

**Änderung der Glycinecarboxylase- und  
Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität in Blättern:  
Wirkungen auf die Photosynthese und den Stickstoff- und  
Kohlenstoff-Metabolismus**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Gerardo Esteban Antonicelli**

aus Córdoba, Argentinien

Göttingen 2005

D7

Referent:

Prof. Dr. Dieter Heineke

Korreferent:

Prof. Dr. Hans Walter Heldt

Tag der mündlichen Prüfung:

26. Januar 2005

an Hilen

Was ist das Schwerste von allem?

Mit den Augen zu sehen, was vor den Augen dir liegt.

Johann Wolfgang von Goethe



---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Die Oxygenase-Aktivität der RubisCO	1
1.2.	Der C <sub>2</sub> -Zyklus	2
1.3.	Die Umwandlung von Glycin zu Serin	4
1.4.	Metabolismus des N aus der Photorespiration	6
1.5.	Folge der Photorespiration	6
1.6.	C <sub>3</sub> /C <sub>4</sub> -intermediäre Photosynthese	7
1.7.	Gentechnische Veränderung der Glycindecarboxylierung	9
1.7.1.	P-Antisense-Pflanzen	10
1.7.2.	SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen	10
1.7.3.	Überexpression von Komponenten des GDC-Komplexes	10
1.8.	Zielsetzung dieser Arbeit	11
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1.	Allgemeines	12
2.2.	Material	12
2.2.1.	Pflanzenmaterial	12
2.2.2.	Bakterienstämme	12
2.2.3.	Plasmide	12
2.2.4.	Oligonukleotide (Primer)	13
2.2.5.	Chemikalien	14
2.2.6.	Enzyme für molekularbiologische Methoden	14
2.2.7.	Verwendete Nährmedien in molekularbiologischen Methoden	15
2.2.8.	Medienzusätze	16
2.3.	Pflanzenanzucht	17
2.3.1.	Anzucht von Kartoffelpflanzen	17
2.3.1.1.	Kartoffelpflanzen in Sterilkultur	17
2.3.1.2.	Kartoffelpflanzen in Erde	17
2.3.1.3.	Kartoffelpflanzen in Hydrokultur	18
2.3.2.	Anzucht von Tabakpflanzen	19
2.3.2.1.	Tabakpflanzen in Sterilkultur	19
2.3.2.2.	Tabakpflanzen im Gewächshaus	19
2.4.	Gaswechselanalyse	19
2.4.1.	Aufbau der Gaswechsel-Anlage	19
2.4.1.1.	Vorbereitung des Gasstroms	19
2.4.1.2.	Gasanalyse	20
2.4.1.3.	Steuerung des Systems	21

---

2.4.1.4.	Aufbau der Blattkammern	21
2.4.1.5.	Datenerfassung und –verarbeitung	21
2.4.2.	Bestimmung der CO <sub>2</sub> -Assimilationsrate unter Anzuchtsbedingungen	22
2.4.3.	Aufnahme von CO <sub>2</sub> -Sättigungskurven	22
2.5.	Messung der Chlorophyllfluoreszenz	22
2.6.	Präparation von Mitochondrien aus grünen Kartoffelblättern	24
2.7.	Extraktionsmethoden	25
2.7.1.	Extraktion von Metaboliten	25
2.7.1.1.	Chloroform/Methanol-Extraktion	25
2.7.1.2.	Perchlorsäure-Extraktion	26
2.7.1.3.	Metaphosphorsäure-Extraktion	26
2.7.2.	Extraktion von Enzymen	26
2.7.2.1.	Standard-Extraktion	26
2.7.2.2.	NADP-abhängige Malatdehydrogenase	27
2.7.2.3.	Nitratreduktase	28
2.7.2.4.	Glyoxylat- und Hydroxypyruvatreduktase	28
2.7.2.5.	Enzyme aus dem Ascorbat-Glutathion-Zyklus	29
2.8.	Bestimmung von Metabolitmengen	29
2.8.1.	Optisch-enzymatische Tests	29
2.8.1.1.	Stärke	30
2.8.1.2.	Glukose, Fruktose und Saccharose	30
2.8.1.3.	Malat	31
2.8.1.4.	Pyruvat	32
2.8.1.5.	Nitrat	32
2.8.1.6.	Glycerat-3-Phosphat	32
2.8.1.7.	Ascorbinsäure	33
2.8.2.	Colorimetrische Tests	33
2.8.2.1.	Glyoxylat	33
2.8.2.2.	Glutathion	34
2.8.3.	Chromatographische Tests	34
2.8.3.1.	Aminosäuren	34
2.9.	Bestimmung von Enzymaktivitäten	36
2.9.1.	Optisch-enzymatische Tests	37
2.9.1.1.	NADP-abhängige Malatdehydrogenase	37
2.9.1.2.	NADP-abhängige Glyoxylatreduktase	39
2.9.1.3.	NADP- und NAD-abhängige Hydroxypyruvatreduktase	39
2.9.1.4.	Ascorbatperoxidase	40
2.9.1.5.	Glutathionreduktase	40

---

2.9.1.6. Phosphoenolpyruvatcarboxylase	41
2.9.1.7. Pyruvatkinase	41
2.9.1.8. ATP-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase	42
2.9.1.9. Pyrophosphat-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase	42
2.9.2. Colorimetrische Tests	43
2.9.2.1. Nitratreduktase	43
2.9.3. Tests mit Einbau eines radioaktiv markierten Substrats	44
2.9.3.1. Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase	44
2.10. Proteinbestimmung	46
2.10.1. Proteinbestimmung nach Bradford	46
2.10.2. Proteinbestimmung nach Lowry	47
2.11. Chlorophyllbestimmung	47
2.12. Phäophytinbestimmung	48
2.13. Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren	48
2.13.1. RNA-Isolierung	48
2.13.2. Isolierung von Plasmid-DNA	49
2.13.2.1. Mini-Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i>	49
2.13.2.2. Maxi-Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i>	50
2.13.2.3. Mini-Plasmid-Präparation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
2.13.3. Ethanol-fällung von DNA oder RNA	51
2.13.4. Phenol/Chloroform-Reinigung von DNA	51
2.13.5. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	52
2.14. DNA-Amplifikation	52
2.14.1. Ableitung von synthetischen Primern	52
2.14.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	53
2.14.3. RT-PCR	54
2.14.4. Kolonie-PCR	54
2.14.5. DNA-Sequenzierung	55
2.15. Klonierungsmethoden	56
2.15.1. Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten	56
2.15.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	57
2.15.3. Auffüllen von überstehenden 5'-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle	57
2.15.4. Ligation von DNA-Moleküle	58
2.15.5. Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	59
2.15.6. Herstellung chemisch kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen	60
2.15.7. Transformationsmethoden	60
2.15.7.1. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	60
2.15.7.2. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	61

Inhaltsverzeichnis	IV
<hr/>	
2.16. Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> L.	61
2.17. Gelelektrophoretische Trennmethode	62
2.17.1. TEA-Agarose-Gelelektrophorese	62
2.17.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	62
2.17.2.1. Zusammensetzung der Gele und Elektrophorese	63
2.17.2.2. Coomassie-Färbung	64
2.18. Immunologische Untersuchungen	65
2.18.1. „Western blot-Analyse“	65
2.18.1.1. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran	65
2.18.1.2. Antikörperreaktion	66
2.18.1.3. Peroxidase-Nachweis über „Enhanced Chemiluminescence“	67
2.18.1.4. Alkalische Phosphatase-Nachweis	67
2.19. Histochemischer $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Test	68
3. <b>Ergebnisse</b>	69
3.1. Überexpression des Genes für das P-Protein in verschiedenen Zelltypen von Tabakblättern	69
3.1.1. Herstellung der Plasmide zur Pflanzentransformation	69
3.1.1.1. Klonierung des Poly-A-Signals in pCAMBIA 1200	70
3.1.1.2. Klonierung der Promotoren	70
3.1.1.3. Amplifikation und Klonierung der cDNA <i>AtGDCsP</i> aus <i>A. thaliana</i> (L.) Heynh.	70
3.1.2. Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun NN	72
3.1.3. Überprüfung des Expressionsniveaus	72
3.1.3.1. Expression in Chloroplasten-haltigen Zellen	72
3.1.3.2. Expression in Mesophyllzellen	73
3.1.3.3. Expression in leitbündelnahen Zellen	73
3.1.4. Überprüfung der Aktivität und Gewebespezifität der Promotoren	74
3.1.4.1. Klonierung der Promotoren in GUS-Expressionskassetten	74
3.1.4.2. Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität	75
3.2. Antisense-Repression der Expression des Genes für das P-Protein in Mesophyllzellen von Kartoffelblättern	77
3.2.1. Wahl der transgenen Linien für die physiologische Untersuchungen	77
3.2.2. Wachstumsphänotyp der P-Antisense-Pflanzen	78
3.2.3. Grad der Repression der Expression des P-Protein-Gens in Abhängigkeit von Blattalter und N-Versorgung	81
3.2.4. Intermediate des C2-zyklus	82
3.2.5. Wirkung der Reduktion der Menge an P-Protein auf die Photosynthese	88

Inhaltsverzeichnis	V
3.2.5.1. CO <sub>2</sub> -Assimilation unter Anzuchtbedingungen	88
3.2.5.2. Effekte verschiedener Photorespirationsraten auf die CO <sub>2</sub> -Assimilation	91
3.2.5.3. Reduktionsgrad des PSII und Photoinhibition	97
3.2.5.4. Symptome von oxidativem Stress	103
3.2.6. Wirkungen der Reduktion der Menge an P-Protein auf den C-Metabolismus	105
3.2.6.1. Hexosen und Stärke	105
3.2.6.2. organische Säuren	107
3.2.7. Wirkungen der Reduktion der Menge an P-Protein auf den N-Metabolismus	108
3.2.7.1. Aminosäuren	108
3.2.7.2. Nitratreduktaseaktivität und Nitratgehalt	112
3.3. Antisense-Repression der Expression des Genes für die Serinhydroxymethyltransferase in Chloroplasten-haltigen Zellen	114
3.3.1. Menge an SHMT und GDC-P-Protein in den SHMT-Antisense-Pflanzen	114
3.3.2. Wachstumsphänotyp der SHMT-Antisense-Pflanzen	115
3.3.3. Intermediate des C <sub>2</sub> -zyklus	117
3.3.4. Wirkungen der Reduktion der Menge an SHMT-Protein auf die Photosynthese	119
3.3.4.1. CO <sub>2</sub> -Assimilation unter verschiedener Photorespirationsraten	119
3.3.4.2. Reduktionsgrad des PSII und Photoinhibition	121
3.3.5. Wirkungen der Reduktion der Menge an SHMT-Protein auf den C-Metabolismus	125
3.3.5.1. Hexosen und Stärke	125
3.3.5.2. Organische Säuren	127
3.3.5.3. Enzyme zur Synthese von organischen Säuren	128
3.3.6. Wirkungen der Reduktion der Menge an SHMT-Protein auf den N-Metabolismus	129
<b>4. Diskussion</b>	<b>131</b>
4.1. Auf dem Weg von einer C <sub>3</sub> -Pflanze zu einer C <sub>3</sub> /C <sub>4</sub> -intermediären Pflanze	131
4.2. Überexpression des P-Proteins	132
4.3. Reduktion der Kapazität für die Decarboxylierung von Glycin	132
4.4. Können Kartoffelpflanzen auf die GDC-Aktivität in Mesophyll verzichten?	133
4.4.1. „CO <sub>2</sub> burst“ in P-Antisense-Kartoffelpflanzen	135
4.5. Auswirkungen reduzierter Menge an P-Protein auf die Photosynthese	136

---

4.5.1. Mögliche Ursachen für die Chlorose in älteren Blättern der P-Antisense-Pflanzen	137
4.5.2. Einfluss der N-Versorgung auf den Chlorose-Phänotyp	139
4.6. Wirkungen reduzierter Menge an P-Protein auf den C- und N-Metabolismus	140
4.7. Wirkungen reduzierter Menge an SHMT-Protein auf den C- und N-Metabolismus	140
4.8. Ausblick	141
5. <b>Zusammenfassung</b>	142
6. <b>Abkürzungsverzeichnis</b>	144
7. <b>Literaturverzeichnis</b>	148

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Oxygenase-Aktivität der RubisCO

Die Schlüsselreaktion der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Assimilation ist die Bindung von CO<sub>2</sub> aus der Atmosphäre an Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP). Diese Reaktion wird von dem Enzym Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) katalysiert. Die CO<sub>2</sub>-Fixierung durch die RubisCO ist mit einer nicht vermeidbaren Nebenreaktion verbunden, in der O<sub>2</sub> anstelle von CO<sub>2</sub> umgesetzt wird.

Nach Bindung von RuBP an das aktivierte Enzym bildet sich durch Keto-Enol-Tautomerie der Carboxylgruppe des RuBP ein Endiol. Weder O<sub>2</sub> noch CO<sub>2</sub> bilden mit dem aktivierten Enzym einen Michaelis-Komplex, sondern beide greifen direkt das C<sub>2</sub>-Atom des Endiols an. Deshalb ist die Oxygenierung eine unvermeidliche Folge der Biochemie der Carboxylase-Reaktion. Kinetisch gesehen ist O<sub>2</sub> ein kompetitiver Inhibitor der Carboxylierungsreaktion und CO<sub>2</sub> ein Inhibitor der Oxygenierungsreaktion.

Die Verteilung von RuBP zwischen Carboxylierung und Oxygenierung ist abhängig von den Konzentrationen von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> sowie vom Spezifitätsfaktor der RubisCO ( $\tau = V_{\max C} \cdot K_m O_2 / V_{\max O} \cdot K_m CO_2$ ). Typische K<sub>m</sub>-Werte der RubisCO für CO<sub>2</sub> sind 10 - 20 µM und für O<sub>2</sub> 400-600 µM. Unter Standardbedingungen (350 ppm CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>) beträgt die Konzentration von CO<sub>2</sub> 11 µM und die O<sub>2</sub>-Konzentration ca. 253 µM (Woodrow und Berry 1988). Unter Berücksichtigung der kinetischen Eigenschaften der RubisCO lässt sich das Verhältnis von Carboxylierung zu Oxygenierung und damit die Photorespirationsrate bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen berechnen:  $V_c/V_o = \tau([CO_2]/[O_2])$ . Sharkey (1988) berechnete das Carboxylierung/Oxygenierungsverhältnis unter normaler Atmosphäre als 4:1 bis 2:1. Mit steigender Temperatur nimmt die Spezifität der RubisCO für CO<sub>2</sub> ab (Brooks und Farquhar 1985), und die Löslichkeit von CO<sub>2</sub> in Wasser nimmt stärker ab als die von O<sub>2</sub>. Daher steigt mit zunehmender Temperatur die relative Photorespirationsrate.

Die Carboxylierung von RuBP führt zur Bildung von zwei Molekülen Glycerat-3-Phosphat. Während fünf Sechstel der Glycerat-3-P-Moleküle für die Regeneration des CO<sub>2</sub>-Akzeptors RuBP verwendet werden, wird das letzte Sechstel entweder als Triosephosphat aus den Chloroplasten exportiert oder in den Chloroplasten zum Aufbau von transitorischer Stärke verwendet. Die Oxygenierung von RuBP führt zur Bildung eines Moleküls Glycerat-3-P und eines Moleküls Glycolat-2-P. Durch den C<sub>2</sub>-Zyklus wird aus zwei Molekülen Glycolat-2-P unter Verlust eines CO<sub>2</sub>-Moleküls ein Molekül Glycerat-3-P zurückgewonnen.



Glyoxylat und  $\text{H}_2\text{O}_2$  sind für die Zelle toxisch. Aus Experimenten mit isolierten Chloroplasten ist bekannt, dass Glyoxylat bereits in geringen Konzentrationen die Aktivierung der RubisCO (Campbell und Ogren 1990) und die Thioedoxin-abhängige Aktivierung der Calvin-Zyklus-Enzyme Fruktose-1,6-Bisphosphatase und Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase (Flügge *et al.* 1980) hemmt. Heupel und Heldt (1994) berichteten, dass Glyoxylat auch die Struktur der peroxisomalen Matrix zerstört. Ein Hemmeffekt von geringeren Konzentrationen von Glyoxylat auf die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase wurde ebenfalls nachgewiesen (Smith 1973).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein effektiver Inhibitor der Photosynthese, und die Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist essentiell für die Funktion der Chloroplasten (Kaiser 1979; Foyer 1993).

Da Glyoxylat und  $\text{H}_2\text{O}_2$  membranpermeabel sind, könnten sie theoretisch aus den Peroxisomen diffundieren. Allerdings gewährleistet die enge Einbindung der peroxisomalen Enzyme in einen Multienzymkomplex den direkten Transfer von Intermediaten von einer Reaktion zur Nächsten (Heupel und Heldt 1994), so dass Glyoxylat und  $\text{H}_2\text{O}_2$  bereits am Ort ihrer Entstehung in die nicht toxischen Verbindungen Glycin und Wasser umgesetzt werden. Damit wird die Akkumulation dieser toxischen Intermediate und ihre Freisetzung in andere Zellkompartimente verhindert.

Der Gehalt von Glyoxylat im Blatt liegt im Bereich von 10 bis 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$  (Chastain und Ogren 1989). Wenn Glyoxylat ausschließlich im Cytosol lokalisiert wäre, betrüge seine Konzentration dort zwischen 1 und 5 mM (in Kartoffel macht das Cytosol 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  Chlorophyll aus; Leidreiter *et al.* 1995). Für eine vollständige Hemmung der RubisCO ist eine chloroplastidäre Glyoxylat-Konzentration von nur  $<100\mu\text{M}$  erforderlich (Chastain und Ogren 1989). Daher ist anzunehmen, dass die Konzentration des freien Glyoxylats durch Bindung im peroxisomalen Multienzymkomplex deutlich unter diesem Wert liegt.

Glyoxylat wird durch Transaminierung zu der Aminosäure Glycin umgesetzt. Dies ist über zwei verschiedene Reaktionen möglich, die nebeneinander im Verhältnis 1:1 ablaufen. Durch die Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase (GGAT) wird die Aminogruppe von Glutamat auf Glyoxylat übertragen. Bei der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (SGAT) dient Serin als Aminodonor. Wie die meisten Aminosäuretransferasen sind diese beiden Enzyme nicht sehr substratspezifisch. GGAT katalysiert auch Glutamat/Pyruvat- und Alanin/Glyoxylat-Transaminierungen (Rehfeld und Tolbert 1972), während SGAT auch Asparagin/Glyoxylat- und Alanin/Hydroxypyruvat-Transaminierungen katalysiert (Murray *et al.* 1987).

Glycin verlässt die Peroxisomen und wird in die Mitochondrien transportiert. Dort erfolgt die Oxidation von zwei Molekülen Glycin zu einem Molekül Serin unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_4^+$  und Bildung von NADH. Diese Reaktionssequenz wird katalysiert durch den Glycinderboxylase-Komplex (GDC) in Verbindung mit der Serinhydroxymethyltransferase (SHMT).

Das gebildete Serin gelangt zurück in die Peroxisomen, wo es über die bereits erwähnte SGAT zu Hydroxypyruvat transaminiert wird. Letzteres wird durch eine

Hydroxypyruvatreduktase unter Verbrauch von NADH in Glycerat reduziert. Das gebildete Glycerat wird wieder in die Chloroplasten importiert, wo es durch die Glyceratkinase unter Verbrauch von ATP zu Glycerat-3-P umgesetzt wird, so dass es in den Calvin-Zyklus eingehen kann; damit ist aus Glycolat-2-P Glycerat-3-P zurückgewonnen und der C<sub>2</sub>-Zyklus abgeschlossen.

Peroxisomen sind auf Versorgung mit Reduktionsäquivalenten aus dem Cytosol angewiesen. Diese können als NADH oder in Form von Malat bereitgestellt werden, denn die peroxisomale Membran ist für beide Stoffe permeabel. Als mögliche Quellen für Reduktionsäquivalente kommen die mitochondriale Glycinderboxylase oder die chloroplastidäre NADP-abhängige Malatdehydrogenase in Betracht. Der Austausch von Reduktionsäquivalenten zwischen diesen Kompartimenten und dem Cytosol kann über die Malat/Oxalacetat-Shuttle in den Hüllmembranen der Chloroplasten und der Mitochondrien erfolgen (Heineke *et al.* 1991; Krömer und Heldt 1991; Raghavendra *et al.* 1998).

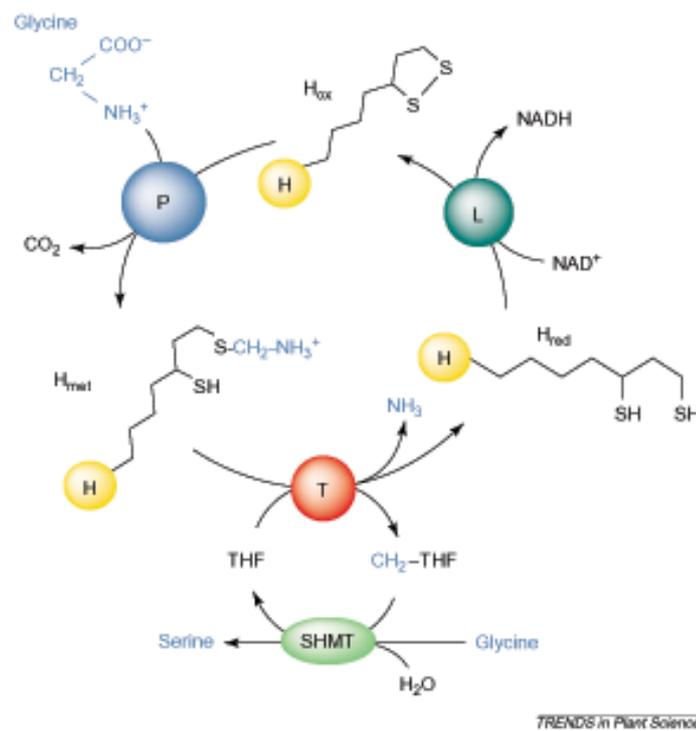
### 1.3. Die Umwandlung von Glycin zu Serin

Die GDC ist der Hauptbestandteil der Mitochondrien grüner Blätter und macht ungefähr die Hälfte des löslichen Proteins aus (Oliver *et al.* 1990; Oliver 1994). GDC besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten, dem P-Protein (Pyridoxal-5-Phosphat-abhängige Glycinderboxylase), dem T-Protein (Tetrahydrofolat-Aminomethyl-Transferase), dem L-Protein (Dihydroliponsäureamid-Dehydrogenase) und dem H-Protein (Wasserstoffträgerprotein mit kovalent gebundenem Liponsäureamid). Das Verhältnis der Monomere der Untereinheiten ist nicht exakt bestimmbar, es beträgt ungefähr 2P/27H/9T/1L (Oliver *et al.* 1990). Dabei ist das H-Protein ein 14,1 kDa-Monomer; das P-Protein stellt ein Homodimer aus 105 kDa-Polypeptiden; das T-Protein ist ein 45 kDa-Monomer, während das L-Protein ein Homodimer aus 60 kDa-Polypeptiden darstellt. Das H-Protein hat keine enzymatische Funktion; es übernimmt die Rolle, das Substrat von einem aktiven Zentrum des Enzyms zum Nächsten zu transportieren, indem es über ein als Kofaktor gebundene Liponsäureamid-Molekül mit jeder der drei anderen Untereinheiten nacheinander interagiert.

Alle Komponenten der GDC dissoziieren sehr leicht und verhalten sich nach Aufbruch der Mitochondrienmembran wie nicht assoziierte Proteine (Bourguignon *et al.* 1988). Isoliertes T-Protein hat eine starke Tendenz zur Bildung hochmolekularer Aggregate und ist in Lösung nicht stabil; in der Gegenwart von H-Protein wird diese Aggregatbildung verhindert (Guilhaudis 2000). Das L-Protein ist nicht nur ein Bestandteil der GDC, sondern auch der Pyruvatdehydrogenase, der  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase und der Verzweigtketten- $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenase (Luethy *et al.* 1996).

Die Aminogruppe des Glycins reagiert zunächst mit der Aldehydgruppe des Pyridoxals im P-Protein zu einer Schiff'schen Base. Der Glycylrest wird decarboxyliert und vom P-Protein auf den Liponsäurerest des H-Proteins übertragen. Der C<sub>1</sub>-Rest wird zur Stufe eines

Formylrestes oxidiert und der Liponsäurerest zur Dihydroliponsäure reduziert. Das Dihydroliponsäureaddukt reagiert nun mit dem T-Protein, dabei wird der C-Rest unter Freisetzung des Dihydroliponsäurerestes auf Tetrahydrofolat (THF; auch 5,6,7,8-Tetrahydropteroylpolyglutamat ( $H_4PteGlu$ ) genannt) übertragen, wobei  $N^5,N^{10}$ -Methylen-Tetrahydrofolat ( $CH_2$ -THF) entsteht. Über das L-Protein wird die Dihydroliponsäure wieder zur Liponsäure oxidiert und dabei NAD zu NADH reduziert (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Reaktionsweg der Umwandlung von Glycin zu Serin durch den GDC-SHMT-Komplex.** Nach Douce *et al.* (2001).

Die Serinhydroxymethyltransferase (SHMT), ein Homotetramer aus 53 kDa-Einheiten, verwendet Glycin und das von der GDC gebildete  $CH_2$ -THF als Substrat für die Synthese von Serin. Das T-Protein und die SHMT sind nicht assoziiert, und die Zwischenprodukte werden nicht direkt vom Reaktionszentrum des T-Proteins auf das der SHMT übertragen. Da die Aktivität der GDC ca. 2,5mal höher ist als die der SHMT, liegt das  $CH_2$ -THF/THF-Verhältnis in der mitochondrialen Matrix gewöhnlich bei 4:1, so dass die endergonische Reaktion der SHMT in Richtung Serin-Synthese abläuft (Rébeillé *et al.* 1994).

#### 1.4. Metabolismus des N aus der Photorespiration

Die Photorespiration stellt eine Verbindung zwischen C- und N-Metabolismus dar. Stickstoff gelangt über die peroxisomale Transaminierungsreaktion der GGAT in den C2-Zyklus und wird in den Mitochondrien im Zuge der GDC-Reaktion in Form von  $\text{NH}_4^+$  freigesetzt. Dieses diffundiert in die anderen Kompartimente. Da  $\text{NH}_4^+$  in wässriger Lösung mit dem gasförmigen  $\text{NH}_3$  im Gleichgewicht steht, entweicht ein Teil in die Atmosphäre und geht dem Stoffwechsel verloren. Die Rate an photorespiratorischer Freisetzung von  $\text{NH}_4^+$  in den Mitochondrien ist dabei ca. zehnmal höher als die Rate der primären  $\text{NO}_3^-$ -Assimilation. Daher muss das freigesetzte  $\text{NH}_4^+$  mit hoher Effizienz reassimiliert werden. Dies geschieht durch das Glutaminsynthetase/Glutamatsynthase (GS/GOGAT)-System. Glutaminsynthetase (GS) assimiliert  $\text{NH}_4^+$  durch die Bildung von Glutamin aus Glutamat in einer ATP-abhängigen Reaktion. Die chloroplastidäre Glutamatsynthase (Ferredoxin-abhängige Glutamat- $\alpha$ -Ketoglutarat-Aminotransferase, GOGAT) katalysiert dann die Umwandlung von Glutamin und  $\alpha$ -Ketoglutarat in zwei Moleküle Glutamat. Dieses Enzym verwendet über Ferredoxin Reduktionsäquivalente aus der photosynthetischen Elektronentransportkette. Die Hälfte des Glutamats wird im Gegentausch mit  $\alpha$ -Ketoglutarat in die Peroxisomen exportiert, wo es als Aminodonor für die Transaminierung von Glyoxylat zu Glycin dient.

#### 1.5. Folge der Photorespiration

Die Photorespiration führt zum Verlust von Kohlenstoff, da bei der Umsetzung von Glycolat-2-P aus jedem Molekül 0,5 Moleküle  $\text{CO}_2$  freigesetzt werden. Die Oxygenase-Reaktion der RubisCO in Verbindung mit dem C2-Zyklus führt auf zwei Wegen zu einer Reduktion der Netto- $\text{CO}_2$ -Assimilation. Erstens wird in der GDC-Reaktion  $\text{CO}_2$  freigesetzt, und zweitens wird wegen der Konkurrenz zwischen  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  um die Bindung an RuBP weniger  $\text{CO}_2$  fixiert. Daher ist bei gleichzeitiger Photorespiration der Verbrauch an ATP und Reduktionsäquivalenten pro fixiertes Molekül  $\text{CO}_2$  deutlich erhöht.

Bei der Fixierung von 1 mol  $\text{CO}_2$  werden 0,33 mol Triosephosphat gebildet und 3 mol ATP und 2 mol NADPH verbraucht. Die Oxygenierung von 1 mol RuBP resultiert im Verbrauch von 0,17 mol Triosephosphat, 3,5 mol ATP und 2 mol NADPH. Wenn man eine photorespiratorische  $\text{CO}_2$ -Freisetzung von 25 % der  $\text{CO}_2$ -Assimilation annimmt (Sharkey 1988), dann steigert die Photorespiration den Verbrauch pro fixierten mol  $\text{CO}_2$  auf 5,375 mol ATP und 3,5 mol NADPH. Es wurde postuliert, dass dieser zusätzliche Verbrauch von ATP und Reduktionsäquivalenten durch die Photorespiration nicht nur als Verlust anzusehen ist. Er könnte auch unter starkem Lichteinfall zum Schutz gegen Photoinhibition beitragen (Osmond 1981; Osmond *et al.* 1997; Heber *et al.* 1996).

### 1.6. C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediäre Photosynthese

Im Laufe der Evolution ist es nicht gelungen, die Oxygenase-Reaktion der RubisCO zu verhindern. Aber einige Pflanzenarten haben Strategien entwickelt, die Effizienz der Photosynthese zu verbessern, indem sie die Oxygenase-Reaktion der RubisCO durch CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismen unterdrücken. In Pflanzen, die Photosynthese nach dem C<sub>4</sub>-Mechanismus betreiben, wird dies erreicht, indem verschiedene Zelltypen in Blättern spezialisierte Funktionen übernehmen. Nur die Bündelscheidenzellen enthalten RubisCO. Das CO<sub>2</sub> wird in den Mesophyllzellen durch eine Sauerstoff-unempfindliche Reaktion in Form von Malat vorfixiert, in einer zyklischen Reaktionssequenz in die Bündelscheidenzellen transportiert und dort durch Decarboxylierung für die RubisCO bereitgestellt. Diese Modifikationen führen zu einer beträchtlichen Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration am Reaktionszentrum der RubisCO und reduzieren dadurch die Konkurrenz mit O<sub>2</sub>. Aus diesem Grund haben die Blätter von C<sub>4</sub>-Pflanzen eine besondere Anatomie entwickelt, die so genannte Kranzanatomie. Die Leitbündel sind von einer chlorenchymatischen Bündelscheide umgeben, und die Mesophyllzellen bilden einen konzentrischen Ring um die Bündelscheide. Einige Pflanzenarten können nicht klar als C<sub>3</sub>- oder C<sub>4</sub>-Pflanzen eingeordnet werden, sondern stellen Zwischenformen beider Photosynthesearten dar. Die ersten Hinweise zur Existenz von diesen als C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediär bezeichneten Pflanzen stammen von Messungen des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkts ( $\Gamma$ ) im Rahmen einer Massenanalyse von monokotylen und dikotylen Pflanzen (Krenzer *et al.* 1975). Einige Arten hatten  $\Gamma$ -Werte (9-30  $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ ; Ku *et al.* 1991), die zwischen denen von C<sub>3</sub>-Pflanzen (40 and 55  $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ ) und C<sub>4</sub>-Pflanzen (5  $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ ) lagen. Inzwischen sind mindestens 23 Pflanzenarten aus sieben Gattungen aus fünf verschiedenen Familien, sowohl von monokotylen als auch von dikotylen Pflanzen, als C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediäre Arten identifiziert worden (Rawsthorne 1992).

Der  $\Gamma$ -Wert ist eines der wichtigsten Charakteristika der C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Photosynthese; niedrige  $\Gamma$ -Werte zeigen klar eine deutliche Reduktion der Photorespirationsrate an. Im Gegensatz zu C<sub>3</sub>-Pflanzen, in denen  $\Gamma$  praktisch von der Lichtintensität unabhängig ist, wird  $\Gamma$  in C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzen stark von der Lichtintensität beeinflusst (Brown und Morgan 1980). Bei Quantenflüssen nah beim Lichtkompensationspunkt der Photosynthese (80-150  $\mu\text{mol Quanten}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) kann der  $\Gamma$ -Wert von C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Arten fast so hoch sein wie der von C<sub>3</sub>-Arten; er nimmt aber bei Erhöhung der Lichtintensität deutlich ab. Dieses Verhalten wurde in allen untersuchten C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Arten beobachtet. Die Lichtabhängigkeit der  $\Gamma$ -Werte zeigt, dass der Mechanismus, der in C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Arten die Photorespiration beeinflusst, von der Photosyntheserate abhängig ist.

Es wird vermutet, dass die C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediäre Photosynthese auf einer Kompartimentierung der photorespiratorischen CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus Glycin in den Bündelscheidenzellen beruht. In allen untersuchten C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzen, ist die GDC, die im Laufe der

Photorespiration  $\text{CO}_2$  freisetzt, nicht gleichmäßig über die Chloroplasten-haltigen Zellen verteilt. Durch Immunogold-Lokalisierungsstudien wurde festgestellt, dass GDC in diesen Arten nur in den Bündelscheidenzellen vorkommt (Rawsthorne *et al.* 1988a; Hylton *et al.* 1988). Die SHMT ist ebenfalls in Bündelscheidenzellen im Vergleich zu Mesophyllzellen angereichert (Rawsthorne *et al.* 1988b; Morgan *et al.* 1993).

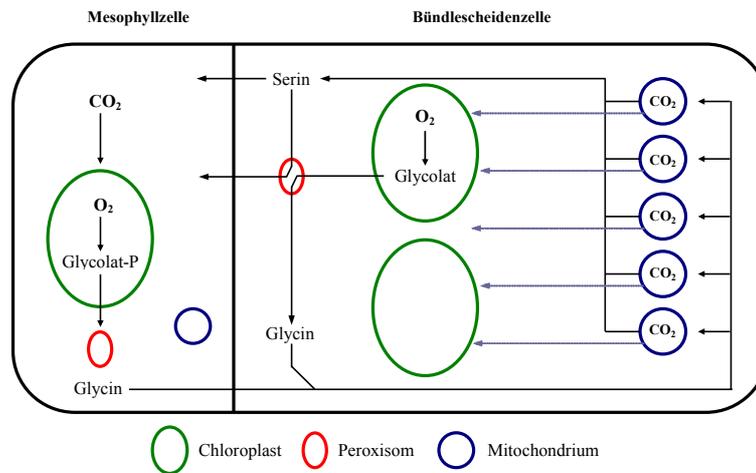
Man nimmt an, dass sich der Verlust der GDC-Aktivität in den Mesophyllzellen in der Evolution schrittweise entwickelt hat. In *Moricandia arvensis* (L.) DC. fehlt im Mesophyll nur das P-Protein, während die anderen drei Untereinheiten der GDC sowie die SHMT sowohl im Mesophyll als auch in den Bündelscheidenzellen vorliegen (Morgan *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu ist in den  $\text{C}_3/\text{C}_4$ -intermediären und in den  $\text{C}_4$ -Arten von *Flaveria* und *Panicum* keine der GDC-Untereinheiten im Mesophyll nachweisbar; sie liegen ausschließlich in den Bündelscheidenzellen vor (Morgan *et al.* 1993). Da die Gattung *Moricandia* keine  $\text{C}_4$ -Arten enthält, wurde postuliert, dass die Repression der Synthese des P-Proteins der evolutionäre Ausgangspunkt der Transition von der  $\text{C}_3$ - zur  $\text{C}_4$ -Photosynthese war, und dass der Verlust der anderen Untereinheiten der GDC erst später stattfand (Morgan *et al.* 1993; Rawsthorne und Bauwe 1998).

Die Blätter von  $\text{C}_3/\text{C}_4$ -intermediären Arten haben eine besondere Anatomie. Die Leitbündel sind von einer chlorenchymatischen Scheide umgeben, die an die Kranzanatomie der Blätter von  $\text{C}_4$ -Pflanzen erinnert. Allerdings bilden die Mesophyllzellen keinen konzentrischen Ring um die Bündelscheide wie in  $\text{C}_4$ -Blättern, sondern sind wie in  $\text{C}_3$ -Pflanzen arrangiert, mit größeren Abständen zwischen den Leitbündeln als in  $\text{C}_4$ -Pflanzen.

In allen  $\text{C}_3/\text{C}_4$ -intermediären Arten enthalten die Bündelscheidenzellen viele Organellen. Zahlreiche Mitochondrien, Peroxisomen und viele der Chloroplasten sind zentripetal organisiert. Die Mitochondrien liegen an der Plasmamembran auf der Seite des Leitgewebes und grenzen an die Chloroplasten. Quantitative Untersuchungen haben gezeigt, dass es in Bündelscheidenzellen viermal mehr Mitochondrien und Peroxisomen pro Raumeinheit als in Mesophyllzellen gibt, und dass die Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran in Bündelscheidenzellen doppelt so groß ist wie in Mesophyllzellen.

Auf Basis der anatomischen Charakteristika und der GDC-Lokalisierungsdaten wurde ein Modell für den  $\text{C}_3/\text{C}_4$ -intermediären photorespiratorischen Metabolismus in den Blättern dieser Pflanzen erstellt (Rawsthorne *et al.* 1988a, Abb. 1.3). Da Glycin in Mesophyllzellen nicht decarboxyliert werden kann, findet die photorespiratorische  $\text{CO}_2$ -Freisetzung nur in den Mitochondrien an der leitbündelseitigen Plasmamembran der Bündelscheidenzellen statt. Diese Mitochondrien sind eng mit Chloroplasten assoziiert, durch die das  $\text{CO}_2$  diffundieren muss, um das Blatt zu verlassen. Das Potential zur Refixierung des photorespiratorischen  $\text{CO}_2$  ist also durch Beschränkung der photorespiratorischen  $\text{CO}_2$ -Freisetzung auf die gut abgeschirmte Bündelscheide im Vergleich zu  $\text{C}_3$ -Blättern deutlich erhöht, was die

charakteristisch geringen Photorespirationsraten und deren Lichtabhängigkeit von  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzen erklären sollte.



**Abb. 1.3: Postuliertes Modell für die Kompartimentierung des C2-Zyklus in  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzenarten.** Nach Rawsthorne *et al.* (1988a).

Der Transfer von Glycin aus dem Mesophyll in die Bündelscheidenzellen kann durch Diffusion erfolgen. Der Glycinegehalt der Blätter der  $C_3/C_4$ -intermediären Art *Moricandia arvensis* (L.) DC. ist doppelt so hoch wie der von *Moricandia*-Arten mit  $C_3$ -Charakteristik und bis zu viermal höher als der Gehalt von Metaboliten, die in  $C_4$ -Blättern zum Transfer von  $CO_2$  in die Bündelscheide dienen (Rawsthorne und Hylton 1991). Dies mag damit zusammenhängen, dass Mesophyllzellen in  $C_3/C_4$ -intermediären Arten nicht in der Kranzanatomie angeordnet sind, so dass die Diffusionswege erheblich länger sind als in  $C_4$ -Pflanzen.

### 1.7. Gentechnische Veränderung der Glycinecarboxylierung

Wie bereits beschrieben, führen die Oxygenase-Reaktion der RubisCO und die daraus resultierende Photorespiration zu einer Reduktion der netto  $CO_2$ -Assimilation und damit der Produktivität der Pflanzen. Einigen Pflanzenarten ist es gelungen, die Photorespiration durch Kompartimentierung der GDC-Aktivität in den Bündelscheidenzellen zu vermindern. Diese Pflanzen zeigen bei hohen Temperaturen und Trockenheit eine bessere photosynthetische Leistung und Wassernutzungseffizienz als  $C_3$ -Pflanzen (Monson und Jaeger 1991).

Diese Eigenschaft des  $C_3/C_4$ -Stoffwechsels könnte durch Gentechnik auf  $C_3$ -Nutzpflanzen übertragen werden, indem die Kompartimentierung der GDC-Aktivität durch Antisense-Inhibierung in Mesophyllzellen und durch Überexpression in den leitbündelnahen Zellen verändert wird. Dafür wurden bereits verschiedene Ansätze untersucht.

### 1.7.1. P-Antisense-Pflanzen

In einem ersten Schritt ist es gelungen, durch Antisense-Verfahren die GDC-Aktivität in Blättern von Kartoffel- und Tabakpflanzen zu reduzieren. Diese transgenen Pflanzen exprimierten eine cDNA des H-, T- oder P-Proteins aus Kartoffel in Antisense-Orientierung unter der Kontrolle des blattspezifischen Promotors *St-LS1* (Stockhaus *et al.* 1987).

Die Antisense-Inhibierung des P-Proteingens hatte in Kartoffelpflanzen stärkere Wirkungen auf die GDC-Aktivität als die Antisense-Repression des T- oder H-Proteingens (H. Bauwe, persönliche Mitteilung). In diesen P-Antisense-Pflanzen war eine Abnahme der GDC-Aktivität um etwa 70-75 % zu beobachten. Wie erwartet, wurde Glycin in den Blättern dieser Pflanzen während der Lichtperiode stark akkumuliert und während der nächsten Dunkelperiode vollständig abgebaut. Diese Veränderungen im Blattstoffwechsel der Transformanten waren von einem chlorotischen Phänotyp in Blättern des unteren Bereichs der Pflanze begleitet. Der Chlorophyllgehalt dieser Blätter war um etwa ein Drittel erniedrigt (Heineke *et al.* 2001).

In einem weiteren Schritt wurde durch ein Antisense-Konstrukt das P-Proteingens in Mesophyllzellen von Kartoffelpflanzen inhibiert. In diesem Fall wurde für die Expression der Antisense-cDNA ein 2,3 kb Promotor-Fragment des Genes *FpGDCsP-D* verwendet, das das P-Protein der GDC in *Flaveria pringlei* kodiert (Chu 1996). Die mit diesem Konstrukt transformierten transgenen Kartoffelpflanzen wiesen eine noch stärkere Reduktion der GDC-Aktivität um 80 bis 85 % auf. Auch in den Blättern dieser Pflanzen war eine beträchtliche Akkumulation von Glycin zu finden, und die Pflanzen entwickelten auch einen Chlorose-Phänotyp (Winzer *et al.* 2001).

### 1.7.2. SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen

Durch Antisense-Inhibierung des SHMT-Gens im Gesamtblatt von Kartoffelpflanzen unter Verwendung des oben erwähnten *St-LS1*-Promotors wurde eine Reduktion der Glycinecarboxylierungsraten um etwa 95 % erzielt (T. Winzer, unveröffentlicht). Diese Pflanzen waren unter ambienten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nicht lebensfähig (H. Bauwe, persönliche Mitteilung).

### 1.7.3. Überexpression von Komponenten des GDC-Komplexes

Da bisher keine Beziehung zwischen Struktur und Funktion aller Komponenten des GDC-Komplexes (Faure *et al.* 2000; Neuburger *et al.* 2000) und keine feste Stöchiometrie zwischen den Untereinheiten gefunden wurde (Oliver *et al.* 1990), ist es denkbar, dass die Menge an einer der Untereinheiten den limitierenden Faktor für die Aktivität des gesamten Komplexes darstellen könnte. Daher wurde versucht, die GDC-Aktivität in Blättern von C<sub>3</sub>-Pflanzen durch Überexpression von jeweils einer der Untereinheiten des GDC-Komplexes zu erhöhen. Dafür wurden die cDNAs für das H- bzw. T-Protein aus *Flaveria pringlei* unter

Kontrolle eines blattspezifischen Promotors in Tabakpflanzen überexprimiert. Die Überexpression führte zwar zu einer Erhöhung des betreffenden Proteins, aber nicht zu einer Steigerung der GDC-Aktivität der aus Blättern dieser Pflanzen isolierter Mitochondrien (Laubner 1999). Die Menge an H- bzw. T-Protein ist wahrscheinlich nicht als limitierend anzusehen. Da das L-Protein Teil mehrerer Enzymkomplexe ist, sollte seine Expression nicht mit der Aktivität der GDC verknüpft sein. Dies bedeutet, dass das P-Protein möglicherweise den limitierenden Faktor für die GDC-Aktivität darstellt und eine Überexpression des P-Protein-Gens zu einer Erhöhung der GDC Aktivität führt. Mehrere Versuche, das P-Protein-Gen in Tabak und Kartoffel zu überexprimieren, waren bisher erfolglos (M. Laubner, H. Bauwe und D. Heineke, persönliche Mitteilung; H. Bauwe, persönliche Mitteilung).

### 1.8. Zielsetzung dieser Arbeit

Wie aus den Experimenten mit Antisense-Pflanzen geschlossen werden kann, ist für die Etablierung eines  $C_3/C_4$ -Stoffwechsels in einer  $C_3$ -Pflanze die Suppression der GDC-Aktivität in den Mesophyllzellen nicht ausreichend. Leitbündelnahe Zellen sollten außerdem in der Lage sein, die im Mesophyll fehlende GDC-Aktivität zu kompensieren.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das P-Proteingen in Tabakblättern zu überexprimieren, und zwar

- im Gesamtblatt
- spezifisch in den Mesophyllzellen
- spezifisch in den leitbündelnahen Zellen (In dieser Arbeit wird der Ausdruck „leitbündelnahe Zellen“ für die Zellschicht in den Blättern von  $C_3$ -Pflanzen verwendet, der unmittelbar an die Leitbündel angrenzt. Diese Zellen unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch funktionell von den Bündelscheidenzellen von  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzen)

Weiterhin sollten zwei Serien der bereits vorhandenen transgenen Kartoffelpflanzen, in denen die Expression von Enzymen des C<sub>2</sub>-Zyklus reprimiert ist, zum besseren Verständnis ihres veränderten Metabolismus genauer charakterisiert werden.

- Die Linien F14-38 und F14-59, in denen die Expression des P-Proteingens spezifisch im Mesophyll reprimiert wird.
- Die Linien G310-76 und G310-85, in denen die Expression des SHMT-Gens im Gesamtblatt reprimiert wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Allgemeines

Sofern nicht anders angegeben

- wurde ausschließlich doppelt destilliertes Wasser verwendet;
- entsprachen alle Chemikalien einem analytischen Reinheitsgrad;
- wurden alle Arbeiten mit sterilen Bakterien- oder Pflanzenkulturen an einer Sterilbank (Bio-II-A, Fa. Prettl-Telstar, Terrasa, Spanien) durchgeführt;
- wurden bei allen Arbeiten mit isolierten Nukleinsäuren oder Sterilkulturen nur autoklavierte Pipettenspitzen, H<sub>2</sub>O, Lösungen und Gefäße verwendet.

### 2.2. Material

#### 2.2.1. Pflanzenmaterial

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN, SNN) wurden zur stabilen Transformation über *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer verwendet (2.16.).

Wildtyp-Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara) und transgenen Linien, die eine cDNA für das P-Protein aus *S. tuberosum* L. (PST8; Bauwe 1998) in Antisense-Orientierung unter Kontrolle von einem 2,3 kb Promotor-Fragment des Genes *FpGDCsP-D* (Chu 1996) aus *Flaveria pringlei* exprimieren (Winzer *et al.* 2001).

Transgenen Kartoffelpflanzen (*S. tuberosum* L. cv. Solara), die eine cDNA für die Serinhydroxymethyltransferase aus *S. tuberosum* L. (SST18; H. Bauwe, unveröffentlicht) in Antisense-Orientierung unter Kontrolle eines blattspezifischen *StLS1*-Promotors (Stockhaus *et al.* 1987) aus *S. tuberosum* L. exprimieren (H. Bauwe, unveröffentlicht).

#### 2.2.2. Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$  (Woodcock *et al.* 1989) verwendet.

Zur Transformation von *N. tabacum* L. (2.16.) wurde *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pAL4404) Rif<sup>r</sup> Strep<sup>r</sup> (Hoekema *et al.* 1983; Hellens *et al.* 2000) verwendet.

#### 2.2.3. Plasmide

pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Amp <sup>r</sup>	Fa. Promega, Madison, USA
pSPORT1	Amp <sup>r</sup>	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
pCAMBIA 1200	Hyg <sup>r</sup> , Clam <sup>r</sup>	Cambia, Canberra, Australien
pRT105	Amp <sup>r</sup>	Töpfer <i>et al.</i> (1993)
pBI101.3	Km <sup>r</sup>	Jefferson <i>et al.</i> (1987)

pL700 (in pBIN19)	Km <sup>r</sup>	<i>StLS1</i> -Promotor; Stockhaus <i>et al.</i> (1987)
pA27 (in pJIT163)	Amp <sup>r</sup>	<i>FpGDCsP-D</i> Promotor; (H. Bauwe, unveröffentlicht)
p <i>Xho</i> I-11 (in pBluescript)	Amp <sup>r</sup>	<i>FaGDCsP-A</i> Promotor; (H. Bauwe, unveröffentlicht)

#### 2.2.4. Oligonukleotide (Primer)

Primer	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> [°C]
<i>AtGDCsP5'</i>	ACT CTC TTC GTT TTC TGA CTG C	58,4
<i>AtGDCsP3'</i>	AGA AAG GGA CAC AAC ACA ATG G	58,4
<i>StLS15'+EcoRI</i>	ATG AAT TCC AAG TTT TTT TGT TGT TTC TAT C	53,5*
<i>StLS13'+BamHI</i>	TAG GAT CCT TGC TCT CAC TAC TTA GTA TG	54,0*
<i>FaGDCsP5'+EcoRI</i>	ATG AAT TCA CGC CAC TGC TTT CTA C	52,8*
<i>FaGDCsP3'+BamHI</i>	TAG GAT CCG GCT GGG GTG GTG G	55,1*
<i>AtGDCsP5' rev</i>	CAC AGA ATT TAG CCA TGT GGG	57,9
<i>StLS13' for</i>	CCA ATG AAT GAA CTC CAA GTG C	58,4
<i>FaGDCsPA3' for</i>	ACT AGC TTC GTG TTG TCA TGG	57,9
<i>FpGDCsPD3' for</i>	TGC CAC TTG ATG ACA TGT GAG	57,9
M13/pUC for	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG	62,4
M13/pUC rev	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG	58,9
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	53,2
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	46,9

\* T<sub>m</sub> des Primers ohne zusätzliche Schnittstellen

Die Primers *AtGDCsP5'*, *AtGDCsP3'*, *StLS15'+EcoRI*, *StLS13'+BamHI*, *FaGDCsP5'+EcoRI* und *FaGDCsP3'+BamHI* wurden zu Klonierungszwecken verwendet (siehe 3.1.1. und Abb. 3.1). Die Primers *AtGDCsP5' rev*, *StLS13' for*, *FaGDCsPA3' for* und *FpGDCsPD3' for* wurden in Kolonie-PCRs verwendet. Die Primers M13/pUC for, M13/pUC rev, T7 und SP6 wurden für die Ansequenzierung von DNA-Enden eingesetzt, zwecks Überprüfung der Richtigkeit der Klonierungen.

### 2.2.5. Chemikalien

Die meisten Chemikalien wurden von den Herstellern Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Die Enzyme für biochemische Analysen wurden von der Firma Roche (Mannheim) bezogen. Sonstige Chemikalien werden hier erwähnt:

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
bacteriophage $\lambda$ DNA	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
6-Benzylaminopurin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Cefotaxim Natrium	Duchefa, Haarlem, Niederlande
dNTPs	Roche, Mannheim
Hefe-Extrakt	Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin B in PBS	Invitrogen, Karlsruhe
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Lab-Lemco-Powder	Oxoid, Basingtoke, England
Micro-Agar	Duchefa, Haarlem, Niederlande
MS-Salze	Duchefa, Haarlem, Niederlande
$\alpha$ -Naphthylelessigsäure	Duchefa, Haarlem, Niederlande
( $^{14}$ C)Natriumhydrogencarbonat	Moravek, Kalifornien, USA
Natronkalk Plätzchen	Merck, Darmstadt
Pepton (Casein-Hydrolysat)	Invitrogen, Karlsruhe
Select Pepton 140	Invitrogen, Karlsruhe
Sephadex <sup>®</sup> G25	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Soda Lime Carbosorb 1-2,5 mm	Promochem, Wesel
X-Gal	Roche, Mannheim
X-Gluc	AppliChem, Darmstadt

### 2.2.6. Enzyme für molekularbiologische Methoden

Die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Puffers wurden von der Firma MBI-Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen. Für andere Enzyme wird hier der Hersteller zitiert:

T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
DNA-Polymerase I Large Fragment (Klenow Fragment)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Taq</i> -Polymerase	Biometra, Göttingen
MLV Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
RNaseA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

**2.2.7. Verwendete Nährmedien in molekularbiologischen Methoden**

## SOC-Medium

20	g/l	Select Pepton 140
5	g/l	Hefe-Extrakt
10	ml/l	1 M NaCl
2,5	ml/l	1 M KCl

Das Medium wurde 10 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend wurden folgende sterilfiltrierte Lösungen hinzugefügt:

10	ml/l	1 M MgCl <sub>2</sub>
10	ml/l	1 M MgSO <sub>4</sub>
10	ml/l	2 M Glukose

## LB-Medium (Luria und Bertani; Sambrook und Russel 2001)

5	g/l	Hefe-Extrakt
10	g/l	Select Pepton 140
10	g/l	NaCl

Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für Festmedium wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugesetzt.

## TB-Medium (Lee und Rasheed 1990)

## Medium 1 (900 ml)

12	g	Select Pepton 140
24	g	Hefe-Extrakt
4	ml	Glycerin

## Medium 2 (100 ml)

2,3	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
16,4	g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Nach dem Autoklavieren wurden Medium 1 und Medium 2 im Verhältnis 9:1 zusammengemischt.

YEB-Medium (van Larebeke *et al.* 1977)

2	g/l	Hefe-Extrakt
5	g/l	Lab-Lemco-Powder (Rinderextrakt)
5	g/l	Pepton (Casein-Hydrolysat)
5	g/l	Saccharose

Das Medium wurde auf pH 7,0 eingestellt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Danach wurden 2 ml/l sterilfiltriertes 1 M MgSO<sub>4</sub> zugegeben. Für Festmedium wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugesetzt.

2MS-Medium (Murashige und Skoog 1962)

4,4	g/l	MS-Salze
20	g/l	Saccharose

Das Medium wurde auf pH 5,7 eingestellt, mit 6,5 g/l Agar supplementiert und für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

### 2.2.8. Medienzusätze

Zusatz	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
X-Gal	DMF	2 % (w/v)	0,004 % (w/v)
IPTG	H <sub>2</sub> O	0,1 M	0,2 mM
Ampicillin	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol*	Ethanol	30 mg/ml	30 bzw. 10 µg/ml
Rifampicin	Methanol	10 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	H <sub>2</sub> O	50 mg/ml	50 µg/ml
6-Benzylaminopurin	Ethanol	0,4 mg/ml	1 µg/ml
α-Naphtylessigsäure	DMSO oder Ethanol	1 mg/ml	0,2 µg/ml
Cefotaxim	H <sub>2</sub> O	250 mg/ml	500 µg/ml
Hygromycin	H <sub>2</sub> O oder PBS	50 mg/ml	25 µg/ml

\*Chloramphenicol wurde für *E. coli* (30 µg/ml) und für *A. tumefaciens* (10 µg/ml) eingesetzt.

Die wässrigen Stammlösungen wurden sterilfiltriert.

## 2.3. Pflanzenanzucht

### 2.3.1. Anzucht von Kartoffelpflanzen

#### 2.3.1.1. Kartoffelpflanzen in Sterilkultur

Die transgenen Linien und der Wildtyp wurden in sterilen Gläsern mit Agar-Nährmedium angezogen und alle 3-4 Wochen umgesetzt. Die Anzucht erfolgte in einem Klimaschrank (Percival Intellus *environmental controller*, Fa. CLF, Emersacker) mit einem Tagesrhythmus von 12 h/12 h Licht/Dunkel, einem Quantenfluss von  $110 \pm 10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (PAR) und einer Lufttemperatur von  $20 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  während der Lichtperiode und  $18 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  während der Dunkelperiode.

#### 2.3.1.2. Kartoffelpflanzen in Erde

Nach zwei bis drei Wochen Wachstum in Sterilkultur (2.3.1.1.) wurden die Pflanzen auf Pikiererde (1:3 Sand/Erde; Einheitserde<sup>®</sup> Typ MiniTray, Fa. Erdverband, Sinnatal-Jossa) übertragen und während der ersten Woche mit einer durchsichtigen Plastikabdeckung vor Austrocknung geschützt. Nach ca. 17 Tagen und noch einmal nach ca. 35 Tagen Wachstum wurden die Pflanzen in größere Töpfe mit Topferde (Frühstorfer Erde<sup>®</sup> Typ T25, Fa. Archut, Lauterbach-Wallenrod) umgetopft. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer mit einem Tagesrhythmus von 12 h/12 h Licht/Dunkel bei einem Quantenfluss von  $275 \pm 25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (PAR) in 33 cm Höhe und einer Lufttemperatur von  $22,5 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  während der Lichtperiode und  $20 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  während der Dunkelperiode. Die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Klimakammer wurde durch ein Mess- und Regelsystem (WMA-2, Fa. PP-Systems, Hitchin, England) konstant bei 360 ppm gehalten. Gegebenenfalls setzte das System zusätzliches  $\text{CO}_2$  aus einer Gasflasche mit 100 % (v/v)  $\text{CO}_2$  über ein Magnetventil frei oder entfernte das überflüssige  $\text{CO}_2$  aus der Kammer durch einen mit Natronkalk gefüllten  $\text{CO}_2$ -Absorber, der durch ein Lüftungsrad betrieben wurde. Das Messgerät speicherte neben dem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck auch Temperatur und relative Luftfeuchte. Die Luftfeuchte in der Kammer lag während der Wachstumsperiode zwischen 60 und 70 %. Die Ernte der Blattproben erfolgte unter Belichtung ab zwei Stunden vor Ende der Lichtperiode. Die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Anzuchtraum wurde möglichst konstant gehalten. Blattscheiben à  $3,8 \text{ cm}^2$  wurden jeweils aus dem Spitzenfiedern des fünften Blattes von oben nach unten im Zentralspross der Pflanzen ausgestanzt und in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren. Die Blattproben wurden bis zur Analyse bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3.1.3. Kartoffelpflanzen in Hydrokultur

Nach zwei bis drei Wochen Wachstum in Sterilkultur (2.3.1.1.) wurden die Pflanzen auf Erde übertragen und während der ersten Woche mit einer durchsichtigen Plastikabdeckung vor Austrocknung geschützt. Die Pflanzen wurden wie in 2.3.1.2. beschrieben in einer Klimakammer weiter kultiviert. Nach weiteren zehn Tagen wurden die Wurzeln der Pflanzen vorsichtig von Erde freigespült. Je zwei Pflanzen wurden mit Schaumstoffpfropfen so auf einen Container mit 7 l Nährlösung nach Randall und Bouma (1973) gesetzt, dass die Wurzeln immer vollkommen benetzt waren. Die Anzucht wurde in derselben Klimakammer fortgesetzt. Die Nitratkonzentration in der Nährlösung wurde auf 10 mM eingestellt, um die Pflanzen ausreichend mit Nitrat zu versorgen. Die Nitratkonzentration in der Nährlösung wurde regelmäßig kontrolliert und falls nötig mit 1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  supplementiert. Bei einigen Versuchen wurde ein Pflanzenset unter Nitratmangel angezogen. Die Nitratkonzentration in der angesetzten Nährlösung betrug hierfür 1 mM und wurde weiterhin nicht supplementiert. Der geringere Nitratgehalt in der 1 mM-Nährlösung wurde durch eine höhere Chloridkonzentration bei gleich bleibenden Konzentrationen aller übrigen Kationen und Anionen ausgeglichen. Alle Nährlösungen wurden alle zehn Tage durch frisch angesetzte Nährlösung ersetzt. Die Nährlösungen wurden mit Druckluft belüftet, um anaeroben Bedingungen vorzubeugen. Die Ernte der Blattproben erfolgte wie in 2.3.1.2. beschrieben.

Nährlösung (nach Randall und Bouma 1973; modifiziert)

10	mM	1	mM	$\text{NO}_3^-$
0,5	mM	0,5	mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2
2	mM	2	mM	$\text{MgCl}_2$
1	mM	1	mM	$\text{MgSO}_4$
3,5	mM	0,5	mM	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
3	mM	0	mM	$\text{KNO}_3^-$
0	mM	3	mM	$\text{CaCl}_2$
0	mM	3	mM	KCl
38,5	$\mu\text{M}$	38,5	$\mu\text{M}$	$\text{H}_3\text{BO}_3$
7,5	$\mu\text{M}$	7,5	$\mu\text{M}$	$\text{MnCl}_2$
0,625	$\mu\text{M}$	0,625	$\mu\text{M}$	$\text{ZnSO}_4$
0,265	$\mu\text{M}$	0,265	$\mu\text{M}$	$\text{CuSO}_4$
0,1	$\mu\text{M}$	0,1	$\mu\text{M}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4$
48	$\mu\text{M}$	48	$\mu\text{M}$	$\text{FeCl}_3$
27,4	$\mu\text{M}$	27,4	$\mu\text{M}$	$\text{Na}_2\text{EDTA}$

### **2.3.2. Anzucht von Tabakpflanzen**

#### **2.3.2.1. Tabakpflanzen in Sterilkultur**

Die transformierten Pflanzen und der Wildtyp wurden in sterilen Gläsern auf 2MS-Agar-medium angezogen und alle 3-4 Wochen umgesetzt. Der Anzucht erfolgte in einem Klimaschrank (Percival Intellus *environmental controller*, Fa. CLF, Emersacker) mit einem Tagesrythmus von 16 h/8 h Licht/Dunkel, einem Quantenfluss von  $72 \pm 10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (PAR) und einer Lufttemperatur von  $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  während der Lichtperiode und  $23 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  während der Dunkelperiode.

#### **2.3.2.2. Tabakpflanzen im Gewächshaus**

Tabakpflanzen wurden aus Sterilkultur ausgesetzt (2.3.2.1.) und auf Topferde (Frühstorfer Erde<sup>®</sup> Typ T25, Fa. Archut, Lauterbach-Wallenrod) übertragen. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einem Gewächshaus mit einem Tagesrythmus von 12 h/12 h Licht/Dunkel bei einem Quantenfluss von  $350\text{-}500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (PAR) und einer Lufttemperatur von  $25\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$  während der Lichtperiode und  $18\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$  während der Dunkelperiode.

### **2.4. Gaswechselanalyse**

Unter Gaswechselanalyse wird hier die Analyse der Zusammensetzung des Luftstroms verstanden, bevor und nachdem er an einem Blatt vorbeigestrichen ist. Es handelt sich um ein offenes differentielles System. Mit verschiedenen Infrarot-Gasanalytoren war es möglich, den absoluten  $\text{CO}_2$ -Partialdruck, eine  $\text{CO}_2$ -Partialdruckdifferenz und eine Wasserdampfpartialdruckdifferenz zu messen. Unter Einbeziehung weiterer Parameter konnte daraus die  $\text{CO}_2$ -Assimilation, die Blattleitfähigkeit für Wasserdampf, die sich im wesentlichen aus der stomatären, aber auch aus der cuticulären Leitfähigkeit zusammensetzt, und der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck des Interzellularraumes berechnet werden. Dies setzte voraus, dass  $\text{CO}_2$ - und Wasserdampfpartialdruck im Luftstrom exakt und konstant einzustellen waren.

#### **2.4.1. Aufbau der Gaswechsel-Anlage**

##### **2.4.1.1. Vorbereitung des Gasstroms**

Außenluft wurde über einen Kompressor angesaugt und mit einem Druck von 150 mbar in das Leitungssystem eingeleitet. Die Luft wurde in einer mit Wasser gefüllten Waschflasche von Partikeln und Öldämpfen befreit und das  $\text{CO}_2$  durch Leitung über zwei hintereinander geschaltete Natronkalksäulen ( $\text{Ø}$  4 cm, Höhe 30 cm) vollständig entfernt. Die Stärke des Luftstroms wurde durch einen Massendurchflussregler (Thermal flow controller Type 5810-

N21C3D4B, Fa. Brooks, Veenendaal, Niederlande) eingestellt. Dem Luftstrom wurde über ein Nadelventil so viel  $\text{CO}_2$  aus einer Gasflasche mit 5 % (v/v)  $\text{CO}_2$  in synthetischer Luft zugemischt, wie zum Erreichen des gewünschten  $\text{CO}_2$ -Partialdruck nötig war.

Der Wasserdampfpartialdruck des Luftstroms wurde über eine Kombination von Luftbefeuchter und Kondensator eingestellt. Im Luftbefeuchter wurde die Luft in einer mit Wasser gefüllten Waschflasche, die in ein auf 23 °C temperiertes Wasserbad (RC6, Fa. MGW Lauda, Königshofen) eintauchte, mit Wasserdampf gesättigt. Im sich anschließenden Kondensator (K4R, Fa. MGW Lauda, Königshofen) wurde die Lufttemperatur auf 16,1 °C erniedrigt, wodurch überschüssiges Wasser auskondensierte. Dabei wurde ständig die Temperatur des Kondensators mit einem Konstantan-Kupfer-Thermoelement gemessen, wobei ein Eis-Wasser-Gemisch als Referenz diente. Aus dieser Temperatur wurde der Wasserdampfpartialdruck des wasserdampfgesättigten Luftstroms errechnet. Dieser lag bei allen Messungen wegen der Temperierung des Kondensators bei ca. 18,29 mbar. Die Druckdifferenz, die sich durch das Auskondensieren überschüssigen Wassers aus dem Luftstrom ergab, wurde von einem Druckmesser (DP I 201; Fa. Schultheiss, Garching) ständig gemessen.

#### 2.4.1.2. Gasanalyse

Der Luftstrom wurde aufgeteilt und die Flüsse der einzelnen Gasströme jeweils durch einen Durchflussregler eingestellt. Ein Luftstrom wurde auf 30 l/h geregelt und direkt in einen Infrarot-Gasanalysator (Binos 1.2B, Messbereich 0 bis 200 Pa  $\text{CO}_2$ , Fa. Leybold-Heraeus, Hanau) eingeleitet. Mit diesem Gerät wurde ständig der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck des Eingangs-Luftstroms ( $\text{CO}_2_{\text{absolut}}$ ) gemessen. Ein zweiter Luftstrom wurde auf 52 l/h eingestellt und als Vergleichsgas zur differentiellen Messung in einen zweiten Gasanalysator (Binos 1.2, Messbereich Kanal 1: -2,5 bis +2,5 Pa  $\text{CO}_2$ , Messbereich Kanal 2: 0 bis 0,5 kPa  $\text{H}_2\text{O}$ , Fa. Leybold-Heraeus, Hanau) geleitet. Ein dritter Luftstrom wurde als Nullgas ebenfalls auf 52 l/h eingestellt und in den zweiten Gasanalysator geleitet, um zur Nullpunkteinstellung des Gasanalysators gegen das Vergleichsgas gemessen werden zu können. Dies war notwendig, da die Infrarot-Gasanalysatoren eine unterschiedliche Empfindlichkeit bei der differentiellen  $\text{CO}_2$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Partialdruck-Messung abhängig vom  $\text{CO}_2$ -Partialdruck des Eingangs-Luftstroms zeigten. Der restliche Eingangs-Luftstrom wurde auf vier Blattkammern so aufgeteilt, dass die Ober- und die Unterseiten der Blattkammern jeweils von 26 l/h durchströmt wurden. Nach Durchströmen der Blattkammer wurden die Gasströme der Kammerober- und -unterseite zur differentiellen  $\text{CO}_2$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Partialdruck-Messung gegen das Vergleichsgas in den zweiten Infrarot-Gasanalysator eingeleitet.

Die Infrarot-Gasanalysatoren wurden regelmäßig durch Einleiten geeichter Messgase kalibriert. Die Kalibrierung war mindestens ein Jahr lang stabil.

### 2.4.1.3. Steuerung des Systems

Da immer nur einer der Gasströme, entweder der Strom aus den Blattkammern oder das Nullgas, gegen das Vergleichsgas gemessen werden konnte, wurde die Einleitung der Gasströme zu dem Gasanalysator durch Magnetventile geregelt. Gesteuert wurde die Abfolge der Messungen durch ein Computerprogramm, das die Magnetventile über eine Schaltbox kontrollierte. Um sicherzustellen, dass Mess- und Vergleichsgas mit dem gleichen Druck durch die Messeinheiten strömten, wurde dieser mit Hilfe eines U-Rohrmanometers kontrolliert.

### 2.4.1.4. Aufbau der Blattkammern

Durch das Einspannen eines Blattes wurden die Ober- und Unterseite der Blattkammer voneinander getrennt. Die Blattkammern wurden durch silikonisierte Schaumstoffringe von der Umgebung abgedichtet. Die Blattfläche innerhalb der Kammer betrug  $7,3 \text{ cm}^2$ . Ein thermostatisiertes Wasserbad (RC6 RCS, Fa. MGW Lauda, Königshofen) temperierte durch isolierte Schläuche die Blattkammern auf  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ein Ventilator jeweils im Inneren der Ober- und Unterseite der Blattkammer durchmischte und verwirbelte die Luft, um einen laminaren Luftstrom auf der Blattoberfläche zu vermeiden. Die Blatttemperatur wurde durch ein Thermoelement gemessen, welches an die Unterseite des Blattes gedrückt wurde. Das Blatt wurde von oben über Lichtleiter durch eine dünne durchsichtige Plastikfolie belichtet. Als Lichtquelle diente eine Universal-Kaltlichtlampe (Flexilux 150HL, Fa. Schöllly Fiberoptik, Denzlingen), die stufenweise bis ca.  $1300 \text{ } \mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (PAR) eingestellt werden konnte. Die Quantenflüsse wurden mit einer Photozelle, die anstelle des Blattes in die Blattkammer gelegt werden konnte, gemessen. Die relative Luftfeuchte in der Blattkammer errechnete sich aus dem Wasserdampfpartialdruck gesättigter Luft bei einer Temperatur gleich der Kammertemperatur und dem Wasserdampfpartialdruck des Luftstroms. Diese lag unter den angegebenen Temperaturen bei ca. 65 %.

### 2.4.1.5. Datenerfassung und -verarbeitung

Alle notwendigen Daten zur Berechnung der Gaswechselfparameter wurden durch eine Kontrolleinheit (3497 A Data Acquisition/Control Unit, Fa. Hewlett-Packard, Hanau) erfasst. Hierzu gehörten einerseits die von den Gasanalysatoren ermittelten Messwerte, der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck des eingeleiteten Luftstroms ( $\text{CO}_2_{\text{absolut}}$ ), sowie die Partialdruck-Differenzen von  $\text{CO}_2$  ( $\Delta\text{CO}_2$ ) und  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\Delta\text{H}_2\text{O}$ ) zwischen dem Mess- und Vergleichsgas und andererseits der Atmosphärendruck, die Druckdifferenz des Luftstroms nach dem Kondensator zum Atmosphärendruck, die Temperatur des Kondensators, sowie die Blatttemperaturen. Der gesamte Datensatz wurde alle sechs Sekunden an einen Rechner (HP 9000\*217, Fa.

Hewlett-Packard, Hanau) gegeben. Die von der Kontrolleinheit erhaltenen Daten wurden von einem Steuer- und Auswerteprogramm über eine Minute gemittelt.

Unter Einbeziehung fester Parameter (Blattfläche, Flussrate des Messgases und Kalibrierfaktoren für  $\Delta\text{CO}_2$  und  $\Delta\text{H}_2\text{O}$ ) wurden aus den gemittelten Daten die  $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate, die Blattleitfähigkeit für Wasserdampf sowie der interzelluläre  $\text{CO}_2$ -Partialdruck errechnet und auf einem Drucker ausgegeben. Basis für die Berechnungen waren die Modelle von v. Caemmerer und Farquhar (1981).

#### **2.4.2. Bestimmung der $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate unter Anzuchtbedingungen**

Zur Ermittlung der  $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate von Blättern intakter Pflanzen unter Anzuchtbedingungen wurden ausgewachsene Blätter in die Blattkammer eingespannt, ohne das Blatt zu verletzen, und mit einem Quantenfluss von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  belichtet. Der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck im Eingangstrom wurde auf  $360 \mu\text{bar}$  eingestellt und die relative Luftfeuchte auf 65 %, was bei einer Blatttemperatur von  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  einer Sättigungsdifferenz zwischen Luft und Blatt (vapour pressure deficit, vpd) von 9,8 mbar entsprach. Nach Erreichen konstanter Blattleitfähigkeit für Wasserdampf wurde die  $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate ermittelt. Zur vollständigen Adaption der Stomata an diese Bedingungen wurden i.d.R. 30 bis 45 min benötigt. Jede Messkammer war 3 min mit dem Infrarot-Gasanalysator verbunden, bevor er auf die nächste Kammer geschaltet wurde. Um Messartefakte der einzelnen Kammern ausschließen zu können, wurden die vier Kammern alternierend benutzt. Die Erdpflanzen wurden regelmäßig gegossen, um ein Austrocknen zu verhindern.

#### **2.4.3. Aufnahme von $\text{CO}_2$ -Sättigungskurven**

Zur Aufnahme der  $\text{CO}_2$ -Sättigungskurven wurden die Blätter in der Blattkammer mit einem Quantenfluss von  $1300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  belichtet und mit Luft mit  $2000 \mu\text{bar}$   $\text{CO}_2$  und 65 % relative Luftfeuchte begast. Nach Erreichen einer konstanten  $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate wurde der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck stufenweise auf 1000, 600, 350, 200, 100, 60 und  $30 \mu\text{bar}$  gesenkt.

Um irreversible Effekte auf die Photosynthese durch hohe Photorespirationsraten in den transgenen Pflanzen zu vermeiden, wurde die Messung bei dem höchsten  $\text{CO}_2$ -Partialdruck begonnen und die Inkubationszeit in jeder Stufe auf maximal 1 h begrenzt. Aus  $\text{CO}_2$ -Sättigungskurven wurden außerdem die Photorespirationsrate, der  $\text{CO}_2$ -Kompensationspunkt ( $\Gamma$ ) und die Carboxylierungseffizienz (CE) bestimmt.

#### **2.5. Messung der Chlorophyllfluoreszenz (nach Schreiber *et al.* 1986)**

Blätter intakter Pflanzen wurden in eine Blattkammer eingespannt und einem Gasstrom mit einem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck von  $360 \mu\text{bar}$  oder  $2000 \mu\text{bar}$ , einer Temperatur von  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchte von 65 % ausgesetzt (siehe 2.4.1.).

Für die Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurde ein Puls-Amplituden-Modulations-Chlorophyll-Fluorometer (PAM, Fa. Walz, Effeltrich) verwendet. Die obere Blattoberfläche wurde durch eine Glasfaseroptik mit einem Messlicht (Peak-Wellenlänge 655 nm) belichtet. Dabei wurden die Chlorophyll *a*-Moleküle im PSII durch Lichtimpulse im  $\mu\text{s}$ -Bereich bei einer Frequenz von 100 kHz angeregt. Die Fluoreszenzimpulse wurden durch dieselbe Glasfaseroptik von einem Photodiodendetektor empfangen und durch einen selektiven Ausschnittverstärker von überlagernden Lichtsignalen getrennt, so dass das Meßsystem nur die Fluoreszenz erfasste, die durch das modulierte Messlicht hervorgerufen wurde und somit unempfindlich gegenüber dem Fluoreszenzanteil war, welcher durch zusätzliche Belichtung oder durch Streulicht bedingt war. Für die Bestimmung der Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) wurden die Blätter 40 min im Dunkeln inkubiert, um eine vollständige Oxidation der primären Elektronenakzeptoren (Quinon-A-Moleküle,  $Q_A$ ) des PSII zu erzielen.

Für die Ermittlung der maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) wurde eine vollständige Reduktion von  $Q_A$  im PSII durch einen 900 ms langen sättigenden Lichtimpuls ( $2500 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) induziert. Der Lichtimpuls wurde von einer Sättigungspulslampe (FL103, Fa. Walz, Effeltrich) erzeugt und durch dieselbe Glasfaseroptik wie das Messlicht geleitet.

Nach der Ermittlung der  $F_m$  wurde die Blattoberfläche durch einen weiteren Lichtleiter mit photosynthetisch aktivem Licht von verschiedenen Intensitäten belichtet (siehe 2.4.1.4.) und die Löschung der Chlorophyllfluoreszenz verfolgt. Um den photochemischen Anteil der Chlorophyllfluoreszenzlöschung ( $qP$ ) von dem nichtphotochemischen ( $qN$ ) zu trennen, wurden im Abstand von 10 s 900 ms lange Lichtimpulse gegeben, die das PSII vollständig reduzierten und dadurch zur kurzfristigen Eliminierung des photochemischen Anteils führten. Die Koeffizienten für die photochemische ( $qP$ ) und nicht photochemische ( $qN$ ) Löschung der Chlorophyllfluoreszenz sowie die maximale ( $F_v/F_m$ ) und effektive ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) Fluoreszenzausbeute des PSII wurden nach folgenden Formeln (Schreiber *et al.* 1998) berechnet:

$$qP = (F_s - F) / (F_s - F_0')$$

$$qN = 1 - (F_s - F_0') / (F_m - F_0)$$

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F_s - F) / F_s$$

$F_0$  ist dabei die Grundfluoreszenz im Dunkeln,  $F_m$  die maximale Fluoreszenz nach einem sättigendem Lichtimpuls im Dunkeln,  $F$  die Fluoreszenz während der Belichtung,  $F_s$  die Fluoreszenz nach einem sättigendem Lichtimpuls während der Belichtung,  $F_0'$  die Grundfluoreszenz nach der Belichtung.

Der Koeffizient für die Löschung der Grundfluoreszenz ( $qF_0$ ) wurde nach folgender Formel (Demmig-Adams und Adams III 1996) berechnet:

$$qF_0 = (F_0 - F_0') / F_0'$$

## 2.6. Präparation von Mitochondrien aus grünen Kartoffelblättern

(nach Neuburger *et al.* 1982; modifiziert)

50-80 g Kartoffelblätter wurden entrippt, in deionisiertem H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend zerschnitten. Das Blattmaterial wurde in einem Polytron® (Fa. Bachofer, Reutlingen) mit 500 ml halbgefrorenen Aufschlussmedium versetzt und zweimal 5-6 s bei „Stufe 4“ (PCU2 power control unit, Fa. Kinematica, Luzern, Schweiz) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Mull filtriert, auf Zentrifugenbecher verteilt und anschließend für 5 min bei 2.710 xg (Sorvall GS3 Rotor) zentrifugiert. Das Sediment, das aus Zelltrümmern und intakten Chloroplasten bestand, wurde verworfen und der Überstand für 20 min bei 10.800 xg (GS3 Rotor) zentrifugiert. Die resultierenden Sedimente aus Mitochondrien, Peroxisomen und Thylakoidfragmenten wurden mit einem Pinsel in Waschmedium vorsichtig resuspendiert und anschließend in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Das Homogenat wurde auf Zentrifugenbecher verteilt, mit Waschmedium aufgefüllt und zur Abtrennung verbliebener Chloroplasten für 10 min bei 1.090 xg (Sorvall SS34 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend für 15 min bei 12.100 xg (SS34 Rotor) abzentrifugiert, die Sedimente wie oben beschrieben vereinigt und in 4-5 ml Dichtegradientenmedium resuspendiert. Die resultierenden Organellen wurden auf Zentrifugenbecher verteilt, mit Dichtegradientenmedium aufgefüllt und anschließend für 30 min bei 39.100 xg zentrifugiert („slow start“, SS34 Rotor). Durch die Zentrifugation bildete sich ein Dichtegradient aus. Das Auslaufen des Rotors erfolgte bei ausgeschalteter Bremse. Die gelbliche bis hellgrüne Mitochondrienbande im unteren Drittel des Gradienten wurde mit Hilfe einer 10 ml-Glaspipette abgesaugt, in einem Zentrifugenbecher mit Waschmedium aufgefüllt und erneut für 15 min bei 12.100 xg in einem SS34-Rotor zentrifugiert. Das entstandene lockere Sediment wurde nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes in 1-2 ml Waschmedium resuspendiert und die so erhaltene Mitochondriensuspension bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt und die verwendeten Becher und Medien auf Eis präinkubiert. Die Zentrifugationen wurden in einer Sorvall RC-5B-Zentrifuge (Fa. DuPont, Wilmington, USA) bei 4 °C durchgeführt.

### Aufschlussmedium

0,3	M	Saccharose
20	mM	MOPS, pH 7,4
2	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
4	mM	Cystein
5	mM	Glycin
1	% (w/v)	BSA (entfettet)
1	% (w/v)	PVP 40

## Waschmedium

0,3	M	Saccharose
10	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
0,1	% (w/v)	BSA (entfettet)

## Gradientenmedium

0,3	M	Saccharose
10	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
0,1	% (w/v)	BSA (entfettet)
31	% (w/v)	Percoll

**2.7. Extraktionsmethoden****2.7.1. Extraktion von Metaboliten****2.7.1.1. Chloroform/Methanol-Extraktion** (nach Stitt *et al.* 1983; modifiziert)

Je eine Blattscheibe à 3,8 cm<sup>2</sup> wurde in einem mit flüssigem N<sub>2</sub> vorgekühlten Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver zerrieben. Nach dem Abdampfen des N<sub>2</sub> wurden 5 ml 1,5:3,5 (v/v) CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH zugegeben und bis zum vollständigen Auftauen der Probe weiter homogenisiert. Der Extrakt wurde quantitativ in ein Reagenzglas überführt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Zur Trennung von wasserlöslichen Metaboliten wurde der Extrakt mit 3 ml H<sub>2</sub>O 2 min ausgeschüttelt und anschließend 5 min bei 912 xg und 4 °C zentrifugiert (5810R, Fa. Eppendorf, Hamburg). Die wässrige Oberphase wurde in einen auf Eis vorgekühlten Rundkolben überführt und die Unterphase noch einmal mit 2 ml H<sub>2</sub>O ausgeschüttelt und 5 min bei 912 xg und 4 °C zentrifugiert. Die vereinigten Oberphasen eines Extraktes wurden im Rotationsverdampfer (Rotavapor R-200, Fa. Büchi, Flawil, Switzerland) bei 34 °C zur Trockne eingengt und in 1,5 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Proben wurden aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die chloroformhaltige Unterphase wurde mit 96%igem (v/v) Ethanol auf 10 ml aufgefüllt und kräftig durchgemischt. Nach 10 min Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und für die Chlorophyllbestimmung eingesetzt, während das Sediment, das in 2 ml 0,2 N KOH aufgenommen wurde, zunächst zur Stärke- und dann zur Proteinbestimmung diente. Für die gesamte Extraktion wurden ausschließlich HPLC-H<sub>2</sub>O und damit gespülte Gefäße verwendet.

### 2.7.1.2. Perchlorsäure-Extraktion

Je eine Blattscheibe à 3,8 cm<sup>2</sup> wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver zerrieben. Nach dem Abdampfen des N<sub>2</sub> wurden 500 µl 10 % (v/v) HClO<sub>4</sub> zugegeben und bis zum Auftauen weiter homogenisiert. Der Extrakt wurde quantitativ in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Zwei Aliquots à 50 µl wurden zur Phäophytinbestimmung abgenommen. Der Extrakt wurde 5 min bei 16.100 xg und 4 °C (5415R, Fa. Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt. Der pH-Wert des Überstandes wurde auf 7,0–7,5 mit 5 M KOH/1 M Triethanolamin (ca. 100 µl) eingestellt. Das zugegebene Volumen wurde notiert. Zur Ausfällung des gebildeten Kaliumperchlorates wurde der Extrakt 15 min auf Eis inkubiert und durch 5 min Zentrifugation bei 16.100 xg und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

### 2.7.1.3. Metaphosphorsäure-Extraktion (nach Anderson *et al.* 1992; modifiziert)

Je eine Blattscheibe à 3,8 cm<sup>2</sup> wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver zerrieben. Nach dem Abdampfen des N<sub>2</sub> wurde eine Spatelspitze PVPP und 1 ml eiskaltes Extraktionsmedium zugegeben und bis zum Auftauen weiter homogenisiert. Der Extrakt wurde quantitativ in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Zwei Aliquots à 50 µl wurden zur Phäophytinbestimmung abgenommen. Der Extrakt wurde 15 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert und anschließend wurde der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt. Der pH-Wert des Überstandes wurde mit 5 M KOH/1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 5,6 eingestellt. Das zugegebene Volumen wurde notiert. Der Überstand wurde in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

Extraktionsmedium

12	% (w/v)	Metaphosphorsäure
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA

## 2.7.2. Extraktion von Enzymen

### 2.7.2.1. Standard-Extraktion

Je eine Blattscheibe à 3,8 cm<sup>2</sup> wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver zerrieben. Nach dem Abdampfen des N<sub>2</sub> wurde 1 ml Extraktionsmedium zugegeben und bis zum Auftauen weiter homogenisiert. Der Extrakt wurde quantitativ in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und zwei Aliquots à 50 µl wurden zur Chlorophyllbestimmung abgenommen. Der Extrakt wurde in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bis zur Analyse gelagert. Die Extrakte wurden zur Bestimmung der Aktivität folgender Enzyme eingesetzt:

Phosphoenolpyruvatcarboxylase (2.9.1.6.), Pyruvatkinase (2.9.1.7.), ATP-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase (2.9.1.8.), Pyrophosphat-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase (2.9.1.9.) und Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (2.9.3.1.).

#### Extraktionsmedium

50	mM	HEPES-KOH, pH 7,4
5	mM	MgCl <sub>2</sub>
5	mM	DTT*
2	mM	Benzamidin
2	mM	ε-Amino-Hexansäure
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
1	mM	EGTA
0,5	mM	PMSF*
0,1	% (v/v)	Triton-X-100
10	% (v/v)	Glycerin

\* Diese Substanzen wurden dem Medium direkt vor der Extraktion zugesetzt.

#### 2.7.2.2. NADP-abhängige Malatdehydrogenase (nach Scheibe und Stitt 1988)

Je eine Blattscheibe à 3,8 cm<sup>2</sup> wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver zerrieben. Nach dem Abdampfen des N<sub>2</sub> wurde das Pulver mit einem in flüssigen N<sub>2</sub> gekühlten Spatel in ein mit flüssigen N<sub>2</sub> gekühltes Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur Extraktion in flüssigem N<sub>2</sub> aufbewahrt. 900 µl Extraktionsmedium wurden zu dem gefrorenen Pulver gegeben und unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre durch gründliches Vortexen aufgetaut. Zwei Aliquots je 20 µl wurden zur Chlorophyllbestimmung abgenommen und in Eis und unter Lichtausschluss bis zur Messung aufbewahrt. Der Extrakt wurde 2 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand sofort für die Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt (2.9.1.1.).

#### Extraktionsmedium

50	mM	NaCH <sub>3</sub> COO, pH 6,0
100	µM	Pefabloc SC
0,1	% (w/v)	BSA (entfettet)
0,1	% (v/v)	Triton X-100
4	mM	DTT*

\* Diese Substanz wurde frisch angesetzt und unmittelbar vor der Extraktion dem Medium zugegeben.

Das Medium wurde 10 min mit Ultraschall behandelt und mit N<sub>2</sub> begast.

**2.7.2.3. Nitratreduktase** (nach Kaiser *et al.* 1992; modifiziert)

Je eine Blattscheibe à 3,8 cm<sup>2</sup> wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver zerrieben. Nach dem Abdampfen des N<sub>2</sub> wurde das Pulver mit einem in flüssigen N<sub>2</sub> gekühlten Spatel in ein mit flüssigen N<sub>2</sub> gekühltes Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur Extraktion in flüssigem N<sub>2</sub> aufbewahrt. Unmittelbar vor der Bestimmung der NR-Aktivität wurden 900 µl Extraktionsmedium zu dem gefrorenen Pulver gegeben und das Pulver unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre durch gründliches Vortexen aufgetaut.

## Extraktionsmedium

100	mM	HEPES-KOH, pH 7,5
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
5	mM	Mg(CH <sub>3</sub> COO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
5	µM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
0,5	% (w/v)	BSA (entfettet)
1	% (w/v)	PVPP
10	% (v/v)	Glycerin
0,2	% (v/v)	Triton X-100
5	mM	DTT*
10	µM	Leupeptin*
8	µM	FAD*
200	µM	PMSF*

\* Diese Substanzen wurden dem Medium direkt vor der Extraktion zugesetzt.

**2.7.2.4. Glyoxylat- und Hydroxypyruvatreduktase** (nach Kleczkowski *et al.* 1992)

Je eine Blattscheibe à 3,8 cm<sup>2</sup> wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver zerrieben. Nach dem Abdampfen des N<sub>2</sub> wurden 400 µl Extraktionsmedium zugegeben und bis zum Auftauen weiter homogenisiert. Der Extrakt wurde quantitativ in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und zwei Aliquots à 50 µl wurden zur Chlorophyllbestimmung abgenommen. Anschließend wurde der Extrakt in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bis zur Analyse gelagert.

## Extraktionsmedium

40	mM	Tricin, pH 7,8
2	mM	MgCl <sub>2</sub>
1	mM	EDTA (freie Säure)
2	% (w/v)	PVP
5	mM	DTT*

\* Diese Substanz wurde dem Medium direkt vor der Extraktion zugesetzt.

### 2.7.2.5. Enzyme aus dem Ascorbat-Glutathion-Zyklus (nach Amako *et al.* 1994)

Je eine Blattscheibe à 3,8 cm<sup>2</sup> wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver zerrieben. Nach dem Abdampfen des N<sub>2</sub> wurden eine Spatelspitze PVPP und 500 µl Extraktionsmedium zugegeben und bis zum vollständigen Auftauen der Probe weiter homogenisiert. Der Extrakt wurde quantitativ in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und zwei Aliquots je 50 µl zur Chlorophyllbestimmung wurden abgenommen. Das Homogenat wurde 20 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde durch eine Sephadex G-25 (1,1 φ \* 5 cm) Säule filtriert, um phenolische Substanzen zu entfernen. Das Eluat wurde unmittelbar nach der Extraktion für die Bestimmung der Aktivität von Ascorbatperoxidase (2.9.1.4.) und Glutathionreduktase (2.9.1.5.) eingesetzt.

#### Extraktionsmedium

50	mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
50	mM	NaCl
5	mM	Ascorbinsäure*

\* Diese Substanz wurde dem Medium direkt vor der Extraktion zugesetzt.

## 2.8. Bestimmung von Metabolitmengen

### 2.8.1. Optisch-enzymatische Tests

Die optisch-enzymatische Bestimmung einer Substratkonzentration beruht auf der Kopplung einer bestimmten enzymatischen Reaktion mit einer Redoxreaktion, bei der NAD(P)<sup>+</sup> reduziert oder NAD(P)H oxidiert wird. Die Änderungen in der Konzentration an NAD(P)H im Reaktionsansatz lassen sich optisch bestimmen. Die Messungen erfolgten an einem Zweistrahl-Photometer (Uvikon 922A, Fa. Kontron, Mailand, Italien) bei einer Wellenlänge von 340 nm oder, wenn die Empfindlichkeit dieses Gerätes nicht mehr ausreichte, an einem Zweiwellenlängen-Filterphotometer (ZFP22, Fa. Sigma-Eppendorf, Berlin) bei einer Wellenlänge von 334 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm. Die Metabolitkonzentrationen (c) sind den Extinktionsänderungen (ΔE) proportional und berechneten sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$C = \frac{\Delta E}{\varepsilon * d} \text{ [mol * l}^{-1}\text{]}$$

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Den Berechnungen lagen folgende Extinktionskoeffizienten zugrunde:

$$\varepsilon (\text{NADH/NADPH}) \text{ bei } 334 \text{ nm} = 6,18 [\text{mM} \cdot \text{cm}]^{-1}$$

$$\varepsilon (\text{NADH/NADPH}) \text{ bei } 340 \text{ nm} = 6,22 [\text{mM} \cdot \text{cm}]^{-1}$$

$$\varepsilon (\text{APADH}_2) \text{ bei } 366 \text{ nm} = 9,1 [\text{mM} \cdot \text{cm}]^{-1}$$

Zur Bestimmung der Metabolitkonzentrationen wurden 20 bis 40  $\mu\text{l}$  Extrakt eingesetzt. Der Reaktionstart erfolgte mittels Enzymzugabe in der jeweils angegebenen Reihenfolge in einem Volumen von 5  $\mu\text{l}$ . In Ammoniumsulfat gelöste Enzyme wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment im jeweiligen Reaktionspuffer resuspendiert.

### 2.8.1.1. Stärke (nach Stitt und Heldt 1981; modifiziert)

Der quantitative Stärkenachweis beruht auf dem sukzessiven Abbau der Amylose- oder Amylopektinmoleküle zu Glukoseseinheiten, die sich optisch-enzymatisch nachweisen lassen.

Die Sedimente der Unterphasen der Chloroform/Methanol-Extrakte wurden in je 3 ml 0,2 N KOH aufgenommen und anschließend zum Aufbruch der Stärkekörner für 3 h bei 85 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 4,5-5,0 durch Zugabe von 1 N Essigsäure wurden die Proben für 15 min mit Ultraschall (Sonorex RK510S, Fa. Bandelin, Berlin) behandelt, um eine weitere Homogenisierung des Materials zu erzielen. Nach Verdünnung der Proben erfolgte der weitere Abbau enzymatisch: Je zwei 100  $\mu\text{l}$  Aliquots wurden mit jeweils 400  $\mu\text{l}$  Reaktionsmedium versetzt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach 2 min Zentrifugation bei 16.100 xg wurde der klare Überstand zur optisch-enzymatischen Bestimmung der Glukosekonzentration eingesetzt (siehe 2.8.1.2.).

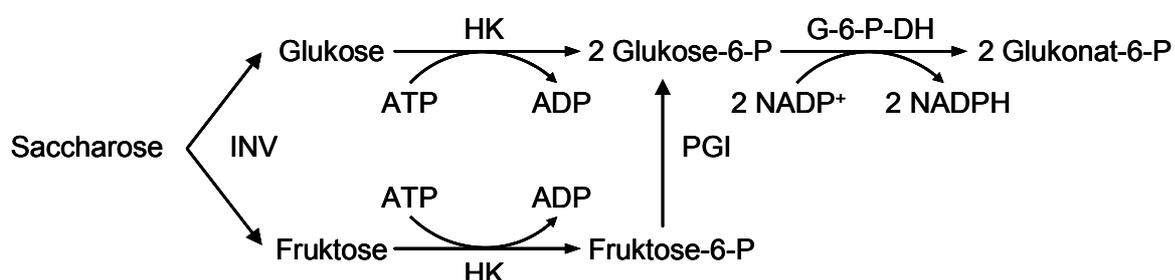
Reaktionsmedium

50	mM	NaCH <sub>3</sub> COO, pH 4,8
23	nKat	Amyloglukosidase*
33	nKat	$\alpha$ -Amylase*

\* Diese Substanzen wurden dem Medium direkt vor dem Reaktionsbeginn zugesetzt.

### 2.8.1.2. Glukose, Fruktose und Saccharose (nach Bergmeyer 1983; modifiziert)

Messprinzip



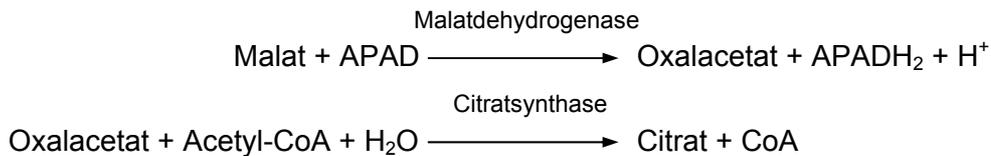
100	mM	Imidazol, pH 6,9
1,5	mM	MgCl <sub>2</sub>
1	mM	NADP*
1,1	mM	ATP*
23,3	nKat	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glu-6-P-DH)*
50	nKat	Hexokinase (HK)*
23,3	nKat	Phosphoglukoseisomerase (PGI)*
1,25	µKat	β-Fruktosidase (Invertase; INV)*

\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt zum Testansatz gegeben.

Gestartet wurden die Reaktionen nacheinander durch Zugabe der Enzyme in der angegebenen Reihenfolge. Die Extinktionszunahme des Testansatzes bei 340 nm durch NADPH-Produktion sind den Konzentrationen an Glukose, Fruktose und Saccharose direkt proportional. Pro mol gespaltener Saccharose entstehen 2 mol NADPH.

### 2.8.1.3. Malat (nach Bergmeyer 1983)

Messprinzip



Testansatz (600 µl)

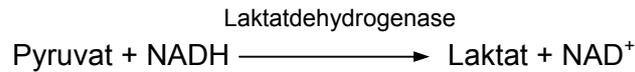
100	mM	Triethanolamin, pH 8,5
0,17	mM	APAD*
0,17	mM	Acetyl-CoA*
23	nKat	Citratsynthase*
200	nKat	Malatdehydrogenase*

\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt zum Testansatz gegeben.

Die Malatkonzentration ist der Extinktionszunahme des Testansatzes bei 366 nm durch APADH<sub>2</sub>-Produktion direkt proportional. APAD (ähnlich wie NAD) wird eingesetzt, damit das Reaktionsgleichgewicht auf Seite des OAA ist.

**2.8.1.4. Pyruvat** (nach Bergmeyer 1983)

Messprinzip



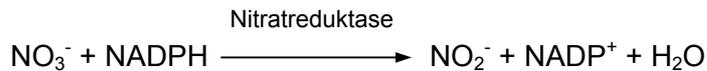
Testansatz (600 µl)

50	mM	HEPES-KOH, pH 7,5
20	mM	KCl
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
0,1	mM	β-NADH
4	nKat	Laktatdehydrogenase

Die Pyruvatkonzentration ist der Extinktionsabnahme des Testansatzes bei 340 nm durch NADH-Verbrauch proportional.

**2.8.1.5. Nitrat** (nach Riens 1992)

Messprinzip



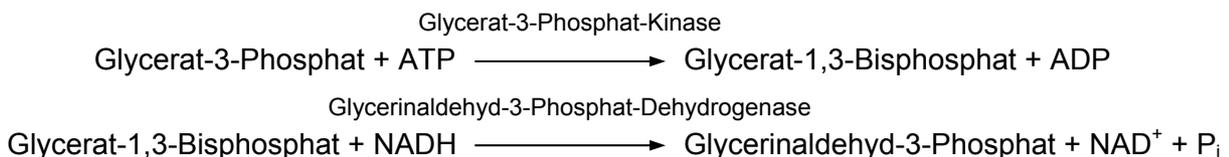
Testansatz (600 µl)

50	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH, pH 7,3
0,2	mM	β-NADPH
0,8	nKat	Nitratreduktase

Die Nitratkonzentration ist der Extinktionsabnahme des Testansatzes bei 340 nm durch NADPH-Verbrauch proportional.

**2.8.1.6. Glycerat-3-Phosphat** (nach Lowry und Passoneau 1972)

Messprinzip



## Testansatz (600 µl)

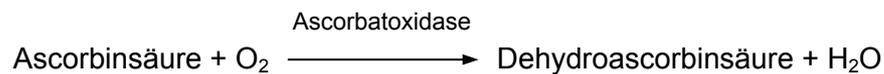
100	mM	Tris-HCl, pH 8,1
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
0,1	mM	β-NADH*
1,1	mM	ATP*
83	nKat	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase*
83	nKat	Glycerat-3-Phosphat-Kinase*

\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt zum Testansatz gegeben.

Die Extinktionsabnahme des Testansatzes bei 334 nm durch NADH-Verbrauch ist der Konzentration von Glycerat-3-Phosphat proportional.

**2.8.1.7. Ascorbinsäure** (nach Foyer *et al.* 1983)

## Messprinzip



## Testansatz (600 µl)

100	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 5,6
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
83,3	nKat	Ascorbatoxidase

Die Extinktionsabnahme des Testansatzes bei 265 nm durch Verbrauch von Ascorbinsäure wurde ermittelt und die Konzentration an Ascorbinsäure anhand einer Eichgerade zwischen 0 und 100 µM bestimmt.

**2.8.2. Colorimetrische Tests****2.8.2.1. Glyoxylat** (nach Häusler *et al.* 1996; modifiziert)

Diese Methode beruht auf der Umwandlung von Glyoxylat und Phenylhydrazin in Glyoxylat-Phenylhydrazon unter sauren Bedingungen. In einer zweiten Reaktion wird das Glyoxylat-Phenylhydrazon in Anwesenheit von K<sub>3</sub>Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub> zu 1,5-Diphenylformazancarboxylsäure oxidiert.

Je eine Blattscheibe à 3,8 cm<sup>2</sup> wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver zerrieben. Nach dem Abdampfen des N<sub>2</sub> wurde 1 ml Extraktionsmedium zugegeben und bis zum Auftauen weiter homogenisiert. Der Extrakt wurde quantitativ in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und zur Bildung des Glyoxylat-Phenylhydrazon-Komplexes 5 min bei 80 °C inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt 10 min auf Eis gekühlt und 5 min bei 16.100 xg zentrifugiert.

## Extraktionsmedium

100	mM	HCl
1	% (v/v)	Phenylhydrazin

Zum Start der Farbreaktion wurden 200 µl des Überstands mit 750 µl 18,5 % (v/v) HCl versetzt und sofort geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl 5 % (v/v)  $K_3Fe(CN)_6$  hinzugefügt und der Reaktionsansatz wurde wieder geschüttelt. Der Reaktionsansatz wurde 3 min bei 16.100 xg zentrifugiert. Exakt 10 min nach Reaktionsbeginn wurde die Extinktion des Überstandes bei 520 nm gegen Luft gemessen (Uvikon 922A, Fa. Kontron, Mailand, Italien). Für die Bestimmung der Konzentration an Glyoxylat in der Probe wurde eine Eichgerade aus Glyoxylsäure im Bereich von 0 bis 300 µM in gleicher Weise wie die Proben aufgearbeitet. Zur Berücksichtigung der Eigenabsorption des Blattextraktes wurde ein Aliquot des Überstandes wie oben behandelt, aber ohne Zugabe von  $K_3Fe(CN)_6$ .

**2.8.2.2. Glutathion** (nach Griffith 1980)

50 µl Probe wurden mit 500 µl 500 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 8 neutralisiert und mit 50 µl 12 mM DTNB in 25 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7 für 5 min bei RT derivatisiert. Die Extinktion des Testansatzes bei 412 nm wurde ermittelt und die Konzentration an Glutathion anhand einer Eichgerade zwischen 5 und 1000 µM bestimmt.

**2.8.3. Chromatographische Tests****2.8.3.1. Aminosäuren** (nach Riens 1992)

Zur Quantifizierung freier Aminosäuren wurden die Aminosäuren mit dem Fluoreszenz-Farbstoff *o*-Phthaldialdehyd und  $\beta$ -Mercaptoethanol zu fluorophoren apolaren Indolderivaten umgesetzt und chromatographisch durch „Reversed Phase“ HPLC getrennt. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Detecktors konnten die Aminosäuren sehr empfindlich identifiziert und quantifiziert werden. Diese Methode ermöglichte den Nachweis von Aminosäuren im Bereich von 0,2-20 µM, dem 20-fachem der Ninhydrin-Derivatisierung, in einem Probenvolumen von 20 µl.

## Derivatisierungsreagenz

## OPA-Stammlösung

16	mM	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
88	% (v/v)	Methanol
0,11	M	Kaliumborat, pH 10,4
1,1	% (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol

Arbeitslösung: OPA-Stammlösung 1:3 (v/v) mit 1 M Kaliumborat, pH 10,4

Die OPA-Stammlösung wurde bis zu 48 h lichtgeschützt aufbewahrt. Der Arbeitslösung wurden 5 µl β-Mercaptoethanol auf 1,5 ml zugesetzt, wenn die Lösung älter als 24 h war. 20 µl Probe aus der Chloroform/Methanol-Extraktion und 20 µl Arbeitslösung wurden gemischt, für 1 min bei 15 °C derivatisiert und anschließend auf die Säule aufgetragen. Die Vorgänge der Derivatisierung, des Mischens und der Auftragung wurden durch einen automatisch gesteuerten Probengeber (Autosampler 2157, Fa. LKB Bromma, Uppsala, Schweden) für alle Proben vereinheitlicht. Die Auftrennung der derivatisierten Aminosäuren erfolgte durch eine C-18-„Reversed Phase“-Säule (LiChro CART<sup>®</sup> 125-4, Superspher<sup>®</sup> 100 RP 18 encapped, 4 µm, Fa. Merck, Darmstadt) bei konstanter Säulentemperatur von 35 °C (HPLC column oven 2155, Fa. LKB Bromma). Verunreinigungen des Säulenmaterials wurden durch eine Vorsäule (LiChro CART<sup>®</sup> 4-4, Fa. Merck) vermindert. Die Gesamtkonzentration aller aufgetragenen Aminosäuren betrug maximal 0,5 mM. Die derivatisierten Aminosäuren wurden von dem apolaren Säulenmaterial (Octadecylsilicat) durch einen Gradienten aus Acetonitril und Phosphatpuffer eluiert. Der Gradient wurde durch einen Gradientenmischer (Low pressure mixer, Fa. LKB Bromma) und eine Pumpe (HPLC pump 2248, Fa. Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) erzeugt. Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad.

#### Elutionslösungen

A:	5	% (v/v)	Acetonitril in Stammpuffer
B:	50	% (v/v)	Acetonitril in Stammpuffer
C:	70	% (v/v)	Acetonitril in H <sub>2</sub> O

#### Verlauf des Gradienten:

min	% A	% B	% C	Flussrate (ml/min)
0	100	0	0	0,9
12	81	19	0	0,9
20	81	19	0	0,9
38	52	48	0	0,9
41	52	48	0	0,9
48	32	68	0	0,9
51	0	0	100	1,2
66	0	0	100	1,2
68	100	0	0	0,9
78	100	0	0	0,9

### Stammpuffer

1,71 mM	EDTA (freie Säure)
18 mM	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
mit 50 % (w/v) NaOH auf pH 7,06-7,08 eingestellt	

Zur Anregung der Derivatisierungsprodukte wurde ein Lichtstrahl von  $\lambda=330$  nm eingesetzt. Die Emission des Eluats wurde bei 408 nm direkt am Säulenausgang mit einer Empfindlichkeit von 500-1000 nA im kontinuierlichen Fluss gemessen (Fluorescence detector 2144, LKB Bromma). Jede Messreihe erforderte eine eigene Kalibrierung, denn die Fluoreszenzintensität der Aminosäurederivate war abhängig vom Alter der Derivatisierungsreagenzien, der Fluoreszenzlampe, der Säule und sehr empfindlich gegenüber geringen pH-Wert-Änderungen. Die Kalibrierung erfolgte mit drei verschiedenen Aminosäurekonzentrationen (4, 10 und 20  $\mu$ M) und H<sub>2</sub>O als Blindwert. Die verschiedenen Aminosäurekonzentrationen wurden aus einem Aminosäure-Standardgemisch (Amino Acid Standard Solution A-2161, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach Zusatz entsprechender Konzentrationen an Phosphoserin, Glutamin, Asparagin, Tryptophan und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) hergestellt.

Die Linearität der Eichgeraden wurde in einem Bereich von 1-50  $\mu$ M getestet. Den Standardgemischen und Proben wurden jeweils 16,7  $\mu$ M  $\alpha$ -Aminobuttersäure (ABA) als interner Standard zugesetzt. Der interne Standard wurde verwendet, um mögliche Geräteungenauigkeiten der Pumpe und des automatischen Probengebers nachzuweisen.

Die Pumpe, der Probengeber und die Messsequenz wurden von einem Computerprogramm (HPLC manager, Pharmacia LKB) gesteuert und die Daten des Fluoreszenzdetektors kontinuierlich gespeichert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einem Integrationsprogramm (PeakNet 5.0, Fa. Dionex, Sunnyvale, USA).

### 2.9. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Es wurde, falls nicht anders erwähnt, die maximalen Aktivitäten der Enzyme ermittelt, indem optimale Konzentrationen von Substraten und Kofaktoren eingesetzt wurden. Bei kontinuierlichen optischen Tests entsprach die Umsetzung des absorbierenden Kofaktors oder Substrats mit der Zeit direkt der Aktivität des Enzyms. Für colorimetrische Tests wurde in einer zeitabhängigen Inkubation ein von der Enzymaktivität abhängiges Produkt hergestellt. Die Produktmenge konnte colorimetrisch bestimmt werden und gab, bezogen auf die Inkubationszeit, die Enzymaktivität an. Bei radioaktiven Tests wurde eine zeitabhängige Inkubation des Extrakts mit einem radioaktiv markierten Substrat durchgeführt. Nicht umgesetztes Substrat wurde entfernt und die Produktmenge über die eingebaute Radioaktivität ermittelt. Die Enzymaktivität wurde durch den Bezug der Produktmenge auf die Inkubationszeit bestimmt. Zur Messung der Enzymaktivitäten wurden die Enzymextrakte entweder frisch hergestellt oder tiefgefrorene Extrakte auf Eis aufgetaut und anschließend 15

min bei 4 °C zentrifugiert. Für die Messung wurde der Überstand eingesetzt. Einmal aufgetaute Proben wurden nicht wieder eingefroren, sondern nach Abschluss der Messungen verworfen.

### 2.9.1. Optisch-enzymatische Tests

Alle optisch-enzymatische Tests erfolgten bei 23 °C an einem Zweistrahl-Photometer (Uvikon 922A, Fa. Kontron, Mailand, Italien). Die eingesetzten Volumina der Extrakte reichten von 20 bis 50 µl. Der Start der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von demjenigen der Substrate oder Kofaktoren, welches in einem Testansatz an letzter Stelle aufgeführt ist. Die Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit entsprach direkt der Umsetzung des absorbierenden Kofaktors oder Substrats (berechnet nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz, siehe 2.8.1.) mit der Zeit und damit der Enzymaktivität.

Extinktionsänderungen vor dem Start der Reaktion wurden von den Messwerten subtrahiert. Eine Blindreaktion ohne Extraktzugabe wurde vor jede Messreihe durchgeführt und später ebenfalls von den Messwerten subtrahiert.

Den Berechnungen lagen folgende Extinktionskoeffizienten zugrunde:

$$\varepsilon (\text{NADH/NADPH}) \text{ bei } 340 \text{ nm} = 6,22 [\text{mM} \cdot \text{cm}]^{-1}$$

$$\varepsilon (\text{Ascorbinsäure}) \text{ bei } 290 \text{ nm} = 2,8 [\text{mM} \cdot \text{cm}]^{-1}$$

#### 2.9.1.1. NADP-abhängige Malatdehydrogenase (nach Scheibe und Stitt 1988)

(S)-Malat:NADP<sup>+</sup> Oxidoreduktase (MDH; EC 1.1.1.82)

Messprinzip



*In vivo*-Aktivität

Nach dem Auftauen wurde der Extrakt für 2 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert. 2x je 50 µl des Überstands wurden sofort in eine mit Testansatz vorbereitete Küvette zugegeben und gemischt. Die Extinktionsabnahme bei 340 nm durch die Oxalacetat-abhängige NADPH-Oxidation wurde über 3 min registriert. Vom Überstand wurden 10 µl für eine Proteinbestimmung abgenommen.

Testansatz (1 ml)

100	mM	Tris-HCl, pH 8,0
1	mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
0,01	% (w/v)	BSA (entfettet)
0,2	mM	β-NADPH*
1	mM	DTT*
2	mM	Oxalacetat*

\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt zum Testansatz gegeben.

Das Medium wurde 10 min mit Ultraschall behandelt und mit N<sub>2</sub> begast.

maximale Aktivität:

Zur vollständigen Aktivierung der MDH wurden 100 µl des Überstands mit 50 µl 0,5 M DTT in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 und 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,0 in einem Mikroreaktionsgefäß unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gemischt und bei RT inkubiert. Aliquots von 50 µl wurden nach 20, 40 und 60 min abgenommen und wie oben beschrieben gemessen, bis keine Zunahme der Aktivität mehr registriert wurde.

NAD-abhängige MDH-Aktivität:

NAD-abhängige Malatdehydrogenasen aus Blättern können auch NADP als Coenzym verwenden (Vidal *et al.* 1977). Obwohl NADP mit einer geringeren Rate im Vergleich mit NAD von NAD-MDH verwendet wird, besitzen Blätter eine sehr hohe NAD-abhängige MDH-Aktivität. 0,2 % der gesamten NAD-abhängigen Aktivität bei pH 8,0 kann auch als unspezifische NADP-abhängige Aktivität gefunden werden (Scheibe und Stitt 1988). Um diese unspezifische Oxalacetat-abhängige NADPH-Oxidation zu berücksichtigen, wurde die gesamte NAD-abhängige MDH-Aktivität in 20 µl Extrakt (1:10 verdünnt) gemessen.

Testansatz (1 ml)

100	mM	Tris-HCl, pH 8,0
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
0,01	% (w/v)	BSA (entfettet)
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2	mM	β-NADH*
1	mM	Oxalacetat*

\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt dem Testansatz zugegeben.

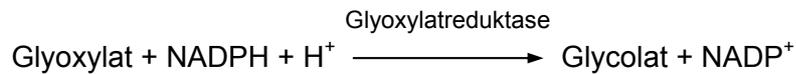
Der Aktivierungszustand der NADP-MDH wurde wie folgt berechnet:

$$(a - 0,002 b) * (c - 0,002 b)^{-1}$$

a	<i>in vivo</i> -NADP-MDH-Aktivität
b	NAD-MDH-Aktivität
c	maximale NADP-MDH-Aktivität

**2.9.1.2. Glyoxylatreduktase** (nach Kleczkowski *et al.* 1992)Glycolat:NADP<sup>+</sup> Oxidoreduktase (EC 1.1.1.79)

Messprinzip



Testansatz (600 µl)

100	mM	MOPS, pH 7,1
0,2	mM	β-NADPH*
1	mM	Glyoxylat*

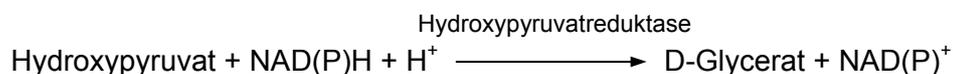
\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt dem Testansatz zugegeben.

Die Extinktionsabnahme bei 340 nm durch NADPH-Verbrauch wurde gemessen.

Andere Enzyme in Blättern sind ebenfalls in der Lage, die Reduktion von Glyoxylat unter Verbrauch von NADH oder NADPH zu katalysieren. Unter diese Enzyme befinden sich die NAD-abhängige Hydroxypyruvatreduktase (HPR1) in Peroxisomen und die NADP-abhängige Hydroxypyruvatreduktase (HPR2) im Cytosol. Beide Enzyme benutzen dieselben Substrate und Kofaktoren, aber mit verschiedenen Spezifitäten. Obwohl die  $K_m$ -Werte dieser Enzyme für Glyoxylat (HPR1 20 mM; HPR2 1,1 mM) höher sind als die der spezifischen NADP-abhängigen Glyoxylatreduktase (70 µM), besitzen grüne Blätter eine sehr hohe HPR-Aktivität, besonders von HPR1. Um den Beitrag der GR zur Gesamtaktivität berechnen zu können, wurde die Glyoxylatreduktase spezifisch durch Inkubation des Extrakts mit 2 mM Acetohydroxamat für 15 min bei 4 °C inhibiert.

**2.9.1.3. NADP- und NAD-abhängige Hydroxypyruvatreduktase** (nach Titus *et al.* 1983)D-Glycerat:NAD(P)<sup>+</sup> 2-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.29, EC 1.1.1.81)

Messprinzip



Testansatz (600 µl)

50	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH, pH 6,5
0,1	% (v/v)	Triton X-100
0,2	mM	β-NADPH oder β-NADH*
4	mM	β-Hydroxypyruvat*

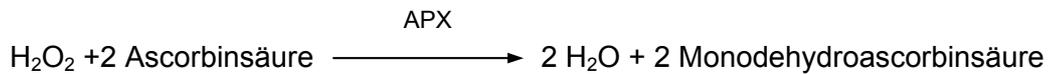
\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt dem Testansatz zugegeben.

Messgröße war die Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit bei 340 nm.

**2.9.1.4. Ascorbatperoxidase** (nach Amako *et al.* 1994)

L-Ascorbat:Wasserstoffperoxid Oxidoreduktase (APX; E.C.1.11.1.11)

Messprinzip



Testansatz (600 µl)

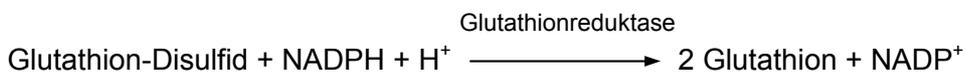
50	mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
0,5	mM	Ascorbinsäure*
0,17	mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *

\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt dem Testansatz zugegeben.

Die Extinktionsabnahme bei 290 nm durch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängige Oxidation von Ascorbinsäure wurde während der ersten 30 s nach dem Reaktionsstart in Schritten von 1,2 s gemessen. Der Extinktionskoeffizient für Ascorbinsäure bei 290 nm beträgt 2,8 [mM·cm]<sup>-1</sup>.

**2.9.1.5. Glutathionreduktase** (nach Schaedle und Bassham 1977)Glutathion:NADP<sup>+</sup> Oxidoreduktase (EC 1.8.1.7)

Messprinzip



Testansatz (600 µl)

50	mM	Tris-HCl, pH 8
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
3	mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5	mM	GSSG*
0,25	mM	β-NADPH*

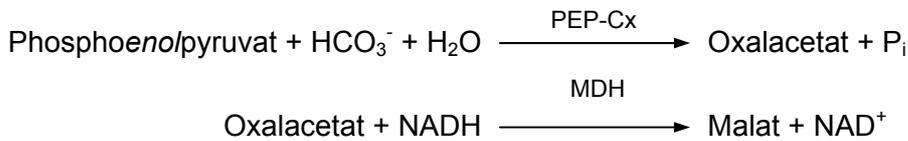
\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt dem Testansatz zugegeben.

Die Extinktionsabnahme bei 340 nm durch den NADPH-Verbrauch wurde während der ersten 2 min in Schritten von 10 s gemessen.

**2.9.1.6. Phosphoenolpyruvatcarboxylase** (nach Podestá und Plaxton 1994; modifiziert)

Phosphat:Oxalacetat Carboxylase (phosphorylierend) (PEP-Cx; EC 4.1.1.31)

Messprinzip



Testansatz (600 µl)

100	mM	Glycylglycin, pH 8,5
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
10	mM	KHCO <sub>3</sub>
0,15	mM	β-NADH*
100	nKat	Malatdehydrogenase (MDH)*
4	mM	Phosphoenolpyruvat*

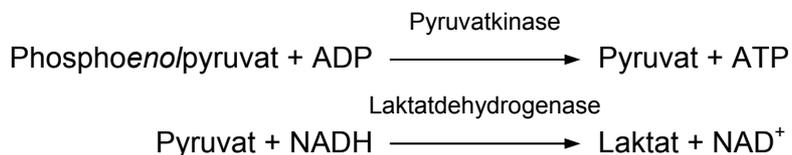
\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt zum Testansatz gegeben.

Die Extinktionsabnahme bei 340 nm durch den NADPH-Verbrauch wurde gemessen.

**2.9.1.7. Pyruvatkinase** (nach Büssis 1995; modifiziert)

ATP:Pyruvat 2-o-Phosphotransferase (EC 2.7.1.40)

Messprinzip



Testansatz (600 µl)

50	mM	HEPES-KOH, pH 7,5
20	mM	KCl
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
2	mM	DTT*
0,15	mM	β-NADH*
20	nKat	Laktatdehydrogenase*
0,5	mM	Phosphoenolpyruvat*
1	mM	ADP*

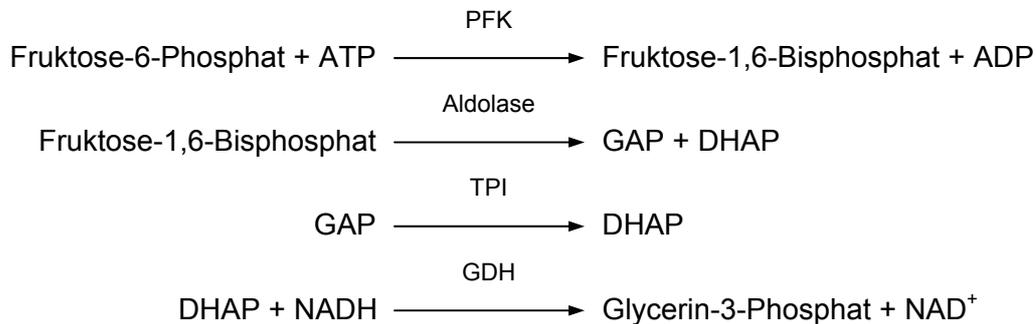
\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt dem Testansatz zugegeben.

Die Extinktionsabnahme bei 340 nm durch den NADPH-Verbrauch wurde gemessen. Die Aktivität Phosphoenolpyruvatphosphatase wurde vor dem Start mit ADP ermittelt und von den Messwerten subtrahiert (2.9.1.).

**2.9.1.8.ATP-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase** (nach Gibbs *et al.* 2000; modifiziert)

ATP:D-Fruktose-6-Phosphat 1-Phosphotransferase (PFK; EC 2.7.1.11)

Messprinzip



Testansatz (600 µl)

100	mM	HEPES-KOH, pH 7,5
5	mM	MgCl <sub>2</sub>
3,6	mM	P <sub>i</sub>
7,5	mM	Fruktose-6-Phosphat*
0,15	mM	β-NADH*
5	nKat	Aldolase*
80	nKat	Triosephosphatisomerase (TPI)*
10	nKat	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH)*
5	nKat	anorganische Pyrophosphatase (PPase)*
0,6	mM	ATP*

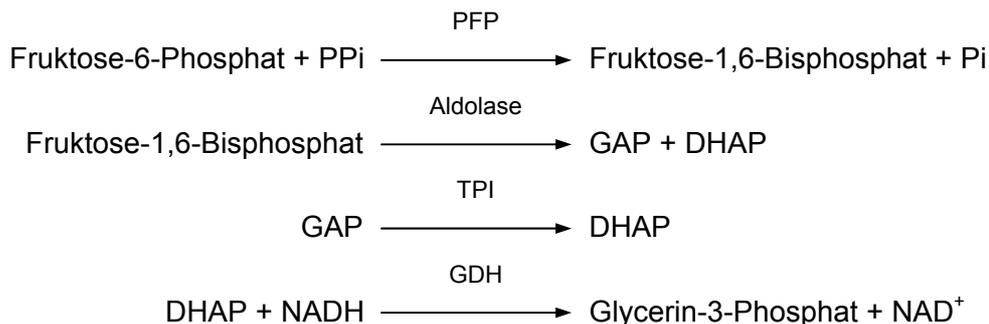
\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt dem Testansatz zugegeben.

Die Extinktionsabnahme bei 340 nm durch den NADPH-Verbrauch wurde gemessen.

**2.9.1.9.Pyrophosphat-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase**Diphosphat:D-Fruktose-6-Phosphat 1-Phosphotransferase (PFP; EC 2.7.1.90)  
(nach Gibbs *et al.* 2000; modifiziert)

Die PFP-Aktivität wurde in glykolytischer Richtung gemessen

Messprinzip



## Testansatz (600 µl)

100	mM	HEPES-KOH, pH 7,5
2	mM	MgCl <sub>2</sub>
1	µM	Fruktose-2,6-Bisphosphat**
7,5	mM	Fruktose-6-Phosphat*
0,15	mM	β-NADH*
5	nKat	Aldolase*
80	nKat	Triosephosphatisomerase (TPI)*
10	nKat	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH)*
1	mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>

\* Diese Substanzen wurden frisch angesetzt und direkt zu dem Testansatz gegeben.

\*\* Stammlösung: 1 mM Fruktose-2,6-Bisphosphat in 0,1 M NaOH (bei -80 °C gelagert)

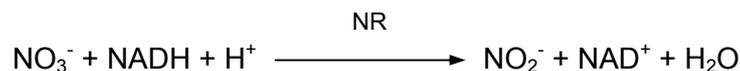
Die Extinktionsabnahme bei 340 nm durch den NADPH-Verbrauch wurde innerhalb von 3 min gemessen.

## 2.9.2. Colorimetrische Tests

### 2.9.2.1. Nitratreduktase (nach Kaiser *et al.* 1992; modifiziert)

Nitrit:NAD<sup>+</sup> Oxidoreduktase (NR; EC 1.7.1.1)

Messprinzip



Messgröße für die Nitratreduktaseaktivität war die Nitritbildung, die durch einen Farbttest quantifiziert wurde. Dabei wurde Sulfanilsäure durch salpetrige Säure diazotiert und das entsprechende Diazoniumsalz mit α-Naphtylamin an einen Azofarbstoff gekoppelt.

## Testansatz (1,2 ml)

940	µl	Reaktionsmedium A oder B
60	µl	Additive

Der Reaktionsstart erfolgte durch 200 µl Extrakt. Nach 5, 10 und 15 min Inkubation bei 30 °C wurden jeweils 300 µl-Aliquots entnommen und die Reaktion mit 25 µl 0,6 M Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> abgestoppt. Das überschüssige NADH, das den Farbttest stört, wurde durch 75 µl 0,2 mM Phenazinmethosulfat und 25minütige Inkubation auf Eis oxidiert. Die Inkubation fand wegen der Lichtempfindlichkeit von Phenazinmethosulfat im Dunkeln statt. Die Proben wurden dann mit 600 µl Farbmix versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Nach 2 min Zentrifugation wurde die Extinktion bei 540 nm bestimmt (Uvikon 922A, Fa. Kontron, Mailand, Italien). Die Farbreaktion war bis zu 6 h lang stabil.

Reaktionsmedien				A	B
100	mM	HEPES-KOH, pH 7,5	+	+	
6	mM	KNO <sub>3</sub>	+	+	
6	mM	EDTA (freie Säure)	+	-	
13	mM	Mg(CH <sub>3</sub> COO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-	+	

Bei Inkubation mit Reaktionsmedium A wurde die maximale Aktivität erfasst, Medium B gab die *in vivo*-Aktivität durch Verwendung physiologischer Konzentrationen an Magnesium wieder. Der Aktivierungszustand der NR errechnet sich wie folgt:

Aktivierungszustand [%] = B/A \* 100 (Kaiser und Spill 1991; Kaiser und Huber 2001)

#### Additive

100	mM	HEPES-KOH, pH 7,5
10	mM	β-NADH
5	mM	DTT
333	μM	Leupeptin
200	μM	FAD
100	μM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>

Die Additive dienen zur Stabilisierung des empfindlichen Enzyms und wurden frisch angesetzt.

#### Farbmix

Lösung A	1	% (w/v)	Sulfanilamid in 2 N HCl
Lösung B	0,02	% (w/v)	N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamin-Dihydrochlorid

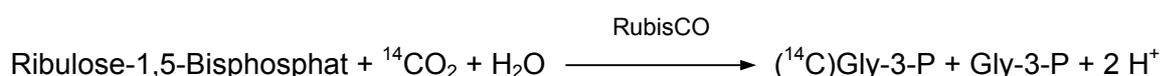
Vor Gebrauch wurden beide Lösungen 1:1 (v/v) zum Farbmix gemischt (Hagemann und Reed 1980). Die Konzentration des gebildeten Nitrits wurde anhand einer Eichgerade im Bereich zwischen 0-15 nmol bestimmt und die NR-Aktivität aus der zeitlichen Rate der Konzentrationszunahme berechnet.

### 2.9.3. Tests mit Einbau eines radioaktiv markierten Substrats

#### 2.9.3.1. Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (nach Heldt *et al.* 1978)

3-Phospho-D-Glycerat Carboxylase (dimerisierend) (RubisCO; EC 4.1.1.39)

#### Messprinzip



Die Aktivität der RubisCO wurde durch den Einbau radioaktiv markierten Kohlendioxids in das säurestabile Produkt Glycerat-3-Phosphat gemessen.

Der Aktivierungszustand der RubisCO ist definiert als der Anteil der Aktivität im nativen Extrakt (*in vivo*-Aktivität) der Aktivität nach vollständiger Aktivierung (maximale Aktivität). Daher sollten aus einem Extrakt jeweils die maximale Aktivität und die *in vivo*-Aktivität der RubisCO bestimmt werden.

Maximale Aktivität:

Durch 20 min Inkubation in einer Lösung mit hohen CO<sub>2</sub>- und MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen wurde der Lysin-Rest 240 der RubisCO carbamyliert und das Enzym dadurch vollständig aktiviert. Dabei war sicherzustellen, dass das Substrat Ribulose-1,5-Bisphosphat nicht zugegeben wurde, da es an die RubisCO bindet und das Enzym damit inaktiviert (Robinson *et al.* 1988). Außerdem musste der Enzymextrakt verdünnt werden, um eine volle Aktivierung der RubisCO zu erreichen (Heineke, persönliche Mitteilung).

100 µl Enzymextrakt (15 µg Chl) wurden mit 400 µl Verdünnungspuffer verdünnt.

Verdünnungspuffer

100	mM	Tris-HCl, pH 7,8
5	mM	MgCl <sub>2</sub>

Zur Carbamylierung wurden 75 µl des verdünnten Enzymextrakts mit 15 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> und 10 µl 1 M NaHCO<sub>3</sub> versetzt und anschließend genau 20 min bei RT inkubiert. 20 µl des Aktivierungsgemisches wurden dann mit 100 µl Reaktionspuffer versetzt und genau 30 s inkubiert.

Reaktionspuffer

100	mM	Tris-HCl, pH 8,1
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
10	mM	KHCO <sub>3</sub> *
1,4	mM	Ribulose-1,5-Bisphosphat*
1	µCi	( <sup>14</sup> C) NaHCO <sub>3</sub> *

\* Diese Substanzen wurden dem Puffer direkt vor Beginn der Reaktion zugesetzt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 2 N HCl gestoppt. Hierdurch wurde außerdem nicht umgesetztes säurelabiles NaHCO<sub>3</sub> als gasförmiges CO<sub>2</sub> freigesetzt. Der Ansatz wurde in 5 ml-Szintillationsgefäße überführt und auf einer Heizplatte bei 60 °C über Nacht eingetrocknet. Der Rückstand wurde in 200 µl 1 N HCl resuspendiert, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier safe, Fa. Canberra-Packard, Groningen, Niederlande) versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler (1900TR, Fa. Canberra-Packard, Meriden, USA) gemessen.

Um aus dem Einbau von  $^{14}\text{CO}_2$  den gesamten Einbau von  $\text{CO}_2$  schließen zu können, musste die spezifische Radioaktivität im Reaktionsansatz ermittelt werden. Diese ergab sich aus der Konzentration an  $\text{HCO}_3^-$  im Reaktionsansatz und der zugegebenen Menge an Radioaktivität als ( $^{14}\text{C}$ )  $\text{NaHCO}_3$ . Dafür wurde die Radioaktivität von 10, 25 und 50  $\mu\text{l}$  des Reaktionspuffers in 3 ml Szintillationsflüssigkeit bestimmt. Die  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration errechnete sich als 25 mM oder 8,33 mM für die maximale bzw. *in vivo*-Aktivität.

*In vivo*-Aktivität:

20  $\mu\text{l}$  des verdünnten Enzymextrakts wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer versetzt und für genau 30 s inkubiert. Durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  2 N HCl wurde die Reaktion gestoppt. Die dadurch ablaufende Carbamylierung konnte aufgrund der kurzen Reaktionszeit von 30 s vernachlässigt werden. Die 20minütige Inkubation zur vollständigen Carbamylierung entfiel. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben beschrieben für die Bestimmung der maximalen Aktivität. Es wurden pro Probe vier Parallelbestimmungen durchgeführt.

## 2.10. Proteinbestimmung

### 2.10.1. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes „Coomasie<sup>®</sup> brilliant blue G-250“ oder „Serva<sup>®</sup>-Blue G“ an Proteine in saurer Lösung, wobei ein Komplex entsteht, dessen Extinktionskoeffizient höher ist als der des freien Farbstoffs. Der Farbttest wird durch Detergenzien, alkalische Medien und Ampholine gestört. Hochvernetzte Proteine und Proteine mit niedrigem isoelektrischen Punkt zeigen nur eine geringe Farbreaktion. 1 ml Farbmix wurde zu 50  $\mu\text{l}$  Probe (Proteingehalt zwischen 5 und 10  $\mu\text{g}$ ) gegeben und nach 10 min Inkubation bei RT die Extinktion bei 595 nm an einem Photometer (Uvikon 922A, Fa. Kontron, Mailand, Italien) gegen Luft ermittelt. Die Proteinmenge wurde anhand einer Eichgerade aus entfettetem BSA im Bereich von 0 bis 15  $\mu\text{g}$  bestimmt. Die Eichgerade wurde jeweils für frisch angesetzten Farbmix hergestellt, da das Farbreagenz sehr stabil war.

Farbmix

Lösung A	70	mg	Serva <sup>®</sup> -Blue G in 50 ml 96 % (v/v) Ethanol
Lösung B	600	ml	H <sub>2</sub> O
	100	ml	85 % (v/v) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

Lösungen A und B wurden gemischt, mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt, gut gerührt und gegebenenfalls filtriert. Der Farbmix wurde lichtgeschützt aufbewahrt.

BSA-Stammlösung: 0,3 mg/ml

### 2.10.2. Proteinbestimmung nach Lowry (1951)

Diese Methode zur Quantifizierung von Proteinmenge basiert auf der Biuret-Reaktion. Dabei bilden Peptidbindungen mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im alkalischen Medium den Biuret-Komplex, der den Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Komplex des Folinreagenz reduziert. 700  $\mu\text{l}$  Farbmix und 150  $\mu\text{l}$  verdünnten Probe wurden gemischt und exakt für 15 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1:3 (v:v) Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz in  $\text{H}_2\text{O}$ , nach der die Probe sofort kräftig geschüttelt wurde. Nach weiteren 15 min Inbubation bei RT wurde die Extinktion bei 578 nm (Uvikon 922A, Kontron) gegen Luft gemessen. Die Proteinmenge wurde anhand einer Eichgerade aus entfettetem BSA im Bereich zwischen 0 und 36  $\mu\text{g}$  bestimmt. Im Gegensatz zur Bradford-Methode muss für jede Messung eine neue Eichreihe hergestellt werden.  $\beta$ -Merkaptoethanol stört die Messung, aber nicht SDS. Um Eigenfärbung der Proben berücksichtigen zu können, wurde für jeden Ansatz ein Leerwert gemessen, bei dem das Folin-Reagenz vor der Probe zugegeben wurde.

Farbmix

Lösung A	2	% (w/v)	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ in 0,1 N NaOH
Lösung B	1	% (w/v)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
Lösung C	2	% (w/v)	Na-K-Tartrat

Vor jedem Test wurde eine frische Lösung aus 99 Teilen Lösung A und jeweils 0,5 Teilen Lösung B und C hergestellt.

### 2.11. Chlorophyllbestimmung (nach Porra *et al.* 1989)

Zur Chlorophyllbestimmung wurde die in Ethanol aufgenommene organische Phase der Chloroform-Methanol-Extraktion oder ein Aliquot der Enzymextraktionen oder der Extraktion von Chlorophyllen und Proteinen genutzt. Die Probe wurde mit 96%igem (v/v) Ethanol auf 1 ml verdünnt und die Extinktion bei 652 nm an einem Photometer (Uvikon 922A, Kontron) gegen Ethanol gemessen. Die Konzentrationen von Chlorophyllen in der Küvette in [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Chl a} = 12,25 * E_{663} - 2,55 * E_{647}$$

$$\text{Chl b} = 20,31 * E_{647} - 4,91 * E_{663}$$

$$\text{Chls a + b} = 17,76 * E_{647} + 7,34 * E_{663}$$

## 2.12. Phäophytinbestimmung (nach Vernon 1960)

Die bei der Perchlorsäureextraktion zur Phäophytinbestimmung abgenommenen Aliquots wurden 2 min bei 16.100 xg zentrifugiert und das Sediment in 1 ml Aceton sorgfältig aufgenommen. Bei 4 °C löste sich das Phäophytin über Nacht im Aceton. Der Ansatz wurde 2 min bei 16.100 xg zentrifugiert. An einem Photometer (Uvikon 922A, Kontron) wurden die Extinktionen bei 666 nm und 655 nm gegen Aceton gemessen. Der Phäophytingehalt in der Küvette berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{mg Ph.} = \frac{(6,8 * A_{666}) + (26 * A_{655})}{1000}$$

## 2.13. Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren

### 2.13.1. RNA-Isolierung

#### **Pine-Tree-Methode** (nach Chang *et al.* 1993; modifiziert)

Diese Methode ist sehr effizient für die Isolierung von RNA aus Gewebe mit hohen Gehalten an Polysacchariden und/oder Phenolen (Chang *et al.* 1993) und wurde für die Isolierung von RNA aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Columbia angewandt, die zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten durch RT-PCR verwendet werden sollte (2.14.3.). 200-400 mg Blattmaterial wurden mit einer Spatelspitze (100-400 mg) Polyclar AT in flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver gemörsert. Zu dem Blattmaterial in flüssigem N<sub>2</sub> wurde tropfenweise 1 ml 65 °C warmes Extraktionsmedium gegeben und bis zum vollständigen Auftauen der Probe weiter homogenisiert. Der Extrakt wurde quantitativ in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, das bereits 500 µl 1:1 (v/v) Phenol/CHCl<sub>3</sub> enthielt, und gründlich gevortext. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz 10 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert (5815R, Fa. Eppendorf, Hamburg). Die Oberphase wurde abgenommen und mit 500 µl 1:1 (v/v) Phenol/CHCl<sub>3</sub> gemischt, wieder gründlich gevortext und 6 min zentrifugiert. Die Oberphase wurde wiederum abgenommen und das Volumen bestimmt. Zur Fällung der RNA wurde ¼ Vol. 10 M LiCl hinzugegeben, der Ansatz gevortext und 3 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 20 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert und das meistens unsichtbare Pellet in 200-400 µl SSTE resuspendiert. Restliche Proteine wurden mit 1 Vol. CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Der Ansatz wurde gründlich gevortext und 6 min zentrifugiert. Zur Oberphase wurden 2 Vol. 99,8 % (v/v) Ethanol gegeben und die Nukleinsäure für 1-2 h bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 20 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert. Zur Entfernung überschüssiger Salze wurde das Pellet mit 300 µl 75 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach 10 min Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bei 37 °C im offenen Reaktionsgefäß getrocknet. Die RNA wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert (5 min bei 65 °C,

dann auf Eis abgekühlt). Die Qualität und Konzentration der RNA wurde durch TEA-Agarose-Gelelektrophorese eines 1 µl-Aliquots und durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt (2.13.5.).

#### Extraktionsmedium

100	mM	Tris-HCl, pH 8,0
2	% (w/v)	CTAB
2	% (w/v)	PVP K30
25	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
2	M	NaCl
0,05	% (w/v)	Spermidin

Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert und vor Gebrauch mit 10 µl β-Merkaptoethanol pro ml versetzt.

#### SSTE

10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
1	M	NaCl
0,5	% (w/v)	SDS

Der Puffer wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

### 2.13.2. Isolierung von Plasmid-DNA

#### 2.13.2.1. Mini-Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

Von potentiell positiven Kolonien (z.B. bei Plasmiden mit Blau/weiß-Selektion weiße Kolonien) auf den Transformationsplatten (2.15.7.1.) wurden einige mit sterilen Zahnstochern gepickt und in Reagenzgläser mit 3 ml LB-Medium und dem geeigneten Antibiotikum überführt. Diese wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nachdem die Bakterienkulturen gewachsen waren, wurden sie auf zwei 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße verteilt und 2 min bei 16.100 xg zentrifugiert (5415R, Fa. Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde abgenommen und jeweils eine der Doppelproben bei -20 °C eingefroren. Die Pellets der nicht eingefrorenen Proben wurden in 150 µl STEL-Puffer resuspendiert und 30 s bei 100 °C inkubiert. Dadurch erfolgte eine Lyse der Bakterienzellen („Triton boiling“). Anschließend wurden die Zelltrümmer und die genomische DNA für 20 min abzentrifugiert. Nachdem das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt worden war, wurde zum Überstand 180 µl Isopropanol gegeben und gut gemischt.

Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Es folgte eine letzte Zentrifugation für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 5 min bei 37 °C getrocknet und durch 10 min Inkubation bei 37 °C in 50 µl H<sub>2</sub>O mit 200 µg/ml RNase A gelöst.

#### STEL-Puffer

50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
50	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
8	% (w/v)	Saccharose
5	% (v/v)	Triton-X-100

Falls sich durch die Restriktionsanalyse herausstellte, dass ein Klon sequenziert werden sollte, erfolgte zusätzlich eine Mini-Plasmid-Präparation des zweiten Aliquots mit einem „Qiaprep® Spin Miniprep“ Kit (Fa. Qiagen, Hilden). Der Kit basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von einer Bindung der DNA an Kieselgel in Anwesenheit hoher Salz-Konzentrationen. Die DNA wurde mit 50 µl H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

#### 2.13.2.2. Maxi-Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

Um größere Mengen sauberer Plasmid-DNA zu erhalten, wurden 50 ml TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Bakterienkolonie (siehe 2.15.7.1.) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 UpM inkubiert. Die gewachsene Kultur wurde auf vier sterile 12,5 ml-Schraubdeckelröhrchen aufgeteilt und die Zellen 10 min bei 912 xg (5810R, Fa. Eppendorf, Hamburg) pelletiert. Zur Plasmid-Präparation diente der „E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep II“ Kit (Fa. PeqLab, Erlangen). Die DNA wurde mit 120 µl H<sub>2</sub>O (5 min bei 37 °C) in zwei Zentrifugationsschritten (erst in 80 µl, dann in 40 µl) eluiert.

#### 2.13.2.3. Mini-Plasmid-Präparation aus *Agrobacterium tumefaciens*

Um die Transformation von *A. tumefaciens* (2.15.7.2.) zu überprüfen, mussten aus diesem die Plasmide reisoliert und anschließend nochmals in *E. coli* (siehe 2.15.7.1.) vermehrt werden, da die DNA-Ausbeute aus *Agrobacterium*-Plasmid-Präparationen i.d.R. zu gering für einen Restriktionsverdau oder eine Sequenzierung ist.

Eine 5 ml-Kultur der gewünschten Kolonie in YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (siehe 2.2.2. und 2.2.3.) wurde 2 Tage bei 28 °C angezogen. 3 ml der Kultur wurden auf zwei 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße verteilt und die Zellen 2 min bei 16.100 xg sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II und 5 min Schwenken wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III hinzugefügt, durch Schwenken gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 10 min bei 16.100 xg zentrifugiert. Die obere wässrige

Phase mit der Plasmid-DNA wurde abgenommen, mit 500  $\mu$ l 1:1 (v/v) Phenol/Chloroform versetzt, 1 min gevortext und zur Phasentrennung 5 min bei 16.100 xg zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die DNA mit 2 Vol. eiskaltem 99,8 % (v/v) Ethanol und 10 min Inkubation auf Eis gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 16.100 xg wurde das DNA-Pellet 15 min bei 37 °C getrocknet und in 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert (10 min bei 37 °C). Die Plasmid-DNA wurde zur Retransformation von *E. coli* eingesetzt.

#### Lösung I

25	mM	Tris-HCl, pH 8,0
50	mM	Glukose
10	mM	Na <sub>2</sub> EDTA

#### Lösung II

0,2	M	NaOH
1	% (w/v)	SDS

#### Lösung III

3	M	KCH <sub>3</sub> COO, pH 4,8
---	---	------------------------------

Die Lösungen wurden entweder selbst angesetzt oder aus dem "Qiaprep<sup>®</sup> Spin Miniprep" Kit (Fa. Qiagen, Hilden) genommen.

### 2.13.3. Ethanolfällung von DNA oder RNA

Zur Aufkonzentrierung von Nukleinsäurelösungen wurde eine Fällung der DNA oder RNA durchgeführt. Hierzu wurden 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 6,0 und 2,5 Vol. 99,8 % (v/v) Ethanol zugegeben und die Nukleinsäuren bei -20 °C für mindestens 1 h gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 16.100 xg und 4 °C wurde das Pellet mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut 5 min abzentrifugiert, etwa 15 min bei 37 °C getrocknet und in einem geringeren Volumen H<sub>2</sub>O oder Puffer resuspendiert.

### 2.13.4. Phenol/Chloroform-Reinigung von DNA

Zur Reinigung von DNA-Lösungen von Proteinen- oder Polysacchariden wurde die Lösung mit 1 Vol. 1:1 (v/v) Phenol/Chloroform versetzt, gevortext und zur Phasentrennung für 5 min zentrifugiert. Denaturierte Proteine sammeln sich dabei an der Phasengrenze. Dieser Arbeitsschritt wurde je nach Bedarf ein- bis dreimal wiederholt. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform gründlich gemischt. Zur Phasentrennung wurde wiederum für 5 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt (2.13.3.).

### 2.13.5. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen wurden zwei Methoden verwendet. Bei beiden konnte eine Kontamination mit Polysacchariden zu einer Überschätzung der DNA- oder RNA-Menge führen. Zum einem wurde ein 1 µl-Aliquot der Lösung durch TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.17.1.) aufgetrennt und nach der Färbung mit Ethidiumbromid die DNA- bzw. rRNA-Banden in ihrer Intensität mit einer Bande des verwendeten  $\lambda$ -PstI-Markers verglichen. Aus der Größe und Intensität der betreffenden Markerbande, der Gesamtgröße des  $\lambda$ -Genoms (50 kb) und der aufgetragenen Gesamtmenge an  $\lambda$ -DNA (1 µg) konnte die DNA- bzw. RNA-Menge abgeschätzt werden.

Für eine genauere Quantifizierung wurde die Abschätzung durch die Elektrophorese mit einer photometrischen Bestimmung verglichen. Doppelproben von 1 µl Nukleinsäurelösung wurden in je 600 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und die Extinktion bei 230, 260 und 280 nm gemessen (Uvikon 922A, Fa. Kontron, Mailand, Italien). Die Quotienten der Extinktionswerte (230 nm/260 nm und 260 nm/280 nm) stellen ein Maß für die Verunreinigung der Lösung mit Polysacchariden bzw. Proteinen dar. Idealerweise sollten die Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} * 42 * V_{\text{Küvette}} * V_{\text{Aliquot}}^{-1}$$

$$\text{DNA } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} * 50 * V_{\text{Küvette}} * V_{\text{Aliquot}}^{-1}$$

Die Extinktionskoeffizienten gelten für doppelsträngige DNA und einzelsträngige RNA (Sambrook und Russel 2001).

## 2.14. DNA-Amplifikation

### 2.14.1. Ableitung von synthetischen Primern

Für die Synthese von Oligonukleotiden, die als spezifische Primer in einer PCR-Reaktion dienen, wurden bestimmte Sequenzen der zu amplifizierenden DNA nach folgenden Kriterien ausgewählt. Sie sollten aus 18-22 Nukleotiden bestehen, die letzten 6 Nukleotide (5' → 3') einen G/C-Gehalt von 50-67 % besitzen und mit einem G oder C enden. Zudem sollten die Primer, die jeweils zusammen in einer PCR eingesetzt werden, ähnliche Schmelztemperaturen haben. Dies ist die Temperatur, bei der sich die Primer von der Template-DNA ablösen. Sie kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 ^{\circ}\text{C} + 0,41 * [\%GC] - 650/n \quad (n = \text{Anzahl der Nukleotide})$$

Um eine gute Amplifikationsrate zu gewährleisten, mussten die Primer so beschaffen sein, dass sie eine geringe Tendenz zur Bildung von Sekundärstrukturen und zur Hybridisierung

miteinander besaßen. Dies wurde mit den Computerprogrammen „foldrna“ und „besfit“ des Wisconsin Package der Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA getestet. Alle verwendete Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) hergestellt.

### 2.14.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der gezielt spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* mehr als  $10^6$ -fach vermehrt werden (Mullis und Faloona 1987). Die DNA wird thermisch denaturiert und mit Primern hybridisiert, die antiparallel an die 5'-Randbereiche der zu amplifizierenden DNA-Sequenz (Template-DNA) binden. Die hitzestabile *Taq*-Polymerase katalysiert im nächsten Schritt die komplementäre Polymerisation von Nucleotiden an die freie 3'-OH-Gruppe der Primer. Bei mehrfacher Wiederholung der Reaktionsfolge kommt es exponentiell zu einer selektiven Amplifikation der DNA-Sequenz, die durch die Oligonucleotide flankiert wird. Da die eingesetzten Oligonucleotide nach einer Verlängerungsreaktion Bestandteile der neue DNA-Moleküle sind und somit als Template-DNA für die nächste Amplifikationsreaktion dienen, kann man durch modifizierte Primer z.B. Restriktionsschnittstellen in die Randbereiche der amplifizierten DNA einfügen.

Für die PCR wurden verschiedene Thermocycler mit beheizbarem Deckel verwendet (TGradient, Fa. Biometra, Göttingen; Mastercycler personal und Mastercycler gradient, Fa. Eppendorf, Hamburg).

Standardansatz (50 µl)

5	µl	10x <i>Taq</i> -Puffer
3	µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
2	µl	Template-DNA
1	µl	10 mM dNTPs
1	µl	100 pmol/µl 5'-Primer
1	µl	100 pmol/µl 3'-Primer
1	µl	<i>Taq</i> -Polymerase
36	µl	H <sub>2</sub> O

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und die Amplifikationsreaktion im Thermocycler gestartet.

10x *Taq*-Puffer

100	mM	Tris-HCl, pH 9,0
500	mM	KCl

## Standard-Programmierung

94	°C	30 s	(Denaturierung)
94	°C	30 s	(Denaturierung)
( $T_m - 3$ )	°C	30 s	(Anlagerung)
72	°C	(1 min/kb)	(Elongation)
Die Schritte 2 bis 4 wurden 29mal wiederholt			
72	°C	10 min	(terminale Elongation)

Die Amplifikationsprodukte wurden durch eine TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.17.1.) analysiert.

**2.14.3. RT-PCR**

Die Methode der Reverse-Transkriptase-PCR (Mullis und Faloona 1987) diente der Amplifikation von einem bekannten Sequenzabschnitt auf der Basis von mRNA aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.. Das hierfür notwendigen Enzym, die Reverse-Transkriptase (RT), synthetisiert auf der Basis einer RNA-Matrize einen komplementären DNA-Gegenstrang (cDNA) und besitzt keine Exonukleaseaktivität. Ein Oligo(dT)-Primer, der mit der poly(A)-Schwanz am 3'-Ende einer mRNA hybridisiert, diente als Template für die RT. 3 µg RNA und 50 pmol dT<sub>20</sub>-Primer wurden mit H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt und folgende Reagenzien hinzugegeben:

4	µl	5x RT-Puffer
1	µl	RNAse-Inhibitor
2	µl	10 mM dNTPs
1	µl	MLV-RT

Der Ansatz wurde gemischt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die gewünschte cDNA-Sequenz konnte durch eine PCR (2.14.2.) mit spezifischen Primern aus dem Ansatz amplifiziert werden (2 µl pro Reaktion).

**2.14.4. Kolonie-PCR**

Zur schnellen Untersuchung von Bakterienkolonien auf das Vorhandensein eines Plasmids mit dem gewünschten Insert kann das Prinzip der PCR auch eingesetzt werden. Gegenüber der Mini-Plasmid-Präparation (2.13.2.1.) mit anschließendem Restriktionsverdau (2.15.1.) hat diese Methode den Vorteil, dass eine hohe Zahl an Bakterienkolonien (ca. 50) einfach und sehr schnell sequenzspezifisch auf das richtige Insert durchsucht werden kann, was bei Ligationen mit geringer Insertionsrate oder bei Vektoren ohne Blau/weiß-Selektion nötig ist. Zudem kann gleichzeitig die Richtung der Insertion bestimmt werden.

Jede Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, der dann in ein mit 20 µl H<sub>2</sub>O gefülltes 0,5 ml-Reaktionsgefäß getaucht wurde. Dann wurde mit dieser Kolonie am Zahnstocher eine Übernacht-Kultur mit 3 ml LB-Medium und dem geeigneten Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Diese Kulturen konnten ggf. am nächsten Tag für eine Mini-Plasmid-Präparation verwendet werden. Die Bakterienzellen in der 20 µl Bakteriensuspension wurden durch Erhitzen auf 100 °C für 10 min zerstört und die darin enthaltenen Plasmide freigesetzt.

#### Reaktionsansatz (25 µl)

10	µl	Bakteriensuspension
2,5	µl	10x <i>Taq</i> -Puffer
1,5	µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
0,5	µl	10 mM dNTPs
0,5	µl	100 pmol/µl 5'-Primer
0,5	µl	100 pmol/µl 3'-Primer
0,5	µl	<i>Taq</i> -Polymerase
9	µl	H <sub>2</sub> O

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und die Amplifikationsreaktion in einem Thermocycler gestartet. Die Programmierung des Thermocyclers erfolgte wie in 2.14.2. beschrieben. Zur Analyse der Amplifikationsprodukte wurde anschließend eine TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.17.1.) durchgeführt.

#### 2.14.5. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977). Nach dieser Methode befinden sich im Reaktionsansatz für eine PCR-Amplifikation der zu sequenzierenden DNA neben den vier Desoxynukleotiden auch die entsprechenden Didesoxynukleotide (Terminatoren), welche bei Einbau einen Abbruch der DNA-Synthese herbeiführen. Die mit dRhodamin markierten Didesoxynukleotide („ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“, Fa. PerkinElmer, Jügesheim) ermöglichen die Fluoreszenz-Detektion (Emissionsspektren von 450-650 nm) der Kettenabbruchprodukte während einer Gelelektrophorese im Analysegerät.

#### PCR-Ansatz

200	ng	Plasmid-DNA (1:5 mol DNA/mol Primer)
2	µl	2 pmol/µl Primer
2	µl	Terminator Ready Reaction Mix
ad 10	µl	H <sub>2</sub> O

## Thermocycler-Programmierung

96	°C	10 s	(Denaturierung)
50	°C	5 s	(Anlagerung)
60	°C	4 min	(Elongation)

Dieser Zyklus wurde 25mal wiederholt.

Als Sequenzierungs-Primer dienten meist in der Nähe der Klonierungsstelle liegende Sequenzabschnitte der verwendeten Vektoren (T7- und SP6-Promotor und -Terminator, M13-forward und -reverse; 2.2.4.). Im Anschluss an die Kettenverlängerungsreaktion mussten nicht eingebaute dRhodamin-ddNTPs durch eine Ethanol-fällung entfernt werden. Dazu wurden zu 10 µl PCR-Ansatz 1 µl 1,5 M NaCH<sub>3</sub>COO, pH ≥ 8, 250 mM EDTA und 35 µl 99 % (v/v) Ethanol gegeben und gut gemischt. Die Probe wurde für 2 h auf Eis inkubiert, danach für 15 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das (i.d.R. nicht mit bloßen Auge erkennbare) Pellet wurde mit 150 µl 75 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet 1 min bei 90 °C im offenen Reaktionsgefäß getrocknet. Danach wurde es in 25-40 µl „Template Suppression Reagent“ (Fa. PerkinElmer, Jügesheim) gelöst und 2 min bei 95 °C denaturiert. Bis zur Sequenzierung wurde die Probe auf Eis aufbewahrt. Die chromatographische Auftrennung und Fluoreszenz-Detektion der Kettenverlängerungs-Produkte erfolgte in einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PerkinElmer). Die Auswertbarkeit der Chromatogramme (Leseweite) lag bei etwa 400-500 bp. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit denen von bereits bekannten DNA-Fragmenten verglichen.

## 2.15. Klonierungsmethoden

### 2.15.1. Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Die sequenzspezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA durch Restriktionsenzyme diente dazu, Vektoren für die Aufnahme eines Inserts zu linearisieren, ein Insert aus einem Plasmid herauszuschneiden, die Enden von Insert und/oder Vektor für eine Ligation vorzubereiten, unerwünschte Sequenzabschnitte aus Plasmiden zu entfernen, sowie dazu, ein Plasmid zu schneiden, um die Richtigkeit einer Klonierung zu überprüfen (2.15.4.) oder eine Restriktionskarte einer DNA-Sequenz herzustellen oder zu überprüfen. Je nach Enzym entstehen bei der Spaltung 3'- oder 5'-überhängende („sticky“) oder glatte („blunt“) DNA-Enden.

## Standardansatz

50-500	ng	Plasmid-DNA
2	µl	10x Reaktionspuffer für das Enzym
0,5	µl	10 U/µl Restriktionsenzym
ad 20	µl	H <sub>2</sub> O

Der Restriktionsansatz wurde 1 h bei der optimalen Temperatur des jeweiligen Enzyms (i.d.R. 37 °C) inkubiert und anschließend durch Analyse eines 10 µl-Aliquots in einem Agarosegel überprüft (2.17.1.). Bei Doppelspaltungen wurde der nach Angabe des Herstellers für beide Enzyme am besten geeignete Puffer ausgewählt. Um unspezifische Reaktionen durch zu hohe Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz zu vermeiden, lag das eingesetzte Volumen an Restriktionsenzymen unter 10 % des gesamten Reaktionsvolumens. Sollten größere DNA-Mengen quantitativ verdaut werden, wurden entsprechend alle Komponenten des Ansatzes im gleichen Verhältnis zueinander in größeren Mengen eingesetzt und der Ansatz 2-4 h bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

**2.15.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Trennung eines bestimmten DNA-Fragments von anderen im Versuchsansatz vorhandenen DNA-Fragmenten, die nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR entstanden waren, wurde die DNA zuerst durch eine präparative TEA-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.17.1.). Die Geltaschen wurden so erstellt, dass sie das Auftragen von bis zu 50 µl Probenvolumen erlaubten. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 40-60 V. Die gesuchte DNA-Bande wurde dann unter langwelligen (366 nm) UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA von der Agarose und dem gebundenen Ethidiumbromid unter Verwendung des MinElute Gel Extraction Kits (Fa. Qiagen, Hilden) getrennt. Nach dem Schmelzen der Agarose bei 50 °C in einem Puffer mit einem chaotropen Salz wurde die DNA selektiv bei hohen Salzkonzentrationen an Kieselgel-Partikel gebunden. Schließlich wurde die DNA mit 12 µl H<sub>2</sub>O eluiert und durch TEA-Agarose-Gelelektrophorese von 1 µl Eluat quantifiziert (2.17.1.).

**2.15.3. Auffüllen von überstehenden 5'-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten (2.15.4.) mit nicht-komplementären überstehenden 5'-Enden war es in einigen Fällen nötig, die Enden in glatte Enden umzuwandeln. Dazu wurde eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase durchgeführt. Das Klenow-Fragment ist das große Fragment eines proteolytischen Verdau der *E. coli* DNA-Polymerase I mit Subtilisin und wird verwendet, weil sie keine 5' → 3' Exonukleaseaktivität besitzt.

## Reaktionsansatz

2	µg	gereinigte DNA
4	µl	10 mM dNTPs
4	µl	10x Klenow-Fragment-Puffer
1	µl	Klenow-Fragment (2 U/µl)
ad 40	µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für maximale 20 min, um zu vermeiden, dass das Klenow-Fragment nach Verbrauch des freien dNTPs mit 3'→5' Exonukleaseaktivität auf die DNA wirkt. Die DNA wurde durch Gelelektion gereinigt (2.15.2.).

**2.15.4. Ligation von DNA-Moleküle**

Mit der DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 können lineare doppelsträngige DNA-Moleküle miteinander verknüpft werden, wenn die Enden entweder beide überstehend („*sticky*“) und zueinander komplementär oder beide glatt („*blunt*“) sind. Außerdem muss zumindest eine freie 5' Phosphatgruppe an einem Doppelstrangende und eine freie 3'Hydroxygruppe am anderen vorhanden sein. Die Ligation wurde benutzt, um PCR-Produkte (2.14.2.) oder durch Restriktionsverdau (2.15.1.) aus einem DNA-Molekül ausgeschnittene Fragmente (Inserts) in einen linearisierten Vektor einzufügen. In der Regel wurden sowohl das Insert als auch der Vektor zuvor durch eine Gelelektion (2.15.2.) gereinigt. PCR-Produkte wurden in den Klonierungsvektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy durch eine sogenannte T/A-Klonierung hinein ligiert. Der fertig linearisierte Vektor besitzt an seinen freien 3' Enden überhängende Thymidine, die mit den an den 3' Enden überhängenden Adenine der PCR-Produkte, die von der *Taq*-Polymerase erzeugt werden, ligiert werden können.

## Standardansatz

30	ng	Vektor
300	ng	Insert-DNA
0,5	µl	10x Y <sup>+</sup> Tango-Puffer
1	µl	T4-DNA-Ligase
1	µl	1 mM DTT
1	µl	10 mM ATP
ad 10	µl	H <sub>2</sub> O

Das molare Verhältnis Vektor zu Insert sollte dabei ca. 1:50 betragen. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 15 °C. 5 µl des Ansatzes wurden für die Transformation von *E. coli*-Zellen (2.15.7.1.) verwendet, der Rest wurde für eine mögliche zweite Transformation bei -20 °C gelagert.

### 2.15.5. Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

(nach Inoue *et al.* 1990; modifiziert)

Für die Transformation von *E. coli*-Zellen sollten sie zuerst für die Aufnahme des Plasmides vorbereitet (kompetent gemacht) werden. Die hier beschriebene Methode lieferte hochkompetente Zellen, die für die Transformation mit Ligationsprodukte mit geringer Insertionsrate geeignet waren.

Für die ganze Prozedur wurden nur sterile Glasgefäße verwendet, die zuerst mit H<sub>2</sub>O gefüllt autoklaviert wurden, um eventuelle Spuren von Detergenzien zu beseitigen. 5 ml SOC-Medium wurden in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5 $\alpha$  angeimpft und ca. 8 h bei 37 °C und 250 UpM geschüttelt. Mit 10  $\mu$ l dieser Vorkultur wurden weitere 5 ml SOC-Medium angeimpft und bei 37 °C und 250 UpM über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden 300 ml SOC-Medium in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit der gesamten Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 250 UpM geschüttelt, bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,25 gegen SOC erreicht hatte, und dann bei 18 °C und 250 UpM weiter inkubiert, bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 erreicht hatte. Die Bakterienkultur wurde dann auf sechs 50 ml-Röhrchen verteilt und 10 min bei 912 xg und 4 °C abzentrifugiert (5810R, Fa. Eppendorf, Hamburg). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten im Kühlraum bei 4 °C, und die Zellen wurden ständig auf Eis gehalten. Die Bakterienpellets wurden in je 15 ml kaltem Transformationspuffer vorsichtig resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 30 ml Suspension in einem 50 ml-Röhrchen vereinigt und die Zellen wiederum 10 min bei 912 xg und 4 °C pelletiert. Beide Pellets wurden wieder in je 15 ml Transformationspuffer resuspendiert und 525  $\mu$ l DMSO wurden langsam unter stetigem Mischen zu jeder Suspension gegeben. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden nochmals 525  $\mu$ l DMSO zu jeder Suspension gegeben. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis wurden die Bakteriensuspensionen in 200  $\mu$ l-Portionen aliquotiert und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80 °C. Frisch hergestellte kompetente Zellen wurden jeweils durch Transformation (2.15.7.1.) mit 1  $\mu$ l Plasmid-DNA oder 1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O auf ihre Transformationsrate und auf Kontamination mit Antibiotikum-resistenten Bakterien getestet.

Transformationspuffer

10	mM	PIPES, pH 6,7
15	mM	CaCl <sub>2</sub>
250	mM	KCl
55	mM	MnCl <sub>2</sub>

Vor der Zugabe von MnCl<sub>2</sub> wurde die Lösung mit 1 M KOH auf pH 6,7 eingestellt. Die Pufferlösung wurde für 20 min autoklaviert.

### 2.15.6. Herstellung chemisch kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Zur Präparation von kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen wurden 5 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie von *A. tumefaciens* LBA4404 angeimpft und ca. 20 h bei 28 °C und 250 UpM geschüttelt. Am darauf folgenden Tag wurden 100 ml YEB-Medium + Antibiotika in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit der gesamten Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bei 28 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 gegen YEB-Medium + Antibiotika inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann auf 50 ml-Röhrchen verteilt und für 15 min auf Eis abgekühlt. Ab diesem Arbeitsschritt wurden die Zellen ständig auf Eis gehalten. Die Zellen wurden 10 min bei 912 xg und 4 °C (5810R, Fa. Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Sedimente in jeweils 10 ml eiskaltem 150 mM NaCl vorsichtig resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellsedimente in jeweils 1 ml eiskaltem 75 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und in 200 µl-Aliquots in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Eine Lagerung bei -80 °C ermöglichte die Nutzung der Zellen über mehrere Wochen.

### 2.15.7. Transformationsmethoden

#### 2.15.7.1. Transformation von *Escherichia coli*

Zur Vermehrung und Analyse eines rekombinanten Plasmids wurden *E. coli*-Zellen mit diesem zunächst transformiert. 200 µl kompetenter Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5 µl Ligationsansatz (2.15.4.) oder 0,5-1 µl Plasmid-Präparation (2.13.2.) zugegeben, gemischt und 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 s beendet. Der Ansatz wurde zurück auf Eis gestellt und dann mit 800 µl SOC-Medium (2.2.7.) gemischt. Danach wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C inkubiert, damit die Antibiotikumresistenzgene auf den Plasmiden exprimiert werden konnten. Die Zellen wurden in Aliquots (z.B. 200 und 800 µl) auf LB-Agar-Platten mit dem geeignetem Antibiotikum (2.2.3.) ausgestrichen. Die Platten wurden dann bei 37 °C über Nacht inkubiert, so dass die transformierten Zellen Kolonien bilden konnten. Die Vektoren pGEM<sup>®</sup>-T Easy, pSPORT1 und pCAMBIA 1200 ermöglichten eine Blau/weiß-Selektion (Sambrook und Russel 2001): die Klonierungsstelle liegt im *lacZ*-Gen, das das α-Peptid des Enzyms β-Galactosidase kodiert. Durch Inkubation mit Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) wird der *lacZ*-Promotor induziert und β-Galactosidase gebildet. Die Bakterien sind nun in der Lage, aus dem im Medium enthaltenen synthetischen Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) einen blauen Farbstoff freizusetzen. Bakterienzellen, die bei der Transformation einen leeren Vektor enthalten haben, erscheinen dadurch blau. Bei einer gelungenen Ligation wird das *lacZ*-Gen durch das Insert unterbrochen und die β-

Galactosidase somit nicht gebildet. Positive Transformanten bilden daher weiße Kolonien. Zur Blau/weiß-Selektion wurden die LB-Platten mit IPTG und X-Gal supplementiert (2.2.8.).

#### **2.15.7.2. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens***

200 µl kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurden zur Vermeidung von Eiskristallbildung in der Hand aufgetaut und sofort auf Eis abgekühlt. 1 µg Plasmid-DNA wurde zu den kompetenten Zellen gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und anschließend für 5 min bei 37 °C aufgetaut. Der Ansatz wurde abgekühlt, mit 800 µl YEB-Medium (2.2.7.) gemischt und zur Expression des/der Resistenzgen(e) in einem 15 ml-Röhrchen 3 h bei 28 °C und 250 UpM geschüttelt. Anschließend wurden Aliquots à 10, 100 und 890 µl auf Selektionsmedium (YEB-Agar + Antibiotika) ausplattiert und zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

#### **2.16. Transformation von *Nicotiana tabacum* L.**

Die stabile Transformation von *N. tabacum* L. wurde über *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer durchgeführt und erfolgte nach der Blattscheiben-Methode (Horsch *et al.* 1985; modifiziert). 2,5 ml einer Kultur von zuvor mit einem binären Plasmid transformierten *A. tumefaciens* in YEB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum wurden für 5 min bei 698 xg abzentrifugiert und in 50 ml YEB-Medium resuspendiert. Blätter von steril angezogenen Tabakpflanzen wurden in 1-2 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und für 2-3 min in der Bakteriensuspension inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke dreimal in sterilem Leitungswasser abgespült und auf sterilem Whatmann-Papier abgetropft, um überschüssige Bakteriensuspension zu entfernen. Die fertigen Blattstücke wurden mit der Blattunterseite nach unten auf 2MS-Agar-Medium gelegt und 2 Tage im Dunkeln bei 22 °C inkubiert. Während dieser Co-Kultivierung konnten die *Agrobacterien* ihre T-DNA in die Pflanzenzellen transferieren, so dass die Fremd-DNA sich stabil ins Pflanzengenom integrieren konnte. Nach dieser Phase wurden die Blattstücke auf SHI-Medium mit Antibiotikum überführt und in einem Klimaschrank mit einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16 h/8 h und bei 25 °C inkubiert. Die Hormone des Mediums induzieren die Bildung von Kallusgewebe, aus dem sich Sprosse regenerieren können. Die dem SHI-Medium beigefügten Antibiotika dienen zum einem dem Abtöten von *Agrobakterien* (Cefotaxim) und zum anderen der Selektion transgener Pflanzenzellen. Das Umlegen der Blattstücke auf frisches SHI-Medium mit Antibiotikum wurde in den ersten drei Wochen wöchentlich und anschließend 14-tägig bis zur Ausbildung von Sprossen wiederholt. Die Spitzen von regenerierten Sprossen wurden zur Bewurzelung auf hormonfreies 2MS-Agar-Medium mit Cefotaxim und Selektionsantibiotikum umgesetzt.

SHI-Medium: steriles 2MS-Agar-Medium, 1 µg/ml BAP, 0,2 µg/ml NAA, 500 µg/ml Cefotaxim

Stammlösungen: 0,4 mg/ml 6-Benzylaminopurin (BAP) in 99,8 % (v/v) Ethanol; 1 mg/ml  $\alpha$ -Naphthyllessigsäure (NAA) in DMSO; 250 mg/ml Cefotaxim. BAP- und Cefotaxim-Lösungen wurden sterilfiltriert.

## 2.17. Gelelektrophoretische Trennmethode

### 2.17.1. TEA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA oder RNA durch TEA-Agarose-Gelelektrophorese diente zur Quantifizierung (2.13.5.) und Reinheitsüberprüfung, Fragment-Größenbestimmung, Kontrolle von Restriktionsverdau (2.15.1.), Detektion von PCR-Produkte (2.14.2.) und zur gezielten Isolierung bestimmter Fragmente (2.15.2.). Die Gele bestanden aus 1 % (w/v) Agarose in 1x TEA-Puffer und 0,1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid zur Färbung der Nukleinsäuren. Vor der Zugabe von Ethidiumbromid wurde die Agarose durch Aufkochen geschmolzen und bis zum Gießen der Gele bei 60 °C aufbewahrt. Für die Gelelektrophorese von RNA wurden die Gelkammer und Gießvorrichtung 1 h in 1 % (w/v) SDS eingelegt, um RNAasen zu inaktivieren. Vor dem Probenauftrag wurde den Proben jeweils 0,2 Vol. „loading dye“ zugesetzt. Als Größenstandard diente mit *Pst*I verdaute  $\lambda$ -DNA. Die Elektrophorese erfolge bei 70 V in 1x TEA-Puffer. Alternativ wurden die Gele ohne Ethidiumbromid gefahren und nach dem Lauf für 5-15 min in 2  $\mu$ g/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt und ebenso lange in H<sub>2</sub>O entfärbt. Die DNA-Banden konnten dann auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und photographiert werden (FLX-20M, Fa. Vilber Lourmat, Marne La-Vallet, Frankreich).

50x TEA-Puffer

2	M	Tris/Acetat, pH 8,3
100	mM	Na <sub>2</sub> EDTA

„loading dye“

10	mM	NaPO <sub>4</sub> , pH 7,0
50	% (v/v)	Glycerin
0,4	% (w/v)	Orange G

### 2.17.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) werden Proteine durch die Bindung von SDS denaturiert und mit einer einheitlich negativen Oberflächenladung versehen. Dies erlaubt eine elektrophoretische Auftrennung, bei der die Wanderungsgeschwindigkeit nur durch das Molekulargewicht und nicht die Tertiärstruktur oder Eigenladung der Proteine bestimmt wird. Die Proteinproben wurden zunächst mit Probenpuffer mindestens im Verhältnis 1:2 versetzt. Durch Aufkochen für 5 min bei 95 °C wurden die Proteine denaturiert.

## Probenpuffer

15	mM	Tris-HCl, pH 6,8
5	% (w/v)	SDS
2	% (v/v)	β-Mercaptoethanol
20	% (v/v)	Glycerin
0,01	% (v/v)	Bromphenolblau

**2.17.2.1. Zusammensetzung der Gele und Elektrophorese**

Die Polyacrylamidgele enthielten 8 bis 12 % (w/v) Acrylamid im Trenngel und 5 % (w/v) im Sammelgel, die Dicke der Gele betrug 0,75 mm, die Länge des Sammelgels betrug ca. 0,8 cm und die Länge des Trenngels 5,4 cm. Sie wurden in Mini Protean III-Kammern (Fa. BioRad, München) gegossen.

Zusammensetzung der Gele:

## Sammelgel (5 % T)

0,125 M	Tris-HCl, pH 6,8
0,1 % (w/v)	SDS
4,87 % (w/v)	Acrylamid
0,13 % (w/v)	N,N-Methylenbisacrylamid
0,05 % (w/v)	APS
0,1 % (v/v)	TEMED

## Trenngel (12 % T)

0,375 M	Tris-HCl, pH 8,8
0,1 % (w/v)	SDS
11,68 % (w/v)	Acrylamid
0,32 % (w/v)	N,N-Methylenbisacrylamid
0,05 % (w/v)	APS
0,05 % (v/v)	TEMED

## Stammlösungen:

Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,4 % (w/v)	SDS
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4 % (w/v)	SDS
Acrylamid	29,2 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	N,N-Methylenbisacrylamid
APS	10 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat

TEMED	100	%	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
-------	-----	---	----------------------------------

Es wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit H<sub>2</sub>O-gesättigtem Isobutanol überschichtet, um Luftblasenbildung zu verhindern und eine gerade Geloberfläche zu erzeugen. Nach der Auspolymerisation (ca. 30 min) wurde das Isobutanol mit H<sub>2</sub>O entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Polymerisationsdauer betrug ebenfalls etwa 30 min. Im Anschluss daran wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und diese mit Laufpuffer befüllt. Pro Geltasche konnten bis zu 20 µl Probe auf das Gel geladen werden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 18 min bei 100 V (ca. 15 mA pro Gel), dann für weitere ca. 40 min bei 200 V (ca. 25 mA pro Gel) bis der Bromphenolblau-Marker das Ende des Trenngels erreichte. Spannung und Leistung des Spannungsgerätes (Consort E 865, Fa. Scie-Plas, Southam, England) wurden dabei auf die maximalen Werte eingestellt. Zur Größenbestimmung wurde ein „Protein Molecular Weight Marker“ (Fa. MBI-Fermentas, Vilnius, Litauen) mit Markerproteinen von 14,4-116 kDa verwendet.

#### Laufpuffer

50	mM	Tris-HCl
380	mM	Glycin
0,1	% (w/v)	SDS

#### Größenstandard

116	kDa	β-Galactosidase
66,2	kDa	BSA
45	kDa	Ovalbumin
35	kDa	Laktatdehydrogenase
25	kDa	RE Bsp98I
18,4	kDa	β-Lactoglobulin
14,4	kDa	Lysozym

Die im Gel aufgetrennten Proteine konnten durch Coomassie angefärbt (2.17.2.2.) oder zur immunologischen Detektion auf eine Nitrozellulosemembran geblotet werden (2.18.1.).

#### 2.17.2.2. Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung dient zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen, bei denen die aufgetragene Proteinmenge ca. 2-20 µg beträgt. Hierzu wurde das Gel für mindestens 30 min in Färbelösung fixiert und angefärbt. Anschließend wurde das Gel mehrmals für 15 min in Entfärber inkubiert, bis der Gelhintergrund nahezu farblos war. Das entfärbte Gel konnte dann für lange Zeit in H<sub>2</sub>O gelagert werden.

## Färbelösung

40	% (v/v)	Methanol
10	% (v/v)	Essigsäure
0,25	% (w/v)	Coomassie® brilliant blue G-250

## Entfärber

50	% (v/v)	Methanol
10	% (v/v)	Essigsäure

**2.18. Immunologische Untersuchungen****2.18.1. „Western blot-Analyse“****2.18.1.1. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran**

Beim „Western blot“ wird ein einzelnes Protein spezifisch in einem Gemisch nachgewiesen, das zuvor elektrophoretisch aufgetrennt und zur Fixierung auf eine Membran übertragen wurde. Der Nachweis erfolgt durch die Bindung von spezifischen Antikörpern an das Protein. Die Protein-Proben wurden zuerst durch eine SDS-PAGE (2.17.2.) aufgetrennt, danach wurde das Sammelgel abgeschnitten und das Trenngel in die „Western blot-Apparatur“ eingespannt. Sowohl die SDS-PAGE als auch das Bloten erfolgten dabei in einer Mini Protean III-Kammern (Fa. BioRad, München). In einer Spannhalterung wurden in der Reihenfolge, die in der Blotkammer später der Flussrichtung von der Kathode (-) zur Anode (+) entsprach, ein Tuch, ein Filterpapier, das Gel, eine entsprechend zugeschnittene Nitrozellulosemembran (Hybond, Fa. Amersham, Freiburg), ein weiteres Filterpapier und noch ein Tuch übereinander gelegt. Die Halterung wurde geschlossen und in die Blotkammer gesteckt. Filter und Nitrozellulosemembran waren vorher mit Transferpuffer angefeuchtet worden und der gesamte Aufbau erfolgte in Transferpuffer, um Luftblasen zwischen den Schichten zu vermeiden. Der Transfer erfolgte bei 4 °C in der mit Transferpuffer gefüllten Kammer für 1 h bei 100 V (ca. 190 mA) (Consort E 865, Fa. Scie-Plas, Southam, England). Zur Kühlung wurde außerdem in die Kammer ein eiskaltes Kühlaggregat gestellt.

## Transferpuffer

25	mM	Tris (pH nicht eingestellt)
192	mM	Glycin
20	% (v/v)	Methanol

Zur Überprüfung des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran anschließend in Ponceau-Rot-Färbelösung angefärbt. Diese fixiert gleichzeitig die Proteine. Dazu wurde die Membran 2 min in die Färbelösung gelegt und dann 3-4mal mit H<sub>2</sub>O gespült, bis die Proteine als rote

Banden sichtbar waren. Die Größenstandard-Banden wurden mit einem Bleistift markiert. Die Ponceau-Färbung ist reversibel und durch weiteres Spülen mit H<sub>2</sub>O wurde die Membran weitestgehend wieder entfärbt. Letzte Reste von Ponceau-Rot verschwanden dann während den nachfolgenden Inkubationen.

#### Ponceau-Rot Färbelösung

2	% (w/v)	Ponceau S
3	% (w/v)	Trichloressigsäure

#### 2.18.1.2. Antikörperreaktion

Als nächstes wurde die Nitrozellulosemembran für mindestens 2 h bei RT in Blockpuffer auf einem Kippschüttler (Duomax 1030, Fa. Heidolph, Schwabach) inkubiert, um überschüssige Bindungsstellen abzusättigen. Alternativ wurde die Membran über Nacht bei 4 °C ohne Schütteln inkubiert. Erst danach wurde die Membran 1 h bei RT mit proteinspezifischem (primärem) Antikörper inkubiert. Zur Verringerung von Hintergrundsignalen erfolgte diese Inkubation in frischem 1,5 % (w/v) BSA in TBS; der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Anschließend wurde die Membran einmal kurz und viermal für 10 min in TBS-T gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundene IgG-Moleküle zu entfernen. Als sekundärer Antikörper diente an Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1:10.000 in frischem 1,5 % (w/v) BSA in TBS verdünnt. Alternativ wurde als sekundärer Antikörper an alkalische Phosphatase gekoppelter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege (Sigma-Aldrich) verwendet. Auch diese Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Danach wurde nochmals einmal kurz und viermal für 10 min mit TBS-T und schließlich einmal für 10 min mit TBS gewaschen.

#### TBS

50	mM	Tris-HCl, pH 7,5
150	mM	NaCl

#### TBS-T

0,1	% (v/v)	Triton X-100 in TBS
-----	---------	------------------------

#### Blockpuffer

3	% (w/v)	BSA in TBS-T
---	---------	-----------------

### 2.18.1.3. Peroxidase-Nachweis über „Enhanced Chemiluminescence“

Der Nachweis des primären Antikörpers und damit des gesuchten Proteins erfolgte über die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase. Sie katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol durch  $H_2O_2$ , wodurch Luminol zur Lichtemission angeregt wurde. Verstärkt wird diese Reaktion durch Phenole. Die Halbwertszeit der Reaktion beträgt ca. 1 h. Diese Methode wird als „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) bezeichnet. Die Lichtemission kann schließlich mit einem Blaulicht-empfindlichen Film detektiert werden.

Die Nitrozellulosemembran wurde mit der Proteinseite nach oben auf eine Frischhaltefolie gelegt und mit frisch zusammengemischter ECL-1- und ECL-2-Lösung (1:1) (Fa. Amersham, Freiburg) bedeckt. Nach 1 min wurde die Flüssigkeit durch Abgießen und seitliches Absaugen mit Zellstoff wieder entfernt und die Membran luftblasenfrei mit Haushaltfolie bedeckt. Anschließend wurde ein Chemilumineszenz-Film (Hyperfilm™ ECL, Fa. Amersham) sofort für 1 min aufgelegt. Je nach der Signalstärke auf diesem Film wurden ein oder mehrere weitere Filme mit angepassten Expositionszeiten von 10 s bis zu 1 h aufgelegt. Die Filmentwicklung erfolgte in einem Optimax (Fa. Protec, Oberstenfeld).

### 2.18.1.4. Alkalische Phosphatase-Nachweis

Alternativ erfolgte der Nachweis des primären Antikörpers und damit des gesuchten Proteins über die an den sekundären Antikörper gebundene alkalische Phosphatase. In diesem Fall wurde die Nitrozellulosemembran mit der Proteinseite nach oben für 5 min in 30 ml Färbelösung inkubiert. Nach Abgießen der Pufferlösung wurde die Membran mit 33  $\mu$ l BCIP-Stocklösung, 66  $\mu$ l NBT-Stocklösung und 10 ml Färbelösung bedeckt. Die Reaktion fand je nach Intensität für 5 bis 60 min im Dunkeln statt. Die Membran wurde dann mit  $H_2O$  gewaschen und zwischen Filterpapier getrocknet.

#### Färbelösung

100	mM	Tris-HCl, pH 9,5
100	mM	NaCl
5	mM	MgCl <sub>2</sub>
5	mM	CaCl <sub>2</sub>

#### BCIP-Stocklösung

50	mg	BCIP
1	ml	100 % (v/v) NN'Dimethylformamid

#### NBT-Stocklösung

50	mg	NBT
1	ml	70 % (v/v) NN'Dimethylformamid

### 2.19. Histochemischer GUS-Test

Das Reportergen für die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) aus *E. coli* ermöglicht es, die Aktivität und Gewebespezifität von Promotoren innerhalb eines Pflanzensystems zu untersuchen. Dazu wird zunächst eine Pflanze mit einem Konstrukt, bei dem GUS unter Kontrolle des zu untersuchenden Promotors steht, transformiert. Nach Regeneration transgener Pflanzen kann dann in Teilen oder auch ganzen Pflanzen die Lokalisation der Promotoraktivität bestimmt werden. Die  $\beta$ -Glucuronidase hydrolysiert das synthetische Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure (X-Gluc) in Glucuronsäure und einen Indoxylrest, der dimerisiert und spontan zu einem unlöslichen indigoblauen Farbstoff oxidiert wird. Pflanzenteile, in denen der Promotor aktiv ist, färben sich daher blau. Die Oxidation des dimerisierten Indoxyls wird durch die Zugabe von Ferricyanat/Ferrocyanat beschleunigt. Ferricyanat/Ferrocyanat verhindert damit die Diffusion des löslichen dimerisierten Indoxyls und sorgt dafür, dass GUS-Färbung wirklich nur in den *GUS*-exprimierenden Zellen auftritt. Zur histochemischen GUS-Färbung wurde das zu untersuchende Pflanzenmaterial in Reaktionspuffer mit 1 mM X-Gluc; 3 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  und 3 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  vollständig getaucht und 30 min durch Vakuum infiltriert. Danach wurde die Probe bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, um das lichtempfindliche X-Gluc zu schützen. Je nach Promotoraktivität wurde die Reaktion nach mehreren Stunden oder nach ein oder zwei Tagen gestoppt. Dafür wurde die Reaktionslösung entfernt und die Probe mit Fixativ bedeckt und 1 h inkubiert. Zur besseren Visualisierung der Färbung wurden die pflanzlichen Farbstoffe (v.a. Chlorophyll) aus dem Gewebe extrahiert. Dies geschah durch eine Inkubation der Probe für 30 min in 70 % (v/v) Ethanol, gefolgt von einer Inkubation für 30 min in 80 % (v/v) Ethanol und einer Inkubation über Nacht in 99,8 % (v/v) Ethanol. Am nächsten Tag wurde das Material wieder schrittweise in 70 % (v/v) Ethanol überführt und darin für lange Zeit gelagert.

#### Reaktionspuffer

50	mM	$Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$
1	mM	$Na_2$ -EDTA
0,1	% (v/v)	Tween20

#### Fixativ

50	% (v/v)	Ethanol
10	% (v/v)	Essigsäure
5	% (v/v)	Formaldehyd

X-Gluc-Stammlösung: 100 mM X-Gluc in N,N-Dimethylformamid

Die Lösung wurde bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Überexpression des Genes für das P-Protein in verschiedenen Zelltypen von Tabakblättern

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aktivität der Glycinecarboxylase (GDC) in Blättern zu erhöhen. Zu diesem Zweck war bereits versucht worden, verschiedene Untereinheiten der GDC in Tabak zu überexprimieren, nämlich das H- und das T-Protein (Laubner 1999). Die Überexpression war gelungen, hatte aber nicht zu einer Steigerung der GDC-Aktivität geführt. Deshalb sollte in dieser Arbeit versucht werden, das Gen für das P-Protein zu überexprimieren, in der Hoffnung, dass die Menge an P-Protein einen limitierenden Faktor für die GDC-Aktivität darstellte. Falls dies nicht der Fall sein sollte, war geplant, die transgenen Pflanzen mit Pflanzen zu kreuzen, die die Gene des H- bzw. T-Proteins überexprimieren. Daher wurden die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte mit einer Hygromycin-Resistenz bestückt. Eine Überexpression des P-Proteins war schon mehrmals erfolglos versucht worden (M. Laubner, H. Bauwe und D. Heineke, persönliche Mitteilung; H. Bauwe, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit verschiedene Ansätze zur Überexpression unternommen werden, erstens unter Verwendung eines blattspezifischen Promotors, zweitens mit einem mesophyllspezifischen Promotor und mit einem Bündelscheidenspezifischen Promotor. Falls die Überexpression in den leitbündelnahen Zellen oder in allen Chloroplasten-haltigen Zellen tatsächlich eine Zunahme der GDC-Aktivität bewirken sollte, bestünde die Möglichkeit, in den transgenen Pflanzen mittels eines Antisense-Konstrukts die Expression des P-Proteingens im Mesophyll zu reprimieren und damit in Tabak den  $C_3/C_4$ -intermediären Stoffwechsel nachzuahmen.

##### 3.1.1. Herstellung der Plasmide zur Pflanzentransformation

Die cDNA des P-Proteins der GDC aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Columbia wurde in verschiedenen Zelltypen von Tabakblättern (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) exprimiert. Dazu wurden Promotoren mit verschiedenen Gewebespezifitäten verwendet. Für die Expression in Chloroplasten-haltigen Zellen wurde der Promotor des Genes *StLS1*, das eine Komponente des Photosystems II von *Solanum tuberosum* kodiert (Stockhaus *et al.* 1987; Accession N° X04753), verwendet. Für die Expression in Mesophyll-Zellen wurde ein 2,3 kb-Promotor-Fragment des Genes *FpGDCsP-D*, das das P-Protein der GDC in *Flaveria pringlei* kodiert (Chu 1996), verwendet. Beide Promotoren wurden eingesetzt, um ein möglichst hohes Expressionsniveau in Blättern zu erzielen. Für die Expression in leitbündelnahen Zellen wurde der Promotor des Gens *FaGDCsP-A*, das das P-Protein der GDC in *Flaveria anomala* kodiert (Chu 1996; Qu und Bauwe 1998), verwendet. Die Herstellung der Konstrukte ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

### 3.1.1.1. Klonierung des Poly-A-Signals in pCAMBIA 1200

Das 35S-PolyA-Signal wurde über *Sall*-*PstI*-Schnittstellen aus pRT105 (Töpfer *et al.* 1993) herausgeschnitten und in pCAMBIA1200 (Cambia, Canberra, Australien; Accession N° AF234292) kloniert. Das auf dieser Weise entstandenes Plasmid wurde pCAMBIApA genannt.

### 3.1.1.2. Klonierung der Promotoren

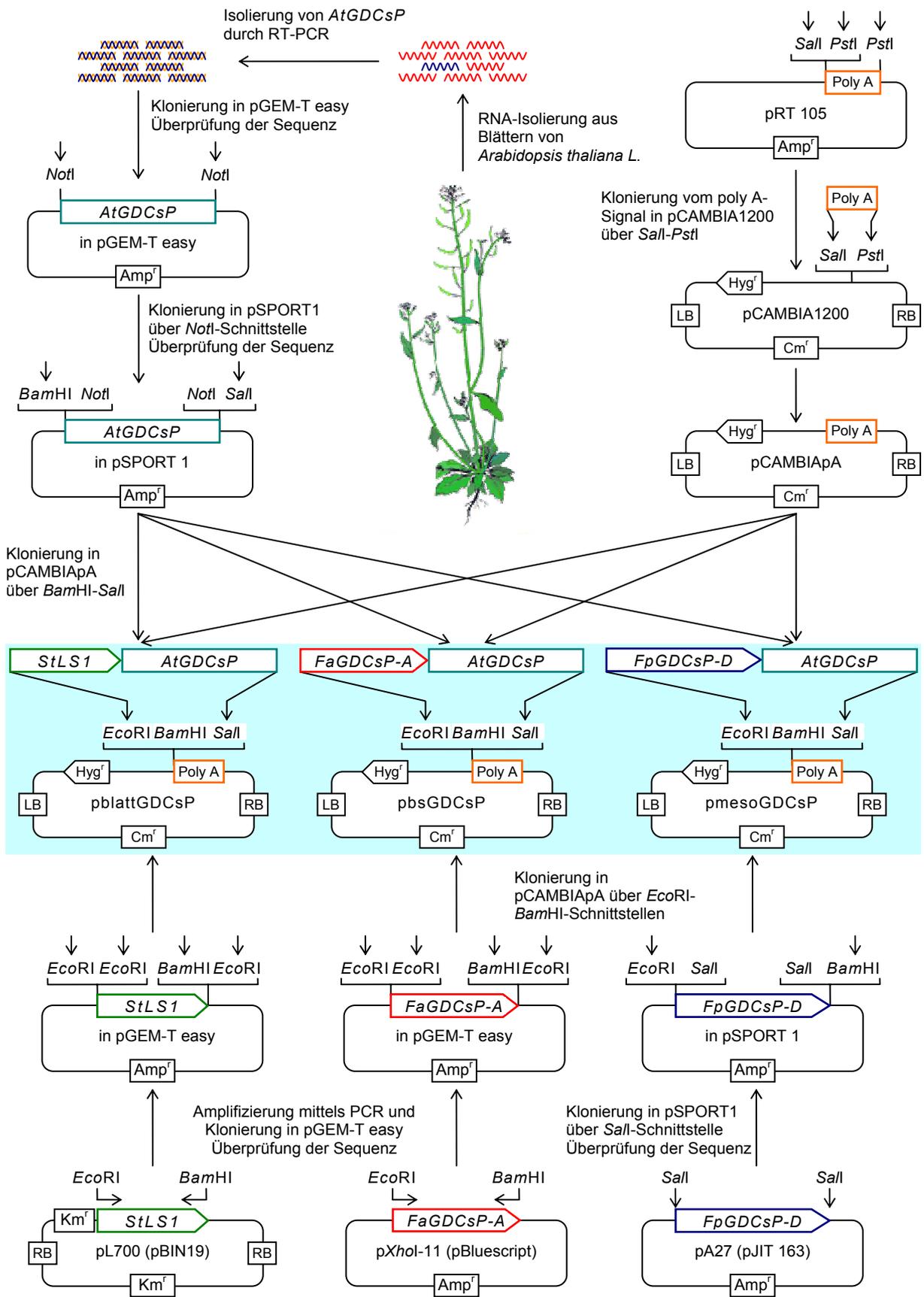
Der Promotor des Genes *StLS1* wurde aus dem auf pBIN19 basierten Plasmid pL700 (Stockhaus *et al.* 1987) mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden spezifischen Primer von der Promotorsequenz in der NCBI-Datenbank (Accession N° X04753) abgeleitet. Der 5' -Primer enthielt am 5'-Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle und der 3'-Primer am 5'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle. Der amplifizierte Promotor mit den angehängten Restriktionsschnittstellen wurde in pGEM-T® Easy (Fa. Promega, Madison, USA) kloniert.

Der Promotor des Gens *FaGDCsP-A* wurde mittels PCR aus dem Plasmid pXhoI-11 (H. Bauwe, unveröffentlicht) amplifiziert. Dafür wurden spezifische Primer von der entsprechenden Sequenz in der NCBI-Datenbank (Accession N° Z99762) abgeleitet. Der 5'-Primer enthielt am 5'-Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle und der 3'-Primer am 5'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle. Der amplifizierte Promotor mit den angehängten Restriktionsschnittstellen wurde in pGEM-T® Easy kloniert.

Das 2,3 kb-Promotor-Fragment des Genes *FpGDCsP-D* wurde aus dem auf pJIT163 basierten Plasmid pA27 (H. Bauwe, unveröffentlicht) mit *Sall* herausgeschnitten und über *Sall* in pSPORT1 (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Jeder Promotor wurde aus dem jeweiligen Plasmid mit *EcoRI* und *BamHI* herausgeschnitten und zusammen mit der durch *BamHI*-*Sall*-Verdau ausgeschnittenen *AtGDCsP*-cDNA über *EcoRI* und *Sall* in pCAMBIApA kloniert.

### 3.1.1.3. Amplifikation und Klonierung der cDNA *AtGDCsP* aus *A. thaliana* (L.) Heynh.

Die cDNA des P-Proteins der GDC (At4g33010; GenBank Accession N° NM\_119455) wurde durch RT-PCR aus Blättern von *A. thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Columbia amplifiziert und in pGEM-T® Easy kloniert. Um die gewünschten Restriktionsschnittstellen an den beiden Enden der cDNA (*BamHI* und *Sall*) zu erzeugen, wurde das Fragment über *NotI*-Schnittstellen in pSPORT1 umklont. Die *AtGDCsP*-cDNA wurde aus dem Plasmid mit *BamHI* und *Sall* herausgeschnitten und zusammen mit dem entsprechenden Promotor über *EcoRI* und *Sall* in pCAMBIApA kloniert.



**Abb. 3.1: Strategie für die Herstellung der Plasmide zur Überexpression des P-Protein-Genes.** Die Plasmide wurden für die stabile Transformation von Tabak durch *A. tumefaciens* nach der Blattscheibenmethode (2.17.) eingesetzt.

### 3.1.2. Transformation von *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN

*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 wurden mit den fertigen Konstrukten transformiert (2.15.8.2.). Der Erfolg der Transformation wurde mittels Kolonie-PCR (2.14.4.) mit Promotor- und cDNA-spezifischen Primern überprüft (2.2.4.). Alternativ wurde Plasmid-DNA aus Agrobacterien isoliert (2.13.2.3.) und zur Transformation von *Escherichia coli* verwendet (2.15.8.1.), damit die Korrektheit der Plasmide überprüft werden könnte. Nach der Überprüfung wurden die Stämme zur Tabaktransformation nach der Blattscheibenmethode (2.16.) eingesetzt.

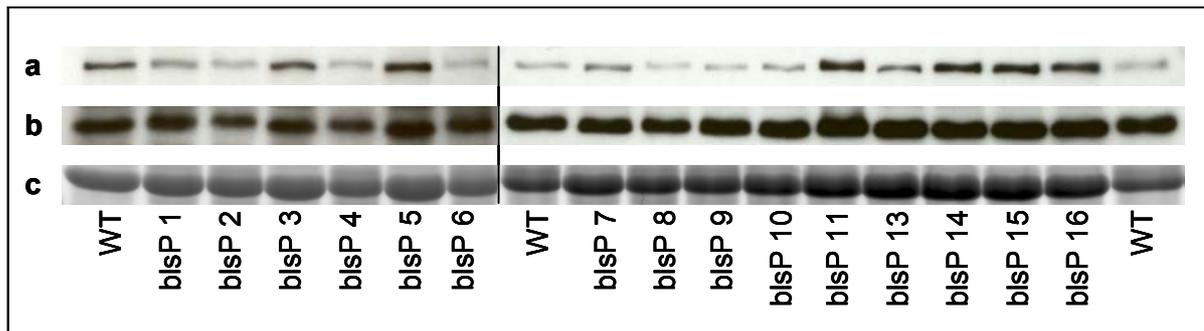
### 3.1.3. Überprüfung des Expressionsniveaus

Das Expressionsniveau der Transgene wurde mittels „Western blot-Analyse“ von Proteinen aus Source-Blättern der originalen Transformanten im Gewächshaus überprüft (2.18.1). Ein polyklonaler Antikörper gegen das P-Protein aus *Pisum sativum* L. (Wingler *et al.* 1997) wurde verwendet. Es wurden jeweils 20 µg Protein pro slot geladen, und die Abschätzung der Expressionsstärke erfolgte semiquantitativ durch Bewertung der relativen Schwärzung der Banden auf den Röntgenfilmen. Parallel wurden gleichermaßen beladene Gele mit Coomassie gefärbt (2.17.2.2.), um zu verifizieren, dass jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren. Außerdem war durch die unspezifische Bindung des Antikörpers an RubisCO ebenfalls eine Abschätzung der Proteinmenge auf dem Gel möglich. Es wurde weiterhin überprüft, ob die verstärkte Expression des P-Protein-Gens die Expression der T-Untereinheit der GDC beeinflusst. Dazu wurde ein Antikörper gegen das T-Protein aus *P. sativum* L. (Wingler *et al.* 1997) verwendet.

#### 3.1.3.1. Expression in Chloroplasten-haltigen Zellen

Die Mengen an P- und T-Protein in den transgenen Linien, die das P-Proteingen unter Kontrolle des *StLS1*-Promotors exprimieren (blsP-Linien), sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Menge an P-Protein war in den Linien blsP3, -5, -11, -14, -15 und -16 erhöht im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.2a). In den Linien blsP2, -4 und -6 war die Menge an P-Protein reduziert, vermutlich aufgrund von Cosuppression. Die Menge an T-Protein war nicht deutlich beeinflusst (Abb. 3.2b).

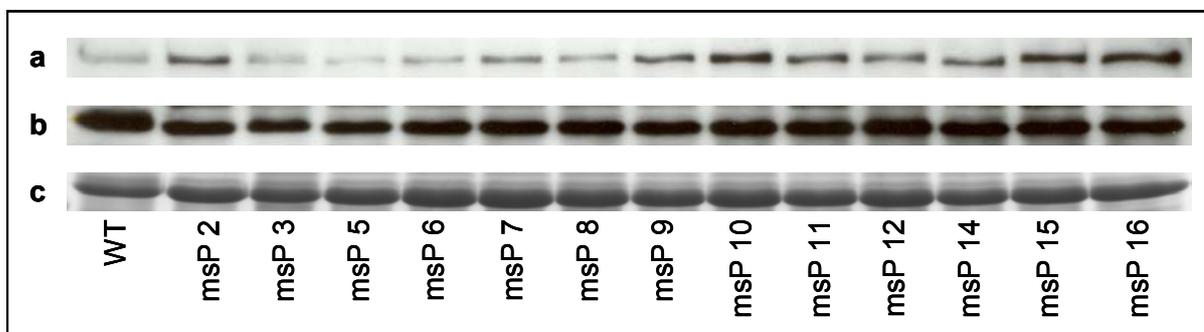
Die Linien blsP14 und blsP15 waren steril; da aber nur diese beiden Linien diesen Phänotyp aufweisen, kann er nicht mit dem Transgen zusammenhängen. Dies reduziert die Anzahl der Linien, von denen die T1-Generation genauer analysiert werden kann.



**Abb. 3.2: Menge an P- und T-Protein in Wildtyp- und bisP-Tabaklinien.** Proteine (20 µg pro Probe) aus Blattextrakten aus Wildtyp- und mit pblattGDCsP transformierten Tabakpflanzen (siehe 3.1.1.) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und der Gehalt an P- oder T-Protein durch „Western blot“-Analyse überprüft. **a)** Behandlung mit P-Protein-Antikörper, **b)** Behandlung mit T-Protein-Antikörper und **c)** Coomassie-Färbung der großen Untereinheit der RubisCO zur Ladekontrolle.

### 3.1.3.2. Expression in Mesophyllzellen

Die Mengen an P- und T-Protein in den transgenen Linien, die das P-Proteingen unter Kontrolle des *Flaveria pringlei* Mesophyll-spezifischen Promotors exprimieren (msP-Linien), sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Menge an P-Protein war in den Linien msP2, -9 -10, -15 und -16 deutlich erhöht im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.3a). Die Menge an T-Protein war nicht deutlich beeinflusst (Abb. 3.3b). In der Linie msP5 war die Menge an P-Protein reduziert, vermutlich aufgrund von Cosuppression.

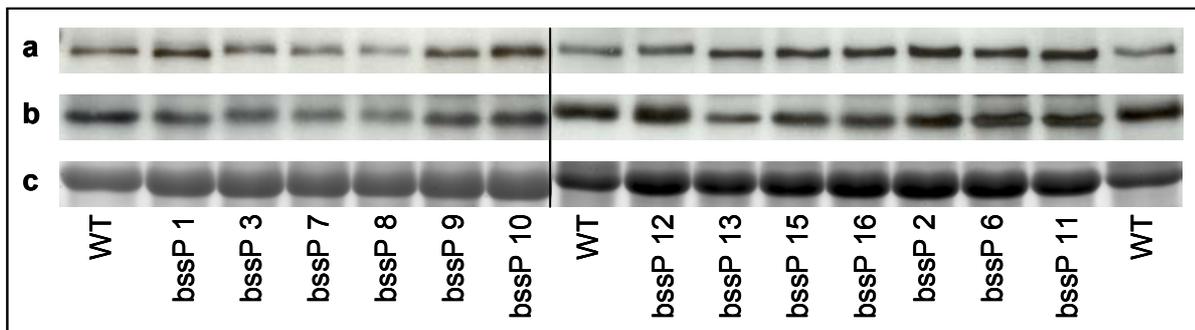


**Abb. 3.3: Menge an P- und T-Protein in Wildtyp- und msP-Tabaklinien.** Proteine (20 µg pro Probe) von Blattextrakten aus Wildtyp- und mit pmesoGDCsP transformierten Tabakpflanzen (siehe 3.1.2.) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und der Gehalt an P- oder T-Protein durch „Western blot“-Analyse überprüft. **a)** Behandlung mit P-Protein-Antikörper, **b)** Behandlung mit T-Protein-Antikörper und **c)** Coomassie-Färbung der großen Untereinheit der RubisCO zur Ladekontrolle.

### 3.1.3.3. Expression in leitbündelnahen Zellen

Die Mengen an P- und T-Protein in den transgenen Linien, die das P-Proteingen unter Kontrolle des bündelscheidenspezifischen Promotors exprimieren (bssP-Linien), sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Wie man sieht, sind keine deutlichen Variationen unter den P-Proteinmengen festzustellen (Abb. 3.4a). Dies ist nicht überraschend, wenn man bedenkt,

dass der Promotor nur in einem kleinen Teil der Blattzellen aktiv ist; Erhöhungen der Proteinmenge, wie sind in den msP- oder blsP-Linien zu finden sind, würden insgesamt nicht sichtbar sein. Die Menge an T-Protein war überraschenderweise in der Linie bssP13 deutlich reduziert. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Charakterisierung der bssP-Linien mittels RNA-Gel-Blot-Hybridisierung oder quantitativer RT-PCR durchgeführt werden muss, weil auf diesem Wege zwischen der mRNA für das endogene P-Protein und für das eingebrachte Transgen unterschieden werden kann.



**Abb. 3.4: Menge an P- und T-Protein in Wildtyp- und bssP-Tabaklinien.** Proteine (20 µg pro Probe) von Blattexttrakten aus Wildtyp- und mit pbsGDCsP transformierten Tabakpflanzen (siehe 3.1.2.) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und der Gehalt an P- oder T-Protein durch „Western blot“-Analyse überprüft. **a)** Behandlung mit P-Protein-Antikörper, **b)** Behandlung mit T-Protein-Antikörper und **c)** Coomassie-Färbung der großen Untereinheit der RubisCO zur Ladekontrolle.

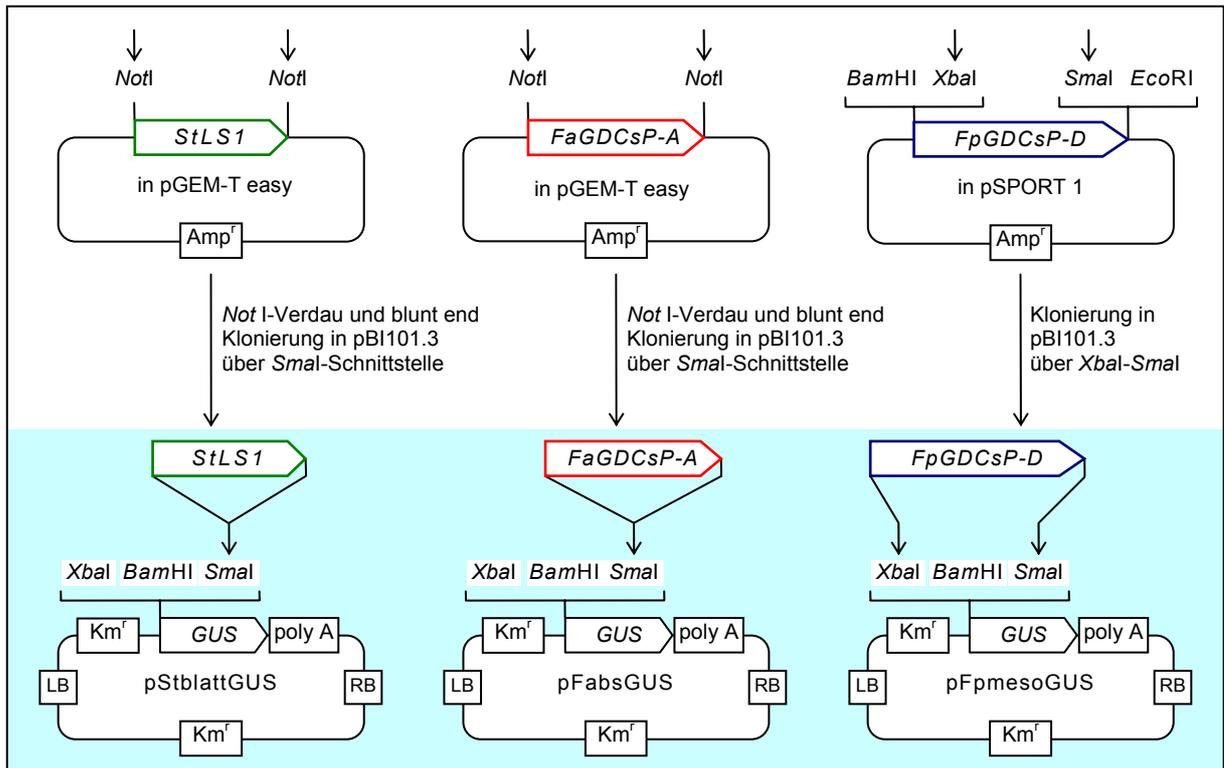
### 3.1.4. Überprüfung der Aktivität und Gewebespezifität der Promotoren

Um die Gewebespezifität der verwendeten Promotoren in Tabak abzusichern, wurden parallel zu den das P-Proteingen exprimierenden transgenen Pflanzen transgene Pflanzen hergestellt, in denen die entsprechenden Promotoren die Expression eines Reportergens, nämlich des *uidA*-Gens aus *E. coli*, das für die  $\beta$ -Glucuronidase kodiert, dirigierten.

#### 3.1.4.1. Klonierung der Promotoren in GUS-Expressionskassetten

Zur Bestätigung des Expressionsmusters der verwendeten Promotoren wurde jeder Promotor vor einer GUS-Expressionskassette kloniert. Dafür wurden die Promotoren *StLS1* und *FaGDCsP-A* mit *NotI* aus pGEM-T<sup>®</sup> Easy ausgeschnitten, und mit Hilfe des Klenow-Fragments wurden glatte Enden erzeugt. Die Produkte wurden jeweils in der *SmaI*-Schnittstelle von pBI101.3 kloniert.

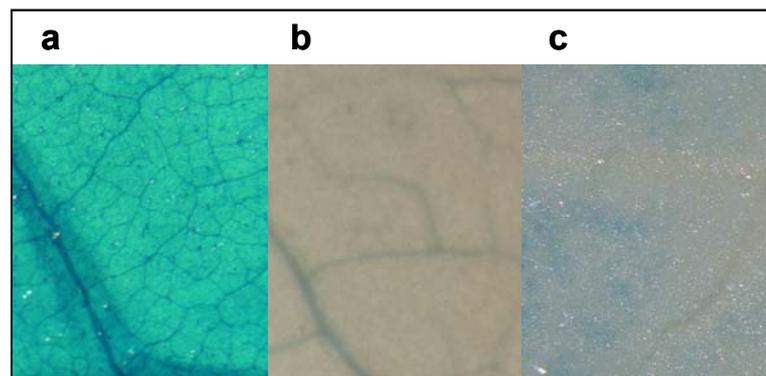
Ein in pSPORT1 in der umgekehrten Orientierung im Vergleich zum vorher erwähnten Konstrukt klonierter *FpGDCsP-D*-Promotor wurde über *XbaI-SmaI* in pBI101.3 (Jefferson *et al.* 1987; Accession N° U12640) kloniert.



**Abb. 3.5: Strategie für die Klonierung der Promotoren in GUS-Expressionskassetten zur Überprüfung der Aktivität und Gewebespezifität der verwendeten Promotoren.** Die hergestellten Plasmide wurden für die stabile Transformation von Tabakblättern durch *A. tumefaciens* eingesetzt.

#### 3.1.4.2. Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität

Der histochemische Nachweis der GUS-Aktivität wurde an Source-Blättern von Gewächshauspflanzen durchgeführt. Die GUS-Färbung (siehe 2.19.) fand über Nacht statt.



**Abb. 3.6: GUS-Aktivität unter Kontrolle von verschiedenen Promotoren in Blattgewebe von Kartoffelpflanzen.** Die Expression der  $\beta$ -Glucuronidase wurde vom *StLS1*-Promotor (a) oder vom *FaGDCsP-A*-Promotor (b) oder vom *FpGDCsP-D*-Promotor gesteuert (c) (siehe 3.1.).

Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, war der *StLS1*-Promotor im gesamten Blatt aktiv. Der *FaGDCsP-A*-Promotor war, wie erwartet, in den leitbündelnahen Zellen aktiv, aber nur in einer von zehn untersuchten Linien (Abb. 3.6b). Die mit dem *FpGDCsP-D*-Promotor-Konstrukt transformierten Pflanzen zeigten in nur in einem Fall nachweisbare GUS-Aktivität

(Abb. 3.6c). Wie nachträglich festgestellt wurde, enthielt sowohl das *FaGDCsP-A*-Promotor-Fragment als auch das *FpGDCsP-D*-Promotor-Fragment den Anfang der transkribierten Region inklusive des ATG des offenen Leserasters. Im Falle der P-Protein-Überexpressionskonstrukte (*pbsGDCsP*, *pmesoGDCsP*) wurde glücklicherweise eine translationale Fusion hergestellt, aber im Falle der GUS-Konstrukte (*pFabsGUS*, *pFpmesoGUS*) liegen das ATG des Promotors und das ATG des Reportergens nicht im selben Leseraster. Es ist also anzunehmen, dass der Mangel an GUS-Aktivität in den meisten *pFabsGUS*- und *pFpmesoGUS*-Transformanten darauf beruht, dass in Pflanzen die Translation gewöhnlich am ersten AUG der mRNA ansetzt, so dass kaum GUS-Protein gebildet werden konnte.

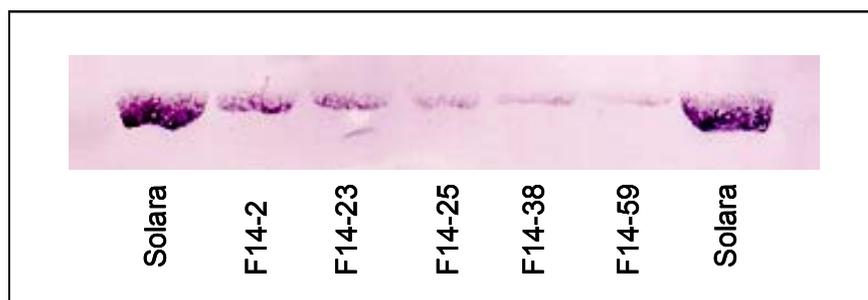
### 3.2. Antisense-Repression der Expression des Gens für das P-Protein in Mesophyllzellen von Kartoffelblättern

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungen einer Reduktion der Kapazität der Umwandlung von Glycin zu Serin auf die Photosynthese sowie den C- und N-Metabolismus zu untersuchen. Dafür wurden Kartoffelpflanzen mit einer Antisense-Inhibierung der Expression des P-Protein-Gens in Mesophyllzellen (dieses Kapitel) oder des Gens für die Serinhydroxymethyltransferase (SHMT; siehe 3.3.) in Chloroplasten-haltigen Zellen verwendet.

Die P-Antisense-Pflanzen wurden zunächst auf die Wirkung des Transgens hin untersucht, indem die Menge an P-Protein in Blattmitochondrien mittels „Western blot-Analyse“ bestimmt wurde. Dann wurden zwei Linien (F14-38 und F14-59), die die stärkste Reduktion der P-Proteinmenge zeigten, unter verschiedenen Anzuchtbedingungen physiologisch charakterisiert. Eine vorläufige Charakterisierung war bereits veröffentlicht worden (Winzer *et al.* 2001); in dieser Arbeit wurden diese Untersuchungen fortgeführt und weitere bisher nicht charakterisierte Effekte analysiert.

#### 3.2.1. Wahl der transgenen Linien für die physiologische Untersuchungen

Die Reduktion der Menge an P-Protein in den P-Antisense-Linien F14-2, F14-23, F14-25, F14-38 und F14-59 (H. Bauwe, persönliche Mitteilung) wurde in diesen Untersuchungen durch „Western blot-Analyse“ von Proteinen aus isolierten Mitochondrien bestätigt (Abb. 3.7). Die Reduktion der Menge an P-Protein korrelierte mit der Reduktion der Atmungsraten isolierter Mitochondrien mit Glycin als Substrat im Vergleich mit der NADH-abhängigen Atmung (Winzer *et al.* 2001).



**Abb. 3.7: Menge an P-Protein in Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen.** „Western blot“-Analyse von mitochondrialen Proteinen aus Blättern von in Erde angezogenen Pflanzen nach acht Wochen Wachstum bei unkontrollierter CO<sub>2</sub>-Konzentration (~450-290 ppm).

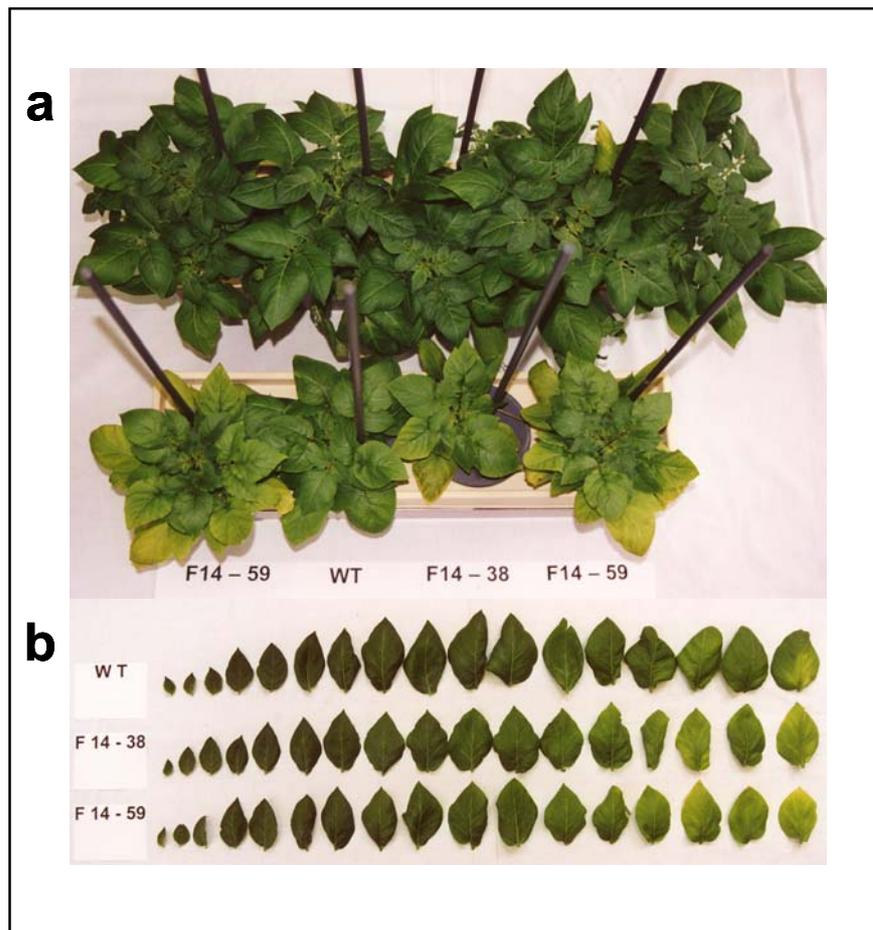
### 3.2.2. Wachstumsphänotyp der P-Antisense-Pflanzen

Wurden die Kartoffelpflanzen in Erde angezogen, waren die Blätter der transgenen Kartoffelpflanzen der Linien F14-38 und F14-59 im unteren Bereich chlorotisch (Abb. 3.8; siehe Winzer *et al.* 2001). Die Blätter im mittleren Bereich der transgenen Pflanzen wiesen unterschiedlich starke unregelmäßige chlorotische Bereiche der Laminae auf; die jüngeren Blätter unterschieden sich dagegen nicht von denen des Wildtyps. Dieser Phänotyp war während der gesamten Wachstumsperiode von zehn Wochen zu beobachten, war aber in älteren Pflanzen (älter als acht Wochen) stärker ausgeprägt. Er ließ sich in jüngeren Pflanzen verstärken, wenn diese später umgetopft wurden. In diesen Fällen dehnte sich der Chlorophyllabbau progressiv auf die Blätter im oberen Bereich der Pflanzen aus. Da die Pflanzen nicht zusätzlich gedüngt wurden, lag es nahe, dass ein Zusammenhang des Chlorose-Phänotyps mit der N-Versorgung besteht. Aus diesem Grund wurde der Wachstumsphänotyp der P-Antisense-Linien auch in einem Wachstumssystem mit kontrollierter Nährstoffversorgung untersucht, nämlich in Hydrokultur mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen (10 mM bzw. <1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; siehe 2.3.1.3.). In Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> wuchsen die Pflanzen grundsätzlich erheblich schneller als in Erde; in Hydrokultur mit <1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dagegen war die Wachstumsrate geringer als in Erde (Abb. 3.9a). Bei Pflanzen in Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> betraf die Chlorose nur sehr alte Blätter der transgenen Pflanzen, so dass die Pflanzen vom Wildtyp kaum zu unterscheiden waren (Abb. 3.9a und b). Bei Wachstum in Hydrokultur mit <1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> war die Chlorose auch in den jüngeren Blättern der transgenen Pflanzen sehr stark ausgeprägt (Abb. 3.9a). Die Pflanzen der transgenen Linien F14-38 und F14-59 waren sowohl in Hydrokultur als auch in Erde während der gesamten Wachstumsperiode genauso groß wie die Wildtyppflanzen. Unter allen Wachstumsbedingungen gab es auch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Linien hinsichtlich Anzahl, Größe und Form der Blätter (Abb. 3.8 und 3.9a; siehe Winzer *et al.* 2001 für Erde).

Der Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Wachstumskammer auf den Wachstumsphänotyp wurde in einer Versuchsserie analysiert, die in 3.2.5. genauer diskutiert wird. Wegen der großen Bedeutung dieses Parameters wird im Folgenden jeweils angegeben, unter welchen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen die untersuchten Pflanzen gewachsen waren.



**Abb. 3.8: Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen.** Die Pflanzen wuchsen acht Wochen in Erde bei unkontrollierter CO<sub>2</sub>-Konzentration (~450-290 ppm).

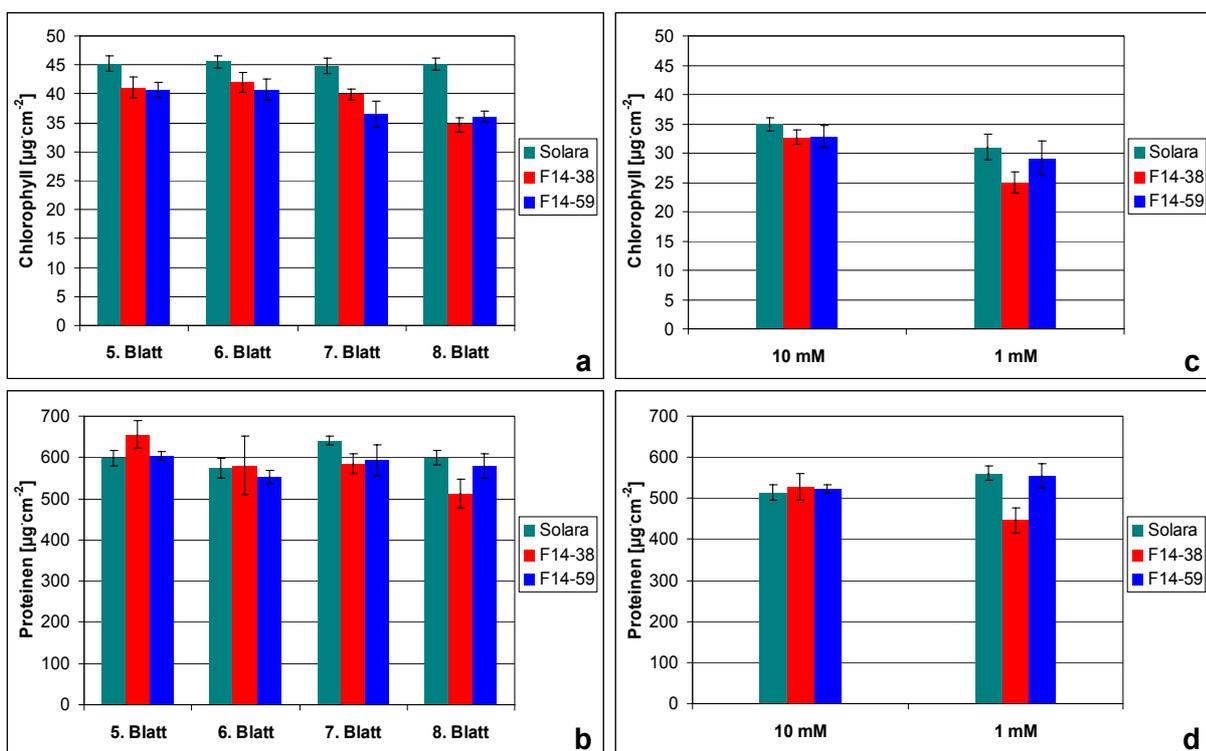


**Abb. 3.9: Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen der Linien F14-38 und F14-59 in Hydrokultur.** Die Pflanzen wuchsen vier Wochen in Hydrokultur mit 10 bzw. <1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (reguliert). **a**) Blick der Pflanzen von oben und **b**) Spitzenfiedern von jedem Blatt des Zentralsprosses der Pflanzen bei Wachstum in Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Die Blattnummerierung bezieht sich auf die Anordnung der Blätter im Hauptspross der Pflanze von der Spitze nach unten.

Der Chlorophyllgehalt der Blätter der transgenen Linien korrelierte mit der beobachteten Chlorose. Jüngere Blätter von jüngeren Pflanzen der P-Antisense-Linien wiesen keine Abnahme des Chlorophyllgehaltes im Vergleich mit dem Wildtyp auf (Daten nicht gezeigt). Ältere Blätter aller Pflanzen, aber auch jüngere Blätter von älteren Pflanzen zeigten niedrigere Chlorophyllgehalte als die entsprechenden Blätter des Wildtyps (Abb. 3.10a). Der

Chlorophyllgehalt der Blätter von Pflanzen in Hydrokultur war in allen Linien niedriger als der von Pflanzen auf Erde (Abb. 3.10c und a). Jüngere Blätter von Pflanzen, die bei  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  kultiviert wurden, hatten geringfügig weniger Chlorophyll als die von Pflanzen bei 10 mM  $\text{NO}_3^-$  (Abb. 3.10c).

Der Proteingehalt der Blätter der transgenen Pflanzen auf Erde war erst in den älteren Blättern beeinflusst (Abb. 3.10b). Blätter von Pflanzen in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  hatten weniger Protein als Blätter von Pflanzen in Erde (Abb. 3.10d und b). Wenn die Pflanzen in  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  kultiviert wurden, zeigten sowohl die Pflanzen der transgenen Linie F14-59 als auch die Wildtyppflanzen höhere Proteingehalte in Blätter im Vergleich mit Kultur in 10 mM  $\text{NO}_3^-$ . Blätter der transgenen Linie F14-38 hatten dagegen niedrigeren Proteingehalte (Abb. 3.10d).

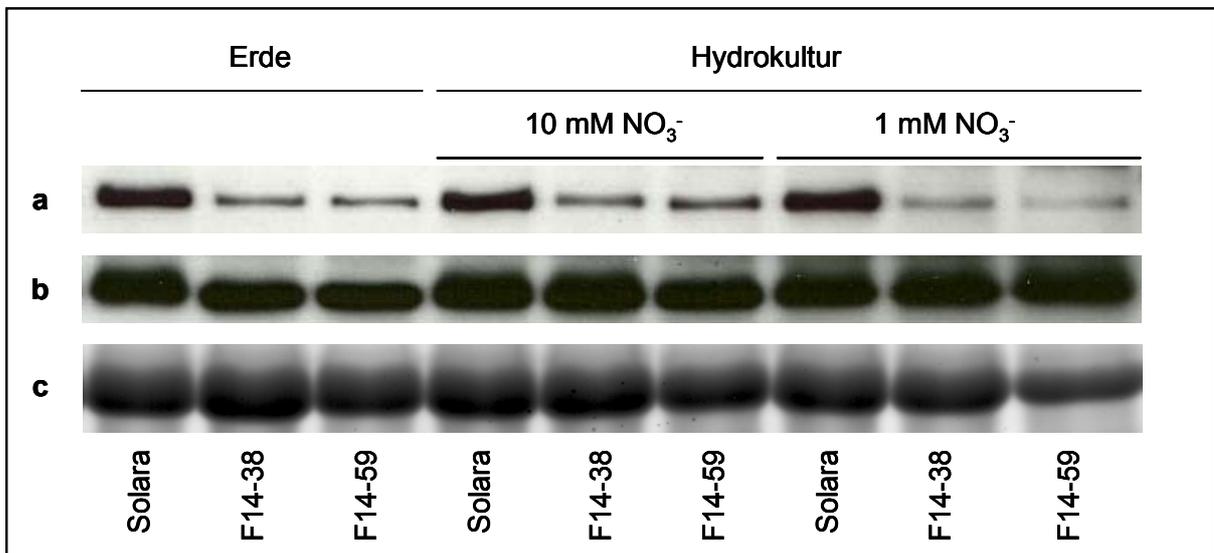


**Abb. 3.10: Chlorophyll- und Proteingehalte von Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen in Abhängigkeit vom Blattalter und Kultursystem.** Chlorophyllgehalt (a) und Proteingehalt (b) wurde in Blättern von in Erde angezogenen Pflanzen nach neun Wochen Wachstum bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) bestimmt. Die Blattnumerierung bezieht sich auf die Anordnung der Blätter im Hauptspross von der Spitze nach unten. Chlorophyllgehalt (c) und Proteingehalt (d) wurde jeweils im fünften Blatt nach vier Wochen Wachstum in Hydrokultur mit 10 bzw.  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  und bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) bestimmt. Mittelwerte und SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

### 3.2.3. Grad der Repression der Expression des P-Protein-Gens in Abhängigkeit mit dem Blattalter und N-Versorgung

Die Frage erhob sich, ob der Chlorose-Phänotyp mit der Menge an P-Protein in den betroffenen Blättern korreliert war. Daher wurde die P-Proteinmenge in Blättern von Pflanzen aus Erde und Hydrokultur mit  $<1$  mM bzw. 10 mM  $\text{NO}_3^-$  verglichen (Abb. 3.11). Es zeigte sich, dass die P-Proteinmenge in den transgenen Pflanzen auf  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  im Vergleich mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  deutlich reduziert war. Allerdings hätte man aufgrund des sehr deutlichen Phänotyps vermuten können, dass die Unterschiede im Gehalt an P-Protein größer seien als der hier beobachtete Faktor von ca. zwei.

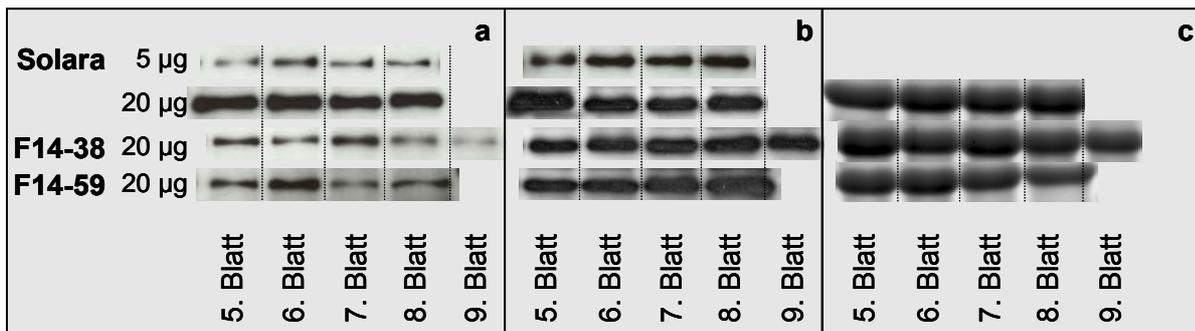
Der Vergleich zwischen den auf Erde und in Hydrokultur gezogenen Pflanzen ist schwierig. In Abbildung 3.11 werden vier Wochen alte Hydrokulturlpflanzen mit 8 Wochen alten auf Erde gezogenen Pflanzen verglichen. Hier sind die Gehalte an P-Protein in den auf Erde gezogenen und den in 10 mM  $\text{NO}_3^-$  gezogenen Pflanzen ähnlich. Bei Kultur in Erde wird beobachtet, dass die P-Proteinmenge in Blättern der transgenen Linie F14-59 nach 9 Wochen Wachstum deutlich reduziert war in Vergleich zu den acht Wochen alten Pflanzen (Daten nicht gezeigt). Da in dieser Zeit auch die Chlorose in dieser Linie sehr deutlich zunimmt, lässt sich vermuten, dass die Menge an P-Protein mit der Erscheinung der Chlorose korreliert.



**Abb. 3.11: Menge an P-Protein in Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen in Abhängigkeit vom Kultursystem und N-Versorgung.** a) „Western blot“-Analyse von P-Protein in Proteinextrakten aus Blättern von in Erde oder in Hydrokultur angezogenen Pflanzen nach acht (Erde) bzw. vier Wochen Wachstum (Hydrokultur) bei 360 ppm  $\text{CO}_2$ , b) „Western blot“-Analyse der Menge an T-Protein in denselben Proben und c) Coomassie-Färbung der großen Untereinheit der RubisCO zur Ladekontrolle. Jeweils das fünfte Blatt von oben des Zentralsprosses wurde analysiert. Für jede Probe wurden Blattextrakte aus drei verschiedenen Pflanzen gemischt und 20  $\mu\text{g}$  Protein pro Probe durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Weiterhin wurde die P-Proteinmenge in Abhängigkeit vom Blattalter untersucht. Die Menge an P-Protein im Wildtyp war unabhängig vom Blattalter, während sie in den transgenen Linien vom sechsten oder siebten Blatt an mit zunehmendem Blattalter abnahm. Für das T-Protein ließ sich weder im Wildtyp noch in den transgenen Linien eine entsprechende Abnahme der Proteinmenge mit zunehmendem Blattalter feststellen (Abb. 3.12).

Die Menge an P-Protein in den Blättern der Antisense-Linien war damit abhängig von den Anzuchtbedingungen und vom Blattalter.



**Abb. 3.12: Menge an P-Protein in Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen in Abhängigkeit vom Blattalter.** a) „Western blot“-Analyse von P-Protein in Proteinextrakten aus Blättern von in Erde angezogenen Pflanzen nach neun Wochen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (kontrolliert), b) „Western blot“-Analyse der Menge an T-Protein in denselben Proben und c) Coomassie-Färbung der großen Untereinheit der RubisCO zur Ladekontrolle. Die Blattnummerierung bezieht sich auf die Anordnung der Blätter im Hauptspross der Pflanze von der Spitze nach unten. Für jede Probe wurden Blattextrakte aus drei verschiedenen Pflanzen gemischt und 20 µg Protein pro Probe (bzw. beim Wildtyp zusätzlich einmal 5 µg) durch SDS-PAGE aufgetrennt.

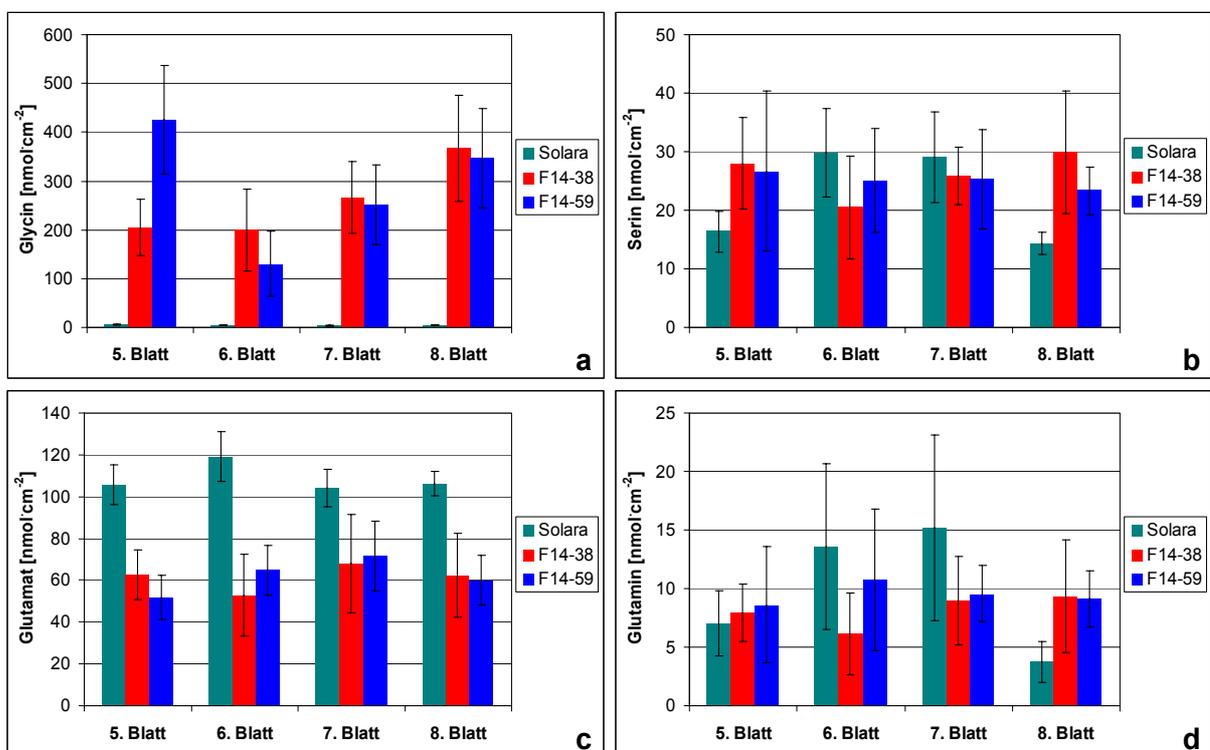
### 3.2.4. Intermediate des C2-Zyklus in Pflanzen mit reduzierter Menge an P-Protein

Zur physiologischen Charakterisierung der P-Protein-Antisense-Linien von Kartoffel sollte bestimmt werden, ob die Reduktion der Menge an P-Protein zu Veränderungen im C2-Zyklus führt. Daher wurden die Konzentrationen einiger Intermediate des C2-Zyklus in den transgenen Linien mit denen im Wildtyp verglichen.

Die Synthese von Glycin in grünen Blättern erfolgt hauptsächlich durch die Transaminierung von Glyoxylat. Das Glycin wird anschließend durch die GDC decarboxyliert und desaminiert (siehe 1.2. und 1.3.). Da die Flussraten von Metaboliten durch den C2-Zyklus im Licht unter normalen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen sehr hoch sind, ist zu erwarten, dass eine Hemmung der GDC zur Akkumulation von Glycin führt. Tatsächlich akkumulieren die Blätter von P-Antisense-Pflanzen während der Lichtperiode große Mengen an Glycin (Heineke *et al.* 2001; Winzer *et al.* 2001). Dies bewirkt, dass ein großer Anteil an reduziertem Stickstoff in Glycin fixiert ist, und es ist zu vermuten, dass auch die Gehalte anderer Aminosäuren beeinflusst werden, insbesondere die Konzentrationen von Glutamat und Serin, die an der Glycin-Bildung direkt beteiligt sind. Außerdem sollte der Glutaminspiegel beeinflusst werden, denn die Konzentrationen von Glutamin und Glutamat stehen über den GS/GOGAT-Zyklus

miteinander in Verbindung (siehe Abb. 1.1). In diesem Kapitel wird daher der Schwerpunkt auf Glycin, Serin, Glutamat und Glutamin gelegt; auf die anderen Aminosäuren und den Gesamtaminosäuregehalt wird in 3.2.7. näher eingegangen werden.

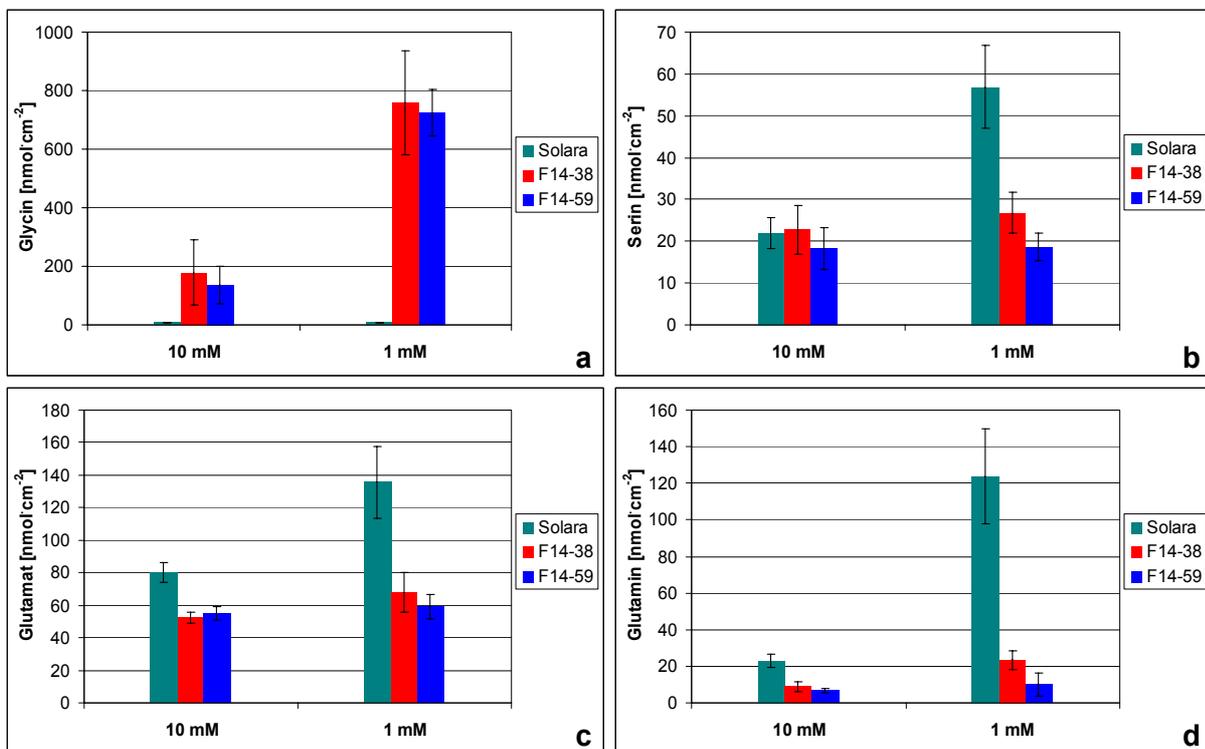
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigten, dass der Glycingehalt in Blättern von Kartoffelpflanzen mit reduzierter Menge an P-Protein im Vergleich mit dem Wildtyp erhöht war. Es wurden auch deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Blättern einzelner Linien beobachtet. In der Linie F14-38 war die Erhöhung in den älteren Blättern (76-86fach im siebten bzw. achten Blatt) größer als in den jüngeren (33-51fach im fünften bzw. sechsten Blatt; siehe Abb. 3.13a). In der Linie F14-59 war die Erhöhung ebenfalls größer in den älteren Blättern (72-82fach im siebten bzw. achten Blatt) als in jüngeren Blättern (33-69fach im sechsten bzw. im fünften Blatt).



**Abb. 3.13: Glycin-, Serin-, Glutamat und Glutaminspiegel in Abhängig vom Blattalter.** Der Gehalt an Glycin (a), Serin (b), Glutamat (c) und Glutamin (d) wurde in Blättern von in Erde angezogenen Pflanzen nach neun Wochen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (kontrolliert) gemessen (siehe 2.3.1.2.). Die Blattnummerierung bezieht sich auf die Anordnung der Blätter im Hauptspross von der Spitze nach unten. Mittelwerte und SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Der Seringehalt in Blättern der P-Antisense-Linien war im Allgemeinen im Vergleich zu dem Wildtyp wenig verändert. Nur in Blättern mit 80fach erhöhten Glycinkonzentrationen wurde eine Verdopplung der Serinkonzentration beobachtet (2,1- bis 1,6fach; Abb. 3.13b). Der Glutamatspiegel war in beiden P-Antisense-Linien im Vergleich zum Wildtyp um jeweils 43 % reduziert (Abb. 3.13c). Dieser Abnahme war nicht mit der relativen Akkumulation von Glycin in diesen Blättern korreliert. Der Glutaminspiegel war in den P-Antisense-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abb. 3.13d).

In Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  zeigten die P-Antisense-Linien ebenfalls einen Anstieg im Glycinspiegel der Blätter, der aber geringer (20fach erhöht; siehe Abb. 3.14a) war als in Pflanzen auf Erde (bis 86fach; s.o.). In Hydrokultur mit <1 mM  $\text{NO}_3^-$  war in den Blättern der transgenen Linien eine im Vergleich zu Wildtypblättern 100fache Erhöhung der Glycinkonzentration zu beobachten (Abb. 3.14a). Transgene Pflanzen in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  zeigten wie auf Erde keine Veränderung des Seringehaltes im Vergleich zum Wildtyp. Bei Hydrokultur mit <1 mM  $\text{NO}_3^-$  dagegen zeigten die Blätter der P-Antisense-Pflanzen eine zwei- bis dreifache Reduktion des Serinspiegels (Abb. 3.14b). Der Glutamatspiegel in den Blättern der transgenen Linien lag bei Wachstum in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  um 32-35 % niedriger als im Wildtyp. Bei Hydrokultur mit <1 mM  $\text{NO}_3^-$  war der Glutamatgehalt noch stärker reduziert (50-57 %) im Vergleich mit dem Wildtyp (Abb. 3.14c). Der Glutamingehalt war bereits bei Wachstum in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  in den transgenen Linien deutlich reduziert im Vergleich zum Wildtyp; bei <1 mM  $\text{NO}_3^-$  war der Unterschied zu dem Wildtyp noch größer (Abb. 3.14d).



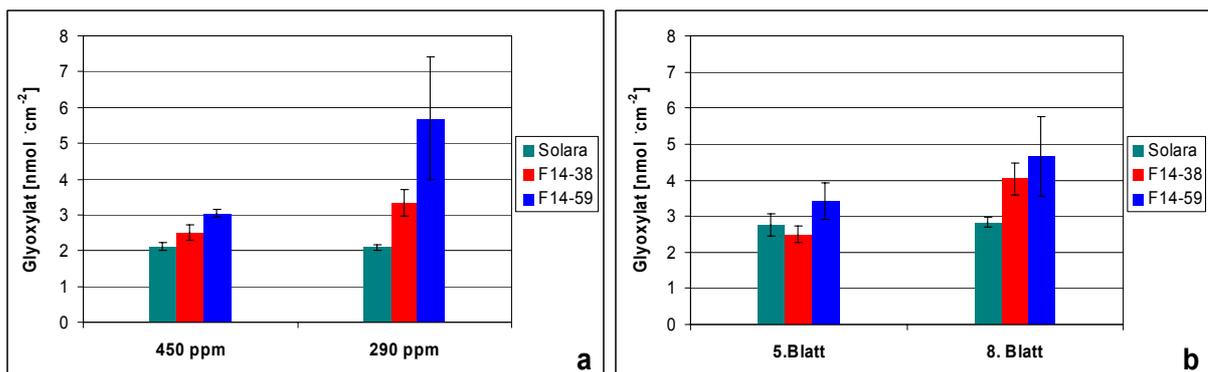
**Abb. 3.14: Glycin-, Serin-, Glutamat und Glutaminspiegel in Abhängig von der N-Versorgung.** Der Gehalt an Glycin (a), Serin (b), Glutamat (c) und Glutamin (d) jeweils im 5. Blatt von Kartoffelpflanzen nach vier Wochen Wachstum in Hydrokultur mit 10 bzw. <1 mM  $\text{NO}_3^-$  und bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) bestimmt (siehe 2.3.1.3.). Mittelwerte und SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Der Gehalt an Glyoxylat in den Peroxisomen ist mit der peroxisomalen Glycinkonzentration über die reversiblen Transaminasereaktionen verbunden (Abb. 1.1).

Die enge Einbindung der Transaminasen im peroxisomalen Multienzymkomplex gewährleistet den direkten Transfer von Intermediaten von einer Reaktion zur nächsten (Heupel und Heldt 1994). Die Affinitäten dieser Enzyme für die Aminogruppendonoren

Glutamat und Serin sind außerdem größer als die für Glycin. Diese Eigenschaften des peroxisomalen Multienzymkomplexes fördern die Bildung von Glycin unter Verbrauch von Glyoxylat und vermeiden die Akkumulation und damit die Freisetzung des toxischen Intermediats Glyoxylat (siehe 1.2.). Somit ist der photorespiratorische Metabolismus zwar darauf ausgerichtet, die Akkumulation von Glyoxylat zu verhindern, aber eine starke Glycinakkumulation oder ein reduzierter Gehalt von Aminogruppendonoren könnte trotzdem zu einer Akkumulation führen.

Daher wurde auch der Glyoxylatspiegel in Blättern von auf Erde kultivierten Pflanzen untersucht. Um den Einfluss einer stärkeren Limitierung der Photorespiration durch die niedrige GDC-Aktivität auf die Intermediate des C2-Zyklus zu untersuchen, wurden hohen Photorespirationsraten erzeugt, indem die CO<sub>2</sub>-Konzentration während des Wachstums variiert wurde. Die Pflanzen wurden zunächst bei 450 ppm CO<sub>2</sub> angezogen, d.h. bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration (die ambiante CO<sub>2</sub>-Konzentration beträgt durchschnittlich 360 ppm), danach wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration auf 290 ppm reduziert (Abb. 3.15a). Außerdem wurden die Glyoxylatkonzentrationen in Blättern von auf Erde gewachsenen Pflanzen in Abhängigkeit vom Blattalter untersucht (Abb. 3.15b).



**Abb. 3.15: Glyoxylatgehalte in Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen.** Die Pflanzen wuchsen 7½ Wochen in Erde bei 450 ppm CO<sub>2</sub> und weitere fünf Tage bei 290 bzw. 450 ppm CO<sub>2</sub> (a) oder neun Wochen bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (kontrolliert) (b). Die Blattnumerierung bezieht sich auf die Anordnung der Blätter im Hauptspross von der Spitze nach unten; im (a) wurde der Glyoxylatgehalt jeweils im fünften Blatt gemessen. Mittelwerte und SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es bereits bei leicht erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen zu einer geringfügigen Erhöhung von Glyoxylat in den Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp kam. Höhere Photorespirationsraten führten zu einem stärkeren Anstieg der Glyoxylatgehalte in den Blättern der transgenen Linien, während der Glyoxylatgehalt in den Wildtypblättern unverändert blieb (Abb. 3.15a). Der Glyoxylatgehalt war in älteren Blättern der transgenen Linien im Vergleich mit jüngeren Blättern derselben Linien und im Vergleich mit gleich alten Blättern des Wildtyps ebenfalls erhöht (Abb. 3.15b). Dieser Anstieg korrelierte mit dem in den gleichen Blättern beobachteten Anstieg an Serin (Abb. 3.13b).

Der Glyoxylatgehalt der Blätter von Wildtyp-Pflanzen war unabhängig vom Blattalter. Lediglich beim Vergleich zwischen Blättern von Pflanzen, die unter 360 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden mit Pflanzen, die unter 450 ppm gewachsen waren, ließen sich geringfügige Unterschiede nachweisen (Abb. 3.15a und b). Es ist allerdings zu bemerken, dass die Pflanzen aus Kultur bei 360 ppm CO<sub>2</sub> eine Woche älter als die Pflanzen auf Kultur bei 450 ppm waren. Die Reduktion der GDC-Aktivität in den P-Antisense-Linien führte in Abhängigkeit von CO<sub>2</sub>-Konzentration und Blattalter zu einer Akkumulation von Glyoxylat.

Die erhöhten Glyoxylatspiegel könnten ein Indiz dafür sein, dass Glyoxylat aus den Peroxisomen entweichen kann. Die Anwesenheit von einer NADP-abhängigen Glyoxylatreduktase im Cytosol, die mit NADPH als Substrat Glyoxylat zu Glycolat reduzieren kann und dessen niedriger K<sub>m</sub>-Wert für Glyoxylat (70 µM) sind Hinweise dafür, dass dieses Enzyms die Zelle vor den toxischen Effekten des Glyoxylats außerhalb der Peroxisomen schützt (Givan und Kleczkowski 1992). Ein Anstieg der Aktivität der NADP-Glyoxylatreduktase würde also die Vermutung unterstützen, dass Glyoxylat aus den Peroxisomen in das Cytosol gelangt.

Andere im Blatt vorkommende Enzyme sind ebenfalls in der Lage, die Reduktion von Glyoxylat unter Verbrauch von NADH oder NADPH zu katalysieren. Unter diesen Enzymen befinden sich die peroxisomale NAD-abhängige Hydroxypyruvatreduktase (HPR1) und die cytosolische NADP-abhängige Hydroxypyruvatreduktase (HPR2). Beide Enzyme verwenden dieselben Substrate und Kofaktoren, aber mit verschiedenen Affinitäten. Obwohl die K<sub>m</sub>-Werte dieser Enzyme für Glyoxylat höher sind als die der spezifischen NADP-abhängigen Glyoxylatreduktase, könnten sie wegen ihrer sehr hohen Aktivität einen Beitrag an der Beseitigung von Glyoxylat leisten.

Um den Beitrag beider Enzyme zu der NADPH-abhängigen Reduktion von Glyoxylat zu bestimmen, wurde zunächst die Gesamtaktivität ermittelt und parallel ein Versuch unter spezifischer Inhibition der Glyoxylatreduktase durchgeführt. Zusätzlich wurden die Aktivitäten der NAD- und NADP-abhängigen Hydroxypyruvatreduktase mit Hydroxypyruvat als Substrat gemessen, um eine mögliche Interferenz mit der Ermittlung der Aktivität der NADP-abhängigen Glyoxylatreduktase besser einschätzen zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

**Tab. 3.1: Aktivitäten der NADP-abhängigen Glyoxylatreduktase sowie der NAD- und der NADP-abhängigen Hydroxypyruvatreduktase in Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen.** Die Pflanzen wuchsen zehn Wochen in Erde bei nicht kontrollierten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (~450-290 ppm) und 275±25 µmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR). Die Gehalte an Glyoxylat, Proteinen und Chlorophyll der Blätter sind dargestellt. Mittelwerte ± SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

	Solara	F14-38	F14-59		
			% WT		% WT
Glyoxylat [nmol·cm <sup>-2</sup> ]	2,8 ± 0,2	10,6 ± 1,3	372	11,6 ± 1,1	408
NADP-GR [nKat·cm <sup>-2</sup> ]	0,083 ± 0,021	0,078 ± 0,010	95	0,077 ± 0,007	93
NADP-HPR [nKat·cm <sup>-2</sup> ]	0,25 ± 0,02	0,20 ± 0,02	80	0,20 ± 0,02	78
NAD-HPR [nKat·cm <sup>-2</sup> ]	2,33 ± 0,07	1,53 ± 0,16	66	1,64 ± 0,23	70
Protein [µg·cm <sup>-2</sup> ]	672 ± 17	468 ± 36	70	503 ± 24	75
Chlorophyll [µg·cm <sup>-2</sup> ]	29 ± 1	13 ± 1	44	14 ± 1	48

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der NADP-abhängigen Glyoxylatreduktase in Blättern der transgenen Linien mit einer ca. vierfachen Akkumulation von Glyoxylat im Vergleich zum Wildtyp nur geringfügig reduziert ist. Die Proteinmenge und die Aktivität der NAD-abhängigen Hydroxypyruvatreduktase sind in den transgenen Linien allerdings um ca. 30 % reduziert, während die Aktivität der NADP-abhängigen Hydroxypyruvatreduktase in den transgenen Linien um ca. 20 % reduziert ist. Damit sind die spezifischen Aktivitäten dieser Enzyme wegen des geringeren Proteingehaltes erhöht. Dies deutet auf eine Funktion dieser Enzyme bei der Entgiftung von in das Cytosol gelangten Glyoxylats hin.

### 3.2.5. Wirkung der Reduktion der Menge an P-Protein auf die Photosynthese

#### 3.2.5.1. CO<sub>2</sub>-Assimilation unter Anzuchtbedingungen in Pflanzen mit reduzierter Menge an P-Protein

Eine Reduktion der GDC-Aktivität kann die CO<sub>2</sub>-Assimilation auf verschiedene Weise beeinflussen. Erstens bedeutet die Bildung von 2-P-Glycolat einen Verlust an Kohlenstoff aus dem Pool von Intermediaten des Calvin-Zyklus. Durch den C2-Zyklus wird 75 % dieses Kohlenstoffes in Form von Glycerat-3-Phosphat zurückgewonnen, die restlichen 25 % werden als CO<sub>2</sub> freigesetzt. Eine Limitation der Flussrate durch den C2-Zyklus wegen einer reduzierten GDC-Aktivität könnte zu einer Verringerung des Glycerat-3-Phosphat-Pools und damit zu einer Limitation der CO<sub>2</sub>-Assimilation führen. Zweitens ist aus Experimenten mit isolierten Chloroplasten bekannt, dass Glyoxylat die Aktivierung der RubisCO (Campbell und Ogren 1990) und die Thioredoxin-abhängigen Aktivierung der Calvin-Zyklus-Enzyme Fruktose-1,6-Bisphosphatase und Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase (Flügge *et al.* 1980) hemmt.

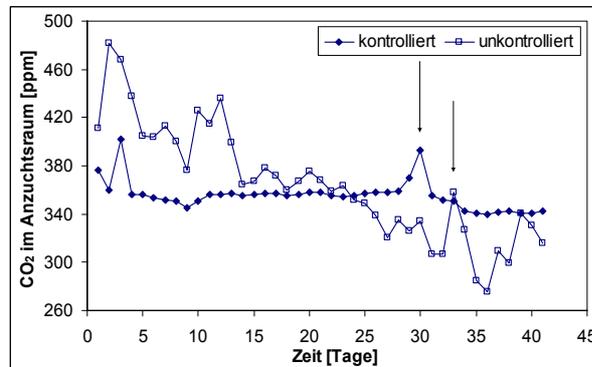
Es ist bekannt aus Untersuchungen mit homozygoten Mutanten des C2-Zyklus, dass eine vollständige Unterbrechung des C2-Zyklus zu einem Zusammenbrechen der CO<sub>2</sub>-Assimilation und des gesamten C-Metabolismus führt, so dass diese Mutanten unter normalen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nicht lebensfähig sind (Blackwell *et al.* 1990).

Untersuchungen mit heterozygoten Mutanten und Antisense-Pflanzen des C2-Zyklus haben allerdings gezeigt, dass die CO<sub>2</sub>-Assimilation in diesen Pflanzen unter normalen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nicht unbedingt beeinflusst wird. In grünen Blättern von P-Antisense-Kartoffelpflanzen mit einer Reduktion der GDC-Aktivität von ca. 71-75 % wurde keine Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate festgestellt (Heineke *et al.* 2001). Dies war auch der Fall mit heterozygoten Gerstenmutanten für das H-Protein mit einer bis zu 50 % reduzierten GDC-Aktivität (Wingler *et al.* 1997) und in heterozygoten Glutaminsynthetase-Gerstenmutanten mit 47 % der Glutaminsynthetase-Aktivität des Wildtyps (Häusler *et al.* 1994). Andererseits zeigten heterozygote Glutamatsynthase-Gerstenmutanten, die noch 63 % der Glutamatsynthase-Aktivität des Wildtyps besaßen, eine leichte Reduktion der CO<sub>2</sub>-Assimilation (Häusler *et al.* 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Reduktion der CO<sub>2</sub>-Assimilation in Kartoffelpflanzen mit einer stärkeren Reduktion der GDC-Aktivität (nämlich auf 15-20 % der Aktivität des Wildtyps) untersucht.

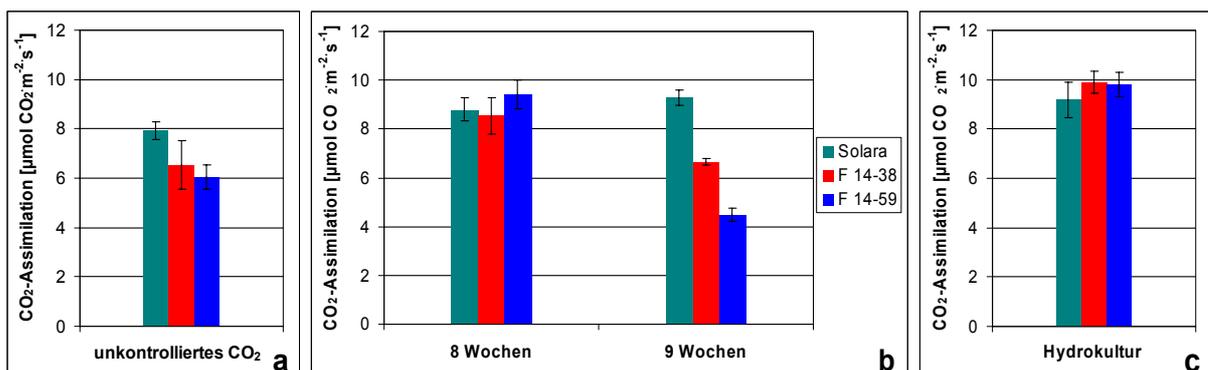
Wie in 3.2.2. erwähnt wurde, hatte die CO<sub>2</sub>-Konzentration einen gewissen Einfluss auf den Wachstumsphänotyp. Wenn die Pflanzen unter nicht kontrollierten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen wuchsen, war die Ausprägung des Phänotyps schneller und stärker als wenn die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Anzuchtraum konstant gehalten wurde (siehe 2.3.1.2.). Daher wurden zwei Parallelversuche durchgeführt, in einem wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Anzuchtraum

konstant gehalten und in anderem wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration zwar registriert aber nicht geregelt. Abbildung 3.16 zeigt eine Aufzeichnung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in beiden Anzuchträume. Die Auswirkungen beider Wachstumsbedingungen auf die CO<sub>2</sub>-Assimilation wurden dann bestimmt.



**Abb. 3.16: CO<sub>2</sub>-Konzentration im Anzuchtraum unter kontrollierter bzw. nicht kontrollierter CO<sub>2</sub>-Konzentration.** Die Pfeile bezeichnen den Zeitpunkt der Gaswechselbestimmungen. Während dieser Zeit wurde eine Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Anzuchtraum durch wiederholtes Eintreten eines Menschen hervorgerufen. Der Median von 17 Messwerten während der Lichtperiode ist dargestellt. Es sollte beachtet werden, dass die CO<sub>2</sub>-Konzentration bei kontrollierten Bedingungen niemals unter 360 ppm fallen durfte.

Eine progressive Senkung der CO<sub>2</sub>-Konzentration unter 360 ppm im Anzuchtraum (Abb. 3.16) bewirkte nach acht Wochen Wachstum eine Reduktion der photosynthetischen Leistung in den transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.17a). Nach acht Wochen Wachstum in Erde unter konstanten 360 ppm CO<sub>2</sub> war dagegen die CO<sub>2</sub>-Assimilation in jungen Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Pflanzen gleich (Abb. 3.17b).

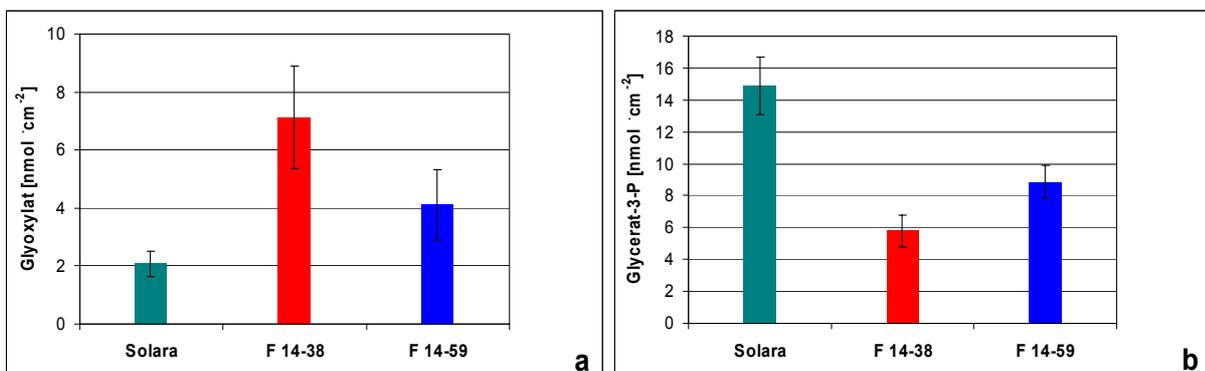


**Abb. 3.17: Steady-state CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten im Wildtyp und in den P-Antisense-Linien in Abhängigkeit von Pflanzenalter und Kultursystem.** Die Pflanzen wuchsen acht Wochen in Erde unter nicht kontrollierter CO<sub>2</sub>-Konzentration (~450-290 ppm) (a) oder acht bzw. neun Wochen in Erde bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (kontrolliert) (b) oder vier Wochen in Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (kontrolliert) (c) und 275±25 µmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR). Die Gasanalyse wurde jeweils mit dem fünften Blatt des Hauptsprosses von der Spitze aus bei 350 ppm CO<sub>2</sub> und 346 µmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR) durchgeführt (siehe 2.4.2.). Mittelwerte und SE aus Messungen an vier verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Nach neun Wochen Wachstum unter diesen Bedingungen zeigten junge Blätter der transgenen Linien allerdings eine starke Reduktion der  $\text{CO}_2$ -Assimilation im Vergleich mit Wildtypblättern (Abb. 3.17b). Die Abnahme der  $\text{CO}_2$ -Assimilation korrelierte damit mit der Abnahme der Chlorophyllgehalte der Blätter (Abb. 3.10a).

In Pflanzen in Hydrokultur mit  $10 \text{ mM NO}_3^-$  gab es nach vier Wochen Wachstum nur geringe Unterschiede in der  $\text{CO}_2$ -Assimilation zwischen Wildtyp und P-Antisense-Linien (Abb. 3.17c); die  $\text{CO}_2$ -Assimilation in den transgenen Linien war leicht höher als die vom Wildtyp. Eine Reduktion der GDC-Aktivität führte also zu einer Reduktion der  $\text{CO}_2$ -Assimilation in jungen Blättern älterer Pflanzen oder wenn die Pflanzen unter erniedrigten  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen wuchsen.

Im Vorigen wurde gezeigt, dass die Reduktion der GDC-Aktivität in den P-Antisense-Linien in einigen Fällen zu einem Anstieg an Glyoxylat führte. Höhere Glyoxylatspiegel wurden in älteren Blättern (Abb. 3.15b), aber auch in jüngeren Blättern gefunden, wenn die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Anzuchttraum unter  $360 \text{ ppm CO}_2$  erniedrigt wurde (Abb. 3.15a). Andererseits bewirkten erniedrigte  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen eine Reduktion der  $\text{CO}_2$ -Assimilation in den transgenen Pflanzen im Vergleich mit dem Wildtyp (Abb. 3.17a). Daher wurde untersucht, ob der Anstieg an Glyoxylat mit einer Änderung des Gehaltes an Intermediaten des Calvin-Zyklus verbunden war. Blätter von auf Erde bei nicht kontrollierten  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen ( $\sim 450\text{-}290 \text{ ppm}$ ) kultivierten Pflanzen wiesen reduzierte Gehalte an Glycerat-3-Phosphat auf (Abb. 3.18b). Die Abnahme an Glycerat-3-Phosphat korrelierte in diesen Blättern mit einem Anstieg an Glyoxylat (Abb. 3.18a).



**Abb. 3.18: Gehalt an Glyoxylat und Glycerat-3-Phosphat in Blättern von P-Antisense-Kartoffelpflanzen mit reduzierten  $\text{CO}_2$ -Assimilationsraten.** Der Gehalt an Glyoxylat (a) und Glycerat-3-Phosphat (b) wurde in Blättern von in Erde angezogenen Pflanzen nach acht Wochen Wachstum bei nicht kontrollierten  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen ( $\sim 450\text{-}290 \text{ ppm}$ ) gemessen. Mittelwerte und SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Da die transgenen Linien in Hydrokultur im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöhte  $\text{CO}_2$ -Assimilationsraten aufwiesen (Abb. 3.17c), wurde untersucht, ob diese leichte Verbesserung der photosynthetischen Leistung auf einer erhöhten RubisCO-Aktivität beruhte. Die RubisCO-Aktivität wurde in jungen Blättern von in Hydrokultur mit  $10 \text{ mM NO}_3^-$  kultivierten

Pflanzen bestimmt (Tab. 3.2). Die *in vivo*-Aktivität der RubisCO war in transgenen Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen leicht erhöht; die maximale Aktivität war aber nicht signifikant verändert. Der Aktivierungszustand der RubisCO war in der Linie F14-59 leicht reduziert.

**Tab. 3.2: Aktivität und Aktivierungszustand der RubisCO in Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen.** Die Pflanzen wuchsen vier Wochen in Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> bei 360 ppm CO<sub>2</sub> und 275±25 μmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR). Mittelwerte ± SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

	<i>in vivo</i> -Aktivität [μmol CO <sub>2</sub> ·min <sup>-1</sup> ·mg Protein <sup>-1</sup> ]	maximale Aktivität	Aktivierungszustand [%]
Solara	17 ± 2	170 ± 17	10
F14-38	23 ± 4	219 ± 34	10
F14-59	22 ± 1	179 ± 12	12

### 3.2.5.2. Effekte verschiedener Photorespirationsraten auf die CO<sub>2</sub>-Assimilation in Pflanzen mit reduzierter Menge an P-Protein

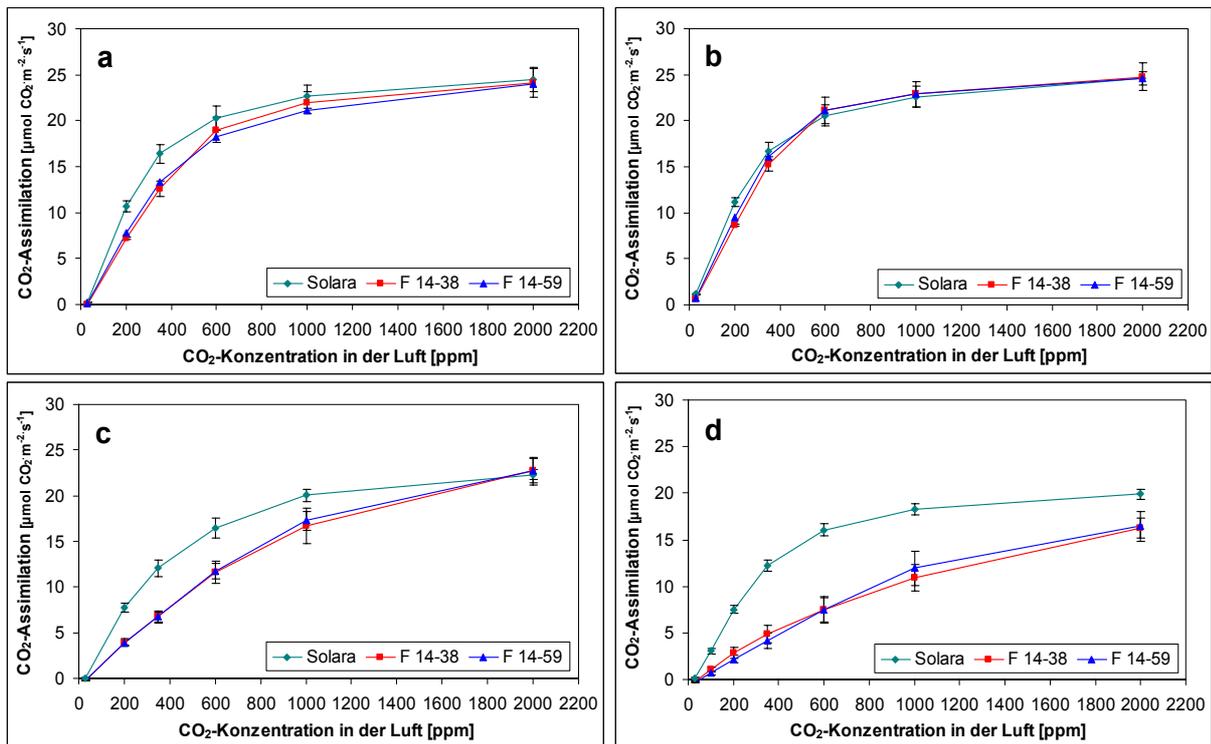
Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die CO<sub>2</sub>-Assimilation in den P-Antisense-Linien unter Anzuchtbedingungen nur in Blättern reduziert war, die verringerte Chlorophyllgehalte aufwiesen, während sie in Blättern mit normalen Chlorophyllgehalten unverändert war. Dieses Ergebnis ließ annehmen, dass die GDC-Aktivität für die CO<sub>2</sub>-Assimilation unter Anzuchtbedingungen nicht limitierend war.

Andererseits deutete die Akkumulation einiger Intermediate der Photorespiration (siehe 3.2.3.) aufgrund der Reduktion der GDC-Aktivität (Winzer *et al.* 2001) an, dass in den transgenen Pflanzen der Fluss von Intermediaten durch den C2-Zyklus behindert war. Es stellte sich also die Frage, unter welchen Bedingungen eine Limitierung der CO<sub>2</sub>-Assimilation durch den C2-Zyklus eintritt.

Daher wurden CO<sub>2</sub>-Sättigungskurven der Photosynthese unter hohen Quantenflüssen aufgenommen. Unter diesen Bedingungen wird die Aktivität des Calvin-Zyklus stimuliert und damit ein hoher Fluss von Intermediaten gewährleistet. Durch Änderung der CO<sub>2</sub>-Konzentration werden dann verschiedene Flussraten durch den C2-Zyklus erzeugt. Außerdem wurde der Einfluss der NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Versorgung und CO<sub>2</sub>-Konzentration (Abb. 3.16) während des Wachstums sowie der Einfluss des Pflanzenalters auf die CO<sub>2</sub>-Assimilation unter erhöhten Photorespirationsraten untersucht.

Nach acht Wochen Wachstum in Erde zeigten junge Blätter der P-Antisense-Linien normale CO<sub>2</sub>-Assimilation unter Anzuchtbedingungen (Abb. 3.17b). Bei sättigenden Licht trat dagegen schon bei 600 ppm CO<sub>2</sub> eine Reduktion der CO<sub>2</sub>-Assimilation in diesen Pflanzen

auf (Abb. 3.19a). Nur bei  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen von  $>1000$  ppm wurden die Wirkungen der Photorespiration in diesen Pflanzen aufgehoben (Abb. 3.19a).



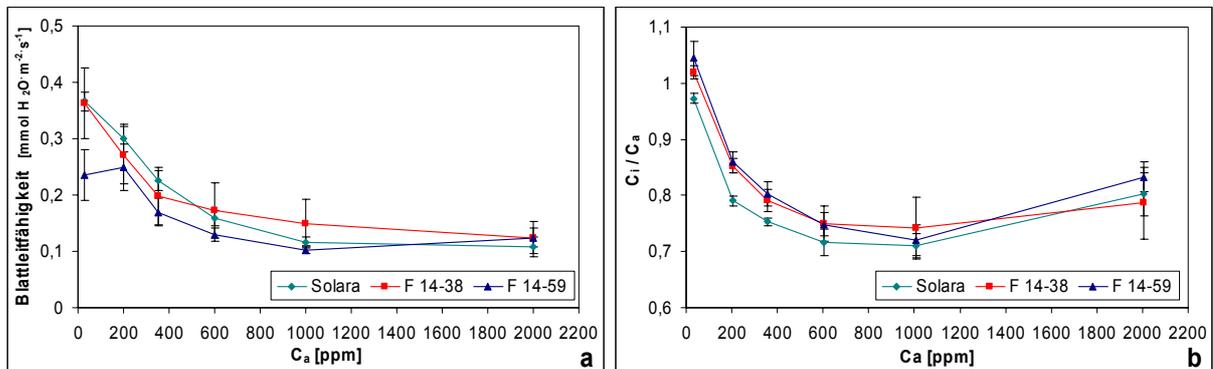
**Abb. 3.19:  $\text{CO}_2$ -Sättigung der Photosynthese in Wildtyp und P-Antisense-Pflanzen aus verschiedenen Anzuchtbedingungen.** Die Pflanzen wuchsen acht Wochen in Erde bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) (a) oder vier Wochen in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  und bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) (b) oder acht Wochen in Erde bei nicht kontrollierter  $\text{CO}_2$ -Konzentration (~450-290 ppm) (c) oder zehn Wochen in Erde bei nicht kontrollierter  $\text{CO}_2$ -Konzentration (d) und  $275 \pm 25 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR). Die Gasanalyse wurde jeweils mit dem fünften Blatt des Hauptsprosses bei 945 (a; c; d) bzw. 1436 (b)  $\mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR) durchgeführt (siehe 2.4.3.). Mittelwerte und SE aus Messungen an vier verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

P-Antisense-Pflanzen in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  zeigten eine geringere Empfindlichkeit der  $\text{CO}_2$ -Assimilation als die Pflanzen in Erde. Erst unter niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen ( $<200$  ppm) trat eine Verminderung der  $\text{CO}_2$ -Assimilation (bis zu 50 % bei 30 ppm  $\text{CO}_2$ ) auf, die wegen des Maßstabs der Auftragung in der Abbildung nicht deutlich zu erkennen ist (Abb. 3.19b). Wie in Abbildung 3.17a gezeigt wurde, führt eine verringerte  $\text{CO}_2$ -Konzentration während des Wachstums zu einer erniedrigten photosynthetischen Leistung in den transgenen Pflanzen. Wird die Assimilationsrate bei sättigender  $\text{CO}_2$ -Konzentration und hoher Lichtintensität bestimmt, sind die Messwerte identisch (Abb. 3.19c). Unter niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen dagegen war die  $\text{CO}_2$ -Assimilation in diesen Pflanzen deutlich niedriger als in Abbildung 3.19a.

Bei zehn Wochen alten Pflanzen, die auf Erde bei unkontrollierten  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen (~450-290 ppm) kultiviert worden waren, war die  $\text{CO}_2$ -Assimilation in den transgenen Linien unter photorespiratorischen Bedingungen noch weiter reduziert. Diese Limitierung der Photosynthese konnte durch hohe  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen nicht aufgehoben werden (Abb.

3.19d). Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduzierte Chlorophyllgehalte aufwiesen (37 % für die Linie F14-38 bzw. 38 % für F14-59).

Eine Reduktion in der  $\text{CO}_2$ -Assimilation kann entweder durch die Kapazität der  $\text{CO}_2$ -Assimilation oder durch eine Reduktion in der  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit hervorgerufen werden, z. B. durch eine stomatär bedingte Reduktion des  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks im Blattinneren ( $C_i$ ). Die Öffnungsweite der Stomata, gemessen als Blattleitfähigkeit, war in den transgenen Linien bei niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen leicht reduziert (Abb. 3.20a). Ob diese Reduktion der Stomataöffnung eine Limitation der Diffusion von  $\text{CO}_2$  ins Blatt verursachte, ließ sich untersuchen, indem die  $\text{CO}_2$ -Partialdruckverhältnisse zwischen dem Blattinneren und der Luft um das Blatt berechnet wurde. Bei niedrigeren  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen war der  $C_i/C_a$ -Quotient im Blättern der Wildtyppflanzen deutlich niedriger als in Blättern der transgenen Linien (Abb. 3.20b). Damit lässt sich eine stomatäre Limitation der  $\text{CO}_2$ -Assimilation in den transgenen Pflanzen ausschließen.



**Abb. 3.20: Blattleitfähigkeit und  $\text{CO}_2$ -Konzentrations-Verhältnis zwischen dem Blattinneren ( $C_i$ ) und der Außenluft ( $C_a$ ) bei verschiedenen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen und  $945 \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PAR) in Wildtyp und P-Antisense-Pflanzen. a) Blattleitfähigkeit für Wasserdampf und b)  $\text{CO}_2$ -Konzentrations-Verhältnis ( $C_i/C_a$ ). Die Werte wurden aus dem Datensatz ermittelt, der auch für die  $\text{CO}_2$ -Sättigungskurve von Abb. 3.18c verwendet wurde. Mittelwerte und SE aus Messungen an vier verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.**

Aus den Gaswechselfmessungen lassen sich weitere Photosyntheseparameter wie Photorespirationsrate,  $\text{CO}_2$ -Kompensationspunkt ( $\Gamma$ ), Carboxylierungseffizienz (CE) oder Wassernutzungseffizienz (WUE) errechnen. Diese Parameter liefern Informationen über die im Blatt stattfindenden Prozesse. Allerdings ist zu prüfen, ob die aus diesen Parametern abgeleiteten Aussagen auch auf diese transgenen Pflanzen anwendbar sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Die Carboxylierungseffizienz (CE) ist die Anfangssteigung einer  $\text{CO}_2$ -Sättigungskurve bei Auftragung der Assimilation gegen die  $\text{CO}_2$ -Konzentration des Interzellularraumes. Nach v. Caemmerer und Farquhar (1981) ist die Carboxylierungseffizienz der maximalen RubisCO-Aktivität proportional.

Die CE ist in den transgenen Linien um die Hälfte reduziert (Tab. 3.3), wie man auch auf Abbildung 3.19c erkennen kann. Unter hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, unter denen die RubisCO-Aktivität als limitierender Faktor angesehen wird, findet man aber keine erniedrigten CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten (Abb. 3.19c). Damit ist der Parameter CE in diesen Pflanzen nicht mit der maximalen RubisCO-Aktivität korrelierbar.

**Tab. 3.3: Photosyntheseparameter in Wildtyp und P-Antisense-Pflanzen.** Die Photosyntheseparameter wurden aus den Messungen der CO<sub>2</sub>-Sättigungskurve (Abb. 3.19c) und den dazugehörigen Evaporationswerten ermittelt. Blattleitfähigkeit und Wassernutzungseffizienz (WUE) werden nur für 350 ppm CO<sub>2</sub> angegeben. Die Respirationsraten wurden durch Inkubation der Blätter im Dunkeln bei 360 ppm bestimmt. Mittelwerte ± SE aus Messungen an vier verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

	Solara	F14-38	F14-59
CE [mol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	0,059 ± 0,003	0,030 ± 0,003	0,029 ± 0,002
WUE [μmol CO <sub>2</sub> mmol H <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> ]	6,93 ± 0,26	5,57 ± 0,34	4,98 ± 0,40
Photorespiration [μmol CO <sub>2</sub> ·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	1,78 ± 0,04	1,21 ± 0,12	1,16 ± 0,02
Γ [ppm]	30 ± 2	41 ± 1	41 ± 3

Unter Wassernutzungseffizienz wird der Quotient aus CO<sub>2</sub>-Assimilation und Evaporation verstanden. Die Wassernutzungseffizienz in den transgenen Pflanzen ist aufgrund einer reduzierten CO<sub>2</sub>-Assimilation bei unveränderten Evaporationsraten im Vergleich mit dem Wildtyp reduziert (Tab. 3.3; siehe Abb. 3.19c und 3.20a).

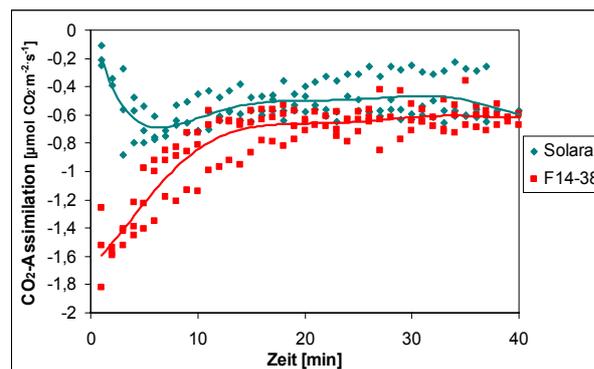
Photorespiration und CO<sub>2</sub>-Assimilation sind experimentell schwierig voneinander zu trennen. Die relativen Photorespirationsraten lassen sich auf verschiedene Weise abschätzen (Oliver 1998). Einige von diesen Verfahren basieren auf die Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Freisetzung bei der Decarboxylierung von Glycin und werden deshalb als indirekte Bestimmung der GDC-Aktivität verwendet.

Beim ersten dieser Verfahren wird sie durch Extrapolation der CO<sub>2</sub>-Assimilation bei 0 ppm CO<sub>2</sub> bei einer Auftragung der CO<sub>2</sub>-Assimilation gegen den CO<sub>2</sub>-Partialdruck des Interzellularraumes bestimmt. Der auf dieser Weise errechnete Wert für die Photorespirationsrate ist in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Tab. 3.3).

Ein zweites Verfahren ist die Bestimmung des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkts. Dies ist der CO<sub>2</sub>-Partialdruck, bei dem CO<sub>2</sub>-Aufnahme und Abgabe des Blattes im Gleichgewicht stehen. Er setzt sich zusammen aus der CO<sub>2</sub>-Fixierung durch die Carboxylasereaktion der RubisCO und die CO<sub>2</sub>-Freisetzung durch die Aktivität der GDC und des Citratzyklus, obwohl die letzteren Quellen der CO<sub>2</sub>-Freisetzung gegenüber der GDC-Aktivität im Licht vernachlässigbar sind. Am CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt also entspricht die CO<sub>2</sub>-Fixierung eines

Blattes exakt der  $\text{CO}_2$ -Freisetzung durch Photorespiration. Der  $\text{CO}_2$ -Kompensationspunkt in den transgenen Pflanzen ist höher als im Wildtyp (Tab. 3.3). Dies würde für eine erhöhte Photorespirationsrate sprechen.

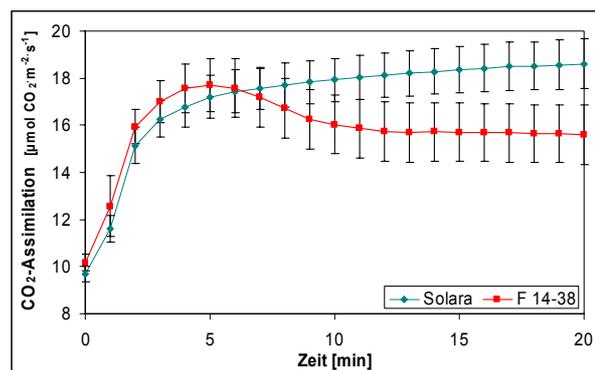
Im dritten Verfahren wird die  $\text{CO}_2$ -Freisetzung nach Unterbrechung der Belichtung („post-illumination  $\text{CO}_2$  burst“) analysiert. Für diese Untersuchung wurden vier Wochen alte Pflanzen verwendet, die in Hydrokultur mit  $10 \text{ mM NO}_3^-$  kultiviert worden waren. Der „ $\text{CO}_2$  burst“ war in den P-Antisense-Pflanzen größer als in den Wildtyppflanzen (Abb. 3.21). Dies ist aber vermutlich nicht die Folge einer erhöhten Photorespirationsrate, sondern lässt sich dadurch erklären, dass die transgenen Pflanzen große Menge an Glycin akkumulieren, das durch die GDC-Aktivität im Dunkel weiter decarboxyliert wird. Auch nach 30 min im Dunkeln waren die Respirationsraten in den transgenen Linien noch deutlich höher ( $0,62 \pm 0,06 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  für die Linie F14-38) als die im Wildtyp ( $0,48 \pm 0,09 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutungen, dass das in den Blättern der transgenen Linien während der Lichtphase akkumulierte Glycin hauptsächlich durch GDC-Aktivität abgebaut wird (Heineke *et al.* 2001).



**Abb. 3.21:  $\text{CO}_2$ -Freisetzung in Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Pflanzen nach Belichtung.** Die Pflanzen wuchsen vier Wochen in Hydrokultur bei  $360 \text{ ppm CO}_2$  (kontrolliert) und  $275 \pm 25 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR). Die Blätter wurden in eine Blattkammer eingespannt und mit  $360 \text{ ppm CO}_2$  in Luft bei  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $65 \%$  relativer Luftfeuchte begast und für  $20 \text{ min}$  mit  $271 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR) und anschließend für  $10 \text{ min}$  mit  $1436 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  belichtet. Dann wurde die Belichtung ausgeschaltet und die  $\text{CO}_2$ -Freisetzung verfolgt (siehe 2.4.). Einzelne Messwerte sowie die logarithmische Regressionskurve aus drei verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Bei der Aufnahme der  $\text{CO}_2$ -Sättigungskurven wurden  $\text{CO}_2$ -Assimilationswerte unter „steady state-Bedingungen“ ermittelt. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, mit welcher Kinetik die  $\text{CO}_2$ -Assimilation der transgenen Pflanzen auf eine Erhöhung der Lichtintensität reagiert. Dazu wurden Blätter von in Hydrokultur mit  $10 \text{ mM NO}_3^-$  gewachsenen Pflanzen erst unter Anzuchtbedingungen inkubiert ( $360 \text{ ppm CO}_2$ ,  $271 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Nach Erreichen einer konstanten  $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate wurde die Lichtintensität auf  $1436 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  erhöht, um hoch photorespiratorische Bedingungen zu erzeugen, wie in Abb. 3.19b. Dann wurde die Veränderung der  $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate verfolgt (Abb. 3.22).

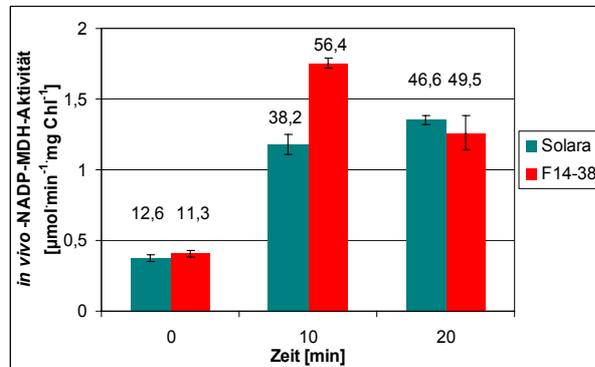
Die steady-state- $\text{CO}_2$ -Assimilationsraten in den Pflanzen der Linie F14-38 ( $10,2 \pm 0,4$ ) waren im Vergleich zum Wildtyp ( $9,7 \pm 0,3$ ) unverändert. Eine rasche initiale Zunahme der  $\text{CO}_2$ -Assimilation wurde sowohl in Wildtyp als auch in transgenen Pflanzen beobachtet. Dies sprach für eine normale Leistung der Lichtreaktionen und des Calvin-Zyklus der Photosynthese in den transgenen Pflanzen. Nach fünf Minuten Inkubation erreichten die Blätter der Linie F14-38 die maximalen Werte, und es trat eine Drosselung der  $\text{CO}_2$ -Assimilation auf. In Blätter des Wildtyps stieg die  $\text{CO}_2$ -Assimilation langsam weiter. Nach ca. 13 Minuten erreichten die Blätter der Linie F14-38 „steady state-Werte“, die deutlich niedriger waren als die des Wildtyps.



**Abb. 3.22: Kinetik der Änderungen in der  $\text{CO}_2$ -Assimilation bei kurzem Photostress in Wildtyp- und P-Antisense-Pflanzen** Die Pflanzen wuchsen sechs Wochen in Hydrokultur mit  $10 \text{ mM NO}_3^-$  bei  $360 \text{ ppm CO}_2$  (kontrolliert) und  $275 \pm 25 \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (PAR). Die Blätter wurden in eine Blattkammer eingespannt und mit  $360 \text{ ppm CO}_2$  in Luft bei  $23 \text{ °C}$  und  $65 \%$  relativer Luftfeuchte begast und mit  $271 \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (PAR) belichtet (siehe 2.4.). Nach Erreichen einer konstanten  $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate wurde die Lichtintensität auf  $1436 \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  erhöht. Mittelwerte und SE aus Messungen an vier verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Die in den transgenen Linien beobachtete Limitation der  $\text{CO}_2$ -Assimilation kann auf einer Limitation des Quantenflusses oder der Aktivität des Calvin-Zyklus beruhen. Da die Limitation durch eine Beeinflussung der Photorespirationsrate bewirkt wurde, erschien es wahrscheinlicher, dass die Aktivität des Calvin-Zyklus verantwortlich war. Dies lässt sich über die Reduktion des Stromas nachweisen. Wenn der Verbrauch an ATP und NADPH vermindert ist, kommt es zu einer Überreduktion des Stromas, was wiederum die Lichtreaktion bremst. Daher war zu prüfen, ob in den transgenen Pflanzen als Folge eines verminderten Verbrauchs an ATP und NADPH eine Überreduktion des Stromas auftrat. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Aktivität der NADP-abhängigen Malatdehydrogenase (NADP-MDH) in Blättern des Wildtyps und der transgenen Pflanzen nach kurzem Photostress verglichen. In Abbildung 3.23 sind die Ergebnisse für die Linie F14-38 dargestellt. Die NADP-MDH-Aktivitäten in F14-38-Blättern vor dem Photostress entsprachen denen im Wildtyp. Nach 10 min Photostress war die *in vivo*-NADP-MDH-Aktivität in F14-38 deutlich erhöht im Vergleich zum Wildtyp, was eine erhöhte Aktivierung des Enzyms bedeutete. Nach 20 min Photostress war die *in vivo*-NADP-MDH-Aktivität in F14-38 wieder

auf das Niveau der Wildtypaktivität zurückgegangen. Also nach Beginn der Drosselung der  $\text{CO}_2$ -Assimilation wurde eine Überreduktion des Stromas hervorgerufen. Dies deutet auf einer Limitierung der Aktivität des Calvin-Zyklus hin. Die Normalisierung des Reduktionsgrades des Stromas nach 20 min kann durch eine Anpassung der Lichtreaktion zum verminderten Verbrauch von Reduktionsäquivalenten und ATP im Stroma erklärt werden.



**Abb. 3.23: *In vivo*-Aktivität der NADP-abhängigen Malatdehydrogenase (MDH) in Wildtyp- und P-Antisense-Pflanzen bei kurzem Photostress.** Die Pflanzen wuchsen vier Wochen in Hydrokultur mit  $10 \text{ mM NO}_3^-$  und bei  $360 \text{ ppm CO}_2$  (kontrolliert) und  $275 \pm 25 \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (PAR). Die Blätter wurden in einer Blattkammer eingespannt und mit  $360 \text{ ppm CO}_2$  in Luft bei  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $65 \%$  relativer Luftfeuchte begast und mit  $271 \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (PAR) belichtet (siehe 2.4.). Nach Erreichen einer konstanten  $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate wurde die Lichtintensität auf  $1436 \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  erhöht. Mittelwerte und SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt. Die Zahlen über den Balken geben den Aktivierungszustand des Enzyms an.

### 3.2.5.3. Reduktionsgrad von PSII und Photoinhibition in Pflanzen mit reduzierter Menge an P-Protein

Im Vorigen wurde gezeigt, dass die  $\text{CO}_2$ -Assimilation unter Anzuchtbedingungen in den P-Antisense-Linien nur in Blättern reduziert war, die verringerte Chlorophyllgehalte aufweisen, während sie in Blättern mit normalen Chlorophyllgehalten unverändert war. Es stellte sich also die Frage, ob die Reduktion der photosynthetischen Leistung in den transgenen Pflanzen auf eine Minderung der Leistung des Photosyntheseapparates (d.h. an einen reduzierten Photonenfluss) oder auf eine verringerte Aktivität des Calvin-Zyklus zurückzuführen ist.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz ist ein geeignetes Mittel, um die Lichtreaktion der Photosynthese und ihre Wechselwirkung mit den biochemischen Reaktionen zu untersuchen. Lichtenergie kann ein Elektron eines Chlorophyllmoleküls von einem Grundzustand in einen angeregten Zustand überführen. Die Rückkehr in den Grundzustand kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Durch Übertragung des angeregten Elektrons auf einen Elektronenakzeptor (qP) kann die Anregungsenergie für biochemische Reaktionen genutzt werden oder sie kann durch Emission von Wärme (qN) oder Licht (d.h. Fluoreszenz) abgegeben werden. Wenn nur ein Teil der Anregungsenergie als Wärme abgegeben wird,

kann das Elektron in den Triplettzustand übergehen, von dem aus es  $O_2$  zu einem Singulettzustand ( $^1O_2$ ) anregen kann. Eine Änderung des Energietransfers durch einer der Wege beeinflusst die Ausbeute der anderen Prozesse. Deshalb kann durch Messung der Fluoreszenz von Chlorophyll *a*-Molekülen Information über die verschiedenen Prozesse der Photosynthese gewonnen werden.

Bei der Sättigungspulsmethode werden durch wiederholte Gabe von Sättigungspulsen Induktionskurven der Chlorophyllfluoreszenz erzeugt. Diese Kurven erlauben die kontinuierliche Verfolgung des Verhaltens der Photosynthese unter den Messbedingungen. Die Analyse verschiedener Parameter ermöglicht eine bessere Interpretation der komplexen Fluoreszenzsignale. Daher werden bei der Auswertung die maximale und die effektive Quantenausbeute sowie die photochemische (qP) und nicht-photochemische (qN) Löschung der Chlorophyllfluoreszenz bei normaler und erhöhter Lichtintensität und  $CO_2$ -Konzentration dargestellt.

Die maximale Quantenausbeute ( $F_v/F_m$ ) stellt die gesamte photochemische Leistung des PSII-Pools dar, die von einem Lichtimpuls erzielt werden kann, und korreliert mit der Anzahl an aktiven PSII-Komplexen. Eine signifikante Abnahme der  $F_v/F_m$  wird als Photoinhibition bezeichnet und wird induziert, wenn die Anregungsenergie die Dissipationsmechanismen übersättigt. Bei der Photoinhibition sind verschiedenen Prozesse beteiligt, nämlich sowohl Schutzmechanismen als auch Photoinaktivierung der PSIIs oder Photoinhibition *per se*. Zu den Schutzmechanismen gehört u.a. die Bildung von langlebigen dissipativen PSII-Komplexen. Man geht davon aus, dass die Photoinhibition *per se* auf einer Schädigung der Pigmente und Proteine im Reaktionszentrum (hauptsächlich der D1-Untereinheit) und auf einer Sättigung der Reparaturmechanismen für die inaktivierten PSII-Komplexe (D1-Protein-Turnover) und der dadurch resultierenden Akkumulierung von inaktiven PSII-Komplexen beruht. Die Ergebnisse der maximalen Quantenausbeute des PSII sind in Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5 zusammengefasst.

**Tab. 3.4: Maximale Quantenausbeute des PSII ( $F_v/F_m$ ) in Wildtyp- und P-Antisense-Pflanzen in Abhängigkeit von Pflanzenalter und  $CO_2$ -Konzentration während des Wachstums.** Die Pflanzen wuchsen 58 Tage in Erde bei  $275 \pm 25 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR) und 360 ppm  $CO_2$  und weitere zwölf Tage bei 290 ppm  $CO_2$  bzw. weiter bei 360 ppm.  $F_v/F_m$  wurde nach Inkubation der Blätter im Dunkeln für genau 15 min ermittelt. Mittelwerte  $\pm$  SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

		$F_v/F_m$		
		Solara	F14-38	F14-59
Tag 0	360 ppm	$0,77 \pm 0,00$	$0,77 \pm 0,00$	$0,78 \pm 0,00$
Tag 12	360 ppm	$0,76 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,01$
Tag 12	290 ppm	$0,76 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,06$	$0,63 \pm 0,08$

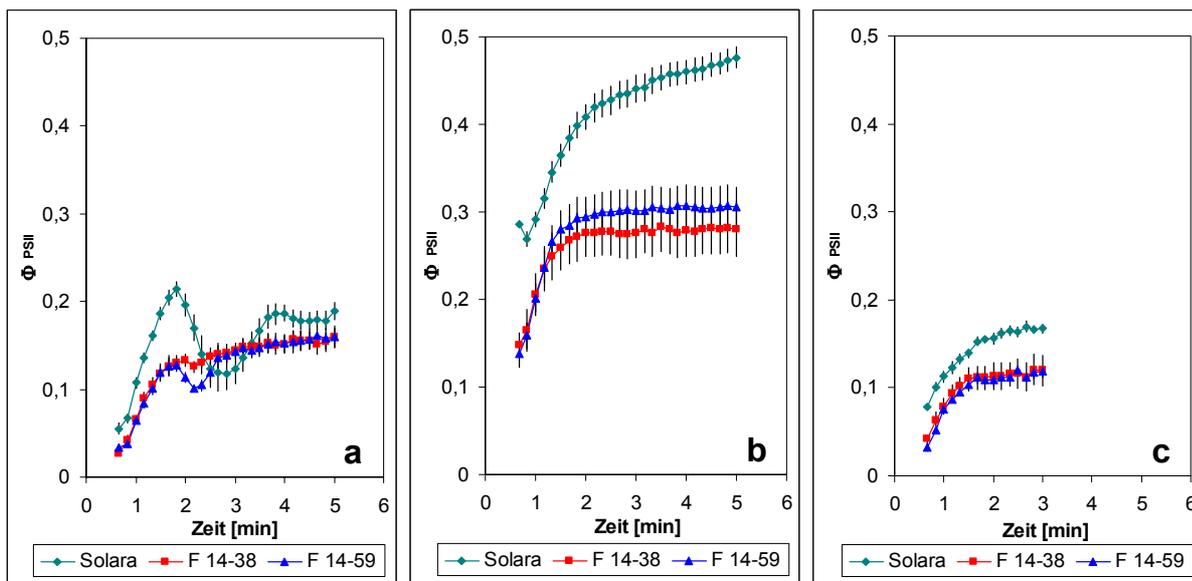
Nach vier Wochen Wachstum in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  ließ sich weder in den Blättern der P-Antisense-Linien noch in Wildtypblättern Photoinhibition nachweisen (Daten nicht gezeigt). Auch nach acht Wochen Wachstum in Erde bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  wurde keine Abnahme der  $F_v/F_m$  in jungen Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Tab. 3.4). Nach weiteren zwölf Tagen Wachstum bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  zeigten junge Blätter der transgenen Pflanzen erste Anzeichen von Photoinhibition, während das  $F_v/F_m$  im Wildtyp kaum verändert war (Tab. 3.4). Bei 12-tägigem Wachstum unter niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen (290 ppm) war die Photoinhibition in den transgenen Linien deutlich ausgeprägt (Tab. 3.4).

Chlorotische Blätter von 10 Wochen alten transgenen Pflanzen zeigten ebenfalls eine starke Reduktion von  $F_v/F_m$  (Tab. 3.5). Die Abnahme in diesem Parameter war charakterisiert durch eine Erhöhung der Grundfluoreszenz ( $F_0$ ), und eine Reduzierung der maximalen Fluoreszenz ( $F_m$ ). Es wird angenommen, dass eine Photoschädigung der Reaktionszentren eine Änderung von  $F_m$ , aber nicht von  $F_0$  verursacht, während Schutzmechanismen im Antennenkomplex  $F_0$  verändern (Setlik *et al.* 1990; Horton *et al.* 1996; Maxwell und Johnson 2000). Also finden beide Prozesse, nämlich Photoschädigung und Schutzmechanismen, in den transgenen Pflanzen statt.

**Tab. 3.5: Chlorotische Blätter von P-Antisense-Pflanzen: maximale Quantenausbeute von PSII ( $F_v/F_m$ ), Chlorophyllgehalt und Chl *a*/Chl *b*-Verhältnis.** Die Pflanzen wuchsen zehn Wochen in Erde bei nicht kontrollierter  $\text{CO}_2$ -Konzentration (~450-290 ppm; siehe Abb. 3.17) und  $275 \pm 25 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR).  $F_v/F_m$  wurde nach Inkubation der Blätter im Dunkeln für 30 min ermittelt. Mittelwerte  $\pm$  SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

	Solara	F14-38	F14-59
$F_v/F_m$	$0,75 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,02$
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i> -Verhältnis	$4,8 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$
Gesamtchlorophyllgehalt [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]	$29 \pm 1$	$19 \pm 1$	$18 \pm 2$

Zwei Fluoreszenzparameter, die effektive Quantenausbeute ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) und die photochemische Fluoreszenzlöschung (qP), liefern ein Maß für die photochemische Konversion der Anregungsenergie.  $\Phi_{\text{PSII}}$  repräsentiert den Anteil des durch das Chlorophyll in PSII absorbierten Lichtes, das für photochemische Reaktionen verwendet wird, und stellt ein Maß für die lineare Elektronentransportrate und damit die gesamte Photosyntheserate dar. qP berücksichtigt nur die aktiven PSII-Komplexe und dient als Maß für den Grad der Oxidation der Reaktionszentren (Maxwell und Johnson 2000). Die effektiven Quantenausbeuten in Blättern von Wildtyp und transgenen Linien unter verschiedenen Lichtbedingungen sind in Abbildung 3.24 dargestellt.



**Abb. 3.24: Effektive Quantenausbeute des PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) in Wildtyp- und P-Antisense-Pflanzen.** Die Pflanzen wuchsen zehn Wochen (69-70 Tage) in Erde bei nicht kontrollierter  $\text{CO}_2$ -Konzentration ( $\sim 450\text{-}290$  ppm; siehe Abb. 3.17) und  $275 \pm 25 \mu\text{mol Quanten}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (PAR). Nach 30 min Inkubation im Dunkeln wurden die Blätter bei 2000 ppm  $\text{CO}_2$  und  $945 \mu\text{mol Quanten}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (PAR) inkubiert (a); nach weiteren 15 min im Dunkeln wurden die Blätter bei 350 ppm  $\text{CO}_2$  und  $346 \mu\text{mol Quanten}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (PAR) inkubiert (b) und nach weiteren 12 min im Dunkeln wurden die Blätter bei 350 ppm  $\text{CO}_2$  und  $945 \mu\text{mol Quanten}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (PAR) inkubiert (c) (siehe 2.4. und 2.5.). Mittelwerte und SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Bei hohen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen und Lichtintensitäten (2000 ppm  $\text{CO}_2$ ,  $945 \mu\text{mol Quanten}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) traten in den Wildtyp starke Schwingungen im linearen Elektronentransport auf (Abb. 3.24a). Es ist bekannt, dass die Aktivierung des Calvin-Zyklus unter hohen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen und hoher Lichtintensität viel schneller abläuft als die Aktivierung der Saccharose-Synthese im Cytosol (Stitt und Grosse 1988). Diese Situation führt zu Phosphatmangel in den Chloroplasten und zu einer drastische Hemmung des Calvin-Zyklus. Die schnelle Abfolge von Aktivierungs- und Inhibitionsschritten des Calvin-Zyklus in den Chloroplasten bis zur vollständigen Aktivierung der Saccharose-Synthese im Cytosol wird durch starke Schwingungen des linearen Elektronentransportes reflektiert (Stitt und Schreiber *et al.* 1988). In den Blättern der transgenen Linien treten solche Schwankungen nicht auf (Abb. 3.24a), was darauf schließen lässt, dass die Saccharosesynthese die  $\text{CO}_2$ -Assimilationsrate in der Induktionsphase nicht limitiert.

Wenn die Pflanzen unter Anzuchtbedingungen, d.h. 350 ppm  $\text{CO}_2$  und  $346 \mu\text{mol Quanten}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  inkubiert wurden, war die effektive Quantenausbeute ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) im Wildtypblättern deutlich höher als in den transgenen Linien (Abb. 3.24b). Dieses Ergebnis deutet auf eine starke Limitation des linearen Elektronenflusses und Elektronentransfer aus dem PSI in den transgenen Pflanzen hin, die durch reduzierte Aktivität der bedeutendsten Reduktionsäquivalenten und ATP verbrauchenden Reaktionen im Stroma, nämlich Calvin-

Zyklus, Reassimilation von photorespiratorischen  $\text{NH}_4^+$  und Nitrit-Reduktion, bewirkt sein sollte.

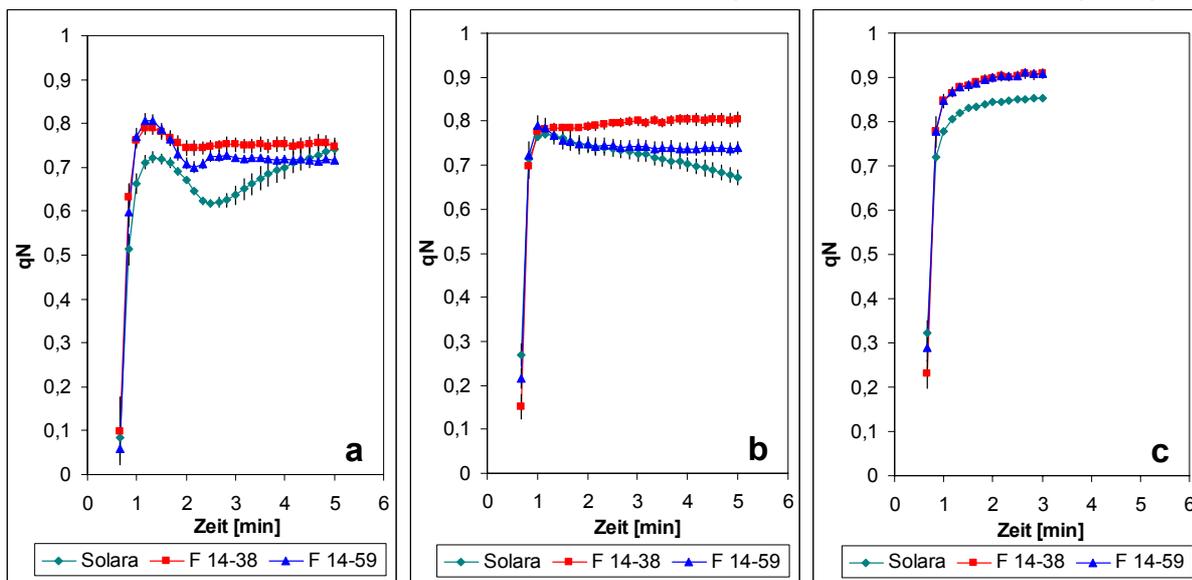
Wenn die Pflanzen unter Anzuchtbedingungen inkubiert wurden, war die photochemische Fluoreszenzlöschung  $qP$  in den Blättern des Wildtyps höher als in den Blättern der transgenen Linien (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet einen höheren Oxidationsgrad von PSII in Wildtypblättern als in den Blättern der transgenen Linien und reflektiert die Ergebnisse der effektiven Quantenausbeute, die einen stärkeren Elektronenfluss in Wildtypblättern zeigten. Eine stomatär bedingte Limitation der  $\text{CO}_2$ -Assimilation ließ sich ausschließen, da unter diesen Bedingungen der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck im Blattinneren ( $C_i$ ) in den transgenen Linien gegenüber dem Wildtyp nicht verändert war (Daten nicht gezeigt).

Wie oben besprochen wurde, kann die Ausbeute der Chlorophyllfluoreszenz noch durch andere Mechanismen als durch die Übertragung der angeregten Elektronen auf  $Q_A$  reduziert werden. Diese nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung ( $qN$ ) besteht aus drei verschiedenen Hauptkomponenten, die sich durch die Relaxationskinetik im Dunkel unterscheiden. Diese Komponenten sind die Energie-abhängige ( $qE$ ), die Transitions- ( $qT$ ) und die Inhibitions-Fluoreszenzlöschung ( $qI$ ). Die erste Phase der Relaxation der  $qN$  im Dunkel ( $t_{1/2} < 1$  min) ist durch  $qE$  bedingt.  $qE$  benötigt einen sauren pH-Wert im Thylakoid-Lumen, der im Dunkel schnell beseitigt wird, und ist mit der Bildung von Zeaxanthin verbunden. Die zweite Phase ( $t_{1/2} \approx 8$  min) ist durch  $qT$  bedingt (Krause und Weis 1991).  $qT$  wird mit dem Übergang der LHCI-Komplexe von „Zustand 1“ (dephosphoryliert) zu „Zustand 2“ (phosphoryliert) assoziiert. Durch diese Prozesse wird die Verteilung von Anregungsenergie zwischen den beiden Photosystemen reguliert.  $qI$  wird definiert als der Teil der durch Licht induzierten  $qN$ , der nach 30-40 min noch nicht aufgehoben ist. Dieser Parameter verursacht eine Reduzierung von  $F_v/F_m$  (Schreiber *et al.* 1998) und wird mit der Photoinhibition der Photosynthese assoziiert.

In Blättern des Wildtyps wurde unter Anzuchtbedingungen eine graduelle Abnahme der  $qN$  beobachtet (Abb. 3.25b). Diese graduelle Relaxation von  $qN$  bei Belichtung spiegelt den Abbau des pH-Gradienten durch die Aktivierung von Calvin-Zyklus wider (Schreiber *et al.* 1998). Die Suppression dieser Relaxation von  $qN$  in den Blättern der transgenen Linien deutet wiederum auf eine Limitierung der Photosynthese durch den Calvin-Zyklus hin (Abb. 3.25b).

Energie-abhängige Dissipationsprozesse reduzieren sowohl die variable als auch die Grundfluoreszenz. Der größte Anteil der Energie-abhängigen Fluoreszenzlöschung ( $qE$ ) ist charakterisiert durch die Abnahme der Grundfluoreszenz  $F_0$  zu  $F_0'$  und ist assoziiert mit der Bildung von Zeaxanthin und mit Dissipationsprozessen innerhalb des Antennenkomplexes. Der zweite Anteil, ohne Löschung von  $F_0$ , ist unabhängig von Zeaxanthin und assoziiert mit Energie-abhängigen Dissipationsprozessen in den Reaktionszentren von PSII (Krause und

Weis 1991; Osmond 1994). In den transgenen Pflanzen wurde neben den Anstieg von  $qN$  eine drastische Abnahme von  $F_0$  während der Belichtung beobachtet (Daten nicht gezeigt).

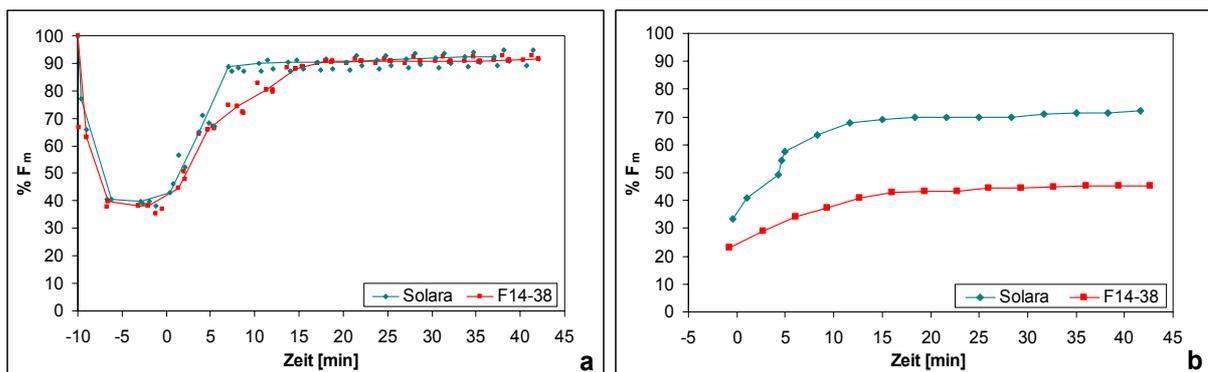


**Abb. 3.25: Nicht-photochemische Löschung der Chlorophyllfluoreszenz ( $qN$ ) in Wildtyp und P-Antisense-Pflanzen.** Die Parameter wurden aus demselben Datensatz berechnet, der auch Abb. 3.24 zugrunde liegt. Messbedingungen waren 30 min Dunkel, dann 2000 ppm  $CO_2$  und  $945 \mu mol Quanten \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  (PAR) inkubiert (a); dann weitere 15 min Dunkel, gefolgt von 350 ppm  $CO_2$  und  $346 \mu mol Quanten \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  (PAR) (b) und dann weitere 12 min Dunkel gefolgt von 350 ppm  $CO_2$  und  $945 \mu mol Quanten \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  (PAR) (c).

Chlorotische Blätter der transgenen Linien zeigten deutliche Photoinhibition (Tab. 3.5). Bei Inkubation der Blätter bei 360 ppm  $CO_2$  und  $945 \mu mol Quanten \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  wurde eine deutliche Zunahme der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung  $qN$  beobachtet. Dagegen wurde in jungen Blättern von acht Wochen alten transgenen Pflanzen unter den gleichen Bedingungen keine Zunahme von  $qN$  festgestellt (Daten nicht gezeigt). Allerdings trat in jungen Blättern von P-Antisense-Pflanzen bereits nach 5 min Inkubation bei hohen Lichtintensitäten ( $1436 \mu mol Quanten \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) und normalen  $CO_2$ -Konzentrationen (360 ppm) eine Limitierung der  $CO_2$ -Assimilation auf (Abb. 3.22). Die  $CO_2$ -Assimilationsraten waren nach 10 min Inkubation deutlich niedriger als in Wildtypblättern. Eine Limitierung der Aktivität des Calvin-Zyklus unter diesen Bedingungen führte vermutlich zu einer vorläufigen Überreduktion des Stroma, was sich in einer höheren *in vivo*-Aktivität und einem höheren Aktivierungszustand der NADP-Malatdehydrogenase widerspiegelte (Abb. 3.23). Der hohe Reduktionsgrad des Stroma verschwand aber nach 20 min Inkubation. Es ließ sich also vermuten, dass Dissipationsmechanismen am PSII aktiviert wurden, um den Überschuss von Anregungsenergie zu beseitigen. Es wurde also untersucht, ob während kurzem Photostress eine stärkere Induktion von  $qN$  in den transgenen Linien stattfand und welche Komponenten von  $qN$  spezifisch induziert werden. Dazu wurde die Induktion von  $qN$  nach Inkubation der Blätter für 10 min bei hohen Lichtintensitäten analysiert (Abb. 3.26). Die Versuchsbedingungen waren dabei die gleichen, die schon für die Untersuchung der  $CO_2$ -

Freisetzung (siehe Abb. 3.21) und für die Photostressbehandlung von Abb. 3.22 und 3.23 verwendet wurden.

Nach 10 min Inkubation bei hoher Lichtintensität wurde keine verstärkte Induktion von  $q_N$  in der transgenen Linie F14-38 im Vergleich mit dem Wildtyp beobachtet (Abb. 3.26a). Es wurde auch dabei keine Photoinhibition in F14-38 festgestellt. Überraschenderweise konnte man in F14-38 eine deutliche Induktion von  $q_T$  beobachten. Während Wildtypblätter nach sieben Minuten Inkubation im Dunkeln die maximalen  $F_m$ -Werte erreichten, dauerte es bei der Linie F14-38 etwa 15 min (Abb. 3.26a). Eine starke Photoinhibition trat erst nach 3 $\frac{1}{2}$ stündiger Inkubation bei hoher Lichtintensität auf. Bei F14-38 erholte sich die  $F_m$  zu 45 %, im Wildtyp zu 70 % des Wertes von vor der Belichtung (Abb. 3.26b).



**Abb. 3.26: Wiederherstellung der maximalen Chlorophyllfluoreszenz im Dunkeln nach Belichtung in Wildtyp- und P-Antisense-Pflanzen.** Die Pflanzen wuchsen vier Wochen in Hydrokultur bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) und  $275 \pm 25 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR). Die Blätter wurden in eine Blatkammer eingespannt und mit 360 ppm  $\text{CO}_2$  in Luft bei 23 °C und 65 % relativer Luftfeuchte begast (siehe 2.4.1.4.). Die maximale Chlorophyllfluoreszenz ( $F_m$ ) wurde nach Verdunkelung der Blätter über 40 min gemessen. Danach wurden die Blätter für 20 min mit  $271 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR) und anschließend für 10 min (a) oder für 3 $\frac{1}{2}$  h (b) mit  $1436 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  belichtet. Die maximale Chlorophyllfluoreszenz wurde während und nach der Belichtung in Abständen von 200 s durch sättigende Lichtimpulse ermittelt (siehe 2.5.). Messungen an drei (a) bzw. eine (b) verschiedenen Pflanzen pro Linie sind zusammengefasst.

#### 3.2.5.4. Symptome von oxidativem Stress in Pflanzen mit reduzierter Menge an P-Protein

Viele metabolische Prozesse führen zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. In grünen Pflanzengewebe ist das photosynthetische Elektronentransportsystem die Hauptquelle reaktiver Sauerstoffspezies.

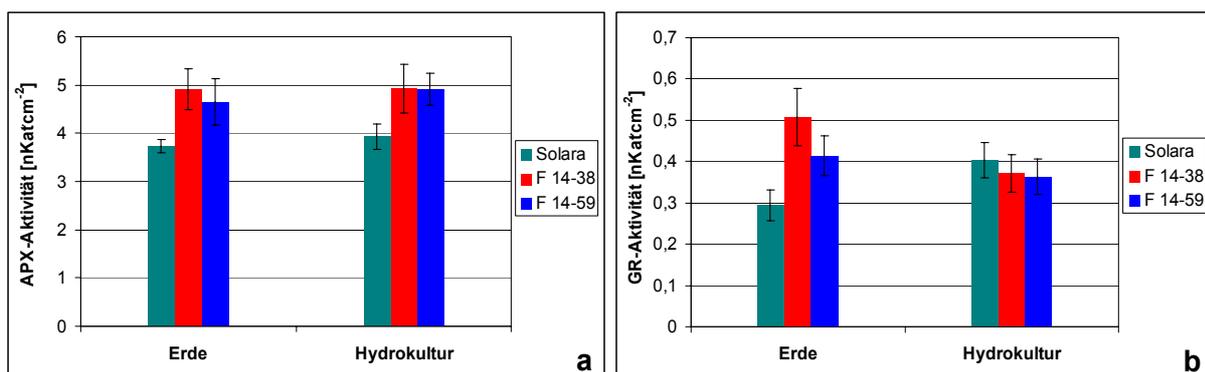
Singulett-Sauerstoff wird im PSII durch angeregte Chlorophyllmoleküle produziert, während die Entstehung von Superoxid am PSI durch die Mehler-Reaktion stattfindet. Selbst unter optimalen Bedingungen ist die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unvermeidlich als Konsequenz der Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette in einer Sauerstoffatmosphäre (Foyer *et al.* 1994).

Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies steigt unter Bedingungen, die zu einer Reduktion der  $\text{CO}_2$ -Assimilation führen. Als Folge einer Reduktion in der  $\text{CO}_2$ -

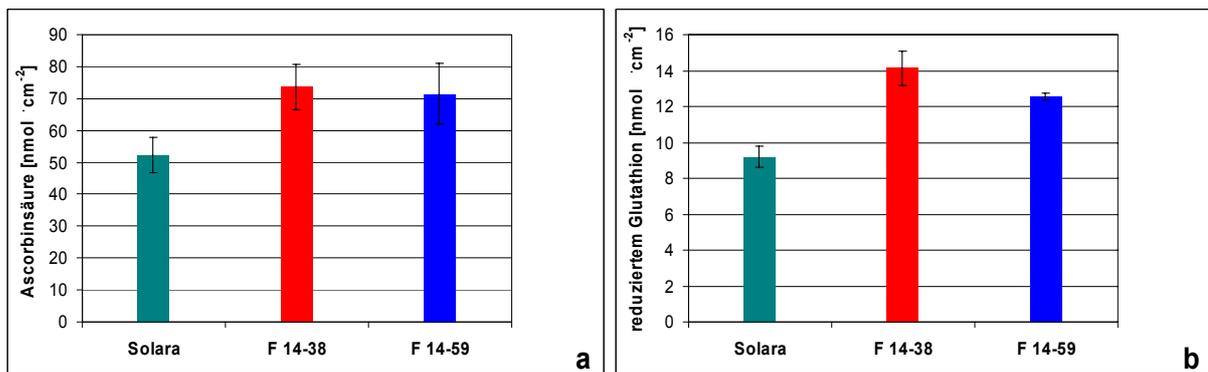
Assimilationsrate wird die Kapazität des photosynthetischen Elektronentransportsystems reduziert. Wenn aber die von den photosynthetischen Pigmenten aufgenommene Energie größer ist als die Kapazität für thermische Dissipation, werden Elektronen verstärkt auf Sauerstoff übertragen unter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Dies führt erstens zur Photoinhibition und zweitens zur Photooxidation.

Alle Pflanzenzellen enthalten ein sehr effektives antioxidatives Schutzsystem aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Komponenten, um die reaktiven Sauerstoffspezies zu entgiften. Während Superoxid und Wasserstoffperoxid durch Enzyme im Ascorbat-Glutathion-Zyklus entgiftet werden, wird die Entgiftung von Hydroxylradikals und Singulett-Sauerstoff durch nicht-enzymatische Systeme bewirkt (Foyer *et al.* 1994). Ascorbatperoxidase und Glutathionreduktase sind zwei Schlüsselenzyme im Ascorbat-Glutathion-Zyklus. Ascorbinsäure und Glutathion gehören zu den wichtigsten hydrophilen Antioxidantien und sind sowohl im Ascorbat-Glutathion-Zyklus als auch in der nicht-enzymatischen Entgiftung von Sauerstoffradikalien beteiligt. Ascorbinsäure ist auch an der Induktion nicht-photochemischer Dissipationsprozesse durch die Bildung von Zeaxanthin aus Violaxanthin beteiligt (Foyer *et al.* 1994; Müller-Moulé *et al.* 2002). Die Induktion des antioxidativen Verteidigungssystems ist daher ein Hinweis darauf, dass die Zelle photooxidativem Stress ausgesetzt ist.

Die Aktivität von Enzymen des antioxidativen Schutzsystems und der Gehalt an Antioxidantien wurde im Wildtyp und in den transgenen Linien untersucht (Abb. 3.27 und 3.28). Es stellte sich heraus, dass in den transgenen Linien sowohl die Aktivitäten von Ascorbatperoxidase und Glutathionreduktase (Abb. 3.27a und b) als auch die Konzentrationen von Ascorbinsäure und reduziertem Glutathion erhöht waren (Abb. 3.28a und b).



**Abb. 3.27: Aktivität von antioxidativen Enzyme in Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen** Die Aktivitäten der Ascorbatperoxidase (a) und der Glutathionreduktase (b) wurde nach acht Wochen Wachstum in Erde bei nicht kontrollierter CO<sub>2</sub>-Konzentration (~450-290 ppm; siehe Abb. 3.17). Für die Bestimmungen wurden jeweils Blattscheiben aus dem fünften Blatt des Hauptsprosses verwendet. Mittelwerte und SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.



**Abb. 3.28: Gehalt an Antioxidanten in Blätter von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen.** Der Gehalt an Ascorbinsäure (a) und an reduziertem Glutathion (b) wurde in Kartoffelpflanzen nach acht Wochen Wachstum in Erde bei nicht regulierter CO<sub>2</sub>-Konzentration bestimmt (siehe Abb. 3.17). Die Messungen wurden jeweils am fünften Blatt (von oben) des Hauptsprosses durchgeführt. Mittelwerte und SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

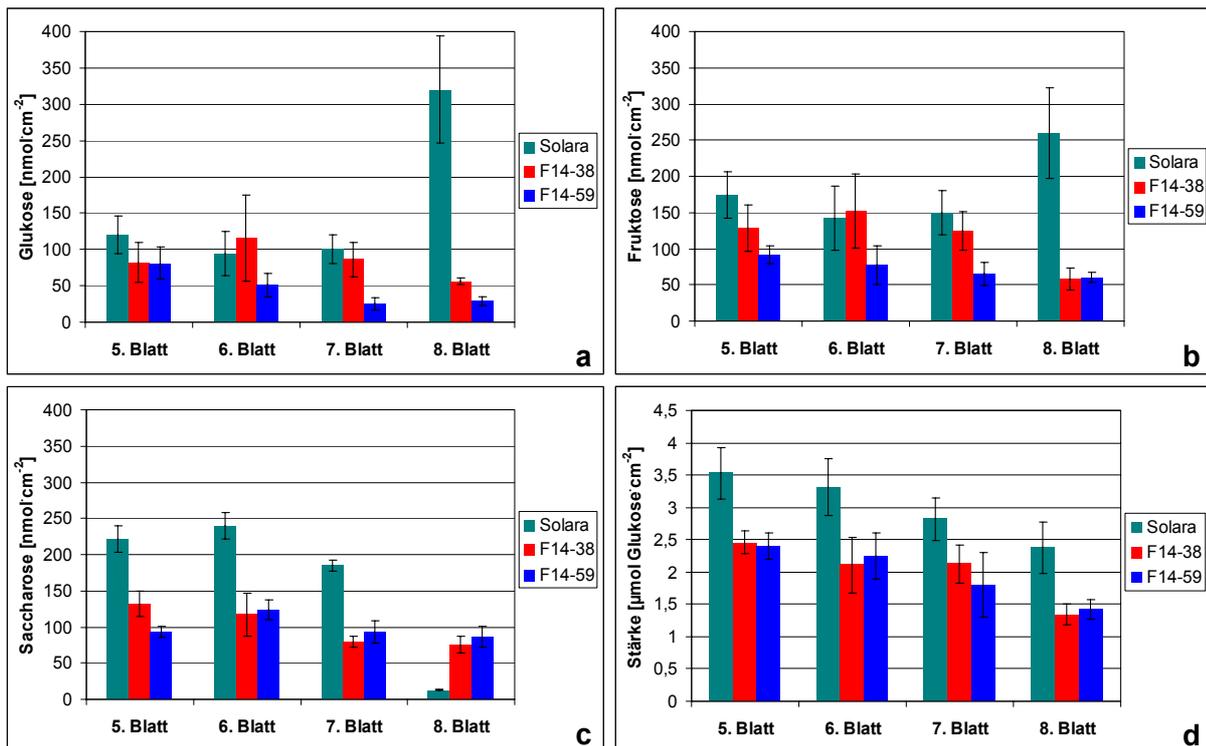
### 3.2.6. Wirkungen der Reduktion der Menge an P-Protein auf den C-Metabolismus

Die Bildung von Glycin aus Glyoxylat und von Hydroxypyruvat aus Serin bilden Verbindungen zwischen dem Pool von freien Aminosäuren und dem Pool von Kohlenstoffgerüsten aus dem Calvin-Zyklus. Die Refixierung von während der Photorespiration freigesetztem NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ermöglicht die Rückführung von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in den Aminosäurepool. Der Fluss von Kohlenstoff, und damit indirekt auch der Fluss von Stickstoff durch die Photorespiration werden durch die kinetischen Eigenschaften der RubisCO sowie durch das CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnis in der Atmosphäre bestimmt. Dabei muss die Synthese von organischen Säuren auf die Verfügbarkeit von Stickstoff abgestimmt werden. Durch eine Akkumulation von Glycin wird N dem anabolen Metabolismus entzogen. Die Reduktion der GDC-Aktivität in den transgenen Pflanzen hat also einen Einfluss auf die Verteilung von assimiliertem Kohlenstoff zwischen C- und N-Metabolismus. Um diesen Einfluss genauer zu charakterisieren, wurden im Weiteren verschiedene Parameter des C-Metabolismus, wie die Konzentrationen von Zuckern, Stärke und organischen Säuren untersucht.

#### 3.2.6.1. Hexosen und Stärke in Blätter mit reduzierter Menge an P-Protein

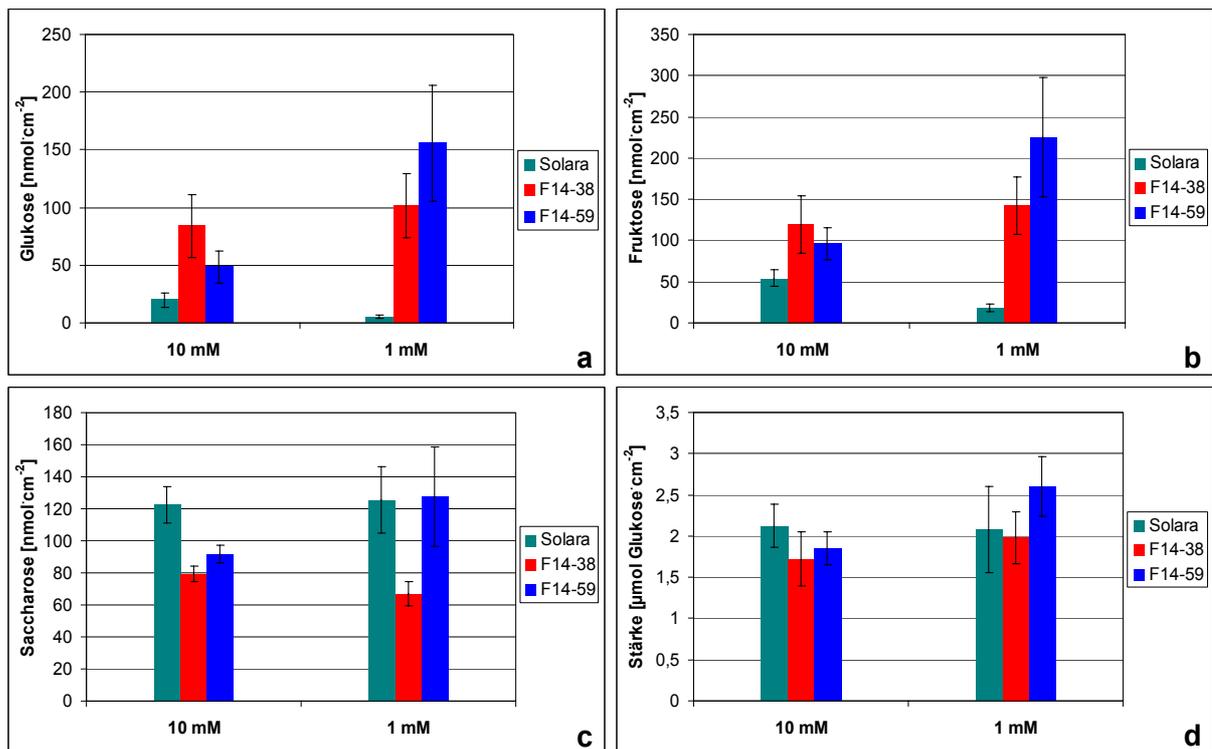
Wurden die Versuchspflanzen auf Erde angezogen, so war der Gehalt an Hexosen in Blättern der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp etwas reduziert, besonders in der Linie F14-59 (Abb. 3.29a und b). Der Saccharose- und Stärkegehalt war, vermutlich aufgrund der verminderten CO<sub>2</sub>-Assimilation, in den transgenen Linien stark reduziert (Abb. 3.29c und d). Dabei konnte man im Wildtyp eine deutliche Abhängigkeit des Saccharose- und Hexosegehalts vom Blattalter beobachten, sowie in geringerem Maße eine Abhängigkeit des Stärkegehalts, die in den Blättern der transgenen Linien nicht parallel verlief. In älteren Wildtypblättern wurden offenbar Hexosen aus Saccharose und womöglich auch aus Stärke

gebildet, vermutlich aufgrund einer Aktivierung der Glykolyse im Zuge der Seneszenz. Dies fand in den chlorotischen älteren Blättern der transgenen Pflanzen nicht statt.



**Abb. 3.29: Zucker- und Stärkegehalt in Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Pflanzen in Abhängigkeit vom Blattalter.** Der Gehalt an Glukose (a), Fructose (b), Saccharose (c) und Stärke (d) wurde in Blättern von in Erde angezogenen Pflanzen nach neun Wochen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (kontrolliert) bestimmt (siehe 2.3.1.2.). Die Blattnumerierung bezieht sich auf die Reihenfolge der Blätter des Hauptsprosses von der Spitze nach unten. Mittelwerte und SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Bei Wachstum in Hydrokultur dagegen waren in den Blättern der transgenen Pflanzen die Hexosekonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht und die Saccharosekonzentrationen reduziert. Diese Änderungen waren bei Hydrokultur mit <1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> besonders stark (Abb. 3.30a, b und c). Der Stärkegehalt war in Blättern der transgenen Linien in Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leicht reduziert im Vergleich mit Wildtypblättern, während er in Blättern von Pflanzen auf <1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> unverändert blieb (Abb. 3.30d). Da die Kartoffelpflanzen in Hydrokultur keine Knollen bildeten, sind die beobachteten Änderungen im Zuckergehalte vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Sink-Source-Verhältnisse sich in diesen Pflanzen von denen in Pflanzen auf Erde unterscheiden.



**Abb. 3.30: Zucker- und Stärkegehalt in Blätter von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen in Abhängigkeit vom Blattalter.** Der Gehalt an Glukose (a), Fruktose (b), Saccharose (c) und Stärke (d) wurde in Blätter von in Hydrokultur angezogenen Pflanzen nach neun Wochen Wachstum bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) bestimmt (siehe 2.3.1.3.). Mittelwerte und SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

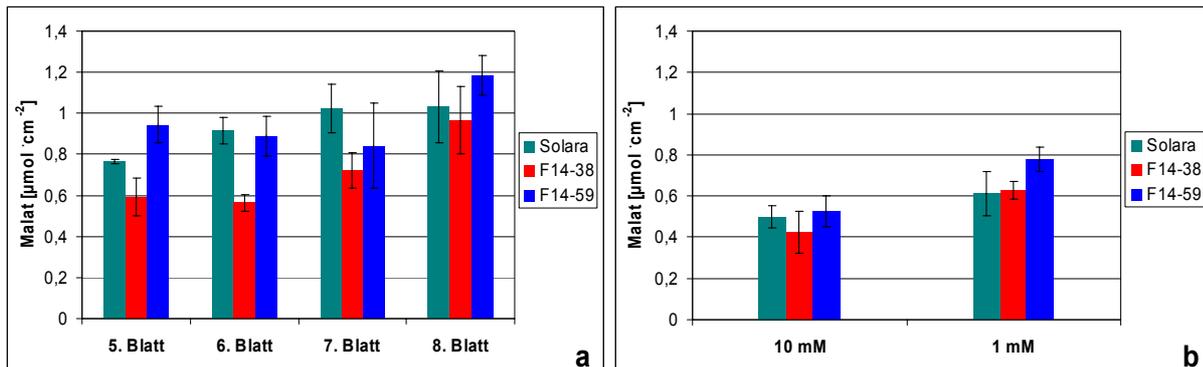
### 3.2.6.2. Organische Säuren in Blätter mit reduzierter Menge an P-Protein

In chlorotischen Blättern von Kartoffelpflanzen mit einer blattspezifischen Antisense-Inhibierung der Synthese von P-Protein wurde eine drei- bis fünffache Akkumulation von Malat festgestellt (Heineke *et al.* 2001), während Blätter dieser Pflanzen mit normalen Chlorophyllgehalten keinen Anstieg an Malat aufwiesen. Andere Untersuchungen an diesen transgenen Pflanzen zeigten neben der beschriebenen Malatakkumulation eine bis zum 1000fache Akkumulation an  $\alpha$ -Ketoglutarat und eine 100fache Akkumulation an Pyruvat in den chlorotischen Blättern (Schmelzer 1998). Es wurde also eine Auswirkung der Glycinakkumulation auf die Konzentration von organischen Säuren vermutet.

Die Glycinakkumulation in den hier untersuchten Kartoffelpflanzen mit einer mesophyllspezifischen Inhibierung der Synthese von P-Protein war unterschiedlich in Blättern von verschiedenem Alter und auch abhängig von der N-Versorgung. Daher wurde der Malatgehalt in Blättern dieser Pflanzen in Abhängigkeit von Blattalter und N-Versorgung untersucht.

Sowohl in Erde als auch in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  war der Malatgehalt in Blätter der transgenen Linie F14-38 reduziert im Vergleich mit dem Wildtyp. In der Linie F14-59 war er dagegen unverändert. Der Malatgehalt in Blätter von Wildtyppflanzen stieg in Abhängigkeit mit dem Blattalter (Abb. 3.31a). Blätter von Pflanzen in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  hatten

weniger Malat als die von Pflanzen in Erde. Bei  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  war der Malatgehalt der Blätter sowohl in Wildtyp als auch in den transgenen Linien höher als in Pflanzen auf Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  (Abb. 3.31b). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den oben beschriebenen Beobachtungen in chlorotischen Blättern von Kartoffelpflanzen mit einer blattspezifischen Antisense-Inhibierung der Synthese des P-Proteins. Es ist allerdings zu bemerken, dass die hier untersuchten Blätter der mesophyllspezifischen P-Antisense-Linien einen leichteren Chlorose-Phänotyp aufwiesen als die Blätter der P-Antisense-Pflanzen, in denen der Malatgehalt in chlorotischen Blättern stark anstieg.



**Abb. 3.31: Gehalt an Malat in Blätter von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen in Abhängigkeit vom Blattalter.** Der Gehalt an Malat wurde in Blättern von in Erde angezogenen Pflanzen nach neun Wochen Wachstum bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) bestimmt. Die Blattnumerierung bezieht sich auf die Anordnung der Blätter des Hauptsprosses von der Spitze nach unten. Mittelwerte und SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

### 3.2.7. Wirkungen der Reduktion der Menge an P-Protein auf den N-Metabolismus

Der Spiegel an freien Aminosäuren in Blättern spiegelt das Gleichgewicht zwischen *de novo*-Synthese von Aminosäuren aus  $\text{NH}_4^+$  und organischen Säuren ( $\text{NH}_4^+$ -Assimilierung), Proteinsynthese und -turnover und Export von Aminosäuren im Phloem wider. Aminosäuren sind Intermediate des C2-Zyklus, während  $\text{NH}_4^+$  durch die GDC-Aktivität freigesetzt wird. Durch die GS-GOGAT-Aktivität wird das freigesetzte N für den Pool von Aminosäuren zurückgewonnen (refixiert). Aufgrund der hohen Photorespirationsraten im Licht wird eine große Menge von amino-N durch den C2-Zyklus umgesetzt. Daher könnte eine Minderung der GDC-Aktivität Wirkungen auf den Spiegel von anderen Aminosäuren, auf den Aminosäureexport, die Proteinsynthese und die Nitratassimilation haben.

#### 3.2.7.1. Aminosäuren in Blättern mit reduzierter Menge an P-Protein

Die in den transgenen Linien beobachtete Glycinakkumulation lässt zunächst vermuten, dass die Konzentrationen anderer Aminosäuren verändert sind. Dies wurde durch eine Analyse aller Aminosäuren in Blättern von Wildtyp und transgenen Linien unter Berücksichtigung der Kulturbedingungen und des Blattalters untersucht.

Wie in 3.2.4. gezeigt wurde (Abb. 3.13a und b), steigt der Glycingehalt in den transgenen Linien bei Kultur auf Erde bis zum 70fachen des Wildtyps, während der Seringehalt nur wenig geändert ist (Tab. 3.6). Das Glycin/Serin-Verhältnis lag in den Wildtypblättern bei 0,3. Aufgrund der Glycinakkumulation stieg es in den transgenen Linien F14-38 und F14-59 auf 20 bzw. 21. Der Gehalt an Glutamat, dem Aminodonor bei der Transaminierung von Glyoxylat, ist in den transgenen Pflanzen deutlich reduziert, während der Gehalt an Glutamin unverändert bleibt (Tab. 3.6; Abb. 3.13c und d). Das Glutamat/Glutamin-Verhältnis betrug in den transgenen Pflanzen 11 bzw. 12 für die Linie F14-38 bzw. F14-59, während es im Wildtyp bei 37 lag. Aufgrund der Akkumulation von Glycin stieg der gesamte Aminosäuregehalt in den transgenen Linien (Tab. 3.6).

**Tab. 3.6: Aminosäuregehalte in Blätter von Wildtyp- und P-Antisense-Pflanzen nach Anzucht in Erde.** Die Gehalte an verschiedenen freien Aminosäuren wurden in jeweils den fünften bis achten Blatt des Hauptsprosses einer Kartoffelpflanze nach neun Wochen Wachstum in Erde bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (kontrolliert) bestimmt (siehe 2.3.1.2.). Die Gehalte an Glycin, Serin, Glutamat und Glutamin, getrennt nach Blattstufe, wurden bereits in Abb. 3.13 gezeigt. Mittelwerte  $\pm$  SE aus Bestimmungen an vier Blattstufen in fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt (n = 20).

	Solara	F14-38 [nmol·cm <sup>-2</sup> ]	F14-59
Glycin	4 $\pm$ 0	262 $\pm$ 40	288 $\pm$ 49
Serin	22 $\pm$ 3	26 $\pm$ 4	25 $\pm$ 4
Glu	109 $\pm$ 5	62 $\pm$ 9	62 $\pm$ 6
Gln	10 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2
Asp	22 $\pm$ 2	16 $\pm$ 5	12 $\pm$ 4
Asn	0,7 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1
andere AS	91 $\pm$ 4	105 $\pm$ 8	83 $\pm$ 8
$\Sigma$ AS	204 $\pm$ 9	417 $\pm$ 36	431 $\pm$ 41

Beim Vergleich von Tabelle 3.6 mit Tabelle 3.7 erkennt man, dass sich die Gesamtaminosäuregehalte der Blätter von Wildtyppflanzen bei Wachstum in Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und auf Erde nicht unterscheiden. Der Unterschied in der Verfügbarkeit von Nitrat drückte sich in einer Veränderung des Glutamat/Glutamin-Verhältnisses aus, das bei Wachstum in Erde bei 37 und bei Wachstum in Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, also bei N-Überschuss, bei 3,8 lag. Das Verhältnis Aspartat/Asparagin änderte sich ebenfalls in Wildtypblättern von 31 in Erde auf 42 in Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Der Aminosäuremuster in Blätter der transgenen Pflanzen in Hydrokultur bei 10 mM  $\text{NO}_3^-$  zeigten gleiche Tendenzen wie in Erde (Tab. 3.6) mit der Ausnahme von Glutamin, dessen Gehalt in den transgenen Linien bei 10 mM  $\text{NO}_3^-$  deutlich geringer war als in Wildtypblättern (Tab. 3.7). Dieser Unterschied resultierte aus der deutlichen Erhöhung des Glutamingehaltes der Wildtypblätter, denn in den transgenen Linien waren die Glutamingehalte in Hydrokultur bei 10 mM  $\text{NO}_3^-$  und in Erde ähnlich.

Bei Kultur in  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  sind große Unterschiede im Aminosäuremuster zu erkennen. Blätter von Wildtyppflanzen zeigten eine deutliche Zunahme von Serin, Glutamat, Glutamin, Aspartat und Asparagin, während die Gehalte an Glycin und anderen Aminosäuren in diesen Blättern unverändert blieben (Tab. 3.7). Parallel zu diesen Änderungen sank das Verhältnis Glutamat/Glutamin auf 1,1 und das Verhältnis Aspartat/Asparagin auf 23. Der gesamte Aminosäuregehalt in Wildtypblättern stieg um 99 %.

Blätter der transgenen Linien zeigten bei  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  eine stärkere Akkumulation von Glycin, wie in 3.2.4. besprochen wurde, diese Erhöhung war auch verantwortlich für den Anstieg des Gesamtaminosäuregehalts (Tab. 3.7). Die Gehalte an den Aminosäuren, die an der Transaminierung von Glycin beteiligt sind, nämlich Glutamat und Serin, und den anderen Aminosäuren wie Glutamin und Asparagin und seinem Transaminierungspartner Aspartat, sanken in den transgenen Linien stark im Vergleich mit dem Wildtyp unter den gleichen Anzuchtbedingungen, aber nicht unter die Werte, die in diesen Linien bei 10 mM  $\text{NO}_3^-$  oder in Erde beobachtet wurden (Tab. 3.7; siehe auch Tab. 3.6).

**Tab. 3.7: Aminosäuregehalt in Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen in Abhängigkeit von der N-Versorgung** Der Gehalt an verschiedenen freien Aminosäuren wurde in jeweils den fünften Blättern der Hauptpflanze nach 4 Wochen Wachstum in Hydrokultur mit 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> bzw. <1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (siehe 2.3.1.3.) bestimmt. Die Gehalte an Glycin, Serin, Glutamat und Glutamin wurden bereits in der Abb. 3.14 gezeigt. Mittelwerte ± SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

[nmol·cm <sup>-2</sup> ]	Solara			F14-38			F14-59		
	10 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<1 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<1 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<1 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<1 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<1 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<1 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Glycin	8 ± 1	7 ± 1	179 ± 110	136 ± 63	759 ± 179	724 ± 80	136 ± 63	759 ± 179	724 ± 80
Serin	22 ± 4	57 ± 10	23 ± 6	18 ± 5	27 ± 5	19 ± 3	18 ± 5	27 ± 5	19 ± 3
Glutamat	80 ± 6	136 ± 22	52 ± 3	55 ± 4	68 ± 12	59 ± 7	55 ± 4	68 ± 12	59 ± 7
Glutamin	23 ± 4	124 ± 26	9 ± 3	7 ± 1	23 ± 5	10 ± 6	7 ± 1	23 ± 5	10 ± 6
Aspartat	35 ± 4	74 ± 9	23 ± 6	21 ± 5	23 ± 5	11 ± 4	21 ± 5	23 ± 5	11 ± 4
Asparagin	0,5 ± 0,2	3,6 ± 0,6	2,0 ± 1,3	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,5	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,5
andere AS	88 ± 5	-	81 ± 7	60 ± 5	-	-	60 ± 5	-	-
Σ AS	203 ± 18	402 ± 66	320 ± 106	261 ± 58	901 ± 156	659 ± 174	261 ± 58	901 ± 156	659 ± 174

### 3.2.7.2. Nitratreduktaseaktivität und Nitratgehalt in Blätter mit reduzierter Menge an P-Protein

Wie bereits beschrieben, bildet die Photorespiration eine Schnittstelle von C- und N-Metabolismus. Die Festlegung von Stickstoff in Glycin während der Lichtperiode führt in den transgenen Pflanzen zu einem höheren Bedarf an verfügbarem reduziertem Stickstoff. N wird von den Wurzeln aus der Bodenlösung aufgenommen, meistens in Form von Nitrat, und entweder in Wurzeln zu Ammonium reduziert oder über das Xylem zu den Source-Blätter transportiert und dort reduziert. Der durch die Glycinakkumulation erhöhte N-Bedarf könnte zu einer Stimulation der Nitratassimilation führen und den Export von freien Aminosäuren aus dem Blatt beeinflussen.

Daher wurde untersucht, ob die Aktivität der Nitratreduktase (NR) in Blättern der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp verändert war. Tabelle 3.8 zeigt, dass bei Wachstum in Erde die transgenen Pflanzen eine erhöhte NR-Aktivität aufwiesen. Dieser Unterschied ließ sich in Pflanzen in Hydrokultur aber nicht beobachten.

Der Aktivierungszustand des Enzyms wurde ebenfalls bestimmt; er unterschied sich in den transgenen Pflanzen sowohl in Erde als auch in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  nicht von dem im Wildtyp. Bei Hydrokultur mit  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  war der Aktivierungszustand der Nitratreduktase leicht erhöht.

**Tab. 3.8: maximale Aktivität und Aktivierungszustand der Nitratreduktase in Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen.** Die NR-Aktivität wurde in Blättern von Kartoffelpflanzen nach neun Wochen Wachstum in Erde bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (a) oder nach vier Wochen Wachstum in Hydrokultur mit 10 bzw.  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  und bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) (b) gemessen (siehe 2.3.1.3.). Mittelwerte  $\pm$  SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

		Solara	F14-38	F14-59
Aktivität [ $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]				
Erde		$3,3 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,6$
Hydrokultur	10 mM $\text{NO}_3^-$	$4,7 \pm 0,4$	$4,1 \pm 1,3$	$4,7 \pm 0,8$
	$<1$ mM $\text{NO}_3^-$	$6,9 \pm 0,8$	$6,9 \pm 0,4$	$7,9 \pm 0,6$
Aktivierungszustand [%]				
Erde		84	83	81
Hydrokultur	10 mM $\text{NO}_3^-$	83	74	84
	$<1$ mM $\text{NO}_3^-$	79	86	87

Der Nitratgehalt von Blättern wurde ebenfalls bestimmt. Tabelle 3.9 zeigt, dass Blätter von Pflanzen in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  mehr als doppelt so viel Nitrat enthielten wie Blätter von Pflanzen in Erde. Bei Hydrokultur mit  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  wurde im Vergleich zu Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  nur eine Abnahme des Nitratgehaltes pro Blattoberfläche um ca. 25 % beobachtet. Der Nitratgehalt der Blätter von P-Antisense-Pflanzen war in Allgemeinen im Vergleich mit Wildtypblättern nicht verändert. Die Akkumulation von freien Aminosäuren in Blättern der Linie F14-59 auf Erde sowie in Blättern von beiden transgenen Linien in Hydrokultur mit  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  war von einer Abnahme des Nitratgehaltes in diesen Blättern begleitet (Tab. 3.7; Tab. 3.9). Dies ließ sich in den transgenen Linien in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  und in der Linie F14-38 auf Erde nicht beobachten.

**Tab. 3.9: Nitratgehalt in Blättern von Wildtyp- und P-Antisense-Kartoffelpflanzen** Der Gehalt an  $\text{NO}_3^-$  wurde in Blättern von Kartoffelpflanzen nach 9 Wochen Wachstum in Erde bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) (a) oder nach vier Wochen Wachstum in Hydrokultur mit 10 bzw.  $<1$  mM  $\text{NO}_3^-$  und bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  (kontrolliert) (b) gemessen. Mittelwerte  $\pm$  SE aus Bestimmungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

		Solara	F14-38	F14-59
		Nitrat [ $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]		
Erde		0,70 $\pm$ 0,14	0,77 $\pm$ 0,16	0,47 $\pm$ 0,07
Hydrokultur	10 mM $\text{NO}_3^-$	1,56 $\pm$ 0,06	1,58 $\pm$ 0,08	1,65 $\pm$ 0,09
	$<1$ mM $\text{NO}_3^-$	1,48 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,09

### 3.3. Antisense-Repression der Expression des Genes für die Serinhydroxymethyltransferase in Chloroplasten-haltigen Zellen von Kartoffelblättern

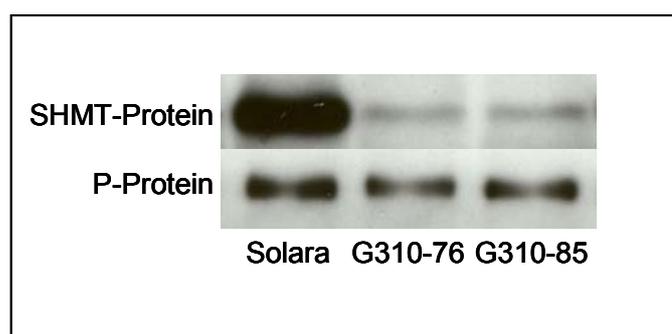
Aus den in der Einleitung angeführten Gründen wurden die Wirkungen der Reduktion der Aktivität des GDC-SHMT Komplexes auf die Photosynthese sowie den C- und N-Metabolismus auch in Kartoffelpflanzen untersucht, in denen die Expression des *SHMT*-Gens im Gesamtblatt durch ein Antisense-Konstrukt unter Kontrolle des Promotors des Genes *StLS1*, das eine Komponente des Photosystems II von *Solanum tuberosum* kodiert (Stockhaus *et al.* 1987), reprimiert wurde.

Da die hier untersuchten SHMT-Antisense-Pflanzen unter ambienter CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nicht wachsen konnten (T. Winzer, persönliche Mitteilung), wurden sie in einer Atmosphäre mit erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration (940 ppm) für acht Wochen angezogen. Um die Wirkungen höherer Flussraten durch den C<sub>2</sub>-Zyklus auf den Metabolismus zu untersuchen, wurden die Pflanzen dann in eine Atmosphäre mit 360 ppm CO<sub>2</sub> transferiert und für eine Woche unter diesen Bedingungen weiter angezogen.

#### 3.3.1. Menge an SHMT und GDC-P-Protein in den SHMT-Antisense-Pflanzen

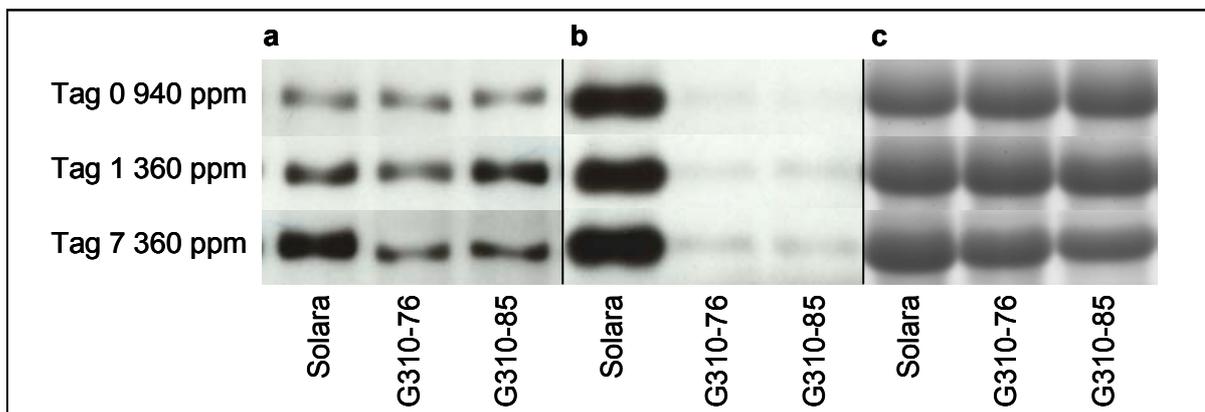
Zum Nachweis der Wirkung des Antisense-Konstrukts wurden die SHMT-Mengen in Wildtyp und transgenen Linien mittels „Western blot“-Analyse verglichen. Ein polyklonaler Antikörper gegen SHMT aus *Pisum sativum* L. (Wingler *et al.* 1997) wurde verwendet.

Die Menge an SHMT-Protein war in den transgenen Linien stark reduziert. Die Menge an GDC P-Protein wurde zur Kontrolle ebenfalls untersucht; sie war in den transgenen Linien unverändert im Vergleich mit dem Wildtyp (Abb. 3.32).



**Abb. 3.32: Menge an SHMT- und P-Protein in Wildtyp- und SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen.** „Western blot“-Analyse von Proteinen aus Blättern von in Erde angezogenen Pflanzen nach 57 Tagen Wachstum bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und weitere 24 h bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Proben für die Proteinisolierung wurden jeweils aus dem fünften Blatt von der Spitze des Hauptsprosses genommen. Für jede Linie wurden Blattextrakte aus fünf verschiedenen Pflanzen gemischt und 10 µg Protein pro Probe durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Nach 24 h Inkubation der Pflanzen bei 360 ppm CO<sub>2</sub> wurde in allen Linien eine Induktion der Expression des P-Proteins festgestellt (Abb. 3.33a). In Wildtyppflanzen stieg der Gehalt an P-Protein in den folgenden Tagen bei Inkubation in 360 ppm CO<sub>2</sub> weiter, während es in Blättern der transgenen Linie G310-76 nicht weiter anstieg. In Blättern der Linie G310-85 war die Menge an P-Protein nach sieben Tagen Inkubation im Vergleich mit dem Wert nach 24 h Inkubation sogar reduziert. Die Menge an SHMT-Protein blieb in allen Linien nach Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf 360 ppm unverändert (Abb. 3.33b).



**Abb. 3.33: Menge an P- und SHMT-Protein in Wildtyp- und SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen in Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration.** „Western blot“-Analyse von Proteinen aus Blättern von in Erde angezogenen Pflanzen nach 57 Tage Wachstum bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und nach weiteren 24 h bzw. sieben Tagen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Proben für die Proteinisolierung wurden jeweils aus dem fünften Blatt von der Spitze des Hauptsprosses aus genommen. Für jede Linie wurden Blattextrakte aus fünf verschiedenen Pflanzen gemischt und 20 µg Protein pro Probe durch SDS-PAGE aufgetrennt. **a)** GDC-P-Protein, **b)** SHMT-Protein, **c)** Coomassie-gefärbte Bande der großen Untereinheit der RubisCO als Ladekontrolle.

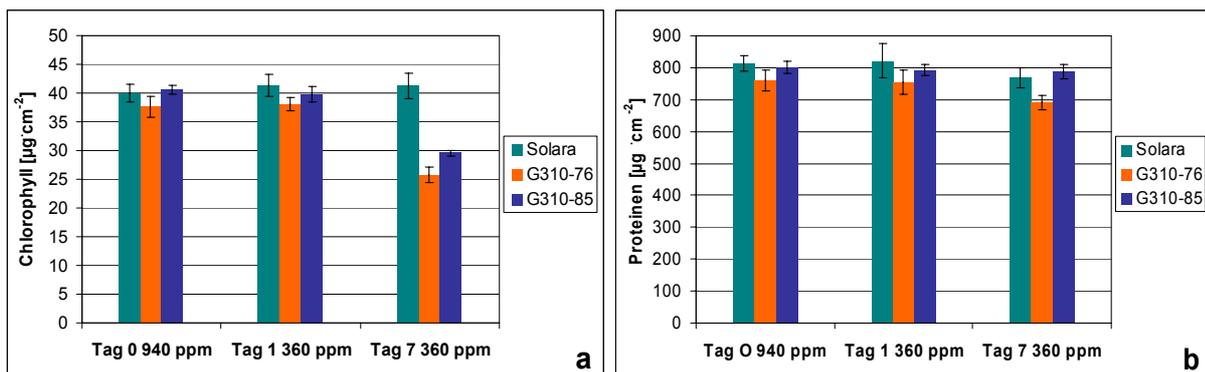
### 3.3.2. Wachstumsphänotyp der SHMT-Antisense-Pflanzen

Für die Untersuchung der Wachstumsphänotypen der SHMT-Antisense-Pflanzen wurden Pflanzen in Erde angezogen. Die Pflanzen wuchsen acht Wochen bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und anschließend eine Woche bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Während der Kultur bei 940 ppm CO<sub>2</sub> wuchsen die SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen ähnlich wie die Wildtyppflanzen und es konnte kein Unterschied in Aussehen der Blätter festgestellt werden (Abb. 3.34). Nach einer Woche Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> waren die Blätter der transgenen Pflanzen dagegen wellenförmig und heller als die des Wildtyps. Dies betraf auch die Blätter im oberen Bereich der Pflanzen. Diese Blätter wiesen aber keine unregelmäßigen chlorotische Bereiche der Laminae auf wie die der P-Antisense-Pflanzen und wurden nicht auch nicht gelb. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit den Resultaten von H. Bauwe und T. Winzer, dass die SHMT-Antisense-Pflanzen bei ambienter CO<sub>2</sub>-Konzentration nicht lebensfähig sind (H. Bauwe, persönliche Mitteilung; siehe 1.7.2.).



**Abb. 3.34: Wildtyp- und SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen.** Die Pflanzen waren acht Wochen in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> angezogen worden (siehe 2.3.1.2.).

Der Chlorophyllgehalt der transgenen Pflanzen nach acht Wochen Wachstum bei 940 ppm CO<sub>2</sub> war unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Nach Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf 360 ppm für 24 h ließ sich in den Blättern der transgenen Pflanzen noch keine Änderung der Chlorophyllkonzentration nachweisen (Abb. 3.35a). Nach siebentägiger Inkubation bei 360 ppm CO<sub>2</sub> zeigten die transgenen Linien jedoch einen starken Abbau von Chlorophyll. Der Chlorophyllgehalt war in der Linie G310-76 um 38% und in der Linie G310-85 im Vergleich mit dem Wildtyp um 29% reduziert (Abb. 3.35a).



**Abb. 3.35: Chlorophyll- und Proteingehalte in Blätter von Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen.** Der Chlorophyll- (a) und Proteingehalt (b) der Blätter wurde in Pflanzen nach 57 Tage Wachstum in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und nach weiteren 24 h bzw. sieben Tagen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> bestimmt. Proben wurden jeweils aus dem fünften Blatt von der Spitze des Hauptsprosses aus genommen. Mittelwerte und SE aus fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Auch das Chl *a*/Chl *b*-Verhältnis war wie der Chlorophyllgehalt bei 940 ppm und nach 1 Tag Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> nicht verändert. Nach sieben Tagen war das Chl *a*/Chl *b*-Verhältnis in den transgenen Linien dagegen erniedrigt (Tab. 3.10).

Der Proteingehalt der Blätter in SHMT-Antisense-Pflanzen der Linie G310-85 blieb unverändert nach Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf 360 ppm (Abb. 3.35b). Der Proteingehalt in Blättern der Linie G310-76 sank erst nach siebentägiger Inkubation der Pflanzen bei 360 ppm CO<sub>2</sub> leicht.

**Tab. 3.10: Chlorophyll a/Chlorophyll b-Verhältnis in Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen.** Die Gehalte an Chlorophyll a und b wurden in Wildtyp und SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen nach 57 Tagen Wachstum in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und 275±25 µmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR) und nach weiteren 24 h bzw. sieben Tagen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> bestimmt. Der Gesamt-Chlorophyllgehalt wird in Abb. 3.35a gezeigt. Mittelwerte ± SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

	Chl a/Chl b-Verhältnis		
	Solara	G310-76	G310-85
Tag 0 940 ppm	5,1±0,1	4,9±0,1	5,1±0,1
Tag 1 360 ppm	5,4±0,1	5,0±0,1	5,1±0,1
Tag 7 360 ppm	5,1±0,1	4,3±0,1	4,7±0,1

### 3.3.3. Intermediate des C2-Zyklus in Pflanzen mit reduzierter Menge an SHMT-Protein

Zur physiologischen Charakterisierung der SHMT-Antisense-Linien von Kartoffel wurde untersucht, ob die Reduktion der Menge an P-Protein zur Veränderungen im C2-Zyklus führt. Daher wurden die Konzentrationen einiger Intermediate des C2-Zyklus unter beiden Anzuchtbedingungen, hohe CO<sub>2</sub>-Konzentration (940 ppm) und ambiente CO<sub>2</sub>-Konzentration (360 ppm) in den transgenen Linien mit denen im Wildtyp verglichen.

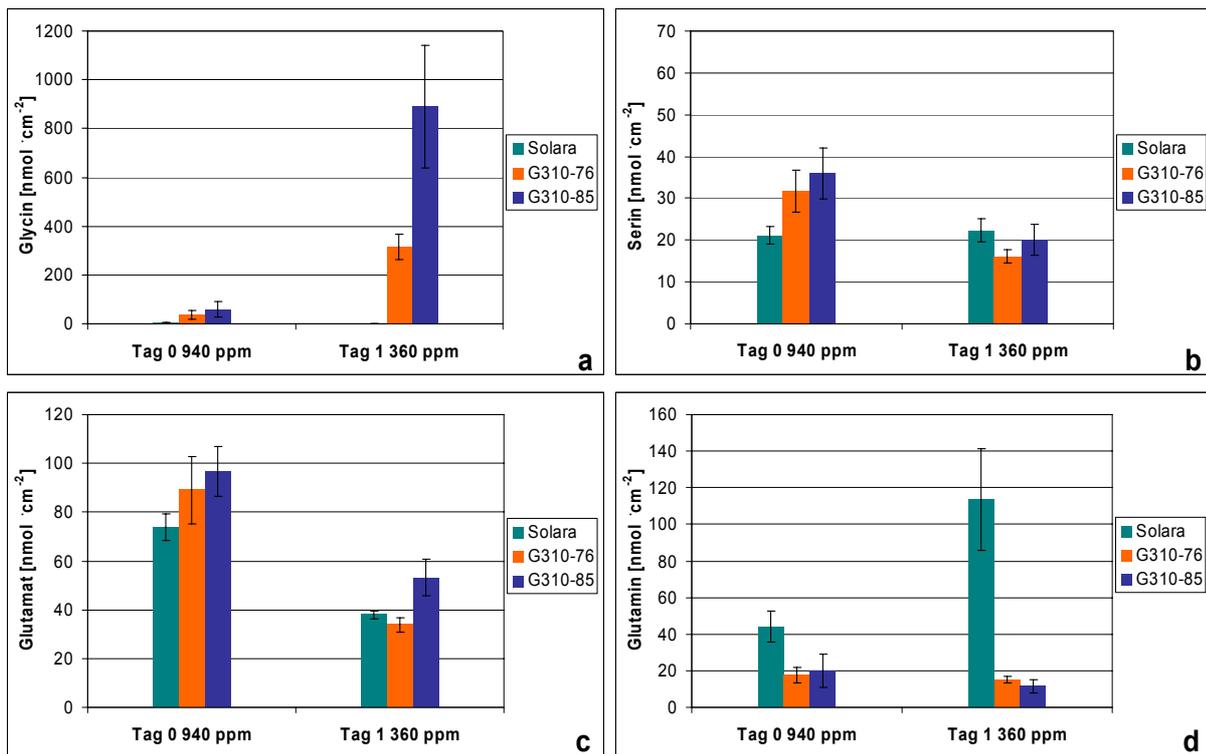
Die Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Anzuchtraum für 24 h führte tatsächlich zu einer deutlichen Akkumulation von Glycin in den Blättern der SHMT-Antisense-Pflanzen (70- bzw. 200fach für die Linien G310-76 bzw. G310-85) im Vergleich mit dem Wildtyp (Abb. 3.36a). Unter hoher CO<sub>2</sub>-Konzentration war die Glycinakkumulation in den transgenen Pflanzen viel geringer (acht- bzw. 14fach für die Linie G310-76 bzw. G310-85) im Vergleich mit dem Wildtyp.

Die erhöhten Glycinspiegel in den transgenen Linien unter hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen waren von einem leichten Anstieg an Serin begleitet. Das kann auf einem Stau in der Transaminierungsreaktion mit Glyoxylat aufgrund der Glycinakkumulation zurückgeführt werden (Abb. 3.36b). Die Akkumulation von Glycin und in geringerem Maße von Serin bewirkt eine Verschlechterung des N-Status, was sich in einem Anstieg an Glutamat und einer gleichzeitigen Abnahme des Glutamingehaltes widerspiegelt (Abb. 3.36c und d).

Insgesamt führte also die deutliche Akkumulation von Glycin in den transgenen Linien nach Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration zu einer Abnahme in der Konzentration von anderen freien Aminosäuren, darunter Serin, Glutamat und in geringerer Maße Glutamin (Abb. 3.36b, c und d).

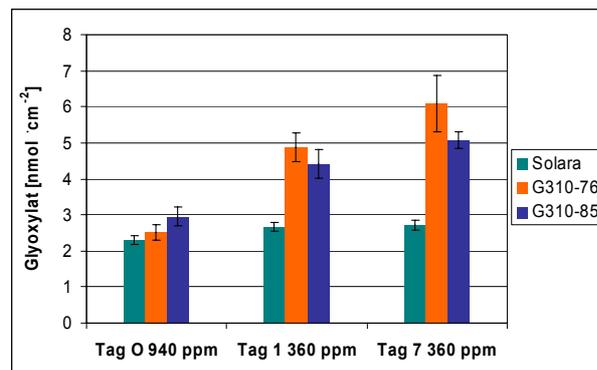
In Wildtyppflanzen dagegen bewirkte die Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration eine Abnahme von Glutamat und einem Anstieg an Glutamin (Abb. 3.36c und d). Es ist zu vermuten, dass

die Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration zu einer Drosselung der CO<sub>2</sub>-Fixierung und einer Veränderung des Verhältnisses zwischen C- und N-Assimilation führte.



**Abb. 3.36: Glycin-, Serin-, Glutamat und Glutaminspiegel in Blätter von Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen.** Der Gehalt an Glycin (a), Serin (b), Glutamat (c) und Glutamin (d) in den Blättern wurde in Pflanzen nach 57 Tagen Wachstum in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und nach weiteren 24 h Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> bestimmt. Proben wurden jeweils aus dem fünften Blatt von der Spitze des Hauptsprosses aus genommen. Mittelwerte und SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Bei 940 ppm CO<sub>2</sub> war der Gehalt an Glyoxylat in den transgenen Pflanzen kaum erhöht (Abb. 3.37). Nach Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf 360 ppm für 24 h ließ sich ein Anstieg im Glyoxylatgehalt von 82 bzw. 65 % in den transgenen Pflanzen der Linien G310-76 bzw. G310-85 im Vergleich mit dem Wildtyp feststellen. Nach siebentägigem Wachstum unter 360 ppm CO<sub>2</sub> war der Glyoxylatgehalt in den Blättern der transgenen Pflanzen der Linien G310-76 und G310-85 weiter angestiegen, er war 124 bzw. 87 % höher als in Wildtyppflanzen (Abb. 3.37).

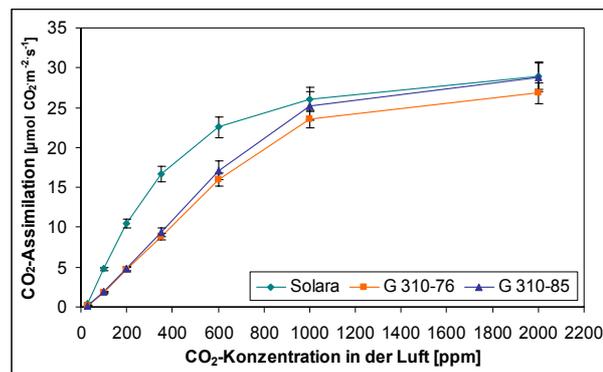


**Abb. 3.37: Glyoxylatgehalt in Blättern von Wildtyp- und SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen.** Der Glyoxylatgehalt der Blätter wurde in Pflanzen nach 57 Tagen Wachstum in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und nach weiteren 24 h bzw. sieben Tagen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> bestimmt. Proben wurden jeweils aus dem fünften Blatt von der Spitze des Hauptsprosses aus genommen. Mittelwerte und SE aus fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

### 3.3.4. Wirkungen der Repression der Expression des SHMT-Protein-Gens auf die Photosynthese

#### 3.3.4.1. CO<sub>2</sub>-Assimilation unter verschiedener Photorespirationsraten in Pflanzen mit reduzierter Menge an SHMT-Protein

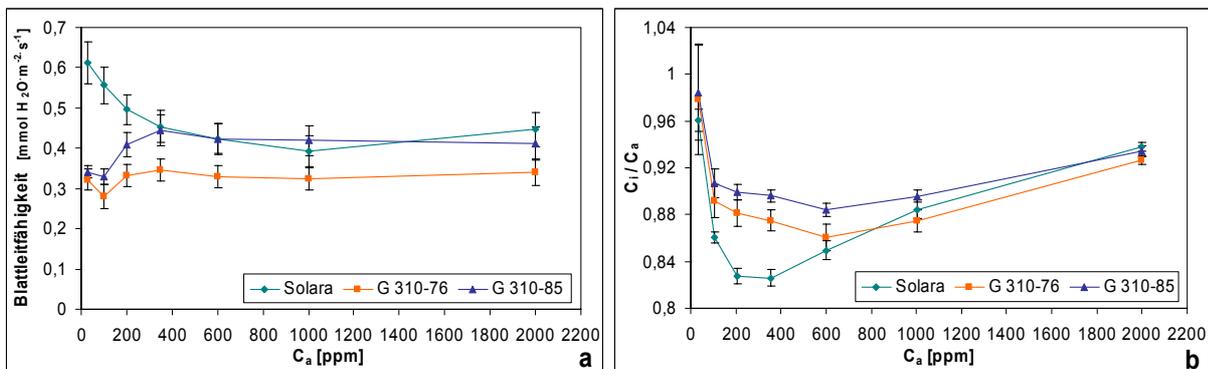
Wie in 3.2.5.1 besprochen wurde, kann eine Reduktion der GDC-Aktivität die CO<sub>2</sub>-Assimilation auf verschiedene Weise beeinflussen. Aus Untersuchungen mit homozygoten Mutanten des C<sub>2</sub>-Zyklus ist bekannt, dass eine vollständige Unterbrechung des C<sub>2</sub>-Zyklus zu einem Zusammenbrechen der CO<sub>2</sub>-Assimilation und des gesamten C-Metabolismus führt, so dass diese Mutanten unter normalen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nicht lebensfähig sind (Blackwell *et al.* 1990). Hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen reduzieren die Photorespirationsraten, aber es ist nicht klar, bei welcher CO<sub>2</sub>-Konzentration die Photorespiration vollständig supprimiert ist. Während eine Anzucht bei 940 ppm CO<sub>2</sub> keinen deutlich sichtbaren Phänotyp in den SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen erzeugt, zeigen die gleichen Pflanzen bei Anzucht unter 800 ppm CO<sub>2</sub> stark reduzierte CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten und Chlorophyllgehalte im Vergleich mit dem Wildtyp (T. Winzer, unveröffentlicht). Offensichtlich hatte die Photorespiration unter diesen Bedingungen erhebliche Auswirkungen auf die Photosynthese. Es wurde hier untersucht, in wie weit die Photosynthese in SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen bei Anzucht unter höheren CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (940 ppm) beeinflusst wird und wie die verschiedenen Photosyntheseparameter der Pflanzen auf höhere Photorespirationsraten reagieren. Die CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten sind in Abbildung 3.38 dargestellt.



**Abb. 3.38: CO<sub>2</sub>-Sättigung der Photosynthese in Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen.** Die Pflanzen wuchsen 7½ Wochen (52-56 Tage) in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und 275±25 μmol Quanten m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (PAR). Die Gasanalyse wurde jeweils im von der Spitze des Hauptsprosses aus gesehen fünften Blatt bei 945 μmol Quanten m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (PAR) durchgeführt (siehe 2.4.3.). Mittelwerte und SE aus fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Bei hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (1000 ppm oder mehr) waren die CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten in den transgenen Pflanzen nur wenig reduziert (7 bis 10 %) im Vergleich zum Wildtyp. Unter hohen photorespiratorischen Bedingungen (niedrige CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und hohe Lichtintensität) trat eine deutliche Reduktion der CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten in den SHMT-Antisense-Pflanzen im Vergleich mit Wildtyppflanzen ein. Der Grad der Reduktion in der CO<sub>2</sub>-Assimilation in den transgenen Pflanzen korrelierte mit der Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration.

Die Öffnungsweite der Stomata war in Blättern der Linie G310-76 bei allen untersuchten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 3.39a).



**Abb. 3.39: Blattleitfähigkeit und C<sub>i</sub> in Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen.** Die Blattleitfähigkeit und die C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>-Verhältnisse wurden aus demselben Datensatz ermittelt, der auch für die CO<sub>2</sub>-Sättigungskurve von Abb. 3.38 verwendet wurde. Mittelwerte und SE aus vier verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Blätter der Linie G310-85 zeigten hingegen bei CO<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 400 und 2000 ppm eine unveränderte Öffnungsweite der Stomata. Blätter von Wildtyppflanzen öffneten ihre Stomata bei Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration. Dieses Verhalten wurde in den transgenen Pflanzen nur im Bereich von 600 und 400 ppm CO<sub>2</sub> beobachtet. Bei niedrigeren CO<sub>2</sub>-

Konzentrationen reagierten die Blätter mit einer deutlichen Reduktion der Stomataöffnungsweite (3.39a).

Trotz der Reduktion der Öffnungsweite der Stomata in Blättern der transgenen Linien waren die  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen im Blattinneren ( $C_i$ ) bei niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen in der Atmosphäre ( $C_a$ ) deutlich höher als in Wildtyppflanzen (Abb. 3.39b). Deshalb kann wie bei den P-Antisense-Kartoffelpflanzen in den SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen eine stomatär bedingte Limitation der  $\text{CO}_2$ -Assimilation ausgeschlossen werden. Die Reduktion der  $C_i$  in Wildtypblättern ließ sich durch hohe  $\text{CO}_2$ -Fixierungsraten erklären, die zu einer Verringerung der  $C_i$  führen, die nicht durch die Diffusion von  $\text{CO}_2$  durch die Stomata ins Blatt kompensiert werden kann.

Die  $\text{CO}_2$ -Assimilation war abhängig von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration, während die Stomataöffnung und damit die Evaporation relativ konstant bei verschiedenen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen blieben (Abb. 3.38 und 3.39a). Damit korrelierte die Wassernutzungseffizienz mit den  $\text{CO}_2$ -Assimilationsraten. Blätter der SHMT-Antisense-Linien schlossen die Stomata bei niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen. Dadurch minimierten die transgenen Pflanzen den relativen Wasserverlust. Die Wassernutzungseffizienz war unter diesen Bedingungen jedoch deutlich niedriger als in Wildtypblättern. Bei 360 ppm  $\text{CO}_2$  und  $945 \mu\text{mol Quanten}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  lag die Wassernutzungseffizienz in den transgenen Linien bei  $3,91\pm 0,24$  bzw.  $3,53\pm 0,12 \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{mmol H}_2\text{O}^{-1}$  (für die Linie G310-76 bzw. G310-85), während dieser Wert in Wildtypblättern  $6,16\pm 0,17$  betrug.

#### **3.3.4.2.Reduktionsgrad des PSII und Photoinhibition in Pflanzen mit reduzierter Menge an SHMT-Protein**

Da Photorespiration vermutlich auch unter hohen  $\text{CO}_2$ -Partialdruck stattfindet (siehe 3.3.4.1.), wurde hier untersucht, ob die SHMT-Antisense-Pflanzen Zeichen von Photoinhibition aufweisen, wenn sie in einer Atmosphäre mit einer hohen  $\text{CO}_2$ -Konzentration wachsen.

Durch die Messung der Chlorophyllfluoreszenz können, wie in 3.2.5.3. erklärt, Informationen über den Zustand des Photosyntheseapparates gewonnen werden. Die maximale Quantenausbeute ( $F_v/F_m$ ) stellt die gesamte photochemische Leistung des PSII dar. Eine signifikante Abnahme der  $F_v/F_m$  wird als Photoinhibition bezeichnet und wird induziert, wenn die Anregungsenergie die Dissipationsmechanismen übersättigt. Nach Anzucht der Pflanzen unter hohen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen (940 ppm  $\text{CO}_2$ ) wurde kein Zeichen von Photoinhibition in den SHMT-Antisense-Pflanzen gefunden. Die optimalen Quantenausbeuten des PSII ( $F_v/F_m$ ) waren in Blättern der SHMT-Antisense-Pflanzen unverändert im Vergleich mit den Ausbeuten in Blättern von Wildtyppflanzen (Tab. 3.11).

**Tab. 3.11: Optimale Quantenausbeute des PSII ( $F_v/F_m$ ) in Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen.** Die Pflanzen wuchsen 7½ Wochen (53-57 Tage) in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und 275±25 µmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR).  $F_v/F_m$  wurde nach Inkubation der Blätter im Dunkeln für genau 10 min ermittelt. Mittelwerte ± SE aus fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

	Solara	G310-76	G310-85
$F_v/F_m$	0,78±0,01	0,77±0,01	0,78±0,01

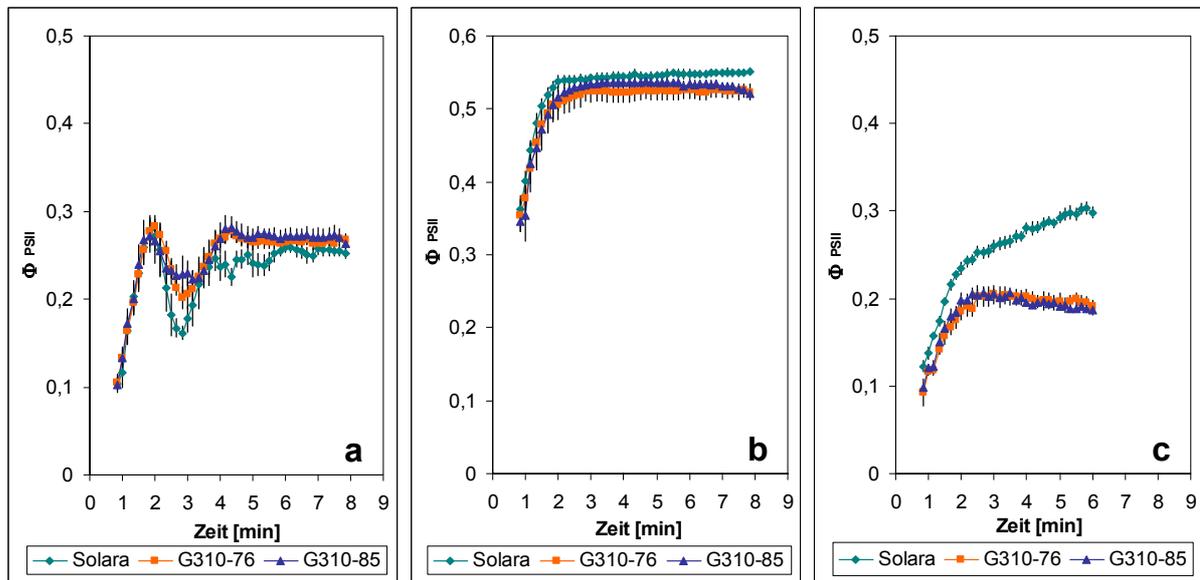
Isolierte Mitochondrien von SHMT-Antisense-Pflanzen zeigten extrem geringere Glycindecarboxylierungsraten (T. Winzer, unveröffentlicht). Es ist daraus zu schließen, dass die Flussraten durch den C2-Zyklus durch die Reduktion der SHMT-Proteinmenge extrem reduziert werden. Es wurde hier untersucht, welche Auswirkungen eine solche Verringerung der Aktivität des C2-Zyklus auf die Lichtreaktionen der Photosynthese hat.

Durch die Messung der Chlorophyllfluoreszenz können die Auswirkungen von biochemischen Reaktionen auf verschiedene Prozesse im PSII unter verschiedenen Bedingungen verfolgt werden. Bei der Sättigungspulsmethode werden durch wiederholte Gabe von Sättigungspulsen Induktionskurven der Chlorophyllfluoreszenz erzeugt. Diese Kurven erlauben die kontinuierliche Verfolgung des Verhaltens der Photosynthese (d.h. der Reaktionen im PSII) unter den Messbedingungen. Die Analyse verschiedener Parameter ermöglicht eine bessere Interpretation der komplexen Fluoreszenzsignale. Bei der Auswertung werden die effektive Quantenausbeute  $\Phi_{PSII}$  sowie die photochemische (qP) und nicht-photochemische (qN) Löschung der Chlorophyllfluoreszenz bei normaler und erhöhter Lichtintensität und CO<sub>2</sub>-Konzentration dargestellt.

Wie in 3.2.5.3. erläutert, repräsentiert die effektive Quantenausbeute  $\Phi_{PSII}$  den Anteil des durch das Chlorophyll in PSII absorbierten Lichtes, das für photochemische Reaktionen verwendet wird, und stellt ein Maß für die lineare Elektronentransportrate und damit die gesamte Photosyntheserate dar. Bei hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und Lichtintensitäten (2000 ppm CO<sub>2</sub>, 945 µmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) traten in den Wildtyp große Schwankungen in der  $\Phi_{PSII}$  auf (Abb. 3.40a), was damit zusammenhängt, dass die Aktivierung des Calvin-Zyklus unter hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und hoher Lichtintensität viel schneller abläuft als die Aktivierung der Saccharose-Synthese im Cytosol (Stitt und Grosse 1988). Dies führt zu einem Phosphatmangel in den Chloroplasten und zur Hemmung des Calvin-Zyklus. Die schnelle Abfolge von Aktivierungs- und Inhibitionsschritten des Calvin-Zyklus bis zur vollständigen Aktivierung der Saccharose-Synthese wird durch große Schwankungen des linearen Elektronentransportes reflektiert (Stitt und Schreiber 1988).

In den Blättern der SHMT-Antisense-Linien waren diese  $\Phi_{PSII}$ -Schwankungen schwächer als in Wildtypblättern (Abb. 3.40a), obwohl die CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten unter diesen Bedingungen normal sind. Dies kann bedeuten, dass in diesen Linien unter den

Versuchsbedingungen kein so ausgeprägter Phosphatmangel in den Chloroplasten auftritt oder dass andere Reaktionen die Aktivität des Calvin-Zyklus drosseln, so dass ein Phosphatmangel nicht oder nur in geringem Ausmaß auftreten kann. Es kann postuliert werden, dass der Bedarf an Phosphat durch eine verringerte Produktion von Glycerat reduziert ist. Das würde aber voraussetzen, dass unter den Versuchsbedingungen immer noch eine gewisse Photorespiration stattfindet.

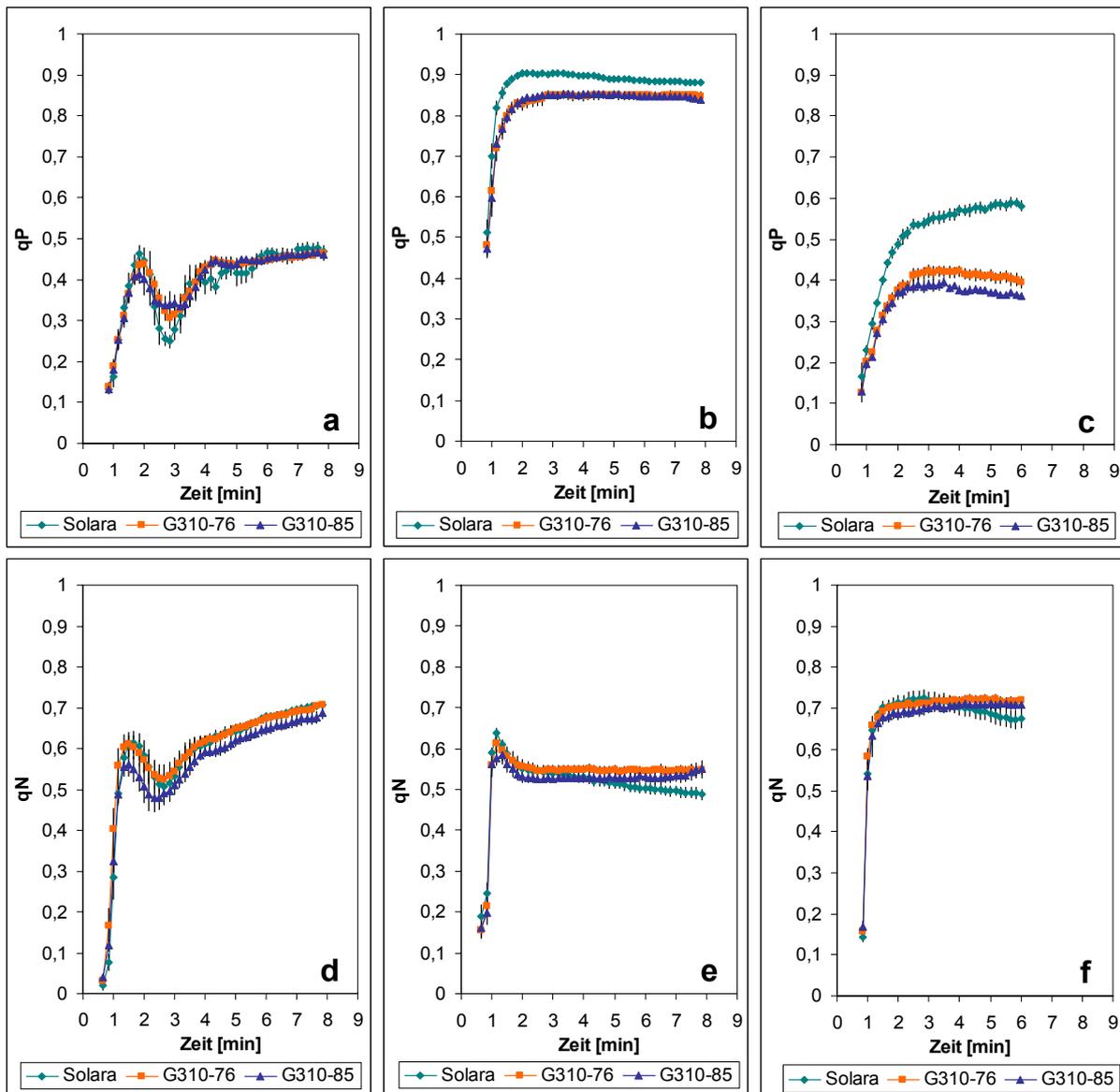


**Abb. 3.40: Effektive Quantenausbeute des PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) in Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen.** Die Pflanzen wuchsen 7½ Wochen (53-57 Tage) in Erde bei 940 ppm  $\text{CO}_2$  und  $275 \pm 25 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR). Die Blätter wurden für genau 10 min im Dunkeln vorinkubiert.  $\Phi_{\text{PSII}}$  wurde anschließend während der Inkubation der Pflanzen bei 2000 ppm  $\text{CO}_2$  und  $945 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR) (a) oder bei 350 ppm  $\text{CO}_2$  und  $346 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR) (b) oder bei 350 ppm  $\text{CO}_2$  und  $945 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (PAR) (c) gemessen (siehe 2.5.). Mittelwerte und SE aus Messungen an fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Unter denselben Messbedingungen war die photochemische Löschung der Chlorophyllfluoreszenz (qP) in Blättern der SHMT-Antisense-Pflanzen unverändert (Abb. 3.41a). Dieser Parameter liefert auch ein Maß für die photochemische Konversion der Anregungsenergie und unterscheidet sich vom  $\Phi_{\text{PSII}}$  darin, dass qP nur die aktiven PSII-Komplexe berücksichtigt. Daher dient qP als Maß für den Grad der Oxidation der Reaktionszentren (Maxwell und Johnson 2000).

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser beiden Parameter kann auf Unterschiede in der Löschung der Grundfluoreszenz ( $qF_0$ ) zwischen Wildtyp und transgenen Linien zurückzuführen sein. Während  $qF_0$  in Blättern des Wildtyps bei  $0,09 \pm 0,03$  lag, betrug  $qF_0$  bei den Linien G310-76 und G310-85  $0,16 \pm 0,01$  bzw.  $0,12 \pm 0,03$ . Es wird im Allgemeinen angenommen, dass die Grundfluoreszenz durch Energie-abhängige Dissipationsprozesse (qE) reduziert wird. Der größte Anteil der nicht-photochemischen Löschung der variablen Chlorophyllfluoreszenz (qN) wird auch durch qE bedingt. Es wurde aber kein Unterschied im qN zwischen dem Wildtyp und den SHMT-Antisense-Linien festgestellt (Abb. 3.41d). Bei der

Linie G310-85 ist dieser Parameter sogar reduziert. Welche Mechanismen dieses Verhalten in den transgenen Linien beeinflussen, ist unklar.



**Abb. 3.41: Photochemische (qP) und nicht-photochemische (qN) Löschung der Chlorophyllfluoreszenz in Wildtyp und SHMT-Antisense Pflanzen.** Die Pflanzen wuchsen 7½ Wochen (53-57 Tage) in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und 275±25 μmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR). Nach 10 min Inkubation im Dunkeln wurden die Pflanzen bei 2000 ppm CO<sub>2</sub> und 945 μmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR) (a und d) oder bei 350 ppm und 346 μmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR) (b und e) oder bei 350 ppm CO<sub>2</sub> und 945 μmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR) (c und f) inkubiert. Mittelwerte und SE aus Messungen fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Unter 350 ppm CO<sub>2</sub> und 346 μmol Quanten·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> Licht (Standardbedingungen für Wildtyppflanzen) wurde eine leichte Reduktion der linearen Elektronentransportrate in Blätter der transgenen Linien im Vergleich mit dem Wildtyp beobachtet (Abb. 3.40b). Diese Reduktion von  $\Phi_{PSII}$  korrelierte mit einer leichten Reduktion der CO<sub>2</sub>-Assimilation in diesen Blättern (Daten nicht gezeigt). Die Reduktion der Elektronentransportrate verursachte einen deutlich erhöhten Reduktionsgrad der Reaktionszentren im Vergleich mit Wildtypblättern, wie

man aus dem Parameter  $qP$  entnehmen kann (Abb. 3.41b). Die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung wurde in Blättern der transgenen Pflanzen nicht stärker induziert als in Wildtypblättern, aber dafür fand der Abbau des  $qN$  aufgrund der Aktivierung des Calvin-Zyklus in den transgenen Pflanzen im Gegensatz zum Wildtyp nicht statt. Hier auch wie bei hohen  $CO_2$ -Konzentrationen und Lichtintensitäten war die Löschung der Grundfluoreszenz in Blättern der transgenen Linien deutlich höher ( $0,15 \pm 0,00$  bzw.  $0,14 \pm 0,02$  jeweils für G310-76 und G310-85) als in Wildtypblättern ( $0,06 \pm 0,02$ ).

Unter hoch photorespiratorischen Messbedingungen war die Abnahme von  $\Phi_{PSII}$  und  $qP$  in den SHMT-Antisense-Pflanzen sehr stark (Abb. 3.40c; Abb. 3.41c), was auf eine reduzierte  $CO_2$ -Assimilationsrate zurückzuführen ist. Wiederum waren diese Änderungen in den photochemischen Prozessen nicht mit einer Abnahme der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung korreliert. Die Löschung der Grundfluoreszenz war im Gegenteil größer in Blättern der transgenen Pflanzen ( $0,21 \pm 0,01$  bzw.  $0,30 \pm 0,06$  jeweils für die Linien G310-76 und G310-85) als in Wildtypblättern ( $0,10 \pm 0,02$ ).

### 3.3.5. Wirkungen der Reduktion der Menge an SHMT-Protein auf den C-Metabolismus

Wie bereits in 3.2.6. erläutert, stellt die Bildung von Glycin aus Glyoxylat und von Hydroxypyruvat aus Serin eine Verbindung zwischen dem Pool von freien Aminosäuren und dem Pool von Kohlenstoffgerüsten aus dem Calvin-Zyklus dar. Der Fluss von Kohlenstoff, und indirekt auch der Fluss von Stickstoff durch die Photorespiration werden durch die kinetischen Eigenschaften der RubisCO sowie durch das  $CO_2/O_2$ -Verhältnis in der Atmosphäre bestimmt. Dabei muss die Synthese von organischen Säuren auf die Verfügbarkeit von Stickstoff abgestimmt werden. In den SHMT-Antisense-Pflanzen wird durch die Akkumulation von Glycin während der Lichtphase N dem anabolen Metabolismus entzogen. Andererseits wird in den SHMT-Antisense-Pflanzen bei niedrigen  $CO_2/O_2$ -Verhältnissen die  $CO_2$ -Fixierung reduziert (siehe 3.3.4.1.). Die Reduktion der SHMT-Aktivität hat also einen Einfluss auf die Verteilung von assimiliertem Kohlenstoff zwischen C- und N-Metabolismus.

Um diesen Einfluss genauer zu charakterisieren, wurden im Weiteren verschiedene Parameter des C-Metabolismus, wie die Konzentrationen von Zuckern, Stärke und organischen Säuren untersucht.

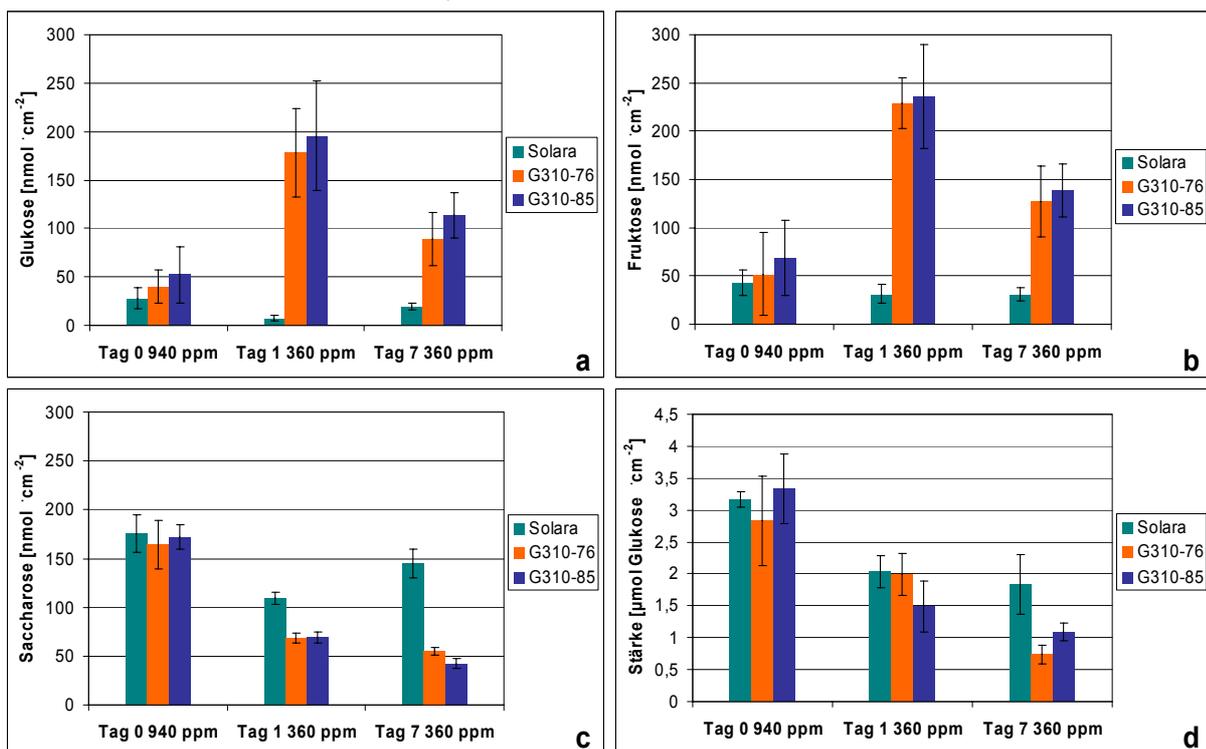
#### 3.3.5.1. Hexosen und Stärke

Wie bereits erwähnt wurde, sind die SHMT-Antisense-Pflanzen unter normalen C/O-Verhältnisse nicht lebensfähig; sie wachsen aber normal in einer Atmosphäre mit hohen  $CO_2$ -Konzentrationen. Wie man aus der Akkumulation von Glycin entnehmen kann, ist die Photorespiration dabei reduziert, aber nicht vollständig supprimiert. Durch Senkung der  $CO_2$ -

Konzentration während des Wachstums können hohe Photorespirationsraten erzeugt werden. Die Wirkungen verschiedenen Photorespirationsraten auf den C-Metabolismus wurden also bei SHMT-Antisense-Pflanzen unter hohen und niedrigen C/O-Verhältnissen untersucht.

Unter hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (940 ppm) zeigten die Gehalte an Hexosen, Saccharose und Stärke in den SHMT-Antisense-Pflanzen keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.42a, b, c und d). Beim Wachstum unter normalen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (360 ppm) war dagegen eine Akkumulation von Hexosen und eine Abnahme im Saccharosegehalt zu beobachten.

Der starke Anstieg von Hexosen deutet darauf hin, dass die transgenen Pflanzen unter osmotischem Stress standen. Hexosen werden ausschließlich in der Vakuole gespeichert, wo sie eine Rolle als Osmotikum spielen; Glycin verteilt sich dagegen auf alle Kompartimente, die höchste Konzentration findet man im Cytosol (Büßis und Heineke 1998; D. Heineke, unveröffentlicht). Es ist zu vermuten, dass die beobachtete Akkumulation von Hexosen die Akkumulation von Glycin kompensiert.



**Abb. 3.42: Zucker- und Stärkegehalte in Blättern von Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen.** Der Gehalt an Glukose (a), Fruktose (b), Saccharose (c) und Stärke (d) der Blätter wurde in Pflanzen nach 57 Tage Wachstum in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und nach weiteren 24 h bzw. sieben Tagen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> bestimmt. Mittelwerte und SE aus fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

Die Akkumulation von Hexosen war nach einem Tag stärker als nach sieben Tagen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub>. Der Saccharosespiegels sank dagegen innerhalb von sieben Tagen. Nach sieben Tagen Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> war auch die Stärkekonzentration in den Blättern der transgenen Linien reduziert. Diese Ergebnisse deuten auf eine deutlich

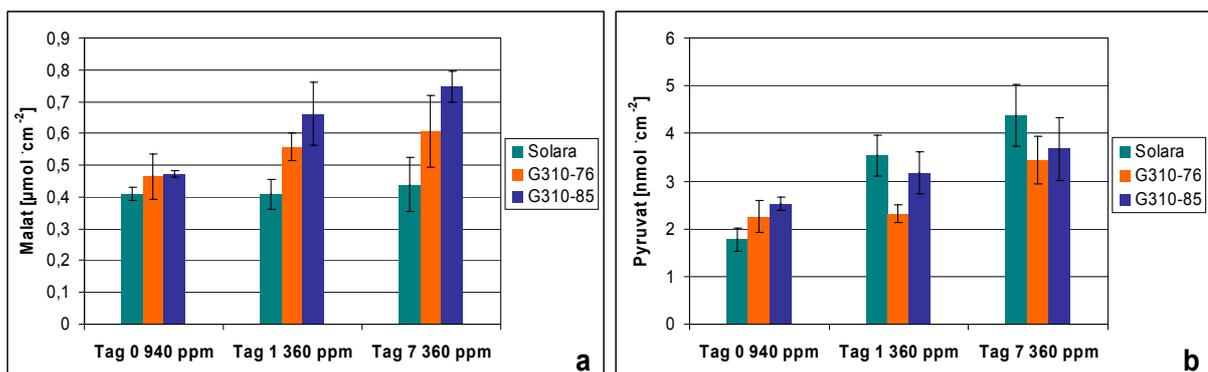
stärkere Limitierung der Photosynthese nach sieben Tagen als nach einem Tag hin und stimmen mit dem reduzierten Chlorophyllgehalt dieser Blätter überein.

Der Zucker- und Stärkegehalt von Wildtypblättern nahm nach dem Transfer der Pflanzen zu normalen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen ebenfalls ab. Das kann auf die Reduktion der CO<sub>2</sub>-Fixierung in Wildtypblättern zurückgeführt werden. Nach sieben Tagen bei ambienter CO<sub>2</sub>-Konzentration (360 ppm) war eine leichte Normalisierung des Saccharose- und Glukosegehalt in Wildtypblättern zu beobachten, d.h. die Konzentrationen näherte sich wieder den Werten vor dem Transfer an. Diese Änderungen in den Zuckergehalten deuten auf eine Anpassung der Pflanzen an die neuen Wachstumsbedingungen hin.

### 3.3.5.2. Organische Säuren

Der Gehalt an organischen Säuren in Blättern des Wildtyps und der SHMT-Antisense-Pflanzen wurde unter denselben Wachstumsbedingungen untersucht. Der Blattgehalt an Malat stieg in den transgenen Linien nach dem Transfer der Pflanzen in normale CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (360 ppm; siehe Abb. 3.43a). Diese Zunahme war nach sieben Tagen Wachstum bei 360 ppm etwas stärker als nach einem Tag Wachstum. Im Wildtypblättern waren dagegen keine Änderungen des Malatgehaltes zu beobachten (Abb. 3.43a).

Der Pyruvatgehalt der Blätter von Wildtyppflanzen stieg nach dem Transfer in 360 ppm CO<sub>2</sub>. Der Anstieg war etwas höher nach sieben Tagen Wachstum unter diesen Bedingungen als nach einem Tag Wachstum (Abb. 3.43b). In den SHMT-Antisense-Pflanzen kann auch eine leichte Zunahme des Pyruvatgehaltes der Blätter festgestellt werden; diese Veränderungen waren aber nicht so deutlich wie beim Wildtyp (Abb. 3.43b).

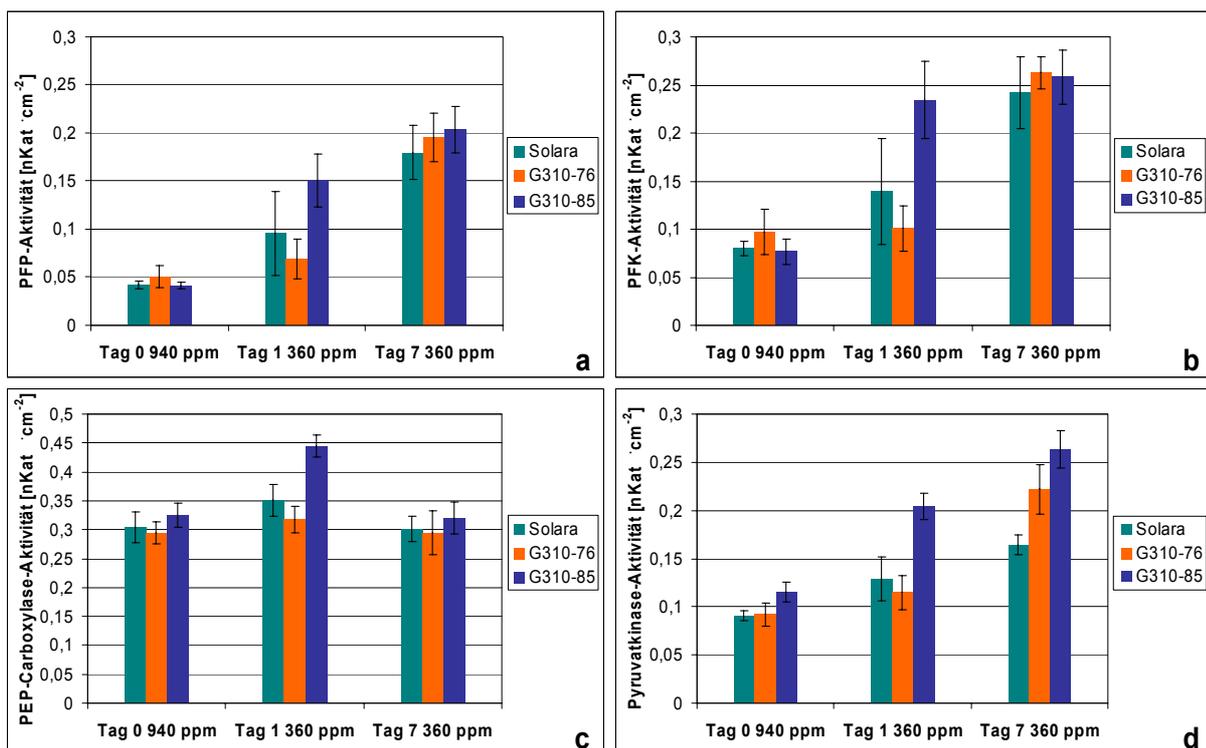


**Abb. 3.43: Gehalt an organischen Säuren in Blätter von Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen.** a) Malat und b) Pyruvat. Es wurden dieselben Blattproben wie in Abb. 3.42 verwendet; zur Bestimmung der Malat- und Pyruvatkonzentrationen siehe 2.8.1.3. und 2.8.1.4.

### 3.3.5.3. Enzyme zur Synthese von organischen Säuren

Die dargestellten Veränderungen im Metabolitspiegel des C-Metabolismus in den SHMT-Antisense-Pflanzen lassen vermuten, dass die Änderungen im Aminosäuremuster in diesen Pflanzen zu einer Aktivierung der Glykolyse zur Produktion von organischen Säuren führen könnten. Daher wurden die Aktivitäten einiger Schlüsselenzyme des C-Metabolismus bestimmt, die für den Ablauf der Glykolyse von Hexose-6-Phosphaten entscheidend sind, nämlich die Pyrophosphat-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase (PFP) und die ATP-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase (PFK). Die Aktivität von terminalen Enzymen der Glykolyse, die an der Synthese von organischen Säuren beteiligt sind, nämlich der Pyruvatkinase und der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEP-Carboxylase) wurde ebenfalls bestimmt.

Nach Umsetzung der Pflanzen auf ambiante CO<sub>2</sub>-Konzentration stiegen die Aktivitäten der glycolytischen Enzyme PFP und PFK sowohl in Wildtyp- als auch in SHMT-Antisense-Blättern. Der Anstieg der PFP-Aktivität nach einem Tag Wachstum bei 360 ppm betrug zwei- bis dreifach und nach sieben Tagen vier- bis fünffach, während die PFK-Aktivität nach sieben Tagen etwa dreifach angestiegen war (Abb. 3.44a und b).



**Abb. 3.44: Aktivitäten einiger Enzyme des C-Metabolismus in Blättern von Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen.** a) Pyrophosphat-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase (PFP) b) ATP-abhängige Fruktose-6-Phosphat-Kinase (PFK), c) Phosphoenolpyruvatcarboxylase und d) Pyruvatkinase. (Legende wie in Abb. 3.42)

Eine Induktion der Pyruvatkinase-Aktivität in Blättern wurde ebenfalls nach Umsetzung der Pflanzen auf 360 ppm CO<sub>2</sub> sowohl in Wildtyp- als auch in den transgenen Pflanzen beobachtet. Der Anstieg war unterschiedlich groß für Wildtyp- und transgenen Pflanzen und

betrug mehr als das zweifache für die transgenen Pflanzen und etwa das 1,8fache für den Wildtyp (Abb. 3.44d).

Die Aktivität der PEP-Carboxylase zeigte einen initialen Anstieg nach einem Tag Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub>, erreichte aber die ursprünglichen Werte nach sieben Tagen. Dieser vorübergehende Anstieg der PEP-Carboxylase-Aktivität war nur leicht bei dem Wildtyp und der Linie G310-76 (Abb. 3.44c).

### 3.3.6. Wirkungen der Reduktion der Menge an SHMT-Protein auf den N-Metabolismus

Wie bereits in 3.3.5. erläutert, stellt die Photorespiration einen Verknüpfungspunkt zwischen C- und N-Metabolismus dar. Die Freisetzung von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und seine Reassimilation während der Photorespiration repräsentieren eine Schleuse für die Einführung von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in den Aminosäurepool. Dabei ist die Rate an photorespiratorischer Freisetzung von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in den Mitochondrien ca. zehnmal höher als die Rate der primären NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Assimilation. Durch eine Akkumulation von Glycin wird N dem anabolen Metabolismus entzogen. Die Reduktion der GDC-Aktivität in den transgenen Pflanzen hat also einen Einfluss auf die Verteilung von assimiliertem Kohlenstoff zwischen C- und N-Metabolismus. Um diesen Einfluss genauer zu charakterisieren, wurden die Änderungen im Aminosäuremuster in Wildtyp- und SHMT-Antisense-Pflanzen unter verschiedenen C/O-Verhältnissen untersucht.

Die in Blättern der SHMT-Antisense-Pflanzen unter hoher CO<sub>2</sub>-Konzentration beobachtete Glycinakkumulation war mit einer Veränderung in den Konzentrationen anderer Aminosäuren begleitet. Während die Gehalte an Serin und Glutamat zunahmen, sanken die Gehalte an Glutamin und Asparagin (Tab. 3.12). Das Glutamat-/Glutamin-Verhältnis stieg von 1,9±0,3 in Wildtypblättern auf 6,1±1,1 in der transgenen Linie G310-76 und 6,9±3,0 in der Linie G310-85. Das Aspartat/Asparagin-Verhältnis stieg von 35±2 in Wildtypblättern auf 53±5 in der Linie G310-76 und 92±23 in der Linie G310-85. Diese Änderungen deuten auf eine Verschlechterung des N-Status der Pflanzen wegen der Festlegung von N in Glycin und Serin hin.

Wie in 3.3.3. bereits beschrieben, führte die deutliche Akkumulation von Glycin in Blättern der transgenen Linien nach Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration zu einer Abnahme in der Konzentration der anderen freien Aminosäuren mit Ausnahme der Amid-Donoren Glutamin und Asparagin (Tab. 3.12). Der Gesamtaminosäuregehalt in diesen Blättern stieg parallel zur Glycinakkumulation.

In Wildtyppflanzen dagegen führte die Änderung der CO<sub>2</sub>-Konzentration zu einer Veränderung des C/N-Verhältnisses insofern, dass die verminderte Verfügbarkeit von Kohlenhydratgerüsten die NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Assimilation beeinträchtigte. Das kann an der Zunahme des Gehaltes an Glutamin und Asparagin und der Abnahme des Gehaltes an den Transaminierungspartnern Glutamat und Aspartat abgelesen werden.

**Tab. 3.12: Aminosäuregehalt in Blätter von Wildtyp- und SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen** Die Gehalte an verschiedenen freien Aminosäuren wurde in jeweils dem fünften Blatt des Hauptprozesses einer Kartoffelpflanze nach 57 Tage Wachstum in Erde bei 940 ppm CO<sub>2</sub> und nach weiteren 24 h Wachstum bei 360 ppm CO<sub>2</sub> bestimmt. Die Gehalte an Glycin, Serin, Glutamat und Glutamin wurden bereits in der Abb. 3.36 gezeigt. Mittelwerte ± SE aus fünf verschiedenen Pflanzen pro Linie sind dargestellt.

[nmol·cm <sup>-2</sup> ]	Solara					
	Tag 0 940 ppm	Tag 1 360 ppm	Tag 0 940 ppm	Tag 1 360 ppm	Tag 0 940 ppm	Tag 1 360 ppm
Glycin	4 ± 1	1 ± 0	35 ± 18	316 ± 51	59 ± 34	891 ± 251
Serin	21 ± 2	22 ± 3	32 ± 5	16 ± 2	36 ± 6	20 ± 4
Glutamat	74 ± 5	38 ± 2	89 ± 14	34 ± 3	97 ± 10	53 ± 7
Glutamin	44 ± 9	114 ± 28	17 ± 4	15 ± 2	20 ± 9	11 ± 3
Aspartat	62 ± 3	25 ± 1	65 ± 13	9 ± 1	93 ± 16	17 ± 4
Asparagin	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1
andere AS	99 ± 5	82 ± 7	83 ± 13	77 ± 4	86 ± 12	70 ± 12
Σ AS	247 ± 15	234 ± 29	273 ± 49	422 ± 56	340 ± 51	1021 ± 247

## 4. Diskussion

### 4.1. Auf dem Weg von einer C<sub>3</sub>-Pflanze zu einer C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Pflanze

Die Oxygenase-Reaktion der RubisCO und die daraus resultierende Photorespiration führen zu einer Reduktion der Netto-CO<sub>2</sub>-Assimilation und damit der Produktivität von C<sub>3</sub>-Pflanzen. In Pflanzenarten mit C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediärem Stoffwechsel wird die Photorespiration durch Kompartimentierung der photorespiratorischen CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus Glycin in den Bündelscheidenzellen vermindert. C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediäre Pflanzen zeigen bei hohen Temperaturen und Trockenheit eine bessere photosynthetische Leistung und Wassernutzungseffizienz als C<sub>3</sub>-Pflanzen (Monson und Jaeger 1991). Daher wäre es wünschenswert, den C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-Stoffwechsel durch Gentechnik auf C<sub>3</sub>-Nutzpflanzen zu übertragen.

Der CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus der C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzenarten beruht auf der ausschließlichen Kompartimentierung der Glycinecarboxylase (GDC)-Aktivität in den Bündelscheidenzellen der Blätter. Die GDC ist ein Enzymkomplex und besteht aus vier Untereinheiten, dem P-, T-, L- und H-Protein. Da in der C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzenart *Moringa arvensis* (L.) DC. nur das P-Protein der GDC im Mesophyll fehlt, während die anderen Untereinheiten der GDC sowie die Serinhydroxymethyltransferase (SHMT) sowohl im Mesophyll als auch in den Bündelscheidenzellen vorliegen (Morgan *et al.* 1993), wurde postuliert, dass die Repression der Synthese des P-Proteins der evolutionäre Ausgangspunkt der Transition von der C<sub>3</sub>- zur C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Photosynthese war, und dass der Verlust der anderen Untereinheiten der GDC erst später stattfand (Morgan *et al.* 1993; Rawsthorne und Bauwe 1998). Die Kompartimentierung der GDC führt zu einem hohen Fluss an Glycin und Serin zwischen den beiden Zelltypen. Dieser ist nur möglich, wenn ein Glycin-Konzentrationsgradient zwischen Mesophyll- und Bündelscheidenzellen in C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzen besteht.

Die Etablierung des C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Stoffwechsels in einer C<sub>3</sub>-Pflanze erfordert die Suppression der GDC-Aktivität im Mesophyll und gleichzeitig die Erhöhung dieser Aktivität in den leitbündelnahen Zellen. Die Struktur der GDC und die Stöchiometrie ihre Untereinheiten sind nicht im Detail aufgeklärt (Oliver *et al.* 1990). Es ist möglich, dass die Menge an einer der Untereinheiten einen limitierenden Faktor für die Aktivität des Komplexes darstellen könnte. Also sollte versucht werden, durch Antisense-Inhibierung von einer der vier Untereinheiten in Mesophyllzellen sowie durch Überexpression in den leitbündelnahen Zellen die Kompartimentierung der GDC-Aktivität von C<sub>3</sub>-Nutzpflanzen zu verändern.

#### 4.2. Überexpression des P-Proteins

Die erste Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob sich die GDC-Aktivität durch die Überexpression einer der Untereinheiten erhöhen lässt. Zu dieser Fragestellung sind bereits mehrere Versuche unternommen worden, von denen aber keiner zu dem gewünschten Ergebnis geführt hat. Nur in einer Versuchsserie gelang es, die Konzentration einzelner Untereinheiten zu erhöhen. Laubner (1999) exprimierte die cDNA für das H- bzw. T-Protein aus *Flaveria pringlei* unter Kontrolle des blattspezifischen Promotors *StLS1* (Stockhaus *et al.* 1987) in Tabakpflanzen. Die Überexpression gelang, führte aber nicht zu einer Steigerung der GDC-Aktivität (Laubner 1999). Die Menge an H- bzw. T-Protein ist also in Tabak kein limitierender Faktor für die GDC-Aktivität. Die Überexpression des P-Proteins wurde ebenfalls versucht, scheiterte aber ohne offensichtlichen Grund (M. Laubner und H. Bauwe, persönliche Mitteilung).

Daher war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, eine cDNA für das P-Protein aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. in Tabakblättern zu exprimieren, um zu überprüfen, ob die Menge an P-Protein einen limitierenden Faktor für die GDC-Aktivität darstellte. Wegen der oben genannten Schwierigkeiten und um verschiedene Pflanzenlinien zur Untersuchung der Folgen der Expression zur Verfügung zu haben, wurden für die Überexpression verschiedene Promotoren eingesetzt: ein blattspezifischer Promotor (*StLS1*; Stockhaus *et al.* 1987), ein mesophyllspezifischer Promotor (*FpGDCsP-D*; Chu 1996) sowie ein Bündelscheidenspezifischer Promotor (*FaGDCsP-A*; Chu 1996).

Wie man auf Abbildung 3.3, 3.4 und 3.5 sehen kann, gelang es nach vielen vergeblichen Bemühungen, in allen drei Ansätzen die Menge an P-Protein in verschiedenen transgenen Linien zu erhöhen. Dieses Ergebnis belegt, dass es zwar schwierig aber nicht grundsätzlich unmöglich ist, die Überexpression dieses Proteins zu erreichen. Leider war es nicht mehr möglich, im Rahmen dieser Dissertation zu untersuchen, ob die Erhöhung der Menge an P-Protein zu einer Steigerung der GDC-Aktivität führte. Es musste auch offen bleiben, welche physiologische Auswirkungen die Veränderung der GDC-Aktivität in den entsprechenden Pflanzenlinien hat. Dies muss späteren Experimenten vorbehalten bleiben.

#### 4.3. Reduktion der Kapazität für die Decarboxylierung von Glycin

Im Gegensatz zur Erhöhung der GDC-Aktivität war ihre Reduktion mit der Antisense-Technik schon seit längerer Zeit erfolgreich. Es sind Antisense-Linien des H-, T- und P-Proteins in Kartoffel und Tabak mit unterschiedlichen Promotoren hergestellt worden (H. Bauwe, unveröffentlicht), und einige davon wurden auch physiologisch charakterisiert. Bei Verwendung eines blattspezifischen Promotors (*StLS1*) stellte sich heraus, dass in Kartoffel die GDC-Aktivität durch Antisense-Inhibierung der Expression des P-Protein-Gens am stärksten reduziert werden konnte; in Tabak waren dagegen Versuche mit dem H-Protein

erfolgreicher gewesen (H. Bauwe, unveröffentlicht). Einige Eigenschaften der P-Protein-Antisense-Kartoffelpflanzen wurden bereits veröffentlicht (Heineke *et al.* 2001). In diesen Untersuchungen wurde ein Chlorophyllabbau in älteren Blättern beschrieben; die Frage nach der Ursache blieb aber unbeantwortet. Außerdem waren die hier beschriebenen Pflanzen wegen der Gewebespezifität des verwendeten Promotors nicht geeignet, um für die Ausbildung von  $C_3/C_4$ -intermediären Eigenschaften in  $C_3$ -Pflanzen eingesetzt zu werden. Daher war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die physiologischen Eigenschaften von Kartoffelpflanzen zu untersuchen, in denen die Synthese des P-Proteins mittels des Antisense-Verfahrens spezifisch im Mesophyll reduziert worden war. In einem zweiten Ansatz wurden Antisense-Kartoffelpflanzen untersucht, in denen die Synthese der Serinhydroxymethyltransferase (SHMT) mittels Antisense-Technik unter Verwendung eines *StLS1*-Promotors in allen Chloroplasten-haltigen Zellen inhibiert war. In den Blättern dieser Kartoffelpflanzen wurde eine mehr als 99%ige Reduktion der Menge an SHMT-Protein beobachtet (Abb. 3.32). In isolierten Mitochondrien war die relative Rate der Glycin-Decarboxylierung im Vergleich mit Wildtyppflanzen um mehr als 95 % vermindert (T. Winzer, unveröffentlicht). Diese transgenen Pflanzen waren unter ambienten  $CO_2$ -Konzentrationen (360 ppm) nicht lebensfähig (H. Bauwe, persönliche Mitteilung). Bei Anzucht unter 800 ppm  $CO_2$  konnten sie zwar überleben, aber die Blätter der transgenen Pflanzen zeigten eine starke Akkumulation von Glycin und einen Chlorose-Phänotyp (T. Winzer, unveröffentlicht). In den in dieser Arbeit dokumentierten Experimenten wurden die SHMT-Antisense-Pflanzen bei 940 ppm  $CO_2$  angezogen, da sie für die hier geplanten Analysen keinen erkennbaren Phänotyp ausbilden sollten (siehe 3.3.1.).

#### 4.4. Können Kartoffelpflanzen auf die GDC-Aktivität in Mesophyll verzichten?

Der  $CO_2$ -Konzentrierungsmechanismus der  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzenarten beruht auf der ausschließlichen Kompartimentierung der GDC-Aktivität in den Bündelscheidenzellen der Blätter. Das Glycin, welches in Mesophyllzellen nicht decarboxyliert werden kann, diffundiert in die Bündelscheidenzellen und wird dort in den Mitochondrien decarboxyliert. Die Diffusion setzt voraus, dass ein ausreichend großer Gradient zwischen dem Mesophyll und den leitbündelnahen Zellen ausgebildet wird. Dies scheint in  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzen stattzufinden, denn der Glycingehalt der Blätter der  $C_3/C_4$ -intermediären Art *Moricandia arvensis* (L.) DC. ist doppelt so hoch wie der von *Moricandia*-Arten mit  $C_3$ -Charakteristika und bis zu viermal höher als der Gehalt von Metaboliten, die in  $C_4$ -Blättern zum Transfer von  $CO_2$  in die Bündelscheide dienen (Rawsthorne und Hylton 1991). Außerdem besitzen die Bündelscheidenzellen von  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzen eine höhere Kapazität zur Decarboxylierung von Glycin als Mesophyllzellen von  $C_3$ -Pflanzen (Rawsthorne und Bauwe 1998). Dadurch wird die fehlende GDC-Aktivität in Mesophyll kompensiert. Es wird vermutet, dass diese höhere Kapazität der Mitochondrien in den Bündelscheidenzellen auch für die

Bildung des Glycin-Gradienten zwischen Mesophyll und Bündelscheidenzellen notwendig ist (Rawsthorne und Bauwe 1998).

Kartoffelpflanzen mit einer blattspezifischen Antisense-Inhibierung der Synthese von P-Protein zeigten eine 100fache Akkumulation an Glycin. Jüngere Blätter dieser Pflanzen wiesen normale Chlorophyllgehalte und CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten (Heineke *et al.* 2001). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die GDC in Wildtyp-Kartoffelpflanzen unter den Anzuchtbedingungen nur mit der Hälfte der maximalen Geschwindigkeit arbeitet, aber in den transgenen Pflanzen erheblich näher an ihrer maximalen Kapazität operiert. Es wurde angenommen, dass die Anreicherung von Glycin in den Blättern zu einer Konzentrationserhöhung in den Mitochondrien führt, die eine höhere maximale Umsatzrate der GDC in den transgenen Pflanzen ermöglicht, so dass ein mit den Wildtyppflanzen vergleichbarer Umsatz erreicht wird.

Aufgrund dieser Resultate war zu prüfen, ob die spezifische Reduktion der GDC-Aktivität in Mesophyll von Kartoffelpflanzen zur Etablierung eines CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus führen könnte. Dafür wurden die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Pflanzen hergestellt, in denen die Synthese des P-Proteins durch Antisense spezifisch im Mesophyll reduziert war. Blätter dieser Pflanzen besaßen 15 – 25 % des Wildtypgehaltes an P-Protein (Abb. 3.11), und die Reduktion der Menge an P-Protein führte zu einer Reduktion der Kapazität isolierter Mitochondrien für die Decarboxylierung von Glycin in Vergleich mit NADH auf 15 – 20 % der Raten des Wildtyps (Winzer *et al.* 2001). Damit war die Reduktion der GDC-Aktivität in Blättern dieser Pflanzen erheblich höher als in den oben beschriebenen blattspezifischen P-Antisense-Linien. Trotzdem war der Phänotyp (Akkumulation von Glycin, Ausbildung chlorotischer Blätter) der hier verwendeten mesophyllspezifischen P-Antisense-Linien ähnlich dem der blattspezifischen Linien (Heineke *et al.* 2001; Abb. 3.13 und 3.8). Der bemerkenswerte Unterschied in der GDC-Aktivität deutet darauf hin, dass die Glycin-Decarboxylierung in den bündelscheidennahen Zellen tatsächlich einen signifikanten Beitrag zur Glycinoxidation liefert.

In jedem Fall sind Kartoffelpflanzen offensichtlich nicht in der Lage, mit einer starken Reduktion der GDC-Aktivität im Mesophyll unter ambienter CO<sub>2</sub>-Konzentration zurechtzukommen. Aus diesen Ergebnissen ließe sich einerseits ableiten, dass eine Reduktion der GDC-Aktivität im Mesophyll von Kartoffelblättern durch die verbleibende Aktivität in anderen Zelltypen teilweise, aber nicht vollständig kompensiert werden kann. Daraus müsste geschlossen werden, dass es für die Etablierung eines C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Stoffwechsel in C<sub>3</sub>-Pflanzen wahrscheinlich notwendig ist, gleichzeitig die GDC-Aktivität im Mesophyll zu reduzieren und in den leitbündelnahen Zellen zu erhöhen.

Es könnte andererseits auch möglich sein, dass die Diffusion von Glycin aus dem Mesophyll in die leitbündelnahen Zellen von Kartoffelblättern nicht stattfinden kann, d.h. dass in

Kartoffelpflanzen im Gegensatz zu  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzen die Voraussetzungen zur Ausbildung eines kontinuierlichen Glycinkonzentrationsgradienten nicht gegeben sind.

Aus den bisher diskutierten Ergebnissen lassen sich unter der Voraussetzung, dass diese an Kartoffelpflanzen gewonnenen Ergebnisse auf andere Pflanzenarten übertragbar sind, versuchsweise einige Folgerungen in Bezug auf die Evolution der  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzen formulieren:

1. Die Ausgangspflanzen für die Transition zum  $C_3/C_4$ -intermediären Metabolismus mussten eine höhere GDC-Aktivität in den leitbündelnahen Zellen oder im Gesamtblatt besitzen, die es ihnen ermöglichte, den Verlust der GDC-Aktivität in Mesophyll zu kompensieren.
2. Der Verlust der GDC-Aktivität im Mesophyll sollte erst nach der Erhöhung der Aktivität (zumindest in den leitbündelnahen Zellen) eingetreten sein.
3. Der Verlust der Expression des P-Proteingens sollte am Anfang nur einzelne Zelltypen betroffen haben.
4. Womöglich mussten die Ausgangspflanzen spezielle Eigenschaften besitzen, vermutlich in Bezug auf die Sequestrierung von Glycin in den Vakuolen, die es ihnen ermöglichte, einen Glycin-Konzentrationsgradienten zu bilden.

#### 4.4.1. „CO<sub>2</sub> burst“ in P-Antisense-Kartoffelpflanzen

Pflanzen mit  $C_3/C_4$ -intermediären photosynthetischen Stoffwechsel sind charakterisiert durch eine Verzögerung der CO<sub>2</sub>-Freisetzung nach der Unterbrechung der Belichtung („post-illumination CO<sub>2</sub> burst“; Rawsthorne und Hylton 1991). Diese Verzögerung beruht darauf, dass in diesen Pflanzen das in den Mesophyllzellen gebildete Glycin eine gewisse Zeit benötigt, um vollständig aus den Mesophyllzellen in die bündelscheidennahen Zellen zu diffundieren. Das Ausmaß der CO<sub>2</sub>-Freisetzung ist in  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzen außerdem größer als in  $C_3$ -Pflanzen, weil der Glycinspiegel doppelt so hoch ist und die Decarboxylierung so lange fortgesetzt wird, bis der für die Dunkelphase charakteristische niedrige Spiegel erreicht ist.

Da auch in den hier untersuchten Kartoffelpflanzen mit mesophyllspezifischer Reduktion der GDC-Aktivität eine Glycinakkumulation beobachtet wurde, sollte sich wie in  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzen ein veränderter „post-illumination CO<sub>2</sub> burst“ nachweisen lassen. Diese Vermutung ließ sich auch bestätigen, denn der „CO<sub>2</sub> burst“ war tatsächlich größer als in Wildtyppflanzen (Abb. 3.21). Es wurde aber keine Verzögerung im „CO<sub>2</sub> burst“ in den transgenen Pflanzen im Vergleich mit dem Wildtyp beobachtet. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Decarboxylierung des akkumulierten Glycins in denselben Zellen stattfindet, in denen es sich befindet, denn anders als in den  $C_3/C_4$ -intermediären Pflanzen hat die Antisense-Inhibierung die GDC-Aktivität zwar deutlich reduziert, aber nicht vollständig

ausgeschaltet. Damit entfällt die Notwendigkeit der Diffusion in der Dunkelperiode. Diese Beobachtung schließt aber nicht aus, dass in der Lichtphase Diffusion stattfindet, denn die Flussrate im Licht ist erheblich höher als in der Dunkelperiode und die Unterbrechung der Lichtreaktionen im Licht/Dunkelübergang lässt einen möglichen Konzentrationsgradienten zusammenbrechen, wenn Glycin in allen Zelltypen decarboxyliert werden kann.

#### **4.5. Auswirkungen reduzierter Menge an P-Protein auf die Photosynthese**

Anhand der P-Antisense-Pflanzen wurden die Auswirkungen einer Reduktion der Kapazität der Mesophyllzellen zur Umwandlung von Glycin in Serin auf die Photosynthese sowie den C- und N-Metabolismus untersucht.

Wie bereits erwähnt, wiesen Kartoffelpflanzen mit einer mesophyllspezifischen Antisense-Inhibierung der Synthese von P-Protein eine Reduktion der Menge an P-Protein in Blättern um etwa 75 % auf (Abb. 3.7 und 3.11), was mit einer Reduktion der Atmungsraten isolierter Mitochondrien mit Glycin als Substrat im Vergleich mit der NADH-abhängigen Atmung um 80 bis 85 % korrelierte (Winzer *et al.* 2001).

P-Antisense-Pflanzen akkumulierten unter ambienten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (360 ppm) Glycin während der Lichtperiode, und zwar unabhängig davon, ob die Expression des P-Proteingens nur im Mesophyll oder in allen Chloroplasten-haltigen Zellen reprimiert wurde (Heineke *et al.* 2001; Winzer *et al.* 2001; Abb. 3.13a und Tab. 3.6). Das gebildete Glycin wurde während der folgenden Dunkelperiode vollständig oder größtenteils abgebaut (Heineke *et al.* 2001; Winzer *et al.* 2001). Es ist zu bemerken, dass das während der Lichtphase akkumulierte Glycin nur ca. 1 % der gesamten Glycinmenge darstellte, die während der gesamten Lichtperiode durch den C<sub>2</sub>-Zyklus gebildet wurde. Das heißt, dass der größte Teil des gebildeten Glycins während der Lichtperiode durch die verbleibende GDC-Aktivität abgebaut oder in andere Organe der Pflanzen exportiert wurde.

Unter ambienten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen wurden die älteren Blätter im mittleren und unteren Bereich der P-Antisense-Kartoffelpflanzen chlorotisch (Winzer *et al.* 2001; Abb. 3.8). Dies war auch bei Kartoffelpflanzen mit blattspezifischer Antisense-Repression der Expression des P-Proteingens der Fall, in denen die GDC-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp um 70 - 75 % reduziert war (Heineke *et al.* 2001). Auch bei SHMT-Antisense-Pflanzen fand sich dieser Chlorose-Phänotyp der älteren Blätter, wenn sie bei 800 ppm CO<sub>2</sub> kultiviert wurden (T. Winzer, unveröffentlicht); bei 940 ppm CO<sub>2</sub> sah man den Phänotyp allerdings nicht (Abb. 3.34).

Dieser Chlorose-Phänotyp, der sich in allen hier betrachteten transgenen Linien nachweisen ließ, ist nicht einfach zu erklären. Die jüngeren Blätter dieser Pflanzen unterschieden sich von vergleichbaren Blättern des Wildtyps nur in den Glycinspiegeln, während die Chlorophyllgehalte und CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten unverändert waren (Heineke *et al.* 2001;

Abb. 3.10 und 3.17). Trotzdem trat mit zunehmendem Blattalter die beschriebene chlorotische Veränderung auf. Diese Beobachtung suggeriert, dass bereits in jungen Blättern andere nicht auffällige Parameter beeinflusst werden, die die langfristigen Veränderungen begünstigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige dieser möglichen Parameter untersucht, von denen einige als Effektoren ausgeschlossen werden konnten. So konnte in diesen Blättern keine Limitation des linearen Elektronentransports und keine Induktion von nicht-photochemischen Dissipationsmechanismen festgestellt werden (Tab. 3.4). Daher kann man davon ausgehen, dass die verbleibende GDC-Aktivität in jüngeren Blättern von P-Antisense-Pflanzen ausreicht, um eine konstante Flussrate durch den C2-Zyklus aufrechterhalten, so dass die CO<sub>2</sub>-Assimilation nicht beeinflusst wird.

#### **4.5.1. Mögliche Ursachen für die Chlorose in älteren Blättern der P-Antisense-Pflanzen**

Die Bildung der Chlorose war progressiv; ihr Grad war abhängig von Blatt- und Pflanzenalter, und wurde durch leichte Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration während des Wachstums beeinflusst (siehe 3.22.). Daraus kann man einen Zusammenhang zwischen der Chlorose und der Photorespiration schließen, obwohl die GDC-Aktivität in jüngeren Blättern offensichtlich nicht limitierend war. Es war auffällig, dass die Reduktion im Chlorophyllgehalt der Blätter und die Höhe der Glycinkkumulation mit einer Reduktion der CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten korrelierte (Heineke *et al.* 2001; Abb. 3.10, 3.13a und 3.17).

Ein Hinweis auf mögliche Ursachen wurde in jungen Blättern zehn Wochen alten Pflanzen der P-Antisense-Linien beobachtet. In diesen Blättern waren unter Anzuchtbedingungen die effektive Quantenausbeute und die photochemische Fluoreszenzlöschung erniedrigt im Vergleich mit Wildtypblättern. (Abb. 3.24b). Dies war von einer Induktion von nicht-photochemischen Dissipationsmechanismen begleitet (Abb. 3.25b). Dieses Ergebnis deutet auf eine Limitation des linearen Elektronenflusses und des Elektronentransfers aus dem PSI in den transgenen Pflanzen hin. Diese Limitation impliziert eine reduzierte Aktivität der bedeutendsten Reduktionsäquivalente- und ATP-verbrauchenden Reaktionen im Stroma, nämlich eine Reduktion der Aktivität des Calvin-Zyklus, der Reassimilation von photorespiratorischen NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und/oder der Nitrit-Reduktion.

Es stellte sich daher die Frage, warum die Aktivität des Calvin-Zyklus reduziert sein könnte. Da die Photorespiration von der Aktivität des Calvin-Zyklus abhängig ist, ist zu erwarten, dass bei reduzierter CO<sub>2</sub>-Assimilation auch die Photorespirationsraten reduziert sind. Allerdings korrelierte die Reduktion des Gehaltes an Glycerat-3-Phosphat in Blättern der P-Antisense-Pflanzen mit reduzierten CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten mit einem Anstieg an Glyoxylat (Abb. 3.18a und b). Dies deutet darauf hin, dass die relativen Flussraten durch den C2-Zyklus unter diesen Bedingungen limitiert waren. Da in jungen Blättern der Glyoxylatspiegel nicht verändert war (Abb. 3.15b), stellt sich die Frage, wie der Stoffwechsel jüngerer Blätter

beeinflusst sein könnte. Auch wenn in den jüngeren Blättern kein erhöhter Glyoxylat-Spiegel nachweisbar ist, wäre es möglich, dass das wegen eines Staus im C2-Zyklus entstehende Glyoxylat nicht ausreichend schnell detoxifiziert werden könnte und die peroxisomale Matrix zerstörte. Dies würde dazu führen, dass die Aktivität des C2-Zyklus in fortschreitendem Maße reduziert würde. Die Aktivität von Entgiftungsenzyme für Glyoxylat ist in jüngeren Blättern nicht erhöht. In älteren Blättern dagegen wird eine Erhöhung der spezifischen Aktivität der Glyoxylatreduktase beobachtet, was die Vermutung unterstützt, dass Glyoxylat aus den Peroxisomen ins Cytosol entweicht.

Ein weiterer Hinweis auf eine Limitation des C2-Zyklus in den transgenen Pflanzen war der Umstand, dass Blätter mit reduzierter CO<sub>2</sub>-Assimilation unter Anzuchtbedingungen eine stärkere Abhängigkeit der CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten von der Photorespiration zeigten als die jüngeren Blätter (Abb. 3.19a und c). Es erhebt sich die Frage, aus welchen Gründen die Flussraten durch den C2-Zyklus in älteren Blättern stärker reduziert sind als in jüngeren. Eine mögliche Erklärung dafür lässt sich aus dem unterschiedlichen Grad der Akkumulation von Glycin herleiten, denn der Glycin-Spiegel jüngerer Blätter ist deutlich niedriger als der von älteren Blättern (Abb. 3.13a). Die erhöhte Glycinakkumulation könnte in den älteren Blättern eine stärkere Kontrolle über die Flussraten von Metaboliten durch den C2-Zyklus ausüben. Obwohl das während der Lichtphase in den jüngeren Blättern gebildete Glycin fast vollständig in der nächsten Dunkelperiode abgebaut wird, lässt sich vermuten, dass die stärkere Glycinakkumulation in den älteren Blättern auf eine langsame Anhäufung des nicht abgebauten Glycins zurückzuführen ist.

Eine Abhängigkeit vom Blattalter des P-Proteingehaltes in Blätter der transgenen Pflanzen wäre eine weitere Erklärung für eine stärker reduzierte Kapazität des C2-Zyklus in älteren Blättern. Es wurde tatsächlich eine Verringerung der Menge an P-Protein in älteren Blättern der transgenen Pflanzen festgestellt (Abb. 3.12). Wenn eine altersabhängige Reduktion der Expression des P-Proteins die Ursache ist, könnte man vermuten, dass die verstärkte Abnahme der P-Proteinmenge in den älteren Blättern in einen Bereich kommt, in dem die Flussraten durch den C2-Zyklus limitiert werden. Das könnte die beobachtete progressive Erscheinung des Phänotyps in den transgenen Pflanzen erklären. Die altersabhängige Abnahme betraf spezifisch die Menge an P-Protein und trat nur in den transgenen Pflanzen auf. Die Menge an T-Protein veränderte sich nicht, es kann sich also nicht um eine Degradation der GDC handeln. Es ist möglich, dass dieses Phänomen darauf beruht, dass die Aktivität des mesophyllspezifischen Promotors mit dem Blattalter steigt; dies wurde von Chu (1996) nicht untersucht. Chu (1996) fand allerdings, dass die Aktivität anderer Promotoren von Genen für Komponenten der GDC aus *Flaveria*-Arten zumindest in Tabak vom Blattalter abhängig war. So stieg die Aktivität des GDCsT-Promotors aus *Flaveria anomala* in Tabak mit dem Blattalter, während die Aktivität des GDCsP-Promotors aus *F. anomala* mit dem Blattalter abnahm.

#### 4.5.2. Einfluss der N-Versorgung auf den Chlorose-Phänotyp

Durch die lichtabhängige Akkumulation von Glycin steigt in den Blättern der transgenen Pflanzen die Menge an in Aminosäuren gebundenem Stickstoff. Dieser wird in der Dunkelperiode durch den Abbau des akkumulierten Glycin wieder freigesetzt. So verändert sich durch die reduzierte GDC-Aktivität nicht der gesamte N-Haushalt, aber der diurnale Umsatz gegenüber Wildtyppflanzen. Daher lag die Vermutung nahe, dass die N-Verfügbarkeit, und damit die N-Versorgung den Chlorose-Phänotyp beeinflussen könnte. Für diese Vermutung spricht die Beobachtung, dass sich der Chlorose-Phänotyp jüngerer Pflanzen verstärken ließ, wenn diese längere Zeit in derselben Erde kultiviert wurden, denn die Pflanzen wurden nicht zusätzlich gedüngt.

Um die Bedeutung der N-Versorgung näher zu untersuchen, wurden Pflanzen auf Hydrokultur unter definierter N-Versorgung angezogen. Wurden die Pflanzen in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  kultiviert, verschwand der Chlorose-Phänotyp fast vollständig, wurde dagegen durch Kultur auf 1 mM  $\text{NO}_3^-$  ein N-Mangel erzeugt, war der Chlorose-Phänotyp verstärkt. Allerdings gibt es kein Hinweis auf einen verstärkten N-Mangel in den transgenen Pflanzen, wenn sie auf Erde angezogen wurden, denn das Wachstum war unter diesen Bedingungen vergleichbar mit dem der Wildtyppflanzen. Die Nitratreduktase-Aktivität in Blättern dieser Pflanzen war auch unter diesen Bedingungen leicht erhöht und der Aktivierungszustand entsprach ungefähr dem des Wildtyps (Tab. 3.8). Es wäre aber denkbar, dass Signale eines Nitratmangels während der Lichtperiode in den transgenen Pflanzen erzeugt werden. Ein Indiz für diese Vermutung ist das veränderte Verhältnis zwischen Glutamat und Glutamin (Tab. 3.6). Dieses postulierte „falsche“ N-Mangel-Signal könnte in älteren Blättern den Abbau von Photosynthese-Enzymen induzieren.

P-Antisense-Pflanzen in Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  unterschieden sich von den auf Erde angezogenen Pflanzen in einem weiteren Punkt. Jüngeren Blätter der transgenen Pflanzen aus Hydrokultur zeigten unter photorespiratorischen Bedingungen, d.h. hoher Lichtintensität und niedriger  $\text{CO}_2$ -Konzentration, eine viel schwächere Reduktion der  $\text{CO}_2$ -Assimilation als die Blätter von in Erde gewachsenen Pflanzen. Der C2-Zyklus hatte also in Hydrokultur einen viel schwächeren limitierenden Einfluss auf die  $\text{CO}_2$ -Assimilation als auf Erde. Zwar wurde dieses Phänomen nicht im Detail analysiert, aber eine mögliche Erklärung wäre, dass die Blätter der Pflanzen aus Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  während der Aufnahme der  $\text{CO}_2$ -Sättigungskurve wegen einer besseren N-Verfügbarkeit mehr Glycin akkumulieren konnten, so dass die Flussraten durch den C2-Zyklus weniger limitiert wurden.

Diese erhöhten N-Reserven könnten auch die Ursache dafür sein, dass die Blätter von transgenen Pflanzen aus Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  "gesünder" waren als die Blätter von Pflanzen auf Erde. Da die Glycinakkumulation in den Blättern der transgenen Pflanzen aus Hydrokultur mit 10 mM  $\text{NO}_3^-$  ungefähr so stark war wie in den Blättern der transgenen

Pflanzen aus Erde (Abb. 3.13a, 3.14a, Tab. 3.6 und 3.7), kann ausgeschlossen werden, dass der Chlorose-Phänotyp eine direkte Folge der Glycinakkumulation ist. Ebenso ist es unwahrscheinlich, dass die Expression des P-Proteins oder des Promotors des Antisense-Konstrukts durch N-Verfügbarkeit reguliert wird, denn wie aus Abbildung 3.11 hervorgeht, ist die Menge an P-Protein zwischen Pflanzen aus Hydrokultur und Pflanzen auf Erde kaum verändert.

#### **4.6. Wirkungen reduzierter Menge an P-Protein auf den C- und N-Metabolismus**

Die Veränderungen in den absoluten und relativen Gehalten von Kohlenhydraten und Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin sind schwer zu interpretieren. Die Tatsache, dass vergleichbare Spiegel der anderen Aminosäuren in den mesophyllspezifischen P-Antisense-Kartoffelpflanzen beobachtet wurden (Tab. 3.6), deutet darauf hin, dass die Synthesewege und die N-Verfügbarkeit für die Bildung dieser Aminosäuren wenig beeinflusst sind. Dies deckt sich auch mit den an blattspezifischen P-Antisense-Pflanzen gefundenen Ergebnisse (Heineke *et al.* 2001). Allerdings ist es nicht möglich, aus Bestimmungen von Gehalten Aussagen über die Synthese- und Exportrate der Aminosäuren zu machen. So ist es durchaus möglich, dass der erhöhte Spiegel aller Aminosäuren, einschließlich Glycin, in den transgenen Linien zu einem vermehrten Export von Aminosäuren während der Lichtperiode führt. In wenigen Untersuchungen zur Zusammensetzung der Knollen von P-Antisense-Pflanzen wurde ein höherer Proteingehalt als in Knollen der Wildtyppflanzen gefunden (T. Winzer, unveröffentlicht). Die verringerten Gehalte von Saccharose und Stärke in den Blättern der transgenen Pflanzen (Abb. 3.29c und d) folgen der mit zunehmendem Blattalter verringerten CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es verschiedene Indikatoren aus dem Metabolismus gibt, die für eine langsam fortschreitende Chlorose verantwortlich sein könnten. Eine schlüssige Abfolge der Wirkungsmechanismen der verschiedenen Faktoren ist aber nicht möglich.

#### **4.7. Wirkungen reduzierter Menge an SHMT-Protein auf den C- und N-Metabolismus**

Die SHMT-Antisense-Pflanzen waren unter ambienter CO<sub>2</sub>-Konzentration nicht lebensfähig (H. Bauwe, unveröffentlicht). Da viele in diesen Linien beobachtete Effekte bereits in den vorhergehenden Kapiteln über die P-Protein-Antisense-Pflanzen diskutiert wurden, soll an dieser Stelle nur auf das Experiment eingegangen werden, als diese Linien von 940 ppm CO<sub>2</sub> in 360 ppm CO<sub>2</sub> umgesetzt wurden. Aufgrund der Reduktion der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Anzuchtraum wurde in allen Pflanzen-Linien die CO<sub>2</sub>-Assimilation reduziert. Wildtyppflanzen und transgene Pflanzen reagierten in unterschiedlicher Weise auf diese Veränderung. In den Wildtyppflanzen wurde nach 24 h eine deutliche Akkumulation von Glutamin bei gleichzeitiger Abnahme im Gehalt von Glutamat und Aspartat beobachtet. Dies deutet auf

eine erhöhte Nitratassimilation. In den transgenen Linien dagegen stieg der Glycingehalt an, während die Gehalte aller anderen Aminosäuren sanken. In Wildtyppflanzen war der Anstieg an Glutamin mit einem Anstieg an Pyruvat begleitet und es kam zu einer Aktivierung der Enzyme der Glykolyse. Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass die Blätter der Wildtyppflanzen sich an die veränderten Umweltbedingungen so anpassten, dass die Nitratassimilation gegenüber der CO<sub>2</sub>-Assimilation aktiviert wurde und die erhöhte Verfügbarkeit von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> die Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten induzierte.

Nach Transfer der SHMT-Antisense-Pflanzen von 940 ppm CO<sub>2</sub> in 360 ppm CO<sub>2</sub> wurde innerhalb von 24 h in den Blättern eine Akkumulation von Hexosen, Malat und Glycin beobachtet. Es ist zu vermuten, dass auch in diesen Pflanzen eine erhöhte Nitratassimilation erfolgte, die sich allerdings in der Akkumulation von Glycin widerspiegelte. Nach einer Woche waren die Blätter dieser Pflanzen wellig. Dieser Phänotyp ist ähnlich den von Büssis und Heineke (1998) beobachteten Veränderungen von in Hydrokultur angezogenen Kartoffelpflanzen, die durch Zusatz von PEG unter Stress gesetzt wurden.

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die ausgewachsenen Blätter nicht in der Lage waren, ihren Stoffwechsel an die veränderten Wachstumsbedingungen anzupassen. Die Blätter starben ab und die Pflanzen bildeten neue, den veränderten Bedingungen angepasste Blätter. Die Blätter der SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen waren auch nicht in der Lage, ihren Stoffwechsel den veränderten Umweltbedingungen anzupassen. Im Gegensatz zu den von Büssis und Heineke (1998) beschriebenen Kartoffelpflanzen wurde bei den SHMT-Antisense-Pflanzen innerhalb einer Woche keine Bildung neuer Blätter beobachtet.

Daher ist es zu vermuten, dass die beobachtete Induktion der glykolytischen Enzyme in den transgenen Pflanzen anders als in Wildtyppflanzen die Folge einer Störung im osmotischen Gleichgewicht ist, und dass diese Störung zur Induktion der Akkumulation von Malat führte.

#### 4.8. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeiten bieten die Voraussetzung für die Möglichkeit, weitere Schritte auf dem Weg, C<sub>3</sub>-Pflanzen in C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediäre Pflanzen zu überführen, zu gehen. Als erster Schritt ist zu prüfen, welche physiologischen Konsequenzen die heterologe Expression des P-Proteins von *A. thaliana* (L.) Heynh. in Tabak hat. Ausgehend von diesen Ergebnissen kann in weiteren Experimenten durch Kreuzung der vorhandenen Antisense-Linien mit den Überexpressionslinien die Kompartimentierung der GDC in C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzen mit den verschiedenen Proteinen imitiert werden. Dazu würden die SHMT-Antisense-Pflanzen, die sich durch ihre fast vollständige Ausschaltung der Kapazität der Glycin-Decarboxylierung besonders gut eignen.

Ob diese Experimente zu dem gewünschten Ziel führen können, muss offen bleiben. Die Voraussetzungen sind aber im Wesentlichen geschaffen.

## 5. Zusammenfassung

In Pflanzenarten mit  $C_3/C_4$ -intermediärem Stoffwechsel wird die Photorespiration durch Kompartimentierung der photorespiratorischen  $CO_2$ -Freisetzung aus Glycin in den Bündelscheidenzellen vermindert. Dieser  $CO_2$ -Konzentrierungsmechanismus beruht auf der ausschließlichen Kompartimentierung der Glycindecarboxylase (GDC)-Aktivität in den Bündelscheidenzellen der Blätter.

Es wäre wünschenswert, diese Eigenschaft durch Gentechnik auf  $C_3$ -Nutzpflanzen zu übertragen. Die Etablierung eines solchen Mechanismus in einer  $C_3$ -Pflanze erfordert die Suppression der GDC-Aktivität im Mesophyll und gleichzeitig die Erhöhung dieser Aktivität in den leitbündelnahen Zellen. Zu diesem Zweck exprimierte Laubner (1999) eine cDNA für das H- bzw. T-Protein der GDC aus *Flaveria pringlei* in Blättern von Tabakpflanzen. Die Überexpression gelang, führte aber nicht zu einer Steigerung der GDC-Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die cDNA für das P-Protein der GDC aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. unter Kontrolle eines blattspezifischen, eines mesophyllspezifischen bzw. eines Bündelscheidenspezifischen Promotors in Tabakpflanzen zu überexprimieren. Ob die Erhöhung der Menge an P-Protein zu einer Steigerung der GDC-Aktivität führte, konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr untersucht werden. Es musste auch offen bleiben, welche physiologischen Auswirkungen die Veränderung der GDC-Aktivität in den entsprechenden Pflanzenlinien hat.

Die Reduktion der GDC-Aktivität mit der Antisense-Technik wurde schon erfolgreich durchgeführt. Es sind Antisense-Linien des H-, T- und P-Proteins in Kartoffel und Tabak mit unterschiedlichen Promotoren hergestellt worden (H. Bauwe, unveröffentlicht). Bei Antisense-Inhibierung der Expression des P-Protein-Gens unter einem blattspezifischen Promotor (*StLS1*) wurde in Kartoffel die GDC-Aktivität am stärksten reduziert, und zwar auf 70 – 75 % der Wildtyp-Aktivität. Diese P-Antisense-Linien wiesen aber nur einen marginalen Phänotyp auf. Jüngere Blätter zeigten normale Chlorophyllgehalte und  $CO_2$ -Assimilationsraten (Heineke *et al.* 2001), während ältere Blätter chlorotisch wurden; die Ursache dieses Phänomens blieb aber ungeklärt. Aus den Untersuchungen wurde geschlossen, dass die GDC in Wildtyp-Kartoffelpflanzen unter den verwendeten Anzuchtbedingungen nur mit der Hälfte der maximalen Geschwindigkeit arbeitet.

Es blieb also zu prüfen, ob die spezifische Reduktion der GDC-Aktivität im Mesophyll von Kartoffelpflanzen durch Antisense-Verfahren zur gewünschten Etablierung eines  $CO_2$ -Konzentrierungsmechanismus führen könnte. Dafür wurden die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Pflanzen hergestellt, in denen die Synthese des P-Proteins durch Antisense spezifisch im Mesophyll reduziert war. Dies führt aber nicht zu einer Verbesserung der photosynthetischen Leistung der transgenen Pflanzen. Sie entwickelten im Gegenteil auch einen Chlorose-Phänotyp in älteren Blättern. Mit Hinblick auf eine Etablierung eines  $C_3/C_4$ -

intermediären Stoffwechsels in C<sub>3</sub>-Pflanzen war es wichtig zu verstehen, welche Auswirkungen eine Reduktion der Kapazität für die Umwandlung von Serin zu Glycin auf den Blattstoffwechsel hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand mesophyllspezifischer P-Antisense-Kartoffelpflanzen und blattspezifischer SHMT-Antisense-Kartoffelpflanzen untersucht, welche Auswirkungen einer Reduktion der Kapazität der Umwandlung von Serin in Glycin auf die Photosynthese und den C- und N-Metabolismus hat, und welche Signale zur Bildung einer Chlorose in älteren Blättern der Antisense-Pflanzen führen.

Blätter der P-Antisense-Pflanzen akkumulierten Glycin während der Lichtperiode; diese Akkumulation war größer in älteren Blättern. Die Bildung der Chlorose war abhängig von Blattalter, Pflanzenalter, leichten Änderungen der CO<sub>2</sub>-Konzentration während des Wachstums und von der N-Versorgung. Der Chlorophyllgehalt und die CO<sub>2</sub>-Assimilation waren in den jüngeren Blättern meistens unverändert. Es wurde keine Limitation des linearen Elektronentransports und keine Induktion von nicht-photochemischen Dissipationsmechanismen in diesen Blättern festgestellt; es wurde auch kein Anstieg der Glyoxylatkonzentration gefunden. Jüngere Blätter der P-Antisense-Linien bildeten in jüngeren Pflanzen in Abhängigkeit von der N-Versorgung und CO<sub>2</sub>-Konzentration während des Wachstums, bzw. in älteren Pflanzen einen Chlorose-Phänotyp. In den ersten Schritten dieses Prozesses zeigten die Blätter geringfügig weniger Chlorophyll, reduzierte CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten und Photoinhibition. Der lineare Elektronentransport war in diesen Fällen limitiert und die Elektronenakzeptoren am PSII waren stärker reduziert als in Wildtypblättern. In diesen Blättern wurde ebenfalls ein Anstieg an Glyoxylat und eine Abnahme des Spiegels an Glycerat-3-Phosphat beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Flussraten durch den C<sub>2</sub>-Zyklus unter diesen Bedingungen limitiert waren.

Ein weiterer Hinweis auf eine Limitation des C<sub>2</sub>-Zyklus in den transgenen Pflanzen war der Umstand, dass Blätter mit reduzierter CO<sub>2</sub>-Assimilation unter Anzuchtbedingungen eine stärkere Abhängigkeit der CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten von der Photorespiration zeigten als Blätter mit normalen CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten. Parallel zu diesen Beobachtungen wurde eine Blattalter- und N-Versorgungs-abhängige Reduktion der Menge an P-Protein in den Blättern der P-Antisense-Linien festgestellt.

Damit ergeben sich zwei Möglichkeiten, wie der Stoffwechsel jüngerer Blätter beeinflusst sein könnte. Wenn eine altersabhängige Reduktion der Expression des P-Proteins stattfände, könnte man vermuten, dass die verstärkte Abnahme der P-Proteinmenge in den älteren Blättern in einen Bereich kommt, in dem die Flussraten durch den C<sub>2</sub>-Zyklus limitiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre es, dass das wegen eines Staus im C<sub>2</sub>-Zyklus entstehende Glyoxylat nicht ausreichend schnell detoxifiziert würde und die peroxisomale Matrix zerstörte. Dies würde dazu führen, dass die Aktivität des C<sub>2</sub>-Zyklus in fortschreitendem Maße reduziert würde.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

A	Assimilation
A	Adenosin
A <sub>340</sub>	Extinktion bei 340 nm
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5`-Diphosphat
ala	Alanin
asn	Asparagin
asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
bar	bar (1 bar = 100000 Pascal = 750 mmHg = 1020 mm WS)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel (1 Zerfall pro Sekunde)
BSA	Rinderserumalbumin (Abkürzung in Englisch)
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
C <sub>a</sub>	CO <sub>2</sub> -Partialdruck um das Blatt
ca.	circa
cDNA	copy-Desoxyribonucleinsäure
CE	Carboxylierungseffizienz
Chl	Chlorophyll
Ci	Curie (1 Ci = 3,7*10 <sup>10</sup> Bq)
C <sub>i</sub>	CO <sub>2</sub> -Partialdruck des Interzellularraumes
CoA	Coenzym A
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid (N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid)
cv.	cultivar
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-N-5`-Triphosphat (N = A, T, G, C)
DTT	DL-Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N`,N`-tetraessigsäure

Fa.	Firma
FAD	Flavinadeninmononukleotid
$F_v/F_m$	optimale Quantenausbeute des PSII
g	Blattleitfähigkeit für Wasserdampf
G	Guanosin
GAP	Glycerinaldehydphosphat
GDC	Glycinderboxylase
GOGAT	Glutamat- $\alpha$ -Ketoglutarat-Aminotransferase (Glutamatsynthase)
GS	Glutaminsynthetase
GSH	$\gamma$ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycin oder reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathiodimer, oxidiertes Glutathion, Glutathiondisulfid
h	Stunde
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethano-sulfonsäure
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	kilo-Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	milli ( $1 \cdot 10^{-3}$ )
M	Molar ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
M	Mega (1000 Einheiten)
min	Minute
mm	Milimeter
$\text{NAD}^+/\text{NADH}$	$\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinukleotid oxydierte/reduzierte Form
$\text{NADP}^+/\text{NADPH}$	$\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat oxydierte/reduzierte Form
NBT	Nitrobluetetrazolium
nKat	nanoKatal (1 Katal = 1 mol Substratumsatz/s)
OAA	Oxalacetat
OD	optische Dichte
PAR	photosynthetic active radiation
PBS	Phosphate-buffered Saline ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und NaCl)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
$\text{P}_i$	ortho-Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP-Cx	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase

---

PFK	ATP-Abhängige-Fruktose-6-Phosphat-Phosphotransferase
PFP	Pyrophosphatabhängige-Fruktose-6-Phosphat-Phosphotransferase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
Q <sub>A</sub>	Quinon-A-Molekül
qE	Energie-abhängige Chlorophyllfluoreszenzlöschung
qN	nicht-photochemische Chlorophyllfluoreszenzlöschung
qP	photochemische Chlorophyllfluoreszenzlöschung
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RubisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-Bisphosphat
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler (Abkürzung in Englisch)
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophylus aquaticus
TEA	Tris-Acetat-EDTA
Φ <sub>PSII</sub>	effektive Quantenausbeute des PSII
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
vpd	Wasserdampfpartialdruckdefizit
WUE	Wassernutzungseffizienz
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D- Galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Glucuronsäure
z.B.	zum Beispiel
Δ CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> -Partialdruckdifferenz
ΔH <sub>2</sub> O	Wasserdampfpartialdruckdifferenz
Γ	CO <sub>2</sub> -Kompensationspunkt

---

$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	mikro ( $1 \cdot 10^{-6}$ )
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
% (w/v)	Prozent Gewicht/Volumen
% (v/v)	Prozent Volumen/Volumen

## 7. Literaturverzeichnis

- Amako K., Chen G.X. and Asada K. (1994)** Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol.* 25:497–504
- Anderson J.V., Chevone B.I. and Hess J.L. (1992)** Seasonal variation in the antioxidant system of Eastern White Pine needles, Evidence for thermal dependence. *Plant Physiol.* 98:501–508
- Bauwe H. (1998)** cDNA encoding P-protein of the glycine cleavage system in *Solanum tuberosum* cv. Désirée (Accession No. Z99770). *Plant Physiol.* 116:445–445
- Bergmeyer H.U. (1983)** *Methods of Enzymatic Analysis*, 3<sup>rd</sup> ed. Weinheim, Verlag Chemie.
- Blackwell R.D., Murray A.J.S. and Lea P.J. (1990)** Photorespiratory mutants of the mitochondrial conversion of glycine to serine. *Plant Physiol.* 94:1316–1322
- Bourguignon J., Neuburger M. and Douce R. (1988)** Resolution and characterization of glycine cleavage reaction in pea leaf mitochondria. Properties of the forward reaction catalyzed by glycine decarboxylase and serine hydroxymethyltransferase. *Biochem. J.* 255:169–178
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254
- Brooks A. and Farquhar G.D. (1985)** Effect of temperature on the CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta* 165:397–406
- Brown R.H. and Morgan J.A. (1980)** Photosynthesis of grass species differing in carbon dioxide fixation pathways. VI. Differential effects of temperature and light intensity on photorespiration in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and intermediate species. *Plant Physiol.* 66:541–544
- Büssis D. (1995)** Untersuchungen zur Adaptation von Kartoffelpflanzen an milden Wasserstreß und zur Adaptation von transgenen Kartoffelpflanzen an die Expression einer heterologen Invertase im Apoplasten, der Vakuole und dem Cytosol. *Dissertation*, Universität Göttingen
- Büssis D. and Heineke D. (1998)** Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *J. Exp. Bot.* 49:1361–1370
- Campbell W.J. and Ogren W.L. (1990)** Glyoxylate inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed and reconstituted chloroplasts. *Photosynth. Res.* 23:257–268
- Chang S., Puryear J. and Cairney J. (1993)** A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Mol. Biol. Reporter* 11:113–116

- Chastain C.J. and Ogren W.L. (1989)** Glyoxylate inhibition of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activation state *in vivo*. *Plant Cell Physiol.* 30:937–944
- Chu C.C. (1996)** Molecular structure and expression patterns of glycine decarboxylase genes from *Flaveria pringlei* (C<sub>3</sub>) and *Flaveria anomala* (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>). *Ph.D. Thesis*, University of Halle
- Demmig-Adams B. and Adams III W.W. (1996)** Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198:460-470
- Douce R., Bourguignon J., Neuburger M. and Rébeillé F. (2001)** The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci.* 6:167–176
- Faure M., Bourguignon J., Neuburger M., Macherel D., Sieker L., Ober R., Kahn R., Cohen-Addad C. and Douce R. (2000)** Interaction between the lipoamide-containing H-Protein and the lipoamide dehydrogenase (L-Protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system. 2. Crystal structures. *Eur. J. Bioch.* 267:2890–2898
- Flügge U.I., Freisl M. and Heldt H.W. (1980)** The mechanism of the control of carbon fixation by the pH in the chloroplast stroma. Studies with acid mediated proton transfer across the envelope. *Planta* 149:48–51
- Foyer C.H. (1993)** Ascorbic acid. *In: Antioxidants in higher plants.* Alscher R.G., Hess J.L. (eds.) *CRC Press, Boca Raton*, pp. 31–58
- Foyer C.H., Lelandais M. and Kunert K.J. (1994)** Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92:696–717
- Foyer Ch., Rowell J. and Walker D. (1983)** Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157:239–244
- Gibbs J., Morrell S., Valdez A., Setter T.L. and Greenway H. (2000)** Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. *J Exp. Bot.* 51:785–796
- Givan C.V. and Kleczkowski L.A. (1992)** The enzymic reduction of glyoxylate and hydroxypyruvate in leaves of higher plants. *Plant Physiol.* 100:552–556
- Griffith O.W. (1980)** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106:207–212
- Guilhaudis L. (2000)** Combined structural and biochemical analysis of the H-T complex in the glycine decarboxylase cycle: evidence for a destabilization mechanism of the H-Protein. *Biochemistry* 39:4259–4266
- Häusler R.E., Bailey K.J., Lea P.J. and Leegood R.C. (1996)** Control of photosynthesis in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase. III. Aspects of glyoxylate metabolism and effects of glyoxylate on the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Planta* 200:388–396

- Häusler R.E., Lea P.J. and Leegood R.C. (1994)** Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase. II. Control of electron transport and CO<sub>2</sub> assimilation. *Planta* 194:418–435
- Hagemann R.H. and Reed A.J. (1980)** Nitrate reductase from plants. *Methods Enzymol.* 69:270–280
- Heber U., Bligny R., Streb P. and Douce R. (1996)** Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C<sub>3</sub> plants against photoinactivation under sunlight. *Bot. Acta* 109:307–315
- Heineke D., Bykova N., Gardeström P. and Bauwe H. (2001)** Metabolic response of potato plants to an antisense reduction of the P-protein of glycine decarboxylase. *Planta* 212: 880–887
- Heineke D., Riens B., Große H., Hoferichter P., Peter U., Flügge U.-I. and Heldt H.W. (1991)** Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiol.* 95:1131–1137.
- Heldt H.W., Chon C.J. and Lorimer G.H. (1978)** Phosphate requirement for light activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in intact spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 92:234–240
- Hellens R., Mullineaux P. and Klee H. (2000)** Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5:446–451
- Heupel R. and Heldt H.W. (1994)** Protein organization in the matrix of leaf peroxisomes. A multi-enzyme complex involved in photorespiratory metabolism. *Eur. J. Biochem.* 220:165–172
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J. and Schilperoort R.A. (1983)** A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179–180
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G. and Fraley R.T. (1985)** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229–1231
- Horton P., Ruban A.V. and Walters R.G. (1996)** Regulation of light harvesting in green plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:655–684
- Hylton C.M., Rawsthorne S., Smith A.M., Jones D.A. and Woolhouse H.W. (1988)** Glycine decarboxylase is confined to the bundle-sheath cells of leaves of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species. *Planta* 175:452–459
- Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. and Bevan M.W. (1987)** GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901–3907
- Kaiser W.M. (1979)** Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145:377–382

- Kaiser W.M. and Huber S.C. (2001)** Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp. Bot.* 363:1981–1989
- Kaiser W.M. and Spill D. (1991)** Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. II. *In vitro* modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol.* 96:368–375
- Kaiser W.M., Spill D. and Brendle-Behnisch E. (1992)** Adenine nucleotides are apparently involved in the light-dark modulation of spinach-leaf nitrate reductase. *Planta* 186:236–240
- Kleczkowski L.A., Edwards G.E. and Randall D.D. (1992)** Effects of oxalate on reduction of hydroxypyruvate and glyoxylate in leaves. *Phytochemistry* 31:51–54
- Krause G.H. and Weis E. (1991)** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:313–349
- Krenzer E.G., Moss D.N. and Crookston R.K. (1975)** Carbon dioxide compensation points of flowering plants. *Plant Physiol.* 56:194–206
- Krömer S. and Heldt H.W. (1991)** Respiration of pea leaf mitochondria and redox transfer between the mitochondrial and extramitochondrial compartment. *Biochim. Biophys. Acta* 1057:42–50
- Ku M.S.B., Wu J.R., Dai Z.Y., Scott R.A., Chu C. and Edwards G.E. (1991)** Photosynthetic and photorespiratory characteristics of *Flaveria* species. *Plant Physiol.* 96:518–528
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Laubner M. (1999)** Untersuchungen von transgenen Solanaceen mit Veränderungen im Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel. *Dissertation*, Universität Göttingen.
- Lee S.Y. and Rasheed S. (1990)** A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *BioTechniques* 9:676–679
- Leidreiter K., Kruse A., Heineke D., Robinson D.G. and Heldt H.W. (1995)** Subcellular volumes and metabolite concentrations in potato (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) leaves. *Bot. Acta* 108:439–444
- Lowry O.H. and Passoneau J.V. (1972)** A collection of metabolite assays. In: A flexible system of enzymatic analysis. *Academic Press*, New York
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951)** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275
- Luethy M.H., Miernyk J.A., David N.R. and Randall D.D. (1996)** Plant pyruvate dehydrogenase complexes. In: Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. Patel M.S., Roche T.E., Harrison R.A. (eds.) *Birkhauser Verlag*, pp. 71–92
- Maxwell K. and Johnson G.N. (2000)** Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51:659–668
- Monson R.K. and Jaeger C.H. (1991)** Photosynthetic characteristics of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate *Flaveria floridana* (Asteraceae) in natural habitats: evidence of advantages to C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> photosynthesis at high leaf temperatures. *Amer. J. Bot.* 78:795–800

- Morgan C.L., Turner S.R. and Rawsthorne S. (1993)** Coordination of the cell-specific distribution of the four subunits of glycine decarboxylase and of serine hydroxymethyltransferase in leaves of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species from different genera. *Planta* 190:468–473
- Müller-Moulé P., Conklin P.L. and Niyogi K.K. (2002)** Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol.* 128:970–977
- Mullis K.B. and Faloona F.A. (1987)** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335–350
- Murashige T. and Skoog F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497
- Murray A.J.S., Blackwell R.D., Joy K.W. and Lea P.J. (1987)** Photorespiratory N donors, aminotransferase specificity and photosynthesis in a mutant of barley deficient in serine:glyoxylate aminotransferase activity. *Planta* 172:106–113
- Neuburger M., Journet E.P., Bligny R., Carde J.P. and Douce R. (1982)** Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. *Arch. Biochem. Biophys.* 217:312–323
- Neuburger M., Polidori A.M., Pietre E., Faure M., Jourdain A., Bourguignon J., Pucci B. and Douce R. (2000)** Interaction between the lipoamide-containing H-Protein and the lipoamide dehydrogenase (L-Protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system. 1. Biochemical studies. *Eur. J. Bioch.* 267:2882–2889
- Oliver D.J. (1994)** The glycine decarboxylase complex from plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:323–337
- Oliver D.J. (1998)** Photorespiration and the C<sub>2</sub> cycle. *In: Photosynthesis, a comprehensive treatise.* Raghavendra A.S. (ed.) *Cambridge University Press*, pp. 173–182
- Oliver D.J., Neuburger M., Bourguignon J. and Douce R. (1990)** Interaction between the component enzymes of the glycine decarboxylase multienzyme complex. *Plant Physiol.* 94:833–839
- Osmond C.B. (1981)** Photorespiration and photoinhibition. Some implications for the energetics of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 639:77–98
- Osmond C.B. (1994)** What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. *In: Photoinhibition of photosynthesis from molecular mechanisms to the field.* Baker N.R. and Bowyer J.R. (eds.) *Bios Scientific, Oxford* pp. 1–24
- Osmond C.B., Badger M., Maxwell K., Björkman O. and Leegood R.C. (1997)** Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci.* 2:119–121
- Podestá F.E. and Plaxton W.C. (1994)** Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons II. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta* 194:381–387

- Porra R.J., Thompson W.A. and Kriedemann P.E. (1989)** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975:384–394
- Qu N. and Bauwe H. (1998)** The GDCSP gene encoding P-protein of the glycine cleavage system in the C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate plant *Flaveria anomala* (Accession No. Z99762). *Plant Physiol.* 116:445
- Raghavendra A.S., Reumann S. and Heldt H.W. (1998)** Participation of mitochondrial metabolism in photorespiration. Reconstituted system of peroxisomes and mitochondria from spinach leaves. *Plant Physiol.* 116:1333–1337
- Randall P. J. and Bouma D. (1973)** Zinc deficiency, carbonic anhydrase and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol.* 52:229–232
- Rawsthorne S. (1992)** C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate photosynthesis – linking physiology to gene expression. *Plant J.* 2:267–274
- Rawsthorne S. and Bauwe H. (1998)** C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate photosynthesis. In: Photosynthesis, a comprehensive treatise. Raghavendra A.S. (ed.) *Cambridge University Press*, pp. 150–162
- Rawsthorne S. and Hylton C.M. (1991)** The relationship between the post-illumination CO<sub>2</sub> burst and glycine metabolism in leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species of *Moricandia*. *Planta* 186:122–126
- Rawsthorne S., Hylton C.M., Smith A.M. and Woolhouse H.W. (1988a)** Photorespiratory metabolism and immunogold localization of photorespiratory enzymes in leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species of *Moricandia*. *Planta* 173:298–308
- Rawsthorne S., Hylton C.M., Smith A.M. and Woolhouse H.W. (1988b)** Distribution of photorespiratory enzymes between bundle sheath and mesophyll cells in leaves of the C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species *Moricandia Arvensis* (L.) DC. *Planta* 176:527–532
- Rébeillé F., Neuburger M. and Douce R. (1994)** Interaction between glycine decarboxylase, serine hydroxymethyltransferase and tetrahydrofolate polyglutamates in pea leaf mitochondria. *Bioch. J.* 302:223–228
- Rehfeld D.W. and Tolbert N.E. (1972)** Aminotransferases in peroxisomes from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* 247:4803–4811
- Riens B. (1992)** Untersuchungen zur Beziehung von Kohlenstoff- und Stickstoff metabolismus in Spinatpflanzen (*Spinacia oleracea* L.). *Dissertation*, Universität Göttingen
- Robinson S.P., Streusand V.J., Chatfield M. and Portis A.R.Jr. (1988)** Purification and assay of rubisco activase from leaves. *Plant Physiol.* 88:1008–1014
- Sambrook J. and Russel D.W. (2001)** Molecular cloning: A laboratory manual, third edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York

- Sanger F., Nickler S. and Coulson A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74:5463–5467
- Schaedle M. and Bassham J.A. (1977)** Chloroplast Glutathione Reductase. *Plant Physiol.* 59:1011–1012
- Scheibe R. and Stitt M. (1988)** Comparison of NADP-malate dehydrogenase activation,  $Q_A$  reduction and  $O_2$  evolution in spinach leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 26:473–481
- Schmelzer E. (1998)** Auswirkungen induzierter Glycinakkumulation auf den Blattstoffwechsel. *Diplomarbeit*, Universität Göttingen
- Schreiber U., Bilger W., Hormann H. and Neubauer C. (1998)** Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. *In: Photosynthesis, A comprehensive Treatise*. Raghavendra A.S. (ed.) *Cambridge University Press*, pp. 320–336
- Schreiber U., Schiwa U. and 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
- Setlik I., Allakhverdiev S.I., Nedbal L., Setlikova E. and Klimov V.V. (1990)** Three types of photosystem II photoinactivation. 1. Damaging processes on the acceptor side. *Photosynth. Res.* 23:39–48
- Sharkey T.D. (1988)** Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiol. Plant.* 73:147–152
- Smith I.K. (1973)** Purification and characterization of serine-glyoxylate aminotransferase from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochim. Biophys. Acta* 321:156–164
- Stitt M., Gerhardt R., Kürzel B. and Heldt H.W. (1983)** A role for fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of sucrose synthesis in spinach leaves. *Plant Physiol.* 72:1139–1141
- Stitt M. and Grosse H. (1988)** Interactions between sucrose synthesis and  $CO_2$  fixation. I. Secondary kinetics during photosynthetic induction are related to a delayed activation of sucrose synthesis. *J. Plant Physiol.* 133:129–137
- Stitt M. and Heldt H.W. (1981)** Physiological rates of starch breakdown in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 68:755–761
- Stitt M. and Schreiber U. (1988)** Interactions between sucrose synthesis and  $CO_2$  fixation. III. Response of biphasic induction kinetics and oscillations to manipulation of the relation between electron transport, calvin cycle and sucrose synthesis. *J. Plant Physiol.* 133:263–271
- Stockhaus J., Eckes P., Rocha-Sosa M., Schell J. and Willmitzer L. (1987)** Analysis of *cis*-active sequences involved in the leaf-specific expression of a potato gene in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7943–7947
- Titus D.E., Hondred D. and Becker W.M. (1983)** Purification and characterization of hydroxypyruvate reductase from *cucumber* cotyledons. *Plant Physiol.* 72:402–408

- Töpfer R., Maas C., Höricke-Grandpierre C., Schell J. and Steinbiss H.H. (1993)** Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Methods Enzymol.* 217:66–78
- Van Larebeke N., Hernalsteens J.P., Depicker A., Zaenen I., Messens E., Van Montagu M. and Schell J. (1977)** Transfer of Ti-plasmids between *Agrobacterium* strains by mobilization with the conjugative plasmid RP4. *Molecular and General Genetics* 152:119–124
- Vernon L.P. (1960)** Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Anal. Chem.* 32:1144–1150
- Vidal J., Gadat P., Cavalié G. and Caillaud-Commanay L. (1977)** NADH and NADPH dependent malate dehydrogenases of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 39:190–195
- von Caemmerer S. and Farquhar G.D. (1981)** Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376–387
- Wingler A., Lea P.J. and Leegood R.C. (1997)** Control of photosynthesis in barley plants with reduced activities of glycine decarboxylase. *Planta* 200:171–178
- Winzer T., Heineke D. and Bauwe H (2001)** Growth and phenotype of potato plants expressing an antisense gene of P-protein of glycine decarboxylase under control of a promoter with preference for the mesophyll. *Ann. Appl. Biol.* 138:9–15
- Woodcock D.M., Crowther D.M., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z. and Graham M.W. (1989)** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids Res.* 17:3469–3478
- Woodrow I.E. and Berry J.A. (1988)** Enzymatic regulation of photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation in C<sub>3</sub> plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:533–594



**ich bedanke mich ganz herzlich bei:**

Herrn Prof. Hans W. Heldt für die Möglichkeit dieser Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen, die freundliche Übernahme des Korreferats und dafür, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat überhaupt nach Deutschland kommen zu können.

Prof. Dr. Dieter Heineke für seine Erfahrung und Kenntnisse, seine große Unterstützung, freundliche Sprechbereitschaft und Geduld und dafür, dass er die Verantwortung übernommen hat mein Doktorvater zu sein.

Prof. Dr. Ivo Feussner für das problemlose Weiterarbeiten, dass er allen „alten“ Abteilungsmitgliedern ermöglicht hat, für seine große Unterstützung, damit dieser Arbeit zu gutem Ende kommt und für sein Verständnis.

Frau PD Dr. Katharina Pawlowski für die freiwillige Übernahme der zweiten 100% der Betreuung, für die große Interesse in meiner Arbeit und in meiner Zukunft und dafür, dass immer jemand da ist, wenn man braucht.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die finanzielle Unterstützung und für die Möglichkeit in Deutschland meine Dissertation durchführen zu können.

Prof. Dr. Hermann Bauwe für die in den Plasmide L700, A27 und Xhol 11 enthaltenen Promotoren und die P- und SHMT-antisense Kartoffelpflanzen.

Prof. Stephen Rawsthorne für die Antikörper gegen die P-, T-, H- und SHMT-Proteinen.

Frau Prof. Dr. Christiane Gatz und ihrer Arbeitsgruppe für das freundliche zur Verfügung Stellen von unentbehrlich Geräten, „Enzyme“ und Sterilbänke in der guten alten Karspülen-Zeit und während der Umzugszeit.

Gerd Mader für alle zügige Reparaturen und Notfalleinsätze, besonders wenn er dafür mit dem Fahrrad in die Untere Karspüle fahren musste und für viele angenehme Unterhaltungen zwischendurch.

Herrn Uwe Wedemeyer für die aufmerksame Pflege der Pflanzen in den „grauen“ „vergessenen“ Keller in der Untere Karspüle

Frau Dr. Sigrun Reumann für die freundliche Zusammenarbeit und nette Unternehmen und Geige-Vorspielen

Frau Andrea Nickel für die Erfahrung in der täglichen Arbeit und für die freundliche Hilfe

Frau Anita Stottmeister für die nette Unterhaltungen

Frau Dr. Olga Voitsekhovskaja für die Anregungen, Sorgen und auch die geteilte Wissenschaftler-Leiden

Dr. Kirill Demchenko für das zusammen Pizza-Essen und die nette Gesellschaft im Laborabends

Dr. Friedrich Kauder für die Einführung in die Gaswechselanalyse

Dr. Thilo Winzer für die Anweisungen bei den ersten Schritte an meiner Dissertation

Frau Dr. Michaela Strauss für die angenehme Unterhaltungen und Arbeitsatmosphäre

Frau Dr. Anke Sirrenberg für die Sorgen, gute Laune und Hilfe bei den GUS-Färbungen

allen Kollegen in der Abteilung für Biochemie der Pflanze, Ehemaligen, „alten Karspülern“ und „neuen Gaterslebenern“, für die wirklich angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

alle Freunde und Bekannte aus Herberhausen, Spangenbergs, Roths, Spellmanns, Mäppers, Haeckers, Lükens usw. für ihre enorme Unterstützung und dafür, dass sie uns als ein Mitglied ihre Familien aufgenommen haben.

## Lebenslauf

04.04.1968	geboren in Córdoba (Argentinien)
1974-1980	Grundschule in Rio Cuarto (Argentinien) und Córdoba
1981-1985	Gymnasium in Córdoba
15.11.1985	Abitur mit zusätzlichem Diplom als "Handelssachverständiger"
1987	Besuch des Studienganges Forstbiologie in Esquel (Argentinien)
1988	Besuch des Studienganges Agrarwissenschaften in Córdoba
1992	Beginn des Studiums der Biologie (Diplom) an der Universität Córdoba
1996-1997	Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Phytopathologie und Pflanzenphysiologie (IFFIVE – INTA), Córdoba Thema: "Zur Bedeutung der Enzyme zum Schutz vor oxidativem Stress für die Trockentoleranz bei toleranten und sensitiven Kultivaren von Weizen ( <i>Triticum aestivum</i> L.)"
1998-1999	Praedoktorales Stipendium des Rates der Provinz Córdoba für Wissenschaftliche und Technologische Forschungsarbeiten und des Nationalen Rates für Wissenschaftliche und Technische Forschungsarbeiten
April 2000	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation