

**Die *Arabidopsis thaliana cue1*-Mutante:
Die Bedeutung des Phosphoenolpyruvat/ Phosphat-
Translokators für den Primär- und
Sekundärstoffwechsel**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Lars Voll

aus Neuss/ Holzheim

November 2001

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von November 1998 bis September 2001 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt. Die vorliegende Dissertation ist von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln angenommen worden.

Berichterstatter: Prof. Dr. U.-I. Flügge
Priv.-Doz. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Februar 2002

Scattered muscles twitch -
too late to switch.

Switch (Siouxsie and the Banshees, 1978)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die <i>Arabidopsis thaliana</i> cue-Mutanten	1
1.2.	Das in <i>cue1</i> betroffene Gen ist der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator der inneren Plastidenhüllmembran	2
1.3.	Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) als Mitglied der Phosphat-Translokator-Familie	3
1.4.	Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) der inneren Plastidenhüllmembran	5
1.5.	Die Rolle von PPT und PEP im Metabolismus von C₃-Pflanzen	6
1.5.1.	Die Bildung von PEP im Stoffwechsel von C₃-Pflanzen	6
1.5.2.	Die Rolle von PEP bei der plastidären Fettsäuresynthese	8
1.5.3.	Die Aufgabe von PEP bei der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren	9
1.5.4.	Die anaplerotische Funktion von PEP für die Aminosäurebiosynthese	10
1.5.5.	PEP als Vorstufe für aromatische Aminosäuren und Sekundärmetabolite	11
1.5.6.	Phenylpropane übernehmen verschiedene Funktionen	12
1.5.6.1.	Phenylpropane dienen dem UV-B-Schutz	13
1.5.6.2.	Phenylpropane stellen Gerüstsubstanzen dar	13
1.5.6.3.	Phenylpropane können antioxidative Kapazitäten besitzen	13
1.5.6.4.	Phenylpropane dienen der Pathogenabwehr	14
1.5.6.5.	Phenylpropane modulieren Signalwege	15
1.5.7.	Zusammenfassende Bemerkungen	16
1.6.	Zielsetzung der Arbeit	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Material	19
2.1.1.	Chemikalien	19
2.1.2.	Enzyme	19
2.1.3.	Vektoren	19
2.1.4.	Bakterien- und Hefestämme	20
2.1.4.1.	E. coli	20
2.1.4.2.	A. tumefaciens	20
2.1.4.3.	S. cerevisiae	20

2.1.5.	Pflanzenmaterial	20
2.2.	Methoden	21
2.2.1.	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> HEYN.	21
2.2.1.1.	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis</i>-Saatgut	21
2.2.1.2.	<i>Arabidopsis thaliana</i> Sterilkulturen.	21
2.2.1.3.	EMS-Mutagenese von <i>Arabidopsis</i>-Saatgut	22
2.2.1.4.	Langtag-Wachstumsbedingungen im Gewächshaus	23
2.2.1.5.	Kurztag-Wachstumsbedingungen in der Phytokammer	23
2.2.1.6.	Hydroponische Anzucht	24
2.2.1.7.	Etablierung anaeroben Stresses durch Staunässe	25
2.2.2.	Mikrobiologische Methoden	25
2.2.2.1.	Anzucht und Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.2.2.2.	Anzucht und Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
2.2.2.3.	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.3.1.	Molekularbiologische Standardmethoden	37
2.2.3.2.	Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe	37
2.2.3.3.	Durchsicht von transgenen Pflanzenpopulationen über PCR	38
2.2.3.4.	Präparation von RNA aus Pflanzengewebe	39
2.2.3.5.	Elektrophorese von RNA	40
2.2.3.6.	Photometrische Quantifizierung von RNA	41
2.2.3.7.	Abschätzung von Nukleinsäurekonzentrationen in Agarosegelen	42
2.2.3.8.	RNA-Transfer von Agarosegelen auf Membranen (RNA-Blot)	43
2.2.3.9.	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	43
2.2.3.10.	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden mit RNA-Blots ..	45
2.2.3.11.	Waschen der hybridisierten Nitrozellulosemembranen	45
2.2.3.12.	Anreicherung von mRNA in RNA-Präparationen	46
2.2.3.13.	Synthese radioaktiv markierter cDNA-Sonden	46
2.2.3.14.	Herstellung von Membranen für die Transkriptomanalyse	47
2.2.3.15.	Hybridisierung von Membranen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden	50
2.2.3.16.	Waschen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisierter Membranen	51
2.2.3.17.	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	51

2.2.3.18.	Hybridisierung von Membranen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden	52
2.2.3.19.	Waschen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden hybridisierter Membranen	53
2.2.3.20.	Entfernen der an die Membran gebundenen markierten Oligonukleotide	53
2.2.3.21.	Einlesen von Bildspeicherfolien mit dem <i>PhosphoImager</i>	53
2.2.3.22.	Densitometrische Auswertung der Membranen der Transkriptomanalyse	53
2.2.3.23.	DNA-Sequenzierungen	54
2.2.4.	Biochemische Methoden	56
2.2.4.1.	Auftrennung von Proteinextrakten über SDS-PAGE	56
2.2.4.2.	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau	57
2.2.4.3.	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	57
2.2.4.4.	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen ...	58
2.2.4.5.	Bestimmung von Proteinmengen in Lösungen	59
2.2.5.	Physiologische Methoden	59
2.2.5.1.	Messungen an intakten Pflanzen	59
2.2.5.2.	Präparation physiologisch intakter Chloroplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
2.2.5.3.	Polarographische Bestimmung der physiologischen Intaktheit von Chloroplasten	62
2.2.5.4.	Raumbestimmung plastidärer Subkompartimente durch Silikonölzentrifugation	63
2.2.5.5.	Differenzielle Zentrifugation	64
2.2.5.6.	Polarographische Messungen mit der Blattscheibenelektrode	65
2.2.5.7.	Transportexperimente mit Proteoliposomen	66
2.2.5.8.	Analyse von Kohlenstoffflüssen im Primärstoffwechsel	69
2.2.5.9.	Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Kationen	71
2.2.5.10.	Enzymatische Synthese von [¹⁴C]-PEP aus [¹⁴C]-Pyruvat	73
2.2.5.11.	Enzymaktivitätsbestimmungen aus Blattextrakten	75
2.2.5.12.	Perchlorsäureextraktion von Blattmaterial	82
2.2.5.13.	Bestimmung des Malatgehaltes in Perchlorsäureextrakten	83

2.2.5.14.	Bestimmung des Gesamtaminosäuregehaltes in Perchlorsäureextrakten	84
2.2.5.15.	Bestimmung der Gehalte an Pyruvat und PEP in Perchlorsäureextrakten	85
2.2.5.16.	Bestimmung der Triosephosphat- und Fruktose-1,6-bisphosphatgehalte in Perchlorsäureextrakten	86
2.2.5.17.	Bestimmung von 3-Phosphoglycerat-Gehalten in Perchlorsäureextrakten	87
2.2.5.18.	Bestimmung von Glukonsäure-6 phosphat- und Hexosephosphatgehalten in Perchlorsäureextrakten	88
2.2.5.19.	Bestimmung der Gehalte an freiem P_a in Perchlorsäureextrakten	89
2.2.5.20.	Bestimmung von Polyamingehalten in Perchlorsäureextrakten über HPLC	89
2.2.5.21.	Bestimmung der Stärkegehalte in Blattproben	90
2.2.5.22.	Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blattproben	91
2.2.5.23.	Wäßrige Extraktion von Blattmaterial	91
2.2.5.24.	Bestimmung von Aminosäuregehalten in wäßrigen Extrakten über HPLC	92
2.2.5.25.	Bestimmung des Phosphorylierungsgrades transitorischer Stärke	92
2.2.5.26.	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Lösungen	93
2.2.6.	Untersuchung des Sekundärmetabolismus	94
2.2.6.1.	Methanolische Extraktion von Pflanzengewebe	94
2.2.6.2.	Auftrennung phenolischer UV-B-absorbierender Metabolite per HPLC	94
2.2.6.3.	Auftrennung phenolischer Substanzen über Dünnschichtchromatographie	95
2.2.6.4.	Untersuchung des Kohlenstoffflusses in Sekundärmetabolite	96
2.2.6.5.	Histologische Lokalisierung von Sekundärmetaboliten	97
2.2.6.6.	Messung des Anthocyangehaltes in Blattproben	97
2.2.6.7.	Photometrische Messung von UV-Schutzsubstanzen	97
3.	Ergebnisse	99
3.1.	Komplementation des <i>cue1</i>-Phänotyps durch <i>metabolic engineering</i>	100
3.1.1.	Überexpression des PPT aus <i>Brassica oleracea</i> in <i>cue1-6</i>	100
3.1.2.	Überexpression der <i>F. trinervia</i> PPK in <i>cue1-6</i>	102

3.1.2.1.	Subzelluläre Lokalisation der <i>Flaveria trinervia</i>-PPDK-Aktivität	104
3.1.2.2.	Einige <i>cueI-6</i>/PPDK-Transformanden zeigen den retikulierten <i>cueI-</i>Blattphänotyp nach dem Pikieren auf Erde	105
3.1.3.	Überexpression von <i>F. trinervia</i> PPDK im Wildtyp (Col-0)	106
3.1.4.	Kreuzungen zwischen <i>cueI-6</i>/PPDK und <i>cueI-6</i>/PPT-Pflanzen	107
3.1.5.	Chemische Mutagenese von <i>cueI</i>-Populationen mit EMS	108
3.2.	Anmerkung zur Vergleichbarkeit der erhobenen Daten aus den unterschiedlichen <i>cueI</i>-Mutanten	109
3.3.	Wachstumscharakteristika der untersuchten Linien	109
3.4.	Stoffwechselphysiologische Untersuchungen	112
3.4.1.	Charakterisierung der Photosynthese unter Starklicht	112
3.4.2.	Bestimmung subplastidärer Räume	116
3.5.	Analyse des Primärmetabolismus	117
3.5.1.	Untersuchungen von Kohlenstoffflüssen durch Primärmetabolite	117
3.5.2.	Tageszeitlicher Verlauf der Blattkohlenhydratgehalte	120
3.5.3.	Untersuchungen des Stärkephosphorylierungsgrades als Indikator für die R1-Bindung	125
3.5.4.	Metabolitgehalte in Blattproben	126
3.5.4.1.	Hexosephosphatgehalte in Blattproben	130
3.5.4.2.	Gehalte von Calvin-Zyklus-Intermediaten in Blattproben	130
3.5.4.3.	Gehalte an Pyruvat und PEP in Blattproben	131
3.5.4.4.	Phosphatgehalte in Blattproben	134
3.5.5.	Aminosäureprofile in Blattproben	134
3.5.6.	Polyamingehalte in Blattproben	140
3.5.7.	Bestimmung von Enzymaktivitäten des Primärstoffwechsels	141
3.6.	Analyse ausgesuchter Sekundärmetabolite	144
3.6.1.	Bestimmung von Profilen der UV-Schutzsubstanzen	144
3.6.2.	Charakterisierung der UV-Schutzsubstanzen	147
3.6.3.	Kohlenstoffflüsse in Sekundärmetabolite mit UV-Schutzwirkung und deren Gehalte	147
3.6.4.	Histologische Lokalisierung von UV-Schutzsubstanzen	153
3.6.4.1.	Histologische Untersuchungen an Blattschnitten	154
3.6.4.2.	Histologische Untersuchungen an Infloreszenzachsen	159
3.6.5.	Vergleich der durch Staunässe induzierbaren Anthocyan synthese	163

3.7.	Transkriptomanalysen	166
4.	Diskussion	171
4.1.	Das Stoffwechselgeschehen in <i>cueI</i>-Mutanten	171
4.1.1.	Wichtige Fakten über die <i>cueI</i>-Mutanten	171
4.1.2.	Vorbemerkung zur Vergleichbarkeit der untersuchten <i>cueI</i>-Allele	172
4.1.3.	Auswirkungen der Mutation auf die Photosynthese in <i>cueI</i>-Mutanten	172
4.1.4.	Auswirkungen der <i>ppt</i>-Mutation auf den Primärmetabolismus im Blatt ..	173
4.1.4.1.	Effekte auf die Akkumulation von Saccharose, transitorische Stärke und den Calvin-Zyklus	173
4.1.4.2.	Effekte auf die Gehalte reduzierender Zucker	177
4.1.4.3.	Effekte auf den Pflanzenwuchs	177
4.1.4.4.	Effekte auf die Gehalte von PEP und Pyruvat	178
4.1.4.5.	Effekte auf die Gehalte an freien Aminosäuren	180
4.1.5.	Veränderungen des Sekundärstoffwechsels in den <i>cueI</i>-Mutanten	182
4.1.5.1.	Gehalte und Muster an UV-Schutzsubstanzen	182
4.1.5.2.	Vergleichende histologische Lokalisierung von Flavonoiden und Zimtsäurederivaten mit potentieller UV-Schutzfunktion in Blättern	184
4.1.5.3.	Die Beeinträchtigung der Anthocyanakkumulation in <i>cueI</i>-Mutanten	185
4.2.	Einfluß der in <i>cueI</i>-Mutanten exprimierten Transgene auf den Metabolismus	186
4.2.1.	Überblick über die Komplementationsstrategien	186
4.2.2.	Die Auswirkung der phänotypischen Komplementation der <i>cueI</i>-Mutanten durch verschiedene Transgene auf den Primärmetabolismus	188
4.2.2.1.	Auswirkungen auf Wachstumscharakteristika	188
4.2.2.2.	Auswirkungen der PPDK-Überexpression auf Photosyntheseeigenschaften und den Calvin-Zyklus von <i>cueI-6</i>/PPDK-Komplementanden	189
4.2.2.3.	Der Stoffwechsel von Pyruvat und PEP in den <i>cueI-6</i>/PPDK-Pflanzen	192
4.2.2.4.	Veränderungen von ausgesuchten Enzymaktivitäten des Primärstoffwechsels in <i>cueI-6</i>/PPDK	194
4.2.2.5.	Der Einfluß der PPDK-Überexpression auf den Kohlenhydratstoffwechsel in Blättern von <i>cueI-6</i>/PPDK- und <i>cueI-6</i>/PPT-Pflanzen ..	195

4.2.2.6.	Veränderungen des Aminosäurestoffwechsels in <i>cueI-6</i>/PPDK- und <i>cueI-6</i>/PPT-Komplementanden	196
4.2.2.7.	Ist die Subkompartimentierung in <i>cueI-6</i>/PPDK-Chloroplasten verändert?	197
4.2.3.	Der Phenylpropanstoffwechsel der komplementierten <i>cueI</i>-Mutanten	198
4.3.	Eingrenzung möglicher Ursachen des retikulierten <i>cueI</i>-Blattphänotyps	200
4.3.1.	Die Rolle der Chloroplastenentwicklung für die Entwicklung des Blattes	200
4.3.2.	Mögliche Ursachen des <i>cueI</i>-Phänotyps	202
4.3.3.	Inwieweit können zelltypspezifische Effekte für das Auftreten des retikulierten Blattphänotyps in den <i>cueI</i>-Mutanten verantwortlich sein? ..	205
5.	Zusammenfassung	207
6.	Abkürzungsverzeichnis	209
7.	Literaturverzeichnis	215
8.	Anhang	245
8.1.	Für die Transkriptomanalyse eingesetzte EST-Stammkulturen des ABRC	245
8.2.	Sequenzen verwendeter Oligonukleotide	248
8.3.	GenBank-Annotationen der cDNA-Sequenzen der bearbeiteten Gene	249
8.4.	Übersicht über Metabolitgehalte weiterer Tageszeitpunkte	250

1. Einleitung

Über die Photosynthese sind Pflanzen befähigt, Lichtenergie in chemische Energie umzuwandeln und diese zu speichern, um damit die Assimilation anorganischer Substanz zu betreiben. Licht ist daher der wichtigste abiotische Faktor für Pflanzen.

Pflanzen müssen nicht nur während des Wachstums ihren Photosyntheseapparat den Lichtverhältnissen anpassen (Horton, 1987, Demming-Adams und Adams, 1992), sondern auch der restliche pflanzliche Stoffwechsel wird maßgeblich durch die Verfügbarkeit von chemisch in Reduktionsäquivalenten, ATP oder organischen Verbindungen fixierter Lichtenergie reguliert (Buchanan, 1984; Scheibe, 1994; Krapp et al., 1991, Sheen, 1990). Darüberhinaus spielt Licht auch eine grundlegende Rolle in der pflanzlichen Entwicklung (Chory und Susek, 1994).

1.1. Die *Arabidopsis thaliana cue*-Mutanten

Zu Beginn der 90er Jahre wurde in der Arbeitsgruppe von J. Chory (Salk Institute, La Jolla, USA) nach Mutanten gesucht, bei denen die lichtabhängige Regulation kernkodierter Gene gestört ist. Zu diesem Zweck wurde die mangelnde De-Repression des Chlorophyll a/b-bindenden Protein 3 (CAB3)-Promotors bei der De-Etiolierung (Ergrünung) anhand von transgenen Pflanzen mit einem binären Reportergenkonstrukt untersucht (Li et al., 1995; López-Juez, 1998). Bislang sind neun verschiedene *cue*-Mutanten aus *A. thaliana* bekannt, wobei das Kürzel *cue* für *chlorophyll a/b binding protein (CAB) underexpressed* steht. Das Chlorophyll a/b bindende Protein 3 (CAB3), auch CAB180 (Leutwiler et al., 1986) bzw. Lhcb1*2 (Jansson et al., 1992) genannt, ist der Hauptbestandteil der Photosyntheseantenne (Leutwiler et al., 1986). Die Expression des CAB muß bei der De-Etiolierung nicht notwendigerweise mit der Ergrünung der Plastiden einhergehen (López-Juez et al., 1998) und korreliert nicht unbedingt mit der Expression anderer lichtregulierter Gene wie dem Lichtsammelkomplex-Protein LHCP (Zhang et al., 1992).

Drei verschiedene Ursachen kommen für die mangelnde Induktion des CAB-Promotors bei Belichtung in Betracht (López-Juez et al., 1998). Die fehlerhafte CAB-Expression kann entweder (1) durch eine defizitäre Transduktion lichtabhängiger Signale, (2) durch die Störung eines lichtunabhängigen Signalweges oder (3) durch eine Blockade der Plastidenentwicklung bedingt werden, die ebenfalls einen Einfluß auf die Genexpression im Kern hat (Oelmüller et al., 1986; Mayfield, 1990). Dabei scheinen sowohl die Integrität des plastidären Transkriptionsapparates (Rapp und Mullet, 1991), eine aktive plastidäre

Genexpression (Sullivan und Gray, 1999) als auch die korrekte Subkompartimentierung von Schlüsselmetaboliten (Møller et al., 2001) wichtige Faktoren zu sein. Für einige der *cue*-Mutanten, die allelisch zu den schon bekannten Mutanten *hyl* und *phyB* (Fankhauser und Chory, 1997) des Rotlichtrezeptors Phytochrom (Quail et al., 1995) sind, gilt die erste der genannten Alternativen. Mit Ausnahme von *cue6* ist die CAB-Expression bei den restlichen *cue*-Mutanten schon in etiolierten Pflanzen geringer als im Wildtyp und läßt sich darüberhinaus schlechter durch Rotlicht induzieren als in Kontrollpflanzen (Li et al., 1995; López-Juez et al., 1998). Dies deutet auf die gemeinsame Steuerung des CAB-Promotors durch Phytochrom und die Plastidenentwicklung hin (López-Juez et al., 1998). Zu dieser Klasse von *cue*-Mutanten zählt auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *cue1*-Mutante (Li et al., 1995).

1.2. Das in *cue1* betroffene Gen ist der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator der inneren Plastidenhüllmembran

Die ersten beiden *cue1*-Allele (für *chlorophyll a/b binding protein (CAB) underexpressed*) wurden bei der Suche nach *A. thaliana*-Mutanten gefunden, die den Promotor des CAB3-Gens bei längerer Belichtung nicht dereprimieren (Li et al., 1995). Abgesehen von der Aktivität des CAB-Promotors ist auch die Transkription anderer lichtregulierter Proteine wie die des plastomkodierten D1, der katalytischen Untereinheit des Photosystems II, oder die der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) in *cue1*-Mutanten gegenüber Kontrollpflanzen verringert (Li et al., 1995). Transkripte der über den Blaulichtrezeptor Cryptochrom (Ahmad und Cashmore, 1993) und den Rotlichtrezeptor Phytochrom regulierten Chalkonsynthase (Chory und Peto, 1990), dem Schlüsselenzym des Flavonoidstoffwechsels, akkumulieren dagegen in gleicher Weise wie in Kontrollpflanzen (Li et al., 1995).

Die *cue1*-Mutanten weisen einen retikulierten Blattphänotyp auf (s. Abb. 1.1), bei dem die Bereiche um das Leitgewebe dunkelgrün und der Rest der Lamina hellgrün gefärbt ist (Li et al., 1995). Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß der Anteil des Palisadenparenchyms am Blattquerschnitt in *cue1*-Mutanten zugunsten des Interzellularraumes und der Bündelscheidenzellen gegenüber den Kontrollpflanzen verringert ist (Streatfield et al., 1999). Weiterhin sind *cue1*-Mesophyllchloroplasten, nicht aber die Bündelscheidenchloroplasten, im Vergleich zu Kontrollpflanzen kleiner (Streatfield et al., 1999). Die Retardierung in der Plastidenentwicklung der Mesophyllzellen kann als Hauptursache für die veränderte Blattmorphologie in *cue1*

betrachtet werden, da die Teilungsrate und Größenzunahme der Mesophyllzellen vermutlich durch ein von den Plastiden ausgehendes Kontrollsignal verringert wird (Li et al., 1995; López-Juez et al., 1998; Kinsman und Pyke, 1998). Mittlerweile sind acht verschiedene, voneinander unabhängige *cue1*-Allele bekannt, die über verschiedene Mutagenesestrategien gewonnen wurden (Streatfield et al., 1999).

Anhand der kosegregierenden T-DNA-Insertion in *cue1-8* konnte das in den *cue1*-Mutanten betroffene Gen identifiziert und der Nachweis geführt werden, daß die bislang isolierten *cue1*-Mutanten allelisch sind (Streatfield et al., 1999). Überraschenderweise kodierte das betroffene Gen für einen Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator der inneren plastidären Hüllmembran (Streatfield et al., 1999) und nicht, wie eher zu erwarten war, für einen Transkriptionsfaktor oder eine Komponente zellulärer Signaltransduktionswege.

Bislang sind erst zwei Gene bekannt, deren Funktionsverlust Transportprozesse beeinträchtigt, gleichzeitig in die Kommunikation zwischen Kern und Plastid eingreift und die Plastidenentwicklung stört (Provencher et al., 2001; Møller et al., 2001). In Mais (*Zea mays* L.) *sucrose export defective1 (sxd1)*-Mutanten ist das defekte Genprodukt ein hydrophiles, stromalokalisiertes Protein noch unbekannter Funktion, das in den Mutanten den Verschuß der Stomata und somit mangelnden Saccharoseexport aus den Blättern hervorruft (Provencher et al., 2001). Als Folge akkumulieren die *sxd1*-Mutanten derart viel Stärke in den Chloroplasten, daß die diese das gesamte Zellumen ausfüllen (Provencher et al., 2001). Das Genprodukt der *A. thaliana long after far red6 (laf6)*-Mutante ist ein *ATP-binding cassette (ABC)* Protein, das in den Transport von Protoporphyrin IX von der inneren Plastidenhüllmembran in die Thylakoide involviert ist (Møller et al., 2001).

1.3. Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) als Mitglied der Phosphat-Translokator-Familie

Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (Fischer et al., 1997) gehört zur Phosphat-Translokator-Familie (PT), die in Samenpflanzen noch drei weitere, bisher identifizierte Mitglieder aufweist; den Triosephosphat/Phosphat-Translokator (Flügge et al., 1989), den Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator (Kammerer et al., 1998) und den Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator (Eicks et al., 2002).



Abb. 1.1 Der retikulierte Blattphänotyp der *cue1*-Mutanten

Die Phosphat-Translokatoren (PTs) weisen eine identische molekulare Architektur mit ca. sechs Transmembranhelices auf (Flügge, 1998), haben untereinander eine Homologie von 30% bis 40 % auf Proteinebene und teilen einen K_m -Wert für anorganisches Phosphat (P_a) im sub-millimolaren Bereich (Kammerer et al., 1998; Fischer et al., 1997; Eicks et al., 2002). Die PTs sind kernkodiert und tragen plastidenspezifische Importsequenzen (z.B. Kammerer et al., 1998), die bei der posttranslationalen Insertion in die innere plastidäre Hüllmembran durch den plastidären Importapparat (May und Soll, 1999) abgespalten wird. Die prozessierten PTs haben ein Molekulargewicht von 30 bis 40 kDa (z.B. Kammerer et al., 1998). Die enzymatisch aktive Form des Triosephosphat/Phosphat-Translokators (TPT) ist ein Homodimer (Flügge, 1998), so daß dies aufgrund der architektonischen Homologie auch für die anderen Mitglieder der PT-Familie angenommen werden kann. Die Relevanz der Phosphattranslokatoren für die Aufrechterhaltung von Stoffwechselflüssen wird durch Untersuchungen an *Mesembryanthemum cristallinum* unterstrichen, wo PPT und GPT während des CAM-Syndroms induziert und den Stoffwechselflüssen entsprechend diurnal reguliert werden (Häusler et al., 2000) – der Phosphoenolpyruvat/ Phosphat-Translokator (PPT) exportiert dabei das während der Lichtperiode über die Pyruvat, P_a -Dikinase (PPDK) gebildete Phosphoenolpyruvat aus dem Plastiden, wohingegen der Glukose-6-phosphat/ Phosphat-Translokator (GPT) den Import von Glukose-6-phosphat (Glk6P) für die Stärkesynthese bewerkstelligt (Häusler et al., 2000).

Jedem Mitglied der PT-Familie kann anhand seines Substratspektrums und seines Expressionsmusters eine bestimmte physiologische Aufgabe zugewiesen werden.

Der TPT ist ausschließlich in grünen Geweben exprimiert (Schulz et al., 1993) und ist das dominierende Protein der inneren plastidären Hüllmembran (Flügge et al., 1991). Er gewährleistet unter physiologischen Bedingungen den Export von Assimilaten in Form von TrioseP aus dem Chloroplasten ins Zytosol (Fliege et al., 1978; Flügge und Heldt, 1984). Als Gegentauschsubstrate kommen unter physiologischen Bedingungen P_a oder 3-Phosphoglycerat (3-PGA) in Frage, durch die die Phosphatbilanz der Chloroplasten ausgeglichen wird.

Der GPT wird vornehmlich in heterotrophen, nicht-grünen Geweben exprimiert, die auf die Bereitstellung organischer Verbindungen aus den autotrophen Organen der Pflanze angewiesen sind (Kammerer et al., 1998). Seine physiologische Rolle ist dort, Glk6P aus der Saccharose-Spaltung vom Zytosol ins Stroma als Substrat für die amyloplastidäre Stärkesynthese zu importieren (Kammerer et al., 1998). ADP-Glukose (Thorbjørnsen et al., 1996; Möhlmann et al., 1997) und Glukose-1-phosphat (Glk1P), die die Stärkebiosynthese in einigen Studien betreiben konnten (Tetlow et al., 1996, Naem et al., 1997, Schünemann und Borchert, 1994), werden nicht vom GPT transportiert (Kammerer et al., 1998).

Die Substratpräferenzen des in allen Geweben exprimierten Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokators (XPT) beschränken sich neben P_a auf Ketopentosephosphate und Triosephosphate (Eicks et al., 2002). Der XPT wird als Verbindungsweg und Kommunikationsschnittstelle zwischen den zytosolischen und plastidären Pentosephosphatwegen gesehen (Eicks et al., 2002), da der nicht-oxidative Teil des oxidativen Pentosephosphat-Zyklus (OPPP) in den meisten bislang untersuchten Angiospermen ausschließlich im Stroma lokalisiert ist (Heber et al., 1967; Schnarrenberger et al., 1973; Schnarrenberger et al., 1995).

1.4. Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT) der inneren Plastidenhüllmembran

Die Kenntnisse über das organ- und gewebespezifische Expressionsmuster des PPT und über seine Transporteigenschaften sind noch lückenhaft. Die vorhandenen Daten aus mehreren höheren Pflanzen fügen sich aber in ein eindeutiges Bild.

Die meisten bislang untersuchten Angiospermen, darunter auch *A. thaliana*, weisen zwei PPT-Gene auf (Fischer et al., 1997), deren Funktionalität teilweise noch geklärt werden muß. Für Tabak (Voll, unveröffentlicht) und *A. thaliana* (Knappe, unveröffentlicht)

existieren vorläufige Daten über die Transkriptmengen der jeweiligen PPT-Isoformen in verschiedenen Geweben. Demnach finden sich PPT-Genprodukte in allen Organen der Pflanzen, wobei sich die Transkriptionsmuster der jeweiligen PPT-Isoformen unterscheiden. In Tabak (*Nicotiana tabacum*) und *A. thaliana* ist die Gesamtmenge der PPT-Transkripte in heterotrophen oberirdischen Organen wie Blüten und *sink*-Blättern (Voll, unveröffentlicht; Knappe, unveröffentlicht) am größten, in *A. thaliana* ist eine PPT-Isoform auch stark in Wurzeln exprimiert (Knappe, unveröffentlicht). In Chloroplasten ist der Anteil des PPT an der Proteinmenge im Vergleich zum TPT verschwindend gering (Fischer et al., 1997); auch in heterotrophen Geweben ist PPT-mRNA nur durch sensitive Methoden wie RT-PCR nachweisbar (Voll, 1998; Knappe, unveröffentlicht).

Der rekombinante, affinitätsgereinigte PPT aus Blumenkohlinfloreszenzen weist nach der Rekonstitution in Proteoliposomen die höchsten Transportraten für anorganisches Phosphat, PEP und 2-PGA auf (Fischer et al., 1997). Hexosephosphate werden vom PPT nicht, TrioseP nur in geringem Ausmaß transportiert (Fischer et al., 1997); die Transporteigenschaften des PPT für Pentosephosphate wurden nicht untersucht. Der apparente K_m -Wert für Phosphat von 0,8 mM und der apparente K_i -Wert von PEP auf den P_a -Transport von 0,3 mM weisen darauf hin, daß diese beiden Substrate unter physiologischen Bedingungen die hauptsächlichen Transportsubstrate darstellen (Fischer et al., 1997). Aufgrund des apparenten K_i -Wertes von 5,7 mM für 2-PGA gegenüber P_a scheidet dieser Metabolit als potentiell Substrat für den PPT aus. Daher transportiert der PPT unter physiologischen Bedingungen nur PEP und P_a .

Die Substratspezifitäten von PPTs aus anderen Pflanzenarten sind noch nicht untersucht worden, können aber anhand der bestehenden Homologieverhältnisse als prinzipiell ähnlich vorausgesetzt werden.

1.5. Die Rolle von PPT und PEP im Metabolismus von C_3 -Pflanzen

1.5.1. Die Bildung von PEP im Stoffwechsel von C_3 -Pflanzen

Phosphoenolpyruvat (PEP) ist ein in Pflanzenzellen vergleichsweise gering konzentriertes (Savada et al., 1999; Scheible et al., 2000), energiereiches phosphoryliertes Intermediat (Jencks, 1970) des Primärstoffwechsels, das in Pflanzen über drei verschiedene Enzymaktivitäten produziert werden kann. Zwei dieser drei Enzyme, die PEP-Carboxykinase (PEPCK, EC 4.1.1.39) und die Pyruvat, P_a -Dikinase (PPDK, EC 2.7.9.1), spielen in C_3 -Pflanzen eine untergeordnete Rolle bei der Bereitstellung von PEP.

Die PEPCK katalysiert die ATP-abhängige Decarboxylierung von Oxalacetat (OAA) zu PEP, ist ein zytosolisches Enzym (Walker et al., 1999) und in C₃-Pflanzen in höherer Aktivität nur in reproduktivem Gewebe und Trichomen (Chen et al., 2000; Walker et al., 1999) zu finden. PEPCK ist in die Glukoneogenese während der Samenbeladung, während der Fruchtreife und in die Mobilisierung von Speicherfetten während der Samenkeimung, eingebunden (Bahrami et al., 2001; Leegood et al., 1999, Walker et al., 1999).

Die PPDK bildet PEP aus Pyruvat, wobei der γ -Phosphatrest eines ATP auf P_a und der β -Phosphatrest des ATP über einen Histidinrest des Enzyms auf Pyruvat übertragen wird (Carrol et al., 1994). In C₃-Pflanzen ist die PPDK-Aktivität stets, aber nicht immer ausschließlich plastidär lokalisiert (Rosche et al., 1994; Aoyagi und Bassham, 1984; Nomura et al., 2000). Obwohl sich die PPDK-Aktivität sowohl in vegetativem Gewebe (Ishimaru et al., 1997; Ishimaru et al., 1998; Rosche et al., 1994; Aoyagi und Bassham, 1983) als auch in reproduktivem Gewebe (Meyer et al., 1982) von C₃-Pflanzen nachweisen läßt, ist sie vernachlässigbar gering (Ishimaru et al., 1997; Ishimaru et al., 1998). Das gilt auch für *A. thaliana* (Ishimaru et al., 1997). Vermutlich ist die PPDK in vegetativen Geweben von C₃-Pflanzen lediglich in die Rückführung von Kohlenstoffgerüsten von Malat in Stärke während des Stomaschlusses beteiligt (Schnabl, 1981).

Im Metabolismus von C₃-Pflanzen ist die Generierung von PEP aus 2-PGA im Zytosol während der Glykolyse durch die Enolase (Journet und Douce, 1985; Lal et al., 1994) weitaus bedeutender. Die nachfolgende irreversible Umsetzung von PEP zu Pyruvat über die Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40) stellt einen zentralen Schritt bei der Kontrolle des Flusses durch die Glykolyse dar und weist hohe Kontrollkoeffizienten auf die Glykolyserate auf (Plaxton et al., 1993; Thomas et al., 1997). PEP kann im Stroma grüner Plastiden allerdings nicht aus 2-PGA hergestellt werden, da Chloroplasten nach heutigen Erkenntnissen keine vollständige Glykolyse betreiben können, weil die plastidären Enolase- und/oder Phosphoglyceratmutaseaktivitäten unzureichend sind (Borchert et al., 1993; Van der Straeten et al., 1991; Bagge und Larsson, 1986; Journet und Douce, 1985; Stitt und ap Rees, 1979; Miernyk und Dennis, 1992; Schulze-Siebert et al., 1984). Daher ist das Zytosol der einzige Ort in der Pflanzenzelle, an dem PEP in ausreichendem Maße für den Zellstoffwechsel bereitgestellt werden kann. Der PPT stellt demnach die Versorgung des Chloroplasten-Stromas mit PEP durch den Import von PEP aus dem Zytosol sicher (Fischer et al., 1997).

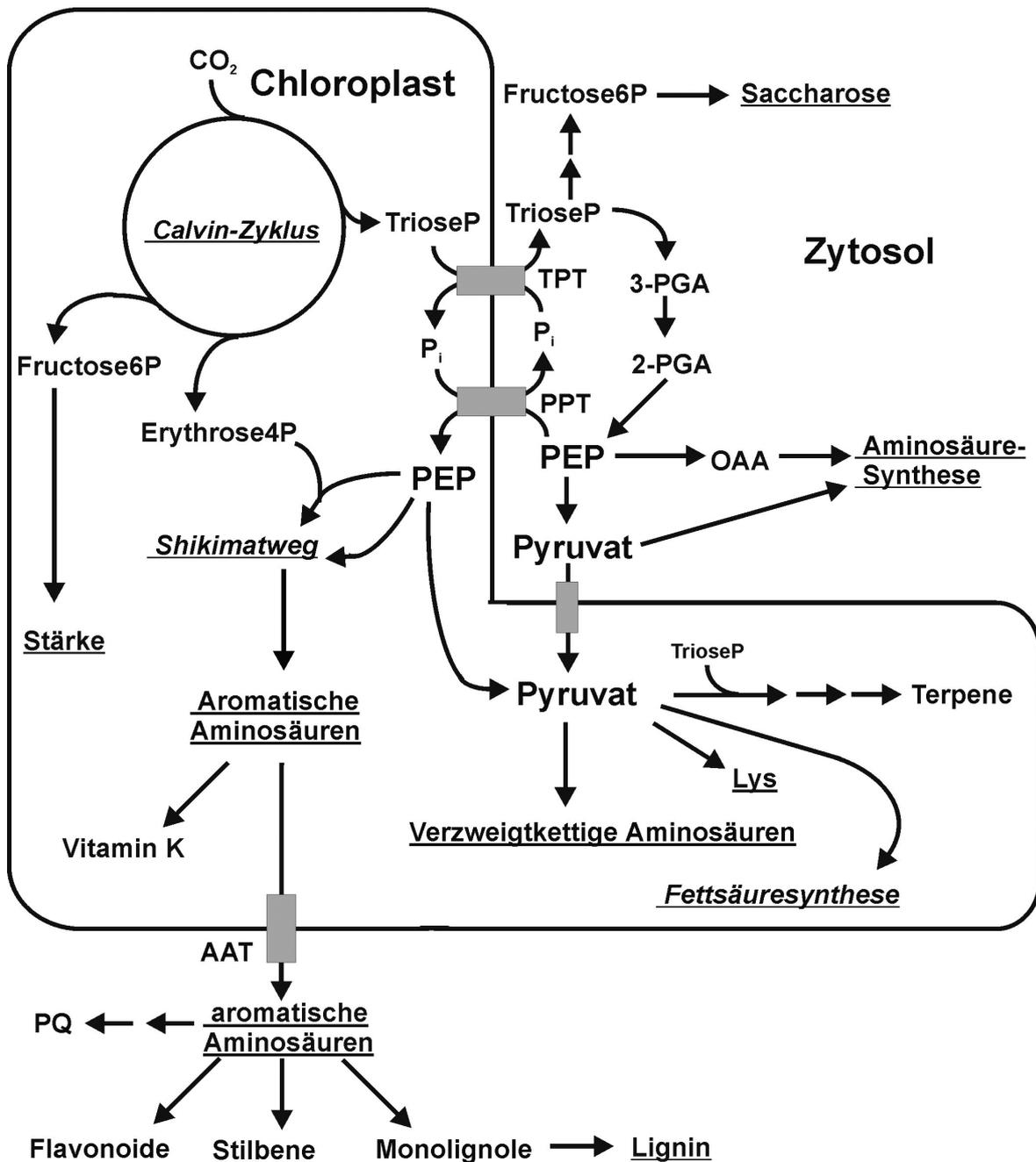


Abb. 1.2 Übersicht über die Rolle von PEP im Metabolismus von C₃-Pflanzen

1.5.2. Die Rolle von PEP bei der plastidären Fettsäuresynthese

Die pflanzliche Fettsäurebiosynthese läuft vorwiegend im Plastiden ab (Moore, 1993). Die Produkte der plastidären Fettsäurebiosynthese werden aus dem Plastiden exportiert und am Endoplasmatischen Retikulum (ER) modifiziert (Moore, 1993). Endprodukte wie Phosphatidylglycerin, Galaktosyldiglyceride, oder Sulfochinovosyldiglycerid sind plastidenspezifisch (Bolton et al., 1978; Harwood, 1979) und eher prokaryotischer Natur, während im Plasmalemma andere Endprodukte vorherrschen (Bolton et al., 1978;

Harwood, 1979). Der störungsfreie Ablauf der plastidären Fettsäurebiosynthese ist wichtig für das Pflanzenwachstum und stellt auch ein Ziel für Herbizide dar (De Prado et al., 2000).

PEP ist in der Lage, die Fettsäuresynthese in isolierten nicht-grünen Plastiden effektiv anzutreiben (Kleinig und Liedvogel, 1980; Qui et al., 1994). Nach dem Import von PEP ins Stroma stehen nach der Umsetzung von PEP über die plastidäre Pyruvatkinase, die sich kinetisch (Sangwan et al., 1992), immunologisch (Plaxton, 1989) und regulatorisch (McHugh et al., 1995) von der zytosolischen Pyruvatkinase unterscheidet, sowohl Pyruvat für den plastidären Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) (Reid et al., 1977; Elias und Givan, 1979; Lenmark und Gardeström, 1994) als auch ATP zur Verfügung. Die benötigten Reduktionsäquivalente werden dabei durch den Umsatz von Hexosephosphaten im OPPP bereitgestellt, die aus dem Stärkeabbau bzw. aus der Spaltung importierter Saccharose rekrutiert werden (Qui et al., 1994; Kang und Rawsthorne, 1995; Fox und Rawsthorne, 2001). In heterotrophen Plastiden ist außerdem eine Speisung der plastidären Fettsäurebiosynthese mit Reduktionsäquivalenten und Kohlenstoffgerüsten durch das plastidäre NADP-Malatenzym möglich (Smith et al., 1992).

In autotrophen Geweben von C_3 -Pflanzen wird die Versorgung der plastidären Fettsäuresynthese mit Pyruvat durch einen direkten Import von Pyruvat (Proudlove und Thurman, 1981) oder über die oxidative Spaltung importierten Malats über das NADP-Malatenzym gewährleistet (Drincovich et al., 1998; Edwards und Andreo, 1992). ATP und die bei der ausschließlichen Verwertung von Pyruvat benötigten Reduktionsäquivalente können dann in der Lichtphase über die Photophosphorylierung bereitgestellt werden. Der limitierende Faktor für die Fettsäurebiosynthese in autotrophen Geweben ist HCO_3^- , um das RubisCO und AcetylCoA-Carboxylase konkurrieren (Schulze-Siebert et al., 1984).

1.5.3. Die Aufgabe von PEP bei der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren

Die verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin (1), Valin (1) und Isoleucin (1,2) leiten sich von Pyruvat (1) und α -Ketobutyrat (2) ab (Bonner und Jensen, 1997).

(1) Pyruvat kann über die oxidative Malatspaltung durch das NADP-Malatenzym aus Malat oder die plastidäre Pyruvatkinase-Reaktion aus PEP abgeleitet werden. Von PEP ist bekannt, daß es in der Lage ist, die stromalokalisierte Synthese (Kaneko et al., 1990; Frisch et al., 1991; Weisemann und Matthews, 1993; Ghislain et al., 1994; Muehlbauer et al., 1995; Samach et al., 1991; Sathasivan et al., 1990) verzweigtkettiger Aminosäuren des Acetolactatweges anzutreiben (Schulze-Siebert et al., 1984).

(2) α -Ketobutyrat wird im Plastiden durch die Deaminierung von Threonin (Samanch et al., 1991) bereitgestellt und unterliegt neben der Produktinhibition durch Isoleucin auch den komplexen Regulationsmechanismen der von Aspartat abgeleiteten Aminosäuren Methionin, Lysin und Threonin (Mifflin und Lea, 1982; Umbarger, 1978; Galili, 1995). Dabei wirken Lysin und das aus Methionin abgeleitete S-Adenosylmethionin regulatorisch antagonistisch zu Threonin – und den Threonin nachgeschalteten verzweigtkettigen Aminosäuren – auf das Aspartatkinase/Homoserin-Dehydrogenase-Tandemenzym am Eingang des gemeinsamen Stoffwechselweges ein (Rognes et al., 1980; Galili, 1995). In *A. thaliana* soll die antagonistische Kontrolle am gemeinsamen Startpunkt durch das Vorhandensein einer für Lysin und Threonin insensitiven Aspartatkinase gelockert sein (Frankard et al., 1997; Heremans und Jacobs, 1995). Eine Akkumulation von verzweigtkettigen Aminosäuren kann trotzdem indirekten Einfluß auf die von Threonin ausgeübte Kontrolle am Eingang des Stoffwechselweges nehmen. Interessanterweise geht Pyruvat auch in die Lysinbiosynthese ein (Galili, 1995), so daß die Bereitstellung des gemeinsamen Substrates Pyruvat synergistisch auf den gesamten zuvor geschilderten Stoffwechselkomplex wirkt.

Somit stellt PEP neben Malat eine wichtige Kontrollinstanz für die Synthese von Aminosäuren der Pyruvat- und Aspartatfamilie dar.

1.5.4. Die anaplerotische Funktion von PEP für die Aminosäurebiosynthese

PEP nimmt im Zytosol eine wichtige Position bei der anaplerotischen Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten für die primäre Aminosäuresynthese ein (Galili, 1995). Über die zytosolische Pyruvatkinase und die ebenfalls zytosolische PEP-Carboxylase (Andrews, 1986, Melzer und O'Leary, 1987) werden Pyruvat und Oxalacetat (OAA) aus PEP gebildet, die nachfolgend in Mitochondrien importiert werden können (Brailsford et al., 1986; Taniguchi und Sugiyama, 1996). Dort stehen Pyruvat - nach der Umsetzung zu AcetylCoA über den PDC - und OAA als Substrate für den Citrat-Zyklus (bzw. Krebs- oder Tricarbonsäurezyklus) bereit, aus dem während der Dunkelperiode Citrat und Malat als Kohlenstoffdonoren für die Ammoniumfixierung entnommen werden können (Scheible et al., 2000). Außerdem können sowohl Pyruvat als auch OAA direkt über Transaminasen in Aminosäuren überführt werden (Reed und Hess, 1975; Rech und Crouzet, 1974; Peeters und Vanlaere, 1994).

1.5.5. PEP als Vorstufe für aromatische Aminosäuren und Sekundärmetabolite

Im Stroma fungiert PEP zusammen mit Erythrose-4-phosphat (Ery4P) aus dem Calvin-Zyklus bzw. dem OPPP (Herrmann et al., 1995; Henkes et al., 2001) als Vorstufe für den Shikimatweg und geht bei der Bildung von 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (Anderson et al., 1990) ein zweites Mal in den Shikimatweg ein, der bis zur Stufe des Chorismats ausschließlich im Stroma abläuft (Schmid und Amrhein, 1995; Herrmann, 1995). Aus Chorismat leiten sich die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan ab (Schmid und Amrhein, 1995). Die Syntheseraten von Phenylalanin und Tyrosin werden über Produktinhibitionsmechanismen auf den Stufen von Chorismatmutase (Schmid und Amrhein, 1995) und Arogenat-Dehydratase (Siehl und Conn, 1988; Byng et al., 1981) koordiniert, während die Tryptophan-Biosynthese auf der Stufe der Anthranilat-Synthase (Belser et al., 1971) reguliert wird.

Die Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) stellt in Dikotyledonen den einzigen, koordiniert und streng regulierten Ausgangspunkt für die Synthese von Phenylpropanen und anderen Sekundärmetaboliten dar (Young et al., 1966; Jangaard, 1974). Sekundärmetabolite decken ein breites Funktionsspektrum ab, das von UV-Protaktantien (Shehan, 1996; Hahlbrock und Grisebach, 1979; Schmelzer et al., 1998) über Festigungssubstanzen (Lewis und Yamamoto, 1990), Signalmodulatoren (Jacobs und Rubery, 1988; Brown et al., 2001; Murphy et al., 2000) und Botenstoffe (Tamagnone et al., 1998b), Strukturelemente von Zellwänden und Cuticulae (Yan und Stark, 2000; Holloway, 1983), Allelopathika (Rusak et al., 1997), Phytoalexine (Kombrink und Somssich, 1995) bis hin zu Antioxidantien (Grace und Logan, 2000) und Redoxpigmenten (Garcia et al., 1999) reicht.

In *A. thaliana* (Ohl et al., 1990; Wanner et al., 1995) und den meisten untersuchten Pflanzenarten (Cramer et al., 1989; Lois et al., 1989; Kawamata et al., 1992; Yamada et al., 1992; Subramaniam et al., 1993; Minami et al., 1989; Lee et al., 1992) befinden sich mehrere PAL-Isoformen, die durch eine Multigenfamilie kodiert werden. Einzelne PAL-Gene werden durch spezifische Stimuli wie Verwundung, Pathogeninfektionen, UV-Streß oder entwicklungspezifisch induziert (Ohl et al., 1990; Lois et al., 1989; Yamada et al., 1992; Liang et al., 1989; Shufflebottom et al., 1993; Diallinas et al., 1994; Hatton et al., 1995) und werden vornehmlich über die Verfügbarkeit des Substrates reguliert (Margna, 1977; Da Cunha, 1987). In Pflanzen mit veränderter PAL-Aktivität kann eine strenge Korrelation zwischen der Akkumulation von Endprodukten aus dem

Phenylpropanstoffwechsel und der PAL-Aktivität festgestellt werden (Elkind et al., 1990; Bate et al., 1994).

Der Phenylpropanstoffwechsel kann in zwei Teilabschnitte gegliedert werden:

(1) In die Biosynthese von Zimtsäurederivate und deren Polymerisierungsprodukte wie Monolignole (Luderitz et al., 1982; Luderitz und Grisebach, 1981), Monolignol-Ester (Schmid und Grisebach, 1982; Linscheid et al., 1980), Lignin (Bao et al., 1993) und hydrolysierbare Tannine (Koornneef, 1990) geht ausschließlich Phenylalanin ein. Diese Endprodukte bestehen nur aus Phenylpropan-Bausteinen. (2) Aktivierte Zimtsäurederivate, CinnamoylCoA-Thioester, stellen gemeinsam mit MalonylCoA-Bausteinen den Ausgangspunkt für den Flavonoidstoffwechsel dar, dessen mannigfaltige Produkte u.a. Flavonoide, Coumarine und kondensierte Tannine umfassen (Graham, 1998; Hahlbrock und Grisebach, 1979; Hahlbrock und Scheel, 1989).

Es gibt Hinweise darauf, daß die enzymatischen Aktivitäten der Substratketten des Phenylpropanstoffwechsels als Multienzymkomplexe am Endoplasmatischen Reticulum organisiert sind (Winkel-Shirley, 1999; Stafford, 1974), die eine flexible und präzise Steuerung der Produkte zulassen. Diese Multienzymkomplexe könnten über verschiedene PAL-Isoformen angesteuert werden die auf unterschiedliche Stimuli ansprechen (Ohl et al., 1990; Lois et al., 1989; Yamada et al., 1992; Liang et al., 1989; Shufflebottom et al., 1993; Diallinas et al., 1994; Hatton et al., 1995).

Außerhalb des Phenylpropanstoffwechsels ist die von Tyrosin ausgehende Plastochinon-Biosynthese ein wichtiger dem Shikimatweg nachgeschalter Stoffwechselweg (Garcia et al., 1999).

Der Fluß über den Shikimatweg kann bis zu 20 bis 50% des fixierten Kohlenstoffs ausmachen (Haslam, 1993), so daß eine unzureichende Versorgung von Plastiden mit PEP durch den PPT einen nachhaltigen negativen Einfluß auf die Gehalte aromatischer Aminosäuren und somit auch auf das gesamte Spektrum der zuvor genannten und im folgenden funktional beschriebenen Sekundärmetabolite nach sich ziehen sollte. Interessanterweise kann der retikulierte *cuel*-Blattphänotyp durch die Fütterung von aromatischen Aminosäuren in Sterilkulturen kompensiert werden (Streatfield et al., 1999).

1.5.6. Phenylpropane übernehmen verschiedene Funktionen

Die Aufgaben von Phenylpropanen in der Pflanze sind divers und in allen Pflanzenorganen von Bedeutung.

1.5.6.1. Phenylpropane dienen dem UV-B-Schutz

Epidermal lokalisierte Flavonolglykoside, in *A. thaliana* vornehmlich Kaempferol- und Quercetin-Derivate (Veit und Pauli, 1999), dienen dem Schutz vor UV-B-Strahlen (Lois und Buchanan, 1994). Außerdem sind einige Isoformen von Enzymen der Phenylpropanbiosynthese wie PAL und p-CoumaroylCoA-Ligase (4CL) UV-induzierbar (Kreuzaler et al., 1983; Reinold et al., 1983; Logemann et al., 1995; Schmelzer et al., 1988; Schulze-Lefert et al., 1989), so daß der Bedarf an UV-Schutzsubstanzen unter UV-Streß angepasst werden kann. Neben den zuvor genannten Flavonolen Kaempferol und Quercetin spielen einfache Phenylpropane wie Sinapin (Sinapoylcholin), Sinapoylmalat oder Sinapoylglukose auch eine wichtige Rolle bei der Absorption schädlicher UV-B-Strahlen in *A. thaliana* (Shehan, 1996; Chapple et al., 1992).

1.5.6.2. Phenylpropane stellen Gerüstsubstanzen dar

In die Lignin- und Suberinbiosynthese gehen die Cinnamyl-Alkohole p-Coumarylalkohol, Sinapylalkohol und Coniferylalkohol als Monolignolbausteine ein (Lewis und Yamamoto, 1990; Holloway, 1983). Monolignole sind einfache Phenylpropane. Beide Polymere, Lignin und Suberin, werden in sekundäre und tertiäre Zellwände inkrustiert (Lewis und Yamamoto, 1990; Holloway, 1983). Lignin dient der Festigung des Xylems, wird aber auch bei der Verwundung von Gewebe verstärkt produziert (Schmelzer et al., 1989); Suberin kommt z.B. im Caspary'schen Streifen der Wurzelendodermis oder in den Bündelscheidenzellen von C₄-Pflanzen als Permeabilitätsbarriere vor.

1.5.6.3. Phenylpropane können antioxidative Kapazitäten besitzen

Untersuchungen an der in Nordamerika beheimateten *Mahonia repens* haben gezeigt, daß Chlorogensäure (CGA), ein Kondensat aus Chinon und Kaffeesäure, ein effektives Antioxidans darstellt und unter oxidativem Streß vermehrt synthetisiert wird (Grace und Logan, 2000). Chlorogensäure macht in *M. repens* mehr als 90% der Phenylpropanmenge aus (Grace et al., 1998) und ist in vielen Dikotyledonen wie Tabak (Tamagnone et al., 1998; Maher et al., 1994), Kartoffel (Yao et al., 1995), Sonnenblume (Koeppel et al., 1976), Karotte (Kühnl et al., 1987) und Paprika (Diaz et al., 1997) beschrieben worden, die ein breites Spektrum an Pflanzenfamilien abdecken. Bislang sind jedoch noch keine signifikanten Mengen an CGA in *A. thaliana* gefunden worden.

In *Arabidopsis* könnten Anthocyane diese Rolle übernehmen, denen ebenfalls antioxidative Fähigkeiten zugeschrieben werden (Yamasaki et al., 1996) und die z.B. bei Salzstreß in

Blättern von *A. thaliana* akkumulieren (Piao et al., 2001). Außerdem haben auch Kaempferol- und Quercetin-Aglyka antioxidatives Potential (Yamasaki et al., 1997). Der Großteil der Anthocyane und Flavonole liegt in der adulten Pflanze als Glykosid in der Vakuole vor. Es fragt sich daher, wie der Kontakt zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die vornehmlich im Chloroplasten durch die Mehler-Reaktion am Photosystem I entstehen (Mehler, 1951), und den vakuolär lokalisierten Anthocyanen und Flavonolen (Lu et al., 1997; Debeaujon et al., 2000) – soweit diese glykosyliert sind - in der Pflanzenzelle zustande kommt.

1.5.6.4. Phenylpropane dienen der Pathogenabwehr

Pflanzen können durch mannigfaltige Pathogene befallen werden. Dazu zählen Viren, bio- und nekrotrophe Pilze, Bakterien und Fraßfeinde.

Quercetin und Quercetinderivate (French und Towers, 1992; French et al., 1991; Rusak et al., 1997), werden von Solanaceen zum Schutz vor Vireninfektionen synthetisiert. Sie hemmen die für die Infektion notwendige virale Reverse Transkriptase (Spedding et al., 1989; Ono et al., 1990).

In der Verteidigung gegen vorwiegend pilzliche Pathogene produzieren Pflanzen Toxine, die aufgrund ihres pflanzlichen Ursprungs Phytoalexine genannt werden (Müller und Börger, 1941). Phytoalexine decken biochemisch gesehen viele Substanzklassen ab. Neben Terpenen wie Rishitin finden sich vor allem auch Phenylpropane unter den Phytoalexinen. Einfache Phenole (Benzoessäure - Svinburne, 1973; Franich et al., 1986), Coumarine (Scopoletin, Harborne und Ingham, 1978), Stilbene (Resveratol, Harborne und Ingham, 1978), Isoflavone (Pisatin – Robeson und Harborne, 1980; O'Neill et al., 1983; Schröder et al., 1979) und hydroxylierte Flavane (Harborne und Ingham, 1978) sind nur einige Beispiele für die Vielfalt von Phenylpropan-Phytoalexinen. Jede Pflanzenfamilie produziert vorwiegend eine Substanzklasse an Phytoalexinen mit zumeist einer Hauptkomponente (Harborne, 1977). Außerdem sind Flavonoide bei der Etablierung der systemischen Antwort (*systemic acquired resistance*, SAR) der Pflanze auf das Pathogen beteiligt (Graham, 1995).

In *A. thaliana* scheinen aus dem Phenylpropanstoffwechsel abgeleitete Phytoalexine jedoch keine Rolle zu spielen (Hagemeier et al., 2001).

Flavonoiden wie Quercetin, Isorhamnetin und Hesperidin ist auch eine Funktion bei der Abwehr von Fraßfeinden zugeschrieben worden (Tringali et al., 2001; Lattanzio et al., 2000).

1.5.6.5. Phenylpropane modulieren Signalwege

Das Pflanzenwachstum wird maßgeblich durch Phytohormone reguliert. Dies sind Substanzen, die per Definition von der Pflanze selbst gebildet werden, ihre Wirkung aber vorwiegend abseits ihres Synthesortes ausüben. Bislang ist bekannt, daß Produkte des Phenylpropanstoffwechsels in die Signalwege zweier der sechs bekannten Phytohormone, Auxin und Cytokinin, eingreifen.

Die Inhibition des Lateralwurzelswachstums ist eine von vielen Funktionen von Auxin (Indoleessigsäure, IAA) in der Pflanze. Auxin wird in der Wurzel über polaren Transport durch den Symplasten von Zelle zu Zelle geleitet (Goldsmith, 1977; Bennett et al., 1998), wobei der Import- und der Export von Auxin über verschiedene Transportproteine vermittelt werden (Bennett et al., 1996; Chen et al., 1998; Gälweiler et al., 1998; Luschnig et al., 1998; Müller et al., 1998; Utsuno et al., 1998; Marchant et al., 1999). Die Flavonole Quercetin und Kaempferol binden an ein Membranprotein, das nach der Bindung der Flavonole den Auxin-Effluxtransporter inhibiert (Jacobs und Rubery, 1988).

Quercetin und Kaempferol sind in keimenden *A. thaliana* vor allem im Hypokotyl und in der Wurzelspitze zu finden (Peer et al., 2001; Murphy et al., 2000). In *A. thaliana transparent testa4 (tt4)*-Mutanten, die aufgrund eines Defektes der Chalkonsynthase (Feinbaum und Ausubel, 1988), einem regulierten Schlüsselenzym des frühen Phenylpropanweges, keine Flavonoide mehr bilden können, ist die Suppression der Lateralwurzelsbildung aufgehoben (Brown et al., 2001).

Cytokinine stimulieren die Proliferation von Geweben. Verschiedene Enantiomere des Dehydrodiconiferylalkohol-Glukosids (DCG) weisen in Tabak wachstumsfördernde Aktivitäten auf (Binns et al., 1987; Lynn et al., 1987) und sind als Bestandteile des Cytokinin-Signalwegs diskutiert worden (Teutonico et al., 1991). Ihre Konzentration ist in Cytokinin- oder Auxin-stimulierten Geweben um etwa das hundertfache höher als in ruhenden Geweben (Binns et al., 1987).

Interessanterweise tritt in Tabak bei der Blockade von Myb-Transkriptionsfaktoren durch die Überexpression heterologer Myb-Paralogue aus *Antirrhinum majus* ein retikulierter Blattphänotyp auf (Tamagnone et al., 1998a; Tamagnone et al., 1998b), wie er auch in den *A. thaliana cue*-Mutanten zu finden ist. Die Auswirkungen auf das Wachstum des Palisadenparenchyms und das der gesamten Pflanzen sind in beiden Fällen sehr ähnlich (Tamagnone et al., 1988b; Streatfield et al., 1999; Li et al., 1995).

Viele verschiedene Myb-Transkriptionsfaktoren sind in die transkriptionelle Regulation von Enzymen des Sekundärstoffwechsels wie PAL (Shufflebottom et al., 1993), Cinnamat-4-Hydroxylase (Sablowski et al., 1994), 4CL (Hauffe et al., 1993) und Cinnamylalkohol-Dehydrogenase (Feuillet et al., 1995) eingebunden, so daß die zugehörigen Genfunktionen bei der Blockade der Bindungsstellen für die endogenen Myb-Faktoren an den Promotoren ausfallen, wie dies in der von Tamagnone et al. (1998a) vorgelegten Studie geschehen ist. In Zellkulturen der von Tamagnone et al. (1998a) erzeugten transgenen Pflanzen konnten Wachstumsabnormalitäten durch die Supplementierung von DCGs revertiert werden (Tamagnone et al., 1998b). Ein Mangel an DCGs kann daher als mögliche Ursache für den retikulierten Blattphänotyp in *cue*-Mutanten erwogen werden, zumal die Beteiligung von Myb-Faktoren an der Regulation des Sekundärstoffwechsels im Pflanzenreich konserviert ist und dies auch auf *A. thaliana* zutrifft (Borewicz et al., 2000).

1.5.7. Zusammenfassende Bemerkungen

Wie unter 1.5 bis 1.5.6 dargelegt, stellt der PPT in C₃-Pflanzen die Versorgung des Chloroplastenstromas mit PEP sicher, das in Chloroplasten auf anderem Wege nicht in ausreichendem Maße bereitgestellt werden kann.

Damit ist der PPT der Ausgangspunkt für mehrere plastidär lokalisierte Biosynthesen, die für den pflanzlichen Stoffwechsel wichtig sind. Darunter fallen die Biosynthese aromatischer und verzweigtkettiger Aminosäuren, die Biosynthese bestimmter Fettsäuren und der Großteil der pflanzlichen Sekundärmetabolite.

Darüberhinaus besteht eine Konkurrenz zwischen zytosolischer Pyruvatkinase, PEP-Carboxylase und dem PPT für das gemeinsame Substrat PEP. Dabei wird auch entschieden, ob PEP im Zytosol verwendet wird oder in plastidäre Synthesen eingeht.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Störungen im Primär- und Sekundärstoffwechsel verschiedener Allele der *cue1*-Mutanten herausgearbeitet werden, um Anhaltspunkte für die Ursachen der verschiedenen Teilaspekte des pleiotropen *cue1*-Phänotyps zu erhalten.

Außerdem wurden verschiedene Strategien zur Komplementation des *cue1*-Blattphänotyps verfolgt, um anhand der physiologischen und molekularbiologischen Analyse der Komplementanden weitere Hinweise auf Faktoren zu gewinnen, die die Ausbildung des pleiotropen *cue1*-Phänotyps beeinflussen.

Bei den angewandten Strategien handelte es sich sowohl um biochemische als auch genetische Ansätze. Die biochemischen Komplementationsstrategien schlossen die Überexpression einer PPDK aus der C₄-Pflanze *Flaveria trinervia*, die Überexpression der PEP-Synthetase aus *E. coli* und die Expression eines heterologen PPT aus Blumenkohl ein. Über eine chemische Mutagenese der Allele *cue1-1* und *cue1-5* wurde ein genetischer Ansatz verfolgt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Difco (Hamburg), Duchefa (Haarlem, NL), Ferak (Berlin), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen, Radiochemikalien von den Firmen ICN (Eschwege) und Amersham Pharmacia (Freiburg).

2.1.2. Enzyme

Enzyme für die Manipulation von Nukleinsäuren wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), GibcoBRL (Karlsruhe), Qiagen (Hilden), Pharmacia (Freiburg), und Promega (Mannheim) erworben; Enzyme für biochemische und physiologische Fragestellungen wurden von der Firma Boehringer bzw. Roche (Mannheim) bezogen.

2.1.3. Vektoren

Folgende Vektoren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Klonierungen eingesetzt:

Vektor	Bezugsquelle	Verwendung
pBluescript®-Serie	Stratagene™	Amplifikation von Fragmenten in <i>E. coli</i>
pGEM-T® Easy	Promega	Klonierung von PCR-Produkten in <i>E. coli</i>
pCAMBIA-Serie	Cambia, Canberra, AUS	Pflanzentransformation
pBIN-AR-Kan	Stammkulturensammlung	Pflanzentransformation
pYES2-NT-C	Invitrogen®, Groningen, NL	Proteinexpression und -reinigung in <i>S. cerevisiae</i>

Der Vektor pSSppdk zur Überexpression der PPDK (EC 2.7.9.1) aus *Flaveria trinervia* in Pflanzen wurde freundlicherweise von Prof. Peter Westhoff, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt (Rosche et al., 1994); den Vektor pSrLpps zur Überexpression der *E. coli* PEP-Synthetase (EC 2.7.9.2) in Pflanzen wurde von Prof. Fritz Kreuzaler, Institut für Biologie I der RWTH Aachen, überlassen (Panstruga et al., 1997).

2.1.4. Bakterien- und Hefestämme

2.1.4.1. *E. coli*

DH5 α - zur Amplifikation von Plasmiden verwendet.

supE44 Δ lacU169 (Φ 80, lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

Darüberhinaus wurden Stammkulturen aus den λ -PRL2- und CD4-13- bis CD4-16-EST-Banken des *Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)*, Ohio State University, Columbus (USA) bezogen (s. Anhang 8.1).

2.1.4.2. *A. tumefaciens*

GV3101 (pMP90) zur Pflanzentransformation (Koncz und Schell, 1986)

Rif^R Gm^R

2.1.4.3. *S. cerevisiae*

InvSc1 – zur Proteinexpression eingesetzt.

his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52

2.1.5. Pflanzenmaterial

Die *A. thaliana-cue1*-Linien und pOCA108-Saatgut wurden dankenswerterweise von Dr. Stephen J. Streatfield zur Verfügung gestellt.

Die verschiedenen Allele der *cue1*-Mutanten befinden sich in folgenden genetischen Hintergründen:

Linie	Ökotyp/ Hintergrund	Genotyp am PPT-Locus	Literaturhinweis
pOCA108	Bensheim (Be-0)	Wildtyp	Li et al., 1995
<i>cue1-1</i>	pOCA108	Gen deletiert, starkes Allel	Li et al., 1995
<i>cue1-3</i>	pOCA108	AS-Austausch an Position 304	Streatfield et al., 1999
<i>cue1-5</i>	Col-0	AS-Austausch an Position 181	Streatfield et al., 1999
<i>cue1-6</i>	Col-0	Stop-Signal in der Präsequenz	Streatfield et al., 1999

2.2. Methoden

2.2.1. Anzucht von *Arabidopsis thaliana* HEYN.

2.2.1.1. Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Saatgut

Stratifizierte *Arabidopsis*-Samen wurden in die Spitze eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes gefüllt und für 30 s in 1 ml 70% Ethanol geschüttelt. Der H₂O_{dd}-Anteil des Ethanol war zuvor steril filtriert worden. Das Ethanol wurde nach der Sedimentation der Samen abgehoben und 1 ml der Hypochlorit-Lösung zu den Samen hinzupipettiert. Nach fünfzehn- bis zwanzigminütiger Inkubation unter gelegentlichem Durchmischen wurde die Hypochlorit-Lösung abgenommen und die Samen sechsmal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Saatgut auf sterilem Filterpapier verteilt und steril gelagert. Alle aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank ausgeübt.

Hypochlorit-Lösung:

15 Vol% Natrium-Hypochlorid-Lösung (12%)

85 Vol% H₂O_{dd} (steril filtriert)

0,15% (v/v) Tween 20

2.2.1.2. *Arabidopsis thaliana* Sterilkulturen

Die wie unter 2.2.1.1 oberflächensterilisierten *Arabidopsis*-Samen wurden mit sterilen Zahnstochern auf MS-Platten ausgelegt, denen bei Bedarf wie unten angegeben Antibiotika zur Selektion beigemischt wurden. Die Platten wurden mit Gewebepband (Omnipor, Hartmann) versiegelt und bis zum Pikieren der Pflanzen nach 2 bis 6 Wochen bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von 16:8 h und einer Temperatur von 22°C im Phytoinkubationsschrank (Rubarth, Laatzen) inkubiert.

Soweit nicht anderweitig angemerkt wurden *cuel*-Mutanten bis zu sechs Wochen lang im voraus steril angezogen; alle anderen Linien wurden erst zum Pikierzeitpunkt der *cuel*-Linien ausgelegt und nach 2 bis 3 Wochen Sterilkultur pikiert. Durch diese Vorgehensweise wurde sichergestellt, daß die Pflanzen zum Untersuchungszeitpunkt physiologisch ähnlich eingestimmt sind und die gleiche Phase der vegetativen Entwicklung durchlaufen.

MS-Platten:

1 % (w/v) Saccharose

0,44 % (w/v) Murashige & Skoog-Medium (Duchefa, Haarlem, NL, Kat.-Nr. M 0245)

0,8 % (w/v) BiTek Agar (Difco)
pH 5,6/ KOH

bei Bedarf wurde nach dem Abkühlen zugesetzt:

Kanamycin (50 µg/ml Endkonzentration)

oder Hygromycin (30 µg/ml Endkonzentration)

Die Suspension wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf Handwärme in sterile Petrischalen gegossen. Die fertigen Platten wurden bis zur Verwendung bei 4°C maximal 1 Monat lang gelagert.

2.2.1.3. EMS-Mutagenese von *Arabidopsis*-Saatgut

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit ergründet den retikulierten Blattphänotyp der *cue1*-Mutanten durch Mutagenese zu revertieren. Für die chemische Mutagenese wurden zwei verschiedene *cue1*-Linien eingesetzt, deren M₂-Populationen auf verschiedene Weise auf kontaminierende Samen überprüft wurden. Potentielle Revertanten der *cue1-1* M₂-Population wurden über PCR (s. 2.2.3.3) auf das Fehlen des AtPPT1-Locus im Genom untersucht, potentielle Revertanten der *cue1-5* M₂-Population wurden aufgrund der hellen Samenschale der von ihnen hervorgebrachten Samen identifiziert.

Die chemische Mutagenese von *Arabidopsis*-Samen mit Ethylmethylsulfonsäure wurde in Anlehnung an das von Lightner und Caspar in *Methods in Molecular Biology* (Vol. 82, 1998) dargelegte Protokoll durchgeführt.

250 mg Saatgut - das entspricht etwa 12.500 Samen – wurden unter dem Abzug über Nacht in 25 ml 0,25 % (v/v) frisch geliefertem EMS bei Raumtemperatur gerührt. Die EMS-Lösung wurde nach Absetzen der Samen weitestgehend abgenommen und 3 bis 4 Wochen lang in 1 M Na₂S₂O₃ eingerührt. Ebenso wurden alle verwendeten Gefäße 2 d zum Abreagieren des EMS mit 1 M Na₂S₂O₃ gefüllt. Die restliche EMS-Lösung wurde mitsamt der Samen in 15 ml-Reaktionsröhrchen überführt und 5 mal mit 5 ml 1 M Na₂S₂O₃ gewaschen, wobei die Samen nach jedem Waschschrift 2 min bei 1.500 U·min⁻¹ sedimentiert wurden und der Überstand mit dem restlichen EMS-haltigen Abfall zur Dekontamination vereinigt wurde. Anschließend wurden die Samen dreimal in gleicher Weise mit Leitungswasser gewaschen und im letzten Schritt in 300 ml Leitungswasser

transferiert. Drei ml Aliquots wurden unter guter Verwirbelung des Inhalts mit einer abgeschnittenen Plastikpasteurpipette gleichmäßig in Teku-Pflanzschalen (TS 1520 S, Nitsch & Sohn, Kreuztal) ausgebracht, so daß sich in jeder Pflanzschale etwa eine Gruppe von 100 Individuen befand. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagsbedingungen (s. 2.2.1.4) herangezogen.

Die M_1 -Generation wurde geselbstet und in gleicher Weise ausgebracht. Die M_2 -Generation wurde schließlich phänotypisch untersucht.

2.2.1.4. Langtag-Wachstumsbedingungen im Gewächshaus

Arabidopsis Pflänzchen wurden in 77er Multiplatten (Nitsch & Sohn, Kreuztal) mit einem Gemisch von 3 Teilen Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz) pikiert und bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16:8 h, also im extremen Langtag, bei einer täglichen Photonendosis von 200 klxh und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 40% herangezogen. In der Lichtperiode betrug die Temperatur 21°C, während der Dunkelperiode 18°C. Die Beleuchtungsstärke wurde während der Lichtperiode durch fakultatives Hinzuschalten von Leuchten oberhalb von 20 lx gehalten.

Die Multiplatten wurden regelmäßig angestaut und einmal wöchentlich mit Nematoden (Sautter und Stepper, Ammerbruch) zur Bekämpfung eines eventuellen Befalls durch Trauermückenlarven besprüht. Bei Befall mit Blattläusen wurden als Nützlinge Florfliegenlarven (Sautter und Stepper, Ammerbruch) ausgebracht.

2.2.1.5. Kurztag-Wachstumsbedingungen in der Phytokammer

A. thaliana Pflänzchen wurden auf dasselbe Substrat wie unter 2.2.1.4 beschrieben pikiert und bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h, also unter Kurztagsbedingungen bei einer PFD von $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, einer relativen Luftfeuchte von 40% und einer Temperatur von 24°C während der Lichtperiode und 18°C während der Dunkelperiode kultiviert. Die Phytokammer (Karl Weiss, Giessen) war zu gleichen Teilen mit Leuchtstoffröhren der Fa. Osram L58W/11-860 (Tageslicht), L58W/30 (Warmweiß), L58W/76 (Natura de Luxe) und L58W/77 (FluorA) bestückt. Zur Bekämpfung von Blattlausbefall wurden bei Bedarf Florfliegenlarven (s. 2.2.1.4) ausgebracht.

2.2.1.6. Hydroponische Anzucht

Zur besseren Kontrolle der Nährsalzzufuhr wurden *A. thaliana* Pflänzchen hydroponisch angezogen. Sie wurden zu sechst in Töpfe (Ø 10 cm) mit einer 1:1-Mischung aus mit Nährlösung durchzogenem *Dorsilit* Quarzsand der Körnungen 0,3 bis 0,9 mm und 0,6 bis 1,2 mm (Gebr. Schäfer/ Testra Strahlmittel Süd, Mannheim) pikiert. Die Töpfe blieben während der gesamten Anzucht im Phytoinkubationsschrank (CLF Laborgeräte, Emersacker) in Kontakt mit der den Boden der Übertöpfe bedeckenden Nährlösung, die bei Bedarf bis zu einem Flüssigkeitsstand von 1 cm nachgefüllt wurde. Einige Wochen nach dem Pikieren wurde die Quarzsandoberfläche zur Vorbeugung von Algenbewuchs dünn mit Schmelzkammerschlacke bestreut.

Im Phytoinkubationsschrank herrschte eine PFD von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 h (Kurztag) und einer relativen Luftfeuchte von 45 %; die Temperatur während der Lichtperiode betrug 22°C , die während der Dunkelperiode 18°C . Die Beleuchtung wurde während der Lichtphase durch Leuchtstoffröhren (Philips F17T8/TL741) sichergestellt, zu Beginn und zum Ende der Lichtperiode wurde über Glühbirnen (Osram Krypton, 60W) eine halbe Stunde lang Dämmerlicht erzeugt.

Nährlösung zur hydroponischen Anzucht von *A. thaliana*:

<i>Makroelemente:</i>	2 mM	KNO_3
	2 mM	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
	3 mM	KH_2PO_4 , pH 5,7 /KOH bzw. H_3PO_4
	2,2 mM	MgSO_4
	0,8 mM	MgCl_2
	1,3 mM	K_2SO_4
	1,28 mM	KCl
	1 mM	NaCl
	4 mM	CaSO_4

<i>Mikroelemente:</i>	20 µM	Fe·EDTA
	60 µM	H ₃ BO ₃
	14 µM	MnSO ₄
	1 µM	ZnSO ₄
	0,6 µM	CuSO ₄
	0,4 µM	NiCl ₂
	0,3 µM	HMoO ₄
	0,02 µM	CoCl ₂

2.2.1.7. Etablierung anaeroben Stresses durch Staunässe

A. thaliana wurde wie unter 2.2.1.2 und 2.2.1.4 beschrieben auf Multiplatten angezogen und diese zu Beginn der Experimente mit Leitungswasser angestaut und darin bis zum Ende der Experimente stehen gelassen. Alle zwei Tage wurden die Pflanzen inspiziert, bei Bedarf photographisch dokumentiert, Wasser bis zum Wulst nachgefüllt und Proben für die Zucker- und Stärkebestimmung (2.2.5.21 und 2.2.5.22) sowie die Untersuchung des Anthocyangehaltes (2.2.6.6) geerntet.

2.2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1. Anzucht und Transformation von *E. coli*

2.2.2.1.1. Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht der in 2.1.4.1 aufgeführten *E. coli*-Stämme wurde eine Kolonie von einer Platte oder 10 µl einer Glycerinstammkultur in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (200 min⁻¹) bei 37°C inkubiert. Falls erforderlich wurden Antibiotika zur Selektion hinzugesetzt (s.u.). *E. coli* Zellen wurden entweder kurzfristig für einige Wochen als Kolonie auf Agarplatten bei 4°C oder langfristig als Stammkultur bei -20°C im gleichen Volumen 65% Glycerin, 0,1 M MgSO₄, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0) gelagert.

LB-Medium:

1 g	Trypton	
0,5 g	Hefeextrakt	
1 g	NaCl	ad 100 ml H ₂ O _{bidest.}

Das Medium wurde nach Zugabe aller Komponenten autoklaviert.

Wenn nötig wurden 0,1 % (v/v) Ampicillin (50 mg/ml in 1M Tris/HCl, pH 8)
bzw. 0,1 % (v/v) Kanamycin (25 mg/ml)
nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

LB-Platten:

LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

2.2.2.1.2. Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung und Transformation kompetenter Zellen wurde auf die von Chung und Miller (1993) entwickelte TSS-Methode zurückgegriffen.

E.coli des Stammes DH5 α wurden in 5 ml LB-Medium (s. 2.2.2.1.1) angeimpft und über Nacht bei 37° C im Schüttelinkubator (New Brunswick G25, Edison/ USA) angezogen. Danach wurde 1 ml der Übernachtskultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml frischem LB-Medium überimpft und die Kultur bei 37° C im Schüttelinkubator etwa 1 bis 2 h geschwenkt, bis die entnommene Proben mit einem $\Delta E = 0,4$ ($\lambda = 600$ nm) auf die exponentielle Wachstumsphase hinwiesen. Die Kultur wurde dann auf SS34-Becher verteilt und die Zellen im SS34-Rotor für 10 min bei 3.000 U \cdot min⁻¹ sedimentiert. Die Sedimente wurden in 10 ml TSS aufgenommen und vereinigt, 15 min auf Eis gestellt, zu 50 μ l in Einmal-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und maximal 2 Monate bis zur Verwendung bei -80° C gelagert.

TSS:

10% (w/v)	PEG 8000
5 Vol%	DMSO
75 Vol%	LB-Medium
50 mM	MgCl ₂
	pH 6,5/ NaOH

2.2.2.1.3. Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Ein 50 μ l Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und nach Zugabe eines gesamten Ligationsansatzes für 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden 90 s auf 42° C erwärmt, kurz auf Eis abgekühlt, dann mit 1 ml LB-Medium (s. 2.2.2.1.1) versetzt und 1 h im bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

2.2.2.1.4. Selektion auf Indikatorplatten

Die wie unter 2.2.2.1.3 transformierten Zellen wurden bei der Verwendung der Vektoren pBSC oder pGEM-T Easy auf Indikatorplatten ausplattiert, die nach dem Antrocknen des Mediums über Nacht bei 37° C bebrütet wurden und nach einer 24stündiger Lagerung bei 4°C auf blaue und ungefärbte Kolonien kontrolliert wurden.

Ungefärbte Klone wurden in Kulturröhrchen mit 5 ml LB-Amp-Medium (s. 2.2.2.1.1) überimpft. Nach der Inkubation im Schüttler bei 37° C über Nacht wurden von 500 µl der Flüssigkulturen wie unter 2.2.2.1.1 beschrieben Stammkulturen angelegt und bei –20°C gelagert.

Indikatorplatten (Blau-weiß-Selektion):

1 g	Trypton
0,5 g	Hefeextrakt
0,1 g	NaCl
0,25 g	MgCl ₂
1,5 g	Bacto-Agar
20 mg	IPTG, dioxanfrei
0,5 Vol%	X-Gal, 2% (w/v) in Dimethylformamid
400 µl	Ampicillin (0,1% w/v)
	ad 100 ml H ₂ O _{dd}

Außer den hitzelablen Bestandteilen IPTG, der X-Gal-Lösung und Ampicillin wurden alle Komponenten zusammengegeben und die resultierende Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 40° C wurden die restlichen Bestandteile hinzugefügt, die Lösung gut durchmischt und unter der Sterilbank in Petrischalen gegossen.

2.2.2.1.5. Selektion positiver Klone mit Hilfe der PCR

Konnte der Ligations- und Transformationserfolg nicht über eine Blau-Weiß-Selektion überprüft werden, so wurden transformierte Zellen auf Selektionsplatten ausgestrichen und diese nach Antrocknen des Mediums über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurde auf die Rückseite der Platten ein Gitter gezeichnet und aus jedem Feld eine halbe Kolonie mit einer Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl PCR-Prämix transferiert. Die Ansätze wurden 5 min auf 95°C erhitzt, und darauf kurz zur Abtrennung der Zelltrümmer anzentrifugiert. Zwanzig µl der Überstände wurden in PCR-Reaktionsgefäße überführt, 1 U Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) hinzugegeben und die PCR-Reaktionen

(s. 2.2.3.3) gestartet. Nach Ende des PCR-Programms wurden die Reaktionen auf 1 x Stop-Puffer gebracht und elektrophoretisch auf die gewünschten Produkte hin untersucht.

PCR-Prämix:

0,1 mM dNTPs, jeweils
0,1 µM Oligonukleotid 1
0,1 µM Oligonukleotid 2
1/10 Vol 10 x Reaktionspuffer

Als Oligonukleotiden wurden jeweils konstruktsspezifische Oligonukleotide (s. Anhang 8.2) eingesetzt.

10 x Stop:

20 % (w/v) Ficoll 400
1 % (w/v) SDS
100 mM EDTA, pH 8,0
0,02 % (w/v) Bromphenolblau
0,02 % (w/v) Xylencyanol

2.2.2.2. Anzucht und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.2.2.1. Voranzucht von *A. tumefaciens*

YEB-Medium:

5 g Fleischextrakt (Rind)
1 g Hefeextrakt
5 g Bacto-Pepton
5 g Saccharose
0,5 g MgSO₄ ad 1 l H₂O_{dd}, pH 7,4

YEB-Platten:

YEB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

Bei Bedarf wurden Gentamycin (25 µg/ml Endkonzentration),
Rifampicin (150 µg/ml Endkonzentration)
oder Kanamycin (25 µg/ml Endkonzentration) nach dem
Autoklavieren der Medien hinzugefügt.

MGL-Medium:

5 g Bacto-Pepton
2,5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
5 g Mannit
1,16 g Natriumglutamat
0,25 g KH_2PO_4
0,1 g MgSO_4
1 mg Biotin

YEB-Medium mit selektiven Antibiotika wurde mit Agrobakterien-Stammkulturen angeimpft und bei 28°C unter Schütteln angezogen (200 min⁻¹). Aliquots der Flüssigkultur wurden dann auf Selektionsplatten ausgestrichen, die einige Tage bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden konnten. Aus den Bakterienrasen wurden dann Vorkulturen für die weitere Verwendung angeimpft.

2.2.2.2.2. Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

Eine 5 ml-Übernachtkultur von *A. tumefaciens* in MGL-Medium mit Antibiotika wurde in 100 ml MGL-Medium (s. 2.2.2.2.1) auf eine Zelldichte von $\Delta E = 0,04$ bis $0,08$ ($\lambda = 600$ nm) verdünnt und bis zu einem $\Delta E = 0,5$ ($\lambda = 600$ nm) herangezogen. Die Zellen wurden dann 5 min bei 300 U·min⁻¹ in der Bodenzentrifuge (Hermle ZK 364, Kontron) sedimentiert und in 40 ml eiskaltem 1 mM Hepes-Puffer, pH 7,0 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Agrobakterien im gleichen Volumen 1 mM Hepes, pH 7,0, 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, wiederum sedimentiert und dann in 2 ml eiskaltem 1 mM Hepes, pH 7,0, 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Je 1 ml dieser Suspensionen wurde 30 s in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 14.000 U·min⁻¹ sedimentiert. Die Bodensätze aus Agrobakterien wurden jeweils in 200 µl 1 mM Hepes, pH 7,0, 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, zu 50 µl in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2.3. Elektrotransformation von *A. tumefaciens*

Fünfzig µl gefrorene, kompetente Agrobakterien (s.2.2.2.2.2) wurden mit 0,5 µg Plasmid-DNA versetzt und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette (PEQlab, Erlangen) überführt. Die Küvette wurde in einen Elektroporator (Gene Pulser II, Biorad, München) eingesetzt und die DNA

durch Elektroporation mit 25 μF , 400 Ω und einem 2,5 kV Puls in die Agrobakterien eingebracht. Der Transformationsansatz wurde mit 1 ml YEB (2.2.2.2.1) versetzt und 2 h bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden die Zellen für 30 s bei 14.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ sedimentiert und in 200 μl YEB resuspendiert. Je 100 μl wurden auf eine YEB-Platte (s. 2.2.2.2.1) mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und nach 3 bis 4 Tagen Inkubation bei 28°C konnten einzelne Kolonien transformierter Agrobakterien großflächig auf weitere selektierende YEB-Platten ausgestrichen werden.

2.2.2.2.4. Selektion von *A. tumefaciens*-Kolonien

Zur Kontrolle der Transformation wurden die Agrobakterien von YEB-Platten (s. 2.2.2.2.1) in LB-Medium mit Kanamycin (s. 2.2.2.1.1) angeimpft und über Nacht bei 28°C im Schüttelinkubator bebrütet und wie in 2.2.2.1.5 beschrieben auf die Anwesenheit gewünschter Plasmide hin untersucht.

2.2.2.2.5. Anzucht von *A. tumefaciens* zur Pflanzentransformation

Agrobakterienkolonien, die die entsprechenden Vektoren zur Pflanzentransformation enthielten, wurden von den YEB-Platten (s. 2.2.2.2.1) in drei bis vier Vorkulturen von je 5 ml YEB-Medium überimpft und bei 28°C und 200 min^{-1} ca. 26 h im Kulturschüttler (New Brunswick Scientific, Nürtingen) inkubiert. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika zugegeben (s. 2.2.2.2.1). Dann wurden 300 ml YEB-Medium mit den 5 ml Vorkulturen angeimpft und bis zur einem $\Delta E = 0,8$ bis 1,0 ($\lambda = 600 \text{ nm}$) für ca. 7 bis 9 h bei 28°C angezogen. Die Zellen wurden dann bei 2.500 xg (GS-3-Rotor, Sorvall RC-5B, DuPont, Bad Homburg) für 15 min sedimentiert, in 100 ml Infiltrationsmedium resuspendiert und bis zur Verwendung am gleichen Tag bei 4°C gelagert.

Infiltrationsmedium:

0,5 g	MES, pH 5,7/ KOH
2,2 g	Murashige & Skoog-Medium (Duchefa, Haarlem, NL, Kat.-Nr. M 0245)
5 % (w/v)	Saccharose
44 nM	6-Benzylaminopurin
0,01 %	Tween 20
	ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

2.2.2.2.6. Transfektion von *A. thaliana*

A. thaliana HEYN. wurde nach der Methode von Bechthold et al. (1993) über Vakuuminfiltration der Infloreszenzen mit transgenen Agrobakterien des Stammes GV 3101 transfiziert.

Die zu transformierenden Pflanzen wurden nach der Anzucht in Sterilkultur (s. 2.2.1.2) zu viert in Töpfe (\varnothing 10 cm) auf Erde pikiert und bis zur Blüte angezogen. Nach der Resektion der Primärinfloreszenzen wurden die Pflanzen nach der Ausbildung zahlreicherer Sekundärinfloreszenzen für die Transfektion eingesetzt.

In einem Vakuumexsiccator wurden Weckgläser mit Agrobakteriensuspension in Infiltrationsmedium (s. 2.2.2.2.5) gestellt und die Pflanzen kopfüber mit den Infloreszenzen in die Suspension getaucht. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde 15 bis 20 min Vakuum angelegt und der Exsiccator danach zügig belüftet. Die infiltrierten Pflanzen wurden in den ersten vier Tagen der weiteren Anzucht unter einer Kunststoffpikierhaube gehalten und die Samen am Ende der Reproduktiven Phase geerntet.

2.2.2.2.7. Selektion von *A. thaliana* T₁-Generationen

Die Oberflächensterilisation der *Arabidopsis*-Samen (s.2.2.1.1) und Sterilkultur der Pflanzen (s. 2.2.1.2) erfolgte wie oben dargestellt, allerdings wurde dem MS-Medium nach dem Abkühlen neben dem Selektionsantibiotikum auch Cefatoxim (500 μ g/ml) zugefügt, um das Wachstum der Agrobakterien in der Sterilkultur einzudämmen.

2.2.2.3. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.2.3.1. Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

10 μ l einer Hefestammkultur des Stammes INVSc1 wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und ein bis zwei Tage bei 30°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden in 10 ml YPD-Medium überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 30°C herangezogen. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur in einem Volumen von 50 ml YPD auf eine $\Delta E = 0,4$ ($\lambda = 600$ nm) verdünnt und weitere 2 bis 4 h unter Schütteln bei 30°C inkubiert.

Die Zellen wurden dann auf sterile 50 ml-Polypropylenröhrchen aufgeteilt und 5 min in einer Bodenzentrifuge (Hermle ZK 364, Kontron) bei 1.500 xg sedimentiert und in 40 ml 1 x TE resuspendiert. Die Zellen wurden wie zuvor sedimentiert, in 2 ml 1 x LiOAc/0,5 x TE aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für jeden Transformationsansatz wurden 100 μ l dieser Suspension mit 1 μ l Plasmid-DNA und 10 μ l

Träger-DNA (10 mg/ml denaturierte Heringsspermen-DNA) in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß vermischt, 700 µl 1 x LiOAc/ 40 % PEG-3350/ 1 x TE hinzugegeben und das Reaktionsgefäß gründlich invertiert. Danach wurden die Transformationsansätze für 30 min bei 30°C inkubiert, bevor 88 µl DMSO zugegeben und die Suspension sorgfältig durchmischt wurde. Anschließend wurden die Hefezellen einem siebenminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und 10 s anzentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben, die Zellen in 1 ml 1 x TE resuspendiert, in gleicher Weise sedimentiert, in 100 µl 1 x TE aufgenommen und auf SC/-Ura-Platten zur Selektion auf fehlende Uracil-Auxotrophie in den Transformanden ausgestrichen.

YPD-Medium:

1 % (w/v) Bactopepton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

2 % (w/v) Glukose

Das Medium wird vor dem Gebrauch autoklaviert.

YPD-Platten:

YPD-Medium mit 2 % (w/v) Bacto-Agar (Difco).

1 x TE-Puffer:

10 mM Tris/ HCl, pH 7,4

1 mM EDTA

Die Lösung wird autoklaviert.

1 x LiOAc/ 0,5 x TE

5 mM Tris/ HCl, pH 7,5

100 mM Lithiumacetat

0,5 mM EDTA

1 x LiOAc/ 40% PEG-3350/ 1 x TE:

10 mM Tris/ HCl, pH 7,5

100 mM Lithiumacetat

1 mM EDTA

40% (w/v) PEG-3350

SC/-Ura-Platten:

0,67 % (w/v)	Yeast Nitrogen Base
5 % (v/v)	40% (w/v) Glukoselösung, sterilfiltriert
1 % (v/v)	10 x Dropout -Ura
2 % (w/v)	Bacto-Agar

10 x Dropout -Ura:

0,03 % (w/v)	Isoleucin
0,15% (w/v)	Valin
0,02 % (w/v)	Adenin
0,02 % (w/v)	Arginin
0,02 % (w/v)	Histidin
0,1 % (w/v)	Leucin
0,03 % (w/v)	Lysin
0,02 % (w/v)	Methionin
0,05 % (w/v)	Phenylalanin
0,2 % (w/v)	Threonin
0,02 % (w/v)	Tryptophan

Soll auf andere Auxotrophien hin selektiert werden, so können dem 10x Dropout ein oder mehrere der anderen Bestandteile vorenthalten werden und dafür 0,02 % (w/v) Uracil beigemischt werden.

2.2.2.3.2. Expression rekombinanter His₆-PPDK in *S. cerevisiae*

Kolonien die auf SC/-Ura-Platten (s. 2.2.2.3.1) gewachsen waren wurden in 15 ml SC/-Ura-Medium mit 2 % (w/v) Glukose überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 30°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Dichte der Übernachtskultur photometrisch bei $\lambda = 600$ nm bestimmt, und das Volumen berechnet, welches zum Erreichen eines ΔE von 0,4 in 50 ml Induktionsmedium nötig war. Ein entsprechendes Aliquot der Übernachtskultur wurde 5 min bei 1.500 xg bei 4°C zentrifugiert (Hermle ZK364, Kontron), der Überstand verworfen und die Hefezellen in 50 ml Induktionsmedium, SC/-Ura mit 2 % (w/v) Galaktose anstelle von Glukose, aufgenommen. Die Proteinexpression wurde über einen Inkubationszeitraum von 20 h bei 30°C unter Schütteln induziert. Dieser Zeitraum hatte sich in Vorversuchen als optimal für die Induktion der eingebrachten Proteine erwiesen.

Induktionsmedium:

0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base

5 % (v/v) 40% (w/v) Galaktoselösung, sterilfiltriert

1 % (v/v) 10 x Dropout –Ura

2.2.2.3.3. Affinitätsreinigung His₆-gekoppelter Proteine aus Hefe über NiNTA

Nachdem die Extinktion der Induktionskulturen bei $\lambda = 600$ nm anhand eines entnommenen Aliquots bestimmt worden war, wurden die Hefezellen 5 min bei 3.000 U·min⁻¹ sedimentiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit Puffer A auf eine Extinktion bei $\lambda = 600$ nm von 50,0 gebracht. Danach wurde die 4fache Menge (w/w) säuregewaschene Glasperlen hinzugegeben, gut durchmischt und die Zellen dann bei 4°C im Kühlraum in einem Zellhomogenisator (Braun, Melsungen) aufgeschlossen. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls im Kühlraum. Nach dem Zellaufschluß wurde das gleiche Volumen Puffer A hinzupipettiert, die Suspension homogenisiert und 8 min bei 2.300 U·min⁻¹ zentrifugiert. Die Überstände werden schließlich auf identische Ansätze aufgeteilt.

Maximal 750 µl des Überstandes werden zum Bodensatz von 150 µl NiNTA-Agarose-Suspension (Qiagen, Hilden) gegeben, die zuvor 5mal mit 1 ml Puffer A äquilibriert wurde, wobei die NiNTA-Agarose-Partikel nach jedem Resuspendieren durch 10 s Anzentrifugieren wieder abgesetzt wurden. Das Gemisch aus NiNTA-Agarose und Hefelysate wurde resuspendiert und 1 h über Kopf geschüttelt.

Die Suspension wurde 15 s anzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment fünfmal mit 1 ml Puffer A gewaschen. Nach jedem Resuspendieren wurde das Säulenmaterial erneut 15 s anzentrifugiert. Bei Bedarf wurden Aliquots der Überstände zur Überwachung der Wasch- und Elutionsschritte mit dem gleichen Volumen 2 x SB versetzt und bis zur Analyse per SDS-PAGE (s. 2.2.4.1) bei Raumtemperatur gelagert. Das His₆-gekoppelte Protein wurde anschließend 6 mal mit 250 µl Puffer B von der NiNTA-Agarose eluiert und korrespondierende Doppelproben vereinigt.

50 µl der Eluate wurden mit dem gleichen Volumen 2 x SB versetzt und bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei Raumtemperatur gelagert. Zu den restlichen 450 µl der Eluate wurden 700 µl Mix C gegeben, die Reaktionsgefäße sorgfältig invertiert und bis zur Verwendung in PPK-Aktivitätstests (s. 2.2.5.11.6) bei –20°C aufbewahrt.

Puffer A:

20 mM	Tris/HCl, pH 7,2
150 mM	NaCl
75 mM	NaH ₂ PO ₄
5 mM	Imidazol
0,1 % (w/v)	Triton-X-100
10 % (w/v)	Glyzerin
1 % (v/v)	PMSF-Stammlösung (50 mg/ml Ethanol)
0,5 % (v/v)	Protease-Inhibitor-Cocktail für Pflanzenextrakte (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Puffer B:

60 mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 6,8
150 mM	Imidazol
100 mM	NaCl
0,1 % (w/v)	Triton-X-100
1 % (v/v)	PMSF-Stammlösung (50 mg/ml Ethanol)
0,5 % (v/v)	Protease-Inhibitor-Cocktail für Pflanzenextrakte (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

2 x SB:

125 mM	Tris/HCl, pH 6,8
20 % (v/v)	Glyzerin
4 % (w/v)	SDS
3 % (w/v)	DTT
0,005 % (w/v)	Bromphenolblau

Mix C:

10 mM	DTT
10 mM	MgCl ₂ in 86%igem Glyzerin

Säuregewaschene Glasperlen:

Die Glasperlen (\varnothing 0,5 mm) wurden in 0,1 M HCl gewaschen und durch mehrfaches Spülen mit H_2O_{dd} neutralisiert.

2.2.2.3.4. Verlauf der Aufreinigung der His₆-PPDK

Die beiden von Prof. Peter Westhoff (Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellten Partialklone der PPDK aus der C₃-Pflanze *Flaveria pringlei* wurden zusammengefügt, nach dem Austausch der Präsequenz gegen eine N-terminale His₆-Affinitätskupplung des Vektors pYES2 (Invitrogen, Groningen, NL, s. 2.1.3) zur Überprüfung des Leserasters sequenziert und in Hefe (*S. cerevisiae*) transformiert. Der Reinigungsverlauf der überexprimierten rekombinanten *Flaveria pringlei*-PPDK eines Molekulargewichtes von 100 kDa über NiNTA-Agarose wurde immunologisch mit anti-Hexahistidin-Antikörpern verfolgt (s. Abb. 2.1) und die spezifischen Aktivitäten sowie die Volumenaktivitäten der Eluate gemessen (s. Tab. 2.1). Das rekombinante PPDK-Protein konnte in ausreichender Reinheit und mit spezifischen Aktivitäten von bis zu 0,83 U·mg Protein⁻¹ und Volumenaktivitäten zwischen 16 und 29 mU·ml Extrakt⁻¹ gewonnen werden (s. Tab. 2.1)

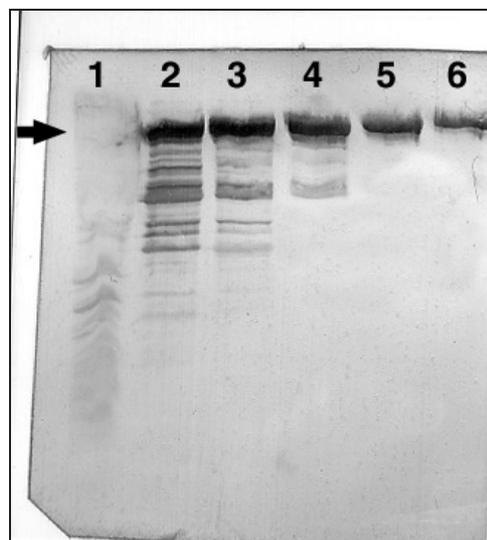


Abb. 2.1 Immunologische Verfolgung der Affinitätsreinigung der rekombinanten His₆-PPDK von *F. pringlei* aus Hefe. Der Pfeil zeigt eine Größe von 100 kDa an. Spur 1: Überstand des Hefeextraktes nach der Sedimentierung der Ni-NTA-Agarose, Spur 2 bis 6: Ni-NTA-Agarose-Eluate 1 bis 5.

Spur	Spezifische PPK-Aktivität (U·mg Protein ⁻¹)	Volumenaktivität (mU·ml ⁻¹)
1	0	0
2	0,032	17,6
3	0,087	23,7
4	0,251	29,0
5	0,333	15,9
6	0,832	19,2

Tab. 2.1 Spezifische Aktivitäten und Volumenaktivitäten der aus Hefeextrakten gereinigten rekombinanten *F. pringlei*-PPDK. Die Numerierung der Eluate entspricht der in Abb. 2.1.

Die gereinigte His₆-PPDK wurde auf 50% Glycerin gebracht und bei –20°C gelagert. Aliquots der Präparationen wurden bis zu sechs Monate später ohne deutlichen Verlust an Aktivität für die Synthese von [2-¹⁴C]-PEP aus [2-¹⁴C-Pyruvat] (s. 2.2.5.10) oder als Positivkontrolle für PEP-Synthetase-Aktivitätsmessungen herangezogen.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Präparation von Plasmid-DNA, Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, RNasen, Ligasen, Phosphorylasen, Polymerasen oder Kinasen, sowie die Agarose-Gelelektrophorese von DNA wurden wie in Ausubel et al. (1997) beschrieben durchgeführt.

2.2.3.2. Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Mit der DNA-Schnellpräparation nach Edwards et al. (1991) kann zwar relativ unreine, aber PCR-fähige genomische DNA aus kleinen Mengen Pflanzengewebe extrahiert und angereinigt werden.

Mindestens 10 mg Blattmaterial wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und evtl. bis zur Aufarbeitung bei –80°C gelagert.

Das Blattmaterial wurde in den Höhlungen von Mikrotiterplatten mit Plastikpistillen gemörsert und nach Zugabe von 400 µl Aufschlußpuffer 5 s gevortext (gestrudelt), in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und maximal 1 h bei Raumtemperatur bis zur Aufarbeitung weiterer Proben stehengelassen. Gewebetrümmern wurden 1 min bei

13.000 U·min⁻¹ (17.900 xg) sedimentiert und 300 µl der Überstände mit dem gleichen Volumen Isopropanol in neuen Reaktionsgefäßen vermischt. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gefäße 5 min bei 13.000 U·min⁻¹ (17.900 xg) zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Sedimente unter der Sterilbank getrocknet. Die getrockneten Sedimente wurden in 100 µl 1 x TE (s. 2.2.2.3.1) aufgenommen und bis zur PCR-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.3. Durchsicht von transgenen Pflanzenpopulationen über PCR

Zwei µl der unter 2.2.3.2 gewonnenen genomischen Pflanzen-DNA wurden in Standard-PCR-Reaktionen von jeweils 20 µl Gesamtvolumen unter Einsatz eines genspezifischen und eines zum Promotorbereich des Konstruktes homologen Oligonukleotids auf die Gegenwart des gewünschten Konstruktes hin überprüft. Nach Beendigung des PCR-Programms (s.u.) wurden die enzymatischen Reaktionen durch Zugabe von 1/5 Volumen 5 x Stop-Puffer (s. 2.2.2.1.5) abgestoppt. Positive Nachweisreaktionen zeichneten sich durch eine Bande der erwarteten Größe zwischen 800 und 100 bp bei der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung der Reaktionen aus.

Um die PCR-Tauglichkeit der eingesetzten DNA-Präparationen nachzuweisen wurde in Parallelansätzen aus jeder DNA-Probe ein 1100 bp-Fragment des AtPPT2 mit entsprechenden Oligonukleotiden amplifiziert.

PCR-Reaktion:

1/10 Vol	genomische DNA (nach 2.2.3.2)
0,1 mM	dNTPs, jeweils
0,5 µM	Oligonukleotid 1 (genspezifisches Oligonukleotid)
0,5 µM	Oligonukleotid 2 (auf den Promotorbereich des Konstruktes passendes Oligonukleotid)
1/10 Vol	10 x Reaktionspuffer
1 U	Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden)

Standard-PCR-Programm:

2 min	93°C	
45 s	93°C	}
45 s	48°C*	} 40 Zyklen
80 s	72°C	}
10 min	72°C	
∞	18°C	

* Die Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide an die Matrizen-DNA hängt von der Basensequenz der verwendeten Oligonukleotid-Paare ab. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bei allen eingesetzten Oligonukleotid-Paaren eine Anlagerungstemperatur von 48°C gewählt.

2.2.3.4. Präparation von RNA aus Pflanzengewebe

Pflanzliche RNA wurde sowohl bei der Weiterverwendung für RNA-Blots als auch als Ausgangspunkt für die Herstellung von radioaktiv markierten cDNA-Sonden nach der Methode von Eggermont et al. (1996) isoliert und gereinigt. Während der gesamten Präparation wurde der Hautkontakt mit Einwegmaterialien vermieden.

Mindestens 20 mg gefrorenes Blattmaterial wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser pulverisiert, in 1 ml eines 1:1-Gemisches aus Extraktionspuffer und PCI aufgenommen und bis zum Auftauen weitergemörsert. Die Suspension wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, maximal 15 min auf Eis inkubiert und dann 5 min zur Phasentrennung bei 10.000 xg zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde abgenommen und in frische Reaktionsgefäße überführt, das gleiche Volumen PCI hinzugegeben und die Gefäße 30 s geschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 10.000 xg herbeigeführt, die Oberphase zum gleichen Volumen CI gegeben und wie vor geschüttelt und zentrifugiert. Zum wäßrigen Überstand wurde $\frac{1}{2}$ Volumen 8 M LiCl gegeben, die Proben 1 h bei -20°C inkubiert und die RNA danach 10 min bei 10.000 xg sedimentiert. Das Sediment wurde mit 400 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und das Ethanol möglichst vollständig abgenommen. Ethanolreste wurden unter dem Abzug verdampft, das getrocknete Sediment in 40 µl DEPC-H₂O_{dd} resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Extraktionspuffer:

100 mM NaOAc
1 mM Na-EDTA
4 % (w/v) SDS

DEPC-H₂O:

0,2 % (v/v) DEPC

Das Gemisch wurde 1 h gerührt und danach autoklaviert.

8 M LiCl:

8 M LiCl
0,2 % (v/v) DEPC

Das Gemisch wurde 1 h gerührt und danach autoklaviert.

PCI:

H₂O-gesättigtes Phenol (s.u.) : Chloroform : Isoamylalkohol (v/v/v) 25 : 24 : 1

CI:

Chloroform : Isoamylalkohol (v/v) 24:1

H₂O-gesättigtes Phenol:

Kristallines Phenol wurde in der gleichen Masse H₂O_{dd} aufgenommen, 3 h gerührt, in einen Scheidetrichter überführt und die untere organische Phase nach der Phasentrennung weiterverwendet und in getönten Glasgefäßen gelagert.

2.2.3.5. Elektrophorese von RNA

Da die Konformation von Nukleinsäuren entscheidend Laufeigenschaften bei der Elektrophorese beeinflusst, muß bei einzelsträngigen RNA-Molekülen durch denaturierende Agentien wie Formamid und Formaldehyd wie in der von Lehrach et al. (1977) entwickelten Methode sichergestellt werden, daß alle identischen RNA-Moleküle auch während der Elektrophorese eine uniforme Konformation aufweisen.

Es wurden sowohl Auftrennungen in RNA-Gelen zur Quantifizierung der RNA als auch präparative RNA-Gele zur Verwendung in RNA-Blot-Experimenten (s. 2.2.3.8) eingesetzt.

Von jeder Probe wurden für analytische Gele 45 μ l Beladungsmix bzw. 95 μ l Beladungsmix für präparative Gele vorbereitet. Die Ansätze wurden 15 min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Jeder Probenansatz wurde nachfolgend mit 5 μ l Ethidiumbromidlösung (1 mg Ethidiumbromid/ml) versetzt und der Inhalt des Reaktionsgefäßes kurz durchmischt. Danach wurden die Ansätze wenige Sekunden anzentrifugiert, die Proben auf Eis zwischengelagert und auf ein 1%iges RNA-Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte bei 130V für ca. 1,5 h. Das Gel wurde nach Abschluß des Laufes wie unter 2.2.3.7 beschrieben bearbeitet und ausgewertet.

RNA-Agarosegel (1%):

1% (w/v)	Agarose	
12 ml	10 x RB	
8 ml	Formaldehyd	ad 120 ml H ₂ O _{bidest.}

Die Agarosesuspension wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, nach dem Abkühlen wurden 10 x RB und Formaldehyd zugegeben. Der Laufpuffer ist 1 x RB.

10 x RB:

200mM	MOPS, pH 7,0 / NaOH
30mM	NaOAc
5mM	EDTA in H ₂ O _{bidest.}

Beladungsmix für RNA-Agarosegele (pro Ansatz):

6,25 μ l	Formaldehyd	
20 μ l	deionisiertes Formamid	
5 μ l	10 x RB	ad 45 μ l bzw. 95 μ l (s.o.) RNA-Lösung

Formamid, deionisiert:

Formamid wurde mit 3,3% (w/v) AG 501-X8 Kationenaustauscherharz für 30 min gerührt und anschließend bei Raumtemperatur gefiltert.

2.2.3.6. Photometrische Quantifizierung von RNA

Wie auch DNA absorbiert RNA maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Aus der Absorption der Lösungen bei $\lambda = 260$ nm kann unter Kenntnis des Extinktionskoeffizienten der RNA bei dieser Wellenlänge die RNA-Konzentration

berechnet werden. Verunreinigungen durch Proteine, Kohlenhydrate, Phenol, sowie Phenolderivate werden über die Absorption der Lösungen bei $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 230$ nm abgeschätzt. Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte bei reinen RNA-Lösungen zwischen 1,6 und 1,7 liegen. Der Meßwert bei $\lambda = 230$ nm sollte ebenso wie der bei $\lambda = 325$ nm möglichst gering sein. Eine Extinktionsdifferenz (ΔE) von 0,025 entspricht einer RNA-Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lösung. Die Kenntnis der Konzentration von RNA-Präparationen ist für den korrekten Einsatz von RNA-Mengen für nachfolgende Experimente wichtig.

Ein Volumen von 1 μl der RNA-Präparationen wurde mit DEPC-H₂O (s. 2.2.3.4) 1:200 verdünnt und die Bestimmung der Extinktion erfolgte bei den Wellenlängen $\lambda = 230$ nm, $\lambda = 260$ nm, $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 325$ nm am Photometer (Ultrospec III, Pharmacia, Freiburg). Die Meßwerte wurden durch eine zuvor mit 200 μl DEPC-H₂O aufgenommenen Grundlinie über den gesamten Meßbereich der $_H$ -Lampe korrigiert. Aufgrund der bisweilen auftretenden beachtlichen Verunreinigungen der Proben mit Kohlenhydraten wurden zur Einstellung von gleichen RNA-Mengen für weiterführende Experimente die Quantifizierung nach 2.2.3.7 vorgezogen.

2.2.3.7. Abschätzung von Nukleinsäurekonzentrationen in Agarosegelen

Ethidiumbromid hat die Eigenschaft zwischen die Basen von Nukleinsäuren zu interkalieren. Der ursprünglich im Stapel vorliegende, thermodynamisch favorisierte Abstand zwischen den hintereinanderfolgenden Basen wird dadurch geändert, das betreffende Molekül, entweder RNA oder DNA, wird gestreckt. Der so gebildete Komplex kann durch UV-C-Licht zur Fluoreszenz im Orangebereich angeregt werden. Die Anzahl emittierter Quanten ist nach Sharp et al. (1973) proportional zur Anzahl der Nukleinsäuremoleküle an der entsprechenden Stelle im Agarosegel und kann densitometrisch analysiert werden.

Die Agarosegele wurden nach der Beendigung des Gellaufes aus der Elektrophoresekammer entfernt, auf einen UV-Tisch plaziert und mit einem Bildbearbeitungsgerät (Intas, Göttingen) fotografisch dokumentiert. Die resultierenden Bilder wurden als TIFF-Dateien gespeichert, die mit Hilfe des Programmes *NIH Image Quant 1.60/ppc* ausgewertet werden konnten. Dabei konnte über die Verteilung der Pixeldichte (= Helligkeit) in den jeweiligen Gelspuren integriert und die Flächen unter den interessanten Banden durch das Programm berechnet und zueinander in Relation gesetzt werden.

Durch die densitometrische Analyse der rRNA-Banden konnten etwa gleiche Mengen RNA für den Transfer auf Nitrozellulose-Membranen (s. 2.2.3.8) oder die Anreicherung von mRNA (s. 2.2.3.12) eingesetzt werden.

DNA-Mengen konnten durch den Vergleich der Quantifizierungsergebnisse der aufgetragenen Proben mit denen des Molekulargewichtsmarkers bekannter Konzentration abgeschätzt werden..

Marker für DNA-Agarose-Gele:

100 µl	1 kb-DNA-Leiter [1 µg/µl], GibcoBRL	
100 µl	10x Stop	ad 1 ml H ₂ O _{dd}

2.2.3.8. RNA-Transfer von Agarosegelen auf Membranen (RNA-Blot)

Die Übertragung von RNA auf Nitrozellulosemembranen erfolgt nach Chomczynski (1992) über Hochsalzpuffer (10x SSC) und ist in Standardwerken beschrieben (Ausubel et al., 1997).

Für den Transfer wurden Biodyne B-Membranen (Pall, Portsmouth, UK) und etwa 30 µg der Gesamt-RNA (s. 2.2.3.4) pro Spur eingesetzt.

2.2.3.9. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Bei der Herstellung radioaktiv markierter DNA-Fragmente nach Feinberg und Vogelstein (1983) wird ³²P über die α-Phosphatgruppe von α-[³²P]-dATP in das Zucker-Phosphat-Rückgrat enzymatisch synthetisierter Nukleinsäuren eingebaut. Die Nukleation der DNA-Synthese erfolgt dabei an Hexanuklotiden, die statistisch alle 4000 Nukleotide an den Matrizenstrang binden (*random priming*).

2.2.3.9.1. Sondensynthese

30 ng isolierter DNA-Fragmente wurden mit 10 µl Oligomarkierungspuffer versetzt und mit H₂O_{dd} so aufgefüllt, daß nach Zugabe der restlichen Komponenten ein Gesamtvolumen von 50 µl in den Reaktionsgefäßen vorlag. Die Ansätze wurden für 10 min auf 95° C zur Denaturierung der DNA-Stränge erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen und Anzentrifugieren der Lösung wurden 2 µl BSA ([1 µg/µl]) und 2 µl Klenow-Fragment (Boehringer, Mannheim - [2 U/µl]), sowie 40 µCi [³²P]dATP (ICN, Aurora/ USA) hinzugegeben und die Ansätze für mindestens 2 h bis maximal 6 h bei 37° C inkubiert.

Oligomarkierungspuffer:

Der Oligomarkierungspuffer wurde aus drei getrennt angesetzten Lösungen hergestellt.

Lösung A:

1,25 M	Tris/HCl pH 8,2
125 mM	MgCl ₂
2 Vol%	β-Mercaptoethanol
je 0,5 mM	dNTPs

Lösung B:

2 M	Hepes/NaOH; pH 6,6
-----	--------------------

Lösung C:

3,6 µg/µl	Desoxyhexanukleotide (Boehringer, Mannheim)
-----------	---

Die Lösungen A, B und C wurden aliquotiert, bei -20°C gelagert und im Volumenverhältnis (v/v/v) 1 : 2,5 : 1 gemischt.

2.2.3.9.2. Kontrolle der Einbaurate

Die Einbaurate wurde vor Reinigung und Verwendung der Sonden kontrolliert, um dem Einsatz evtl. zu niedriger spezifischer Aktivitäten vorzubeugen. War die Einbaurate zu gering, so konnte die Inkubationszeit verlängert werden.

1,5 µl der Markierungsreaktionen wurden mit 100 µl H₂O_{dd} verdünnt und die DNA nach Zugabe von 2 µl Träger-DNA (10 mg/ml Heringsspermen-DNA) mit 130 µl 20%iger Trichloressigsäure (TCA) für 5 min auf Eis gefällt. Nachfolgend wurden die Ansätze 7 min bei 13.000 U·min⁻¹ (17.900 xg) zentrifugiert und die Überstände vollständig in neue Einweg-Reaktionsgefäße überführt. Nun wurde die Radioaktivität des Sedimentes und des wäßrigen Überstandes mit dem Zählrohr gemessen und die prozentuale Verteilung des ³²P berechnet. Ab einer Markierungsrate von mindestens 70% wurden die Ansätze weiter aufgearbeitet.

2.2.3.9.3. Reinigung der DNA-Sonden

S200 *spin columns* (Pharmacia, Freiburg) wurden zum Resuspendieren des Säulenmaterials mehrfach invertiert, geöffnet und in Einmal-Reaktionsgefäße gestellt. Der Puffer der Säulen wurden durch Zentrifugation für 1 min bei $3.100 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ (1.000 xg) mit leicht gelöstem Säulenschraubdeckel abgetrennt. Nach dem Auftrag des Restvolumens der Markierungsansätze wurden Säulen und Reaktionsgefäße für 2 min bei $3.100 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ ($1000 \times \text{g}$) zentrifugiert, wobei die Sonden in neuen Reaktionsgefäßen aufgefangen wurden. Die Eluate wurden anschließend mit $100 \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt und wurden für 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und schließlich in das Prähybridisierungsmedium (s. 2.2.3.10) gegeben. Es wurden spezifische Aktivitäten zwischen 380 und $510 \text{ Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ Sonde ($\equiv 2,5 \text{ mCi}\cdot\mu\text{g DNA}^{-1}$) erzielt. Alternativ konnten die Eluate nach der Verdünnung auch bei -20°C bis zur Verwendung gelagert werden.

2.2.3.10. Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden mit RNA-Blots

RNA-tragende Nitrozellulosemembranen wurden im Hybridisierungssofen unter Rotation 30 min bei 68°C in Church-Puffer prähybridisiert. Die wie unter 2.2.3.9 vorbereitete radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde hinzugefügt und über Nacht bei 58°C hybridisiert.

Church-Puffer:

0,5 M	NaH_2PO_4 , pH 7,2
7 % (w/v)	SDS
1 mM	EDTA

2.2.3.11. Waschen der hybridisierten Nitrozellulosemembranen

Am nächsten Morgen wurde die Hybridisierungslösung in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und bei -20°C bis zur erneuten Verwendung oder bis zum Abklingen gelagert. Die Membranen wurden jeweils 5 min bei Raumtemperatur mit steigender Stringenz in $6 \times \text{SSC}/ 0,5 \%$ SDS, $4 \times \text{SSC}/ 0,5 \%$ SDS und $2 \times \text{SSC}/ 0,5 \%$ SDS gewaschen. Danach werden die Membranen maximal 15 Minuten in $2 \times \text{SSC}/ 0,5 \%$ SDS und bei Bedarf weitere Minuten in $1 \times \text{SSC}/ 0,5 \%$ SDS bei 65°C im Hybridisierungssofen durchgeführt, wobei die auf der Membran verbliebene Radioaktivität auch während der Waschungen mit dem Monitor überwacht wurde.

Die Membranen werden feucht in Gefrierbeutel eingeschweißt und über Nacht bis mehrere Tage auf Bildspeicherfolien des *Phosphoimagers* (Molecular Dynamics, Krefeld) exponiert.

2.2.3.12. Anreicherung von mRNA in RNA-Präparationen

Die Anreicherung von mRNA wurde mit dem *QuickPrep® Micro* Reaktionsbausatz (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers mit leichten Modifikationen und unter akribischem Ausschluß möglicher RNase-Kontaminationen durchgeführt.

Ungefähr 40 µg Gesamt-RNA wurden aus einer DEPC-H₂O-Lösung (s. 2.2.3.4) heraus mit Extraktionspuffer (Amersham Pharmacia, Bestandteil des Bausatzes) auf 0,4 ml aufgefüllt und mit 0,8 ml Elutionspuffer (Amersham Pharmacia, Bestandteil des Bausatzes) verdünnt. Die Ansätze wurden 1 min bei 14.000 U·min⁻¹ (20.800 xg) anzentrifugiert und 1 ml des Überstandes auf das Sediment von 1 ml in gleicher Weise zentrifugierter Oligo(dT)-Zellulose (Amersham Pharmacia, Bestandteil des Bausatzes) pipettiert und 10 min gründlich durch Invertieren vermischt. Die Oligo(dT)-Zellulose-Partikel wurden durch kurzes Anzentrifugieren sedimentiert, der Überstand abgehoben und 1 ml Hochsalzpuffer (Amersham Pharmacia, Bestandteil des Bausatzes) hinzugegeben. Es schlossen sich weitere zwei Waschschrte mit Hochsalz- und drei weitere Waschschrte mit Niedrigsalzpuffer (Amersham Pharmacia, Bestandteil des Bausatzes) an, bei denen die Oligo(dT)-Zellulose-Partikel wie vor abgetrennt wurden. Das Sediment des letzten Waschschrtes wurde in 0,3 ml Niedrigsalzpuffer resuspendiert und in leere *MicroSpin®*-Säulchen (Bestandteil des Reaktionsbausatzes, Amersham Pharmacia) transferiert. Die Säulchen wurden in leere Einweg-Reaktionsgefäße gestellt und 5 s anzentrifugiert. Das Säulenmaterial wurde noch dreimal mit 0,5 ml Niedrigsalzpuffer gewaschen und die mRNA danach mit 0,2 ml auf 72°C temperiertem Elutionspuffer eluiert. Zum Eluat wurden 1/10 Volumen 2,5 M KOAc (Amersham Pharmacia, Bestandteil des Bausatzes) und 1 ml Ethanol gegeben und die mRNA über Nacht bei -20°C gefällt und bei Bedarf in dieser Form bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3.13. Synthese radioaktiv markierter cDNA-Sonden

Die unter 2.2.3.12 gefällte mRNA wurde 5 min bei 14.000 U·min⁻¹ (20.800 xg) präzipitiert, der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das restliche Ethanol im Abzug verdunstet. Das getrocknete Sediment wurde in 5 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen,

5 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (1 µg/ µl) hinzugegeben, das Gemisch 10 min bei 70°C denaturiert und unmittelbar danach auf Eis gestellt. In die Reaktionsgefäße wurden dann 5 µl 5 x Erststrangpuffer (GibcoBRL, Karlsruhe), 2,5 µl 0,1 M DTT (Gibco BRL, 1 µl dNTP-Mix und 50 µCi α-[³²P]-dATP (unstabilisiert, ICN, Eschwege) hinzupipettiert und die Ansätze 5 min bei 42°C inkubiert. Pro Ansatz wurden 100 U M-MLV-Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim) hinzugefügt und die Sondensynthese erfolgte dann für 75 min bei 42°C. Die Reaktionen wurden 15 min bei 70°C abgestoppt und die RNA-Matrizen 30 min bei 37°C mit 2 U RNase H abgebaut. 1 µl Aliquots der Proben wurden einem Einbautest (s. 2.2.3.9.2) unterzogen. Die cDNA-Sonden wurden ab einer Einbaurrate von 15 % verwendet und wie unter 2.2.3.9.3 beschrieben für die Hybridisierung mit den Membranen vorbereitet. Die eingesetzten spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 10 und 32 Ci·nmol⁻¹ Sonde (≡ 25 bis 90 µCi·µg cDNA⁻¹).

2.2.3.14. Herstellung von Membranen für die Transkriptomanalyse

Mit Hilfe des TBlastN-Algorithmus wurden ESTs aus *A. thaliana* aufgrund ihrer Homologie zu annotierten Genen aus *A. thaliana* und anderen Dikotyledonen ausgesucht und die zugehörigen Stammkulturen der λ-PRL2- und CD4-EST-Banken vom ABRC (Ohio State University, Columbus, Ohio) geordert. Homologiezuordnungen wurden als solche akzeptiert, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeiten dafür statistisch kleiner als 10⁻²⁵ waren.

Vom ABRC bezogene *E. coli*-Stammkulturen (s. Anhang 8.1) wurden bei -80°C gelagert und bei der Herausnahme der Mikrotiterplatte zum Ausstreichen der Kulturen auf Selektions-Platten auf Trockeneis gestellt. Mit einer Impföse wurde dann etwas Substanz der gefrorenen Stammkultur auf LB-Amp-Platten (s. 2.2.2.1.1) ausgestrichen und diese über Nacht bei 37°C bebrütet. Für jede Ausgangsstammkultur des ABRC wurde eine Kolonien wie in 2.2.2.1.1 beschrieben vermehrt, Stammkulturen dieser Kolonien angelegt (s. 2.2.2.1.1) und Plasmid-DNA (s. 2.2.3.1) gewonnen. In Sequenzreaktionen (2.2.3.23) wurde die Übereinstimmung der amplifizierten Fragmente mit den EST-Sequenzen aus der Datenabanksuche verifiziert. Die DNA-Konzentrationen der Plasmid-Präparationen wurden dann densitometrisch (s. 2.2.3.7) bestimmt, auf 200 pg DNA/µl verdünnt, in mehrere Mikrotiterplatten nach feststehendem Schema aliquotiert und die Mikrotiterplatten bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die unverdünnten Plasmid-Präparationen wurden parallel gleichsam aufbewahrt.

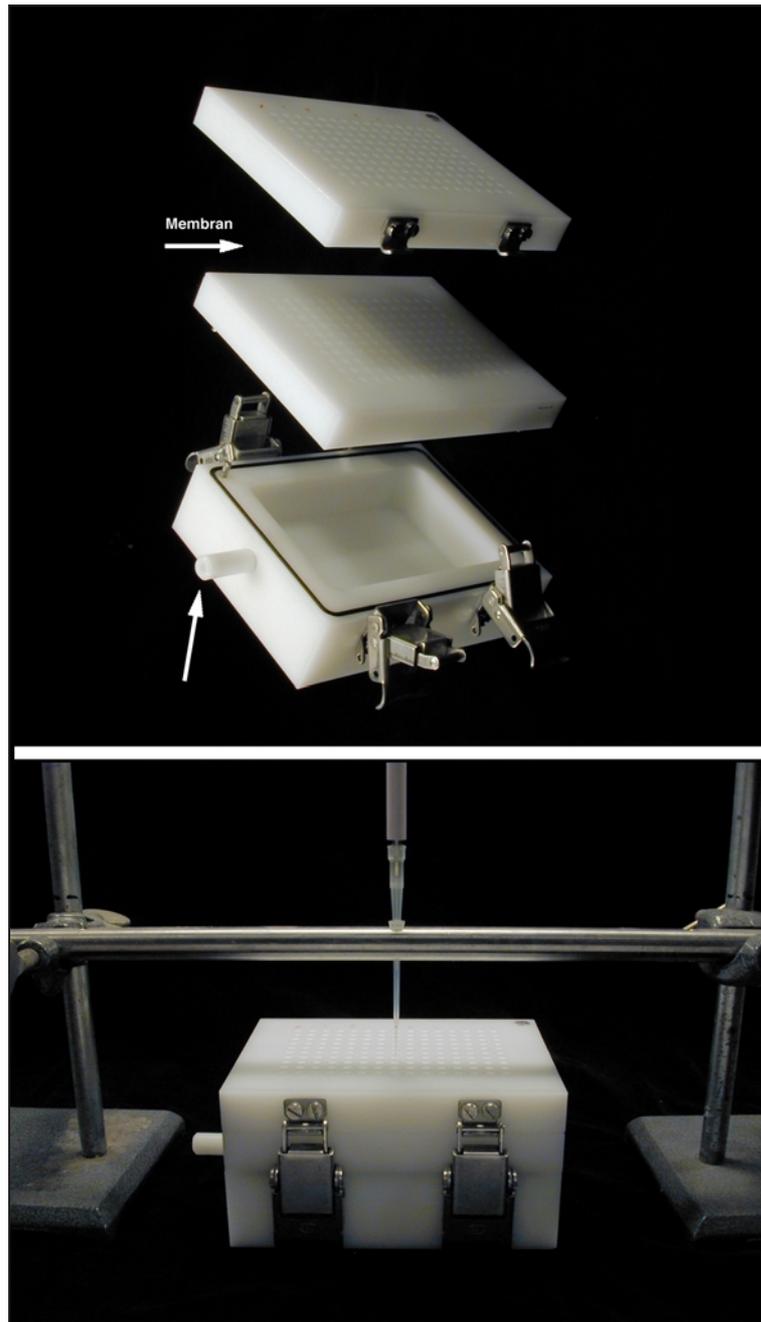


Abb. 2.2 oben: Einzelteile der Auftragsapparatur zur Herstellung der Membranen für die Transkriptomanalyse. Die Membranen wurden in 0,2 M NaOH getränkt und zwischen den beiden obersten Blöcken eingesetzt (s. beschrifteter Pfeil), die Knebelverschlüsse geschlossen, die Proben wie im unteren Teil der Abbildung gezeigt aufgetragen, und schließlich ein Vakuum angelegt (Stutzen für den Anschluß der Vakuumpumpe s. Pfeil links).

1 μ l der aliquotierten Plasmid-DNA-Verdünnungen (200 pg/ μ l) wurden in PCR-Reaktionen eines Gesamtvolumens von 100 μ l mit geeigneten Primern (s.u.) aus den MCS der entsprechenden Vektoren amplifiziert, 1/100 Vol der PCR-Ansätze zur Kontrolle auf Agarosegelen aufgetrennt und die Konzentration der Fragmente anhand der

densitometrischen Analyse der Bandenintensitäten (s. 2.2.3.7) bestimmt. Ein Volumen, das jeweils 1 µg der PCR-Fragmente entsprach, wurde mit Applikationslösung auf 330 µl aufgefüllt und für den punktförmigen Auftrag auf mit 0,2 M NaOH benetzten Hybond N⁺-Membranen (Amersham, Chalfont, GB) einer Serie verwendet. Jede Membranserie bestand aus einem Paar vollständiger EST-Fragment-Sätze, die auf jeweils drei Membranen nach Größenklassen - I) 400 – 900 bp; II) 900 – 1200 bp; III) 1200 – 3000 bp - aufgeteilt waren.

80 µl der Applikationslösungen wurden manuell mit ausgezogenen Kristallspitzen (Sorenson, Salt Lake City, USA) an zwei verschiedenen Positionen der Membranen aufgetragen, die in eine selbstgefertigte Auftragsapparatur (s. Abb. 2.2, Werkstatt des Botanischen Instituts, Köln) eingespannt waren. Mit den Applikationslösungen aus einer PCR-Reaktion konnten also jeweils Doppelaufträge auf zwei Membranen bestritten werden, von denen eine bei der Transkriptomanalyse für die Kontrolllinie und eine für die Mutante bzw. Komplementäre eingesetzt wurde.

Mit Hilfe einer Membranpumpe wurde 2 min lang ein Unterdruck an die Auftragsapparatur angelegt, sobald alle Positionen der Membran beschickt waren. Die Membranen wurden aus der Apparatur ausgespannt, 2 h bei 80°C gebacken und anschließend ohne weitere Behandlung für die Hybridisierungen mit Oligonukleotid-Sonden (2.2.3.18) zur Überprüfung des gleichmäßigen Auftrags oder cDNA-Sonden (2.2.3.15) zur Transkriptomanalyse eingesetzt.

PCR-Reaktion:

1 µl	Plasmid-DNA (200 pg/µl)
20 µM	dNTPs, jeweils
50 nM	Oligonukleotid 1 (T7-pBSC-SK)
50 nM	Oligonukleotid 2 (λ-PRL2-Klone: EMBL3-SP6 CD4-Klone: T3-pBSC-SK)
1/10 Vol	10 x Reaktionspuffer
1 U	Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden)

PCR-Programm:

2 min	93°C	
45 s	93°C	}
45 s	60°C	} 40 Zyklen
80 s	72°C	}
10 min	72°C	
∞	18°C	

Applikationslösung:

1/160 Vol	0,04 % (w/v) Bromphenolblau in 1 M Tris/ HCl, pH 7,5
0,2 M	NaOH

2.2.3.15. Hybridisierung von Membranen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden

Die nach 2.2.3.14 hergestellten Membranen wurden ohne weitere Vorbehandlung mit der DNA-tragenden Seite nach oben in Hybridisierungsröhrchen gesteckt. Diese wurden mit 25 ml APH gefüllt und anschließend 2 h im Hybridisierungsofen bei 65° C zur Prähybridisierung rotiert. Die denaturierten cDNA-Sonden (s. 2.2.3.13) wurden jeweils auf drei Hybridisierungsröhrchen aufgeteilt, die gemeinsam den kompletten Satz der EST-Fragmente abdeckten.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65° C unter Rotation der Hybridisierungsröhrchen. Die für die Hybridisierung eingesetzte Aktivität lag zwischen 80 und 160 nCi·cm⁻² Membranfläche. Jede Membran wurde nur einmal für eine Hybridisierung mit cDNA-Sonden eingesetzt.

APH:

4 ml	20 x SSC
1 ml	100 x Denhardt's
1% (w/v)	SDS
400 µl	Heringsspermen-DNA (10 mg/ml)

ad 100 ml H₂O_{dd}

Die Heringsspermen-DNA wird erst kurz vor der Verwendung 10 min bei 95° C denaturiert und in die auf 65° C vorgewärmte Lösung gegeben.

100 x Denhardt's:

2% (w/v) Ficoll 400

2% (w/v) PVP

2% (w/v) BSA

Die Lösung wurde steril filtriert (FP030/2; 0,45 µm Porendurchmesser, Schleicher & Schuell, Dassel) und danach aliquotiert bei -20° C gelagert.

20 x SSC:

3 M NaCl

0,3 M Natrium-Citrat

pH 7,5 / NaOH

Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert.

2.2.3.16. Waschen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisierter Membranen

Die benutzten Hybridisierungsmedien wurden nach Beendigung der Hybridisierung wie unter 2.2.3.11 beschrieben bis zum Abklingen der Radioaktivität gelagert. Die Ablösung unspezifisch an die Membran gebundener Sonden erfolgte durch jeweils zwei Waschschrte bei 65°C mit 2x SSC/ 0,1% SDS bei 65°C und 1x SSC/ 0,1% SDS. Die an den Membranen verbliebene Radioaktivität wurde während der Waschungen mit einem Zählrohr überwacht. Die Membranen wurden feucht und luftblasenarm in Gefrierfolie eingeschweißt und zur Visualisierung und weiteren 2 d auf Bildspeicherfolien des *PhosphorImagers* (s. 2.2.3.11) exponiert.

2.2.3.17. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mit Hilfe des *Oligonucleotide Labelling Kit* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) radioaktiv mit ³³P am 5'-Ende markiert und unter Zuhilfenahme des *QIAquick Nucleotide Removal Kit* Reaktionsbausatzes (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Markierung mit ³³P erhielt aufgrund geringerer Überstrahlungseffekte benachbarter Signale den Vorzug gegenüber einer Markierung mit ³²P. Außerdem behinderten nicht ganz vollständig von den Membranen entfernte Oligonukleotid-Sonden die spätere Hybridisierung mit ³²P-markierten cDNA-Sonden vergleichsweise gering.

In jeden Markierungsansatz wurden 5 pmol T7-pBSC-SK-Primer (s. 8.2), 1/10 Volumen 10 x Puffer B (MBI Fermentas, Bestandteil des Reaktionsbausatzes), 4 µl PEG-6000 (MBI Fermentas, Bestandteil des Reaktionsbausatzes), 1 µl Bakteriophagen T4-Kinase (MBI Fermentas, Bestandteil des Reaktionsbausatzes) und 60 µCi [γ -³³P]-ATP (ICN, Eschwege) gegeben, mit H₂O_{dd} auf 20 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 80 µl PN-Puffer (Bestandteil des Qiagen-Reaktionsbausatzes) hinzupipettiert und wie vom Hersteller angegeben aufgereinigt (*QIAquick Spin Handbook* 01/99, S. 22/3).

Um den Einbau des markierten Phosphats quantifizieren zu können wurden 1 µl [γ -³³P]-ATP Stammaktivität 1:500 verdünnt und verschiedene Volumina dieser Lösung im Szintillationszähler LS7500, Programm 3, Kanal 1 (Beckman, München) nach Zugabe von 2 ml Szintillationscocktail (Rotiszint EcoPlus, Roth) gezählt. Die Durchflüsse der säulengebundenen Oligonukleotidreinigung wurden vereinigt und ein Aliquot dieser Lösung ebenfalls in gleicher Weise im Szintillationszähler gezählt. 40 bis 70% der vorgelegten Radioaktivität konnten in den Oligonukleotidsonden wiedergefunden werden, was spezifischen Aktivitäten von 4 bis 9 Ci·µmol⁻¹ entspricht.

2.2.3.18. Hybridisierung von Membranen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden

Durch die Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonden konnte der gleichmäßige Auftrag der EST-Fragmente auf die Membranen kontrolliert werden.

Mehrere komplette Membransätze (s. 2.2.3.14) wurden 2 h bei 4°C in 40 µg Heringsspermen-DNA/ml 1 x SSare prähybridisiert. Dabei wurden für jede der drei Membranen eines Membransatzes 15 ml Lösung eingesetzt. Die unter 2.2.3.17 markierten und aufgereinigten Oligonukleotid-Sonden wurden zu gleichen Teilen auf die zu testenden Membranen aufgeteilt, den Prähybridisierungsmedien zugesetzt und die Hybridisierung über Nacht bei 4°C durchgeführt.

10 x SSare:

7 % (w/v)	Sarcosyl
4 x	SSC (s. 2.2.3.15)
4 mM	EDTA

2.2.3.19. Waschen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden hybridisierter Membranen

Die mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden hybridisierten Transkriptomanalyse-Membranen (2.2.3.18) wurden 30 s bei 48°C in 1 x SSare (s. 2.2.3.18) gewaschen und wie in 2.2.3.11 beschrieben auf Bildspeicherfolien des *PhosphoImagers* (Molecular Dynamics, Krefeld) exponiert.

2.2.3.20. Entfernen der an die Membran gebundenen markierten Oligonukleotide

Vor der Weiterverwendung der Membranen (2.2.3.14) für die Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden (2.2.3.13) wurden die gebundenen Oligonukleotid-Sonden 2 h bei Raumtemperatur mit Stripping-Lösung von den Membranen abgewaschen und feucht in Stripping-Lösung gelagert.

Stripping-Lösung:

4 mM	NaOH
0,1 % (w/v)	SDS
0,1 x	SSC (s. 2.2.3.15)

2.2.3.21. Einlesen von Bildspeicherfolien mit dem *PhosphoImager*

Die in Gefrierfolie eingeschweißten Membranen (s. 2.2.3.11, 2.2.3.16 und 2.2.3.19) wurden in eine strahlungsabsorbierende Schatulle gelegt und eine Bildspeicherfolie mit der weißen, sensitiven Seite nach unten aufgelegt. Je nach Intensität der von den Membranen ausgehenden Radioaktivität konnte die Exposition der Platte von 5 h bis zu einer Woche reichen. Danach wurden die Platten mit dem *Storm 860* (Molecular Dynamics, Krefeld) eingelesen und ein virtuelles Abbild der Signalverteilung durch das Programm *Image Quant* (Molecular Dynamics, Krefeld) berechnet. Die vom Programm generierten Grafiken wurden im TIFF-Format gespeichert und mit dem Programm *ScanAlyze v2.35+* (Shareware) analysiert.

2.2.3.22. Densitometrische Auswertung der Membranen der Transkriptomanalyse

Die generierten TIFF-Dokumente (2.2.3.21) wurden in Adobe Photoshop invertiert und dann mit dem Programm *ScanAlyze* (2.2.3.21) geöffnet. Für jeden untersuchten

Membransatz wurden individuelle Gittergruppen erstellt und die vom Programm ausgegebenen Daten der Analyse zugrundegelegt.

In der vergleichenden Auswertung wurden nur die Datenpaare berücksichtigt, bei denen der relative Fehler der Signale eines Doppelauftrages in beiden Membransätzen (2.2.3.14) geringer als 60% war und bei denen mindestens 50% der jeweils eingeschlossenen Pixel den Werte des Hintergrundes um den Faktor 1,5 überstiegen.

2.2.3.23. DNA-Sequenzierungen

Die enzymatische Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) ist ein enzymatisches Verfahren und wird mittlerweile in modifizierter und automatisierter Form angewendet. Außer dNTPs werden auch 2,3-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zu linearen PCR-Ansätzen gegeben. Die enzymatische Kettenverlängerung bricht ab, sobald ein 2,3-Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) in den neu synthetisierten DNA-Strang inkorporiert wird. Im verwendeten System ist jedes ddNTP mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert (Big Dye, Perkin Elmer, Foster City/ USA), so daß die Abbruchsfragmente im Sequenzierer (Perkin Elmer, ABI Prism 310) über Kapillarelektrophorese aufgetrennt und über die vier verschiedenen Fluoreszenzsignale detektiert werden können. Durch die Überlagerung der vier charakteristischen Fluoreszenzprofile kann die Sequenz der in der PCR eingesetzten DNA anhand des Musters der Fluoreszenzmaxima gelesen werden.

2.2.3.23.1. Reinigung der DNA für die Sequenzierungsreaktion

Eine Plasmid-DNA-Präparation (s. 2.2.3.1) wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf 100 μl aufgefüllt, 5 μl DNase-freie RNase hinzugefügt und die in der Präparation befindliche RNA für 1 h bei 37° C abgebaut. Anschließend wurden 200 μl PCI (s. 2.2.3.4) in die Reaktionsgefäße hinzugegeben, diese für 3 min auf dem Schüttler geschüttelt und für 5 min bei 13.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ (17.900x g) zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde abgehoben und noch je einmal in gleicher Weise mit PCI und CI (s. 2.2.3.4) ausgeschüttelt. Zum letzten Zentrifugationsüberstand wurden in frischen Reaktionsgefäßen _ Volumen 7,5 M NH_4OAc und 3 Volumen Rotisol gegeben, die Ansätze durchmischt und die DNA für mehr als 30 min bei -20° C gefällt und anschließend bei 14.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ (20.800x g) für 5 min sedimentiert. Die Überstände wurden abgenommen und verworfen, die Sedimente zweimal mit 500 μl Rotisol gewaschen. Verbliebenes Rotisol des letzten Waschschrilles wurde anschließend 7 min im Exsiccator unter Anlegen eines Vakuums abgezogen. Die

Sedimente wurden schließlich in 40 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgenommen und lagen nun befreit von Proteinen, Ethanol, Phenol und störenden Salzen vor. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1 μl Aliquots der aufgereinigten DNA auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.3.23.2. Lineare PCR und Vorbereitung der Produkte für die Sequenzierung

In 0,2 ml-Reaktionsgefäßen (Perkin Elmer, Foster City/ USA) wurden 2 μl Big Dye-Prämix (Perkin Elmer, Foster City/ USA), 1 μg Plasmid-DNA und 10 pmol Oligonukleotid mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf 10 μl aufgefüllt, die Gefäße in den auf 90° C vorgeheizten Heizblock des PCR-Gerätes (Perkin Elmer 9600) gestellt und das PCR-Programm (s.u.) gestartet.

Nach Beendigung der PCR wurden die Reaktionsansätze in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf 100 μl aufgefüllt, mit 10 μl 3M NaOAc (pH 5,0) und 250 μl Rotisol vermischt und 30 min bei 14.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ (20.800x g) zentrifugiert. Der ethanolische Überstand wurde gründlich abgenommen, das Sediment mit 250 μl 70% Ethanol versetzt und 5 min wie zuvor zentrifugiert. Das Ethanol wurde sorgfältig abgenommen, das Sediment wie unter 2.2.3.23.1 im Exsiccator getrocknet, in 20 μl TSR-Puffer (= *template suppression buffer*, Perkin Elmer) aufgenommen und quantitativ in Sequenzierröhrchen (Perkin Elmer, Foster City/ USA) überführt. Die Sequenzierröhrchen wurden mit speziellen Septen (Perkin Elmer, Foster City/ USA) verschlossen und die Ansätze bis zur Sequenzierung bei 4° C gelagert. Vor der Sequenzierung wurden die Proben 2 min zur Denaturierung der DNA auf 95° C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt.

Die Proben wurden in den Sequenzierer (ABI Prism 310, Perkin Elmer, Foster City/ USA) geladen und die rechnergesteuerte Kapillarelektrophorese gestartet. Mit dem Programm *ABI Prism 310 Diagnostics v1.0* konnten die resultierenden Elektrophoreseprofile analysiert und gegebenenfalls korrigiert werden. Die gelesenen Sequenzen konnten danach zur Identifizierung mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen werden.

PCR-Programm für die Sequenzierung:

20 s	96°C	
10 s	96°C	}
5 s	50°C*	} 30 Zyklen
4 min	60°C	}
∞	4°C	

2.2.4. Biochemische Methoden

2.2.4.1. Auftrennung von Proteinextrakten über SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt.

SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe der Minigel Apparatur System 2050 Midget (Pharmacia, Freiburg) hergestellt, dabei wurden mehrere Gele gemeinsam in einer Apparatur gegossen. Trenngele wurden vor der Polymerisierung mit n-Butanol überschichtet, das nach erfolgter Polymerisierung wieder abgeschüttet wurde. Die Sammelgele nahmen eine Strecke von 1 cm zwischen der Taschenkante und dem Trenngelbeginn ein; die Gesamtmaße der Trenngele betragen (L x B x T) 101 x 82 x 0,75 mm. Polymerisierungsreaktionen wurden durch Zugabe von TEMED gestartet.

Bei der Elektrophorese waren die Kathoden- und Anodenpuffertanks voneinander getrennt und durch die Gele miteinander verbunden. Die Proben (s. 2.2.2.3.3) und Molekulargewichtsmarker (Dalton Mark VII-L, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurden aufgetragen, 10 min bei 10 mA einlaufen gelassen, 5 min bei 40 mA fokussiert und bis die Proteinfront das Ende des Trenngels erreicht hatte bei 25 mA aufgetrennt.

4 x Sammelgelpuffer:

500 mM Tris/HCl, pH 6,8
0,4% SDS

4 x Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
0,4% SDS

Sammelgelzusammensetzung:

25 % (v/v) 4 x Sammelgelpuffer
15 % (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)
0,06 % (w/v) APS
0,3 % (v/v) TEMED

Trenngelzusammensetzung (12,5 % Acrylamid):

25 % (v/v)	4 x Trenngelpuffer
42 % (v/v)	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)
0,05 % (w/v)	APS
0,05 % (v/v)	TEMED

2.2.4.2. Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau

Die Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau erfolgte nach Weber und Osborn (1969). Die Färbelösungen 1 und 2 wurden zu gleichen Teilen gemischt und die SDS-PAGE-Gele 30 min unter leichtem Schütteln darin gefärbt. Die Gele wurden dann in Entfärber überführt und bis zur Entfärbung des Gelhintergrundes und unter einmaligem Wechseln des Entfärbers entfärbt und bei Bedarf fotografisch dokumentiert, sowie in gespannter und in Entfärber getränkter Zellophanfolie mehrere Wochen lang luftblasenfrei getrocknet.

Coomassie Färbelösung 1:

0,5% (w/v)	Coomassie Brilliant Blau (Serva)
80% (w/v)	MeOH

Coomassie Färbelösung 2:

20% (v/v)	HOAc
-----------	------

Entfärber

10% (v/v)	HOAc
40% (v/v)	MeOH

2.2.4.3. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die Übertragung von Proteinen von SDS-Polyacrylamidgelen (2.2.4.1) auf PVDF-Membranen (BioRad, München) wurde im Halbtrockenverfahren nach Khyse-Andersen (1984) in einer Transferkammer mit Carbon-Elektroden (Carboglass, Schleicher & Schuell, Dassel) bewerkstelligt. Der Aufbau der Apparatur und die Vorbereitung der Lösungen erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers der verwendeten Kathoden- und Anodenpuffer (RotiBlot®-System, Roth, Karlsruhe). Vor dem Aufbau des Systems wurde die PVDF-Membran 10 s in Methanol aktiviert. Der Elektrotransfer dauerte 1,5 h bei $1 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ Gelfläche.

2.2.4.4. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach Beendigung des Elektrotrensfers wurde der Bereich der PVDF-Membran mit dem Molekulargewichtsmarker abgetrennt und 30 s in Coomassie-Brilliantblau (2.2.4.2) gefärbt.

Der Rest der Membran wurde zügig in Blockierpuffer überführt und 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur mit BSA abgesättigt. Der primäre, gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichtete Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2500 bis 1:3000 in den Blockierungspuffer gegeben und 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal für 10 min mit TBST-T und einmal 10 min mit TBS gewaschen und anschließend der sekundäre Antikörper einer 1:3000-Verdünnung in Blockierpuffer appliziert. Nach einer 1,5-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran wie nach Entfernen des primären Immunglobulins gewaschen und schließlich solange in Färbelösung geschwenkt, bis Banden des blau gefärbten, unlöslichen Niederschlags aus NBT- und BCPIP-Addukten sichtbar waren. Die Membran wurde dann kurz in H₂O_{dd} überführt, an der Luft getrocknet und zur besseren Konservierung in Folie eingeschweißt.

Am Ende der Inkubationszeiten wurden die Antikörperlösungen in 50 ml-Polypropylenröhrchen überführt und bis zur erneuten Verwendung bei -20°C gelagert. Antikörperlösungen konnten mehrfach wiederverwendet werden.

Färbelösung:

10 ml	Puffer A
66µl	NBT (5 % (w/v) in 70 % DMF)
33µl	BCIP (5 % (w/v) in DMF)

Puffer A:

100 mM	Tris/ HCl, pH 9,5
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂

TBST-T:

10% (v/v)	10x TBS
0,2% (v/v)	Triton X-100
0,05% (v/v)	Tween 20

10x TBS:

0,1 M Tris/HCl, pH 7,4

1,5 M NaCl

2.2.4.5. Bestimmung von Proteinmengen in Lösungen

Bei dem von Bradford (1976) entwickelten Test werden Proteine mit Coomassie-Brilliantblau nachgewiesen. Proteinmenge und Extinktion bei $\lambda = 590$ nm korrelieren nicht linear zueinander, so daß auch die Extinktion bei $\lambda = 450$ nm gemessen und der Quotient A_{590}/A_{450} gebildet wurde. Die Proteinkonzentrationen in den Proben wurden mit Hilfe einer mitgeführten BSA-Eichreihe im Bereich bis 20 μ g BSA berechnet.

Die Proben wurden mit H_2O_{dd} auf 800 μ l aufgefüllt, 200 μ l Roti-Quant (Roth, Karlsruhe) zugegeben, die Reaktionsgefäße gründlich invertiert und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Photometer wurde bei $\lambda = 590$ nm mit einer leeren Einmal-Küvette auf Null abgeglichen, die Extinktionen der Lösungen bei $\lambda = 450$ nm und $\lambda = 590$ nm gemessen und die Proteingehalte anhand der Eichreihe berechnet.

2.2.5. Physiologische Methoden**2.2.5.1. Messungen an intakten Pflanzen****2.2.5.1.1. Statistische Erhebungen**

Die Untersuchungspopulationen von 30 bis 70 Individuen pro Linie wurden gleichzeitig wie unter 2.2.1.2 gekeimt und im Langtag (2.2.1.4) angezogen. Keimungsrate und Blattanzahl wurden alle zwei bis drei Tage manuell aufgenommen. Für die Bestimmung des spezifischen Frischgewichtes wurden mindestens zehn verschiedene Blätter einer jeden Linie während der vegetativen Phase gewogen und ihre Fläche nachträglich ermittelt.

Zu Beginn der reproduktiven Phase wurden jeweils fünf Blattrossetten gewogen und aus den erhobenen Daten die Frischgewichtsproduktion während der vegetativen Phase, sowie das mittlere Blattgewicht und der mittlere tägliche Blattzuwachs bestimmt. Die Anzahl der Schoten wurde gezählt, als die Pflanzen trotz gleichbleibender Kulturbedingungen keine Schoten mehr bildeten.

2.2.5.1.2. Messungen im Pulsamplitudenmodulationsverfahren an intakten Blättern

Dynamische Änderungen der Chlorophyllfluoreszenz wurden mit einer PAM-2000 (Walz, Effeltrich) gemessen. Grundlegende Größen wie F_v (variable Fluoreszenz), F_s (Fluoreszenz im Fließgleichgewicht), F_m' (maximale Fluoreszenz in lichtadaptierten Blättern) F_0 (Grundfluoreszenz in dunkeladaptierten Blättern) und F_m (maximale Fluoreszenz in dunkeladaptierten Blättern) wurden wie in Schreiber et al. (1986) beschrieben während der Experimente alle 10 bis 30 s ermittelt. Die aus den Meßwerten abgeleiteten Parameter q_N (nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung), q_P (photochemische Fluoreszenzlöschung), das F_v/F_m' -Verhältnis, und die ETR (Elektronentransportrate) wurden während der Messungen von den mit dem Gerät gelieferten Programmen nach Schreiber et al. (1986), Φ PSII (Effizienz des Quantentransfers im Photosystem II) nach Genty et al. (1989) berechnet und ausgegeben. Vor der Bestimmung von F_0 und F_m wurden die Pflanzen 20 min dunkeladaptiert. Die Berechnung von q_{NI} (= q_s ; Fluoreszenzlöschung durch Photoinhibition), q_{NT} (= q_m ; Fluoreszenzlöschung durch die Verlagerung von Lichtsammelkomplexen) und q_{NE} (= q_f ; Fluoreszenzlöschung durch den an der Thylakoidmembran anliegenden elektrochemischen Gradienten) erfolgte nach Quick und Stitt (1989). Die Bestimmung von $\%Q_A^-$, dem prozentualen Anteil reduzierten, an Photosystem II gebundenen Plastochinons, wurde mit der Formel $\%Q_A^- = 100 \cdot (1 - q_P)$ in Anlehnung an Schreiber et al. (1986) bestimmt.

2.2.5.2. Präparation physiologisch intakter Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Physiologisch intakte Chloroplasten wurden in kleinem Maßstab in modifizierter Form nach Kunst (1998) aus *A. thaliana* gewonnen.

A. thaliana wurden wie unter 2.2.1 beschrieben angezogen und unter Langtag-Bedingungen auf Erde (2.2.1.4) verbracht, um die Akkumulation transitorischer Stärke in der Lichtperiode möglichst gering zu halten. Vor der Ernte des Pflanzenmaterials wurden die Pflanzen für mehr als 17 h dunkel gehalten. Ganze Blattrossetten 6 bis 10 Wochen alter Pflanzen und eines Gesamt-Frischgewichts von 6 bis 8 g wurden geerntet und für 20 bis 40 min in Eiswasser schwimmen gelassen.

Vor Beginn der Präparation wurden gleiche Volumina Percoll (Pharmacia, Freiburg) und 2 x REB gemischt und 30 min bei 43.300 xg (SS-34-Rotor, Sorvall RC5B) zur Bildung eines Gradienten zentrifugiert. Nach dem Auslaufen des Rotors bei deaktivierter Bremse

wurden die Becher mit den Gradienten auf Eis gelagert. Die gesamte weitere Aufarbeitung wurde im Kühlraum bzw. bei 4°C durchgeführt.

Die Blätter wurden aus dem Eiswasser geholt, trockengetupft und im zwanzigfachen Volumen HB mit dem Polytron-Rührstab (Bachofer, Reutlingen) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, Schwalbach) in ein Becherglas filtriert, auf SS-34-Becher verteilt und 90 s bei 280 xg ($1.600 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$, Sorvall RC5B) inklusive Verzögerungszeit bei deaktivierter Bremse im SS-34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das Sediment in 1/50 Volumen 1 x REB mit einem Pinsel resuspendiert und mit einer Pasteurpipette auf die Percollgradienten aufgeschichtet.

Bei der Weiterverwendung für die Differentielle Zentrifugation wurde das Sediment in 0,5 ml HB resuspendiert und wie in 2.2.5.5 beschrieben weiterbehandelt.

Die Gradienten wurden 6 min bei 13.300 xg (SS-34, Sorvall RC5B) zentrifugiert und der Rotor ohne Bremse auslaufen gelassen. Die obere plastidenhaltige Bande mit aufgebrochenen Plastiden und die weiter unten im Gradienten befindliche Bande intakter Plastiden wurden mit einer Pasteurpipette abgesaugt, mit 3 Volumen 1 x REB verdünnt und 90 s bei 3.300 xg ($6.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$, SS-34, Sorvall RC5B) sedimentiert. Die Sedimente wurden in 0,5 bis 1 ml 1 x REB aufgenommen und für polarographische Messungen an der Clarke-Sauerstoffelektrode (Hansatech, Bachofer, Reutlingen) eingesetzt (2.2.5.3).

HB:

450 mM	Sorbit
20 mM	Tricin/KOH, pH 8,4
10 mM	EDTA
10 mM	NaHCO ₃
0,1% (w/v)	BSA, entfettet

2x REB:

0,6 M	Sorbit
40 mM	Tricin/KOH, pH 7,6
10 mM	MgCl ₂
5 mM	EDTA

5x REB:

1,5 M	Sorbit
100 mM	Tricin/KOH, pH 7,6
25 mM	MgCl ₂
12,5 mM	EDTA

2.2.5.3. Polarographische Bestimmung der physiologischen Intaktheit von Chloroplasten

Die Messung der Hill-Reaktion in chloroplastenhaltigen Suspensionen erfolgte polarographisch nach der Methode von Delieu und Walker (1972).

Die Sauerstoff-Elektrode (Clarke-Typ, Hansatech, Bachofer, Reutlingen) wurde 2 bis 3 h vor Versuchsbeginn, typischerweise vor Beginn der Chloroplastenpräparation, eingeschaltet damit sich der Lösungsdruck der Elektrode bei der Messung im Gleichgewicht mit dem Abscheidungsdruck befand. Bei Bedarf wurde eine frische Teflonmembran auf die mit einem Streifen Zigarettenpapier überbrückte Elektrode gespannt und mit einem O-Ring aus dem beiliegenden Zubehörsatz (WTW, Weilheim) befestigt. Während der Eichung und der Messungen wurde das System mit einem Thermostat auf 25°C temperiert.

Die Eichung der Elektrode erfolgte in H₂O_{dd} durch Einleiten von Raumluft und durch Zugabe von Na₂S₂O₄, um die jeweiligen Spannungen des Polarisators (CB1D, Bachofer, Reutlingen) 1,23 μmol O₂·l⁻¹ und 0 μmol O₂·l⁻¹ in der Lösung zuordnen zu können. Um die Chlorophyllmenge in den Messungen einstellen zu können wurden 10 μl Aliquots der Suspensionen vor Beginn der Polarographie für eine Chlorophyllbestimmung (2.2.5.26) eingesetzt.

Chloroplastensuspensionen (2.2.5.2) wurden mit 1 x REB (2.2.5.2) auf eine Konzentration von 10 bis 30 μg Chlorophyll·ml⁻¹ aufgefüllt, mit 1 M K₂HPO₄, pH 7,0 auf 5 mM Phosphat gebracht und abgedunkelt. Die Reaktion des Polarisators wurde mit einem Schreiber (Goerz Servogor 110, Norma-Goerz, Neudorf, A) bei adäquater Spreizung und geeignetem Vorschub aufgezeichnet und etwa 5 min gewartet bis die O₂-Zehrung eine konstante Rate erreicht hatte. Dann wurde bei laufender Aufzeichnung der Polarisatorspannung 0,3 M Kaliumhexacyanoferrat(III) (Ferricyanid) zugegeben, so daß die Endkonzentration in der Suspension 8 mM Fe[CN]₆³⁻ betrug. Schließlich wurde die thylakoidäre Elektronentransportkette optional mit NH₄Cl einer Endkonzentration von 5 mM entkoppelt und die Spannungsänderung des Polarisators wie zuvor aufgezeichnet.

Die gesamte Messung wurde mit Chloroplasten gleicher Präparationen wiederholt, die zuvor 5 min bei Raumtemperatur durch die Zugabe des gleichen Volumens $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ osmotisch geschockt worden waren.

Die Steigungen der aufgenommenen Kurven wurden später manuell ausgewertet und aus dem Verhältnis der O_2 -Entwicklung intakter und osmotisch geschockter Chloroplasten konnte die physiologische Intaktheit der Plastidenpräparationen berechnet werden. Diese lag bei gradientengereinigten Präparationen zwischen 38 und 44 %, wobei nur ca. 1,5 % der ursprünglich eingesetzten Chlorophyllmenge intakten Plastiden zuzuordnen war.

2.2.5.4. Raumbestimmung plastidärer Subkompartimente durch Silikonölzentrifugation

Chloroplasten wurden aus *Arabidopsis*-Blättern angereinigt (2.2.5.2), jedoch nicht auf einen Percoll-Gradienten (2.2.5.2) aufgetragen, sondern ein zweites Mal bei 280 xg (1.600 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$, SS-34, Sorvall RC5B) sedimentiert und in 1 ml 1 x REB (2.2.5.2) aufgenommen. 10 μl Aliquots dieser Suspensionen wurden vorab für eine Chlorophyllbestimmung (2.2.5.26) eingesetzt. Die Raumbestimmung erfolgte wie von Heldt (1980) beschrieben.

In 0,4 ml-Polypropylen-Kapillarröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Best. Nr. 72.100) wurden 20 μl 1 M HClO_4 , 70 μl einer Silikonölmischung der Öle AR 200 und AR20 im Volumenverhältnis 8:2 und Chloroplastensuspensionen eines Chlorophyllgehaltes von 10 bis 20 μg übereinandergeschichtet. Es wurden 2,5 μCi $^3\text{H}_2\text{O}$ sowie 0,5 μCi [^{14}C]-Sorbit hinzugegeben und die Ansätze 30 s später in einer Vertikalzentrifuge (Beckman Microfuge ETM, Beckman München) für 15 s zentrifugiert.

Ein möglichst großes Aliquot der obersten Phase mit definiertem Volumen wurde abgenommen, in Szintillationsröhrchen überführt, mit 2 ml Szintillationscocktail (Rotiszint EcoPlus) versetzt und sorgfältig geschüttelt. Im Flüssigszintillationszähler (Beckman LS 6000A) wurden dann die meßbaren Zerfälle im ^3H - und ^{14}C -Fenster bestimmt, gegen Überlagerungen korrigiert und ausgegeben.

Die Spitze der Kapillarröhrchen wurde danach mit einem Skalpell in der Mitte der Silikonölbände abgetrennt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit 300 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ überführt. Die Reaktionsgefäße wurden in einem Zellhomogenisator (Braun, Melsungen) 1 min geschüttelt und grobe Chloroplastentrümmer anschließend 3 min bei 14.000 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ (20.800 xg) sedimentiert. 200 μl des Überstandes wurden in gleicher Weise wie zuvor dargelegt im Flüssigszintillationszähler gemessen. Anhand der von Heldt (1980)

hergeleiteten Formeln wurde die Größe des Intermembranraumes und des Stroma aus den Meßwerten berechnet.

2.2.5.5. Differentielle Zentrifugation

Der Aufschluß des Blattmaterials erfolgte wie in 2.2.5.2 beschrieben, allerdings wurden die Pflanzen vor der Ernte 20 min zur Aktivierung lichtregulierter Enzyme belichtet.

2 ml Aliquots des Rohextraktes und des ersten Überstandes wurden für die Anreicherung von Proteinen (2.2.5.5.1) entnommen, genauso wie die Hälfte des in HB (2.2.5.2) resuspendierten ersten Sedimentes (s. Hinweis in 2.2.5.2). Die andere Hälfte des resuspendierten Sedimentes wurde mit 10 Volumen HB aufgefüllt und erneut wie zuvor (2.2.5.2) zentrifugiert. 2 ml des Überstandes und das gesamte im HB-Rückstand resuspendierte Sediment wurden wiederum für die Proteinanreicherung (2.2.5.5.1) verwendet.

2.2.5.5.1. Anreicherung von Proteinen in Lösungen

Proteinlösungen wurden mit Hilfe des Amicon-30-Systems (Amicon, Beverly, USA) nach Angaben des Herstellers mit leichten Modifikationen angereichert.

Die Amicon-Röhrchen wurden mit 1ml H₂O_{dd} gefüllt und die Membran 5 min bei 1.000 xg (SS-34-Rotor mit Adaptern, Sorvall RC5B) äquibriert. Der zugehörige Deckel wurde auf die Röhrchen aufgesetzt, die Röhrchen umgedreht und 2 min wie zuvor zentrifugiert.

Nun wurden die Deckel abgenommen, die Röhrchen wieder richtig orientiert und die Aliquots der in 2.2.5.5 gewonnenen Fraktionen in die Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden 90 min bei 4.000 xg (SS-34-Rotor mit Adapter, Sorvall RC5B) zentrifugiert und die Retentate wie bei der Äquibrierung der Membran gewonnen. Die Retentate wurden auf 50 % (v/v) Glycerin gebracht, die Volumina der Proben notiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert..

25 µl der Retentate wurden in NADP-GAPDH-Enzymtests, je 50 µl in PPK- und PEPCase Enzymtests (2.2.5.11.5, 2.2.5.11.6 und 2.2.5.11.4) eingesetzt. 100 µl der Überstandretentate und 20 µl der Sedimentretentate wurden für Chlorophyllbestimmungen (2.2.5.26) verwendet.

Nach Beendigung des Verfahrens wurden die Membranen mit 1 % (w/v) SDS gereinigt und mehrfach mit H₂O_{dd} aus einer Spritzflasche ausgespült.

2.2.5.6. Polarographische Messungen mit der Blattscheibenelektrode

Polarographische Messungen mit der Blattscheibenelektrode LD 2/2 (Bachofer, Reutlingen) erfolgten nach Delieu und Walker (1981). Die Messungsvorbereitungen wurden in Anlehnung an die vom Hersteller mitgelieferte Bedienungsanleitung durchgeführt.

Die Polarisationsspannung wurde wie unter 2.2.5.3 geeicht, nur daß N₂ anstelle von Na₂S₂O₄ zum Nullen der Apparatur verwendet wurde. Weiterhin wurden jegliche Berechnungen von O₂-Konzentrationsänderungen auf den Sauerstoffpartialdruck in Gasgemischen bei Raumtemperatur bezogen.

Die Sauerstoffkonzentration [O₂] in Luft beträgt bei t °C:

$$[\text{O}_2] = 9,37 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 273 \text{ K} : (t + 273) \text{ K} \quad (\text{in } \mu\text{mol} \cdot \text{ml Gas}^{-1})$$

Zur Bestimmung des effektiven Kammervolumens V_E wurde nach der Eichung der Elektrode die Polarisatorspannung vor und nach der Injektion von 1 ml Luft in die Blattkammer gemessen und das effektive Kammervolumen V_E nach der Formel

$$V_E = U1 / (U2 - U1)$$

$$V_E = \text{effektives Kammervolumen} \quad [\text{ml}]$$

$$U1 = \text{Polarisatorspannung bei 1016 mbar} \quad [\text{mV}]$$

$$U2 = \text{Polarisatorspannung nach Injektion von 1 ml Luft} \quad [\text{mV}]$$

berechnet. Die Absolutmenge an Sauerstoff n(O₂) in der Kammer ist durch das Produkt von [O₂] und V_E gegeben:

$$n(\text{O}_2) = [\text{O}_2] \cdot V_E$$

$$n(\text{O}_2) = \text{Stoffmenge O}_2 \text{ in der Kammer} \quad [\mu\text{mol}]$$

$$V_E = \text{effektives Kammervolumen} \quad [\text{ml}]$$

$$[\text{O}_2] = \text{O}_2\text{-Konzentration im Kammergasgemisch} \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

Das System wurde durch die Ermittlung der Lichtabhängigkeit der O₂-Produktion überprüft bevor die eigentlichen Experimente durchgeführt wurden.

Blattmaterial der verschiedenen Linien wurde geerntet und bis zur unmittelbar folgenden Messung in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Die Blattkammer wurde mit den Blättern beschickt und sofort mit Alufolie abgedunkelt bis die O₂-Zehrung konstant war. Danach wurden die Messungen gestartet. Die Änderung der Polarisatorspannung wurde mit einem

Schreiber (2.2.5.3) protokolliert und Sauerstoffverbrauch bzw. -freisetzung manuell wie in 2.2.5.3 beschrieben ermittelt.

Nach Beendigung einer jeden Messung wurde die Fläche der für die Messung eingesetzten Blätter bestimmt (2.2.5.6.1).

2.2.5.6.1. Bestimmung der Blattfläche von *A. thaliana* Blättern

Blätter von *A. thaliana* wurden auf Millimeterpapier ausgelegt und mit Kopierfolien abgedeckt, die wenn nötig beschriftet werden konnten. Kopierfolie und Millimeterpapier wurden mit Büroklammern arretiert und mit der Kopierfolie nach unten kopiert. Die Silhouetten der Blätter und Referenzflächen verschiedener Größe wurden aus der Kopie ausgeschnitten und auf der Feinwaage gewogen. Anhand der Eichwerte der Referenzflächen konnten die Blattflächen berechnet werden.

2.2.5.7. Transportexperimente mit Proteoliposomen

Die Extraktion, Solubilisierung und Rekonstitution pflanzlichen Gesamtmembranproteins wurde in leicht modifizierter Form nach Fischer et al. (1994) durchgeführt.

2.2.5.7.1. Reinigung von Phosphatidylcholin für die Liposomenherstellung

Das von Sigma (Deisenhofen) vertriebene Phosphatidylcholin weist noch Verunreinigungen an freien Fettsäuren auf, die nach dem folgenden Protokoll abgetrennt wurden.

Es wurden 30 g Phosphatidylcholin (Sigma, Deisenhofen) in 100 ml Chloroform gelöst, mit 540 ml Aceton versetzt, das Gemisch 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Phospholipid über Nacht bei 4°C gefällt. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 100 ml Diethylether gelöst, der nachfolgend am Rotationsverdampfer abgezogen wurde. Der hochreine Phosphatidylcholin-Rückstand wurde aliquotiert bei -20° C aufbewahrt.

2.2.5.7.2. Extraktion und Solubilisierung der Membranproteine

Blattmaterial definierten Gewichts wurde geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wenn nötig bei -80°C gelagert. Das Blattmaterial wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser pulverisiert, 15 Volumen (v/w) Aufschlußpuffer hinzugegeben und das Gemisch bis zum Auftauen homogenisiert. Das Homogenat wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und diese 2 min bei 14.000 U·min⁻¹ (20.800 xg) zur Sedimentierung grober Gewebetrümmer zentrifugiert. Die Überstände wurden abgehoben,

in frische Reaktionsgefäße transferiert und die Suspension mit der Pipette durchmischt. 100 µl der Suspension wurden für eine Chlorophyllbestimmung (s. 2.2.5.26) abgenommen und bei -20° C in einem Reaktionsgefäß bis zur Verwendung eingefroren, der Rest der Präparation wurde bis zur Zugabe in die Liposomenlösung (s.u.) auf Eis gelagert.

Aufschlußpuffer:

0,2 M	Tricin/ KOH, pH 8,0
10 mM	EDTA
4 mM	DTT
6 mM	Ascorbat
0,1% (w/v)	BSA, entfettet
0,1% (w/v)	PVP

2.2.5.7.3. Rekonstitution der Membranproteine

Mit dem Ultraschallgerät (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics, Danbury/USA) wurden 5 ml der Liposomenpuffer 10 min auf Eis bei 30% Auslastung auf Stufe 5 beschallt und danach auf Eis gestellt. 600 µl der nunmehr leicht opaken Liposomensuspension wurden mit je 400 µl der solubilisierten Proteine aus den verschiedenen Blattproben vermischt, die Reaktionsgefäße invertiert, wenige Sekunden anzenrifugiert und bei -80° C in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Ansätze konnten bei Bedarf bis zur zweiten Beschallung bei -80° C gelagert werden. Die Liposomengemische wurden anschließend auf Eis aufgetaut und danach 30 Pulse lang in gleicher Stärke wie zuvor zur Bildung von Proteoliposomen beschallt. Das gesamte Volumen von 1 ml der Proteoliposomenlösungen wurde auf vorher dreimal mit 5 ml PD10-Puffer äquilibrierte NAP-25-Säulen (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen und dann mit einmal 500 µl PD10-Puffer und einmal 1,2 ml PD10-Puffer zur Abtrennung des alten Außenmediums auf der Säule nach unten gespült. Die Proteoliposomen wurden mit 1,15 ml PD10-Puffer eluiert bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die NAP-25-Säulen wurden nach der Verwendung zur Reinigung viermal mit Azidwasser gefüllt.

Liposomenpuffer:

100mM	Tricin/ KOH, pH 7,8
50mM	Kaliumglukonat
20mM	Substrat
10 Vol%	Phosphatidylcholin

Als Substrate wurden Kaliumsalze des Phosphats, Phosphoenolpyruvats und Glukonats eingesetzt.

PD10-Puffer:

100mM	Natriumglukonat
50mM	Kaliumglukonat
10mM	Tricin/ KOH, pH 7,6

2.2.5.7.4. Vorbereitung der Anionenaustauschersäulen

Pasteurpipetten wurden mit wenig Watte an der sich verjüngenden Stelle verstopft, mit 1,5 ml einer dichten Suspension von Anionenaustauscherharz (Dowex AG 1-X8, 100-200 mesh, BioRad, München) in H₂O_{dd} gefüllt, mit 1 ml H₂O_{dd} gespült und mit zweimal 1 ml 150 mM NaOAc äquilibriert.

2.2.5.7.5. Transportexperimente mit den gereinigten Proteoliposomen

Pro Ansatz wurden 6 µCi [³²P]-NaH₂PO₄ mit 1 M KH₂PO₄, pH 7,0 auf eine Phosphatkonzentration von 2,5 mM gebracht und 50 µl-Aliquots dieser Stammlösung in Reaktionsgefäße vorgelegt. Zur Bestimmung der exakten spezifischen Aktivität der Substratlösung wurden verdünnte Aliquots der Phosphatstammlösung im Szintillationszähler (Beckman LS 6000A, München) über den Cherenkov-Effekt gezählt. Die spezifische Aktivität des P_a lag zwischen 50 und 100 cpm/ pmol PO₄³⁻.

950 µl der gereinigten Proteoliposomenlösungen wurden zur vorgelegten Phosphatlösung in die Reaktionsgefäße pipettiert und der Inhalt mit der Pipettenspitze durchmischt. 15, 35, 55 und 75 s nach Zugabe der Proteoliposomen wurden 200 µl aus den Reaktionsgefäßen entnommen und jeweils auf eine Anionenaustauschersäule (2.2.5.7.4) gegeben. Anschließend wurden die radioaktiv beladenen Proteoliposomen mit einmal 300 µl und einmal 800 µl 150 mM NaOAc in Szintillationsgefäße eluiert. Dabei inhibiert das NaOAc die Transportproteine irreversibel, so kein Substratmolekül mehr die Liposomen verlassen kann. Die Eluate wurden wie die Aliquots der Substratlösung im Flüssigszintillationszähler gezählt.

Das ans Austauscherharz gebundene [³²P]-Phosphat wurde mit 3 mal 1 ml 1 M HCl eluiert und entsorgt.

2.2.5.8. Analyse von Kohlenstoffflüssen im Primärstoffwechsel

Die Verteilung des bei Belichtung der Blattscheiben inkorporierten $^{14}\text{CO}_2$ gibt über die Kohlenstoffflüsse im Blattgewebe Auskunft. Um einen groben Überblick über die Verteilung zwischen Zuckern, Carbonsäuren, phosphorylierten Intermediaten und Aminosäuren zu gewinnen reicht die Subfraktionierung der ethanollöslichen Fraktionen in diese Substanzklassen völlig aus.

2.2.5.8.1. $^{14}\text{CO}_2$ -Pulsverfolgungsexperimente mit *A. thaliana* Blättern

Lichtadaptiertes Blattmaterial der untersuchten *A. thaliana*-Linien wurden von Pflanzen definierten Alters (2.2.1.2) geerntet und bis zur Markierung dunkel und in feuchtem Küchenkrepp zum Schutz vor Austrocknung gelagert.

Der Boden der linken Inkubationskammer (s. Abb. 2.3) wurde mit 2 Lagen Whatmanpapier (Schleicher und Schuell, Dassel) ausgelegt, diese anschließend mit 5 ml 1M NaHCO_3 (pH 9,1) getränkt, die Kammer gasdicht verschlossen und 0,2 mCi [^{14}C]- NaHCO_3 (56 mCi/ mmol, ICN, Eschwege) durch ein Septum auf die Whatmanpapierlagen injiziert. Pro Parallele wurden 2 Blätter eines Frischgewichts von etwa 40 mg entnommen und das exakte Frischgewicht auf einer Feinwaage bestimmt. Die Blätter wurden 1 min unter ambienten Bedingungen in der rechten, ebenfalls gasdicht verschlossenen Blattkammer mit einem Photonenfluß von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vorbelichtet (Schott KL 1500, H. Walz, Effeltrich) und in der linken Inkubationskammer einem Puls von 1 oder 3 min bei gleicher Photonenflußdichte ausgesetzt. Danach wurde das Gitter mit den Blättern zurück in die rechte Blattkammer gezogen, die Blätter direkt entnommen oder das mitgeschleppte $^{14}\text{CO}_2$ über zwei Natronkalksäulen ausgeblasen und die Blätter weitere 30, 60, 150 oder 300 s mit $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ belichtet. Nach Beendigung der Inkubationen wurden die Blätter sekundengenau in auf flüssigem Stickstoff treibende Aluschiffchen überführt und in schockgefrorenem Zustand in 1 ml auf 65°C vortemperiertes 80% Ethanol transferiert. Die Reaktionsgefäße wurden wenige Minuten auf 80°C erhitzt, das Ethanol abgehoben, durch 1 ml frisches 80% Ethanol ersetzt und weiter bis zur vollständigen Ausbleichung der Blätter bei 80°C extrahiert. Die ethanolischen Extrakte wurden vereinigt und im Vakuumkonzentrator (Bachofer, Reutlingen) zur Trockne eingengt. Alternativ konnten lösliche und unlösliche Fraktionen bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren werden.

Nach Beendigung der Markierungen wurde das $^{14}\text{CO}_2$ mit 10 ml 2 M NaOH in der linken Inkubationskammer als $^{14}\text{CO}_3^-$ fixiert und restliches $^{14}\text{CO}_2$ über zwei Natronkalksäulen ausgeblasen.

2.2.5.8.2. Aufarbeitung der in Ethanol unlöslichen Fraktion

Das ausgebleichte Gewebe wurde mit 250 μl 0,2 M KOH versetzt und mit einem rotierenden Pistill (Techn. Werkstätten, Institut f. Botanik) in den Reaktionsgefäßen homogenisiert. Am Bohrkopf verbliebene Gewebereste wurde mit weiteren 250 μl 0,2 M KOH zum Homogenisat gespült. Stärke wurde durch 45minütiges Erhitzen auf 95° C in Lösung gebracht, die Ansätze 1 min auf Eis abgekühlt und zur Einstellung des pH-Wertes auf 5,5 bis 6 mit 120 μl 1 M Essigsäure vermischt. 7,3 U α -Amylase und 5 U Amyloglukosidase in 100 μl 0,1 M NaOAc wurden zur enzymatischen Hydrolyse der Stärke hinzupipettiert und die Gefäße über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Reaktionen wurden durch die 10minütige Denaturierung der Enzyme bei 95° C abgestoppt und die Reaktionsgefäße danach 5 min bei 14.000 U \cdot min $^{-1}$ (20.800 xg) zentrifugiert. 650 μl des Überstandes wurden in Szintillationsröhrchen gefüllt, 3 ml Szintillationscocktail (Rotiszint EcoPlus, Roth, Karlsruhe) zugegeben, kräftig geschüttelt und im Flüssigszintillationszähler (Beckman LS7500, München) im ^{14}C -Fenster gezählt.

2.2.5.8.3. Aufarbeitung der löslichen Fraktion

Die eingeeengten löslichen Fraktionen (2.2.5.8.1) wurden in 500 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgenommen, mit einem Enzymspatel resuspendiert, 5 min bei 14.000 U \cdot min $^{-1}$ (20.800 xg) zentrifugiert und 80 μl des Überstandes im Flüssigszintillationszähler (2.2.5.8.2) gezählt.

2.2.5.8.4. Subfraktionierung der löslichen Fraktionen

Säulen mit Anionenaustauscherharz (Dowex AG 1-X8, 100-200 mesh, BioRad, München) bzw. Kationenaustauscherharz (Dowex AG 50W-X8, 200-400 mesh, BioRad, München) wurden wie unter 2.2.5.7.4 beschrieben hergestellt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gespült. Die Anionen- und Kationenaustauschersäulen wurden so in zwei Ständern übereinander angeordnet, daß die Eluate der Kationenaustauscher- auf die Anionenaustauschersäulen tropften.

400 μl des Überstandes des löslichen Fraktion (2.2.5.8.3) wurden auf die Kationenaustauschersäulen aufgetragen und die neutralen Fraktionen mit zweimal 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ und siebenmal 300 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ eluiert. Vor der Zugabe des Szintillationscocktails in die Röhrchen wurden 1 ml des Eluates verworfen.

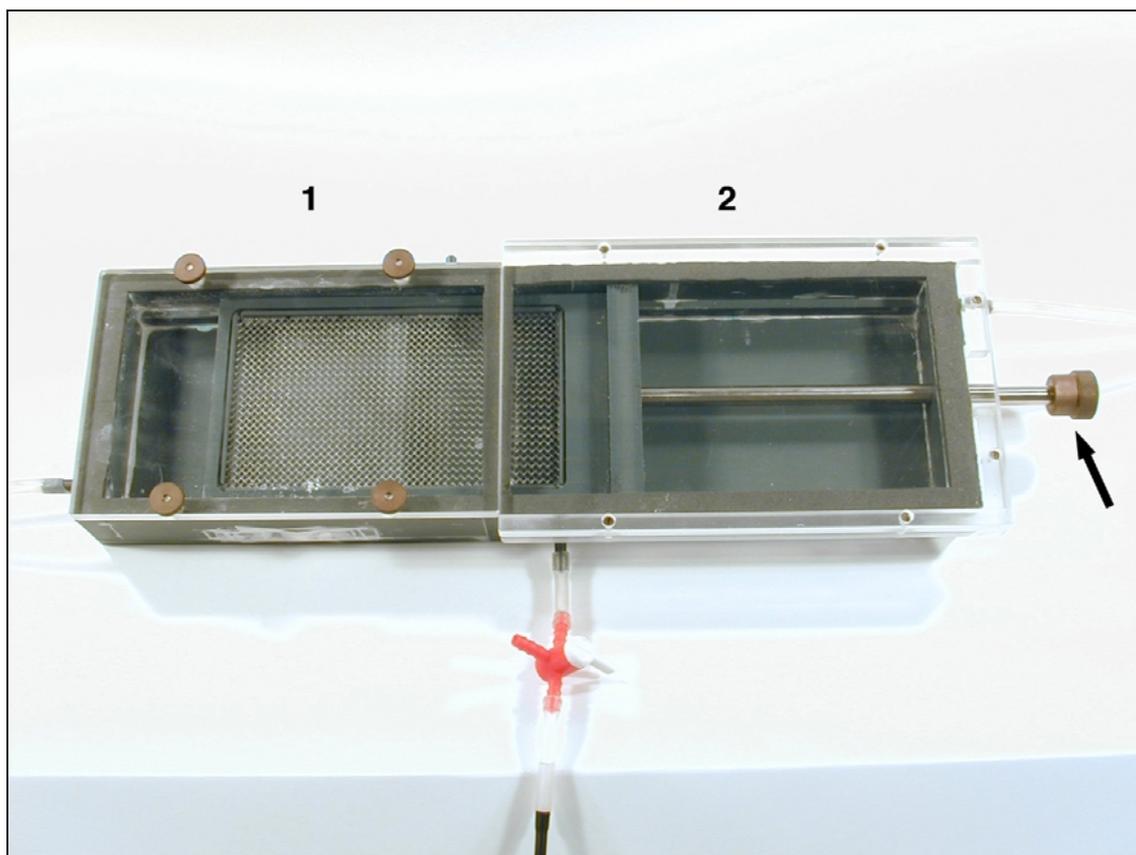


Abb. 2.3 Blattinkubationskammer für Markierungen mit $^{14}\text{CO}_2$. Die Blätter befanden sich auf dem verschiebbaren Gitter (Kolben s. Pfeil) und konnten so zwischen der linken Kammer (1) mit $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre und der rechten Kammer (2) mit Raumlufte verschoben werden.

Die Ständer mit den Säulen wurden getrennt und die Anionenaustauschersäulen zur Elution markierter phosphorylierter Intermediate fünfmal mit 300 μl 3 M Ameisensäure gespült, danach wurden markierte Carbonsäuren fünfmal mit 300 μl 2 M HCl eluiert. Die Kationenaustauschersäulen wurden fünfmal mit 300 μl 5M NH_4OH gespült. 1 ml der in Szintillationsröhrchen aufgefangenen Eluate wurde für die dünnschichtchromatographische Auftrennung (2.2.5.9) bei -20°C eingefroren und 500 μl der Eluate im Flüssigszintillationszähler (Beckman LS 7000) gezählt (2.2.5.8.2).

2.2.5.9. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Kationen

Die von Brenner et al. (1967) als zweidimensionale Auftrennung für Aminosäuren beschriebene Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit nur in der ersten Dimension angewendet.

Das gesamte Volumen der aminosäurehaltigen Eluate (2.2.5.8.4) mit einer Volumenaktivität von mehr als $0,5 \text{ nCi}\cdot\text{ml}^{-1}$ wurde im Vakuumkonzentrator (Bachofer,

Reutlingen) zur Trockne eingengt und in jeweils 7,5 µl 10% Ethanol aufgenommen. Zwei korrespondierende Parallelproben wurden vereinigt und 10 µl dieser Lösung punktförmig mit einer Kristallspitze auf Kieselgelplatten (Durasil-25, Macherey und Nagel, Düren) aufgetragen. Die Abstände zwischen den Proben betragen 1 cm, die zu den Rändern der Platte 1,5 cm. Zur Identifizierung der Signale wurden 10 µl verschiedener Aminosäure-Standardgemische (2.2.5.9.1) mitchromatographiert.

Die Kieselgelplatten wurden nach dem Trocknen der Proben vertikal in Laufmittel I entwickelt und nach der Chromatographie 6 h unter dem Abzug getrocknet.

Laufmittel I (nach Brenner et al., 1967):

n-Butanol : Eisessig : H₂O_{dd} (v/v/v) 4:1:1

2.2.5.9.1. Aminosäure-Standards

Als Standards wurden verschiedene Aminosäure-Gemische mit Aminosäure-Konzentrationen von 1 mg AS · ml⁻¹ verwendet. Die zehnfach konzentrierten Stammlösungen von Alanin, Phenylalanin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Lysin, Leucin, Prolin, Arginin, Serin und Valin wurden in H₂O:n-Propanol (9:1 - v/v) angesetzt, die Asparaginsäure-, Glutaminsäure-, Tryptophan- und Tyrosin-Stammlösungen in 0,1 M HCl gelöst.

2.2.5.9.2. Autoradiographien von DC-Platten auf Bildspeicherfolien

Die DC-Platten wurden mit Hilfe einer Sprühvorrichtung für Druckluftleitungen (Schott, Mainz) gleichmäßig mit Amplifier (Amersham, Chalfont, UK) besprüht und in Entwicklungsschatullen eingeklebt und mit Frischhaltefolien abgedeckt. Anschließend wurden Bildspeicherplatten des *PhosphoImagers* (Molecular Dynamics, Krefeld) aufgelegt und mindestens eine Woche exponiert. Anhand der markierten Position der Folien auf den Kieselgelplatten konnten die Retentionsfaktoren der markierten Aminosäuren berechnet werden. Nach Ablauf der Expositionszeit wurden die Platten mit Ninhydrinreagens angefärbt (2.2.5.9.3).

2.2.5.9.3. Nachweis von Aminosäuren auf DC-Platten

Die Kieselgelplatten wurden fein und gleichmäßig mit Ninhydrin-Sprühreagens nach Moffat und Lytle (1959) besprüht (2.2.5.9.2) und über eine auf 100°C vorgeheizte Kochplatte gehalten. Während der Entstehung der Banden wurde ihre Position mit einem Bleistift markiert. Die Platten konnten im Flachbettscanner (HP ScanJet II cx, Hewlett

Packard) zur digitalen Dokumentation des Bandenmusters eingelefen und die einzelnen Aminosäuren über die für die einzelnen Banden berechneten Retentionsfaktoren (R_F -Werte) identifiziert werden.

ASL I:

0,1 g	Ninhydrin
50 ml	Ethanol
10 ml	Eisessig
2 ml	Collidin

ASL II:

1% (w/v)	Kupfer(II)sulfat in Ethanol
----------	-----------------------------

Ninhydrin-Sprühreagens:

95 Vol%	ASL I
5 Vol%	ASL II

2.2.5.10. Enzymatische Synthese von [^{14}C]-PEP aus [^{14}C]-Pyruvat

[^{14}C]-PEP ist nicht kommerziell erhältlich. Weil [^{14}C]-PEP für einige weiterführende Experimente unabdingbar ist, wurde diese Substanz mit Hilfe gereinigter rekombinanter PPDK aus *Flaveria pringlei* im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus [^{14}C]-Pyruvat dargestellt. Dazu mußte die Präsequenz der PPDK aus *F. pringlei* gegen eine Hexahistidin-Affinitätskupplung getauscht und das rekombinante Protein in Hefe exprimiert werden (2.2.2.3.2 und 2.2.2.3.3).

2.2.5.10.1. Synthese

In etwa einem Dutzend Parallelansätzen eines Endvolumens von jeweils 500 µl befanden sich:

100 mM	Tricin/KOH, pH 8,0
10 mM	DTT
1 mM	Glukose-6-phosphat
6 mM	NaH ₂ PO ₄
4 mM	ATP
8 mM	Creatinphosphat
8 mM	MgCl ₂
5 mM	KCl
3,5 U	Creatinkinase* (Roche, in 20 mM Tricin, 1 mM DTT, pH 7,0)
0,1 U	Nucleotidmonophosphat-Kinase* (Roche, in 20 mM MES, 50% (v/v) Glyzerin, pH 6,5)
0,5 mM	2-[¹⁴ C]-Pyruvat [555 MBq·mmol ⁻¹] (NEN, Köln)
1–3 mU	aufgereinigte His ₆ -PPDK*

* Creatinkinase und Nucleotidmonophosphatkinase konnten in den angegebenen Puffern bis zu 4 Monaten bei 4°C ohne deutlichen Aktivitätsverlust gelagert werden. Die aufgereinigte rekombinante PPDK war in dem unter 2.2.2.3.3 angegebenen Puffer mindestens 6 Monate bei –20°C ohne erkenntlichen Aktivitätsverlust lagerbar.

Außer den Ansätzen mit markiertem Pyruvat wurde stets ein Ansatz mit der gleichen Menge nicht-radioaktiven Pyruvats für die spätere Kontrolle auf vollständigen Umsatz des Pyruvats nebenhergeführt.

Die Reaktionsansätze wurden 3 h bei 30°C inkubiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen wurden je 5 Reaktionsansätze in einem 50 ml-Polypropylenröhrchen vereinigt, 1,25 ml Chloroform und 2,9 ml Methanol zugegeben, die Proben invertiert und 30 min auf Eis gestellt. Danach wurden 2,5 ml H₂O_{dd} hinzupipettiert, erneut geschüttelt und die Phasentrennung in der Bodenzentrifuge (Hermle ZK 364, Kontron) für 5 min bei 5.000 U·min⁻¹ herbeigeführt. Die Oberphasen wurden in neue 50 ml-Polypropylenröhrchen überführt und die Unterphasen wie zuvor mit 1,8 ml H₂O_{dd} ausgeschüttelt. Die Oberphasen wurden vereinigt und von der sich neu bildenden Unterphase in neue Gefäße abgehoben. Diese wurden mit Parafilm verschlossen, der

danach mit einer Kanüle angestochen wurde, und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Proben werden dann 3 d lyophilisiert (Christ Alpha I-5, Osterode).

2.2.5.10.2. Kontrolle der Ausbeute

Die Lyophilisate (2.2.5.10.1) werden in 1/5 des ursprünglichen Reaktionsvolumens aufgenommen und jeweils 6 und 12 µl der Resuspendate der nicht-radioaktiven Parallele für eine Pyruvat- und PEP-Bestimmung im Fluoreszenzmodus (Kurzpaßanregungsfilter $\lambda = 360$ nm, Kurzpaßemissionsfilter $\lambda = 435$ nm) des Mikrotiterplattenlesegeräts (*SpectraFluor plus*, SIL-Tecan, Crailsheim) eingesetzt. Der Test setzt sich wie folgt zusammen:

50 mM	Hepes/ KOH, pH 7,5
1 mM	ADP
1,5 mM	MgCl ₂
0,1 mM	NADH
0,03 % bzw. 0,06 % (v/v)	Probe

Vor Beginn der Messungen wurde etwa 15 min gewartet bis sich die Fluoreszenzsignale stabilisiert hatten. Dann wurden zum sequentiellen Nachweis von Pyruvat (a) und PEP (b) in je 2 µl Volumen hinzugegeben:

- a) 14 U Lactat-Dehydrogenase (Boehringer, Mannheim)
- b) 40 U Pyruvatkinase (Boehringer, Mannheim)

Zur Eichung der NADH-Fluoreszenzsignale wurde parallel eine Eichreihe mit 0 bis 20 nmol NADH mitgemessen.

Anhand dieser Meßwerte konnten Stoffmenge und Ausbeute radioaktiv markierten [¹⁴C]-PEPs berechnet und die Produkte der Reaktion adäquat eingesetzt werden.

2.2.5.11. Enzymaktivitätsbestimmungen aus Blattextrakten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die maximal extrahierbare Enzymaktivität aus Gewebeextrakten gemessen. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgt wie auch die Metabolitbestimmungen (2.2.5.13 bis 2.2.5.18) über einfache oder gekoppelte optische Tests. Kopplungsenzyme und Substrate wurden im Überschuß hinzugegeben, damit allein die Aktivität des untersuchten Enzyms geschwindigkeitsbestimmend war. Durch Substratmangelansätze konnten die gemessenen Aktivitäten gegen einen unspezifischen Hintergrund korrigiert werden.

2.2.5.11.1. Aufschluß des Blattmaterials

Arabidopsis-Blätter von Pflanzen eines unter 2.2.1.2 beschriebenen Alters wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion bei -80°C gelagert. Die Proben wurden dann mit einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten rotierenden Pistill im drei- bis fünffachen Volumen Extraktionspuffer aufgeschlossen, so daß sich eine Proteinkonzentration von mindestens 1,5 mg Protein-ml Extrakt⁻¹ ergab. Die Extrakte wurden sofort auf -20°C gestellt und noch am gleichen Tag gemessen.

Vor der Messung wurden die Extrakte 1 min bei $12.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ (15.300 xg) anzentrifugiert und auf Eis gestellt. 5 bis 10 μl Aliquots der Überstände wurden in den Enzymtests bei 30°C (s. 2.2.5.11.2 bis 2.2.5.11.7) im Absorptionsmodus des *SpectraFluor plus* (SIL-Tecan, Crailsheim) eingesetzt und mit den mitgelieferten Programmen (*EasyWIN kinetics*, SIL-Tecan, Crailsheim) ausgewertet. 20 μl des Überstandes wurden mit dem gleichen Volumen 100 mM DTT vermischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für die Bestimmung der NADP-MDH-Aktivität (s. 2.2.5.11.3) verwendet. 10 μl Aliquots dieser Verdünnung und des ursprünglichen Überstandes wurden für eine Proteinbestimmung (s. 2.2.4.5) abgezweigt und bis zur Verwendung am gleichen Tag 4°C gelagert.

Vor der Zugabe in die Reaktionsgemische wurden in NH_4SO_4 suspendierte Kopplungsenzyme 1 min bei $12.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ (15.300 xg) zentrifugiert, der ammoniumsulfathaltige Überstand abgenommen und das Sediment im gleichen Volumen 50mM HEPES/ NaOH, pH 7,3 aufgenommen.

Extraktionsmedium:

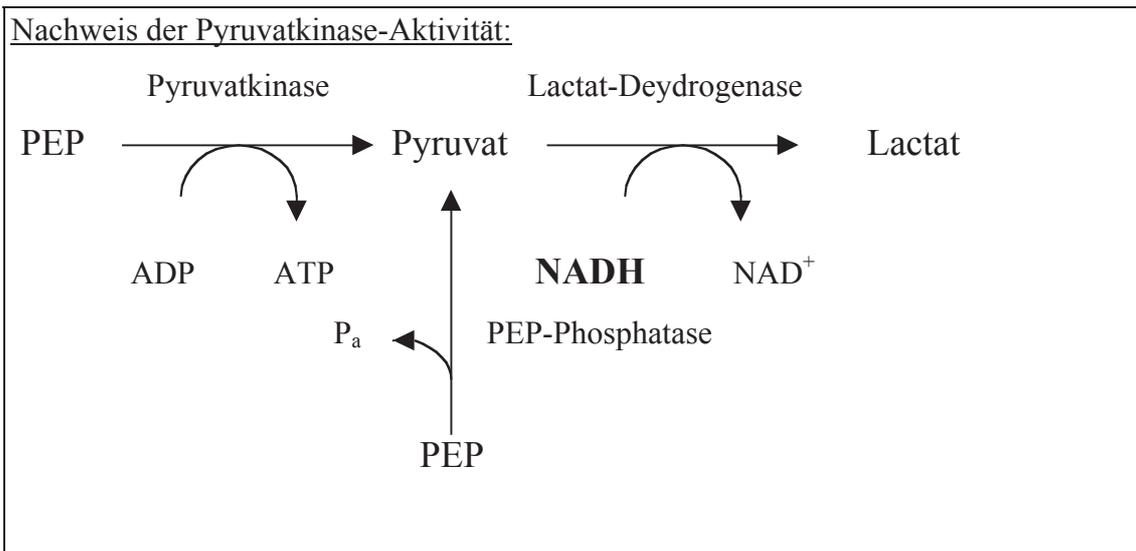
50mM	HEPES/ NaOH, pH 7,5
2mM	DTT
5mM	MgCl_2
1mM	EDTA
0,1 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
0,5 % (v/v)	Triton-X-100
50 % (v/v)	Glyzerin

β -Mercaptoethanol, Triton-X-100 und Glyzerin wurden erst nach Einstellung des pH-Werts in den Puffer gegeben. Unmittelbar vor der Extraktion wurde der Extraktionspuffer 2 min mit Stickstoff (Messer Griesheim, Krefeld) durchblasen.

2.2.5.11.2. Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)

Der Nachweis der Pyruvatkinase-Aktivität wurde nach der von Plaxton (1988) entwickelten Methode durch Zugabe von Lactat-Dehydrogenase geführt. Um die erhaltenen Umsatzgeschwindigkeiten gegen mitextrahierte PEP-Phosphatase-Aktivität zu korrigieren wurde ein Kontrollansatz zur Messung der PEP-Phosphatase-Aktivität nach Duff et al. (1989) parallel mitgeführt.

Zur Differenzierung der Aktivitäten der zytosolischen und plastidären Isoform wurden die Messungen an den pH-Optima beider Isoformen durchgeführt.



Die Testansätze in den Mikrotiterplatten enthielten in 200 μ l Volumen:

50 mM	Hepes/ NaOH	a) pH 6,9 (pH-Optimum der zytosolischen Isoform)
		b) pH 8,1 (pH-Optimum der plastidären Isoform)
2 mM	PEP*	
2 mM	ADP ⁺	
50 mM	KCl	
10 mM	MgCl ₂	
0,2 mM	NADH	
0,2 mg·ml ⁻¹	BSA	
2 mM	DTT	
2 U	Lactat-Dehydrogenase (Boehringer, Mannheim)	
5 % (v/v)	Extrakt	

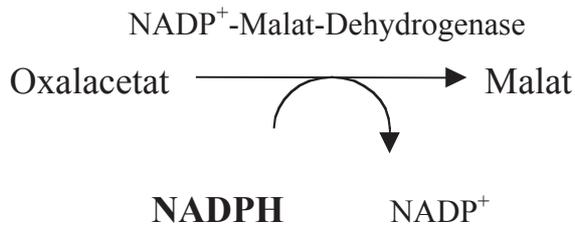
* Wurden in den Ansätzen zur Messung des unspezifischen Hintergrundes weggelassen.

⁺ Wurde dem Testansatz bei der Messung der PEP-Phosphatase-Aktivität vorenthalten.

2.2.5.11.3. NADP-Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.82)

Die Messung der NADP-Malat-Dehydrogenase erfolgte nach Johnson und Hatch (1970) über einen einfachen optischen Test.

Nachweis der NADP-Malatdehydrogenase-Aktivität durch einfachen optischen Test:



Die Testansätze in den Reaktionsräumen der Mikrotiterplatten enthielten in 200 μ l Volumen:

- 50 mM Tricin/ NaOH, pH 8,1
- 5 mM EDTA
- 2 mM Oxalacetat *
- 0,2 mM NADPH
- 20 mM DTT
- 5 % (v/v) in 50 mM DTT inkubierter Extrakt (2.2.5.11.1)

* Fehlte in den Kontrollansätzen zur Korrektur des unspezifischen Hintergrundes.

2.2.5.11.4. PEP-Carboxylase (EC 4.1.1.31)

In dem von Hatch et al. (1969) etablierten Test wird die PEP-Carboxylase-Aktivität durch einen an NAD-Malat-Dehydrogenase gekoppelten optischen Test ermittelt.

Nachweis der PEP-Carboxylase-Aktivität:



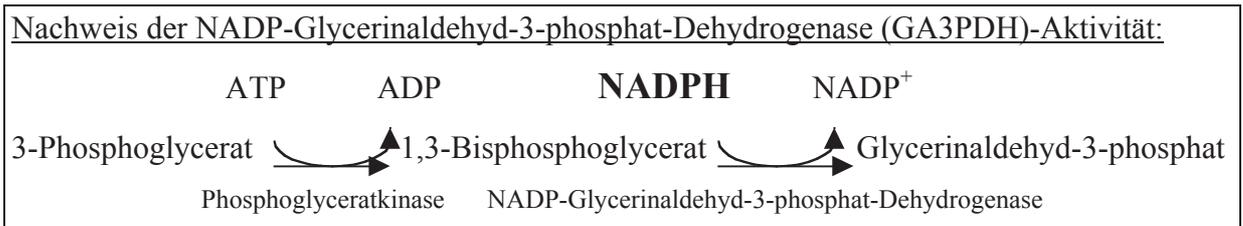
In den Reaktionsräumen der Mikrotiterplatten befanden sich in 200 µl Volumen:

50 mM	Hepes/ NaOH, pH 7,3
5 mM	MgCl ₂
2 mM	DTT
1 mM	KHCO ₃
5 mM	PEP*
0,2 mM	NADH
2 U	NADH-Malat-Dehydrogenase (Boehringer, Mannheim)
5 % (v/v)	Extrakt

* Fehlte in den Ansätzen zur Korrektur gegen den unspezifischen Hintergrund.

2.2.5.11.5. NADP-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.13)

Die Aktivität der NADP-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase wird prinzipiell in gleicher Weise wie die Gehalte an TrioseP (2.2.5.16) nachgewiesen.



In den Reaktionsansätzen befanden sich in je 200 µl Volumen:

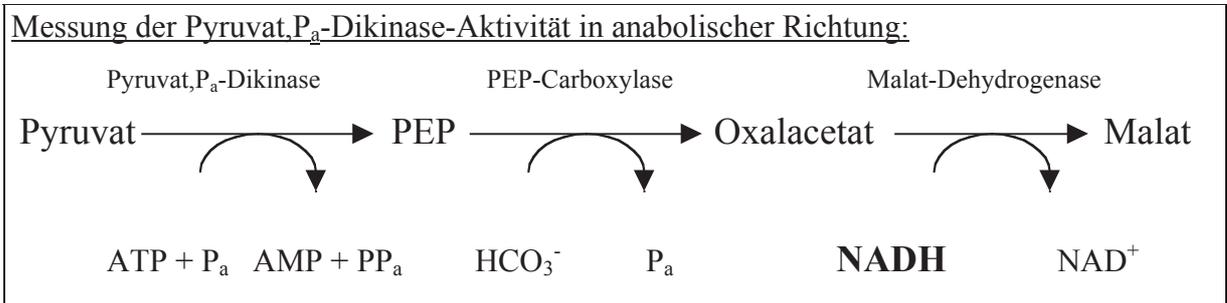
50 mM	Tricin/ NaOH, pH 8,1
4 mM	3-Phosphoglycerat*
5 mM	ATP
10 mM	MgCl ₂
0,2 mM	NADPH
20 U	Phosphoglyceratkinase (Boehringer, Mannheim)
2,5 % (v/v)	Extrakt

* Das Substrat 3-Phosphoglycerat fehlte in den Kontrollansätzen.

2.2.5.11.6. Pyruvat,P_a-Dikinase (EC 2.7.9.2)

Die Messung der Aktivität der Pyruvat, P_a-Dikinase kann sowohl in anabolischer wie auch in katabolischer Richtung erfolgen. Da nur auf eine in C₃-Pflanzen erhöhte Aktivität untersucht werden sollte, wurde der von Jenkins und Hatch (1985) ausgearbeitete Nachweis in anabolischer Richtung gewählt. Die Aktivierung des Enzyms durch

Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte während der Messungen, insbesondere bei einem großen Probenaufkommen wie bei der Durchsicht von Populationen.



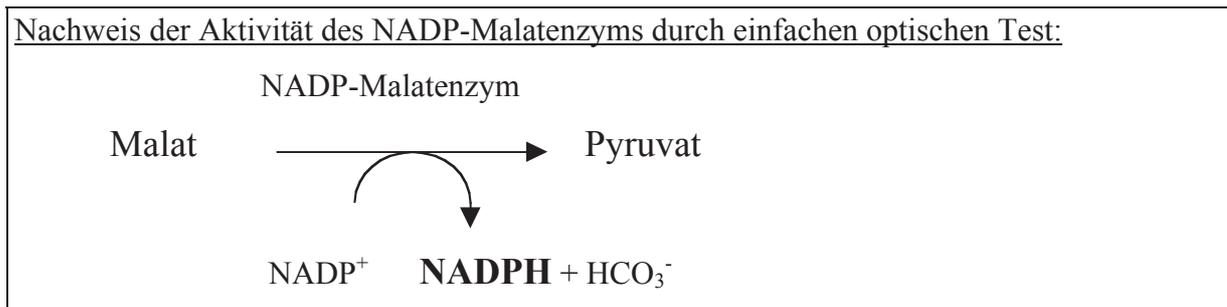
In den Reaktionsansätzen befanden sich in je 200 μ l Volumen:

100 mM	Tricin/NaOH, pH 8,0
10 mM	DTT
8 mM	$MgSO_4$
10 mM	$NaHCO_3$
2 mM	Pyruvat*
5 mM	$(NH_4)_2SO_4$
1,5 mM	NaH_2PO_4
0,24 mM	NADH
1 mM	ATP
1 U	NADH-Malat-Dehydrogenase (Boehringer, Mannheim)
0,3 U	PEP-Carboxylase (Präparation nach Hatch und Heldt, 1985)
5 % (v/v)	Extrakt

* Pyruvat wurde in den Ansätzen zur Hintergrundkorrektur weggelassen.

2.2.5.11.7. NADP-Malatenzym (EC 1.1.1.40)

Die Aktivität des NADP-Malatenzyms wurde nach Hatch und Mau (1977) in decarboxylierender Richtung mit einem einfachen optischen Test bestimmt.



In den Reaktionsansätzen befanden sich in 200 µl Gesamtvolumen:

50 mM	Tricin/ NaOH, pH 7,3
25 mM	Malat*
25 mM	MgCl ₂
0,6 mM	NADP
5 % (v/v)	Extrakt

* Auf die Malatzugabe wurde in Ansätzen zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrundes verzichtet.

2.2.5.11.8. PEP-Synthetase (EC 2.7.9.2)

Die Messung der *E. coli*-PEP-Synthetase-Aktivität in transgenen Pflanzen erfolgte radioaktiv in Anlehnung an die Verfahren von Cooper und Kornberg (1969) und Panstruga et al. (1997). Zur Kontrolle auf systematische Fehler wurde die PEP-Produktion parallel auch in Ansätzen mit gereinigter rekombinanter PPK aus *F. pringlei* (2.2.5.10.1) untersucht.

Arabidopsis-Chloroplasten wurden wie unter 2.2.5.2 aufgeschlossen und sedimentiert. Das Sediment der ersten Zentrifugation wurde im HB-Rückstand (2.2.5.2) resuspendiert, mit 5 Volumen Puffer A aufgefüllt und 10 min bei 3.000 U·min⁻¹ in der Bodenzentrifuge (Hermle ZK 364, Kontron) zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt, das Sediment mit einem rotierenden Pistill in 1 ml Puffer A aufgeschlossen und die Ansätze 3 min bei 12.000 U·min⁻¹ (15.300 xg) zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und die Extraktion des Sedimentes zweimal in gleicher Weise wiederholt. Die Vereinigten Überstände wurden mit gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung auf 40% (NH₄)₂SO₄-Sättigung gebracht und die Ansätze 5 min bei 3.000 U·min⁻¹ zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 µl Puffer B aufgenommen und auf eine mit 6 ml Puffer B äquilibrierte DEAE-Zellulose-Säule (Pharmacia, Freiburg) gegeben. Die Säule wurde mit je 3 ml 0,1 M KCl, 0,2 M KCl und 0,3 M KCl gewaschen und die potentiell aktive Fraktion mit 6 ml 0,4 M KCl eluiert. Die Säule wurde mit 6 ml 1 M KCl gespült und die Eluate auf 60% (NH₄)₂SO₄-Sättigung gebracht, 10 min wie zuvor zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 250 µl Puffer B aufgenommen und bis zur Aktivitätsbestimmung bei 4°C gelagert.

Die Ansätze für die Aktivitätsbestimmungen umfaßte ein Volumen von je 500 µl und setzten sich wie folgt zusammen:

100 mM	Hepes/ KOH, pH 8,4
10 mM	MgCl ₂
10 mM	ATP*
2 mM	[2- ¹⁴ C]-Pyruvat (15 mCi·mmol ⁻¹ , NEN, Köln)

* Negativkontrollen wurde das ATP vorenthalten.

Die Kontrollansätze mit PPK, einer mit und einer ohne ATP, wurden im gleichen Volumen und mit der gleichen Stoffmenge [2-¹⁴C]-Pyruvat wie die PEP-Synthetase-Reaktionsansätze angesetzt. Auf den Zusatz der Kopplungsenzyme und des Creatinphosphats (2.2.5.10.1) wurde dabei verzichtet.

Die Reaktionsgefäße wurden bei 37°C inkubiert und 40 µl-Aliquots nach 0, 15, 30, 60 und 180 min Reaktionszeit entnommen in flüssigem Stickstoff abgestoppt und bis zum Auftrag auf Kieselgur-Platten (GUR-25, Macherey & Nagel, Düren) bei -80°C gelagert.

Je 25 µl der Proben wurden wie unter 2.2.5.9 auf die Kieselgur-Platten aufgetragen, die Platten in Laufmittel II entwickelt, anschließend 3 h unter dem Abzug getrocknet und 24 h auf Bildspeicherplatten exponiert (s. 2.2.5.9.2).

Laufmittel II:

n-Propanol : 25 % NH₃ (v/v) 13:7

Puffer A:

5 mM	Tris/ HCl, pH 7,5
10 mM	MgCl ₂
2 mM	EDTA
0,015 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

Puffer B:

5 mM	Tris/ HCl, pH 6,8
1 mM	MgCl ₂
5 mM	EDTA
0,015 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
1 M	Saccharose

2.2.5.12. Perchlorsäureextraktion von Blattmaterial

Blattmaterialproben definierten Frischgewichts wurden von *A. thaliana*-Pflanzen schon beschriebenen Alters (2.2.1.2) geerntet und in Alubriefchen überführt. Die während der

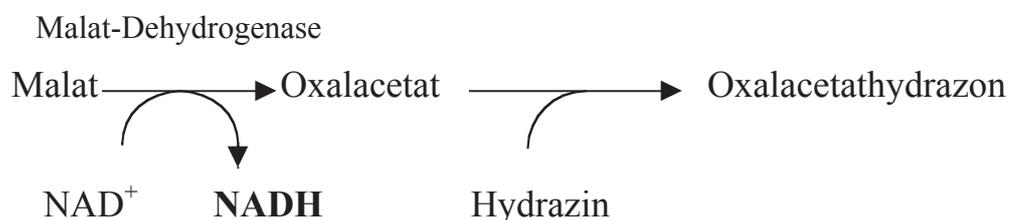
Lichtperiode eines Tagesganges genommenen Proben wurden bis zum Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff im Licht gehalten. Die Blattproben wurden bis zur Extraktion bei -80°C gelagert.

Die Proben wurden in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser pulverisiert, 1 ml 1 M HClO_4 hinzugefügt und homogenisiert. Der leicht angetaute Extrakt wurde mit einem Spatel in 2 ml-Einweg-Reaktionsgefäße überführt, der Rückstand der ersten Überführung in 1 ml 0,1 M HClO_4 aufgenommen, bis zum Auftauen mit dem Pistill weitervermischt und die resultierende Suspension mit dem ersten Homogenat vereinigt. Die Reaktionsgefäße wurden 3 min bei $14.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ (20.800 xg) zentrifugiert, 1,8 ml des Überstandes abgehoben, in neue 2 ml-Reaktionsgefäße transferiert und auf Eis zweimal $50 \mu\text{l}$ 5 M K_2CO_3 zur Neutralisierung hinzugegeben. Nachfolgend wurden die Reaktionsgefäße 3 min bei $14.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ (20.800 xg) zentrifugiert und die Überstände in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, in die zuvor eine Spatelspitze Aktivkohle zur Adsorption von phenolischen Substanzen, Reduktionsäquivalenten und ATP gegeben worden war. Die Zugabe der Aktivkohle unterblieb wenn Polyamingehalte in den Extrakten gemessen werden sollten. Die Reaktionsgefäße wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5.13. Bestimmung des Malatgehaltes in Perchlorsäureextrakten

Die Bestimmung der Malatgehalte erfolgt enzymatisch nach der von Lowry und Passoneau (1992) ausgearbeiteten Endpunktmethode durch einen direkten optischen Test, bei dem die Gesamtmenge reduzierten NAD^+ s photometrisch bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ gemessen wird.

Reaktionsverlauf beim Malatnachweis nach Lowry und Passoneau (1992):



Aliquots der Perchlorsäureextrakte wurden aufgetaut und die Aktivkohle sowie restliches Kaliumperchlorat 1 min bei $14.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ (20.800 xg) sedimentiert. Aliquots der Überstände wurden für die photometrische Messung bei 30°C im Absorptionsmodus (Kurzpaßabsorptionsfilter, $\lambda = 360 \text{ nm}$) des Mikrotiterplattenlesegeräts (*SpectraFluor plus*, SIL-Tecan, Crailsheim) eingesetzt.

In einem Testansatz von 200 μl befanden sich:

200 mM Hydrazin/ HCl, pH 9,1

2 mM NAD^+

15 % (v/v) Extrakt

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von

2 U NADH-Malat-Dehydrogenase (Boehringer, Mannheim)

mit einem Stempelblock (Technische Werkstätten der Botanischen Institute, Universität Köln) gestartet.

Aus den absoluten Extinktionsänderungen konnten die Malatkonzentrationen in den Ansätzen nach folgender Formel berechnet werden:

$$\Delta c (\text{Malat}) = \frac{\Delta E \cdot \pi \cdot r^2}{\epsilon_{340}(\text{NADH}) \cdot V_E}$$

ΔE :	absolute Extinktionsänderung	[dimensionslos]
r:	Radius der Reaktionsräume	[cm]
$\epsilon_{340}(\text{NADH})$:	Extinktionskoeffizient von NADH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$	$[\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}]$
V_E :	eingesetztes Extraktvolumen	$[\text{cm}^3]$
$\Delta c (\text{Malat})$:	Konzentrationsänderung an Malat	$[\mu\text{mol} \cdot \text{ml Extrakt}^{-1}]$

2.2.5.14. Bestimmung des Gesamtaminosäuregehaltes in Perchlorsäureextrakten

Ninhydrin enthält eine thermodynamisch stabile Hydratgruppe, an die die Aminogruppe der Aminosäuren nukleophil angreifen kann. Das Endprodukt nachgeschalteter Umlagerungen absorbiert maximal bei $\lambda = 506 \text{ nm}$. Um die Aminosäuremengen in den Proben quantifizieren zu können wurden Eichreihen mit Alanin-Konzentrationen zwischen 0 und $2,5 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ mitgeführt.

Von den Extrakten und Eichlösungen wurden 40 μl in Einmal-Reaktionsgefäßen mit 160 μl 3 M Essigsäure verdünnt und mit 400 μl Ninhydrin-Lösung versetzt. Die Proben wurden 10 min auf 80° C erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und je zweimal 250 μl eines jeden Ansatzes in verschiedene Reaktionsräume einer transparenten Mikrotiterplatte (Greiner, Solingen) pipettiert und die Absorption der Lösungen mit einem

Absorptionsfilter von $\lambda = 492$ nm im *SpectraFluor plus* (SIL-Tecan, Crailsheim) gemessen.

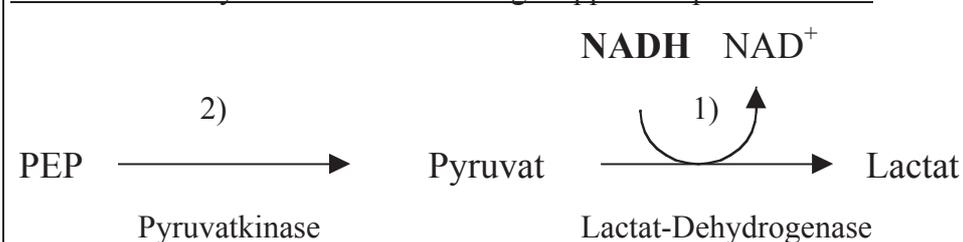
Ninhydrin-Lösung:

0,4 g	Ninhydrin
1 g	CdCl ₂
80 ml	Rotisol
10 ml	Eisessig
	ad 110 ml H ₂ O _{dd}

2.2.5.15. Bestimmung der Gehalte an Pyruvat und PEP in Perchlorsäureextrakten

PEP und Pyruvat wurden gemeinsam durch einen indirekten optischen Test nachgewiesen. Der Nachweis von Pyruvat erfolgt direkt durch Zugabe von Lactat-Dehydrogenase, der daran gekoppelte Nachweis von PEP erfolgt durch Zugabe von Pyruvatkinase:

Nachweis von Pyruvat und PEP durch gekoppelten optischen Test:



Pyruvat- und PEP-Gehalte sind in Pflanzengewebe vergleichsweise gering und wurden daher über NADH-Fluoreszenz in nicht-transparenten Mikrotiterplatten (Greiner, Solingen) bei 30°C im *SpectraFluor plus* (SIL-Tecan, Crailsheim) nachgewiesen. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei $\lambda < 360$ nm, emittierte Fluoreszenz wurde bei $\lambda < 435$ nm gemessen (s. 2.2.5.10.2). In verschiedenen Perchlorsäureextrakten wurde die NADH-Fluoreszenz unterschiedlich stark gedämpft, was die Meßergebnisse verfälschen kann sobald die Extrakte in der Messung mehr als 10 % des Gesamtvolumens einnehmen. Daher wurden die Lösungsseigenschaften eines jeden Extrakts auf die im Test eingesetzte NADH-Menge über individuelle Eichkurven erfaßt.

Außerdem wurden die gemessenen Fluoreszenzdifferenzen gegen die Fluoreszenzänderung durch bloße Enzymzugabe korrigiert. Vor Zugabe der Kopplungsenzyme wurde ca. 15 min gewartet bis sich die Fluoreszenzsignale aus den Reaktionsräumen stabilisiert hatten.

Pro Reaktionsraum der Mikrotiterplatten wurden in 200 µl vorgelegt:

50 mM	Hepes, pH 7,5
1 mM	ADP
1 mM	MgCl ₂
50 µM	NADH.
50 % (v/v)	Extrakt

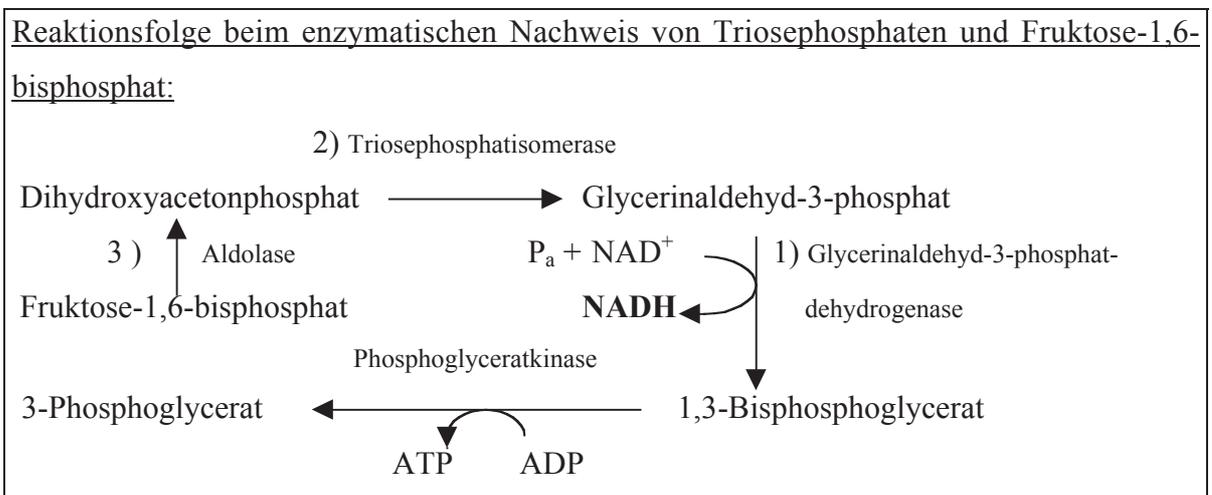
Später wurden mit einem Stempelblock in die Reaktionsräume zugegeben:

- 1) 14 mU Lactat-Dehydrogenase(Boehringer, Mannheim) zur Umsetzung von Pyruvat
- 2) 40 mU Pyruvatkinase(Boehringer, Mannheim) zur Umsetzung von PEP

Die NADH-Eichgerade deckte den Konzentrationsbereich bis 10 nmol·ml⁻¹ NADH ab. Die Kinetiken wurden mit Hilfe der mitgelieferten Programme (*EasyWin Kinetics*, SIL-Tecan) ausgewertet.

2.2.5.16. Bestimmung der Triosephosphat- und Fruktose-1,6-bisphosphatgehalte in Perchlorsäureextrakten

Der Nachweis von Dihydroxyacetonphosphat, Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fru-1,6-bP erfolgte gemeinsam über einen gekoppelten optischen Test im Fluoreszenzmodus des Mikrotiterplattenlesegerätes (s. 2.2.5.15). Zur Umsetzung der einzelnen Metabolite wurden sequentiell Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (1), Triosephosphatisomerase (2) und Aldolase (3) zugegeben. Die unter 2.2.5.15 erstellten Eichkurven konnten übernommen werden. Die der Quantifizierung zugrundeliegenden NADH-Eichgeraden deckten den Bereich bis 2 nmol·ml⁻¹ NADH ab.



Pro Reaktionsraum wurden in einem Volumen von 200 μl vorgelegt:

50 mM	Hepes/ NaOH, pH 7,5
0,6 mM	NAD ⁺
1 mM	ADP
2 mM	NaH ₂ PO ₄
50 % (v/v)	Extrakt

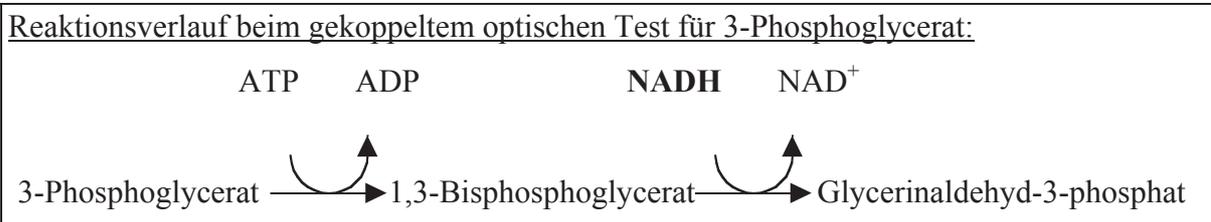
Zur Umsetzung der einzelnen Metabolite wurden mit einem Stempelblock zugegeben:

- 1) 32 mU Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
(Boehringer, Mannheim)
- 2) 80 mU Triosephosphat-Isomerase (Boehringer, Mannheim)
- 3) 0,1 U Aldolase (Boehringer, Mannheim)

Durchführung und Auswertung der Messungen erfolgten wie in 2.2.5.15.

2.2.5.17. Bestimmung von 3-Phosphoglycerat-Gehalten in Perchlorsäureextrakten

Beim 3-Phosphoglyceratnachweis handelt es sich um einen gekoppelten optischen Test, wobei hier der umgekehrte Weg wie bei der Bestimmung der TrioseP eingeschlagen wird (s. 2.2.5.16):



Pro Reaktionsraum wurden in einem Volumen von 200 μl vorgelegt:

50 mM	Hepes/ NaOH, pH 7,5
10 mM	MgCl ₂
2 mM	ATP
20 μM	NADH
10 % (v/v)	Extrakt

Aufgrund des geringen Anteils des Extraktes am Gesamtvolumen der Tests wurden die Meßwerte nicht gegen die spezifische Fluoreszenzlöschung der Extrakte (2.2.5.15) korrigiert. Die NADH-Eichwerte reichten bei diesem Test bis 20 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ NADH herauf.

Pro Ansatz wurden gemeinsam zugegeben:

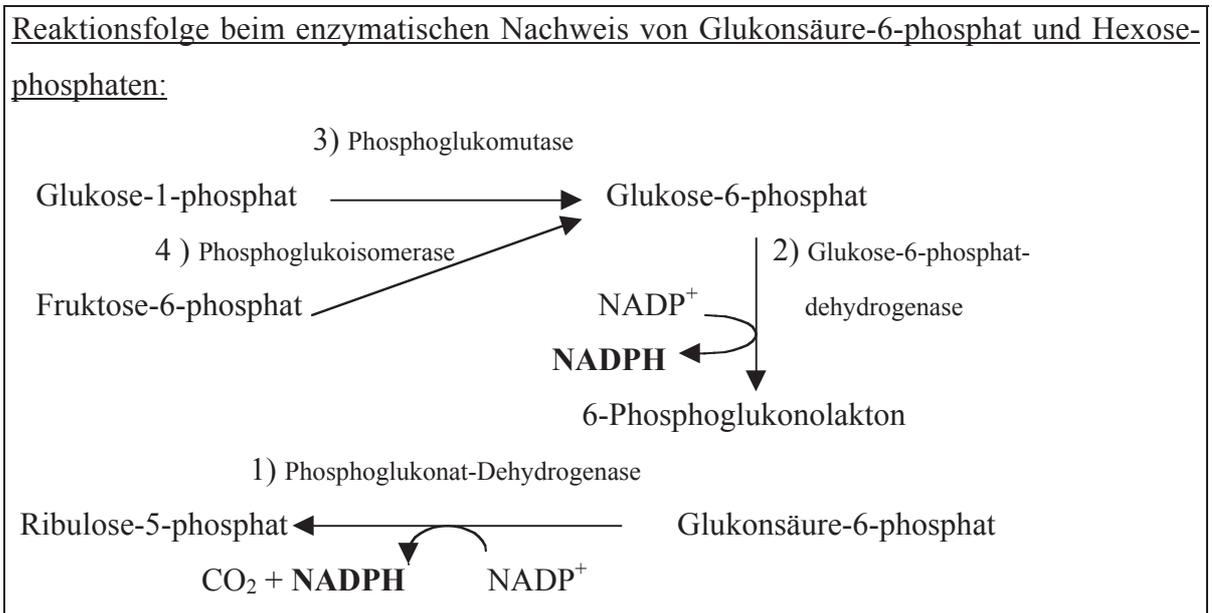
20 mU Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Boehringer, Mannheim)

50 mU Phosphoglyceratkinase (Boehringer, Mannheim)

Messung und Auswertung erfolgten ansonsten wie unter 2.2.5.17 beschrieben.

2.2.5.18. Bestimmung von Glukonsäure-6-phosphat- und Hexosephosphatgehalten in Perchlorsäureextrakten

Gehalte an 6-PG, Glk6P, Glk1P und Fru6P wurden gemeinsam in einem z.T. gekoppelten optischen Test bestimmt. Eichungen und Korrekturen wurden wie unter 2.2.5.17 vorgenommen.



In den Reaktionsräumen der Mikrotiterplatten befanden sich in 200 µl:

100 mM Hepes/ KOH, pH 7,5

0,8 mM NADP⁺

1 mM MgCl₂

10 µM Glukose-1,6-bisphosphat

10 % (v/v) Extrakt

Nach 15 min Präinkubation (2.2.5.15) wurden sequentiell

1) 50 mU Glukonsäure-6-phosphat-Dehydrogenase (Boehringer, Mannheim)

2) 0,1 U Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Roche, Mannheim)

3) 40 mU Phosphoglukomutase (Boehringer, Mannheim)

4) 0,35 U Phosphoglukoisomerase (Roche, Mannheim)

mit einem Stempelblock in die Reaktionsräume gegeben.

Messung, Korrektur und Auswertung der Bestimmungen erfolgten wie unter 2.2.5.17.

2.2.5.19. Bestimmung der Gehalte an freiem P_a in Perchlorsäureextrakten

Gehalte anorganischen Phosphats wurden nach der Methode von Bartlett (1958) mit leichten Modifikationen bestimmt.

Mindestens 350 µl der Perchlorsäureextrakte (2.2.5.12) wurden mit H₂O_{dd} auf 1 ml aufgefüllt, 50 µl 5 M H₂SO₄, 50 µl 5 % (w/v) Ammoniumheptamolybdat und 50 µl Fiske-Subbarow-Reagens hinzugegeben, die Ansätze 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, 2 min bei 14.000 U·min⁻¹ (20.800 xg) zentrifugiert und die Extinktion von 900 µl des Überstandes bei λ = 680 nm im Photometer (LKB Novaspec II, Pharmacia, Freiburg) gemessen. Eine Eichreihe mit 0 bis 0,2 µmol Phosphat wurde parallel mitgeführt.

Fiske-Subbarow-Reagens:

15 % (w/v) Na₂S₂O₅

0,25 % (w/v) 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure

0,5 % (w/v) Na₂SO₃

Die Lösung ist bei dunkler Lagerung eine Woche lang haltbar.

2.2.5.20. Bestimmung von Polyamingehalten in Perchlorsäureextrakten über HPLC

Die Bestimmung von Polyaminen erfolgte nach Dansylierung unter Anbringung leichter Modifikationen wie von Marcé et al. (1995) beschrieben.

300 µl der Perchlorsäureextrakte von mehr als 100 mg Blattmaterial wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen mit 4 µl 50 µM Diaminoheptan als internem Standard, 300 µl gesättigter Na₂CO₃-Lösung und 600 µl Dansylchlorid (5 mg·ml Aceton⁻¹) vermischt und 30 min bei 40°C im Dunkeln derivatisiert. Nach der Zugabe von 200 µl Prolin (100 mg·ml⁻¹) wurden die Proben 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es wurden 1 ml Toluol hinzugegeben, die Reaktionsgefäße 30 s geschüttelt und 600 µl der Oberphase nach der Phasentrennung im Vakuumkonzentrator (Bachofer, Reutlingen) 25 min bei 35°C zur Trockne eingengt. Die Sedimente wurden unmittelbar vor der Injektion in das HPLC-System in 40 µl Acetonitril resuspendiert und dunkel und auf Eis gelagert.

Zur Eichung des Systems wurden 1 mM Polyaminstandards verschiedener Zusammensetzung in der Hälfte der o.a. Volumina derivatisiert und in 800 µl Acetonitril resuspendiert.

20 µl der Standards und der Proben wurden auf einer 250 x 4,6mm C₁₈-Spherisorb ODS II-Säule, 5 µm Partikelgröße (Bischoff Analystechnik, Leonberg) mit einer Nucleosil C₁₈ 120-5 250/8/4-Vorsäule (Macherey und Nagel, Düren) bei 1,5 ml·min⁻¹ Lösungsmittelfluß

in folgendem Gradienten mit einer Shimadzu LC-6A-Anlage (Shimadzu, Tokio, JP) aufgetrennt:

0 – 4 min 70 % Acetonitril (= Eluent B)

5 – 9 min 100 % Acetonitril

10 – 15 min 70 % Acetonitril

Eluent A: H₂O_{dd}

Die Detektion bei $\lambda = 500$ nm erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor (Shimadzu RF-535, Shimadzu, Tokio, JP) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 350$ nm. Die Integration der Signale erfolgte mit dem Shimadzu Chromatopac CR-5A (Shimadzu, Tokio, JP). Abweichende Effizienzen bei der Derivatisierung wurden über den internen Standard Diaminoheptan korrigiert.

2.2.5.21. Bestimmung der Stärkegehalte in Blattproben

A. thaliana-Blattmaterial eines Frischgewichts zwischen 20 und 80 mg wurde in 2 ml-Einweg-Reaktionsgefäßen gerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Extraktion und Aufarbeitung des Blattmaterials erfolgte wie in 2.2.5.8, 2.2.5.8.2 und 2.2.5.8.3 beschrieben.

Der letzte Zentrifugationsüberstand (2.2.5.8.2) wurde bis zur Messung bei -20°C tiefgefroren.

Aliquots der Überstände wurden bei 30°C im Mikrotiterplattenlesegerät (SIL-Tecan, Crailsheim) mit einem Absorptionsfilter von $\lambda = 360$ nm im Absorptionsmodus in folgenden Testansätzen eingesetzt:

100 mM Hepes/ KOH, pH 8,0

0,6 mM NADP⁺

2 mM ATP

10 mM MgCl₂

2,5 % (v/v) Überstand

Die Reaktionen wurden nach wenigen Minuten durch Zugabe eines Gemisches von

34 mU Hexokinase und

17 mU Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase

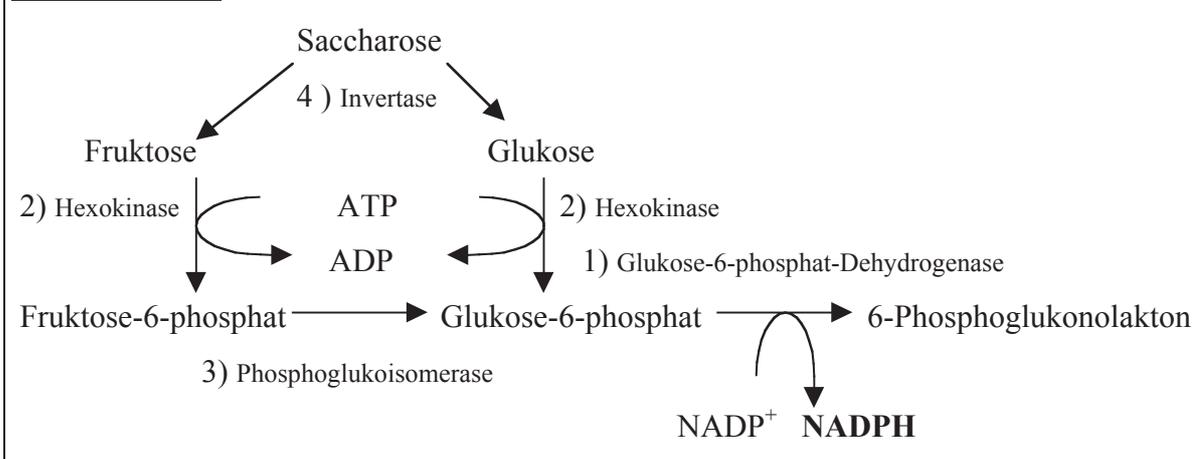
mit einem Stempelblock gestartet und wie unter 2.2.5.13 dargelegt ausgewertet.

2.2.5.22. Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blattproben

Die Rückstände der ethanolischen Fraktionen nach dem Einengen (s. 2.2.5.8.1) wurden in 200 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ mit einem Rührspatel resuspendiert, unlösliche Bestandteile 2 min bei $14.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ (20.800 xg) sedimentiert. 20 μl des Überstandes wurden für die Zuckerbestimmung in den gleichen Testansätzen wie unter 2.2.5.21 eingesetzt.

Glk6P, Glukose, Fruktose und Saccharose wurden nach Bergmeyer (1970) gemeinsam in einem gekoppelten optischen Test durch die sequentielle Zugabe der folgenden Enzyme (2.2.5.18) bestimmt:

Reaktionsfolge beim enzymatischen Nachweis von Glukose-6-phosphat, Glukose, Fruktose und Saccharose:



- 1) 50 mU Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Roche, Mannheim)
- 2) 20 mU Phosphoglukomutase (Boehringer, Mannheim)
- 3) 0,2 U Phosphoglukoisomerase (Roche, Mannheim)
- 4) 120 U Invertase (Roche, Mannheim)

Messung und Auswertung erfolgten wie unter 2.2.5.13 beschrieben.

2.2.5.23. Wäßrige Extraktion von Blattmaterial

Von *A. thaliana* eines Alters wie unter 2.2.1.2 beschrieben wurden Blätter eines Frischgewichts zwischen 30 und 60 mg wurden wie unter 2.2.5.12 gerntet und in 300 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ mit einem rotierenden Pistill extrahiert, der Pistill mit 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ nachgespült und die Proben 10 min bei 95°C gekocht. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert, 250 μl des Überstandes in neue 1,5 ml-Einweg-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Derivatisierung bei -80°C gelagert.

2.2.5.24. Bestimmung von Aminosäuregehalten in wäßrigen Extrakten über HPLC

Die Aminosäuregehalte wurden über die Derivatisierung mit Orthophthalaldehyd (OPA) nach der Methode von Hecker (unveröffentlicht) bestimmt.

Aliquots der wäßrigen Extrakte (2.2.5.23) wurden 1 min bei Raumtemperatur mit 1 μ l Fluoraldehyd™-Reagens (Pierce, Bonn) automatengesteuert prässäulenderivatisiert und auf einer Hypersil-ODS 5 Säule (125 x 4,6 mm) mit einer 40 x 4,6 mm Vorsäule (beide CS Chromatographieservice, Langerwehe) mit einem diskontinuierlichen binären Gradienten (s.u.) bei 40°C auf einem HP 1090 HPLC-System (Hewlett Packard, Waldbronn) aufgetrennt. Die Derivate wurden bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 230$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 455$ nm mit einem HP 1046A Fluoreszenzdetektor detektiert und mit dem Programm *Chemstation v6.03* (Hewlett Packard, Waldbronn) quantifiziert.

Verwendeter binärer Gradient:

t (min)	% (v/v) Puffer B	Flußrate (ml·min ⁻¹)
0	7	0,8
3	10	0,8
12	15	0,8
12,1	15	1
20	50	1
22	100	1
25	100	Ende

Puffer A:

20 mM NaOAc, pH 7,2

0,008 % (v/v) Triethylamin

0,3 % (v/v) THF

Puffer B:

100 mM NaOAc, pH 7,2 : Acetonitril : Methanol (v/v/v) 1:2:2

2.2.5.25. Bestimmung des Phosphorylierungsgrades transitorischer Stärke

Die Bestimmung des Stärkephosphorylierungsgrades wurde in modifizierter Form nach Nielsen et al. (1994) durchgeführt.

Zwei Blattrosetten von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen eines Alters wie unter 2.2.1.2 beschrieben und eines Gesamt-Frischgewichts von 150 bis 300 mg wurden unmittelbar vor Ende der Lichtperiode und 2 h nach Beginn der Dunkelperiode geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung des Materials bei -80°C gelagert. Das Blattmaterial wurde in einem auf Eis gekühlten Mörser in 5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ unter Zugabe einer Spatelspitze säuregewaschenem Seesand gemörsert, das Homogenisat durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, Schwalbach) filtriert, der Mörser mit 2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gespült und die vereinigten Filtrate 4 min bei $3.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ in der Bodenzentrifuge (Hermle ZK 364, Kontron) zentrifugiert. Das Sediment wurde noch zweimal unter Resuspendieren des Bodensatzes mit 2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ und einmal mit 2 ml 80 % Ethanol gewaschen und jeweils wie zuvor zentrifugiert. Das letzte Sediment wurde unter dem Abzug getrocknet, in 100 μl 0,7 M HCl aufgenommen und in 1,5 ml-Einweg-Reaktionsgefäße überführt. Die Stärke wurde 2 h bei 95°C sauer hydrolysiert, nach dem Abkühlen mit dem gleichen Volumen 0,7 M KOH unter Zugabe von 50 μl 333mM HEPES/ KOH, pH 7,3 neutralisiert, kurz anzentrifugiert und die Überstände für Glukose- und Glk6P-Bestimmungen in getrennten Ansätzen eingesetzt. Für die Glukosebestimmung mit einem Absorptionsfilter von $\lambda = 360 \text{ nm}$ im Absorptionsmodus des Mikrotiterplattenlesegerätes (SIL-Tecan, Crailsheim) wurden 20 μl einer 1:10-Verdünnung des Überstandes eingesetzt, für die Glk6P-Bestimmung im Fluoreszenzmodus (2.2.5.18) 20 μl des unverdünnten Überstandes. In beiden Fällen enthielten die Reaktionsräume 200 μl folgender Testansätze:

100 mM	HEPES/ KOH, pH 8,0
0,32 mM	NADP ⁺
0,8 mM	ATP
4 mM	MgCl ₂
10 % (v/v)	Probe

Die Messungen wurden wie unter 2.2.5.22 gestartet und wie zuvor beschrieben (2.2.5.13 und 2.2.5.17) ausgewertet.

2.2.5.26. Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Lösungen

Chlorophyllgehalte wurden photometrisch nach Graan und Ort (1984) in 80 % Aceton bestimmt.

Die zu testenden Lösungen wurden mit 80 % Aceton auf 1 ml aufgefüllt, die Gefäße invertiert und 10 min im Dunkeln inkubiert. Bei Bedarf wurde Blattmaterial bekannten Frischgewichts direkt in 80 % Aceton gemörsert, in 1,5 ml-Einweg-Reaktionsgefäße

überführt und in gleicher Weise inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße 1 min bei $14.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ (20.800 xg) zentrifugiert und $900 \mu\text{l}$ der Überstände im Photometer (LKB Novaspec II, Pharmacia, Freiburg) bei $\lambda = 645 \text{ nm}$, $\lambda = 652 \text{ nm}$ und $\lambda = 663 \text{ nm}$ in einer bei $\lambda = 663 \text{ nm}$ gegen Null abgeglichenen Küvette gemessen. Die Chlorophyllgehalte der Lösungen bzw. der Extrakte konnten mit den von Graan und Ort (1984) bestimmten Extinktionskoeffizienten berechnet werden.

2.2.6. Untersuchung des Sekundärmetabolismus

2.2.6.1. Methanolische Extraktion von Pflanzengewebe

Die Auftrennung von UV-Schutzsubstanzen und ihre Extraktion (2.2.6.1 bis 2.2.6.3.2) wurde in Anlehnung an Weissenböck et al. (1984) durchgeführt.

A. thaliana Blattmaterial eines unter 2.2.1.2 dargelegten Alters wurde gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion bei -20°C bis -80°C gelagert. Die Proben wurden in 2 bis 5 Volumen (v/w) 60 % Methanol gemörsert, in 1,5 ml-Einweg-Reaktionsgefäße überführt, die Mörser mit $200 \mu\text{l}$ 60 % Methanol gespült und die vereinigten Extrakte kurz anzentrifugiert. Aliquots der Überstände wurden für nachfolgende Analysen weiterverwendet und bei Bedarf bei -20°C aufbewahrt.

2.2.6.2. Auftrennung phenolischer UV-B-absorbierender Metabolite per HPLC

Mit einer Shimadzu LC-10A-Anlage (Shimadzu, Tokio, JP) wurden $10 \mu\text{l}$ der methanolischen Extrakte (2.2.6.1) über eine Nucleosil 100-5 C_8 -Säule ($125 \times 4,6 \text{ mm}$, CS Chromatographierservice, Langerwehe) in einem binären, diskontinuierlichen Phosphorsäure/ Acetonitril-Gradienten bei Raumtemperatur und einer Flußrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ aufgetrennt. Phenylpropane wurden mit dem Shimadzu SPD-10A-Detektor über die Absorption bei 315 nm detektiert und mit dem Chromatopac CR-5A (Shimadzu, Tokio, JP) quantifiziert.

Verwendeter Gradient:

0 min	15 % Lösung B
8 - 13 min	17 % Lösung B
16 min	18 % Lösung B
26 min	50 % Lösung B, Ende der Aufzeichnung
27 - 31 min	100 % Lösung B
32 - 38 min	15 % Lösung B

Lösung A:1 % (v/v) Phosphorsäure in H₂O_{dd}**Lösung B:**

Acetonitril

2.2.6.2.1. Charakterisierung der Substanzen durch Co-Chromatographie

Aliquots gereinigter Kaempferol-Glykoside unbekannter Konzentration (Sammlung Prof. Weissenböck, Institut für Botanik, Köln) wurden bei Bedarf mit 80 % Methanol verdünnt und wie unter 2.2.6.2 chromatographisch aufgetrennt und detektiert. Stimmt die Retentionszeit der Glykoside mit einer Komponente aus den Extrakten überein, so wurden 10 µl eines methanolischen Blattextraktes (2.2.6.1) mit dem gleichen Volumen einer Referenzsubstanz adäquater Verdünnung koinjiziert.

2.2.6.2.2. Charakterisierung der Substanzen durch die Aufnahme von Absorptionsspektren

Konnten die Signale des HPLC-Chromatogramms (2.2.6.2) keinem der vorhandenen Kaempferol-Glykoside zugeordnet werden, so wurde das Laufmittel während der Chromatographie (2.2.6.2) zum Zeitpunkt maximaler Detektorreaktion im Analysator (Shimadzu SPD-10A, Shimadzu, Tokio, JP) festgehalten und grundlinienkorrigierte Absorptionsspektrum von $\lambda = 230$ nm bis $\lambda = 370$ nm aufgenommen, mit einem Schreiber (Goerz Servogor S, Norma-Goerz, Neudorf, A) festgehalten und die Absorptionsmaxima und -minima am Detektor bestimmt. Mit Hilfe von Literaturwerten (Harborne et al., 1975) konnten dann Zuordnungen zu bekannten Phenylpropanen vorgeschlagen werden.

2.2.6.3. Auftrennung phenolischer Substanzen über Dünnschichtchromatographie

Methanolische Extrakte (2.2.6.1) von mehr als 100 mg Blattgewebe wurden in 1,5 ml Aliquots im Vakuumkonzentrator (Bachofer, Reutlingen) zur Trockne eingengt und in 50 µl 80 % Methanol aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.6.3.1. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie

15 µl der eingengten Extrakte (2.2.6.3) wurden punktförmig auf mikrokristalline Zellulose-Platten (Avicel 400, Macherey und Nagel, Düren) und in 15 % Essigsäure

entwickelt. Die über Nacht unter dem Abzug getrockneten Platten wurden zuerst mit Ammoniakdampf geräuchert und unter UV-C- ($\lambda = 254 \text{ nm}$) und UV-B-Anregung ($\lambda = 350 \text{ nm}$) fotografisch dokumentiert, bevor sie nach dem Verfliegen des Ammoniaks gleichmäßig mit Naturstoffreagenz A-Sprühlösung besprüht wurden und in gleicher Weise analysiert wurden.

Naturstoffreagenz A-Sprühlösung:

1 % (w/v) Naturstoffreagenz A (Diphenylborsäure-2-Aminoethylester) in Methanol

2.2.6.3.2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

30 μl der eingeeengten Extrakte (2.2.6.3) wurden punktförmig in die linke untere Ecke von mikrokristallinen Zellulose-Platten (CEL MN 400 Avicel, Macherey und Nagel, Düren) aufgetragen, nacheinander in verschiedenen Dimensionen unter zwischengeschaltetem Trocknen in Laufmittel A und B entwickelt und wie unter 2.2.6.3.1 nachbehandelt und analysiert.

Laufmittel A:

60 % (v/v) Chloroform

40 % (v/v) Eisessig

Das Gemisch wird vor der Verwendung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gesättigt und als einphasige Flüssigkeit eingesetzt.

Laufmittel B:

15 % Essigsäure

2.2.6.4. Untersuchung des Kohlenstoffflusses in Sekundärmetabolite

A. thaliana Blattrosetten beschriebenen Alters (2.2.1.2) wurden wie unter 2.2.5.8.1 bei einer Photonenflußdichte von $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ für 7 h mit $240 \mu\text{Ci}$ [^{14}C]- NaHCO_3 ($56 \text{ mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$, ICN, Eschwege) markiert. Die Proben wurden am Ende des Markierungspulses in 60 % Methanol aufgeschlossen (2.2.6.1), 200 μl der Extrakte bei -20°C bis zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung gelagert und 500 μl der Extrakte bis auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingeeengt (2.2.6.3) und bis zur Auftrennung über die HPLC (2.2.6.2) bei -20°C gelagert. 10 μl dieser angereicherten Proben wurden auf der HPLC chromatographiert (2.2.6.2), die Eluate manuell alle 10 s fraktioniert und wie zuvor im Szintillationszähler gezählt. Anhand der Quantifizierungsergebnisse des

Chromatopac RC-5A und des ^{14}C -Elutionsprofils konnten die spezifischen Aktivitäten der aufgetrennten Phenylpropane bestimmt werden.

Parallel dazu wurden jeweils 10 μl der ursprünglichen Extrakte im Flüssigszintillationszähler (Beckman LS 7000, Beckman, München) nach Zugabe von 2 ml Szintillationscocktail (Rotiszint EcoPlus, Roth, Karlsruhe) gezählt, um die Volumenaktivität der Sedimente zu bestimmen. Pro Probe wurde ein 12 mg Frischgewicht entsprechendes Volumen einer Aktivität von 5 bis 25 nCi dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt (2.2.6.3.1), autoradiographiert (2.2.5.9.2), mit Ammoniak geräuchert und mit Naturstoffreagenz A besprüht (2.2.6.3.1).

2.2.6.5. Histologische Lokalisierung von Sekundärmetaboliten

Handschnitte von Blättern und Infloreszenzachsen der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* HEYN.) wurden mit Hilfe von Styropor®blöcken angefertigt, in Tropfen bidestillierten Wassers überführt und unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse E800, Nikon Düsseldorf) im Durchlicht inspiziert. Geeignete Schnitte wurden ohne Zusätze oder nach Durchziehen von 0,1 % (w/v) NH_3 bzw. 0,05 % Naturstoffreagenz A mit einem Anregungslicht von $330 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$ und einem Emissionsfilter von $\lambda > 420 \text{ nm}$ im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit einem Kameraaufsatz (Nikon FDX-35, Nikon, Düsseldorf) photographisch auf handelsüblichen Tageslichtfilmen (Agfa RSX II, Iso100/21°) dokumentiert.

2.2.6.6. Messung des Anthocyangehaltes in Blattproben

Blattproben anaerob gestreifter (2.2.1.7) Pflanzen wurden im zehnfachen Volumen 2 % (w/v) salzsaurem Methanol aufgeschlossen, auf Eis gelagert, kurz anzentrifugiert, der Überstand 1:10 mit dem Extraktionsmedium verdünnt und die Extinktion bei $\lambda = 534 \text{ nm}$ gegen salzsaures Methanol photometrisch bestimmt (LKB Novaspec II, Pharmacia, Freiburg).

2.2.6.7. Photometrische Messung von UV-Schutzsubstanzen

Die Bestimmung des generellen Gehaltes von UV-Schutzsubstanzen erfolgte nach Pinto et al. (1999) über die Absorption bei $\lambda = 310 \text{ nm}$.

Blattmaterial des beschriebenen Alters (2.2.1.2) wurde geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion bei -80°C gelagert. Die Blattproben wurden im 60fachen Volumen Methanol/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ /HCl (v/v/v) 79:20:1 gemörsert, in 2 ml-Einweg-

Reaktionsgefäße überführt und 2 h bei 65°C extrahiert. Die Reaktionsgefäße wurden kurz anzentrifugiert und 1 ml der Überstände gegen das Extraktionsmedium im Photometer (LKB Novaspec II, Pharmacia, Freiburg) bei $\lambda = 310$ nm gemessen.

3. Ergebnisse

Die von Streatfield et al. (1999) an der *cue1-1*-Mutante gemessenen Photosyntheseigenschaften, Gehalte an Kohlenhydraten, Aminosäuren und Anthocyanen zeigten auf, daß sowohl der Primär-, als auch der Sekundärstoffwechsel der *cue1-1*-Mutanten durch das Fehlen des PPT-Genproduktes pleiotrop beeinflußt war. Eine eingehendere Analyse des Primär- und Sekundärstoffwechsels mehrerer *cue1*-Allele schien daher weitgehende Einsichten über den Einfluß des PPT auf den pflanzlichen Stoffwechsel zu versprechen. Daher wurden neben detaillierteren Untersuchungen von Aminosäure-, Metabolit-, Zucker-, Stärke- und Flavonoidgehalten weitere Daten über die Photosynthese, Kohlenstoffflüsse in Primär- und Sekundärmetabolite und Wachstumseigenschaften erhoben, sowie ausgewählte Enzymaktivitäten des Primärstoffwechsels bestimmt. Darüberhinaus wurden noch vergleichende Transkriptomanalysen mit *cue1*-Mutanten und Kontrollpflanzen durchgeführt.

Es wurde darüberhinaus versucht den retikulierten *cue1*-Blattphänotyp über verschiedene Strategien zu komplementieren. Einen grundlegenden Ansatz stellte die Expression eines heterologen PPT aus Blumenkohl im *cue1*-Hintergrund dar. Weiterhin wurde untersucht, ob die über verschiedene Enzyme vermittelte Produktion von PEP aus Pyruvat im Stroma von *cue1*-Plastiden ebenfalls in der Lage ist, den retikulierten Blattphänotyp aufzuheben. Dies wurde durch die stromagebundene Überexpression der *Flaveria trinervia* C₄-Typ-PPDK, die unter physiologischen Bedingungen eine irreversible Reaktion katalysiert, und die stromagebundene Überexpression der *E. coli* PEP-Synthetase angegangen, die unter physiologischen Bedingungen eine reversible Reaktion katalysiert. An jenen Komplementanden wurden die gleichen physiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wie an den *cue1*-Mutanten durchgeführt, um die Bedeutung des plastidären PEP-Spiegels für die Ausbildung des Phänotyps herauszuarbeiten.

Außerdem wurde über chemische Mutagenese zweier *cue1*-Allele nach Mutationen weiterer Gene gesucht, die die Ausbildung des retikulierten *cue1*-Blattphänotyps verhindern.

Zuerst werden die angewandten Komplementationsstrategien und die daraus resultierenden transgenen *cue1*-Linien vorgestellt, bevor die Ergebnisse der verschiedenen physiologischen Analysen, gegliedert nach Wachstum, Photosynthese, Primär- und Sekundärmetaboliten dargelegt werden. Zum Schluß werden die Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse vorgestellt.

3.1. Komplementation des *cue1*-Phänotyps durch *metabolic engineering*

Außer verschiedenen *cue1*-Allelen und Kontrollpflanzen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit transgene *cue1-6*-Pflanzen hergestellt und untersucht, in denen der retikulierte Blattphänotyp durch die Überexpression verschiedener Gene exemplarisch für alle *cue1*-Mutanten aufgehoben wurde.

3.1.1. Überexpression des PPT aus *Brassica oleracea* in *cue1-6*

Ein grundlegender Ansatz zur Überprüfung der funktionalen Identität eines defekten Gens ist die Komplementation der Mutanten durch die Überexpression eines homologen Proteins. Hier wurde der heterologe PPT aus Blumenkohl-Infloreszenzen (BoPPT) konstitutiv in *cue1-6*-Mutanten überexprimiert. Die Transformanten zeigten keinen retikulierten Blattphänotyp mehr (Abb. 3.1). Darüberhinaus zeichneten sich die *cue1-6*/PPT-Pflanzen durch ein erhöhtes vegetatives (Abb. 3.1 und Tab. 3.1) und reproduktives Wachstum (Tab. 3.4) gegenüber dem Wildtyp aus.

Nachfolgenerationen der *cue1-6*/PPT-Transformanten wurden für einige Studien herangezogen. Die Integration des Konstruktes zur Überexpression des BoPPT wurde in den herangezogenen *cue1-6*/PPT-Pflanzen über PCR mit geeigneten Oligonukleotiden (CaMV35Sforw, BoPPTrev) überprüft und die Aktivität des funktionalen BoPPT in *cue1-6*/PPT-Blättern durch Transportexperimente mit Proteoliposomen im Vergleich zu Wildtyp-, *cue1-6*- und *cue1-6*/PPDK-Pflanzen (s. 3.1.2) gemessen (Abb. 3.2).

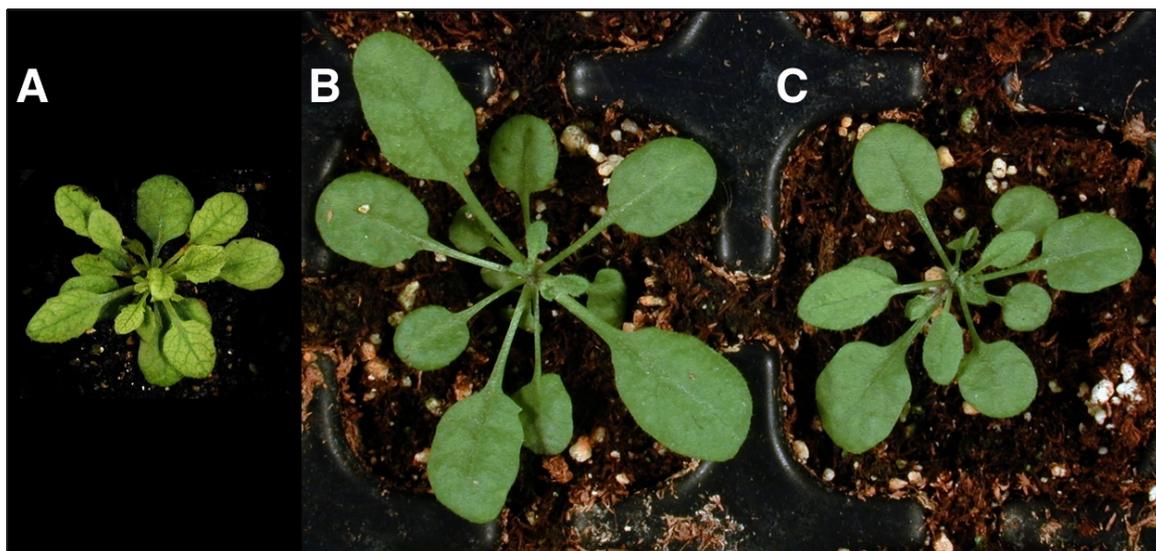


Abb. 3.1 Gegenüberstellung von *cue1-6* (A), *cue1-6*/PPT (B) und Col-0 (Wildtyp, C).

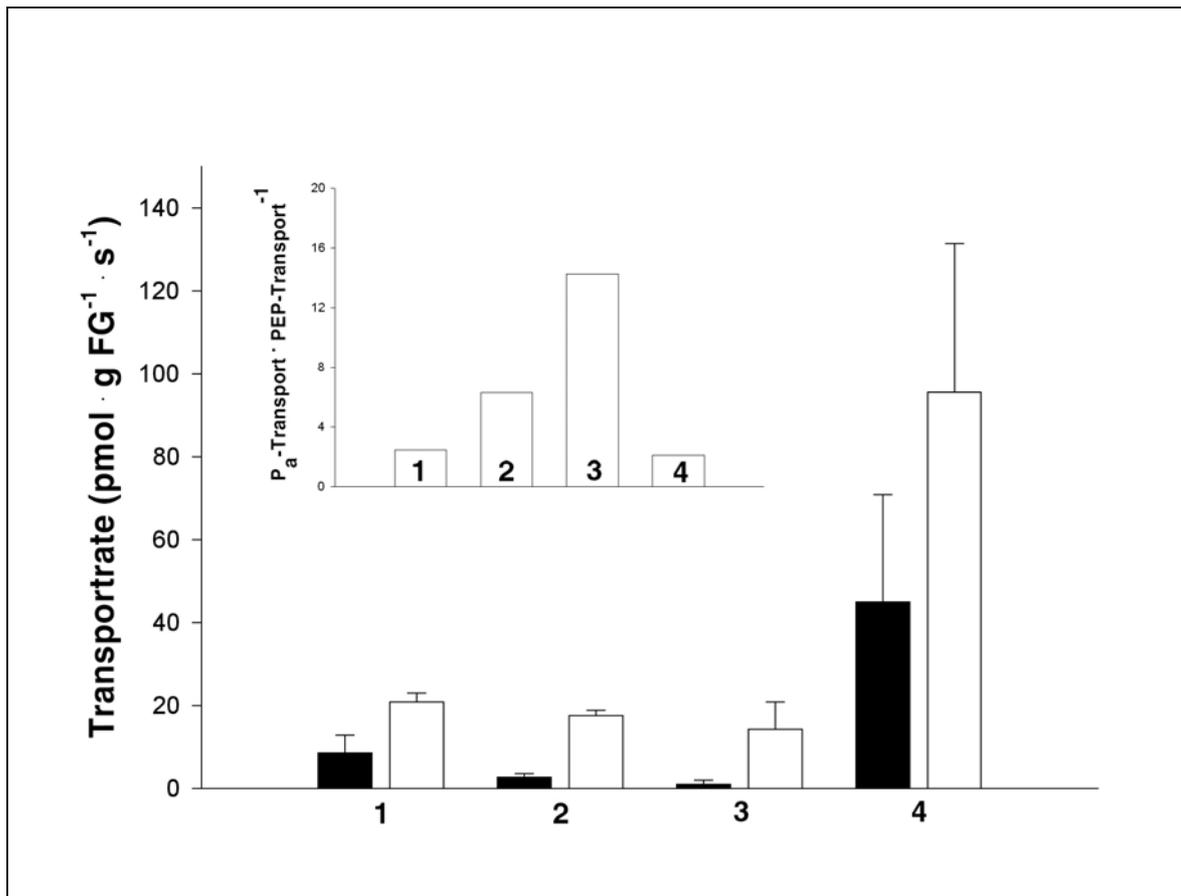


Abb. 3.2 Gegen Negativkontrollen korrigierte Transportaktivitäten in Proteoliposomen mit rekonstituiertem Blattgesamtmembranprotein. Insert: Verhältnis der P_a-Transportraten zu den PEP-Transportraten. 1: Col-0, 2: *cue1-6*, 3: *cue1-6*/PPDK, 4: *cue1-6*/PPT. schwarze Balken: PEP-Transportrate, weiße Balken: P_a-Transportrate. n=2.

Die Transportraten für PEP und P_a waren in Blättern von *cue1-6*/PPT im Vergleich zum Wildtyp (Col-0) jeweils um einen Faktor 5 erhöht; im Vergleich zu den *cue1-6*-Mutanten konnte die PEP-Transportrate durch die Überexpression des BoPPT in *cue1-6*/PPT-Blättern sogar um das 24-fache gesteigert werden, der Phosphattransport um das 6-fache. Die P_a-Transportrate im Wildtyp (Col-0) und *cue1-6*/PPT betrug etwa das doppelte der PEP-Transportrate. In Pflanzen wie *cue1-6* und *cue1-6*/PPDK, denen ein funktioneller AtPPT1 fehlt, betrug die P_a-Transportrate mehr als das sechsfache der PEP-Transportrate. Die P_a-Transportrate repräsentiert die Summe der rekonstituierten Phosphattranslokatoren, während PEP nur durch den PPT transportiert wird. Der Ausfall der AtPPT1-Aktivität in *cue1-6*-Mutanten und *cue1-6*/PPDK-Transformanden kann anhand des erhöhten Verhältnisses der P_a- zur PEP-Transportrate abgelesen werden (s. Abb. 3.2). Außerdem kann aus den Daten ersehen werden, daß sich die Transporteigenschaften der

rekonstituierten Membranproteine von *cue1-6*-Mutanten nicht von denen aus *cue1-6*/PPDK-Pflanzen unterscheiden. Durch die Überexpression der PPDK bewirkte Veränderungen der PEP-Transportkapazitäten in *cue1-6*/PPDK können demnach ausgeschlossen werden.

Sowohl in *cue1-6* als auch in *cue1-6*/PPDK konnte dennoch ein schwacher, aber signifikant über dem Hintergrund liegender PEP-Transport gemessen werden (Abb. 3.2). Diese restliche Transportaktivität für PEP wäre nicht zu erwarten, wenn kein anderer Transporter PEP-Transport vermitteln könnte. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, daß die Funktionalität des AtPPT2 noch nicht nachgewiesen ist (s. 4.3.3).

3.1.2. Überexpression der *F. trinervia* PPDK in *cue1-6*

Durch die stromagebundene Überexpression der C₄-Typ-PPDK aus *F. trinervia* wurde versucht, die Bereitstellung von PEP aus Pyruvat im Stroma von *cue1*-Mutanten auf artifizielle Weise wieder zu etablieren und somit den retikulierten *cue1*-Phänotyp, der durch den Ausfall des AtPPT1 in den *cue1*-Mutanten zustandekommt, abzuwenden.

Das von Prof. Peter Westhoff (Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Universität Düsseldorf) überlassene Konstrukt zur konstitutiven Überexpression der *F. trinervia*-PPDK im Stroma wurde in *cue1-6*-Pflanzen transformiert und die Integration des Konstruktes in die genomische DNA dreier unabhängiger Transformanden der T₁-Generation in einer PCR mit konstruktsspezifischen Oligonukleotiden (CaMV35Sforw und Ftppdk5' rev s. 8.2) nachgewiesen. Der *cue1*-Blattphänotyp war in den *cue1-6*/PPDK Transformanden den Vermutungen entsprechend aufgehoben worden (s. Abb. 3.3).

Die T₁-Generation wurde geselbstet und Blätter der T₂-Nachkommen für PPDK-Aktivitätsmessungen (s. 2.2.5.11.6) herangezogen.

Nicht alle Individuen der *cue1-6*/PPDK T₂-Generationen wiesen eine im Vergleich zu Wildtyp- und *cue1-6*-Pflanzen erhöhte PPDK-Aktivität auf (Tab. 3.1). Interessanterweise scheint außerdem ein Schwellenwert für die Komplementation des *cue1-6*-Phänotyps durch die eingebrachte PPDK-Aktivität zwischen 20 und 25 mU (PPDK)·mg Protein⁻¹ zu bestehen (Tab. 3.1). Für weitere physiologische und genetische Studien wurden drei unterschiedliche *cue1-6*/PPDK-Linien ohne retikulierten Blattphänotyp mit abgestuften PPDK-Aktivitäten propagiert (s. Tab. 3.1).



Abb. 3.3 Gegenüberstellung von Wildtyp- (Col-0, A), *cue1-6*- (B) und *cue1-6*/PPDK-Pflanzen (C). Die *cue1-6*-Pflanzen auf dem Foto sind 4 Wochen älter als die Pflanzen der anderen beiden Linien.

Linie	PPDK-Aktivität (mU · mg Protein ⁻¹)	Blattphänotyp
<i>cue1-6</i> /PPDK 7-11	3,3 ± 0,3	unkomplimentiert
<i>cue1-6</i> /PPDK 7-4	3,9 ± 0,5	unkomplimentiert
<i>cue1-6</i> /PPDK 2-7	6,3 ± 0,3	unkomplimentiert
Col-0	6,4 ± 1,5	Wildtyp
<i>cue1-6</i>	8,2 ± 1,4	<i>cue1</i>-Mutante
<i>cue1-6</i> /PPDK 7-16	9,3 ± 0,2	teilweise komplimentiert
<i>cue1-6</i> /PPDK 1-3	20,5 ± 4,0	teilweise komplimentiert
<i>cue1-6</i> /PPDK 7-22*	20,7 ± 5,0	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 2-19	20,9 ± 0,9	teilweise komplimentiert
<i>cue1-6</i> /PPDK 1-2	26,6 ± 2,5	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 1-6	28,0 ± 6,4	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 2-9*	29,5 ± 7,6	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 2-20	32,0 ± 2,9	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 7-2*	35,1 ± 8,9	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 7-9	38,0 ± 4,0	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 2-10	40,1 ± 2,4	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 2-24	40,3 ± 7,4	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 7-10	41,7 ± 4,1	kuriert
<i>cue1-6</i> /PPDK 2-1*	43,1 ± 5,5	kuriert

Tab. 3.1 Übersicht über die PPDK-Aktivitäten ± Standardabweichung in transgenen *cue1-6*/PPDK-Linien im Vergleich zu Kontrollen. Die mit einem Sternchen markierten Linien wurden für weitere Analysen herangezogen.

Wie zu Beginn des Ergebnisteils (3) erwähnt, wurde auch eine Komplementation des *cue1*-Blattphänotyps durch die Überexpression der *E. coli* PEP-Synthetase angestrebt, die im Gegensatz zur PPDK eine unter physiologischen Bedingungen reversible Reaktion vermittelt.

Die Komplementation des retikulierten Blattphänotyps von *cue1-6*-Mutanten durch die stromagebundene Expression der *E. coli* PEP-Synthetase (PEPS) war dementsprechend nicht erfolgreich. Die *E. coli* PEPS katalysiert im Gegensatz zur PPDK eine reversible Reaktion, bei der der γ -Phosphatrest des ATP auf H₂O statt auf Phosphat übertragen wird. Sowohl der immunologische Nachweis des PEPS-Proteins in *cue1-6*/PEPS-Rohextrakten als auch der Nachweis der PEPS-Aktivität in plastidären Fraktionen von *cue1-6*/PEPS-Blattextrakten konnten nicht erbracht werden, obwohl die Präsenz des Transgens im Genom der *cue1-6*/PEPS-Pflanzen über PCR bestätigt werden konnte (nicht gezeigt).

3.1.2.1. Subzelluläre Lokalisation der *Flaveria trinervia*-PPDK-Aktivität

Obwohl die in *cue1-6* überexprimierte *Flaveria trinervia*-PPDK mit einer plastidären Präsequenz ausgestattet ist, erschien es sinnvoll, die Lokalisation des Enzyms zu überprüfen. Durch die Einbringung der PPDK in die Plastiden sollte aufgezeigt werden, daß ein Mangel von PEP im Plastiden für den retikulierten Blattphänotyp der *cue1*-Mutanten verantwortlich ist. Sollte die eingebrachte PPDK-Aktivität in den phänotypisch kurierten *cue1-6*/PPDK-Pflanzen nicht dem Stroma zuzuordnen sein, so wären es unwahrscheinlich, daß unzureichende PEP-Gehalte im Stroma für das Entstehen des retikulierten Blattphänotyps in den *cue1*-Mutanten verantwortlich sind.

Die Aktivität der überexprimierten PPDK ließ sich nach der Sedimentation von angereinigten Chloroplasten beim Vergleich mit der Verteilung von Markerenzymen des Zytoplasmas (PEPC) und des Stromas (NADP-GAPDH) mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Plastiden zuordnen (s. Tab. 3.2), obwohl sich etwa 65% bis 85% der Aktivität des plastidären Markerenzym NADP-GAPDH in der zytosolischen Fraktion befand (Tab. 3.2). Diese recht hohe Kreuzkontamination läßt sich auf eine hohe Aufbruchrate der Chloroplasten bei den Zentrifugationsschritten zurückführen. Die Verteilung des zytosolischen Markerenzym PEPC war dagegen sehr eindeutig und ließ auf eine Kreuzkontamination der Sedimente durch zytosolische Bestandteile von weniger als 1,5% schließen. Es kann festgehalten werden, daß die eingangs erwähnte Annahme, daß unzureichende PEP-Gehalte im Stroma für die Entstehung des retikulierten Phänotyps in den *cue1*-Mutanten verantwortlich sind, anhand der Ergebnisse der subzellulären Lokalisierung bestätigt werden konnte.

Col-0	Gesamtaktivität (mU)			Verteilung zwischen Überstand und Sediment (%)		
	NADP-GAPDH	PEPC	PPDK	NADP-GAPDH	PEPC	PPDK
Rohextrakt	2614,1	48,9	327,4			
Überstand	102,9	26,3	n.d.	85,4	99,4	n.d.
Sediment	18,4	0,3	n.d.	14,6	0,6	n.d.
<i>cue1-6/PPDK</i>	NADP-GAPDH	PEPC	PPDK	NADP-GAPDH	PEPC	PPDK
Rohextrakt	674,0	49,0	733,7			
Überstand	117,6	1,2	n.d.	64,7	100,0	0,0
Sediment	42,8	n.d.	38,5	35,3	0,0	100,0

Tab. 3.2 Nachweis der PPDK-Aktivität in *cue1-6/PPDK*-Plastiden durch differentielle Zentrifugation. Chloroplastenisolate wurden zweimal sedimentiert und die Aktivitäten der angegebenen Enzyme im Sediment und im Überstand bestimmt. In der Tabelle ist die Verteilung der Enzymaktivitäten repräsentativ anhand der zweiten Sedimentation dargestellt. NADP-GAPDH fungiert als Markerenzym für Plastiden, PEP-Carboxylase als Markerenzym für das Zytoplasma. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus zwei repräsentativen Experimenten.

3.1.2.2. Einige *cue1-6/PPDK*-Transformanten zeigen den retikulierten *cue1*-Blattphänotyp nach dem Pikieren auf Erde

20 bis 25% der Pflanzen der *cue1-6/PPDK*-Populationen, die in Sterilkultur ursprünglich phänotypisch dem Wildtyp entsprachen, zeigten kurioserweise nach dem Pikieren auf Erde und einigen Wochen weiteren Wachstums an der neugebildeten Basis der Blätter wieder den retikulierten Blattphänotyp (Abb. 3.4).

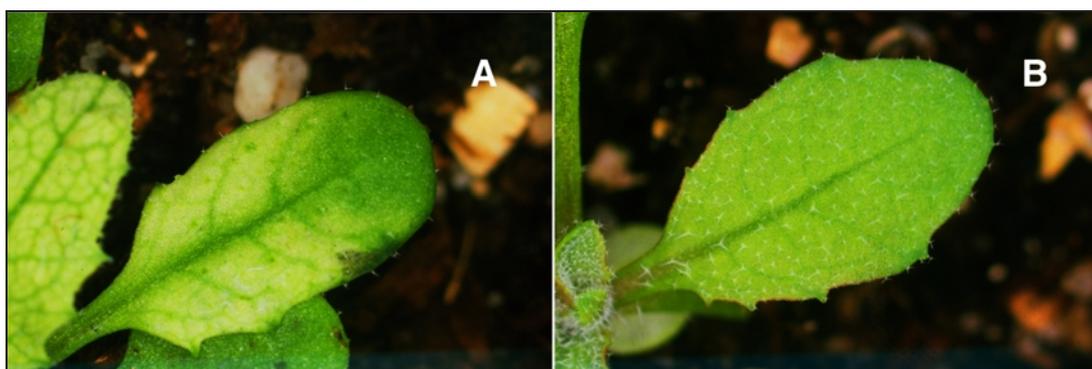


Abb. 3.4 Blätter von *cue1-6/PPDK*-Pflanzen, bei dem der retikulierte Blattphänotyp nur teilweise komplementiert ist. A und B stellen zwei verschiedene Ausprägungen dar. A: Der Phänotyp ist nur an der äußersten Blattspitze komplementiert, B: Am basalen Teil der Lamina ist die sich leicht vom Rest der Lamina abhebende Blattnervatur zu erkennen.

Messungen der PPDK-Aktivität in Blattbereichen mit und ohne Phänotyp ergaben, daß die PPDK-Aktivität in beiden Teilen der Lamina niedriger ist als in vollständig komplementierten Pflanzen (Tab. 3.3). Sowohl die an der Blattbasis als auch die in der phänotypisch dem Wildtyp gleichenden Blattspitze gemessene PPDK-Aktivität unterschied sich nicht signifikant von der im Wildtyp oder in *cue1-6*-Mutanten gemessenen PPDK-Aktivität (Tab. 3.3), so daß davon ausgegangen werden kann, daß dort kein PPDK-Protein mehr produziert wird und das Konstrukt transkriptionell stillgelegt ist. Diese Vermutung müßte in weiteren Experimenten überprüft werden.

3.1.3. Überexpression von *F. trinervia* PPDK im Wildtyp (Col-0)

Um einige der an *cue1-6*/PPDK-Linien beobachteten Effekte kausal einordnen zu können wurden Col-0-Pflanzen mit dem gleichen PPDK-Konstrukt transformiert (s. 3.1.2 und 2.1.3) und bis zur T₂-Generation in gleicher Weise selektiert (s. 3.1.2).

Einige Enzymaktivitäten (s. 3.5.7) wurden an diesen Pflanzen schon bestimmt, die Analyse weiterer Parameter wird folgen. Interessanterweise schienen Col-0/PPDK-Pflanzen ab einer PPDK-Aktivität, die mehr als das Doppelte der endogenen PPDK-Aktivität beträgt, steril zu sein und bildeten stark gedrungene Infloreszenzen aus (Abb. 3.5).

Linie	Blattphänotyp	A _{PPDK} (mU·mg Protein ⁻¹)	± σ
Col-0	Wildtyp	8,89	± 0,31
<i>cue1-6</i>	Mutante	9,25	± 1,07
<i>cue1-6</i> /PPDK	komplementiert	19,25	± 2,28
<i>cue1-6</i> /PPDK	nicht komplementiert	12,88	± 0,62
<i>cue1-6</i> /PPDK	partiell komplementiert, - Phänotyp	10,71	± 2,54
<i>cue1-6</i> /PPDK	partiell komplementiert, + Phänotyp	8,48	± 3,74

Tab. 3.3 PPDK-Aktivitäten in partiell komplementierten *cue1-6*/PPDK-Blättern im Vergleich zum Wildtyp und *cue1-6*. σ: Standardabweichung.

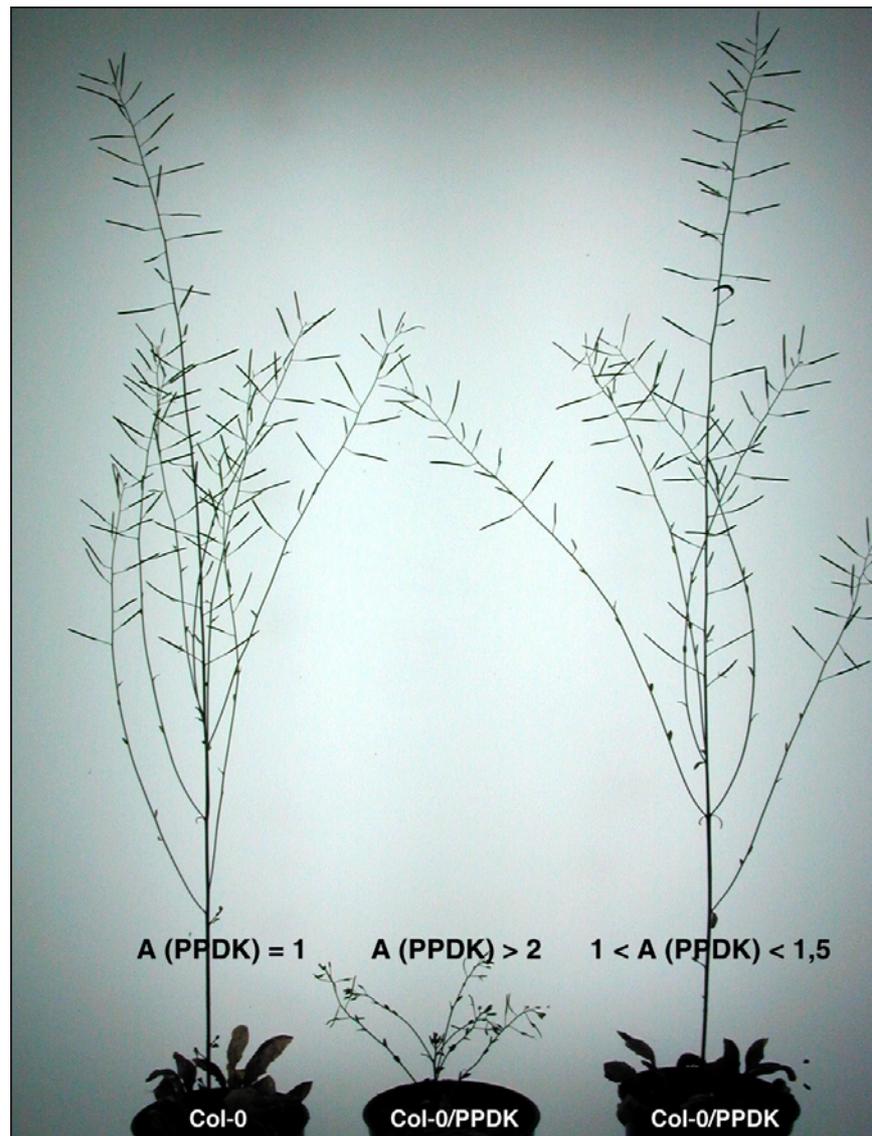


Abb. 3.5 Gegenüberstellung von Col-0 und Col-0/PPDK-Überexprimierern mit verschiedenen PPDK-Aktivitäten am Ende der reproduktiven Phase. Die PPDK-Aktivitäten in Relation zum Wildtyp sind in der Abbildung angegeben.

3.1.4. Kreuzungen zwischen *cue1-6*/PPDK und *cue1-6*/PPT-Pflanzen

Um eventuell positive oder negative Interferenzen der beiden Transgene im *cue1-6*-Hintergrund zu bestimmen, wurden *cue1-6*/PPDK und *cue1-6*/PPT reziprok gekreuzt. Die Präsenz beider Konstrukte im Genom der Nachkommen der F₁-Generation wurde über PCR mit geeigneten Oligonukleotiden (s. 3.1.2 und 3.1.1) nachgewiesen. Individuen, die beide Konstrukte im Genom enthielten, wurden auf die Höhe der PPDK-Aktivität (s. 2.2.5.11.6) und über Northernblots auf die Mengen an BoPPT-Transkripten untersucht. Pflanzen die hohe BoPPT-Transkriptmengen und hohe PPDK-Aktivitäten aufwiesen, wurden geselbstet und die individuenstarke F₂-Generation wie zuvor durchmustert, um

Nachkommen zu finden, bei denen beide Transgene aufgrund von Rekombinationsereignissen im Genom kosegregieren. Die Kosegregationsanalyse ist noch nicht abgeschlossen.

3.1.5. Chemische Mutagenese von *cue1*-Populationen mit EMS

Da sowohl die Stoffwechselwege als auch die Regulation des Stoffwechsels aus komplexen Netzwerken besteht, könnten bestimmte Zweitmutationen im *cue1*-Hintergrund zu einer Reversion des retikulierten Blattphänotyps führen. Durch chemische Mutagenese zweier verschiedener *cue1*-Allele wurde nach solchen Suppressor-Mutanten gesucht.

Je 15.000 Samen der Allele *cue1-1* und *cue1-5* wurden mit EMS mutagenisiert. Diese beiden Allele wurden deshalb ausgewählt, weil sie unterschiedlich starke Phänotypen repräsentierten und bei der Durchsicht der M₁- und M₂- Populationen vergleichsweise leicht auf Kontaminationen mit Fremdsamen untersucht werden konnten.

Cue1-1 ist ein Deletionsmutante mit einem starken Phänotyp, bei dem das gesamte AtPPT1-Gen im Genom fehlt (Streatfield et al., 1999). In PCR-Reaktionen mit AtPPT1-spezifischen Oligonukleotiden (PPTfor2 und PPTrev2, s. 8.2) werden daher auf genomischer DNA aus *cue1-1* keine Produkte erhalten. Genomische DNA aus kontaminierenden Pflanzen zeigte bei der Durchsicht der M₁- und M₂-Populationen in diesen PCR-Reaktionen genspezifische Banden und konnte dadurch von DNA aus mutagenisierten *cue1-1*-Individuen, die keine AtPPT1-spezifischen Banden zeigten, unterschieden werden.

Cue1-5 ist ein Allel mit einem vergleichsweise milden Phänotyp (Streatfield et al., 1999) und einer kosegregierenden *transparent testa (tt)*-Mutation. Saatgut von *cue1-5* konnte folglich über die transparente Testa, der kondensierte Tannine fehlen, von den Samen kontaminierender Pflanzen unterschieden werden.

In den M₂-Generationen beider Mutageneseansätze fanden sich einige statistisch häufige Mutationen, darunter solche mit Ähnlichkeit zu Mutanten des Phytochrom-Signalweges, Albinos, Pflanzen mit veränderter Keimblattmorphologie und -anordnung, Trichommutanten, usw., in erwarteter Frequenz (Lightner und Caspar, 1998), jedoch keine Revertanten – die Mutagenese war also zumindest technisch erfolgreich verlaufen. Da nach einer Reversion des *cue1*-Blattphänotyps gesucht wurde, wurden die mutagenisierten Populationen nicht näher untersucht.

3.2. Anmerkung zur Vergleichbarkeit der erhobenen Daten aus den unterschiedlichen *cue1*-Mutanten

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden Untersuchungen an drei verschiedenen *cue1*-Allelen durchgeführt, die sich in unterschiedlichen Ökotypen von *A. thaliana* befinden. Der Vergleich der erhobenen physiologischen Daten innerhalb der entsprechenden Ökotypen ist sehr wichtig, da sich die unterschiedlichen *Arabidopsis*-Ökotypen in ihren physiologischen Eigenschaften z.T. deutlich voneinander unterscheiden. Eine Übersicht über die Verhältnisse der Linien zueinander ist unter 2.1.5 dargestellt worden.

Cue1-6 ist eine Mutante des Ökotyps Columbia (Col-0), in der durch chemische Mutagenese ein Translationsstop an der Position 54 der Präsequenz erzeugt wurde (Streatfield et al., 1999), so daß der starke Phänotyp von *cue1-6* durch das gänzliche Fehlen des reifen AtPPT1-Proteins erklärt werden kann. Der Blattphänotyp dieser Mutante konnte durch die Einbringung verschiedener Transgene - s. 3.1.2 (PPDK) und 3.1.1 (BoPPT) – komplementiert werden. Daten der Komplementanden werden daher auch stets mit Daten aus Col-0 verglichen.

Die Mutanten *cue1-1* und *cue1-3* sind aus Populationen der transgenen Linie pOCA108 hervorgegangen und werden daher im weiteren mit pOCA108 verglichen. Die Linie pOCA108 (im folgenden pOCA bezeichnet) ist eine Alkohol-Dehydrogenase-Totalmutante und enthält neben einem Kanamycin-Selektionsmarker zwei verschiedene Reporterengenkonstrukte, mit denen bei der ursprünglichen Suche nach Mutanten die Unterexpression von CAB3 bei der De-Etiolierung nachgewiesen wurde (Li et al., 1995). Bei den Reporterengen handelt es sich um die *E. coli* β -Glukuronidase (GUS) und die *A. thaliana* Alkohol-Dehydrogenase (ADH), die beide durch den CAB3-Promotor getrieben werden (Li et al., 1995). pOCA-Pflanzen befinden sich im Ökotyp Bensheim (Be-0).

Im Genom der *cue1-1*-Mutanten ist der AtPPT1-Locus durch die Einwirkung von γ -Strahlen zerstört (Streatfield et al., 1999). Es handelt sich daher bei *cue1-1* um ein starkes Allel, da ohne PPT1-Gen auch kein PPT1-Protein mehr gebildet werden kann. *Cue1-3*-Mutanten weisen einen Aminosäureaustausch von Alanin nach Valin an der Position 304 des C-Terminus des PPT1-Proteins auf (Streatfield et al., 1999). Das *cue1-3*-Allel ist ein schwaches Allel.

3.3. Wachstumscharakteristika der untersuchten Linien

Um einen grundlegenden Eindruck über die Eigenschaften der untersuchten *Arabidopsis*-Linien zu bekommen wurden Keimung, vegetatives und reproduktives Wachstum vor

Beginn der physiologischen Analysen während einer Vegetationsperiode untersucht (s. 2.2.5.1.1).

Die Keimung aller Linien im Col-0-Hintergrund war im Vergleich zum Wildtyp signifikant beschleunigt, wohingegen die Keimung von pOCA-Samen im Vergleich zu *cue1*-Saatgut schneller ablief (Tab. 3.4). Vegetatives und reproduktives Wachstum waren vor allem in starken *cue1*-Mutanten wie *cue1-1* und *cue1-6* im Vergleich zu den Kontrollen gehemmt und diese Phänomene konnten durch die Überexpression von PPKK oder BoPPT in *cue1-6* teilweise behoben werden (Tab. 3.4).

	Col-0	<i>cue1-6</i>	<i>cue1-6</i> /PPDK	<i>cue1-6</i> /PPT
Chlorophyllgehalt (mg Chl · g FG ⁻¹)	1,89 ± 0,26	1,59 ± 0,16	1,52 ± 0,06	n.b.
Proteingehalt (mg Protein · g FG ⁻¹)	11,0 ± 0,2	6,4 ± 0,8 ⁺⁺	6,8 ± 1,3 ⁺⁺	n.b.
Chlorophyll a/b-Verhältnis	1,35 ± 0,02	1,36 ± 0,01	1,52 ± 0,02*	n.b.
Keimungszeitpunkt (d nach Aussat)	4,1 ± 0,2	3,6 ± 0,2 ^{***}	3,8 ± 0,3 ^{***}	3,1 ± 0,1 ^{***}
Häufigkeit des Blattphänotyps (% d. Indiv.)	0	100	32,9	0
Mittleres Blattfrischgewicht (mg FG pro Blatt)	20,3 ± 2,0	5,5 ± 0,9 ^{***}	16,1 ± 1,4 ^{***}	29,1 ± 1,4 ^{***}
Spezifisches Blattfrischgewicht (g FG·m ⁻²)	138 ± 9	161 ± 10 ^{***}	137 ± 6	n.b.
Anthese (d nach Aussaat)	29,9 ± 0,2	37,2 ± 0,3 ^{***}	31,0 ± 0,3 ^{***}	30,3 ± 0,2 ^{***}
Blattanzahl bei der Anthese	16,3 ± 0,3	13,8 ± 0,2 ^{***}	14,8 ± 0,4 ^{***}	17,5 ± 0,4 ^{***}
Schoten pro Pflanze	82,7 ± 4,6	18,7 ± 3,7 ^{***}	62,6 ± 6,1 ^{***}	145 ± 23 ^{***}
	n = 55	n = 33	n = 154	n = 77

	pOCA	<i>cue1-1</i>	<i>cue1-3</i>
Chlorophyllgehalt (mg Chl · g FG ⁻¹)	1,62 ± 0,08	1,0 ± 0,02 ⁺	1,34 ± 0,01 ⁺
Proteingehalt (mg Protein · g FG ⁻¹)	11,3 ± 2,0	7,3 ± 1,0 ⁺⁺	8,4 ± 0,9 ⁺⁺
Chlorophyll a/b-Verhältnis	1,45 ± 0,07	1,55 ± 0,03	1,53 ± 0,01
Keimungszeitpunkt (d nach Aussat)	2,7 ± 0,1	3,1 ± 0,1 ^{***}	5,2 ± 0,1 ^{***}
Häufigkeit des Blattphänotyps (% d. Indiv.)	0	100	100
Mittleres Blattfrischgewicht (mg FG pro Blatt)	30,9 ± 2,9	5,3 ± 0,7 ^{***}	10,9 ± 1,8 ^{***}
Spezifisches Blattfrischgewicht (g FG·m ⁻²)	127 ± 9	146 ± 4 ^{***}	130 ± 12
Anthese (d nach Aussaat)	39,5 ± 0,5	45,9 ± 0,5 ^{***}	39,9 ± 1,1 ⁺
Blattanzahl bei der Anthese	32,5 ± 0,9	26,3 ± 0,8 ^{***}	22,9 ± 2,4 ^{***}
Schoten pro Pflanze	95,8 ± 8,0	22,2 ± 2,8 ^{***}	40 ± 6,3 ^{***}
	n = 25	n = 66	n = 33

Tab. 3.4 Wachstumseigenschaften, Protein- und Chlorophyllgehalte der untersuchten *Arabidopsis*-Linien. Die Samen wurden auf MS-Platten gekeimt und unter Langtagsbedingungen (s. 2.2.1.4) angezogen.

⁺: $\alpha < 0,1$; ⁺⁺: $\alpha < 0,05$; ⁺⁺⁺: $\alpha < 0,025$; *: $\alpha < 0,01$; **: $\alpha < 0,005$; ***: $\alpha < 0,0005$ im Vergleich zu Kontrollen. α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit eines einseitigen Welch-Tests an. n=2 für die Chlorophyll- und Proteingehalte. n.b.: nicht bestimmt.

Das durchschnittliche Blattfrischgewicht und damit auch die Rosettengröße war in *cue1-1* und *cue1-6* auf etwa ein Sechstel bis ein Viertel, in *cue1-3* auf ein Drittel der Kontrollwerte reduziert und wurde durch die Überexpression von PPDK in *cue1-6* annähernd auf die Größe der Kontrollwerte revertiert bzw. wurde durch die Expression des heterologen PPT um die Hälfte überkompensiert (Tab. 3.4). Interessanterweise war das spezifische Blattfrischgewicht in starken *cue1*-Allelen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (Tab. 3.4). Eine veränderte Blattmorphologie wurde bereits für verschiedene *cue1*-Allele beschrieben (Li et al., 1995; Streatfield et al., 1999).

Weiterhin war die Anthese in starken *cue1*-Mutanten den Kontrollen gegenüber verzögert. Diese Verzögerung konnte in *cue1-6* wiederum durch die Überexpression von PPDK bzw. BoPPT kompensiert werden (Tab. 3.4). Die Blattanzahl bei der Anthese lag bei den Kontrollpflanzen signifikant höher als in allen übrigen Linien. Für die Schotenausbeute pro Pflanze gilt dasselbe wie für die mittlere Blattgröße: die in den starken *cue1*-Allelen um ca. drei Viertel reduzierte reproduktive Kapazität wurde durch die Überexpression von PPDK zu weiten Teilen, durch die Überexpression des BoPPT um das 1,5fache überkompensiert (Tab. 3.4). Die Überexpression von PPT-Genen in PPT-Null-Mutanten scheint daher eine Möglichkeit darzustellen, den vegetativen und reproduktiven Ertrag gegenüber den eigentlichen Wildtypen zu steigern.

Wie schon von der Ausprägung des Blattphänotyps abzuleiten ist, war der Chlorophyllgehalt in *cue1*-Mutanten signifikant - in *cue1-1*-Mutanten um 40% bzw. um 20% in *cue1-3*-Mutanten - im Vergleich zu pOCA-Kontrollpflanzen erniedrigt (Tab. 3.4). Diese Verringerung des Chlorophyllgehalte war beim Vergleich von *cue1-6* und Col-0 nicht zu finden. Erstaunlicherweise waren die Gesamtchlorophyllgehalte in *cue1-6* und *cue1-6*/PPDK-Blättern nur tendentiell gegenüber Col-0-Blättern verringert (Tab. 3.4). Dies ist vor allem deswegen verwunderlich, weil die *cue1-6*-Mutanten optisch den gleichen Blattphänotyp aufwiesen wie die *cue1*-Mutanten im pOCA-Hintergrund. Für das Ergebnis der Signifikanzanalyse war es unerheblich, ob die Chlorophyllgehalte dabei auf Frischgewicht oder auf Blattfläche bezogen wurden. Offenbar enthalten die dem Leitgewebe benachbarten Zellen in *cue1-6*-Mutanten mehr Pigmente als die Bündelscheidenzellen des Wildtyps und gleichen das Pigmentdefizit der restlichen *cue1-6*-Blattspreite dadurch aus. Interessanterweise ist das Chlorophyll a/b-Verhältnis in *cue1-6*/PPDK-Blättern signifikant gegenüber dem Wildtyp und den *cue1-6*-Mutanten erhöht (Tab. 3.4), was auf eine Verschiebung der Stöchiometrie der photosynthetischen Pigment-Komplexe zueinander in *cue1-6*/PPDK-Blättern schließen läßt, da sich die pro

Polypeptidkette gebundenen Mengen an Chlorophyll a und b unter den Chlorophyllbindenden Proteinen unterscheiden. Dieser Befund wird im Zusammenhang mit anderen Beobachtungen an den *cue1-6*/PPDK-Pflanzen noch ausführlich diskutiert werden (s. 4.2.2).

Die Gesamtproteingehalte waren in Blättern aller *cue1*-Mutanten und Blättern von *cue1-6*/PPDK gegenüber den Kontrollen um 25% bis 40% verringert (Tab. 3.4). Durch die Überexpression der *Flaveria trinervia* PPDK kann also das vegetative und reproduktive Wachstum der *cue1-6*-Mutanten positiv beeinflusst werden (s.o.), ohne daß der Proteinanteil am Frischgewicht in den Komplementanden ansteigt.

3.4. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen

3.4.1. Charakterisierung der Photosynthese unter Starklicht

Streatfield et al. (1999) konnten zeigen, daß die *cue1*-Mutanten hypersensitiv gegenüber Starklicht sind. Daher wurde die Etablierung der Photosynthese in dunkeladaptierten *Arabidopsis*-Linien bei einer PFD von $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ beobachtet, da hier die stärksten Effekte auf die Lichtreaktionen und den Elektronentransport in den *cue1*-Mutanten zu vermuten waren.

Bei einer PFD von $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ war der Elektronentransport (ETR) durch Photosystem II (PS II) in *cue1-1* tatsächlich um 60%, im schwächeren Allel *cue1-3* um 30% gegenüber den Kontrollen vermindert. Die in *cue1-6* gemessene Elektronentransportrate war im Vergleich zum Wildtyp nur tendentiell vermindert. Die an den *cue1*-Mutanten gemessenen ETR spiegeln also im Vergleich zu den Kontrollen in etwa die unter 3.3 dargestellten Verminderungen der Chlorophyllgehalte wider. Die ETR in *cue1-6*/PPDK war demgegenüber um 40% gegenüber dem Wildtyp und um 30% gegenüber den *cue1-6*-Mutanten verringert. Dies ist angesichts der phänotypischen Komplementation der *cue1-6*-Mutante durch PPDK-Überexpression erstaunlich (s. 4.2.2.2).

Am Ende des zweieinhalbstündigen Lichtstresses zeigten *cue1-1* und *cue1-6*/PPDK-Blätter eine gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Photoinhibition (s. Tab. 3.5), die über q_N -Relaxationskinetiken bestimmt wurde. Photoinhibition entsteht durch die mittelfristige funktionelle Beeinträchtigung des Photosyntheseapparates und ist durch die Änderung der Oligomerisierungszustände der Reaktionszentren und Antennenpigmente gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den Daten aus Col-0 und *cue1-6* konnte in *cue1-1*-Blättern eine um 30% verstärkte Photoinhibition gegenüber pOCA-Blättern beobachtet werden (Tab. 3.5).

Betrachtet man die nicht signifikante Erhöhung von q_{NI} in *cue1-6* gegenüber dem Wildtyp im gleichen experimentellen Ansatz, so zeigt sich, daß die *cue1-1*-Mutanten prinzipiell sensitiver gegenüber hohen PFD sind als *cue1-6*-Mutanten. *Cue1-1*-Mutanten zeigten entgegen den *cue1-6*-Mutanten auch im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigte Elektronentransportraten und deutlich geringere Chlorophyllgehalte (s.o.). In *cue1-1* und *cue1-6*/PPDK konnten im Vergleich zu den Kontrollen auch die deutlichsten Effekte auf den Verlauf der Q_A^- -Reoxidation bei Belichtung festgestellt werden, die im folgenden Absatz erläutert werden. Außerdem ist in *cue1-6*/PPDK-Blättern die apparente Atmung im Dunkeln gegenüber dem Wildtyp (Col-0) und den *cue1-6*-Mutanten signifikant erhöht (Tab. 3.5). Dieses Resultat wird aber an späterer Stelle noch einmal aufgegriffen werden (s. 4.2.2).

Die Oxidation des terminalen Elektronenakzeptors Q_A im PS II durch freies Plastochinon (PQ) gilt als geschwindigkeitsbestimmender Schritt am PS II. Limitationen durch eine unzureichende stöchiometrische Abstimmung der PS II-Reaktionszentren mit freiem PQ oder anderen nachgeschalteten Reaktionen sind zumeist durch eine verlangsamte Q_A^- -Reoxidation bei der Belichtung dunkeladaptierter Blätter gekennzeichnet (z.B. Streatfield et al., 1999; Abadia et al., 1999; Melis und Brown, 1980). Der Anteil reduzierten Q_{AS} kann direkt aus der photochemischen Fluoreszenzlöschung q_P bestimmt werden (s. 2.2.5.1.2).

	Col-0	<i>cue1-6</i>	<i>cue1-6</i> /PPDK
Apparente Dunkelatmung ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	$1,5 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,5$	$2,4^+ \pm 0,6$
ETR bei $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}$)	$131,9 \pm 16$	$114,8 \pm 4,5$	$79,9^{+++} \pm 4,7$
$q_{NI}^\#$	$0,48 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,04$	$0,58^{+++} \pm 0,05$

	pOCA	<i>cue1-1</i>	<i>cue1-3</i>
ETR bei $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	$131,9 \pm 8,9$	$55,0^{**} \pm 9,6$	$94,1^{+++} \pm 6,8$
$q_{NI}^\#$	$0,64 \pm 0,03$	$0,82^{++} \pm 0,09$	n.b.

Tab. 3.5 Photosyntheseparameter und Dunkelatmung, verschiedener *Arabidopsis*-Linien. n=3. #: Die durch Photoinhibition bedingte nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung q_{NI} wurde an Blättern gemessen, die vorher 2,5 h lang einer PFD von $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ausgesetzt waren. +: $\alpha < 0,1$; ++: $\alpha < 0,05$; +++: $\alpha < 0,025$; *: $\alpha < 0,01$; **: $\alpha < 0,005$; ***: $\alpha < 0,0005$; α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. n.b.: nicht bestimmt.

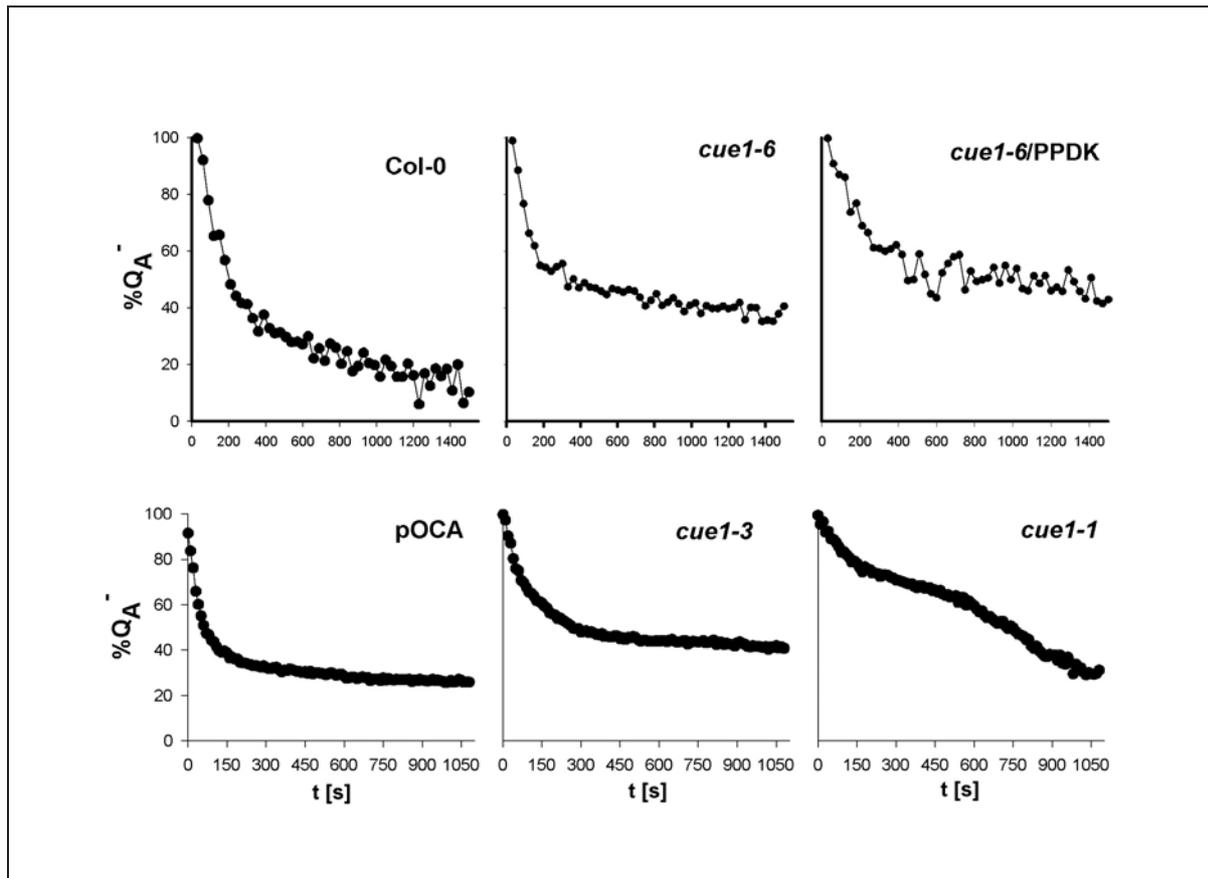


Abb. 3.6 Q_A^- -Reoxidationskinetiken bei $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. $n=3$

Die initiale Geschwindigkeit der Q_A^- -Reoxidation war bei der Belichtung dunkeladaptierter Blätter von *cue1*-Mutanten, vor allem in *cue1-1*, langsamer als in den Kontrollen (Abb. 3.6). Nach 20 Minuten Belichtung war zumindest in *cue1-1* der gleiche relative Anteil von Q_A^- oxidiert wie in den Kontrollen. Dies war in den beiden anderen untersuchten *cue1*-Mutanten nicht der Fall. Nach ca. 20-minütiger Belichtung war das gebundene Q_A^- im Wildtyp vollständig oxidiert, während dies z.B. in den *cue1-6*-Mutanten nur zu 40% der Fall war. Im Vergleich zu den *cue1-6*-Mutanten waren die Effekte auf die Q_A^- -Reoxidation in *cue1-6/PPDK*-Blättern wiederum noch etwas stärker ausgeprägt. Durch die neu in *cue1-6* eingebrachte PPDK-Aktivität wird die Photosyntheseleistung und die Integrität des Photosyntheseapparates offenbar weiter eingeschränkt.

Die nicht-photochemische Chlorophyllfluoreszenzlöschung q_N setzt sich aus drei verschiedenen Komponenten, q_{NE} , q_{NT} und q_{NI} , zusammen, die bei Licht-Dunkel-Wechseln unterschiedlich schnell auf- bzw. abgebaut werden (Quick und Stitt, 1989; Krause et al., 1983; Horton und Hague, 1988; Laasch, 1987). q_{NE} kommt durch die thermische

Dissipation von Anregungsenergie am PS II zustande und korreliert mit der Steilheit des pH-Gradienten über die Thylakoidmembran. Die durch q_{NE} vermittelte Fluoreszenzlöschung stellt den Löwenanteil von q_N dar (Quick und Stitt, 1989), wird bei Belichtung innerhalb von wenigen Sekunden etabliert und zerfällt genauso schnell wieder bei der Verdunkelung der Blätter (Krause et al., 1983, Quick und Stitt, 1989). q_{NT} ist die Fluoreszenzlöschung, die auf die Umverteilung von Lichtsammelkomplexen zwischen den Photosystemen I und II beruht; Auf- und Abbau von q_T laufen im Minutenmaßstab ab (Quick und Stitt, 1989; Horton und Hague, 1988). q_{NI} ist die Fluoreszenzlöschung durch Photoinhibition, die durch die Umorganisation des Photosyntheseapparates zustande kommt und ein langsamer Prozeß ist, da zum einen ein längerer Einfluß hoher Lichtintensitäten für die Bildung von q_{NI} vonnöten ist und die Neusynthese von z.B. D1-Reaktionszentren des PS II beim Abklingen von q_{NI} zum anderen einiges an Zeit bedarf (Quick und Stitt, 1989; Laasch, 1987; Krause, 1988).

Bei der vergleichenden Betrachtung der q_N -Induktionskinetiken von Col-0- *cue1-6* und *cue1-6*/PPDK-Blättern bei Belichtung mit hohen PFD zeigte sich, daß der Aufbau von q_N innerhalb der ersten Minute in Wildtypen und *cue1-6*/PPDK schneller als in *cue1-6* vonstatten ging (Abb. 3.10), die Werte von q_N in der Sättigungsphase nach mehr als 15 min bei $900 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ in *cue1-6*/PPDK-Blättern jedoch signifikant höhere Werte als in Wildtyp- oder *cue1-6*-Blättern annahmen. Diese Änderung von q_N in *cue1-6*/PPDK-Blättern gegenüber dem Wildtyp kann aufgrund der oben beschriebenen Anteile von q_{NE} , q_{NT} und q_{NI} an q_N auf eine Erhöhung von q_{NE} zurückgeführt werden und wird im Zusammenhang mit den an *cue1-6*/PPDK im Vergleich zum Wildtyp und den *cue1-6*-Mutanten beobachteten Verlangsamung der Q_A^- -Reoxidation bei Belichtung, der gegenüber den *cue1-6*-Mutanten und dem Wildtyp verringerten ETR, der erhöhten apparenten Dunkelatmung gegenüber *cue1-6* und dem Wildtyp und der erhöhten Photoinhibition in *cue1-6*/PPDK im Vergleich zum Wildtyp diskutiert werden.

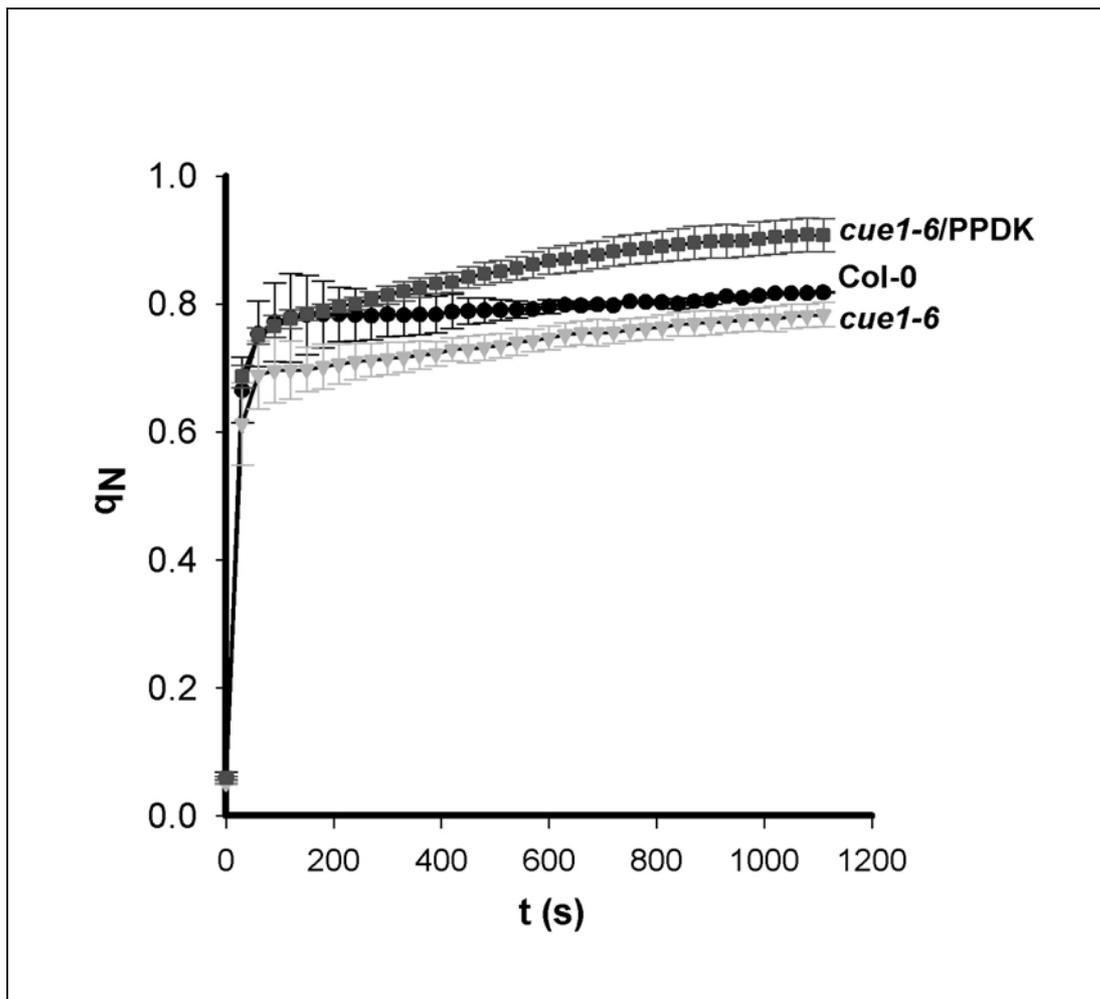


Abb. 3.7 qN-Induktionskinetiken bei einer PFD von $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. $n = 3$.

3.4.2. Bestimmung subplastidärer Räume

Li et al. (1995) und Streatfield et al. (1999) haben gezeigt, daß die Morphologie von Mesophyllchloroplasten in *cue1*-Mutanten gegenüber Kontrollen stark verändert ist und daß *cue1-1*-Mesophyllchloroplasten unterentwickelt sind. Bei Transportexperimenten (nicht gezeigt) mit isolierten, angereinigten Chloroplasten aus verschiedenen Linien wurde festgestellt, daß die Chloroplasten aus *cue1-6* und *cue1-6/PPDK* gegenüber Col-0-Chloroplasten im Schnitt das 1,6fache Volumen pro mg Chlorophyll aufwiesen (Tab. 3.6). Dies war nicht in *cue1-6/PPT*-Chloroplasten zu beobachten.

Die Morphologie der *cue1-6/PPDK* Chloroplasten ist offensichtlich in anderer Weise als die der *cue1-6*-Mutanten verändert, da diese außer einer veränderten Relation von Chloroplastenvolumen zu Chlorophyllgehalt auch mehr Stromaraum pro Chlorophyllmenge aufwiesen (Tab. 3.8). Hier wären elektronenmikroskopische Studien aufschlußreich.

	Col-0	<i>cue1-6</i>	<i>cue1-6</i> /PPDK	<i>cue1-6</i> /PPT
μl Chloroplastenvolumen·mg Chl ⁻¹ (% d. WT)	100 ± 23	169 ^{a**}	162 ⁺⁺ ± 33	120 ± 20
Stromaraum (μl ·mg Chl ⁻¹)	5,2 ± 2,3	5,0 ± 0,2	9,0 ⁺⁺ ± 1,5	8,3 ± 2,7

Tab. 3.6 Über ³H₂O-[¹⁴C]-Sorbit Doppelmarkierungen bestimmte Größe subplastidärer Räume. n=3; Sorbit gelangt nur in den Intermembranraum, während alle subplastidären Kompartimente für H₂O permeabel sind. ⁺: $\alpha < 0,1$; ⁺⁺: $\alpha < 0,05$; ⁺⁺⁺: $\alpha < 0,025$; ^{*}: $\alpha < 0,01$; ^{**}: $\alpha < 0,005$; ^{***}: $\alpha < 0,0005$. α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. Das Chloroplastenvolumen betrug in Col-0 $32,9 \pm 7,7 \mu\text{l} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$. ^a: nur eine Einzelmessung.

3.5. Analyse des Primärmetabolismus

3.5.1. Untersuchungen von Kohlenstoffflüssen durch Primärmetabolite

Die Erfassung radioaktiv markierter Moleküle nach deren Assimilation ist eine Methode, um Aufschluß über Veränderungen von Stoffwechselflüssen unter verschiedenen Bedingungen bzw. in unterschiedlichen Pflanzenlinien zu erhalten. Kohlenstoffflüsse wurde mit Hilfe der Markierung mit ¹⁴CO₂ untersucht, wobei der Fluß des assimilierten Kohlenstoffs in verschiedene Substanzklassen und somit die Aktivität bestimmter metabolischer Wege im Blatt verfolgt wurde. Außerdem kann die Rate der CO₂-Fixierung über die Inkorporation des markierten Kohlendioxyds bestimmt werden.

Bei längeren Pulsen mit hoch-¹⁴CO₂ besteht die Gefahr, daß Kohlenstoffflüsse in die minderrepräsentierten sauren und basischen Fraktionen nur schwer zu verfolgen sind und von den Veränderungen der Stärkefraktion und der löslichen Fraktion maskiert werden, weil die von ihrer Konzentration her dominierenden löslichen Zucker vollständig durchmarkiert sind. Daher wurden lichtadaptierte Blätter von *cue1-1*, *cue1-6* und von Kontrollpflanzen nur maximal wenige Minuten mit ¹⁴CO₂ einer hohen spezifischen Aktivität von 56 mCi·mmol⁻¹ markiert, bevor die Umsetzung der markierten Metabolite im Licht verfolgt wurde. Abb. 3.8 stellt die Ergebnisse bei einem Belichtungspuls von einer Minute dar, die repräsentativ für die restlichen Messungen anderer Pulslänge sind (nicht gezeigt).

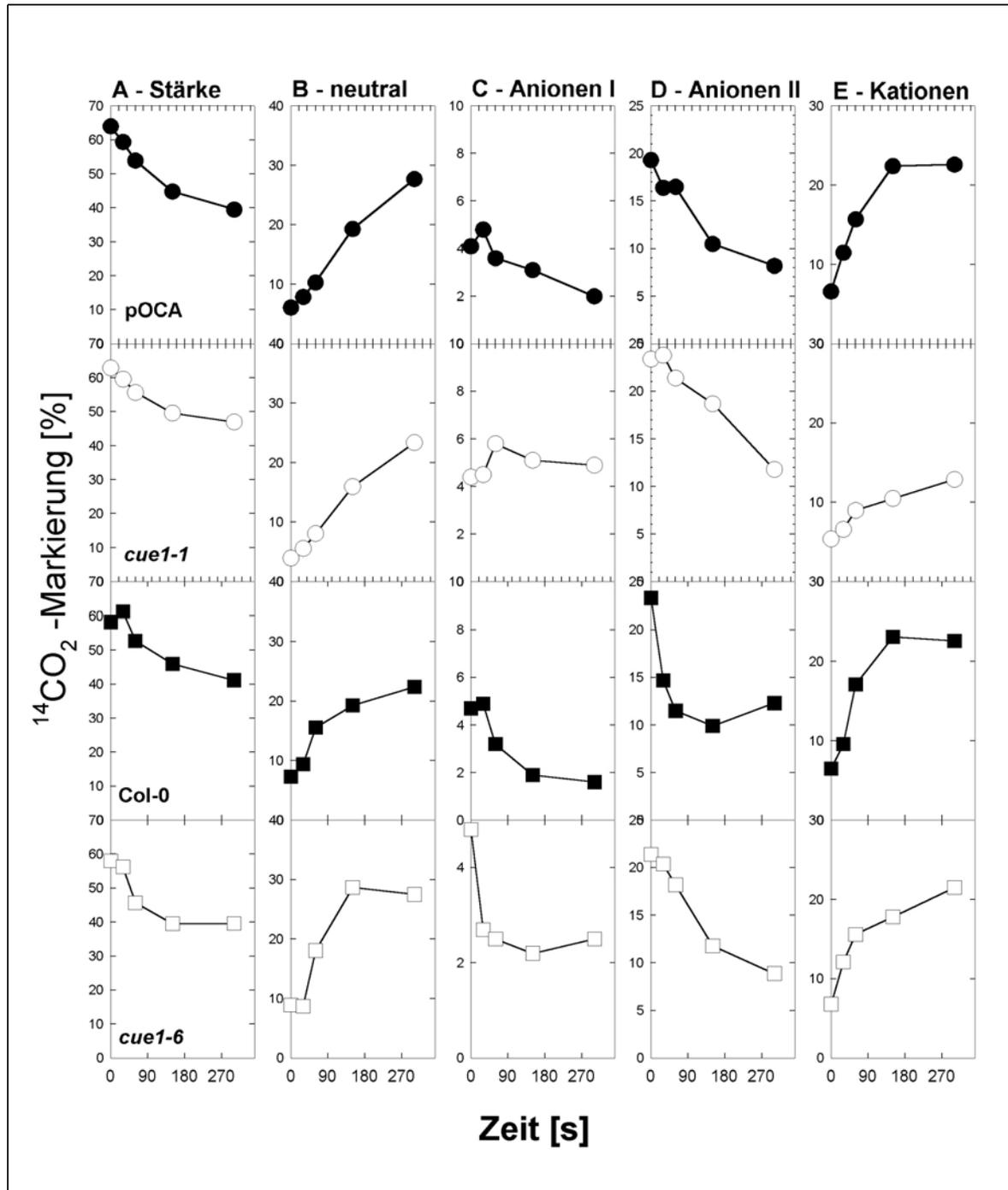


Abb. 3.8 Prozentuale Verteilung von ^{14}C in verschiedenen Fraktionen von Blattextrakten nach einminütigem Puls mit $0,2 \text{ mCi } ^{14}\text{CO}_2$ und einer Verfolgung über eine Zeitspanne von 5 min. A – Stärkefraktion, B – Neutrale Fraktion (vornehmlich Mono- und Disaccharide), C – Anionische Fraktion I (vornehmlich phosphorylierte Intermediate), D – Anionische Fraktion II (vornehmlich Carbonsäuren), E – Kationische Fraktion (vorwiegend Aminosäuren und Polyamine); schwarze Kreise: pOCA, weiße Kreise: *cue1-1*, schwarze Quadrate: Col-0, weiße Quadrate: *cue1-6*.

Die Gesamt-CO₂-Einbaurrate lag nach einer Minute Belichtungspuls in Col-0 bei $7,5 \pm 0,8 \mu\text{mol} \cdot \text{g FG}^{-1}$, in *cue1-6* bei $5,3 \pm 0,3 \mu\text{mol} \cdot \text{g FG}^{-1}$, in pOCA bei $7,5 \pm 0,8 \mu\text{mol} \cdot \text{g FG}^{-1}$ und in *cue1-1* bei $3,9 \pm 0,4 \mu\text{mol} \cdot \text{g FG}^{-1}$ und war demnach in den beiden untersuchten *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen um etwas mehr als 50% verringert.

In allen untersuchten Linien war ein substantieller Fluß aus der Stärkefraktion in die neutrale und basische Fraktion während der Verfolgungsphase zu konstatieren (Abb. 3.8). Daraus kann geschlossen werden, daß die relative Markierung der transitorischen Stärke in bezug auf die Gesamtmenge an transitorischer Stärke recht gering war, so daß Verluste einzelner Glukose-Monomere während der Stärketrimmung im Licht (Ball et al., 1996) erkennbare Verluste in der prozentualen Markierung der Stärkefraktion hervorriefen. Dennoch fand sich etwa 60% des assimilierten ¹⁴CO₂ in der Stärkefraktion wieder (Abb. 3.8).

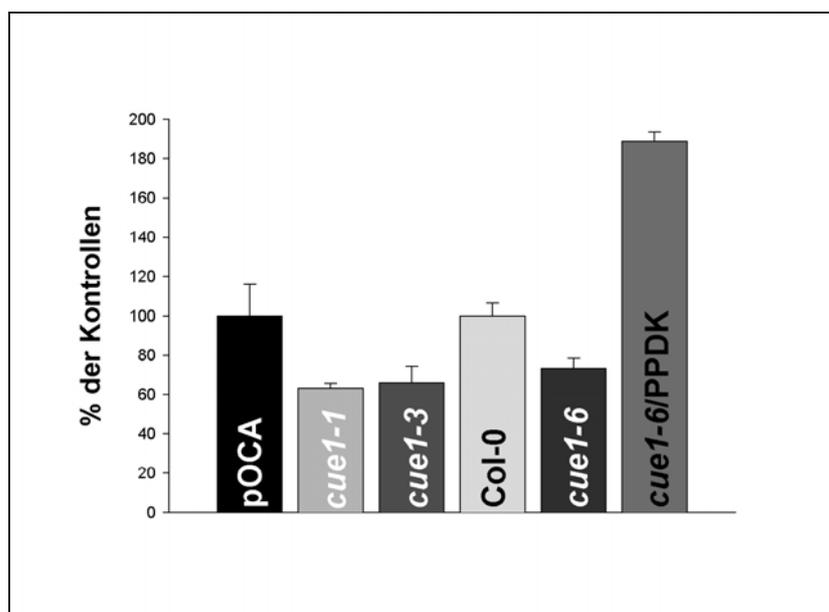


Abb. 3.9 CO₂-Einbauraten in *Arabidopsis*-Blätter bei einer Markierungsdauer von 30 min unter $10 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$ hoch-¹⁴CO₂, gegeben in % der Einbauraten in den Kontrollen. Die CO₂-Einbaurrate von Col-0 lag bei $25,2 \pm 1,6 \mu\text{mol} \cdot \text{g FG}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und die von pOCA bei $31,2 \pm 2,5 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{g FG}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. n = 12.

Der Verteilung des ¹⁴C im Laufe der Pulsverfolgung unterschied sich zwischen *cue1*-Mutanten und Kontrollpflanzen nur in einem Punkt klar: in *cue1*-Mutanten war der Fluß in die kationische Fraktion deutlich langsamer und prozentual geringer (Abb. 3.8). Die Autoradiographie der dünn-schichtchromatographisch aufgetrennten kationischen Fraktionen ergab, daß sich die Markierung fast ausschließlich in Serin wiederfand (nicht

gezeigt). Da die Experimente in einer Hoch-CO₂-Atmosphäre durchgeführt wurden, um markiertes CO₂ trotz geschlossener Stomata in den Interzellularraum einbringen zu können, ist es nicht sicher, ob photorespiratorische Prozesse als Ursache für den starken Fluß in und durch Serin ausgeschlossen werden, da die tatsächliche Konzentration von CO₂ im Interzellularraum der Blätter unbekannt ist.

Aufgrund der bei den Kurzzeitmarkierungen beobachteten Differenzen in der CO₂-Einbaurrate zwischen den *cue1*-Mutanten und den Kontrollen wurde die CO₂-Einbaurrate in *Arabidopsis*-Blätter in einem weiteren Experiment durch einen dreißigminütigen Puls mit ¹⁴CO₂ bei einer PFD von 200 µE·m⁻²·s⁻¹ näher bestimmt (Abb. 3.9). In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß der Gesamteinbau von CO₂ nach Markierungen von 30 Minuten Dauer noch nicht gesättigt war.

Der Einbau von CO₂ war in allen *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen um etwa ein Drittel verringert, wobei die CO₂-Einbaurrate der Kontrollen Col-0 und pOCA bei 25,2 ± 1,6 und 31,2 ± 2,5 µmol CO₂·g FG⁻¹ lagen. Die Verringerung der CO₂-Einbaurrate in *cue1-1* kann mit den Verminderungen der Elektronentransportraten korreliert werden (s. 3.4.1). Dies gelingt in den *cue1-3*- und *cue1-6*-Mutanten nur zum Teil. Offenbar waren *cue1-6*-Mutanten aber in der Lage nach längerer Belichtung im Vergleich zum Wildtyp Col-0 relativ mehr CO₂ zu fixieren als bei kurzen Lichtpulsen (s.o.).

Der Einbau von ¹⁴CO₂ in Blätter von *cue1-6*/PPDK-Pflanzen war mit 200% der Einbaurrate des Wildtyps unter Berücksichtigung der bereits aufgezeigten Photosyntheselimitationen in *cue1-6*/PPDK-Blättern (s. 3.4.1) unrealistisch hoch und kann möglicherweise auf einen Effekt der erhöhten CO₂-Konzentration während der Markierung zurückgeführt werden.

3.5.2. Tageszeitlicher Verlauf der Blattkohlenhydratgehalte

Die Assimilation von Kohlenstoff in Kohlenhydrate erfolgt in Blättern mit vergleichsweise hohen Raten. Transitorische Stärke stellt den transienten Kohlenstoffspeicher des Blattgewebes dar, Zucker sind die bevorzugte Transportform des Kohlenstoffs aus den Blättern in die heterotrophen Teile der Pflanze. Die transiente Kohlenhydratspeicherung im Blatt und der Kohlenhydratexport aus dem Blatt sind antagonistische Stoffwechselwege und ihr Gleichgewicht ist streng reguliert. Die Untersuchung des Kohlenhydratstoffwechsels im Blatt als bedeutendstem Stoffwechselweg ist grundlegend für weitere Stoffwechselanalysen.

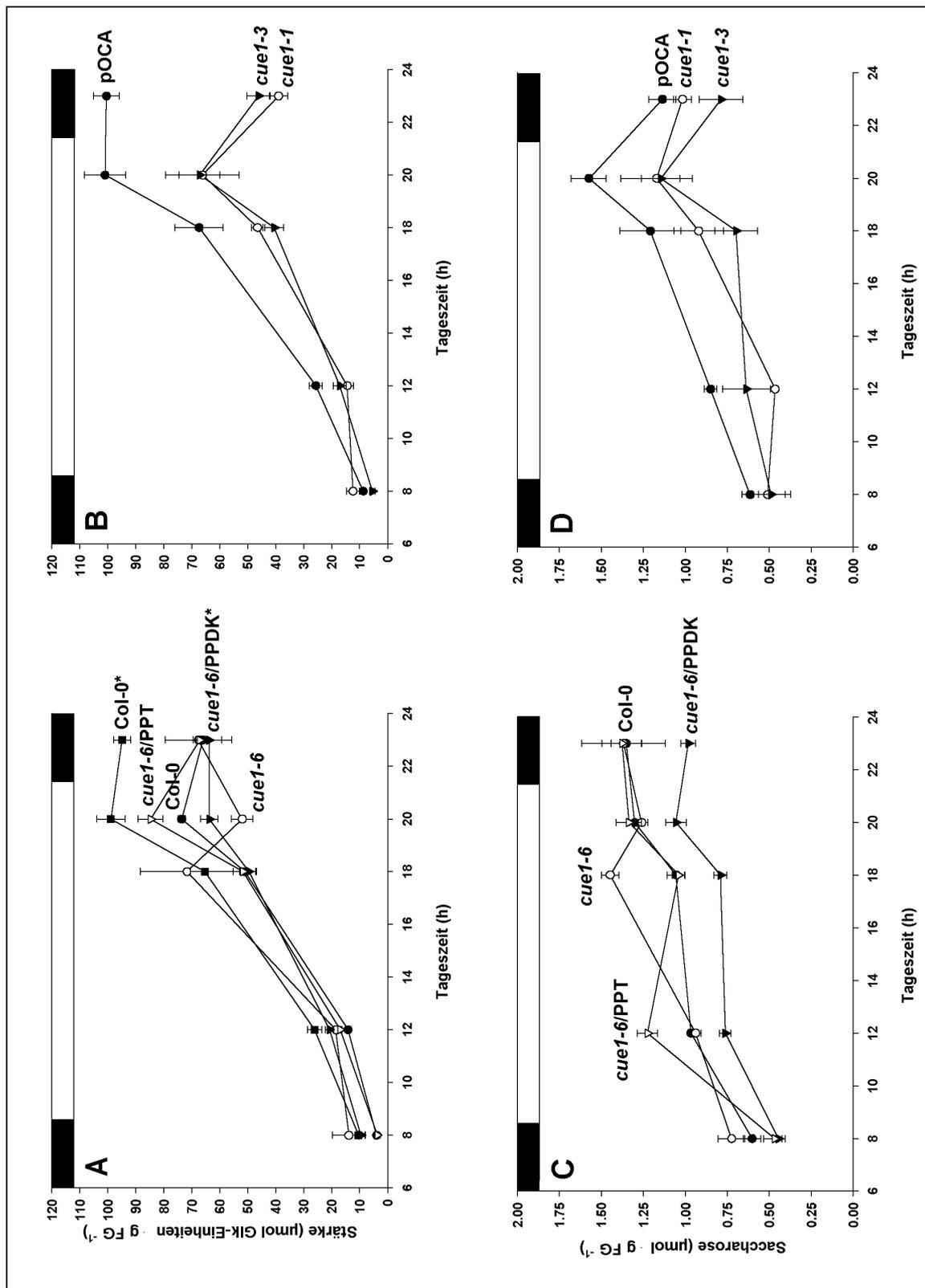


Abb. 3.10 Diurnaler Verlauf der Stärke- (A, B) und Saccharose-Gehalte (C, D) von *Arabidopsis*-Blättern. $n=4$. Die Stärkegehalte sind als Einheiten an Glukosemonomeren angegeben. Die Balken am oberen Ende der Diagramme zeigen Licht- (hell) und Dunkelphasen (dunkel) an. Die mit * gekennzeichneten Daten für Col-0 und *cue1-6*/PPDK resultieren aus Parallelmessungen und sind deshalb nur untereinander vergleichbar.

Daher wurden die Gehalte an Glukose, Fruktose und Saccharose, sowie der Gehalt an transitorischer Stärke als Tagesgänge unter Kurztagsbedingungen (s. 2.2.1.5) aufgenommen.

Die Saccharosegehalte waren in *cue1-1* und *cue1-3* über den gesamten Tagesgang hinweg geringer als in Blättern der Kontrollpflanze pOCA (Abb. 3.10 D). Dementgegen entsprachen die Saccharose-Gehalte der *cue1-6*-Mutante fast zu allen Zeitpunkten des Tages den Saccharose-Gehalten im Wildtyp. Ansonsten waren anhand der Saccharose-Tagesgänge zunächst keine deutlichen Unterschiede auszumachen. Berechnete man jedoch die Differenz der Saccharose-Gehalte zu Beginn und am Ende der Lichtperiode, so war die Saccharose-Akkumulation während der Lichtphase in allen *cue1*-Mutanten und in den *cue1-6*/PPDK-Pflanzen um etwa 30% gegenüber den Kontrollen erniedrigt (Tab. 3.7). Durch die Überexpression des Blumenkohl-PPT in *cue1-6* konnte die Saccharose-Akkumulation während der Lichtperiode wieder auf Wildtyp-Niveau revertiert werden.

Die Gehalte an transitorischer Stärke sind in Abb. 3.10 A und B dargelegt; die Stärke-Akkumulationen der verschiedenen Linien während der Lichtperiode sind in Tab. 3.7 einander gegenübergestellt. Die Akkumulation transitorischer Stärke während der Lichtperiode war in allen *cue1*-Mutanten um ca. 30% gegenüber den Kontrollen verringert (Abb. 3.10 A und B, Tab. 3.7). Die Saccharose-Akkumulation (s.o.) und die Akkumulation transitorischer Stärke während der Lichtperiode waren in *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen also um den gleichen Prozentsatz reduziert wie die CO₂-Einbaurate unter Hoch-CO₂ (s. 3.5.1). In *cue1-6*/PPT war die Bildung transitorischer Stärke im Licht sogar höher als im Wildtyp, in *cue1-6*/PPDK konnten die geringeren Gehalte an transitorischer Stärke der *cue1-6*-Mutante nur partiell kompensiert werden (Tab. 3.10).

Die Glukose-Gehalte lagen in den starken *cue1*-Allelen *cue1-1* und *cue1-6* über den gesamten Tagesgang hinweg signifikant ($\alpha < 0,05$) über denen der Kontrollpflanzen (Abb. 3.11). Durch die Überexpression des Blumenkohl-PPT als auch durch die Überexpression der *F. trinervia* PPDK im *cue1-6*-Hintergrund konnten die Glukose-Gehalte auf Wildtypwerte verringert werden (Abb. 3.11). In den Pflanzen des Col-0-Hintergrundes stiegen die Glukose-Gehalte während der Lichtperiode von durchschnittlich 1,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{g FG}^{-1}$ auf 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{g FG}^{-1}$ an, in den Linien des pOCA-Hintergrundes blieben die Glukose-Gehalte dagegen eher konstant.

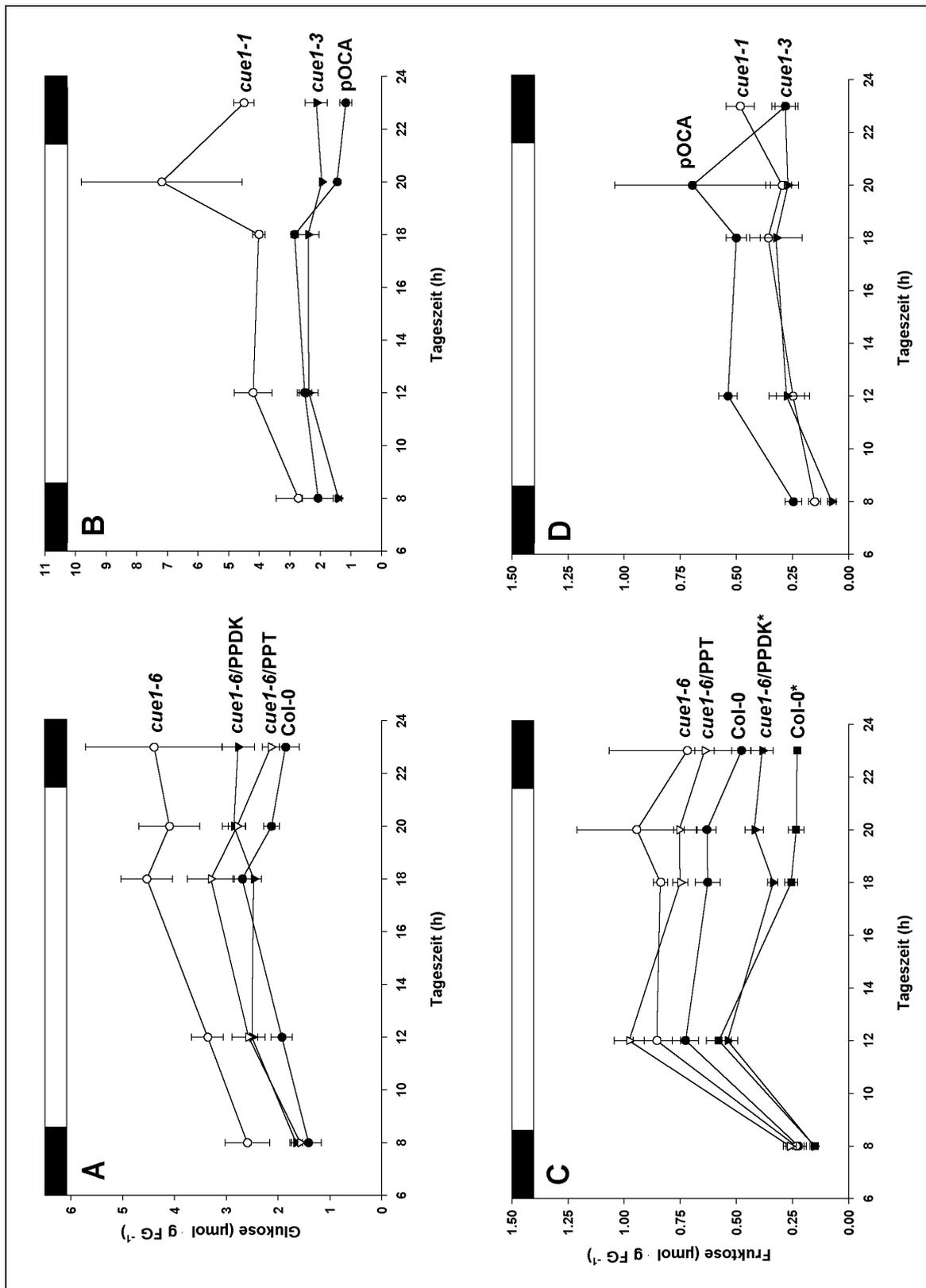


Abb. 3.11 Diurnaler Verlauf der Glukose- (A, B) und Fruktose-Gehalte (C, D) von *Arabidopsis*-Blättern. $n=4$. Die Balken am oberen Ende der Diagramme zeigen Licht-(hell) und Dunkelphasen (dunkel) an. Die mit * gekennzeichneten Daten für *Col-0* und *cue1-6/PPDK* resultieren aus Parallelmessungen und sind deshalb nur untereinander vergleichbar.

Ergebnisse

	Col-0^a	<i>cue1-6/PPDK^a</i>	Col-0	<i>cue1-6</i>	<i>cue1-6/PPT</i>
Δ Stärke (μmol Glk-Einheiten)	88,5 ± 5,7	54,2** ± 10,0	69,6 ± 1,9	45,9*** ± 6,1	81,0** ± 4,9
Δ Saccharose (μmol)	0,82 ± 0,06	0,61 ⁺⁺⁺ ± 0,13	0,75 ± 0,08	0,54 ⁺⁺⁺ ± 0,12	0,87 ± 0,14

	pOCA	<i>cue1-1</i>	<i>cue1-3</i>
Δ Stärke (μmol Glk-Einheiten)	92,3 ± 7,9	53,8** ± 15,3	61,8** ± 8,2
Δ Saccharose (μmol)	0,96 ± 0,1	0,67 ⁺ ± 0,32	0,66 ⁺ ± 0,23

Tab. 3.7 Stärke- und Saccharose-Akkumulation nach 12 h im Licht unter Kurztagsbedingungen. n=4.

⁺: $\alpha < 0,1$; ⁺⁺: $\alpha < 0,05$; ⁺⁺⁺: $\alpha < 0,025$; *: $\alpha < 0,01$; **: $\alpha < 0,005$; ***: $\alpha < 0,0005$. α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. ^a: Die Daten für Col-0 und *cue1-6/PPDK* resultieren aus Parallelmessungen und sind deshalb nur untereinander vergleichbar.

Der Anstieg der Fruktose-Gehalte während der Lichtperiode auf das Dreifache der Gehalte am Ende der Dunkelperiode war zwar in allen Linien ähnlich, die Tendenzen innerhalb der verschiedenen *cue1*-Linien waren jedoch uneinheitlich: *cue1-1* und *cue1-3* im pOCA-Hintergrund wiesen niedrigere, *cue1-6*, *cue1-6/PPDK* und *cue1-6/PPT*-Blätter wiesen zum Ende der Lichtperiode gegenüber dem Wildtyp erhöhte Fruktose-Gehalte auf (Abb. 3.11).

	Col-0^a	<i>cue1-6/PPDK^a</i>	Col-0	<i>cue1-6</i>
Glukose·Fruktose ⁻¹	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.3	2.7 ± 0.2	4.0** ± 0.4
Glukose·Saccharose ⁻¹	2.8 ± 0.2	3.2 ⁺⁺⁺ ± 0.2	2.0 ± 0.2	3.6*** ± 0.4

	pOCA	<i>cue1-1</i>	<i>cue1-3</i>
Glukose·Fruktose ⁻¹	4.7 ± 0.2	19.6 ⁺⁺⁺ ± 4.7	10.6 ⁺ ± 3.6
Glukose·Saccharose ⁻¹	3 ± 0.3	6.9 ⁺⁺⁺ ± 1.1	4 ⁺ ± 0.8

Tab. 3.8 Relation der Glukosegehalte zu den Fruktose- und Saccharose-Gehalten in Blättern der untersuchten *A. thaliana*-Linien nach 4 h im Licht. n=4. ⁺: $\alpha < 0,1$; ⁺⁺: $\alpha < 0,05$; ⁺⁺⁺: $\alpha < 0,025$; *: $\alpha < 0,01$; **: $\alpha < 0,005$; ***: $\alpha < 0,0005$. α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. Die mit * gekennzeichneten Daten für Col-0 und *cue1-6/PPDK* resultieren aus Parallelmessungen und sind deshalb nur untereinander vergleichbar.

Eine signifikante Erhöhung der Glukose-Gehalte in den *cue1*-Mutanten sollte einen Einfluß auf die Verhältnisse der Zuckergehalte zueinander haben, wenn die Gehalte anderer löslicher Zucker in *cue1* in etwa gleich bleiben. In Tab. 3.8 sind daher die Glukose-Fruktose-Verhältnisse und die Glukose-Saccharose-Verhältnisse exemplarisch nach 4 h im Licht angegeben. In Blättern aller untersuchter *cue1*-Mutanten war Glukose gegenüber Fruktose und Saccharose signifikant, bei *cue1-1*-Mutanten jeweils bis zu 4- und zweifach, erhöht (Tab. 3.9). In *cue1-6*/PPDK war lediglich das Verhältnis Glukose zu Saccharose erhöht, weil die Saccharose-Gehalte in *cue1-6*/PPDK geringer waren als im Wildtyp (Abb. 3.10C); ansonsten waren in den Komplementanden gegenüber dem Wildtyp keine Verschiebungen der Zuckergehalte zueinander festzustellen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß der Stoffwechsel löslicher Zucker und transitorischer Stärke in *cue1*-Mutanten beeinträchtigt war und in *cue1-6* in jeglicher Hinsicht durch die Überexpression des Blumenkohl-PPT aufgehoben werden konnte. Die Glukose-Gehalte waren in *cue1*-Mutanten zu jedem Tageszeitpunkt höher als in den Kontrollen, die Akkumulation von Saccharose und transitorischer Stärke waren in *cue1*-Mutanten jeweils um 30% gegenüber den Kontrollen vermindert. Durch die Überexpression der *F. trinervia* PPDK in *cue1-6* konnten lediglich die von den Kontrollen abweichenden Gehalte an Monosacchariden revertiert werden; Saccharosegehalte und Stärkeakkumulation blieben in *cue1-6*/PPDK gegenüber dem Wildtyp leicht verringert.

3.5.3. Untersuchungen des Stärkephosphorylierungsgrades als Indikator für die R1-Bindung

In der Literatur wurde eine Beteiligung von PEP bei der Stärkephosphorylierung diskutiert. Dem R1-Protein, das bei hohen Stärkephosphorylierungsgraden vermehrt mit Stärke assoziiert ist (Lorberth et al., 1998; Yu et al., 2001; Ritte et al., 2000), wurde aufgrund einer hohen Homologie zur *E. coli* PEP-Synthetase (PEPS) im Bereich des aktiven Zentrums der PEPS eine Rolle bei der Stärkephosphorylierung zugeschrieben. Es war jedoch unklar, ob das R1-Protein eine Stärke-Wasser-Dikinase-Funktion besitzt, bei der PEP als Phosphatdonor in Frage kommt, oder ob sich das R1-Protein anderer Phosphatdonoren bedient (G. Ritte, persönliche Mitteilung).

Da die Stärkebiosynthese im Stroma abläuft und der Defekt des AtPPT1 in *cue1*-Mutanten eine unzureichende Versorgung des Stromas mit PEP nach sich ziehen sollte (s. 1.5.1), wurden die Stärkephosphorylierungsgrade in Blättern von *cue1*-Mutanten im Vergleich zu Kontrollblättern zum Ende der Licht- und eine Stunde nach Beginn der Dunkelperiode

bestimmt. 80% der phosphorylierten Glukose-Einheiten tragen den Phosphatrest am C6-Atom (Takeda und Hizukuri, 1971), so daß eine Bestimmung des Verhältnisses der Glk6P-Monomere zu den unphosphorylierten Glukose-Monomeren nach der Stärkehydrolyse hinreichend zur Bestimmung des Stärkephosphorylierungsgrades ist.

Die Phosphorylierungsgrade transitorischer Stärke lagen im Licht zwischen 0,5 und 0,8 nmol Glk6P· μ mol Glk⁻¹ und stiegen im Dunkeln auf 0,8 bis 2 nmol Glk6P· μ mol Glk⁻¹ an (Abb. 3.12). In den Kontrollen (Col-0 und pOCA) erhöhte sich der Phosphorylierungsgrad der Stärke im Dunkeln um das 1,7- bis 2,7fache. Die in Abb. 3.12 erkennbaren Unterschiede zwischen den Daten aus den starken *cue1*-Mutanten *cue1-1* und *cue1-6* und den Kontrollen sind jedoch nicht signifikant. Sollten sich die PEP-Konzentrationen im Stroma (s. 3.5.4) zwischen den *cue1*-Mutanten und den Kontrollen unterscheiden, könnte aufgrund der hier präsentierten Daten eine direkte Beteiligung von PEP an der Stärkephosphorylierung in *A. thaliana* ausgeschlossen werden. Mittlerweile ist das R1-Protein als ATP-abhängige Wasser-Stärke-Dikinase identifiziert worden (Ritte et al., in Vorbereitung); PEP scheint also nicht an der Phosphorylierung der Stärke beteiligt zu sein.

3.5.4. Metabolitgehalte in Blattproben

Neben der Analyse von Stoffwechselflüssen läßt die Beobachtung von Metabolitgehalten im Stoffwechselfließgleichgewicht Rückschlüsse auf den Ablauf des Metabolismus in den untersuchten Geweben zu. Wird dies zu verschiedenen Tageszeiten durchgeführt, kann die Dynamik des Stoffwechsels im Tagesverlauf erfaßt werden. Besonders aussagekräftig ist dabei die Relation der Gehalte miteinander über enzymatische Gleichgewichte gekoppelter Metabolite zueinander.

In den untersuchten Linien von *A. thaliana* wurden daher die Gehalte ausgesuchter Metabolite zu verschiedenen Tageszeitpunkten aufgenommen. Der Übersichtlichkeit halber sind jeweils nur die Daten eines repräsentativen Licht- (Tab. 3.10) und Dunkelzeitpunktes (Tab. 3.9) auf Frischgewicht bezogen dargestellt. Die übrigen Daten, darunter auch Metabolitbestimmungen in jungen, vermutlich heterotrophen Rosettenblättern, können in Anhang 8.4 nachgeschlagen werden. Obwohl das spezifische Blattfrischgewicht in den *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen erhöht war (s. 3.3), verändern sich die Unterschiede zwischen den untersuchten Linien verändern sich nur unwesentlich, wenn die gemessenen Metabolitgehalte auf die Blattfläche normiert werden; selbst beim Bezug der Daten auf Chlorophyllgehalte, die in den *cue1*-Mutanten drastisch reduziert sind, ändert sich die prinzipielle Aussage lediglich geringfügig.

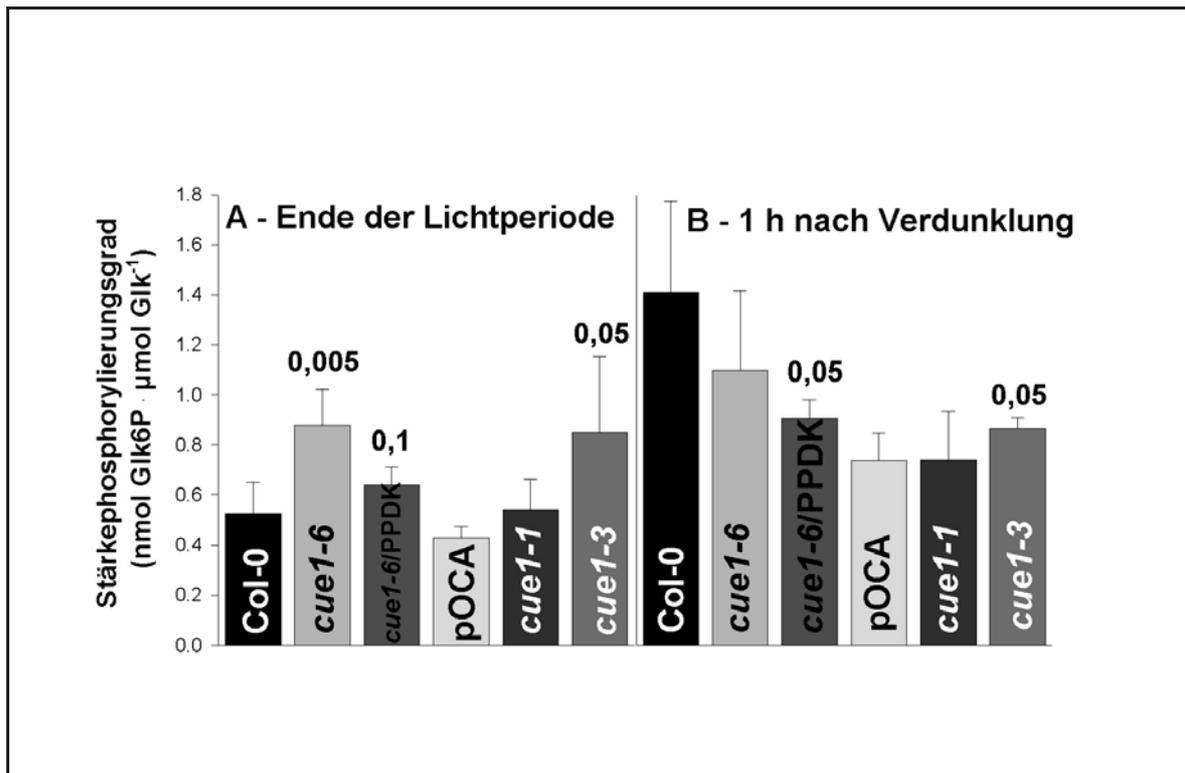


Abb. 3.12 Phosphorylierungsgrade der transitorischen Stärke aus verschiedenen *A. thaliana*-Linien. $n=4$. A: Stärkephosphorylierungsgrad am Ende der Lichtperiode; B: Stärkephosphorylierungsgrad nach 1 h im Dunkeln. Signifikante Unterschiede sind durch die Irrtumswahrscheinlichkeit α eines einseitigen Welch-Tests oberhalb der Fehlerbalken angegeben.

Die Bildung von Hexosephosphaten und der Ablauf des Calvin-Zyklus stellen anaplerotische Reaktionen für die Biosynthese von Saccharose, Stärke und reduzierenden Zuckern dar, so daß ein veränderter Kohlenhydratstoffwechsel im Blatt durchaus auch auf veränderte Kapazitäten des Calvin-Zyklus (z.B. Price et al., 1995; Harrison et al., 1998) oder des Hexosephosphatstoffwechsels (z.B. Kofler et al., 2000) zurückgeführt werden könnte. In den folgenden beiden Abschnitten werden daher die gemessenen Gehalte an Hexosephosphaten und Calvin-Zyklus-Intermediaten beleuchtet.

	Col-0 $\pm \sigma$	<i>cuel-6</i> $\pm \sigma$	<i>cuel-6</i> /PPDK $\pm \sigma$
Glukose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	517,3 \pm 26,7	194,5*** \pm 24,4	454,4 ⁺ \pm 26,2
Fruktose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	114,4 \pm 10,3	59,5** \pm 8,8	82,6 ⁺ \pm 12,8
Glukose-1-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	82,4 \pm 17,0	37,0 ⁺⁺⁺ \pm 9,7	101,8 \pm 13,4
6-Phosphoglukonat (nmol·g FG ⁻¹)	84,7 \pm 33,6	29,2 ⁺ \pm 6,7	146,8 \pm 95,5
Fruktose-1,6-bisphosphat (nmol·g FG ⁻¹)	6,1 \pm 6,1	4,6 \pm 3,9	4,8 \pm 4,8
3-Phosphoglycerat (μ mol·g FG ⁻¹)	n.b. n.b.	0,01 ⁺ \pm 0,01	0,71 ⁺⁺⁺ \pm 0,05
Triosephosphate (nmol·g FG ⁻¹)	23,9 \pm 6,6	8,6 ⁺⁺ \pm 2,2	19,8 \pm 4,6
PEP (nmol·g FG ⁻¹)	39,8 \pm 31,0	8,8 \pm 3,8	n.b. n.b.
Phosphat (μ mol·g FG ⁻¹)	12,4 \pm 0,0	18,5*** \pm 2,4	n.b. n.b.
Malat (μ mol·g FG ⁻¹)	4,7 \pm 0,0	6,5** \pm 0,3	6,3 ⁺ \pm 0,5
Pyruvat (nmol·g FG ⁻¹)	302,0 \pm 112,8	54,7 ⁺⁺ \pm 18,1	234,0 \pm 61,2
Pyruvat·PEP ⁻¹	13,7 \pm 7,8	6,4 \pm 1,5	n.b. n.b.

	pOCA $\pm \sigma$	<i>cuel-1</i> $\pm \sigma$	<i>cuel-3</i> $\pm \sigma$
Glukose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	362,1 \pm 54,3	201,0** \pm 13,4	250,8 ⁺⁺⁺ \pm 67,2
Fruktose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	120,8 \pm 29,9	60,7* \pm 19,2	65,3* \pm 9,3
Glukose-1-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	136,8 \pm 23,5	74,8** \pm 6,7	49,4*** \pm 26,2
6-Phosphoglukonat (nmol·g FG ⁻¹)	136,4 \pm 32,3	92,5 ⁺⁺⁺ \pm 20,8	62,0** \pm 22,3
Fruktose-1,6-bisphosphat (nmol·g FG ⁻¹)	4,0 \pm 2,1	n.b. n.b.	3,8 \pm 2,2
3-Phosphoglycerat (μ mol·g FG ⁻¹)	0,05 \pm 0,03	0,04 \pm 0,03	0,07 ⁺ \pm 0,03
Triosephosphate (nmol·g FG ⁻¹)	16,4 \pm 4,4	8,1* \pm 1,7	105,8*** \pm 3,2
PEP (nmol·g FG ⁻¹)	26,7 \pm 3,9	8,1*** \pm 2,0	13,0*** \pm 3,4
Phosphat (μ mol·g FG ⁻¹)	9,1 \pm 0,2	11,4* \pm 1,0	4,5*** \pm 0,7
Malat (μ mol·g FG ⁻¹)	7,0 \pm 0,6	5,5** \pm 0,5	16,3*** \pm 0,9
Pyruvat (nmol·g FG ⁻¹)	103,2 \pm 13,1	80,1 ⁺⁺⁺ \pm 13,1	148,9 \pm 129,1
Pyruvat·PEP ⁻¹	8,3 \pm 3,1	14,4 \pm 10,8	7,2 \pm 5,4

Tab. 3.9 Metabolitgehalte in *Arabidopsis*-Blättern am Ende der Dunkelperiode. n=4. ⁺: $\alpha < 0,1$; ⁺⁺: $\alpha < 0,05$; ⁺⁺⁺: $\alpha < 0,025$; *: $\alpha < 0,01$; **: $\alpha < 0,005$; ***: $\alpha < 0,0005$. α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. σ : Standardabweichung. n.b.: nicht bestimmt.

	Col-0 $\pm \sigma$	<i>cuel-6</i> $\pm \sigma$	<i>cuel-6</i> /PPDK $\pm \sigma$
Glukose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	411,0 \pm 44,1	318,9 ⁺⁺⁺ \pm 38,2	437,8 \pm 31,2
Fruktose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	158,6 \pm 9,8	126,5* \pm 12,8	137,7 \pm 51,5
Glukose-1-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	89,7 \pm 9,4	52,0** \pm 10,0	159,3 \pm 38,0
6-Phosphoglukonat (nmol·g FG ⁻¹)	86,4 \pm 29,5	53,8 ⁺ \pm 11,7	116,7 \pm 0,0
Fruktose-1,6-bisphosphat (nmol·g FG ⁻¹)	25,1 \pm 14,9	5,6 ⁺ \pm 3,1	n.b. n.b.
3-Phosphoglycerat (μ mol·g FG ⁻¹)	0,54 \pm 0,06	0,36 ⁺⁺⁺ \pm 0,08	1,07 ⁺ \pm 0,21
Triosephosphate (nmol·g FG ⁻¹)	84,9 \pm 8,2	44,0** \pm 6,0	37,7 ⁺ \pm 13,6
PEP (nmol·g FG ⁻¹)	55,3 \pm 12,9	54,1 \pm 8,3	146,9 ⁺ \pm 29,7
Phosphat (μ mol·g FG ⁻¹)	12,9 \pm 1,6	18,5* \pm 2,4	n.b. n.b.
Malat (μ mol·g FG ⁻¹)	9,1 \pm 0,8	8,2 ⁺ \pm 0,7	8,1 \pm 2,2
Pyruvat (nmol·g FG ⁻¹)	134,3 \pm 44,7	124,3 \pm 18,4	488,9 ⁺⁺⁺ \pm 64,2
3-PGA·Triosephosphate ⁻¹	6,3 \pm 0,5	7,5 \pm 2,7	33,1 ⁺ \pm 10,2
3-PGA·P _i ⁻¹	0,045 \pm 0,0	0,02*** \pm 0,002	n.b. n.b.
Pyruvat·PEP ⁻¹	3,5 \pm 1,6	2,8 \pm 0,8	3,8 \pm 0,9

	pOCA $\pm \sigma$	<i>cuel-1</i> $\pm \sigma$	<i>cuel-3</i> $\pm \sigma$
Glukose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	384,5 \pm 21,8	206,6*** \pm 17,1	260,4*** \pm 35,9
Fruktose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	169,3 \pm 14,0	103,1*** \pm 13,7	101,8*** \pm 10,1
Glukose-1-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	55,2 \pm 8,4	41,1* \pm 4,8	34,9** \pm 4,9
6-Phosphoglukonat (nmol·g FG ⁻¹)	61,0 \pm 19,7	62,3 \pm 9,2	57,0 \pm 6,7
Fruktose-1,6-bisphosphat (nmol·g FG ⁻¹)	3,8 \pm 1,5	0,7** \pm 0,3	1,3* \pm 0,7
3-Phosphoglycerat (μ mol·g FG ⁻¹)	0,47 \pm 0,03	0,22*** \pm 0,03	0,31*** \pm 0,02
Triosephosphate (nmol·g FG ⁻¹)	44,3 \pm 6,4	19,0*** \pm 1,5	31,1** \pm 3,1
PEP (nmol·g FG ⁻¹)	60,2 \pm 4,7	35,5** \pm 4,4	85,7 ⁺⁺ \pm 26,2
Phosphat (μ mol·g FG ⁻¹)	8,8 \pm 1,5	14,8*** \pm 0,7	18,5*** \pm 2,4
Malat (μ mol·g FG ⁻¹)	8,3 \pm 0,1	9,9 ⁺ \pm 1,7	15,3*** \pm 1,7
Pyruvat (nmol·g FG ⁻¹)	113,1 \pm 18,2	63,4** \pm 16,9	338,7* \pm 130,9
3-PGA·Triosephosphate ⁻¹	10,6 \pm 2,9	13,5 \pm 2,7	11,3 \pm 2,4
3-PGA·P _i ⁻¹	0,05 \pm 0,011	0,012*** \pm 0,009	0,031 ⁺ \pm 0,008
Pyruvat·PEP ⁻¹	1,1 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	n.b. n.b.

Tab. 3.10 Metabolitgehalte in *Arabidopsis*-Blättern nach 4 h im Licht. n=4. ⁺: $\alpha < 0,1$; ⁺⁺: $\alpha < 0,05$; ⁺⁺⁺: $\alpha < 0,025$; *: $\alpha < 0,01$; **: $\alpha < 0,005$; ***: $\alpha < 0,0005$. α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. σ : Standardabweichung. n.b.: nicht bestimmt.

3.5.4.1. Hexosephosphatgehalte in Blattproben

Die Gehalte aller gemessenen Hexosephosphaten waren in sämtlichen untersuchten *cue1*-Mutanten sowohl im Licht als auch im Dunkeln signifikant um bis zu 50% gegenüber den Kontrollen verringert (Tab. 3.9 und 3.10). Hexosephosphate fungieren als energiereiche Vorstufen für die Saccharosebiosynthese im Zytosol und die Stärkebiosynthese im Stroma. Auch wenn keine Informationen über die subzelluläre Verteilung der Hexosephosphate vorliegen, reflektieren prinzipielle Verringerungen der Hexosephosphat-Gehalte die zuvor angesprochenen geringeren Stärke- und Saccharosesyntheseraten (s. 3.5.2) in den *cue1*-Mutanten, da Hexosephosphate in gleicher Weise in beide Biosynthesen eingehen. Analog zur Reversion der Stärke-Akkumulation in *cue1-6*/PPDK-Blättern (s. 3.5.2), wichen auch die Hexosephosphatgehalte in *cue1-6*/PPDK während der Lichtphase nicht signifikant von den Gehalten in den Kontrollen ab. Am Ende der Dunkelperiode traten zwar signifikante Verminderungen der Hexosephosphatgehalte in *cue1-6*/PPDK gegenüber Col-0 auf, im Vergleich zu den Hexosephosphatgehalten in *cue1-6*-Mutanten stellten die in *cue1-6*/PPDK bestimmten Werte aber eine deutliche Steigerung in Richtung der Wildtypwerte dar.

3.5.4.2. Gehalte von Calvin-Zyklus-Intermediaten in Blattproben

Die Gehalte an TrioseP, 3-PGA und Fru-1,6-bP waren vor allem während der Lichtphase in allen untersuchten *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen signifikant verringert (Tab. 3.10). Die Fru-1,6-bP-Gehalte betragen in den starken *cue1*-Mutanten nur etwa 20% der Gehalte in den Kontrollen, TrioseP und 3-PGA waren in diesen beiden *cue1*-Mutanten um 50% reduziert. Da die Gehalte dieser drei Metabolite in den Blättern im Licht mindestens vierfach, bei 3-PGA sogar zehnfach anstiegen (Vgl. Tab. 3.9 mit 3.10) kann davon ausgegangen werden, daß der Großteil der TrioseP-, Fru-1,6-bP- und 3-PGA-*pools* während der Lichtperiode in den Calvin-Zyklus und andere lichtabhängige Reaktionen wie den Export von Photoassimilaten aus dem Chloroplasten und die daran angeschlossene Saccharosebiosynthese eingebunden ist. Die Gesamtaktivität des Calvin-Zyklus scheint daher in Blättern von *cue1* stark verringert zu sein – das ist einleuchtend, wenn man berücksichtigt, daß die Mesophyllchloroplasten in *cue1* unterentwickelt und die Photosyntheseleistung und die CO₂-Fixierungsrate gegenüber den Kontrollen reduziert sind (s. 3.4.1 und 3.5.1). Obwohl die Fru-1,6-bP-Gehalte in *cue1*-Blättern stärker vermindert waren als die Gehalte an TrioseP und 3-PGA, änderten sich die Gehalte dieser Metabolite zueinander nicht signifikant (nicht gezeigt).

Im Vergleich zu *cue1-6*-Mutanten zeigten sich im Licht keine einheitlichen Änderungen der Gehalte an TrioseP, 3-PGA und Fru-1,6-bP in *cue1-6*/PPDK-Überexprimierern (Tab. 3.10). Bemerkenswert war aber die signifikante Erhöhung des Verhältnisses von 3-PGA zu TrioseP in *cue1-6*/PPDK im Vergleich zum Wildtyp und den *cue1-6*-Mutanten um das Fünffache (Tab. 3.10). In einigen Experimenten konnte sogar die Akkumulation von 3-PGA während der Lichtperiode beobachtet werden (nicht gezeigt). Dieser Befund deutet auf einen Mangel an Reduktionsäquivalenten für die reduzierende Phase des Calvin-Zyklus bzw. die Veränderung des NADPH/ATP-Verhältnisses im Stroma hin und wird unter Berücksichtigung der Daten aus den Photosynthese- und Gaswechselformen eingehend diskutiert werden.

Die Meßwerte für TrioseP, 3-PGA und Fru-1,6-bP aus den Dunkelproben sind mit hohen relativen Fehlern behaftet und daher schwer zu interpretieren.

3.5.4.3. Gehalte an Pyruvat und PEP in Blattproben

Die Vermutung liegt nahe, daß eine mangelnde AtPPT1-Aktivität in den *cue1*-Mutanten einen eindeutigen Einfluß auf die Gehalte des transportierten Substrats PEP und des mit PEP über viele verschiedene enzymatische Reaktionen (s. 1.5.1) im Gleichgewicht stehenden Pyruvat hat.

Am Ende der Dunkelperiode waren die PEP-Gehalte in den starken Allelen *cue1-1* und *cue1-6* um jeweils 75%, im schwachen Allel *cue1-3* immerhin noch um 50% gegenüber den Kontrollen vermindert (Tab. 3.9). Die Pyruvat-Gehalte waren nur in den starken Allelen *cue1-1* und *cue1-6* gegenüber den Kontrollen herabgesetzt. Im Licht waren lediglich die Pyruvat- und PEP-Gehalte in *cue1-1* im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Da die Kompartimentierung von PEP und Pyruvat nicht untersucht wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, inwiefern sich PEP und Pyruvat in den verschiedenen *cue1*-Linien im Zytosol anstauen oder inwieweit diese beiden Metabolite dem Stroma zuzuordnen sind. Offenbar scheint die PPT-Aktivität während der Dunkelphase von größerer Bedeutung für den Stoffwechsel im Blatt zu sein als während der Lichtperiode, denn in den Kontrollen wurden keine substantiellen Veränderungen der Pyruvat- und PEP-Gehalte zwischen im Licht und im Dunkeln genommenen Blattproben beobachtet (vgl. Tab. 3.9 mit Tab. 3.10).

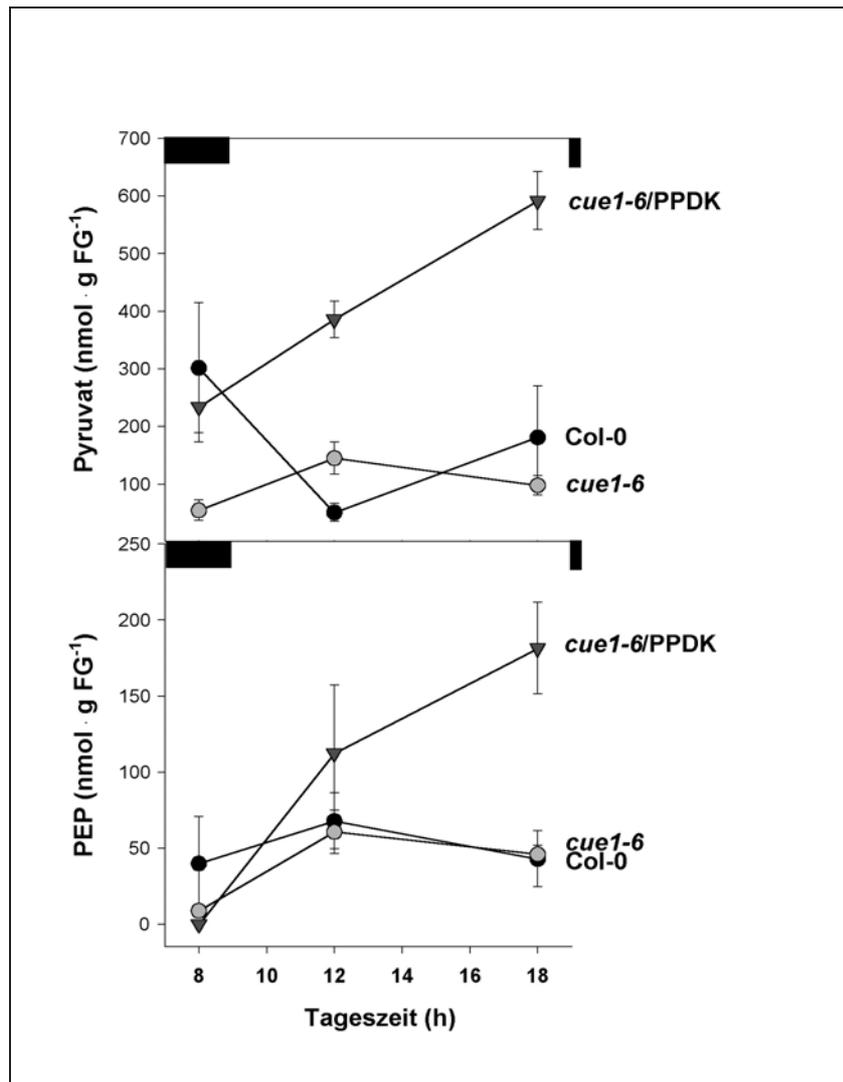


Abb. 3.13 Akkumulation von Pyruvat- und PEP-Gehalten in *cue1-6/PPDK* während der Lichtperiode. $n=3$. Die Balken am oberen Ende der Diagramme zeigen Licht-(hell) und Dunkelphasen (dunkel) an.

Im Licht waren sowohl Pyruvat- als auch PEP-Gehalte in *cue1-6/PPDK* gegenüber dem Wildtyp verdreifacht (Tab. 3.10). Weitere Untersuchungen ergaben, daß Pyruvat und PEP während der Lichtperiode substantiell akkumulierten (Abb. 3.13) – die in Tab. 3.10 dargestellten Werte wurden schon nach 4 h im Licht gemessen und stellen somit nicht die maximalen gemessenen Gehalte an Pyruvat und PEP in *cue1-6/PPDK* dar.

Weiterhin konnte die Akkumulation von PEP in *cue1-6/PPDK*-Blättern direkt mit der Aktivität der eingeführten PPDK korreliert werden (Abb. 3.14). Aufgrund der Lokalisation der PPDK-Aktivität in den Plastiden von *cue1-6/PPDK* (s. 3.1.2) und der AtPPT1-Defizienz im *cue1*-Hintergrund kann davon ausgegangen werden, daß sich PEP in *cue1-6/PPDK* im Stroma anstaut und aufgrund des AtPPT1-Defektes nicht mehr abgeführt

werden kann. Da sich die PEP- und Pyruvat-Gehalte in *cue1-6*/PPDK am Ende der Dunkelperiode wieder im Bereich der Gehalte im Wildtyp bzw. der in *cue1-6* bewegten (Abb. 3.13), muß außerdem angenommen werden, daß die angestauten Pyruvat- und PEP-Mengen während der Dunkelperiode metabolisch abfließen können. Auch in *cue1*-Mutanten war eine Verringerung der Pyruvat- und PEP-Gehalte während der Dunkelperiode zu beobachten (s.o.), die in den Kontrollen nicht erkennbar war. Die metabolische Zehrung an den Pyruvat- und PEP-Gehalten ist offenbar eine Eigentümlichkeit des *cue1*-Hintergrundes, die durch das Fehlen des AtPPT1 bedingt wird. Die Akkumulation von Pyruvat konnte entgegen der PEP-Akkumulation in *cue1-6*/PPDK-Blättern nur schwach mit der Aktivität der PPDK in *cue1-6*-Transformanden korreliert werden (nicht gezeigt); außerdem kann über die subzelluläre Lokalisation des akkumulierten Pyruvats nur spekuliert werden. Abgesehen von den z.T. dramatischen Änderungen der Pyruvat- und PEP-Gehalte war das Verhältnis von Pyruvat zu PEP erstaunlicherweise in allen untersuchten Linien im Rahmen der Signifikanzschwellen identisch (Tab. 3.9 und 3.10).

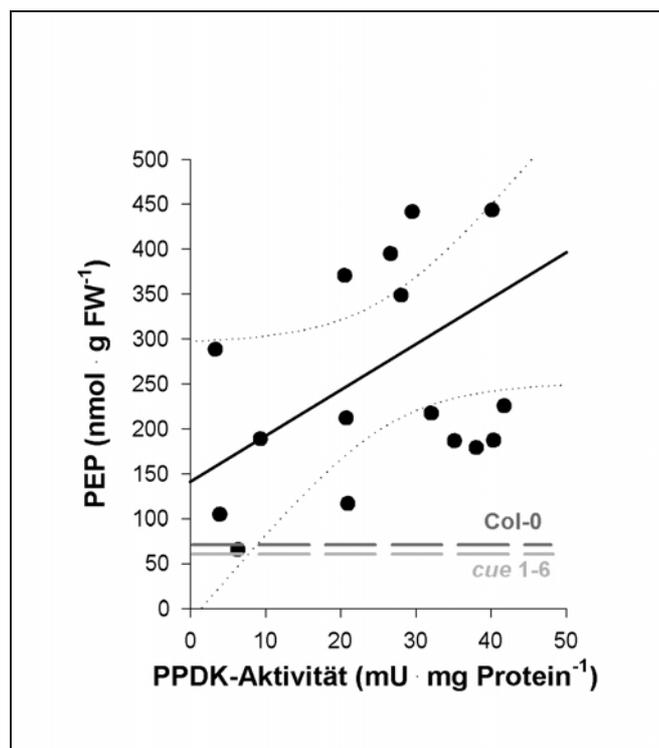


Abb. 3.14 Korrelation der PEP-Gehalte gegen Ende der Lichtperiode mit der PPDK-Aktivität in *cue1-6*/PPDK-Blättern. $n=3$ für die PEP-Gehalte; $n=7$ für die PPDK-Aktivität – die PPDK-Aktivität wurde aus den Daten dreier unterschiedlicher Anzuchten gemittelt. Die PEP-Gehalte des Wildtyps (Col-0) und von *cue1-6* sind durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht.

3.5.4.4. Phosphatgehalte in Blattproben

Interessanterweise waren die P_a -Gehalte in den *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen bis auf das Doppelte erhöht (Tab. 3.9 und 3.10). In der Regel findet sich der Großteil des zellulären P_a in der Vakuole (Schleucher et al., 1998). Für den Fall, daß sich ein erhöhter Gesamtposphatgehalt auf die Phosphatkonzentrationen in allen Kompartimenten auswirkt, könnte das in den *cue1*-Mutanten um das Zwei- bis Vierfache verringerte 3-PGA- P_a -Verhältnis (Tab. 3.12) einen inhibitorischen Effekt auf die plastidäre Stärkesynthese haben. Die Akkumulation transitorischer Stärke war wie unter 3.5.2 gezeigt in den *cue1*-Mutanten tatsächlich gegenüber den Kontrollen um 30% verringert, was aber auch durch eine Limitation der Lichtreaktion in *cue1* hervorgerufen werden kann (s. 3.5.2). Daten über den Gehalt anorganischen Phosphats und dessen Verhältnis zu 3-PGA-Gehalten fehlen für *cue1-6*/PPDK-Blättern zum Vergleich.

3.5.5. Aminosäureprofile in Blattproben

PEP spielt eine wichtige Rolle bei der Biosynthese vieler Aminosäuren (s. 1.5.3, 1.5.4 und 1.5.5). Die über den Shikimatweg gebildeten aromatischen Aminosäuren spielen offenbar eine zentrale Rolle bei der Ausprägung des Blattphänotyps in *cue1*, da dieser in *cue1*-Sterilkulturen durch die Fütterung von aromatischen Aminosäuren verschwindet (Streatfield et al., 1999). Die hier präsentierten Aminosäuregehalte entstammen Tagesgängen aus langtagadaptierten Pflanzen. Der Übersichtlichkeit halber werden nur die Aminosäuregehalte am Ende der Dunkelperiode und nach 4 h im Licht gezeigt; die Aminosäuregehalte am Ende der Lichtperiode sind prinzipiell ähnlich mit den hier aufgeführten Daten aus der Lichtperiode und sind in Anhang 8.4 dargestellt. Die dargestellten Aminosäuregehalte sind weiterhin auf gleiche Frischgewichte normiert. Genausogut hätten die Daten auf gleiche Blattflächen, gleichen Chlorophyllgehalt oder prozentual auf die Gesamtaminosäuregehalte bezogen dargestellt werden können. Da die Aussage der Ergebnisse sich dadurch aber nicht maßgeblich ändert, werden die Werte nur in einer Form präsentiert. Eine Aufstellung der relativen Aminosäuregehalte in Prozent des Gesamtaminosäuregehaltes findet sich für alle Meßzeitpunkte in Anhang 8.4.

AS (nmol · g FG ⁻¹)	Col-0*	Col-0 SD	cue1-6/PPDK* SD	Col-0 SD	cue1-6 SD	cue1-6W3 SD	pOCA SD	cue1-1 SD	cue1-3 SD
Glu	2096,1 ±50,5	3326,8 ±285,8	2166,1 ±94,7	3398,8 ±291,2	4865,9** ±527,3	1618,0 ±91,6	1029,5** ±144,7	1879,0 ±367,0	
Gln	476,5 ±10,3	1993,0 ±87,8	846,8*** ±139,2	238,7*** ±18,1	2070,6 ±283,0	514,6 ±110,7	215,6*** ±35,9	420,8 ±146,6	
Asp	1290,5 ±17,6	2093,3 ±150,8	997,5* ±61,0	663,3*** ±96,4	1482,1** ±83,5	868,8 ±34,3	455,1*** ±44,7	1160,8* ±251,0	
Asn	176,4 ±19,7	533,5 ±11,3	216,8* ±25,7	106,1*** ±16,3	551,3 ±47,0	92,6 ±17,4	59,3** ±8,2	197,1* ±63,4	
Ser	271,5 ±35,5	383,1 ±23,2	396,7* ±23,4	990,3*** ±58,1	466,4*** ±44,0	161,9 ±17,4	636,0* ±90,6	366,7*** ±75,0	
Gly	181,3 ±22,0	56,9 ±4,6	98,5*** ±4,4	46,1* ±4,9	58,3 ±11,1	102,4 ±19,9	100,0 ±10,7	112,4 ±20,6	
Ala	392,6 ±20,3	742,2 ±43,2	439,3* ±37,2	530,7*** ±18,0	810,5*** ±20,9	440,9 ±121,5	257,6* ±35,5	377,2 ±58,5	
His	42,8 ±2,8	63,2 ±8,0	n.b.	18,9** ±0,8	56,3 ±6,9	24,3 ±8,0	22,5 ±0,0	n.b.	
Arg	n.b.	19,9 ±1,9	30,9 ±1,1	16,9*** ±1,0	19,9 ±1,3	20,3 ±5,5	30,1** ±3,2	41,2 ±6,5	
Pro	n.b.	80,2 ±14,5	n.b.	253,0* ±160,2	256,6*** ±81,9	n.b.	n.b.	n.b.	
Lys	60,3 ±6,9	55,6 ±6,8	36,7*** ±1,2	27,4*** ±4,9	40,6*** ±1,9	32,2 ±1,6	22,8** ±3,0	43,7** ±0,8	
Met	n.b.	18,0 ±1,6	n.b.	10,2** ±0,2	14,6* ±0,8	7,1 ±1,3	6,9 ±0,0	6,6 ±0,4	
Thr	51,8 ±4,1	192,8 ±1,8	274,20** ±32,8	155,3** ±12,1	214,7*** ±13,1	191,2 ±14,9	162,7* ±24,4	283,4 ±91,0	
Val	80,0 ±5,4	73,4 ±4,3	51,7** ±3,4	49,4*** ±2,5	65,8*** ±1,8	51,0 ±3,2	30,3** ±3,3	51,1** ±3,6	
Ile	35,5 ±3,1	21,6 ±1,3	20,9* ±1,0	20,0* ±0,9	20,2* ±1,1	23,6 ±0,8	16,0*** ±3,0	23,5 ±1,1	
Leu	42,1 ±2,3	23,7 ±1,8	30,80** ±1,3	26,5** ±0,6	20,3*** ±0,7	26,7 ±3,1	20,5** ±3,5	34,1*** ±1,7	
Phe	42,7 ±5,3	32,2 ±1,0	13,4* ±0,6	20,4*** ±1,0	26,3*** ±0,5	28,0 ±6,8	18,0* ±4,3	27,3** ±0,6	
Tyr	29,2 ±2,7	9,4 ±1,0	38,7 ±10,9	15,0** ±1,4	7,7*** ±0,2	17,6 ±3,1	17,5 ±3,3	31,0* ±2,8	
Trp	15,8 ±5,2	8,8 ±1,0	21,7* ±1,5	10,2** ±0,2	7,8* ±0,3	12,4 ±2,6	9,9 ±0,4	19,0 ±3,2	
Cit	n.b.	22,5 ±0,6	n.b.	7,5*** ±1,2	33,8*** ±5,9	n.b.	n.b.	n.b.	
Orn	29,2 ±1,9	98,4 ±7,4	25,0*** ±1,3	260,8** ±48,3	89,1** ±2,7	30,9 ±9,3	16,6** ±5,2	42,5 ±12,9	
gesamt	5299,0 ±108,1	9848,5 ±534,6	5701,8 ±369,8	6865,4*** ±303,0	11178,6* ±142,9	4698,3 ±542,5	3127,5* ±367,1	5115,2 ±1023,3	

Tab. 3.11 (vorige Seite) Aminosäuregehalte in *Arabidopsis*-Blättern am Ende der Dunkelperiode im Langtag. n=4; ⁺: $\alpha < 0,1$; ⁺⁺: $\alpha < 0,05$; ⁺⁺⁺: $\alpha < 0,025$; * : $\alpha < 0,01$; ** : $\alpha < 0,005$; *** : $\alpha < 0,0005$; α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. Die Daten für *cue1-6*/PPDK stammen aus einer anderen Meßreihe als die für *cue1-6* und *cue1-6*/PPT und sind daher auf die mitgeführte Wildtyp-Kontrolle dieser Messung bezogen. n.b.: nicht bestimmt. SD: Standardabweichung.

Generell unterscheiden sich die Gehalte der verschiedenen proteinogenen Aminosäuren in Blattgewebe beträchtlich voneinander. Glutamat, Glutamin, Aspartat und Serin sind im Blatt in Stoffwechselflüsse mit hohen Flußraten, wie die Ammonium(re)fixierung oder die Photorespiration eingebunden und machen je nach Stickstoffverfügbarkeit in ihrer Summe etwa 60% bis 75% der Gesamtaminosäuregehalte aus. Weitere stark repräsentierte Aminosäuren sind Asparagin, Glycin, Alanin und Threonin. Auf die restlichen zwölf proteinogenen Aminosäuren entfallen lediglich 10% bis 15% des Gesamtaminosäuregehaltes.

Die Gesamtaminosäuregehalte (Tab. 3.11, 3.12 und Anhang 8.4) wiesen in den verschiedenen *Arabidopsis*-Linien unterschiedliche Tagesgänge auf. Anhand der Unterschiede zwischen den beiden Col-0-Meßreihen (Tab. 3.11, 3.12 und Anhang 8.4), die von verschiedenen Anzuchten unter den gleichen Bedingungen stammten, kann ersehen werden, daß allein die Varianz der Gesamtaminosäuregehalte trotz identischer Bedingungen recht groß sein kann: In der ersten Meßreihe (in Tab. 3.11 und 3.12 links) wiesen die Aminosäuregehalte ein Maximum nach 4 Stunden im Licht auf, das vornehmlich von einem Anstieg der Glutamin-Gehalte bestimmt wurde. In der zweiten Meßreihe hingegen blieb dieser Anstieg der Glutamin- und Gesamtaminosäuregehalte aus (Tab. 3.11 und 3.12, Mitte). Daher ist es notwendig, stets nur Werte der gleichen Probennahme zu vergleichen. Außerdem macht es wenig Sinn, den Gehalt einer jeden Aminosäure isoliert zu betrachten. Daher werden im folgenden diejenigen Aminosäuregehalte gemeinschaftlich betrachtet, die sich Biosynthesewege zumindest partiell teilen.

Am Ende der Dunkelperiode waren die Gehalte der sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat sowie die Gehalte ihrer Säureamid-Derivate Glutamin und Asparagin signifikant um 70% bis 90% in *cue1-6* und um 40% bis 60% in *cue1-1* im Vergleich zu den Kontrollen verringert (Tab. 3.11). Nach der Überexpression der *F. trinervia* PPDK und des Blumenkohl-PPT in *cue1-6* waren diese Abweichungen vom Wildtyp nicht mehr vorhanden (Tab. 3.11).

AS (nmol · g FG ⁻¹)	Col-0	SD	cue1-6/PPDK	SD	Col-0	SD	cue1-6	SD	cue1-6/W3	SD	pOCA	SD	cue1-1	SD	cue1-3	SD
Glu	2201,3	±237,0	2795,4 ⁺⁺⁺	±160,4	2959,3	±261,9	3367,9 ⁺	±330,6	10660,7 ^{**}	±2440,3	1565,6	±72,7	2337,4 [*]	±176,4	1627,8	±247,9
Gln	2065,1	±95,9	1793,3 ⁺	±212,0	1858,8	±161,6	1469,2 ⁺⁺⁺	±196,9	2326,2 ⁺⁺	±373,5	1934,4	±134,9	1983,0	±246,7	2170,2	±268,5
Asp	1306,3	±108,0	1313,9	±75,8	1617,2	±199,0	785,6 ^{**}	±23,8	1453,5	±145,6	1016,5	±81,0	1184,1 ⁺	±126,5	1141,7 ⁺	±102,7
Asn	234,8	±14,4	259,3	±30,5	325,1	±22,9	210,6 ⁺⁺	±74,3	380,2 ⁺	±56,0	220,9	±18,4	490,2 ⁺⁺⁺	±103,3	270,8 ⁺	±32,9
Ser	1017,2	±131,1	1053,7	±59,2	1411,8	±149,9	1505,0	±55,0	1535,7	±182,4	825,2	±94,5	935,7	±185,6	832,5	±103,8
Gly	715,1	±103,1	566,2 ⁺	±81,1	442,8	±72,1	247,8 ^{**}	±46,2	635,0 ⁺⁺	±126,9	646,0	±33,6	237,6 ^{**}	±62,4	574,7	±86,0
Ala	935,9	±69,0	748,3 ⁺⁺⁺	±50,6	520,5	±59,0	828,3 ⁺⁺⁺	±157,3	873,9 ^{**}	±96,5	724,1	±40,9	674,6	±85,1	1314,4 ^{***}	±19,7
Arg	58,0	±6,6	93,7	±41,1	57,3	±10,0	33,7 [*]	±5,5	54,2	±11,8	46,9	±2,1	66,1 ^{**}	±3,1	69,5 ⁺⁺⁺	±6,0
His	n.b.		n.b.		43,6	±2,9	40,0 ⁺	±3,8	49,5	±9,1	n.b.		63,1	±0,0	n.b.	
Pro	n.b.		n.b.		240,7	±21,4	1066,8 ^{**}	±174,1	418,9 ^{***}	±29,7	n.b.		n.b.		n.b.	
Lys	69,0	±4,9	47,2 ^{**}	±4,6	38,7	±2,8	43,5 ⁺⁺	±3,2	36,4	±4,3	48,1	±2,6	50,9	±1,6	55,3 ⁺	±4,8
Met	23,6	±3,6	14,5 ⁺⁺⁺	±2,2	30,1	±2,7	23,0 [*]	±2,8	35,4 ⁺⁺	±4,3	15,6	±0,9	12,4 ⁺⁺⁺	±0,4	11,6 ⁺	±3,1
Thr	469,6	±41,4	337,4 [*]	±27,7	399,5	±28,7	315,3 ⁺⁺⁺	±53,9	456,7 ⁺⁺⁺	±28,8	319,6	±34,3	857,8 ^{***}	±52,0	480,8 ⁺⁺⁺	±55,9
Val	118,7	±5,9	67,2 ^{***}	±3,2	57,2	±5,6	73,7 ^{**}	±6,3	67,7 ⁺⁺⁺	±5,5	108,5	±6,6	73,3 ^{**}	±3,8	127,9 ⁺⁺⁺	±8,8
Ile	47,6	±3,9	31,4 ^{**}	±1,7	22,9	±1,3	24,9 ^{**}	±0,3	25,2	±2,8	34,7	±2,7	43,1 [*]	±2,3	41,9 ⁺⁺	±3,7
Leu	68,0	±6,2	37,2 [*]	±2,1	19,7	±1,7	26,8 ⁺⁺⁺	±4,1	23,0 ⁺⁺⁺	±1,2	49,4	±3,3	41,8 ⁺⁺⁺	±2,7	50,7	±4,0
Phe	58,2	±3,0	45,5 ^{**}	±2,5	41,4	±3,4	32,8 ^{**}	±6,3	39,2	±6,2	51,9	±3,4	26,2 ^{***}	±2,7	24,1 ^{***}	±3,5
Tyr	31,1	±4,4	26,6	±1,7	9,2	±0,8	12,7 ⁺⁺⁺	±2,1	11,7 ^{**}	±0,7	22,1	±3,0	36,5 [*]	±4,2	23,7	±4,3
Trp	32,5	±5,2	20,0 ⁺⁺	±1,7	11,1	±0,9	14,2 ⁺	±2,9	10,4	±0,9	21,0	±4,0	18,0	±2,1	27,5 ⁺	±3,9
Cit	n.b.		n.b.		141,9	±11,6	27,6 ^{***}	±3,9	267,1 ^{**}	±29,1	n.b.		n.b.		n.b.	
Orn	48,7	±9,7	36,4 ⁺	±2,7	91,0	±9,6	372,4 ^{***}	±15,8	96,4	±6,7	33,1	±5,5	31,5	±5,8	43,9	±10,9
gesamt	9500,7	±706,3	9495,1	±622,3	10340,0	±917,8	10465,1	±775,4	16580,1 ⁺⁺	±4014,1	7683,6	±526,7	9019,1 ⁺	±986,2	8883,6 ⁺	±900,3

Tab. 3.12 (vorige Seite) Aminosäuregehalte in *Arabidopsis*-Blättern im Langtag nach 4 h im Licht. n=4; ⁺: $\alpha < 0,1$; ⁺⁺: $\alpha < 0,05$; ⁺⁺⁺: $\alpha < 0,025$; *: $\alpha < 0,01$; **: $\alpha < 0,005$; ***: $\alpha < 0,0005$; α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. Die Daten für *cue1-6*/PPDK stammen aus einer anderen Meßreihe als die für *cue1-6* und *cue1-6*/PPT und sind daher auf die mitgeführte Wildtyp-Kontrolle dieser Messung bezogen. n.b.: nicht bestimmt. SD: Standardabweichung.

Weitaus interessanter sind jedoch die Gehalte an aromatischen Aminosäuren in den *cue1*-Mutanten. Die Messung der Aminosäuregehalte diente ursprünglich dazu zu bestätigen, daß der retikulierte Blattphänotyp durch einen Mangel an aromatischen Aminosäuren und daraus abgeleiteten Phenylpropanen hervorgerufen wird. Diese Hypothese lag aufgrund der erfolgreichen Komplementation des *cue1*-Blattphänotyps durch die Fütterung mit aromatischen Aminosäuren (Streatfield et al., 1999) nahe. Die Gehalte der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin waren jedoch in *cue1*-Mutanten sowohl in lichtexponierten Blättern als auch am Ende der Dunkelperiode nicht wie erwartet gegenüber den Kontrollen vermindert, sondern lagen teilweise signifikant über den Gehalten in Kontrollpflanzen. Lediglich die Gehalte an Phenylalanin, das in Dikotyledonen die alleinige Vorstufe für die Synthese von Phenylpropanen darstellt (Young et al., 1966; Jangaard, 1974), waren in *cue1*-Mutanten sowohl in Licht- als auch im Dunkelproben signifikant um bis zu 50% gegenüber den Gehalten in den Kontrollen reduziert. Anscheinend scheint eine Limitation des Sekundärstoffwechsels ausschließlich von den verringerten Phenylalaningehalten auszugehen, wie dies z.B. schon von Da Cunha (1987) vorgeschlagen wurde (s. 4.1.4.5).

Die Gehalte aller aromatischer Aminosäuren, inklusive der Phenylalaninergehalte, unterscheiden sich in Blättern von komplementierten *cue1-6*-Pflanzen weniger dramatisch (*cue1-6*/PPDK) bzw. gar nicht mehr signifikant (*cue1-6*/PPT) von den Gehalten in Col-0 (Tab. 3.11, Tab. 3.12 und Anhang 8.4). Die partielle Reversion der Phenylalanin-Gehalte zum Wildtyp hin ist außerdem in lichtexponierten Blättern von *cue1-6*/PPDK deutlicher als in Blättern zum Ende der Dunkelperiode (Tab. 3.11 und Tab. 3.12). Durch die unterschiedlichen Gehalte an Phenylalanin in *cue1*-Mutanten im Vergleich zu den anderen Linien konnte die Bedeutung der Phenylalaninergehalte für die Phenylpropan-Biosynthese und die Muster an Sekundärmetaboliten untersucht werden (s. 3.6).

In den starken *cue1*-Mutanten *cue1-1* und *cue1-6* waren die Alanin-Gehalte am Ende der Dunkelperiode signifikant gegenüber den Kontrollen um 40% bzw. 30% verringert (Tab. 3.11). Pyruvat und Alanin stehen über eine Transaminase in direktem Gleichgewicht

miteinander und die Pyruvat-Gehalte waren in *cue1-1* und *cue1-6* ebenfalls am Ende der Dunkelperiode um etwa denselben prozentualen Betrag im Vergleich zu den Kontrollen reduziert (s. 3.5.4). Der Zusammenhang ist offensichtlich. Aus Pyruvat leiten sich außerdem die verzweigtkettigen Aminosäuren des Acetolactat-Weges und Lysin ab (s. 1.5.3). Die übrigen Aminosäuren der Aspartat-Familie, Methionin und Threonin, werden durch gemeinsame Regulationsmechanismen durch die Verfügbarkeit von Pyruvat beeinflusst (s. 1.5.3). Es erscheint daher einsichtig, daß die Gehalte der meisten dieser Aminosäuren am Ende der Dunkelperiode in den beiden starken *cue1*-Mutanten *cue1-1* und *cue1-6* ebenfalls signifikant gegenüber den Kontrollen verringert waren (Tab. 3.11).

Die Verfügbarkeit von Pyruvat schien darüberhinaus in *cue1-6*/PPDK-Komplementanden permanent limitierend für die Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren zu sein (Tab. 3.11 und Tab. 3.12), da die Gehalte der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin, wie auch die Gehalte an Methionin und Lysin sowohl während der Licht- als auch am Ende der Dunkelperiode in *cue1-6*/PPDK signifikant um 30% bis 40% gegenüber dem Wildtyp vermindert waren. Dies scheint im Zusammenhang mit der Akkumulation von Pyruvat und PEP in den *cue1-6*/PPDK-Pflanzen während der Lichtperiode zu stehen (s. 3.5.4). Je nach Kompartimentierung des Pyruvats könnte dieses nicht mehr in dem Maße als Baustein für die Aminosäurebiosynthese zur Verfügung stehen. Darüberhinaus akkumulierte Threonin während der Dunkelperiode in *cue1-6*/PPDK, wobei die Threonin-Gehalte während der Lichtperiode sogar wieder auf 15% des Wildtypniveaus absanken. Threonin übt neben Lysin die stärkste metabolische Kontrolle auf die Biosynthese der Pyruvat- und Aspartat-Familie aus (s. 1.5.3). Der Zusammenhang des Tagesganges der Threonin-Gehalte mit der Kanalisation der akkumulierten Pyruvat- und PEP-Gehalte während der Dunkelperiode wird in der Diskussion näher erörtert werden.

Die Gehalte der Endprodukte des Pyruvat-Aspartat-Weges, Methionin, Valin, Leucin und Lysin waren außerdem während der Lichtperiode in *cue1-1* im Vergleich zu den Kontrollen vermindert (Tab. 3.12). Auch in diesem Fall waren die Pyruvat-Gehalte im Licht ebenfalls geringer als in den Kontrollen (s. 3.5.4). Im Vergleich der *cue1-6*-Mutanten zum Wildtyp sind beide Unterschiede nicht zu finden (Tab. 3.12 und 3.5.4). Das Aufeinandertreffen geringer Pyruvat-Gehalte und verminderter Gehalte an Aminosäuren des Pyruvat- und Aspartat-Weges ist in *cue1-1*-Mutanten und *cue1-6*/PPDK-Pflanzen sehr deutlich.

Die Beobachtung der Gehalte nicht-proteinogener Aminosäuren wie Citrullin und Ornithin in einigen Proben ließ erkennen, daß das Gleichgewicht zwischen den beiden Metaboliten

in Blättern von *cue1-6* im Vergleich zu Col-0- und *cue1-6*/PPT-Blättern sowohl im Licht als auch im Dunkeln um das Zehn- bis Zwanzigfache in Richtung Ornithin verschoben war (Tab. 3.13 und 3.14). Ornithin fungiert neben dem Methionin-Derivat S-Adenosylmethionin in Pflanzen als Vorstufe für die Polyaminbiosynthese. Daher wurden Polyamingehalte in *cue1*-Mutanten bestimmt und mit den Gehalten in den Kontrollen verglichen (s. 3.5.6).

3.5.6. Polyamingehalte in Blattproben

Polyaminen wird nicht nur eine Rolle bei der Adaption an Wasserstreß beigemessen, sondern seit kurzem auch eine Beteiligung an der Blühinduktion und der Internodienelongation in *A. thaliana* (Hanzawa et al., 2000; Applewhite et al., 2000). Die höchsten Polyamingehalte finden sich in *A. thaliana* daher in reproduktiven Geweben, doch auch im vegetativen Pflanzenkörper sind substantielle Gehalte an Polyaminen zu finden (Applewhite et al., 2000).

Die Gehalte an Polyaminen sind in *cue1-1*-Blättern z.T. dramatisch gegenüber der Kontrollpflanze pOCA verringert (s. Tab. 3.13), die Spermingehalte um 95%, die Gehalte an Putreszin um 75% und die Spermidin-Gehalte um die Hälfte. Es läßt sich nicht feststellen, ob die verminderten Polyamin-Gehalte einer der pleiotropen Effekte in *cue1-1* sind, oder ob sie ursächlich den retikulierten Blattphänotyp begünstigen. Weitere Untersuchungen der Polyamingehalte, insbesondere unter Wasserstreß, wären hier aufschlußreich.

	pOCA $\pm \sigma$	<i>cue1-1</i> $\pm \sigma$
Putreszin (nmol·g FG ⁻¹)	88,6 \pm 10,8	24,1** \pm 1,6
Spermidin (nmol·g FG ⁻¹)	230,5 \pm 27,0	147,1+++ \pm 6,2
Spermin (nmol·g FG ⁻¹)	29,3 \pm 9,2	2,0+++ \pm 2,0

Tab. 3.13 Gehalte an Polyaminen in Blättern der *Arabidopsis*-Linien zur Mitte der Lichtperiode. n=4. $\alpha < 0,1$; ++: $\alpha < 0,05$; +++: $\alpha < 0,025$; *: $\alpha < 0,01$; **: $\alpha < 0,005$; ***: $\alpha < 0,0005$; α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. n.b.: nicht meßbar.

3.5.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten des Primärstoffwechsels

Aktivitäten von Pyruvat- und PEP-umsetzenden Enzymen des Primärstoffwechsels wurden gemessen um den Einfluß der in *cue1* verminderten AtPPT1-Aktivität auch auf der Ebene von Enzymaktivitäten zu ermitteln. Der Primärstoffwechsel der untersuchten Pflanzen wird also unter drei verschiedenen Gesichtspunkten beleuchtet – die Ergebnisse der Kohlenstoffflußanalysen (s. 3.5.1) und der Metabolitgehalte im Fließgleichgewicht (s. 3.5.2, 3.5.4 und 3.5.5) sind schon in vorherigen Kapiteln dargelegt worden, die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmungen werden im folgenden dargestellt.

In Tab. 3.15 sind die maximal extrahierbaren Enzymaktivitäten aus Blättern der verschiedenen *cue1*-Mutanten den maximal extrahierbaren Aktivitäten aus Kontrollpflanzen gegenübergestellt.

Die signifikantesten und konsistentesten Veränderungen im Vergleich der *cue1*-Mutanten zu den Kontrollen waren die Erhöhung der PEP-Carboxylase- und der NADP-GAPDH-Aktivitäten in allen untersuchten *cue1*-Mutanten (Tab. 3.14). Die PEP-Carboxylase-Aktivitäten waren im Vergleich zu den Kontrollen verdoppelt bis verdreifacht, die Aktivitäten der NADP-GAPDH waren gegenüber den Kontrollen um das Eineinhalbfache erhöht. In den starken *cue1*-Mutanten war darüberhinaus die NADP-MDH-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen um etwa 35% erniedrigt (Tab. 3.14).

Linie	Col-0	<i>cue1-6</i>	pOCA	<i>cue1-1</i>	<i>cue1-3</i>
NADP-GAPDH	278,1 ± 35,9	432,2** ± 34,5	230 ± 28,8	352,3*** ± 30,3	315** ± 12,3
NADP-MDH	17,2 ± 13,4	11,6 ± 2,2	24,5 ± 11,2	18,1 ⁺ ± 4,6	81,6 ⁺ ± 15,5
NADP-Malatenzym	24,6 ± 11,7	11,6 ⁺ ± 2,1	7 ± 1,3	n.b.	n.b.
PPDK	6,4 ± 1,5	8,2 ⁺ ± 1,4	3,2 ± 1,2	n.b.	n.b.
PEP-Carboxylase	11,2 ± 2,0	29,3*** ± 3,6	9,1 ± 3,2	17,8*** ± 3,2	29,9*** ± 0,07
Pyruvatkinase, pH 6,9	71,2 ± 9,5	19,9*** ± 7,7	63,5 ± 4,5	70,1 ⁺ ± 4,6	n.b.
Pyruvatkinase, pH 8,1	26,5 ± 10,4	48,9 ⁺⁺⁺ ± 2,5	38,0 ± 6,1	37,8 ± 1,2	n.b.
PEP-Phosphatase	50,2 ± 17,9	54,3 ± 3,2	52,8 ± 8,9	49,3 ± 3,5	64,5*** ± 1,9

Tab. 3.14 Maximal extrahierbare Enzymaktivitäten aus *Arabidopsis*-Blättern in mU-mg Protein⁻¹. n=6. Die Aktivität der Pyruvatkinase wurde zur Abgrenzung der zytosolischen und plastidären Isoformen an den jeweiligen pH-Optima, pH=6,9 für die zytosolische und pH=8,1 für die plastidäre Isoform, gemessen. $\alpha < 0,1$; ⁺: $\alpha < 0,05$; ⁺⁺⁺: $\alpha < 0,025$; *: $\alpha < 0,01$; **: $\alpha < 0,005$; ***: $\alpha < 0,0005$; α gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine bestehende Differenz zu den Kontrollwerten bei einem einseitigen Welch-Test an. n.b.: nicht bestimmt.

Zusammengenommen legt die Veränderung der Aktivitäten der PEP-Carboxylase, der NADP-MDH und des NADP-Malatenzyms in *cue1*-Mutanten eine Verlagerung der Pyruvat-Malat-Balance zugunsten von Malat nahe, was noch im Rahmen der Diskussion detaillierter erörtert werden wird. Tatsächlich waren die Malat-Gehalte in den meisten Blattproben der *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (s. 3.5.4), aber vor allem waren die Pyruvat-Gehalte in *cue1*-Blättern im Vergleich zu den Kontrollen um bis zu 50% geringer (s. 3.5.4).

Die NADP-GAPDH-Aktivität ist ausschließlich in den Plastiden zu finden (s. auch 3.1.2). Die übereinstimmend in allen *cue1*-Mutanten gefundene Erhöhung der NADP-GAPDH-Aktivität könnte wie auch die verminderten Gehalte an TrioseP, 3-PGA und Fru-1,6-bP im Licht (s. 3.5.4) auf Limitationen im Calvin-Zyklus der Mutanten hinweisen.

Interessanterweise war die endogene PPDK-Aktivität in *cue1-6*-Mutanten im Vergleich zu Col-0 um 30% erhöht (Tab. 3.14). Mit dem Wissen, daß sich der *cue1*-Blattphänotyp und somit auch zumindest einige der Limitationen im Stoffwechsel der *cue1*-Mutanten durch die Überexpression einer C₄-PPDK im Stroma aufheben lassen und daß die endogene C₃-PPDK ebenfalls vornehmlich plastidär lokalisiert ist (s. 1.5.1), kann man vermuten, daß die endogene PPDK-Aktivität in *cue1-6*-Mutanten als Antwort auf den PEP-Bedarf im Stroma erhöht ist, aber trotzdem nicht hinreichend ist den Blattphänotyp zu kurieren. Meßwerte für PPDK-Aktivitäten in *cue1-1* könnten diese Vermutung untermauern, liegen aber nicht vor. Die Aktivitäten der anderen bestimmten Enzymaktivitäten ließen keine eindeutigen Tendenzen innerhalb der *cue1*-Allele erkennen.

Die o.g. Enzymaktivitäten wurden auch in Blättern von *cue1-6*/PPDK bestimmt. Diese wurden gegen die verschieden hohe PPDK-Aktivität in den Transformanden aufgetragen, um zu ermitteln, ob die neu eingebrachte PPDK die Aktivität anderer PEP-umsetzenden Enzyme des Primärstoffwechsels in irgendeiner Form beeinflußt.

In *cue1-6*/PPDK korrelierten die Aktivitäten der NADP-GAPDH, der NADP-MDH und des NADP-Malatenzyms negativ mit der Aktivität der eingebrachten PPDK (Abb. 3.15), wobei PPDK-Überexprimierer mit einer niedrigen PPDK-Aktivität beachtlicherweise nicht den *cue1-6*-Mutanten glichen und PPDK-Überexprimierer mit einer hohen PPDK-Aktivität nicht ähnliche NADP-ME- und NADP-MDH-Aktivitäten aufwiesen wie der Wildtyp, wie es zu erwarten gewesen wäre. Schon eine geringe Aktivität des PPDK-Transgens scheint den Transformanden prinzipielle Unterschiede gegenüber dem *cue1-6*-Hintergrund zu vermitteln, so daß vom kurierten Blattphänotyp in *cue1-6*/PPDK nicht auf ähnliche

Enzymaktivitätsmuster wie im Wildtyp geschlossen werden kann. Die übrigen in *cue1-6*/PPDK gemessenen Enzymaktivitäten zeigten keinerlei Korrelationen bei der Auftragung gegen die PPDK-Aktivität (nicht gezeigt).

Wurde die *Flaveria trinervia*-PPDK in Col-0 überexprimiert (s. 3.1.3), so korrelierten die Aktivitäten von PPDK- und NADP-Malatenzym ebenfalls negativ (Abb. 3.16). Der Einfluß der beiden Enzymaktivitäten aufeinander scheint folglich unabhängig vom der Intaktheit des AtPPT1-Genproduktes zu sein. Für Col-0/PPDK-Pflanzen liegen allerdings keine Daten über PEP- und Pyruvatgehalte vor.

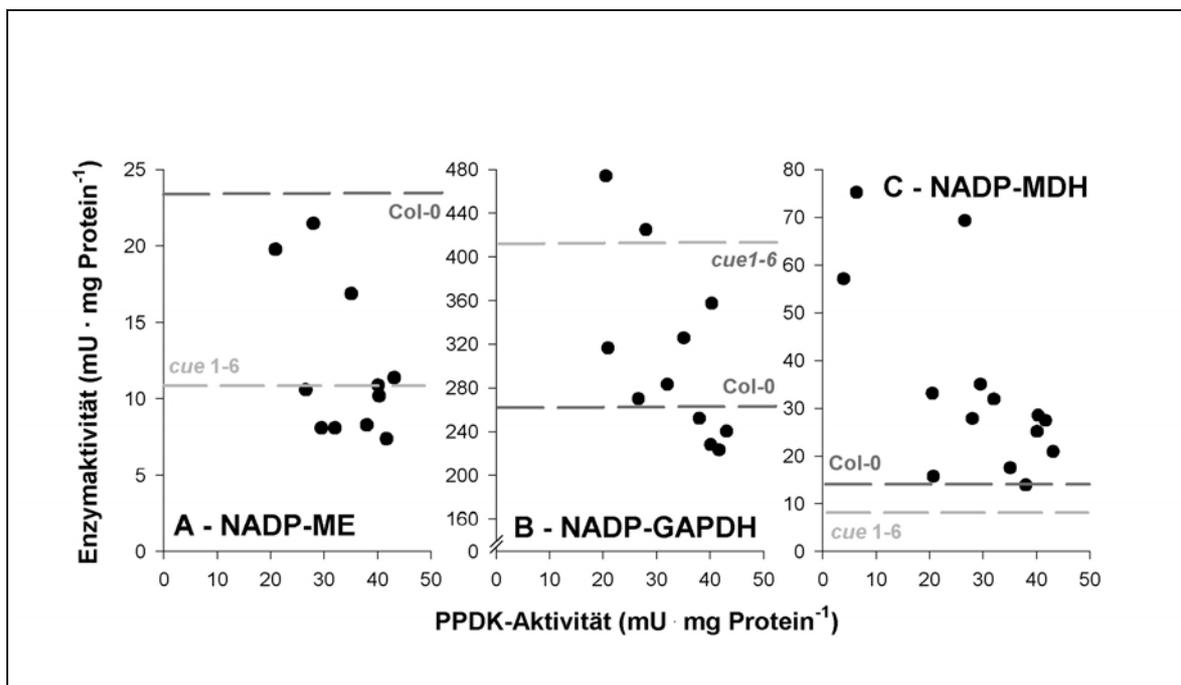


Abb. 3.15 Korrelationen verschiedener Enzymaktivitäten mit der eingebrachten PPDK-Aktivität in *cue1-6*/PPDK-Blättern. A: NADP-Malatenzym, B: NADP-GAPDH, C: NADP-MDH. Jeder Datenpunkt entspricht einer Einzelmessung. Die jeweiligen Aktivitäten für Col-0 und *cue1-6* sind als gestrichelte Abszissenparallelen dargestellt und entsprechend beschriftet.

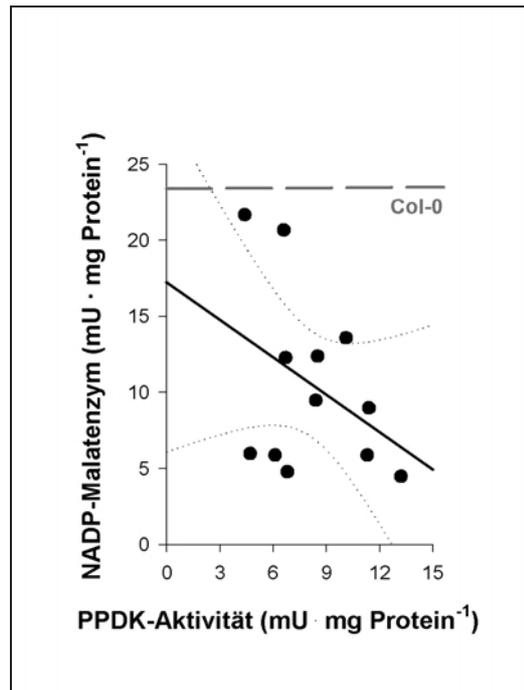


Abb. 3.16 Korrelation der Aktivität des NADP-Malatenzyms mit der eingebrachten PPDK-Aktivität in Col-0/PPDK-Blättern. Jeder Datenpunkt entspricht einer Einzelmessung. Die gepunkteten Linien stellen das Konfidenzintervall mit $\alpha < 0,05$ dar. Die Aktivität untransformierter Col-0-Pflanzen ist als gestrichelte Linie Abszissenparallele dargestellt.

3.6. Analyse ausgesuchter Sekundärmetabolite

Obwohl die Gesamtgehalte an aromatischen Aminosäuren in *cue1*-Mutanten gegenüber Kontrollpflanzen nicht vermindert waren (s. 3.5.5), waren doch substantielle Verminderungen der Phenylalanin-Gehalte in *cue1*-Mutanten festzustellen, die in *cue1-6*/PPDK- und *cue1-6*/PPT-Komplementanden revertiert waren (s. 3.5.5). Da Phenylalanin der gemeinsame Ausgangspunkt für die Biosynthese von Phenylpropanen und davon abgeleiteten Substanzen ist, wurden die Gehalte einzelner ausgewählter Klassen von Phenylpropanen in *cue1*-Mutanten im Vergleich zu Komplementanden und Kontrollpflanzen untersucht.

3.6.1. Bestimmung von Profilen der UV-Schutzsubstanzen

Gehalte an UV-Schutzsubstanzen sind vergleichsweise leicht über die Absorptionseigenschaften im UV-Bereich nachzuweisen. Daher wurden methanolische Extrakte der verschiedenen Linien über HPLC aufgetrennt und UV-absorbierende Substanzen durch die Absorption bei $\lambda = 315$ nm detektiert. Hierbei wurden vor allem hydroxylierte Phenylpropane wie Kaempferol und Quercetin erfaßt; die ebenfalls als UV-

Schutzsubstanzen fungierenden Zimtsäurederivate, mengenmäßig bedeutend sind hier Sinapoyl-Derivate, haben ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 280$ nm, waren aber auch bei $\lambda = 315$ nm nachweisbar.

Beim Vergleich der HPLC-Chromatogramme (Abb. 3.17) fiel auf, daß es in den Kontrollen fünf Hauptkomponenten gab, die in den *cue1*-Mutanten alle unterrepräsentiert waren. Wurden zehnfach konzentriertere Extrakte aufgetrennt, so fanden sich sowohl im Wildtyp als auch in den *cue1-6*-Mutanten und den *cue1-6*/PPDK-Pflanzen mehr als 20 verschiedene UV-absorbierende Komponenten (nicht gezeigt), von denen sich einige auch unter diesen Bedingungen am Rande der Nachweisgrenze befanden. In *cue1-6*/PPDK fanden sich im Vergleich zum Wildtyp zwei weitere dominante Komponenten.

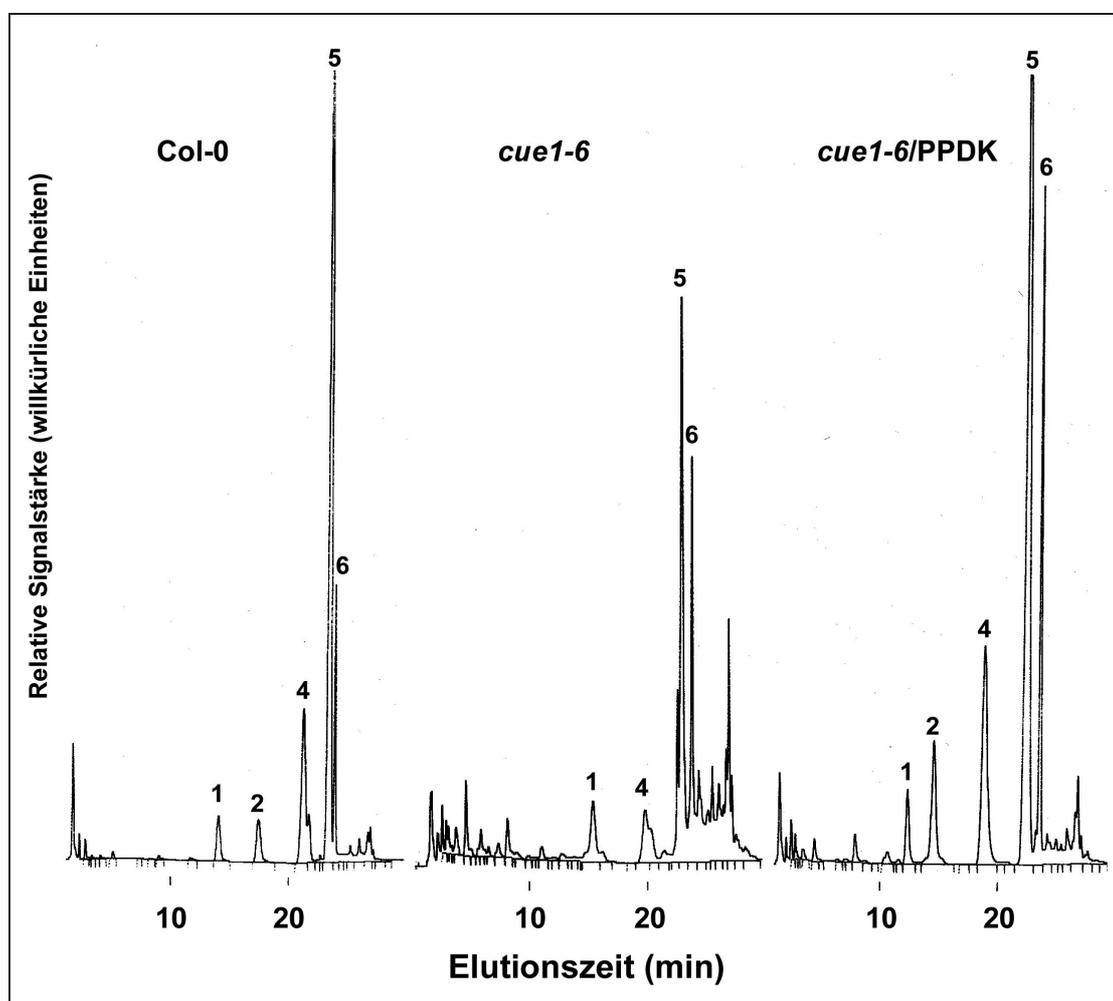


Abb. 3.17 Repräsentative HPLC-Elutionsprofile methanolischer Extrakte von Col-0-, *cue1-6*- und *cue1-6*/PPDK-Blättern. Die Detektion der Substanzen erfolgte bei $\lambda = 315$ nm. Die Hauptkomponenten sind durch Ziffern über den Signalspitzen kenntlich gemacht, anhand derer sie in den nachfolgend präsentierten Tabellen 3.16 bis 3.19 und in der Abb. 3.23 zugeordnet werden können.

Darüberhinaus waren die Gehalte an UV-Schutzsubstanzen in *cue1-6*/PPDK entscheidend gegenüber *cue1-6* erhöht (Abb. 3.17). Die in Abb. 3.17 dargestellten Elutionsprofile stellen allerdings nur Muster dar, bei denen nicht gleiche Frischgewichtsmengen aufgetrennt worden sind, so daß anhand dieser Abbildung keine absoluten Aussagen getroffen werden können; Abb. 3.17 dient lediglich der Veranschaulichung der Elutionsprofile UV-absorbierender phenolischer Inhaltsstoffe. Die Quantifizierung der einzelnen Gehalte wird ausführlich in 3.6.3 dargestellt.

Die Gesamtgehalte an UV-Schutzsubstanzen in *cue1-6*/PPDK wurden nach einer anderen Methode photometrisch bestimmt und konnten positiv mit der PPDK-Aktivität korreliert werden (s. Abb. 3.18). Offenbar hängt die Menge an produzierten UV-Schutzsubstanzen direkt von der Menge des im Plastiden bereitgestellten PEP (s. 3.5.4) ab. Die Gehalte einzelner UV-Schutzsubstanzen werden unter 3.6.3 gemeinsam mit den bestimmten Kohlenstoffflußraten in die UV-Schutzsubstanzen quantitativ dargestellt und erläutert.

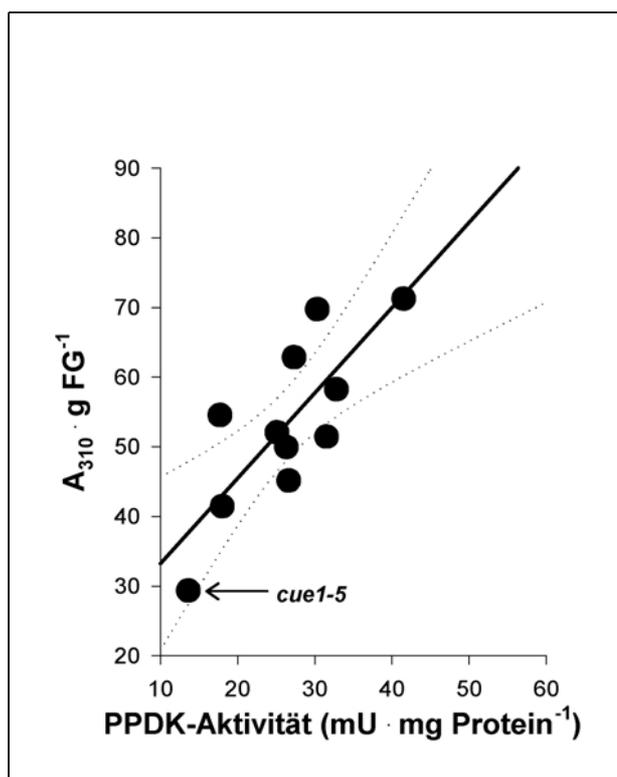


Abb. 3.18 Korrelation zwischen der Extinktion methanolischer Extrakte von *cue1-6*/PPDK bei $\lambda = 315$ nm und der in den Pflanzen gefundenen PPDK-Aktivität. Jeder Datenpunkt entspricht einer Einzelmessung von A_{310} . Als Referenz ist *cue1-5* angegeben ($n=2$, s. Pfeil). Die PPDK-Aktivitäten der *cue1-6*/PPDK-Linien entstammen den bereits unter 3.5.7 dargelegten Siebenfachmessungen. Die gepunkteten Linien stellen das Konfidenzintervall mit $\alpha < 0,05$ dar.

Substanz	λ_{\max} (Bande I) (nm)	λ_{\max} (Bande II) (nm)	λ_{\min} (nm)	Identifizierung
1	343	233, 267sh	250, 282	
3	348	265	288	Kaempferol-3-O-gluc-7-O-rha ^a
4	331	235	265	Hydroxyliertes Flavon
5	332	234	267	Hydroxyliertes Flavon
6	315sh, 342	264	238, 286	Kaempferol-Derivat

Tab. 3.15 Identifizierung einiger der mengenmäßig bedeutenden UV-Schutzsubstanzen. Die Substanznummern beziehen sich auf die in Abb. 3.17 dargestellte Numerierung. sh: Schulter.

^a: Identifizierung über Co-Chromatographie.

3.6.2. Charakterisierung der UV-Schutzsubstanzen

Eine Identifizierung der UV-Schutzsubstanzen, deren relative Gehalte sich in den *cue1*-Mutanten und den Kontrollpflanzen unterscheiden (Abb. 3.17, Tab. 3.17) wurde angestrebt, um die Zusammenhänge bei ihrer Biosynthese zu erfassen und analysieren zu können. Daher wurden Phenylpropanderivate entweder über die Co-Chromatographie mit isolierten und chemisch identifizierten UV-Schutzsubstanzen aus Roggen (*Secale cereale*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) charakterisiert oder es wurde während der Chromatographie ein Absorptionsspektrum zwischen $\lambda = 230$ nm und $\lambda = 370$ nm aufgenommen, um Aussagen über die Natur des Aglykons treffen zu können. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in Tab. 3.15 aufgeführt.

Substanz Nr. 3 konnte über Co-Chromatographie eindeutig als Kaempferol-3-O-glucosid-7-O-rhamnosid identifiziert werden. Die Phenylpropaneinheiten von Substanz Nr. 4 und Nr. 5 sind mit großer Sicherheit hydroxylierte Flavone – die bisherigen Kenntnisse über in *A. thaliana* vorkommende Flavonoide legen hier Dihydrokaempferol- und Dihydroquercetin-Bausteine nahe (Mittal, 1996). Bei Substanz Nr. 6 handelt es sich um ein Kaempferol-Derivat, vermutlich Kaempferol-3-O-rhamnogalaktosid-7-O-rhamnosid. Über Massenspektrometrie werden momentan weitere Anstrengungen unternommen, Strukturinformationen über alle detektierten Phenylpropanderivate zu erhalten.

3.6.3. Kohlenstoffflüsse in Sekundärmetabolite mit UV-Schutzwirkung und deren Gehalte

Nicht nur die Gehalte an UV-Schutzsubstanzen, sondern auch die Syntheseraten dieser Substanzen *in planta* geben Aufschluß über die Eigenschaften dieses Teilbereiches des

Phenylpropanstoffwechsels. Daher wurden intakte Pflanzen 7 h lang unter Hoch-CO₂ mit ¹⁴CO₂ markiert, die autotrophen Pflanzenteile extrahiert und eingengt und dann die Markierungsmuster der fraktionierten HPLC-Eluate (Abb. 3.20) mit den Chromatographieprofilen zur Deckung gebracht, so daß sowohl die Gehalte als auch die Flußraten der detektierten Substanzen ermittelt werden konnten. Aliquots gleicher Frischgewichtsmenge der ¹⁴C-markierten Extrakte wurden parallel zu der Auftrennung über HPLC auch über eindimensionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, um über die Auto- und die durch Naturstoffreagenz A-induzierte Sekundärfluoreszenz der separierten Substanzen weitere Informationen zu gewinnen.

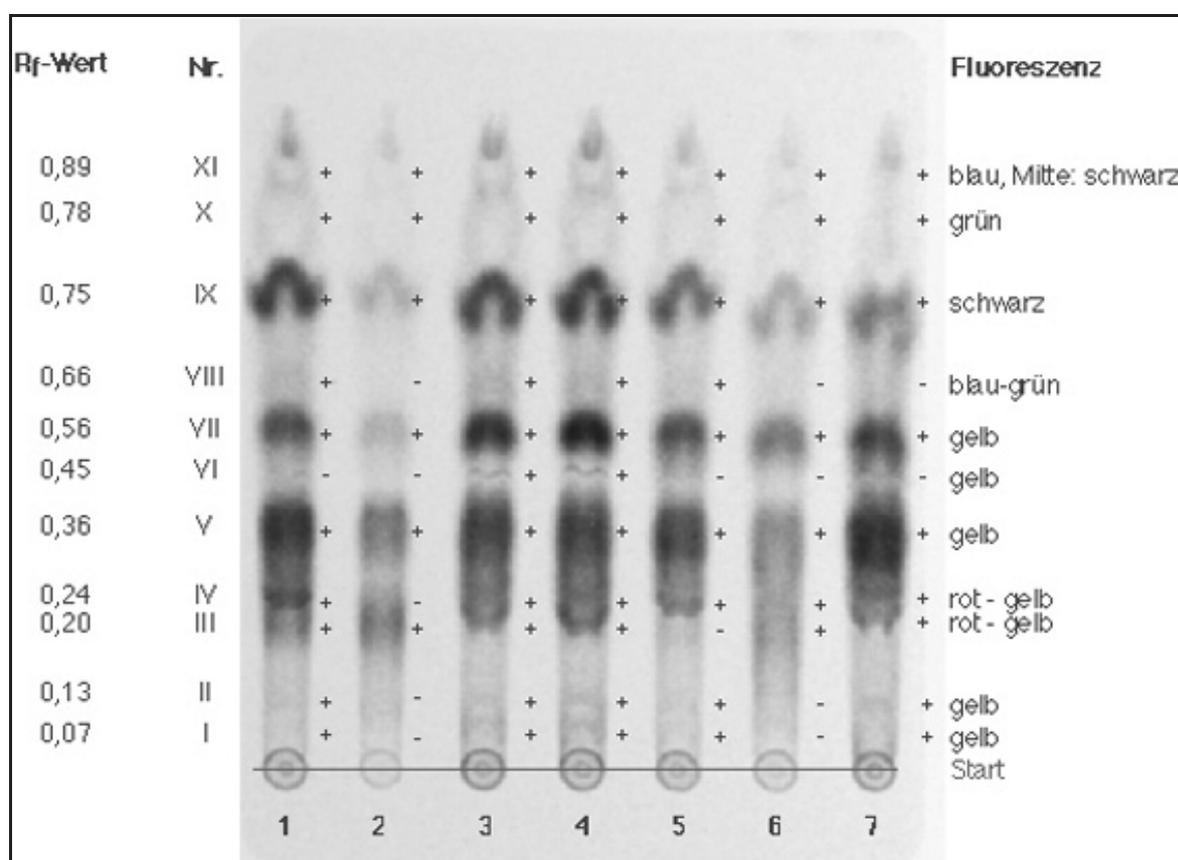


Abb. 3.19 Autoradiogramm der dünnschichtchromatographischen Auftrennung markierter UV-Schutzsubstanzen. Die R_f-Werte sind auf der linken Seite neben den Signalen angegeben, die mit Naturstoffreagenz A-induzierte Sekundärfluoreszenz auf der rechten Seite in Höhe der Signale. Die Signalflecken sind um Verwechslungen mit den arabisch durchnummerierten HPLC-Signalen zu vermeiden mit römischen Ziffern bezeichnet. Rechts neben den Spuren ist die Präsenz der Substanz in den jeweiligen Extrakten vermerkt. +: anwesend; -: abwesend. Es wurden Extrakte gleicher Frischgewichtsmenge aufgetragen. 1: Col-0, 2: *cuel-6*, 3: *cuel-6/PPDK2-1*, 4: *cuel-6/PPDK2-9*, 5: *pOCA*, 6: *cuel-1*, 7: *cuel-3*.

Ein Autoradiogramm der chromatographierten Extrakte ist in Abb. 3.19 dargestellt. Es konnten bis zu zwölf verschiedene markierte Substanzen in *cue1-6*/PPDK-Extrakten differenziert werden. In Extrakten der Kontrollpflanzen Col-0 und pOCA sind elf verschiedene markierte Substanzen zu erkennen, im Extrakt der *cue1-3*-Mutante zehn und in den Extrakten der starken *cue1*-Mutanten *cue1-1* und *cue1-6* nur acht bzw. sieben Substanzen.

Gelbliche Sekundärfluoreszenzen weisen auf Kaempferol-Derivate hin, eine orange bis gelb-grünliche Autofluoreszenz zeigt Quercetin-Derivate an. Allerdings konnten diese Farbnuancen optisch auf den DC-Platten nicht so klar unterschieden werden wie bei der zweidimensionalen Auftrennung (s. 3.6.4; Abb. 3.24), so daß diese beiden Gruppen an dieser Stelle lediglich als Flavonol-Derivate angesprochen werden können. Zu den gelblich fluoreszierenden Flavonol-Derivaten zählten die Substanzen I, II, V, VI und VII. Rötlich-gelbe Sekundärfluoreszenz ging von Anthocyanen und Anthocyanidinen, den Aglyka der Anthocyane, aus; dies waren die Substanzen Nr. III und IV. Blaue und blau-grünliche Autofluoreszenz wird von Zimtsäurederivaten emittiert, zu denen folglich Substanz Nr. VIII, X und XIa gehörten. Unter UV-Anregung fluoreszieren einfache Phenole gar nicht, so daß die Flecken schwarz erscheinen; zu dieser Stoffklasse gehörten Substanz Nr. IX und XIb.

Zwei verschiedene Flavonol-Derivate (I, II) und ein Zimtsäurederivat (VIII) fehlten in den starken *cue1*-Mutanten, bzw. waren diese nicht ausreichend markiert. Außerdem war die Gesamtmarkierung in den Spuren von *cue1-1* und *cue1-6* schwächer als in den übrigen Pflanzenlinien. Bei der Auftrennung über HPLC konnten diese Unterschiede besser quantifiziert werden (s.u.). Bei der ausschließlich in *cue1-6*/PPDK zu findenden Substanz VI handelte es sich nach der Sekundärfluoreszenz zu schließen um ein Flavonol-Derivat.

Bei der Auftrennung der markierten Extrakte über HPLC konnten eine Fülle von Daten gewonnen werden. In Abb. 3.20 sind die ¹⁴C-Elutionsprofile der HPLC der Extrakte dargestellt, die gemeinsam mit den Absorptionsdaten jener Auftrennungen zur Berechnung der in Tab. 3.16 und Tab. 3.17 angegebenen Einbaumengen und Gehalte dienten. In Tab. 3.16 sind der Gesamteinbau in UV-Schutzsubstanzen und der Gesamtgehalt an UV-Schutzsubstanzen in den untersuchten Linien allgemein angegeben. Diese beiden Größen sind in Tab. 3.17 auf die verschiedenen Metabolite aufgeschlüsselt dargestellt.

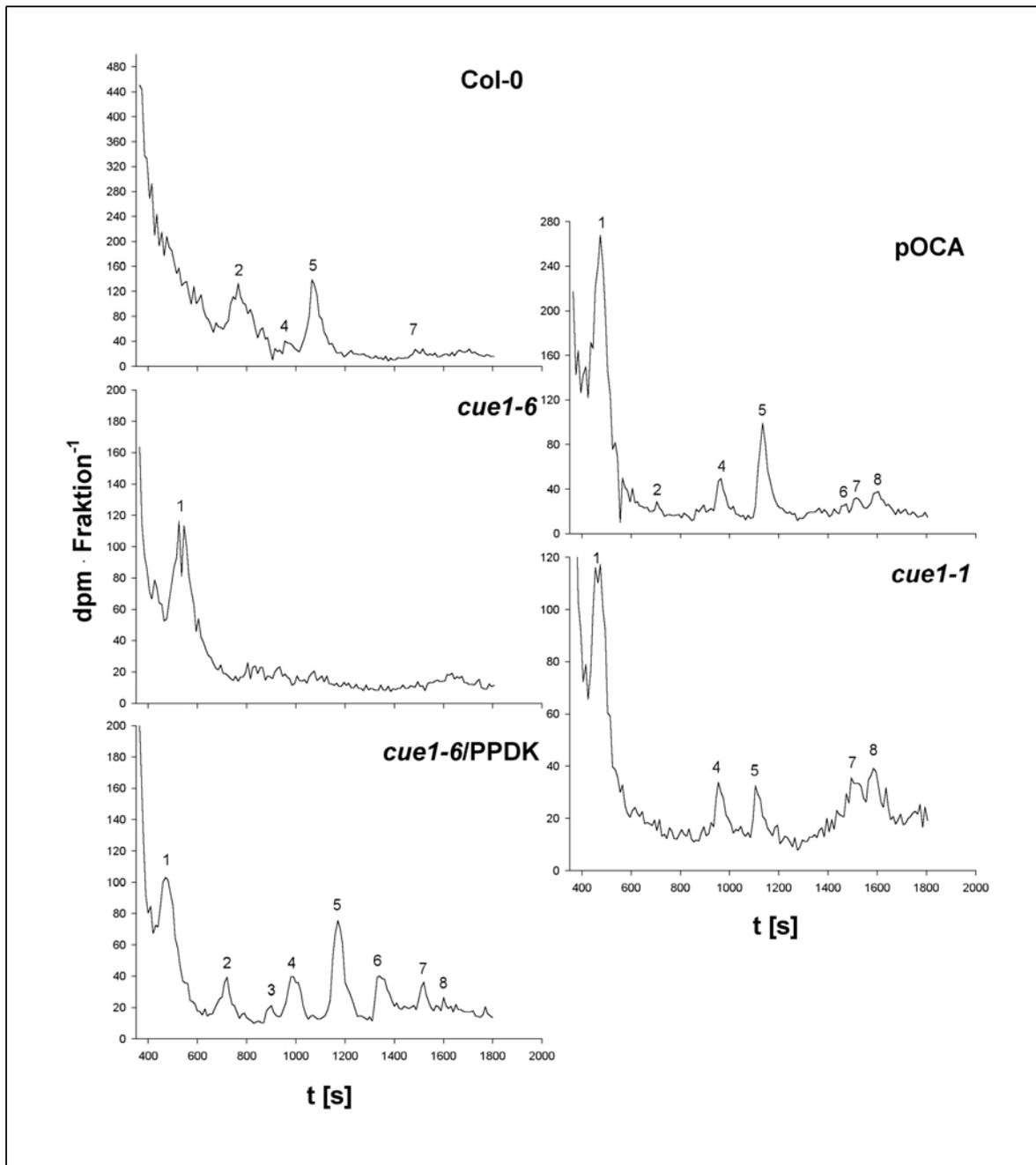


Abb. 3.20 ^{14}C -Elutionsprofile der über HPLC aufgetrennten methanolischen Blattextrakte nach einer 7 h-Markierung mit $250 \mu\text{Ci } ^{14}\text{CO}_2$. Die Numerierung entspricht den Numerierungen in den Tab. 3.16, 3.17 und 3.18, sowie der Numerierung in Abb. 3.17. Der Ordinatenmaßstab ist unterschiedlich.

Linie	Flavonoidgehalt [A ₃₁₅ · g FG ⁻¹]	% der Kontrollen	Einbau [10 ⁶ dpm · g FG ⁻¹]	% der Kontrollen
Col-0	932,9	100	2,67	100
<i>cue1-6</i>	472,1	51	0,69	26
<i>cue1-6</i> /PPDK2-1	601,2	64	2,17	81
<i>cue1-6</i> /PPDK2-9	709,9	76	2,36	88
pOCA	549,0	100	2,74	100
<i>cue1-1</i>	300,3	55	1,55	56
<i>cue1-3</i>	205,6	37	2,72	99

Tab. 3.16 Gesamteinbauarten in UV-Schutzsubstanzen. Die Quantifizierungsergebnisse des Detektors sind als A₃₁₅-Einheiten angegeben. Eine A₃₁₅-Einheit entspricht 1000 berechneten Flächeneinheiten unter einem Signalausschlag. Die Werte stellen die Ergebnisse von Einzelmessungen dar.

Der Gesamtgehalt an UV-Schutzsubstanzen war in den *cue1*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen durchweg um etwa 50% verringert (Tab. 3.16) und betrug in *cue1-6*/PPDK-Blättern 70% der Kontrollgehalte. Dies entspricht in etwa der prozentualen Erhöhung der Phenylalanin-Gehalte durch die Expression der PPDK in *cue1-6*-Pflanzen (s. 3.5.5) und stützt die Hypothese, daß die Phenylalaningehalte in *cue1*-Mutanten limitierend für die Phenylpropan synthese sind. Die Kohlenstoffflußraten in UV-Schutzsubstanzen waren in den starken *cue1*-Mutanten um 30% in *cue1-6* bzw. um 50% in *cue1-1* gegenüber den Kontrollen und den *cue1-3*-Mutanten vermindert (Tab. 3.16). Der Fluß von ¹⁴C in UV-Schutzsubstanzen in *cue1-6*/PPDK betrug mit annähernd 90% fast die Rate des Wildtyps (Tab. 3.17). Der Einbau und die Gehalte an UV-Schutzsubstanzen waren in den *cue1-1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen um den gleichen Betrag vermindert, in *cue1-6* unterschritt der Kohlenstofffluß die Gehalte an UV-Schutzsubstanzen um die Hälfte. Demgegenüber überstieg der Kohlenstofffluß die Gehalte an UV-Schutzsubstanzen in *cue1-6*/PPDK jedoch relativ zum Wildtyp gesehen um 15% (Tab. 3.16). Aus Tab. 3.17 kann besonders gut ersehen werden, daß der Fluß in die meisten der UV-Schutzsubstanzen des Phenylpropanweges in *cue1-6*/PPDK-Rosetten deutlich erhöht ist, dies wird aber noch dargestellt werden (s.u.).

Substanz	R _t (min)	Gehalte (A ₃₁₅ -g FG ⁻¹) ^a		Prozentualer Anteil (%)		Spezifische Aktivität (dpm · A ₃₁₅ ⁻¹)	
		Col-0	<i>cueI-6</i> /PPDK	Col-0	<i>cueI-6</i> /PPDK	Col-0	<i>cueI-6</i> /PPDK
1	6,3	9,0	9,6 ± 0,4	1,0	2,3 ± 0,1	n.n.	4,42
2	10,3	42,4	22,4 ± 2,5	3,2	5,4 ± 0,04	n.n.	0,54 ± 0,003
3	13,2	31,9	10,2 ± 1,1	4,5	2,4 ± 0,01	2,37	0,59 ± 0,12
4	14,6	74,2	56,4 ± 8,7	7,9	13,5 ± 0,7	0,15	0,23 ± 0,02
5	17,5	566,8	203 ± 19,3	60,8	48,8 ± 0,5	0,08	0,12 ± 0,04
6	21,6	8,3	40,9 ± 5,4	0,9	9,8 ± 0,3	n.n.	0,32 ± 0,06
7	23,6	16,8	10,3 ± 2	1,8	2,5 ± 0,2	0,46	0,81 ± 0,11
8	25,2	20,4	12,2 ± 1,5	2,2	2,9 ± 0,06	n.n.	0,3 ± 0,01
9	26	10,5	12,5 ± 2,6	1,1	3 ± 0,3	n.n.	n.n.

Substanz	R _t (min)	Gehalte (A ₃₁₅ -g FG ⁻¹) ^a		Prozentualer Anteil (%)		Spezifische Aktivität (dpm · A ₃₁₅ ⁻¹)	
		pOCA	<i>cueI-1</i>	pOCA	<i>cueI-1</i>	pOCA	<i>cueI-1</i>
1	6,3	18,8	15,0	3,4	5,0	52,2	26,5
2	10,3	7,6	n.b.	1,4	n.b.	7,3	n.n.
3	13,2	8,6	n.b.	1,6	n.b.	6,0	n.n.
4	14,6	76,7	37,8	14,0	12,6	1,7	2,2
5	17,5	346	142,6	63,0	47,5	0,7	0,5
6	21,6	0,5	11,5	0,1	3,8	88,4	9,0
7	23,6	4,0	3,3	0,7	1,1	19,9	24,7
8	25,2	3,4	9,7	0,6	3,2	34,1	3,6

Tab. 3.17 Übersicht über die Gehalte und den Einbau in verschiedene UV-Schutzsubstanzen in *cueI-1* und *cueI-6*/PPDK im Vergleich zu den Kontrollen. Die Daten entstammen einem repräsentativen Experiment. n.n.: nicht nachweisbar. Die Quantifizierungsergebnisse des Detektors sind als A₃₁₅-Einheiten angegeben; eine A₃₁₅-Einheit entspricht 1000 berechneten Flächeneinheiten unter einem Signalausschlag. n=2 für die *cueI-6*/PPDK-Pflanzen.

In den *cueI-1*-Mutanten waren die Gehalte der meisten UV-Schutzsubstanzen geringer als in den Kontrollen, mit Ausnahme zweier Substanzen (Tab. 3.17). Der Gehalt eines Kaempferol-Derivats war in *cueI-1* zwanzigmal höher als in pOCA. Diese Veränderung war bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Extrakte nicht zu erkennen, vermutlich weil dieser Metabolit durch einen anderen überlagert war. Der Kohlenstofffluß in dieses Kaempferol-Derivat war in den *cueI-1*-Mutanten aber um 90% geringer als in den Kontrollen. Das gleiche gilt auch für die bislang unidentifizierte Substanz Nr.8, deren Gehalt in *cueI-1* gegenüber den Kontrollen um das Dreifache erhöht war, dessen Syntheserate während des ¹⁴CO₂-Pulses aber im Vergleich zu den Kontrollen nur 10%

betrug (Tab. 3.17). Zwei Substanzen, darunter Kaempferol-3-O-glukosid-7-O-rhamnosid, fehlen in *cue1-1*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen.

Auch in *cue1-6*/PPDK-Komplementanden waren die Gehalte von sechs der acht untersuchten UV-Schutzsubstanzen gegenüber dem Wildtyp Col-0 um 50% bis 75% verringert. Im Gegensatz dazu war der Gehalt des anderen identifizierten Kaempferol-Derivats, bei dem es sich vermutlich um Kaempferol-3-O-rhamnogalaktosid-7-O-rhamnosid handelt, in *cue1-6*/PPDK im Vergleich zum Wildtyp um das Vierfache erhöht (Tab. 3.17). Betrachtet man jedoch den Kohlenstofffluß in diese acht Substanzen während des Markierungsexperimentes, so existierten in *cue1-6*/PPDK-Pflanzen Flüsse in vier Sekundärmetabolite, die im Wildtyp nicht markiert wurden (Tab. 3.17), darunter war auch das – nimmt man die Daten aus dem Vergleich zwischen *cue1-1* und pOCA zur Hand (s.o.) – fakultative und vorläufig als Kaempferol-3-O-rhamnogalaktosid-7-O-rhamnosid identifizierte Produkt. Aber auch die Kohlenstoffflüsse in die restlichen drei UV-Schutzsubstanzen, die sowohl im Wildtyp als auch in *cue1-6*/PPDK markiert waren, sind in *cue1-6*/PPDK bis auf den Fluß in Kaempferol-3-O-glukosid-7-O-rhamnosid um das eineinhalb- bis zweifache gegenüber der Wildtyp-Kontrolle erhöht.

Die prozentuale Verteilung der Gehalte an UV-Schutzsubstanzen zeigte, daß zwischen *cue1-6*/PPDK und dem Wildtyp nur geringe, aber bedeutsame Veränderungen im Muster der UV-Schutzsubstanzen bestanden (Tab. 3.17). Die Dominanz der Hauptkomponente, einem hydroxylierte Flakon, war in Col-0 mit 60% des Gesamtanteils viel deutlicher ausgeprägt als in *cue1-6*/PPDK mit rund 50% des Gesamtanteils. In *cue1-6*/PPDK wurden dafür mehrere verschiedene Metabolite in substantieller Menge produziert (Tab. 3.17). Am deutlichsten war der Anstieg der Gehalte eines im Wildtyp eher gering vertretenen Sekundärmetabolite am Beispiel des vorläufig als Kaempferol-3-O-rhamnogalaktosid-7-O-rhamnosid identifizierten Kaempferol-Derivats, das 1% des Gesamtanteils an UV-Schutzstoffen im Wildtyp ausmacht, aber 10% der Gesamtsubstanz an UV-Schutzsubstanzen in *cue1-6*/PPDK (Tab. 3.17).

Eine Verteilung der Gesamtmenge an UV-Schutzsubstanzen auf mehrere Komponenten als in den Kontrollen war auch in *cue1-1* zu beobachten. In *cue1-1* waren daran aber weniger und andere Metabolite beteiligt als in *cue1-6*/PPDK.

3.6.4. Histologische Lokalisierung von UV-Schutzsubstanzen

Die UV-Fluoreszenz der unter 3.6.1 bis 3.6.3 beschriebenen UV-Schutzsubstanzen kann sowohl nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung als auch im intakten

Gewebe mit Naturstoffreagenz A oder mit Ammoniak differentiell verändert werden. Durch Ammoniak wird die grün bis bläuliche Autofluoreszenz von Zimtsäurederivaten verstärkt, mit Naturstoffreagenz A kann eine spezifische, gelbe bis grünliche Sekundärfluoreszenz von Flavonoiden induziert werden (Schnitzler et al., 1996). Durch die Alkalisierung mit Ammonium kann allerdings auch eine grüne, in unbehandelten Schnitten fehlende Fluoreszenz von Kaempferol-Glykosiden erzeugt werden (Schnabl et al., 1986), die die Interpretation der Ammonium-induzierten Fluoreszenzen erschwert. Anhand des Vergleichs von Autofluoreszenzen und Sekundärfluoreszenzen in handgefertigten Gewebeschnitte können trotzdem prinzipielle Aussagen über die histologische Lokalisierung einzelner Substanzklassen und Substanzen getroffen werden.

3.6.4.1. Histologische Untersuchungen an Blattschnitten

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden transversale und oberflächenparallele Blattschnitte wie auch Infloreszenzquerschnitte angefertigt. Die im folgenden dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen stellen eine exemplarische Auswahl der Ergebnisse dar.

In den Zellen des Palisadenparenchyms war in Querschnitten von pOCA-Blättern eine blau-grünliche Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 3.21 A), die unter Ammonium-Einfluß gleißend grün wurde (Abb. 3.21 C). Diese war aufgrund der zu beobachtenden Autofluoreszenz zu großen Teilen auf ein Zimtsäurederivat zurückzuführen. In *cue1-1*-Blattquerschnitten kam die Autofluoreszenz durch die geringere Chlorophyllmenge im Palisadenparenchym besser zum Vorschein als in der Kontrolle (Abb. 3.21 D), doch nach der Ammonium-Behandlung war die Sekundärfluoreszenz in *cue1-1*-Palisadenparenchymzellen deutlich schwächer ausgeprägt als in den Kontrollen (Abb. 3.21 F). Dafür schien jenes Zimtsäurederivat im Schwammparenchym von *cue1-1* stärker vertreten zu sein als im Schwammparenchym der Kontrollen (Abb. 3.21 F und Abb. 3.21 C). Die Untersuchung plasmolysierter Gewebe bestätigte darüberhinaus, daß die zuvor angesprochenen Fluoreszenzen der Vakuole entstammten (nicht gezeigt).

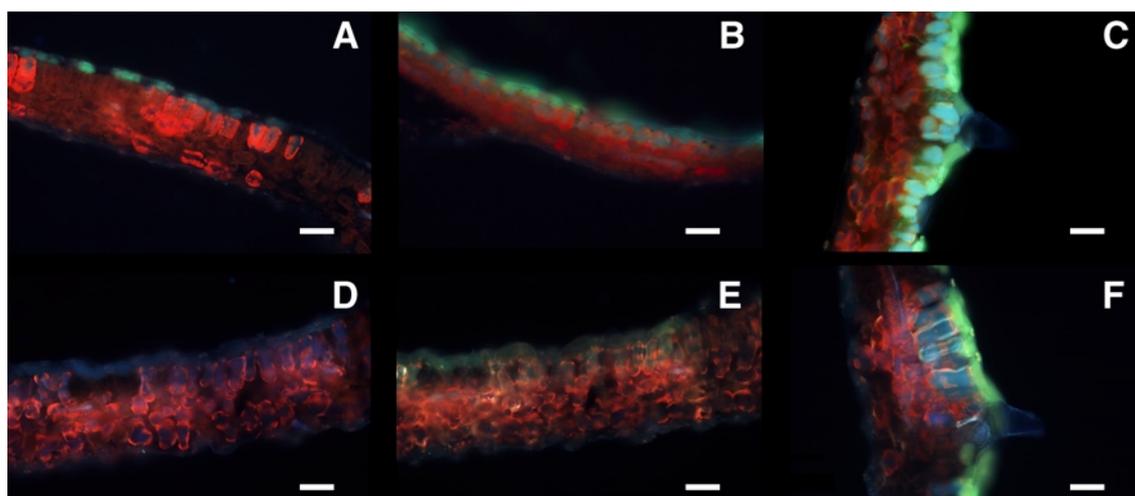


Abb. 3.21 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von pOCA- (A bis C) und *cueI-1*-Pflanzen (D bis F) Blattquerschnitten bei einer Anregungswellenlänge von $330 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda > 420 \text{ nm}$. A, D: Autofluoreszenz; B, E: Sekundärfluoreszenz nach Naturstoffreagenz A-Behandlung; C, F: Sekundärfluoreszenz nach Ammonium-Einwirkung. Der Maßstab entspricht $25 \mu\text{m}$ in allen Bildern.

In Abb. 3.21 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Blattquerschnitten von pOCA (oben, A bis C) und *cueI-1*-Blättern (unten, D bis F) einander gegenübergestellt. Anhand der Autofluoreszenzen bei UV-A-Anregung wird erkennbar, daß die Chlorophyllfluoreszenz in den Plastiden des Palisaden- und Schwammparenchyms in *cueI-1* (Abb. 3.21D) viel geringer war als in der Kontrolle (Abb. 3.21 A). Dies veranschaulicht die Unterschiede zwischen den unter 3.4.1 gezeigten Chlorophyllgehalten von *cueI-1* und pOCA. Außerdem ist beim Vergleich von Abb. 3.21 A mit 3.21 D klar erkennbar, daß das *cueI-1*-Blatt dicker war und mehr Interzellularen aufwies als das der pOCA-Kontrolle. Auch dieser Befund ist an anderer Stelle in dieser Arbeit schon aufgezeigt worden (s. 3.3).

In der oberen Epidermis befanden sich sowohl durch Naturstoffreagenz A zur Sekundärfluoreszenz anregbare Flavonoide, als auch Zimtsäurederivate, deren Primärfluoreszenz über Ammonium stimuliert werden konnte (vgl. Abb. 3.21 A mit 3.21 B und C, z.B.). Der Flavonoidbestandteil war in der Epidermis der Kontrolle stärker vorhanden als in der oberen *cueI-1*-Epidermis (vgl. Abb. 3.21 B mit E), während sich die Gehalte des Zimtsäurederivats zwischen *cueI-1* und pOCA höchstens unwesentlich unterschieden (vgl. Abb. 3.21 C mit F). Um eine zuverlässigere Quantifizierung der fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesenen Substanzen für den Vergleich der *cueI-1*-

Mutanten mit den Kontrollen zu erzielen, wurden auch an einem entsprechend ausgestatteten Mikroskop konfokale Bilder aufgenommen, deren Aussagekraft jedoch nicht die der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen überstieg (nicht gezeigt).

In tangentialen Blattlängsschnitten der oberen Epidermen konnte noch besser erkannt werden, daß die Gehalte des grün fluoreszierenden Zimtsäurederivats sich nicht merklich zwischen *cue1-1* und pOCA unterschieden (Abb.3.22 A und C). Vergleich man jedoch die Ammonium-induzierbare Sekundärfluoreszenz der unteren Epidermen von *cue1-1* und pOCA, so zeigte sich eine strahlend blaue Fluoreszenz in der unteren Epidermis von pOCA (Abb. 3.22 B), die nach einigen Minuten Einwirkung des Anregungslichtes in einen dunklen Blauton überging (nicht gezeigt), während in der unteren Epidermis von *cue1-1* praktisch keine Sekundärfluoreszenz zu erkennen war (Abb. 3.22 E). Das für die strahlend blaue Sekundärfluoreszenz verantwortliche Zimtsäurederivat fehlte in *cue1-1* offenbar völlig. Der gleiche Schnitt des *cue1-1*-Blattes ist in Abb. 3.22 D zum Vergleich bei gleicher Vergrößerung im Durchlicht dargestellt.

Beim Vergleich von Abb. 3.23 A und D ist klar zu erkennen, daß das Palisadenparenchym von *cue1-1*-Blättern eine einheitlich dominante sekundäre Gelbfluoreszenz aussand (Abb. 3.23 D), die im Palisadenparenchym der Kontrollpflanzen nur in Ansätzen zu erkennen war (Abb. 3.23 A). Naturstoffreagenz A-induzierte Gelbfluoreszenz wird durch Kaempferol-Derivate hervorgerufen (Hutzler et al., 1998). Interessanterweise wurde bei der Analyse der Sekundärstoffgehalte ein Kaempferol-Derivat gefunden, dessen Gehalt in *cue1-1* gegenüber der Kontrolle pOCA um das zwanzigfache angereichert war (s. 3.6.3). Unter gemeinsamer Betrachtung dieser beiden Resultate kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, daß dieses Kaempferol-Derivat, vermutlich Kaempferol-3-O-rhamnogalaktosid-7-O-rhamnosid (s. 3.6.2), im Palisadenparenchym lokalisiert ist und den Unterschied zwischen den Sekundärfluoreszenzen von *cue1-1* und pOCA-Palisadenparenchymen ausmacht.

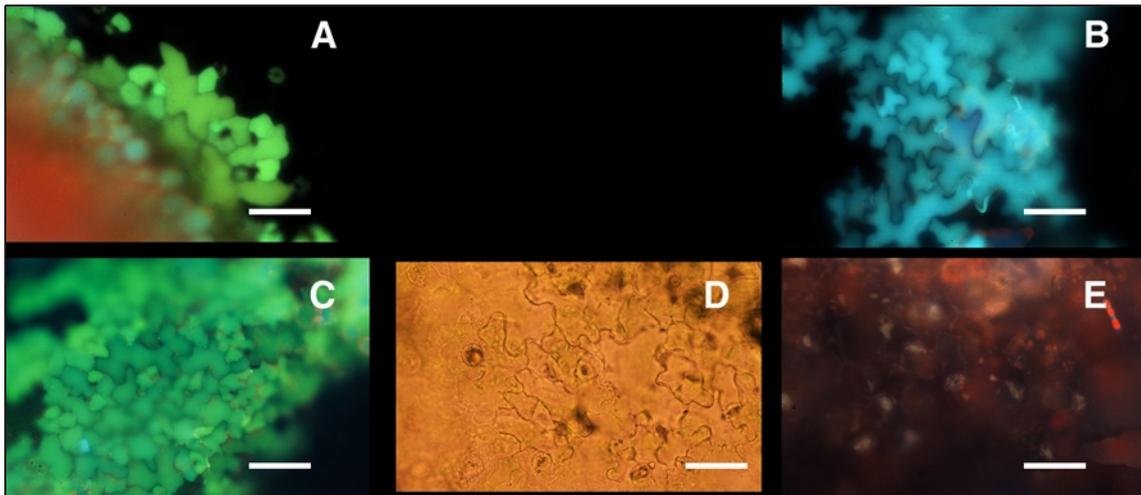


Abb. 3.22 Fluoreszenzmikroskopisches Bild der tangentialen Längsschnitte von pOCA- (A und B, oben) und *cue1-1*-Pflanzen (C und E, unten) bei einer Anregungswellenlänge von $330 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda > 420 \text{ nm}$. A bis C und E: Sekundärfluoreszenz der Epidermen nach Ammonium-Einwirkung. D: Durchlichtaufnahme der gleichen Stelle wie in E. Der Maßstab entspricht $25 \mu\text{m}$ in allen Bildern.

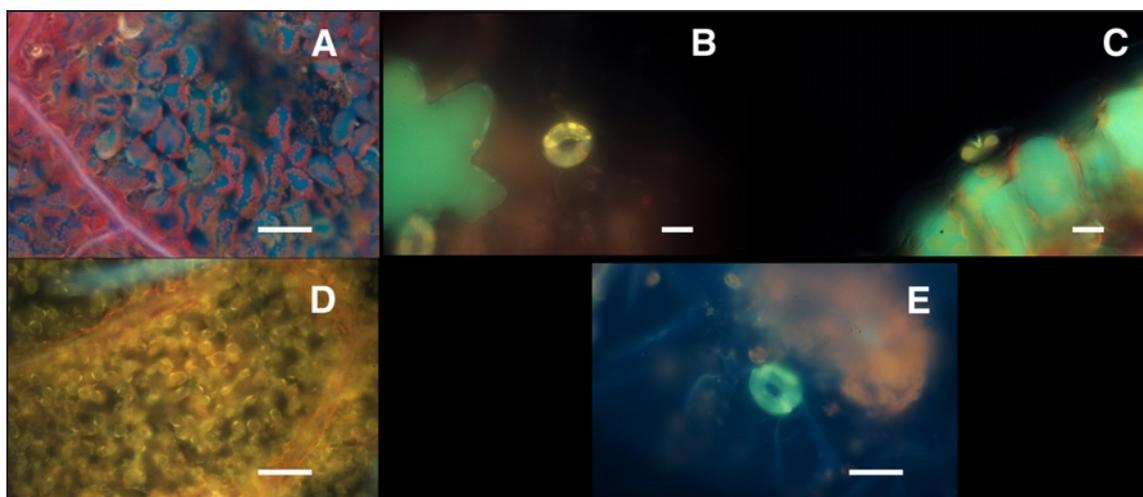


Abb. 3.23 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von pOCA- (A bis C, oben) und *cue1-1*-Blattschnitten (D und E, unten) bei einer Anregungswellenlänge von $330 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda > 420 \text{ nm}$. Alle Bilder (A bis E): Naturstoffreagenz A-induzierte Sekundärfluoreszenz. A, D und E: Der Maßstab entspricht $25 \mu\text{m}$, B und C: Der Maßstab entspricht $5 \mu\text{m}$. A und C: Tangentiale Längsschnitte des Palisadenparenchyms, B und D: Aufsicht auf die obere Epidermis – der Zellsaft der den Stomata benachbarten Epidermiszellen ist ausgelaufen, so daß die vakuoläre Fluoreszenz der Schließzellen besser zu erkennen ist, E: Querschnitt.

Beim Vergleich der Naturstoffreagenz A-induzierten Sekundärfluoreszenz in Schließzellen war in den Stomata der Kontrollen ein warmer, gelb-oranger Farbton zu finden (Abb. 3.23 B und C), während die Schließzellvakuolen von *cue1-1* gelb-grün fluoreszierten (Abb. 3.23 E). Orange Sekundärfluoreszenz ist auf Quercetin-Derivate zurückzuführen, während Kaempferol-Derivate durch Naturstoffreagenz A-Behandlung in der Regel eine gelbe bis gelb-grünliche Sekundärfluoreszenz aufweisen (G. Weissenböck, persönliche Mitteilung). Wurden methanolische Blattextrakte gleicher Frischgewichtsmenge von *cue1-1* und pOCA in einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, so zeigte sich, daß die Sekundärfluoreszenz zweier Quercetin-Derivate in den *cue1-1*-Mutanten fehlte und die eines dritten Quercetin-Derivats im Vergleich zur Kontrolle stark verringert war (Abb. 3.24, Pfeilspitzen). Dies deutet darauf hin, daß die Aktivität der Flavonoid-3'-Hydroxylase, die Kaempferol zu Quercetin umsetzt, in *cue1-1*-Mutanten beeinträchtigt sein könnte.

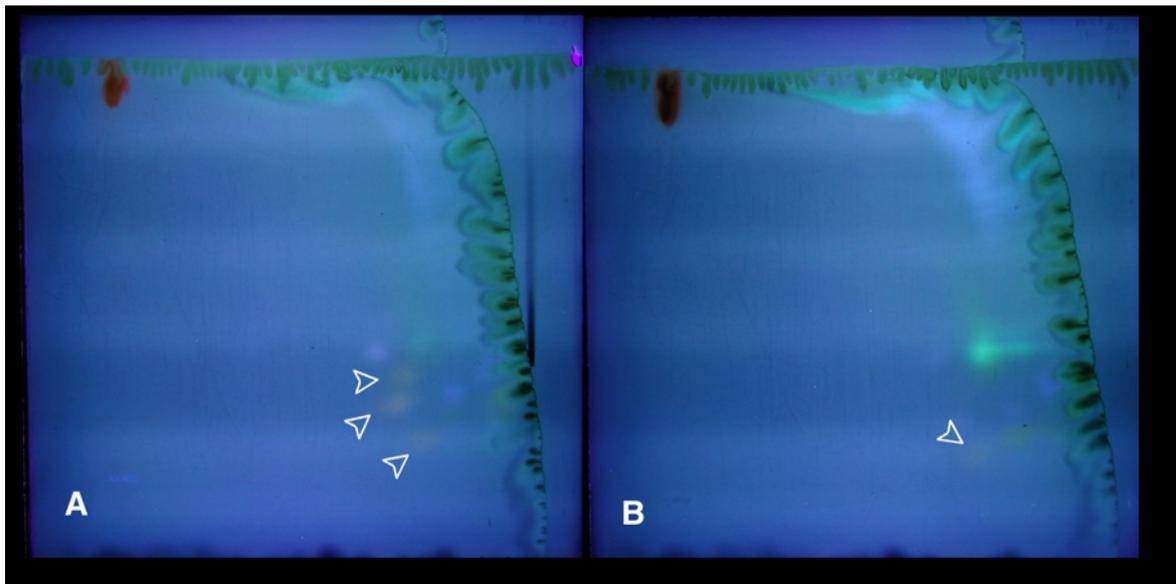


Abb. 3.24 Naturstoffreagenz A-induzierte Sekundärfluoreszenz eines zweidimensionalen Dünnschichtchromatogramms methanolischer Blattextrakte von pOCA (A, oben) und *cue1-1* (B, unten). Die erste Dimension (CEW 3:2) ist horizontal, die zweite Dimension (15% HoAc) ist vertikal orientiert. Die orange fluoreszierenden Quercetin-Derivate in A und B sind mit Pfeilspitzen markiert. Mit Blattsschnitten der gleichen Pflanzen wurden zuvor die in Abb. 3.21 bis 3.23 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen angefertigt.

3.6.4.2. Histologische Untersuchungen an Infloreszenzachsen

Ein geringerer Stoffwechselfluß in Sekundärmetabolite hat zumeist auch einen Einfluß auf die Lignifizierung des Xylems und anderen Festigungsgewebes (Tamagnone et al., 1998a, Vignols et al., 1995; Halpin et al., 1994). Daher wurden frisch ausgebildete Infloreszenzachsen von *A. thaliana* fluoreszenzmikroskopisch auf die Autofluoreszenz von Ferulasäure-Resten in den Tertiärwänden der Gefäßelemente des Xylems untersucht.

Das Ergebnis war unerwartet (Abb. 3.25). Die Anzahl der lignifizierten Gefäßelemente pro Leitbündel in *cue1-1* und pOCA war nicht nur in etwa gleich, sondern in *cue1-1*-Infloreszenzachsen zeigte sich zusätzlich eine Ferulasäure-Autofluoreszenz im Kollenchymring (Abb. 3.25 D) und sogar in einzelnen Siebröhrenelementen (Abb. 3.25 F, Pfeil), die in Infloreszenzquerschnitten der Kontrollpflanzen nicht vorhanden war (Abb. 3.25 A). In *cue1-1*-Mutanten war die Chlorophyllfluoreszenz der Chloroplasten-tragenden Cortezellen im Vergleich zu den Kontrollinfloreszenzen geringer (vgl. Abb.3.25 A mit D), ganz analog zu den Verhältnissen im Mesophyll (s.o.). Dies läßt darauf schließen, daß der Ausfall der AtPPT1-Funktion in *cue1-1* sich auch auf die Entwicklung der Chloroplasten außerhalb der Blätter auswirkt.

Beim Vergleich der Flavonoid-Sekundärfluoreszenzen in Infloreszenzachsen zeigten sich dramatische Unterschiede zwischen *cue1-1* und den Kontrollen (Abb. 3.25 B und D). In den Kontrollen fanden sich sehr starke gelbe Fluoreszenzsignale in der Epidermis, im Cortex, im Mark und auch im Leitgewebe (Abb. 3.25 B), wohingegen in *cue1-1*-Infloreszenzquerschnitten nur einzelne Idioblasten in der Epidermis gelb fluoreszierten (Abb. 3.25D). Ein ähnliches Bild bietet sich beim Vergleich der Ammonium-induzierten Sekundärfluoreszenzen in *cue1-1* und pOCA-Kontrollen (Abb. 3.25 F und C). Das Fluoreszenzmuster nach Ammonium-Behandlung gleiche in den Kontrollen dem der Naturstoffreagenz A-Sekundärfluoreszenz (vgl. Abb. 3.25 B und C); in *cue1-1* waren - entgegen der Naturstoffreagenz A-induzierten Fluoreszenz - schwache Fluoreszenzsignale in einigen Cortex-Zellen zu erkennen (Abb. 3.25 F), die demnach auf Zimtsäurederivate zurückzuführen sind. In Abb. 3.26 sind das Mark (Abb. 3.26 A) und das Leitgewebe (Abb. 3.26 C) von pOCA-Infloreszenzen sowie der Cortex von *cue1-1*-Infloreszenzen (Abb. 3.26 D) verschiedener Sekundärfluoreszenz vergrößert dargestellt, um einige der vorgenannten Beobachtung präziser darlegen zu können.

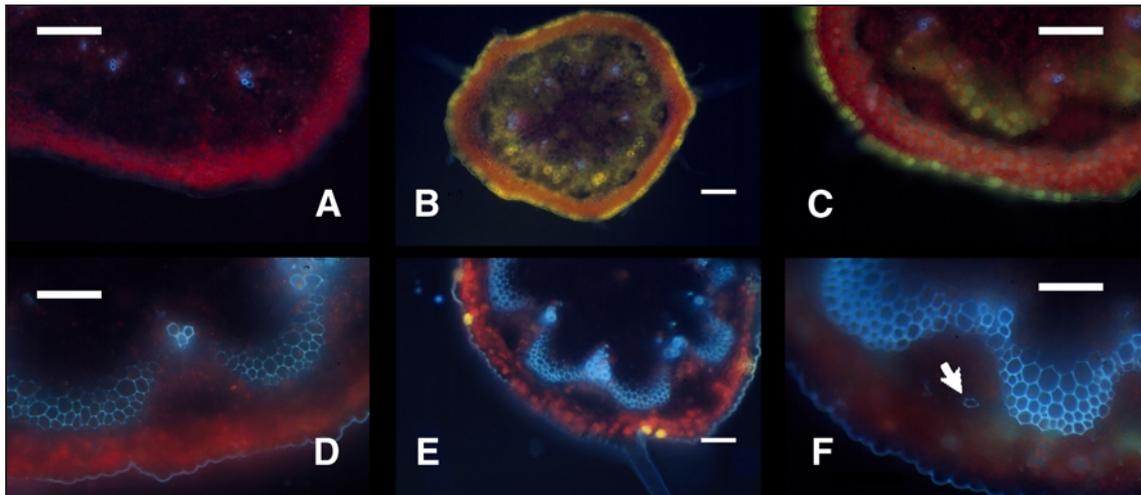


Abb. 3.25 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von pOCA- (A bis C, oben) und *cue1-1*-Infloreszenzquerschnitten (D bis F, unten) bei einer Anregungswellenlänge von $330 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda > 420 \text{ nm}$. A, D: Autofluoreszenz; B, E: Sekundärfluoreszenz nach Naturstoffreagenz A-Behandlung; C, F: Sekundärfluoreszenz nach Ammonium-Einwirkung. Der Maßstab entspricht $25 \mu\text{m}$ in A und C bis F $50 \mu\text{m}$ in B.

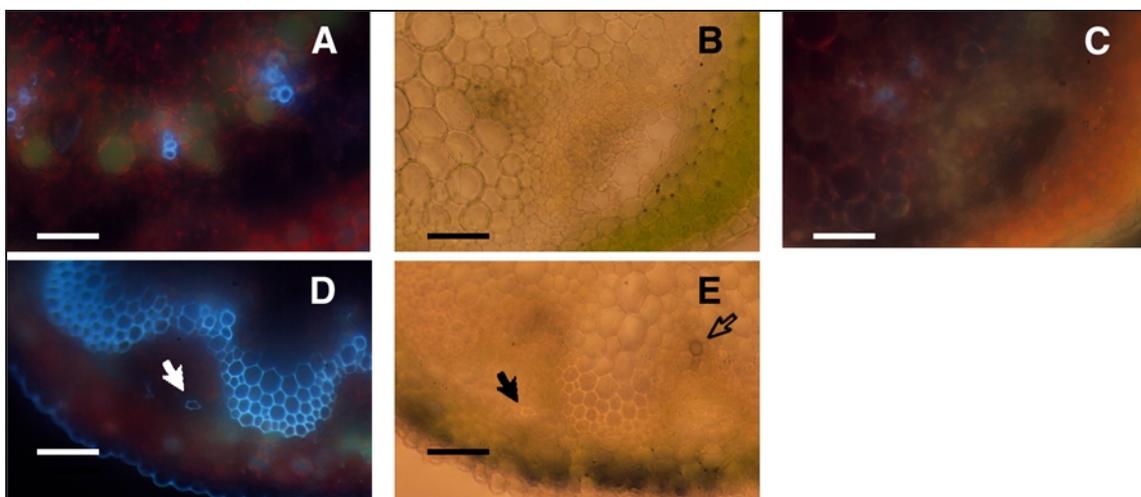


Abb. 3.26 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von pOCA- (A und C, oben) und *cue1-1*-Infloreszenzquerschnitten (D, unten) bei einer Anregungswellenlänge von $330 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda > 420 \text{ nm}$. B: Durchlichtaufnahme der gleichen Stelle wie in C (pOCA), E: Durchlichtaufnahme der gleichen Stelle wie in D. C: Sekundärfluoreszenz nach Naturstoffreagenz A-Behandlung; A und D: Sekundärfluoreszenz nach Ammonium-Einwirkung. Der Maßstab entspricht in allen Aufnahmen $25 \mu\text{m}$.

In Abb. 3.26A ist die durch Ammonium induzierte Sekundärfluoreszenz von Zimtsäurederivaten in den weitlumigen Markzellen von pOCA-Infloreszenzen zu erkennen, die in *cue1-1* nicht vorhanden war (Abb. 3.26 D). In Abb. 3.26 D und E ist auch eine lignifizierte Zelle im Phloem von *cue1-1* zu erkennen (s. ausgefüllte Pfeile). Lignifizierung von intakten Siebröhrenelementen ist äußerst ungewöhnlich und um eine Zelle des Hartbastes kann es sich ebenfalls nicht handeln, da *A. thaliana* kein sekundäres Dickenwachstum zeigt.

Die oben erwähnte Ferulasäure-Autofluoreszenz im Kollenchymring von *cue1-1* (Abb. 3.26 D; s. auch Abb. 3.25 D) ist nicht auf eine Lignifizierung zurückzuführen. Dies zeigt das ungefärbte Durchlichtbild der gleichen Stelle im Präparat (Abb. 3.26 E), in dem die Tertiärwände der Gefäßelemente des Xylems bräunlich erscheinen (s. transparenter Pfeil), die Wände des Kollenchyms dementsgegen aber dichroitisch schimmern. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die Wände des Kollenchymringes zwar Ferulasäurereste enthalten, aber dennoch nicht lignifiziert sind, so wie dies für Kollenchyme typisch ist.

In Abb. 3.26 C ist ein Ausschnitt eines Naturstoffreagenz A-behandelten Querschnittes einer pOCA-Infloreszenz gezeigt. Es ist zu erkennen, daß das Lumen einiger Zellen des Bastes sekundär fluoreszierende Flavonoide enthielt – im Vergleich dazu ist in Abb. 3.26 B die zugehörige Durchlichtaufnahme gezeigt, in der das Leitgewebe gut zu erkennen ist. Es stellt sich die Frage, welche Aufgabe den hier nachgewiesenen Flavonoide im Phloem, höchstwahrscheinlich im Phloemparenchym, zukommt.

Um den Effekt der phänotypischen Komplementation durch die Überexpression der *F. trinervia*-PPDK oder des Blumenkohl-PPT auf die Lokalisation der zuvor analysierten Sekundärmetabolite zu untersuchen, wurden Wildtyp-, *cue1-6*-, *cue1-6*/PPDK- und *cue1-6*/PPT-Infloreszenzen querschnitten und fluoreszenzmikroskopisch in gleicher Weise wie die anderen Gewebeschnitte untersucht. In Abb. 3.27 ist exemplarisch der Vergleich zwischen der Autofluoreszenz und der Ammonium-induzierten Sekundärfluoreszenz der Querschnitte von Col-0-, *cue1-6*- und *cue1-6*/PPT-Infloreszenzen dargestellt.

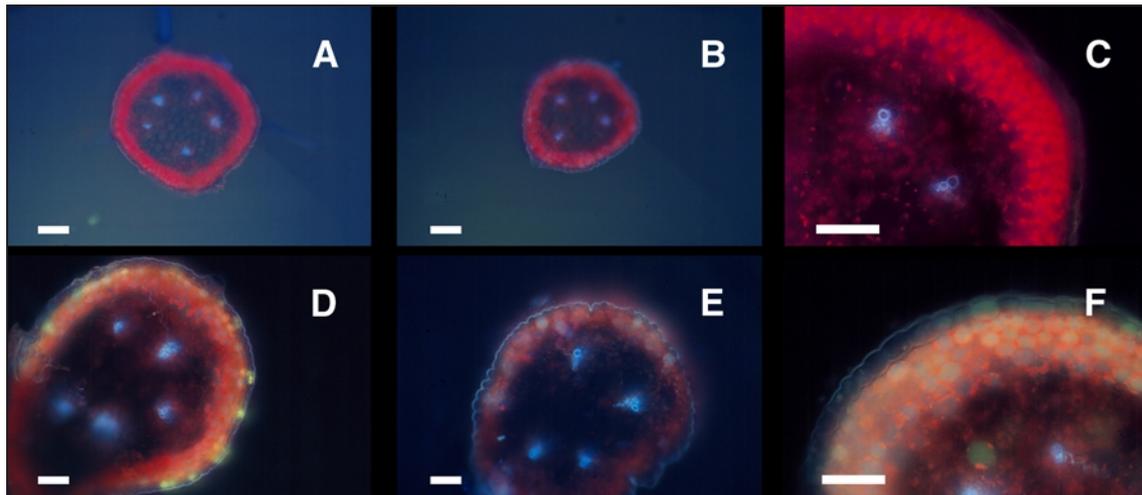


Abb. 3.27 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Col-0 (A und D, links), *cue1-6*- (B und E, Mitte) und *cue1-6*/PPT-Infloreszenzquerschnitten (C und F, rechts) bei einer Anregungswellenlänge von $330 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda > 420 \text{ nm}$. A bis C: Autofluoreszenz, D bis F: Sekundärfluoreszenz nach Ammonium-Einwirkung. Der Maßstab entspricht $125 \mu\text{m}$ in A und B, $50 \mu\text{m}$ in D und E und $25 \mu\text{m}$ in C und F.

Die Autofluoreszenz der Querschnitte unterschied sich nicht offensichtlich (Abb. 3.27 A bis C). Die Sekundärfluoreszenz von Zimtsäurederivaten war in *cue1-6* nur in vereinzelt Zellen des Cortex zu finden (Abb. 3.27 E), während im Wildtyp alle Cortex-Zellen ein Fluoreszenzsignal emittierten (Abb. 3.27 D) und in *cue1-6*/PPT-Komplementanden (Abb. 3.27 F) darüberhinaus auch in vereinzelt Zellen des Marks Zimtsäure-Sekundärfluoreszenzen zu finden waren. Außerdem war die Farbvielfalt im Cortex von *cue1-6*/PPT-Infloreszenzen höher als in den Wildtyp-Kontrollen (vgl. Abb. 3.27 F mit 3.27 D). Die für die *cue1-6*/PPT-Pflanzen gezeigten Ergebnisse trafen auch auf Infloreszenzquerschnitte von *cue1-6*/PPDK zu (nicht gezeigt). Es liegt also nahe, daß die Wiederherstellung der plastidären PEP-Versorgung in Infloreszenzen von *cue1-6*-Komplementanden eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte bzw. diversifiziertere Synthese von Phenylpropanen und Zimtsäurederivaten bewirkt.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß sich keine substantiellen Mengen an Ferulasäure im Infloreszenzkollenchym von *cue1-6*-Mutanten lokalisieren ließen, so wie dies in den Infloreszenzquerschnitten von *cue1-1* zu beobachten war (s.o.). Der in *cue1-1* festgestellte Effekt scheint also spezifisch für *cue1-1*-Mutanten zu sein.

3.6.5. Vergleich der durch Staunässe induzierbaren Anthocyan synthese

Aus der Literatur ist bekannt, daß *A. thaliana* Blätter z.B. bei Zuckerfütterung (Tsukaya et al., 1991) Stärke und Anthocyane akkumulieren. Dies geschieht durch die Induktion von β -Amylase (Mita et al., 1995; Mita et al., 1997) und die Induktion einer Chalkonsynthase-Isoform (Tsukaya et al., 1991). Dieses Syndrom tritt auch bei Staunässe auf. Staunässe wurde daher als Testsystem eingesetzt, um die Fähigkeit zur Anthocyanakkumulation der *cue1*-Mutanten und der komplementierten Linien zu überprüfen.

Wildtyp-Pflanzen, *cue1-6*-Mutanten, *cue1-6*/PPDK und *cue1-6*/PPT wurden acht Tage lang Staunässe ausgesetzt und die Gehalte an Stärke, löslichen Zuckern und Anthocyanen alle zwei Tage bestimmt. Bei der optischen Inspektion der Pflanzen war schon zu erkennen, daß Col-0 und *cue1-6*/PPDK Pflanzen am Ende des Versuches massiv Anthocyane in den Rosettenblättern akkumuliert hatten, während dies bei 75% der *cue1-6*-Mutanten nicht der Fall war (Abb. 3.28).

Beim Vergleich der gemessenen Gehalte von transitorischer Stärke und Anthocyanen während des anaeroben Stresses zeigte sich, daß sich die Gehalte an Glk6P, löslichen Zuckern und transitorischer Stärke unabhängig von der Pflanzenlinie direkt mit dem Anthocyan gehalt korrelieren ließen (Abb. 3.29). Die *cue1-6*-Mutanten wiesen dabei die geringsten Gehalte aller getesteten Substanzen auf (Abb. 3.29, Dreiecke).



Abb. 3.28 Col-0 (A), *cue1-6* (B) und *cue1-6*/PPDK-Pflanzen (C) nach acht Tagen Staunässe im Vergleich.

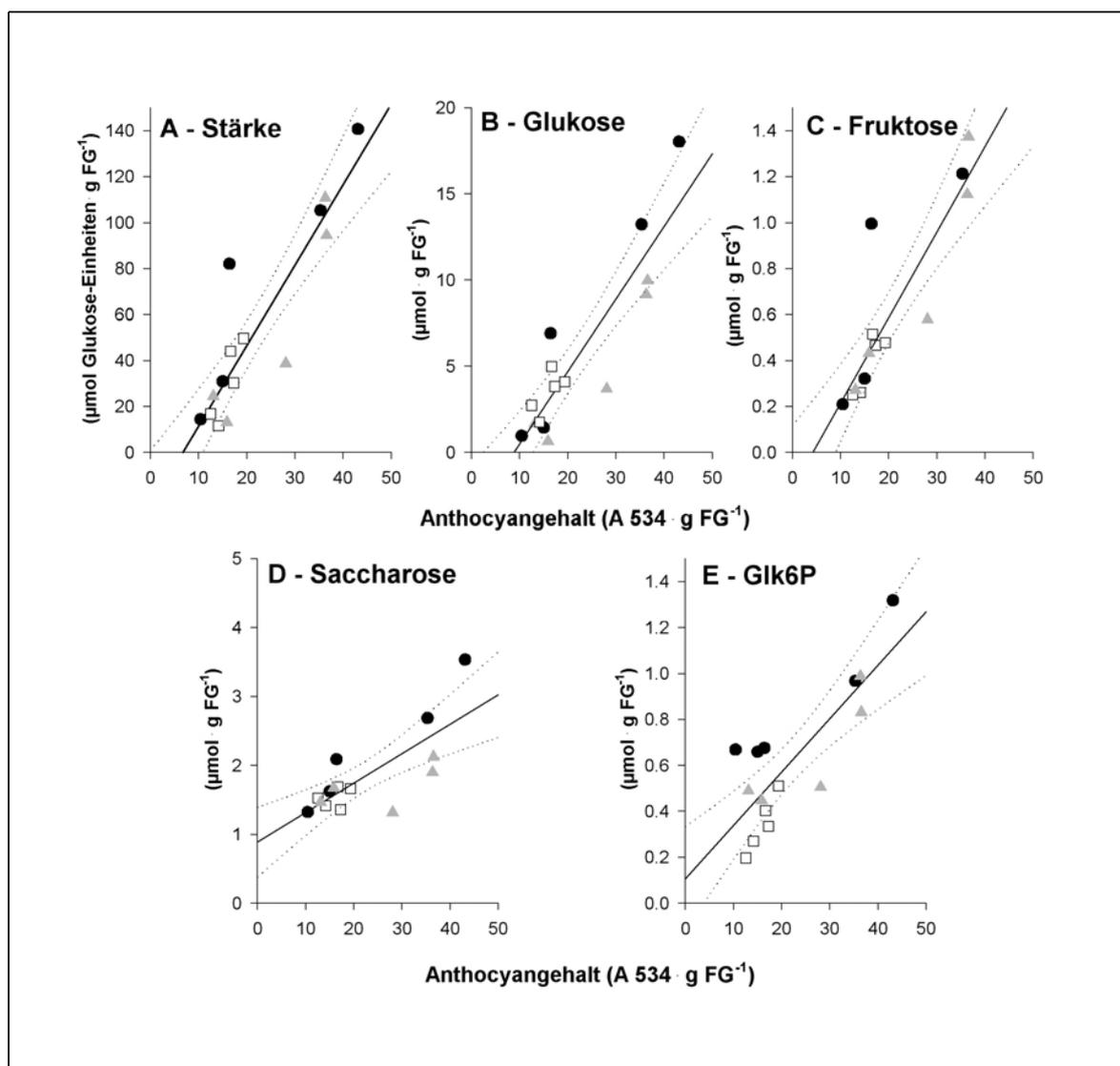


Abb. 3.29 Korrelation zwischen dem Anthocyanengehalt und den Gehalten an Stärke (A), Glukose (B), Fruktose (C), Saccharose (D) und Glukose-6-phosphat (E). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert für einen bestimmten Probestag. In die Auftragungen sind alle während des Akkumulationsverlaufes erhobenen Meßwerte eingegangen. Punkte: Col-0, Quadrate: *cue1-6*, Dreiecke: *cue1-6/PPDK*. Die gestrichelten Linien geben das Konfidenzintervall für eine bestehende Korrelation von $\alpha < 0,05$ an.

Aus dem Verlauf des Akkumulationsverlaufes von Stärke und Anthocyanen kann ersehen werden, daß die Fähigkeit zur Akkumulation von Stärke und Anthocyanen durch die Überexpression von PPDK und heterologem PPT in *cue1-6*-Mutanten wiederhergestellt wurde (Abb.3.30). In *cue1-6/PPDK* verlief die Anthocyanakkumulation sogar noch etwas schneller als im Wildtyp, wenn auch nicht mit identischen Endgehalten nach acht Tagen anaeroben Stresses. Außer dem in der Literatur beschriebenen Einfluß der Zuckergehalte auf die Stärke- und Anthocyanengehalte scheint umgekehrt auch die Fähigkeit Anthocyane akkumulieren zu können einen Einfluß auf die Kohlenhydratgehalte auszuüben.

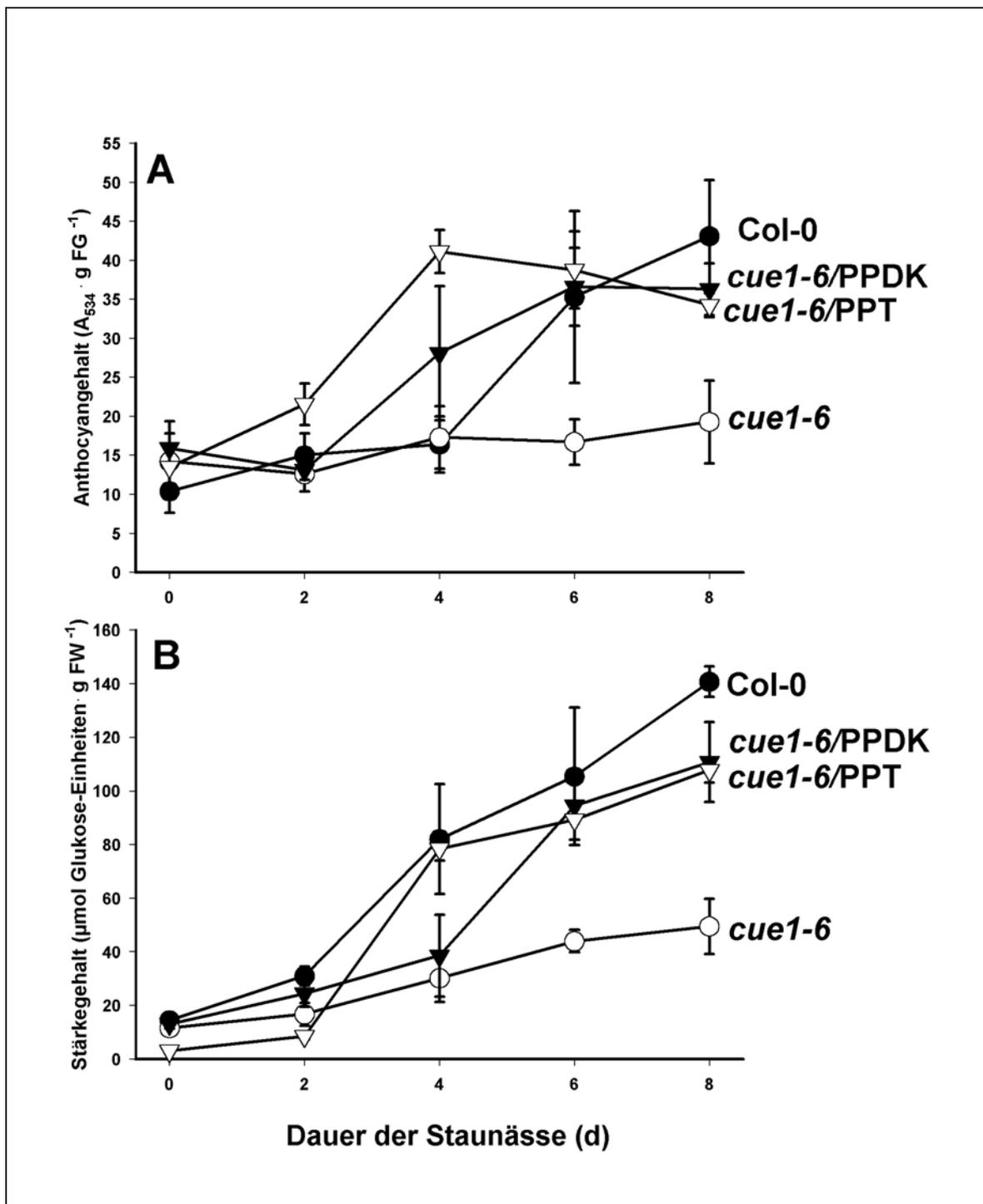


Abb. 3.30 Anthocyan- (A) und Stärkegehalte (B) am Ende der Dunkelperiode während des Staunässe-Einflusses. $n=4$. Col-0: schwarze Kreise, *cue1-6*: weiße Kreise, *cue1-6/PPDK*: schwarze Dreiecke, *cue1-6/PPT*: weiße Dreiecke.

3.7. Transkriptomanalysen

Die gleichzeitige Untersuchung einer großen Anzahl von verschiedenen Transkriptmengen ist eine sehr effektive und potente Methode eine möglichst umfassende Aussage über das Transkriptom eines Organismus zu gewinnen. Die Grenzen bei der Erstellung von Transkriptmengenprofilen liegen vornehmlich in der zuvor getätigten Auswahl der vertretenen Gene. Dennoch hat die Erfahrung bei der Erstellung von Transkriptmengenprofilen gezeigt, daß die gezielte und spezifische Untersuchung der Transkriptmenge eines einzelnen Gens über Northernblot und quantitative RT-PCR zuverlässiger und weniger störanfällig ist als ein unspezifischer, breitgefächerter Ansatz. Bei der Transkriptomanalyse wird darüberhinaus auf die Gegenwart der mRNA im Gewebe getestet; eine verlässliche Aussage über die nach der Translation der mRNA vorhandenen Proteingehalte kann damit nicht getroffen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine vergleichsweise geringe Anzahl von 68 Genen simultan untersucht, die für Enzyme des Primär- und Sekundärstoffwechsels kodieren. Zu diesem Zweck wurden geeignete EST-Sequenzen (*expressed sequence tag*) aus Datenbanken ermittelt, die zugehörigen Stammkulturen bezogen und PCR-Fragmente der ESTs manuell im makroskopischen Maßstab auf Nylonmembranen aufgetragen und immobilisiert. Ein vollständiger Satz an EST-Fragmenten war auf drei verschiedene Membranen nach Größenklassen aufgeteilt (s. 2.2.3.14). Die gesamte Kollektion der ausgewählten EST-Klone ist in Anhang 8.1 gegeben, Tab. 3.18 gibt einen Überblick über die Funktionen der zu den EST-Sequenzen annotierten Gene.

Um die Qualität der hergestellten Membranen zu überprüfen, wurden diese mit ^{33}P -markierten Oligonukleotiden hybridisiert, die in allen aufgetragenen DNA-Fragmenten vertreten waren. Abb. 3.31 zeigt den Auftrag der Signalstärken zweier Parallelhybridisierungen gegeneinander.

Diese repräsentative Testhybridisierung zeigt, daß die Signalstärke zwischen den beiden parallel hergestellten Membransätzen sehr gleichmäßig war. Folglich waren die mit einem Paar eines solchen Membransatzes erzielten Hybridisierungsmuster gut miteinander vergleichbar.

Eingruppierung	Untersuchte Gene
ATPasen	2
Calvin-Zyklus	3
Fettsäurebiosynthese	1
Glykolyse	1
Kohlenstoff-Stoffwechsel	8
Nukleinsäuresynthese	1
Phenylpropanweg	6
Photophosphorylierung	3
Photorespiration	4
Phytohormon-Synthesen	4
Plastochinon-Biosynthese	1
Polysaccharidsynthese	4
Redox-Homeostase	5
Schwefel-Stoffwechsel	1
Shikimatweg	5
Stärkemetabolismus	3
Stickstoff- und AS-Stoffwechsel	13
Kontrollen	3

Tab. 3.18 Funktionelle Klassifizierung der zu den ESTs annotierten Gene.

Im Verlauf der vorgelegten Arbeit wurden 8 komplette Membransatzpaare - also 16 Sätze à drei Membranen (s. 2.2.3.14) – hergestellt. Bei der vergleichenden Hybridisierung zweier Membransätze wurden dreimal *cue1-1*- im Vergleich zu pOCA-cDNA-Sonden eingesetzt, zweimal *cue1-6*-cDNA-Sonden im Vergleich zu Col-0 und dreimal cDNA-Sonden aus *cue1-6*/PPDK und Col-0. Unterschiede der Transkriptmengen zwischen *cue1*- bzw. *cue1-6*/PPDK-Profilen und den Kontrollen wurden nur dann als solche angesehen, wenn sich ihr Verhältnis zueinander um das 2,5fache unterschied, die Signale gleichmäßig waren und eindeutig über dem durch Negativkontrollen bestimmten Hintergrund lagen. In Tab. 3.19 sind die Transkripte aufgeführt, deren Mengen sich reproduzierbar zwischen *cue1*- bzw. *cue1-6*/PPDK und den Kontrollen unterschieden.

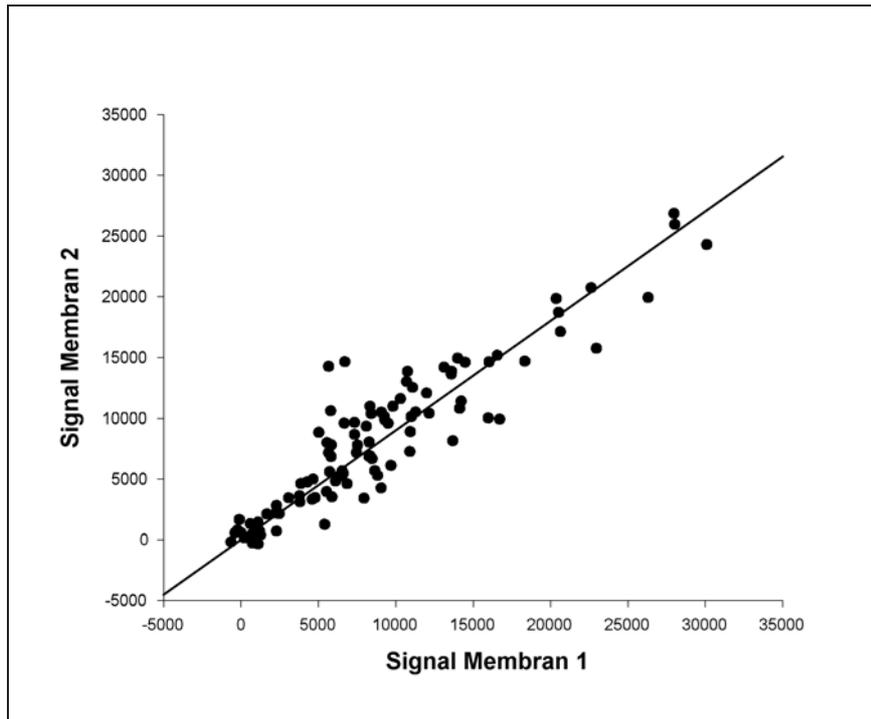


Abb. 3.31 Auftrag der Signalstärken zweier parallel angefertigter Membransätze gegeneinander, die mit einer ubiquitär enthaltenen ^{33}P -markierten Oligonukleotidsonde hybridisiert wurden.

Linien	induziert	Relation
<i>cue1</i> und Kontrollen ^a	Ribonukleotid-Reduktase	9,8
	Phenylpyruvat-Dioxygenase	9,0
	Tryptophan-Synthase	8,0
	PEP-Carboxylase	4,2
<i>cue1-6/PPDK</i> und Kontrollen ^b	Fd-GOGAT	6,6
	EPSP-Synthase	4,2
	NADP-GAPDH	3,4
	Glycin-Decarboxylase-Komplex	3,2
	Tryptophan-Synthase	2,7

Linien	reprimiert	Relation
<i>cue1</i> und Kontrollen ^a	CAB	0,16
	EPSP-Synthase	0,23
	Prephenat-Dehydrogenase	0,27

Tab. 3.19 (vorige Seite) In *cue1*- bzw. *cue1-6*/PPDK im Vergleich zu den Kontrollen veränderte Transkriptmengen. Die Daten sind als Relation der normalisierten Signalstärken zwischen zusammengehörigen Filterpaaren angegeben. n=5 für den Vergleich zwischen *cue1-1* und pOCA; n=3 für den Vergleich zwischen *cue1-6*/PPDK und Col-0. ^a: Bei *cue1-1* wurden cDNAs aus pOCA als Kontrolle eingesetzt, für Hybridisierungen mit *cue1-6*-cDNA fungierten Ansätze aus Col-0 als Kontrolle. Die Ergebnisse für *cue1-1* und *cue1-6* sind zusammengefaßt und gemeinsam dargestellt. ^b: Als Kontrolle für *cue1-6*/PPDK-Hybridisierungen dienten Col-0-cDNAs.

Wie erwartet war die Transkriptmenge des untersuchten CAB-Gens in *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen um 80% reduziert (Tab.3.20). Dieses Resultat deckt sich mit den von Li et al. (1995) veröffentlichten Daten; letztlich sind die *cue1*-Mutanten ursprünglich gerade durch die verringerte CAB-Transkription und -Expression bei der De-Etiolierung charakterisiert worden. Die Daten für Enzyme des Shikimatweges und der Biosynthese aromatischer Aminosäuren waren im Vergleich der *cue1*-Mutanten mit den Kontrollen uneinheitlich. Die Tryptophan-Synthase zeigte eine achtfache transkriptionelle Induktion in *cue1*-Mutanten, während die 5'-Enol-pyruvyl-shikimat-3-phosphat-Synthase (EPSP-Synthase) und die Prephenat-Dehydrogenase transkriptionell um 75% reduziert waren (Tab. 3.19). Die unterschiedlichen Veränderungen der Prephenat-Dehydrogenase- und Tryptophan-Synthase-mRNA-Mengen in den *cue1*-Mutanten kann dadurch erklärt werden, daß diese beiden Enzyme von Chorismat ausgehend in antagonistisch regulierte Stoffwechselwege eingebunden sind.

In den meisten Pflanzen gibt es mehrere Isoformen der EPSP-Synthase, so auch in *A. thaliana*, wie sich anhand der EST-Datenbanksuche ergab (nicht gezeigt). Eventuell wurde durch die verwendete EPSP-DNA-Matrize nur eine der EPSP-Isoformen erkannt, die gemeinsam mit der Prephenat-Dehydrogenase reguliert ist, und andere EPSP-Isoformen, die gemeinsam mit der Tryptophan-Synthase in den anderen Zweig des Sekundärstoffwechsels eingebunden sind, wurden durch die Matrize nicht erfaßt.

Die transkriptionelle Induktion der PEP-Carboxylase in *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen stimmte mit den Ergebnissen der Enzymaktivitätsmessungen überein (s. 3.5.7). Der Effekt auf Aktivitätsebene war jedoch im Vergleich zu den Veränderungen auf Transkriptebene um die Hälfte geringer. Die Erhöhung der PEP-Carboxylase-Aktivität auf das Doppelte der Kontrollen (s. 3.5.7) war dennoch ein vergleichsweise starker Effekt.

In *cue1-6*/PPDK-Blättern waren im Vergleich zum Wildtyp vorwiegend Enzyme des Primärstoffwechsels transkriptionell induziert (Tab. 3.19). Die plastidäre Ferredoxin-abhängige Glutamin-Oxoglutarat-Ammonium-Transferase (Fd-GOGAT) und der

mitochondriale Glycin-Decarboxylase-Komplexes (GDC) sind in die Photorespiration eingebunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stärke der Photorespiration in *cue1-6*/PPDK im Vergleich zum Wildtyp oder zu den *cue1-6*-Mutanten jedoch nicht bestimmt, so daß keine weiteren Daten zur Erhärtung der hier gewonnenen Ergebnisse vorliegen.

Die Erhöhung der Transkriptmenge der plastidären NADP-GAPDH in *cue1-6*/PPDK im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 3.19) steht im Gegensatz zur zuvor bestimmten (3.5.7) klaren negativen Korrelation zwischen PPDK-Aktivität und NADP-GAPDH-Aktivität in *cue1-6*/PPDK-Blättern. Wie schon eingangs erwähnt, lassen die Transkriptmengen eines Gens nicht immer Rückschlüsse auf die Expressionsstärke oder den Aktivierungszustand des Proteins zu.

Die Veränderung der EPSP-Synthase-, Prephenat-Dehydrogenase- und der Tryptophan-Synthase-Transkriptmengen im Vergleich von *cue1-6*/PPDK und Wildtyp war umgekehrt zum Vergleich der Transkriptprofile von *cue1*-Mutanten mit den Kontrollen (s.o.): die Tryptophan-Synthase wurde durch die Überexpression der *Flaveria trinervia* C₄-PPDK in *cue1-6*-Mutanten transkriptionell heruntergefahren, während die Prephenat-Dehydrogenase und die EPSP-Synthase transkriptionell induziert wurden. Die Transkriptmengen der Prephenat-Dehydrogenase wiesen in *cue1-6*/PPDK dieselben relativen Mengen wie im Wildtyp auf und sind daher in Tab. 3.19 nicht dargestellt. Gegenüber den *cue1*-Mutanten waren sie aber relativ gesehen induziert. Die ursprünglichen transkriptionellen Veränderungen von Genen des Shikimatweges und des Sekundärstoffwechsels in *cue1*-Mutanten konnten also durch die Überexpression der PPDK revertiert werden. Die Resultate der Transkriptomanalyse decken sich in mit den in *cue1-6*/PPDK erhöhten Flußraten in UV-Schutzsubstanzen und Anthocyanen im Vergleich zu *cue1-6* und auch im Vergleich zum Wildtyp (s. 3.6.3 und 3.6.5).

4. Diskussion

4.1. Das Stoffwechselgeschehen in *cue1*-Mutanten

4.1.1. Wichtige Fakten über die *cue1*-Mutanten

Die *cue1*-Mutanten wurden Mitte der 90er Jahre bei der Suche nach *Arabidopsis*-Mutanten gefunden, die den lichtregulierten CAB3-Promotor bei der De-Etiolierung (der Ergrünung dunkelgehaltener oder sich entwickelnder photosynthetischer Gewebe) nicht dereprimieren (Li et al., 1995). Das Ziel dieser Studie war es, Gene zu identifizieren, die in die Photomorphogenese eingebunden sind. Außer den bislang bekannten Photorezeptoren für Rotlicht (Phytochrom, Quail et al., 1995) und Blaulicht (Cryptochrom, Huala et al., 1997) sind viele weitere Proteine in die von den Photorezeptoren ausgehenden Signalketten involviert, die die Antwort der Zelle auf den perzipierten Lichtreiz propagieren (z.B. Sakai et al., 2000; Fairchild et al., 2000; Bolle et al., 2000).

Erstaunlicherweise zeigten weitere Untersuchungen der *cue1*-Mutanten, von denen mittlerweile acht verschiedene Allele isoliert wurden (Streatfield et al., 1999), daß es sich bei dem in *cue1* mutierten Gen um den Phosphoenolpyruvat/ Phosphat-Translokator (PPT) der inneren Plastidenhülle handelt (Streatfield et al., 1999). Eine mögliche Rolle des PPT in C₃-Pflanzen besteht darin den Chloroplasten mit PEP zu versorgen (Fischer et al., 1997), das in den Shikimatweg (Herrmann, 1995; Schmid und Amrhein, 1995), die Fettsäurebiosynthese (Kleinig und Liedvogel, 1980; Qui et al., 1994) und die Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren (Schulze-Siebert et al., 1984) eingehen kann. Aus dem Shikimatweg leiten sich aromatische Aminosäuren und eine Reihe weiterer wichtiger Primär- und Sekundärmetabolite ab (s. 1.5.6). Produkte des Shikimatweges scheinen eine wichtige Rolle bei der Ausprägung des retikulierten Blattphänotyps zu haben, da dieser durch die Supplementierung von aromatischen Aminosäuren aufgehoben werden konnte (Streatfield et al., 1999).

Diese Hypothese bildete den theoretischen Ausgangspunkt für die physiologische Untersuchung des Primär- und Sekundärmetabolismus der *cue1*-Mutanten im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Streatfield et al. (1999) hatten bereits Hinweise darauf erhalten, daß die Gehalte an Zucker und Stärke, Aminosäuren, die Gehalte einiger Phenylpropane sowie die Photosyntheseigenschaften der *cue1-1*-Mutante verändert sind. Die Aussage der dort vorgestellten Daten kann nach vertiefenden physiologischen Analysen mehrerer *cue1*-

Mutanten und funktionell durch die Expression der *Flaveria trinervia*-PPDK in den Chloroplasten und die Überexpression des Blumenkohl-PPT komplementierten *cue1*-Mutanten erweitert und modifiziert werden.

4.1.2. Vorbemerkung zur Vergleichbarkeit der untersuchten *cue1*-Allele

Für die physiologische Untersuchung der *cue1*-Mutanten wurden drei verschiedene Allele herangezogen, die starken Allele *cue1-1* und *cue1-6*, sowie das schwache *cue1-3* Allel. Die drei *cue1*-Mutanten können nicht direkt miteinander verglichen werden, da sich *cue1-1* und *cue1-3* im genetischen Hintergrund der transgenen Linie pOCA108 (Ökotyp Bensheim R002 (Be-0), s. 2.1.5 und 3.2) befinden und *cue1-6* eine Mutante des Ökotyps Columbia (Col-0) ist. In die Diskussion werden vor allem die Resultate aus den starken *cue1*-Mutanten *cue1-1* und *cue1-6* eingehen, da die Unterschiede im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen bei diesen beiden Linien am deutlichsten und darüberhinaus zumeist konsistent waren.

4.1.3. Auswirkungen der Mutation auf die Photosynthese in *cue1*-Mutanten

Die auf die Photosynthese ausgeübten Limitationen sind in *cue1-1* und *cue1-6* im Vergleich zu den Kontrollen unterschiedlich ausgeprägt. Die unter Lichtstreß (PFD = $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gemessenen Elektronentransportraten waren in *cue1-1* im Vergleich zu den Kontrollen um 60%, in *cue1-6* hingegen nur um 15% gegenüber dem Wildtyp verringert (s. 3.4.1) - die Elektronentransportraten der Kontrollpflanzen beider Ökotypen waren aber ähnlich. Es scheint sich bei dieser Abweichung zwischen den beiden *cue1*-Allelen um einen ökotypspezifischen Effekt zu handeln, denn selbst in der schwachen *cue1-3*-Mutante, die sich im gleichen Ökotyp wie *cue1-1* befindet, waren die Elektronentransportraten bei $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ um 30% gegenüber der Kontrolle vermindert. Die graduelle Abstufung der Elektronentransportraten zwischen Kontrollen, *cue1-3* und *cue1-1* ist bereits für geringere PFD beschrieben worden (Streatfield et al., 1999).

Auch die Reoxidation des primären Chinon-Elektronenakzeptors im Photosystem II, Q_A , war bei Belichtung in *cue1-1* und *cue1-6* im Vergleich zu den Kontrollen in unterschiedlicher Weise vermindert (s. 3.4.1). In *cue1-1* verlief die Q_A^- -Reoxidation langsamer als in den Kontrollpflanzen, der Anteil oxidierten Q_AS war aber nach zwanzig Minuten prozentual genauso groß wie in den Kontrollen. Die Q_A^- -Reoxidation verlief in *cue1-6* hingegen ähnlich schnell wie im Wildtyp, erreichte jedoch nur etwa 40% des

Wildtypwertes. Von Streatfield et al. (1999) war anhand schneller Fluoreszenzinduktionskinetiken an *cue1-1* vorgeschlagen worden, daß diese eine geringere Menge freien Plastochinons als der Wildtyp besitzen. Insbesondere der hohe Prozentsatz nicht-oxidierten Q_A nach längerer Belichtung von *cue1-6*-Blättern bekräftigt diese Vermutung. Trotz dieser Unterschiede erscheint die Kapazität des photosynthetischen Elektronentransports sowohl in *cue1-1* als auch in *cue1-6* limitiert zu sein. Es ist aber durchaus denkbar, daß die Limitation des photosynthetischen Elektronentransports in den *cue1*-Mutanten auch von Engpässen der Dunkelreaktionen herrührt, die unter 4.1.4 dargelegt werden. Eine Verringerung der PS II-Effizienz und der Plastochinon-Oxidation wurde auch in etiolierenden Blättern bei Eisenmangel gefunden, deren Photosyntheseapparat ähnlich beeinträchtigt ist wie der der *cue1*-Mutanten (Abadia et al., 1999), so daß die Limitationen der *cue1*-Photosynthese genauso gut auch durch die veränderte Zusammensetzung des Photosyntheseapparates in den *cue1*-Mutanten bedingt sein könnten.

Außerdem läuft der Aufbau von q_N bei Belichtung dunkeladaptierter Blätter sowohl in *cue1-1* (s. Streatfield et al., 1999) als auch in *cue1-6* (s. 3.4.1) im Vergleich zu den Kontrollen langsamer ab. Es kann daher vermutet werden, daß der an der Thylakoidmembran anliegende pH-Gradient, der unter Vernachlässigung des Beitrags der Mehler-Reaktion mit der ETR an PS II korreliert und in der Regel innerhalb einer Minute etabliert ist (Quick und Stitt, 1989), in *cue1*-Mutanten langsamer aufgebaut wird.

Zusammengenommen zeigen die verglichenen Photosynthesedaten, daß außer einem Mangel an Plastochinon (Streatfield et al., 1999) auch eine Limitation des Calvin-Zyklus für die verzögerte Induktion der Photosynthese bei der Belichtung dunkeladaptierter *cue1*-Blätter in Betracht kommt.

4.1.4. Auswirkungen der *ppt*-Mutation auf den Primärmetabolismus im Blatt

4.1.4.1. Effekte auf die Akkumulation von Saccharose, transitorische Stärke und den Calvin-Zyklus

Ein aktiver photosynthetischer Elektronentransport beeinflußt die Aktivität zahlreicher Enzyme des Calvin-Zyklus. Je steiler der transthylakoidale pH-Gradient ist, desto höher ist die Mg^{2+} -Konzentration im Stroma (Heldt, 1979; Portis, 1981) und desto größer ist die Reduktionskraft des Stromas, die über das Ferredoxin-Thioredoxin-System geregelt wird (Buchanan, 1984). Beide Faktoren spielen eine maßgebliche Rolle bei der

posttranslationalen Aktivierung von Enzymen des Calvin-Zyklus (Lorimer et al., 1976; Buchanan, 1984). Wie unter 4.1.3 dargelegt, ist der photosynthetische Elektronentransport in den *cue1*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen eingeschränkt, was sich auf die Regulation und die Aktivität des Calvin-Zyklus auswirken kann.

Über die Untersuchung der Gehalte von Intermediaten des Calvin-Zyklus konnten bislang Limitationen innerhalb des Calvin-Zyklus in transgenen Pflanzen aufgedeckt werden, in denen die Aktivitäten verschiedener Enzyme des Calvin-Zyklus artifiziell verringert worden waren. Die Gehalte an TrioseP und 3-PGA, die im Licht vornehmlich in den Calvin-Zyklus eingebunden sind (Henkes et al., 2001), sind in Blättern von starken *cue1*-Mutanten um 50% gegenüber den Kontrollen verringert, die Gehalte von Fru-1,6-bP sogar um 80% (s. 3.5.4). Bei der Verringerung von SBPase (Harrison et al., 1998), NADP-GAPDH (Price et al., 1995), der plastidären Aldolase (Haake et al., 1998) und der plastidären FB Pase (Kossmann et al., 1994) zeigten sich Limitationen in der regenerativen Phase des Calvin-Zyklus, die durch die Verringerung des 3-PGA/TrioseP-Verhältnisses oder des 3-PGA/RubP-Verhältnisses gekennzeichnet waren. Außerdem fanden sich in allen dieser transgenen Pflanzen Einschränkungen des photosynthetischen Elektronentransports und der Assimilationsraten sobald die Aktivität des betrachteten Enzyms eine spezifische Schwelle unterschritt (z.B. Price et al., 1995; Haake et al., 1998; Harrison et al., 1998; Ruuska et al., 2000). Trat dagegen ein Mangel an Reduktionsäquivalenten auf, so kam es zwar auch zu einer Verringerung der Assimilationsrate, die Limitation der regenerativen Phase des Calvin-Zyklus beschränkte sich aber auf die Verringerung des RubP/ 3-PGA-Verhältnisses (Ruuska et al., 2000).

In den *cue1*-Mutanten scheint im Gegensatz zu den vorgenannten Beispielen aus der Literatur eine unspezifische Minderung der gesamten Photosynthese, sowohl der Licht- als auch der Dunkelreaktion vorzuliegen, da das Verhältnis der verschiedenen Calvin-Zyklus-Intermediate zueinander nicht verändert ist. Darüberhinaus war die Aktivität der NADP-GAPDH in Blättern der starken *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen um 50% erhöht. Die NADP-GAPDH ist ein allosterisch und posttranslational reguliertes Enzym des Calvin-Zyklus, das die Reduktion des primären CO₂-Fixierungsproduktes 3-PGA zu TrioseP katalysiert. Durch die Erhöhung der NADP-GAPDH-Aktivität in den *cue1*-Mutanten könnte der Fluß durch den Calvin-Zyklus aufrecht erhalten werden und dies stellt möglicherweise eine physiologische Antwort auf einen erhöhten Bedarf an 3-PGA-Reduktion in *cue1* dar, denn das 3-PGA-TrioseP-Verhältnis war in den *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen nicht verändert (s 3.5.4).

In *cue1-1* und *cue1-6* waren die CO₂-Einbauraten, die Saccharose- und Stärkeakkumulation während der Lichtperiode und die Gehalte von Hexosephosphaten (s. 3.5.1, 3.5.2 und 3.5.4) gegenüber den Kontrollen in etwa gleichem Umfang verringert. In transgenen Pflanzen mit Limitationen von Calvin-Zyklus-Enzymen wie Phosphoribulokinase (Paul et al., 1995), FBPase (Kossmann et al., 1994), Aldolase (Haake et al., 1998) und SBPase (Harrison et al., 1998) änderte sich stets das Gleichgewicht zwischen den Kohlenstoffflüssen in Saccharose und Stärke zugunsten von Saccharose. In den *cue1*-Mutanten konnte dagegen keine Verlagerung der Kohlenstoffflüsse zwischen Stärke und Saccharose festgestellt werden (s. 3.5.1). Abgesehen davon war die Akkumulation von Saccharose und Stärke in *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen während der Lichtperiode in gleichem Ausmaß vermindert (s.o.). Auch bei der reduzierten Produktion von Kohlenhydrat-Reserven scheint es sich um einen unspezifischen Effekt in den *cue1*-Mutanten zu handeln. Insbesondere die Verringerung der Hexosephosphatgehalte in den starken *cue1*-Mutanten *cue1-1* und *cue1-6* gegenüber den Kontrollen reflektieren die zu gleichen Teilen reduzierte Saccharose- und Stärkebiosynthese. Bei einer Kompromittierung der Stärkebiosynthese in *starch free1 (stfl)*-Mutanten mit einem Defekt in der plastidären Phosphoglukomutase (Kofler et al., 2000) wurde eine dramatische Erhöhung der Hexosephosphatgehalte, insbesondere der Glk6P-Gehalte, gegenüber den Kontrollen beobachtet, die auf die fehlende Aktivität der plastidären Phosphoglukomutase zurückgeführt wurden. Ein ähnliche metabolische Beeinflussung der Stärkeakkumulation in *cue1*-Mutanten kann daher ausgeschlossen werden, weil die Änderungen der Hexosephosphatgehalte zwischen den *cue1*-Mutanten und den Kontrollen völlig anders ausgeprägt waren (s 3.5.4) als z.B. in den *stfl*-Mutanten.

Ein weiterer Einflußfaktor auf die Stärkebiosynthese ist die Aktivität der AGPase, die allosterisch über das Verhältnis 3-PGA-P_a reguliert wird (Preiss, 1991). Das in Gesamtblattextrakten von *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen sehr signifikant zugunsten von P_a verschobene 3-PGA-P_a-Verhältnis scheint nicht die Konzentrationsverhältnisse im Chloroplasten widerzuspiegeln. Ansonsten wären viel deutlichere Effekte auf die Stärkebiosynthese zu erwarten, weil die Aktivität der AGPase durch das verringerte 3-PGA-P_a-Verhältnis im Stroma nach unten moduliert wäre.

Die folgende Erklärung für den in den *cue1*-Mutanten veränderten Hexosephosphatgehalte scheint plausibler: die Stärke- und Saccharosebiosynthese bedienen sich der Hexosephosphate in gleicher biochemischer Strategie, laufen aber in verschiedenen

Zellkompartimenten ab, so daß eine Verringerung der Gesamtgehalte an Hexosephosphaten das Resultat eines konzertierten Effektes auf beide Biosynthesewege sein muß. Wäre einer der beiden Synthesewege zugunsten des anderen erniedrigt, so würden sich die jeweiligen Veränderungen der Hexosephosphatmengen aufheben, wie dies von Haake et al. (1998) in *antisense*-Aldolase-Pflanzen beobachtet worden ist. Sowohl die verminderten Gehalte an Calvin-Zyklus-Intermediaten als auch die niedrigeren Gehalte an Hexosephosphaten, Stärke und Saccharose in den *cue1*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen können als Konsequenz eines prinzipiellen, durch die rückständige Chloroplastenentwicklung und die damit verbundene verringerte Photosynthesekapazität (s. 4.1.3) vermittelten Effektes verstanden werden.

Besonderer Bedeutung bei der Interpretation der Veränderungen im Primär- und Sekundärmetabolismus der *cue1*-Mutanten kommt einer neueren Studie zu, bei der Tabakpflanzen mit bis zu 75% verminderter Aktivität der plastidären Transketolase (TK) untersucht worden sind (Henkes et al., 2001). Über die Transketolase wird u.a. Ery4P im Calvin-Zyklus gebildet, das neben PEP in die Synthese von DAHP, dem ersten Intermediat des Shikimatweges, eingeht (Herrmann, 1995; Schmid und Amrhein, 1995). Tatsächlich sind in den Pflanzen mit stark verminderter Transketolase-Aktivität ähnlich starke Reduktionen der Q_A^- -Reoxidation im Licht, der Assimilationsrate, der Stärke- und Saccharosegehalte und der 3-PGA-Gehalte während der Lichtperiode wie in den *cue1*-Mutanten gefunden worden (Henkes et al., 2001). Die Gehalte an Hexosephosphaten, Fru-1,6-bP und TrioseP sind im Vergleich zu den *cue1*-Mutanten allerdings in den *antisense*-Transketolase-Pflanzen gegenüber den Kontrollen nicht verringert. Dies deutet darauf hin, daß sich die Limitationen im Calvin-Zyklus und der Stärke- und Saccharosebiosynthese in den *antisense*-Transketolase-Transformanden anders auswirken als in den *cue1*-Mutanten. Aus dem Vergleich der in den *cue1*-Mutanten beobachteten Effekte auf Calvin-Zyklus-Intermediate und Hexosephosphate mit den Veränderungen in *antisense*-Aldolase- (Haake et al., 1998), *antisense*-SBPase- (Harrison et al., 1998), *antisense*-FBPase- (Kossmann et al., 1994), *antisense*-NADP-GAPDH- (Price et al., 1995), *antisense*-RubisCO- (Rodermeil et al., 1988) und vor allem *antisense*-Transketolase-Pflanzen (Henkes et al., 2001) kann nochmals unterstrichen werden, daß die Stoffwechsellimitationen durch den AtPPT1-Defekt in den *cue1*-Mutanten nicht durch den Calvin-Zyklus begründet sind, sich aber auf die Integrität des Calvin-Zyklus auswirken. Der Einfluß der verminderten Transketolase-Aktivität auf die Gehalte an aromatischen Aminosäuren, Phenylpropanen und freien Hexosen in den *antisense*-Transketolase-Pflanzen ist jedoch ungemein stärker als in den

cue1-Mutanten (Henkes et al., 2001) und wird bei der Erörterung der Ursache des *cue1*-Phänotyps einbezogen werden.

4.1.4.2. Effekte auf die Gehalte reduzierender Zucker

Im Gegensatz zu den vorgenannten *antisense*-TK-Tabakpflanzen mit erniedrigter Transketolase-Aktivität (Henkes et al., 2001) enthielten die beiden starken *cue1*-Allele höhere Glukosegehalte als die Kontrollpflanzen (s. 3.5.2). Erhöhte Glukosegehalte wurden u.a. dann beobachtet, wenn die Saccharosesynthese aufgrund zu schwacher metabolischer Senken, wie z.B. durch erhöhte endogene Invertase-Aktivität eingeschränkt wurde (Hubert, 1989; Fichtner et al., 1993). Metabolische Senken sind heterotrophe Gewebe, die auf die Zufuhr von Assimilaten aus den autotrophen Pflanzenteilen angewiesen sind. Metabolische Senken in wachsenden Pflanzen stellen beispielsweise Apikalmeristeme und sich entwickelnde Blätter dar. Da das Wachstum von *cue1*-Blättern durch ein plastidenabhängiges Signal gehemmt wird (Li et al., 1995; Streatfield et al., 1999), kann aufgrund der höheren Glukosegehalte in den Blättern von *cue1*-Mutanten vermutet werden, daß diese durch die unzureichende Senken-Stärke sich entwickelnder Blätter bedingt sind. Die veränderte Senkenstärke in *cue1*-Mutanten kann neben der im Mesophyll von *cue1*-Mutanten kompromittierten Photosynthese als eine Hauptursache für den veränderten Blattkohlenhydratstoffwechsel angesehen werden.

4.1.4.3. Effekte auf den Pflanzenwuchs

Zusammengenommen korrelieren die Beeinträchtigungen im Primärstoffwechsel der *cue1*-Mutanten mit verringerten vegetativen und reproduktiven Wachstumsraten. Sowohl vegetatives als auch reproduktives Wachstum sind in beiden Allelen um 75% gegenüber den Kontrollen eingeschränkt (s. 3.3) - mehr als aufgrund der Restriktionen im Primärmetabolismus der *cue1*-Mutanten alleine angenommen werden kann. Ein zusätzliches Wachstumshemmnis durch Signale von den unterentwickelten *cue1*-Plastiden (Li et al., 1995; Streatfield et al., 1999), die den oben beschriebenen Indizien zufolge auch die Senkenstärke junger, heterotropher Blätter vermindern können, muß darüberhinaus vorhanden sein. Wachstumseinschränkungen, die vom rückständigen Entwicklungsstand der Plastiden ausgehen und die gesamte Pflanze beeinträchtigen, sind auch in weiteren als den von López-Juez et al. (1998) beschriebenen übrigen *cue*-Mutanten (*cue3*, *cue4*, *cue6*, *cue8* und *cue9*) beobachtet worden, so z.B. in den *albostrians*-Mutanten aus Gerste (Börner und Hess, 1993), die eine defekte plastidäre Translationsmaschinerie aufweisen,

ghost- und *dcl*-Mutanten aus Tomate, bei denen die Chloroplastenentwicklung auf der Stufe der Proplastiden zum Erliegen kommt, in *Arabidopsis gun5*-Mutanten (Mochizuki et al., 2001) sowie weiteren Chlorophyll-Biosynthese-Mutanten aus *Antirrhinum (olive)*, Hudson et al., 1993) und *Arabidopsis (hyl × gun5)*, Vinti et al., 2000; *laf6*, Møller et al., 2001).

4.1.4.4. Effekte auf die Gehalte von PEP und Pyruvat

Die Pyruvat- und PEP-Gehalte in den *cue1*-Mutanten sind vor allem deswegen besonders interessant, weil der PEP-Transport in den *cue1*-Mutanten beeinträchtigt ist. PPT-Proteine sind nur vergleichsweise gering exprimiert (Fischer et al., 1997) und der Fluß von PEP über die Chloroplastenhülle kann daher ebenfalls als recht gering angesehen werden. Dennoch ist es denkbar, daß die vermutlich veränderte Kompartimentierung des PEP in den *cue1*-Mutanten zu unterschiedlichen PEP- und Pyruvat-Gehalten und einem im Vergleich zu den Kontrollen veränderten Pyruvat-PEP-Verhältnis führen kann.

Während im Licht keine konsistenten Unterschiede zwischen den verschiedenen *cue1*-Allelen und den Kontrollen bestanden, waren die PEP-Gehalte am Ende der Dunkelperiode in den starken Allelen *cue1-1* und *cue1-6* um 75%, im schwachen Allel *cue1-3* noch um 50% gegenüber den Kontrollen reduziert. Auch die Pyruvatgehalte waren in den starken *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen um 20% bis 80% vermindert. Im Dunkeln besteht in den *cue1*-Mutanten offenbar ein starker Umsatz von Pyruvat und PEP, der sowohl während der Lichtperiode als auch in den Kontrollpflanzen nicht vorhanden ist (s. 3.5.4). Während der Lichtperiode scheint PEP in den *cue1*-Mutanten vermehrt über die PEPCase zu OAA umgesetzt zu werden und anaplerotisch in den Citrat-Zyklus einzugehen. Sowohl auf Enzym-Aktivitätsebene (s. 3.5.7) als auch auf Transkriptebene (s. 3.7) konnte eine Erhöhung der PEPCase festgestellt werden. Weiterhin scheint die Bildung von Pyruvat aus Malat in *cue1*-Mutanten während der Lichtperiode durch Verringerungen der NADP-ME- und der NADP-MDH-Aktivitäten vermindert zu sein (s. 3.5.7). Die Kohlenstoffgerüste, die in *cue1*-Mutanten im Licht in PEP und Pyruvat fließen, werden anhand dieser Indizien offenbar in OAA und Malat umgeleitet. Tatsächlich ist das Verhältnis Pyruvat-Malat in den *cue1*-Mutanten zugunsten von Malat verschoben (s. 3.5.7).

In *A. thaliana*-Pflanzen mit defektem AtPPT1 werden die soeben angesprochenen Veränderungen der Pyruvat- und PEP-Gehalte während der Dunkelperiode noch deutlicher, wenn die Daten aus den *cue1-6*/PPDK-Pflanzen betrachtet werden.

Cue1-6/PPDK-Pflanzen akkumulierten während der Lichtperiode massiv Pyruvat und PEP und konnten auch diese im Vergleich zu den *cue1*-Mutanten viel höheren Gehalte an Pyruvat und PEP während der Dunkelperiode kanalisieren (s. 3.5.4). Hierin besteht also eine Gemeinsamkeit mit den unkomplementierten *cue1*-Mutanten (s.o.). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre, daß die bei der Dissimilation der transitorischen Stärke im Dunkeln aus den Chloroplasten exportierten Kohlenstoffgerüste im Zytosol von *cue1*-Mutanten verstärkt in Pyruvat fließen, das in die Plastiden reimportiert wird und dort durch die PPDK zu PEP umgesetzt wird. Die Aktivität der PPDK ist in *cue1-6*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp tatsächlich signifikant um 30% erhöht (s. 3.5.7). Das über den zuvor beschriebenen Weg bereitgestellte PEP könnte dann während der Dunkelphase in den Shikimatweg, und somit in den Phenylpropanstoffwechsel und andere von Produkten des Shikimatweges gespeisten Stoffwechselwege eingehen, für das es im Licht offenbar nicht zur Verfügung steht. Die Messungen der Aminosäuregehalte in *cue1*-Blättern untermauern diese Vermutung. Die Gehalte der aromatischen Aminosäuren waren in *cue1*-Blättern am Ende der Dunkelperiode besonders hoch und denen der komplementierten *cue1-6*/PPDK-Pflanzen sehr ähnlich (s. 3.5.5); außerdem waren die Gehalte der von Pyruvat abgeleiteten Aminosäuren Alanin, Threonin, Valin, Methionin, Isoleucin und Lysin in Blättern der starken *cue1-1*- und *cue1-6*-Mutanten am Ende der Dunkelperiode zwischen 25% und 50% gegenüber den Kontrollen vermindert (s. 3.5.5). Auch wenn die Aminosäuregehalte keine direkten Aussagen über Stoffwechselflüsse zulassen, so scheint der Fluß von PEP und Pyruvat in die verschiedenen Aminosäuren während der Dunkelperiode aufgrund der gemessenen Metabolitgehalte zugunsten der von PEP abgeleiteten Aminosäuren verschoben zu sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch Pulsverfolgungen mit markiertem Kohlenstoff im Dunkeln durchgeführt (nicht gezeigt). Die Veränderungen in den Fraktionen der phosphorylierten Intermediate, Carbonsäuren und der Aminosäuren werden aber substantiell von anderen Intermediaten als PEP, Pyruvat und aromatischen bzw. verzweigt-kettigen Aminosäuren getragen, da die Gehalte an PEP, Pyruvat und den angesprochenen Aminosäuren nur einen Bruchteil der Gesamtfractionen ausmachen (s. 3.5.4 und 3.5.5), so daß aufgrund der Pulsverfolgungsexperimente keine Bestätigung der angenommenen hohen Flüsse durch Pyruvat und PEP im Dunkeln erfolgen kann.

In den Mais-Mutanten *opaque-2* (*o2*), in denen der Transkriptionsfaktor O2 defekt ist, konnte im Gegensatz zu den *cue1*-Mutanten u.a. eine Akkumulation von Lysin und den Aminosäuren der Aspartatfamilie im Endosperm beobachtet werden (Wang und Larkins,

2001), die über O₂ reguliert werden. Dies verdeutlicht die Rolle der Regulation der Aminosäurebiosynthesewege über Transkriptionsfaktoren wie O₂ bei der Akkumulation einzelner Gruppen von Aminosäuren, denen im Umkehrschluß auch eine Bedeutung bei der Zehrung an Aminosäuregehalten bestimmter Gruppen beigemessen werden kann, wie dies in den *cue1*-Mutanten während der Dunkelperiode beobachtet werden konnte (s.o.). Es ist also vorstellbar, daß die Repression der O₂-kontrollierten Gene in den *cue1*-Mutanten und den *cue1-6*/PPDK-Transformanten während der Dunkelperiode stärker als im Wildtyp ist.

Einen weiteren Hinweis auf höhere Stoffwechselflüsse in Aminosäuren und andere Metabolite, für deren Biosynthesen Stickstoffspeicher mobilisiert werden müssen, stellen die Gehalte an Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin in Blättern der *cue1*-Mutanten am Ende der Dunkelperiode dar, die im Vergleich zu den Kontrollen um 40% bis 90% niedriger liegen. Besonders Asparagin und Glutamin stellen ja nach Stickstoffversorgung transiente Stickstoffspeicher unter diesen hochkonzentrierten Aminosäuren dar (Galili, 1995; Lea et al., 1989; von Wettstein et al., 1995; Radwanski und Last, 1995) und könnten während der Dunkelperiode in *cue1*-Mutanten als Stickstoffquelle für die dann stattfindenden Biosynthesen aromatischer und verzweigtkettiger Aminosäuren genutzt werden (s.o.).

4.1.4.5. Effekte auf die Gehalte an freien Aminosäuren

Die während der Lichtperiode gemessenen Aminosäuregehalte in den starken *cue1*-Mutanten *cue1-1* und *cue1-6* weisen nur wenige konsistente und signifikante Unterschiede zu den Kontrollpflanzen auf; am deutlichsten ist die Verringerung der Glycin-Gehalte und die Erniedrigung der Phenylalanin-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollen (s. 3.5.5). Erstaunlicherweise sind in den starken *cue1*-Mutanten außer den Phenylalanin-Gehalten die Gehalte der anderen beiden aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin weder während der Licht- noch während der Dunkelphase gegenüber den Kontrollen verringert. Da vermutet wird, daß der Shikimatweg in den *cue1*-Mutanten durch die limitierende PEP-Versorgung eingeschränkt ist und ein Mangel an aromatischen Aminosäuren für den retikulierten Blattphänotyp in *cue1* verantwortlich ist (Streatfield et al., 1999), sollten die Gehalte aller aromatischen Aminosäuren in *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen dramatisch erniedrigt sein wie in *antisense*-TK-Tabakpflanzen (Henkes et al., 2001), bei denen die Versorgung des Shikimatweges mit Ery4P limitierend ist. In den starken *cue1*-Mutanten war aber immerhin eine konsistente Verringerung der Phenylalanin-Gehalte um

50% gegenüber den Kontrollen zu finden. Der Umsatz von Phenylalanin über die PAL stellt in Dikotyledonen den einzigen Ausgangspunkt für den Phenylpropanweg dar (Young et al., 1966; Jangaard, 1974), wobei berichtet worden ist, daß der Fluß über die PAL durch die Verfügbarkeit des Substrates Phenylalanin gesteuert wird (Da Cunha, 1987; Margna, 1977). Daher liegt die Limitation in den *cue1*-Mutanten eher bei der Versorgung des Phenylpropanstoffwechsels mit Phenylalanin. Es war folglich nur die Limitation der aromatischen Aminosäure Phenylalanin, die in den von Streatfield et al. (1999) durchgeführten Fütterungsversuchen mit aromatischen Aminosäuren aufgehoben werden konnte und nicht ein prinzipieller Mangel an allen aromatischen Aminosäuren. Tyr und Trp mußten in den Fütterungsexperimenten beigelegt werden um der ‚Generellen Aminosäure-Inhibition‘ (Bonner und Jensen, 1987) vorzubeugen, die auf der allosterischen Inhibition gemeinsam regulierter Aminosäuresynthesewege am Verzweigungspunkt beruht. Bei der Fütterung nur einer Aminosäure wird die Biosynthese anderer über den gleichen Stoffwechselweg synthetisierten Aminosäuren blockiert und führt so zu Mangelerscheinungen von nicht supplementierten Aminosäuren.

Es ist durchaus denkbar, daß die eingeschränkte Phenylalanin-Verfügbarkeit in den *cue1*-Mutanten nicht direkt mit der verminderten PEP-Versorgung des Plastiden zusammenhängt, sondern über sekundäre Effekte und Signale bewirkt wird. Bei einer mangelnden Verfügbarkeit des anderen Shikimatweg-Substrates Ery4P haben sich umfassendere Beeinträchtigungen der Gehalte an aromatischen haben (Henkes et al., 2001). Beim Vergleich der *cue1*-Mutanten mit den *antisense*-Transketolase-Pflanzen (Henkes et al., 2001) darf aber nicht außer acht gelassen werden, daß durch die verringerte Aktivität der Transketolase auch der Calvin-Zyklus limitiert wird und neben einem Mangel an Ery4P für die Speisung des Shikimatweges auch die Kohlenstoffassimilation massiv beeinträchtigt ist. Dies hätte Auswirkungen auf Biosynthesewege, die von Intermediaten des Calvin-Zyklus ausgehen. Neben einer unzureichenden Versorgung des Shikimatweges mit Ery4P könnte ein genereller Mangel an Kohlenstoffgerüsten für jegliche Art von Biosynthesen den Primär- und v.a. den Sekundärstoffwechsel in den *antisense*-TK-Tabakpflanzen nachhaltig beeinflussen. Genau aus dieser Argumentation heraus macht es Sinn, daß gerade die PEP-Versorgung als Signal für die Chloroplastenentwicklung dient, da PEP vornehmlich in die Biosynthese von Aminosäuren eingebunden ist (s. 1.5), also in Stoffwechselwege, die, verglichen mit der CO₂-Assimilation, nur geringe Flußraten im Blatt aufweisen und deren Intermediate längst nicht so vielseitig verwendet werden.

4.1.5. Veränderungen des Sekundärstoffwechsels in den *cue1*-Mutanten

Die Gehalte mehrerer verschiedener Gruppen an Sekundärmetaboliten wurden beispielhaft untersucht. Dabei wurden wie bei den Gehalten an Primärmetaboliten erwartete Unterschiede zwischen *cue1*-Mutanten und den Kontrollen gefunden, allerdings entsprachen einige der erhaltenen Resultate nicht den ursprünglichen Erwartungen.

4.1.5.1. Gehalte und Muster an UV-Schutzsubstanzen

Sowohl Flavonoide (Lois und Buchanan, 1994) als auch Sinapinsäurederivate (Shehan, 1996) fungieren als UV-Schutzsubstanzen in *A. thaliana* (Veit und Pauli, 1999) und anderen Pflanzenarten. Hier wurden beispielhaft Gehalte von UV-Schutzsubstanzen flavonoider Struktur untersucht, deren Analyse vergleichsweise einfach ist. Die Ergebnisse der Analysen sollten die Veränderungen des Sekundärmetabolismus exemplarisch widerspiegeln.

Die *cue1-1*-Mutanten reagieren aufgrund ihres unterentwickelten Photosyntheseapparates deutlich empfindlicher auf Starklicht als Wildtyp-Pflanzen (Streatfield et al., 1999), folglich sollten sie auch ohne Lichtstreß mehr UV-Schutzpigmente akkumulieren als die Kontrollen. Die Gesamtgehalte an UV-B-absorbierenden Substanzen und deren Synthese sind jedoch in beiden starken *cue1*-Mutanten um 50% gegenüber den Kontrollen verringert (s. 3.6.3). Es kann also angenommen werden, daß die Kapazität, UV-Schutzsubstanzen zu bilden, in *cue1*-Mutanten vermindert ist. Weiterhin ist anzunehmen, daß die Versorgung mit Phenylalanin für die Phenylpropan-Synthese limitierend ist (s. 4.1.4). Aus den HPLC-Profilen der acht Hauptsubstanzen läßt sich ableiten, daß die Verminderung der verschiedenen UV-Schutzsubstanzen nicht unspezifisch war, sondern daß einzelne Komponenten in den *cue1*-Mutanten völlig fehlten, andere dagegen nur geringfügig gegenüber den Kontrollen vermindert waren und ein Inhaltsstoff sogar um das Zwanzigfache gegenüber den Kontrollen erhöht war (s. 3.6.1 und 3.6.3). Bei dieser Substanz handelte es sich um ein Kaempferol-Derivat, aufgrund des aufgenommenen Absorptionsspektrums vermutlich um Kaempferol-3-O-rhamnogalaktosid-7-O-rhamnosid. In histologischen Blattschnitten konnte die Akkumulation eines Kaempferol-Derivats im Palisadenparenchym von *cue1-1*-Mutanten ersehen werden (s. 3.6.4), das in den Kontrollen nicht nachzuweisen war. Es liegt nahe zu vermuten, daß es sich hierbei um Kaempferol-3-O-rhamnogalaktosid-7-O-rhamnosid handelt. Der Grund für eine spezifische Akkumulation dieses Kaempferol-Derivates ist unklar.

Die Untersuchung Naturstoffreagenz A-induzierter Sekundärfluoreszenz in Schließzellen ergab, daß die Schließzellen von pOCA-Kontrollblättern eine gelb-orange Sekundärfluoreszenz aussenden, die Stomata in *cue1-1*-Mutanten blaßgelb bis grün-gelb fluoreszierten (s. 3.6.4). Nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie zeigte sich, daß es *cue1-1*-Blattextrakten gegenüber den Kontrollen an zwei Quercetin-Derivaten mangelte und ein drittes unterrepräsentiert war (s. 3.6.4). Der Ausfall der orangen Quercetin-Sekundärfluoreszenz kann demnach als eine Ursache des Farbumschlages in den Schließzellen von *cue1-1* im Vergleich zu den pOCA-Kontrollen betrachtet werden. Daraus läßt sich ableiten, daß die Aktivität des Enzyms Flavonoid-3'-Hydroxylase, das Kaempferol zu Quercetin umsetzt, in Blättern von *cue1-1* beeinträchtigt ist. Schließzellen des Columbia-Wildtyps und allen untersuchten Linien des Columbia-Ökotyps wiesen die gleiche gelb-grüne Sekundärfluoreszenz in Schließzellen auf wie die *cue1-1*-Mutanten (nicht gezeigt) – die in *cue1-1* fehlenden Quercetin-Derivate sind also offensichtlich verzichtbar.

In Tabakpflanzen mit einer Verminderung der Transketolase-Aktivität von mehr als 50% gegenüber dem Wildtyp wurden keine differenzierten Auswirkungen auf einzelne Phenylpropane beobachtet wie in den *cue1*-Mutanten, sondern es wurden nur generell drastisch herabgesetzte Gehalte aller aromatischen Aminosäuren und Phenylpropane, sowie Phenylpropanderivate wie Chlorogensäure (CGA), Kaffeesäure, Hydroxyzimtsäuren und Lignin festgestellt (Henkes et al., 2001), obwohl die Limitation des Sekundärstoffwechsels in den *antisense*-TK-Transformanden und den *cue1*-Mutanten ähnlich sein sollte. Tatsächlich unterscheiden sich aber auch schon die Effekte auf den Primärstoffwechsel, insbesondere auf die Gehalte an aromatischen Aminosäuren, zwischen den *antisense*-TK-Pflanzen und den *cue1*-Mutanten (s. 4.1.4), was auf die größere Bedeutung der Transketolase für den Primärmetabolismus im Vergleich zum AtPPT1 zurückgeführt werden kann. Die Limitation des Sekundärmetabolismus wird daher in den *antisense*-TK-Pflanzen vermutlich durch die Einschränkungen des Primärmetabolismus verstärkt, während für die *cue1*-Mutanten eine weniger generelle Beeinträchtigung des Stoffwechsels angenommen werden kann (s. 4.1.4.5).

Entgegen der Untersuchungsergebnisse an den *antisense*-TK-Transformanden unterscheiden sich interessanterweise die Lignin-Gehalte in den histologischen Gewebeschnitten der Infloreszenzachsen nicht zwischen den *cue1*-Mutanten und den Kontrollen (s. 3.6.4), obwohl Ligninmonomere ebenfalls über den von Phenylalanin gespeisten Phenylpropanweg gebildet wird (Lewis und Yamamoto, 1990; Holloway,

1983). Im Gegenteil: offenbar findet sich in den Kollenchymen von *cue1-1*-Infloreszenzen ein beachtlicher Anteil von Ferulasäure-Bausteinen, der nicht im Kollenchym der Kontrollpflanzen zu finden ist (s. 3.6.4). Dies scheint eine spezifische Auswirkung des *cue1-1*-Hintergrundes zu sein, denn in *cue1-6*-Mutanten ist der Einbau von Monolignolen in sekundäre Kollenchymwände nicht zu beobachten (s. 3.6.4).

4.1.5.2. Vergleichende histologische Lokalisierung von Flavonoiden und Zimtsäurederivaten mit potentieller UV-Schutzfunktion in Blättern

Unter Kenntnis der jeweils ausgesendeten Primär- und Sekundärfluoreszenzen - der Fluoreszenz nach der Komplexbildung mit batho- oder hypsochromen Agentien - kann die Verteilung verschiedener Klassen von Flavonoiden und Zimtsäurederivaten in den Zelltypen von Gewebe anhand der Fluoreszenzmikroskopie von Gewebeschnitten untersucht werden. Im Idealfall kann mit dieser Methode die Lokalisierung einzelner identifizierter Flavonoide im Gewebe bei entsprechend eindeutigen Fluoreszenzmustern aufgeklärt werden. Da die Fluoreszenzeigenschaften eines Flavonoidglykosids oder Zimtsäurederivats vornehmlich durch den phenolischen Bestandteil bestimmt werden und zumeist mehrere verschiedene Derivate eines Sekundärmetaboliten synthetisiert werden, bleibt dies jedoch die Ausnahme.

In Blattquerschnitten von *cue1-1*-Mutanten konnte im Vergleich zu den Kontrollen exemplarisch festgestellt werden, daß die Gehalte an Zimtsäurederivaten mit UV-Schutzfunktion in der oberen Epidermis von *cue1-1* nicht vermindert sind, wohl aber die dort lokalisierten Flavonoidkomponenten (s. 3.6.4). Die Gehalte an Zimtsäurederivaten des Palisaden- und Schwammparenchyms waren in *cue1-1* im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls geringer, die in der unteren Epidermis lokalisierten Flavonoide fehlten in *cue1-1* ganz (s. 3.6.4). Wie auch schon der Einbau in die verschiedenen Sekundärmetabolite und deren Gehalte vermuten lassen, sind die Änderungen in *cue1-1* gegenüber den Kontrollen sehr divers. So ist z.B. der Fluß in Kaempferol-3-O-glukosid-7-O-rhamnosid, das auch von Veit und Pauli (1999) als eins der Hauptflavonoide in *A. thaliana* beschrieben wurde, in *cue1-1*-Mutanten höher als in den Kontrollen, obwohl die absoluten Gehalte in den *cue1-1*-Mutanten nur die Hälfte betragen. Genau gegensätzlich verhält es sich mit dem anderen als Kaempferol-Derivat identifizierten Sekundärmetabolit (s.o.), dessen Gehalte in *cue1-1* übersteigen die der Kontrollen um das Zwanzigfache übersteigen, während der Einbau von ¹⁴C in dieses Kaempferol-Derivat aber nur ein Zehntel der in den Kontrollen gemessenen Werte beträgt. Die aus der Transkriptomanalyse gewonnenen Daten unterstützen weiterhin

die Annahme, daß die Effekte auf den Sekundärmetabolismus in *cue1*-Mutanten differentiell ausgeprägt sind. Einige Gene von Enzymen des Shikimatweges wie EPSP-Synthase und Prephenat-Dehydrogenase waren in den *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollen transkriptionell reprimiert, die Transkripte der Tryptophan-Synthase waren in den *cue1*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen jedoch angereichert (s. 3.7). Es ist durchaus denkbar, daß durch die verwendeten DNA-Matrizen einzelne Isoformen (Herrmann, 1995; Schmid und Amrhein, 1995) der Enzyme besser erkannt werden, die in differentiell regulierte Zweige der Phenylpropanbiosynthese (Winkel-Shirley, 1999) eingebunden sind. Außerdem sei bemerkt, daß die Tryptophan-Synthase nicht in die Bereitstellung von Vorstufen für den Phenylpropanweg eingebunden ist (Herrmann, 1995; Schmid und Amrhein, 1995) und Tryptophan bei der Untersuchung der Aminosäure-Gehalte in *cue1*-Mutanten stets gegenüber den Kontrollen erhöht war (s. 3.5.5).

Anhand der verschieden starken Reduktionen von UV-Schutzsubstanzen in *cue1-1*-Mutanten, die auf der abaxialen Seite der Blätter stärker ausgeprägt sind als auf der adaxialen Seite kann geschlossen werden, daß das Spektrum an Phenylpropanen in *cue1-1* trotz verminderter Kapazitäten bei der Synthese bedarfsorientiert reguliert wird. UV-Schutzsubstanzen der oberen Epidermis von Gerste (*Hordeum vulgare*) sind in der Lage einen Großteil der einfallenden UV-Strahlung zu absorbieren (Burchard et al., 2000). Den Phenylpropanen der oberen Epidermis von *A. thaliana* wird die gleiche zentrale Bedeutung wie denen in Gerste zukommen, so daß diese Substanzen unverzichtbar für die Pflanze sind (Lois und Buchanan, 1994). Die Deposition von Zimtsäurederivaten in der oberen Epidermis von *cue1*-Mutanten scheint gegenüber den Kontrollen weniger eingeschränkt zu sein als die Gehalte an epidermalen Flavonoiden (s.o.). Es wurde schon häufiger vermutet, daß Zimtsäurederivate einen größeren Beitrag für den UV-Schutz leisten als Flavonoide (Shehan, 1996; Chapple et al., 1992).

4.1.5.3. Die Beeinträchtigung der Anthocyanakkumulation in *cue1*-Mutanten

Anthocyane werden als Antwort auf Streß (Streatfield et al., 1999) oder Nährstoffmangel (Salisbury und Ross, 1992) gebildet und werden koordiniert mit Enzymen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels wie β -Amylase (Mita et al., 1997a; Mita et al., 1997b) oder Saccharosephosphat-Synthase (SPS) (Yanofsky et al., 1998) gebildet. Ähnlich deutlich wie die Verminderung von Phenylpropanen in allen Zelltypen von *cue1*-Infloreszenzachsen ist die verringerte Fähigkeit von *cue1-6*-Mutanten Anthocyane bei Staunässe zu akkumulieren (s. 3.6.5). Die enge Verknüpfung der Anthocyanakkumulation mit dem Kohlenhydrat-

Stoffwechsel war auch unter anaerobem Streß durch Staunässe zu beobachten, denn die Akkumulation von Anthocyanen in Blättern korrelierte unabhängig von der untersuchten Pflanzenlinie stets mit den Gehalten an Stärke und freien Zuckern und Glk6P am Ende der Dunkelperiode (s. 3.6.5), wobei die *cue1-6*-Mutanten die geringsten Gehalte aufwiesen. Bei deregulierter, permanenter Produktion von Anthocyanen in den Mutanten *hp-2* (Mustilli et al., 1999) bzw. dem *Arabidopsis*-Homolog *det1* (Chory et al., 1989; Chory und Peto, 1990), *fus6* (Castle und Meinke, 1994) und *fhy3-1* (Yanofsky et al., 2000) ist stets die Rotlichtperzeption über Phytochrom A gestört und durch ein konstitutives Signal ersetzt, so daß diese Mutanten auch ohne Lichteinwirkung Photomorphogenese zeigen. Die exakte Funktion der betroffenen Proteine ist jedoch in keiner der genannten Mutanten bekannt, bisweilen sind lediglich einige Interaktionspartner von Homologen aus Tieren bekannt (Spain et al., 1996). Die Anthocyanakkumulation bei *fus6* (Castle und Meinke, 1994) und *hp-2* (Mustilli et al., 1999) geht einher mit einer Entwicklung der Proplastiden zu Chloroplasten im Dunkeln. Im Umkehrschluß ist daher abzuleiten, daß die Unterentwicklung der Plastiden in *cue1* in der Lage ist, die Antwort auf Phytochrom-Signale derart zu hemmen, daß die Anthocyanakkumulation unterbleibt. Darüberhinaus ist schon von Li et al. (1995) gezeigt worden, daß die CAB-Expression in *cue1-1*-Mutanten nicht mehr durch Rotlicht angesteuert werden kann. Interessanterweise sind auch *fus6*-Mutanten nicht mehr fähig, CAB-mRNA auf Lichteinwirkung hin zu bilden (Castle und Meinke, 1994). Offenbar agieren das *fus6*-Genprodukt, ein hydrophiles Protein mit Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle, und der AtPPT1 antagonistisch im gleichen Signalweg, da Mutationen in beiden Genen hyposensitive Antworten auf Phytochrom bedingen, die *fus6*-Mutanten aber Anthocyane akkumulieren während die *cue1*-Mutanten diese Fähigkeit nicht mehr besitzen.

4.2. Einfluß der in *cue1*-Mutanten exprimierten Transgene auf den Metabolismus

4.2.1. Überblick über die Komplementationsstrategien

Die physiologische Komplementation des *cue1*-Blattphänotyps birgt ein enormes Potential, um die Ursache des Phänotyps aufzuklären, den der Defekt des AtPPT1 hervorruft. Geht dies nur durch einen funktionellen PPT, reicht schon die Bereitstellung von PEP im Plastiden aus, oder gibt es gar Möglichkeiten, die Ausbildung des Blattphänotyps über die Mutation eines zweiten Gens verhindern?

Durch die konstitutive Überexpression des heterologen PPT aus Blumenkohl-Infloreszenzen konnte nicht nur der *cue1*-Blattphänotyp kuriert und die Einschränkungen im Blattkohlenhydrat-Stoffwechsel der *cue1*-Mutante revertiert werden, sondern auch das vegetative und reproduktive Wachstum, sowie die Gehalte an freien Aminosäuren über die Spezifikationen des Wildtyps gehoben werden (s. 3.3, 3.5.2 und 3.5.5). Es zeigt sich also, daß auch ein heterologer PPT die Aufgaben des AtPPT1 in vollem Ausmaß übernehmen kann.

Besonders interessant ist die phänotypische Komplementation der *cue1*-Mutante durch die alternative Bereitstellung von PEP im Stroma durch die Überexpression von PEP-synthetisierenden Enzymen. (1) Durch die Überexpression der PEP-Synthetase (PEPS) aus *E. coli* konnte der retikulierte Blattphänotyp der *cue1-6*-Mutante nicht kuriert werden (s. 3.1.2). In den *cue1-6*/PEPS-Pflanzen konnte jedoch außer der Integration des Transformationskonstruktes weder das PEPS Protein noch die PEPS-Aktivität in den Transformanden nachgewiesen werden (s. 3.1.2). Der definitive Nachweis, daß der retikulierte *cue1*-Blattphänotyp durch die Überexpression der PEPS nicht komplementiert werden kann, steht also noch aus. (2) Der retikulierte *cue1*-Blattphänotyp konnte aber durch die Überexpression der *Flaveria trinervia* C₄-PPDK in den Plastiden der *cue1-6*-Mutanten revertiert werden (s. 3.1.2). Demzufolge ist noch nicht einmal das PPT-Protein selbst für die Komplementation des Blattphänotyps vonnöten, sondern es reicht aus, die Versorgung der Plastiden mit PEP wiederherzustellen. Obwohl die Überexpression der PPDK viele Aspekte des *cue1*-Phänotyps kurieren konnte, waren in den *cue1-6*/PPDK-Transformanden auch weitere Restriktionen des Stoffwechsels zu beobachten, die im folgenden dargelegt und erläutert werden sollen.

Über die chemische Mutagenese zweier verschiedener *cue1*-Populationen mit EMS wurde versucht ein Gen zu finden, dessen Mutation den retikulierten Blattphänotyp der *cue1*-Mutante kurieren kann. Diese Strategie war jedoch nicht erfolgreich (s. 3.1.5). Es ist trotzdem denkbar, daß ein solches Gen existiert, es aber aufgrund der zu geringen Größe der mutagenisierten Populationen von 12.500 Samen in der M₁ nicht gefunden werden konnte. In der Theorie sollte bei der gewählten Populationsgröße im Schnitt mehr als eine Mutation pro Individuum zu finden sein (Lightner und Caspar, 1992), wobei mehr als drei Viertel des Genoms abgedeckt sind. Häufig zu erwartende Mutationen waren in der zu erwartenden Frequenz in der M₂ zu beobachten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Mutagenese prinzipiell erfolgreich war.

4.2.2. Die Auswirkung der phänotypischen Komplementation der *cue1*-Mutanten durch verschiedene Transgene auf den Primärmetabolismus

4.2.2.1. Auswirkungen auf Wachstumscharakteristika

Durch die Überexpression von PPDK und Blumenkohl-PPT in *cue1-6* konnte nicht nur der retikulierte Blattphänotyp geheilt werden, sondern auch das vegetative und reproduktive Wachstum wiederhergestellt werden; die in den *cue1-6*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp um 75% reduzierte Wachstumsrate war in *cue1-6*/PPDK auf das Dreifache gesteigert, die *cue1-6*/PPT-Pflanzen erreichten sogar ein um 50% gesteigertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (s. 3.3). Offenbar scheint die Dosis des PPT-Proteins, das in *cue1-6*/PPT konstitutiv exprimiert wird, eine wichtige Rolle für die Produktion von Biomasse und die reproduktive Kapazität der Pflanze zu besitzen. Daher sind Ansätze, PPT-Gene im Wildtyp überzuexprimieren, in Angriff genommen worden.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Wachstumseigenschaften der verschiedenen Linien ist, daß durch die Überexpression der *Flaveria trinervia*-PPDK in *cue1-6* klare positive Effekte erzielt werden konnten, sich aber bei der Erhöhung der endogenen PPDK-Aktivität des Wildtyps auf mehr als das Doppelte durch die Transformation mit dem gleichen Konstrukt ein drastisch reduziertes reproduktives Wachstum und Sterilität der Transformanden ergab (s. 3.1.3). Mehr als eine zweieinhalbfache Steigerung der PPDK-Aktivität konnte in Wildtyp-Transformanden nicht erreicht werden. Bei der Überexpression der C₄-PPDK aus Mais in *Arabidopsis* (Ishimaru et al., 1997) oder der Überexpression der *Mesembryanthemum cristallinum*-PPDK in Tabak (Sheriff et al., 1998) wurden ähnlich geringe Erhöhungen der PPDK-Aktivität durch das Transgen erzielt und auf eine strikte posttranslationale Regulation des eingeführten Enzyms zurückgeführt (Ishimaru et al., 1997). Die reproduktiven Fähigkeiten der Transformanden sind in dieser Studie nicht untersucht worden (Ishimaru et al., 1997). Im Gegensatz dazu konnte die aus *cue1-6* extrahierbare PPDK-Aktivität durch die Expression der *Flaveria trinervia*-PPDK um mehr als das Fünffache gesteigert werden und hatte darüberhinaus einen durchweg positiven Einfluß auf die Wachstumseigenschaften der Mutante (s. 3.1.2, s.o.), was auf eine geringere Modulation der -Aktivität des PPDK-Transgens im *cue1-6*-Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp schließen läßt. Eine geringere Modulation der PPDK-Aktivität ist in *cue1-6*PPDK auch notwendig, da die *cue1-6*/PPDK-Pflanzen erst bei einer Erhöhung der endogenen PPDK-Aktivität um mehr als das Vierfache einen deutlichen Nutzen aus der PPDK-Überexpression ziehen, der zum Verschwinden des retikulierte Blattphänotyps

führt. Verringerte sich die PPDK-Aktivität in den *cue1-6*/PPDK-Komplementanden während des vegetativen Wachstums unter die Schwelle der Vierfachen endogenen PPDK-Aktivität, so zeigte sich der retikulierte Blattphänotyp der *cue1*-Mutante an den Blattbasen wachsender Blätter, deren Spitze Wildtyp-ähnlich aussah (s. 3.1.2). Es wurde nicht untersucht, ob diese Effekte auf eine transkriptionelle Stilllegung des Transgens zurückzuführen waren.

4.2.2.2. Auswirkungen der PPDK-Überexpression auf Photosyntheseeigenschaften und den Calvin-Zyklus von *cue1-6*/PPDK-Komplementanden

Entgegen den phänotypischen Beobachtungen an den *cue1-6*/PPDK-Transformanden waren die Photosyntheseeigenschaften in *cue1-6*/PPDK im Vergleich zu den untransformierten Mutanten keineswegs verbessert (s. 3.4.1). Die in den *cue1-6*-Mutanten nur tendentiell gegenüber dem Wildtyp verringerte ETR war in Blättern von *cue1-6*/PPDK um 30% gegenüber den *cue1-6*-Mutanten reduziert. Außerdem verlief die Q_A^- -Reoxidation in *cue1-6*/PPDK noch langsamer und unvollständiger ab als in den *cue1-6*-Mutanten. Es stellt sich daher die Frage, warum die *cue1-6*/PPDK Transformanden, deren Phänotyp kuriert worden ist und deren Wachstumseigenschaften gegenüber den Mutanten deutlich verbessert worden sind, derartige Einschränkungen der Photosyntheseleistung aufweisen. Anhand weiterer Untersuchungen und Beobachtungen an den *cue1-6*/PPDK-Pflanzen konnten Indizien zusammengetragen und eine schlüssige Hypothese über diese Phänomene formuliert werden, die durch wenige weitere Messungen erhärtet werden könnte.

(1) Aus q_N -Induktionskinetiken war ersichtlich, daß die nach einigen Minuten erreichten q_N -Werte in *cue1-6*/PPDK über denen des Wildtyps und der *cue1-6*-Mutante lagen (s. 3.4.1). q_{NE} ist die anteilig bedeutendste Komponente von q_N , deren Betrag mit dem Gefälle des über die Thylakoidmembran anliegenden pH-Gradienten korreliert (Krause et al., 1993). Je steiler der pH-Gradient über die Thylakoidmembran ist, desto mehr Reduktionsäquivalente und ATP werden durch den Elektronentransport gewonnen. Eine Erhöhung des pH-Gradienten kann außer durch einen verstärkten Q-Zyklus, bei dem die Ausbeute der über die Thylakoidmembran verbrachten Protonen am Cyt- b_6/f -Komplex verdoppelt wird (Sackstedter et al., 2000; Cornic et al., 2000) und den zyklischen Elektronentransport am PS I auch durch die Mehler-Reaktion entstehen, bei der molekularer Sauerstoff direkt von PS I zu Superoxidradikalen reduziert wird (Mehler, 1951), die dann durch Antioxidantien unter Verbrauch von reduziertem Ferredoxin und Protonen im Stroma in H_2O überführt werden (Asada, 1999). Das Potential, ATP über die

ATP-Synthase zu gewinnen, ist unabhängig von der Ursache für die Erhöhung von q_N in den *cue1-6*/PPDK-Pflanzen gesteigert. Tatsächlich kann eine verstärkte Mehler-Reaktion als Ursache für die höheren q_N -Werte nicht ausgeschlossen werden, da das am Ende des Lichtstresses gemessene q_I , die Maß für die Photoinhibition, in *cue1-6*/PPDK gegenüber dem Wildtyp und den *cue1-6*-Mutanten signifikant erhöht war. (2) Das Chlorophyll a/b-Verhältnis war in *cue1-6*/PPDK-Pflanzen gegenüber Wildtyp und *cue1-6*-Mutante erhöht (s. 3.4.1), was den Rückschluß zuläßt, daß sich in *cue1-6*/PPDK-Thylakoiden im Vergleich zu den beiden anderen Linien anteilmäßig mehr Photosystem I als II befindet, da an Photosystem I in Relation zu Photosystem II mehr Chlorophyll a als Chlorophyll b-Chromophoren gebunden sind (Zouni et al., 2001; Krauss et al., 1996). Der Anstieg des Chlorophyll a/b-Verhältnisses in *cue1-6*/PPDK kann aber auch dadurch erklärt werden, daß pro PS I- und PS II-Reaktionszentrum weniger Antennenkomplexe vorhanden sind, wie dies in Tabak-Transformanden mit geringerer Mg-Chelatase-Aktivität gefunden wurde (Papenbrock et al., 2000). Tatsächlich war der Chlorophyllgehalt in *cue1-6*/PPDK-Blättern tendentiell geringer als im Wildtyp und den *cue1-6*-Mutanten (s. 3.4.1), was auf eine geringere Anzahl an Antennenpigmenten zurückgeführt werden könnte, experimentell aber belegt werden müßte. Zusammengenommen bedeuten die Aussagen (1) und (2), daß in *cue1-6*/PPDK-Blättern im Vergleich zum Wildtyp oder *cue1-6* mehr Elektronen durch Photosystem I als durch Photosystem II fließen, so daß pro gespaltenem H₂O-Molekül mehr ATP gebildet wird als im Wildtyp oder in *cue1-6*.

(3) Darüberhinaus war das 3-PGA/ TrioseP-Verhältnis in Blättern von *cue1-6*/PPDK gegenüber dem Wildtyp und den *cue1-6*-Mutanten um das Fünffache erhöht. Ein derartiges Ungleichgewicht zugunsten von 3-PGA zeigt an, daß ein Mangel an ATP bzw. Reduktionsäquivalenten für die Umsetzung von 3-PGA zu TrioseP besteht, genauso wie die Verschiebung des 3-PGA/ TrioseP-Verhältnisses in die andere Richtung Limitationen in der regenerierenden Phase des Calvin-Zyklus anzeigen kann (Kossmann et al., 1994, Harrison et al., 1998; Haake et al., 1998; Price et al., 1995). In Pflanzen mit erniedrigter Aktivität des Cytochrom-b₆/f-Komplexes und einer verringerten Produktion von Reduktionsäquivalenten konnte wie in den *cue1-6*/PPDK-Transformanden eine Limitation in der carboxylierenden bzw. reduzierenden Phase des Calvin-Zyklus aufgezeigt werden, die allerdings durch die Messung des RubP-3-PGA-Verhältnisses bestimmt wurde (Ruuska et al., 2001). (4) Der K_M -Wert der *Flaveria trinervia*-PPDK für ATP liegt mit 90 bis 100 μ M (Nakamoto und Edwards, 1990) unter den K_M -Werten der AGPase (190 μ M; Fuchs et al., 1979) und plastidären Phosphoglyceratkinase (220 bis 420 μ M, Köpke-

Secundo et al., 1990) für ATP. Die PPDK ist also durch ihre höhere Affinität zu ATP in der Lage PGK und AGPase mit ATP auszuhungern. Obwohl die Photophosphorylierung in *cue1-6*/PPDK gegenüber den Kontrollen potentiell erhöht ist, ist sie wohl nicht in der Lage, alle um ATP konkurrierenden Reaktionen im Stroma mit ATP zu versorgen, so daß sich z.B. 3-PGA anstaut, weil der Zugriff der PGK auf ATP gelockert ist (s. (3)). Das durch die in *cue1-6*/PPDK erhöhte Photophosphorylierung zusätzlich bereitgestellte ATP (s. (1) und (2)) fließt vermutlich in die neu etablierte PPDK-Reaktion, da die PPDK im Vergleich mit AGPase und PGK den niedrigsten K_M -Wert für ATP aufweist. Weil die Aktivität des eingebrachten PPDK-Transgens im *cue1-6*-Hintergrund konstitutiv ist (s.o.), akkumulieren demzufolge während der Lichtphase PEP und Pyruvat in *cue1-6*/PPDK-Blättern (s. 3.5.4). Die maximal aus *cue1-6*/PPDK-Pflanzen extrahierbare PPDK-Aktivität ist jedoch deutlich höher als sie *in vivo* sein kann. Unter Vernachlässigung der Photorespiration kann vorausgesetzt werden, daß pro fixiertem CO_2 mindestens 3 ATP produziert und durch den Calvin-Zyklus umgesetzt werden – dies ergibt eine minimale ATP-Produktion von $8,6 \mu\text{mol}\cdot\text{g FG}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, die in die CO_2 -Fixierung im Calvin-Zyklus eingeht. Anhand der maximalen aus den *cue1-6*/PPDK-Transformanten extrahierbaren PPDK Aktivität von $43,1 \text{ mU}\cdot\text{mg Protein}^{-1}$ für die stärksten Überexprimierer, kann ein ATP-Bedarf von $293,1 \mu\text{mol}\cdot\text{g FG}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ für eine vollkommen aktivierte PPDK errechnet werden. Da dies etwa 35-mal mehr ist als die minimal anzunehmende ATP-Produktion durch die Photophosphorylierung, muß die *in vivo* PPDK-Aktivität in *cue1-6*/PPDK weit unter der gemessenen Maximalaktivität liegen. Überträgt man dieses Gedankenspiel auf die Daten aus Col-0, so liegt der errechnete ATP-Verbrauch der PPDK immerhin noch um das 15-fache über der zugrundegelegten basalen ATP-Produktion. Beim Vergleich der Berechnungen für *cue1-6*/PPDK und Col-0 zeigt sich jedoch, daß das Potential des ATP-Verbrauchs durch die PPDK im Verhältnis zur geschätzten ATP-Produktion in *cue1-6*/PPDK mehr als doppelt so hoch ist wie im Wildtyp. Anhand dieses Rechenexempels kann es als wahrscheinlich angesehen werden, daß *cue1-6*/PPDK-Pflanzen einen höheren ATP-Bedarf haben als Wildtyp-Pflanzen.

In C_4 -Pflanzen wird die PPDK-Aktivität posttranslational über reversible Phosphorylierung und durch AMP als allosterischem Inhibitor reguliert (Smith et al., 1994; Nakamoto und Edwards, 1983) In weiteren nicht gezeigten Experimenten wurde der Einfluß von Licht-Dunkel-Wechseln und der Einfluß des allosterischen Regulators AMP auf die aus *cue1-6*/PPDK-Rosetten extrahierbare PPDK-Aktivität im Vergleich zur PPDK aus Mais-Blättern untersucht und festgestellt, daß weder AMP noch Belichtung einen meßbaren

Unterschied auf die *Flaveria trinervia*-PPDK-Aktivität in *cue1-6*/PPDK-Pflanzen hatte. Zumindest scheint die Regulation der *Flaveria trinervia*-PPDK-Aktivität in *cue1-6*/PPDK-Pflanzen über reversible Phosphorylierung nicht zu funktionieren.

Der negative Einfluß auf den Calvin-Zyklus bzw. auf alle ATP-verbrauchenden Reaktionen im Stroma mag einen Grund dafür darstellen, daß die endogene plastidäre PPDK-Aktivität in C₃-Pflanzen sehr niedrig ist (Ishimaru et al., 1997; Ishimaru et al., 1998) und in C₄-Pflanzen nur in Plastiden des Mesophylls, nicht aber in denen der Bündelscheidenzellen zu finden ist, wo der Calvin-Zyklus abläuft (Hatch, 1987).

Weitere ATP-abhängige Enzyme im Stroma von Chloroplasten, wie z.B. die Phosphoribulokinase (PRK) sind in der vorstehenden Argumentation vernachlässigt worden, da mit der PGK bzw. der AGPase schon zwei Kandidaten behandelt worden sind, die aufgrund einer potentiell zu geringen Affinität zu ATP im Vergleich zur eingebrachten *Flaveria trinervia*-C₄-Typ-PPDK die Stoffwechselflüsse durch die jeweiligen Substratketten limitieren könnten.

4.2.2.3. Der Stoffwechsel von Pyruvat und PEP in den *cue1-6*/PPDK-Pflanzen

Das in Blättern von *cue1-6*/PPDK akkumulierte PEP und Pyruvat wird offenbar während der Dunkelperiode metabolisch abgeführt, so daß sich die PEP- und Pyruvat-Gehalte in *cue1-6*/PPDK zum Ende der Dunkelperiode nicht mehr signifikant von den Gehalten im Wildtyp und *cue1-6* unterscheiden (s. 3.5.4). Dafür kommen zwei Mechanismen in Frage. Zum einen könnten Pyruvat und PEP während der Dunkelperiode in die Aminosäuresynthese eingehen, wie dies für die *cue1*-Mutanten angenommen wurde (s. 4.1.4), zum anderen könnten die beiden Metabolite auch in den Mitochondrien veratmet werden. Die erste Alternative erscheint unwahrscheinlich, da in *cue1-6*/PPDK viel mehr PEP und Pyruvat für die Aminosäurebiosynthese zur Verfügung stehen als in *cue1*-Mutanten, so daß auch mehr transiente Stickstoffspeicher wie die Aminosäuren Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin während der Dunkelperiode gezehrt werden müßten. Die Gehalte der sauren Aminosäuren und der Säureamid-Aminosäuren waren in *cue1-6*/PPDK gegenüber dem Wildtyp am Ende der Dunkelperiode aber so gut wie unverändert und sogar eher leicht erhöht (s. 3.5.5). Die Möglichkeit zur Kanalisierung der angestauten Pyruvat- und PEP-Mengen durch Veratmung erscheint aufgrund der Datenlage viel wahrscheinlicher, da die polarographisch gemessene apparente Dunkelatmung in *cue1-6*/PPDK-Blättern doppelt so groß war wie in *cue1-6* und den Wildtyp und sich signifikant von der in *cue1-6*- oder Wildtyp-Blättern bestimmten apparenten

Dunkelrespiration unterschied (s. 3.4.1). Sicherlich kann die erhöhte apparente Dunkelrespiration in *cue1-6*/PPDK auch eine andere als die soeben dargelegte Ursache haben, allerdings erscheint die zuvor gegebene Begründung schon aufgrund der in (1) bis (4) (s. 4.2.2.2) geschilderten Zusammenhänge plausibel. An den gemessenen PEP- und Pyruvat-Gehalten ist bemerkenswert, daß sich das Verhältnis von PEP zu Pyruvat in Blättern von *cue1-6*/PPDK nicht signifikant vom Verhältnis im Wildtyp unterschied (s. 3.5.4), obwohl angenommen werden kann, daß das Pyruvat-PEP-Gleichgewicht im Plastiden von *cue1-6*/PPDK weit auf der Seite von PEP liegt, da die PPDK eine unter physiologischen Bedingungen irreversible Reaktion katalysiert (Hatch und Slack, 1968). Obwohl zwischen *cue1-6*/PPDK-Blättern und Blättern des Wildtyps keine signifikanten Unterschiede der Aktivitäten der zytosolischen und plastidären Pyruvat-Kinase (PK) gefunden wurden, die an den pH-Optima der zytosolischen und plastidären Isoform gemessen wurden, könnte der Fluß durch die plastidäre PK in *cue1-6*/PPDK trotzdem erhöht sein. Dadurch könnte ein Teil des durch die PPDK gebildeten PEP und ADP - das über die NTP-Kinase aus AMP, dem Produkt der PPDK-Reaktion bereitgestellt würde - in Pyruvat und ATP zurückführen. Unter diesen Voraussetzungen wäre der ATP-Bedarf im Stroma nicht höher als im Wildtyp, da die antagonistischen Reaktionen der PPDK und PK lediglich die Substrate des jeweils anderen Enzyms regenerierten. Da jedoch mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden kann, daß sowohl die ATP-Produktion als auch der -Bedarf in den *cue1-6*/PPDK-Transformanten gegenüber dem Wildtyp und den *cue1-6*-Mutanten erhöht sind, scheint dieser ping-pong-Umsatz von Substraten *in vivo* nicht ganz vollständig abzulaufen; unter Umständen könnte die Bildung von ADP aus AMP im Chloroplasten für dieses Szenario limitierend sein. Es ist allerdings noch keine pflanzliche NTP-Kinase biochemisch charakterisiert worden, so daß errechnet werden könnte, ob die NTP-Kinase-Aktivität limitierend für die zuvor dargestellten Rückführung von PEP in Pyruvat über die PK sein könnte.

Aus diesen Überlegungen folgt, daß sich zumindest ein Teil des Pyruvats in einem anderen Zellkompartiment als dem Plastiden anstaut und daß dort die Gleichgewichtslage zwischen Pyruvat und PEP zugunsten von Pyruvat verschoben sein muß. Die Akkumulation von Pyruvat im Zytosol ist denkbar, allerdings kommuniziert der zytosolische Pyruvat-*pool* über einen Transporter mit dem plastidären Pyruvat-*pool* (Proudlove und Thurman, 1981), so daß rückwirkend auch die Pyruvat-Menge im Stroma ansteigen würde. Da keine subzellulären Gehalte von Pyruvat und PEP bestimmt worden sind, kann über die räumliche Verteilung von Pyruvat und PEP nur spekuliert werden.

4.2.2.4. **Veränderungen von ausgesuchten Enzymaktivitäten des Primärstoffwechsels in *cue1-6*/PPDK**

Die Veränderung einer Enzymaktivität zieht nur dann eine Veränderung der Stoffwechselflüsse entlang von Substratketten nach sich, wenn die entsprechende Enzymaktivität limitierend für den Substratfluß durch diese Kette war oder wird.

Die Akkumulation von Pyruvat und PEP bzw. die in *cue1-6*/PPDK eingebrachte PPDK-Aktivität beeinflussen tatsächlich die Aktivitäten einiger anderer Enzyme des Primärstoffwechsels (s. 3.5.7). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der NADP-GAPDH, der NADP-MDH und des NADP-ME negativ mit der Aktivität der *Flaveria trinervia*-PPDK in verschiedenen *cue1-6*/PPDK-Linien korrelierten. Eine Verringerung der Aktivität des NADP-ME konnte auch bei der Überexpression von C₄-Typ-PPDK in *Arabidopsis*-Wildtypen beobachtet werden (diese Arbeit, 3.5.7; Ishimaru et al., 1997); der Einfluß der C₄-PPDK-Aktivität auf NADP-GAPDH und NADP-MDH ist in transgenen Tabak- (Sheriff et al., 1998), Kartoffel- (Ishimaru et al., 1997) und *Arabidopsis*-Pflanzen (Ishimaru et al., 1998), die PPDK überexprimieren, nicht untersucht worden.

Die Aktivitäten der NADP-MDH und des NADP-ME sind auch in *cue1*-Mutanten erniedrigt (s. 4.1.4). Die Bildung von Pyruvat könnte in *cue1-6*/PPDK durch die Verringerung der Aktivitäten von NADP-MDH und NADP-ME zugunsten von Malat vermindert sein, um einer weiteren Produktion von PEP aus Pyruvat entgegenzuwirken und die damit verbundene Notwendigkeit ATP zu verbrauchen zu umgehen. Obwohl sich die relativen Gehalte von PEP, Pyruvat und Malat zueinander in *cue1-6*/PPDK zu Beginn der Lichtperiode nicht signifikant von denen des Wildtyps unterscheiden, konnte eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen PEP, Pyruvat und Malat in Kartoffelpflanzen beobachtet werden, die eine Mais-C₄-PPDK überexprimieren (Ishimaru et al. 1998): in den PPDK-überexprimierenden Kartoffelpflanzen wurden höhere Malat-Gehalte und ein zugunsten von PEP verschobenes Pyruvat-PEP-Gleichgewicht gefunden. Es ist möglich, daß diese Verschiebungen der Metabolitkonzentrationen aufgrund von veränderten Stoffwechselflüssen im *cue1-6*-Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp nicht deutlich werden.

Die Verringerung der NADP-GAPDH-Aktivität in *cue1-6*/PPDK im Vergleich zum Wildtyp läßt sich physiologisch nicht direkt ansehen. Die Aktivität der Phosphoglyceratkinase, die der NADP-GAPDH im Calvin-Zyklus vorgeschaltet ist, wird über das 3-PGA-ATP-Verhältnis reguliert (Bas sham und Krause, 1969; Leegood, 1990),

das in *cue1-6*/PPDK-Blättern gegenüber Wildtyp-Blättern stark in Richtung 3-PGA verschoben ist, was eine allosterische Inaktivierung der PGK zur Folge hätte (Bassham und Krause, 1969; Leegood, 1990). Obwohl die Aktivität der plastidären NADP-GAPDH nicht über Metabolite reguliert ist, könnte eine Inhibition der PGK-Aktivität auch die NADP-GAPDH-Aktivität negativ beeinflussen, da die Edukte und Produkte der PGK- und NADP-GAPDH-Reaktion sich fast im thermodynamischen Gleichgewicht befinden (Dietz und Heber, 1984 und 1986).

4.2.2.5. Der Einfluß der PPDK-Überexpression auf den Kohlenhydratstoffwechsel in Blättern von *cue1-6*/PPDK- und *cue1-6*/PPT-Pflanzen

Die Störung des plastidären Stoffwechsels durch die konstitutiv aktive PPDK schlägt sich auch im Saccharose- und Stärkemetabolismus der *cue1-6*/PPDK-Pflanzen nieder. Während die in *cue1-6* gefundenen Veränderungen des Saccharose- und Stärkemetabolismus durch die Expression des Blumenkohl-PPTs auf Wildtypwerte revertiert werden konnten, blieb die Akkumulation von Saccharose und Stärke während der Lichtperiode in *cue1-6*/PPDK im Vergleich zum Wildtyp fast um den gleichen Anteil verringert wie in den *cue1-6*-Mutanten (s. 3.5.2). Es ist durchaus denkbar, daß die Stärkeakkumulation in *cue1-6*/PPDK durch die Konkurrenz der neu eingebrachten PPDK mit der in die Stärkebiosynthese eingebunden AGPase (Smith et al., 1997) um ATP geschmälert wird. Die Gehalte an Hexosen und Hexosephosphaten sind aber in *cue1-6*/PPDK wie auch in *cue1-6*/PPT gegenüber dem Wildtyp unverändert (s. 3.5.2 und 3.5.4). In Kartoffelknollen und Mais-Samen mit verminderter Aktivität des Adenylat-Translokators (AATP) ist die AGPase-Aktivität durch mangelnde ATP-Versorgung limitiert (Tjaden et al., 1998; Shannon et al., 1996). Im Gegensatz zu den Beobachtungen an *cue1-6*/PPDK-Blättern waren die Gehalte an freien Hexosen und Saccharose sowohl im Mais-Endosperm (Shannon et al., 1996) als auch in Kartoffelknollen um das Zwei- bis Dreifache erhöht. Auch in *A. thaliana stf1*-Mutanten, denen die plastidäre Phosphoglukomutase fehlt, konnte eine Akkumulation von freien Zuckern und Hexosephosphaten beobachtet werden (Kofler et al., 2000). Es kann daher ausgeschlossen werden, daß die Verminderung der Stärkebiosynthese in *cue1-6*/PPDK alleine durch einen Mangel von ATP ausgelöst wird.

4.2.2.6. **Veränderungen des Aminosäurestoffwechsels in *cue1-6*/PPDK- und *cue1-6*/PPT-Komplementanden**

In 4.1.4 wurde aufgezeigt, daß die im Vergleich zum Wildtyp um 50% geringeren Gehalte an Phenylalanin den Fluß durch den Shikimatweg und den Phenylpropanstoffwechsel in *cue1*-Mutanten limitieren könnten. Während die Phenylalaningehalte in *cue1-6*/PPDK gegenüber dem Wildtyp nur noch um 20% reduziert sind, waren die Phenylalaningehalte in *cue1-6*/PPT ähnlich wie im Wildtyp (s. 3.5.5). Die wiederhergestellte Bereitstellung von PEP im Plastiden stellt beiden Fällen den Schlüsselschritt für die Erhöhung der Phenylalanin-Gehalte in den Komplementanden gegenüber den *cue1-6*-Mutanten dar. Interessanterweise sind die Gehalte der beiden anderen aromatischen Aminosäuren, Tryptophan und Tyrosin, in den komplementierten *cue1*-Mutanten nicht gegenüber dem Wildtyp erhöht wie in den *cue1*-Mutanten, sondern tendentiell verringert (s. 3.5.5). Die Auswirkungen der PPDK- und PPT-Überexpression auf den aus Phenylalanin abgeleiteten Phenylpropanstoffwechsel in den *cue1*-Mutanten werden in 4.2.3 behandelt.

In *cue1-6*/PPDK-Pflanzen, nicht aber in *cue1-6*/PPT-Pflanzen, konnte außerdem während der Lichtperiode eine Verminderung der Gehalte verzweigtkettiger Aminosäuren der Pyruvat-Familie und Aminosäuren der Aspartat-Familie um 30% bis 40% gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden (s. 3.5.5). Die Regulation der Biosynthese dieser Aminosäuren ist auf Transkriptionsebene (Wang und Larkins, 2001) und auf allosterischem Wege (Galili, 1995) eng miteinander verwoben (s. 1.5.3), wobei Pyruvat in die Biosynthese von Lysin, Isoleucin, Valin und Leucin an verschiedenen Stellen des verzweigten Pfades eingeht (Bonner und Jensen, 1997; Galili, 1995) und somit einen Schlüsselbaustein darstellt, dessen Fehlen über mehrere Rückkopplungsregulationsmechanismen (Bonner und Jensen, 1997; Galili, 1995) die Syntheseraten von Aminosäuren beider Familien beeinträchtigen kann. Die Kontrolle auf die von der Aspartat-Kinase (AK) katalysierte gemeinsame Eingangsreaktion für die Biosynthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie ist in *A. thaliana* durch die Existenz einer Rückkopplungs-insensitiven AK-Isoform gelockert (Frankard et al., 1997; Heremans und Jacobs, 1994), so daß die Biosynthese von Aminosäuren der Aspartat- und Pyruvat-Familie auf niedrigem Niveau aufrecht erhalten werden kann, wenn z.B. die Threonin-sensitiven AK/HSDH-Tandemenzyme bei einem Pyruvatmangel und einer dadurch verminderten Synthese des Threonin-Antagonisten Lysin allosterisch inhibiert sind. Durch die bereits angesprochene konstitutive Aktivität der PPDK in *cue1-6*/PPDK wird nicht nur die Verteilung von ATP und die Photosyntheseleistung beeinträchtigt (s.o.), sondern auch das im Plastiden befindliche

Pyruvat statt in die Aminosäurebiosynthese in PEP geleitet. In *cue1-6*/PPDK konnte zwar auch eine Akkumulation von Pyruvat beobachtet werden, diese kann aufgrund der Gleichgewichtslage der PPDK-Reaktion (s.o.) aber nicht im Stroma auftreten, wo die Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren und Aminosäuren der Aspartat-Familie stattfindet (Kaneko et al., 1990; Frisch et al., 1991; Weisemann und Matthews, 1993; Ghislain et al., 1994; Muehlbauer et al., 1995; Samach et al., 1991; Sathasivan et al., 1990). Es ist wahrscheinlich, daß ein Mangel an Pyruvat im Stroma von *cue1-6*/PPDK-Mesophyllzellen die Ursache für die im Vergleich zum Wildtyp geringeren Gehalte an Aminosäuren der Pyruvat- und Aspartat-Familie ist. Diese Annahme wird dadurch untermauert, daß die Gehalte an Alanin, das sich direkt über eine Transaminierungsreaktion von Pyruvat ableitet, in Blättern von *cue1-6*/PPDK gegenüber dem Wildtyp um 20% verringert waren (s. 3.5.5). Auch in den Blattproben der *cue1*-Mutanten korrelierten geringere Pyruvat-Gehalte stets mit verringerten Gehalten an Alanin und Aminosäuren der Aspartat- und Pyruvat-Familie (s. 3.5.5). Daten über die Gehalte von verzweigtkettigen und aromatischen Aminosäuren in PPDK-überexprimierenden C₃-Pflanzen sind bislang nur von Tabakpflanzen bekannt, die die PPDK aus der CAM-Pflanze *Mesembryanthemum cristallinum* unter der Kontrolle CaMV35S-Promotors exprimieren (Sheriff et al., 1998). Die in der Arbeit von Sheriff et al. (1998) gefundenen Unterschiede zwischen den Gehalten der relevanten Aminosäuren in Blättern, Samen und Wurzel waren jedoch gering, uneinheitlich innerhalb der verzweigtkettigen bzw. aromatischen Aminosäuren und statistisch unsicher.

4.2.2.7. Ist die Subkompartimentierung in *cue1-6*/PPDK-Chloroplasten verändert?

Eine weiterer interessanter experimenteller Befund schließt an die von Streatfield et al. (1999) beobachteten Veränderungen von *cue1*-Mesophyllchloroplasten an. *Cue1*-Mesophyllchloroplasten sind viel kleiner gegenüber Mesophyllchloroplasten der Kontrollen, während sich die Bündelscheidenchloroplasten von *cue1*-Mutanten und den Blättern der Kontrollen nicht erkennbar unterscheiden (Streatfield et al. 1999). Tatsächlich wurden die von Li et al. (1995) durch Elektronenmikroskopie gewonnenen Ergebnisse über die Chloroplastenmorphologie bei der Bestimmung der Raumgrößen plastidärer Subkompartimente reflektiert (s. 3.4.2). Gesamtchloroplastenpräparationen aus *cue1-6* weisen pro mg Chl das 1,6-fache Volumen auf wie Wildtyp-Chloroplasten. Dies kann

durch die rückständige Entwicklung der *cue1-6*-Mesophyllplastiden und deren geringeren Chlorophyllanteil erklärt werden.

Der errechnete Stromaraum von *cue1-6*/PPDK-Plastiden liegt signifikant über denen von *cue1-6*- und Wildtyp-Plastidenpräparationen, wobei das Verhältnis von Chloroplastenvolumen zum Chlorophyllgehalt ähnlich hoch ist wie in *cue1-6*-Plastiden (s. 3.4.2). Dieser Befund könnte derart interpretiert werden, daß *cue1-6*/PPDK-Plastiden weniger Grana aufweisen als *cue1-6*-Plastiden und somit eine weiteres Indiz für einen geringeren Fluß von Elektronen durch Photosystem II in *cue1-6*/PPDK bereithalten, da Photosystem II vornehmlich in den Grana-Thylakoiden lokalisiert ist (Andersson et al., 1985; Greene et al., 1988a; Greene et al., 1988b). Um diese Hypothese zu erhärten, wären elektronenmikroskopische Studien der *cue1-6*/PPDK-Plastiden notwendig, die in naher Zukunft in Angriff genommen werden.

4.2.3. Der Phenylpropanstoffwechsel der komplementierten *cue1*-Mutanten

Die Einschränkung des Shikimatweges und der nachgeschalteten Biosynthesewege, wie z.B. des Phenylpropanweges, wurde als die Hauptursache für die Entstehung des retikulierten Blattphänotyps in den *cue1*-Mutanten angesehen, da die Bereitstellung von aromatischen Aminosäuren hinreichend war um den Blattphänotyp zu kurieren (Streatfield et al., 1999). Es stellte sich daher die Frage, ob auch schon die Re-Etablierung der PEP-Versorgung der Plastiden ausreichen würde, um zumindest den retikulierten Phänotyp der *cue1*-Mutanten zu kurieren. Wie schon unter 3.1.2 und 3.1.1 dargestellt, konnte der retikulierte Blattphänotyp der *cue1*-Mutanten durch die Überexpression eines heterologen PPT aus Blumenkohl und der *Flaveria trinervia*-C₄-Typ-PPDK aufgehoben werden. In *cue1-6*/PPDK und *cue1-6*/PPT konnten darüberhinaus auch die Eigenschaften des *cue1*-Sekundärmetabolismus positiv beeinflusst werden.

Schon bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung methanolischer Blattextrakte der verschiedenen Linien wurde deutlich, daß in *cue1-6*/PPDK-Pflanzen alle durch Sekundärfluoreszenz detektierbaren Substanzen vorhanden sind, die sich auch im Wildtyp befanden, während in *cue1*-Mutanten vier fluoreszierende Banden weniger als im Wildtyp nachgewiesen werden konnten (s. 3.6.3). Darüberhinaus fand sich in *cue1-6*/PPDK ein Flavonol-Derivat, daß im Wildtyp nicht zu finden war (s. 3.6.3). Die Gesamtgehalte an UV-Schutzsubstanzen korrelierten zwar mit der Aktivität der PPDK in *cue1-6*/PPDK, waren aber immer noch um 30% gegenüber dem Wildtyp verringert (s. 3.6.3 und 3.6.1).

Dennoch konnten die Gesamtgehalte an UV-Schutzsubstanzen im Vergleich zur *cue1-6*-Mutante in *cue1-6*/PPDK um 40% gesteigert werden.

Bei der genaueren Betrachtung des Profils an UV-Schutzsubstanzen in *cue1-6*/PPDK fällt auf, daß die Hauptkomponente, ein hydroxyliertes Flavon, in Blättern von *cue1-6*/PPDK zugunsten einiger geringer konzentrierter Substanzen im Vergleich zum Wildtyp abgereichert ist (s. 3.6.3). Daraus folgt, daß der Fluß in UV-Schutzsubstanzen in *cue1-6*/PPDK gegenüber den *cue1-6*-Mutanten stimuliert ist, die produzierten Substanzen aber keinesfalls dem Muster im Wildtyp gleichkommen. Noch deutlicher ist dies anhand des Einbaus von markiertem CO₂ in die untersuchten UV-Schutzsubstanzen festzustellen (s. 3.6.3). Die Flüsse in vier der acht in *cue1-6*/PPDK markierten Sekundärmetabolite waren im Wildtyp nicht nachzuweisen, die Flüsse in drei der restlichen vier Substanzen waren in *cue1-6*/PPDK höher als im Wildtyp (s. 3.6.3), obwohl die absoluten Gehalte aller dieser Metabolite geringer waren als im Wildtyp. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, daß die CO₂-Assimilation von *cue1-6*/PPDK-Pflanzen unter ambientem CO₂ limitierend ist und unter Hoch-CO₂-Bedingungen, die bei den Markierungsexperimenten eingesetzt wurden, überoptimal verläuft. Tatsächlich war die CO₂-Einbaurrate in *cue1-6*/PPDK unter Hoch-CO₂ auch in anderen Experimenten doppelt so groß wie im Wildtyp (s. 3.5.1). Diese Vermutung könnte leicht durch die Anzucht von *cue1-6*/PPDK und Kontrollen unter Hoch-CO₂ bestätigt werden. Auch wenn man den Kohlenstoffeinbau in UV-Schutzsubstanzen um den potentiell höheren Gesamteinbau in *cue1-6*/PPDK-Blättern korrigiert, so ist der Einbau in jene drei Sekundärmetabolite, die einen erhöhten Einbau im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, immer noch mindestens genauso groß wie im Wildtyp. Dies stellt immer noch eine Steigerung gegenüber den *cue1*-Mutanten dar. Die Induktion des Shikimat- und Phenylpropanweges in *cue1-6*/PPDK gegenüber den *cue1-6*-Mutanten und dem Wildtyp wird durch die Ergebnisse der Transkriptomanalyse unterstrichen (s. 3.7). In *cue1-6*/PPDK sind die EPSP-Synthase und die Tryptophan-Synthase transkriptionell gegenüber dem Wildtyp induziert, gegenüber den *cue1-6*-Mutanten auch die Prephenat-Dehydrogenase. EPSP-Synthase und Prephenat-Dehydrogenase sind beide in den Shikimatweg involviert (Hermann, 1995; Schmid und Amrhein, 1995), der aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin bereitstellt, das in den *cue1*-Mutanten als limitierend für den Sekundärstoffwechsel angesehen wurde (s. 4.1.4 und 4.1.5). Eine transkriptionelle Induktion von Genen des Phenylpropanstoffwechsels in *cue1-6*/PPDK gegenüber dem Wildtyp konnte allerdings nicht gezeigt werden. Dies wäre aufgrund des erhöhten Flusses in Flavonoide zu erwarten gewesen.

Die (ektopische) Bildung bestimmter Phenylpropane und Zimtsäurederivate in *cue1-6/PPDK* und *cue1-6/PPT* konnte besonders eindrucksvoll anhand der Infloreszenzquerschnitte von Wildtyp-, *cue1-6*-, *cue1-6/PPDK*- und *cue1-6/PPT*-Infloreszenzen demonstriert werden (s. 3.6.4). Während in Querschnitten von *cue1-6*-Infloreszenzen nur in wenigen Cortex-Zellen Phenylpropane über ihre Naturstoffreagenz A-induzierte Sekundärfluoreszenz nachgewiesen werden konnten, war die Vielfalt der Sekundärfluoreszenzen und die histologische Verteilung in Infloreszenzquerschnitten von *cue1-6/PPDK* und *cue1-6/PPT* breiter als im Wildtyp (s. 3.6.4). In diesem Zusammenhang sollte berücksichtigt werden, daß sich beide Linien im *cue1-6*-Hintergrund befinden, dessen Phytochrom-abhängige Antworten beeinträchtigt sind (Li et al., 1995), worunter auch die Akkumulation von Phenylpropanen wie Anthocyanen fällt (s. 4.1.5). Die für die Anthocyanakkumulation notwendige Chalkonsynthese ist transkriptionell durch viele verschiedene Stimuli induzierbar, außer durch UV- (Fuglevand et al., 1996; Lin et al., 1996) und Blau- (Fuglevand et al., 1996) auch durch Rotlicht (Barnes et al., 1996; Chory und Peto, 1990). Außerdem wird die Bedeutung des Phytochrom-Signalweges für die Akkumulation von Anthocyanen anhand von Mutanten (s. 4.1.5) des Phytochrom-Signalweges deutlich (Mustilli et al., 1999; Chory und Peto, 1990; Castle und Meinke, 1994; Yanofsky et al., 2000). Die Akkumulation von Anthocyanen und Blattkohlenhydraten durch Staunässe konnte aber sowohl in *cue1-6/PPDK* als auch in *cue1-6/PPT* wiederhergestellt werden (s. 3.6.5). Es ist daher verwunderlich, daß die Anthocyanakkumulation in *cue1-6/PPDK* wiederhergestellt werden konnte, wenn das von der Plastidenentwicklung ausgehende und somit für die Anthocyanakkumulation nötige Signal von einem funktionalen AtPPT1 ausgehen sollte. *Cue1-6/PPDK*-Pflanzen enthalten nach wie vor keinen funktionalen AtPPT1, was auch anhand der reduzierten PEP-Transportaktivität in rekonstituierten Liposomen ersehen werden kann, die in *cue1-6/PPDK* gegenüber dem Wildtyp in gleichem Maße wie in *cue1-6* vermindert ist (s. 3.1.1). Das die Plastidenentwicklung anzeigende Signal muß daher PEP selber oder – viel wahrscheinlicher – ein von PEP abgeleiteter Metabolit sein.

4.3. Eingrenzung möglicher Ursachen des retikulierten *cue1*-Blattphänotyps

4.3.1. Die Rolle der Chloroplastenentwicklung für die Entwicklung des Blattes

Aus zahlreichen dikotylen C₃-Pflanzen sind Mutanten und transgene Pflanzen bekannt, bei denen sich die leitbündelnahen Bereiche und das restliche Mesophyll der Lamina

phänotypisch unterscheiden. Dabei gibt es sowohl Pflanzen bei denen wie in den *cuel*-Mutanten die leitbündelnahen Bereiche dem Wildtyp ähneln und der Rest der Blattspreite chlorotisch und abnorm erscheint (Kinsman und Pyke, 1998; Tamagnone et al., 1998a; Redei und Hirono, 1964), als auch solche bei denen es sich umgekehrt verhält (Harrison et al., 1998; Höfgen et al., 1994; Papenbrock et al., 2000). In einer weiteren Gruppe ist die Chloroplastenentwicklung und die De-Etiolierung vollkommen blockiert (Chatterjee et al., 1996; Scolnik et al., 1987; Börner und Hess, 1993; Walbot und Coe, 1979; Keddie et al., 1996; Harpster et al., 1984; Stitt und Schulze, 1994; Reiter et al., 1994; Henningsen et al., 1993), wobei den betroffenen Genen eine Rolle bei der frühen Plastidenentwicklung zugeschrieben wurde, da die Chloroplastenentwicklung in diesen Mutanten auf der Stufe der Proplastiden zum Erliegen kommt (z.B. Chatterjee et al., 1996; Keddie et al., 1996; Walbot und Coe, 1979; Scolnik et al., 1987). Tatsächlich sind in Mutanten bei denen die Ergrünung komplett blockiert ist Gene mit sehr grundlegenden Funktionen betroffen. In den Gerste (*Hordeum vulgare*) *albostrians*-Mutanten (Börner und Hess, 1993), und den Mais (*Zea mays*) *iojap (ij)*-Mutanten (Walbot und Coe, 1979; Han et al., 1992) sind die plastidären Ribosomen unfunktional, in den Tomate (*Solanum lycopersicon*) *ghost*-Mutanten (Scolnik et al., 1987) und *albino*-Mutanten von Mais (Harpster et al., 1984) ist die Carotenoid-Biosynthese kompromittiert und in Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) *dag*-Mutanten (Chatterjee et al., 1996) und Tomate *dcl*-Mutanten (Keddie et al., 1996) sind plastomkodierte Komponenten des Signalweges zwischen Plastid und Kern betroffen, die nur bei der Differenzierung von Proplastiden in Chloroplasten benötigt werden und bei der Differenzierung in Amyloplasten oder Chromoplasten unwichtig sind (Mullet, 1993; Deng und Gruissem, 1987; Deng und Gruissem, 1988). Die Blockade der Plastidenentwicklung in den *cuel*-Mutanten findet zu einer späteren Phase der Ontogenese statt, da *cuel*-Plastiden immerhin Thylakoide ausbilden (Li et al., 1995). Interessanterweise gibt es genügend Pflanzen mit eingeschränkten oder defekten Genfunktionen in der Chlorophyllbiosynthese (Hudson, 1993; Papenbrock et al., 2000; Mochizuki et al., 2001; Møller et al., 2001), der Carotenoidbiosynthese (Mochizuki et al., 2001), im plastidären Proteinimportapparat (Voelker und Barkan, 1995; Gutensohn, 1999) und in der Kommunikation zwischen Plastom und Kern (Mochizuki et al., 2001), deren Chloroplastenentwicklung wie in den *cuel*-Mutanten zu einem späteren Zeitpunkt der Ontogenese zum Erliegen kommt. In jenen Mutanten sind Genfunktionen derselben Signal- oder Stoffwechselwege betroffen wie bei denen, in denen die Chloroplastenentwicklung auf der Stufe der Proplastiden blockiert ist (Chatterjee et al.,

1996; Keddie et al., 1996; Walbot und Coe, 1979; Scolnik et al., 1987). Es scheint also Schlüsselfunktionen innerhalb der verschiedenen Stoffwechsel- und Signalwege der sich entwickelnden Chloroplasten zu geben, mit denen die Plastiden ihren Entwicklungsstatus an den Kern weitergeben. Offenbar existieren in den verschiedenen Stoffwechselwegen darüberhinaus redundante Kontrollpunkte, die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Bedeutung sind.

Die Abhängigkeit der Blattmorphogenese von der Plastidenentwicklung ist spezifisch für Dikotyledonen, während ähnliche Beeinträchtigungen in Mutanten von Monokotyledonen wie Mais (Coe et al., 1988) und Gerste (Börner und Hess, 1993) keinen Einfluß auf die Ausbildung der Blattmorphologie haben. In Monokotyledonen ist die Bedeutung von Licht für die Entwicklung des Blattes weitaus weniger bedeutend als in Dikotyledonen (Vince-Prue und Tucker, 1983; van Volkenburgh et al., 1985). Dagegen weisen die meisten Mutanten von Dikotyledonen mit einer gestörten Chloroplastenentwicklung auch veränderte Sensitivität auf Phytochrom-Signale auf (Castle und Meinke, 1994; Mustilli et al., 1999; Møller et al., 2001; Mochizuki et al., 2001; Vinti et al., 2000; Susek und Chory, 1992), darunter auch die *cue1*-Mutanten (Li et al., 1995). Nichtsdestotrotz sind auch Mutanten aus Monokotyledonen wie Mais bekannt, die spezifisch die Ausbildung eines Zelltyps blockieren (Langdale und Kidner, 1994; Roth et al., 1996), z.B. *bsd1* und *bsd2*, die die Bildung der Bündelscheide stören.

4.3.2. Mögliche Ursachen des *cue1*-Phänotyps

Das Leitbündel samt benachbartem Assimilationsparenchym und das Mesophyll werden bei der Blattmorphogenese einer Dikotyledonen von verschiedenen unabhängigen Zelllinien des Blattprimordiums gebildet (Poethig, 1989). Auch während des weiteren Wachstums des Blattes behalten die leitbündelnahen Zellen des Assimilationsparenchyms und die Mesophyllzellen unterschiedliche physiologische (Williams, 1989; Franceschi und Giaquinta, 1983a und b) und morphogenetische (Kinsman und Pyke, 1996) Eigenschaften. In C_3 -Pflanzen stellen die leitbündelnahen Mesophyllzellen eine physiologische Stärkescheide dar, in der mehr Stärke gebildet wird als in den benachbarten Mesophyllzellen (Williams, 1989; Franceschi und Giaquinta, 1983a und b; Müller-Röber et al., 1994) – dies ist auch in Blättern von *A. thaliana* zu beobachten (Knappe, unveröffentlicht). Es ist diskutiert worden, daß die leitbündelnahen Mesophyllzellen als

Umschlag- und Knotenpunkt für die Beladung des Phloems mit Assimilaten aus dem Mesophyll dienen (Franceschi und Giaquinta, 1983a und b).

In den *cue1*-Mutanten ist die Morphologie des gesamten Blattes verändert, wobei lediglich die Intercostalfelder einen sichtbaren Phänotyp aufzeigen, der sich von Wildtyp-Blättern unterscheidet (Li et al., 1995). Aus den von Streatfield et al. (1999) und den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten kann klar abgeleitet werden, daß die unzureichende Bereitstellung von Phenylalanin als einem Produkt des Shikimatweges durch eine mangelnde Versorgung des Stromas mit PEP für das Entstehen des retikulierten Blattphänotyps verantwortlich ist. Sowohl die Fütterung mit aromatischen Aminosäuren (Streatfield et al., 1999) als auch die Bereitstellung von PEP im Stroma der Chloroplasten (4.2.2 und 4.2.3) waren in der Lage, den Phänotyp der *cue1*-Mutanten zu kurieren. PEP steht dabei am Anfang der Substratkette des Shikimatweges, Phenylalanin am Ende. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Indizien dafür erarbeitet werden, daß die Gehalte an Phenylalanin limitierend für den Fluß in weitere Stoffwechselwege sind (s. 4.1.4, 4.1.5, 4.2.2 und 4.2.3).

Zwei von Phenylalanin abgeleiteten Metaboliten kann eine exponierte Rolle für die Ausbildung des Phänotyps zugeschrieben werden. Plastochinon ist nicht nur wichtig als Redoxakzeptor des PS II, sondern spielt auch eine Rolle als Elektronenakzeptor bei der von der Phytoen-Desaturase katalysierten Reaktion bei der Biosynthese von Carotenoiden (Norris et al., 1995). Von Streatfield et al. (1999) konnte errechnet werden, daß das Verhältnis von Q_A zu freiem PQ in den *cue1*-Mutanten gegenüber den Kontrollpflanzen erhöht war.

In Tabakpflanzen, in denen die Funktionalität eines Myb-Transkriptionsfaktors durch die Überexpression von unspezifischen, heterologen Paralogen aus *Antirrhinum majus* eingeschränkt wurde, konnte ebenfalls ein retikulierter Blattphänotyp mit dunklen leitbündelnahen Bereichen und hellen Intercostalfeldern beobachtet werden (Tamagnone et al., 1998a). Eine Analyse der Gehalte verschiedenster phenolischer Inhaltsstoffe zeigte, daß die Lignifizierung und die Gehalte aller untersuchten Sekundärmetabolite in den Transformanten gegenüber den Kontrollpflanzen dramatisch reduziert waren (Tamagnone et al., 1998a), was vor allem auf die transkriptionelle Repression von Enzymen des Phenylpropanstoffwechsels wie 4CL, C4H und CAD zurückgeführt wurde (Tamagnone et al., 1998a). In weiteren Studien von Tamagnone et al. (1998b) ergaben sich Hinweise, daß die in gleicher Weise wie in den *cue1*-Mutanten aberrante Blattmorphologie durch den Mangel an Dehydrodiconiferylalkohol-Glykosiden (DCGs) ausgelöst wird. DCGs sind in

den Cytokinin-Signalweg eingebunden (Teutonico et al., 1991) und haben in wachstumsfördernde Aktivität in Tabak (Binns et al., 1987; Lynn et al., 1987). Bei der Ausprägung des *cue1*-Phänotyps könnten außer diesen beiden von Phenylalanin abgeleiteten Metaboliten auch Polyamine von Bedeutung sein, denen eine Schutzfunktion für den Photosyntheseapparat (Subhan und Murphy, 2001) und eine Rolle bei der Blühinduktion (Applewhite et al., 2000) und der Internodienelongation von *Arabidopsis*-Infloreszenzen (Hanzawa et al., 2000) zugeschrieben wird. Die Gehalte an Polyaminen sind in *cue1-1* um bis zu 75% bis 95% gegenüber den Kontrollen verringert (s. 3.5.4), also weitaus dramatischer als die Gehalte an Plastochinon oder den meisten untersuchten Phenylpropanen. Es ist jedoch unklar, ob die in *cue1-1* verringerten Polyamin-Gehalte nicht nur eine Konsequenz anderer Beeinträchtigungen sind und in der Kausalitätskette bei der Entstehung des Phänotyps nur eine nachgeordnete Funktion übernehmen.

Ein Mangel an allen drei genannten Substanzen, Plastochinon, DCGs und Polyaminen, kann für das Auftreten des *cue1*-Phänotyps in Betracht gezogen werden, zumal alle Substanzen erst zu einem späteren Zeitpunkt der Chloroplastengenese benötigt werden und die Entwicklung der *cue1*-Chloroplasten auch erst in einem späteren Stadium blockiert ist (Li et al., 1995; 4.3.1). Da die an *cue1*-Mutanten beobachteten physiologischen und morphologischen Veränderungen pleiotrop sind und die Photophosphorylierung (s. 4.1.3), den Primär- (s. 4.1.4) und den Sekundärmetabolismus (s. 4.1.5), sowie die Signaltransduktion (Li et al., 1995; 4.1.5) beeinflussen, ist der Ausfall weiterer wichtiger (Sekundär-)Metabolite in *cue1* zu vermuten. Es fragt sich jedoch, warum nur die Mesophyllzellen in *cue1*-Mutanten eine retardierte Chloroplastenentwicklung zeigen und die leitbündelnahen Zellen nicht. Interessanterweise verhält sich der an Tabakpflanzen mit verminderter Transketolase-Aktivität zu beobachtende Blattphänotyp genau umgekehrt zum retikulierten Phänotyp von *cue1*-Blättern, denn die Tabaktransformanden zeigen chlorotische Leitbündelbereiche und ein augenscheinlich intaktes Mesophyll (Henkes et al., 2001). Über die Transketolase wird während der Lichtphase Ery4P bereitgestellt, das gemeinsam mit PEP als Baustein in den ersten Syntheseschritt des Shikimatwegs eingeht (Herrmann, 1995; Schmid und Amrhein, 1995). Die physiologischen Auswirkungen auf den Primär-, aber v.a. auf den Sekundärmetabolismus waren in den *antisense*-Transketolase-Pflanzen viel dramatischer als in den *cue1*-Mutanten (Henkes et al., 2001): die Gehalte aller aromatischen Aminosäuren, die Chlorophyll-Gehalte, die Tocopherol-Gehalte und die Gehalte der untersuchten Phenylpropane und Phenylpropan-Derivate waren bei einer Reduktion der Transketolase-Aktivität von 75% gegenüber dem Wildtyp

drastisch reduziert (s. auch 4.1.5 und 4.1.4). Aufgrund dieser Unterschiede kann der in *cue1*-Mutanten defekte AtPPT1 nicht nur metabolische Funktion besitzen. Es ist zu vermuten, daß ein von PEP abgeleiteter Sekundärmetabolit, der bei der Verringerung der Transketolase-Aktivität nicht beeinflußt wird, zusammen mit anderen Metaboliten aus anderen Stoffwechselwegen (Møller et al., 2001; Provencher et al., 2001) den Entwicklungsstatus des Plastiden an den Kern weitergibt.

Kenntnisse über das Expressionsmuster des AtPPT1 im Blatt und die Verteilung der untersuchten Primär- und Sekundärmetabolite zwischen den leitbündelnahen Zellen und dem Mesophyll könnten weitere Aufschlüsse über die zellspezifische Rolle des AtPPT1 geben, z.B. ist es denkbar, daß das über den Shikimatweg bereitgestellte Signal nur in bestimmten Zellen des Blattes vorhanden sein darf und die konstitutive Herunterregulation der Transketolase zu unspezifisch ist, um ein solches Signal zu verändern

4.3.3. Inwieweit können zelltypspezifische Effekte für das Auftreten des retikulierten Blattphänotyps in den *cue1*-Mutanten verantwortlich sein?

Die Aktivität des AtPPT1-Promotors wurde anhand von Promotor-GUS-Fusionen (Knappe, unveröffentlicht) untersucht. Verblüffenderweise ist der Promotor des AtPPT1 ausschließlich in leitbündelnahen Mesophyllzellen und im Leitgewebe selbst aktiv (Knappe, unveröffentlicht), also genau in den Zellen, deren Entwicklung in den *cue1*-Mutanten nicht beeinträchtigt ist. Anhand des daraus abzuleitenden AtPPT1-Expressionsmusters müßte davon ausgegangen werden, daß die unter 4.3.2 angesprochenen für den Phänotyp der *cue1*-Mutanten verantwortlichen Sekundärmetabolite gerade in den leitbündelnahen phänotypfreien Zellen von *cue1*-Mutanten fehlen.

Die Entdeckung eines zweiten PPT, AtPPT2, im *A. thaliana*-Genom, durch dessen konstitutive Überexpression der *cue1*-Phänotyp kuriert werden kann, genau wie das für den Blumenkohl-PPT (s. 3.1.1) und den AtPPT1 (Knappe, unveröffentlicht) der Fall ist, verkompliziert die Situation. Durch Promotor-GUS-Fusionen (Knappe, unveröffentlicht) konnte gezeigt werden, daß der AtPPT2-Promotor in grünen Geweben ubiquitär und in der Wurzel gar nicht aktiv ist. Bei einer entsprechenden ubiquitären Expression des AtPPT2 in Blättern wäre zu erwarten, daß der AtPPT2, dessen Transkription in *cue1*-Mutanten unverändert ist (Knappe, unveröffentlicht), die Rolle des AtPPT1 übernehmen kann. Dies ist aber offensichtlich nicht der Fall, obwohl eine PEP-Transportaktivität in rekonstituierten Liposomen aus *cue1-6* gemessen werden kann, die auf die Präsenz des

AtPPT2 zurückgeführt werden muß (s. 3.1.1). Bislang sind noch keine Mutanten des AtPPT2 gefunden worden.

Es wäre denkbar, daß aus dem Shikimatweg oder nachgeschalteten Stoffwechselwegen abgeleitete Botenstoffe spezifisch im leitbündelnahen Mesophyll produziert werden und dann symplastisch im restlichen Blattgewebe verteilt werden, so daß ein Gradient des potentiellen Morphogens von den leitbündelnahen Regionen zum restlichen Mesophyll anliegen würde. Der Ausfall des AtPPT1 hätte dann zur Folge, daß dieser Botenstoff fehlen würde, der u.U. auch ausschließlich für die Entwicklung der Mesophyllchloroplasten benötigt werden könnte. Diese Hypothese wird zur Zeit durch die Expression verschiedener PPTs und der *Flaveria pringlei* PPDK unter der Kontrolle zelltypspezifischer Promotoren für das leitbündelnahe Gewebe und das Mesophyll überprüft.

Eine weitere Hypothese beruht auf den hier vorgestellten Resultaten. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Aktivität der endogenen, plastidär lokalisierten PPDK in *cue1*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht ist (s. 3.5.7) und daß die Gehalte an Pyruvat und PEP in Pflanzen mit defekten AtPPT1 – dazu gehören auch die *cue1-6*/PPDK Komplementanden – während der Dunkelperiode stark verringert sind (s. 3.5.4). Berücksichtigt man die Existenz einer physiologischen Stärkescheide um das Leitgewebe in Blättern von *A. thaliana* (s. 4.3.2) liegt die Vermutung nahe, daß die leitbündelnahen Mesophyllzellen aufgrund einer größeren Reserve transitorischer Stärke während der Dunkelperiode mehr glykolytisch aus der Stärkedissimilation gewonnenes Pyruvat über die endogene PPDK in PEP und somit in den Shikimatweg leiten können und daher zumindest während der Dunkelperiode eine ausreichende Bereitstellung von PEP gewährleisten können, die im chlorotischen restlichen Mesophyll aufgrund mangelnder Bildung von Photoassimilaten während der Lichtperiode nicht gegeben ist. Diese Hypothese wird zur Zeit durch die Kreuzung der *cue1*-Mutanten mit stärkefreien Mutanten überprüft.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der retikulierte Blattphänotyp der in einem PPT-Gen defekten *cue1*-Mutanten durch die konstitutive Expression der *Flaveria trinervia* PPDK und die konstitutive Expression eines heterologen PPT aus Blumenkohl aufgehoben werden kann. Die Transformanten wurden molekularbiologisch und über den Nachweis der jeweiligen Enzymaktivitäten charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß auch rekonstituierte Liposomen mit Gesamtmembranprotein aus Blättern von *cue1-6*-Mutanten eine sehr geringe, aber deutlich vom Hintergrund zu unterscheidende PEP-Transportaktivität aufwiesen.

Mit den *cue1*-Mutanten und den komplementierten Linien wurde eine detaillierte physiologische Analyse durchgeführt, die die Untersuchung von Wachstumseigenschaften, ausgewählten Primär- und Sekundärmetaboliten, Photosyntheseparametern, Enzymaktivitäten des Primärmetabolismus, Kohlenstoffflüssen und des Transkriptoms einschloß.

Es konnten klare Hinweise dafür gefunden werden, daß die Limitation des Sekundärstoffwechsels in *cue1* auf eine mangelnde Versorgung des Chloroplastenstromas mit PEP und die unzureichende Bereitstellung von Phenylalanin zustande kommt, die in den komplementierten Linien nicht mehr zu beobachten waren. Die Gehalte der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan und die Gehalte an Pyruvat und PEP während der Lichtperiode wurden in den *cue1*-Mutanten entgegen den ursprünglichen Erwartungen als unverändert gegenüber den Kontrollen bestimmt. In den *cue1*-Mutanten konnte dagegen eine starke Verringerung der Pyruvat- und PEP-Gehalte während der Dunkelperiode gemessen werden, die gemeinsam mit der gegenüber dem Wildtyp erhöhten PPDK-Aktivität für eine partielle Kompensation des PPT-Defektes durch die Bildung von PEP während der Dunkelphase in Betracht gezogen werden kann. Die Einschränkungen der Photosyntheseleistung, der CO₂-Einbaurrate und des Saccharose- und Stärkemetabolismus um jeweils 30% konnten als Teil der pleiotropen Effekte der rückständigen Chloroplastenentwicklung in den *cue1*-Mutanten beschrieben werden. Die Polyamingehalte in Blättern der *cue1*-Mutanten waren gegenüber den Kontrollen dramatisch verringert.

Bei der Untersuchung der in den *cue1*-Mutanten produzierten UV-Schutzsubstanzen konnten differenzierte Effekte auf die Synthese, Gehalte und histologische Lokalisierung einzelner Substanzen aufgezeigt werden, von denen einige identifiziert werden konnten. Es

zeigte sich, daß mindestens ein Zimtsäurederivat in der unteren Epidermis von *cue1-1* fehlte. In *cue1-6*/PPDK- und *cue1-6*/PPT-Pflanzen konnte eine deutliche, wenn auch unspezifische Erhöhung an verschiedenen UV-Schutzsubstanzen beobachtet werden. Die in *cue1*-Mutanten fehlende Fähigkeit, Anthocyane unter anaerobem Streß zu akkumulieren, war in beiden Komplementanden wiederhergestellt. Aufgrund der Anthocyanakkumulation in *cue1-6*/PPDK-Transformanden konnte das durch die Aktivität des PPT bereitgestellte, die Chloroplastenentwicklung vermittelnde Signal in einen funktionalen Kontext mit dem *fus6*-Genprodukt gebracht werden. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse untermauerten sowohl die auf den Sekundärstoffwechsel gefundenen Effekte in den *cue1*-Mutanten als auch die Beobachtungen an den *cue1-6*/PPDK-Komplementanden.

Es wurde beobachtet, daß durch die Überexpression der *Flaveria trinervia* PPDK in *cue1-6*/PPDK-Transformanden weitere Einschränkungen der Photosyntheseleistung, des Calvin-Zyklus, der Stärke- und Saccharoseakkumulation erzeugt wurden, die klar auf die konstitutive Aktivität des Transgens und den damit verbundenen Verbrauch an ATP zurückzuführen waren. Über die eingeführte PPDK wurde eine massive Akkumulation von Pyruvat und PEP in Blättern von *cue1-6*/PPDK während der Lichtperiode bewirkt. Die an den *cue1-6*/PPDK beobachteten Verringerungen von NADP-GAPDH, NADP-MDH und NADP-ME wurden als physiologische Maßnahmen verstanden, mit denen dem Anstau von Pyruvat und PEP begegnet wurde. Als weitere Konsequenz der PPDK-Überexpression im *cue1-6*-Hintergrund waren die Gehalte aller Aminosäuren der Aspartat- und Pyruvat-Familie in Blättern von *cue1-6*/PPDK gegenüber dem Wildtyp verringert.

Mangelnde Gehalte an Plastochinon, Dehydrodiconiferylglykosiden und Polyaminen werden als mögliche Ursachen für das Auftreten des retikulierten Phänotyps in den *cue1*-Mutanten diskutiert und das Fehlen bzw. die veränderte räumliche Produktion eines von PEP abgeleiteten Signalmetaboliten für die Ausbildung des retikulierten Blattphänotyps in *cue1* in Erwägung gezogen. Unter Einbeziehung neuester Erkenntnisse wird die Rolle des PPT bei der Ausbildung des Phänotyps vor dem Hintergrund der Existenz eines zweiten funktionalen PPT in *A. thaliana* und der Aktivität des AtPPT1-Promotors, die auf die in den Mutanten unbeeinträchtigten leitbündelnahen Bereiche beschränkt ist, kritisch beleuchtet.

6. Abkürzungsverzeichnis

2-PGA	2-Phosphoglycerinsäure	Aufl.	Auflage
3-PGA	3-Phosphoglycerinsäure	AUS	Australien
4CH	Cinnamat-4-Hydroxylase	BAC	<i>bacterial artificial</i>
4CL	p-Coumaroyl-CoA-Ligase		<i>chromosome</i>
6-PG	Glukonsäure-6-phosphat	Be-0	Bensheim
		BoPPT	Blumenkohl-
A	Alanin, auch: Österreich		Phosphoenolpyruvat/
Å	Ångström		Phosphat-Translokator
α	Irrtumswahrscheinlichkeit	bp	Basenpaare
A _{Zahl}	Absorption bei der	BSA	Rinderserum-Albumin
	Wellenlänge λ	<i>bsd</i>	<i>bundle sheath defective</i>
Abb.	Abbildung	bzw.	beziehungsweise
ABRC	<i>Arabidopsis Biological</i>	C	Cystein
	<i>Research Center</i>	¹⁴ C	Kohlenstoff-Isotop
AcetylCoA	Acetyl-Coenzym A	°C	Grad Celsius
ADH	Alkohol-Dehydrogenase	ca.	zirka
ADP	Adenosindiphosphat	CAB	<i>chlorophyll a/b binding</i>
AGPase	ADP-Glukose-Pyrophos-		<i>protein</i>
	phorylase	CAD	Cinnamylalkohol-
AK	Aspartat-Kinase		Dehydrogenase
Ala	Alanin	CAM	<i>crassulacean acid</i>
Amp	Ampicillin		<i>metabolism</i>
AMP	Adenosinmonophosphat	CaMV	<i>cauliflower mosaic virus</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat		(= Blumenkohl-Mosaik-
AS	Aminosäure		Virus)
Arg	Arginin	cDNA	<i>copyDNA</i>
Asn	Asparagin	CGA	Chlorogensäure
Asp	Aspartat	CH	Schweiz
ATP	Adenosintriphosphat	Chl	Chlorophyll
AtPPT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CI	Chloroform/
	Phosphoenolpyruvat/		Isoamylalkohol
	Phosphat-Translokator 1		

Abkürzungsverzeichnis

CinnamoylCoA	Cinnamoyl-Coenzym A	EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure
Cit	Citrullin	EMS	Ethylmethylsulfonsäure
cm	Zentimeter	Ery4P	Erythrose-4-phosphat
cm ²	Quadratzenimeter	EPSP	5'-Enol-pyruvyl-shikimat- 3-phosphat
Col-0	Columbia	EST	<i>expressed sequence tag</i>
<i>cue</i>	<i>chlorophyll a/b binding protein underexpressed</i>	et al.	und Andere
Cys	Cystein	EtOH	Ethanol
d	Tag(e)	ETR	Elektronentransportrate
D	Asparaginsäure	F	Phenylalanin
DAHP	3-Desoxyarabinoheptulo- sonat-7-phosphat	F ₀	Chlorophyllgrundfluores- zenz
DC	Dünnschicht-Chromato- graphie	F ₁ , F ₂	erste und zweite Filial- generation
DCG	Dehydrodiconiferyl- Glykosid	Fa.	Firma
<i>dcl</i>	<i>defective chloroplasts and leaves</i>	FBPase	Fruktose-1,6-bisphospha- tase
DEAE	Diethylaminoethyl-	Fd	Ferredoxin
DEPC	Diethylpyrocarbonat	ff.	die folgenden
<i>det1</i>	<i>deetiolated1</i>	FG	Frischgewicht
ddNTP	Didesoxyribonukleosid- triphosphate	F _m	maximale Chlorophyll- fluoreszenz
DMF	Dimethylformamid	F _s	Chlorophyllfluoreszenz im Fließgleichgewicht
DMSO	Dimethylsulfoxid	F _v	variable Chlorophyll- fluoreszenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure	fmol	Femtomol
dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphate	Fru-1,6-bP	Fruktose-1,6-bisphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure	Fru6P	Fruktose-6-phosphat
DTT	Dithiothreitol	<i>fus</i>	<i>fusca</i> (lat.: violett)
ΔE	Extinktionsänderung	g	Gramm
E	Glutaminsäure	xg	Vielfaches der Erdbbe- schleunigung

G	Glycin	H ₂ O _d	destilliertes Wasser
GDC	Glycin-Dehydrogenase-Komplex	H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
Glk	Glukose	I	Isoleucin
Glk1P	Glukose1-phosphat	IAA	Indolessigsäure = Auxin
Glk6P	Glukose-6-phosphat	<i>ij</i>	<i>iojap</i>
Gln	Glutamin	Ile	Isoleucin
Glu	Glutaminsäure	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Gly	Glycin		
Gm	Gentamycin	K	Lysin, auch: Kelvin
GOGAT	Glutamat-2-Oxoglutarat-Aminotransferase	Kan	Kanamycin
GPT	Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator	kb(p)	Kilobasenpaare
GS	Glutamin-Synthetase	kDa	Kilodalton
<i>gun</i>	<i>genomes uncoupled</i>	K _m	Michaelis-Menten-Konstante
GUS	β-Glucuronidase	kV	Kilovolt
h	Stunde(n)	l	Liter
H	Histidin	λ	Wellenlänge in nm
³ H	Tritium	L	Leucin
<i>hcf</i>	<i>high chlorophyll fluorescence</i>	<i>laf</i>	<i>long after far red</i>
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat	Leu	Leucin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	LHCP	Lichtsammelkomplex (<i>light harvesting complex</i>)
His	Histidin	Lys	Lysin
His ₆	Hexahistidin	m	Meter
<i>hp</i>	<i>high pigment</i>	M	Methionin, auch: molar
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>	m ²	Quadratmeter
Hrsg.	Herausgeber	M ₁ , M ₂	erste und zweite Filialgeneration einer Mutagenese
HSDH	Homoserin-Dehydrogenase	mA	Milliampère
Hyg	Hygromycin	MalonylCoA	Malonyl-Coenzym A
		μCi	Mikrocurie
		mCi	Millicurie
		MCS	<i>multiple cloning site</i>

Abkürzungsverzeichnis

μE	Mikroeinsteinst	NADP-ME	NADP-Malatenzym
MES	4-Morpholinoethan- sulfonsäure	NADPH	Nicotinadenindinukleotid- phosphat, reduzierte Form
MeOH	Methanol	n.b.	nicht bestimmt
Met	Methionin	NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
μF	Mikrofarad	NL	Niederlande
min	Minute(n)	nCi	Nanocurie
μg	Mikrogramm	ng	Nanogramm
mg	Milligramm	nm	Nanometer
μl	Mikroliter	nmol	Nanomol
ml	Milliliter	nt	Nukleotide
μm	Mikrometer	NTP	Nukleosidtriphosphat
μM	mikromolar	Ω	Ohm
mm	Millimeter	O_2	Sauerstoff
mM	millimolar	<i>o2</i>	<i>opaque-2</i>
mm^2	Quadratmillimeter	OAA	Oxalacetat
μmol	Mikromol	OAc	Acetat
MOPS	(3-N-Morpholin)propan- sulfonsäure	o.g.	oben genannt(en)
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonuklein- säure	OPPP	Oxidativer Pentosephos- phat-Zyklus
mU	Milliunits	Orn	Ornithin
N	Asparagin	oxid.	oxidiert
NAD^+	Nicotinadenindinukleotid, oxidierte Form	P	Prolin
NADH	Nicotinadenindinukleotid, reduzierte Form	$^{32}\text{P}, ^{33}\text{P}$	Phosphor-Isotope
NADP^+	Nicotinadenindinukleotid- phosphat, oxidierte Form	P_a	anorganisches Phosphat
NADP-GAPDH	NADP-Glycerinaldehyd-3- phosphat-Dehydrogenase	π	Ludolf'sche Zahl
NADP-MDH	NADP-Malat-Dehydroge- nase	<i>pac</i>	<i>pale cress</i>
		PAGE	Polyacrylamid-Gelelektro- phorese
		PAL	Phenylalanin-Ammonium- Lyase
		pBSC	<i>Bluescript</i>
		PCI	Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol

PCR	Polymerasekettenreaktion	Q _A	an PS II gebundenes
PDC	Pyruvatdehydrogenase- Komplex	q _N	Plastochinon nicht-photochemische
PEG	Polyethylenglykol		Fluoreszenzlöschung
PEP	Phosphoenolpyruvat	q _{NE}	Fluoreszenzlöschung
PEPC(ase)	PEP-Carboxylase		durch den elektroche-
PEPCK	PEP-Carboxykinase		mischen Gradienten
PEPP	PEP-Phosphatase	q _{NI}	Fluoreszenzlöschung
PEPS	PEP-Synthetase		durch Photoinhibition
PFD	Photonenflußdichte	q _{NT}	Fluoreszenzlöschung
pg	Picogramm		durch die Verlagerung von
PGK	Phosphoglyceratkinase		Lichtsammelkomplexen
Phe	Phenylalanin	q _P	photochemische Fluores-
<i>phy</i>	<i>phytochrome</i>		zenzlöschung
PK	Pyruvatkinase	R	Arginin
pmol	Picomol	R _f	Retentionsfaktor
PMSF	Phenylmethylsulfonyl- fluorid	red.	reduziert
		Rif	Rifampicin
PP	Polypropylen	RNA	Ribonukleinsäure
PP _i	Pyrophosphat	rRNA	ribosomale Ribonuklein- säure
PPDK	Pyruvat, Phosphat- Dikinase	RT	Reverse Transkription
PPT	Phosphoenolpyruvat- Phosphat-Translokator	RT-PCR	Reverse Transkriptions- Polymerasekettenreaktion
PQ	Plastochinon	RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat- Carboxylase/ Oxygenase
PRK	Phosphoribulokinase		
Pro	Prolin	RubP	Ribulose-1,5-bisphosphat
Prot.	Protein	RWTH	Rheinisch-Westfälische
PS	Photosystem		Technische Hochschule
PT	Phosphat-Translokator	s	Sekunde(n)
PVDF	Polyvinylidendifluorid	S	Serin
PVP	Polyvinylpyrrolidon	s.	siehe
Q	Glutamin	σ	Standardabweichung

Abkürzungsverzeichnis

SBPase	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	Tris	(Tris-hydroxymethyl-)aminomethan
SD	Standardabweichung	Trp	Tryptophan
SDS	Natriumdodecylsulfat	<i>tt</i>	<i>transparent testa</i>
Ser	Serin	Tyr	Tyrosin
s.o.	siehe oben		
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure	U	Unit(s), auch: Spannung
		u.a.	unter anderem
s.u.	siehe unten	UK	Großbritannien
<i>sxd</i>	<i>sucrose export defective</i>	U·min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
$\tau_{1/2}$	Halbwertszeit	USA	Vereinigte Staaten von Amerika
T ₁ , T ₂	erste und zweite Filialgeneration einer Transformation	UV	ultraviolett
		v	Version
T _m	Schmelztemperatur	V	Valin, auch: Volt
Tab.	Tabelle	Val	Valin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	vgl.	vergleiche
TBS	<i>tris buffered saline</i>	Vol	des Volumens
TCA	Trichloressigsäure	v/v	Volumenprozent
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethlendiamin	W	Tryptophan, auch: Watt
		WT	Wildtyp
T-DNA	Transfer-Desoxyribonukleinsäure	w/v	Masseprozent
		XPT	Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator
Thr	Threonin		
TIFF	<i>tagged image file</i>	Y	Tyrosin
TK	Transketolase	z.B.	zum Beispiel
TPT	Triosephosphat/ Phosphat-Translokator	z.T.	zum Teil
		∞	unendlich
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)methylglycin		
TrioseP	Triosephosphat(e)		

7. Literaturverzeichnis

- Abadia**, J., Morales, F., Abadia, A. (1999) Photosystem II efficiency in chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant & Soil* 215: 183-92
- Ahmad**, M., Cashmore, A.R. (1996) The *pef* mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome pathway. *Plant J.* 10: 1103-10
- Anderson**, K.S., Simmons, R.D., Leo, G.C., Sikorski, J.A., Benesi, A.J., Johnson, K.A. (1990) Observation by ^{13}NMR of the EPSP synthase tetrahedral intermediate bound to the enzyme active site. *Biochemistry* 29: 1460-5
- Andersson**, B., Sundby, C., Åkerlund, H.-E., Albertsson, P.-Å. (1985) Inside-out thylakoid vesicles. An important tool for the characterization of the photosynthetic membrane. *Physiol. Plant.* 65: 322-30
- Andrews**, M. (1986) The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell and Environment* 9: 511-519.
- Aoyagi**, K., Bassham, J.A. (1983) Pyruvate,orthophosphate dikinase in wheat leaves. *Plant Physiol.* 73: 853-4
- Aoyagi**, K., Bassham, J.A. (1984) Pyruvate,orthophosphate dikinase mRNA organ specificity in wheat and maize plants. *Plant Physiology* 76: 278-280
- Ausubel**, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Snuth, F.A., Seidman, J.G., Struhl, K. (1997) Current protocols in molecular biology. *Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences*, New York
- Bagge**, P., Larsson, C. (1986) Biosynthesis of aromatic amino acids by highly purified spinach chloroplasts – Compartmentation and regulation of the reactions. *Physiol. Plant.* 68: 641-7
- Bahrami**, A.R., Chen, Z.-H., Walker, R.P., Leegood, R.C., Gray, J.E. (2001) Ripening related occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase in tomato fruit. *Plant Mol. Biol.* 47: 499-506
- Bao**, W., Omalley, D.M., Whetten, R. (1993) A laccase associated with lignification in loblolly-pine xylem. *Science* 260: 672-4
- Barnes**, S.A., Nishizawa, N.K., Quaggio, R.B., Whitlam, G.C., Chua, N.-H. (1996) Far-red light blocks seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell* 8: 601-15

- Bartlett**, G.R. (1959) Phosphorus Assay in Column Chromatography. *J. Biol.Chem.* 234: 466-8
- Bate**, N.J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P.W., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Elkind, Y. (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 91: 7608-12
- Bechtold**, N., Ellis, J., Pelletier, G., (1993) *In planta Agrobacterium* mediated transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris* 316: 1194-9
- Belser**, W.L., Baron Murphy, J., Delmer, D.P., Mills, S.E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 237: 1ff.
- Bennett**, M.J., Marchant, A.M., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., Feldmann, K.A. (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-50
- Bennett**, M.J., Marchant, A.M., Sean, T., Swarup, R. (1998) Going the distance with auxin: unraveling the molecular basis of auxin transport. *Phil. Trans. Royal. Soc. London Ser. B* 353: 1511-5
- Binns**, A.N., Chen, R.H., Wood, H.N., Lynn D.G. (1987) Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: do cell wall components control cell division? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 980-4
- Birnboim**, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-1523
- Bonner**, C.A., Jensen, R.A. (1997) Recognition of specific patterns of amino acid inhibition of growth in higher plants, uncomplicated by glutamine-reversible ,general amino acid inhibition‘. *Plant Science* 130: 133-43
- Bolle**, C., Koncz, C., Chua, N.-H. (2000) PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Gen. Dev.* 14: 1269-78
- Bolton**, P., Wharfe, J., Harwood, J.L. (1978) The lipid composition of a barley mutant lacking chlorophyll b. *Biochem. J.* 15: 67-72
- Borchert**, S., Harborth, J., Schünemann, D., Hoferichter, P., Heldt, H.W. (1993) Studies of the enzymic capacities and transport properties of pea root plastids. *Plant Physiol.* 101: 303-12
- Borevitz**, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A. Lamb, C. (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12: 2383-94

- Börner**, T., Hess, W.R. (1993) Altered nuclear, mitochondrial and plastid gene expression in white barley cells containing ribosome-deficient plastids. *In Plant mitochondria* (Kück, U., Brennicke, A., Hrsg.), *Verlag Chemie*, Weinheim
- Bradford**, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54
- Brailsford**, M.A., Thompson, A.G., Kaderbhai, N., Beechey, R.B. (1986) The extraction and reconstitution of the alpha-hydroxycinnamate-sensitive pyruvate transporter from castor bean mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14: 1036-42
- Brenner**, M., Niederwieser, A., Pataki, G. (1967) *In Dünnschichtchromatographie* (Stahl, E., Hrsg.), 2. Aufl., S. 696ff., *Springer Verlag*, Berlin
- Brown**, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., Muday, G.K. (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 524-35
- Buchanan**, B.B. (1984) The ferredoxin/ thioredoxin system: A key element in the regulatory function of light in photosynthesis. *Bio Science* 34: 378-83
- Budde**, R.J., Holbrook, G.P., Chollet, R. (1985) Studies of maize leaf pyruvate, orthophosphate dikinase by reversible phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 283-90
- Burchard**, P., Bilger, W., Weissenböck, G. (2000) Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell Environ.* 23: 1373-80
- Byng**, G., Whitaker, R., Flick, C., Jensen, R.A. (1981) Enzymology of L-tyrosine biosynthesis in corn (*Zea mays*). *Phytochemistry* 20: 1289-92
- Casati**, P., Drincovich, M.F., Edwards, G.E., Andreo, C.S. (1999) Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosyn. Res.* 61: 99-105
- Castle**, L.A., Meinke, D.W. (1994) A FUSCA gene of *Arabidopsis* encodes a novel protein essential for plant development. *Plant Cell* 6: 25-41
- Chapple**, C.S., Vogt, T., Ellis, B.E., Somerville, C.R. (1992) An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4: 1413-24
- Chapple**, C.S., Shirley, B.W., Zook, M., Hammerschmidt, R., Somerville, S.C. (1994) Secondary metabolism in *Arabidopsis*. *In Arabidopsis* (Somerville, C., Meyerowitz, E., Hrsg.), S. 989-1030, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

- Chatterjee**, M., Sparvoli, S., Edmunds, C., Garosi, P., Finday, K., Martin, C. (1996) *DAG*, a gene required for chloroplast differentiation and palisade development in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 15: 4194-207
- Chen**, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, Masson, P.H. (1998) The *Arabidopsis thaliana* AGRAVITROPIC1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 15112-7
- Chen**, Z.-H., Walker, R.P. Acheson, R.M., Tésci, L.I., Wingler, A., Lea, P.J., Leegood, R.C. (2000) Are isocitrate lyase and phosphoenolpyruvate carboxykinase involved in gluconeogenesis during senescence of barley leaves and cucumber cotyledons? *Plant Cell Physiol.* 41: 960-7
- Chomczynski**, P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201(1):134-139
- Chory**, J., Peto, C. (1990) Mutations in the *DET1* gene affect cell-type-specific expression of light-regulated genes and chloroplast development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8776-80
- Chory**, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L., Ausubel, F. (1989) *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* 58: 991-9
- Chory**, J. Susek, R. (1994) Light signal transduction and the control of seedling development. In *Arabidopsis* (Meyerowitz, E. und Somerville, C., Hrsg.) S. 579-614, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York
- Chung**, C.T., Miller, M.H. (1993) Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. *Meth. Enzymol.* 218: 621-7
- Cooper**, R.A., Kornberg, H.L. (1969) Phosphoenolpyruvate synthetase. *Meth. Enzymol.* 13: 309-314
- Cornic**, G., Bukhov, N.G., Wiese, C., Bligny, R., Heber, U. (2000) Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C₃-plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta* 210: 468-77
- Cramer**, C.L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S.L., Bolwell, G.P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Schuch, W. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 367
- Da Cunha**, A. (1987) The estimation of L-phenylalanine ammonia-lyase shows phenylpropanoid biosynthesis to be regulated by L-phenylalanine supply and availability. *Phytochemistry* 26: 2723-7
- Debeaujon**, I., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M. (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 403-13

- Delieu**, T., Walker, D.A. (1972) *New Phytol.* 71: 201-25
- Delieu**, T., Walker, D.A. (1981) Polarographic measurement of photosynthetic oxygen evolution by leaf discs. *New Phytol.* 89: 165-78
- Demming-Adams**, B. und Adams III, W.W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 599-626
- Deng**, X.-W., Gruissem, W. (1987) Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 63: 1311-22
- Deng**, X.-W., Gruissem, W. (1988) Constitutive transcription and regulation of gene expression in non-photosynthetic plastids of higher plants. *EMBO J.* 7: 3301-8
- DePrado**, R., Gonzalez-Gutierrez, J., Menendez, J. (2000) Resistance to acetyl CoA carboxylase-inhibiting herbicides in *Lolium multiflorum*. *Weed Sci.* 48: 311-8
- Diallinas**, G., Kanellis, A.K. (1994) A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit – cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Mol. Biol.* 26: 473ff.
- Diaz**, J., Ros Barceló, A., de Cáceres, F.M. (1997) Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignin, during the early development of seedlings of *Capsicum annuum*. *New Phytol.* 136: 183-8
- Drincovich**, M.F., Casati, P., Andreo, C.S., Donahue, R., Edwards, G.E. (1998) UV-B induction of NADP-malic enzyme in etiolated and green maize seedlings. *Plant Cell Environ.* 21: 63-70
- Edwards**, G.E., Andreo, C.S. (1992) NADP-malic enzyme from plants. *Photosynth. Res.* 31: 1845-57
- Edwards**, K., Johnston, C., Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR-analysis. *Nucl. Acids Res.* 19: 1349
- Eggermont**, K., Goderis, I.J., Broekaert, W.F. (1996) High-throughput RNA extraction from plant samples based on homogenisation by reciprocal shaking in the presence of a mixture of sand and glass beads. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14: 273-9
- Eicks**, M.H., Maurino, V.G., Knappe, S., Flügge, U.-I., Fischer, K. (im Druck) The plastidic pentose phosphate translocator represents an important link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol.*
- Elias**, B.A., Givan, C.V. (1979) Localization of pyruvate dehydrogenase complex in *Pisum sativum* chloroplasts. *Plant Sci. Lett.* 115-122
- Elkind**, Y., Edwards, R., Mavandad, M., Hedrick, S.A., Ribak, O., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1990) Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid

biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 87: 9057-61

Fairchild, C.D., Schumaker, M.A., Quail, P.H. (2000) HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Gen. Dev.* 14: 2377-91

Fankhauser, C., Chory, J. (1997) Light control of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 203-29

Feinbaum, R.L., Ausubel, F.M. (1988) Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene. *Mol. Cell Biol.* 8: 1985-92

Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1):6-13

Feuillet, C., Lauvergeat, C., Deswarte, C., Pilate, G., Boudet, A., Grima-Pettenati, J. (1995) Tissue- and cell-specific expression of cinnamoyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. *Plant Mol. Biol.* 27: 651-67

Fichtner, K., Quick, W.P., Schulze, E.-D., Mooney, H.A., Rodermel, S.R., Bogorad, L., Stitt, M. (1993) Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' *rbcS*. *Planta* 190: 1-9

Fischer, K., Arbinger, B., Kammerer, K., Busch, C., Brink, S., Wallmeier, H., Sauer, N., Eckerskorn, C., Flügge, U.I. (1994) Cloning and *in vivo* expression of functional triose phosphate/ phosphate translocators from C₃- and C₄-plants: evidence for the putative participation of specific amino acids residues in the recognition of phosphoenolpyruvate. *Plant. J.* 5: 215-26

Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbinger, B., Weber, A., Häusler, R.E., Flügge, U.I. (1997) A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/ phosphate antiporter. *Plant Cell* 9: 453-462

Fliege, R., Flügge, U.I., Werdan, K., Heldt, H.W. (1978) Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts *Biochim. Biophys. Acta* 502: 232-47

Flügge, U.I. (1998) Metabolite transporters in plastids. *Curr. Op. Plant Biol.* 1: 201-8

Flügge, U.I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., Eckerskorn, C. (1989) The triose-phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts, *EMBO J.* 8: 39-46

- Flügge**, U.I., Heldt, H.W. (1984) The phosphate-triose phosphate-3-phosphoglycerate translocator of chloroplasts. *Trends Biochem. Sci.* 9:530-33
- Flügge**, U.I., Weber, A., Fischer, K., Lottspeich, F., Eckerskorn, C., Wägemann, K., Soll, J. (1991) The major chloroplast envelope polypeptide is the phosphate translocator and not the protein import receptor. *Nature* 353: 364-7
- Fox**, S.R., Rawsthorne, S., Hills, M.J., (2001) Fatty acid synthesis in pea-root plastids is inhibited by the action of long-chain acyl-coenzyme As on metabolite transporters. *Plant Physiol.* 126: 1259-65
- Franceschi**, V.R., Giaquinta, R.T. (1983a) The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. I. Ultrastructure and histochemistry during vegetative development. *Planta* 157: 411-21
- Franceschi**, V.R., Giaquinta, R.T. (1983b) The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. II. Structural, metabolic and compartmental changes during reproductive growth. *Planta* 157: 422-31
- Franich**, R.A., Carson, M.J., Carson, S.D. (1986) *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 28: 267-8
- Frankard**, V., Vauterin, M., Lacobs, M. (1997) Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartate kinase. *Plant Mol. Biol.* 34: 233-42
- French**, C.J., Elder, M., Leggett, F., Ibrahim, R.K., Towers, G.H.N. (1991) Flavonoids inhibit infectivity of tobacco mosaic virus. *Can. J. Plant Pathol.* 13: 1-6
- French**, C.J., Towers, G.H.N. (1992) Inhibition of potato virus X by flavonoids. *Phytochemistry* 31: 3017-20
- Frisch**, D.A., Tommey, A.M., Gengenbach, B.G., Somers, D.A. (1991) Direct genetic selection of a maize cDNA for dihydrodipicolinate synthase in an *Escherichia coli* *dapA* auxotroph. *Mol. Gen. Genet.* 228: 287-93
- Fuchs**, R.L., Smith, J.D. (1979) The purification and characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase A from developing maize seeds. *Biochim. Biophys. Acta* 566: 40-8
- Fuglevand**, G., Jackson, J.A., Jenkins, G.I. (1996) UV-B, UV-A and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 2347-57
- Galili**, G. (1995) Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell* 7: 899-906
- Gälweiler**, L., Guan, C., Mueller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., Palme, K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-30

- Garcia, I.,** Rodgers, M., Pepin, R., Hsieh, T.-F., Matringe, M. (1999) Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 119: 1507-16
- Genty, B.,** Briantis, J.M., Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic transport and the quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92
- Ghislain, M.,** Frankard, V., Vandenbossche, D., Matthews, B.F., Jacobs, B. (1994) Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 24: 835-51
- Goldsmith, M.H.** (1977) The polar transport of auxin. *Annu Rev. Plant Physiol.* 28: 439-78
- Graan, T.,** Ort, D.R. (1984) Quantitation of the rapid electron donors to P700, the functional plastoquinone pool, and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 259(22):14003-14010
- Grace, S.C.,** Logan, B.A., Adams III, W.W. (1998) Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell Environ.* 21: 513-21
- Grace, S.C.,** Logan, B.A. (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 1499-1510
- Graham, T.L.** (1991) A rapid, high resolution high performance liquid chromatography profiling procedure for plant and microbial secondary metabolites. *Plant Physiol.* 95: 584-93
- Graham, T.L.** (1995) Cellular biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In Handbook of phytoalexin metabolism and action. (Danile, M., Purkayastha, R.P., Hrsg.), S. 85-116, *Marcel Dekker*, New York
- Graham, T.L.** (1998) Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 135-144-0
- Greene, B.A.,** Allred, D.R., Morishige, D.T., Staehelin, L.A. (1988a) Hierarchical response of light harvesting chlorophyll-proteins in a light sensitive chlorophyll b-deficient mutant of maize. *Plant Physiol.* 87: 357-64
- Greene, B.A.,** Staehelin, L.A., Melis, A. (1988b) Compensatory alterations in the photochemical apparatus of a photoregulatory, chlorophyll-deficient mutant of maize. *Plant Physiol.* 87: 350-356

- Gutensohn**, M. (1999) Studien zur Identifizierung und Charakterisierung von Komponenten des chloroplastidären Protein-Import-Apparates. Dissertation an der Universität zu Köln
- Haake**, V., Zrenner, R., Sonnewald, U., Stitt, M. (1998) A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J.* 14: 147-57
- Hagemeier**, J., Schneider, B., Oldham, N.J., Hahlbrock, K. (2001) Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar. tomato strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 753-8
- Hahlbrock**, K., Grisebach, H. (1979) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30: 105-30
- Hahlbrock**, K., Scheel, D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 347-69
- Halpin**, C., Knight, M.E., Foxon, G.A., Campbell, M.M., Boudet, A.M., Boon, J.J., Chabbert, B., Tollier, M.-T., Schuch, W. (1994) Manipulation of lignin quality by down regulation of cinnamoyl alcohol dehydrogenase. *Plant J.* 6: 339-50
- Han**, C.-d., Coe, E.H., Martinsen, R.A. (1992) Molecular cloning and characterization of *iojap (ij)*, a pattern striping gene of maize. *EMBO J.* 11: 4037-46
- Harborne**, J.B. (1977) Chemosystematics and coevolution. *Pure appl. Chem.* 49: 1403-21
- Harborne**, J.B., Ingham, J.L. (1978) Biochemical aspects of the coevolution of higher plants with their fungal parasites. In *Biochemical aspects of plant and animal coevolution* (Harborne, J.B., Hrsg.), S. 343-405, *Academic Press*, London
- Harborne**, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (1975) *The Flavonoids*, 1. Aufl., 46ff., *Chapman and Hall*, London
- Harpster**, M.H., Mayfield, S.P., Taylor, W.C. (1984) Effects of pigment-deficient mutants on the accumulation of photosynthetic proteins in maize. *Plant Mol. Biol.* 3: 59-71
- Harrison**, E.P., Willingham, N.M., Lloyd, J.C., Raines, C.A. (1998) Reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation. *Planta* 204: 27-36
- Haslam**, E. (1993) Shikimic acid: Metabolism and metabolites. *John Wiley and Sons*, Chichester, UK
- Hatch**, M.D. (1987) C₄-Photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895: 81-106
- Hatch**, M.D., Mau, S.L. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179:361-9

- Hatch**, M.D., Slack, C.R. (1968) *Biochem. J.* 106: 141-6
- Hatch**, M.D., Slack, C.R., Bull, T.A. (1969) *Phytochemistry* 8: 697-706
- Hatton**, D., Sablowski, R., Yung, M.H., Smith, C., Schuch, W., Bevan, M. (1995) Two classes of *cis* sequences contribute to tissue-specific expression of a PAL2 promoter in transgenic tobacco. *Plant J.* 7: 859ff.
- Hauffe**, K.D., Lee, S.P., Subramaniam, R., Douglas, C.J. (1993) Combinatorial interactions between positive and negative *cis*-acting elements control spatial patterns of *4CL-1* expression in transgenic tobacco. *Plant J.* 4: 235-53
- Häusler**, R.E., Baur, B., Scharte, J., Teichmann, T., Eicks, M., Fischer, K.L., Flügge, U.-I., Schubert, S., Weber, A., Fischer, K. (2000) Plastidic metabolite transporters and their physiological functions in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* 24: 285-96
- Heber**, U., Hallier, U.W., Hudson, M.A. (1967) Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung von Enzymen und Substraten in der Blattzelle. II. Lokalisation von Enzymen des reduktiven und oxidativem Pentosephosphat-Zyklus in den Chloroplasten und Permeabilität der Chloroplastenmembran gegenüber Metaboliten. *Z. Naturforsch.* 22b: 1200-15
- Heldt**, H.W. (1979) Light-dependent changes of stromal H⁺ and Mg²⁺ concentration controlling CO₂ fixation. In Encyclopedia of plant physiology, Vol. 6: Photosynthesis II (Gibbs, M., Latzko, E., Hrsg.), S. 202-7, *Springer Verlag*, Berlin
- Heldt**, H.W. (1980) Measurement of metabolite movement across the envelope and of the pH in the stroma and the thylakoid space in intact chloroplasts. *Meth. Enzymol.* 69: 605-13
- Henkes**, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R., Stitt, M. (2001) A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 13: 535-51
- Henningsen**, K.W., Boynton, J.E., von Wettstein, D. (1993) Mutants at *xantha* and *albina* loci in relation to chloroplast biogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). Royal Danish Academy of Sciences and Letters, *Munksgaard*, Copenhagen
- Heremans**, B., Jacobs, M. (1995) Threonine accumulation in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with an altered aspartate kinase. *J. Plant Physiol.* 146: 249-57
- Herrmann**, K.M. (1995) The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-11
- Höfgen**, R., Axelsen, K.B., Kannangara, C.G., Schuettke, I., Pohlenz, H.D., Willmitzer, L., Grimm, B., von Wettstein, D. (1994) A visible marker for antisense mRNA expression on

- plants: inhibition of chlorophyll synthesis with a glutamate-1-semialdehyde aminotransferase antisense gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1726-30
- Holloway**, P.J., (1983) Some variations in the composition of suberin from the cork layers of higher plants. *Phytochemistry* 22: 495-502
- Horton**, P. (1987) Interplay between environmental and metabolic factors in the regulation of photosynthesis in higher plants. In *Progress in Photosynthesis Research* (Biggins, J., Hrsg.), 2. Aufl., S. 681-89, *Martinus Nijhoff Publishers*, Dordrecht
- Horton**, P., Black, M.T. (1980) *FEBS Lett.* 119: 141-4
- Horton**, P., Hague, A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 932: 107-15
- Huala**, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.-S., Larsen, E., Briggs, W.R. (1997) *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278: 2120-3
- Hubert**, S.C. (1989) Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. *Plant Physiol.* 91: 656-82
- Hudson**, A., Carpenter, R., Doyle, S., oen, E.S. (1993) *Olive*: a key gene required for chlorophyll biosynthesis in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 12: 3711-9
- Hutzler**, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T.P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenböck, G., Schnitzler, J.-P. (1998) Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* 323: 953-65
- Ishimaru**, K., Ishikawa, I., Matsuoka, M., Ohsugi, R. (1997) Analysis of a C₄ maize pyruvate,orthophosphate dikinase expressed in C₃ transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Science* 129: 57-64.
- Ishimaru**, K., Okawa, Y., Ishige, T., Tobias, D.J., Ohsugi, R. (1998) Elevated pyruvate,orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C₃ transgenic potatoes with a C₄ maize PPDK gene. *Physiol. Plant.* 103: 340-346.
- Jacobs**, M., Rubery, P.H. (1988) Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241: 346-9
- Jangaard**, N.O. (1974) The characterization of phenylalanine ammonia-lyase from several plant species. *Phytochemistry* 13: 1765-8
- Jansson**, S., Pichersky, E., Bassi, R., Green, B.R., Ikeuchi, M., Melis, A., Simpson, D.J., Spangfort, M., Staehelin, A., Thornber, J.P. (1992) A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:242-53
- Jencks**, W.P. (1970) Free energies of hydrolysis and decarboxylation. In *Handbook of Biochemistry* (Sober, H.A., Hrsg.), 2. Aufl., S. J181-J186, *Chemical Rubber Co.*

- Jenkins**, C.L., Hatch, M.D. (1985) Properties and reaction mechanism of C₄ leaf pyruvate, Pi dikinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 239(1):53-62
- Johnson**, H.S., Hatch, M.D. (1969) The C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Identification of intermediates and products and quantitative evidence for the route of carbon flow. *Biochem J.* 114(1):127-134
- Johnson**, H.S., Hatch, M.D. (1970) Properties and regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase and 'malic' enzyme in plants with the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem J.* 19(2):273-280
- Journet**, E.P., Douce, R. (1985) Enzymic capacities of purified cauliflower bud plastids for lipid synthesis and carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* 79: 458-67
- Kammerer**, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., Flügge U.I. (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose-6-phosphate/ phosphate antiporter. *Plant Cell* 10: 105-117
- Kaneko**, T., Hashimoto, T., Kumpaisai, R., Yamada, Y. (1990) Molecular cloning of wheat dihydrodipicolinate synthase. *J. Biol. Chem.* 265: 17451-5
- Kang**, F., Rawsthorne, S. (1996) Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta* 199: 321-7
- Kawamata**, S., Yamada, T., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Kato, H., Ichinose, Y., Kato, H., Shirashi, T., Oku, H. (1992) Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA from *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* 20: 167-70
- Keddie**, J.S., Carroll, B., Jones, J.D.G., Gruissem, W. (1996) The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO J.* 15: 4208-17
- Kerckhoffs**, L.H.J., Schreuder, M.E.L., Van Tuinen, A., Koornneef, M., Kendrick, R.E. (1997) Phytochrome control of anthocyanin biosynthesis in tomato seedlings: Analysis using photomorphogenic mutants. *Photochem. Photobiol.* 65: 374-81
- Kinsman**, E.A., Pyke, K.A. (1998) Bundle sheath cells and cell-specific plastid development in *Arabidopsis* leaves. *Development* 125: 1815-22
- Khyse-Anderson**, J.(1984) Electroblothing of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-9

- Kleinig**, H., Liedvogel, B. (1980) Fatty-acid synthesis by isolated chromoplasts from the daffodil: energy sources and distribution patterns of the acids. *Planta* 150: 166-9
- Koeppe**, D.E., Southwick, L.M., Bittell, J.E. (1976) The relationship of tissue chlorogenic acid concentrations and leaching of phenolics from sunflowers grown under varying phosphate nutrient conditions. *Can. J. Bot.* 54: 593-9
- Kofler**, H., Häusler, R.E., Schulz, B., Gröner, F., Flügge, U.-I., Weber, A. (2000) Molecular characterization of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in *Arabidopsis*, and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. *Mol. Gen. Genet.* 263: 978-86
- Kombrink**, E., Somssich, I.E. (1995) Defense responses of plants to pathogens. *Adv. Bot. Res.* 21: 1-34
- Koncz**, C., Schell, J. (1986) The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-96
- Koornneef**, M., Mutations affecting the testa color in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* 28: 1-4
- Köpke-Secundo**, E., Molnar, I., Schnarrenberger, C. (1990) Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplastic 3-phosphoglycerate kinase from spinach leaves. *Plant Physiol.* 93: 40-7
- Kossmann**, J., Sonnewald, U., Stitt, M. (1995) Reduction of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth. *Plant J.* 6: 637-50
- Krapp**, A., Quick, W.P., Stitt, M. (1991) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, other Calvin cycle enzymes and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. *Planta* 186: 58-6
- Krauss**, N., Schubert, W.D., Klukas, O., Fromm, P., Witt, H.T., Saenger, W. (1996) Photosystem I at 4-Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna system. *Nature Struct. Biol.* 3: 965-73
- Kreuzaler**, F., Ragg, H., Heller, W., Tesch, R., Witt, I., Hammer, D., Hahlbrock, K. (1983) Flavanone synthase from *Petroselinum hortense*. Molecular weight, subunit composition, size of messenger RNA, and absence of pantetheinyl residue. *Eur. J. Biochem.* 99: 89-96
- Kühnl**, T., Koch, U., Heller, W., Wellman, E. (1987) Chlorogenic acid biosynthesis: characterization of a light-induced microsomal 5-O-(4-coumaroyl)-D-quinic/ shikimate-

3'-hydroxylase from carrot (*Daucis carota* L.) cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 258: 226-32

Kunst, L. (1998) In *Methods in Molecular Biology: Arabidopsis Protocols*, 87. Aufl. (Martinez-Zapater, J.M., Salinas, J., Hrsg.), S. 43ff., *Humane Press*

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5

Lal, S.K., Kelley, P.M., Elthon, T.E. (1994) Purification and differential expression of enolase from maize. *Physiol. Plant.* 91: 587-92

Langdale, J.A., Kidner, C.A. (1994) *Bundle sheath defective*, a mutation that disrupts differentiation in maize leaves. *Development* 120: 673-81

Lattanzio, V., Arpaia, Cardinali, A., Di Venere, D., Linsalata, V. (2000) Role of endogenous flavonoids in resistance mechanism of *Vigna* to aphids. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5316-20

Lea, P.J., Blackwell, R.D., Murray, A.J.S., Joy, K.W. (1989) The use of mutants lacking glutamine synthetase and glutamate synthase to study their role in plant nitrogen metabolism. In *Recent advances in phytochemistry* (Poulton, J.E., Romeo, J.T., Conn, E.E., Hrsg.), S. 157-189; *Plenum Press*, New York

Lee, S.W., Robb, J.E., Nazar, R.N. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 11824ff.

Leegood, R.C., Acheson, R.M., Tecsi, L.I., Walker, R.P. (1999) The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. In *Regulation of primary metabolism in plants*. (Kruger, N.J., Hill, S.A., Ratcliffe, R.G., Hrsg.), S. 37-57, *Kluwer*, Dordrecht

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtke, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16(21):4743-4751

Lernmark, U., Gardeström, P. (1994) Distribution of pyruvate dehydrogenase complex activities between chloroplasts and mitochondria from leaves of different species. *Plant Physiol.* 106: 1633-8

Leutwiler, L.S., Meyerowitz, E.M., Tobin, E.M. (1986) Structure and expression of three light-harvesting chlorophyll a/b binding protein genes in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acid Res.* 14: 4051-4064

Lewis, N.G., Yamamoto, E. (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 455-96

- Li, H., Culligan, K., Dixon, R.A., Chory, J. (1995)** CUE1: A mesophyll cell-specific positive regulator of light-controlled gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7: 1599-1610
- Liang, X., Dron, M., Cramer, C.L., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1989)** Developmental and environmental regulation of a phenylalanine ammonia-lyase- β -glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9284ff.
- Lightner, Caspar (1998)** In *Methods in Molecular Biology: Arabidopsis Protocols*, 87. Aufl. (Martinez-Zapater, J.M., Salinas, J., Hrsg.), S. 91ff., *Humane Press*
- Lin, C., Ahmad, M., Cashmore, A.R. (1996)** *Arabidopsis* cryptochrome I is a soluble protein mediating blue-light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J.* 10: 893-902
- Linscheid, M., Wendisch, D., Strack, D. (1980)** The structures of sinapic acid esters and their metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z. Naturforsch.* 35: 907-14
- Logemann, E., Parniske, M., Hahlbrock, K. (1995)** Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5905-9
- Lois, R., Buchanan, B.B. (1994)** Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation: II. Mechanism of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta* 194: 504-9
- Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K., Schulz, W. (1989)** A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. *EMBO J.* 8: 1641
- López-Juez, E., Jarvis, R.P., Takeuchi, A., Page, A.M., Chory, J. (1998)** New *Arabidopsis cue* mutants suggest a close connection between plastid- and phytochrome regulation of nuclear gene expression. *Plant Physiol.* 118: 803-15
- Lorenz, R.J. (1984)** *Biometrie – Grundbegriffe der Biometrie*. *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart, ISBN 3-437-20324-X
- Lorimer, G.H., Badger, M.R., Andrews, T.J. (1976)** The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase by carbon dioxide and magnesium ions: equilibria, kinetics, a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry* 15: 529-36
- Lowry, O.H., Passoneau, J.V. (1972)** A flexible system of enzymatic analysis. *Academic Press*, N.Y. 201-202

- Lu**, Y.-P., Li, Z.-S., Rea, P. (1997) The AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione-S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 94: 8243-8
- Luderitz**, T., Grisebach, H. (1981) Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol:NADP⁺ dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Biochem.* 119: 115-24
- Luderitz**, T., Schatz, G., Grisebach, H. (1982) Enzymic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of 4-coumarate:CoA ligase from cambial sap of spruce (*Picea abies* L.). *Eur. J. Biochem.* 123: 583-6
- Luschnig**, L., Gaxiola, R.A., Grisafi, P., Fink, G.R. (1998) EIR1, a root specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 12: 2175-87
- Lynn**, D.G., Chen, R.H., Manning, K.S., Wood, H.N. (1987) The structural characterization of endogenous factors from *Vicia rosea* crown gall tumors that promote cell division of tobacco cells. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 84: 615-9
- Maher**, E.A., Bate, N.J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7802-6
- Marcé**, M., Brown, D.S., Capell, T., Figueras, X., Tiburcio, A.F. (1995) Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J. Chromatogr. B* 666: 329-35
- Marchant**, A., Kargul, J., May, S.J., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., Bennett, M.J. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* 18: 2066-73
- Margna**, U. (1977) *Phytochemistry* 16: 419-26
- Maurino**, V.G., Drincovich, M.F., Casati, P., Andreo, C.S., Ku, M.S.B., Gupta, S.K., Edwards, G.E., Franceschi, V.R. (1997) NADP-malic enzyme: Immunolocalization in different tissues of the C₄ plant maize and the C₃ plant wheat. *J. Exp. Bot.* 48: 799-811
- Mayfield**, S.P. (1990) Chloroplast gene regulation: interaction of the nuclear and chloroplast genomes in the expression of photosynthetic proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2: 509-13
- McHugh**, S.G., Knowles, V.L., Blakeley, Sangwan, R.S., Miki, B.L., Dennis, D.T., Plaxton, W.C. (1995) Differential expression of cytosolic and plastid pyruvate kinase isozymes in tobacco. *Physiol. Plant.* 95: 507-14

- Mehler**, A.H. (1951) Studies in the reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33: 65-77
- Melis**, A., Brown, J.S. (1980) Stoichiometry of system I and system II reaction centers and of plastoquinone in different photosynthetic membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4712-6
- Melzer**, E., O'Leary, M.H. (1987) Anaplerotic CO₂ fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Plant Physiology*. 84: 58-60.
- Meyer**, A.O., Kelly, G.J., Latzko, E. (1982) Pyruvate, orthophosphate dikinase from the immature grains of cereal grasses. *Plant Physiol.* 69: 7-10
- Miernyk**, J.A., Dennis, D.T. (1992) A developmental analysis of the enolase isoenzymes from *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* 99: 748-50
- Miflin**, B.J., Lea, P.J. (1982), Ammonia assimilation and amino-acid metabolism. *Encycl. Plant Physiol. New Ser.* 14a: 5-64
- Minami**, E.-I., Ozeki, Y., Matsuoka, M., Koizuka, N., Tanaka, Y. (1989) *Eur. J. Biochem.* 185: 19ff.
- Mita**, S., Hirano, H., Nakamura, K. (1997a) Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 114: 575-82
- Mita**, S., Murano, N., Akaike, M., Nakamura, K. (1997b) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J.* 11: 841-51
- Mittal**, S. (1996) Biochemical, genetic and molecular analysis of the phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. Doktorarbeit an der Ohio State University, USA
- Mochizuki**, N., Brusslan, J.A., Larkin, R., Nagatani, A., Chory, J. (2001) *Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5)* mutant reveals the involvement of Mg-chelatase subunit H in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2053-8
- Moffat**, E.D., Lytle, R.I. (1959) *Analyt. Chem.* 31: 926ff.
- Möhlmann**, T., Tjaden, J., Heinrichs, G., Quick, W.P., Häusler, R.E., Neuhaus, H.E. (1997) ADP-glucose drives starch synthesis in isolated maize endosperm amyloplasts: characterization of starch synthesis and transport properties across the amyloplast envelope. *Biochem. J.* 324: 503-9
- Møller**, S.G., Kunkel, T., Chua, N.-H. (2001) A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes & Dev.* 15: 90-103
- Moore**, T.S. (Hrsg.) (1993) Lipid metabolism in plants. *CRC Press*, Boca Raton, USA

- Muehlbauer**, G.J., Somers, D.A., Matthews, B.F., Gengenbach, B.G. (1995) Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. *Plant Physiol.* 106: 1303-12
- Müller**, K.O., Börger, H. (1941) *Arb. biol. Abt. (Ansl. Reichsanst.)*, Berl. 23: 189-231
- Müller**, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17: 6903-11
- Müller-Röber**, B., Lacognata, U., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1994) A truncated version of an ADP-glucose pyrophosphorylase promoter from potato specifies guard cell-selective expression in transgenic plants. *Plant Cell* 6: 601-12
- Mullet**, J.E., (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.* 103: 309-13
- Murphy**, A., Peer, W.A., Taiz, L. (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 211: 315-24
- Mustilli**, A.C., Fenzi, F., Ciliento, R., Alfano, F., Bowler, C. (1999) Phenotype of the tomato *high pigment-2* mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of *DEETIOLATED1*. *Plant Cell* 11; 145-57
- Naem**, M., Tetlow, I.J., Emes, M.J. (1997) Starch synthesis in amyloplasts purified from developing potato tubers. *Plant J.* 11: 1095-1103
- Nakamoto**, H., Edwards, G.E. (1983) Control of pyruvate, P_i dikinase from the C₄ plant maize by adenylate energy charge, pyruvate and analogs of pyruvate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15: 673-9
- Nakamoto**, H., Edwards, G.E. (1990) *Plant Physiol. Biochem.* 28: 553-9
- Nielsen**, T.H., Wischmann, B., Enevoldsen, K., Møller, B.L. (1994) Starch phosphorylation in potato tuber proceeds concurrently with *de novo* biosynthesis of starch. *Plant Physiol.* 105: 111-7
- Nomura**, M., Sentoku, N., Tajima, S., Matsuoka, M. (2000) Expression patterns of cytoplasmic pyruvate, orthophosphate dikinase of rice (C₃) and maize (C₄) in a C₃ plant, rice. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 343-347
- Norris**, S.R., Barrette, T.R., DellaPenna, D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastocyanin as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* 7: 2139-49
- O'Neill**, M.J., Adesanya, S.A., Roberts, M.F. (1983) Antifungal phytoalexins in *Phaseolus aureus* Roxb.. *Z. Naturforsch.* 38: 693-7

- Oelmüller**, R., Levitan, I., Bergfeld, R., Rajasekhar, V.K., Mohr, H. (1986) Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta* 168: 482-92
- Ohl**, S., Hederick, S.A., Chory, J., Lamb, C.J. (1990) Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promotor from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 837-48
- Ono**, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J.C., Barré-Sinoussi, F. (1990) Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* 190: 469-76
- Panstruga**, R., Hippe-Sanwald, S., Lee, Y.-K., Lataster, M., Lipka, V., Fischer, R., Liao, Y.C., Häusler, R.E., Kreuzaler, F., Hirsch, H.-J. (1997) Expression and chloroplast targeting of active phosphoenolpyruvate synthetase from *Escherichia coli* in *Solanum tuberosum*. *Plant Sci.* 191-205
- Papenbrock**, J., Pfündel, E., Mock, H.-P., Grimm, B. (2000) Decreased and increased expression of the subunit CHL I diminishes Mg-chelatase activity and reduces chlorophyll synthesis in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 22: 155-64
- Paul**, M.J., Andralojc, P.J., Banks, F.M., Parry, M.A.J., Knight, J.S., Gray, J.C., Keys, A.J. (1996) Altered RubisCO activity and amounts of a daytime tight-binding inhibitor in transgenic tobacco expressing limiting amounts of phosphoribulokinase. *J. Exp. Bot.* 47: 1963-6
- Peer**, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L., Murphy, A.S. (2001) Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 536-48
- Peeters**, K.M.U., Vanlaere, A.J. (1994) Amino-acid-metabolism associated with N-mobilization from the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.) during grain development. *Plant Cell Environm.* 17: 131-41
- Piao**, H.L., Lim, J.H., Kim, S.J., Cheong, G.W., Hwang, I. (2001) Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27: 305-14
- Pinto**, M.E., Casati, P., Hsu, T.-P., Ku, M.S.B., Edwards, G.E. (1999) Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B-absorbing compounds and NADP-malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different conditions. *J. Photochem Photobiol. B: Biol.* 48: 200-9
- Plaxton**, W.C. (1988) Purification of pyruvate kinase from developing castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 94: 1528-34

- Plaxton**, W.C. (1989) Molecular and immunological characterization of plastid and cytosolic pyruvate kinase isozymes from castor oil plant leaf and endosperm. *Eur. J. Biochem.* 181: 444-51
- Plaxton**, W.C., Sangwan, R.S., Singh, N., Gauthier, D.A., Turpin, D. (1993) Phosphoenolpyruvate metabolism of developing seeds. *In* Seed oils for the future. (MacKenzie, S.L., Taylor, C., Hrsg.), S. 35-43, *AOCS Press*, Champaign
- Poethig**, S. (1989) Genetic mosaics and cell lineage in plants. *Trends Genet.* 5: 273-7
- Portis**, A.R. Jr. (1981) Evidence of a low stromal Mg^{2+} concentration in intact chloroplasts in the dark. 1. Studies with the ionophore A23187. *Plant Physiol.* 67: 985-9
- Price**, G.D., Evans, J.R., von Caemmerer, S., Yu, J.-W., Badger, M.R. (1995) Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO_2 assimilation via a reduction in ribulose biphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *Planta* 195: 369-78
- Proudlove**, O., Thurman, D.A. (1981) The uptake of 2-oxoglutarate and pyruvate by isolated pea chloroplasts. *New Phytol.* 88: 255-64
- Provencher**, L.M., Miao, L., Sinha, N., Lucas, W. (2001) *Surcose export defective1* encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *Plant Cell* 13: 1127-1141
- Quail**, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., Wagner, D. (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 268: 675-80
- Qui**, Q., Kleppinger-Sparace, K.F., Sparace, S.A. (1994) The role of the triose-phosphate shuttle and glycolytic intermediates in fatty-acid and glycerolipid biosynthesis in pea root plastids. *Planta* 194: 193-9
- Quick**, W.P., Schurr, U., Scheibe, R., Schulze, E.-D., Rodermel, S.R., Bogorad, L., Stitt, M. (1991) Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' rbcS. I. Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. *Planta* 183: 542-54
- Quick**, W.P., Stitt, M. (1989) An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 977: 287-96
- Radwanski**, E.R., Last, R.L. (1995) Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7:921-34

- Rapp**, J.C., Mullet, J.E. (1991) Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently. *Plant Mol. Biol.* 17:813-23
- Rech**, J., Crouzet, J. (1974) Partial purification and initial studies of the tomato L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 350: 392-9
- Reed**, R.E., Hess, J.L. (1975) Partial purification and characterization of aspartate aminotransferases from seedling oat leaves. *J. Biol. Chem.* 250: 4456-61
- Redei**, G.P., Hirano, Y. (1964) Linkage studies. *Arabidopsis Info Serv.* 1: 9-10
- Reid**, E.E., Thompson, P., Lyttle, C.R., Dennis, D.T. (1977) Pyruvate dehydrogenase complex from higher plant mitochondria and proplastids. *Plant Physiol.* 59: 842-8
- Reiter**, R.S., Coomber, S.A., Bourett, T.M., Bartley, G.E., Scolnik, P.A. (1994) Control of leaf and chloroplast development by the *Arabidopsis* gene *pale cress*. *Plant Cell* 6: 1253-64
- Robeson**, D.J., Harborne, J.B. (1980) A chemical dichotomy in phytoalexin induction within the tribe Viciae of the Leguminosae. *Phytochemistry* 19: 2359-65
- Rodermel**, S.R., Abbott, M.S., Bogorad, L. (1988) Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense gene inhibits ribulose biphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell* 55: 673-81
- Rognes**, S.E., Lea, P.J., Mifflin, B.J. (1980) S-adenosylmethionine: a novel regulator of aspartate kinase. *Nature* 287: 357-9
- Rosche**, E., Streubel, M., Westhoff, P. (1994) Primary structure of the photosynthetic pyruvate,orthophosphate dikinase of the C₃ plant *Flaveria pringlei* and expression analysis of pyruvate,orthophosphate dikinase sequences in C₃, C₃-C₄ and C₄ *Flaveria* species. *Plant Mol. Biol.* 26: 763-9
- Roth**, R., Hall, L., Brutnell, T., Langdale, J. (1996) *Bundle sheath defective-2*, a mutation that disrupts the co-ordinated development of bundle sheath and mesophyll cells in the maize leaf. *Plant Cell* 8: 915-27
- Rusak**, G., Kraja_i_, M., Ple_e, N. (1997) Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L.. *Antivir. Res.* 36: 125-9
- Ruuska**, S.A., Andrews, T.J., Badger, M.R., Price, G.D., von Caemmerer, S. (2000) The role of chloroplast electron transport and metabolites in modulating Rubisco activity in tobacco. Insights from transgenic plants with reduced amounts of cytochrome b/f complex or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiol.* 122: 491-504

- Sablowski**, R.W.M.m Moyano, E., Culianezmacia, F.A., Schuch, W. Martin, C., Bevan, M. (1994) A flower-specific myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.* 13: 128-37
- Sackstedter**, C.A., Kanazawa, A., Jacoby, M.E., Kramer, D.M. (2000) The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: A proton-pumping Q cycle is continuously engaged. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14283-8
- Sakai**, T., Wada, T., Ishiguro, S., Okada, K. (2000) RPT2: A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 225-36
- Salamone**, P.R., Greene, T.W., Kavakli, I.H., Okita, T.W. (2000) Isolation and characterization of higher plant ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit homotetramer. *FEBS Lett.* 482: 113-8
- Salisbury**, F.B., Ross, C.W. (1992) Plant Physiology, 4. Aufl., *Wadsworth Publishing Co.*, Belmont
- Samach**, A., Broday, L., Hareven, D., Lifschitz, E. (1995) Expression of an amino acid biosynthesis gene in tomato flowers: developmental upregulation and MeJa response are parenchyma-specific and mutually compatible. *Plant J.* 8: 391-406
- Sanger**, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12):5463-5467
- Sangwan**, R.S., Gauthier, D.A., Turpin, D.H., Pomeroy, M.H., Plaxton, W.C. (1992) Pyruvate kinase isoenzymes from zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus*. Developmental profiles and subunit composition. *Planta* 187: 198-202
- Sathasivan**, K., Haughn, G.W., Murai, N. (1990) Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. *Nucleic Acids Res.* 18: 2188ff.
- Savada**, S., Arakawa, O., Muraki, I. (1999) Photosynthesis with single-rooted *Amaranthus* leaves. I. Changes in the activities of RubP-1,5-bisphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase and the amounts of intermediates in photosynthetic metabolism in response to changes in the source-sink balance. *Plant Cell Physiol.* 40: 1143-51
- Scheibe**, R. (1994) Lichtregulation von Chloroplastenenzymen. *Naturwissenschaften* 81: 443-8
- Scheible**, W.R., Krapp, A., Stitt, M. (2000) Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate

synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant Cell Environm.* 23: 1155-67

Schleucher, J., Vanderveer, P.J., Sharkey, T.D. (1998) Export of carbon from chloroplasts at night. *Plant Physiol.* 118: 1439-45

Schmelzer, E., Jahnen, W., Hahlbrock, K. (1988) *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2989-93

Schmelzer, E., Krüger-Lebus, S., Hahlbrock, K. (1989) Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. *Plant Cell* 1: 993-1001

Schmid, G., Gisebach, H. (1982) Enzymic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of UDP glucose:coniferyl-alcohol glucosyltransferase from cambial sap of spruce (*Picea abies* L.). *Eur. J. Biochem.* 123: 363-70

Schmid, J., Amrhein, N. (1995) Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* 4: 737-49

Schnabl, H. (1981) The compartmentation of carboxylating and decarboxylating enzymes in guard cell chloroplasts. *Planta* 152: 307-13

Schnarrenberger, C., Flechner, A., Martin, W. (1995) Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant Physiol.* 108: 609-14

Schnarrenberger, C., Oeser, A., Tolbert, N.E. (1973) Two isoenzymes each of glucose-6-P dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 154: 4398-48

Schnitzler, J.P., Jungblut, T.P., Heller, W., Hutzler, P., Heinzmann, U., Schmelzer, E., Ernst, D., Langebartels, C., Sandermann, H. (1996) Tissue localization of UV-B screening pigments and chalcone synthase mRNA in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *New Phytol.* 132: 247-58

Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10: 51-62

Schröder, G., Zahringer, U., Heller, W., Ebel, J., Grisebach, H. (1979) Biosynthesis of antifungal isoflavonoids in *Lupinus albus*. Enzymatic prenylation of genistein and 2'-hydroxygenistein. *Arch. Biochem. Biophys.* 194: 635-6

- Schulz, B.**, Frommer W.B., Flüge U.I., Hummel, S., Fischer, K., Willmitzer, L. (1993) Expression of the triose phosphate translocator gene is light dependent and restricted to green tissues. *Mol. Gen. Genet.* 238: 357-61
- Schulze-Lefert, P.**, Becker-André, M., Schulz, W., Hahlbrock, K., Dangl, J. (1989) Functional architecture of the light-responsive chalcone synthase promoter from parsley. *Plant Cell* 1: 707-14
- Schulze-Siebert, D.**, Heineke, D., Scharf, H., Schulz, G. (1984) Pyruvate-derived amino acids in spinach chloroplasts: synthesis and regulation during photosynthetic carbon metabolism. *Plant Physiol.* 76: 465-71
- Schünemann, D.**, Borchert, S. (1994) Specific transport of inorganic phosphate and C₃- and C₆-sugar-phosphates across the envelope membranes of tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaf-chloroplasts, tomato fruit-chloroplasts and fruit-chromoplasts. *Bot. Acta* 107: 461-7
- Scolnik, P.A.**, Hinton, P., Greenblatt, I.M., Giuliano, G., Delanoy, M.R., Spector, D.L., Pollock, D. (1987) Somatic instability of carotenoid biosynthesis in the tomato *ghost* mutant and its effect on plastid development. *Planta* 171: 11-8
- Shannon, J.C.**, Pien, F.-M., Liu, K.-C. (1996) Nucleotides and nucleotide sugars in developing maize endosperms – synthesis of ADP-glucose in *brittle-1*. *Plant Physiol.* 110: 835-43
- Sheahan, J.J.** (1996) Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 83: 679-86
- Sheen, J.** (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-1038
- Sheriff, A.**, Meyer, H., Riedel, E., Schmitt, J.M., Lapke, C. (1998) The influence of pyruvate, orthophosphate dikinase on a C₃ plant with respect to the intracellular location of the enzyme. *Plant Sci.* 136: 43-57
- Shufflebottom, D.**, Edwards, K., Schuch, W., Bevan, M. (1993) Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction-patterns. *Plant J.* 3: 835ff.
- Siehl, D.L.**, Conn, E.E. (1988) Kinetic and regulatory properties of aspartate dehydratase in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench.. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 822-9
- Smith, A.M.**, Denyer, K., Martin, C. (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 48: 67-87

- Smith**, C.M., Sarath, G., Chollet, R. (1994) A simple, single radioisotopic assay for the phosphorylation/ inactivation activity of the pyruvate,orthophosphate dikinase regulatory protein. *Photosynth. Res.* 40: 295-301
- Smith**, R.G., Gauthier, D.A., Dennis, D.T., Turpin, D.H. (1992) Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor seed endosperm. *Plant Physiol.* 98: 1233-8
- Spain**, B.H., Bowdish, K.S., Pacal, A.R., Staub, S.F., Koo, D., Chang, C.Y.R., Colicelli, J. (1996) Two human cDNAs, including a homolog of *Arabidopsis FUS6 (COP11)*, suppress G-protein- and mitogen-activated protein kinase-mediated signal transduction in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 16: 6698-6706
- Spedding**, G., Ratty, A., Middleton, E. Jr. (1989) Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.* 12: 99-110
- Stitt**, M., ap Rees, T. (1979) Capacities of pea chloroplasts to catalyse the oxidative pentose phosphate pathway and glycolysis. *Phytochemistry* 18: 1905-11
- Stitt**, M., Schulze, E.-D. (1994) Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant Cell Environ.* 17: 465-87
- Streatfield**, S.J., Weber, A., Kinsman, E.A., Häusler, R.E., Li, J, Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W.M., Pyke, K.A., Flügge, U.-I., Chory, J. (1999) The Phosphoenolpyruvate/ phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development and plastid-dependent nuclear gene expression. *Plant Cell* 11: 1609-21
- Subhan**, D., Murthy, S.D.S. (2001) Effect of polyamines on chlorophyll and protein contents, photochemical activity, and energy transfer in detached wheat leaves during dark incubation. *Biol. Plant.* 44: 529-33
- Subramaniam**, R., Reinold, S., Molitor, E.K., Douglas, C.J. (1993) Structure, inheritance and expression of hybrid poplar (*Populus nigra* × *Populus deltoides*) phenylalanine ammonia-lyase genes. *Plant Physiol.* 33: 715ff.
- Sullivan**, J.A., Gray, J.C. (1999) Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant. *Plant Cell* 11: 901-10
- Susek**, R.E., Chory, J. (1992) A tale of two genomes: role of a chloroplast signal in coordinating nuclear and plastid genome expression. *Austr. J. Plant Physiol.* 19: 387-99
- Swinburne**, T.R. (1973) The resistance of immature Bramley's seeding apples to rotting by *Nectaria galligena*. In Fungal pathogenicity and the plants response. (Byrde, R.J.W., Cutting, C.V., Hrsg.), S. 365-82, *Academic Press*, London

- Takeda**, S., Hizukuri (1971) Studies on starch phosphate. Part 2. Isolation of glucose-3-phosphate and maltose phosphate by acidic hydrolysis of potato starch. *Stärke* 23: 267-72
- Tamagnone**, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., Roberts, K., Martin, C. (1998a) The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* 10: 135-54
- Tamagnone**, L., Merida, A., Stacey, A., Plaskitt, K., Parr, A., Chang, C.F. Lynn, D., Dow, J.M., Roberts, K., Martin, C. (1998b) Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 10: 1801-16
- Taniguchi**, M., Sugiyama, T. (1996) Isolation, characterization and expression of cDNA clones encoding a mitochondrial malate translocator from *Panicum miliaceum* L. *Plant Mol. Biol.* 30: 51-64
- Tetlow**, I.J., Bowsher, C.G., Emes, M.J. (1996) Reconstitution of the hexose phosphate translocator from the envelope membranes of wheat endosperm amyloplasts. *Biochem J.* 319: 717-23
- Teutonico**, R.A., Dudley, M.W., Orr, J.D., Lynn, D.G., Binns, A.N. (1991) Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 97: 288-97
- Thomas**, S., Mooney, P.J., Burrell, M.M., Fell, D.A. (1997) Metabolic Control Analysis of glycolysis in tuber tissue of potato (*Solanum tuberosum*): explanation for the low control coefficient of phosphofructokinase over respiratory flux. *Biochem J.* 322: 119-127
- Thorbjørnsen**, T., Villand, P., Denyer, K., Olsen, O.-A., Smith, A.M. (1996) Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *Plant J.* 10: 243-50
- Tjaden**, J., Möhlmann, T., Kampfenkel, K., Henrichs, G., Neuhaus, H.E. (1998) Altered plastidic ATP/ ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *Plant J.* 16: 531-40
- Tringali**, C., Spatafora, C., Cali, V., Simmonds, M.S. (2001) Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*. *Filoterapia* 72: 538-43
- Tsukaya**, H., Oshima, T., Naito, S., Chino, M., Komeda, Y. (1991) Sugar-dependent expression of the *CHS-A* gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 97: 1414-21

- Umbarger**, H.E. (1978) Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 533-606
- Utsuno**, K., Shikanai, T., Yamada, Y., Hashimoto, T. (1998) AGR, an AGRVITROPIC locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane protein family member. *Plant Cell Physiol.* 39: 1111-8
- Van der Straeten**, D., Rodrigues-Pousada, R.A., Goodman, H.M., Van Montagu, M. (1991) Plant Enolase: Gene structure, expression and evolution. *Plant Cell* 3: 719-35
- van Volkenburgh**, E., Cleland, R.E., Schmidt, M.G. (1985) The mechanism of light-dependent leaf cell expansion. In Control of leaf growth SEB seminar series. (Baker, N.R., Davies, W.J., Ong, C.K., Hrsg.), *Cambridge University Press*, Cambridge
- Veit**, M., Pauli, G.F. (1999) The major flavonoids of *Arabidopsis thaliana* L. leaves. *J. Nat. Prod.* 62: 1301-3
- Vignols**, F., Rigan, J., Torres, M.A., Capellades, M., Puigdomènech, P. (1995) The *brown midrib3 (bm3)* mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Plant Cell* 7: 407-16
- Vince-Prue**, D., Tucker, D.J. (1983) Photomorphogenesis in leaves. In The Growth and functioning of leaves. (Dale, J.E., Milthorpe, F.L., Hrsg.), S. 233-70, *Cambridge University Press*, Cambridge
- Vinti**, G., Hills, A., Campbell, S., Bowyer, J.R., Mochizuki, N., Chory, J., López-Juez, E. (2000) Interactions between *hyl* and *gun* mutants of *Arabidopsis*, and their implications for plastid/ nuclear signalling. *Plant J.* 24: 883-94
- Voelker**, R., Barkan, A. (1995) Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO J.* 14: 3905-14
- von Wettstein**, D., Gough, S., Kannangara, C.G., (1995) Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1039-57
- Walbot**, V., Coe, E.H. (1979) Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2760-4
- Walker**, R.P., Chen, Z.-H., Tésci, L.I., Famiani, F., Lea, P.J., Leegood, R.C. (1999) Phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development. *Planta* 210: 9-18
- Walter**, M.H., Grima-Pettenati, J., Feuillet, C. (1994) Characterization of a bean (*Phaseolus vulgaris* L.) malic enzyme gene. *Eur. J. Biochem.* 224: 999-1009
- Wang**, X., Larkins, B.A. (2001) Genetic analysis of amino acid accumulation in *opaque-2* maize endosperm. *Plant Physiol.* 125: 1766-77

- Wanner** L.A., Li, G., Ware, D., Sommsich, I.E., Davis, K.R. (1995) The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 27: 327-38
- Weber**, K., Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-9
- Weisemann**, J.M., Matthews, B.F. (1993) Identification and expression of a cDNA from *Daucus carota* encoding a bifunctional aspartokinase-homoserine dehydrogenase. *Plant Mol. Biol.* 22: 301-12
- Weissenböck**, G., Schnabl, H., Sachs, G., Elbert, C., Heller, F.-O. (1984) Flavonol content of guard cell and mesophyll cell protoplasts isolated from *Vicia faba* L. leaves. *Physiol. Plant.* 62: 356-62
- Williams**, M.L., Farrar, Pollock, C.J. (1989) Cell specialization within the parenchymatous bundle sheath of barley. *Plant Cell Environ.* 12: 909-18
- Winkel-Shirley**, B. (1999) Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol. Plant.* 107: 142-9
- Wollenweber**, P. (1962) *J. Chromatogr.* 9: 369ff.
- Yamada**, T., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Kato, H., Hashimoto, T., Kawamata, S., Ichinose, Y., Kato, H., Shirashi, T., Oku, H. (1992) *Plant Cell Physiol.* 33: 715
- Yamasaki**, H., Uefuji, H., Sakiyama, Y. (1996), Bleaching of the red anthocyanin by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 332: 183-6
- Yamasaki**, H., Sakihama, Y., Ikehara, N. (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115: 1405-12
- Yan**, B., Stark, R.E. (2000) Biosynthesis, molecular structure and domain architecture of potato suberin: a ¹³C-NMR study using isotopically labeled precursors. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3298-304
- Yanofsky**, M.J., Alconada-Magliano, T.M., Mazzella, M.A., Gatz, C., Thomas, B., Casal, J.J. (1998) Phytochrome A affects stem growth, anthocyanin synthesis, sucrose-phosphate-synthase activity and neighbour detection in sunlight-grown potato. *Planta* 205: 235-41
- Yanofsky**, M.J., Whitelam, G.C., Casal, J.J. (2000) *Fhy3-1* retains inductive responses of phytochrome A. *Plant Physiol.* 123: 235-42
- Yao**, K., De Luca, V., Brisson, N. (1995) Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 7: 1787-99
- Young**, M.R., Towers, G.H.N., Neish, A.C. (1966) Taxonomic distribution of ammonia-lyase for L-phenylalanine and L-tyrosine in relation to lignification. *Can. J. Bot.* 44: 341-9

Zhang, H., Scheirer, D.C., Fowle, W.H., Goodman, H.M. (1992) Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4: 1575-88

Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3,8-Å resolution. *Nature* 409: 739-43

8. Anhang

8.1. Für die Transkriptomanalyse eingesetzte EST-Stammkulturen des ABRC

Stammkultur Nr.	Homologie des ESTs zu
173B8T7	Ascorbat-Peroxidase (zytosolisch)
119H19T7	UGPase
173J24T7	SPS
113G11T7	SPS II
143C8T7	RubisCO, SSU (Vollänge)
106F1T7	GSH-Reduktase
172D1T7	Cellulose-Synthase
186G16T7	NADP-GAPDH (Vollänge)
110L14T7	NADP-GAPDH (Partialklon)
231F6T7	FBPase
280G8T7	Glycin-Decarboxylase, H-Untereinheit
203H11T7	CAB II (PSI)
H10E5T7	psaA
S4T7	CAB I (PS II) (Vollänge)
104L22T7	CAB I (PS II) (Vollänge)
195L17T7	γ -Untereinheit F-ATPase
G8B10T7	α -Untereinheit V-ATPase (fast Vollänge)
105H22T7	α -Untereinheit V-ATPase (Partialklon)
201O21T7	β -Amylase
135M15T7	α -Amylase
216H23T7	Nitrat-Reduktase
177N14T7	Nitrit-Reduktase
249I20T7	PEP-Carboxylase
122A24T7	Fd-GOGAT
H1B7T7	NADH-GOGAT
242P4T7	Glutamin-Synthetase (zytosolisch), Vollänge
214A14T7	Glutamin-Synthetase (zytosolisch), Partialklon

Stammkultur Nr.	Homologie des ESTs zu
91I19T7	ATP-Sulfurylase
104L23T7	ATP-Sulfurylase II
179H3T7	Pre-Ferredoxin I (Vollänge)
271B5T7	Pre-Ferredoxin II (Vollänge)
273H6T7	Thioredoxin-m
156K18T7	AcetylCoA-Carboxylase
G10C5T7	HMG-CoA Reductase (Vollänge)
114M5T7	HMG-CoA Reductase II
120P4T7	HMG-CoA Reductase III
202N9T7	Phytoen-Synthase
229L21T7	Squalen-Synthase
181M9T7	Aspartat-Kinase
201J3T7	Ribonukleotid-Reduktase
107F14T7	Acetolactat-Synthase
251E22T7	γ -Glutamylcystein-Synthase
115M22T7	γ -Glutamylcystein-Synthase II
E8C12T7	Protochlorophyllid-Oxidase
E4F4T7	Mg ²⁺ -Chelatase, δ -Untereinheit
195D3T7	Mg ²⁺ -Chelatase H-Untereinheit
184J11T7	Glutamat-Semialdehyd-Dehydrogenase
31A5T7	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (Vollänge)
160N3T7	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (Partialklon)
191F19T7	Dihydrodipicolinat-Synthase (Vollänge)
218N24T7	NADP-Isocitrat-Dehydrogenase
148N6T7	NAD-Isocitrat-Dehydrogenase, Untereinheit 1(Vollänge)
111K6T7	NAD-IDH, Untereinheit 1 (Partialklon)
180K19T7	MDH (mitochondrial)
169F18T7	MDH (zytosolisch) (Vollänge)
111C4T7	MDH (zytosolisch) (Partialklon)
155L16T7	PPDK
251K11T7	DAHP-Synthase

Stammkultur Nr.	Homologie des ESTs zu
98G7T7	Dihydrochinon-Dehydratase/Shikimate Oxidoreduktase
G10B8T7	EPSP-Synthase (Vollänge)
G2C8T7	EPSP-Synthase (Partialklon)
145F17T7	Chorismat-Mutase
82B7T7	PAL
175B13T7	4CL
187C23T7	Chalcon-Synthase
F4E1T7	Tryptophan-Synthase
129B12T7	Tryptophan-Synthase
180H16T7	Laccase
33E10T7	Cinnamylalkohol-Dehydrogenase (Vollänge)
193J2T7	Cinnamylalkohol-Dehydrogenase (Partialklon)
41H9T7	CinnamoylCoA-Reduktase (Vollänge)
67E6T7	CinnamoylCoA-Reduktase (Partialklon)
231F8T7	CinnamoylCoA-Reduktase II
175H23T7	Tryptophan-Hydrolase
137C2T7	UDP-Glc-IAA-Glucosyltransferase (Vollänge)
176A10T7	UDP-Glc-IAA-Glucosyltransferase (Partialklon)
288D2T7	ACC-Synthase
105C8T7	Glutamat-Dehydrogenase (fast Vollänge)
128L23T7	Glycin-Decarboxylase, P-Protein
216M11T7	Glycin-Decarboxylase, T-Protein (Vollänge)
247G1T7	Glycin-Decarboxylase, T-Protein (Partialklon)
179M16T7	Actin 2
156L22T7	Actin
165O7T7	Ubiquitin
134O2XP	Pyruvat-Kinase
161P15T7	Stärke-Phosphorylase, H-Isoform
181M9T7	Homoserin-Dehydrogenase
F4H5T7	Prephenat-Dehydrogenase (Vollänge)
113G9T7	Prephenat-Dehydrogenase (Partialklon)
116C2T7	Isopropylmalat-DH

Stammkultur Nr.	Homologie des ESTs zu
125M17T7	Δ 1-Pyrrolin-5'-Carboxylat-Synthetase
126G8T7	Shikimate-Kinase
91B13T7	p-Phenylpyruvat-Dioxygenase
198M23T7	Nitrilase
E10B1T7	Aldehyd-Oxidase

Die Stammkultur-Nummer gibt die Nummer an, mit der die bezogene Stammkultur in der ABRC-EST-Datenbank annotiert ist.

8.2. Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt und lyophilisiert angeliefert.

EMBL3-SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGC-3'
T7-pBSC-SK	5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAG-3'
T3-pBSC-SK	5'-GCTCGAAATTAACCCCTCACTAAG-3'
CaMV35Sforw	5'-GCAAGACCCTTCCTCTATATAG-3'
PPDK3457forw	5'-CTCGAGCTGCTTTAATAGCTGAAG-3'
PPDK3457K _{pn} rev	5'-ACACAGGTACCCATAAGCCATCCTCCTTTCAAAGC-3'
Ftppdk5' forw	5'-CCGCATAGAAATCAGATATCA-3'
Ftppdk5' rev	5'-CATCATACCAGGCATAGATAT-3'
Ftppdk3' rev	5'-CATCCTCCTTTCAAAGCTTAA-3'
BoPPTrev	5'-CAGTTGAATGAGACCTCTGTCAC-3'
pYES2/6forw	5'-AATATACCTCTATACTTTAACGTC-3'
pYES2/6rev	5'-CCGTGAATGTAAGAGTGAC-3'
PPTfor2	5'-CCACCGCCGCTTCTTCAAGCGATC-3'
PPTrev2	5'-TCAAATGGCACCGAGTACCCATGG-3'
F4P13for2	5'-ACACCAGCAAGTGAGACATGATGC-3'
F4P13rev3	5'-TTGGACTCGTTTGGCTCTTCG-3'
PPSrev	5'-GATTTTAAACCTGCTTGCCGTGCT-3'

8.3. GenBank-Annotationen der cDNA-Sequenzen der bearbeiteten Gene

Gen	Organismus	GenBank Registrier-Nr.
FtPPDK	<i>Flaveria trinervia</i>	X75516
FpPPDK	<i>Flaveria pringlei</i>	X57141
BoPPT	<i>Brassica oleracea</i> <i>var. botrytis</i>	U13632
AtPPT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	U66321
AtPPT2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAC AC009325
PEPS	<i>Escherischia coli</i>	AAC74722

8.4. Übersicht über Metabolitgehalte weiterer Tageszeitpunkte

	Col-0 $\pm \sigma$	<i>cuel-6</i> $\pm \sigma$	<i>cuel-6/PPDK</i> $\pm \sigma$
Glukose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	501,2 38,5	312,7 25,6	350,2 76,3
Fruktose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	210,3 3,7	68,3 12,2	103,9 54,1
Glukose-1-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	127,0 16,7	53,3 11,3	122,1 8,2
6-Phosphoglukonat (nmol·g FG ⁻¹)	124,4 37,5	91,7 31,2	146,7 50,7
Fruktose-1,6-bisphosphat (nmol·g FG ⁻¹)	18,7 8,0	4,7 3,0	16,2 2,2
3-Phosphoglycerat (μmol·g FG ⁻¹)	0,218 0,115	0,042 0,031	1,937 1,336
Triosephosphate (nmol·g FG ⁻¹)	19,8 5,3	10,8 2,7	32,2 16,1
PEP (nmol·g FG ⁻¹)	42,9 18,4	45,9 6,0	181,4 30,1
Phosphat (μmol·g FG ⁻¹)	8,0 0,0	22,4 2,4	n.b. n.b.
Malat (μmol·g FG ⁻¹)	10,5 0,8	8,8 0,9	9,6 1,4
Pyruvat (nmol·g FG ⁻¹)	181,3 89,1	98,2 17,1	592,0 50,0
Pyruvat·PEP ⁻¹	6,7 3,0	2,3 0,5	3,3 0,3

	pOCA $\pm \sigma$	<i>cuel-1</i> $\pm \sigma$	<i>cuel-3</i> $\pm \sigma$
Glukose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	402,9 42,0	256,0 27,2	288,1 17,7
Fruktose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	145,1 10,4	78,3 12,1	95,3 10,1
Glukose-1-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	38,6 7,1	80,1 16,0	43,7 5,2
6-Phosphoglukonat (nmol·g FG ⁻¹)	68,0 23,1	76,4 29,4	73,7 19,3
Fruktose-1,6-bisphosphat (nmol·g FG ⁻¹)	4,4 1,5	1,4 0,5	2,3 1,0
3-Phosphoglycerat (μmol·g FG ⁻¹)	0,109 0,088	0,039 0,027	0,049 0,038
Triosephosphate (nmol·g FG ⁻¹)	5,0 1,1	13,0 4,4	9,4 1,2
PEP (nmol·g FG ⁻¹)	57,5 7,5	34,6 11,0	98,4 28,4
Phosphat (μmol·g FG ⁻¹)	9,7 0,4	18,5 2,4	18,5 2,4
Malat (μmol·g FG ⁻¹)	11,6 0,7	11,3 1,1	19,7 3,1
Pyruvat (nmol·g FG ⁻¹)	150,2 3,0	147,9 64,0	257,1 78,9
Pyruvat·PEP ⁻¹	2,8 0,5	3,9 1,8	3,6 0,4

Tab. 8.4.1 Metabolitgehalte in *Arabidopsis*-Blättern 10 h nach Beginn der Lichtperiode im Kurztag. n=4.
 σ : Standardabweichung. n.b.: nicht bestimmt.

	Col-0 $\pm \sigma$	<i>cue1-6</i> $\pm \sigma$	<i>cue1-6</i> /PPDK $\pm \sigma$
Glukose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	1198,2 391,6	986,1 104,2	2217,8 647,6
Fruktose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	334,8 112,0	157,7 31,2	186,7 60,0
Glukose-1-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	450,3 96,7	311,4 94,9	864,0 320,4
6-Phosphoglukonat (nmol·g FG ⁻¹)	358,0 79,1	253,7 70,6	1307,8 54,2
Fruktose-1,6-bisphosphat (nmol·g FG ⁻¹)	n.b. n.b.	15,5 6,2	268,1 128,2
3-Phosphoglycerat (μmol·g FG ⁻¹)	552,2 167,2	299,6 71,4	1694,5 872,0
Triosephosphate (nmol·g FG ⁻¹)	134,6 53,3	233,9 162,5	104,5 37,3
PEP (nmol·g FG ⁻¹)	122,9 49,5	65,1 30,2	551,4 176,3
Malat (μmol·g FG ⁻¹)	11,1 3,7	10,0 3,3	41,2 20,6
Pyruvat (nmol·g FG ⁻¹)	1675,1 254,0	1302,7 313,3	2210,5 815,8
Pyruvat·PEP ⁻¹	8,3 0,6	10,6 3,8	7,9 2,7

	pOCA $\pm \sigma$	<i>cue1-1</i> $\pm \sigma$	<i>cue1-3</i> $\pm \sigma$
Glukose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	808,6 63,5	677,1 48,4	899,3 62,5
Fruktose-6-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	310,4 58,4	202,8 45,8	132,3 42,8
Glukose-1-phosphat (nmol·g FG ⁻¹)	226,6 36,5	206,3 59,0	113,0 6,7
6-Phosphoglukonat (nmol·g FG ⁻¹)	278,6 39,0	283,0 31,5	218,4 17,5
Fruktose-1,6-bisphosphat (nmol·g FG ⁻¹)	19,6 9,6	31,5 16,8	32,2 15,6
3-Phosphoglycerat (μmol·g FG ⁻¹)	221,0 65,2	135,4 24,8	139,6 32,7
Triosephosphate (nmol·g FG ⁻¹)	88,2 16,1	63,7 11,2	241,8 48,6
PEP (nmol·g FG ⁻¹)	67,6 16,4	62,0 14,5	51,4 12,5
Malat (μmol·g FG ⁻¹)	15,8 1,9	7,0 1,0	16,3 2,5
Pyruvat (nmol·g FG ⁻¹)	1016,0 81,6	756,6 119,7	438,6 105,0
Pyruvat·PEP ⁻¹	9,7 2,0	11,9 3,7	8,6 1,1

Tab. 8.4.2 Metabolitgehalte in *Arabidopsis-sink*-Blättern während der Lichtperiode im Kurztag. n=4.
 σ : Standardabweichung. n.b.: nicht bestimmt.

Tab. 8.4.3 (nächste Seite) Aminosäuregehalte in *Arabidopsis*-Blättern 13 h nach Beginn der Lichtperiode im Langtag. n=3. Die Daten von *cue1-6*/PPDK stammen aus einer anderen Meßreihe als die für *cue1-6* und *cue1-6*/PPT und sind daher auf die mitgeführte Wildtyp-Kontrolle dieser Messung bezogen. n.b.: nicht bestimmt. SD: Standardabweichung.

AS (%)	Col-0	SD	cue1-6/PPDK	SD	Col-0	SD	cue1-6	SD	cue1-6/W3	SD	pOCA	SD	cue1-1	SD	cue1-3	SD
Glu	25,80	3,49	30,93	2,74	22,38	2,39	35,35	1,57	33,88	3,14	27,97	4,38	28,90	2,87	17,69	1,17
Gln	12,66	1,79	18,48	2,54	20,76	1,33	12,82	2,00	17,36	0,40	15,93	2,85	14,02	2,11	14,35	2,37
Asp	22,63	2,91	20,15	1,41	15,20	0,83	8,24	1,29	9,36	0,19	24,29	2,27	18,41	0,53	18,69	1,06
Asn	2,64	0,31	3,51	0,34	3,39	0,12	5,59	0,06	2,96	0,05	3,03	0,41	4,37	0,88	2,92	0,14
Ser	11,61	2,09	10,30	0,76	12,91	0,75	14,59	0,54	10,08	0,27	9,07	0,94	18,01	3,69	7,57	0,90
Gly	3,18	0,26	4,84	0,74	3,40	0,37	1,79	0,17	6,87	0,42	1,77	0,34	1,50	0,34	1,42	0,36
Ala	7,77	0,48	7,33	0,60	8,66	0,53	9,66	1,25	7,82	0,12	7,01	1,21	8,52	1,17	9,23	1,49
His	0,82	0,18	0,28	0,28	0,56	0,05	0,41	0,03	0,42	0,02	n.b.	n.b.	0,34	0,34	1,09	0,08
Arg	0,91	0,02	0,03	0,03	0,24	0,02	0,47	0,14	0,39	0,02	1,02	0,10	1,01	0,30	0,75	0,14
Pro	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,94	0,09	3,83	0,14	2,79	0,14	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Lys	0,52	0,28	0,48	0,07	0,31	0,02	0,52	0,03	0,19	0,02	0,75	0,09	0,66	0,04	0,68	0,12
Met	0,04	0,04	0,09	0,03	0,29	0,02	0,21	0,01	0,22	0,01	0,25	0,01	0,15	0,02	0,17	0,03
Thr	5,90	0,83	0,55	0,08	5,16	0,34	3,75	0,30	3,87	0,07	5,63	0,67	7,64	1,74	6,11	0,57
Val	1,30	0,14	0,76	0,05	0,74	0,02	0,96	0,06	0,58	n.b.	1,10	0,10	1,20	0,12	1,25	0,30
Ile	0,70	0,10	0,35	0,03	0,26	0,01	0,30	0,01	0,17	0,01	0,49	0,06	0,58	0,15	0,60	0,19
Leu	0,92	0,16	0,34	0,02	0,22	0,01	0,30	0,01	0,15	0,01	0,61	0,05	0,57	0,09	0,63	0,24
Phe	0,81	0,07	0,52	0,03	0,75	0,07	0,33	0,03	0,52	0,01	0,80	0,01	0,41	0,07	0,26	0,06
Tyr	0,48	0,07	0,39	0,02	0,13	0,01	0,13	0,01	0,09	n.b.	0,30	0,01	0,30	0,04	0,38	0,12
Trp	0,30	0,08	0,21	0,03	0,17	0,01	0,18	0,01	0,09	n.b.	0,19	0,05	0,26	0,07	0,27	0,08
Cit	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,50	0,15	0,23	0,02	1,70	0,04	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Orn	1,01	0,19	0,38	0,06	0,89	0,06	2,78	0,52	0,48	0,03	0,46	0,05	0,29	0,01	0,57	0,28
gesamt	100,00	9,61	100,00	8,77	100,00	6,81	100,00	7,36	100,00	2,76	100,00	12,81	100,00	8,12	100,00	16,40

AS (%)	Col-0	SD	cue1-6/PPDK	SD	Col-0	SD	cue1-6	SD	cue1-6/W3	SD	pOCA	SD	cue1-1	SD	cue1-3	SD
Glu	39,56	0,95	37,99	1,66	33,78	2,90	49,51	4,24	43,53	4,72	34,44	1,95	32,92	4,63	36,73	7,17
Gln	8,99	0,19	14,85	2,44	20,24	0,89	3,48	0,26	18,52	2,53	10,95	2,36	6,89	1,15	8,23	2,87
Asp	24,35	0,33	17,50	1,07	21,25	1,53	9,66	1,40	13,26	0,75	18,49	0,73	14,55	1,43	22,69	4,91
Asn	3,33	0,37	3,80	0,45	5,42	0,11	1,55	0,24	4,93	0,42	1,97	0,37	1,90	0,26	3,85	1,24
Ser	5,12	0,67	6,96	0,41	3,89	0,24	14,42	0,85	4,17	0,39	3,45	0,37	20,33	2,90	7,17	1,47
Gly	3,42	0,42	1,73	0,08	0,58	0,05	0,67	0,07	0,52	0,10	2,18	0,42	3,20	0,34	2,20	0,40
Ala	7,41	0,38	7,71	0,65	7,54	0,44	7,73	0,26	7,25	0,19	9,38	2,59	8,24	1,14	7,37	1,14
His	0,81	0,05	n.b.	n.b.	0,64	0,08	0,28	0,01	0,50	0,06	0,52	0,17	0,72	n.b.	n.b.	n.b.
Arg	n.b.	n.b.	0,54	0,02	0,20	0,02	0,25	0,02	0,18	0,01	0,43	0,12	0,96	0,10	0,81	0,13
Pro	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,81	0,15	3,69	2,33	2,30	0,73	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Lys	1,14	0,13	0,64	0,02	0,56	0,07	0,40	0,07	0,36	0,02	0,69	0,03	0,73	0,09	0,85	0,02
Met	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,18	0,02	0,15	n.b.	0,13	0,01	0,15	0,03	0,22	n.b.	0,13	0,01
Thr	0,98	0,08	4,81	0,57	1,96	0,02	2,26	0,18	1,92	0,12	4,07	0,32	5,20	0,78	5,54	1,78
Val	1,51	0,10	0,91	0,06	0,74	0,04	0,72	0,04	0,59	0,02	1,09	0,07	0,97	0,11	1,00	0,07
Ile	0,67	0,06	0,37	0,02	0,22	0,01	0,29	0,01	0,18	0,01	0,50	0,02	0,51	0,09	0,46	0,02
Leu	0,80	0,04	0,54	0,02	0,24	0,02	0,39	0,01	0,18	0,01	0,57	0,07	0,66	0,11	0,67	0,03
Phe	0,81	0,10	0,23	0,01	0,33	0,01	0,30	0,01	0,23	n.b.	0,60	0,15	0,58	0,14	0,53	0,01
Tyr	0,55	0,05	0,68	0,19	0,10	0,01	0,22	0,02	0,07	n.b.	0,38	0,07	0,56	0,10	0,61	0,05
Trp	0,30	0,10	0,38	0,03	0,09	0,01	0,15	n.b.	0,07	n.b.	0,26	0,05	0,32	0,01	0,37	0,06
Cit	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,23	0,01	0,11	0,02	0,30	0,05	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Orn	0,55	0,04	0,44	0,02	1,00	0,08	3,80	0,70	0,80	0,02	0,66	0,20	0,53	0,17	0,83	0,25
gesamt	100,00	2,04	100,00	6,49	100,00	5,43	100,00	4,41	100,00	1,28	100,00	11,55	100,00	11,74	100,00	20,01

Tab. 8.4.4 Aminosäuregehalte in *Arabidopsis*-Blättern am Ende der Dunkelperiode im Langtag, gegeben als prozentualer Anteil am Gesamtaminosäuregehalt. n=3. Die Daten von *cue1-6*/PPDK stammen aus einer anderen Meßreihe als die für *cue1-6* und *cue1-6*/PPT und sind daher nur mit der mitgeführten Wildtyp-Kontrolle dieser Messung vergleichbar. n.b.: nicht bestimmt. SD: Standardabweichung.

AS (%)	Col-0	SD	<i>cue1-6</i> /PPDK	SD	Col-0	SD	<i>cue1-6</i>	SD	<i>cue1-6</i> /W3	SD	pOCA	SD	<i>cue1-1</i>	SD	<i>cue1-3</i>	SD
Glu	23,17	2,49	29,44	1,69	28,62	2,53	32,18	3,16	64,30	14,72	20,38	0,95	25,92	1,96	18,32	2,79
Gln	21,74	1,01	18,89	2,23	17,98	1,56	14,04	1,88	14,03	2,25	25,18	1,76	21,99	2,74	24,43	3,02
Asp	13,75	1,14	13,84	0,80	15,64	1,92	7,51	0,23	8,77	0,88	13,23	1,05	13,13	1,40	12,85	1,16
Asn	2,47	0,15	2,73	0,32	3,14	0,22	2,01	0,71	2,29	0,34	2,88	0,24	5,44	1,14	3,05	0,37
Ser	10,71	1,38	11,10	0,62	13,65	1,45	14,38	0,53	9,26	1,10	10,74	1,23	10,37	2,06	9,37	1,17
Gly	7,53	1,09	5,96	0,85	4,28	0,70	2,37	0,44	3,83	0,77	8,41	0,44	2,63	0,69	6,47	0,97
Ala	9,85	0,73	7,88	0,53	5,03	0,57	7,92	1,50	5,27	0,58	9,42	0,53	7,48	0,94	14,80	0,22
His	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,42	0,03	0,38	0,04	0,30	0,05	n.b.	n.b.	0,70	n.b.	n.b.	n.b.
Arg	0,61	0,07	0,99	0,43	0,55	0,10	0,32	0,05	0,33	0,07	0,61	0,03	0,73	0,03	0,78	0,07
Pro	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,33	0,21	10,19	1,66	2,53	0,18	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Lys	0,73	0,05	0,50	0,05	0,37	0,03	0,42	0,03	0,22	0,03	0,63	0,03	0,56	0,02	0,62	0,05
Met	0,25	0,04	0,15	0,02	0,29	0,03	0,22	0,03	0,21	0,03	0,20	0,01	0,14	n.b.	0,13	0,03
Thr	4,94	0,44	3,55	0,29	3,86	0,28	3,01	0,52	2,75	0,17	4,16	0,45	9,51	0,58	5,41	0,63
Val	1,25	0,06	0,71	0,03	0,55	0,05	0,70	0,06	0,41	0,03	1,41	0,09	0,81	0,04	1,44	0,10
Ile	0,50	0,04	0,33	0,02	0,22	0,01	0,24	n.b.	0,15	0,02	0,45	0,03	0,48	0,03	0,47	0,04
Leu	0,72	0,07	0,39	0,02	0,19	0,02	0,26	0,04	0,14	0,01	0,64	0,04	0,46	0,03	0,57	0,04
Phe	0,61	0,03	0,48	0,03	0,40	0,03	0,31	0,06	0,24	0,04	0,68	0,04	0,29	0,03	0,27	0,04
Tyr	0,33	0,05	0,28	0,02	0,09	0,01	0,12	0,02	0,07	n.b.	0,29	0,04	0,40	0,05	0,27	0,05
Trp	0,34	0,06	0,21	0,02	0,11	0,01	0,14	0,03	0,06	0,01	0,27	0,05	0,20	0,02	0,31	0,04
Cit	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,37	0,11	0,26	0,04	1,61	0,18	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Orn	0,51	0,10	0,38	0,03	0,88	0,09	3,56	0,15	0,58	0,04	0,43	0,07	0,35	0,06	0,49	0,12
gesamt	100,00	7,43	100,00	6,55	100,00	8,88	100,00	7,41	100,00	24,21	100,00	6,85	100,00	10,93	100,00	10,13

Tab. 8.4.5 Aminosäuregehalte in *Arabidopsis*-Blättern 4 h nach Beginn der Lichtperiode im Langtag, gegeben als prozentualer Anteil am Gesamtaminosäuregehalt. n=3. Die Daten von *cue1-6*/PPDK stammen aus einer anderen Meßreihe als die für *cue1-6* und *cue1-6*/PPT und sind daher nur mit der mitgeführten Wildtyp-Kontrolle dieser Messung vergleichbar. n.b.: nicht bestimmt. SD: Standardabweichung.

AS (%)	Col-0	SD	<i>cue1-6/PPDK</i>	SD	Col-0	SD	<i>cue1-6</i>	SD	<i>cue1-6/NW3</i>	SD	pOCA	SD	<i>cue1-1</i>	SD	<i>cue1-3</i>	SD
Glu	25,80	3,49	30,93	2,74	22,38	2,39	35,35	1,57	33,88	3,14	27,97	4,38	28,90	2,87	17,69	1,17
Gln	12,66	1,79	18,48	2,54	20,76	1,33	12,82	2,00	17,36	0,40	15,93	2,85	14,02	2,11	14,35	2,37
Asp	22,63	2,91	20,15	1,41	15,20	0,83	8,24	1,29	9,36	0,19	24,29	2,27	18,41	0,53	18,69	1,06
Asn	2,64	0,31	3,51	0,34	3,39	0,12	5,59	0,06	2,96	0,05	3,03	0,41	4,37	0,88	2,92	0,14
Ser	11,61	2,09	10,30	0,76	12,91	0,75	14,59	0,54	10,08	0,27	9,07	0,94	18,01	3,69	7,57	0,90
Gly	3,18	0,26	4,84	0,74	3,40	0,37	1,79	0,17	6,87	0,42	1,77	0,34	1,50	0,34	1,42	0,36
Ala	7,77	0,48	7,33	0,60	8,66	0,53	9,66	1,25	7,82	0,12	7,01	1,21	8,52	1,17	9,23	1,49
His	0,82	0,18	0,28	0,28	0,56	0,05	0,41	0,03	0,42	0,02	n.b.	n.b.	0,34	0,34	1,09	0,08
Arg	0,91	0,02	0,03	0,03	0,24	0,02	0,47	0,14	0,39	0,02	1,02	0,10	1,01	0,30	0,75	0,14
Pro	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,94	0,09	3,83	0,14	2,79	0,14	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Lys	0,52	0,28	0,48	0,07	0,31	0,02	0,52	0,03	0,19	0,02	0,75	0,09	0,66	0,04	0,68	0,12
Met	0,04	0,04	0,09	0,03	0,29	0,02	0,21	0,01	0,22	0,01	0,25	0,01	0,15	0,02	0,17	0,03
Thr	5,90	0,83	0,55	0,08	5,16	0,34	3,75	0,30	3,87	0,07	5,63	0,67	7,64	1,74	6,11	0,57
Val	1,30	0,14	0,76	0,05	0,74	0,02	0,96	0,06	0,58	n.b.	1,10	0,10	1,20	0,12	1,25	0,30
Ile	0,70	0,10	0,35	0,03	0,26	0,01	0,30	0,01	0,17	0,01	0,49	0,06	0,58	0,15	0,60	0,19
Leu	0,92	0,16	0,34	0,02	0,22	0,01	0,30	0,01	0,15	0,01	0,61	0,05	0,57	0,09	0,63	0,24
Phe	0,81	0,07	0,52	0,03	0,75	0,07	0,33	0,03	0,52	0,01	0,80	0,01	0,41	0,07	0,26	0,06
Tyr	0,48	0,07	0,39	0,02	0,13	0,01	0,13	0,01	0,09	n.b.	0,30	0,01	0,30	0,04	0,38	0,12
Trp	0,30	0,08	0,21	0,03	0,17	0,01	0,18	0,01	0,09	n.b.	0,19	0,05	0,26	0,07	0,27	0,08
Cit	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,50	0,15	0,23	0,02	1,70	0,04	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Orn	1,01	0,19	0,38	0,06	0,89	0,06	2,78	0,52	0,48	0,03	0,46	0,05	0,29	0,01	0,57	0,28
gesamt	100,00	9,61	100,00	8,77	100,00	6,81	100,00	7,36	100,00	2,76	100,00	12,81	100,00	8,12	100,00	16,40

Tab. 8.4.6 Aminosäuregehalte in *Arabidopsis*-Blättern 13 h nach Beginn der Lichtperiode im Langtag, gegeben als prozentualer Anteil am Gesamtaminosäuregehalt. n=3. Die Daten von *cue1-6/PPDK* stammen aus einer anderen Meßreihe als die für *cue1-6* und *cue1-6/PPT* und sind daher nur mit der mitgeführten Wildtyp-Kontrolle dieser Messung vergleichbar. n.b.: nicht bestimmt. SD: Standardabweichung.

Ich danke...

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge für das interessante und ertragreiche Thema, die stetige Diskussionbereitschaft in wissenschaftlichen Fragen – damit verbunden auch die Anregung ungeahnter experimenteller Ansätze -, die uneingeschränkte finanzielle und psychologische Unterstützung bei Tagungen und seine hilfreichen praktischen Tips zur Silikonöltrigugation,

PD Dr. Sabine Waffenschmidt für die Übernahme des Koreferats, die unkomplizierte, kooperative Hilfsbereitschaft und die zahllosen kreativen Vorschläge zur Überwindung analytischer Hürden,

Dr. Rainer E. Häusler für die exorbitant gute Betreuung dieser Arbeit, seine weitsichtigen Ratschläge, die fundierte Vorarbeit, unzählige Anregungen in Theorie und Praxis, die unerschöpfliche Bereitschaft zum Diskurs über Stoffwechselschemata und Modellvorstellungen, seine enorme Einsatzfreude bei der Durchsicht des Manuskripts sowie für die vielen Dinge, die ich wissenschaftlich von ihm gelernt habe,

Rolf Hecker für die altruistische und unglaublich präzise Analyse der Aminosäuregehalte unverschämt zahlloser Extrakte, ohne die dieser Arbeit sicherlich Einiges fehlen würde,

Prof. Dr. Gottfried Weißenböck für seine engagierte, selbstlose und interessierte Hilfe in Sekundärstofffragen, die unkomplizierte Bereitstellung seiner Laborausstattung und für die spannenden Wettschnipseleien vor dem Fluoreszenzmikroskop,

Gabi Fiene für alle Pflanzentransformationen, die sie jemals auf diesem Planeten für mich durchgeführt hat – mit der Bitte um Verzeihung für meine sich glücklicherweise verjährende Undankbarkeit -, ihre Verdienste als Pflanzenamme und alles, für das sie sich im Laufe der Jahre verdient gemacht hat,

Dr. Andreas Weber für die umfassende Hilfsbereitschaft in molekularbiologischen Fragen,

Dr. Frank Ludwig für seine themenübergreifenden Ideen und Anregungen, den zielorientierten Einsatz seiner Beziehungen bei der Lösung verzwickter Probleme und seine rührende Bereitschaft beim Mittagessen langsameren, sozial vernachlässigten Tischgenossen Gesellschaft zu leisten,

Silke Knappe für die zahlreichen konstruktiven Ideen und kritischen Kommentare zu gemeinsamen Problemen und die selbstlose Einsatzfreude bei der Lösung dieser Probleme,

PD Dr. Rüdiger Simon für die theoretische und praktische Einführung in die chemische Mutagenese und seine geduldige Unterstützung bei der Durchsicht der mutagenisierten Pflanzen,

Katrin Lieselotte Fischer für die ambitionierte, engagierte und altruistische allumfassende praktische Hilfe und die leider auch notwendige häufige Kritik bei den umfangreichen Klonierungen zur Erschließung neuer thematischer Ufer und für die potentiell berechnigte mütterliche Sorge um mein Wohlergehen,

Sabine Kemp für die arbeitsreichen Vorarbeiten bei der Erstellung von Membranen für die Transkriptomanalyse und die freudige und bereitwillige Einführung in die Fischer-Kemp'sche Block-Vakuum-Technik,

Michael Eicks für die lückenlose Einführung in die Proteinexpression in Hefe, die praktischen Tips zu den Transportversuchen, sowie für die penetrant häufige Leihgabe seines hochtechnisierten Geodreiecks, ohne das einige Experimente nicht optimal hätten ausgewertet werden können,

Dr. Anika Wiese für die präzise Einführung in Alles, was mit Proteinbiochemie zu tun hat und für die eine Mini-Präp, deren unsägliche Bedeutung nicht ganz offenbar war,

Dr. Heike Kofler für die anschauliche praktische Erläuterung der pflanzlichen Sexualität anhand von Kreuzungsexperimenten,

den Mitarbeitern der Institutswerkstatt um Leo Leson für die vielen findigen Lösungen verzwickter Konstruktionen,

Hans Zimmer und den Mitarbeitern der Versuchsgärtnerei für den sorgsame Anzucht und die verantwortungsvolle Pflege vieler *Arabidopsis*-Generationen,

Siggi Werth für die unendlich vielen Konvertierungen zwischen analogen und digitalen Bildern und die unzähligen brillianten Fotos, die ihm trotz larmoyant beklagter räumlicher Enge wunderbar gelungen sind,

Sigrid Lorbeer für die einfallsreiche, stoische und unauffällige Abwicklung bürokratischer und administrativer Hindernisse und Probleme, sowie für die unermüdliche psychologische Ermunterung,

Dr. Stephen Streatfield für die Überlassung der *cue1*-Mutanten,

Prof. Dr. Peter Westhoff für jegliche PPDK-Konstrukte aus allen erdenklichen *Flaveria*-Arten,

Prof. Dr. Fritz Kreuzaler für die Übersendung des PEP-Synthetase-Konstruktes,

Dr. Herrmann Bauwe für die Bereitstellung des N1-Promotors aus Tabak,

Prof. Dr. Terry Graham für die Zusendung unschätzbar hilfreicher Daten und Literatur,

meinen Banknachbarn Dr. Verónica Maurino, Marion Kersthold und Klaus Ottmaier für die teilweise jahrelange Geduld und Leidenschaft beim Ertragen meiner Macken und Spinnereien,

den am Graduiertenkolleg beteiligten Dozenten und Stipendiaten für die zahllosen interessanten und profitablen wissenschaftlichen Einsichten und die erbauliche Geselligkeit und die stets ungezwungene Atmosphäre bei diversen Gelegenheiten jedweder Art,

der ganzen Labormannschaft für das großartige, unterhaltsame, lockere und sehr fröhliche Arbeitsklima in all' den Jahren,

meinen MannschaftskollegInnen vom Unihandball für die zahlreichen Inspirationen bei Turnieren und anderen konspirativen Gelegenheiten, insbesondere Charlotte Rürup, von der ich menschlich sehr viel gelernt habe (und was sie vielleicht gar nicht glauben mag),

der DFG für die Finanzierung im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen“,

und nicht zuletzt meinen Eltern für die allumfassende Unterstützung von Anfang an.

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht publiziert worden ist und daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Universität zu Köln sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.-I. Flügge betreut worden.

Beiträge zu Tagungen:

Voll, L., Häusler, R.E., Weber, A., Hecker, R., Fiene, G., Weissenböck, G., Flügge, U.-I.
Pleiotrope Effekte eines mutierten Locus am Beispiel der *cue1*-Mutante aus *Arabidopsis thaliana*. (2000) Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Jena, S. 54.

Voll, L., Häusler, R.E., Weber, A., Hecker, R., Fiene, G., Weissenböck, G., Waffenschmidt, S., Flügge, U.-I.

The *cue1* mutant of *Arabidopsis* – multiple effects of PEP shortage in the plastid. (2001)
10. Photosynthese-Rundgespräch, Wallenfels (Vortrag)

Voll, L., Häusler, R.E., Weber, A., Hecker, R., Fiene, G., Weissenböck, G., Waffenschmidt, S., Flügge, U.-I.

Pleiotropic effects of the *PPT* locus on primary and secondary metabolism in the *Arabidopsis cue1* mutants. (2001) 12th International Congress on Photosynthesis – PS 2001, Brisbane, AUS (Vortrag)

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die physiologische Analyse des Primär- und Sekundärstoffwechsels der *Arabidopsis thaliana cue1*-Mutanten, die einen Defekt im Phosphoenolpyruvat/ Phosphat-Translokator (PPT) der inneren Plastidenhüllmembran und einen retikulierten Blattphänotyp mit grünen Bereichen um die Leitbündel und einer chlorotischen restlichen Blattspreite aufweisen. Die Chloroplastenentwicklung und die lichtabhängige De-Repression des *chlorophyll a/b binding protein3* (CAB3)-promotors sind in den *cue1*-Mutanten gestört.

Die *cue1*-Mutante konnte phänotypisch durch die Expression eines heterologen PPT aus Blumenkohl und durch die Überexpression der Pyruvat, Orthophosphat-Dikinase (PPDK) aus der C₄-Pflanze *Flaveria trinervia* komplementiert werden.

Im Vergleich mit den komplementierten Linien und Kontrolllinien konnte gezeigt werden, daß die Limitationen der Photosynthese, des Calvin-Zyklus, der Saccharose- und Stärkeakkumulation in den *cue1*-Mutanten auf eine generelle Stoffwechselbeeinträchtigung zurückgeführt werden können. Es konnte erarbeitet werden, daß die durch die mangelnde Versorgung des Stromas mit Phosphoenolpyruvat (PEP) bedingten geringeren Gehalte an Phenylalanin verantwortlich für einen verringerten Sekundärstoffwechsel und die Ausprägung des retikulierten Blattphänotyps in den *cue1*-Mutanten sind, da die Gehalte an Phenylalanin und die Gehalte ausgewählter Sekundärmetabolite durch die Überexpression des heterologen PPT und der PPDK im *cue1*-Hintergrund wiederhergestellt werden konnten.

Obwohl der retikulierte Blattphänotyp durch die PPDK-Überexpression aufgehoben werden konnte, führte dies zu weiteren Beeinträchtigungen der Photosyntheseleistung, verminderten Gehalten an verzweigtkettigen Aminosäuren, zu einer geringeren Saccharose- und Stärkeakkumulation, sowie zu der Akkumulation von Pyruvat und PEP während der Lichtperiode. Der Einfluß auf den Stoffwechsel in den PPDK-Überexprimierern konnte auf den zusätzlichen ATP-Verbrauch der eingeführten PPDK im Stroma zurückgeführt werden.

Die möglichen Ursachen für den retikulierten Blattphänotyp der *cue1*-Mutanten wird im Hinblick auf Mutanten mit gestörter Chloroplastenentwicklung und Mutanten des Phytochrom A-Signalweges diskutiert.

Abstract

This work describes the physiological analysis of the primary and secondary metabolism of the *Arabidopsis thaliana cue1* mutants, which are defective in the phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) of the inner envelope and show a reticulate leaf phenotype with a dark green vasculature and light green intercostal region. Chloroplast development and light-dependent de-repression of the chlorophyll a/b binding protein 3 (CAB3) promoter are hampered in the *cue1* mutants.

The *cue1* mutant could be phenotypically complemented by the expression of a heterologous PPT from cauliflower and by the overexpression of a plastid-targeted pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) from the C₄-plant *Flaveria trinervia*.

In comparison with the complemented lines and the controls, it could be shown that the restrictions in photosynthesis, the Calvin cycle, sucrose and starch metabolism in *cue1* were due to a general effect on metabolism. It is shown that limiting contents of phenylalanine caused by a shortage of phosphoenolpyruvate (PEP) supply to the stroma were responsible for the a decreased secondary metabolism and the reticulate leaf phenotype in *cue1*, as the contents of phenylalanine and selected secondary metabolites could be restored by PPT and PPDK overexpression in the *cue1* background.

Although the reticulate leaf phenotype could be cured upon PPDK overexpression, this resulted in further restrictions in photosynthesis, the contents of branched chain amino acids, sucrose and starch metabolism and in an accumulation of pyruvate and PEP during the light period. The constraints on metabolism in the PPDK overexpressors could be attributed to ATP consumption by the introduced PPDK in the stroma.

The possible causes for the reticulate leaf phenotype in the *cue1* mutants are discussed with respect to already described mutants with impaired chloroplast development and mutants of the phytochrome A signal transduction pathway.

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 24. Juni 1974
Geburtsort: Holzheim, jetzt Neuss
Eltern: Katharina Voll, geb. Förmer
Alfred Voll
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang:

August 1980 – Juli 1984 St. Dionysius-Grundschule Kleinenbroich
August 1984 – Juni 1993 Gymnasium Korschenbroich,
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

Oktober 1993 Immatrikulation an der Universität zu Köln im Fach Biologie
Oktober 1995 Diplomvorprüfung im Erststudiengang Biologie
Februar bis Juli 1997 ERASMUS-Student an der Universität Athen im Fachgebiet Botanik
November 1997 Diplomprüfung im Hauptfach Botanik und den Nebenfächern Genetik und Biochemie
Dezember 1997 – Oktober 1998 Diplomarbeit am Botanischen Institut der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.-I. Flügge mit dem Thema: „Analyse transgener Pflanzen mit veränderten Aktivitäten plastidärer Transportsysteme“
November 1998 Beginn der experimentellen Arbeiten zur Dissertation am Institut für Botanik der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.-I. Flügge
April 2000 Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Molekulare Analysen von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen“ als DFG-Stipendiat
Beginn des Diplomstudienganges der Betriebswirtschaftslehre an der Universität zu Köln als Zweitstudiengang