

Inaugural-Dissertation

**zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg**

**vorgelegt von**

**Diplom-Biologe Norbert Giermann**

**aus Mannheim**

**Tag der mündlichen Prüfung:** \_\_\_\_\_

Thema:

Untersuchungen zur genomischen Organisation und Expression  
der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme  
in Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*)

**Gutachter:**

**Prof. Dr. Mark Stitt**  
**Prof. Dr. Thomas Rausch**

**Erklärungen gemäß § 7 (3) b) und c) der Promotionsordnung:**

- a) ich erkläre hiermit, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe,
- b) ich erkläre hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderen Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 26.02.2002

---

(Norbert Giermann)

Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Mark Stitt für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Promotionsstelle und seine Betreuung.

Prof. Dr. Thomas Rausch für die Übernahme des Co-Referats.

Dr. Rita Zrenner für ihre Betreuung und viele wichtige Denkanstöße, Tips und Anregungen, auch über mehrere Bundeslandgrenzen hinweg.

Emilia Sancho-Vargas für viele Jahre gute Zusammenarbeit und Freundschaft.

Irene Loef, da sie es so lange neben mir ausgehalten hat und nie den Humor verloren hat.

Heike Weiner für Beistand mit Rat & Tat in allen Lebenslagen.

Der wechselnden Besetzung im „kleinen Labor“ für die schöne gemeinsame Zeit dort.

Dr. Ralf Flachmann für viele interessante Gespräche und Anregungen.

Mirsada Kurtisi für die gemeinsame Arbeit an den UGPase- und SuSy-Knollen während ihres Laborpraktikums im Frühjahr 1999.

Karin Bologna für die freundliche Bereitstellung von Kartoffelscheiben-Material.

Inge Günther, Manuela Itin, Jolanta Pniewski und Monika Reichert für die Anwesenheit zu unchristlich-frühen Tageszeiten.

Michael Schillbach für Bereitstellung und Pflege von Pflanzen sowie die Rettung meiner *Brighamia* vor den Spinnmilben.

Regina Feil für ihre Geduld an der Nukleotid-HPLC.

Der ganzen Arbeitsgruppe sowie dem gesamten Institut für die Zusammenarbeit.

Douglas Adams, Terry Pratchett, David Quammen und J.R.R. Tolkien für viele unterhaltsame Zugfahrten nach Heidelberg.

Michael & Lilli Honikel, Gerd Jung, Sonja Piron, Marion Nonn, Annette Nonn, Claudia, Kerstin Schwarz, Thorsten & Daniela Stephan, Tim & Sabine Zenker für die Ablenkung bei Wanderungen, Spiele- und Eistee-Abenden.

Und vor allem meinen Eltern Eckhard & Inge Giermann sowie meinem Bruder Dietmar Giermann, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese	2
1.1.2 Die Pyrimidinnukleotid - Wiederverwertungsreaktionen	3
1.1.3 Die Beziehungen zu anderen Stoffwechselwegen	5
1.1.4 Die Beziehung zur Zellteilung	8
<b>1.2 Organisation der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese in verschiedenen Organismen</b>	<b>9</b>
1.2.1 Organisation der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese in Prokaryoten	9
1.2.2 Organisation der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese in Eukaryoten	9
<b>1.3 Regulation der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese in Pflanzen</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Transgene Pflanzen als Möglichkeit, die Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese zu untersuchen</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Materialien und Geräte</b>	<b>16</b>
2.1.1 Materialien und Geräte	16
2.1.2 Oligonukleotide	18
2.1.3 Plasmide und Vektoren	18
2.1.4 cDNAs und DNA-Sonden	20
2.1.5 Antikörper	21
2.1.6 Bakterienstämme	21
2.1.7 Zellkultur	22
2.1.8 Pflanzen	22
2.1.9 Computerprogramme zur Erstellung der Arbeit	23
<b>2.2 Methoden</b>	<b>24</b>
2.2.1 Methoden zum Arbeiten mit Pflanzen	24
2.2.2 Methoden zum Arbeiten mit Bakterien	30
2.2.3 Methoden zur Analyse und Bearbeitung von DNA	32
2.2.4 Methoden zur Analyse und Bearbeitung von RNA	37
2.2.5 Methoden zur Analyse und Bearbeitung von Proteinen	41
2.2.6 Methoden zur Extraktion und Bestimmung von Metaboliten	48
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>3.1 Genomische Organisation der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese in Tabak und Kartoffel</b>	<b>55</b>
<b>3.2 Analyse der Expression der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzyme</b>	<b>58</b>
3.2.1 Gewebespezifische Variation der extrahierbaren mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzyme	58
3.2.2 Entwicklungsspezifische Variation der extrahierbaren mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzyme	62
3.2.3 Gewebe- und entwicklungsspezifische Variation der extrahierbaren Protein-Menge von Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzymen	65
3.2.4 Tageszeitspezifische Variation der extrahierbaren mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzyme	67
3.2.5 Einfluß der Sauerstoffverfügbarkeit auf die extrahierbare mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzyme	69

<b>3.3 Analyse der Regulation der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese durch Metabolite</b>	<b>71</b>
3.3.1 Einfluß von Phosphat	72
3.3.2 Einfluß von Nukleotidvorstufen	87
3.3.3 Einfluß von Bestandteilen des Argininstoffwechsels	122
<b>3.4 Beeinflussung des Nukleotid-Stoffwechsels durch gentechnische Veränderung von Pflanzen</b>	<b>136</b>
3.4.1 Einflußnahme auf die Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese durch Einführung von Hefe-UDPase in das Tabakgenom	136
3.4.2 Untersuchung der extrahierbaren mRNA-Menge von ATCase in verschieden alten Knollen von Gegensinn-UGPase-, Gegensinn-SuSy- und Wildtyp-Kartoffelpflanzen	146
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>148</b>
<b>4.1 Die genomische Organisation der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzyme in Tabak und Kartoffel ist einfach.</b>	<b>149</b>
<b>4.2 Die Expression der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzyme wird von internen und externen Faktoren beeinflusst.</b>	<b>151</b>
4.2.1 Die an der Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese beteiligten Enzyme können auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.	151
4.2.2 CPSase LU, CPSase SU und ATCase können auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden.	152
4.2.3 Die extrahierbare mRNA- und Proteinmenge von Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzymen hängt von Art und Alter des Gewebes ab.	152
4.2.4 Die extrahierbare mRNA-Menge von Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzymen wird von externen Faktoren beeinflusst.	155
4.2.5 <u>Fazit</u> : Die Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese-Enzyme werden wie „Haushalts“-Gene exprimiert, wobei es situationsbedingte Unterschiede gibt.	157
<b>4.3 Die externe Zufuhr von diversen Metaboliten beeinflusst den Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel.</b>	<b>158</b>
4.3.1 Das Substrat Phosphat hat Auswirkungen auf den Nukleotidstoffwechsel.	158
4.3.2 Die externe Zufuhr von verschiedenen Nukleotidvorstufen hat unterschiedliche Auswirkungen auf den Nukleotidstoffwechsel.	162
4.3.3 Die Inkubation von Tabakzellen mit Arginin sowie seinen Vorstufen Ornithin und Citrullin beeinflusst den Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel.	171
4.3.4 <u>Fazit</u> : Die externe Zufuhr von Metaboliten beeinflusst Aspekte des Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsels.	174
<b>4.4 Transgene Pflanzen bieten eine weitere Möglichkeit, die Pyrimidinnukleotid <i>de novo</i> Synthese in Pflanzen zu untersuchen.</b>	<b>174</b>
4.4.1 Erste Versuche mit Pflanzen, die mit Hefe-UDPase transformiert wurden, zeigen eine gewisse Beeinflussung.	175
4.4.2 Die extrahierbare mRNA-Menge der ATCase ist in Gegensinn-UGPase- und Gegensinn-SuSy-Kartoffelpflanzen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.	180
<b>4.5 Fazit und Ausblick</b>	<b>181</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>183</b>
<b>6. SUMMARY</b>	<b>184</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>185</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
A	Adenin bzw. Ampere
Abb.	Abbildung
Acc. Nr.	Nummer, unter der Sequenzen (von DNA, RNA, usw.) publiziert werden ( <i>engl.: accession number</i> )
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATCase	Aspartat-Transcarbamoylase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA ( <i>engl.: complementary DNA</i> )
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CPSase	Carbamoylphosphatsynthetase
CPSase LU	große Untereinheit der CPSase ( <i>engl.: large subunit</i> )
CPSase SU	kleine Untereinheit der CPSase ( <i>engl.: small subunit</i> )
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
CTPsase	Cytidintriphosphatsynthetase
cv.	Kultivar
°C	Grad Celsius
d	desoxy bzw. Tag ( <i>engl.: day</i> )
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl.: desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
e <sup>-</sup>	Elektron
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FG	Frischgewicht
g	Gramm
<b>g</b>	Erdbeschleunigung (= 9,81 m/sek <sup>2</sup> )
G	Guanin
GABA	γ-Aminobuttersäure ( <i>engl.: γ-amino-butyric acid</i> )
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
g/v	Gewicht pro Volumen
h	Stunde ( <i>engl.: hour</i> )

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie ( <i>engl.: High Pressure Liquid Chromatography</i> )
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	kilo
kB	Kilobasen
l	Liter
$\lambda$	der Phage Lambda
lacI	Gen, das den Repressor des lac-operons codiert
lacZ	Gen, das die $\beta$ -Galactosidase codiert
m	Meter bzw. milli
M	Molarität
$\mu$	mikro
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mol	Einheit der Stoffmenge
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ( <i>engl.: messenger ribonucleic acid</i> )
MS-Medium	Murashige-Skoog-Medium
n	nano
N	Normalität einer Lösung
NAD(P)(H)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-(phosphat)(reduziert)
NDP	Nukleosiddiphosphat
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium
Nr.	Nummer
NTA	Nitrilo-tri-essigsäure ( <i>engl.: nitrilo-tri-acetic acid</i> )
NTP	Nukleosidtriphosphat
<i>N.tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OMP	Orotidin-5'-monophosphat
OMPdecase	Orotidinmonophosphatdecarboxylase
OPRTase	Orotat-Phosphoribosyltransferase
Orotase	Dihydroorotase
P <sup>+</sup> bzw. -	Pflanzen mit bzw. ohne externe Phosphatzufuhr
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl.: Polymerase chain reaction</i> )
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat ( <i>engl.: inorganic phosphate</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
r	Radius
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>engl.: ribonucleic acid</i> )
RNAi	RNA-Überlagerung ( <i>engl.: RNA interference</i> )
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RNUDP-Pflanzen	Tabakpflanzen, transformiert mit dem Konstrukt „Hefe-UDPase im Vektor pBinAR“
RSuSy-Pflanzen	Kartoffelpflanzen, transformiert mit dem Konstrukt „Gegensinn-SuSy im Vektor pBin19“
RUGPase-Pflanzen	Kartoffelpflanzen, transformiert mit dem Konstrukt „Gegensinn-UGPase im Vektor pBin19“
Rx	RNUDP-Pflanzen-Linie Nr. x
S	Svedberg-Einheit (Einheit des Sedimentationskoeffizienten, 1 S = 10 <sup>-13</sup> sek)
s.	siehe
sek	Sekunde
s.o.	siehe oben

SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>engl.: sodium dodecylsulfate</i> )
SPS	Saccharose-Phosphat-Synthase
ss	einzelsträngig ( <i>engl.: single-stranded</i> )
<i>S.tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
SuSy	Saccharose-Synthase
Sx	RSuSy-Pflanzen-Linie Nr. x
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat/EDTA - Elektrophorese-Puffer
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure ( <i>engl.: trichloroacetic acid</i> )
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TG	Trockengewicht
Triton X-100	Polyoxyethylen(9,10) <i>p</i> -t-octylphenol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymin-5'-triphosphat
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaureat
T <sub>0</sub>	Nullwert
U	unit (Einheit der Enzymaktivität; 1 U = 1µmol umgesetzt Substrat pro Minute = 1,67*10 <sup>-8</sup> Katal)
u.a.	unter anderem
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPase	Uridin-5'-Diphosphatase
UDP-Kinase	Uridindiphosphatkinase
UGPase	UDP-Glucose-Pyrophosphorylase
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UMP-Kinase	Uridinmonophosphatkinase
UMP-Synthase	Uridinmonophosphatsynthase
UPPase	Uracil-Phosphoribosyltransferase
Urd-Kinase	Uridin-Kinase
URPase	Uridin-Phosphorylase
usw.	und so weiter
UTP	Uridin-5'-triphosphat
u.U.	unter Umständen
Ux	RUGPase-Pflanzen-Linie Nr. x
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
Wt	Wildtyp
WTT	Wahrscheinlichkeit nach T-Test, daß zwei Datengruppen unterschiedlich sind, ist in % angegeben
x	fach, mal
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
6xHis	6 aufeinanderfolgende Histidinreste

# 1. Einleitung

Pyrimidinnukleotide spielen eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel, da sie für eine Reihe von Prozessen wichtige Metabolite darstellen. Ein Beispiel ist die DNA- und RNA-Synthese, wobei Desoxyribonukleotide (DNA-Synthese) bzw. Ribonukleotide (RNA-Synthese) benötigt werden. Im Verlauf dieser Synthesereaktionen werden aus Pyrimidinnukleotiden und Purinnukleotiden die Nucleinsäuren DNA bzw. RNA gebildet. Eine Koordinierung der Bereitstellung von Pyrimidin- und Purinnukleotiden ist im zellulären Stoffwechsel deshalb notwendig. Purin- und Pyrimidinnukleotide stehen beispielsweise über das Enzym UMP-Kinase miteinander in enger Verbindung, was auch Einfluß auf den zellulären Energiestoffwechsel hat. Darüber hinaus sind Pyrimidinnukleotide insbesondere für den Kohlenhydratstoffwechsel sehr wichtig, wobei UDP-Glucose eine zentrale Position zukommt. Eine enge Verhältnis besteht auch mit dem Stickstoff- und insbesondere dem Aminosäure-Stoffwechsel.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten für Zellen, ihren Bedarf an Pyrimidinnukleotiden zu decken. Im folgenden werden diese Stoffwechselwege näher erläutert. Da Pyrimidinnukleotide nicht nur für die Nucleinsäuresynthese wichtig sind, wird auch auf die Zusammenhänge mit anderen Stoffwechselwegen eingegangen, wobei ein besonderes Augenmerk auf den Kohlenhydratstoffwechsel gerichtet ist. Desweiteren werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen Organismengruppen dargestellt. Schließlich werden Möglichkeiten der Regulation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese im pflanzlichen Metabolismus aufgezeigt.

## 1.1 Der Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel

Sämtliche Pyrimidinnukleotide werden von Uridin-5'-monophosphat (= UMP) abgeleitet. Gewöhnlich existieren zwei verschiedene Wege, um UMP bereitzustellen: die *de novo* Biosynthese und die Wiederverwertungsreaktionen, bei denen UMP aus bereits vorhandenen Pyrimidin-Verbindungen gewonnen wird (Denis-Duphil, 1989). Beide Wege existieren in fast allen Organismen (Denis-Duphil, 1989), mit Ausnahme einiger Parasiten, die nicht in der Lage sind, die Pyrimidinbiosynthese durchzuführen. Dazu gehören die Protozoen *Giardia lamblia* (Lindmark und Jaroll, 1982) und *Trichomonas* spp. (Heyworth et al., 1984).

### 1.1.1 Die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese

Die Pyrimidinnukleotid *de novo* Biosynthese läuft in allen Organismen ähnlich ab (Abb. 1.1). Aufgrund molekularbiologischer und biochemischer Beweise wird ein entsprechender Ablauf auch für den pflanzlichen Organismus angenommen (Wagner und Backer, 1992).

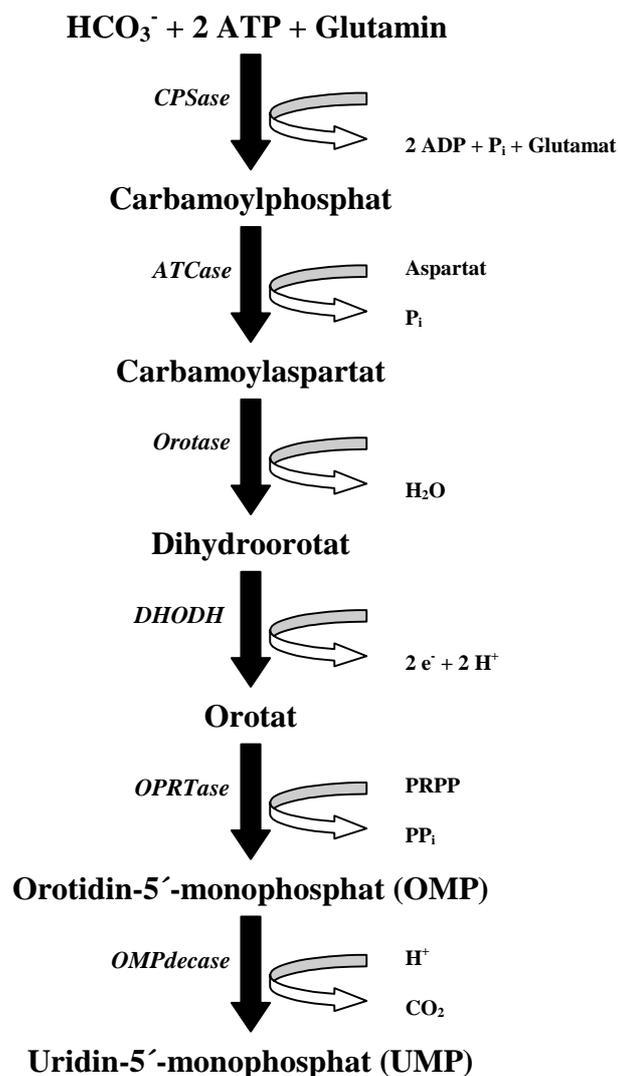


Abb. 1.1 Der Pyrimidinnukleotid *de novo* Syntheseweg (Stryer, 1996)

Es führen sechs Schritte zur Synthese von UMP (Abb. 1.1). Der erste Schritt ist die Bildung von Carbamoylphosphat aus Hydrogencarbonat, 2 ATP und Glutamin durch eine Carbamoylphosphatsynthetase (= CPSase, EC 6.3.5.5). Aus Carbamoylphosphat und Aspartat wird von einer Aspartat-Transcarbamoylase (= ATCase, EC 2.1.3.2) Carbamoylaspartat gebildet. In der folgenden, durch eine Dihydroorotase (= Orotase, EC

3.5.2.3) katalysierten Reaktion wird unter Wasserabspaltung der Pyrimidinring gebildet. Es entsteht dabei Dihydroorotat, dessen durch eine Dihydroorotat-Dehydrogenase (= DHODH, EC 1.3.1.14) vermittelte Dehydrierung zu Orotat führt. Der nächste Schritt ist die Anknüpfung einer Ribosephosphatgruppe. Das freie Pyrimidin Orotat reagiert mit 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (= PRPP) unter Vermittlung einer Orotat-Phosphoribosyltransferase (= OPRTase, EC 2.4.2.10) zu Orotidin-5'-monophosphat (= OMP). Dieses wird von einer Orotidinmonophosphatdecarboxylase (= OMPdecase, EC 4.1.1.23) zu Uridin-5'-monophosphat (= UMP) decarboxyliert.

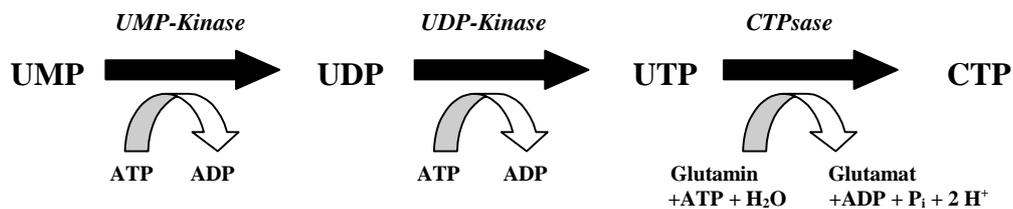


Abb. 1.2 Bildung aller weiteren Pyrimidinribonukleotide aus UMP (Stryer, 1996)

Aus UMP entstehen alle weiteren Pyrimidinribonukleotide (Abb 1.2). Eine Uridinmonophosphatkinase (= UMP-Kinase, EC 2.7.4.4) katalysiert die Umwandlung von Uridin-5'-monophosphat zu Uridin-5'-diphosphat (= UDP). Unter Vermittlung einer Uridindiphosphatkinase (= UDP-Kinase, EC 2.7.4.6) entsteht daraus Uridin-5'-triphosphat. Eine Cytidintriphosphatsynthetase (= CTPsase, EC 6.3.4.2) katalysiert schließlich die Bildung von Cytidin-5'-triphosphat (= CTP). Desoxyribonukleotide entstehen durch Reduktion der Ribonukleotide.

Wie Abb. 1.2 weiterhin zeigt, hängt die Bildung von UDP aus UMP bzw. UTP aus UDP über die Umsetzung von ATP zu ADP eng mit dem Purinstoffwechsel und vor allem auch dem zellulären Energiestoffwechsel zusammen und soll im folgenden auch in diesem Zusammenhang betrachtet werden.

### 1.1.2 Die Pyrimidinnukleotid - Wiederverwertungsreaktionen

Durch Wiederverwertungsreaktionen, die viel weniger aufwendig sind als die *de novo* Synthese, können bereits bestehende Pyrimidinbasen und Nukleoside verwendet werden, die beim Umsatz von Nukleinsäuren entstehen oder die von der Zelle aufgenommen worden sind. Bei der Wiederverwertung von Pyrimidinbasen kann sowohl PRPP (katalysiert von

Phosphoribosyltransferasen) als auch Ribose-1-Phosphat (katalysiert von Nucleosid-Phosphorylasen) als Donor der Ribosegruppe fungieren. Für die Wiederverwertung von Nucleosiden stehen ebenfalls zwei Möglichkeiten zur Auswahl: Zum einen die Entfernung der Ribose-Gruppe über Hydrolyse oder Phosphorylyse und Wiederverwertung der freigewordenen Pyrimidinbase. Zum anderen die direkte Wiederverwertung der Nucleoside durch die Tätigkeit von Kinasen oder Phosphotransferasen. Abb. 1.3 zeigt ein generalisiertes Schema der Wiederverwertungsreaktionen (Wagner und Backer, 1992), wie es beispielsweise aus Mikroorganismen bekannt ist.

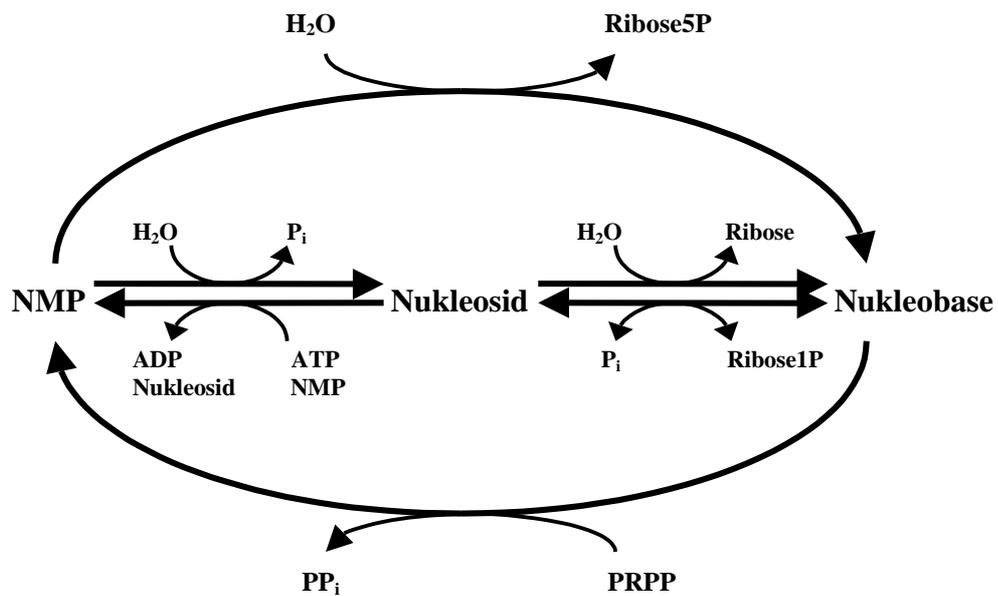


Abb. 1.3 Pyrimidinwiederverwertungsreaktionen (Wagner und Backer, 1992) NMP = Nucleosidmonophosphat; Ribose1P = Ribose-1-Phosphat; Ribose5P = Ribose-5-Phosphat.

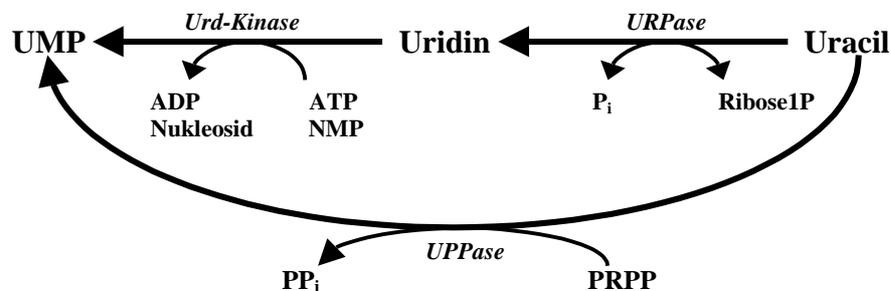


Abb. 1.4 Synthese von UMP aus Uracil bzw. Uridin (nach Wagner und Backer, 1992) UPPase = Uracil-Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.9); URPase = Uridin-Phosphorylase (EC 2.4.2.3); Urd-Kinase = Uridin-Kinase (EC 2.7.1.48)

Abb. 1.4 zeigt beispielhaft die Synthese von UMP aus Uracil bzw. Uridin. Wenig ist bisher über den genauen Ablauf oder die zelluläre Lokalisation der Pyrimidinwiederverwertungsreaktionen oder des damit zusammenhängenden Pyrimidinnukleotid-Abbaus in Pflanzen bekannt. Es konnte gezeigt werden, daß beide Stoffwechselwege in Pflanzen existieren (Wagner und Backer, 1992; Brown und Turan, 1995). Desweiteren wurden pflanzliche Homologe zu aus anderen Organismen bekannten Enzymen beschrieben, wie z.B. die UPPase von Tabak (Acc.Nr. Y11210).

### 1.1.3 Die Beziehungen zu anderen Stoffwechselwegen

Der Pyrimidinstoffwechsel ist mit einer Reihe anderer Stoffwechselwege verbunden. Da die Pyrimidinbasen Stickstoff enthalten, ist die Beziehung zum Stickstoff-Stoffwechsel offensichtlich (siehe Abschnitt 1.1.3.1), wobei über Carbamoylphosphat ein besonderes Verhältnis zur Argininbiosynthese besteht. Mit CDP aktivierte Lipid-Vorläufer spielen eine wichtige Rolle während der Phospholipid-Synthese. Weiterhin sind Pyrimidinnukleotide Vorstufen bei der Vitaminsynthese. Besonders wichtig erscheinen schließlich die Beziehungen zum Kohlenhydratstoffwechsel und der damit zusammenhängenden Zellwandsynthese, die in Abschnitt 1.1.3.2 erläutert werden.

#### 1.1.3.1 Beziehung zum Stickstoff-Stoffwechsel

Der Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel ist ein Berührungspunkt zwischen dem Stickstoff- und dem Kohlenstoff-Stoffwechsel, da die Aminosäuren Glutamin (als Donor der Ammoniumgruppe) und Aspartat direkte Vorstufen darstellen (Abb. 1.1). Im ersten Schritt der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese wird Carbamoylphosphat gebildet, das darüber hinaus auch noch im Verlauf der Argininbiosynthese benötigt wird. Wegen der direkten Verbindung dieser beiden Stoffwechselwege in einer einzigen Vorstufe wird im folgenden näher darauf eingegangen:

Die durch ATCase katalysierte Reaktion mit Aspartat zur Bildung von Carbamoylaspartat während der Pyrimidinnukleotidsynthese ist in Abschnitt 1.1.1 beschrieben. Bei der Argininbiosynthese kondensiert Ornithin mit Carbamoylphosphat. Diese Reaktion wird von der Ornithin-Transcarbamoylase (EC 2.1.3.3) katalysiert. Dabei entsteht Citrullin, woraus schließlich Arginin gebildet wird.

In Prokaryoten ist in der Regel nur eine CPSase vorhanden, die sowohl die Pyrimidinnukleotid- als auch die Arginin *de novo* Biosynthese mit Carbamoylphosphat versorgt (Pierard et al., 1965; Cunin et al., 1986). Eine Ausnahme stellt *Bacillus subtilis* dar, der für jeden Syntheseweg eine separate CPSase besitzt (Paulus und Switzer, 1979).

Untersuchungen an *Rattus norvegicus* (Hager und Jones, 1967; Nakanishi et al., 1968) und *Saccharomyces cerevisiae* (Lacroute et al., 1965) zeigten, daß bei Tieren und Pilzen zwei separate CPSasen vorhanden sind, die jeweils Argininsynthese und Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese versorgen (van den Hoff et al., 1995).

In Pflanzen wurde gezeigt, daß ähnlich wie bei den meisten Prokaryoten nur eine CPSase vorhanden ist (Ong und Jackson, 1972; Jacques und Sung, 1981; Doremus, 1986), die sowohl den Syntheseweg von Arginin als auch die *de novo* Biosynthese von Pyrimidinnukleotiden mit Carbamoylphosphat versorgt (O'Neal und Naylor, 1976). Hinweise auf eine zweite, für die Argininsynthese in Pflanzen spezifische CPSase (Ludwig, 1991) konnten nicht weiter bestätigt werden. Bei einer Betrachtung des komplett sequenzierten Genoms von *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) konnte ebenfalls nur eine einzige CPSase nachgewiesen werden.

#### 1.1.3.2 Beziehung zum Kohlenhydratstoffwechsel

Ein beträchtlicher Anteil der insgesamt vorhandenen Nukleotide in Pflanzenzellen liegt in Form von Nukleosid-Diphosphat-Zuckern vor, wobei UDP-Zucker den Hauptanteil stellen (Meyer und Wagner, 1986). Von diesen ist UDP-Glucose am wichtigsten, da es eine zentrale Position innerhalb des Kohlenhydratstoffwechsels innehat: UDP-Glucose ist das Substrat für die Cellulose-Synthese im Verlauf der Zellwandsynthese (Delmer und Stone, 1988). Für die Synthese von Hemicellulosen und Pektinen (= weitere Bestandteile der Zellwand), die im Golgi-Apparat stattfindet (Driouch et al., 1993; Staehelin und Moore, 1995), wird ebenfalls u.a. UDP-Glucose benötigt. Der Callose-Synthase-Komplex akzeptiert ebenfalls UDP-Glucose als Substrat (Delmer und Stone, 1988). Desweiteren hat UDP-Glucose eine Schlüsselposition im Verlauf von Synthese und Abbau von Saccharose, der wichtigsten Transportform von Kohlenhydraten in vielen Pflanzen - beispielsweise von sink- zu source-Gewebe (sink-Gewebe = Netto-Kohlenhydrat-Importeure, source-Gewebe = Netto-Kohlenhydrat-Exporteure (Turgeon, 1989); sink-Gewebe: z.B. wachsende Knollen und sich entwickelnde Blätter, source-Gewebe: z.B. Speichergewebe von austreibenden Knollen und ausgewachsene Blätter). Saccharose-Phosphat-Synthase (= SPS, EC 2.4.1.14) benutzt UDP-Glucose und Fructose-6-Phosphat zur Synthese von Saccharose-6-Phosphat. Der Abbau von

Saccharose geschieht einmal durch hydrolytische Spaltung von Invertasen, was zu freien Hexosen führt, die über ATP-verbrauchende Kinase-Reaktionen in Hexose-Phosphate umgewandelt werden. In vielen Geweben, wie beispielsweise wachsenden Knollen, konnte aber auch ein energiesparender, reversibler Weg über die Saccharose-Synthase (= SuSy, EC 2.4.1.13) gezeigt werden (Morell und ap Rees, 1986; Geigenberger und Stitt, 1993), bei dem UDP-Glucose entsteht. Die UDP-Glucose kann entweder für Synthese-Reaktionen benutzt werden oder sie wird unter Verbrauch von einem Molekül Pyrophosphat mittels UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (= UGPase, EC 2.7.7.9) reversibel zu Glucose-1-Phosphat umgesetzt, das für die Stärkesynthese oder auch im Verlauf der Glykolyse verbraucht werden kann. Pyrophosphat entsteht in wachsenden Geweben aufgrund von DNA- bzw. RNA-Synthese in großen Mengen. Abb. 1.5 faßt die genannten Punkte zusammen (Wagner und Backer, 1992).

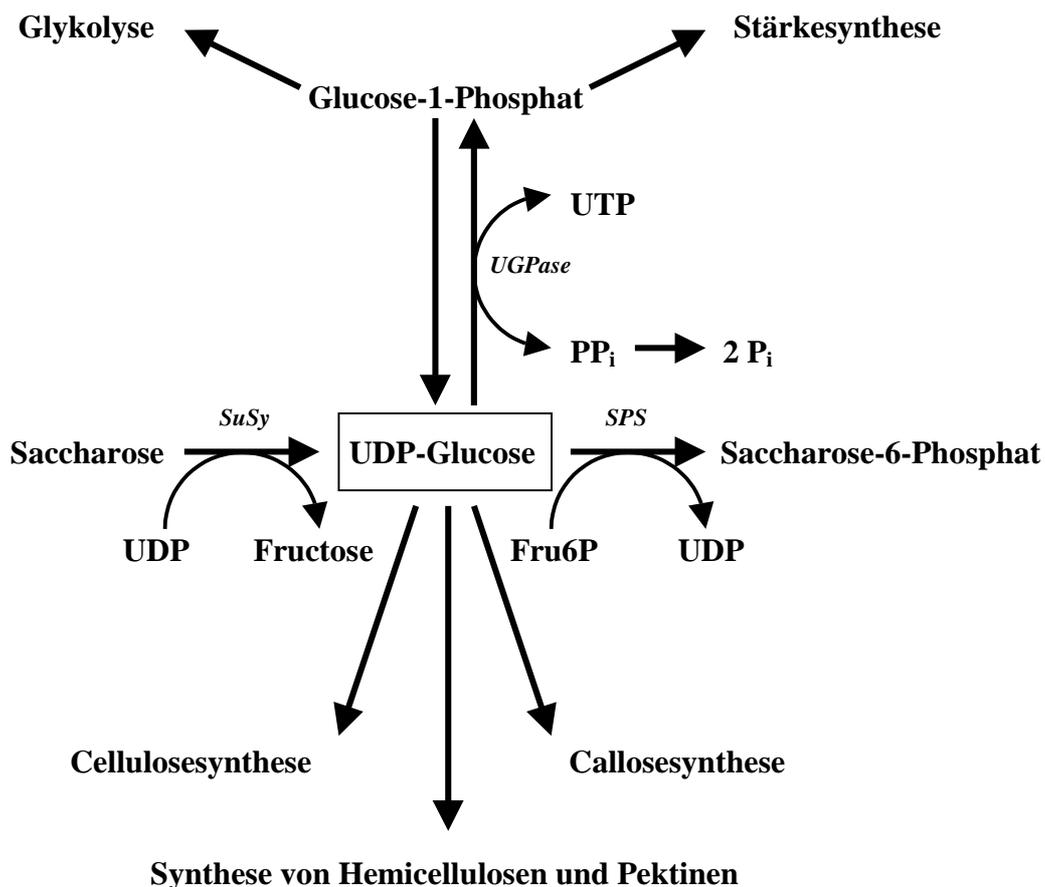


Abb. 1.5 Position von UDP-Glucose im Kohlenhydratstoffwechsel (Wagner und Backer, 1992) Fru6P = Fructose-6-Phosphat; PP<sub>i</sub> = Pyrophosphat

Für die Synthese der Kohlenhydratbestandteile pflanzlicher Zellwände sind Nukleosid-Diphosphat-Zucker wichtige Ausgangssubstrate. Zusätzlich zur Cellulose können Hemicellulosen und Pektine angeführt werden, die im Golgi-Apparat synthetisiert werden (Driouch et al., 1993; Staehelin und Moore, 1995). Den Transfer der Zucker-Gruppe übernehmen Glycosyltransferasen (Brett und Waldron, 1996), während das Nukleosid-Diphosphat frei wird. Bei der Umsetzung von UDP-Glucose entsteht demnach UDP. Es wurde gezeigt, daß UDP und auch andere Nukleosid-Diphosphate Glycosyltransferasen inhibieren (Ray et al., 1969; Fredrikson und Larsson, 1992). In Zusammenhang mit der Eliminierung von UDP im Golgi-Apparat wird die Uridin-5'-Diphosphatase (= UDPase, EC 3.6.1.6) gesehen (Dauwalder et al., 1969; Ray et al., 1969; Mitsui et al., 1994; Orellana et al., 1997; Neckelmann und Orellana, 1998), die im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Ray et al., 1969) und die Umsetzung von UDP zu UMP und  $P_i$  katalysiert.

In Blättern von Spinat wurde gezeigt, daß der überwiegende Teil der Uridinnukleotid-Derivate im Cytosol lokalisiert ist (Dancer et al., 1990). Die Umsetzung von UDP-Glucose im Golgi-Apparat bedingt einen Transport dieses Metabolites in das Lumen dieses Systems. Dies konnte bei *Pisum sativum* nachgewiesen werden (Muñoz et al., 1996). Im Rahmen der gleichen Untersuchung wurde auch die Art des Transportes postuliert: Es wurde ein Antiporter-Mechanismus vorgeschlagen, bei dem UDP-Glucose in den Golgi-Apparat gelangt, während im Austausch ein Uridin-Nukleotid den Golgi-Apparat verläßt. Ob es sich hierbei um das bei der Spaltung der UDP-Glucose gebildete UDP oder das durch die UDPase-Aktivität entstandene UMP handelt, ist zur Zeit nicht bekannt.

#### 1.1.4 Die Beziehung zur Zellteilung

Pyrimidinnukleotide sind zusammen mit Purinnukleotiden nötig zur Synthese von DNA und RNA. Dabei werden aus den Pyrimidinnukleotiden dCTP und dTTP (DNA) bzw. CTP und UTP (RNA) sowie den Purinnukleotiden dATP und dGTP (DNA) bzw. ATP und GTP (RNA) die entsprechenden Nukleinsäuren gebildet. Damit hängt die beobachtete Abstimmung von Purin- und Pyrimidinsynthese (O'Neal und Naylor, 1976; Denis-Duphil, 1989) zusammen. In zellteilungsaktiven Geweben liegt eine verstärkte Nukleinsäuresynthese vor (Burgess, 1985), wie z.B. die Replikation der DNA, da jede Tochterzelle die komplette genetische Information erhalten muß, was sowohl den Zellkern als auch DNA-synthetisierende Organellen wie Chloroplasten und Mitochondrien betrifft. Dies resultiert in einem erhöhten Bedarf an Nukleotiden. Es konnte gezeigt werden, daß die Synthese von DNA eine aktivierende

Wirkung auf Teilschritte der Pyrimidinnukleotid *de novo* Biosynthese hat (Parker und Jackson, 1981).

Zellteilungsaktive Gewebe stellen in Pflanzen z.B. sich noch teilende sink-Blätter (Poethig und Sussex, 1985; Walter und Schurr, 2000) oder die Wurzelspitzenregion (Silk, 1984; Beemster und Baskin, 1998) dar. Auch Zellsuspensionskulturen können in diesem Zusammenhang genannt werden.

## 1.2 Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in verschiedenen Organismen

Obwohl der Pyrimidinnukleotidstoffwechsel in allen Organismen nach dem in Abb. 1.1 dargestellten Schema abläuft (O'Donovan und Neuhard, 1970; Jones, 1972; Lovatt et al., 1979), gibt es in der Organisation des Stoffwechsels beträchtliche Unterschiede. Im folgenden sollen diese Unterschiede aufgezeigt werden, wobei sich auf die *de novo* Biosynthese im eigentlichen Sinne (= Synthese von UMP) beschränkt werden soll.

### 1.2.1 Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in Prokaryoten

In Prokaryoten ist jede für die Synthese von UMP benötigte Enzymaktivität auf einem separaten Protein lokalisiert (Beckwith et al., 1962; O'Donovan und Neuhard, 1970). In *Escherichia coli* sind die Gene für CPSase sowie für ATCase polycistronische Operons (Syvanen und Roth, 1973).

### 1.2.2 Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in Eukaryoten

Generell nimmt die Zahl der Gene, welche die Enzyme für die Bildung von UMP codieren, mit dem Übergang von Prokaryoten zu Eukaryoten und der Höherentwicklung innerhalb der Eukaryoten ab. Aber die molekulare Organisation nimmt zu: Es kommt zur Bildung von zusammengesetzten Genen, die multifunktionelle Proteine codieren (Denis-Duphil, 1989).

### 1.2.2.1 Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in Pilzen und Säugetieren

CPSase und ATCase befinden sich bei Pilzen auf einem bifunktionellen Protein (Souciet et al., 1987; Denis-Duphil, 1989) im Cytosol (Jones, 1972). Allerdings gibt es bei *Saccharomyces cerevisiae* auch Hinweise für eine Lokalisierung im Zellkern (Nagy et al., 1982). Die restlichen Aktivitäten der UMP-Synthese sind separat und cytosolisch (Jones, 1972), außer der DHODH, die in den Mitochondrien lokalisiert ist (Miller, 1975). Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde allerdings ebenfalls eine cytosolische Lokalisation der DHODH gezeigt (Guillerez et al., 1988).

In Säugetieren befinden sich die Aktivitäten für CPSase, ATCase und Orotase auf einem multifunktionellen Protein (Mori et al., 1975; Coleman et al., 1977; Hiroyuki et al., 1996) im Cytosol (Natale und Tremblay, 1969). DHODH ist auf der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Chen und Jones, 1976). Die beiden letzten Schritte der UMP-Synthese laufen wiederum im Cytosol ab und werden durch ein multifunktionelles Protein katalysiert (Reyes und Gunganig, 1975).

### 1.2.2.2 Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in höheren Pflanzen

Die genaue Organisation und subzelluläre Lokalisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese ist in Pflanzen nicht vollständig bekannt und in einigen Aspekten immer noch sehr spekulativ. Im folgenden sollen die bisher bekannten Sachverhalte dargestellt werden, die auf den wenigen bisher publizierten molekularbiologischen und biochemischen Analysen beruhen. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch eine Betrachtung des komplett sequenzierten Genoms von *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Für die Aktivitäten von CPSase, ATCase, Orotase und DHODH wird eine Lokalisation auf separaten Polypeptiden angenommen (Doremus und Jagendorf, 1985; Doremus, 1986). OPRase und OMPdecase befinden sich auf einem bifunktionellen Polypeptid (in der weiteren Arbeit als UMP-Synthase bezeichnet) (Walther et al., 1984; Doremus, 1986), das von *einem* Gen codiert wird (Nasr et al., 1994). Diese früheren Untersuchungen werden durch eine Betrachtung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* gestützt, hierbei zeigt sich zudem, daß die Gene über alle Chromosomen von *Arabidopsis* verteilt sind.

Für CPSase konnte in Pflanzen gezeigt werden, daß ähnlich wie bei Prokaryoten (Trotta et al., 1971; Trotta et al., 1974; Abdelal und Ingraham, 1975; Rubio und Cervera, 1995; Kasahara

und Ohmori, 1997) zwei Untereinheiten vorhanden sind (Brandenburg et al., 1997). Eine kleine Untereinheit von ungefähr 40kDa (Brandenburg et al., 1997), die im folgenden als CPSase SU bezeichnet wird, besitzt vermutlich ähnlich der Situation in Bakterien (Trotta et al., 1971) eine Glutaminaseaktivität (Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und  $\text{NH}_3$ ) (Brandenburg et al., 1997). Ebenfalls konnte eine große Untereinheit von etwa 130 kDa mit der eigentlichen Synthetase-Aktivität identifiziert werden (Williamson et al., 1996; Brandenburg et al., 1997), die in der vorliegenden Arbeit CPSase LU genannt wird.

Biochemische Untersuchungen sprechen dafür, daß CPSase sowie ATCase im Stroma der Chloroplasten lokalisiert sind (Shibata et al., 1986; Doremus, 1986), was durch eine Untersuchung von entsprechenden Proteinsequenzen mittels der Programme PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>; Nakai und Kanehisa, 1992) und TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>; Emanuelsson et al., 2000) untermauert werden konnte (Giermann et al., 2002). Die in den Chloroplasten lokalisierten Enzyme für die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese sind von Zellkern-Genen codiert und werden an cytosolischen Ribosomen synthetisiert (Doremus und Jagendorf, 1987).

Die Aktivität der Orotase wurde in einer früheren Untersuchung ebenfalls im Chloroplasten-Stroma festgestellt (Doremus und Jagendorf, 1985), was aber bisher nicht weiter bestätigt werden konnte. Analysen von Proteinsequenzen mit den Programmen PSORT und TargetP ergaben Hinweise auf eine mögliche Lokalisation im Zellkern (Giermann et al., 2002). Die genaue subzelluläre Lage dieses Enzyms gilt zur Zeit als sehr unsicher.

Ebenfalls fraglich ist in Pflanzen die subzelluläre Lokalisation der DHODH. Zwar existieren biochemische Hinweise dafür, daß sich DHODH ähnlich wie bei Säugetieren an der inneren Mitochondrien-Membran befindet (Doremus und Jagendorf, 1985). Aber dies konnte bei Analysen mit PSORT und TargetP nicht eindeutig geklärt werden (Giermann et al., 2002).

Als Wirkungsort der bifunktionellen UMP-Synthase wird das Cytosol angesehen (Kanamori et al., 1980). Eine Analyse der Gen-Sequenz für UMP-Synthase aus dem Genom von *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) bestätigt dies.

## 1.3 Regulation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in Pflanzen

Die Regulation von Enzymen erfolgt über die Beeinflussung der Expression und der Aktivität sowie über Proteinmodifikation. In dieser Hinsicht wurde die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in Bakterien, Hefe und Säugetieren bereits vielfach untersucht, wofür im folgenden Beispiele für jede Art der Regulationsmöglichkeit angegeben werden:

Transkriptionelle Regulation von Genen, die an diesem Syntheseweg beteiligt sind, wurde in Bakterien und Hefe näher analysiert. In *Bacillus subtilis* codiert das *pyrR*-Gen ein bifunktionelles Produkt, das eine UPPase-Aktivität besitzt und an drei verschiedenen Stellen des Pyrimidinnukleotid-Synthese-Operons an der UMP-abhängigen transkriptionellen Inhibierung beteiligt ist (Turner et al., 1998). In *E.coli* besitzt das Produkt des *pyrH*-Gens eine UMP-Kinase-Aktivität und ist gleichzeitig in die transkriptionelle Regulation beider Untereinheiten der CPSase involviert (Kholti et al., 1998). In *Saccharomyces cerevisiae* stellt das *Ppr1p*-Genprodukt ein transkriptionelles Aktivator-Protein dar, das auf Dihydroorotat oder Orotat reagiert und an der Regulation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese beteiligt ist (Flynn und Reece, 1999).

Als Beispiel für Regulation über Enzymaktivität stellt die ATCase in *E.coli* ein Lehrbuchbeispiel für allosterische Wechselwirkungen von Enzymen dar (Gerhart, 1970). Hierbei liegt eine negative Rückkopplung von CTP vor.

Regulation von an der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese beteiligten Enzymen durch Proteinmodifikation wurde z.B. an der CPSase in Säugetieren beschrieben. Dabei wird das Enzym von einer MAP Kinase phosphoryliert (Graves et al., 2000), wodurch seine regulativen Eigenschaften verändert werden.

Nur wenige Untersuchungen haben bisher die Regulation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in Pflanzen näher analysiert:

In *Cucurbita pepo* wurde gezeigt, daß eine Regulation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in den ersten beiden Schritten stattfindet (Lovatt et al., 1979). In Blättern von *Pisum sativum* konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der CPSase sowohl durch Intermediate der Argininbiosynthese (Ornithin: aktivierend) als auch der Pyrimidinnukleotid *de novo* Biosynthese (UMP, UDP und UTP: inhibierend) reguliert wird (O'Neal und Naylor, 1976), was CPSase als möglichen limitierenden Schritt erscheinen ließ. Aufgrund von

Untersuchungen an Zell-Suspensions-Kulturen von *Nicotiana tabacum* wurde auch UMP-Synthase als ein limitierender Schritt vorgeschlagen (Santoso und Thornburg, 1992).

Nur für UMP-Synthase wurde bisher eine Untersuchung einer Regulation über die Transkription durchgeführt (Santoso und Thornburg, 1998 und 2000). Dabei wurde eine Regulation der Transkription in *Nicotiana plumbaginifolia* durch zelluläre Pyrimidin-Spiegel postuliert. Darüber hinaus ist in Pflanzen bisher nichts bekannt.

## 1.4 Transgene Pflanzen als Möglichkeit, die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese zu untersuchen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, einen Stoffwechselweg und seine zugehörigen Enzyme zu charakterisieren. Dazu gehört die Analyse der Expression auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Geweben und Situationen, die Bestimmung der Enzymaktivität oder die Aufstellung von Beziehungen zu anderen Stoffwechselwegen.

Eine weitere Untersuchungsmöglichkeit liegt in der Verwendung von Pflanzen, in denen eine definierte Veränderung in der Expression oder Aktivität eines bestimmten Enzyms bzw. im Ablauf eines ganzen Stoffwechselweges vorliegt. Dabei ist eine Untersuchung in Hinblick auf Wachstum, Entwicklung und Stoffwechsel der betroffenen Pflanze möglich.

Dies können zum einen Mutanten sein, in denen die Expression eines bestimmten Genproduktes nicht stattfindet (sogenannte „*knock-out*“-Mutanten) oder verändert ist. Für *Arabidopsis thaliana* sind diese Mutanten mittlerweile in großen Datenbanken und Saatgutsammlungen erfaßt und können für Analysen bestellt werden (für weiterführende Informationen siehe <http://www.arabidopsis.org>). Jedoch ist bisher für kein Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzym eine *A.thaliana* „*knock-out*“-Mutante bekannt. Für *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana plumbaginifolia* vorhandene UMP-Synthase-Mutanten existieren nur in Zellkultur (Santoso und Thornburg, 1992, 1998 und 2000).

Zum anderen bietet sich die Verwendung von transgenen Pflanzen an (Stitt, 1995; Stitt und Sonnewald, 1995). Transgene Pflanzen werden am häufigsten durch einen von *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer erzeugt (Zupan und Zambryski, 1995). Bei der Erstellung der zu transformierenden Konstrukte ist auf eine einfache Isolierung erfolgreicher Transformanten zu achten - sehr häufig werden Antibiotika- oder Herbizid-Resistenzen benutzt. Desweiteren muß ein geeigneter Promotor benutzt werden - am häufigsten findet

bisher der konstitutive 35S-*CaMV* Promotor (Franck et al., 1980) Verwendung. Damit kann eine gerichtete Manipulation von Enzymaktivitäten in den Zielorganismen erreicht werden, die den zu untersuchenden Stoffwechselweg und darüber hinaus den gesamten Metabolismus betreffen kann.

Das Einbringen von Genen in das Pflanzengenom kann in Sinn- oder Gegensinn-Orientierung erfolgen (Majeau et al., 1994; Brisson et al., 1998; Gojon et al., 1998).

Bei Sinn-Orientierung wird von der transkribierten mRNA das betreffende Protein codiert. Mit dieser Technik ist zum einen eine Überexpression des eingebrachten Proteins – das auch aus einem völlig anderen Organismus stammen kann – möglich (Sonnewald und Willmitzer, 1992). Zum anderen kann eine Repression des natürlich vorkommenden Endogens durch Cosuppression erfolgen (Napoli et al., 1990).

Bei Gegensinn-Orientierung ist die resultierende mRNA komplementär zur mRNA des zu manipulierenden Enzyms. Dabei kann die Expression eines bestimmten Genproduktes gezielt reduziert werden (van der Krol et al., 1988a und 1988b; Zrenner et al., 1993 und 1995). Dies geschieht durch einen noch nicht näher geklärten Mechanismus, wobei aber eine Bildung von RNA-RNA-Hybriden, die schlecht translatiert bzw. schnell abgebaut werden, möglich scheint (Mol et al., 1990).

In diesem Zusammenhang steht eine weitere Möglichkeit, die Expression eines bestimmten Gens in transgenen Pflanzen stillzulegen: Die Verwendung von RNAi-Konstrukten (Sharp, 1999; Bernstein et al., 2001). Dabei weisen die künstlich etablierte mRNA sowie die mRNA des natürlich vorkommenden Endogens kurze homologe Bereiche auf (ungefähr 22 Nukleotide), was zur Bildung von doppelsträngiger RNA führt. Die Folge ist ein schneller Abbau durch RNasen.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In Pflanzen sind nur Teilbereiche der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese bereits näher bekannt. Ein sehr wenig untersuchtes Gebiet stellt die Expression von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen sowie die Regulation ihrer Expression dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Expression der an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzyme und eine mögliche Einflußnahme darauf in *Nicotiana tabacum* (Tabak) und *Solanum tuberosum* (Kartoffel) zu untersuchen. Dies konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene geschehen, wobei auch Auswirkungen auf Metabolit-Ebene und die Beziehungen zu anderen Stoffwechselwegen berücksichtigt werden sollten.

Für die Untersuchungen der Expression auf mRNA-Ebene war es nötig, spezifische, markierte Sonden-DNAs herzustellen. Um die Expression auf Proteinebene untersuchen zu können, sollten von ausgewählten Enzymen Protein-Teilfragmente in *E.coli* überexprimiert werden, um gegen das jeweilige Protein spezifische Antikörper zu erhalten. Bei Analyse der Expression sollte ein Schwerpunkt auf gewebe- und entwicklungsspezifischer Variation liegen. Daneben sollte der Einfluß von Tageszeit und Sauerstoffverfügbarkeit analysiert werden.

Bei Betrachtung der Regulation der Expression der an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzyme sollte der Einfluß verschiedener Metabolite in unterschiedlichen Gewebesystemen untersucht werden. Es sollten dazu die Konzentrationen von Substraten der Enzym-Reaktionen (am Beispiel von Phosphat), Zwischen- und Endprodukten der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese sowie damit zusammenhängender Stoffwechselwege in den Geweben variiert werden.

Eine gezielte Einflußnahme auf den Nukleotidstoffwechsel sollte auch durch die Verwendung transgener Pflanzen vorgenommen werden. Zum einen sollte dies in eigens herzustellenden Tabakpflanzen geschehen, die eine heterologe UDPase konstitutiv exprimieren sollten. UDPase spaltet UDP in UMP und  $P_i$ , was Auswirkungen auf den Pyrimidinstoffwechsel haben sollte. Zum anderen wurden bereits vorhandene UGPase- und SuSy-Gegensinn-Kartoffelpflanzen verwendet, in denen die Expression von UGPase bzw. SuSy je nach Linie unterschiedlich stark reprimiert ist. UGPase und SuSy haben Einfluß auf den UDP-Glucose-Gehalt in Pflanzen, was in Hinsicht auf die Expression von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen untersucht werden sollte.

Schließlich sollte über Southern-Analyse die genomische Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme in Tabak und Kartoffel charakterisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Materialien und Geräte

**Amersham Life Science** (Braunschweig): Hyperfilm ECL

**Atto** (Tokyo, Japan): AE-6210 Gelsystem

**Beckman Instruments GmbH** (München): Zentrifuge J2-21

**Biometra** (Göttingen): Agagel Midi Wide und Agagel Mini Wide; Personal Cycler; Uno Thermoblock

**BioRad** (München): Econo Pac Chromatography-Columns, Durchmesser 1,6cm; Ready Gel Cell; Ziege-Anti-Kaninchen IgG (H+L), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase; Blot-Absorptions-Filterpapier; Acrylamid / Bisacrylamid; Bradford-Reagenz; Kaleidoscope Prestained Standards (Protein-Gewichtsstandard)

**Calbiochem.Novabiochem.Corporation** (Bad Soden): Miracloth

**Duchefa** (Haarlem, Niederlande): Murashige-Skoog-Medium inkl. Vitamine

**Eppendorf** (Hamburg): Mikroreaktionsgefäße; Tischzentrifuge 5415 C mit Standardrotor F-45-18-11 für 18 Gefäße; Sigma ZFP-22

**Eurogentech** (Parc scientifique du Sart Tilman, Belgien): Goldstar Taq-DNA-Polymerase mit Goldstar 10x Inkubationspuffer und Goldstar 25mM MgCl<sub>2</sub>; Smartladder (Molekulargewichtsstandard); T3-Primer; T7-Primer; SP6-Primer

**Gesellschaft für elektropysikalischen Apparatebau** (Darmstadt): Laborgefriertrockner L05

**Greiner** (Kremsmünster, Österreich): 50ml Reagenzröhren

**Heidolph** (Kelheim): Schüttler Unimax 2010

**Heraeus Sepatech** (Osterode): Megafuge 1.0R, mit Tragringrotor 3360

**Herolab** (Wiesloch): Herolab E.A.S.Y. Enhanced Analysis System inkl. UV-Transilluminator

**ICN Pharmaceuticals Inc.** (Costa Mesa, CA, USA): [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]dCTP

**Julabo** (Seelbach): Schüttelwasserbad SW-20C

**Knauer GmbH** (Berlin): Hypersil ODS-Säule

**Kodak** (Rochester, New York, USA): Biomax MR-Film; Entwickler; Fixierer

**Kontron Instruments** (Eching) : Uvikon Spectrophotometer 930; Fluorimeter SFM-25; Autosampler 465; Datensystem 450 MT2; HPLC-Anlage (Pumpen Nr. 422, Injektionsventil Cotati 9125, UV-Detektor Nr. 430); Autosampler 360

**Life Technologies** (Paisley, UK): Agarose (ultrapure, elektrophoresis grade)

**MBI Fermentas** (Vilnius, Litauen): Restriktionsendonukleasen; T4-Ligase inkl. 10x-Ligase-Puffer

**Medicell Internat.** (London, UK): Dialysemembranen (Size 1-8/32'')

**Millipore** (Bedford, MA, USA): Immobilon-P 0,45µm Porenweite

**MWG-Biotech AG** (Ebersberg): Oligonukleotide

**Osmotek Ltd.** (Rehovot, Israel): Life Raft<sup>®</sup>, inkl. Osmowet S

**Percival Scientific** (Perry, USA): Anzuchtschrank Modell AR-36L

**Pharmacia** (Freiburg): LKB.Ultrospec.III; Ficoll Typ 400; LKB-MultiphorII (NovaBlot) Semi-Dry-Blotter

**Promega** (Mannheim): pGEM-T EASY Vector System (pGEM-T EASY Vector (50ng/μl); Promega T4-Ligase; Promega 10x-Ligase-Puffer); *E.coli* JM-109(DE3)

**QIAGEN Inc., DIAGEN GmbH.** (Hilden): QIAGEN-tips 100; QIAexpress (The high level expression and protein purification system: pQE Vectors; *E.coli* M15 (pREP 4); 50%-Nickel-NTA-Agarose-Suspension); QIAquick PCR Purification Kit; QIAquick Gel Extraction Kit

**Roche Diagnostics GmbH** (Mannheim): Alkaline Phosphatase, shrimp; Antibiotika; IPTG (Isopropylthiogalactosid); Nukleotide (dATP bzw. dCTP bzw. dGTP bzw. dTTP, je 0,1M); Restriktionsendonukleasen; RNase A; T4-Ligase inkl. 10x-Ligase-Puffer; X-Gal = 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid; Nukleotide für HPLC-Standard; High Prime Reaktionsmix (in 5x Reaktionspuffer: Klenow-Enzym; Oligonukleotide; je 0,125mM dATP, dGTP, dTTP); Lactat-Dehydrogenase aus Schweinemuskel; Myokinase aus Kaninchenmuskel; Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Hefe; Phosphoglucoisomerase aus Hefe; Phosphoglucomutase aus Kaninchenmuskel; Hexokinase aus Hefe; Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel

**Sarstedt** (Nümbrecht): Mikroreaktionsgefäße; 15ml Reagenzröhren

**Schleicher & Schüll GmbH** (Dassel): Rundfilter Ø90mm, Nr. 300109, 589<sup>2</sup> Weißband

**Serva Feinbiochemica** (Heidelberg/New York): Bovines Serum Albumin (=BSA); TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)

**Sigma** (Deisenhofen): Protein-Gewichtsstandard (Sigma SDS MB7B) (vor Gebrauch in 8M Harnstoff und 2x Probenauftragspuffer lösen); Tween 20; Aminosäuren und Nukleotide für HPLC-Standard; UDP; Mineralöl; NBT (4-Nitroblau-Tetrazolium); BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-phosphat); ssDNA (Heringsspermien); Uridin-5'-Diphosphoglucose-Pyrophosphorylase; Invertase; Behälter zur Pflanzenanzucht in Gewebekultur (Magenta GA7-Vessel und Phytatrays II large)

**Stratagene** (LaJolla, CA, USA): Duralon-UV-Membran; *E.coli* XL1-Blue MRF<sup>a,b</sup>; pBluescript SK (+/-) - phagmid; UV-Stratalinker 1800; Robo-Cycler-Gradient40; Pfu-DNA-Polymerase mit 10x Inkubationspuffer; PCR-Script Amp Cloning Kit

**Techne** (Cambridge, UK): Hybridiser HB-19; Hybridisierungsröhren

**Whatman Internat.** (Maidstone, UK): 3MM-Papier; Partisil<sup>®</sup>-SAX Anionenaustauschersäule

Weitere Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: **Fluka** (Buchs, Schweiz); **Merck** (Darmstadt); **Roth** (Karlsruhe); **Sigma** (Deisenhofen).

### 2.1.2 Oligonukleotide

- **T3-Primer:** 18mer (Eurogentech): 5'-TAACCCTCACTAAAGGGA-3'
- **T7-Primer:** 17mer (Eurogentech): 5'-AATACGACTCACTATAG-3'
- **SP6-Primer:** 19mer (Eurogentech): 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'
- **Primer Jle 190:** 24mer: 5'-GGGGATCCTTGGGTAAAAGAACAG-3'
- **Primer Jle 185:** 18mer: 5'-TCAAGCAAGAACACCTCA-3'
- **Primer Oli77:** 32mer: 5'-AAGGATCCACGATATCTCCGCCGTCAAATTCG-3'
- **Primer Oli78:** 32mer: 5'-TTGAATTCTTACTTGCAGTTAACCAAATACGC-3'

Primer Jle 190, Jle 185, Oli77 und Oli78 wurden am DNA-Synthesizer (380A, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) hergestellt.

- **Primer YUV:** 23mer: 5'-GCTAGCATGCTCATAGAAAACAC-3'
- **Primer YUH:** 23mer: 5'-TCTAGATCAATCATATAGCCTAC-3'

Primer YUV und YUH wurden am DNA-Synthesizer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) hergestellt.

### 2.1.3 Plasmide und Vektoren

- **pGEM-T Easy Vektor (Promega):** T7 Promotor, SP6 Promotor, Multiple Klonierungsstelle, lacZ-Gen, Amp<sup>r</sup>, f1-origin, Bindungsstellen für pUC/M13 Forward- und Reverse-Primer; 3 kB. Der Vektor ist innerhalb des lacZ-Gens mit Eco RV geschnitten worden - er ist also offen. Desweiteren wurde an die beiden entstandenen 3'-Enden ein Thymidin angefügt. Dies hat zwei Effekte: Erstens können PCR-Produkte einfach in diesen Vektor ligiert werden. Dies hängt damit zusammen, daß viele Taq-Polymerasen an die 3'-Enden amplifizierter Fragmente ein Desoxyadenosin anfügen. Zweitens setzt es die Anzahl an Autoliganden stark herab. Zur Selektion von Zellen, die überhaupt erfolgreich transformiert worden sind, ist ein Ampicillin-Resistenz-Gen ( $\beta$ -Lactamase) vorhanden.
- **pBluescript SK (+/-) - phagemid (Stratagene):** T7 Promotor, T3 Promotor, Multiple Klonierungsstelle, lacZ-Gen, Amp<sup>r</sup>, f1-origin, ColE1-origin; Bindungsstellen für pUC/M13 Forward- und Reverse-Primer, SK- und KS-Primer, T3- und T7-Primer; 3 kB; abgeleitet von pUC 19. Zur Selektion von Zellen, die überhaupt erfolgreich transformiert worden sind, ist ein Ampicillin-Resistenz-Gen ( $\beta$ -Lactamase) vorhanden.
- **pPCR-Script Amp SK (+) (Stratagene):** Multiple Klonierungsstelle, lacZ-Gen, Amp<sup>r</sup>, f1-origin, ColE1-origin; Bindungsstellen für T3- und T7-Primer; 3 kB. Zur Selektion von Zellen, die überhaupt erfolgreich transformiert worden sind, ist ein Ampicillin-Resistenz-Gen ( $\beta$ -Lactamase) vorhanden.

Bei allen 3 Vektoren liegt die Multiple Klonierungsstelle im lacZ-Gen (codiert eine  $\beta$ -Galactosidase) - die Grundlage der Blau-Weiß-Selektion. Die Wirksamkeit der  $\beta$ -Galactosidase kann durch eine Farbreaktion überprüft werden, sofern ein Induktor (z.B. IPTG) und ein geeignetes Substrat (z.B. X-Gal, verursacht Blaufärbung) vorhanden sind. Es können nur Vektoren ohne Insert gefärbte Kolonien hervorrufen, da in ihnen das lacZ-Gen eine funktionstüchtige  $\beta$ -Galactosidase liefert. Vektoren mit einem Insert verursachen demnach weiße Kolonien.

- **Überexpressionsvektor pQE-9 (QIAGEN Inc.):** Multiple Klonierungsstelle, Amp<sup>r</sup>, 6xHis, T5/lac Promotor-Operator-Element,  $\lambda$ -Transkriptionsterminator, synthetische Ribosomen-Bindungsstelle, Replikationsorigin; 3,4 kB; aus der pDS-Plasmid-Familie abgeleitet. Dieser Vektor ist aus mehreren Gründen als Überexpressionsvektor geeignet: Er besitzt ein regulierbares Promotor/Operator-Element, bestehend aus einem T5-Promotor und zwei Operator-Sequenzen aus dem lac-operon. Auf diese Weise ist eine Induktion der Überexpression mit IPTG möglich. Eine synthetische Ribosomen-Bindungsstelle erhöht die Effizienz der Translation. Nach dem Start-Codon folgen 6 Nukleotid-Triplets, die Histidin codieren. Mit diesem aus 6 Histidin bestehenden Segment am Anfang des überexprimierten Proteins ist die Aufreinigung mit Nickel-NTA-Agarose möglich. Die Ligation erfolgt in einer Multiplen Klonierungsstelle. Für alle Leseraster sind Stop-Codons vorhanden. Zur Selektion von Zellen, die überhaupt erfolgreich transformiert worden sind, ist ein Ampicillin-Resistenz-Gen ( $\beta$ -Lactamase) vorhanden.
- **pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1992):** 12kB; pBinAR wird von pBin19 (Bevan, 1984) abgeleitet. Die modifizierte T-DNA wird von der rechten (RB = right border) und der linken Grenze (LB = left border) umgeben. Sie enthält eine Multiple Klonierungsstelle, den starken 35S Promotor aus *CaMV* (Franck et al., 1980) und als Terminator das Polyadenylierungssignal des Octopin Synthase Gens (OCS), welches normalerweise auf dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* liegt (aus pTiACH5; Gielen et al., 1984). Daneben enthält der Bereich das NPTII Gen, welches die Neomycin Phosphotransferase II codiert und den transformierten Bakterien und Pflanzen Kanamycinresistenz verleiht.

## 2.1.4 cDNAs und DNA-Sonden

Genprodukt	Plasmid	Herkunft	cDNA-Größe	Acc.Nr.	Volle Länge
CPSase LU	pBK-CMV	<i>N.tabacum</i>	4,0 kB	AJ319872	Ja
CPSase SU	pBK-CMV	<i>N.tabacum</i>	1,7 kB	AJ319873	Ja
ATCase	pBluescript	<i>S.tuberosum</i>	1,3 kB	AJ319874	Ja
Orotase	pBluescript	<i>S.tuberosum</i>	1,3 kB	AX093580	Nein
DHODH	pBK-CMV	<i>N.tabacum</i>	2,0 kB	AX093582	Ja
UMP-Synthase	pGEM Amp	<i>N.tabacum</i>	1,5 kB	U22260	Nein
UMP-Kinase	pBluescript	<i>N.tabacum</i>	1,0 kB	nicht publiziert	Ja
UPPase	pGEM-T Easy	<i>N.tabacum</i>	1,3 kB	Y11210	Ja
SuSy	pBluescript	<i>S.tuberosum</i>	2,4 kB	M18745	Ja
UGPase	pBluescript	<i>S.tuberosum</i>	1,4 kB	D00667	Ja

Tab. 2.1 Beschreibung der verwendeten cDNAs

Die cDNAs für CPSaseLU, CPSase SU und DHODH gingen aus einer cDNA-Bibliothek einer Tabakzellkultur (Greiner et al., 1998) hervor (Giermann et al., 2002). Die cDNAs für ATCase und Orotase wurden aus einer cDNA-Bibliothek von Kartoffel-sink-Blättern gewonnen (Giermann et al., 2002). Die cDNA für UMP-Kinase wurde aus einer Tabak-Blatt cDNA-Bank im Hefe two-hybrid-Vektor pAD-GAL4 isoliert und freundlicherweise von Frederik Börnke (IPK Gatersleben, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die cDNAs von UMP-Synthase bzw. UPPase gehen auf die publizierten Sequenzen U22260 bzw. Y11210 zurück. Die cDNAs für SuSy (Zrenner et al., 1995) und UGPase (Zrenner et al., 1993) gehen auf die publizierten Sequenzen M18745 bzw. D00667 zurück.

Tab. 2.1 zeigt die zur Sondenherstellung verwendeten cDNAs. Die unmarkierten DNAs zur Herstellung der Sonden für CPSase SU, ATCase, Orotase, DHODH, UMP-Kinase, SuSy und UGPase wurden über PCR unter Verwendung der Oligonukleotide T3 und T7 erstellt. Die UPPase-DNA wurde über PCR mit SP6 und T7 amplifiziert. In allen bisher genannten Fällen wurde durch die Wahl der Oligonukleotide die gesamte cDNA des jeweiligen Genproduktes amplifiziert. Die unmarkierte DNA für eine UMP-Synthase-Sonde (nicht volle Länge) wurde über PCR mit den Oligonukleotiden Oli77 und Oli78 gewonnen. Zur Analyse der mRNA von CPSase LU wurde ein Teilfragment der cDNA (2,6 kB) mit den Oligonukleotiden Jle 190 und Jle 185 amplifiziert. Für die Southern-Analyse von CPSase LU wurde eine Volle-Länge-Sonde benötigt. Diese wurde über Restriktion der cDNA aus pBK-CMV mit Eco RI und Xho I gewonnen.

UDPase-DNA zur Herstellung von Volle-Länge-Sonden (1,9 kB) wurde aus genomischer Hefe-DNA, die freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde (Remus, 1999), über PCR mit YUV und YUH amplifiziert.

Alle unmarkierten DNAs wurden gemäß Abschnitt 2.2.4.6 radioaktiv markiert.

### 2.1.5 Antikörper

- **Anti-CPSase LU-Antikörper:** (Giermann, 1997) Ausgehend vom CPSase LU – Gen-Konstrukt (Tab. 2.1) wurde ein 2,6 kB großes Teilstück per PCR mit den Oligonukleotiden J1e 190 (führte eine Bam HI-Schnittstelle ein) und J1e 185 amplifiziert und die gereinigte DNA in pGEM-T EASY ligiert. Ein positiver Klon wurde gewählt und ein 2,4 kB großes Teilstück Bam HI / Sph I in den Überexpressionsvektor pQE-30 ligiert. Die Auswahl positiver Klone fand in *E.coli* XL1-Blue statt. Die Überexpression des Proteins geschah in *E.coli* M15(pREP4). Nach Aufreinigung des überexprimierten Proteins (ca. 40kDa groß) mit Nickel-NTA-Agarose wurde es dialysiert, gefriergetrocknet und von der Firma BioGenes GmbH (Berlin) für die Immunisierung eines Kaninchens aufgearbeitet.
- **Anti-CPSase SU-Antikörper:** Ausgehend vom CPSase SU – Gen-Konstrukt (Tab. 2.1) wurde ein 1,5 kB großes Teilstück mit Xho I ausgeschnitten und die gereinigte DNA in den Sal I geschnittenen, gereinigten und dephosphorylierten Überexpressionsvektor pQE-9 ligiert. Die Auswahl positiver Klone fand in *E.coli* XL1-Blue statt. Die Überexpression des Proteins geschah in *E.coli* M15(pREP4). Nach Aufreinigung des überexprimierten Proteins (ca. 40kDa groß) mit Nickel-NTA-Agarose wurde es dialysiert, gefriergetrocknet und von der Firma BioGenes GmbH (Berlin) für die Immunisierung eines Kaninchens aufgearbeitet.
- **Anti-ATCase-Antikörper:** Ausgehend vom ATCase – Gen-Konstrukt (Tab. 2.1) wurde ein 1,2 kB großes Teilstück mit Bam HI und HindIII ausgeschnitten und die gereinigte DNA in den ebenfalls Bam HI und HindIII geschnittenen und gereinigten Überexpressionsvektor pQE-9 ligiert. Die Auswahl positiver Klone fand in *E.coli* XL1-Blue statt. Die Überexpression des Proteins geschah in *E.coli* M15(pREP4). Nach Aufreinigung des überexprimierten Proteins (ca. 50kDa groß) mit Nickel-NTA-Agarose wurde es dialysiert, gefriergetrocknet und von der Firma BioGenes GmbH (Berlin) für die Immunisierung eines Kaninchens aufgearbeitet.

Alle 3 erhaltenen Antisera wurden mittels Western-Blots auf ihre Spezifität überprüft und mit der Immunantwort der Präimmunsere verglichen (Daten nicht gezeigt).

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden:

- **Anti-UGPase-Antikörper** (J.P. Sychalla, Washington State University, Pullman, USA)
- **Anti-SuSy-Antikörper** (K. Koch, University of Florida, FL, USA)
- **Anti-UDPase-Antikörper** (Gao et al., 1999)

Als Zweit-Antikörper wurde in allen Fällen **Ziege-Anti-Kaninchen IgG (H+L), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase** (BioRad), verwendet.

### 2.1.6 Bakterienstämme

- ***E.coli* XL1-Blue MRF<sup>a,b</sup>** (Stratagene):  $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}(F' \text{proAB lacI}^{\text{qZ}} \Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}))^{\text{c}}$

- ***E. coli* XL10-Gold** (Stratagene): Tet<sup>r</sup>Δ (mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte[F' proABlacI<sup>q</sup>ZΔM15Tn10(Tet<sup>r</sup>)AmyCam<sup>r</sup>]<sup>a</sup>
- ***E. coli* M15(pREP4)** (QIAGEN): Nal<sup>s</sup> Str<sup>s</sup> rif<sup>s</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup>. Dieser Stamm trägt viele Kopien des pREP4-Plasmids, das ein lacI-Gen (codiert den lac-Repressor) und ein Kanamycin-Resistenz-Gen trägt.
- ***E. coli* JM-109(DE3)** (Promega): endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>Z ΔM15]λ(DE3)
- ***Agrobacterium tumefaciens*** (Deblaere et al., 1985): C58C1 / GV2260

### 2.1.7 Zellkultur

Die verwendeten heterotrophen Zellen stammten aus einer Suspensionskultur von *Nicotiana tabacum* cv. Maryland. Der Stamm wurde aus Tabakmark gewonnen und befindet sich seitdem in Flüssigkultur (Schlitzberger, 1981; Beiderbeck und Knoop, 1984).

### 2.1.8 Pflanzen

- ***Solanum tuberosum* L. cv. Desiree (Kartoffel)**
- ***Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (Tabak)**
- **RNUDP-Pflanzen:** *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, transformiert mit dem Konstrukt Hefe-UDPase in Sinnorientierung in pBinAR (siehe Abb. 2.1). Hefe-UDPase-DNA wurde ausgehend von genomischer Hefe-DNA (Remus, 1999, freundlicherweise zur Verfügung gestellt) mittels der Oligonukleotide YUV und YUH volle Länge über PCR mit Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert und unter Verwendung des PCR-Script Amp Cloning Kits (Stratagene) in pPCR-Script Amp SK (+) (Stratagene) ligiert, womit *E. coli* XL10-Gold transformiert wurde. Nach Auswahl eines positiven Klons wurde die DNA volle Länge über Not I und Bam HI in den Sma I und Bam HI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1992) ligiert. Nach Transformation von *A. tumefaciens* mit dem Konstrukt wurde *N. tabacum* mit dem Gen für Hefe-UDPase transformiert und RNUDP-Pflanzen regeneriert.

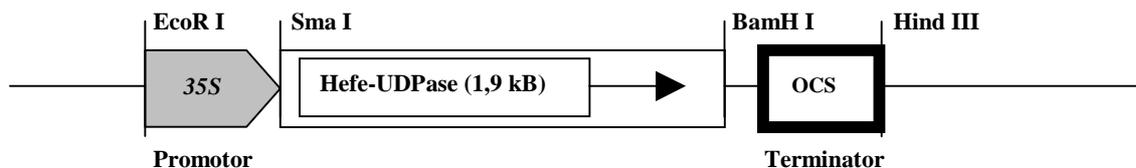


Abb. 2.1 Hefe-UDPase in pBinAR

- **RUGPase-Pflanzen:** (Zrenner et al., 1993) *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree, transformiert mit dem Konstrukt Gegensinn-UGPase in pBin19 (Bevan, 1984), unter Kontrolle des 35S Promotors aus *CaMV* (Franck et al., 1980). In den regenerierten UGPase-Gegensinn-Pflanzen sind mRNA-Menge, Proteinmenge und Enzymaktivität der UGPase im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert, wobei vor allem wachsende Knollen analysiert wurden (Zrenner et al., 1993). Hierbei nimmt der Grad der Inhibierung von Pflanzenlinie U10 über die Linien U21 und U45 zur Linie Uwt ab. Letztere stellt eine Transformante mit Wildtyp-ähnlichen Eigenschaften dar. Sämtliches RUGPase-Pflanzenmaterial wurde freundlicherweise von Dr. Rita Zrenner (MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Deutschland) zur Verfügung gestellt.
- **RSuSy-Pflanzen:** (Zrenner et al., 1995) *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree, transformiert mit dem Konstrukt Gegensinn-SuSy in pBin19 (Bevan, 1984), unter Kontrolle des 35S Promotors aus *CaMV* (Franck et al., 1980). In Knollen von regenerierten SuSy-Gegensinn-Pflanzen sind mRNA-Menge und Enzymaktivität der SuSy im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Zrenner et al., 1995). Hierbei nimmt der Grad der Inhibierung von Pflanzenlinie S112 über die Linien S129 und S108 zur Linie S114 ab. Sämtliches RSuSy-Pflanzenmaterial wurde freundlicherweise von Dr. Rita Zrenner (MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.9 Computerprogramme zur Erstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde mit Microsoft<sup>®</sup> Word 97 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) erstellt. Die Auswertung von Meßdaten erfolgte mit Microsoft<sup>®</sup> Excel 97 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Die Wahrscheinlichkeit nach T-Test (=WTT), daß zwei Datengruppen unterschiedlich sind (ist in % angegeben), wurde ebenfalls unter Verwendung von Microsoft<sup>®</sup> Excel 97 ermittelt. Sämtliche Schaubilder dieser Arbeit wurden mit SigmaPlot 5.0 (SPSS Inc., Richmond, CA, USA) angefertigt. Die Bearbeitung von Fotos erfolgte mit Micrografx<sup>®</sup> Picture Publisher 7a (Micrografx Inc., Richardson, TX, USA).

## 2.2 Methoden

Zum Ansetzen sämtlicher Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet. DNA, RNA und Proteine wurden stets in sterilem Wasser aufgenommen und solches auch für sämtliche molekularbiologischen Reaktionen benutzt. Hilfsmittel wie Pipettenspitzen und Mikroreaktionsgefäße wurden vor der Benutzung autoklaviert. Soweit nicht anders angegeben wurde nach Sambrook et al., 1989 vorgegangen.

### 2.2.1 Methoden zum Arbeiten mit Pflanzen

#### 2.2.1.1 Medien

Es wurden folgende Medien zur Pflanzenanzucht verwendet:

- Standard-Pflanzen-Nährlösung (4mM KNO<sub>3</sub>; 4mM Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 2mM MgSO<sub>4</sub>; 1mM NaCl; 3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,8, mit KOH eingestellt; 8mg/l NaFe-EDTA; 0,32g/l CaSO<sub>4</sub>; 0,4‰ (v/v) Mikroelement-Lösung)
- Hydroponik-Nährlösung (4mM KNO<sub>3</sub>; 2mM MgSO<sub>4</sub>; verschiedene Konzentrationen KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,8, mit KOH eingestellt; 8mg/l NaFe-EDTA; 0,68g/l CaSO<sub>4</sub>; 0,4‰ (v/v) Mikroelement-Lösung)
- Mikroelement-Lösung (25mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2mM MnSO<sub>4</sub>; 2mM ZnSO<sub>4</sub>; 1mM CuSO<sub>4</sub>; 1mM NaMoO<sub>4</sub>; 1mM NiCl<sub>2</sub>; 1mM CoCl<sub>2</sub>)
- Spezial-Flüssig-Medium (10mM KNO<sub>3</sub>; 0,1mM NH<sub>4</sub>Cl; 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1mM MgSO<sub>4</sub>; 5mM CaCl<sub>2</sub>; 50µM KCl; 25µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2µM MnSO<sub>4</sub>; 2µM ZnSO<sub>4</sub>; 1µM CuSO<sub>4</sub>; 1µM NaMoO<sub>4</sub>; 24,5µM NaFe-EDTA; 1µM NiCl<sub>2</sub>; 1µM CoCl<sub>2</sub>; 3mM MES; pH 5,8, mit KOH eingestellt; vor Gebrauch autoklaviert)
- Spezial-Fest-Medium (Spezial-Flüssig-Medium mit 0,5% (g/v) Saccharose und 0,2% (g/v) Gelrite)
- Standard-Fest-Medium (1x Murashige-Skoog-Medium inkl. Vitamine (MS); 2% (g/v) Saccharose; 0,7% (g/v) Agar; pH 5,8, mit KOH eingestellt)

Festmedium wurde direkt nach dem Autoklavieren gegossen. Falls Antibiotika (1:500) und Phytohormone (1:1000) zugegeben werden sollten, wurden sie erst hinzugefügt, wenn die Temperatur des Mediums unter 60°C war.

- Kanamycin (Stammlösung: 5% (g/v) in Wasser)
- Claforan (Stammlösung: 25% (g/v) in Wasser)
- 6-Benzylaminopurin (Stammlösung: 0,1% (g/v) in Ethanol)
- 1-Naphtyllessigsäure (Stammlösung: 0,02% (g/v) in Ethanol)

### 2.2.1.2 Anzuchtbedingungen auf Erde und Sand

Pflanzen wurden im Gewächshaus oder einer Klimakammer angezogen. Tab. 2.2 zeigt die Anzuchtbedingungen.

Bedingung	Gewächshaus1	Gewächshaus2	Gewächshaus3	Klimakammer
Temperatur	Tag 24°C Nacht 20°C	Tag 18°C Nacht 15°C	Tag 23°C Nacht 20°C	20°C
Luftfeuchte	50%	30%	50%	60%
Belichtung	15h	12h	14h	12h
Lichtintensität	100-150 $\mu$ Einstein	100-150 $\mu$ Einstein	100-150 $\mu$ Einstein	350 $\mu$ Einstein

Tab. 2.2 Anzuchtbedingungen in Gewächshaus und Klimakammer

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus mit einer Zusatzbeleuchtung homogen beleuchtet, um Außenlichtschwankungen auszugleichen. Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Sand (Dorsolit-Quarzsand, Größe 0,6-1,2mm, gemischt mit Größe 0,3-0,8mm) in 175ml-Töpfen oder auf Erde (3 Teile Torfkultursubstrat, 1 Teil Fruhstorfer Erde Typ T, 0,75 Teile Rheinsand) in 1,5l-Töpfen (Tabak) bzw. 2,5l-Töpfen (Kartoffel). Pflanzen auf Sand erhielten täglich Standard-Pflanzen-Nährlösung, Pflanzen auf Erde wurden durch ein automatisches Bewässerungssystem mit Wasser gegossen (alle 16h, nicht zwischen 18.00 und 7.00 Uhr).

### 2.2.1.3 Anzuchtbedingungen in Gewebekultur

Pflanzen in Gewebekultur wurden üblicherweise in Pflanzenanzuchtschränken kultiviert. Tab. 2.3 zeigt die Bedingungen. Medium und Anzuchtbehälter waren stets steril.

Bedingung	Anzuchtschrank1	Anzuchtschrank2
Temperatur	25°C	20°C
Belichtung	14h	12h
Lichtintensität	150 $\mu$ Einstein	100 $\mu$ Einstein

Tab. 2.3 Anzuchtbedingungen in den Anzuchtschränken

Als Festmedium wurde, soweit nicht anders angegeben, das Standard-Fest-Medium (1xMS; 2% (g/v) Saccharose; 0,7% (g/v) Agar; pH 5,8, mit KOH eingestellt) verwendet. Die Pflanzen wurden in Anzuchtdosen (Magenta GA7-Vessel bzw. Phytatrays II large, beide Sigma, Deutschland) bzw. in Anzuchtplatten (Falcon Petri Dish 100x15mm, Becta Dickson Laboratories, USA/Frankreich) kultiviert.

### 2.2.1.4 Anzuchtbedingungen für das Osmotek-Floß-System

Bei Benutzung des Life Raft<sup>®</sup> Floß-Systems (Osmotek Ltd., Rehovot, Israel) wurden oberflächensterilisierte Samen auf einem Floß angezogen, das auf sterilem Spezial-Flüssig-Medium schwamm. Die in den Anzuchtdosen ohne Medium autoklavierten Flöße besaßen saugfähige Membranen (25 $\mu$ M Maschendurchmesser), die nach Gebrauch mit einer Regenerationslösung (4,5% (v/v) Osmowet S) regeneriert werden mußten.

### 2.2.1.5 Hydroponische Anzucht

#### (1) Vorbereitung

Es wurden blaue Pipettenspitzen mit abgeschnittener Spitze mit Standard-Fest-Medium (ohne Saccharose) gefüllt und in einer Dose für blaue Pipettenspitzen auf Wasser gehalten. Pro Pipettenspitze wurde ein Same angezogen und abgedeckt im Gewächshaus<sup>3</sup> kultiviert, bis die gekeimten Pflanzen über mehrere Blätter und eine 1-2cm lange Wurzel verfügten. Ausgewählte Pflanzen wurden vorsichtig von anhängendem Festmedium gereinigt und in die hydroponische Anlage umgesetzt.

#### (2) Aufbau und Betreibung der hydroponischen Anlage

Standort der Anlage war ebenfalls Gewächshaus<sup>3</sup>. Je 8 Pflanzen wurden mit Schaumstoff in einem Plastikträger mit 8 Öffnungen befestigt. Dieser Träger saß einem 2,5l-Pflanzenanzucht-Topf entsprechenden Durchmessers auf, so daß die Wurzeln der Pflanzen in die Hydroponik-Nährlösung hinein reichten. Über eine neunte Öffnung im Träger wurde über einen Schlauch, der in einer blauen Pipettenspitze endete, Luft zugeführt, um anaerobe Bedingungen zu vermeiden. Um Austrocknung der Pflanzen zu verhindern, wurde der komplette Träger in den ersten 2 Tagen mit Frischhaltefolie überzogen. Nach ungefähr 1 Woche wurden 4 Pflanzen verworfen, um 4 möglichst identische Pflanzen pro Topf überzubehalten. Die Hydroponik-Nährlösung wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Abb. 2.2 verdeutlicht den Versuchsaufbau.



Abb. 2.2 Aufbau der hydroponischen Anlage

Im Hintergrund links sind die blauen Pipettendosen zu sehen, in denen die Pflanzen angezogen wurden.

#### 2.2.1.6 Oberflächensterilisation von Tabaksamen

Tabaksamen wurden sukzessive für 3min in 70% (v/v) Ethanol und für 10min in 0,2% (g/v) Natriumhypochlorit mit 0,1% (v/v) Tween 20 geschüttelt. Nach Sedimentation der Samen wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Samen 3x mit sterilem bidestilliertem Wasser gewaschen.

#### 2.2.1.7 Anzucht von Tabaksamen in Gewebekultur

Getrocknete Tabaksamen wurden 1 Woche bei 10°C inkubiert, danach oberflächensterilisiert und auf Fest-Medium ausgebracht.

#### 2.2.1.8 Arbeiten mit Zellkulturen

##### (1) Kultivierung

Heterotrophe Tabakzellen wurden in Dunkelheit und bei 25°C in 250ml-Meßkolben mit 50ml Zellkultur-Medium geschüttelt (100 Umdrehungen pro Minute). Nach einer Woche wurden 10ml der Zellkultur in einen neuen sterilen 250ml-Meßkolben mit 40ml sterilem Zellkultur-Medium überführt und weiter kultiviert.

- Zellkultur-Medium (1x Murashige-Skoog-Medium inkl. Vitamine (MS); 2% (g/v) Saccharose; 1mg/l 1-Naphtyllessigsäure; 0,03mg/l Kinetin; pH 5,8, mit KOH eingestellt)

##### (2) Inkubationsversuche

Mehrere ungefähr eine Woche alte Zellkulturen wurden in einem großen sterilen Becherglas vereinigt. Davon wurden 10ml mit 40ml jeweiligem Inkubationsmedium in identische, sterile 250ml-Meßkolben gegeben. Die Ansätze wurden in Dunkelheit und bei 25°C geschüttelt (100 Umdrehungen pro Minute). Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mittels Wasserstrahlpumpe über einen Rundfilter (Ø 90mm, Nr. 300109, Schleicher & Schüll) filtriert, kurz mit bidestilliertem Wasser gewaschen und samt Filter in flüssigem Stickstoff eingefroren. Lagerung des Materials erfolgte bei -80°C.

#### 2.2.1.9 Inkubation von Kartoffelscheiben

Wachsende Kartoffelknollen wurden geerntet und mit Wasser gewaschen. Mittels eines Korkbohrers (9mm Durchmesser) und eines Gemüsehobels wurden möglichst identische Scheiben hergestellt und mehrmals mit 10mM MES pH 6,5 gewaschen. Die Scheiben wurden auf Meßkolben mit 20ml des jeweiligen Inkubationsmediums verteilt und unter starkem

Schütteln (um aerobe Bedingungen zu erhalten) bei Raumtemperatur inkubiert. Zu gegebenen Zeiten wurden mindestens 4 Scheiben pro Ansatz entnommen, abgespült, mit Küchenrolle abgetupft und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen inkubierte Kartoffelscheiben wurden freundlicherweise von Karin Bologna zur Verfügung gestellt (Bologna, 2001; Geigenberger et al., 2000).

#### 2.2.1.10 Entnahme und Mörsern von Geweben

Aufgrund des schnellen Umsatzes vieler Zellinhaltsstoffe mußte das von der Pflanze geerntete Gewebe schnell durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff inaktiviert werden. Die Ernte erfolgte unter ambienten Bedingungen. Wurzeln und Knollen wurden durch kurzes Abwaschen mit Wasser von Erde oder anhaftendem Medium gereinigt. Gewebe aus Kartoffelknollen wurde in Scheibenform entnommen (siehe Abschnitt 2.2.1.9). In einigen Fällen erfolgte die Probenentnahme bei source-Blättern in der Weise, daß mit einem Korkbohrer (9-12mm Durchmesser) Blattscheiben ausgestanzt wurden, um nur das Gewebe zwischen den großen Leitbündeln zu erhalten. Alle Gewebe wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zum Mörsern der Gewebe wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlte Mörser und Pistille verwendet. Das Material wurde ohne Auftauen pulverisiert und in mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mikroreaktionsgefäßen abgewogen, die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

#### 2.2.1.11 Ermittlung von Phänotyp-Daten

##### (1) Frisch- und Trockengewicht

Durch Wiegen der Gewebe unmittelbar nach der Entnahme von der Pflanze wurde das Frischgewicht erhalten. Wurzeln wurden nach dem Waschen kurz mit Küchenrolle abgetupft. Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde das Material entweder 1 Woche bei  $80^{\circ}\text{C}$  gehalten oder gefriergetrocknet.

##### (2) Blattfläche

Um die Gesamtblattfläche einer Pflanze zu erhalten, wurden alle Blätter 1:1 fotokopiert und die Kopien genau ausgeschnitten. Aus dem gleichen Papier wurde ebenfalls ein Quadrat mit 5cm Kantenlänge (Fläche =  $25\text{cm}^2$ ) ausgeschnitten. Durch Gewichtsvergleich konnte die Gesamtblattfläche der Pflanze ermittelt werden.

### 2.2.1.12 Tabaktransformation

(Rosahl et al., 1987)

#### (1) Transformation und Regeneration

Eine *Agrobacterium tumefaciens* Übernachtskultur in YEB-Selektionsmedium (mit Rifampicin, Kanamycin, Ampicillin) wurde abzentrifugiert (3min bei 3000xg) und das Pellet in YEB-Medium ohne Antibiotika aufgenommen. In der Zwischenzeit wurden Tabakblättchen einer ca. 4 Wochen alten Pflanze in Sterilkultur in ca. 2cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Die Blattstücke wurden 30sek in der Bakteriensuspension geschwenkt und anschließend auf Platten mit Standard-Fest-Medium gelegt, um 2 Tage im Dunkeln und bei 25°C inkubiert zu werden.

Danach wurden die Blattstücke auf Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und im Anzuchtschrank<sup>1</sup> inkubiert. Alle 7 Tage wurden die Stücke auf neue Platten überführt.

Nach 3 Wochen waren deutlich sichtbare Kalli gewachsen, woraus spontane Sproßbildung erfolgte. Zur besseren Sproßbildung wurden die Blattstücke in Dosen mit Kallusinduktionsmedium überführt.

Die Sprosse wurden abgeschnitten und in Dosen mit Standard-Fest-Medium mit Claforan und (nur beim ersten Umsetzen) Kanamycin überführt. Die Bewurzelung erfolgte spontan.

- Kallusinduktionsmedium (1x MS-Medium inkl. Vitamine; 1,6% (g/v) Glucose; 0,7% (g/v) Agar; nach Autoklavieren die Antibiotika Claforan und Kanamycin (je 1:500) sowie die Phytohormone 6-Benzylaminopurin und 1-Naphtyllessigsäure (je 1:1000) zufügen)

#### (2) Ausbringung der Pflanzen aus Gewebekultur auf Sand

Die Pflanzen wurden in Gewebekultur bis zu einer Größe von etwa 2-3cm kultiviert. Nach vorsichtigem Reinigen der Wurzeln von anhängendem Festmedium wurden die Pflanzen auf Sand ausgebracht und schrittweise an die niedrigere Luftfeuchtigkeit gewöhnt.

## 2.2.2 Methoden zum Arbeiten mit Bakterien

### 2.2.2.1 Medien

- LB (1% (g/v) Bacto Trypton; 0,5% (g/v) Hefe-Extrakt; 1% (g/v) NaCl; 1,5% (g/v) Agar (für Festmedium); pH 7,0)
- Psi (2% (g/v) Bacto Trypton; 0,5% (g/v) Hefe-Extrakt; 0,08% (g/v) KCl; 0,4% (g/v) MgSO<sub>4</sub>; pH 7,6)
- YEB (0,5% (g/v) Pepton; 0,5% (g/v) Rinderextrakt; 0,1% (g/v) Hefe-Extrakt; 0,5% (g/v) Saccharose; 2mM MgSO<sub>4</sub>; 1,5% (g/v) Agar (für Festmedium))

Alle Medien wurden autoklaviert. Festmedium wurde direkt nach dem Autoklavieren gegossen. Entsprechende Antibiotika wurden 1:1000 hinzugefügt, wenn die Temperatur des Mediums unter 60°C war. Von IPTG und X-Gal (nötig für Blau-Weiß-Selektion) wurden nach Bedarf je 20µl auf einer Kulturplatte ausgestrichen.

- Tetracyclin (Stammlösung: 1,25% (g/v) in 50% (v/v) Ethanol)
- Ampicillin (Stammlösung: 10% (g/v) in 50% (v/v) Ethanol)
- Kanamycin (Stammlösung: 5% (g/v) in Wasser)
- Rifampicin (Stammlösung: 10% (g/v) in Dimethylsulfoxid)
- IPTG (Stammlösung: 0,1M in Wasser)
- X-Gal (Stammlösung: 25% (g/v) in Dimethylformamid)

### 2.2.2.2 Übernachtkulturen von Bakterien

Für eine Bakterien-Übernachtkultur wurde eine Einzelkolonie von einer Selektionsplatte entnommen und in Selektionsmedium bei den für die jeweiligen Bakterien idealen Wachstumsbedingungen über Nacht im Wasserbad geschüttelt.

### 2.2.2.3 Transformation von *Escherichia coli*

(1) Herstellung kompetenter Zellen

Es wurden 100ml Psi-Selektions-Medium 1:100 mit einer Übernachtkultur der kompetent zu machenden Zellen versetzt. Die Kultur wurde bei 37°C geschüttelt bis die Optische Dichte bei 546nm 0,4-0,5 betrug. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, in sterile Glasröhrchen überführt und 5min bei 4°C und 1300xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30ml TFB1 resuspendiert, 10min auf Eis inkubiert und 5min bei 4°C und 1300xg zentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in 4ml TFB2 wurden die Zellen in 200µl-Aliquots verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- TFB1 (30mM Kaliumacetat; 50mM MnCl<sub>2</sub>; 100mM RbCl; 10mM CaCl<sub>2</sub>; 15% (v/v) Glycerin; steril filtern)
- TFB2 (10mM MOPS, pH 7,0; 10mM RbCl; 75mM CaCl<sub>2</sub>; 15% (v/v) Glycerin; steril filtern)

#### (2) Transformation kompetenter Zellen

Pro Ansatz wurde ein Aliquot (=200µl) kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Die gerade aufgetauten Zellen wurden mit der DNA versetzt. Bei der Transformation mit Ligationsansätzen wurde üblicherweise die Hälfte des Ansatzes verwendet. Die Zellen wurden 15min auf Eis inkubiert, exakt 100sek einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und für 3min auf Eis abgekühlt. Danach folgte eine Erholungsphase, bei der 800µl LB ohne Antibiotika zugegeben wurden und der Ansatz im Mikroreaktionsgefäß 45min bei 37°C rotiert wurde. Die Ausplattierung erfolgte auf zwei LB-Selektionsplatten: Auf einer Platte wurden 100µl des Ansatzes direkt ausplattiert. Der Rest des Ansatzes wurde 10sek bei 16000xg zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100µl verworfen, worin das Bakterienpellet resuspendiert wurde. Diese 100µl wurden auf der zweiten Selektionsplatte ausplattiert und beide Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Verwenden zweier verschiedener ausplattierter Zellkonzentrationen stellte sicher, daß Einzelkolonien erhalten wurden.

#### 2.2.2.4 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

(Höfgen und Willmitzer, 1988)

##### (1) Herstellung kompetenter Zellen

Es wurden 200ml YEB-Selektions-Medium (mit Rifampicin, Kanamycin, Ampicillin) 1:8 mit einer Übernachtskultur der kompetent zu machenden Zellen versetzt. Die Kultur wurde bei 25°C geschüttelt bis die Optische Dichte bei 600nm 0,7 betrug, die Zellen befanden sich dann in der logarithmischen Phase. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und 20min bei 3000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml kaltem TE-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 20min bei 3000xg und 4°C). Nach Aufnahme des Bakterienpellets in 10ml YEB-Medium ohne Antibiotika wurden die Zellen in 500µl-Aliquots verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- TE-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 7,5; 1mM EDTA)

## (2) Transformation kompetenter Zellen

Pro Ansatz wurde ein Aliquot (=500µl) kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Die gerade aufgetauten Zellen wurden mit 0,5-1µg DNA versetzt. Die Zellen wurden nacheinander für je 5min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1ml YEB-Medium wurden die Zellen für 2-4h bei 25-28°C geschüttelt. Die Ausplattierung erfolgte auf zwei YEB-Selektionsplatten: Auf einer Platte wurden 200µl des Ansatzes direkt ausplattiert. Der Rest des Ansatzes wurde 10sek bei 16000xg zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 200µl verworfen, worin das Bakterienpellet resuspendiert wurde. Diese 200µl wurden auf der zweiten Selektionsplatte ausplattiert und beide Platten 2 Tage bei 25°C und Dunkelheit inkubiert. Das Verwenden zweier verschiedener ausplattierter Zellkonzentrationen stellte sicher, daß Einzelkolonien erhalten wurden.

## 2.2.3 Methoden zur Analyse und Bearbeitung von DNA

### 2.2.3.1 DNA-Elektrophorese in TAE-Agarosegelen

Es wurden 1%ige (g/v) Agarosegele verwendet, die Fragmente zwischen 0,3 und 6kB gut auftrennen. Die Agarose wurde in 1x TAE in der Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlung auf ca. 60°C mit etwas Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration =  $5 \cdot 10^{-6}$ % (g/v)) versetzt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Das Gel wurde zwischen 100-120 V entwickelt. Die Trennung wurde am UV-Transilluminator überprüft. Zur Größen- und Konzentrationsabschätzung wurden stets 5µl des Molekulargewichtsstandards (Smartladder, Eurogentech) mit aufgetragen (1 Bande entspricht 20-100ng).

- 1x TAE-Elektrophoresepuffer (40mM Tris-Acetat; 1mM EDTA pH 8,0)
- 0,1% (g/v) Ethidiumbromid-Lösung
- Probenauftragspuffer für Agarosegele (30% (v/v) Glycerin; 0,25% (g/v) Bromphenolblau; 0,25% (g/v) Xylencyanol FF; 10mM EDTA; Puffer 1:20 mit aufzutragender Probe verdünnen)

### 2.2.3.2 Restriktion von DNA

Die Restriktionen wurden in 20µl Reaktionsvolumen (1x Reaktionspuffer, <2µg DNA, 3 Units Restriktionsendonuklease / µg DNA) bei den für die jeweiligen Enzyme optimalen Reaktionstemperaturen (in der Regel 37°C) für 1-2 Stunden durchgeführt.

Für die Restriktion genomischer DNA wurden 5-10µg DNA in 50-100µl Reaktionsvolumen 16h inkubiert.

#### 2.2.3.3 Polymerase Chain Reaction (= PCR)

In 1x Reaktionspuffer mit 2,5mM Magnesiumchlorid wurden <1ng DNA-Template, je 1µM der jeweils verwendeten Oligonukleotide, 0,25mM jedes Nukleotids (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 1 Unit Taq-DNA-Polymerase bzw Pfu-DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50µl gemischt. Zur Vermeidung von Verdunstung während der einzelnen Zyklen wurde jeder Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Allgemein bestand eine PCR aus 30-40 Zyklen von drei Schritten: Erstens einer Denaturierung für 1min bei 95°C, zweitens der Anlagerung der Oligonukleotide für 45 sek, wobei hier die Temperatur von den verwendeten Oligonukleotiden abhängig war und drittens der Extension bei 72°C. Die Extensionszeit hing von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Stücks ab: Generell wurde bei Verwendung der Taq-DNA-Polymerase pro 800 bp DNA 1min Zeit gegeben, während im Fall der Pfu-DNA-Polymerase aufgrund ihrer Korrekturleseeseigenschaft die doppelte Zeit erforderlich war. Nach dem letzten Zyklus erfolgte abschließend eine Extension bei 72°C für 5min.

#### 2.2.3.4 Reinigung von PCR-Produkten

Optional konnte eine Reinigung der amplifizierten DNA-Fragmente durchgeführt werden. Hierzu wurde der QIAquick PCR Purification Kit verwendet und gemäß Protokoll vorgegangen: Der PCR-Reaktionsmix wurde, versetzt mit der fünffachen Menge QIAGEN-Puffer PB, auf eine sich in einem Mikroreaktionsgefäß befindende QIAquick-Säule gegeben und zentrifugiert (60sek, 16000xg). Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule anschließend mit 750µl QIAGEN-Puffer PE gewaschen (Zentrifugation, 60sek bei 16000xg). Durch erneute Zentrifugation (60sek, 16000xg) wurde der Waschpuffer restlos entfernt. Die Elution erfolgte in ein neues Mikroreaktionsgefäß durch Zugabe von 30µl QIAGEN-Puffer EB auf die Säule, Inkubation für 1min bei Raumtemperatur und Zentrifugation (60sek bei 16000xg).

#### 2.2.3.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die zu reinigende DNA wurde auf mehrere Geltaschen auf einem 1x-TAE-Agarosegel verteilt. Nach Entwicklung des Gels wurde die gesuchte Bande unter dem UV-Transilluminator mit einer sauberen Rasierklinge ausgeschnitten. Zur Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel-Stück wurde der QIAquick Gel Extraction Kit verwendet und gemäß Protokoll vorgegangen: Je 100mg Gelstück wurden in einem Mikroreaktionsgefäß mit 300µl QIAGEN-Puffer QG versetzt und der Ansatz bei 56°C mindestens 10min inkubiert bis das

Gelstück vollständig gelöst war. Wenn sich der Ansatz von gelb nach orange oder violett verfärbt haben sollte, wurde mit 3M Natriumacetat (pH 5,0) neutralisiert. Anschließend wurden je 100mg Gelstück 100µl Isopropanol zugegeben und der Ansatz auf eine QIAquick – Säule überführt. Danach wurde wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben fortgefahren.

#### 2.2.3.6 Fällung von DNA in wässriger Lösung

Die DNA-Lösung wurde mit sterilem Wasser auf 100µl aufgefüllt (= 1 Volumen) und mit der gleichen Menge CIP-Lösung versetzt. Nach der Zentrifugation (5min, 16000xg) wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 1/10 Volumen 8M Lithiumchlorid sowie 2,5 Volumen 100% (v/v) Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte für 30min bei -20°C. Danach wurde der Ansatz 10min bei 16000xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 Volumen 80% (v/v) Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10min bei 16000xg) und in der gewünschten Menge sterilem Wasser aufgenommen. Diese Methode ist auch geeignet, um Restriktionsendonukleasen oder andere Enzyme aus Versuchsansätzen zu entfernen.

- CIP-Lösung (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol: 24/24/1 (v/v/v))

#### 2.2.3.7 Dephosphorylierung von 5'-Phosphat von DNA

Die Dephosphorylierung erfolgte in 20µl Reaktionsvolumen (1x Dephosphorylierungspuffer, ca. 500ng DNA, 1 Unit Alkaline Phosphatase shrimp) für 15min bei 37°C. Anschließend wurde die Phosphatase 20min bei 70°C inaktiviert.

#### 2.2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Die Ligation erfolgte in 15µl Reaktionsvolumen (1 x Ligase-Puffer, 60-160ng des zu ligierenden DNA-Fragmentes, 15-40ng Vektor-DNA - stets 1/4 der eingesetzten Menge DNA-Fragment - und 1 Unit T4-Ligase) für 1h bei Raumtemperatur. Dann wurden noch einmal 0,5 Units T4-Ligase hinzugefügt und der Ansatz weitere 20min bei 37°C inkubiert.

#### 2.2.3.9 Plasmid-Präparation

##### (1) Plasmid-Minipräparation

Es wurden 3ml LB-Selektionsmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. 1,5ml der Übernachtskultur wurden in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und die Zellen durch Zentrifugation (30sek bei 16000xg) pelletiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 100µl Präparations-Lösung I resuspendiert. Die Lyse

der Zellen und Denaturierung chromosomaler DNA erfolgte durch Zugabe von 200µl Präparations-LösungII, das Ausfällen der chromosomalen DNA durch Mischen des Ansatzes mit 150µl Präparations-LösungIII. Zur Eliminierung der zellulären Proteine wurden 100µl CIP-Lösung hinzugefügt. Der kurz geschüttelte Ansatz wurde 5min bei 16000xg zentrifugiert und die wäßrige Phase in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Zur Ausfällung der Plasmid-DNA wurde 1ml 100% (v/v) Ethanol zugegeben und der gevortexte Ansatz 15min bei 16000xg zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet in 80% (v/v) Ethanol resuspendiert und 5min bei 16000xg zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde das Pellet zur Eliminierung zellulärer RNA in 25µl RNaseA-Lösung aufgenommen.

- Präparations-LösungI (50mM Glucose; 10mM EDTA; 25mM Tris-HCl pH 8,0)
- Präparations-LösungII (0,2N NaOH; 1% (g/v) SDS)
- Präparations-LösungIII (3M Kaliumacetat pH 4,8)
- CIP-Lösung (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol: 24/24/1 (v/v/v))
- 0,01% (g/v) RNaseA-Lösung (aus 1% (g/v) Stammlösung: Inkubation für 10min bei 95°C und langsames Abkühlen – dies eliminierte die DNasen, während die RNasen wieder renaturierten)

#### (2) Plasmid-Maxipräparation

Es wurden 100ml LB-Selektionsmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Durch Zentrifugation (5min bei 12000xg) wurden die Zellen pelletiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 10ml Präparations-LösungI gelöst und mit 20ml Präparations-LösungII und 15ml Präparations-LösungIII versetzt. Nach Zentrifugation (10min bei 12000xg) wurde der Überstand zur Entfernung des restlichen SDS mit Miracloth filtriert. Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol wurde die Plasmid-DNA für 30min bei Raumtemperatur ausgefällt. Nach der Zentrifugation für 20min bei 12000xg und 4°C wurde das Pellet in 3ml Wasser resuspendiert und mit 600µl 5M NaCl und 400µl 0,5M MOPS (pH 7,0) gemischt. Zur Reinigung der Plasmid-DNA wurde der Ansatz auf eine mit 10ml QBT-Puffer äquilibrierte QIAGEN-tips 100-Säule gegeben und der Durchfluß verworfen. Nach Waschen der Säule mit 2x 10ml QC-Puffer wurde die Plasmid-DNA mit 5ml QF-Puffer eluiert. Nach einem erneuten Fällschritt mit 0,7 Volumen Isopropanol (s.o.) wurde das Pellet in 200µl Wasser aufgenommen und mit 1/20 Volumen RNaseA-Lösung versetzt.

- QBT-Äquilibrierungspuffer (750mM NaCl; 50mM MOPS pH 7,0; 15% (v/v) Ethanol; 0,15% (v/v) TritonX-100)
- QC-Waschpuffer (1M NaCl; 50mM MOPS pH 7,0; 15% (v/v) Ethanol)
- QF-Elutionspuffer (1,25M NaCl; 50mM Tris-HCl pH 8,5; 15% (v/v) Ethanol)

### 2.2.3.10 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

(Bouchez und Camilleri, 1998)

Ungefähr 100mg gemörstertes und bei -80°C gelagertes Pflanzenmaterial wurden in 750µl Extraktionspuffer suspendiert und 20-120min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens Chloroform-Isoamylalkohol (24/1 (v/v)) wurde 10min bei Raumtemperatur und 5000xg zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt. Nach Zentrifugation (5min, 5000xg) wurde die pelletierte genomische DNA mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen (5min bei 5000xg zentrifugieren) und nach kurzem Trocknen in 50-100µl sterilem Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung wurde wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt.

- Extraktionspuffer, frisch anzusetzen aus:
  - 1 Volumen DNA-Puffer (0,35M Sorbitol; 0,1M Tris; 5mM EDTA, pH 8,25)
  - 1 Volumen Kernlysepuffer (0,2M Tris; 2M NaCl; 50mM EDTA; 2% (v/v) CTAB, pH 8,1)
  - 0,4 Volumen 5% (g/v) Laurylsarkosin
  - 0,38% (g/v) Natriumbisulfit

### 2.2.3.11 Southern-Analyse genomischer DNA

Die geschnittene DNA (siehe Abschnitt 2.2.3.2) wurde samt Molekulargewichtsstandard auf einem 1x-TAE-Agarosegel ohne Ethidiumbromid 16h bei 40V entwickelt. Danach wurde das Gel 15min in 0,2M HCl geschwenkt, was zu Strangbrüchen in der DNA führte. Nach 45min Schwenken in Alkalisierungslösung (0,5M NaOH; 1,5M NaCl) wurde das Gel 2x in Neutralisierungslösung (1M Tris, pH 7,4; 1,5M NaCl) je 30min inkubiert. Der Transfer mittels Kapillarblot und die Fixierung der DNA auf der Membran wurde gemäß den Abschnitten 2.2.4.4 und 2.2.4.5 durchgeführt. Von den getrockneten Membranen wurden die Stücke mit den Molekulargewichtsstandards abgeschnitten und diese 1-2min in einer Methylenblau-Lösung gefärbt. Die Membranstücke mit der genomischen DNA wurden wie in Abschnitt 2.2.4.6 beschrieben bei 42°C für mindestens 16h hybridisiert. Zum Entfernen unspezifischer Hintergrundsignale wurden die Membranen 3x je 15min mit Waschlösung1 (2x SSC; 0,1% (g/v) SDS) bei 50°C und 1x 15min mit Waschlösung2 (0,2x SSC; 0,1% (g/v) SDS) bei 55°C gewaschen. Den auf einem Röntgenfilm detektierten Signalen konnten mit Hilfe der gefärbten Membranstücke mit den Molekulargewichtsstandards die korrekten Größen zugeordnet werden.

Durch Inkubation der Membranen für 15min in Strip-Lösung bei 80°C wurden die markierten Sonden entfernt und die Filter konnten wieder verwendet werden.

- Methyleneblau-Lösung (0,5M Natriumacetat, pH 5,2; 0,04% (g/v) Methyleneblau)
- 20x SSC (3M NaCl; 300mM Na<sub>3</sub>Citrat; pH 7,0)
- Strip-Lösung (0,05x SSC; 10mM EDTA, pH 8,0; 0,1% (g/v) SDS)

## 2.2.4 Methoden zur Analyse und Bearbeitung von RNA

### 2.2.4.1 RNA-Präparation

(Logemann et al., 1987)

Etwa 300-500mg gemörsertes und bei -80°C gelagertes Pflanzenmaterial wurden mit 1ml RNA-Extraktionspuffer (= 1 Volumen) versetzt und die Suspension mit 0,5 Volumen CIP-Lösung gemischt, was zelluläre Proteine (z.B. RNasen) inaktivierte. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (5min, 16000xg) bei Raumtemperatur. Die obere wäßrige Phase (mit RNA, DNA, Polysacchariden) wurde abgenommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Das Fällern der RNA erfolgte durch Zugabe von 1/20 Volumen steriler 1M Essigsäure und 0,7 Volumen 100% (v/v) Ethanol. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 30min bei 4°C inkubiert. Das durch Zentrifugation (20min, 16000xg) erhaltene Pellet wurde in 1 Volumen sterilem 3M Natriumacetat pH 5,4 resuspendiert, um Polysaccharide zu entfernen. Der Ansatz wurde zentrifugiert (20min, 16000xg) und das Pellet in 1 Volumen 80% (v/v) Ethanol resuspendiert, um Salze aus der Lösung zu entfernen. Nach Zentrifugation (10min, 16000xg) wurde der Überstand restlos entfernt, das RNA-Pellet kurz angetrocknet und in kleinem Volumen (30 bis 200µl) DEPC-Wasser gelöst. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von RNA wurden die Ansätze auf 65°C erwärmt. Eventuell nicht lösliche Partikel (weitere Polysaccharide) wurden abzentrifugiert und verworfen. Die RNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Um Kontaminationen mit RNasen zu verhindern, mußten alle Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt werden.

- DEPC-Wasser (0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat, 16h bei Raumtemperatur unter dem Abzug stehen lassen. Reste von DEPC wurden durch zweimaliges Autoklavieren entfernt)
- RNA-Extraktionspuffer (20mM MES, pH 7,0; 20mM EDTA, pH 8,0; 6 M Guanidinhydrochlorid; 0,5% (v/v) β-Mercaptoethanol, erst vor Gebrauch zugeben)
- CIP-Lösung (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol: 24/24/1 (v/v/v))

#### 2.2.4.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach einer 1:200-Verdünnung mit Wasser (kein DEPC-Wasser) photometrisch bei 260nm. Als Referenz diente Wasser. Als empirische Richtwerte für Nukleinsäuren gelten:

1 Optische Dichte bei 260nm = 40µg/ml RNA bzw. ssDNA

1 Optische Dichte bei 260nm = 50µg/ml dsDNA

Die Reinheitsbestimmung erfolgte durch zusätzliche Messung der Optischen Dichte bei 280nm (Verunreinigung mit Proteinen) und Berechnung des Verhältnisses aus:

$$\text{Optische Dichte bei 260nm} / \text{Optische Dichte bei 280nm}$$

Für gute RNA-Präparationen werden hierbei Verhältnisse von 1,6 bis 2,0 erreicht.

#### 2.2.4.3 RNA-Gelelektrophorese

(Lehrach et al., 1977)

In 50-100µl Probenvolumen (1x MEN, 50% (v/v) Formamid, 3,7% (v/v) Formaldehyd) wurden 15-30µg RNA in DEPC-Wasser 10min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und danach 5sek anzentrifugiert. Zum Auftragen auf das Gel wurden noch 1/20 Volumen Probenauftragspuffer und 1µg Ethidiumbromid hinzugefügt.

Für die Herstellung des denaturierenden Formaldehyd-Agarosegels (1,5%iges (g/v) Agarosegel mit 1x MEN und 6% (v/v) Formaldehyd) wurde die Agarose in Wasser aufgeköcht (Mikrowelle). Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde die erforderliche Menge 10x MEN und 37% (v/v) Formaldehydlösung zugegeben, gut gemischt und das Gel luftblasenfrei gegossen.

Das Gel wurde bei 120 bis 140 V mit 1x MEN als Laufpuffer für 2-3h entwickelt, wobei der Laufpuffer so in die Gelkammer gefüllt war, daß er das Gel gerade nicht bedeckte, was die Diffusion von Formaldehyd aus dem Gel einschränkte. Die Auswertung erfolgte am UV-Transilluminator. In der Regel waren nur die rRNA und tRNA zu erkennen, die zusammen ca. 95% der zellulären RNA ausmachen.

- 10x MEN-Elektrophoresepuffer (200mM MOPS; 10mM EDTA; 50mM Natriumacetat; pH 7,0)
- 0,1% (g/v) Ethidiumbromid-Lösung
- Probenauftragspuffer für Agarosegele (30% (v/v) Glycerin; 0,25% (g/v) Bromphenolblau; 0,25% (g/v) Xylencyanol FF; 10mM EDTA; Puffer 1:20 mit aufzutragender Probe verdünnen)

#### 2.2.4.4 Northern Transfer mittels Kapillarblot

In eine Plastikwanne wurde ausreichend 10x SSC gefüllt, und ein Gelträger hineingestellt. Auf diesen Träger wurde luftblasenfrei eine mit 10x SSC getränkte Brücke aus Whatman 3MM-Papier gelegt, die genauso breit wie das Gel war. Das Gel, von dem überflüssige Teile abgeschnitten worden waren, wurde mit der Oberseite nach unten luftblasenfrei auf die Brücke gelegt. Darauf kamen nacheinander luftblasenfrei die mit bidestilliertem Wasser angefeuchtete Duralonmembran, drei Lagen trockenes Whatman 3MM-Papier und ein 3-5cm hoher Stapel Papierhandtücher (alles jeweils in der exakten Größe des Gels) und wurden mit einem Gewicht von ca. 500g beschwert. Das Gel wurde mit alten Röntgenfilmen umlegt, um etwaige Brückenbildung zwischen Blottingpuffer und den Papierhandtüchern zu verhindern. Der Transfer erfolgte für 6-18h.

- 20x SSC (3M NaCl; 300mM Na<sub>3</sub>Citrat; pH 7,0)

#### 2.2.4.5 Fixierung der RNA

Die irreversible Fixierung der RNA an die Duralonmembran erfolgte durch Exposition von UV-Strahlung (Autocross-link am Stratagene UV-Stratalinker 1800). Anschließend wurde der Filter in 5x SSC gebadet, um Gelreste zu entfernen.

#### 2.2.4.6 Hybridisierung mit [ $\alpha^{32}$ P]dCTP-markierten Sonden und Signaldetektion

Bei der Hybridisierung wechselwirken markierte Sonden mit der auf die Membran fixierte RNA. Es wurde eine radioaktive Methode der Markierung mit [ $\alpha^{32}$ P]dCTP benutzt.

##### (1) Herstellung markierter Sonden

Ungefähr 25ng über PCR amplifizierte Sonden-DNA wurden 10min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Auf Eis wurde der Markierungsansatz (25ng denaturierte DNA, 30 $\mu$ Ci [ $\alpha^{32}$ P]dCTP, 1x High Prime Reaktionsmix (enthält Klenow-Enzym, Oligonukleotide, dATP, dGTP, dTTP in Reaktionspuffer), Gesamtvolumen betrug 20 $\mu$ l) gemischt und mindestens 10min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit sterilem Wasser auf 50 $\mu$ l aufgefüllt. Durch Zugabe von KOH zu einer Endkonzentration von 600mM und Inkubation für 5min bei Raumtemperatur wurde die Sonden-DNA denaturiert.

### (2) Prähybridisierung

Die mit 5x SSC angefeuchtete Membran wurde in die Hybridisierungsröhre eingeführt (luftblasenfrei, RNA zeigte nach oben). Ungefähr 10ml Hybridisierungspuffer wurden hinzugefügt und die Membran mindestens 2 Stunden bei 42°C im Hybridiser prähybridisiert.

### (3) Hybridisierung und Detektion der Signale

Die denaturierte Sonde wurde in den Prähybridisierungspuffer gegeben (mindestens 2ng/ml). Die Hybridisierung erfolgte für mindestens 16h bei 50°C. Zum Entfernen unspezifischer Hintergrundsignale wurden die Membran 3x je 15min mit Waschlösung1 (2x SSC; 0,1% (g/v) SDS) bei 50°C, 55°C und 60°C sowie 1x 15min mit Waschlösung2 (0,2x SSC; 0,1% (g/v) SDS) bei 65°C gewaschen. Die Membran wurde in einen Plastikbeutel verschweißt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition erfolgte bei -80°C je nach Signalstärke für 1-30 Tage.

Durch Inkubation der Membran für 10min in bidestilliertem Wasser bei 95°C wurde die markierte Sonde entfernt und der Filter konnte wieder verwendet werden.

- Hybridisierungspuffer (5x Denhardts Reagenz; 5x SSC; 1% (g/v) SDS; 2,5mM EDTA; 50mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 0,01% (g/v) ssDNA (Heringsspermien); 50% (v/v) Formamid)
- 50x Denhardts Reagenz (1% (g/v) Pharmacia Ficoll Typ 400; 1% (g/v) Polyvinylpyrrolidon; 1% (g/v) BSA)
- 20x SSC (3M NaCl; 300mM Na<sub>3</sub>Citrat; pH 7,0)

## 2.2.4.7 Auswertung der Signale

### (1) Bestimmung von mRNA-Größen

Das RNA-Gel wurde zusammen mit einem Lineal unter dem UV-Transilluminator fotografiert. Ein Vergleich der Position des auf dem Röntgenfilm erhaltenen mRNA-Signals mit der Lage von rRNA und tRNA auf dem RNA-Gel-Foto ließ eine ungefähre Zuordnung der Größe der untersuchten mRNA zu.

### (2) Intensitätsanalyse von mRNA-Signalen

Es wurde im Herolab E.A.S.Y Enhanced Analysis System das Auswertungsprogramm „Spotanalyse“ benutzt. Mit diesem Programm werden die unterschiedlichen Intensitäten von Gelbanden, Spots usw. gemessen und zueinander in Beziehung gesetzt, was Rückschlüsse auf die jeweilige Substanzmenge zuläßt.

## 2.2.5 Methoden zur Analyse und Bearbeitung von Proteinen

### 2.2.5.1 Herstellung von Proteinextrakten

#### (1) Extraktion mit Protein-Probenauftragspuffer

Das gemörserte Probenmaterial wurde in 1x Protein-Probenauftragspuffer im Verhältnis 1:10 bis 1:20 aufgenommen. Bakterienpellets wurden in 250µl des Puffers gelöst. Die Proben wurden 10min bei 95°C denaturiert, kurz anzentrifugiert und die Überstände in neue Mikroreaktionsgefäße überführt.

- 1x Protein-Probenauftragspuffer (62,5mM Tris-HCl, pH 6,9; 2% (g/v) SDS; 10% (v/v) Glycerin; 0,02% (g/v) Bromphenolblau; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, erst vor Gebrauch zugeben)

#### (2) Extraktion mit PMSF-Extraktionspuffer

Etwa 20mg gemörsertes und bei -80°C gelagertes Pflanzenmaterial wurden im Verhältnis 1:8 in PMSF-Extraktionspuffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Nach Aufnahme aller Proben in Puffer wurden die Ansätze 10min bei 16000xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -20°C aufbewahrt.

- PMSF-Extraktionspuffer (10% (v/v) Glycerin; 50mM HEPES-KOH, pH 7,4; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 0,1% (v/v) TritonX-100; 5mM DTT, erst vor Gebrauch zugeben; 1mM PMSF, erst vor Gebrauch zugeben)

### 2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford, 1976 mit Hilfe des Biorad-Proteinnachweises durchgeführt. Das in der Probe enthaltene Protein bindet dabei an einen anionischen Farbstoff, wodurch ein blauer Farbkomplex entsteht.

10µl der mit PMSF-Extraktionspuffer hergestellten Probe wurden mit 1ml 20% (v/v) Bradford-Reagenz gemischt und 15min bei Raumtemperatur in Halbmikroküvetten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595nm gegen einen identisch behandelten Blindwert ohne Probe gemessen. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels einer Eichkurve (0-20µg/ml BSA).

### 2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Trennsystems aus Sammel- und Trenngel. Es wurden Gelsysteme von BioRad (München) und Atto (Tokyo, Japan) verwendet. Soweit nicht anders angegeben wurden 10% (v/v) – Polyacrylamid-Trenngele verwendet.

(1) Trenngel zur Auftrennung der Proteine (3/4 des Gesamtgels)

10% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Stammlösung: 30:0,8 (v/v))

375 mM Tris-HCl pH 8,8 (Stammlösung: 3 M)

0,1% (g/v) SDS (Stammlösung: 10% (g/v))

(2) Sammelgel zur Aufnahme der Proteinproben (1/4 des Gesamtgels)

4% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Stammlösung: 30:0,8 (v/v))

250 mM Tris-HCl pH 6,8 (Stammlösung: 1 M)

0,1% (g/v) SDS (Stammlösung: 10% (g/v))

Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin, Endkonzentration = 0,1% (v/v)) und APS (Ammoniumpersulfat, Endkonzentration = 0,075% (g/v)) gestartet. Um eine gerade obere Gelkante zu erhalten, wurde das frisch gegossene Trenngel mit Isopropanol überschichtet, das vor dem Gießen des Sammelgels zu entfernen war.

Die Proteinproben in 1x Protein-Probenauftragspuffer wurden zusammen mit 10µl Protein-Gewichtsstandard (Kaleidoscope Prestained Standard, BioRad bzw. SDS MB7B, Sigma) aufgetragen und das Gel mit 1x Tris/Glycin-Laufpuffer bei 200 V entwickelt.

- 1x Tris/Glycin-Laufpuffer (0,1215% (g/v) Tris; 0,72% (g/v) Glycin; 0,1% (g/v) SDS)

#### 2.2.5.4 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Zum Sichtbarmachen der Auftrennung wurde das Gel 5min in Coomassie Brilliant Blau geschwenkt und dann so lange mit Entfärber behandelt, bis die blauen Proteinbanden klar erkennbar waren.

- Coomassie Brilliant Blau (0,2% (g/v) Coomassie Brilliant Blau R-250; 0,05% (g/v) Coomassie Brilliant Blau G-250; 42,5% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure; 5% (v/v) Methanol)
- Entfärber (7% (v/v) Essigsäure; 10% (v/v) Ethanol)

#### 2.2.5.5 Abschätzung der Protein-Konzentration

Verschiedene Konzentrationen eines Proteinstandards (BSA, Stammlösung = 0,1% (g/v)) wurden mit verschiedenen Verdünnungen des zu testenden Proteins auf einem 10% (v/v) - SDS-Polyacrylamidgel verglichen.

#### 2.2.5.6 Western Transfer im „Semi-dry“-Verfahren

(Khyse-Anderson, 1984)

Sollte das Proteingel für die Detektion mit Antikörpern verwendet werden, mußten zunächst die der Größe nach aufgetrennten Proteinbanden auf eine geeignete Membran (Immobilon-Membran) übertragen werden. Dies geschah im sogenannten „Semi-dry“-Verfahren.

Nach Entfernen des Sammelgels wurde das Trenngel 15min in 1x Transferpuffer äquilibriert. Parallel wurden die Elektrodenplatten aus Graphit des Semi-Dry-Blotters (Pharmacia) gewässert und zwei in der exakten Größe des Gels zugeschnittene Blot-Absorptions-Filterpapiere mit 1x Transferpuffer benetzt. Die Immobilon-Membran, in der exakten Größe des Gels, wurde vor dem Benutzen 15sek in 100% (v/v) Methanol geschwenkt und dann in 1x Transferpuffer äquilibriert. Ein Trockenfallen der Membran war zu vermeiden.

Auf die Anodenplatte des Semi-Dry-Blotters wurden nacheinander luftblasenfrei ein Filterpapier, die Immobilon-Membran, das Gel, das zweite Filterpapier und die Kathodenplatte der Apparatur gelegt. Der Proteintransfer erfolgte für 60-90min bei 1,6-3mA pro cm<sup>2</sup> Gel und weniger als 20 V.

Um die Gleichmäßigkeit des Proteintransfers zu überprüfen, wurden die auf die Immobilon-Membran gebundenen Proteine mit Ponceau S (0,2% (g/v) in 3% (g/v) Trichloressigsäure) reversibel angefärbt. Überschüssiges Farbreagenz wurde mit Wasser abgespült.

- 1x Transferpuffer (39mM Glycin; 48mM Tris; 10% (v/v) Methanol, erst vor Gebrauch zugeben; pH 9,0)

### 2.2.5.7 Immunodetektion der Proteine

Für die Immunodetektion der Proteine wurde das Nitroblau-Tetrazolium-System verwendet. Hierbei entsteht durch die Spaltungsreaktion der Alkalischen-Phosphatase am Zweit-Antikörper ein blauer, derivatisierter Indigofarbstoff, der auf der Membran präzipitiert.

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Immobilon-Membran zu verhindern, wurde die Membran mit Protein abgesättigt. Hierzu wurde sie entweder 1h bei Raumtemperatur oder mindestens 16h bei 4°C in Blockierungs-Lösung (2% (g/v) Magermilchpulver in TBST) geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1h bei Raumtemperatur mit dem Erst-Antikörper (soweit nicht anders angegeben 1:1000 in 1% (g/v) Magermilchpulver in TBST). Danach wurde die Membran 1x 5min mit TBS, 1x 15min mit TBST und 1x 15min mit TBS gewaschen. Als Zweit-Antikörper wurde Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper aus Ziege (mit Alkalischer-Phosphatase gekoppelt) verwendet (1:2000 in 1% (g/v) Magermilchpulver in TBST) und die Membran 1h darin geschwenkt. Danach wurde die Membran 1x 5min mit TBS, 1x 15min mit TBST und 1x 15min mit TBS gewaschen. Zur Detektion der Signale wurde die Membran für 15-500sek in Detektionspuffer inkubiert. Die Reaktion wurde mit Wasser abgestoppt.

- TBS (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 500mM NaCl)
- TBST (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 500mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20)
- Detektionspuffer (0,033% (g/v) NBT (4-Nitroblau-Tetrazolium); 0,016% (g/v) BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) in: 100mM Tris-HCl, pH 9,5; 100mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>)
- NBT-Stammlösung (5% (g/v) in 70% (v/v) Dimethylformamid)
- BCIP-Stammlösung (2,5% (g/v) in 100% (v/v) Dimethylformamid)

Die unterschiedlichen Intensitäten der erhaltenen Signale auf der Membran wurden gemäß Abschnitt 2.2.4.7, Punkt (2) ausgewertet.

### 2.2.5.8 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen

#### (1) Überexpression

Mit der Übernachtskultur einer Bakterien-Einzelkolonie wurde LB-Selektionsmedium 1:50 angeimpft und bis zu einer Optische Dichte bei 600nm von 0,6-0,9 bei 37°C geschüttelt. Die Überexpression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von IPTG = 2mM) induziert. Im Falle einer präparativen Überexpression wurde die gesamte Kultur induziert. Falls eine Überprüfung geplant war, ob die Überexpression stattfindet, wurde die Kultur in zwei gleiche Aliquots aufgeteilt und die eine Hälfte als nicht induzierte Kontrolle wachsen

gelassen. Zum Zeitpunkt  $T_0 = 0$  Stunden und nach jeder weiteren Stunde wurden von jedem Ansatz je zwei 1,5ml-Proben entnommen, die Zellen durch 30sek Zentrifugation bei 16000xg und 4°C pelletiert und die Bakterien-Pellets sofort bei -20°C eingefroren. Die gesamte Kultur wurde nach 4-6h abzentrifugiert (15min bei 4000xg und 4°C) und bei -20°C aufbewahrt.

(2) Schnelle Aufreinigung zur Überprüfung der Überexpression

Die multiple Klonierungsstelle der pQE-Vektoren ist so gestaltet, daß kurz nach dem Startcodon der Translation sechs Codons folgen, die Histidin codieren. Dies kann zur Trennung des überexprimierten Proteins von den übrigen bakteriellen Proteinen benutzt werden, indem man die Interaktion zwischen Histidin und Nickelionen ausnutzt.

Die sofort eingefrorenen Pellets der Kulturen wurden in 200µl Puffer B resuspendiert, was zur Lyse der Zellen führte. 10min Zentrifugation bei 16000xg pelletierte die Zellreste. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt. Es wurden 50µl mit Puffer B äquilibrierte Nickel-NTA-Agarose-Suspension hinzugefügt und der Ansatz 30min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10sek bei 16000xg wurde der Überstand mit den übrigen zellulären Proteinen verworfen, während das Pellet in 1ml Puffer C resuspendiert wurde, um unspezifisch gebundene bakterielle Proteine zu entfernen. Der Ansatz wurde 10sek bei 16000xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde 2x wiederholt. Die Elution des Proteins erfolgte durch Resuspension des Pellets in 20µl PufferC/100mM EDTA und Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Das EDTA komplexiert die Nickelionen und eluiert so das Protein. Nach Zentrifugation (10sek bei 16000xg) enthielt der vorsichtig abgenommene Überstand das aufgereinigte überexprimierte Protein.

(3) Aufreinigung der präparativen Überexpression unter denaturierenden Bedingungen

Mit diesem Verfahren konnte das überexprimierte Protein in größerer Menge gewonnen werden. Denaturierende Bedingungen erlauben auch die Gewinnung von Proteinen, die von den Zellen in Einschlußkörpern gelagert wurden, was bei überexprimierten Proteinen vorkommen kann.

Die eingefrorenen Zellen wurden langsam aufgetaut und in Puffer A resuspendiert (5ml/g Pellet). Nach Rühren bei Raumtemperatur für 1h wurde 20min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 8ml mit Puffer A äquilibrierte Nickel-NTA-Agarose-Suspension wurde der Ansatz 45min bei

Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Probe vorsichtig auf eine Econo Pac Chromatography-Säule geladen und der Durchfluß verworfen. Die Säule wurde mit zehn Säulenvolumen Puffer A gewaschen und dann solange mit Puffer B weiter gewaschen, bis die Optische Dichte bei 280nm kleiner als 0,01 war. Anschließend wurde mit Puffer C gewaschen, bis die Optische Dichte bei 280nm wiederum kleiner als 0,01 war. Die Elution erfolgte nacheinander mit 10ml Puffer D, Puffer E und Puffer F. Durch die schrittweise Senkung des pH-Wertes werden die Histidin-Reste des Proteins protoniert, was schließlich bei einem von Protein zu Protein unterschiedlichem pH-Wert zur Elution führt. Die Eluate wurden in 1ml-Fractionen gesammelt.

- Puffer A (6M Guanidiniumhydrochlorid; 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM Tris; pH 8,0, mit NaOH einstellen)
- Puffer B (8M Harnstoff; 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM Tris; pH 8,0, mit NaOH einstellen)
- Puffer C (gleiche Zusammensetzung wie Puffer B; pH 6,3, mit HCl einstellen)
- Puffer D (gleiche Zusammensetzung wie Puffer B; pH 5,9, mit HCl einstellen)
- Puffer E (gleiche Zusammensetzung wie Puffer B; pH 4,5, mit HCl einstellen)
- Puffer F (6M Guanidiniumhydrochlorid; 200mM Essigsäure)

#### 2.2.5.9 Entsalzung von Proteinen mittels Dialyse

Es wurden ca. 15cm lange Stücke der Dialyseschläuche abgeschnitten und 10min in Kochlösung1 (2% (g/v) NaHCO<sub>3</sub>; 1mM EDTA pH 8,0) gekocht. Nach Waschen der Schläuche mit bidestilliertem Wasser wurden sie 10min in Kochlösung2 (1mM EDTA pH 8,0) gekocht und dann in bidestilliertem Wasser abgekühlt und bei 4°C unter Wasser aufbewahrt.

Ungefähr 500µl Proteinprobe wurden in einen Dialyseschlauch gefüllt und 5h bei 4°C in bidestilliertem Wasser unter mehrmaligem Wasserwechsel gerührt. Nach Ablauf dieser Zeit war ein Großteil der Ionen hindurchdiffundiert, das Protein fiel als weißes Pulver aus. Das Protein wurde aus den Schläuchen in Mikroreaktionsgefäße geschwemmt, 15min bei 16000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen oder einer Proteinfällung (siehe Abschnitt 2.2.5.10) unterzogen. Das Proteinpellet wurde mit 80% (v/v) Aceton gewaschen (Zentrifugation für 15min bei 16000xg und 4°C). Das Pellet wurde in 500µl Wasser aufgenommen, was u.U. eine Änderung des pH-Wertes erforderte.

#### 2.2.5.10 Proteinfällung

Das Protein wurde in 10% (g/v) Trichloressigsäure und 0,02% (g/v) Deoxycholat für 30min bei 4°C gefällt. Nach Zentrifugation (15min bei 16000xg und 4°C) wurde das Pellet 2x mit 80% (v/v) Aceton gewaschen (Zentrifugation für 15min bei 16000xg und 4°C). Das Pellet wurde in 500µl Wasser aufgenommen, was u.U. eine Änderung des pH-Wertes erforderte.

#### 2.2.5.11 Bestimmung der UDPase-Aktivität

(Nagahashi und Kane, 1982, modifiziert)

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde bei -80°C gelagertes gemörsertes Pflanzenmaterial verwendet. Das Material wurde in kaltem Homogenisierungsmedium im Verhältnis 1:25 aufgenommen, 5min bei 1000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt.

Bei der Spaltung von UDP bzw. GDP durch die UDPase entsteht UMP bzw. GMP und anorganisches Phosphat. Durch den Nachweis letzteren (siehe Abschnitt 2.2.6.2) wurde eine Bestimmung der Enzymaktivität durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß die Absorptionsänderung sowohl bezüglich der Zeit als auch der eingesetzten Extraktmenge linear war (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurde gezeigt, daß in Anwesenheit der Lösungen zur Bestimmung des Phosphatgehaltes kein UDP- bzw. GDP-Umsatz stattfindet (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der Aktivität wurden 20-30µg Protein in 750µl Inkubationsmedium aufgenommen und 20min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. 125µl des Ansatzes wurden dann mit den Lösungen zur Bestimmung des Phosphatgehaltes versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 660nm gegen einen identisch behandelten Blindwert ohne Probe gemessen.

- Homogenisierungsmedium (30mM Tris-MES, pH 7,7; 5mM EDTA; 5mM DTT; 500mM Saccharose; 0,1% (v/v) TritonX-100)
- Inkubationsmedium (30mM Tris-MES, pH 6,5; 3mM MnSO<sub>4</sub>; 3mM UDP bzw. GDP)

## 2.2.6 Methoden zur Extraktion und Bestimmung von Metaboliten

Um die Verlässlichkeit der Experimente zu überprüfen, wurden in früheren Experimenten in der Gruppe Stitt die jeweiligen Metabolite in einer bestimmten Konzentrationen zu den Extrakten hinzugegeben und der Gehalt mit den Methoden bestimmt, die auch für die im Pflanzengewebe vorliegenden Metabolite eingesetzt wurden. Da die Wiederfindungsrate der Metabolite in mehreren Veröffentlichungen dargestellt worden ist (Jelitto et. al. 1992, Hajirezaei und Stitt 1991), wurde auf eine Wiederholung dieser Experimente verzichtet.

### 2.2.6.1 Extraktionsmethoden

#### (1) Ethanolische Extraktion

Für die ethanolische Extraktion wurden ca. 20mg bei -80°C gelagertes gemörsertes Pflanzenmaterial in 200µl Extraktionspuffer1 aufgenommen und 20min bei 80°C inkubiert. Nach Zentrifugation (1min, 16000xg) wurde der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Es folgten nacheinander entsprechende Extraktionen mit Extraktionspuffer2 und Extraktionspuffer3; alle erhaltenen Überstände wurden vereinigt und bei -20°C gelagert.

- Extraktionspuffer1 (80% (v/v) Ethanol; 5mM HEPES-KOH, pH 7,0)
- Extraktionspuffer2 (50% (v/v) Ethanol; 5mM HEPES-KOH, pH 7,0)
- Extraktionspuffer3 (5mM HEPES-KOH, pH 7,0)

#### (2) Trichloressigsäureextraktion

(Jelitto et al.,1992)

Es wurden ca. 200mg bei -80°C gelagertes gemörsertes Pflanzenmaterial in 500µl TCA/Ether aufgenommen und 20min auf Eis inkubiert. Nach Mischen mit 800µl TCA/Wasser und Auffüllen mit wassergesättigtem Diethylether wurde der Ansatz unter gelegentlichem Schütteln 3h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 5min bei 16000xg und 4°C zentrifugiert und die wäßrige (in der Regel die untere) Phase in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Reste der Trichloressigsäure wurden durch viermaliges Waschen des Ansatzes mit wassergesättigtem Diethylether (Zentrifugation für 5min bei 16000xg und 4°C) entfernt. Nachdem der Ansatz 10min offen auf Eis inkubiert worden war (um Reste des Diethylethers abdampfen zu lassen), wurde durch schrittweise Zugabe von KOH/TEA ein pH-Wert von 6-7 eingestellt. Nach 10min Inkubation auf Eis wurde 10min bei 16000xg und 4°C zentrifugiert, um Salze zu entfernen. Der Überstand wurde vorsichtig in ein

neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

- TCA/Ether (In Diethylether: 16% (g/v) Trichloressigsäure)
- TCA/Wasser (In Wasser: 16% (g/v) Trichloressigsäure; 5mM EGTA)
- KOH/TEA (5M KOH; 1M Triethanolamin)

#### 2.2.6.2 Bestimmung des Phosphatgehaltes

(Itaya und Ui, 1966)

Die Konzentration an anorganischem Phosphat wurde über Komplexbildung mit einem Farbreagenz bestimmt. Es wurden 20-100 $\mu\text{l}$  ethanolischer Extrakt mit Wasser auf ein Endvolumen von 250 $\mu\text{l}$  verdünnt und mit 1ml Farbreagenz und 1ml 1N HCl versetzt. Nach 15min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 $\mu\text{l}$  1,5% (v/v) Tween 20 zugegeben und nach weiteren 15min die Absorption bei 660nm gegen eine Referenz ohne Extrakt gemessen. Die Bestimmung des Phosphatgehaltes erfolgte mittels einer Eichkurve (0-50nmol/ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

- Farbreagenz: 1 Volumen 4,2% (g/v)  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  in 5N HCl  
3 Volumen 0,2% (g/v) Malachitgrün  
30min bei Raumtemperatur rühren, filtrieren, dunkel aufbewahren

#### 2.2.6.3 Bestimmung von Metaboliten über gekoppelte enzymatische Testverfahren

Die Bestimmung der Metabolitkonzentrationen erfolgte an einem Zweiwellenlängen-Photometer (Sigma ZFP-22, Eppendorf, Hamburg, Meßwellenlänge 334 nm, Referenzwellenlänge 405 nm) mit Hilfe enzymatischer Substratanalyse nach Lowry und Passoneau, 1972, modifiziert nach Stitt et al., 1980, Stitt et al., 1984 und Wirtz et al., 1980. Alternativ wurden die Analysen an einem Uvikon 930 Photometer (Kontron Instruments, Eching) durchgeführt.

Meßgröße bei allen Enzymtests war die Bildung bzw. der Verbrauch von NADH bzw. NADPH und die daraus resultierende Absorptionsänderung.

Die in Ammoniumsulfat präzipitierten Hilfsenzyme wurden vor den Tests abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Enzyme im jeweiligen Testpuffer resuspendiert.

Sofern nicht anders angegeben, betrug das Endvolumen in der Küvette 600  $\mu\text{l}$  (Sigma ZFP-22) bzw. 800 $\mu\text{l}$  (Uvikon 930). Bei allen Metabolitmessungen wurde ein Blindwert mit Puffer anstelle Extrakt erstellt, der zur Korrektur der eigentlichen Meßwerte diente.

(1) Hexosephosphate und UDP-Glucose

Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat, Fructose-6-Phosphat und UDP-Glucose konnten zusammen in einem Ansatz bestimmt werden:

- Reaktionspuffer (100mM Tris-HCl, pH 8,1; 5mM MgCl<sub>2</sub>)
- 250μM NADP
- 10-50μl Trichloressigsäureextrakt

Die Reaktionen wurden gestartet durch sukzessive Zugabe von:

- 0,2 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Messung von Glucose-6-Phosphat)
- 0,4 U Phosphoglucomutase (Messung von Glucose-1-Phosphat)
- 0,4 U Phosphoglucoisomerase (Messung von Fructose-6-Phosphat)

(nach Zugabe von NaPP<sub>i</sub> zu einer Endkonzentration von 125μM und Inkubation für 1min)

- 0,4 U Uridin-5'-Diphosphoglucose-Pyrophosphorylase (Messung von UDP-Glucose)

(2) ATP

- Reaktionspuffer (100mM Tris-HCl, pH 8,1; 5mM MgCl<sub>2</sub>)
- 250μM NADP
- 1mM Glucose
- 0,2 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
- 0,4 U Phosphoglucoisomerase
- 10-50μl Trichloressigsäureextrakt

Die Reaktion wurden gestartet durch Zugabe von 1 U Hexokinase.

(3) ADP und AMP

ADP und AMP konnten zusammen in einem Ansatz bestimmt werden (Stitt et al., 1982):

- Reaktionspuffer (50mM HEPES-KOH, pH 7,0; 5mM MgCl<sub>2</sub>)
- 1mM NADH
- 1,5mM Phosphoenolpyruvat
- 1 U Lactatdehydrogenase
- 10-50µl Trichloressigsäureextrakt

Die Reaktionen wurden gestartet durch sukzessive Zugabe von:

- 2 U Pyruvatkinase (Messung von ADP)
- 2 U Myokinase (Messung von 2 AMP)

(4) Glucose, Fructose und Saccharose

Glucose, Fructose und Saccharose konnten zusammen in einem Ansatz bestimmt werden:

- Reaktionspuffer (100mM Imidazol-HCl, pH 6,9; 3mM MgCl<sub>2</sub>)
- 500µM NADP
- 1,2mM ATP
- 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
- 10-50µl ethanolischer Extrakt

Die Reaktionen wurden gestartet durch sukzessive Zugabe von:

- 1 U Hexokinase (Messung von Glucose)
- 1 U Phosphoglucoisomerase (Messung von Fructose)
- 100 U Invertase (Messung von 2 Saccharose)

## 2.2.6.4 Bestimmung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern durch HPLC

Die Auftrennung von UDP, ADP, GDP, UTP, ATP, GTP sowie UDP- und ADP-Glucose aus den Trichloressigsäureextrakten erfolgte über HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).

Bei Zellkultur-Proben wurden die Extrakte ohne Aufkonzentration verwendet, bei allen anderen Proben wurden je 200µl der Extrakte vollständig eingengt und die entstandenen Pellets dann in 50µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Die HPLC wurde an einer Kontron-Anlage (Datensystem 450 MT2, Pumpen Nr. 422, Injektionsventil Cotati 9125, UV-Detektor Nr. 430, Kontron Instruments, Eching) durchgeführt, welche mit einer Partisil<sup>®</sup>-SAX Anionenaustauschersäule (5mm x 250mm, Whatman, Maidstone) ausgestattet war.

Über einen automatischen Probengeber (Autosampler 360, Kontron Instruments, Eching) wurden 20 µl Extrakt eingespritzt und über die Vor- und Trennsäule aufgetrennt. Tab. 2.4 zeigt den benutzten Laufmittelgradienten.

Zeitpunkt	Gradient	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
Minute 0-3	isokratisch	95	5
bis Minute 15	isokratisch	95	5
bis Minute 18	linearer Gradient auf	50	50
bis Minute 27	linearer Gradient auf	10	90
bis Minute 37	linearer Gradient auf	0	100
bis Minute 41	linearer Gradient auf	95	5

Tab. 2.4 Laufmittelgradient zur Nukleotid-Auftrennung

Angegeben ist jeweils die Endzusammensetzung des Laufmittels. Während Minute 37-41 sowie 0-3 wurde die Säule für den nächsten Lauf äquilibriert.

Die Flußrate betrug dabei stets 1 ml/min. Die eluierten Substanzen wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert und mit Hilfe eines Nukleotidstandards (Tab. 2.5) am Datensystem (450 MT2, Kontron Instruments, Eching) identifiziert und quantifiziert.

- Laufmittel A (10mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Merck suprapure, pH 2,8; filtriert und 45min im Ultraschallbad entgast)
- Laufmittel B (750mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Merck suprapure, pH 3,7; filtriert und 45min im Ultraschallbad entgast)

Nukleotid	Endkonzentration
AMP	20µM
UMP	20µM
GMP	20µM
ADP	50µM
UDP	50µM
GDP	50µM
ATP	100µM
UTP	100µM
GTP	100µM
ADP-Glucose	50µM
UDP-Glucose	50µM

Tab.2.5 Nukleotidstandard

### 2.2.6.5 Bestimmung von Aminosäure-Konzentrationen

#### (1) Bestimmung des Gesamt-Aminosäure-Gehaltes

Für die Bestimmung der Konzentration an Aminosäuren insgesamt wurde der Nachweis mit Ninhydrin benutzt. 100µl ethanolischer Extrakt wurden mit dem 1,5fachen Volumen bidestilliertem Wasser und dem 2,5fachen Volumen 100% (v/v) Ethanol auf ein Endvolumen von 500µl verdünnt und mit der gleichen Menge Ninhydrin-Reagenz versetzt. Nach 10min Inkubation bei 70°C wurde die Absorption bei 510nm gegen eine Referenz ohne Extrakt gemessen. Die Bestimmung des Aminosäuregehaltes erfolgte mittels einer Eichkurve (10-300nmol/ml Glutamin).

- Ninhydrin-Reagenz: 1 Volumen 0,83% (g/v) Cadmiumacetat in 16,7% (v/v) Essigsäure  
8,3 Volumen 1% (g/v) Ninhydrin in 100% (v/v) Aceton

#### (2) Bestimmung von Aminosäuren durch HPLC

Die proteinogenen Aminosäuren (außer Prolin und Cystein) wurden mittels Umgekehrte-Phasen-Chromatographie an einer Hypersil ODS-Säule (Partikeldurchmesser 3µm; Säulenlänge 150mm; Säulendurchmesser 4,6mm; Knauer GmbH, Berlin) unter Verwendung einer HPLC-Anlage (Kontron Instruments, Eching) aufgetrennt (Geigenberger et al., 1996). Als Proben wurden Trichloressigsäureextrakte verwendet, die bei Bedarf verdünnt wurden.

Für die Fluoreszenzdetektion (Fluorimeter SFM-25, Kontron Instruments, Eching; Anregungswellenlänge 330nm; Emissionswellenlänge 450nm) der Aminosäuren wurden diese vor der chromatographischen Auftrennung mit *o*-Phthalsäuredialdehyd derivatisiert. Diese Derivatisierung erfolgte automatisiert unter Verwendung des Probengebers (Autosampler 465,

Kontron Instruments, Eching): In 35µl Probe wurde die gleiche Menge Derivatisierungsreagenz injiziert, 100sek bei 4°C derivatisiert und 20µl dieses Ansatzes über die Vor- und Trennsäule aufgetrennt. Tab. 2.6 zeigt den benutzten Laufmittelgradienten.

Zeitpunkt	Gradient	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
Minute 0-2	isokratisch	100	0
bis Minute 11	linearer Gradient auf	90	10
bis Minute 17	isokratisch	90	10
bis Minute 27	linearer Gradient auf	50	50
bis Minute 38	linearer Gradient auf	40	60
bis Minute 44	linearer Gradient auf	0	100
bis Minute 46	isokratisch	0	100
bis Minute 48	linearer Gradient auf	100	0
bis Minute 60	isokratisch	100	0

Tab. 2.6 Laufmittelgradient zur Aminosäure-Auftrennung

Angegeben ist jeweils die Endzusammensetzung des Laufmittels. Während Minute 48-60 wurde die Säule für den nächsten Lauf äquilibriert.

Die Aminosäuren wurden mit Hilfe eines Aminosäurestandards (Tab. 2.7) am Datensystem (450 MT2, Kontron Instruments, Eching) identifiziert und quantifiziert.

- Laufmittel A (10mM Na-Phosphat, pH 6,8; 2,4‰ (v/v) Tetrahydrofuran)
- Laufmittel B (20mM Na-Phosphat, pH 6,8; 35% (v/v) Methanol; 15% (v/v) Acetonitril)
- Derivatisierungsreagenz (Gemisch aus: 5% (g/v) *o*-Phthalsäuredialdehyd in Methanol / 0,8M Boratpuffer, pH 10,4 /  $\beta$ -Mercaptopropionsäure: 10/90/1 (v/v/v))

Aminosäure	Endkonzentration	Aminosäure	Endkonzentration
Asparaginsäure	20µM	GABA	20µM
Glutaminsäure	20µM	Tyrosin	10µM
Asparagin	20µM	Valin	20µM
Serin	20µM	Methionin	20µM
Glutamin	20µM	Norvalin	10µM
Glycin	20µM	Tryptophan	10µM
Threonin	10µM	Phenylalanin	10µM
Histidin	10µM	Isoleucin	20µM
Citrullin	10µM	Leucin	10µM
Alanin	20µM	Lysin	10µM
Arginin	20µM		

Tab. 2.7 Aminosäurestandard

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Genomische Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in Tabak und Kartoffel

Mit der kompletten Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) konnte erstmals die genomische Organisation der Pyrimidinnukleotid-Synthese-Enzyme in einer Pflanze betrachtet werden. Dabei zeigte sich, daß CPSase LU, CPSase SU, ATCase, Orotase, DHODH und UMP-Synthase jeweils nur durch ein einziges Gen repräsentiert werden. Demgegenüber gibt es für UMP-Kinase zwei Gene.

Um zu überprüfen, ob eine ähnliche Organisation des Genoms bei Tabak und Kartoffel vorliegt, wurde aus sink-Blättern von im Gewächshaus<sup>2</sup> angezogenen Tabak- bzw. Kartoffelpflanzen genomische DNA isoliert, diese mit Eco RI, Hind III sowie (nur bei Kartoffel) Xho I geschnitten und einer Southern-Analyse unterzogen. Es wurden alle 5 Schritte der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese sowie UMP-Kinase untersucht. Bis auf Orotase und UMP-Synthase konnten Volle-Länge-Sonden verwendet werden.

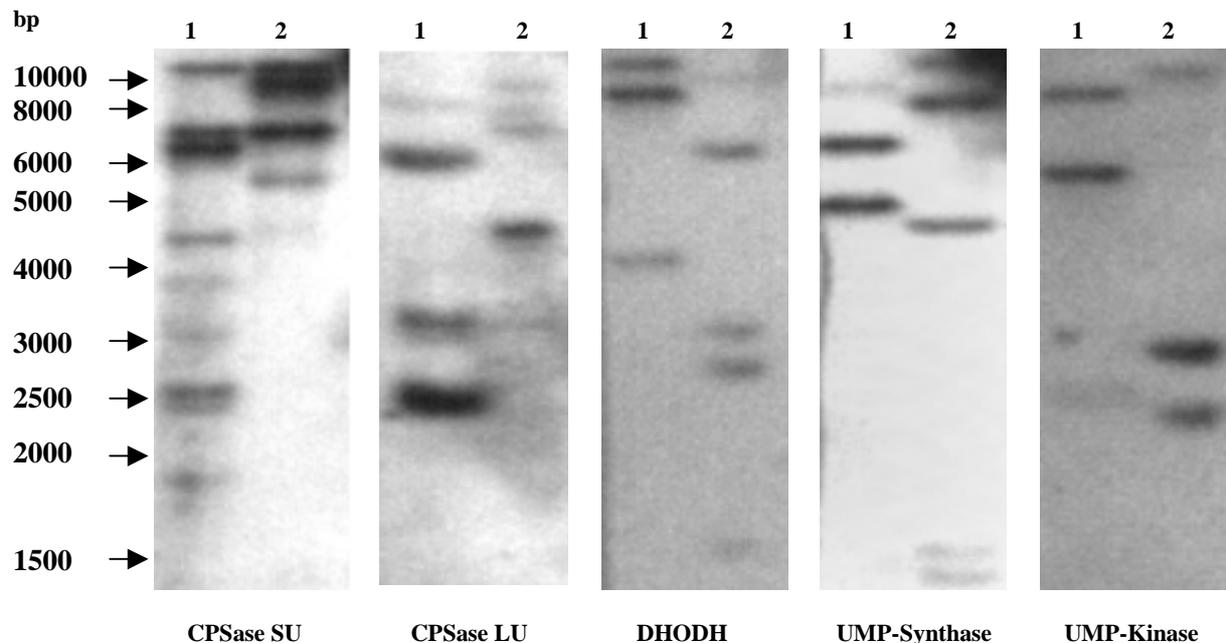


Abb. 3.1 Southern-Analyse der genomischen Tabak-DNA

Analysiert wurde mit Eco RI (=Spur1) und Hind III (=Spur2) geschnittene Tabak-DNA. Es wurden jeweils 10µg DNA aufgetragen. Es wurden DNA-Sonden verwendet, denen Tabak-cDNA zu Grunde lag: die Sonden für CPSase SU, CPSase LU, DHODH, UMP-Synthase sowie UMP-Kinase. Als Molekulargewichtsstandard diente die Smartladder (Eurogentech).

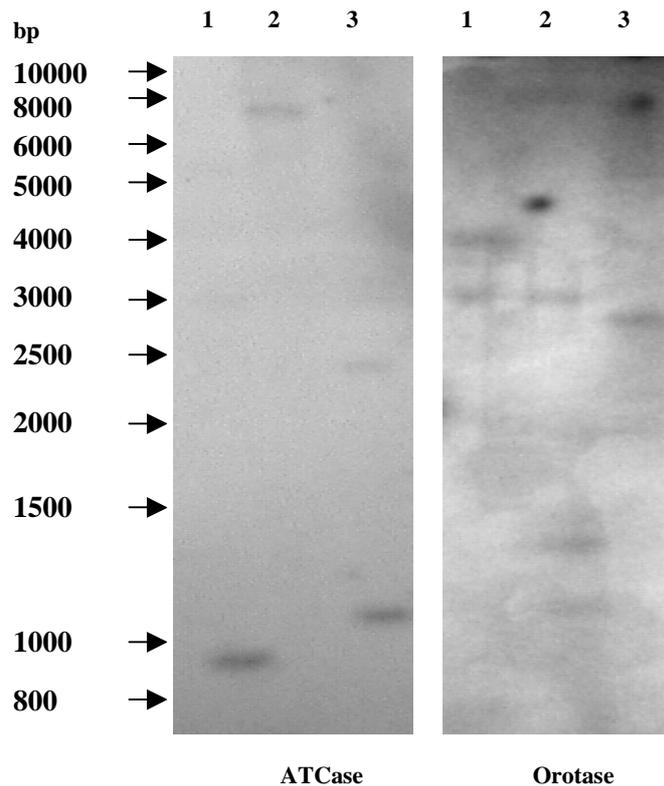


Abb. 3.2 Southern-Analyse der genomischen Kartoffel-DNA

Analysiert wurde mit Eco RI (=Spur1), Hind III (=Spur2) und Xho I (=Spur3) geschnittene Kartoffel-DNA. Es wurden jeweils 5µg DNA aufgetragen. Es wurden DNA-Sonden verwendet, denen Kartoffel-cDNA zu Grunde lag: die Sonden für ATCase und Orotase. Als Molekulargewichtsstandard diente die Smartladder (Eurogentech).

Wie Abb. 3.1 und 3.2 zeigen, führte die Hybridisierung der geschnittenen genomischen Tabak- bzw. Kartoffel-DNA mit den jeweiligen Sonden bis auf CPSase SU zu ähnlichen Ergebnissen. Während bei CPSase SU sowohl die Restriktion mit Eco RI als auch mit Hind III eine Vielzahl Banden unterschiedlicher Größe ergab, wurden in allen anderen Fällen für jede durchgeführte Restriktion nur wenige Banden detektiert. Bei Betrachtung der Signale, die für CPSase LU und CPSase SU erhalten wurden, fällt auf, daß bei beiden Restriktionen im oberen Bereich (zwischen 6000 und 10000 bp) eine gewisse Ähnlichkeit im Bandenmuster auftritt.

Bei der Durchführung der in Abb. 3.1 und Abb. 3.2 dargestellten Southern-Analysen wurden Sonden verwendet, die auf cDNAs der jeweiligen Genprodukte beruhten (siehe Tab. 2.1), sie enthielten also nur die codierenden Exon-Bereiche des jeweiligen Gens, während die nicht-codierenden Intron-Bereiche fehlten. Eine Betrachtung der Anzahl der Restriktionsstellen für die verwendeten Endonukleasen in diesen Bereichen kann zeigen, ob eine Übereinstimmung mit den Daten der Southern-Analysen besteht (Tab. 3.1).

Tabak: cDNA von	Zahl der Restriktionsstellen	
	Eco RI	HindIII
CPSase LU	2	4
CPSase SU	1	0
DHODH	1	1
UMP-Synthase	0	1
UMP-Kinase	0	2

Tab. 3.1 Zahl der Restriktionsstellen für Eco RI, Hind III und Xho I in den in Tab. 2.1 dargestellten cDNAs.

Kartoffel: cDNA von	Zahl der Restriktionsstellen von		
	Eco RI	Hind III	Xho I
ATCase	2	1	2
Orotase	1	2	0

Wie Tab. 3.1 zeigt, besitzen die bei den Southern-Analysen verwendeten Restriktionsendonukleasen in allen verwendeten cDNAs (also den Exon-Sequenzen) nur wenige Schnittstellen. Dies paßt mit den in Abb. 3.1 und Abb. 3.2 dargestellten Verhältnissen zusammen. CPSase SU stellt dabei eine Ausnahme dar, da gemäß Abb. 3.1 bei den Restriktionen mit Eco RI und auch Hind III viele Banden erhalten wurden, während die cDNA nur einmal (Eco RI) bzw. gar nicht (Hind III) geschnitten wird. Allerdings ist über die Anzahl der Schnittstellen in den Intron-Bereichen nichts bekannt. Bei einer Berechnung der Größe der jeweiligen Restriktionsfragmente aus Tab. 3.1 könnte man keinen verlässlichen Vergleich mit den in Abb. 3.1 und Abb. 3.2 dargestellten Ergebnissen durchführen, da nichts über die genaue Lage der Intron-Bereiche bekannt ist.

#### **Fazit:**

Bei einer Southern-Analyse von Tabak- und Kartoffel-DNA konnten bei allen Pyrimidin-nukleotid *de novo* Synthese-Enzymen (bis auf CPSase SU) nur wenige Banden detektiert werden.

## 3.2 Analyse der Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme

Die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese spielt für viele Stoffwechselwege eine wichtige Rolle. Insbesondere für die Synthese von Nucleinsäuren ist die ständige Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden unverzichtbar. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob die Expression der an der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese beteiligten Enzyme in jeder Lebenssituation der Pflanze gleich bleibt oder eine Variation erfährt. Es wurde zwar die Expression einzelner Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme bereits punktuell untersucht (ATCase in *Pisum sativum*: Williamson und Slocum, 1994; UMP-Synthase in *Nicotiana plumbaginifolia*: Santoso und Thornburg, 1998), aber eine Analyse des gesamten Stoffwechselweges fand bisher noch nicht statt.

Bei der Untersuchung der Expression wurden Northern- und Western-Analysen durchgeführt. Die Detektion der spezifischen mRNAs wurde mittels radioaktiv markierter Sonden-DNA durchgeführt. Für den spezifischen Proteinnachweis fanden eigens hergestellte Antikörper (siehe Abschnitt 2.1.5) Verwendung.

### 3.2.1 Gewebespezifische Variation der extrahierbaren mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme

#### 3.2.1.1 Untersuchung der Variation

Pflanzliche Gewebe weisen in ihrem Aufbau starke Unterschiede auf, die mit der jeweiligen Funktion des Organs zusammenhängen. Dementsprechend variieren auch Faktoren wie die Stoffwechselaktivität oder das Vorhandensein und damit auch die Expression bestimmter Enzyme, die sogar auf bestimmte Regionen des Organs beschränkt sein können (Rost und Bryant, 1996).

Um festzustellen, wie sich die Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme in dieser Hinsicht verhält, wurde Gesamt-RNA verschiedener Pflanzengewebe von Tabak (Abb. 3.3) und Kartoffel (Abb. 3.4) einer Northern-Analyse unterzogen. Neben Unterschieden sollte vor allem auch gezeigt werden, ob die jeweiligen mRNAs überhaupt in jedem Gewebe nachgewiesen werden können. Es wurden alle 5 Schritte der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese untersucht.

Dazu wurden im Gewächshaus3 (Tabak) bzw. Gewächshaus2 (Kartoffel) angezogene Pflanzen verwendet. Zum Zeitpunkt der Ernte (10.00-11.00 Uhr) waren die Tabakpflanzen etwa 3 Monate alt, die Kartoffelpflanzen etwa 2 Monate.

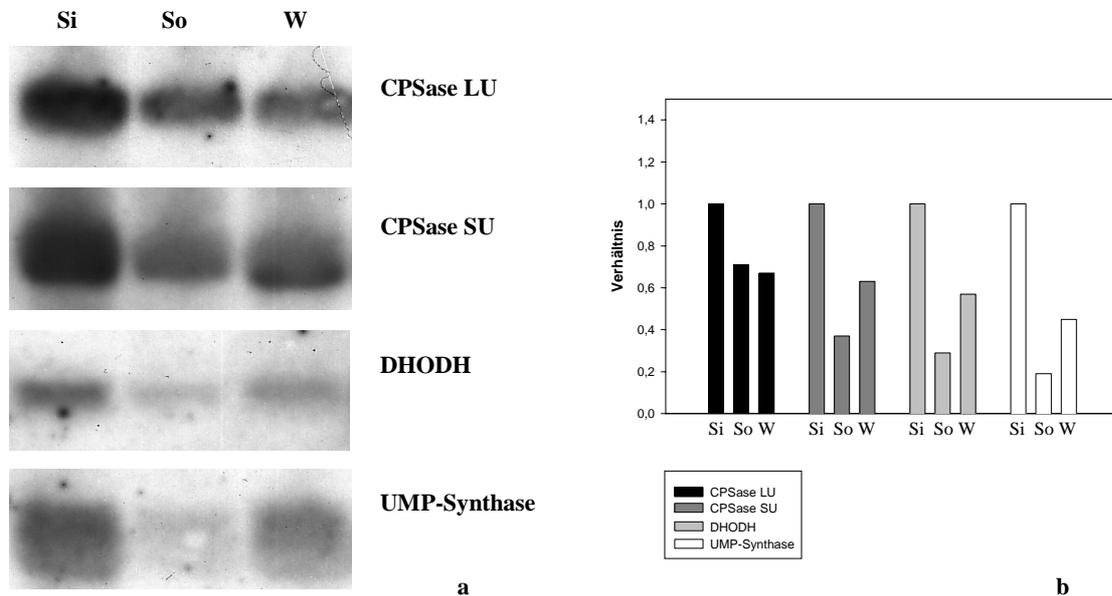


Abb. 3.3 Gewebespezifische Unterschiede der extrahierbaren Menge der mRNA der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme in Tabak

**a:** Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Si = sink-Blatt (<2cm); So = source-Blatt (>10cm); W = Wurzel. Es wurden jeweils 30µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Die Werte für das sink-Blatt wurden jeweils = 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

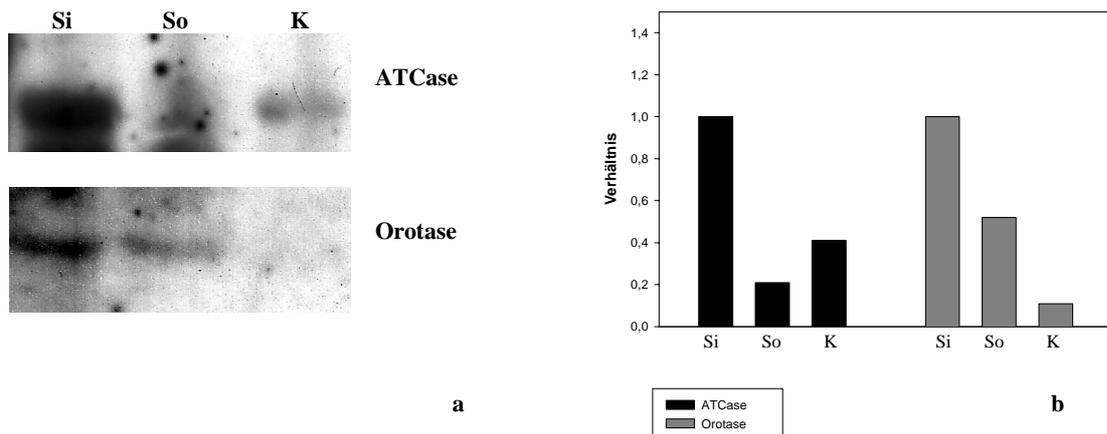


Abb. 3.4 Gewebespezifische Unterschiede der extrahierbaren Menge der mRNA der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme in Kartoffel

**a:** Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Si = sink-Blatt (<2cm); So = source-Blatt (Endfieder); K = sink-Knolle (ca. 10-20g). Es wurden jeweils 30µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Die Werte für das sink-Blatt wurden jeweils = 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

Wie Abb. 3.3 und Abb. 3.4 zeigen, konnten in jedem untersuchten Gewebe die mRNAs aller Syntheseschritte nachgewiesen werden. Die extrahierbare spezifische mRNA-Menge war in sink-Blättern in jedem Fall am größten. Bis auf Orotase und CPSase LU war sie in source-Blättern am geringsten. In heterotrophen Geweben (Wurzel bei Tabak, Knolle bei Kartoffel) lagen die extrahierbaren spezifischen mRNA-Mengen in den meisten Fällen etwa zwischen denen von sink- und source-Blättern. Die Ausnahmen waren CPSase LU und Orotase: Während für CPSase LU ungefähr gleiche spezifische mRNA-Mengen aus Wurzel und source-Blatt isoliert wurden, war bei Orotase die spezifische mRNA-Menge in source-Blatt größer als in Knolle.

Zusätzlich zu den 5 Schritten der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese wurde eine entsprechende Northern-Analyse für die UMP-Kinase als Verbindungsglied zum Energiestoffwechsel durchgeführt (Abb. 3.5). Dazu wurden im Gewächshaus3 angezogene Tabakpflanzen verwendet, die zum Zeitpunkt der Ernte (10.00-11.00 Uhr) etwa 3 Monate alt waren.

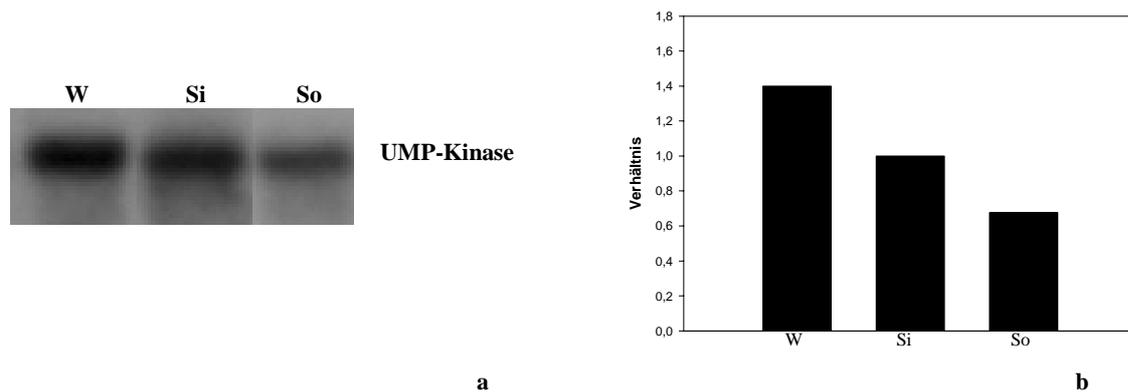


Abb. 3.5 Gewebespezifische Unterschiede der extrahierbaren Menge der UMP-Kinase - mRNA in Tabak  
**a:** Northern-Blot, nach Hybridisierung mit der UMP-Kinase-Sonde. W = Wurzel; Si = sink-Blatt (<2cm); So = source-Blatt (>10cm). Es wurden jeweils 30µg Gesamt-RNA aufgetragen.  
**b:** Intensitätsanalyse der Banden des Blots. Der Wert für das sink-Blatt wurde = 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

Auch die mRNA der UMP-Kinase konnte in jedem Gewebe nachgewiesen werden. Aus Wurzelgewebe wurde hierbei am meisten spezifische mRNA isoliert, gefolgt von sink-Blatt und schließlich source-Blatt.

## 3.2.1.2 Bestimmung der Transkriptgrößen

Mittels der Northern-Blots (Abb. 3.3 - 3.5) und der dazugehörigen RNA-Gele konnten die Transkriptgrößen aller untersuchten Enzyme ungefähr bestimmt werden. Die Transkriptgröße von UPPase (Pyrimidinnukleotid-Wiederverwertung) wurde mit dem in Abb. 3.7 gezeigten Blot und dem dazugehörigen RNA-Gel bestimmt. Tab. 3.2 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Genprodukt	Transkriptgröße (kB)
CPSase LU	> 3,5
CPSase SU	1,8
ATCase	1,6
Orotase	1,7
DHODH	2,0
UMP-Synthase	1,8
UMP-Kinase	1,1
UPPase	1,3

Tab. 3.2 Transkriptgrößen

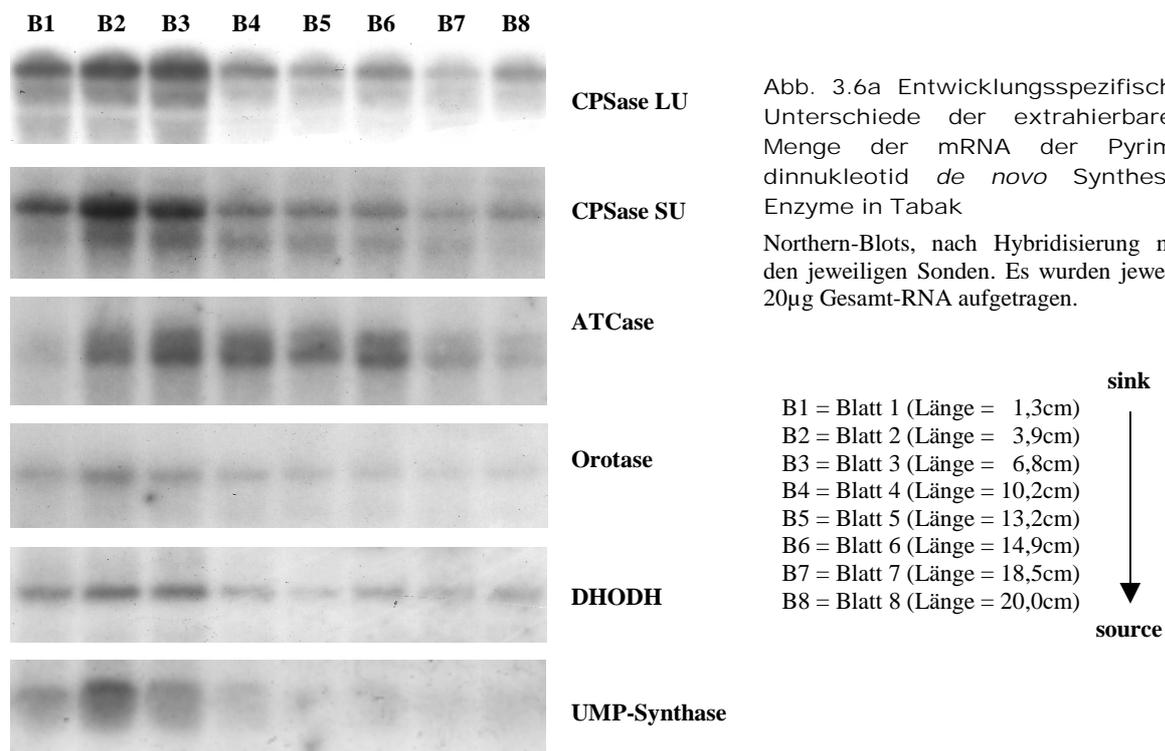
Die in Tab. 3.2 dargestellten Transkriptgrößen stimmen im wesentlichen mit den Größen der für die DNA-Sonden-Herstellung verwendeten cDNAs überein (siehe Tab. 2.1).

**Fazit:**

Die mRNAs aller Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme konnten in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Dabei war die extrahierbare mRNA-Menge in noch wachsendem Gewebe größer als in bereits ausgereiftem Gewebe.

### 3.2.2 Entwicklungsspezifische Variation der extrahierbaren mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme

Während des Wachstums eines Blattes findet ab einem bestimmten Zeitpunkt keine Zellteilungsaktivität mehr statt (Poethig und Sussex, 1985), sondern nur noch reines Streckenwachstum. Da in zellteilungsaktiven Geweben eine verstärkte Nukleinsäuresynthese vorliegt (Burgess, 1985), herrscht dementsprechend auch ein erhöhter Bedarf an Nukleotiden. Um den Zusammenhang zwischen Zellteilungsaktivität bzw. Wachstum des Gewebes und der Expression der Enzyme, die für die Synthese und Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden nötig sind, zu untersuchen, wurden alle Blätter einer Tabakpflanze einer Northern-Analyse unterzogen. Auf diese Weise konnten verschieden alte und entwickelte Blätter untersucht werden. Es wurden ungefähr 3 Monate alte Tabakpflanzen aus dem Gewächshaus3 verwendet, deren Blätter zwischen 10.00-11.00 Uhr geerntet wurden.



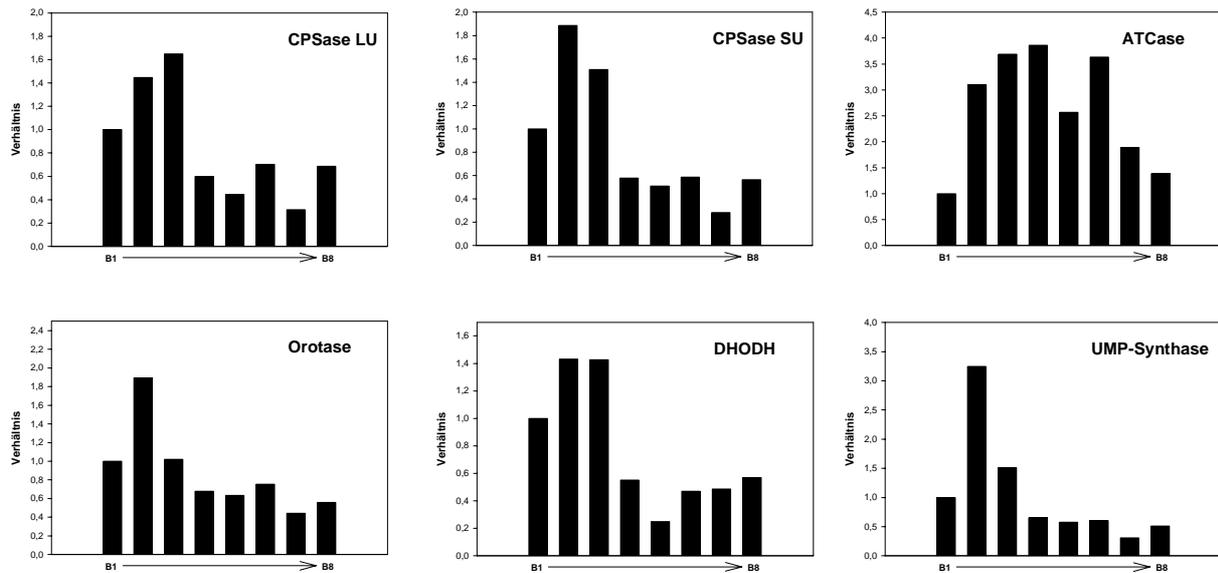


Abb. 3.6b Entwicklungsspezifische Unterschiede der extrahierbaren Menge der mRNA der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme in Tabak

Intensitätsanalyse der Banden der Blots aus Abb. 3.6a. Der Wert für Blatt1 wurde jeweils = 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gestellt. B1-B8 = Blatt1-Blatt8.

Wie Abb. 3.6 zeigt, konnten in jedem Entwicklungsstadium der Blätter die mRNAs aller Pyrimidinnukleotid-Syntheseschritte nachgewiesen werden. Für alle untersuchten Genprodukte mit Ausnahme von ATCase ergab sich im wesentlichen das gleiche Muster: In jedem Fall fand eine deutliche Zunahme der spezifischen extrahierbaren mRNA-Mengen von Blatt1 nach Blatt2 statt. Während des weiteren Blattwachstums und damit steigendem Alter des Blattes nahm die spezifische detektierbare mRNA-Menge stets ab. ATCase stellte insofern eine Ausnahme dar, daß die detektierbare ATCase-spezifische mRNA-Menge auch in vergleichsweise älteren Blättern (Blatt4-Blatt6) kaum abgenommen hatte und erst in Blatt7-Blatt8 einen deutlichen Rückgang erfuhr.

Zum Vergleich wurden auch die Verhältnisse für Enzyme untersucht, die nicht direkt zur Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese dazugehören, aber ebenfalls zur Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden beitragen: UMP-Kinase (Energiestoffwechsel) und UPPase (Pyrimidinnukleotid-Wiederverwertung).

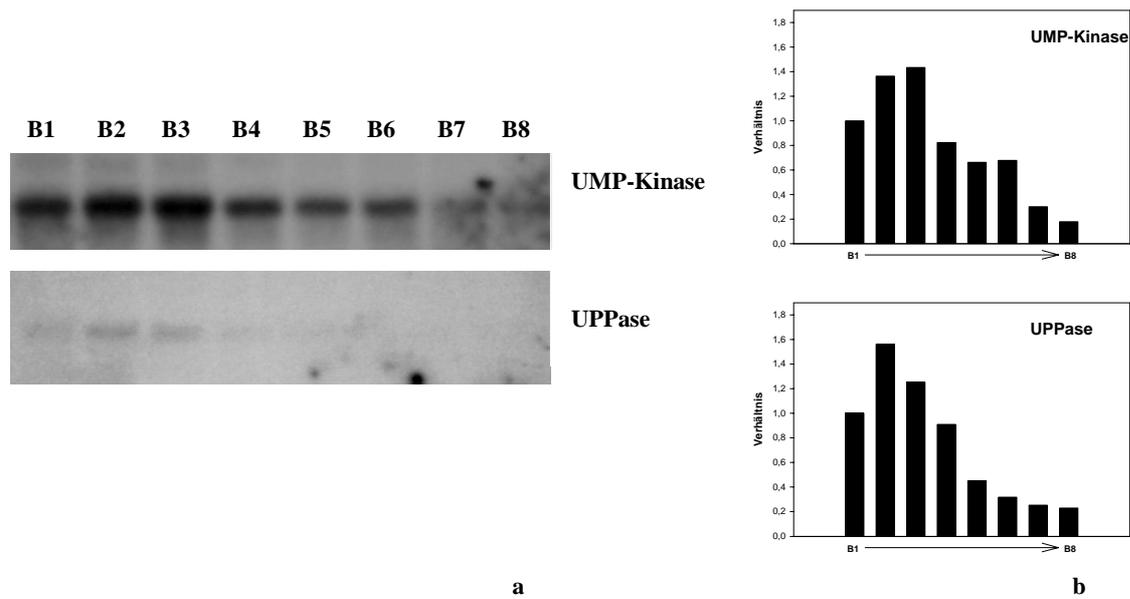


Abb. 3.7 Entwicklungsspezifische Unterschiede der extrahierbaren Menge der mRNA von UMP-Kinase und UPPase in Tabak

**a:** Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Es wurden jeweils 20µg Gesamt-RNA aufgetragen. B1-B8 = Blatt1-Blatt8 (siehe Abb. 3.6a)

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Der Wert für Blatt1 wurde jeweils = 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

Abb. 3.7 zeigt, daß für UMP-Kinase und UPPase ein ähnliches Muster wie im Falle der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme beobachtet werden konnte: Es wurde ebenfalls eine Zunahme der extrahierbaren spezifischen mRNA von Blatt1 nach Blatt2 festgestellt sowie eine Abnahme mit zunehmendem Blattalter.

### **Fazit:**

Die extrahierbaren mRNA-Mengen der an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzyme waren abhängig vom Alter der Blätter. Bis auf ATCase wurde dabei für alle Genprodukte ein im wesentlichen ähnliches Muster festgestellt.

### 3.2.3 Gewebe- und entwicklungsspezifische Variation der extrahierbaren Protein-Menge von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen

#### 3.2.3.1 Untersuchung der Variation

Die extrahierbare mRNA-Menge von Genprodukten zeigt eine Tendenz auf, läßt jedoch keine Aussagen über die tatsächlich vorhandene Menge des Proteins zu. Durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern konnte die tatsächlich vorhandene Menge der Enzyme in verschiedenartigen und –alten Geweben bestimmt werden und eine Expressionsanalyse auf Proteinebene erfolgen. Es wurden die Proteinextrakte von verschiedenen Geweben von Tabak einer Western-Analyse unterzogen und dabei mit Antikörpern gegen CPSase LU, CPSase SU und ATCase untersucht. Dazu wurden ungefähr 3 Monate alte Tabakpflanzen aus dem Gewächshaus3 verwendet, deren Blätter zwischen 10.00-11.00 Uhr geerntet worden waren.

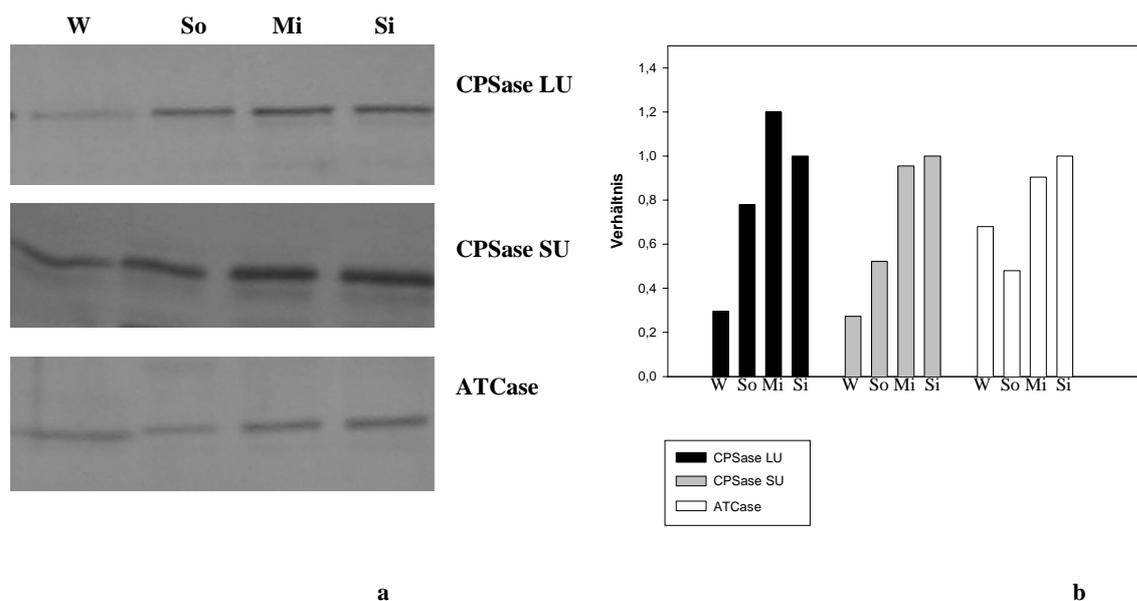


Abb. 3.8 Gewebe- und entwicklungsspezifische Unterschiede der extrahierbaren Protein-Menge von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen in Tabak

**a:** Western-Blots, nach Detektion mittels der jeweiligen Antikörper. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-Protein aufgetragen und auf 10% (v/v) - SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. W = Wurzel; So = source-Blatt (Länge: 20cm); Mi = mittleres Blatt (Länge: 5,5cm); Si = sink-Blatt (Länge: 2,5cm).

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Der Wert für das sink-Blatt wurde = 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

Wie Abb. 3.8 zeigt, ließen sich alle 3 Proteine (CPSase LU, CPSase SU und ATCase) in allen untersuchten Geweben nachweisen. Die spezifische extrahierbare Protein-Menge war in jedem Fall in sink-Blättern größer als in source-Blättern. In einem Blatt, das in seiner Entwicklung dazwischen lag (=mittleres Blatt), war die spezifische Protein-Menge jeweils ungefähr gleich der in sink-Blättern. In Wurzelgewebe waren die detektierten Signale für CPSase LU und CPSase SU am schwächsten, für ATCase lag das Signal in seiner Intensität zwischen dem des source-Blattes und den beiden jüngeren Blättern. Außerdem fiel bei ATCase auf, daß das in Wurzelgewebe detektierte Protein kleiner als in Blattgewebe war. Dies war reproduzierbar und beruhte nicht auf einem Gellauf-Artefakt.

### 3.2.3.2 Bestimmung der Protein-Größen

Mittels der mit aufgetragenen Protein-Gewichtsstandards konnten die ungefähren Protein-Größen für CPSase LU, CPSase SU und ATCase ermittelt werden (Tab. 3.3).

Genprodukt	Protein-Größe (kDa)
CPSase LU	120-140
CPSase SU	50
ATCase	40

Tab. 3.3 Protein-Größen

#### **Fazit:**

Die Expression von CPSase LU, CPSase SU und ATCase konnte auch auf Proteinebene in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Dabei war die extrahierbare Proteinmenge in sink-Blättern größer als in source-Blättern.

### 3.2.4 Tageszeitspezifische Variation der extrahierbaren mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme

Für eine Expressionsanalyse eines beliebigen Genproduktes in Pflanzen spielt neben der Art und dem Alter eines Gewebes vor allem der Zeitpunkt eine Rolle, an dem die Entnahme der Proben stattfindet. Viele Reaktionen und Prozesse in Pflanzen sind eng an das Vorhandensein von Licht gekoppelt – das naheliegendste Beispiel dafür stellt die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie während der Photosynthese dar.

Das Blattwachstum unterliegt in Pflanzen tageszeitlichen Schwankungen (Schmundt et al. 1998; Schurr et al., 2000; Walter und Schurr, 2000). Es ist mit Zellteilungen verbunden, bis die Blätter ungefähr halb ausgewachsen sind (Poethig und Sussex, 1985). Zellteilungsaktivität ist gekoppelt mit verstärkter Synthese von RNA und DNA (Burgess, 1985). Da die Nukleinsäuresynthese u.a. von der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese abhängt, wurde untersucht, inwiefern die extrahierbare mRNA-Menge von an der Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden beteiligten Genprodukten (CPSase LU, DHODH, UMP-Kinase) auch einem diurnalen Rhythmus unterliegt. Dazu wurden im Gewächshaus1 identische, 8 Wochen alte Tabakpflanzen untersucht. Die Lichtphase dauerte 15h, die Dunkelphase 9h. Zu bestimmten Zeiten wurde ein sink-Blatt (<2cm) entnommen, wobei für jede Probenentnahme eine neue Pflanze gewählt wurde, um den Einfluß von Streßreaktionen einer vorherigen Ernte auszuschließen. Das gemörserte Material wurde einer Northern-Analyse unterzogen.

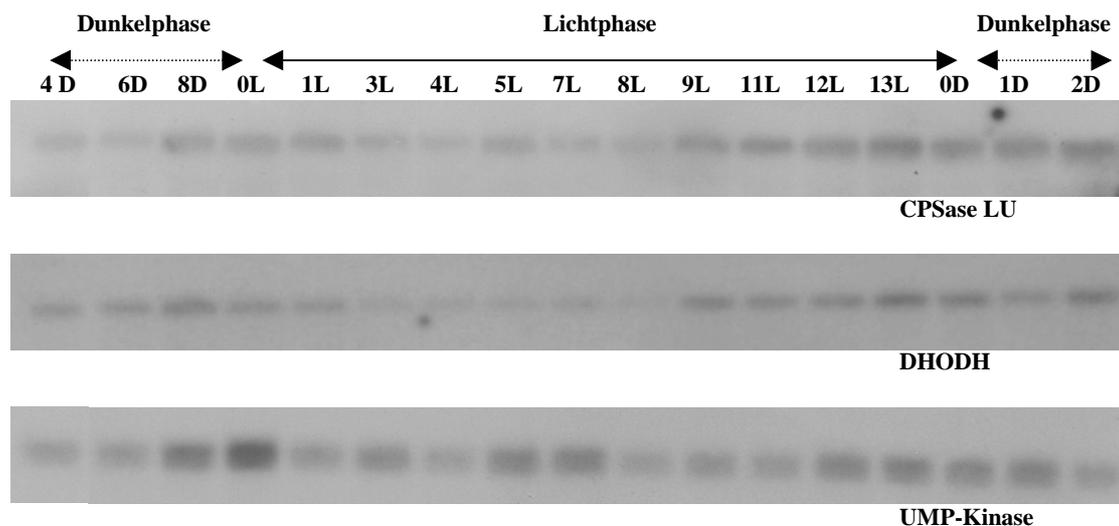


Abb. 3.9a Tageszeitspezifische Unterschiede der extrahierbaren Menge der mRNA von CPSase LU, DHODH und UMP-Kinase in Tabak-sink-Blatt

Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen. 1D, 2D, 4D, 6D, 8D = 1, 2, 4, 6, 8h Dunkelphase; 1L, 3L, 4L, 5L, 7L, 8L, 9L, 11L, 12L, 13L = 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13h Lichtphase; 0L = Beginn der Lichtphase (nach 9h Dunkelphase); 0D = Beginn der Dunkelphase (nach 15h Lichtphase).

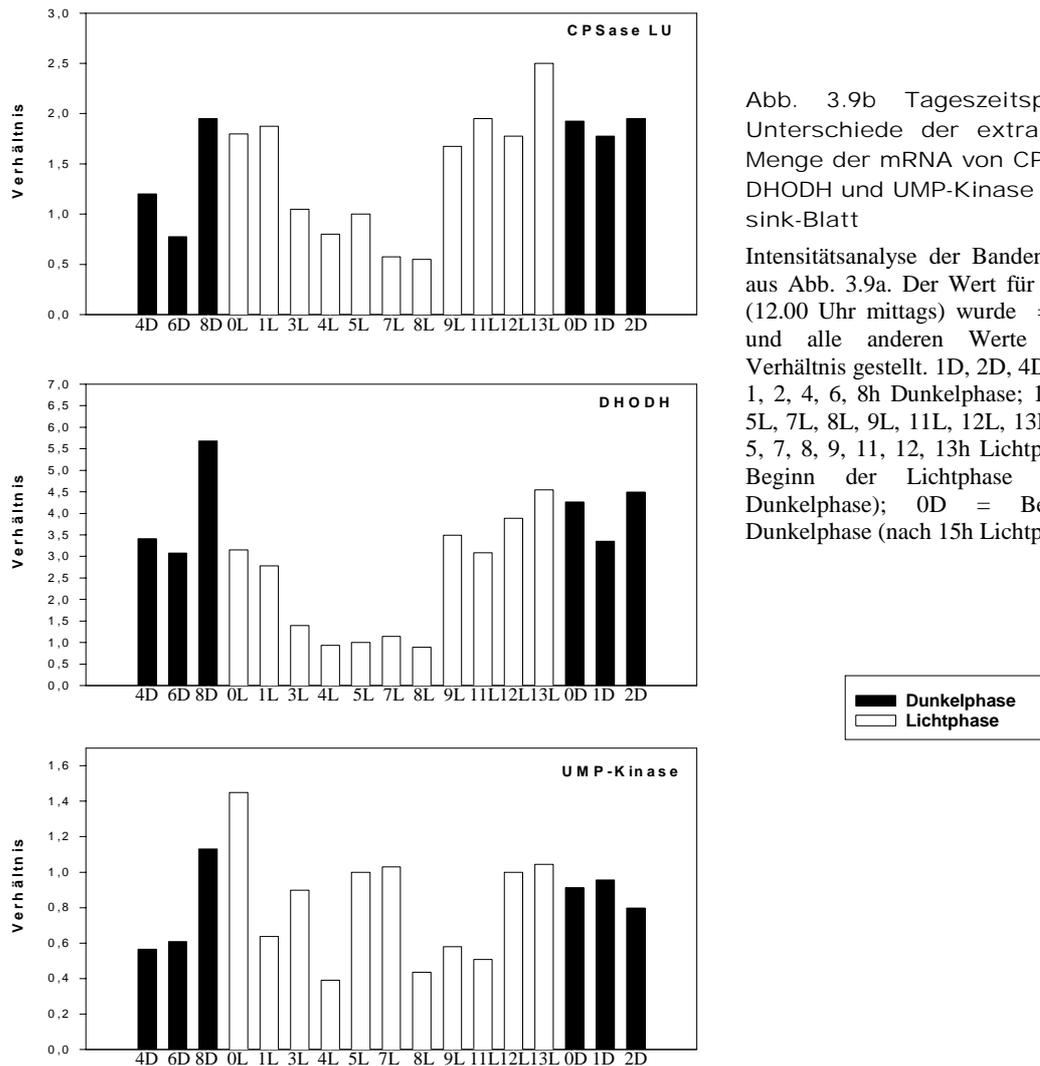


Abb. 3.9b Tageszeitspezifische Unterschiede der extrahierbaren Menge der mRNA von CPSase LU, DHODH und UMP-Kinase in Tabak-sink-Blatt

Intensitätsanalyse der Banden der Blots aus Abb. 3.9a. Der Wert für Zeitpunkt 8 (12.00 Uhr mittags) wurde = 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gestellt. 1D, 2D, 4D, 6D, 8D = 1, 2, 4, 6, 8h Dunkelphase; 1L, 3L, 4L, 5L, 7L, 8L, 9L, 11L, 12L, 13L = 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13h Lichtphase; 0L = Beginn der Lichtphase (nach 9h Dunkelphase); 0D = Beginn der Dunkelphase (nach 15h Lichtphase).

Wie Abb. 3.9 zeigt, unterlag die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU und DHODH einem deutlichen diurnalen Rhythmus: Mit Beginn der Lichtphase nahm die spezifische mRNA-Menge ab, blieb dann einige Stunden auf niedrigem Niveau, um dann gegen Ende der Lichtphase wieder anzusteigen. Die gesamte Dunkelphase über blieb die extrahierbare spezifische mRNA-Menge auf diesem höheren Niveau.

Die extrahierbare mRNA-Menge von UMP-Kinase unterlag keinem ausgeprägten diurnalen Rhythmus. Zwar schwankte die spezifische mRNA-Menge im Verlauf der untersuchten 24h, aber die Minima und Maxima der Werte waren über den gesamten Zeitraum verteilt.

### **Fazit:**

Die extrahierbaren mRNA-Mengen von CPSase LU und DHODH unterlagen in Tabak-sink-Blättern einem Tagesgang, die extrahierbare mRNA-Menge von UMP-Kinase nicht.

### 3.2.5 Einfluß der Sauerstoffverfügbarkeit auf die extrahierbare mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme

In allen lebenden Systemen läuft die Verbindung zwischen Energie liefernden Reaktionen und Energie verbrauchenden Synthesen über einige wenige energiereiche Zwischenprodukte ab, von denen ATP das wichtigste darstellt. Eine der wichtigsten Quellen zur Gewinnung von ATP stellt in fast allen Lebewesen die in den Mitochondrien ablaufende oxidative Phosphorylierung dar. Hierbei wird unter Sauerstoffverbrauch ATP aus ADP und anorganischem Phosphat gebildet.

Es wurde in Kartoffelscheiben gezeigt, daß niedrige Sauerstoffbedingungen zu einer Hemmung energiereicher Biosynthesen (Stärke, Aminosäuren) führten (Geigenberger et al., 2000). Da die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese ebenfalls unter starkem ATP-Verbrauch abläuft (siehe Abschnitt 1.1.1), wurden entsprechende Northern-Analysen mit den DNA-Sonden für CPSase LU und DHODH durchgeführt. Zusätzlich wurde das Verhalten der UMP-Kinase untersucht, die ein Bestandteil des Energiestoffwechsels ist (siehe Abb. 1.2, aus UMP und ATP entstehen hierbei zwei Nukleosid-Diphosphate - UDP und ADP).

Es wurden Kartoffelscheiben (aus noch wachsenden sink-Knollen gewonnen) verwendet, die 2 Stunden unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen inkubiert wurden (Geigenberger et al., 2000). Die Inkubationen, wovon freundlicherweise gemörsertes Material zur Verfügung gestellt wurde, wurden von Karin Bologna während ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Bologna, 2001).

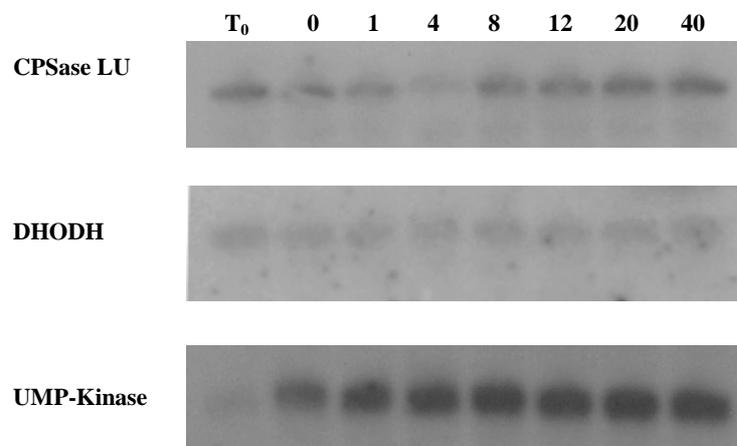


Abb. 3.10a Einfluß der Sauerstoffverfügbarkeit auf die extrahierbare Menge der mRNA von CPSase LU, DHODH und UMP-Kinase in Kartoffel-sink-Knollen

Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen. T<sub>0</sub> = Nullwert; 0, 1, 4, 8, 12, 20, 40 = Inkubation für 2h in 0, 1, 4, 8, 12, 20, 40% Sauerstoff.

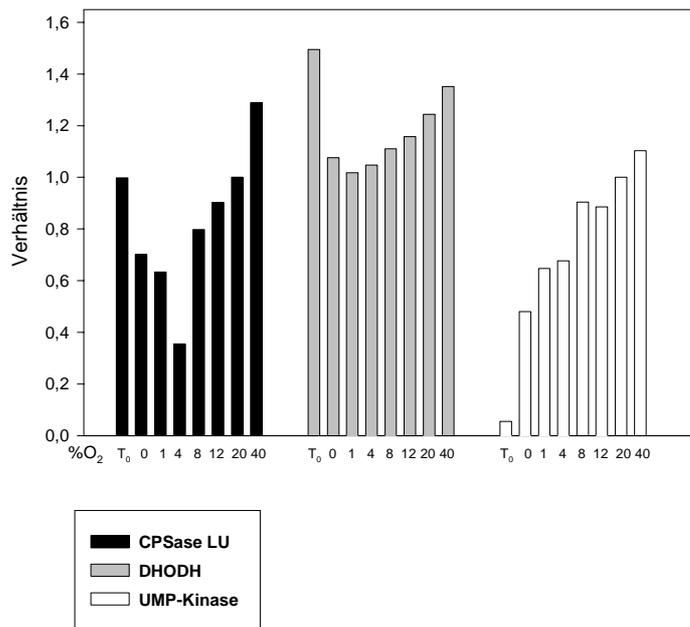


Abb. 3.10b Einfluß der Sauerstoffverfügbarkeit auf die extrahierbare Menge der mRNA von CPSase LU, DHODH und UMP-Kinase in Kartoffel-sink-Knollen

Intensitätsanalyse der Banden der Blots aus Abb. 3.10a. Der Wert für die Inkubation bei 20% Sauerstoff wurde = 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gestellt. T<sub>0</sub> = Nullwert; 0, 1, 4, 8, 12, 20, 40 = Inkubation für 2h in 0, 1, 4, 8, 12, 20, 40% Sauerstoff.

Messungen ergaben, daß wachsende Kartoffelknollen einen deutlichen internen Sauerstoffgradienten aufweisen (Geigenberger et al., 2000). Der Sauerstoffgehalt liegt bei 15-11% unmittelbar unter dem Periderm und sinkt auf 5% in der Knollenmitte. In diesem Bereich muß der Sauerstoffgehalt in den Nullwert-Proben gesehen werden.

Wie Abb. 3.10 zeigt, nahm die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU und DHODH bei Inkubation unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen im Vergleich zum Nullwert ab. Je mehr Sauerstoff bei der Inkubation zur Verfügung gestellt wurde, um so größer war in der Regel die extrahierbare spezifische mRNA-Menge. Die im Nullwert vorgefundenen spezifischen mRNA-Mengen wurden erst bei hohen Sauerstoffkonzentrationen erreicht bzw. übertroffen.

Für UMP-Kinase wurde aus dem Nullwert am wenigsten spezifische mRNA extrahiert. Die Stärke der Signale nahm mit zunehmender Sauerstoffkonzentration kontinuierlich zu.

### **Fazit:**

Bei Inkubation von Kartoffelscheiben unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen waren die extrahierbaren mRNA-Mengen von CPSase LU, DHODH und UMP-Kinase um so größer je höher die externe Sauerstoffkonzentration war.

### 3.3 Analyse der Regulation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese durch Metabolite

In jedem Organismus laufen ständig viele tausend Reaktionen ab, die zum größten Teil direkt oder indirekt miteinander verbunden sind. Ein derart komplexes Gefüge muß flexibel und genau regulierbar sein, um auf interne oder externe Änderungen und Signale reagieren zu können.

Die Regulierung kann zum einen über eine Steuerung der katalytischen Aktivität eines Enzyms erfolgen, was üblicherweise mittels End- oder Zwischenprodukten des Stoffwechselweges bzw. Substraten des Enzyms geschieht. Ein gut untersuchtes Beispiel in diesem Zusammenhang stellt die ATCase in *E.coli* dar (Gerhart, 1970), wobei die Regulation über negative Rückkopplung von CTP geschieht.

Eine andere Möglichkeit zur Regulierung eines Stoffwechselweges besteht in der Steuerung der Menge eines bestimmten Enzyms. Hierbei spielen die Synthese- und die Abbaurate eine wichtige Rolle. Die Regulierung über die Synthese – die Expression eines Genproduktes – kann auf der Ebene von Transkription, Translation, Modifikation und Transport zum Zielort erfolgen. Auch hierbei spielen Stoffwechselprodukte und Enzymsubstrate eine Rolle. Ein bekanntes Beispiel stellt das lac-operon in *E.coli* dar (Jacob und Monod, 1961). Hierbei erfolgt die Genexpression von  $\beta$ -Galactosidase nur dann, wenn geeignetes Substrat vorhanden ist.

Die Regulation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese wurde in Bakterien (Gerhart, 1970; Kholti et al., 1998) und Hefe (Flynn und Reece, 1999) bereits untersucht. Für Pflanzen liegen nur wenige Untersuchungen zur Regulierung des Stoffwechselweges über die Steuerung der Expression (UMP-Synthase: Santoso und Thornburg, 1998 und 2000) oder der Aktivität (CPSase: O'Neal und Naylor, 1976) vor.

Ob Substrate oder Zwischen- und Endprodukte einen Einfluß auf die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese haben, wurde in verschiedenen Geweben von Tabak und Kartoffel untersucht, wobei auch Beziehungen zu anderen Stoffwechselwegen berücksichtigt wurden.

### 3.3.1 Einfluß von Phosphat

Phosphat stellt einen für den pflanzlichen Organismus essentiellen Nährstoff dar. Dies wurde bereits in zahlreichen Abhandlungen dargestellt (z.B. Raghothama, 1999), aber über die Bedeutung für die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese ist kaum etwas bekannt. Phosphat stellt in der Form von PRPP ein direktes Substrat der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese dar (siehe Abb. 1.1). Der Einfluß einer Variation des internen Phosphatgehaltes in Pflanzen auf die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese wurde in verschiedenen Geweben von Tabak untersucht:

Hierzu wurden Tabakpflanzen in einer hydroponischen Anzucht (siehe Abschnitt 2.2.1.5) im Gewächshaus<sup>3</sup> unter verschiedenen Phosphatkonzentrationen angezogen. Eine hydroponische Anzucht bot den Vorteil, daß Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen kultiviert und die Phosphatkonzentrationen einfach und im laufenden Versuch variiert werden konnten. Wurzeln wurden nach Abspülen mit Wasser (um Reste des Flüssigmediums zu entfernen) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei source-Blättern wurden Blattscheiben zwischen den großen Leitbündeln ausgestanzt und bei Licht eingefroren.

Im folgenden ist mit Phosphatgehalt die Konzentration an anorganischem Phosphat gemeint.

#### 3.3.1.1 Etablierung einer Möglichkeit, den Phosphatgehalt in Pflanzen *in vivo* zu beeinflussen

Um den Einfluß des Phosphatgehaltes in Pflanzen auf die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese untersuchen zu können, war es eine Grundbedingung, die interne Phosphatmenge in den Versuchspflanzen eindeutig im Vergleich zu einer Kontrolle zu verändern. Hierzu wurden mehrere Anzuchten zur Etablierung einer geeigneten Methode durchgeführt.

(1) Der Phosphatgehalt in Pflanzen sollte durch Erhöhung der Phosphatkonzentration in der Nährlösung beeinflusst werden.

Es wurden Tabakpflanzen in Hydroponik-Nährlösung mit 0,1mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  angezogen. In jedem der Töpfe befanden sich je 4 möglichst identische Pflanzen. Nach 3 Wochen wurde in 3 Anzuchtöpfen der Phosphatgehalt auf 2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  erhöht, 3 Töpfe wurden als Kontrolle bei 0,1mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  belassen. Der Versuchsbeginn war um 09.00 Uhr, nach 3h, 8h, 27h und 51h wurde pro Topf eine Pflanze entnommen und die gewünschten Gewebe (source-Blatt, Wurzel) geerntet.

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes (Itaya und Ui, 1966) in ethanologischen Extrakten von source-Blatt- sowie Wurzelmaterial zeigte jedoch, daß durch die Erhöhung der Phosphatkonzentration im Medium der Pflanzen-interne Phosphatgehalt nicht geändert wurde (Abb. 3.11). Die gewählten Bedingungen erwiesen sich als ungeeignet.

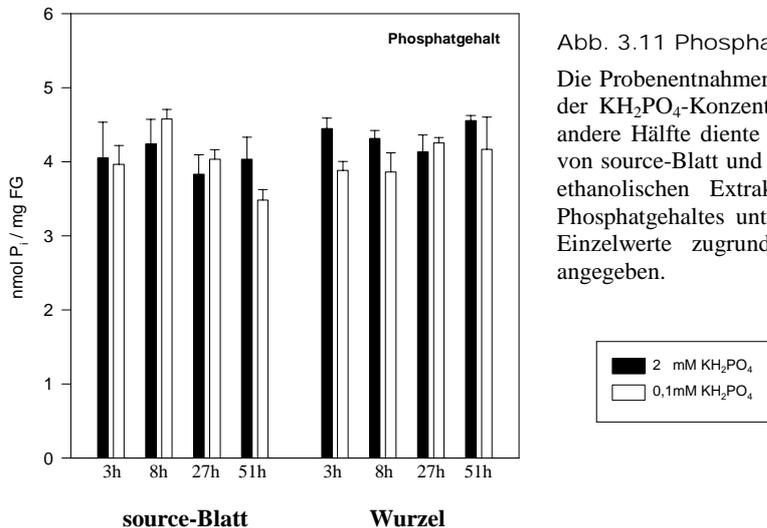


Abb. 3.11 Phosphatgehalt der Pflanzen

Die Probenentnahmen erfolgten 3h, 8h, 27h und 51h nach Erhöhung der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; die andere Hälfte diente als Kontrolle bei 0,1mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Es wurden von source-Blatt und Wurzel je ca. 20mg gemörstertes Material einer ethanologischen Extraktion und anschließenden Bestimmung des Phosphatgehaltes unterzogen. Jedem Wert der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

(2) Der Phosphatgehalt in Pflanzen sollte durch Nährlösung ohne Phosphat beeinflusst werden.

Es wurden Tabakpflanzen in Hydroponik-Nährlösung mit 1mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  angezogen. In jedem der Töpfe befanden sich je 4 möglichst identische Pflanzen. Nach 2,5 Wochen wurden die Pflanzen in frische Töpfe überführt und die Wurzeln vorher kurz mit Wasser abgespült. In 3 Anzuchttöpfen wurde der Phosphatgehalt als Kontrolle bei 1mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  belassen, 3 Töpfe enthielten kein Phosphat mehr in der Hydroponik-Nährlösung. Der Versuchsbeginn war um 09.00 Uhr, nach 24h, 48h, 72h und 96h wurde pro Topf eine Pflanze entnommen und die gewünschten Gewebe (source-Blatt, Wurzel) geerntet.

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes in ethanologischen Extrakten von source-Blatt- sowie Wurzelmaterial zeigte eine deutliche Beeinflussung des Pflanzen-internen Phosphatgehaltes durch die gewählten Versuchsbedingungen (Abb. 3.12). Eine Überführung der Pflanzen von 1mM auf 0mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  führte bereits bei der ersten Probenentnahme nach 24h zu einer deutlichen Senkung des Phosphatgehaltes in den betroffenen Pflanzen. Dies wurde sowohl in source-Blatt als auch in Wurzel beobachtet. Während der Phosphatgehalt in den Pflanzen bei 1mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf gleichen Niveau verblieb, sank er in den Pflanzen mit 0mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  im Medium im Laufe der Zeit weiter ab, in den Wurzeln stärker als in den source-Blättern.

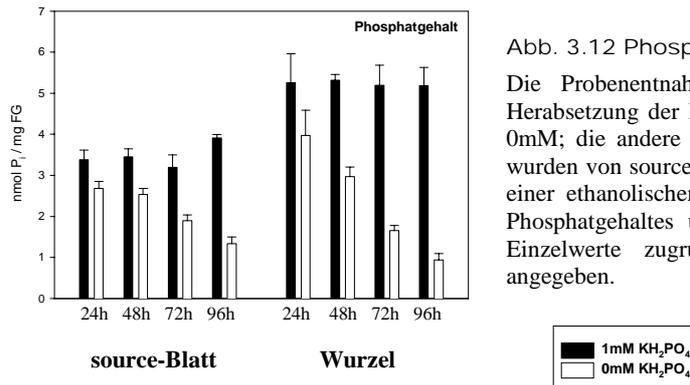


Abb. 3.12 Phosphatgehalt der Pflanzen

Die Probenentnahmen erfolgten 24h, 48h, 72h und 96h nach Herabsetzung der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 0mM; die andere Hälfte diente als Kontrolle bei 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Es wurden von source-Blatt und Wurzel je ca. 20mg gemörsertes Material einer ethanolischen Extraktion und anschließenden Bestimmung des Phosphatgehaltes unterzogen. Jedem Wert der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

### 3.3.1.2 Beeinflussung der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese bei Phosphatzufuhr in phosphatverarmten Pflanzen

Wie Abschnitt 3.3.1.1 zeigt, war eine Anzucht bei 0,1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> für das Wachstum der Pflanzen ausreichend, so daß eine Erhöhung auf 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> keinen Effekt auf den internen Phosphatgehalt der Pflanzen hatte. Eine 4tägige Inkubation ohne Phosphat zeigte eine deutliche Senkung des Pflanzen-internen Phosphatgehaltes. Aufbauend auf diesen Vorversuchen wurden Bedingungen gewählt, die in den zunächst gut versorgten Pflanzen zu einer deutlichen Phosphatverarmung führten, die dann durch erneute Phosphatzufuhr einen deutlichen Effekt zeigen sollten.

Es wurden Tabakpflanzen in Hydroponik-Nährlösung mit 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> angezogen. Nach 5 Wochen wurden alle Töpfe gewechselt, die Wurzeln der Pflanzen kurz in Wasser abgespült und die Pflanzen fortan bei 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in Hydroponik-Nährlösung kultiviert. In jedem der Töpfe befanden sich je 4 möglichst identische Pflanzen. 9 Tage später wurde in 3 Anzuchttöpfen 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> verabreicht (die Pflanzen sollen im folgenden als P<sup>+</sup>-Pflanzen bezeichnet werden), 3 Töpfe wurden als Kontrolle bei 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> belassen (die Pflanzen sollen im folgenden als P<sup>-</sup>-Pflanzen bezeichnet werden). Der Versuchsbeginn war um 09.00 Uhr, nach 3h, 27h und 51h wurde pro Topf eine Pflanze entnommen und analysiert.

Während der 51stündigen Dauer der Inkubation war keine Zunahme an Biomasse mehr zu detektieren, was unter Umständen am Alter der Pflanzen lag, die kurz vor dem Eintritt in die Blühphase standen. Auch das Sproß-Wurzel-Verhältnis zeigte keine signifikanten Änderungen (Daten nicht gezeigt).

Das geerntete source-Blatt- und Wurzelmaterial wurde gemörsert, extrahiert und analysiert.

## (1) Bestimmung des Phosphatgehaltes

Es mußte festgestellt werden, ob die Änderung der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – Konzentration im Medium von einer Pflanzen-internen Änderung des Phosphatgehaltes begleitet war. Deshalb wurden ethanolsche Extrakte von source-Blatt- und Wurzelmaterial einer Bestimmung des Phosphatgehaltes unterzogen.

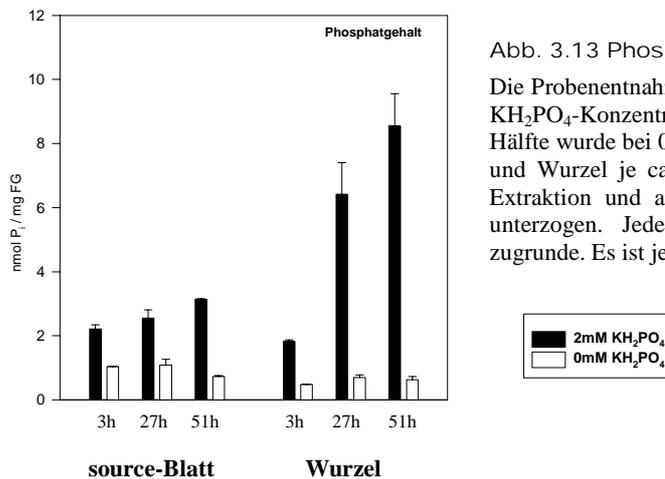


Abb. 3.13 Phosphatgehalt der Pflanzen

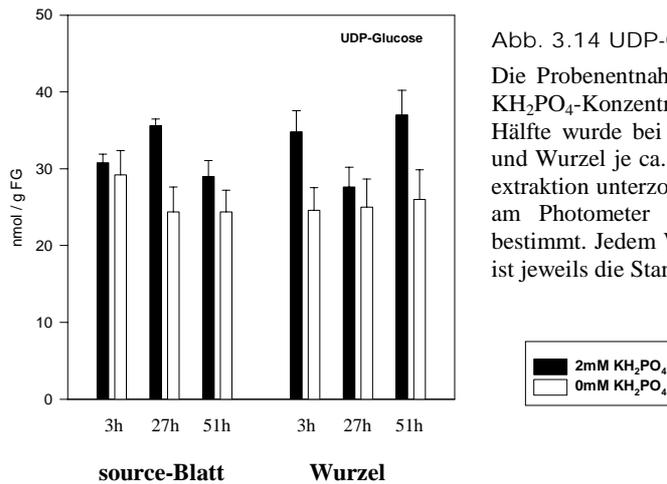
Die Probenentnahmen erfolgten 3h, 27h und 51h nach Erhöhung der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; die andere Hälfte wurde bei 0mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  belassen. Es wurden von source-Blatt und Wurzel je ca. 20mg gemörstertes Material einer ethanolschen Extraktion und anschließenden Bestimmung des Phosphatgehaltes unterzogen. Jedem Wert der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

Eine Erhöhung der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – Konzentration im Medium von 0mM auf 2mM führte bereits nach 3h zu einer deutlichen Zunahme des Phosphatgehaltes in den Pflanzen (Abb. 3.13). Dies wurde sowohl in source-Blatt als auch in Wurzel beobachtet. Während der Phosphatgehalt in den P<sup>-</sup>-Pflanzen auf niedrigem Niveau verblieb, stieg er in den P<sup>+</sup>-Pflanzen nach 27h und 51h weiter an, in den Wurzeln stärker als im source-Blatt.

Die gewählten Versuchsbedingungen erwiesen sich als geeignet, den Pflanzen-internen Phosphatgehalt zu verändern und den Einfluß davon auf die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese zu untersuchen.

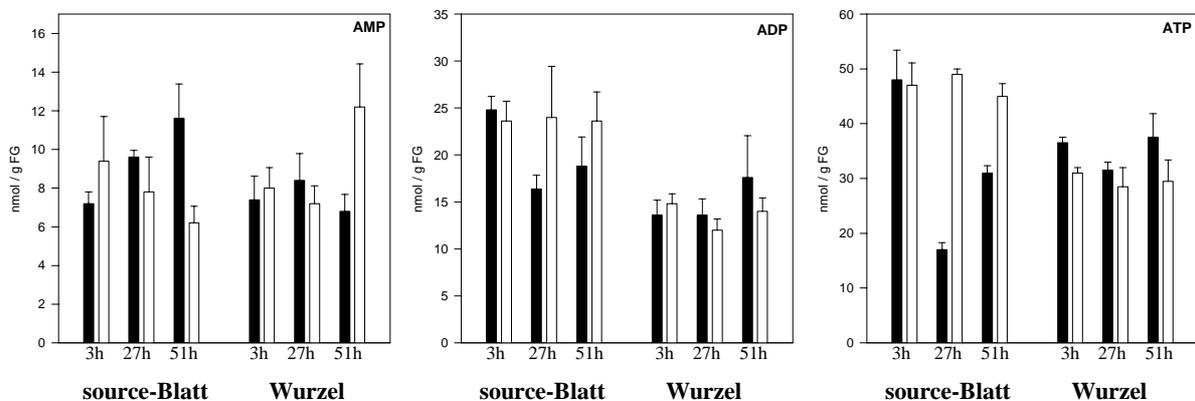
## (2) Phosphatabhängige Variation von Nukleotid-Konzentrationen

Ein beträchtlicher Anteil der insgesamt vorhandenen Nukleotide in Pflanzenzellen liegen in Form von Nukleosid-Diphosphat-Zuckern vor, wobei UDP-Zucker den Hauptanteil stellen (Meyer und Wagner, 1986) Von diesen ist UDP-Glucose am wichtigsten – auch wegen seiner zentralen Position innerhalb des Kohlenhydratstoffwechsels (siehe Abb. 1.5).



In allen untersuchten Geweben war der UDP-Glucose-Gehalt bei den  $\text{P}^+$ -Pflanzen größer als bei den  $\text{P}^-$ -Pflanzen (Abb. 3.14). Dies konnte bereits nach 3h festgestellt werden und war in den Wurzeln besonders ausgeprägt.

Wegen ihrer zentralen Rolle im Energiestoffwechsel jedes Organismus wurden zusätzlich die Konzentrationen von AMP, ADP und ATP bestimmt (Abb. 3.15).



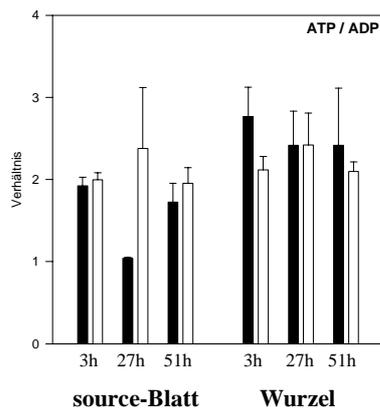


Abb. 3.16 ATP/ADP-Verhältnis

Das Verhältnis von ATP zu ADP (siehe Abb. 3.15). 3h, 27h und 51h = 3h, 27h und 51h nach Versuchsbeginn. Jedem Wert der Abbildung liegen je 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

Die Auswertung der Konzentrationsbestimmungen von AMP, ADP und ATP (Abb. 3.15) ergab, daß bei den P<sup>+</sup>-Pflanzen im Vergleich zu den P<sup>-</sup>-Pflanzen vor allem in den source-Blättern eine Änderung der Verhältnisse stattfand. Nach 3h konnte in allen untersuchten Geweben noch keine Änderung der untersuchten Purinnukleotid-Konzentrationen aufgrund der Phosphatzufuhr festgestellt werden. 27h nach Versuchsbeginn waren die Konzentrationen an ADP und in noch stärkerem Maße ATP in den source-Blättern der P<sup>+</sup>-Pflanzen im Vergleich zu den P<sup>-</sup>-Pflanzen signifikant gesunken. Dies war auch 51h nach Versuchsbeginn der Fall, allerdings waren die ADP- und ATP-Konzentrationen in den source-Blättern der P<sup>+</sup>-Pflanzen bereits wieder höher als die entsprechenden 27h-Werte. Die AMP-Konzentrationen hingegen waren in den source-Blättern der P<sup>+</sup>-Pflanzen größer als bei den P<sup>-</sup>-Pflanzen. In den Wurzeln bewirkte die Phosphatzufuhr keine signifikante Änderung der AMP- und ADP-Konzentrationen, während die ATP-Konzentration bei den P<sup>+</sup>-Pflanzen geringfügig größer war als bei den P<sup>-</sup>-Pflanzen. Das ATP/ADP-Verhältnis war in den meisten Fällen von der Phosphatverfügbarkeit unbeeinflusst geblieben (Abb. 3.16); eine deutliche Ausnahme stellte der 27h-Wert der source-Blätter der P<sup>+</sup>-Pflanzen dar: hier war das Verhältnis signifikant in Richtung ADP verschoben.

### (3) Einfluß der Phosphatverfügbarkeit auf Gesamt-Aminosäure- und Gesamt-Protein-Gehalt

Die meisten Biosynthesen in Organismen verlaufen unter Verbrauch von ATP und sind somit abhängig von der Verfügbarkeit von Phosphat. Als ein Beispiel können der Aminosäuren- und Proteinhaushalt herangezogen werden. Um zu untersuchen, ob die Phosphatverfügbarkeit einen Einfluß darauf hatte, wurden Gesamt-Aminosäure- und Gesamt-Protein-Gehalt in source-Blatt und Wurzel bestimmt (Abb. 3.17).

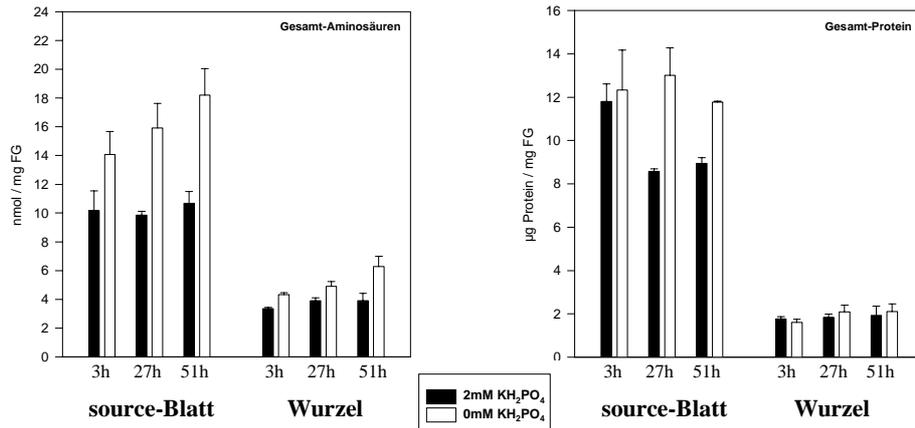


Abb. 3.17 Gesamt-Aminosäure- und Gesamt-Protein-Gehalt

Die Probenentnahmen erfolgten 3h, 27h und 51h nach Erhöhung der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; die andere Hälfte wurde bei 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> belassen. Es wurden von source-Blatt und Wurzel je ca. 20mg gemörstertes Material einer ethanolischen Extraktion und anschließenden Bestimmung des Gesamt-Aminosäure-Gehaltes unterzogen. Ungefähr 20mg gemörstertes Material wurden in PMSF-Extraktionspuffer aufgenommen und der Gesamt-Protein-Gehalt am Photometer nach Bradford, 1976 bestimmt. Jedem Wert der Abbildung liegen je 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

Wie Abb. 3.17 zeigt, enthielten source-Blätter unter jeder Bedingung mehr Aminosäuren und Protein je mg Frischgewicht als Wurzeln.

Bereits 3h nach Versuchsbeginn waren Gesamt-Aminosäuren- und Gesamt-Protein-Gehalt in den source-Blättern der P<sup>+</sup>-Pflanzen geringer als bei den P<sup>-</sup>-Pflanzen (Abb. 3.17). In den source-Blättern der P<sup>-</sup>-Pflanzen nahm der Gesamt-Aminosäure-Gehalt mit der Zeit zu, während er in den source-Blättern der P<sup>+</sup>-Pflanzen gleich blieb. Der Gesamt-Protein-Gehalt blieb in den source-Blättern der P<sup>-</sup>-Pflanzen gleich, bei den P<sup>+</sup>-Pflanzen nahm er ab.

Während der Gesamt-Protein-Gehalt in den Wurzeln unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit auf etwa gleichem Niveau blieb, nahm der Gesamt-Aminosäure-Gehalt in den P<sup>-</sup>-Pflanzen mit der Zeit zu und war bereits nach 3h größer als der konstant bleibende Gehalt in den Wurzeln der P<sup>+</sup>-Pflanzen (Abb. 3.17).

#### (4) Einfluß der Phosphatverfügbarkeit auf Konzentrationen von Kohlenhydraten

Sowohl für die Saccharose- als auch für die Stärkesynthese dienen Nucleosiddiphosphat-Zucker als Vorstufe. Für Saccharose handelt es sich dabei um UDP-Glucose, für Stärke um ADP-Glucose. Der Glucose-Anteil kommt direkt aus der Photosynthese, der Nucleosiddiphosphat-Anteil aus dem Nucleotidstoffwechsel. Kohlenhydratstoffwechsel und Pyrimidinnucleotid *de novo* Synthese hängen eng zusammen, wobei UDP-Glucose eine zentrale Position zukommt (siehe Abschnitt 1.1.3.2).

Um den Einfluß der Phosphatverfügbarkeit auf den Kohlenhydratstoffwechsel zu untersuchen, wurde der Gehalt an Saccharose, das in Pflanzen das wichtigste Transportkohlenhydrat darstellt, in verschiedenen Geweben bestimmt. Außerdem wurden die Konzentrationen von Glucose und Fructose ermittelt, die in modifizierter Form Bestandteil vieler Stoffwechselwege sind.

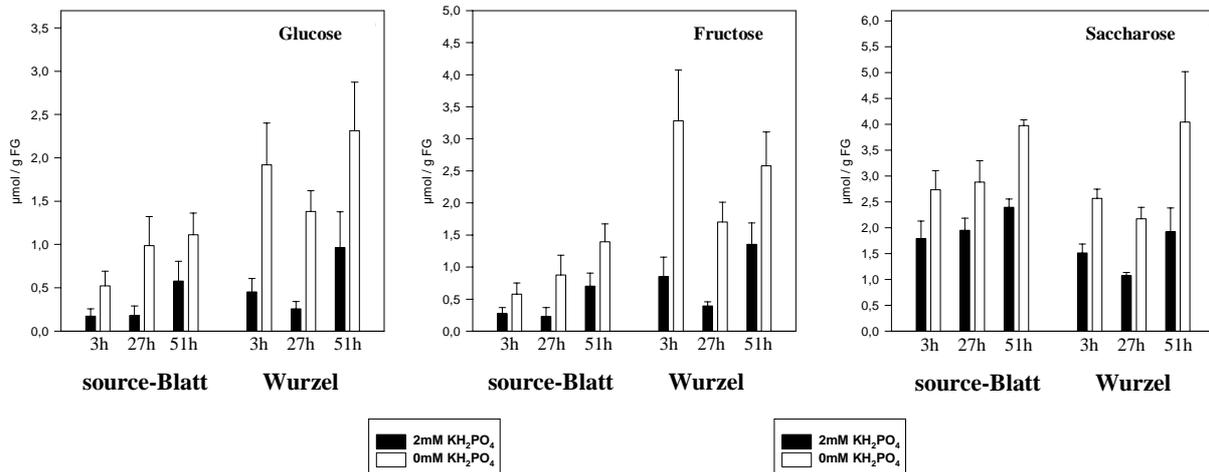


Abb. 3.18 Konzentrationen von Glucose, Fructose, Saccharose

Die Probenentnahmen erfolgten 3h, 27h und 51h nach Erhöhung der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; die andere Hälfte wurde bei 0mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  belassen. Es wurden von source-Blatt und Wurzel je ca. 20mg gemörseretes Material einer ethanolanischen Extraktion unterzogen und anschließend die Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose am Photometer über gekoppelte enzymatische Testverfahren bestimmt. Jedem Wert der Abbildung liegen je 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

In jedem untersuchten Gewebe waren die Konzentrationen aller 3 analysierten Kohlenhydrate bei den  $\text{P}^-$ -Pflanzen größer als bei den  $\text{P}^+$ -Pflanzen (Abb. 3.18). Dies konnte bereits in den Proben beobachtet werden, die 3h nach Versuchsbeginn entnommen worden waren. Mit der Zeit nahmen alle untersuchten Kohlenhydratkonzentrationen unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit sowohl in source-Blatt als auch in Wurzel zu. Dabei waren die Werte für die  $\text{P}^-$ -Pflanzen stets wesentlich größer.

Phosphorylierte Zucker sind eine weitere wichtige Klasse von Kohlenhydrat-Derivaten, die Bestandteil vieler Stoffwechsel-Reaktionen sind. Bei der Synthese und beim Abbau von Kohlenhydraten sind phosphorylierte Zucker wichtige Intermediate.

Ob das Vorhandensein phosphorylierter Zucker auch von der Phosphatverfügbarkeit abhängig war, wurde beispielhaft an den Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat untersucht, die Zwischenprodukte bei der Glykolyse, der Saccharosesynthese und anderer Reaktionen sind.

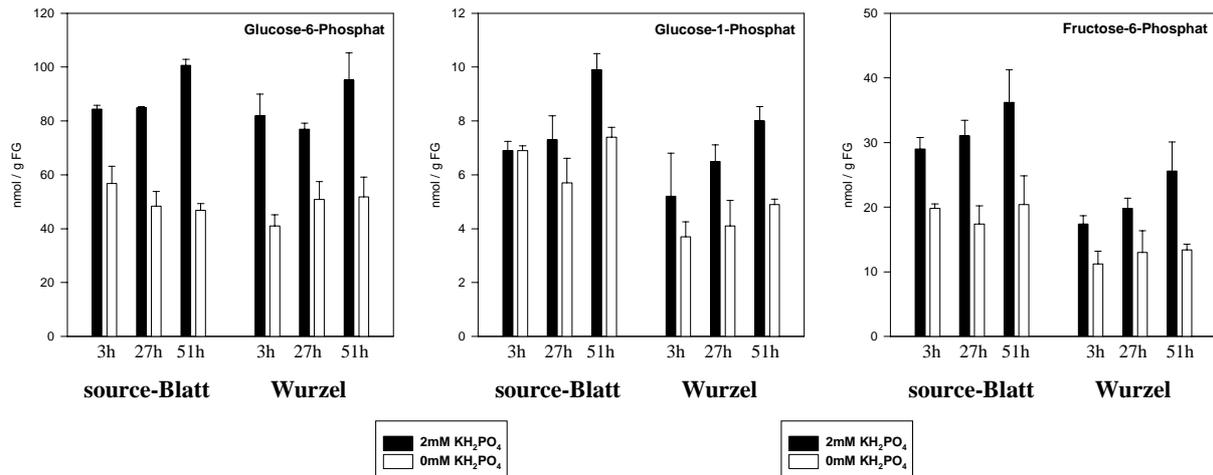


Abb. 3.19 Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat

Die Probenentnahmen erfolgten 3h, 27h und 51h nach Erhöhung der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; die andere Hälfte wurde bei 0mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  belassen. Es wurden von source-Blatt und Wurzel je ca. 200mg gemörstertes Material einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat am Photometer über gekoppelte enzymatische Testverfahren bestimmt. Jedem Wert der Abbildung liegen je 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

In jedem untersuchten Gewebe waren die Konzentrationen aller 3 analysierten phosphorylierten Kohlenhydrate bei den  $\text{P}^-$ -Pflanzen kleiner als bei den  $\text{P}^+$ -Pflanzen (Abb. 3.19). Dies konnte (bis auf Glucose-1-Phosphat in source-Blatt) bereits in den Proben beobachtet werden, die 3h nach Versuchsbeginn entnommen worden waren. In den  $\text{P}^+$ -Pflanzen nahmen alle 3 Metabolitkonzentrationen in jedem untersuchten Gewebe mit der Zeit weiter zu, während sie bei den  $\text{P}^-$ -Pflanzen relativ konstant blieben.

#### (5) Phosphatabhängige Variation der extrahierbaren mRNA-Menge von CPSase LU und UMP-Kinase

Bei der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese ist die Herstellung von Carbamoylphosphat durch CPSase ein limitierender Schritt (O'Neal und Naylor, 1976). Um festzustellen, ob die Variation des Phosphatgehaltes in den Pflanzen einen Einfluß auf die Expression dieses limitierenden Schrittes hat, wurde die extrahierbare mRNA-Menge der CPSase LU – der die eigentliche katalytische Funktion der CPSase zukommt – in verschiedenen Geweben untersucht.

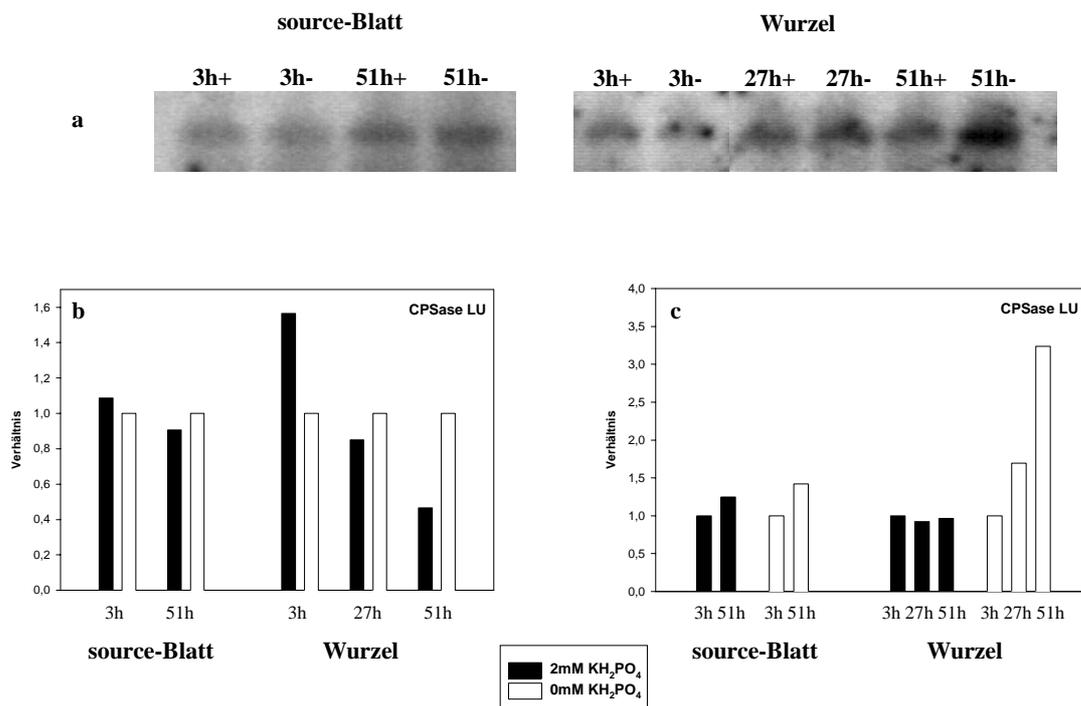


Abb. 3.20 Phosphatabhängige Unterschiede der extrahierbaren Menge der CPSase LU - mRNA

**a:** Northern-Blots, nach Hybridisierung mit der CPSase LU-Sonde. 3h+, 27h+, 51h+ = 3h, 27h und 51h nach Erhöhung der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; 3h-, 27h-, 51h- = Kontrolle mit 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> im Medium 3h, 27h und 51h nach Versuchsbeginn. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots: Vergleich der P<sup>+</sup>-Pflanzen-Proben eines Zeitpunktes mit den entsprechenden P<sup>-</sup>-Pflanzen-Proben. Die Werte für die Inkubation bei 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden stets = 1 gesetzt und die Werte der Inkubation bei 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dazu ins Verhältnis gestellt.

**c:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots: Analyse der extrahierbaren, spezifischen mRNA-Mengen in den untersuchten Geweben über die *gesamte* Versuchsdauer. Der 3h-Wert wurde stets = 1 gesetzt und die entsprechenden 27h- bzw. 51h-Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

Wie Abb. 3.20a, b zeigt, war in allen untersuchten Geweben die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU bei den P<sup>+</sup>-Pflanzen nach 27 bzw. 51h niedriger als bei den P<sup>-</sup>-Pflanzen. In den Wurzeln war dies ausgeprägter als in den source-Blättern. 3h nach Versuchsbeginn waren die Verhältnisse umgekehrt: Aus allen untersuchten Geweben der P<sup>-</sup>-Pflanzen wurde weniger CPSase-spezifische mRNA isoliert als aus den entsprechenden Geweben der P<sup>+</sup>-Pflanzen. Wiederum war dieser Effekt in den Wurzeln stärker als in source-Blättern.

Abb. 3.20a, c zeigt zudem, daß über die Versuchsdauer die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU vor allem in den Wurzeln aber auch in den source-Blättern der P<sup>-</sup>-Pflanzen stark zunahm. Dies wurde auch in den source-Blättern der P<sup>+</sup>-Pflanzen beobachtet, jedoch nicht in deren Wurzeln.

Weiterhin wurde die spezifische mRNA-Menge von UMP-Kinase analysiert, um die Verbindung zum ATP-ADP-Stoffwechsel herzustellen.

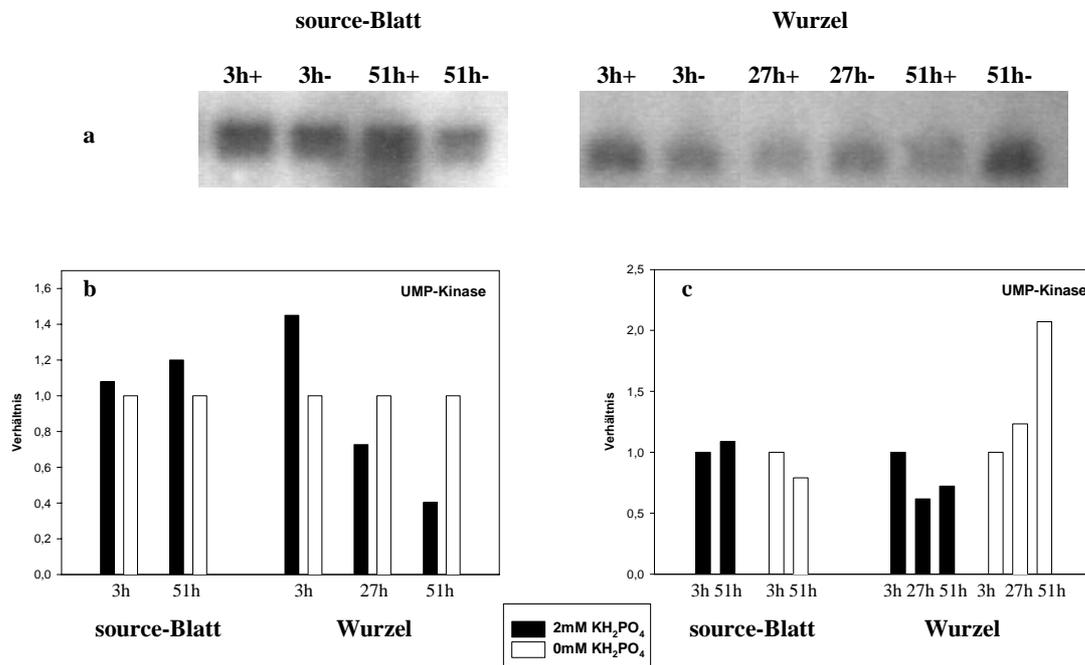


Abb. 3.21 Phosphatabhängige Unterschiede der extrahierbaren Menge der UMP-Kinase - mRNA

**a:** Northern-Blots, nach Hybridisierung mit der UMP-Kinase-Sonde. 3h+, 27h+, 51h+ = 3h, 27h und 51h nach Erhöhung der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; 3h-, 27h-, 51h- = Kontrolle mit 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> im Medium 3h, 27h und 51h nach Versuchsbeginn. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots: Vergleich der P<sup>+</sup>-Pflanzen-Proben eines Zeitpunktes mit den entsprechenden P<sup>-</sup>-Pflanzen-Proben. Die Werte für die Inkubation bei 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden stets = 1 gesetzt und die Werte der Inkubation bei 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dazu ins Verhältnis gestellt.

**c:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots: Analyse der extrahierbaren, spezifischen mRNA-Mengen in den untersuchten Geweben über die *gesamte* Versuchsdauer. Der 3h-Wert wurde stets = 1 gesetzt und die entsprechenden 27h- bzw. 51h-Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

Wie Abb. 3.21a, b zeigt, war die extrahierbare mRNA-Menge der UMP-Kinase in den Wurzeln der P<sup>+</sup>-Pflanzen nach 27 bzw. 51h niedriger als in den Wurzeln der P<sup>-</sup>-Pflanzen. Dies war 3h nach Versuchsbeginn genau umgekehrt. In source-Blättern war die UMP-Kinase-spezifische mRNA-Menge bei den P<sup>-</sup>-Pflanzen stets kleiner als bei den P<sup>+</sup>-Pflanzen.

Abb. 3.21a, c zeigt zudem, daß über die Versuchsdauer die extrahierbare mRNA-Menge von UMP-Kinase in den Wurzeln der P<sup>-</sup>-Pflanzen stark zunahm, während sie in den source-Blättern leicht abnahm. Demgegenüber war in den Wurzeln der P<sup>+</sup>-Pflanzen die extrahierbare mRNA-Menge von UMP-Kinase 3h nach Versuchsbeginn größer als nach 27 bzw. 51h (wobei der 51h-Wert größer als der 27h-Wert war). In den source-Blättern der P<sup>+</sup>-Pflanzen wurde eine nur minimale Zunahme der UMP-Kinase-spezifischen extrahierbaren mRNA-Menge über den Versuchszeitraum festgestellt.

(6) Phosphatabhängige Variation der extrahierbaren Proteinmenge von CPSase LU und ATCase

Die extrahierbare mRNA-Menge von spezifischen Genprodukten zeigt eine Tendenz auf, läßt jedoch keine Aussagen über die tatsächlich vorhandene Menge des Proteins *in vivo* zu. Um die tatsächlich vorhandene Menge der Enzyme, die an der Synthese von Pyrimidinnukleotiden beteiligt sind, zu ermitteln, wurden Proteinextrakte von source-Blatt und Wurzel bei einer Western-Analyse mit Antikörpern gegen CPSase LU und ATCase untersucht.

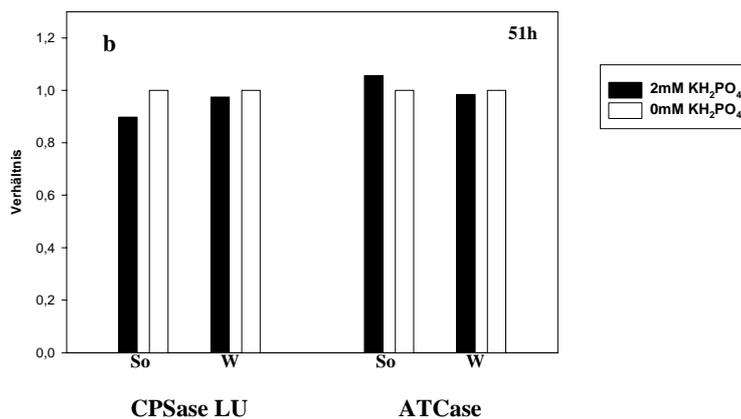
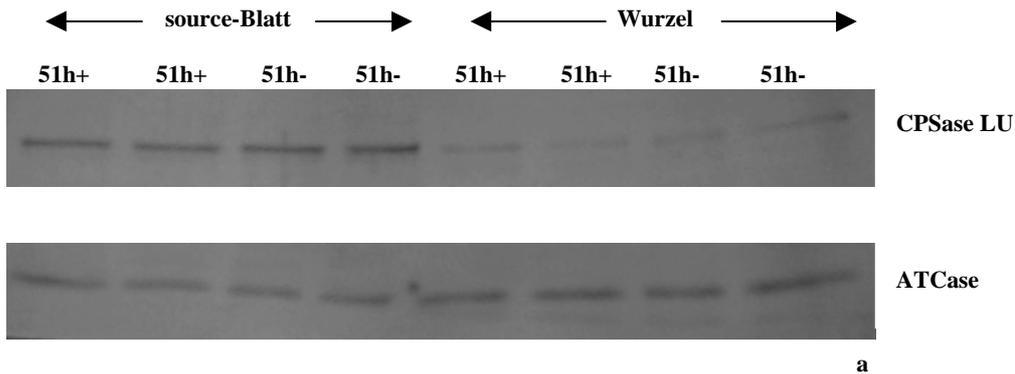


Abb. 3.22 Phosphatabhängige Unterschiede der isolierbaren Proteinmenge von CPSase LU und ATCase  
**a:** Western-Blots, nach Detektion mittels der jeweiligen Antikörper. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-Protein aufgetragen und auf 10% (v/v) - SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. 51h+ = 51h nach Erhöhung der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; 51h- = Kontrolle mit 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> im Medium 51h nach Versuchsbeginn.  
**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Die Werte für die Inkubation bei 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden stets = 1 gesetzt und die Werte der Inkubation bei 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dazu ins Verhältnis gestellt. So = source-Blatt; W = Wurzel. Jedem Wert der Abbildung liegen 2 Einzelwerte zugrunde.

Unabhängig von der Phosphatmenge in der Hydroponik-Nährlösung wurden nach 51h Versuchszeit sowohl aus source-Blatt als auch aus Wurzel ähnliche Mengen von CPSase LU- bzw. ATCase-Protein extrahiert (Abb. 3.22). Die generellen Unterschiede in der spezifischen Proteinmenge zwischen source-Blatt und Wurzel bei CPSase LU bzw. ATCase wurden in Abschnitt 3.2.3.1 besprochen.

(7) Phosphatabhängige Variation von extrahierbaren Expressionsprodukten von UGPase und SuSy

Im Kohlenhydratstoffwechsel kommt der UDP-Glucose eine zentrale Position zu, da von dort aus vielfältige Synthesewege ausgehen (siehe Abb. 1.5). Der UDP-Glucose-Gehalt in Abhängigkeit der Phosphatverfügbarkeit wurde in Abb. 3.14 dargestellt. Zusätzlich wurde eine Untersuchung der Expression der beiden Enzyme durchgeführt (Abb. 3.23; Abb. 3.24), die für den UDP-Glucose-Gehalt bedeutend sind (siehe Abschnitt 1.1.3.2): UGPase ist für die Umsetzung von UDP-Glucose aus bzw. zu Glucose-1-Phosphat und UTP zuständig, SuSy spaltet in vielen Geweben Saccharose in UDP-Glucose und Fructose auf.

Es wurde die extrahierbare mRNA-Menge von UGPase und SuSy in source-Blatt und Wurzel bestimmt. Weiterhin wurden Proteinextrakte von source-Blatt und Wurzel bei einer Western-Analyse mit einem Antikörper gegen UGPase bzw. SuSy untersucht.

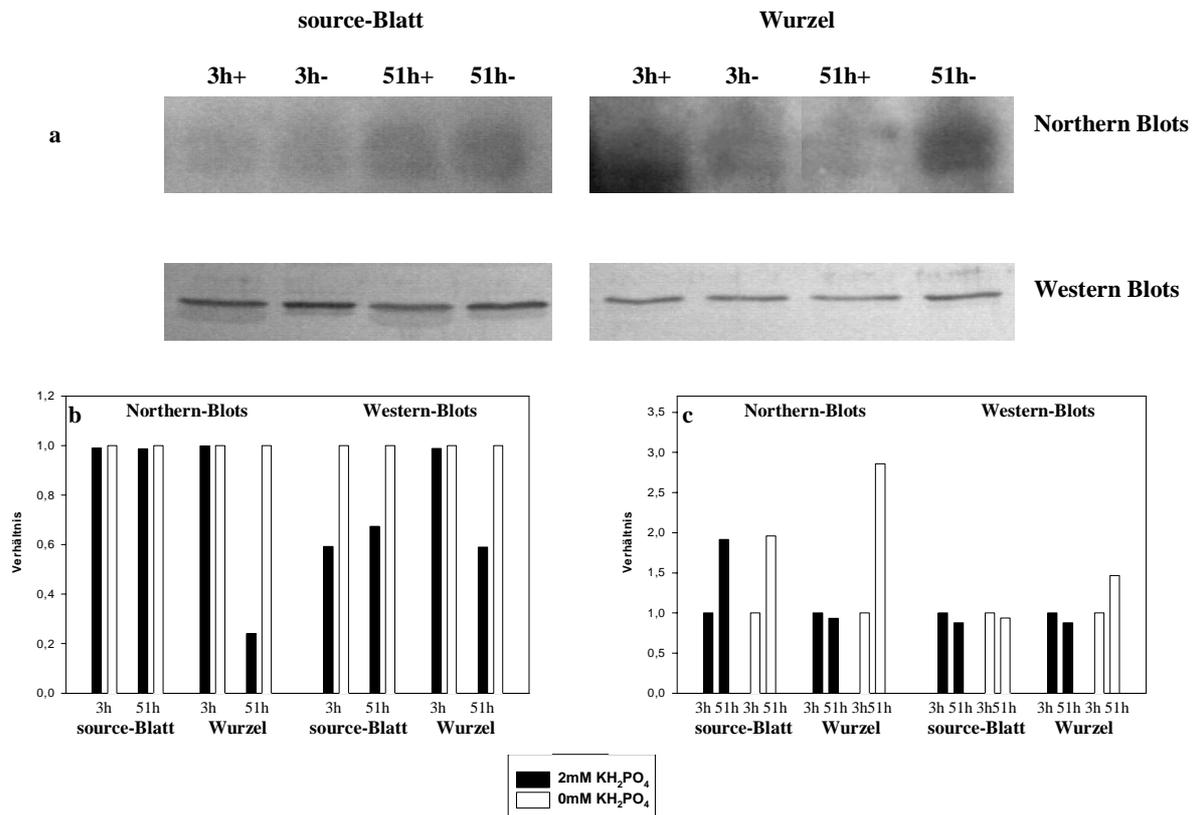


Abb. 3.23 Phosphatabhängige Unterschiede der extrahierbaren mRNA- und Proteinmenge von UGPase

**a:** Northern-Blots (nach Hybridisierung mit der UGPase-Sonde, es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen) und Western Blots (nach Detektion mittels des UGPase-Antikörpers. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-Protein aufgetragen und auf 10% (v/v) - SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt). 3h+, 51h+ = 3h und 51h nach Erhöhung der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; 3h-, 51h- = Kontrolle mit 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> im Medium 3h und 51h nach Versuchsbeginn.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots: Vergleich der P<sup>-</sup>-Pflanzen-Proben *eines* Zeitpunktes mit den entsprechenden P<sup>-</sup>-Pflanzen-Proben. Die Werte für die Inkubation bei 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden stets = 1 gesetzt und die Werte der Inkubation bei 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dazu ins Verhältnis gestellt.

**c:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots: Analyse der extrahierbaren, spezifischen mRNA-Mengen in den untersuchten Geweben über die *gesamte* Versuchsdauer. Der 3h-Wert wurde stets = 1 gesetzt und die entsprechenden 51h-Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

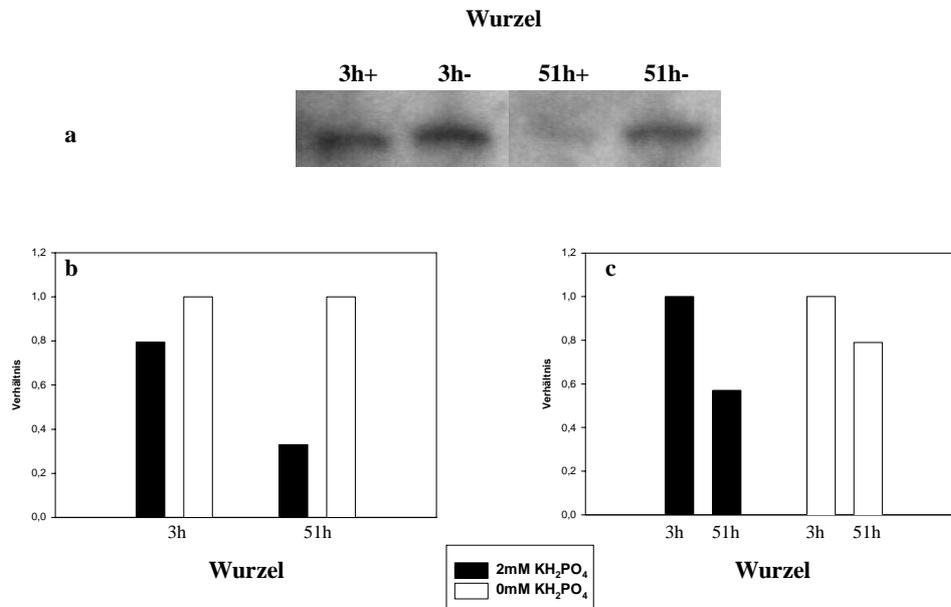


Abb. 3.24 Phosphatabhängige Unterschiede der extrahierbaren Menge der SuSy - mRNA

**a:** Northern-Blot, nach Hybridisierung mit der SuSy-Sonde. 3h+, 51h+ = 3h und 51h nach Erhöhung der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration in der Hälfte der Töpfe auf 2mM; 3h-, 51h- = Kontrolle mit 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> im Medium 3h und 51h nach Versuchsbeginn. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden des Blots: Vergleich der P<sup>+</sup>-Pflanzen-Proben *eines* Zeitpunktes mit den entsprechenden P<sup>-</sup>-Pflanzen-Proben. Die Werte für die Inkubation bei 0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden stets = 1 gesetzt und die Werte der Inkubation bei 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dazu ins Verhältnis gestellt.

**c:** Intensitätsanalyse der Banden des Blots: Analyse der extrahierbaren, spezifischen mRNA-Mengen in den Wurzeln über die *gesamte* Versuchsdauer. Der 3h-Wert wurde stets = 1 gesetzt und die entsprechenden 51h-Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

Beim Vergleich der P<sup>+</sup>-Pflanzen-Proben mit den P<sup>-</sup>-Pflanzen-Proben *eines* Zeitpunktes, konnte festgestellt werden, daß die unterschiedliche Phosphatverfügbarkeit einen Einfluß auf die extrahierbare mRNA- und Proteinmenge von UGPase und – so weit untersucht – auch von SuSy hatte (Abb. 3.23a, b und Abb. 3.24a, b):

In den Wurzeln war die extrahierbare mRNA-Menge von UGPase und SuSy nach 51h bei den P<sup>+</sup>-Pflanzen niedriger als bei den P<sup>-</sup>-Pflanzen (für SuSy galt dies bereits 3h nach Versuchsbeginn). In den source-Blättern konnten keine signifikanten, von der Phosphatverfügbarkeit abhängigen Unterschiede in der extrahierbaren mRNA-Menge von UGPase und SuSy bemerkt werden. SuSy war in source-Blättern nur sehr schwach detektierbar, so daß die Daten nicht darstellbar sind.

Die extrahierbare Proteinmenge der UGPase war in source-Blättern zu jedem untersuchten Zeitpunkt bei den P<sup>-</sup>-Pflanzen größer als bei den P<sup>+</sup>-Pflanzen. In Wurzeln wurde dies erst nach 51h festgestellt. Eine Detektion mit einem Antikörper gegen SuSy ergab bei dem verwendeten Material keine Signale (Daten nicht gezeigt).

Abb. 3.23a, c zeigt zudem, daß über die Versuchsdauer die extrahierbare mRNA-Menge von UGPase vor allem in den Wurzeln aber auch in den source-Blättern der P<sup>-</sup>-Pflanzen stark zunahm. Dies wurde auch in den source-Blättern der P<sup>+</sup>-Pflanzen beobachtet, jedoch nicht in deren Wurzeln. Die extrahierbare Proteinmenge der UGPase blieb in fast allen Fällen nahezu konstant, nur in den Wurzeln der P<sup>-</sup>-Pflanzen war eine Zunahme festzustellen.

Demgegenüber nahm die extrahierbare mRNA-Menge von SuSy in den untersuchten Wurzelproben über den Versuchszeitraum ab (Abb. 3.24a, c).

**Fazit:**

Tabakpflanzen wurden für 9 Tage von der externen Phosphatzufuhr abgeschnitten. Anschließend erhielt die Hälfte wieder Phosphat, die andere Hälfte wurde als Kontrolle ohne Phosphat belassen:

- 1.) Der Phosphatgehalt konnte in den untersuchten Tabakpflanzen gezielt verändert werden.
- 2.) In phosphatverarmten Pflanzen, die wieder Phosphat im Anzuchtmedium hatten, konnte eine Zunahme der Konzentrationen von anorganischem Phosphat, UDP-Glucose und Hexosephosphaten beobachtet werden. Gleichzeitig nahmen in den source-Blättern dieser Pflanzen die Konzentrationen von ADP und ATP ab.
- 3.) In phosphatverarmten Pflanzen waren der Gesamt-Aminosäure- und Gesamt-Protein-Gehalt sowie die Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose größer als in den Pflanzen mit externer Phosphatzufuhr und nahmen im weiteren Versuchsverlauf noch zu.
- 4.) Die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU, UMP-Kinase, UGPase und SuSy war in den Wurzeln der phosphatverarmten Pflanzen größer als bei den Pflanzen mit externer Phosphatzufuhr und nahm bis auf SuSy im weiteren Versuchsverlauf noch zu.
- 5.) Die extrahierbare Proteinmenge von CPSase LU und ATCase blieb durch die unterschiedliche Phosphatverfügbarkeit unbeeinflusst. Bei UGPase war sie in den phosphatverarmten Pflanzen größer als in den Pflanzen mit externer Phosphatzufuhr und nahm in den Wurzeln mit der Zeit noch zu.

### 3.3.2 Einfluß von Nukleotidvorstufen

Die Regulation von Biosynthesen erfolgt im Organismus häufig über eine negative Rückkopplung durch End- oder Zwischenprodukte. In wenigen Untersuchungen wurde bisher gezeigt, daß Pyrimidinnukleotide in Pflanzen an der Regulation ihres Syntheseweges beteiligt sein können (O'Neal und Naylor, 1976; Santoso und Thornburg, 1998). Hierbei wurden aber stets nur Teilschritte des Syntheseweges betrachtet.

Durch gezielte Manipulation des Nukleotidstoffwechsels in Pflanzen sollten die Auswirkungen auf die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese untersucht werden. Dabei wurde auch die Beeinflussung anderer Stoffwechselwege betrachtet. Zu diesem Zweck wurden verschiedene pflanzliche Systeme verwendet.

In allen Inkubationsversuchen bezeichnet  $T_0$  (= Nullwert) den Versuchsbeginn.

#### 3.3.2.1 Etablierung eines Systems zur Beeinflussung des Nukleotidgehalts in Pflanzen

Ziel der folgenden Experimente war es, ein System zu etablieren, mit dem der Nukleotidgehalt in Pflanzen verändert werden konnte. Deshalb wurden Tabakpflanzen auf Medium angezogen, das mit verschiedenen Nukleotidvorstufen versetzt war und mit entsprechenden Kontrollen verglichen.

(1) Anzucht auf Spezial-Fest-Medium

Es wurden oberflächensterilisierte Tabaksamen auf Spezial-Fest-Medium (siehe Abschnitt 2.2.1.1) in sterilen Anzuchtdosen kultiviert. Neben Kontrollen wurden Ansätze mit verschiedenen Nukleotidvorstufen im Medium (Uridin, Uracil und Orotat, jeweils 0,2mM bzw. 2mM) erstellt. Die Anzucht erfolgte in der Klimakammer. Nach 3,5 Wochen wurden die Pflanzen um 14.00 Uhr geerntet und das Sproßmaterial analysiert.

Die Daten der Analysen ergaben auf keiner Untersuchungsebene (mRNA-, Protein- und Nukleotidebene) eine signifikante Reaktion der Pflanzen auf die im Medium anwesenden Nukleotidvorstufen (Daten nicht gezeigt). Es konnte nicht nachgewiesen werden, daß tatsächlich eine Aufnahme der Nukleotidvorstufen erfolgt war und diese auch einen Einfluß auf den Nukleotidstoffwechsel hatten.

Das Problem bei dieser Anzuchtmethode war die Art der Nährstoffversorgung der Pflanzen: Sie wurde völlig durch die Diffusion im Medium bestimmt. Eine gleichmäßige Versorgung mit Nährstoffen und somit auch den zugeführten Nukleotidvorstufen über den gesamten Versuchsverlauf war mit diesem System nicht zu erreichen. Etwaige Effekte auf die externe Verfügbarkeit von Nukleotidvorstufen wurden aufgrund der langen Wachstumszeit auf Festmedium überlagert.

(2) Anzucht auf dem Life Raft® Floß-System

Um eine gleichmäßige Versorgung der untersuchten Pflanzen mit Nährstoffen zu erreichen, wurde eine Methode gewählt, bei der das Anzuchtmedium regelmäßig ausgetauscht werden konnte. Als geeignet wurde eine Anzucht von oberflächensterilisierten Tabaksamen auf dem Life Raft® Floß-System mit Spezial-Flüssig-Medium (siehe Abschnitt 2.2.1.1) angesehen, da hierbei die Pflanzen problemlos unter sterilen Bedingungen in frisches Medium überführt werden konnten. Damit konnte die kurzfristige Reaktion auf die externe Verfügbarkeit von Nukleotidvorstufen untersucht werden.

Die Anzucht der Tabakpflanzen erfolgte in der Klimakammer. Neben Kontrollen wurden Ansätze mit 1mM Uridin (eine Zwischenstufe der Pyrimidin-Wiederverwertungsreaktionen) verwendet. Das Medium wurde jeweils wöchentlich gewechselt. Nach 5 Wochen fand der eigentliche Versuch unter ambienten Bedingungen statt: Die Kontrollen blieben unverändert. Ein Teil der Anzuchten mit Uridin wurde unverändert belassen, der andere Teil auf Medium ohne Uridin überführt. Die Ernten erfolgten nach 24h und 72h jeweils um 14.00 Uhr. Es wurde nur Sproßmaterial analysiert.

Auch bei diesem Versuchsansatz konnten keine signifikanten und eindeutigen Veränderungen der extrahierbaren mRNA-Mengen der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme beobachtet werden (Abb. 3.25 zeigt beispielhaft das Ergebnis für CPSase LU).

Das Problem dieser Anzuchtmethode war die starke Variation der wenigen Pflanzen jedes Ansatzes. Um identischeres und vergleichbareres Ausgangsmaterial zu erhalten, wäre eine wesentlich größere Anzahl von Pflanzen nötig gewesen. Dies war jedoch mit den vorhandenen Kapazitäten nicht möglich.

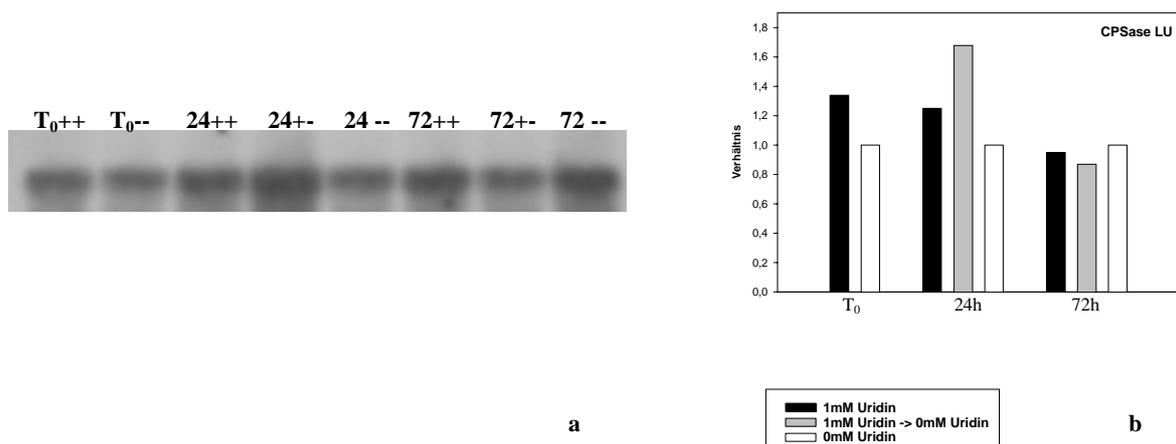


Abb. 3.25 Extrahierbare Menge der CPSase LU - mRNA in Sprossen bei unterschiedlicher Uridinverfügbarkeit

**a:** Northern-Blot, nach Hybridisierung mit der CPSase LU-Sonde. Die Pflanzen wurden mittels des Life Raft® Floß-Systems mit Spezial-Flüssig-Medium angezogen. Ein Teil der Ansätze enthielt durchgehend 1mM Uridin (++), der andere Teil diente als Kontrolle (--). Zum Versuchsbeginn (T<sub>0</sub>) wurden ein Teil der Ansätze mit Uridin auf Medium ohne Uridin (+-) überführt. Die Ernte erfolgte 24h (24++, 24+-, 24--) und 72h (72++, 72+-, 72--) nach Versuchsbeginn. Es wurden jeweils 30µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden des Blots. Die Werte für die Inkubation bei 0mM Uridin wurden stets = 1 gesetzt und die anderen Werte dazu ins Verhältnis gestellt.

### 3.3.2.2 Beeinflussung des Nukleotidgehaltes in Tabakzellkulturen

Die in Abschnitt 3.3.2.1 dargestellten Versuche schildern die Schwierigkeit, ein geeignetes System zu etablieren, mit dem eine Beeinflussung des Nukleotidgehaltes in Pflanzen möglich ist. Bei den beschriebenen Anzuchten war es zum einen schwierig, identisches und vergleichbares Ausgangsmaterial zu erhalten. Zum anderen muß berücksichtigt werden, ob die betreffende Substanz überhaupt von einer Pflanze aufgenommen werden kann bzw. ob sie jederzeit gleichmäßig verfügbar ist. Schließlich ist folgendes zu bedenken: Wenn Substanzen von außerhalb in den Pflanzenorganismus inkorporiert werden, so werden sie durch aktive oder passive Transportsysteme an den Zielort gebracht. Dabei werden u.U. weite Strecken innerhalb der Pflanze zurückgelegt und es können verschiedene Organsysteme passiert werden.

Ein geeignetes System, um Substanzen direkt ohne größere Transportwege in einen zellulären Stoffwechsel einzubringen, ist die Verwendung von Zellkulturen. Hierbei werden Einzelzellen in Suspensionskultur gehalten und können direkt mit den Substanzen versetzt werden, deren Einfluß auf den Stoffwechsel untersucht werden soll. Außerdem steht hierbei jederzeit eine ausreichende Menge von vergleichbarem und identischem Ausgangsmaterial zur Verfügung.

Es wurden Tabakzellkulturen mit verschiedenen Nukleotidvorstufen inkubiert und in mehreren Ansätzen der Einfluß auf den Nukleotidstoffwechsel untersucht. Für andere pflanzliche Zellkulturen wurde gezeigt, daß diese Vorstufen in die Zellen aufgenommen und auch metabolisiert werden (Ashihara et al., 2000).

### 3.3.2.2a Betrachtung von mit Nukleotidvorstufen inkubierten Tabakzellkulturen über einen Zeitraum von 8 Tagen

Die Umsetzung von Zellkulturen in neues Zellkultur-Medium erfolgte im Verlauf der gesamten Arbeit nach 7-8 Tagen (siehe Abschnitt 2.2.1.8). Über diesen Zeitraum sollte die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese sowohl in Kontrollansätzen als auch in Ansätzen mit zugegebenen Nukleotidvorstufen untersucht werden. Dazu wurden 10ml aus mehreren vereinigten, ungefähr 1 Woche alten Zellkulturen (siehe Abschnitt 2.2.1.8) zu 40ml Zellkultur-Medium in identische Meßkolben gegeben. An Nukleotidvorstufen wurden eingesetzt: 5mM Orotat (ein Zwischenprodukt der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese - um direkt die Biosynthese zu beeinflussen), 10mM Uridin (eine Zwischenstufe der Pyrimidin-Wiederverwertungsreaktionen - um das Verhältnis Neusynthese zu Wiederverwertungsreaktion zu beeinflussen) sowie 10mM Adenin (ein Bestandteil der Purinnukleotid-Wiederverwertungsreaktionen - um das Verhältnis Purin- zu Pyrimidinnukleotide zu variieren). Als Kontrolle dienten Ansätze in reinem Zellkultur-Medium. Mit diesem Vorversuch sollte zum einen untersucht werden, ob eine Reaktion der Zellen auf die externe Verfügbarkeit von Nukleotidvorstufen erfolgt. Zum anderen sollte ein geeigneter Inkubationszeitraum für weitergehende Analysen ermittelt werden.

Nach 1, 2, 4, 6 und 8 Tagen wurden Proben genommen: Die Zellen jeweils eines Meßkolbens einer Inkubationsreihe wurden filtriert, gewogen und eingefroren. Abb. 3.26 zeigt die erhaltenen Frischgewichte.

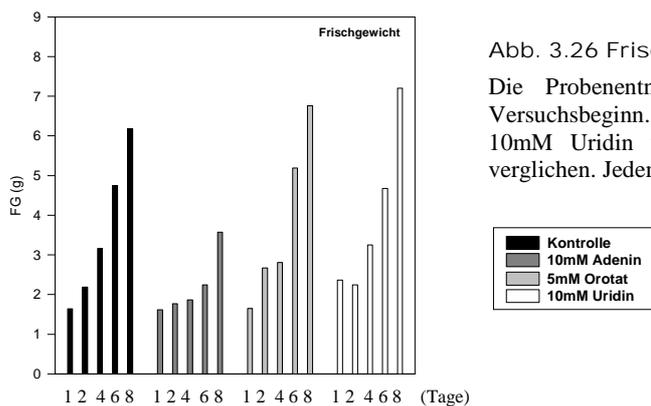


Abb. 3.26 Frischgewichtsdaten der Zellkulturen

Die Probenentnahmen erfolgten 1, 2, 4, 6, 8 Tage nach Versuchsbeginn. Ansätze mit 10mM Adenin bzw. 5mM Orotat bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Jedem Wert der Abbildung liegt 1 Einzelwert zugrunde.

Bei den Kontrollen konnte eine gleichmäßige Zunahme des Frischgewichtes beobachtet werden. Bei den Inkubationen mit Uridin und Orotat waren im wesentlichen keine Unterschiede zu den Kontrollen festzustellen. Im Fall der Adenininkubation erfolgte eine im Vergleich zur Kontrolle geringere, aber gleichmäßige Zunahme des Frischgewichts.

Das eingefrorene Zellmaterial wurde gemörsert, extrahiert und analysiert.

(1) Bestimmung des Phosphatgehaltes

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie die Ernährungssituation der Zellen zu Beginn des Versuches war und sich im Laufe der Zeit änderte, wurde beispielhaft der Phosphatgehalt sowohl in den Zellen selbst als auch im sie umgebenden Medium bestimmt. Es werden im folgenden exemplarisch die für die Kontrollansätze erhaltenen Werte angegeben. Zusätzlich werden die Werte eines weiteren Versuches herangezogen, bei dem Zellen in Zellkultur-Medium für 0, 1, 2, 4, 5 und 6 Stunden inkubiert, gerntet und aufgearbeitet worden waren. Abb. 3.27 zeigt die Phosphatgehalte in Zellen und Medien beider Versuche.

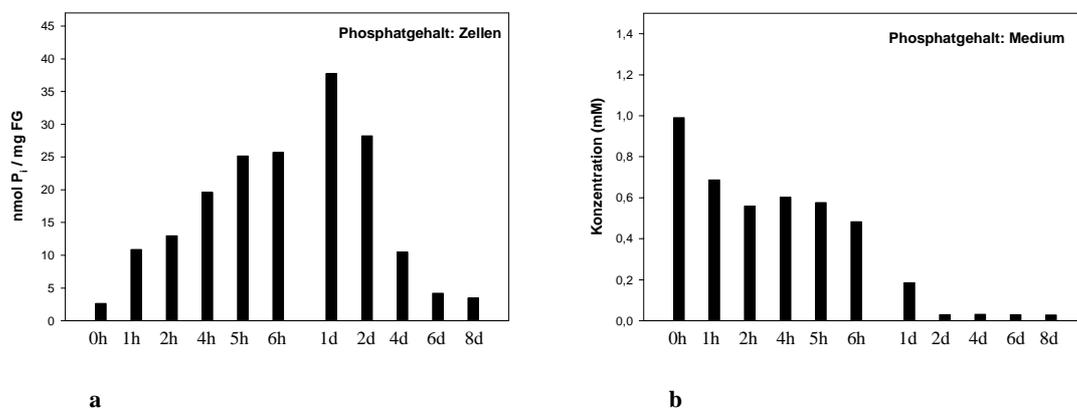


Abb. 3.27 Phosphatgehalt in Zellen und Medium

**a:** Phosphatgehalt in den Zellen. Die Zellen wurde in reinem Zellkultur-Medium ohne Nukleotidvorstufen inkubiert. Die Probenentnahmen erfolgten 0h, 1h, 2h, 4h, 5h und 6h bzw. 1d, 2d, 4d, 6d und 8d nach Versuchsbeginn. Es wurden je ca. 20mg gemörsertes Zellmaterial einer ethanolschen Extraktion und anschließenden Bestimmung des Phosphatgehaltes unterzogen (Itaya und Ui, 1966). Jedem Wert der Abbildung liegt 1 Einzelwert zugrunde.

**b:** Phosphatgehalt im Medium. Es handelte sich um reines Zellkultur-Medium ohne Nukleotidvorstufen. Die Probenentnahmen erfolgten 0h, 1h, 2h, 4h, 5h und 6h bzw. 1d, 2d, 4d, 6d und 8d nach Versuchsbeginn. Es wurden je 30µl des Mediums einer Bestimmung des Phosphatgehaltes unterzogen. Jedem Wert der Abbildung liegt 1 Einzelwert zugrunde.

Wie Abb. 3.27 zeigt, verhielten sich die Phosphatgehalte in den Zellen und ihrem zugehörigem Medium in den ersten Stunden genau entgegengesetzt: Während zum Versuchsbeginn (0h) der Phosphatgehalt im Medium seinen Maximalwert aufwies, befand er sich in den Zellen auf dem niedrigsten Stand des Versuches. Der Phosphatgehalt stieg während der ersten 6h in den Zellen an und sank im Medium. Dies war innerhalb der 1. Stunde besonders stark ausgeprägt. Nach 1 Tag hatte der Phosphatgehalt in den Zellen sein Maximum erreicht und nahm daraufhin stetig wieder ab. Im Medium war der Phosphatgehalt nach 2 Tagen stark gesunken und verblieb für den Rest des Versuches auf diesem niedrigen Niveau.

Nach einer Woche Inkubation war der Phosphatgehalt sowohl im Medium als auch den Zellen signifikant erniedrigt. Dies läßt Rückschlüsse auf die allgemeine Ernährungssituation der Zellen nach einer Woche Inkubation zu. Obwohl die Zellkulturen nach einer Woche Inkubation immer noch eine Frischgewichtszunahme zeigten, waren die relativen Wachstumsraten (bezogen auf das Ausgangsgewicht) zurückgegangen (Daten nicht dargestellt). Bei Überführung in neues, nährstoffreiches Medium erfolgt schnelle Aufnahme der Nährstoffe, was vermutlich Einfluß auf den gesamten zellulären Stoffwechsel hat und in einer raschen und stetigen Zunahme an Biomasse resultiert.

## (2) Einfluß der Inkubation mit Nucleotidvorstufen auf Nucleotid-Konzentrationen

Der Einfluß der 8tägigen Inkubationen mit Nucleotidvorstufen auf den Nucleotidspiegel der Zellkulturen ist in Abb. 3.28 (Purinnucleotide) und Abb. 3.29 (Pyrimidinnucleotide) dargestellt.

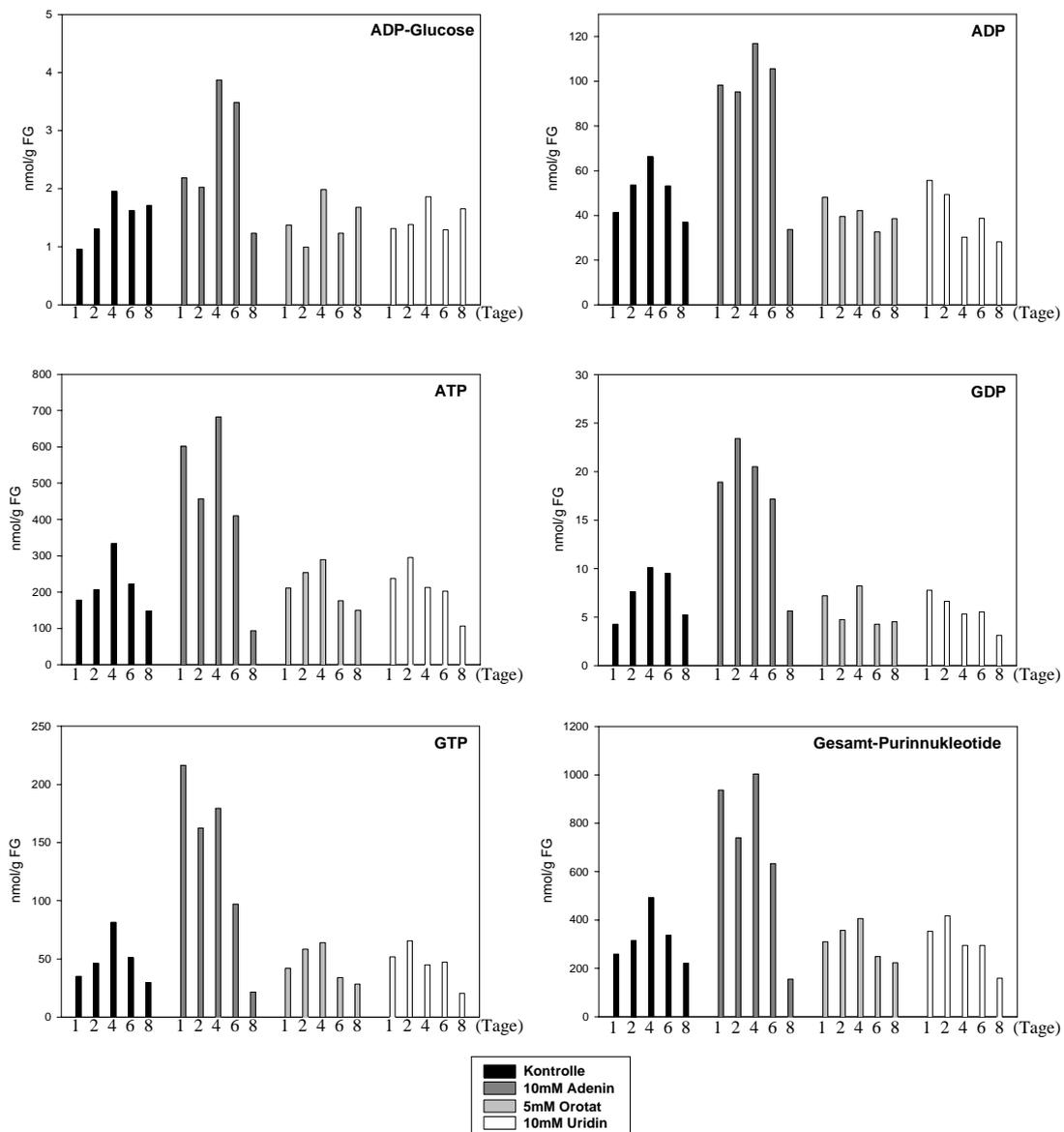


Abb. 3.28 Konzentrationen von Purinnucleotiden

Konzentrationen von ADP-Glucose, ADP, ATP, GDP, GTP sowie der Summe aller untersuchten Purinnucleotide. Ansätze mit 10mM Adenin bzw. 5mM Orotat bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 1, 2, 4, 6, 8 Tage nach Versuchsbeginn. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Nucleotid-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Jedem Wert der Abbildung liegt 1 Einzelwert zugrunde.

In den Kontrollen nahmen die Konzentrationen aller untersuchten Purinnucleotide bis zum 4. Tag zu, um dann wieder abzunehmen (Abb. 3.28)

Die Inkubation mit Adenin führte im Vergleich zur Kontrolle bis zum 6. Tag zu einer starken Akkumulation von Purinnukleotiden (Abb. 3.28). Am 8. Tag hingegen lagen alle Konzentrationen unter den Kontrollwerten. Bezogen auf das Gesamtgewicht der Zellkulturen (Daten nicht gezeigt), waren die Purinnukleotid-Konzentrationen bei der Adenin-Inkubation nur bis zum 2. Tag größer als die Kontrollwerte. Vom 4. bis zum 6. Tag entsprachen sie den Kontrollwerten, am 8. Tag lagen sie darunter.

Bei den Inkubationen mit Orotat und Uridin entsprachen die einzelnen Purinnukleotid-Konzentrationen im wesentlichen den Kontrollwerten (Abb. 3.28). Dies zeigt auch ein Bezug auf das Gesamtgewicht der Zellkulturen (Daten nicht gezeigt).

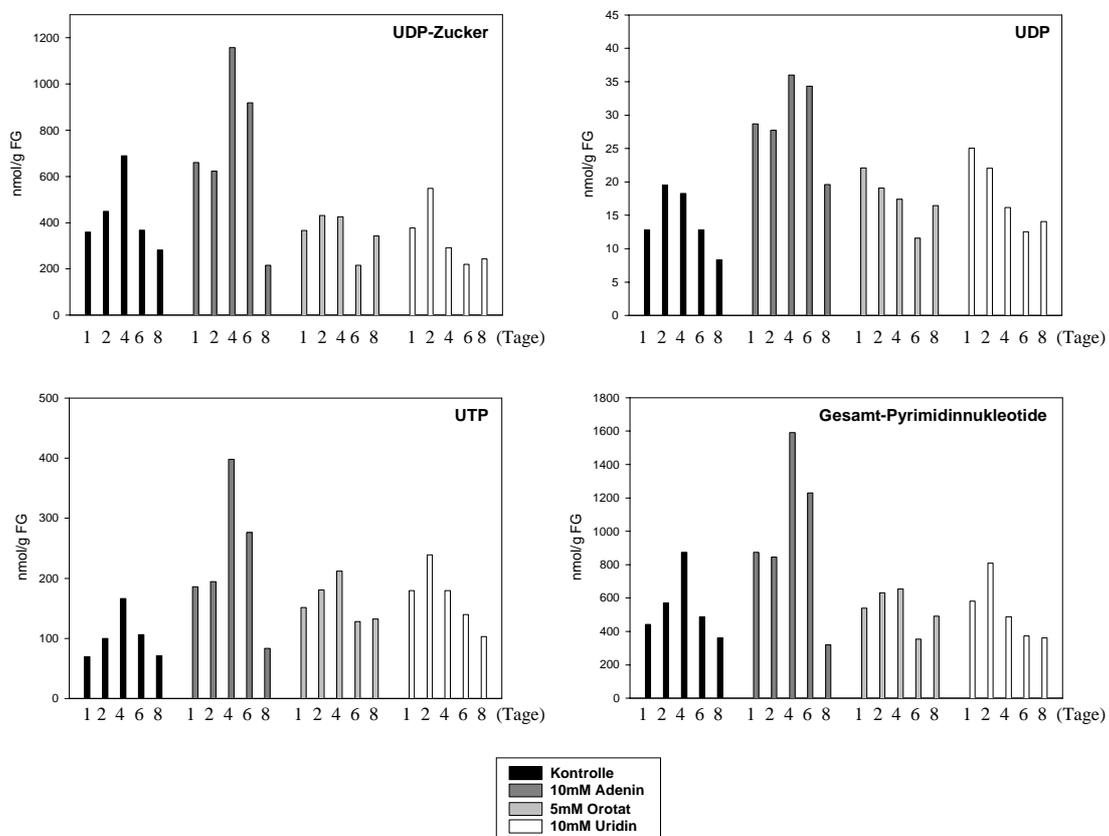


Abb. 3.29 Konzentrationen von Pyrimidinnukleotiden

Konzentrationen von UDP-Zuckern, UDP, UTP sowie der Summe aller untersuchten Pyrimidinnukleotide. Ansätze mit 10mM Adenin bzw. 5mM Orotat bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 1, 2, 4, 6, 8 Tage nach Versuchsbeginn. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Nukleotid-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Mehrere UDP-Zucker (UDP-Glucose, UDP-Galactose) ergaben auf der HPLC ein Signal und wurden zusammengefaßt betrachtet. Jedem Wert der Abbildung liegt 1 Einzelwert zugrunde.

In den Kontrollen nahmen die Konzentrationen aller untersuchten Pyrimidinnukleotide bis zum 4. Tag zu, um dann wieder abzunehmen (Abb. 3.29).

Bei der Inkubation mit Adenin waren die Konzentrationen aller untersuchten Pyrimidinnukleotide in den ersten 6 Tagen größer als die Kontrollwerte (Abb. 3.29). Am 8. Tag hingegen entsprachen sie im wesentlichen den Kontrollwerten. Bezogen auf das Gesamtgewicht der Zellkulturen (Daten nicht gezeigt), waren die Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen bei der Adenin-Inkubation nur am 1. Tag größer als die Kontrollwerte. Vom 2. bis zum 6. Tag entsprachen sie den Kontrollwerten, am 8. Tag lagen sie darunter.

Die Inkubationen mit Orotat und Uridin bewirkten in den ersten 2 Tagen im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der Konzentrationen von UDP und UTP (Abb. 3.29). Die Konzentrationen an UDP-Zuckern entsprachen im wesentlichen den Kontrollwerten. Dies zeigt auch ein Bezug der Metabolit-Konzentrationen auf das Gesamtgewicht der Zellkulturen (Daten nicht gezeigt).

Das Verhältnis an Purinnukleotiden zu Pyrimidinnukleotiden (Abb. 3.30) blieb in den Kontrollen über den Versuch relativ konstant. Bei der Inkubation mit Adenin war das Verhältnis am Versuchsbeginn stark auf die Seite der Purinnukleotide verschoben, um sich dann im weiteren Versuch immer mehr den Kontrollwerten anzunähern. Bei den Inkubationen mit Orotat und Uridin ähnelten die Verhältnisse den Kontrollwerten.

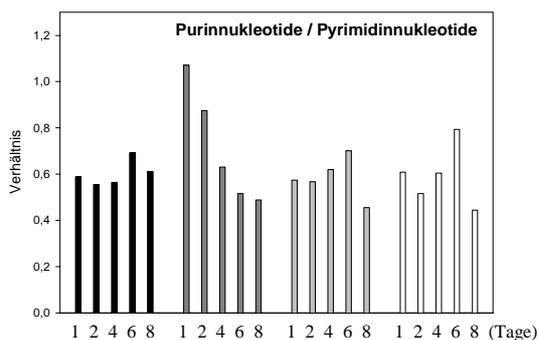


Abb. 3.30 Verhältnis Purinnukleotide zu Pyrimidinnukleotide

Summe der Purinnukleotide aus Abb. 3.28 zur Summe der Pyrimidinnukleotide aus Abb. 3.29.

(3) Einfluß der Inkubation mit Nukleotidvorstufen auf die Expression von an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzymen

Der Einfluß von im Medium anwesenden Nukleotidvorstufen auf die extrahierbaren mRNA- und Proteinmengen von Enzymen, die an der Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden beteiligt sind, wurde anhand mehrerer Beispiele untersucht. Auf mRNA-Ebene wurden CPSase LU, ATCase und UMP-Kinase untersucht (Abb. 3.31), auf Proteinebene CPSase SU und ATCase (Abb. 3.32).

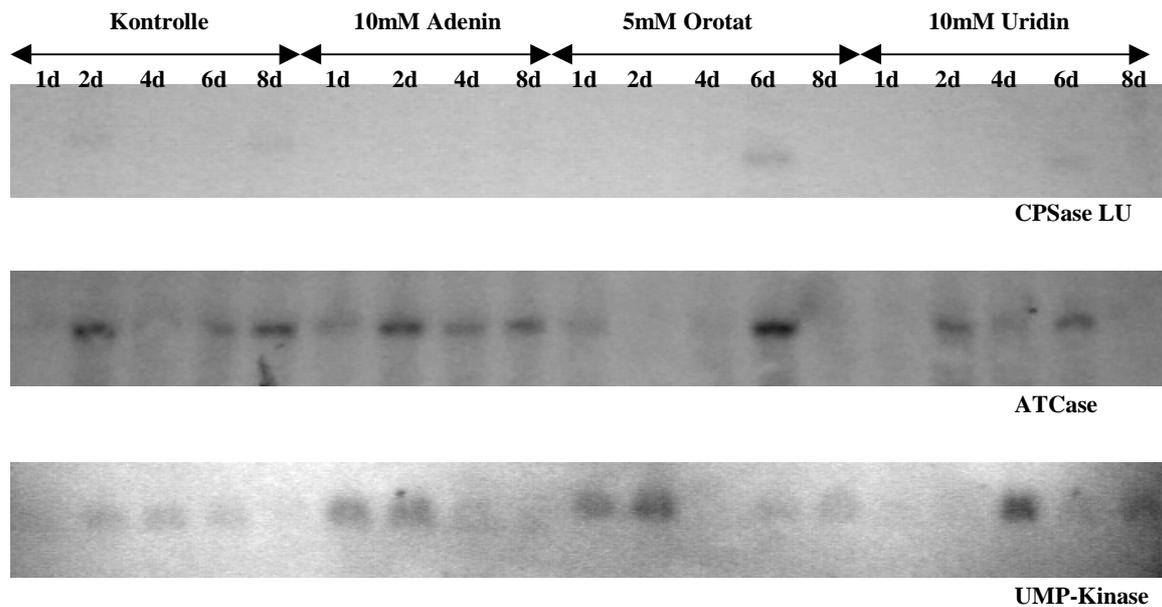
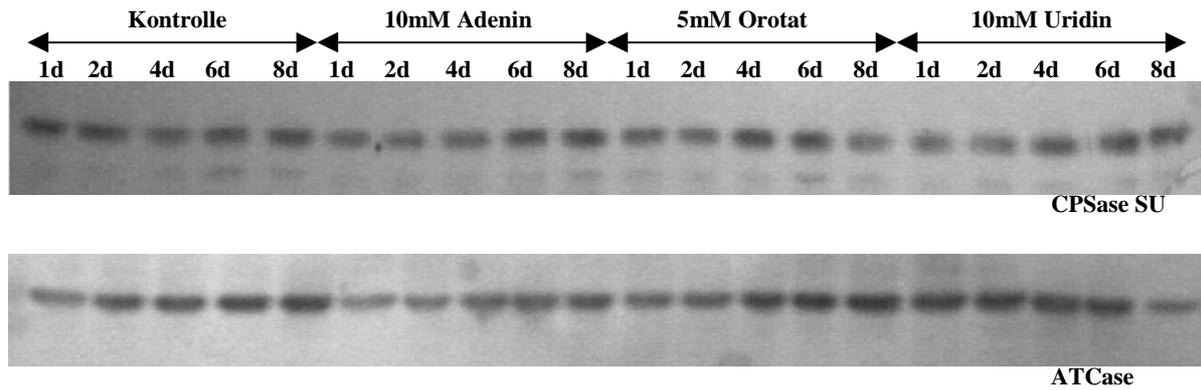


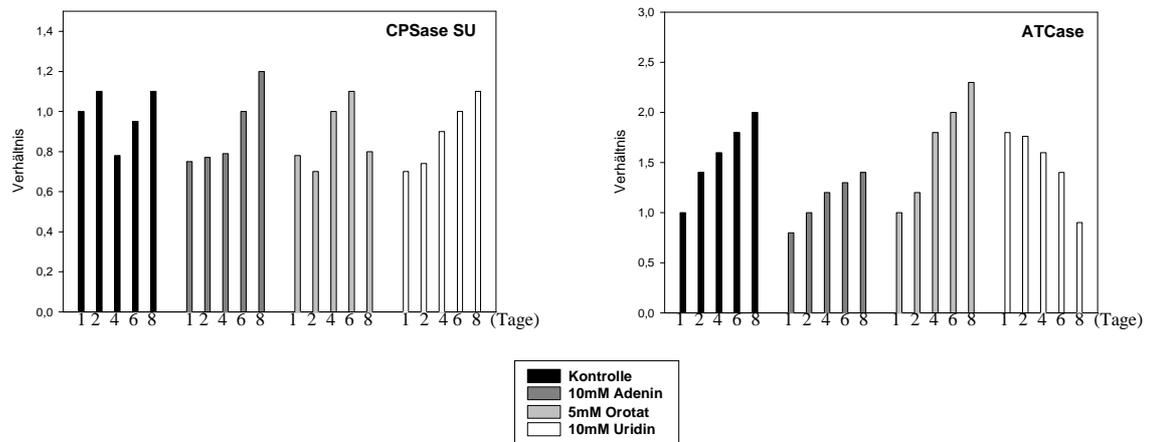
Abb. 3.31 Extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU, ATCase und UMP-Kinase

Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Ansätze mit 10mM Adenin bzw. 5mM Orotat bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 1, 2, 4, 6, 8 Tage (1d, 2d, 4d, 6d und 8d) nach Versuchsbeginn. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen.

Wie Abb. 3.31 zeigt, wurden aus den verschiedenen Inkubationsansätzen sehr unterschiedliche spezifische mRNA-Mengen extrahiert. Dabei konnte keine Koordination der einzelnen Gene beobachtet werden, wie es z.B. in Abb. 3.6 der Fall ist. Ein weiterer Vergleich der einzelnen Bedingungen war nicht möglich, auf eine Intensitätsanalyse der Banden der Blots wurde verzichtet.



a



b

Abb. 3.32 Extrahierbare Proteinmenge von CPSase SU und ATCase

**a:** Western-Blots, nach Detektion mittels der jeweiligen Antikörper. Ansätze mit 10mM Adenin bzw. 5mM Orotat bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 1, 2, 4, 6, 8 Tage (1d, 2d, 4d, 6d und 8d) nach Versuchsbeginn. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-Protein aufgetragen und auf 10% (v/v) - SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Der Wert für die Kontroll-Inkubation bei Tag1 wurde = 1 gesetzt und die übrigen Werte der Inkubationen dazu ins Verhältnis gestellt.

Bei fast allen Inkubationen nahm die extrahierbare spezifische Proteinmenge von CPSase SU und ATCase mit der Zeit zu (Abb. 3.32). Bei der Inkubation mit Adenin war diese Zunahme im Vergleich zu den anderen Inkubationen weniger stark ausgeprägt. Bei der Uridin-Inkubation konnte eine Abnahme der extrahierbare Proteinmenge von ATCase im Laufe des Versuchs beobachtet werden.

**Fazit:**

In einem Vorversuch wurden Inkubationen von Tabak-Zellkulturen mit verschiedenen Nukleotidvorstufen (Adenin, Orotat, Uridin) über 8 Tage durchgeführt:

- 1.) Bei den Inkubationen mit Adenin wurden im Vergleich zu den Kontrollen vor allem in den ersten Tagen hohe Konzentrationen aller untersuchten Nukleotide festgestellt, was von einer geringen Zunahme an Frischgewicht begleitet war.
- 2.) Bei den Inkubationen mit Orotat und Uridin war im Vergleich zu den Kontrollen am Versuchsanfang eine leichte Erhöhung einiger Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen festzustellen. Ansonsten verliefen die Inkubationen ähnlich den Kontrollen.
- 3.) Die extrahierbaren mRNA-Mengen der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme waren in den einzelnen Ansätzen sehr unterschiedlich, eine vergleichende Analyse war nicht möglich. Die extrahierbaren Proteinmengen nahmen in fast allen Ansätzen mit der Zeit zu.

### 3.3.2.2b Betrachtung von mit Nukleotidvorstufen inkubierten Tabakzellkulturen über einen Zeitraum von 6 Stunden

Die Inkubation der Tabakzellkulturen über mehrere Tage brachte das Problem mit sich, daß Zellteilung, Stoffwechselreaktionen usw. in jedem Meßkolben unabhängig voneinander stattfanden. Diese Auseinanderentwicklung der Kulturen über den langen Zeitraum wurde insbesondere bei der Analyse auf mRNA-Ebene deutlich (siehe Abb. 3.31). Um diese Analysen unter in jeder Kultur vergleichbaren Bedingungen durchführen zu können, wurde eine kürzere Inkubationszeit von 6 Stunden gewählt. Als Ausgangsmaterial dienten 1 Woche alte Zellkulturen, die sich in nährstoffverarmten Medium befanden (siehe Abb. 3.27). Damit sollte sicher gestellt werden, daß identisches Ausgangsmaterial gewählt wurde, das auf das neue Medium mit den verschiedenen Inkubationsbedingungen vergleichbar reagierte.

Der Versuch wurde gemäß Abschnitt 3.3.2.2a vorbereitet. An Nukleotidvorstufen wurden 5mM Orotat, 2 bzw. 10mM Uridin sowie 10mM Adenin gewählt und mit Kontrollansätzen verglichen (Adenin-Inkubation: 4 Meßkolben, alle anderen Ansätze jeweils 3 Meßkolben). Aus den vereinigten, 1 Woche alten Zellkulturen wurden 2 Nullwert-Proben entnommen. Nach 6 Stunden wurden die Zellen aller Ansätze filtriert, gewogen und eingefroren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Frischgewichten der einzelnen Ansätze festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das eingefrorene Zellmaterial wurde gemörsert, extrahiert und analysiert.

(1) Einfluß der Inkubation mit Nucleotidvorstufen auf Nucleotid-Konzentrationen

Der Einfluß der 6stündigen Inkubationen mit Nucleotidvorstufen auf den Nucleotidspiegel der Zellkulturen ist in Abb. 3.33 (Purinnucleotide), Abb. 3.34 (Pyrimidinnucleotide) sowie Abb. 3.35 (Gesamt-Nucleotid-Daten) dargestellt.

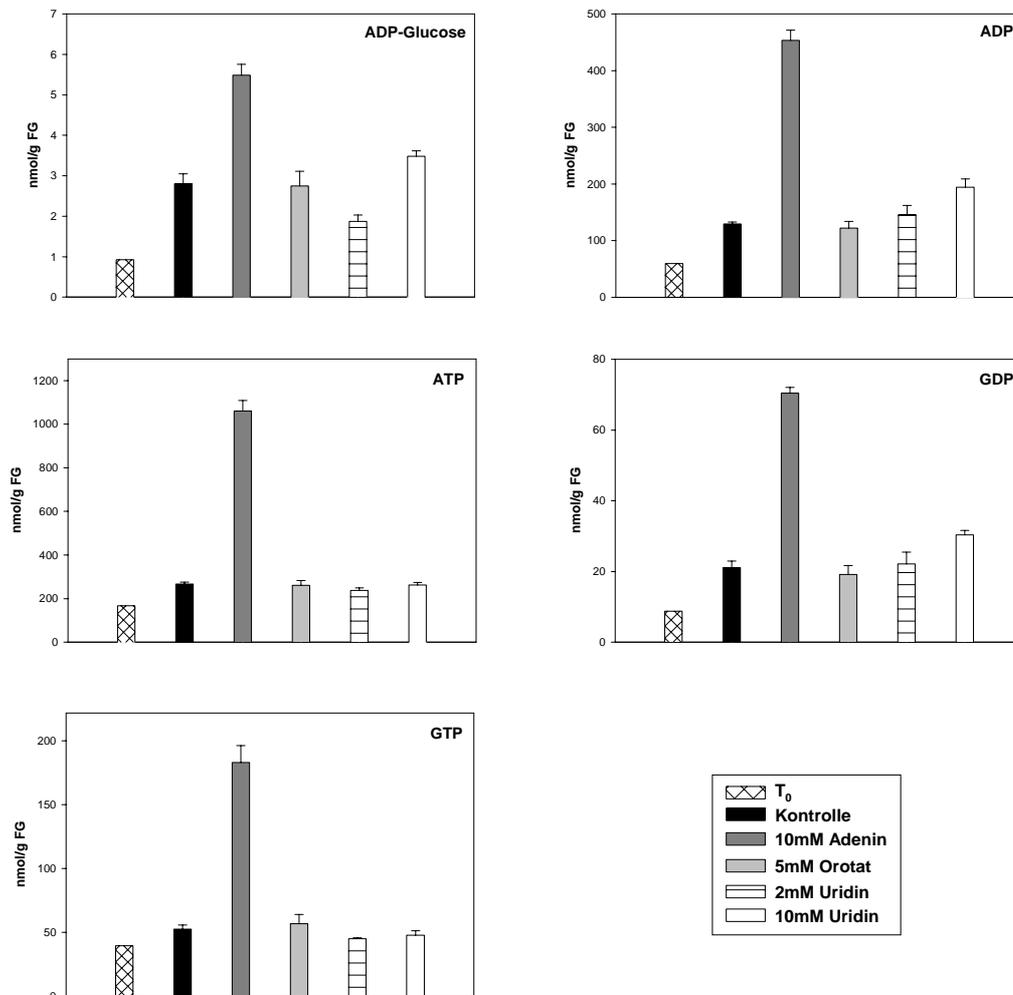


Abb. 3.33 Konzentrationen von Purinnucleotiden

Konzentrationen von ADP-Glucose, ADP, ATP, GDP und GTP. Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert ( $T_0$ ) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörsertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Nucleotid-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Die Inkubation mit verschiedenen Nucleotidvorstufen hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die untersuchten Purinnucleotid-Konzentrationen (Abb. 3.33): Im Vergleich zum Nullwert hatte nach den 6 Stunden Versuchszeit in allen Ansätzen die Konzentration aller untersuchten Purinnucleotide zugenommen – wenn auch unterschiedlich stark. Die Inkubation mit Adenin

fürte im Vergleich zur Kontrolle und allen anderen Ansätzen zu einer sehr starken Akkumulation aller analysierten Purinnukleotide. Die Inkubationen mit Orotat und 2mM Uridin hatten keine Auswirkungen auf die Konzentrationen der untersuchten Purinnukleotide. Die Inkubation mit 10mM Uridin führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer Zunahme von ADP, GDP und ADP-Glucose (WTT jeweils >90%), während die anderen Purinnukleotide unbeeinflusst blieben.

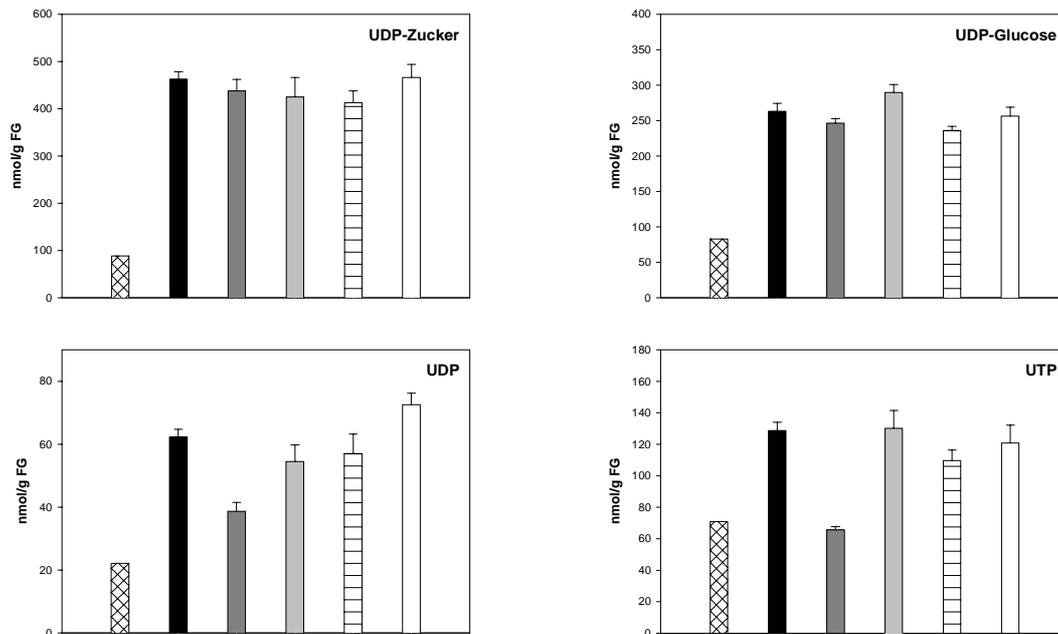


Abb. 3.34 Konzentrationen von Pyrimidinnucleotiden

Konzentrationen von UDP-Zuckern, UDP-Glucose, UDP und UTP. Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert ( $T_0$ ) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend alle Nucleotid-Konzentrationen außer UDP-Glucose per HPLC bestimmt. Mehrere UDP-Zucker (UDP-Glucose, UDP-Galactose) ergaben auf der HPLC ein Signal und wurden zusammengefaßt betrachtet. Die UDP-Glucose-Konzentration wurde am Photometer über ein gekoppeltes enzymatisches Testverfahren bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.



Die Inkubation mit verschiedenen Nucleotidvorstufen hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die untersuchten Pyrimidinnucleotid-Konzentrationen (Abb. 3.34): In fast allen Fällen war nach 6 Stunden im Vergleich zum Nullwert eine deutliche Zunahme aller untersuchten Pyrimidinnucleotide zu beobachten. Die Inkubation mit Adenin stellte insofern eine Ausnahme dar, daß die Konzentrationen von UTP und UDP im Vergleich zum Nullwert nicht (UTP) oder nur wenig (UDP) zugenommen hatten. Die Konzentrationen dieser Nucleotide lagen deutlich unter den Kontrollwerten. Die Konzentrationen der UDP-Zucker und UDP-Glucose speziell blieben durch die Anwesenheit von Adenin unbeeinflusst. Orotat und 2mM

Uridin hatten keinen nennenswerten Effekt auf die untersuchten Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen. Die Inkubation mit 10mM Uridin führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer größeren UDP-Konzentration (WTT = 93%), während die übrigen analysierten Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen nicht von den Kontrollwerten abweichen.

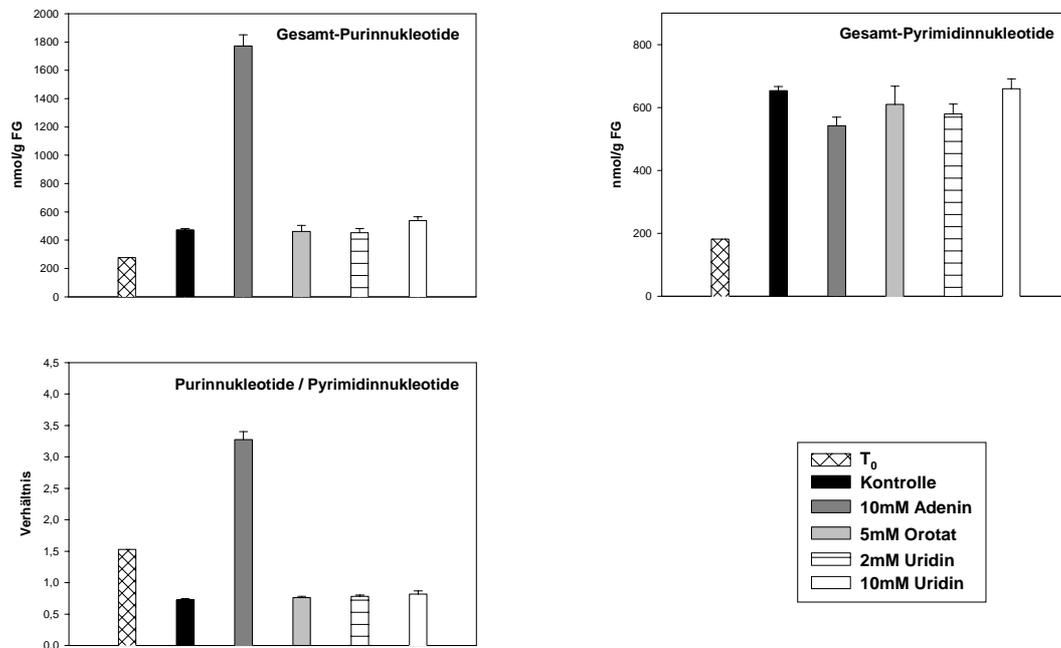


Abb. 3.35 Gesamt-Nukleotid-Daten

Summe der Konzentrationen aller analysierten Purin- bzw. Pyrimidinnukleotide (Abb. 3.33 bzw. Abb. 3.34) sowie das Verhältnis zwischen den beiden Summen. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Bei Betrachtung der Gesamt-Nukleotid-Daten (Abb. 3.35) fällt auf, daß in den Nullwert-Proben sowohl die Purin- als auch die Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen am niedrigsten waren. Das Nukleotid-Verhältnis war im Vergleich zur Kontrolle in Richtung Purinnukleotide verschoben. Die Inkubation mit Adenin ließ die Gesamt-Purinnukleotid-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle über die 6 Stunden Versuchszeit viel stärker zunehmen, während bei den Pyrimidinnukleotiden eine weniger starke Zunahme zu bemerken war, die unter den Kontrollwerten lag. Das Nukleotid-Verhältnis war bei der Adenin-Inkubation stark in Richtung Purinnukleotide verschoben. Die Orotat- und die Uridin-Inkubationen hatten keine nennenswerte Wirkung auf die Gesamt-Nukleotid-Verhältnisse.

(2) Einfluß der Inkubation mit Nukleotidvorstufen auf die extrahierbare DNA- und RNA-Menge

Nukleotide sind nötig für die Biosynthese von Nucleinsäuren. Es wurde gezeigt, daß in zellteilungsaktiven Geweben eine verstärkte Nucleinsäuresynthese vorliegt (Burgess, 1985), wozu auch Zellkulturen zählen. Darum wurden aus gemörsertem Zellmaterial quantitativ genomische DNA (Bouchez und Camilleri, 1998) und Gesamt-RNA (Logemann et al., 1987) isoliert. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung beider Nucleinsäuren zeigt Abb. 3.36.

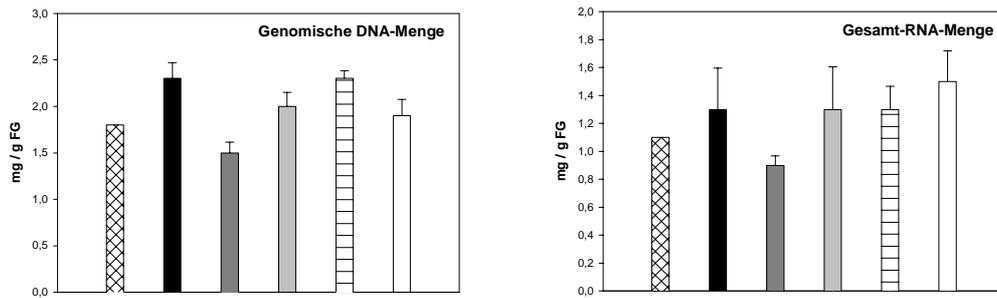


Abb. 3.36 Genomische DNA- und Gesamt-RNA-Menge

Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Genomische DNA wurde aus 200mg gemörsertem Material nach Bouchez und Camilleri, 1998 isoliert. Gesamt-RNA wurde aus 200mg gemörsertem Material nach Logemann et al., 1987 gewonnen. Die Konzentrationen beider Nucleinsäuren wurden am Photometer bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.



Im Vergleich zum Nullwert war die extrahierbare Menge genomischer DNA und Gesamt-RNA in allen Ansätzen außer den Adenin-Inkubationen größer. Bei den Adenin-Ansätzen waren die DNA- und RNA-Menge kleiner als in den Nullwert-Proben. Die Ansätze mit 5mM Orotat ergaben etwas weniger genomische DNA als die Kontrollen (WTT = 70%), während im Gesamt-RNA-Gehalt keine Unterschiede zu beobachten waren. Bei den Inkubationen mit 10mM Uridin waren die DNA-Mengen niedriger (WTT = 96%), die Gesamt-RNA-Mengen höher als die entsprechenden Kontrollwerte (WTT > 99%). Bei der Inkubation mit 2mM Uridin konnten keine Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden.

(3) Einfluß der Inkubation mit Nucleotidvorstufen auf die extrahierbare Proteinmenge

Im Pyrimidinstoffwechsel besteht eine enge Verbindungen zwischen Kohlenstoff- und Stickstoff-Stoffwechsel (Abb. 1.1). Wichtige Bestandteile des Stickstoff-Stoffwechsels sind neben den Nucleotiden vor allem Proteine. Eine Analyse der extrahierbaren Gesamt-Proteinmenge zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zellkulturansätzen (Abb. 3.37).

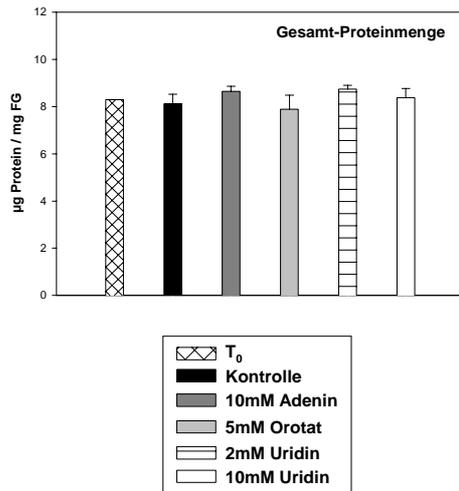


Abb. 3.37 Gesamt-Proteinmenge

Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde aufbewahrt. Ungefähr 20mg gemörstertes Material wurden in PMSF-Extraktionspuffer aufgenommen und die Gesamt-Proteinmenge am Photometer nach Bradford, 1976 bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

#### (4) Einfluß der Inkubation mit Nucleotidvorstufen auf Konzentrationen von Kohlenhydraten

Um eine Querverbindung vom Nucleotid-Stoffwechsel zum Kohlenhydratstoffwechsel durchführen zu können, wurden die Konzentrationen mehrerer wichtiger Metabolite bestimmt, die für den Zusammenhang beider Wege bedeutend sind: UDP-Glucose (siehe Abb. 3.34), die freien Zucker Glucose, Fructose und Saccharose (Abb. 3.38) sowie die Hexosephosphate Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat (Abb. 3.39).

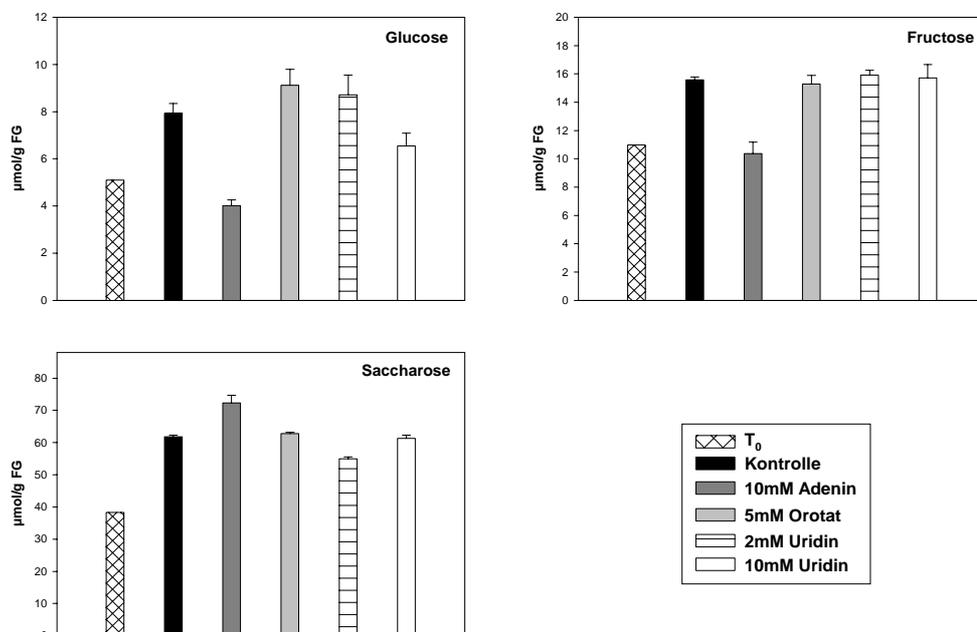


Abb. 3.38 Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose

Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde aufbewahrt. Es wurden je ca. 20mg gemörstertes Material einer ethanolischen Extraktion unterzogen und anschließend die Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose am Photometer über gekoppelte enzymatische Testverfahren bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Mit Ausnahme der Adenin-Inkubation wurden im Vergleich zum Nullwert in allen Ansätzen höhere zelluläre Konzentrationen aller untersuchten freien Zucker festgestellt (Abb. 3.38). Von wenigen Ausnahmen abgesehen (z.B. Glucose-Konzentration im 10mM Uridin-Ansatz) hatten die Inkubationen mit Orotat und Uridin im Vergleich zur Kontrolle keine wesentlichen Auswirkungen auf die zellulären Konzentrationen der freien Zucker. Bei der Adenin-Inkubation hingegen waren die zellulären Glucose- und Fructose-Konzentrationen niedriger als in den Kontrollen, den Nullwertproben und allen anderen Ansätzen, während die extrahierte Saccharosemenge von allen Ansätzen hier am größten war.

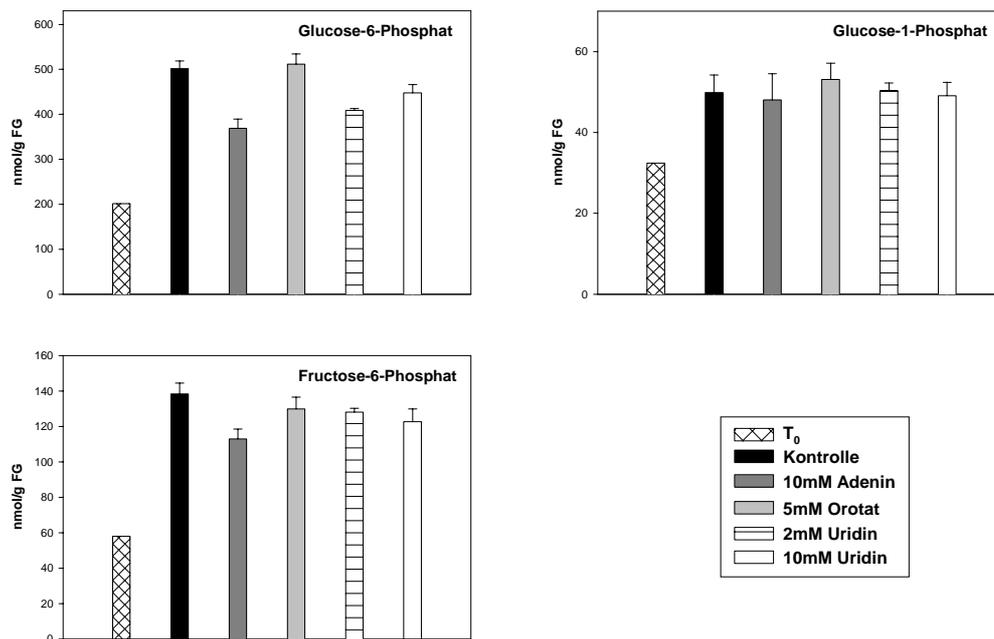


Abb. 3.39 Konzentrationen von Hexosephosphaten

Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat. Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert ( $T_0$ ) wurde aufbewahrt. Es wurden je ca. 200mg gemörsertes Material einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat am Photometer über gekoppelte enzymatische Testverfahren bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

In allen Inkubationsansätzen wurde eine höhere Konzentration aller untersuchten Hexosephosphate festgestellt als in den Nullwert-Proben (Abb. 3.39). Die zelluläre Glucose-1-Phosphat-Konzentration war in allen Inkubationsansätzen ungefähr gleich groß. Die zelluläre Glucose-6-Phosphat-Konzentration war bei der Inkubation mit 2 und 10mM Uridin sowie vor allem mit Adenin niedriger als in den Kontrollen oder den Orotat-Ansätzen. Die zelluläre Fructose-6-Phosphat-Konzentration lag in den Ansätzen mit Adenin deutlich unter den Werten der anderen Inkubationen, die alle ungefähr gleich groß waren.

(5) Einfluß der Inkubation mit Nukleotidvorstufen auf die extrahierbare mRNA-Menge von an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzymen

Der Einfluß von im Medium anwesenden Nukleotidvorstufen auf die extrahierbare mRNA-Menge von Enzymen, die an der Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden beteiligt sind, wurde anhand mehrerer Beispiele untersucht (Abb. 3.40). Es wurden CPSase (hierbei die große Untereinheit) und DHODH für die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese sowie UMP-Kinase als Verbindung zum Energiestoffwechsel gewählt.

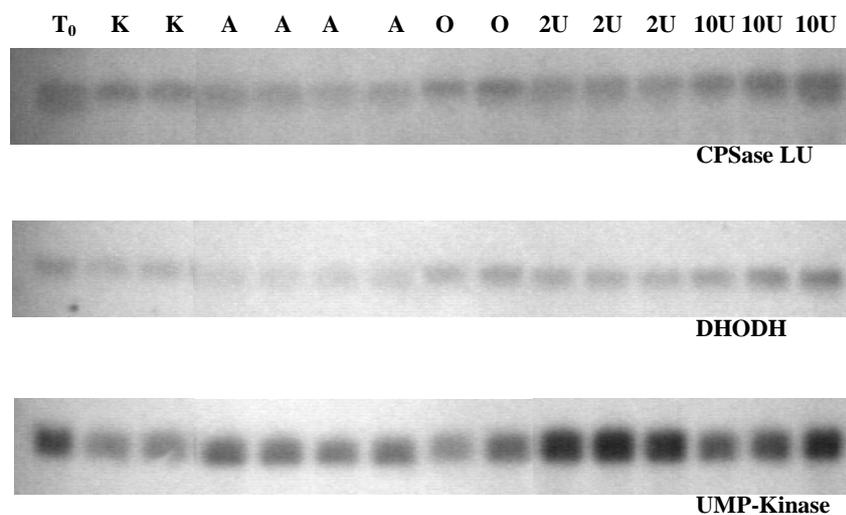


Abb. 3.40a Extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU, DHODH und UMP-Kinase

Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Ansätze mit 10mM Adenin (=A), 5mM Orotat (=O), 2mM bzw. 10mM Uridin (=2U bzw. 10U) wurden mit Kontrollen (=K) ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (=T<sub>0</sub>) wurde aufbewahrt. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen.

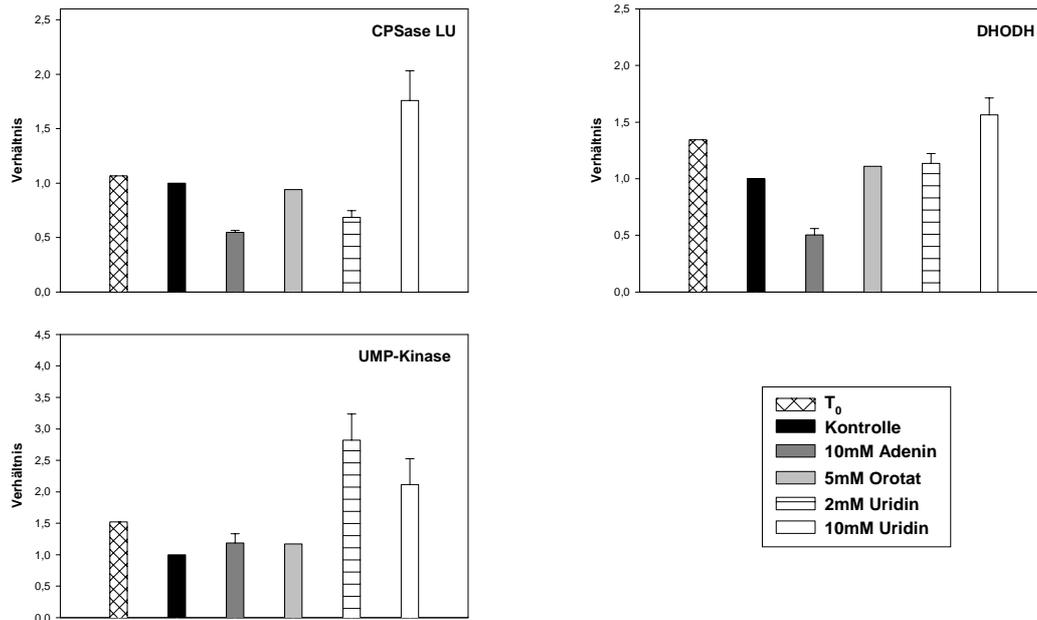


Abb. 3.40b Extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU, DHODH und UMP-Kinase

Intensitätsanalyse der Banden der Blots aus Abb. 3.40a. Der Wert für die Kontroll-Inkubation wurde = 1 gesetzt und die übrigen Werte der Inkubationen dazu ins Verhältnis gestellt. Die Werte in der Abbildung setzen sich aus unterschiedlich vielen Einzelwerten zusammen: Nullwert aus einem, Kontrolle und Orotat-Inkubation aus zwei, 2mM und 10mM Uridin-Inkubationen aus drei, Adenin-Inkubation aus vier. Es ist, wenn möglich, die Standardabweichung angegeben.

Die Inkubationen mit verschiedenen Nukleotidvorstufen bewirkten im Vergleich zur Kontrolle Veränderungen in den extrahierbaren spezifischen mRNA-Mengen (Abb. 3.40): Bei beiden Genprodukten aus der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese (CPSase LU, DHODH) war die extrahierbare spezifische mRNA-Menge bei der 10mM Uridin-Inkubation größer, bei der 10mM Adenin-Inkubation kleiner als der entsprechende Kontrollwert. Die Inkubation mit Orotat blieb ohne nennenswerte Wirkung. Bei der 2mM Uridin-Inkubation war die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU kleiner, von DHODH größer als der Kontrollwert. Der Nullwert war in allen Fällen gleich bis größer als der jeweilige Kontrollwert.

Für UMP-Kinase lieferten alle Inkubationen mit Nukleotidvorstufen größere extrahierbare spezifische mRNA-Mengen als die Kontrolle, wobei die Werte für die Inkubationen mit 2mM und 10mM Uridin am größten waren (Abb. 3.40). Auch hier war der Nullwert größer als der Kontrollwert.

(6) Einfluß der Inkubation mit Nucleotidvorstufen auf die extrahierbare Proteinmenge von an der Pyrimidinnucleotid-Bereitstellung beteiligten Enzymen

Der Einfluß von im Medium anwesenden Nucleotidvorstufen auf die Expression von Enzymen, die an der Bereitstellung von Pyrimidinnucleotiden beteiligt sind, wurde auch auf Proteinebene untersucht (Abb. 3.41). Es wurden CPSase SU und ATCase aus dem Pyrimidinnucleotid *de novo* Syntheseweg gewählt.

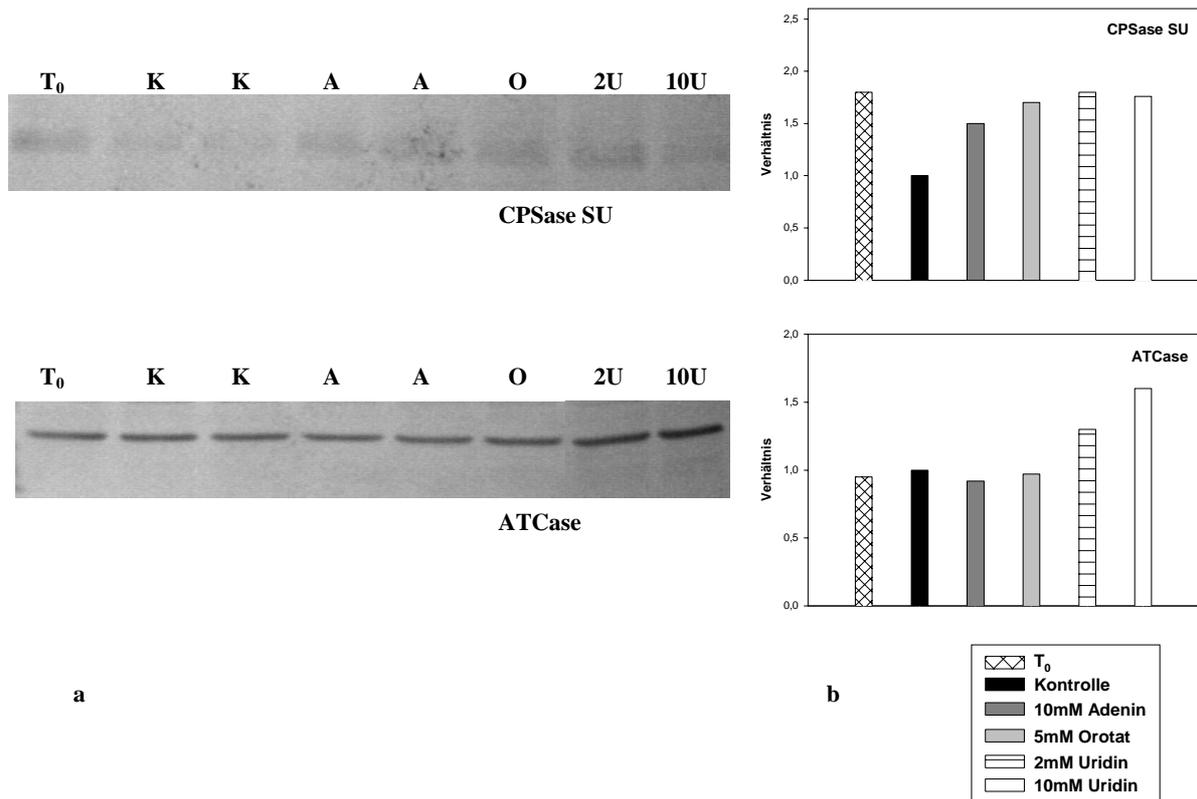


Abb. 3.41 Extrahierbare Proteinmenge von CPSase SU und ATCase

**a:** Western-Blots, nach Detektion mittels der jeweiligen Antikörper. Ansätze mit 10mM Adenin (=A), 5mM Orotat (=O), 2mM bzw. 10mM Uridin (=2U bzw. 10U) wurden mit Kontrollen (=K) ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (=T<sub>0</sub>) wurde aufbewahrt. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-Protein aufgetragen und auf 10% (v/v) - SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Der Wert für die Kontroll-Inkubation wurde = 1 gesetzt und die übrigen Werte der Inkubationen dazu ins Verhältnis gestellt. Die Werte in der Abbildung setzen sich aus unterschiedlich vielen Einzelwerten zusammen: Nullwert, Orotat-Inkubation, 2mM und 10mM Uridin-Inkubationen aus je einem, Kontrolle und Adenin-Inkubation aus zwei.

Wie Abb. 3.41 zeigt, war die extrahierbare Proteinmenge von CPSase SU in den Kontrollproben kleiner als in allen anderen Proben, zwischen denen ansonsten keine großen Unterschiede festzustellen waren.

Die extrahierbare Proteinmenge der ATCase blieb in den meisten Fällen relativ konstant. Die beiden Uridin-Inkubationen bildeten eine Ausnahme, hier wurde mehr ATCase-Protein isoliert als aus allen anderen Proben. Dabei ergab die 10mM Uridin-Inkubation ein stärkeres Signal als die 2mM Uridin-Inkubation.

(7) Einfluß der Inkubation mit Nukleotidvorstufen auf die extrahierbare mRNA-Menge von SuSy und UGPase

Eine Analyse der extrahierbaren mRNA-Menge der Enzyme SuSy und UGPase sollte aufzeigen, ob die Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels sich auch auf Expressions-Ebene äußerte. SuSy und UGPase wurden gewählt, da sie eine Rolle für den UDP-Glucose-Gehalt spielen (siehe Abschnitt 1.1.3.2): SuSy spaltet in vielen Geweben Saccharose in UDP-Glucose und Fructose auf. UGPase ist für die Umsetzung von UDP-Glucose aus bzw. zu Glucose-1-Phosphat und UTP zuständig. Abb. 3.42 zeigt das erhaltene Ergebnis.

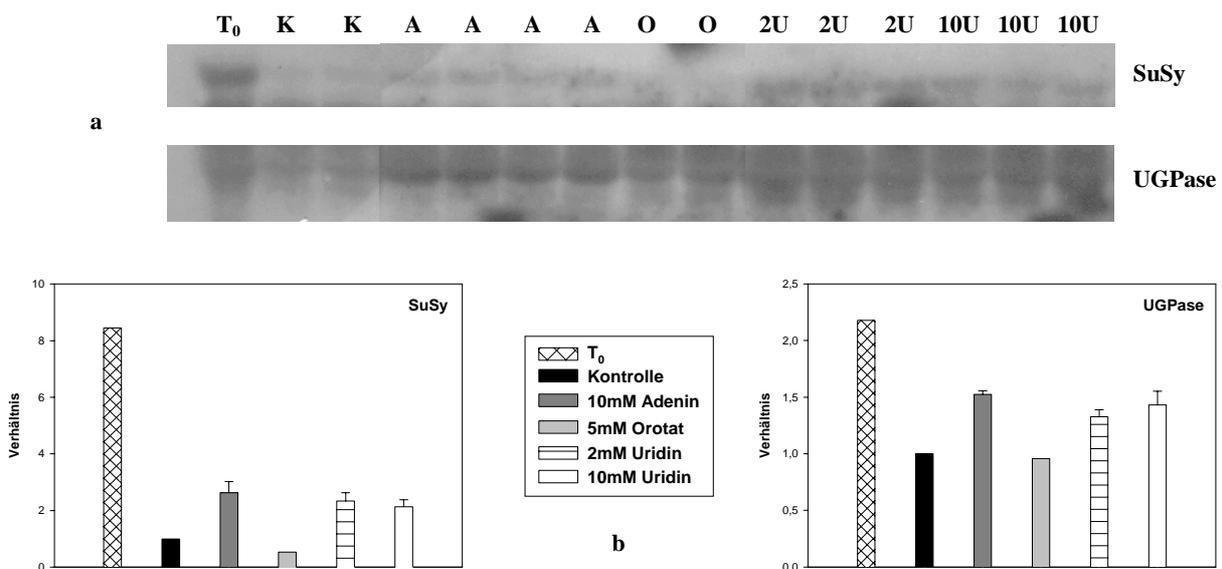


Abb. 3.42 Extrahierbare mRNA-Menge von SuSy und UGPase

**a:** Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Ansätze mit 10mM Adenin (=A), 5mM Orotat (=O), 2mM bzw. 10mM Uridin (=2U bzw. 10U) wurden mit Kontrollen (=K) ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (=T<sub>0</sub>) wurde aufbewahrt. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Der Wert für die Kontroll-Inkubation wurde = 1 gesetzt und die übrigen Werte der Inkubationen dazu ins Verhältnis gestellt. Die Werte in der Abbildung setzen sich aus unterschiedlich vielen Einzelwerten zusammen: Nullwert aus einem, Kontrolle und Orotat-Inkubation aus zwei, 2mM und 10mM Uridin-Inkubationen aus drei, Adenin-Inkubation aus vier. Es ist, wenn möglich, die Standardabweichung angegeben.

Wie Abb. 3.42 zeigt, konnte ein Einfluß der Inkubationsversuche auf die extrahierbare mRNA-Menge von SuSy und UGPase festgestellt werden. Sowohl für SuSy als auch für UGPase war die extrahierbare mRNA-Menge im Nullwert viel größer als in allen Inkubationsansätzen. Den Kontrollen und den Orotatinkubationen kamen die kleinsten extrahierbaren mRNA-Mengen beider untersuchten Enzyme zu. Aus den Inkubationen mit Adenin, 2mM und 10mM Uridin wurden ähnliche mRNA-Mengen von SuSy und UGPase isoliert, die über den Kontrollwerten lagen.

Eine Analyse auf Proteinebene konnte für SuSy nicht durchgeführt werden, da eine Detektion mit einem Antikörper gegen SuSy bei dem verwendeten Material keine Signale ergab (Daten nicht gezeigt). Eine Detektion mit einem Antikörper gegen UGPase war möglich und wurde im Rahmen einer anderen Inkubation durchgeführt. Dabei wurden zwischen den einzelnen Ansätzen keine Unterschiede hinsichtlich der UGPase-Proteinmenge festgestellt (Abb. 3.53).

In einem weiteren 6stündigen Versuchsansatz mit entsprechenden Bedingungen und Versuchsablauf konnten die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

**Fazit:**

Es wurden Inkubationen von Tabak-Zellkulturen mit verschiedenen Nukleotidvorstufen (Adenin, Orotat, Uridin) über 6 Stunden durchgeführt:

- 1.) Die Inkubationen mit Adenin beeinflussten verschiedene Aspekte des zellulären Metabolismus: Es wurden im Vergleich zu den Kontrollen analog zu dem 8tägigen Experiment hohe Konzentrationen aller untersuchten Purinnukleotide festgestellt. Die Konzentrationen von UDP und UTP lagen unter den Kontrollwerten, während sie sich bei der 8tägigen Inkubation darüber befunden hatten. Ebenfalls unter den Kontrollwerten lagen die Konzentrationen der meisten Hexosephosphate, Glucose, Fructose, der Gesamt-DNA- und Gesamt-RNA-Gehalt sowie die extrahierbaren mRNA-Mengen von CPSase LU und DHODH. Über den Kontrollwerten befanden sich die Saccharose-Konzentration sowie die extrahierbare mRNA-Menge von UMP-Kinase, UGPase und SuSy.
- 2.) Die Inkubationen mit Orotat und Uridin beeinflussten den zellulären Metabolismus im 6stündigen Versuch nur wenig. Bei den Inkubationen mit Orotat waren im Vergleich zu den Kontrollen keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Dies gilt zum größten Teil auch für die Inkubationen mit 2mM Uridin, allerdings konnte hier eine Erhöhung der extrahierbaren mRNA-Menge von UMP-Kinase, SuSy und UGPase detektiert werden. Bei den Inkubationen mit 10mM Uridin war die UDP-Konzentration sowie die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU, DHODH, UMP-Kinase, SuSy und UGPase höher als in den Kontrollproben.

### 3.3.2.2c Betrachtung von mit Nukleotidvorstufen inkubierten Tabakzellkulturen über einen Zeitraum von 18 Stunden

Um eine Verbindung zwischen den in den Abschnitten 3.3.2.2a und 3.3.2.2b beschriebenen Experimenten herzustellen zu können, wurde eine Inkubation über einen Zeitraum durchgeführt, der den Übergang vom Kurzzeit- zum Langzeitversuch repräsentierte. Als geeignet wurden 18 Stunden angesehen.

An Nukleotidvorstufen wurden 5mM Orotat, 2 bzw. 10mM Uridin sowie 10mM Adenin gewählt und mit Kontrollansätzen verglichen.

Unter Verwendung von vereinigten, 1 Woche alten Tabakzellkulturen als Ausgangsmaterial wurde der Versuch gemäß Abschnitt 3.3.2.2a vorbereitet. Aus den vereinigten, 1 Woche alten Zellkulturen wurden 3 Nullwert-Proben entnommen. Nach 18 Stunden wurden die Zellen aller Ansätze filtriert, gewogen und eingefroren (für alle Bedingungen je 3 Meßkolben). Alle Inkubationsansätze wiesen ungefähr das gleiche Frischgewicht auf, das aber über dem der Nullwertproben lag (Abb. 3.43). Das eingefrorene Zellmaterial wurde gemörsert, extrahiert und analysiert.

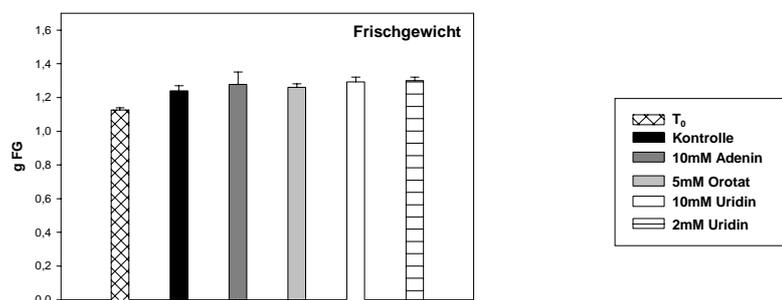


Abb. 3.43 Frischgewichtsdaten der Zellkulturen

Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Allen Werten der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

#### (1) Einfluß der Inkubation mit Nukleotidvorstufen auf Nukleotid-Konzentrationen

Der Einfluß der 18stündigen Inkubationen mit Nukleotidvorstufen auf den Nukleotidspiegel der Zellkulturen ist in Abb. 3.44 (Purinnukleotide), Abb. 3.45 (Pyrimidinnukleotide) sowie Abb. 3.46 (Gesamt-Nukleotid-Daten) dargestellt.

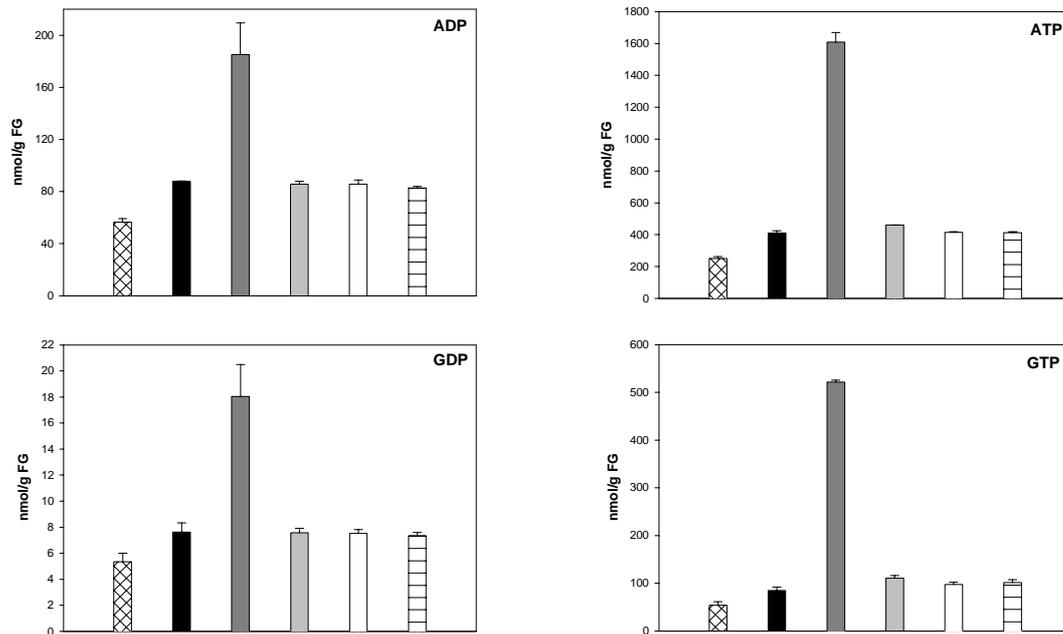
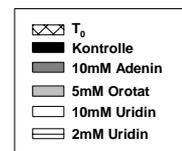


Abb. 3.44 Konzentrationen von Purinnukleotiden

Konzentrationen von ADP, ATP, GDP und GTP. Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert ( $T_0$ ) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Nukleotid-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Allen Werten der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.



Die Konzentrationen aller untersuchten Purinnukleotide lagen in allen Inkubationsansätzen über den für die Nullwertproben erhaltenen Werten (Abb. 3.44). Dabei waren die Werte für die Adenin-Inkubationen viel größer als die der Kontrollen und aller anderen Inkubationen. Zwischen den anderen Proben konnten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden und sie wichen auch nicht signifikant von den Kontrollwerten ab.

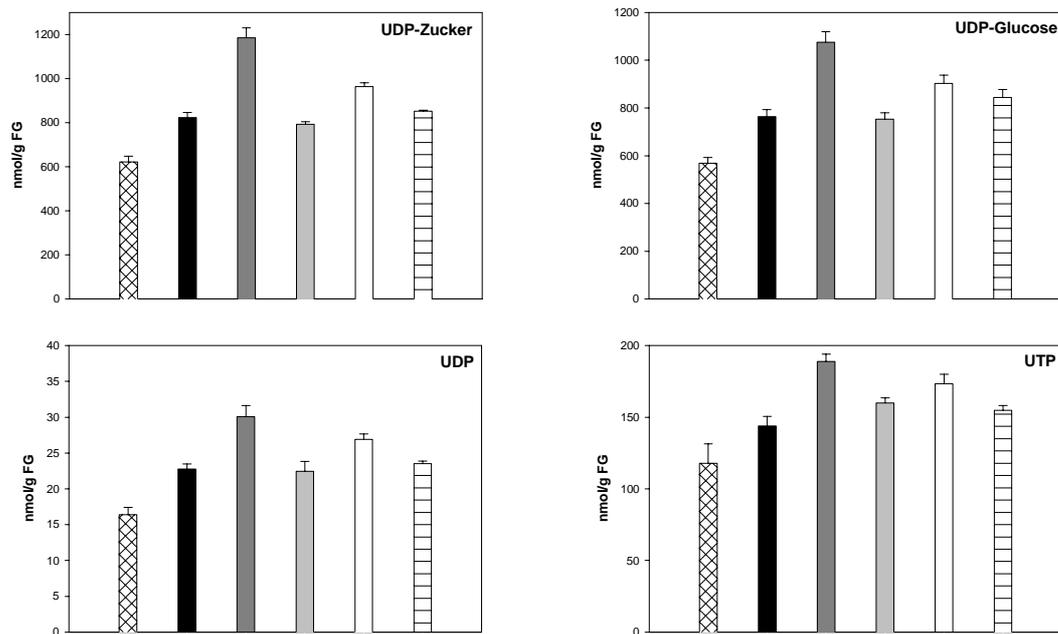


Abb. 3.45 Konzentrationen von Pyrimidinnukleotiden

Konzentrationen von UDP-Zuckern, UDP-Glucose, UDP und UTP. Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert ( $T_0$ ) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend alle Nukleotid-Konzentrationen außer UDP-Glucose per HPLC bestimmt. Mehrere UDP-Zucker (UDP-Glucose, UDP-Galactose) ergaben auf der HPLC ein Signal und wurden zusammengefaßt betrachtet. Die UDP-Glucose-Konzentration wurde am Photometer über ein gekoppeltes enzymatisches Testverfahren bestimmt. Allen Werten der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.



Die Konzentrationen aller untersuchten Pyrimidinnukleotide lagen in allen Inkubationsansätzen über den für die Nullwertproben erhaltenen Werten (Abb. 3.45). Die Inkubationen mit 10mM Uridin sowie vor allem mit 10mM Adenin wiesen im Vergleich mit den Kontrollen höhere Konzentrationen aller untersuchten Pyrimidinnukleotide auf (WTT > 99%). Bei den Inkubationen mit 2mM Uridin waren nur die zellulären Konzentrationen von UTP und UDP-Glucose höher als in den Kontrollproben (WTT = 72% bzw. 98%). Bei den Orotat-Ansätzen war die extrahierte UTP-Menge größer als in den Kontrollen (WTT = 80%), die übrigen Werte wichen nicht nennenswert von den Kontrollwerten ab.

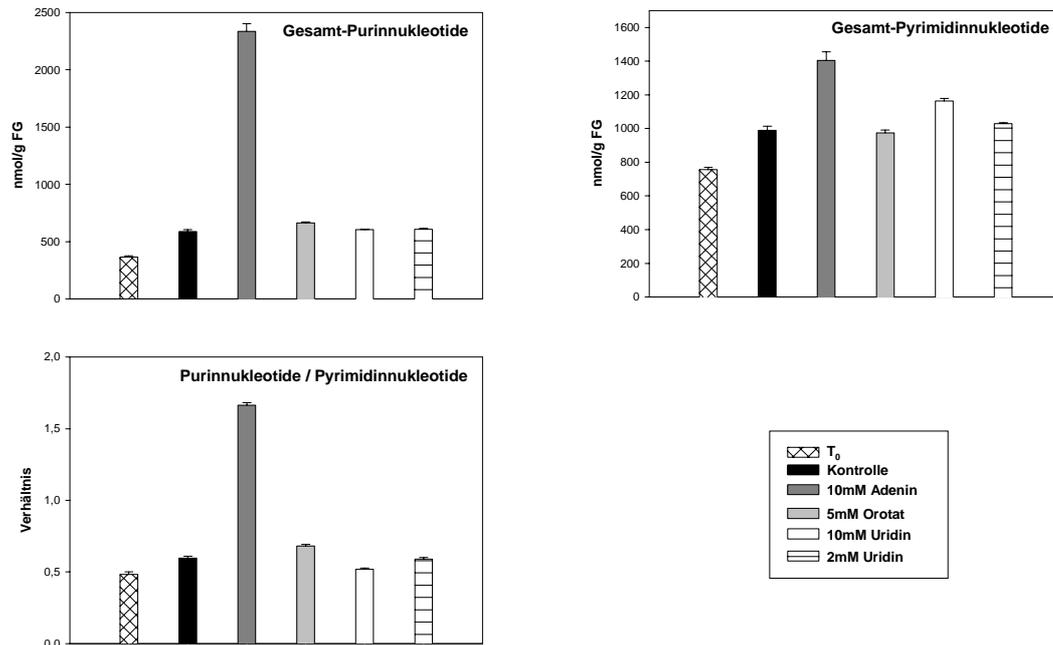


Abb. 3.46 Gesamt-Nukleotid-Daten

Summe der Konzentrationen aller analysierten Purin- bzw. Pyrimidinnukleotide (Abb. 3.44 bzw. Abb. 3.45) sowie das Verhältnis zwischen den beiden Summen. Allen Werten der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Bei Betrachtung der Gesamt-Nukleotid-Daten (Abb. 3.46) wurde festgestellt, daß in den Nullwert-Proben sowohl die Purin- als auch die Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen am niedrigsten waren. Das Nukleotid-Verhältnis war im Vergleich zur Kontrolle etwas in Richtung Pyrimidinnukleotide verschoben. Die Inkubation mit Adenin ließ im Vergleich zur Kontrolle vor allem die Gesamt-Purinnukleotid-Konzentration aber auch die Gesamt-Pyrimidinnukleotid-Konzentration über die 18 Stunden Versuchszeit viel stärker zunehmen, wobei das Nukleotid-Verhältnis stark in Richtung Purinnukleotide verschoben war. Die Inkubationen mit Orotat und 2mM Uridin zeigten keine besonderen Unterschiede zu den Kontrollen, mit der Ausnahme daß bei den Orotat-Ansätzen das Nukleotid-Verhältnis etwas in Richtung Purinnukleotide verschoben war. Während bei der 10mM Uridin-Inkubation die Gesamt-Purinnukleotid-Konzentration dem Kontrollwert entsprach, war die Pyrimidinnukleotid-Konzentration höher. Außerdem war hier das Nukleotid-Verhältnis im Vergleich zur Kontrolle in Richtung Pyrimidinnukleotide verschoben.

Bei Auswertung der Nukleotid-Daten wurde festgestellt, daß die meisten Nukleotid-Konzentrationen der Nullwert-Proben größer waren als in allen bisher durchgeführten Experimenten (vgl. Abschnitt 3.3.2.2b). Dies galt auch für die meisten anderen Metabolit-

Konzentrationen. Eine Nebeneinanderstellung der jeweiligen Daten ist trotzdem möglich, wenn er auf den Vergleich der Kontrollen mit den Inkubationen mit Nukleotidvorstufen beschränkt wird.

(2) Einfluß der Inkubation mit Nukleotidvorstufen auf die extrahierbare DNA- und RNA-Menge

Die Betrachtung des Nukleotid-Stoffwechsels wurde durch eine Analyse der extrahierbaren Gesamtmengen der zellulären Nukleinsäuren – DNA und RNA – vervollständigt (Abb. 3.47). Die Nullwert-Proben und die Kontroll-Proben wiesen ähnliche Konzentrationen an genomischer DNA und Gesamt-RNA auf. Die Adenin-Inkubationen besaßen im Vergleich zur Kontrolle eine geringere Menge an genomischer DNA und Gesamt-RNA. Die Gesamt-RNA-Menge entsprach im Fall der 2mM Uridin-Inkubationen den Kontrollwerten. Die Nukleinsäure-Konzentrationen aller anderen Inkubationen lagen über den Kontrollwerten (WTT jeweils > 80%).

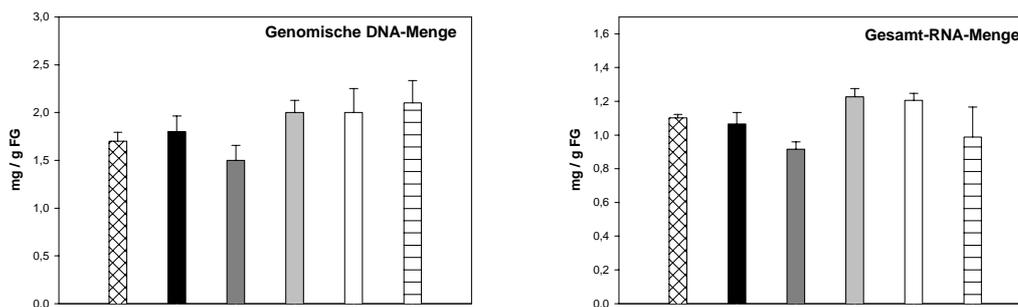


Abb. 3.47 Genomische DNA- und Gesamt-RNA-Menge

Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Genomische DNA wurde aus 200mg gemörsertem Material nach Bouchez und Camilleri, 1998 isoliert. Gesamt-RNA wurde aus 200mg gemörsertem Material nach Logemann et al., 1987 gewonnen. Die Konzentrationen beider Nukleinsäuren wurden am Photometer bestimmt. Allen Werten der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.



(3) Einfluß der Inkubation mit Nukleotidvorstufen auf die extrahierbare Proteinmenge

Eine Analyse der extrahierbaren Gesamt-Proteinmenge (Abb. 3.48) zeigte, daß aus den Kontrollen und den Inkubationen mit 10mM Uridin etwas mehr Protein als aus allen anderen Ansätzen isoliert werden konnte (WTT > 95%). Ansonsten waren keine signifikanten Unterschiede in den zellulären Gesamt-Proteinmengen festzustellen.

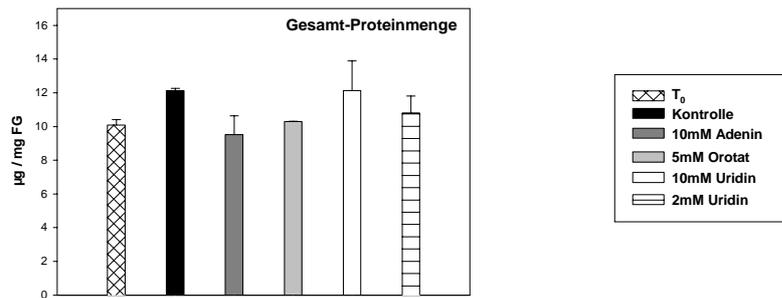


Abb. 3.48 Gesamt-Proteinmenge

Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Ungefähr 20mg gemörstertes Material wurden in PMSF-Extraktionspuffer aufgenommen und die Gesamt-Proteinmenge am Photometer nach Bradford, 1976 bestimmt. Allen Werten der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

#### (4) Einfluß der Inkubation mit Nucleotidvorstufen auf Konzentrationen von Kohlenhydraten

Wie in Abschnitt 3.3.2.2b besprochen, wurden auch für die 18stündige Inkubation mit Nucleotidvorstufen die Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel untersucht, wobei als Metabolite wiederum UDP-Glucose (siehe Abb. 3.45), die wichtigsten freien Zucker (Abb. 3.49) und Hexosephosphate (Abb. 3.50) analysiert wurden.

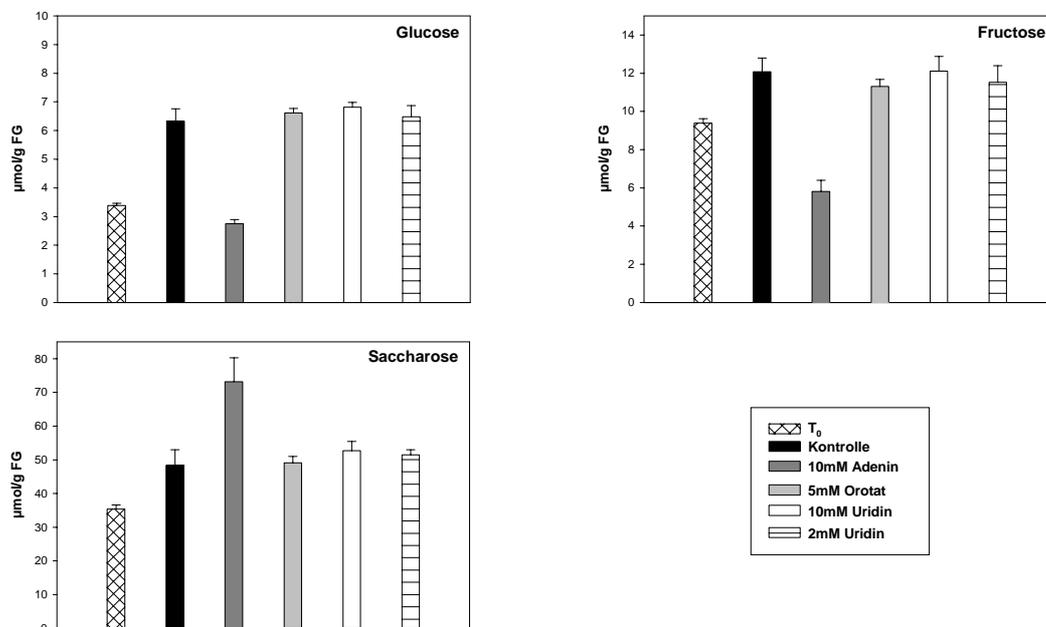


Abb. 3.49 Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose

Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden je ca. 20mg gemörstertes Material einer ethanolschen Extraktion unterzogen und anschließend die Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose am Photometer über gekoppelte enzymatische Testverfahren bestimmt. Allen Werten der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Die Konzentrationen aller drei untersuchten Zucker waren in den Kontroll-Proben größer als in den Nullwert-Proben (Abb. 3.49). Mit Ausnahme der Adenin-Inkubationen glichen alle Werte den Kontrollen. Bei den Adenin-Inkubationen waren die extrahierbaren Glucose- und Fructosemengen kleiner als in den Kontroll- und den Nullwert-Proben, während die Saccharosekonzentration die aller anderen Ansätze übertraf.

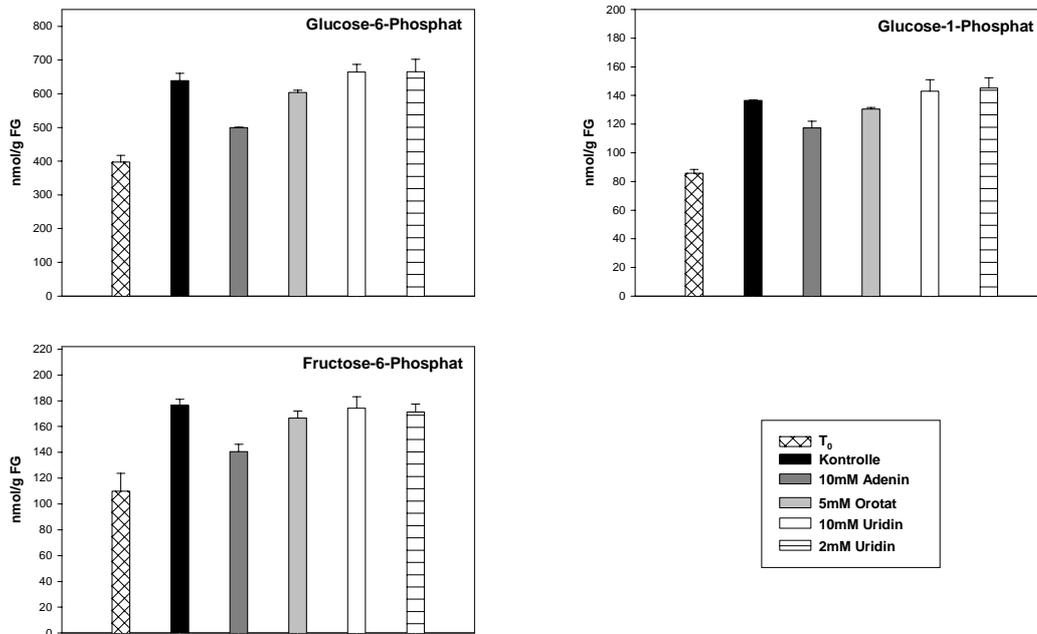


Abb. 3.50 Konzentrationen von Hexosephosphaten

Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat. Ansätze mit 10mM Adenin, 5mM Orotat, 2mM bzw. 10mM Uridin wurden mit Kontrollen ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert ( $T_0$ ) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Material einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat am Photometer über gekoppelte enzymatische Testverfahren bestimmt. Allen Werten der Abbildung liegen 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Wie Abb. 3.50 zeigt, wurde aus allen Inkubationsansätzen eine größere Menge aller untersuchten Hexosephosphate isoliert als aus den Nullwert-Proben. Bis auf die Adenin-Inkubation konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen festgestellt werden. Bei den Adenin-Inkubationen waren die Konzentrationen von Glucose-1-Phosphat und vor allem Glucose-6-Phosphat sowie Fructose-6-Phosphat kleiner als die entsprechenden Kontrollwerte, jedoch größer als die Nullwerte.

(5) Einfluß der Inkubation mit Nukleotidvorstufen auf die extrahierbare mRNA-Menge von an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzymen

Der Einfluß von Nukleotidvorstufen auf die Expression der an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzyme wurde auf mRNA-Ebene untersucht (Abb. 3.51). Es wurden CPSase (hierbei die große Untereinheit) und DHODH für die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese, UMP-Kinase als Verbindung zum Energiestoffwechsel sowie UPPase als Bestandteil der Pyrimidin-Wiederverwertungsreaktionen gewählt.

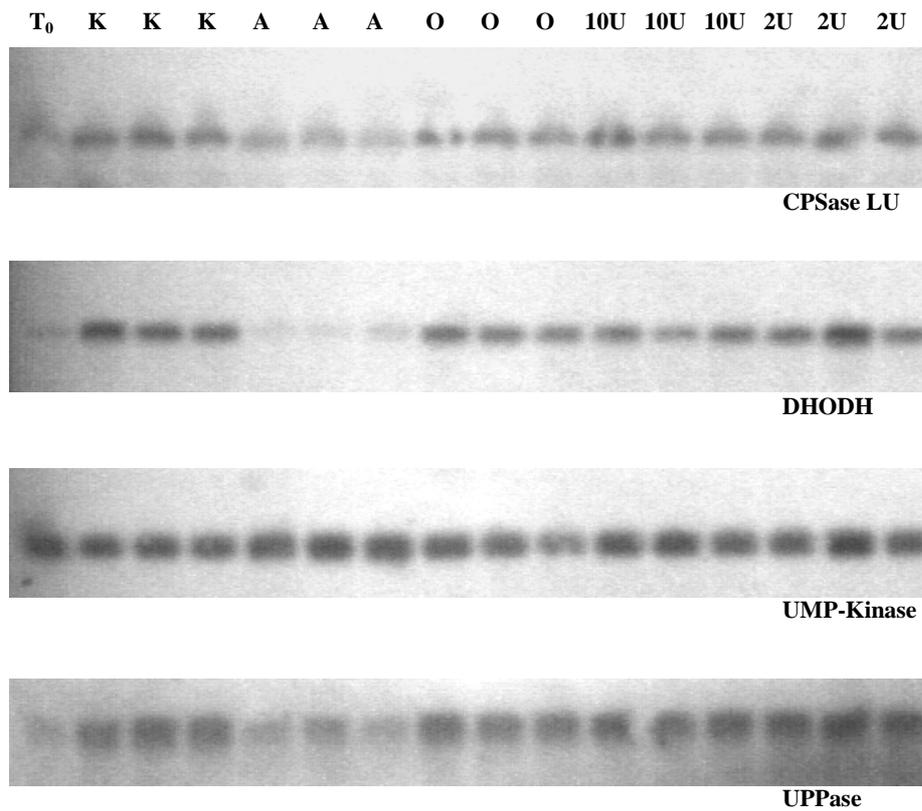


Abb. 3.51a Extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU, DHODH, UMP-Kinase und UPPase

Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Ansätze mit 10mM Adenin (=A), 5mM Orotat (=O), 2mM bzw. 10mM Uridin (=2U bzw. 10U) wurden mit Kontrollen (=K) ohne Nukleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (=T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen.

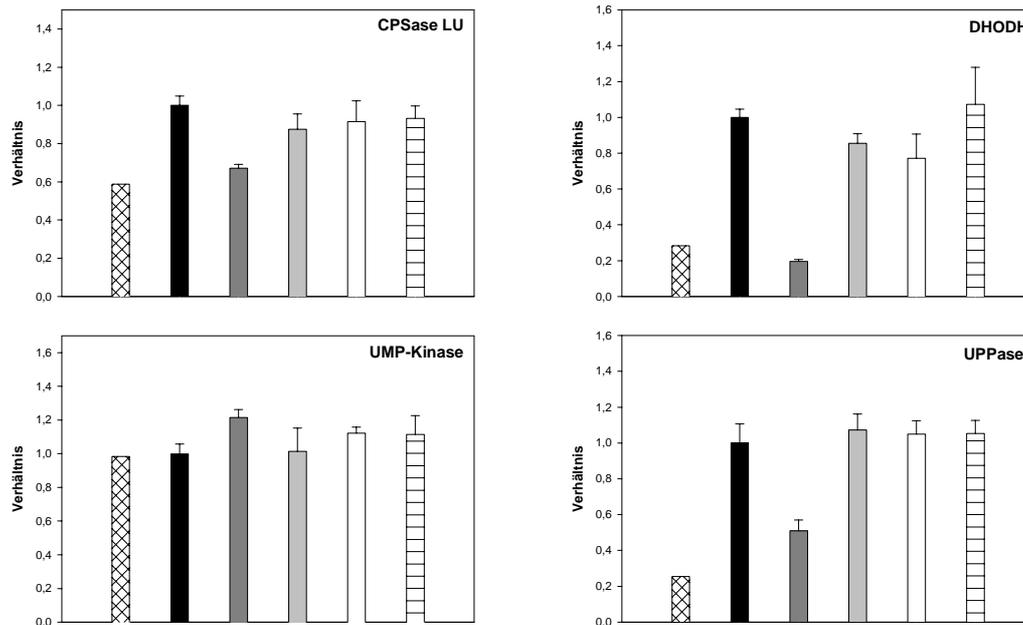
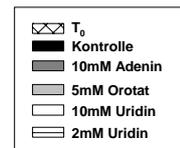


Abb. 3.51b Extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU, DHODH, UMP-Kinase und UPPase

Intensitätsanalyse der Banden der Blots aus Abb. 3.51a. Der Wert für die Kontroll-Inkubation wurde = 1 gesetzt und die übrigen Werte der Inkubationen dazu ins Verhältnis gestellt. Dem Nullwert liegt ein Einzelwert, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist, wenn möglich, die Standardabweichung angegeben.



Wie Abb. 3.51 zeigt, war die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU und DHODH in den Kontrollen im Gegensatz zu dem in Abschnitt 3.3.2.2b beschriebenem Versuch größer als in den Nullwert-Proben, was auch für UPPase gilt. Die extrahierbare mRNA-Menge von UMP-Kinase war im Nullwert und den Kontrollproben ungefähr gleich groß. Bei der Adenin-Inkubation lagen die Werte für CPSase LU, DHODH und UPPase weit unter dem Kontrollwert (für DHODH sogar unter den Nullwert), für UMP-Kinase darüber. Bei der Orotat- und den beiden Uridin-Inkubationen waren die Werte für die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme sowie UPPase kleiner oder ungefähr gleich dem Kontrollwert. Die extrahierbare mRNA-Menge der UMP-Kinase war bei der Orotat-Inkubation gleich dem Kontrollwert, während sie bei den beiden Uridin-Inkubationen etwas größer war (WTT jeweils > 70%).

(6) Einfluß der Inkubation mit Nucleotidvorstufen auf die extrahierbare Proteinmenge von an der Pyrimidinnucleotid-Bereitstellung beteiligten Enzymen

Der Einfluß von im Medium anwesenden Nucleotidvorstufen auf die Expression von Enzymen, die an der Bereitstellung von Pyrimidinnucleotiden beteiligt sind, wurde auch auf Proteinebene untersucht (Abb. 3.52). Es wurden CPSase SU und ATCase aus dem Pyrimidinnucleotid *de novo* Syntheseweg analysiert.

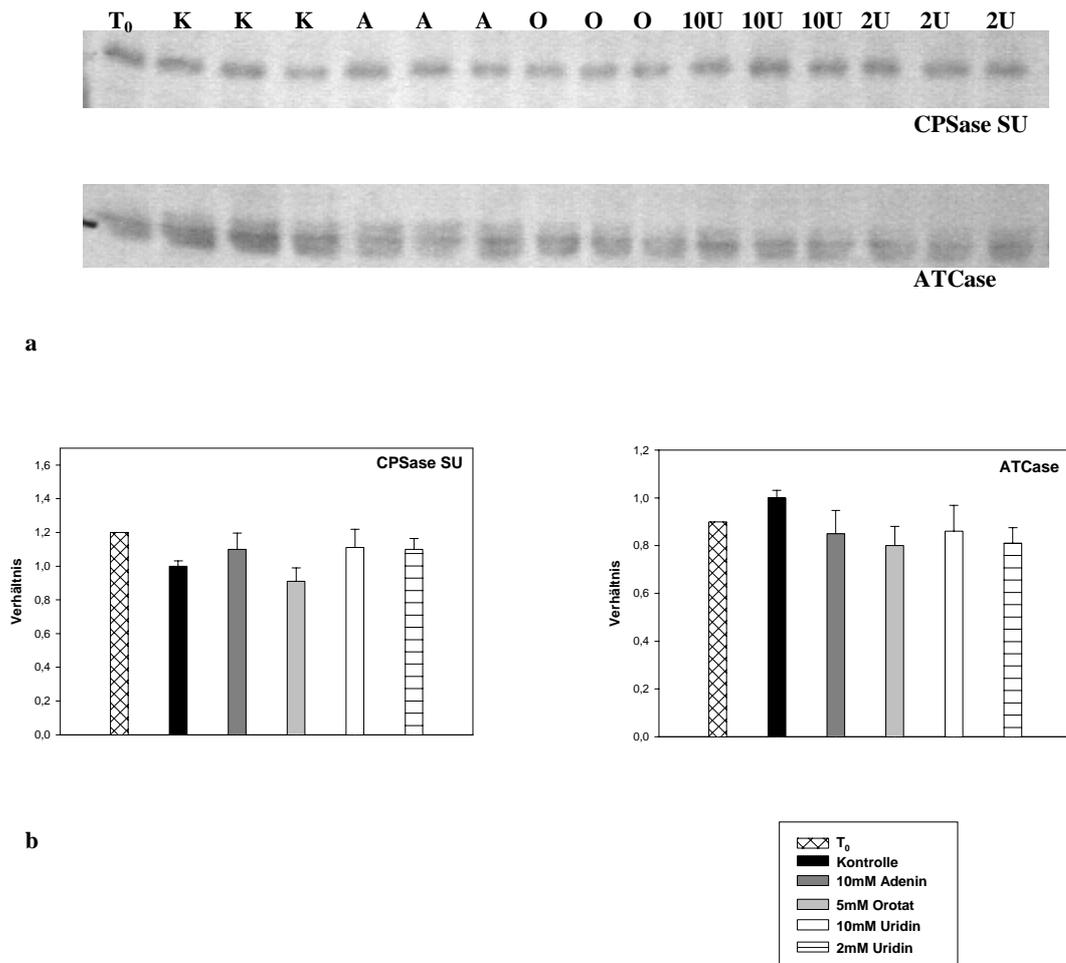


Abb. 3.52 Extrahierbare Proteinmenge von CPSase SU und ATCase

**a:** Western-Blots, nach Detektion mittels der jeweiligen Antikörper. Ansätze mit 10mM Adenin (=A), 5mM Orotat (=O), 2mM bzw. 10mM Uridin (=2U bzw. 10U) wurden mit Kontrollen (=K) ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (=T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-Protein aufgetragen und auf 10% (v/v) - SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Der Wert für die Kontroll-Inkubation wurde = 1 gesetzt und die übrigen Werte der Inkubationen dazu ins Verhältnis gestellt. Dem Nullwert liegt ein Einzelwert, allen anderen Werten der Abbildung drei Einzelwerte zugrunde. Es ist, wenn möglich, die Standardabweichung angegeben.

Für CPSase SU und ATCase konnten keine signifikanten Unterschiede der jeweiligen spezifischen Proteinmenge detektiert werden (Abb. 3.52): Aus fast allen Ansätzen wurden ähnliche Mengen von CPSase SU- bzw. ATCase-Protein isoliert, die nicht wesentlich von den Kontrollwerten abwichen.

(7) Einfluß der Inkubation mit Nucleotidvorstufen auf die extrahierbare Proteinmenge von UGPase

In Abschnitt 3.3.2.2b wurde der Einfluß von Nucleotidvorstufen im Zellkultur-Medium auf die Expression der UGPase, die eine wichtige Rolle für den UDP-Glucose-Gehalt spielt (siehe Abschnitt 1.1.3.2), auf mRNA-Ebene näher untersucht (siehe Abb. 3.42). Im folgenden soll dieser Einfluß auf Protein-Ebene charakterisiert werden (Abb. 3.53).

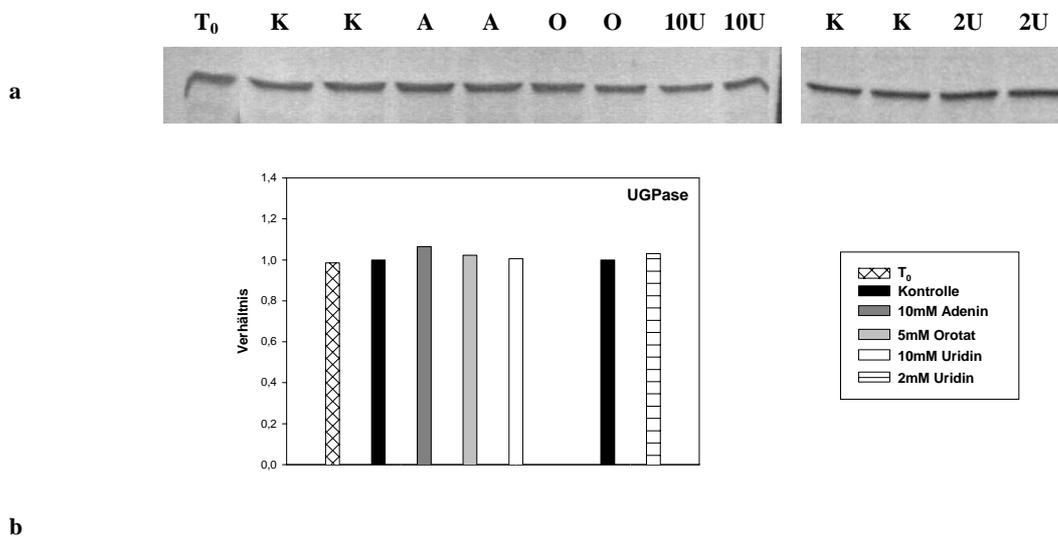


Abb. 3.53 Extrahierbare Proteinmenge von UGPase

**a:** Western-Blots, nach Detektion mittels des UGPase-Antikörpers. Ansätze mit 10mM Adenin (=A), 5mM Orotat (=O), 2mM bzw. 10mM Uridin (=2U bzw. 10U) wurden mit Kontrollen (=K) ohne Nucleotidvorstufen verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 18h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (=T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-Protein aufgetragen und auf 10% (v/v) -SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Der Wert für die Kontroll-Inkubation wurde für jeden Blot = 1 gesetzt und die übrigen Werte der Inkubationen dazu ins Verhältnis gestellt. Dem Nullwert liegt ein Einzelwert, allen anderen Werten der Abbildung zwei Einzelwerte zugrunde.

Wie Abb. 3.53 zeigt, konnte auf Proteinebene keine nennenswerte Variation der Expression der UGPase festgestellt werden. Die Werte der Inkubationen mit Nucleotidvorstufen wichen nicht signifikant von den Kontrollwerten ab. Auch wurde kein Unterschied zwischen dem Nullwert und den 18stündigen Inkubations-Ansätzen beobachtet.

**Fazit:**

Es wurden Inkubationen von Tabak-Zellkulturen mit verschiedenen Nukleotidvorstufen (Adenin, Orotat, Uridin) über 18 Stunden durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente bestätigt.

- 1.) Bei den Inkubationen mit Adenin wurden im Vergleich zu den Kontrollen ähnliche Effekte auf die verschiedenen Metabolit-Konzentrationen und extrahierbaren mRNA-Mengen von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen beobachtet wie beim 6stündigen Inkubationsversuch. Die Ausnahme waren die Konzentrationen von UDP und UTP, die (analog zu den 1d-Werten beim 8tägigen Experiment) über den Kontrollwerten lagen.
- 2.) Die Inkubationen mit Orotat und Uridin beeinflussten den zellulären Metabolismus auch im 18stündigen Versuch nur wenig. Die Konzentrationen von UTP, z.T. auch UDP und UDP-Glucose sowie (bei den Inkubationen mit Uridin) die extrahierbare mRNA-Menge von UMP-Kinase lagen über den Kontrollwerten, ansonsten waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

### 3.3.3 Einfluß von Bestandteilen des Argininstoffwechsels

Carbamoylphosphat kondensiert mit Ornithin zu Citrullin, woraus schließlich Arginin gebildet wird, das eine proteinogene Aminosäure darstellt.

In Pflanzen versorgt eine einzige CPSase sowohl die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese als auch die Argininbiosynthese mit Carbamoylphosphat (O'Neal und Naylor, 1976; siehe auch Abschnitt 1.1.3.1). Der Zusammenhang zwischen beiden Synthesewegen in diesem wichtigen Schritt ist damit offensichtlich.

Aus diesem Grund wurde das Verhältnis zwischen diesen beiden Synthesewegen in verschiedenen pflanzlichen Systemen untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde darauf gerichtet, ob eine Veränderung der Konzentration an Arginin bzw. seinen Vorstufen einen Einfluß auf die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese hat. Zu diesem Zweck wurden Inkubationen mit Arginin, Citrullin und Ornithin durchgeführt.

#### 3.3.3.1 Untersuchung des Einflusses von Arginin und seinen Vorstufen auf die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU in inkubierten Kartoffelscheiben

Durch die Inkubation von Kartoffelscheiben unter bestimmten Bedingungen ist es möglich, gezielt Eingriffe in Stoffwechselwege vorzunehmen und deren Einflüsse zu untersuchen (Geigenberger et al., 1997). In einem ersten Versuch sollte festgestellt werden, ob die Zufuhr von Arginin, Citrullin und Ornithin einen Einfluß auf die extrahierbare mRNA-Menge der CPSase LU hatte, der eine Schlüsselposition bei der Betrachtung von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese einerseits und Argininbiosynthese andererseits zukommt.

Als Untersuchungsobjekte dienten wachsende Kartoffelknollen (10-30g), die im Gewächshaus<sup>2</sup> gezogen worden waren. Daraus wurden identische Scheiben gewonnen und mit 10mM MES pH 6,5 gewaschen (siehe Abschnitt 2.2.1.9). Anschließend wurden die Scheiben auf die jeweiligen Inkubationsansätze verteilt: 10mM Arginin bzw. Citrullin bzw. Ornithin in 20ml 10mM MES pH 6,5 sowie als Kontrolle 20ml 10mM MES pH 6,5 alleine. Nach 1, 3, 6 Stunden wurden von jedem Ansatz 8 Scheiben entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ein Nullwert war aufbewahrt worden. Das Material wurde gemörsert und für CPSase LU einer Northern-Analyse unterzogen (Abb. 3.54).

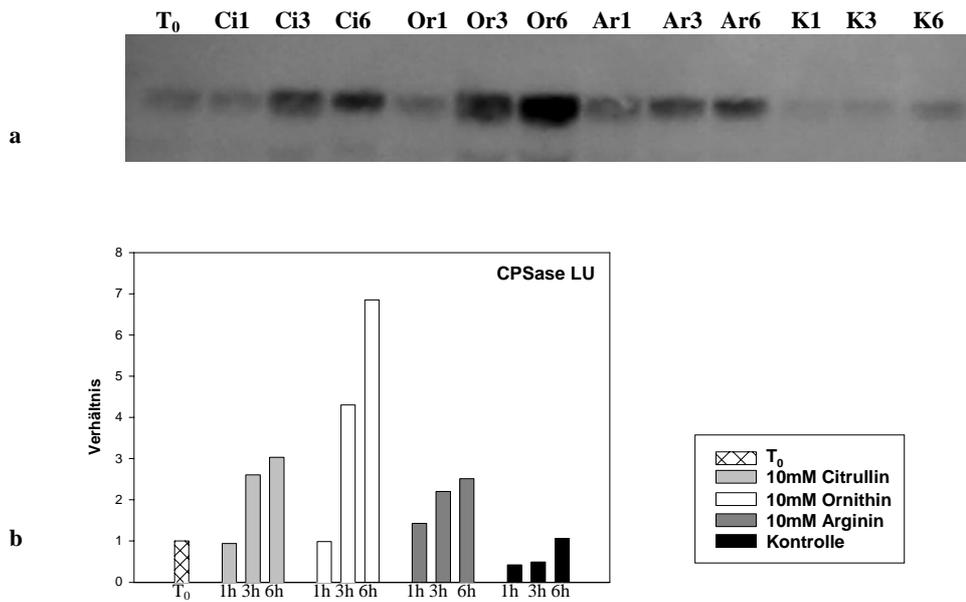


Abb. 3.54 Einfluß von Arginin und seinen Vorstufen Citrullin und Ornithin auf die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU in inkubierten Kartoffelscheiben

**a:** Northern-Blot, nach Hybridisierung mit der CPSase LU - Sonde. Ansätze mit 10mM Citrullin (=Ci), 10mM Ornithin (=Or) und 10mM Arginin (=Ar) wurden mit Kontrollen (=K) ohne Aminosäuren verglichen. 1, 3, 6 = Probenentnahme 1h, 3h, 6h nach Versuchsbeginn. Ein Nullwert (=T<sub>0</sub>) wurde aufbewahrt. Es wurden jeweils 30µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden des Blots. Der Wert für T<sub>0</sub> wurde = 1 gesetzt und die Werte der Inkubationen dazu ins Verhältnis gestellt. 1h, 3h, 6h = 1h, 3h, 6h nach Versuchsbeginn.

In jedem Inkubationsansatz konnte eine Zunahme der extrahierbaren mRNA-Menge von CPSase LU mit der Zeit festgestellt werden (Abb. 3.54). Nach 1 Stunde waren die Werte für die Inkubationen mit Citrullin und Ornithin gleich dem Nullwert, für Arginin größer, für die Kontrolle kleiner. Bei der Kontrolle konnte nach 3 Stunden kaum eine Zunahme der extrahierbaren CPSase LU-spezifischen mRNA-Menge festgestellt werden, während nach 6 Stunden die im Nullwert detektierte Menge erreicht war. Nach 3 und 6 Stunden waren die Werte für die Inkubationen mit allen Aminosäuren wesentlich größer als der Nullwert.

Zu jedem untersuchten Zeitpunkt war die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU in den Knollenscheiben mit Aminosäure-Inkubation größer als in der Kontrolle. Besonders stark waren die Unterschiede zwischen den Ansätzen mit Aminosäuren und der Kontrolle nach 3 und vor allem 6 Stunden. Hierbei wurden für die Ornithin-Inkubation die größten Werte ermittelt, gefolgt von dem Ansatz mit Citrullin und schließlich der Inkubation mit Arginin.

### 3.3.3.2 Beeinflussung von Arginin- und Nukleotidstoffwechsel in Tabakzellkulturen

In Abschnitt 3.3.3.1 konnte ein Einfluß von Bestandteilen aus dem Argininstoffwechsel auf die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU gezeigt werden. Bei der Inkubation mit Kartoffelscheiben muß jedoch mit einbezogen werden, wie das Gewebe auf die Verwundung aufgrund der Scheibenherstellung reagiert. Zusätzlich spielen auch Unterschiede im Gewebe der Kartoffelscheiben eine Rolle. Um den direkten Einfluß von Bestandteilen des Argininstoffwechsels auf den zellulären Metabolismus zu untersuchen, wurden entsprechend den in Abschnitt 3.3.2.2 besprochenen Experimenten Inkubationen mit Tabakzellkulturen durchgeführt.

Es wurden als Ausgangsmaterial 1 Woche alte Zellkulturen verwendet, die vereinigt wurden. Der Versuch wurde gemäß Abschnitt 3.3.2.2a vorbereitet. An Bestandteilen des Argininstoffwechsel wurden 5mM Arginin bzw. Citrullin bzw. Ornithin in Zellkultur-Medium eingesetzt und mit Kontrollansätzen (Zellkultur-Medium alleine) verglichen (jeweils 3 Meßkolben pro Inkubationsbedingung). Aus den vereinigten, 1 Woche alten Zellkulturen wurden 2 Nullwert-Proben entnommen. Nach 6 Stunden wurden die Zellen aller Ansätze filtriert, gewogen und eingefroren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Frischgewichten der einzelnen Ansätze festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das eingefrorene Zellmaterial wurde gemörsert, extrahiert und analysiert.

(1) Einfluß der Inkubation mit Arginin bzw. seinen Vorstufen auf Aminosäure-Konzentrationen

Bei einer Analyse der Beeinflussung von Arginin- und Pyrimidinstoffwechsel durch Inkubation mit Arginin und seinen Vorstufen Citrullin und Ornithin mußte sicher gestellt werden, daß die Aminosäuren von den Zellen aufgenommen und metabolisiert worden waren. Zu diesem Zweck wurden mittels HPLC die Konzentrationen von Arginin und Citrullin in den einzelnen Ansätzen bestimmt (Abb. 3.55). Mit den benutzten Methoden war die direkte Bestimmung der Ornithin-Konzentration nicht möglich. Es wird vermutet, daß Ornithin bei der HPLC-Trennung mit Leucin zusammenfällt. Hier mußte der Nachweis indirekt über die Umsetzung zu Citrullin und Arginin erfolgen.

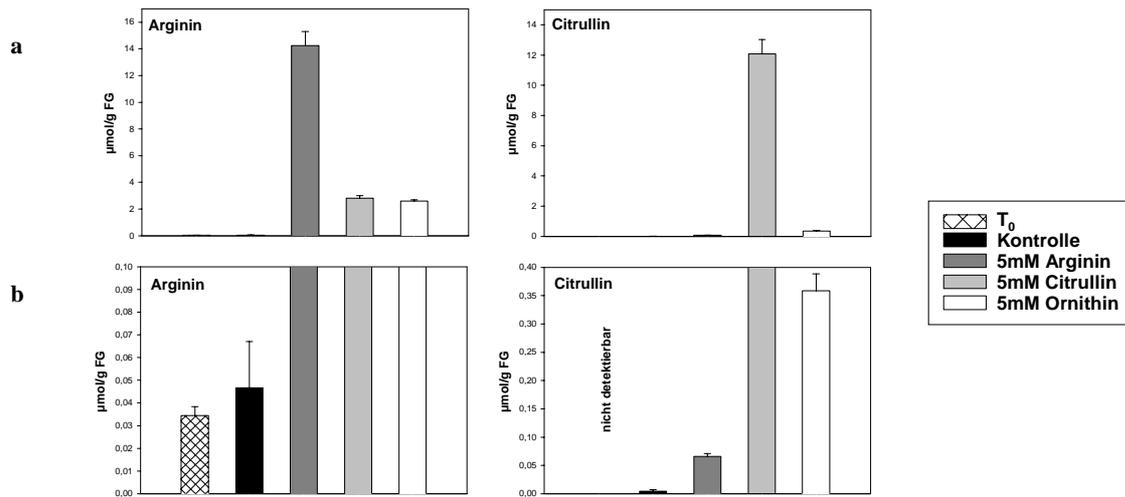


Abb. 3.55 Konzentrationen von Arginin und Citrullin

Ansätze mit 5mM Arginin, 5mM Citrullin und 5mM Ornithin wurden mit Kontrollen ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert ( $T_0$ ) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Aminosäure-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

a: Darstellung des gesamten Bereiches der y-Achse

b: Darstellung des unteren Bereiches der y-Achse

Wie Abb. 3.55 zeigt, wurden Arginin, Citrullin und Ornithin in den durchgeführten Inkubationen von den Zellen aufgenommen und metabolisiert: Die Inkubation aller drei Aminosäuren führte im Vergleich zu den Kontrollen und dem Nullwert zu höheren zellulären Konzentrationen von Arginin und Citrullin: Der zelluläre Arginin-Gehalt war in den Kontrollen nur wenig höher als in den Nullwert-Proben. Bei der Arginin-Inkubation war er um ein vielfaches größer als in den Kontrollen, was die Aufnahme von Arginin beweist. Der erhöhte Arginin-Gehalt in den Proben mit Citrullin- bzw. Ornithin-Inkubation zeigt die Umsetzung dieser Metabolite zu Arginin. Ähnliches gilt für die Citrullin-Konzentrationen: Citrullin war in den Nullwert-Proben nicht nachweisbar und lag in den Kontrollen in sehr geringer Konzentration vor. Bei der Citrullin-Inkubation war die zelluläre Citrullin-Konzentration um ein vielfaches größer als in den Kontrollen, was die Aufnahme von Citrullin beweist. Der erhöhte Citrullin-Gehalt in den Proben mit Arginin- bzw. Ornithin-Inkubation zeigt die Umsetzung dieser Metabolite zu Citrullin.

Im pflanzlichen Metabolismus können alle proteinogenen Aminosäuren synthetisiert werden. Dabei sind sie alle ineinander überführbar, wobei Glutaminsäure ein wichtiges Bindeglied darstellt. Um festzustellen, ob die Zufuhr von Arginin und seinen Vorstufen auch einen Einfluß auf den übrigen Aminosäure-Haushalt in den Zellen hatte, wurden die Konzentrationen von Aminosäuren mittels HPLC bestimmt.

Die Besprechung der einzelnen Aminosäuren erfolgt nach ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Gruppen, die sich aus den verschiedenen Synthesewegen ableitet (Heldt, 1996). Der namensgebende Metabolit wird dabei in hier nicht näher erläuterten Schritten zu den entsprechenden Aminosäuren umgesetzt. Unterschieden werden: Die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Gruppe (Glutamin, Glutaminsäure, Abb. 3.56), die Pyruvat-Gruppe (Alanin, Valin, Leucin, Abb. 3.57), die Oxalacetat-Gruppe (Asparagin, Asparaginsäure, Methionin, Threonin, Lysin und Isoleucin, Abb. 3.58), die Phosphoglycolat-Gruppe (Serin, Glycin, Abb. 3.59), sowie die aromatischen Aminosäuren, die über den Shikimatweg synthetisiert werden (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Abb. 3.60).

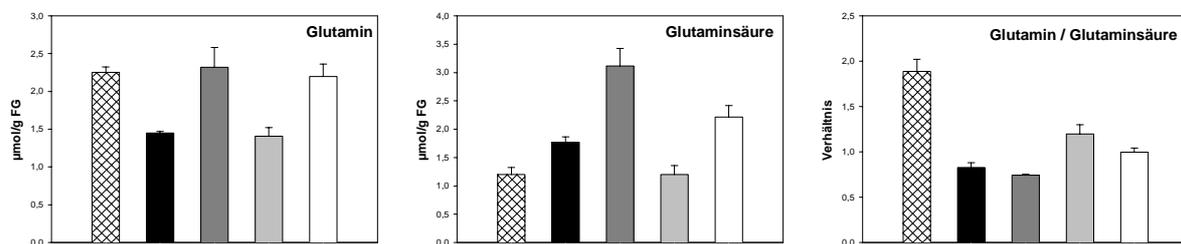
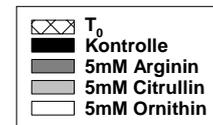


Abb. 3.56 Konzentrationen von Aminosäuren der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Gruppe

Konzentrationen von Glutamin, Glutaminsäure sowie das Verhältnis der beiden Metabolite zueinander. Ansätze mit 5mM Arginin, 5mM Citrullin und 5mM Ornithin wurden mit Kontrollen ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert ( $T_0$ ) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörseretes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Aminosäure-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.



Wie Abb. 3.56 zeigt, führten die Inkubationen mit Arginin und Ornithin im Vergleich zur Kontrolle im untersuchten Zellmaterial zu größeren Konzentrationen von Glutamin und Glutaminsäure. Die Citrullin-Inkubationen hingegen ergaben im Vergleich mit den Kontrollproben die gleichen (Glutamin) oder niedrigere Werte (Glutaminsäure). Verglichen mit den Nullwert-Proben blieb die Glutamin-Konzentration bei der Inkubation mit Arginin und Ornithin auf gleichem Niveau, während aus den Kontrollen und den mit Citrullin inkubierten Proben weniger Glutamin extrahiert wurde. Die Glutaminsäure-Konzentration hatte in Bezug auf die Nullwerte bei den Kontrollproben sowie den mit Arginin und Ornithin inkubierten Proben zugenommen, während sie bei den mit Citrullin inkubierten Proben gleich geblieben war. Das Glutamin/Glutaminsäure-Verhältnis war in den Nullwert-Proben im Vergleich zur Kontrolle in Richtung Glutamin verschoben, was auch für die Proben aus der Citrullin- und Ornithin-Inkubation galt. Bei der Arginin-Inkubation waren in diesem Punkt keine Unterschiede zur Kontrolle festzustellen.

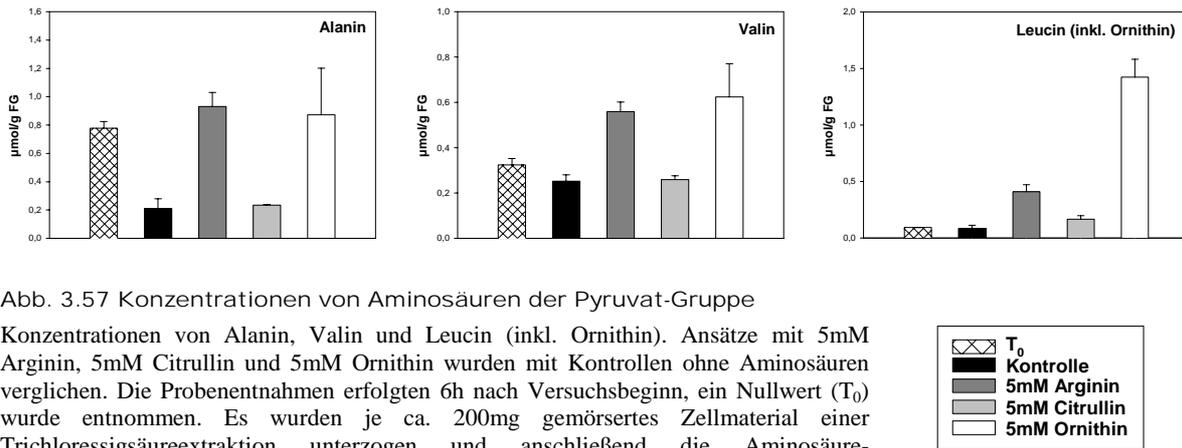


Abb. 3.57 Konzentrationen von Aminosäuren der Pyruvat-Gruppe

Konzentrationen von Alanin, Valin und Leucin (inkl. Ornithin). Ansätze mit 5mM Arginin, 5mM Citrullin und 5mM Ornithin wurden mit Kontrollen ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Aminosäure-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Bei den Inkubationen mit Arginin und Ornithin waren die extrahierbaren Mengen von allen Aminosäuren aus der Pyruvat-Gruppe wesentlich größer als bei den Kontroll-Proben und auch bei den Nullwert-Proben (Abb. 3.57). Bestandteil der „Leucin“-Konzentration in den einzelnen Ansätzen ist vermutlich auch Ornithin. Dieser Wert ist bei der Ornithin-Inkubation besonders hoch und liegt auch bei der Arginin-Inkubation weit über dem Kontrollwert. In den Citrullin-Ansätzen wurden in jedem Fall den Kontrollen ähnliche Werte ermittelt. Die Kontrollwerte schließlich waren stets kleiner als die Nullwerte.

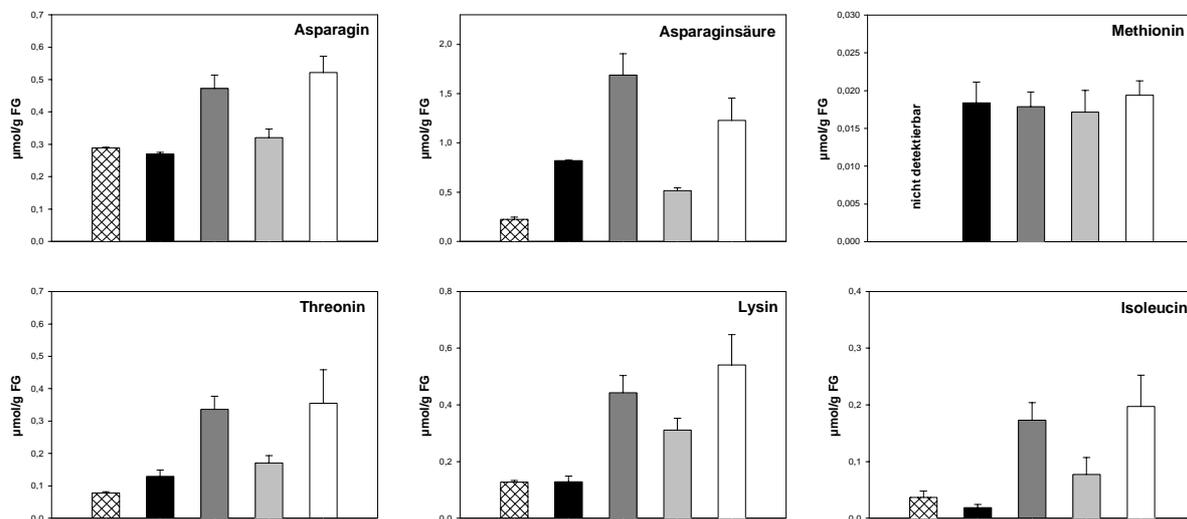


Abb. 3.58 Konzentrationen von Aminosäuren der Oxalacetat-Gruppe

Konzentrationen von Asparagin, Asparaginsäure, Methionin, Threonin, Lysin und Isoleucin. Ansätze mit 5mM Arginin, 5mM Citrullin und 5mM Ornithin wurden mit Kontrollen ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Aminosäure-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Bei den Inkubationen mit Arginin und Ornithin waren im Vergleich zu den Kontrollen bzw. Nullwerten die zellulären Konzentrationen aller Aminosäuren der Oxalacetat-Gruppe mit Ausnahme von Methionin wesentlich höher (Abb. 3.58). Dies gilt bis auf Asparaginsäure und Methionin auch für die Citrullin-Inkubationen. Die Methionin-Konzentration wurde von der Inkubation mit Arginin oder seinen Vorstufen nicht beeinflusst. Für Asparaginsäure, Methionin und Threonin waren die Kontrollwerte im Vergleich mit den Nullwerten größer, bei den anderen Aminosäuren kleiner bis gleich.

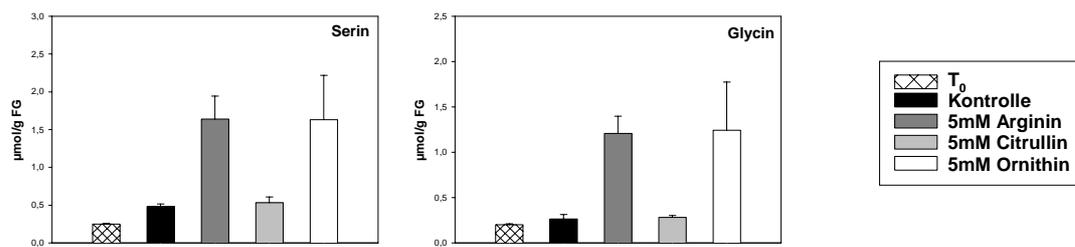


Abb. 3.59 Konzentrationen von Aminosäuren der Phosphoglycolat-Gruppe

Konzentrationen von Serin und Glycin. Ansätze mit 5mM Arginin, 5mM Citrullin und 5mM Ornithin wurden mit Kontrollen ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörsertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Aminosäure-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Auch bei den Aminosäuren der Phosphoglycolat-Gruppe waren die zellulären Konzentrationen bei Anwesenheit von Arginin und Ornithin im Medium höher als in den Kontrollen bzw. den Nullwert-Proben, während die Citrullin-Inkubationen ohne Effekt waren (Abb. 3.59). Die Kontrollwerte waren stets größer als die Nullwerte.

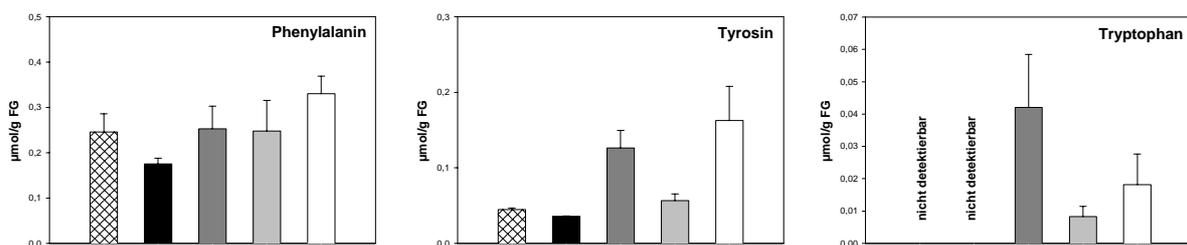
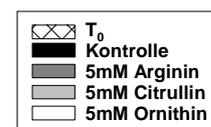


Abb. 3.60 Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren

Konzentrationen von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Ansätze mit 5mM Arginin, 5mM Citrullin und 5mM Ornithin wurden mit Kontrollen ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörsertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Aminosäure-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.



Bei den Inkubationen mit Arginin, Citrullin und Ornithin waren die extrahierbaren Mengen von allen aromatischen Aminosäuren wesentlich größer als bei den Kontroll-Proben und (mit der Ausnahme von Phenylalanin) auch bei den Nullwert-Proben (Abb. 3.60). Hierbei hatten die Inkubationen mit Arginin und Ornithin vor allem auf die Konzentrationen von Tyrosin und Tryptophan einen größeren Effekt als die Inkubationen mit Citrullin. In den Kontrollen waren die Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin niedriger als in den Nullwert-Proben. Tryptophan konnte weder in den Kontrollen noch in den Nullwert-Proben nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung des Gesamt-Aminosäure-Gehaltes (=Summe der Gehalte aller untersuchten Aminosäuren) in den einzelnen Ansätzen wurde festgestellt, daß die Werte bei den Proben mit Arginin bzw. seinen Vorstufen im Medium größer waren als bei den Kontrollen oder den Nullwerten (Abb. 3.61). Dabei waren die Werte bei der Inkubation mit Arginin am größten, gefolgt von Citrullin und schließlich Ornithin. Der Gesamt-Aminosäure-Gehalt war in den Kontrollen etwas niedriger als in den Nullwerten.

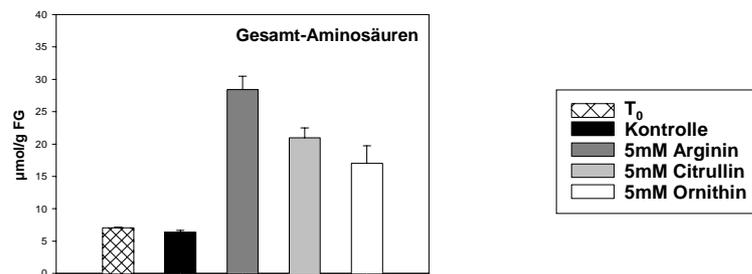


Abb. 3.61 Gesamt-Aminosäure-Gehalt

Summe der Aminosäure-Konzentrationen aus Abb. 3.55 - 3.60. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Bei Betrachtung der Gesamt-Proteinmengen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Inkubationsansätzen detektiert (Daten nicht gezeigt).

(2) Einfluß der Inkubation mit Arginin bzw. seinen Vorstufen auf Nukleotid-Konzentrationen

Der Einfluß der 6stündigen Inkubationen mit Arginin bzw. seinen Vorstufen auf den Nukleotidspiegel der Zellkulturen ist in Abb. 3.62 (Purinnukleotide), Abb. 3.63 (Pyrimidinnukleotide) sowie Abb. 3.64 (Gesamt-Nukleotid-Daten) dargestellt.

Dabei ist zu bedenken, daß durch die Inkubation mit Arginin und Ornithin die Konzentrationen von Glutamin (Abb. 3.56), Asparaginsäure (Abb. 3.58) und Glycin (Abb. 3.59) über den Kontrollwerten lagen. Diese drei Aminosäuren stellen direkte Vorstufen bei der Nukleotid *de novo* Synthese dar (Glycin nur bei der Purinnukleotid-Synthese).

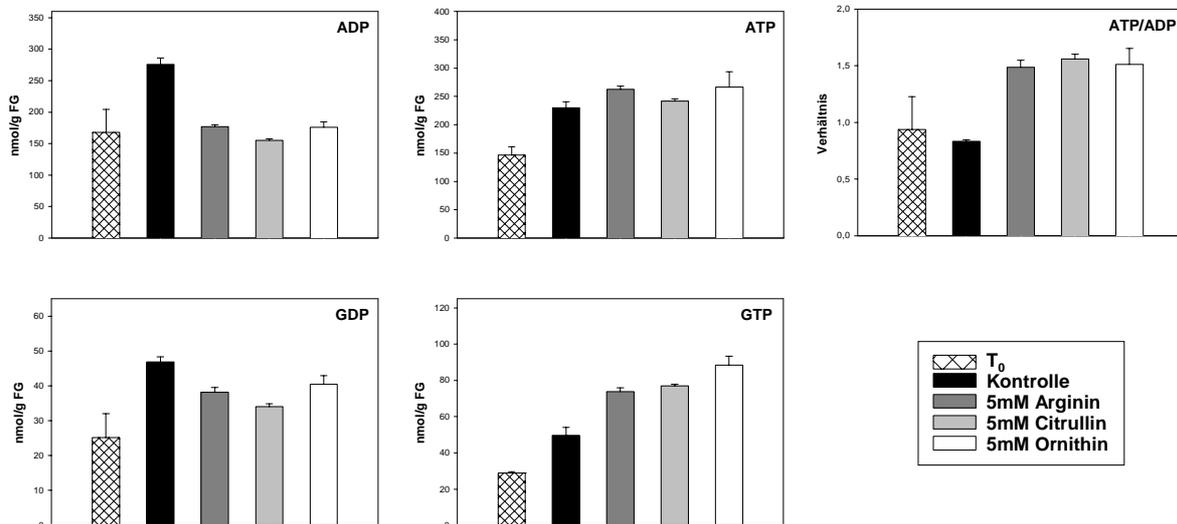


Abb. 3.62 Konzentrationen von Purinnukleotiden

Konzentrationen von ADP, ATP, GDP und GTP. Außerdem wurde das Verhältnis ATP zu ADP berechnet. Ansätze mit 5mM Arginin, 5mM Citrullin und 5mM Ornithin wurden mit Kontrollen ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörseretes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Nukleotid-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Wie schon bei anderen Inkubationen gezeigt (siehe Abb. 3.33 und Abb. 3.44), war der Purinnukleotidgehalt auch in diesem Experiment in den Kontrollen größer als in den Nullwert-Proben. Die Inkubationen mit Arginin bzw. seinen Vorstufen Citrullin und Ornithin hatten einander ähnliche Auswirkungen auf die untersuchten Purinnukleotid-Konzentrationen (Abb. 3.62): Die Konzentrationen der Diphosphat-Nukleotide ADP und GDP lagen bei externer Zufuhr von Arginin bzw. seinen Vorstufen unter den Kontrollwerten und z.T. nur wenig über den Nullwerten. Demgegenüber nahm der Gehalt an den Triphosphat-Nukleotiden ATP und vor allem GTP bei den Inkubationen mit Arginin bzw. seinen Vorstufen von den Nullwerten aus gesehen stärker zu als bei den Kontrollen (WTT > 80%). Eine Berechnung des Verhältnisses ATP zu ADP zeigte, daß dieses Gleichgewicht bei allen drei Aminosäure-Inkubationen im Vergleich zur Kontrolle oder dem Nullwert in Richtung ATP verschoben war.

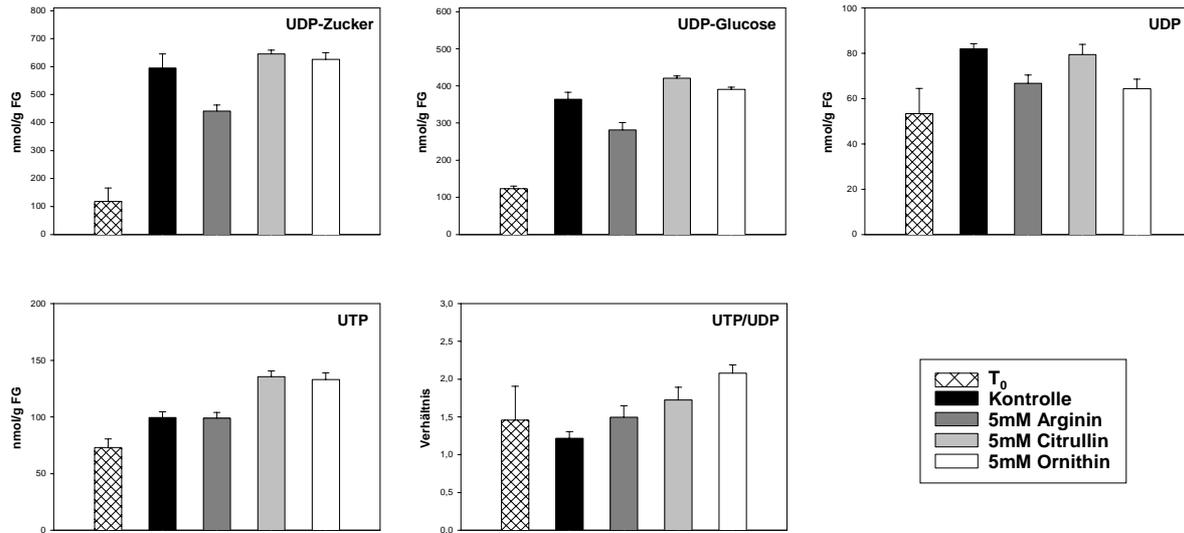


Abb. 3.63 Konzentrationen von Pyrimidinnukleotiden

Konzentrationen von UDP-Zuckern, UDP-Glucose, UDP und UTP. Außerdem wurde das Verhältnis UTP zu UDP berechnet. Ansätze mit 5mM Arginin, 5mM Citrullin und 5mM Ornithin wurden mit Kontrollen ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden je ca. 200mg gemörstertes Zellmaterial einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend alle Nukleotid-Konzentrationen außer UDP-Glucose per HPLC bestimmt. Mehrere UDP-Zucker (UDP-Glucose, UDP-Galactose) ergaben auf der HPLC ein Signal und wurden zusammengefaßt betrachtet. Die UDP-Glucose-Konzentration wurde am Photometer über ein gekoppeltes enzymatisches Testverfahren bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Wie Abb. 3.63 zeigt, waren auch die Konzentrationen der einzelnen untersuchten Pyrimidinnukleotide in den Kontrollen höher als in den Nullwert-Proben. Bei den Inkubationen mit Arginin waren die extrahierbaren zellulären Konzentrationen von UDP-Zuckern, UDP-Glucose speziell und UDP kleiner als in den Kontrollen, während der UTP-Gehalt unverändert blieb. Bei Inkubation mit Citrullin bzw. Ornithin wurden aus den Zellen UDP-Zucker- und UDP-Glucose-Mengen isoliert, die den Kontrollwerten entsprachen, während die UTP-Konzentrationen höher waren. Für die UDP-Konzentration ergab die Inkubation mit Citrullin im Vergleich mit den Kontrollen keine Veränderung, während bei den Ansätzen mit Ornithin Werte ermittelt wurden, die deutlich unter den Kontrollwerten, aber über den Nullwerten lagen. Bei Betrachtung der UTP zu UDP – Relation zeigte sich, daß im Vergleich zur Kontrolle alle anderen Ansätze Verhältnisse zeigten, die in Richtung UTP verschoben waren, wobei dieser Effekt bei der Ornithin-Inkubation am stärksten, bei der Arginin-Inkubation am geringsten ausgeprägt war.

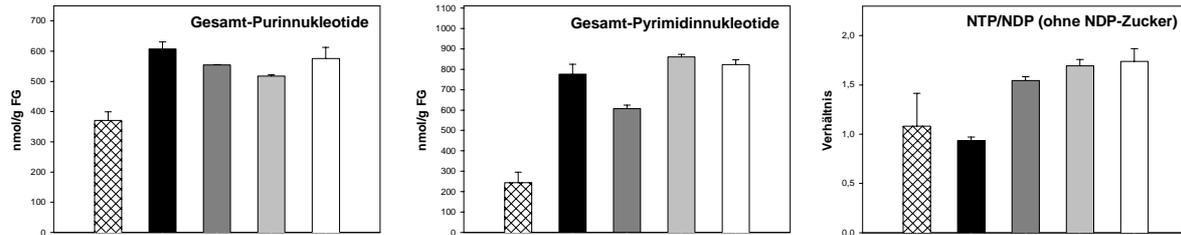
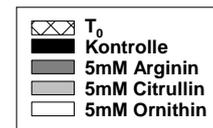


Abb. 3.64 Gesamt-Nukleotid-Daten

Summe der Konzentrationen aller analysierten Purin- und Pyrimidinnukleotide (Abb. 3.62 und Abb. 3.63) sowie das Verhältnis Nucleosidtriphosphate zu Nucleosiddiphosphate (ohne NDP-Zucker). Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.



Wie Abb. 3.64 zeigt, nahm im Vergleich zum Nullwert die Gesamtkonzentration aller untersuchten Nukleotide in allen Inkubationen zu. Der Gesamt-Purinnukleotid-Gehalt war bei den drei Aminosäure-Inkubationen nur unwesentlich kleiner als der Kontrollwert. Der Gesamt-Pyrimidinnukleotid-Gehalt war bei der Arginin-Inkubation deutlich kleiner als der Kontrollwert, bei den Inkubationen mit Citrullin und Ornithin etwas größer. Das Verhältnis Purin- zu Pyrimidinnukleotide wurde durch die Inkubationen mit den drei Aminosäuren im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant verändert (Daten nicht gezeigt).

Abb. 3.64 zeigt ferner, daß die Inkubation mit allen drei Aminosäuren im Vergleich zum Nullwert und den Kontrollen eine Verschiebung des NTP/NDP-Verhältnisses in Richtung NTP mit sich brachte.

(3) Einfluß der Inkubation mit Arginin bzw. seinen Vorstufen auf Konzentrationen von Kohlenhydraten

Die Beeinflussung des eng mit dem Pyrimidinnukleotidstoffwechsels verbundenen Kohlenhydratstoffwechsels (Abb. 1.5) durch die externe Zufuhr von Arginin bzw. seinen Vorstufen Citrullin und Ornithin wurde anhand verschiedener Metabolite untersucht. Es wurden die zellulären Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose, sowie von Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat bestimmt (Abb. 3.65).

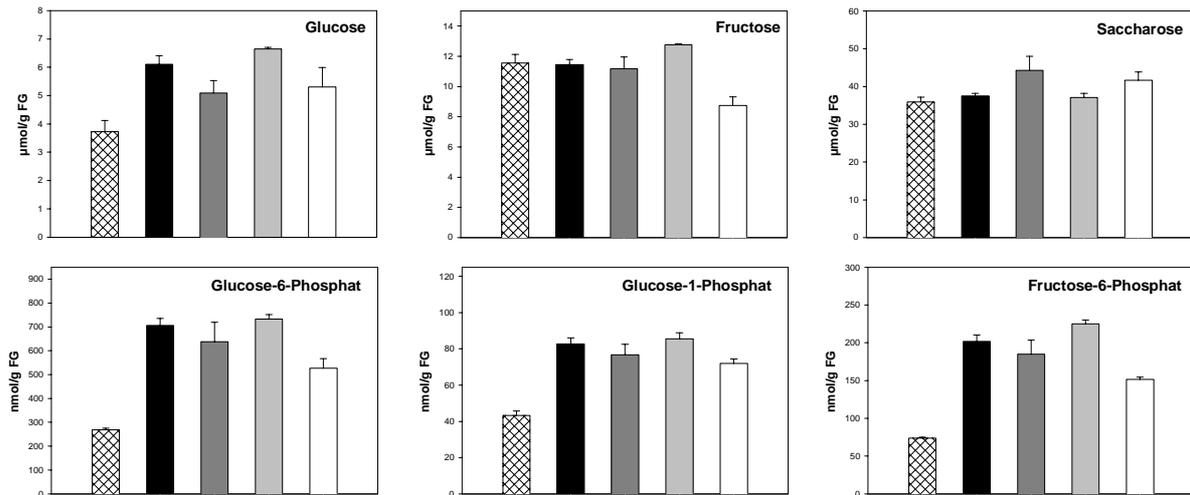
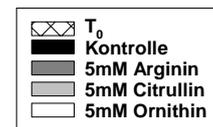


Abb. 3.65 Konzentrationen von Glucose, Fructose, Saccharose und Hexosephosphaten

Ansätze mit 5mM Arginin, 5mM Citrullin und 5mM Ornithin wurden mit Kontrollen ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden je ca. 20mg gemörstertes Material einer ethanolischen Extraktion unterzogen und anschließend die Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose am Photometer über gekoppelte enzymatische Testverfahren bestimmt. Weiterhin wurden je ca. 200mg gemörstertes Material einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat am Photometer über gekoppelte enzymatische Testverfahren bestimmt. Dem Nullwert liegen 2, allen anderen Werten der Abbildung 3 Einzelwerte zugrunde. Es ist die Standardabweichung angegeben.



Die Inkubation mit den verschiedenen Aminosäuren hatte unterschiedliche Wirkung auf die untersuchten Metabolite aus dem Kohlenhydratstoffwechsel (Abb. 3.65): Bei den Arginin-Inkubationen waren bis auf Saccharose alle zellulären Kohlenhydrat-Konzentrationen kleiner bis gleich den Kontrollwerten. Citrullin hatte keine signifikante Wirkung auf die zellulären Kohlenhydrat-Konzentrationen. Bei den Ornithin-Inkubationen lagen die meisten Konzentrationen unter den Kontrollwerten.

(4) Einfluß der Inkubation mit Arginin bzw. seinen Vorstufen auf die extrahierbare mRNA-Menge von an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzymen

Aufgrund der Schlüsselposition von CPSase LU für die Pyrimidinnukleotid- und Argininbiosynthese wurde ihre Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Daneben fanden Analysen für DHODH und UMP-Kinase statt (Abb. 3.66).

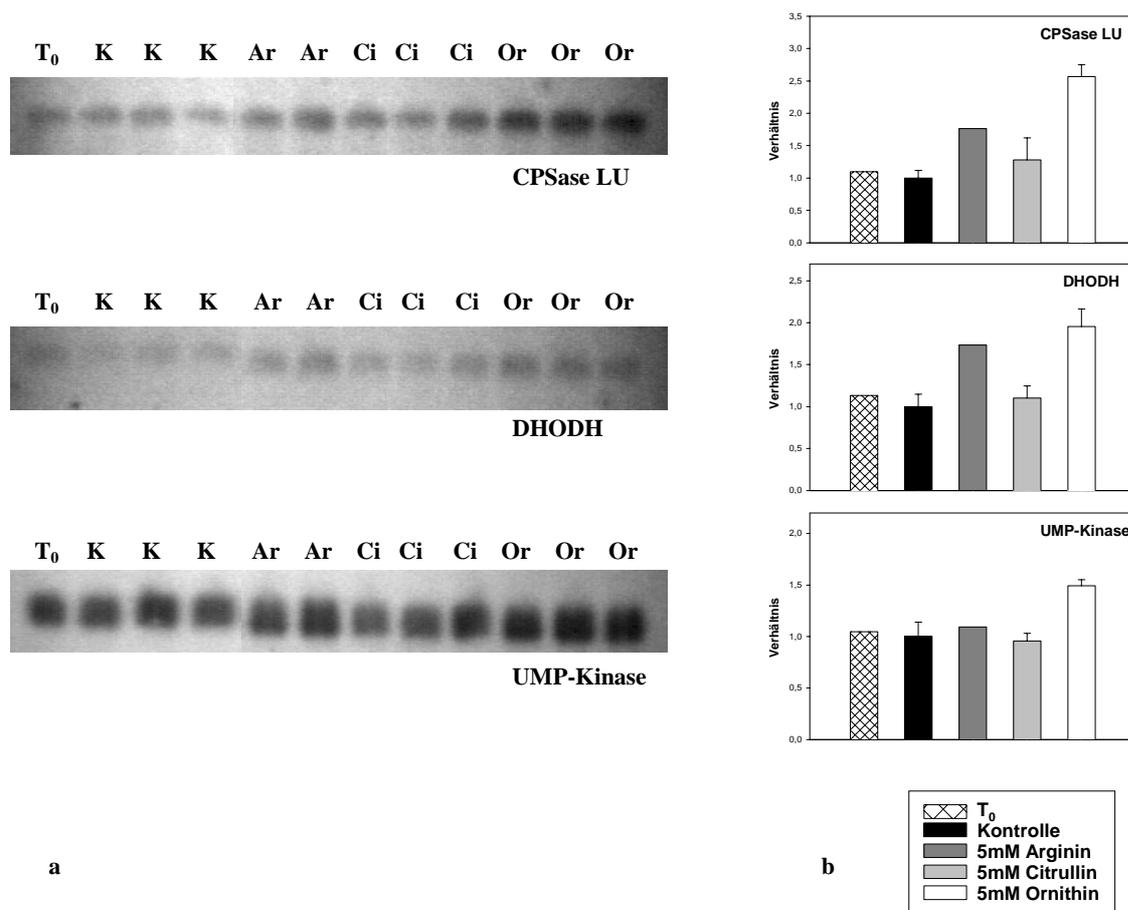


Abb. 3.66 Extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU, DHODH und UMP-Kinase

**a:** Northern-Blots, nach Hybridisierung mit den entsprechenden Sonden. Ansätze mit 5mM Arginin (=Ar), 5mM Citrullin (=Ci) und 5mM Ornithin (=Or) wurden mit Kontrollen (=K) ohne Aminosäuren verglichen. Die Probenentnahmen erfolgten 6h nach Versuchsbeginn, ein Nullwert (=T<sub>0</sub>) wurde entnommen. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Der Wert für die Kontroll-Inkubation wurde = 1 gesetzt und die übrigen Werte der Inkubationen dazu ins Verhältnis gestellt. Die Werte in der Abbildung setzen sich aus unterschiedlich vielen Einzelwerten zusammen: Nullwert aus einem, die Arginin-Inkubationen aus zwei, die übrigen Inkubationen aus drei. Es ist, wenn möglich, die Standardabweichung angegeben.

Die Inkubation mit Arginin bzw. seinen Vorstufen Citrullin und Ornithin hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die extrahierbare mRNA-Menge der untersuchten Genprodukte (Abb. 3.66): Im Vergleich zu den Kontrollen und auch zu dem Nullwert war die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU und DHODH in den mit Arginin bzw. Ornithin inkubierten Ansätzen größer, wobei dies bei letzteren ausgeprägter war. Die Inkubation mit Citrullin führte im Fall von CPSase LU zu etwas höheren Werten als bei den Kontrollen und dem Nullwert, während die extrahierbare mRNA-Menge von DHODH unbeeinflusst blieb. Insgesamt ähnelt das Verteilungsmuster hier stark den Verhältnissen bei den meisten Aminosäuren-Konzentrationen: Die Werte für die Arginin- und Ornithin-Inkubationen lagen über den Kontrollwerten, Citrullin war ohne sichtbare Auswirkung.

Die extrahierbare mRNA-Menge von UMP-Kinase wurde nur bei externer Zufuhr von Ornithin im Vergleich zum Nullwert und den Kontrollen erhöht, während die Inkubationen mit Arginin und Citrullin keine Wirkung hatten (Abb. 3.66).

In allen Fällen waren die Kontrollwerte etwas kleiner als die Nullwerte (Abb. 3.66).

Eine Analyse der extrahierbaren spezifischen Proteinmenge wurde für CPSase LU, CPSase SU und ATCase durchgeführt. Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

**Fazit:**

Es wurden Inkubationen von Tabak-Zellkulturen mit Arginin und seinen Vorstufen Citrullin und Ornithin über 6 Stunden durchgeführt:

- 1.) Alle drei Aminosäuren wurden von den Zellen aufgenommen und metabolisiert.
- 2.) Die Inkubationen mit Arginin und Ornithin bewirkten im Vergleich zu den Kontrollen eine Erhöhung der meisten anderen Aminosäure-Konzentrationen. Bei der Inkubation mit Citrullin waren die Konzentrationen von Citrullin und Arginin wesentlich höher als in den Kontrollen, die meisten anderen Aminosäure-Konzentrationen blieben jedoch ohne sichtbare Beeinflussung.
- 3.) Bei den Inkubationen mit Arginin und Ornithin konnte im Vergleich zu den Kontrollen auch eine Erhöhung der Konzentrationen von Glutamin, Asparaginsäure und Glycin festgestellt werden, die Vorstufen bei der Nukleotid-Synthese sind. Dies resultierte nicht in einer signifikanten Erhöhung der Purin- bzw. Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen. Allerdings wurde das Verhältnis NTP/NDP in Richtung NTP verschoben, was auch bei der Citrullin-Inkubation festgestellt wurde.
- 4.) Bei den Inkubationen mit Arginin und Ornithin waren die extrahierbaren mRNA-Mengen von CPSase LU und DHODH größer als in den Kontrollen, was bei den Citrullin-Inkubationen nur für CPSase LU galt. Eine Erhöhung der extrahierbaren mRNA-Menge von CPSase LU war auch bei Inkubation von Kartoffelscheiben mit Arginin, Citrullin und Ornithin festzustellen. Die extrahierbare mRNA-Menge von UMP-Kinase war nur bei der Ornithin-Inkubation größer als in den Kontrollen.

## 3.4 Beeinflussung des Nukleotid-Stoffwechsels durch gentechnische Veränderung von Pflanzen

Die Verwendung transgener Pflanzen (Stitt und Sonnewald, 1995) bietet die Möglichkeit, gezielte Eingriffe in den Pflanzenmetabolismus vorzunehmen. Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten der Einflußnahme, von denen zwei untersucht wurden:

Zum einen können durch den erfolgreichen Einbau eines artfremden Gens in das Pflanzengenom vollkommen neue Eigenschaften und Stoffwechsel-Reaktionen etabliert werden, die Auswirkungen auf bestimmte Stoffwechselflüsse und darüber hinaus auch den Gesamtmetabolismus haben können. Eine entsprechende Untersuchung hinsichtlich der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese wird in Abschnitt 3.4.1 erläutert.

Zum anderen kann durch die Verwendung von Gegensinn-Pflanzen die Expression eines bestimmten Genproduktes gezielt ausgeschaltet werden, wobei u.U. nicht nur die direkt betroffenen Stoffwechsel-Reaktionen sondern der gesamte Metabolismus beeinflusst sein können. Eine derartige Analyse in Bezug auf die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese wird in Abschnitt 3.4.2 angesprochen.

### 3.4.1 Einflußnahme auf die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese durch Einführung von Hefe-UDPase in das Tabakgenom

UDPase katalysiert die Umsetzung von UDP zu UMP und  $P_i$  (siehe Abschnitt 1.1.3.2). Das Enzym ist im Golgi-Apparat lokalisiert und wird als Marker dieses Vesikelsystems benutzt (Ray et al., 1969). Eine Beziehung zwischen der dort stattfindenden Polysaccharid-Biosynthese und der UDPase-Aktivität wurde gezeigt (Dauwalder et al., 1969; Ray et al., 1969; Mitsui et al., 1994): Demnach entfernt UDPase das bei der Umsetzung von UDP-Glucose anfallende, die Polysaccharid-Biosynthese inhibierende UDP (Orellana et al., 1997; Neckelmann und Orellana, 1998).

Es wurde Hefe-UDPase, die unter Kontrolle des konstitutiven 35S-*CaMV*-Promotors (Franck et al., 1980) stand (Abb. 2.1), in Tabak eingeführt. Damit sollte das im Verlauf der Polysaccharid-synthese entstehende UDP schneller in UMP und  $P_i$  gespalten werden, wovon Auswirkungen auf den gesamten Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel erhofft wurden. Es wurde bereits gezeigt, daß Enzyme des Golgi-Apparates aus anderen Organismen (z.B. Säugetieren:

Wee et al., 1998) in Pflanzen korrekt exprimiert und lokalisiert werden. Die Verwendung von Hefe-UDPase für die gewünschte Transformation von Tabakpflanzen war demnach ebenfalls vielversprechend.

Weiterhin sollte generell geklärt werden, ob eine zusätzliche UDPase-Aktivität Einfluß auf den Metabolismus hat. Die natürlich vorhandene UDPase-Aktivität ist in jungen wachsenden Blättern und einigen anderen Geweben so hoch, daß sie bei der Isolierung von Golgi-Apparaten als Marker dient (Ray et al., 1969).

#### 3.4.1.1 Einführung von konstitutiv exprimierter Hefe-UDPase in Tabak

UDPase aus *Saccharomyces cerevisiae* in Sinnorientierung im Vektor pBinAR (siehe Abb. 2.1) wurde über *Agrobacterium tumefaciens* in Tabak eingeführt (zum Ablauf siehe Abschnitte 2.1.8 und 2.2.1.12). Dabei steht das Hefe-UDPase-Gen unter Kontrolle eines Promotors, der konstitutive Expression vermittelt – dem 35S-Promotor aus *CaMV* (Franck et al., 1980). Bei einer DNA-Sequenzierung des UDPase-Konstruktes wurden keine Fehler gefunden, eine Störung der korrekten Expression aus diesen Gründen war somit auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

Die Pflanzen wurden gemäß Abschnitt 2.2.1.12 transformiert und im Anzuchtschrank1 regeneriert, wobei Selektion über Kanamycin stattfand. Es wurden 18 verschiedene Klone regeneriert. Die Pflanzen sollen im folgenden als RNUDP-Pflanzen bezeichnet werden.

#### 3.4.1.2 Durchmusterung der regenerierten Pflanzen

Der erste Schritt beim Arbeiten mit transgenen Pflanzen besteht in der Durchmusterung der gewonnenen Pflanzen, um Klone zu identifizieren, in denen eine Expression des eingeführten Gens stattfindet. Diese Analyse wurde auf mRNA-Ebene mittels der vorhandenen Hefe-UDPase-DNA-Sonde (siehe Abschnitt 2.1.4) durchgeführt.:

Von den 18 regenerierten RNUDP-Pflanzen wurde je ein Exemplar auf Sand ausgebracht und zusammen mit entsprechenden Wildtyp-Pflanzen in der Klimakammer mit Standard-Pflanzen-Nährlösung (siehe Abschnitt 2.2.1.1) kultiviert. Nach 2 Wochen wurde pro Pflanze 1 sink-Blatt (<2cm) entnommen, gemörsert und einer Northern-Analyse unterzogen (Abb. 3.67).

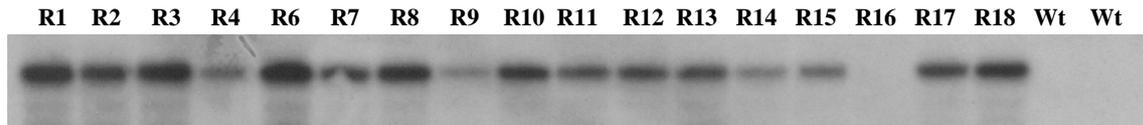


Abb. 3.67 Durchmusterung der RNUDP-Pflanzen auf mRNA-Ebene mit der Hefe-UDPase-DNA-Sonde Northern-Blot, nach Hybridisierung mit der UDPase-Sonde. R1-R18 = Pflanze RNUDP 1-18; Wt = Wildtyp-Pflanze. Es wurden jeweils 15µg Gesamt-RNA aus sink-Blatt (<2cm) aufgetragen.

Wie Abb. 3.67 zeigt, konnte in fast allen ausgebrachten Pflanzenklonen die mRNA der Hefe-UDPase nachgewiesen werden. Wie erwartet ergab die mRNA-Analyse der Wildtyp-Pflanzen kein Signal. In der Linie RNUDP 16 konnte ebenfalls kein Signal detektiert werden. Von allen Pflanzen wurde Saatgut gesammelt.

#### 3.4.1.3 Analyse ausgewählter RNUDP-Pflanzen

##### (1) Auswahl und Kontrolle der Linien

Um den Einfluß der eingeführten Hefe-UDPase auf den Nukleotidstoffwechsel besser untersuchen zu können, wurden für die weiteren Analysen Linien ausgewählt, in denen die Hefe-UDPase unterschiedlich stark exprimiert wurde. Diese Auswahl war auf die Untersuchungen auf mRNA-Ebene beschränkt (siehe Abb. 3.67) und ging von der extrahierbaren Hefe-UDPase-mRNA-Menge in identischem Gewebe (sink-Blatt, <2cm, von identisch angezogenen Pflanzen) aus. Es wurden folgende Linien ausgewählt: RNUDP 3 und RNUDP 6 mit vergleichsweise größerer Menge an extrahierbarer mRNA der Hefe-UDPase, was eventuell Rückschlüsse auf eine verstärkte Expression des Genproduktes gibt sowie RNUDP 9 und RNUDP 17 als Vertreter für eine mittlere bis schwächere detektierbare spezifische mRNA-Menge bzw. eventuell auch Expression.

Von den ausgewählten RNUDP-Linien und entsprechenden Wildtypen wurden oberflächensterilisierte Samen auf Standard-Fest-Medium ausgebracht (siehe Abschnitte 2.2.1.1, 2.2.1.6 und 2.2.1.7). Um positive Klone auch in der 2.Generation mit Sicherheit zu erhalten, enthielt das Medium der RNUDP-Pflanzen Kanamycin, das bei den Wildtypen nicht vorhanden sein durfte. Die Selektionsplatten wurden 18 Tage im Anzuchtschrank2 kultiviert.

Das Keimungsverhalten der ausgewählten Linien wurde täglich beobachtet, dabei konnten keine Unterschiede untereinander oder zum Wildtyp festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Probleme mit dem Selektionsmedium in Form von verzögerter Keimung, Gelbfärbung oder Kümmerwuchs der Keimlinge wurden ebenfalls nicht beobachtet. Sieben Tagen nach

Überführung der Selektionsplatten in den Anzuchtschrank2 waren die gekeimten Pflanzen groß genug, um eine erste Untersuchung zu ermöglichen. Die Pflanzen der Linien RNUDP 9 und RNUDP 17 entsprachen von der Größe dem Wildtyp, die der Linien RNUDP 3 und RNUDP 6 waren etwas größer.

18 Tage nach Überführung der Selektionsplatten in den Anzuchtschrank2 wurden von jeder RNUDP-Linie und den Wildtypen je 10 Pflanzen auf Sand in der Klimakammer (siehe Tab. 2.2) ausgebracht. Gegossen wurde mit Standard-Pflanzen-Nährlösung (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Nach 24 und 31 Tagen Anzucht in der Klimakammer wurden von jeder Linie je 4 möglichst identische Pflanzen geerntet und analysiert (1. bzw. 2.Ernte). Die Ernten fanden etwa 1 Stunde nach Beginn der Lichtphase statt. Mit der Wahl von zwei verschiedenen langen Anzuchtzeiten sollten entwicklungsabhängige Unterschiede berücksichtigt werden. Die verbliebenen 2 Pflanzen jeder Linie dienten der Saatgutgewinnung

(2) Untersuchung des Phänotyps von RNUDP-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

Von den in der Klimakammer ausgebrachten Pflanzen wurden kurz vor der 2.Ernte (nach 31 Tagen Anzucht) Aufnahmen von repräsentativen Exemplaren gemacht (Abb. 3.68).

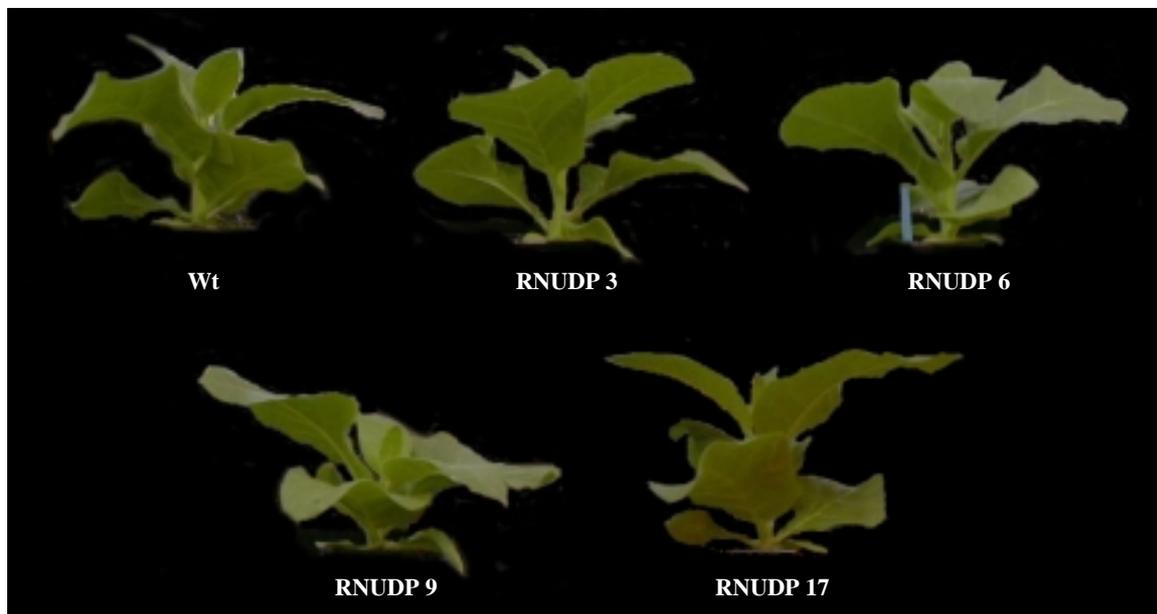


Abb. 3.68 Phänotyp von RNUDP-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

Maßstabsgetreue Abbildung der transgenen Pflanzen RNUDP 3, 6, 9, 17 und eines entsprechenden Wildtyps (=Wt). Die Pflanzen hatten sich zum Zeitpunkt der Aufnahme 31 Tage in der Klimakammer befunden.

Die rein optische Auswertung des Phänotyps zeigte nur wenig Unterschiede der RNUDP-Pflanzen zum Wildtyp (Abb. 3.68). Die Pflanzen variierten nur geringfügig in der Höhe. Keine Linie zeigte Veränderungen in Wuchsform oder Aufbau und Farbe der Pflanzenorgane. Das dabei gewonnene Bild entsprach den Verhältnissen vom 1. Erntezeitpunkt (Daten nicht gezeigt).

Vor der Ernte wurde von jeder Pflanze je ein source-Blatt (Länge ca. 15cm) ausgewählt, woraus zur Analyse von Zellbestandteilen Blattscheiben bei Licht entnommen und eingefroren wurden. Vom geernteten Material wurde das Frischgewicht ermittelt (Abb. 3.69). Dabei wurden alle oberirdischen Pflanzenteile als Sproß zusammengefaßt, während die unterirdischen, vom Sand befreiten Teile sich im wesentlichen aus der Wurzel zusammensetzten. Danach wurde gemäß Abschnitt 2.2.1.11 die Gesamtblattfläche jeder Pflanze ermittelt (Abb. 3.70), um unterschiedliche Wachstumsmuster identifizieren zu können. Zur Trockengewichtsbestimmung (Abb. 3.69) wurde das Sproß-Material 1 Woche bei 80°C gehalten, während die Wurzeln gefriergetrocknet wurden, um mit diesem Material weitere Analysen durchführen zu können.

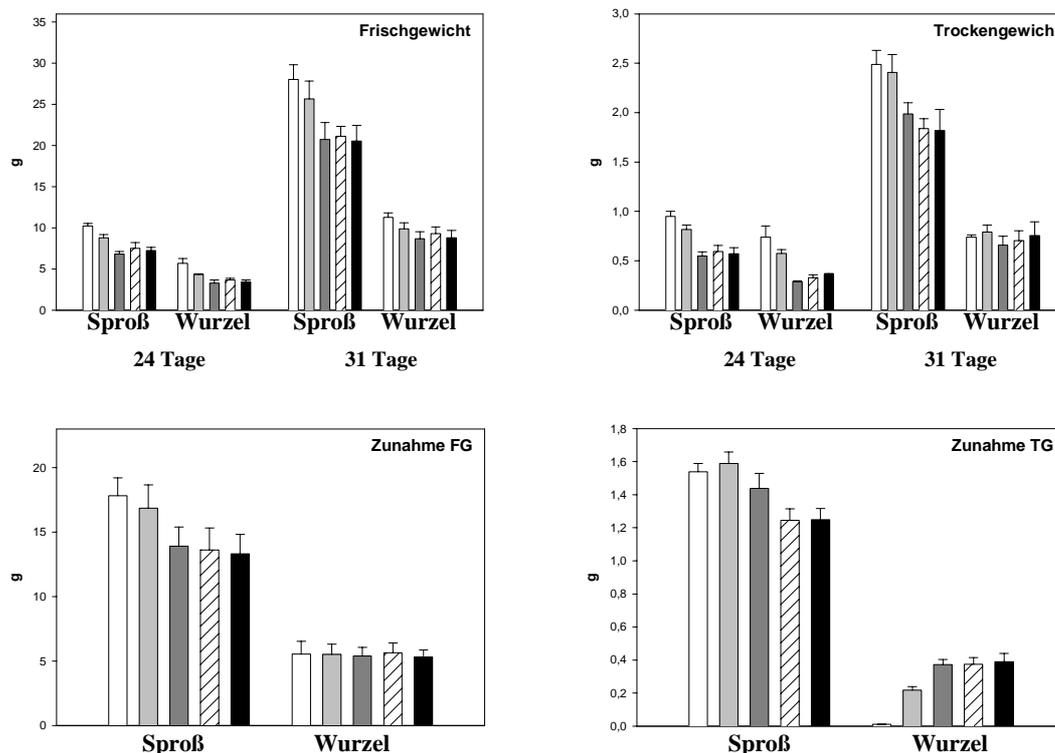
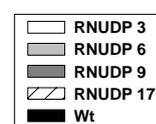


Abb. 3.69 Frisch- und Trockengewichtsdaten

Frischgewicht (=FG), Trockengewicht (=TG) und Zunahme der beiden Gewichte zwischen den beiden Erntezeitpunkten. Daten der transgenen Pflanzen RNUDP 3, 6, 9, 17 und von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen (=Wt). Die Pflanzen hatten sich zum Zeitpunkt der Datenermittlung 24 bzw. 31 Tage in der Klimakammer befunden. Jedem Wert der Abbildung liegen 4 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.



Sowohl der Sproß als auch die Wurzel der RNUDP-Linien 3 und 6 hatten ein größeres Frisch- und auch Trockengewicht als die entsprechenden Gewebe der anderen RNUDP-Linien bzw. des Wildtyps (Abb. 3.69). Dies konnte sowohl bei der Ernte nach 24 als auch nach 31 Tagen Klimakammer beobachtet werden (mit der Ausnahme, daß das Trockengewicht aller Wurzeln bei der letzten Ernte nicht mehr von den Wildtyp-Daten abwich). Die Frisch- und Trockengewichte der RNUDP-Linien 9 und 17 entsprachen den Wildtyp-Daten.

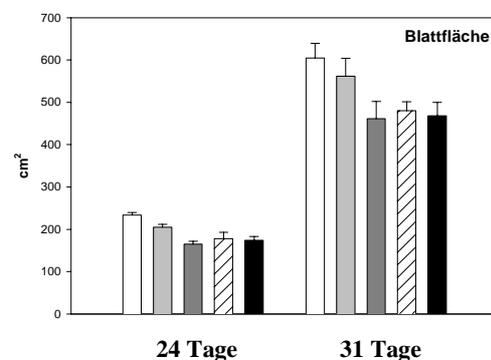
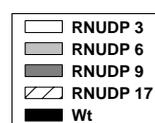
Bei Betrachtung der Zunahme der Gewichte zwischen den beiden Ernten (Abb. 3.69) zeigte sich, daß das Frisch- und Trockengewicht der Sprosse bei den Linien RNUDP 3 und RNUDP 6 viel stärker zugenommen hatte als beim Wildtyp. Die Frischgewichtszunahme der Sprosse der Linien RNUDP 9 und RNUDP 17 ähnelte dem Wildtyp. Die Trockengewichtszunahme der Sprosse war bei Linie RNUDP 9 größer als beim Wildtyp, bei Linie RNUDP 17 waren im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede festzustellen. Bei den Wurzeln hatte das Frischgewicht zwischen den beiden Ernten bei allen Linien ungefähr gleich zugenommen. Die Trockengewichtszunahme war in den Wurzeln der Linien RNUDP 6 und vor allem RNUDP 3 viel kleiner als beim Wildtyp, während bei den anderen RNUDP-Linien keine Unterschiede zum Wildtyp festzustellen waren.

Die Sproß-Wurzel-Verhältnisse waren bei den RNUDP-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant verändert (Daten nicht gezeigt).

Durch Ermittlung der Blattfläche der Pflanzen (Abb. 3.70) konnte das Wachstumsverhalten der einzelnen Pflanzen genauer untersucht werden. Dabei korrelierte die Blattfläche der Pflanzen zu jedem Zeitpunkt mit den Frischgewichtsdaten (Abb. 3.69): Für RNUDP 3 und 6 ergaben sich größere, für RNUDP 9 und 17 dem Wildtyp ähnliche Werte.

Abb. 3.70 Blattfläche der Pflanzen

Gesamt-Blattfläche der Pflanzen. Daten der transgenen Pflanzen RNUDP 3, 6, 9, 17 und von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen (=Wt). Die Pflanzen hatten sich zum Zeitpunkt der Datenermittlung 24 bzw. 31 Tage in der Klimakammer befunden. Jedem Wert der Abbildung liegen 4 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.



Das eingefrorene source-Blatt- und Wurzelmaterial wurde gemörsert und analysiert.

(3) Untersuchung der Nukleotidgehalte von RNUDP-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

Bei konstitutiver Expression eines Enzyms, das UDP in UMP und Phosphat spaltet, wurden Auswirkungen auf die Nukleotidgehalte der betroffenen RNUDP-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp erwartet. Die Bestimmung der UMP-Konzentration war zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht möglich. Die Konzentrationen von UDP sowie anderen Nukleotiden zeigen Abb. 3.71 (Purinnukleotide) und Abb. 3.72 (Pyrimidinnukleotide).

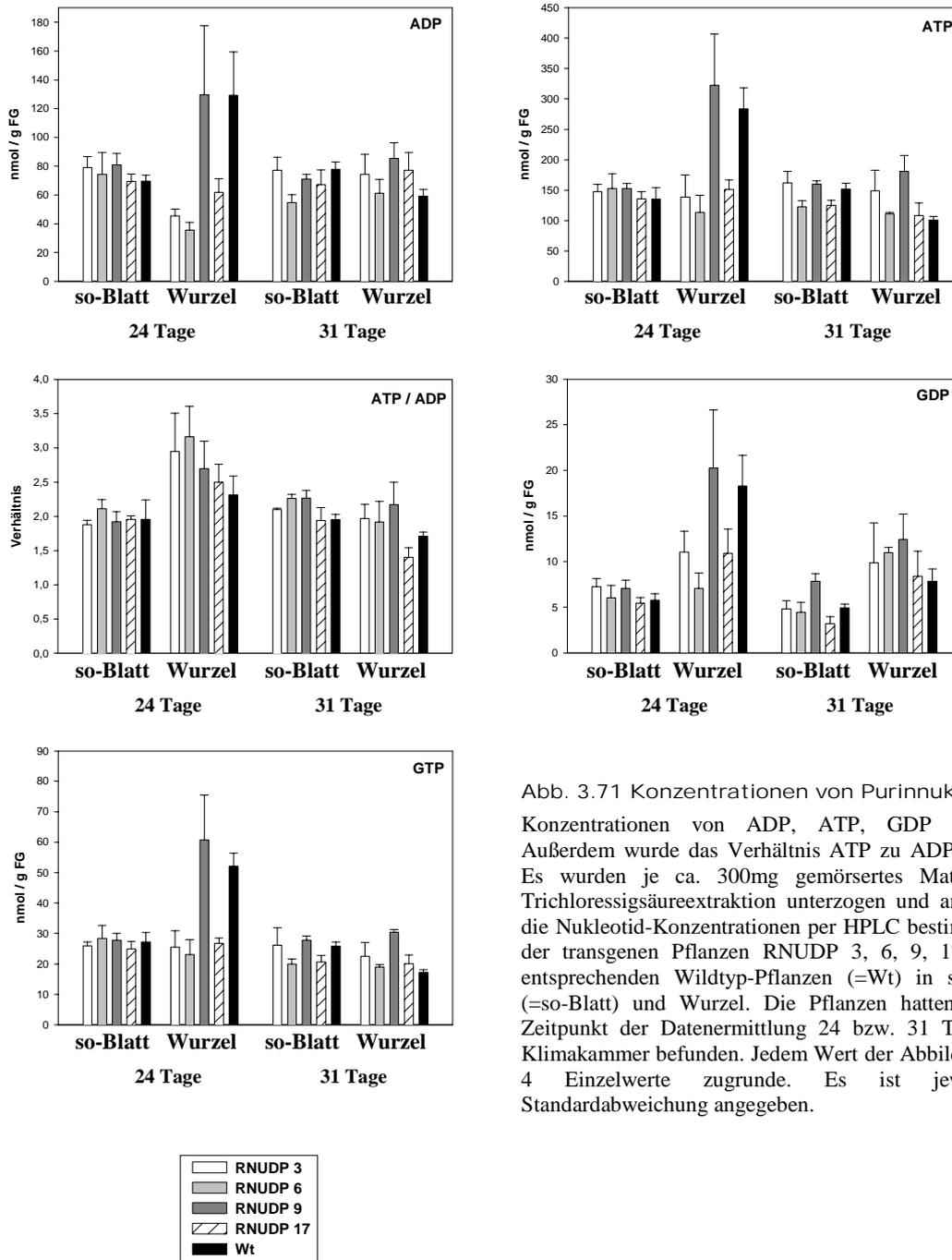


Abb. 3.71 Konzentrationen von Purinnukleotiden  
 Konzentrationen von ADP, ATP, GDP und GTP. Außerdem wurde das Verhältnis ATP zu ADP berechnet. Es wurden je ca. 300mg gemörsertes Material einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Nukleotid-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Daten der transgenen Pflanzen RNUDP 3, 6, 9, 17 und von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen (=Wt) in source-Blatt (=so-Blatt) und Wurzel. Die Pflanzen hatten sich zum Zeitpunkt der Datenermittlung 24 bzw. 31 Tage in der Klimakammer befunden. Jedem Wert der Abbildung liegen 4 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

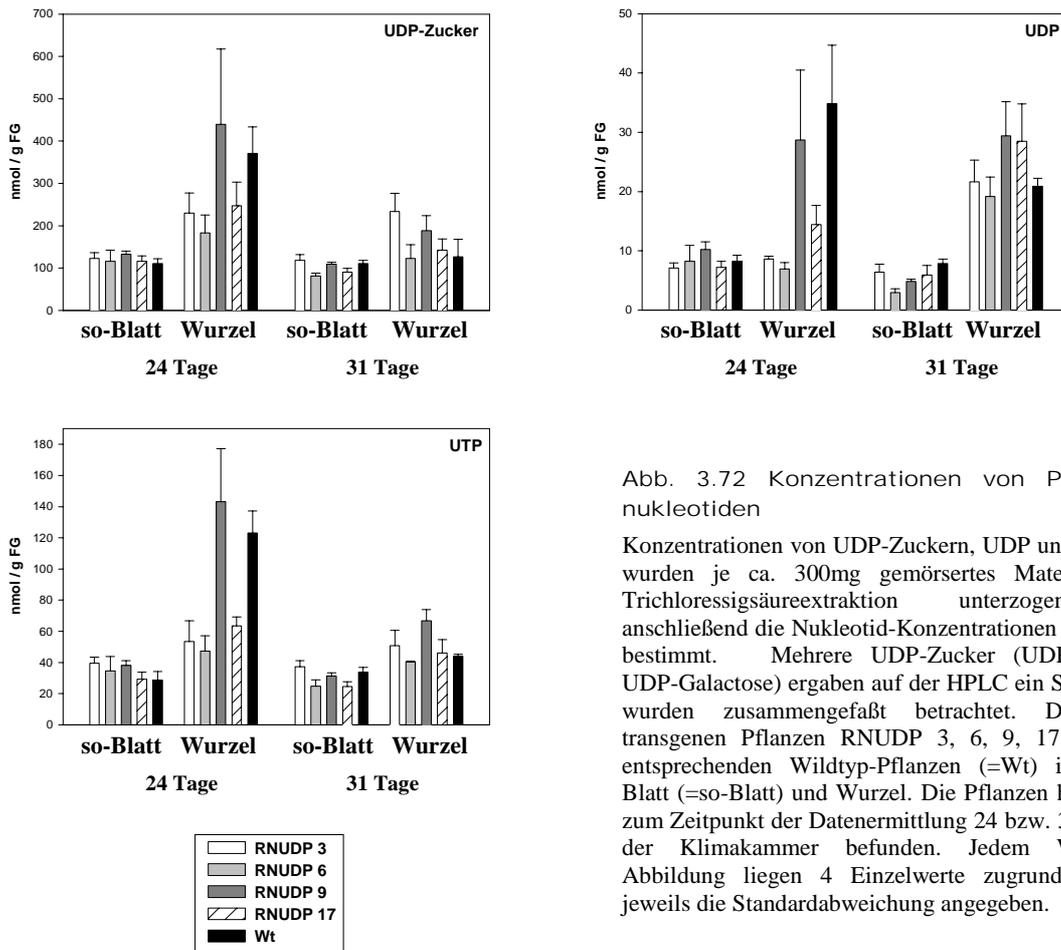


Abb. 3.72 Konzentrationen von Pyrimidin-nukleotiden

Konzentrationen von UDP-Zuckern, UDP und UTP. Es wurden je ca. 300mg gemörsertes Material einer Trichloressigsäureextraktion unterzogen und anschließend die Nukleotid-Konzentrationen per HPLC bestimmt. Mehrere UDP-Zucker (UDP-Glucose, UDP-Galactose) ergaben auf der HPLC ein Signal und wurden zusammengefaßt betrachtet. Daten der transgenen Pflanzen RNUDP 3, 6, 9, 17 und von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen (=Wt) in source-Blatt (=so-Blatt) und Wurzel. Die Pflanzen hatten sich zum Zeitpunkt der Datenermittlung 24 bzw. 31 Tage in der Klimakammer befunden. Jedem Wert der Abbildung liegen 4 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

Wie Abb. 3.71 und Abb. 3.72 zeigen, waren sowohl die Purinnukleotid- als auch die Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen in den RNUDP-Pflanzen von z.T. sehr starken Schwankungen abgesehen im Vergleich zum Wildtyp nicht eindeutig verändert.

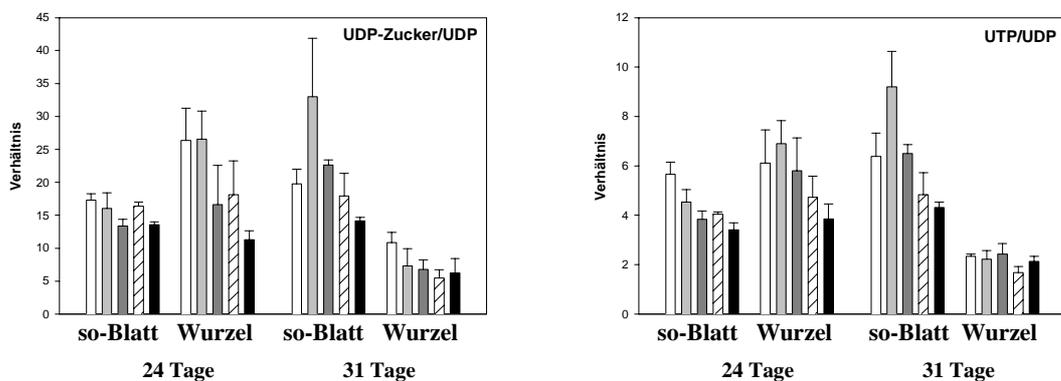
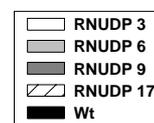


Abb. 3.73 Verhältnisse von UDP-Zuckern bzw. UTP zu UDP

Die Konzentrationen von UDP-Zuckern, UDP und UTP sind in Abb. 3.72 dargestellt. Daten der transgenen Pflanzen RNUDP 3, 6, 9, 17 und von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen (=Wt) in source-Blatt (=so-Blatt) und Wurzel. Die Pflanzen hatten sich zum Zeitpunkt der Datenermittlung 24 bzw. 31 Tage in der Klimakammer befunden. Jedem Wert der Abbildung liegen 4 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.



UDP als eines der Produkte der Spaltung von UDP-Zuckern weist außerdem auch eine Beziehung zu UTP auf, mit dem zusammen es Bestandteil des Energiestoffwechsels ist (siehe Abschnitt 1.1.1). Darum wurde die Verhältnisse UDP-Zucker zu UDP sowie UTP zu UDP berechnet (Abb. 3.73):

Das Verhältnis der UDP-Zucker zu UDP war in den source-Blättern der Linien RNUDP 3, 6 und 17 bei der 1. Ernte im Vergleich zum Wildtyp leicht in Richtung UDP-Zucker verschoben. Bei der 2. Ernte war dies signifikanter und galt für alle RNUDP-Linien (vor allem RNUDP 3, 6 und 9). In den Wurzeln der 1. Ernte war bei allen RNUDP-Linien im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls eine Verschiebung des Verhältnisses in Richtung UDP-Zucker festzustellen (vor allem bei RNUDP 3 und 6). Bei der 2. Ernte galt dies nur noch für RNUDP 3, alle anderen Werte entsprachen hier den Wildtyp-Werten.

Das UTP/UDP-Verhältnis war in den source-Blättern der RNUDP-Linien 3 und 6 bei beiden Ernten im Vergleich zum Wildtyp in Richtung UTP verschoben. Dies galt auch für die source-Blätter von RNUDP 9 der 2. Ernte, während die anderen Werte dem Wildtyp entsprachen. In den Wurzeln lag bei der 1. Ernte das Verhältnis für alle RNUDP-Pflanzen auf der Seite von UTP (besonders für die Linien 3, 6 und 9). Bei der 2. Ernte entsprachen alle Werte den Kontrollen.

Eine Betrachtung des Verhältnisses Purin- zu Pyrimidinnukleotide zeigte bei beiden Ernten in den verschiedenen Geweben von Schwankungen abgesehen keine signifikanten Unterschiede zwischen RNUDP-Pflanzen und Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

#### (4) UDPase-Aktivität in RNUDP-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

Bei konstitutiver Expression eines auch natürlich in Pflanzen vorkommenden Enzyms kann in Transformanten im Vergleich zum Wildtyp eine verstärkte Aktivität dieses Enzyms erwartet werden. Voraussetzung ist die erfolgreiche Transkription, Translation und Weiterverarbeitung des Genproduktes. Auf mRNA-Ebene konnte Hefe-UDPase in den RNUDP-Pflanzen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.67). Da zum Zeitpunkt der Analysen kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand, um einen Nachweis auf Proteinebene durchführen zu können, wurde beschlossen, die erfolgreiche Umsetzung der Hefe-UDPase in den Transformanten über einen Vergleich der UDPase-Aktivität in den RNUDP-Pflanzen und dem Wildtyp zu kontrollieren. Dies sollte in dem source-Blatt-Material geschehen, das nach 24 Tagen Anzucht in der Klimakammer geerntet worden war. Extraktion der Enzyme und Messung der Aktivität erfolgte nach Nagahashi und Kane, 1982 (modifiziert) sowie Itaya und

Ui, 1966. Prinzip der Methode ist der Nachweis des anorganischen Phosphates, das bei der Spaltung von UDP entsteht (siehe Abschnitte 2.2.5.11 und 2.2.6.2). Da dieses Enzym auch andere Nukleotide als Substrat akzeptiert (Gao et al., 1999) wurde in einem weiteren Ansatz GDP als Substrat gewählt.

In Vorversuchen wurde gezeigt, daß die Absorptionsänderung sowohl bezüglich der Zeit als auch der eingesetzten Extraktmenge linear war (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurde die Wiederfindung von nachträglich zugeführtem Phosphat kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

Mit UDP als Substrat konnten nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen bezüglich der UDPase-Aktivität festgestellt werden (Abb. 3.74): Die Linien RNUDP 3 und RNUDP 6 zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine schwach erhöhte UDPase-Aktivität. Diese gemessene Erhöhung ist jedoch nicht signifikant. Entsprechendes gilt auch für die Messungen mit GDP als Substrat (Abb. 3.74)

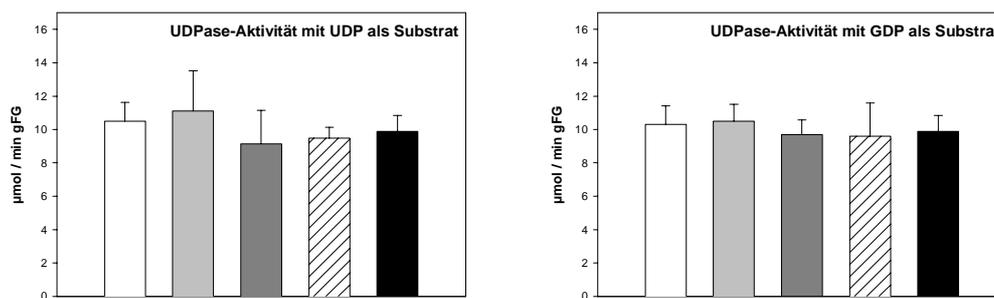
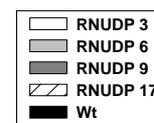


Abb. 3.74 UDPase-Aktivität in source-Blättern der RNUDP-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

Es wurden je ca. 20mg gemörsertes source-Blatt-Material der 1. Ernte (nach 24 Tagen Anzucht in der Klimakammer) einer Enzymextraktion unterzogen. Anschließend wurde die UDPase-Aktivität in den Ansätzen bestimmt (Nagahashi und Kane, 1982 (modifiziert); Itaya und Ui, 1966). Daten der transgenen Pflanzen RNUDP 3, 6, 9, 17 und von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen (=Wt). Jedem Wert der Abbildung liegen 4 Einzelwerte zugrunde. Es ist jeweils die Standardabweichung angegeben.



**Fazit:**

Es wurden Tabakpflanzen mit Hefe-UDPase transformiert und analysiert:

- 5.) Die Transformation konnte auf mRNA-Ebene bewiesen werden, jedoch lieferten die Untersuchungen der Enzymaktivität kein signifikantes Ergebnis.
- 6.) Die Transformanten-Linien zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine besonderen morphologischen Veränderungen. Bei den Linien mit der größten extrahierbaren mRNA-Menge von Hefe-UDPase waren Frisch-, und Trockengewicht sowie die Blattfläche größer als beim Wildtyp.
- 7.) Die Konzentrationen der einzelnen Nukleotide waren in den Transformanten-Linien nicht eindeutig verändert, dies gilt auch für die Konzentrationen von UDP, UTP und den UDP-Zuckern. Es konnte aber in den Linien mit der größten extrahierbaren mRNA-Menge von Hefe-UDPase und der nicht signifikanten Erhöhung der UDPase-Aktivität eine Verschiebung der Verhältnisse UDP-Zucker/UDP bzw. UTP/UDP in Richtung UDP-Zucker bzw. UTP beobachtet werden.

### 3.4.2 Untersuchung der extrahierbaren mRNA-Menge von ATCase in verschieden alten Knollen von Gegensinn-UGPase-, Gegensinn-SuSy- und Wildtyp-Kartoffelpflanzen

UGPase und SuSy spielen für den UDP-Glucose-Gehalt in vielen pflanzlichen Geweben eine wichtige Rolle (siehe Abschnitt 1.1.3.2). Da UDP-Glucose einen beträchtlichen Anteil der in Zellen vorhandenen Pyrimidinnukleotide ausmacht (Meyer und Wagner, 1986), ist der Einfluß dieser beiden Enzyme auf den Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel offensichtlich.

Eine Möglichkeit den Einfluß dieser Enzyme zu analysieren besteht darin, die Enzyme in den betreffenden Geweben auszuschalten und die Folgen zu studieren. Für diesen Zweck ist die Verwendung von transgenen Pflanzen sinnvoll, in denen eine Gegensinn-Inhibierung der Expression der betreffenden Enzyme vorliegt (siehe Abschnitt 1.4).

Es existieren Pflanzen, in denen die Expression von UGPase (Zrenner et al., 1993) bzw. SuSy (Zrenner et al., 1995) inhibiert ist. Es handelt sich dabei jeweils um verschiedene Linien transformierter Kartoffelpflanzen, in denen ein unterschiedlicher Inhibierungsgrad der jeweiligen Enzyme vorliegt. Die UGPase-Gegensinn-Pflanzen sollen im folgenden als RUGPase-Pflanzen bezeichnet werden, die SuSy-Gegensinn-Pflanzen als RSuSy-Pflanzen.

Bei den UGPase-Pflanzen nimmt der Grad der Inhibierung von Pflanzenlinie U10 über die Linien U21 und U45 zur Linie Uwt ab. Letztere stellt eine Transformante mit Wildtyp-ähnlichen Eigenschaften dar. Bei den SuSy-Pflanzen nimmt der Grad der Inhibierung von

Pflanzenlinie S112 über die Linien S129 und S108 zur Linie S114 ab. Sämtliches Pflanzenmaterial wurde freundlicherweise von Dr. Rita Zrenner (MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Da alle bisher zu diesen Pflanzen durchgeführte Analysen vor allem in Knollenmaterial stattgefunden hatten (Zrenner et al., 1993 und 1995), wurde in dieser Arbeit ebenfalls dieses Material gewählt.

Es wurden sink-Knollen (10-30g) von RUGPase-, RSuSy- und Wildtyp-Kartoffelpflanzen (jeweils im Gewächshaus2 angezogen) untersucht. Das Material wurde gemörsert und einer Northern-Analyse mit einer ATCase-Sonde unterzogen (Abb. 3.75). Dabei gab es von wenigen Schwankungen abgesehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transformanten und dem Wildtyp. Weitere Analysen mit gelagerten, austreibenden source-Knollen (40-60g) und den austreibenden Sproßachsen lieferten das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

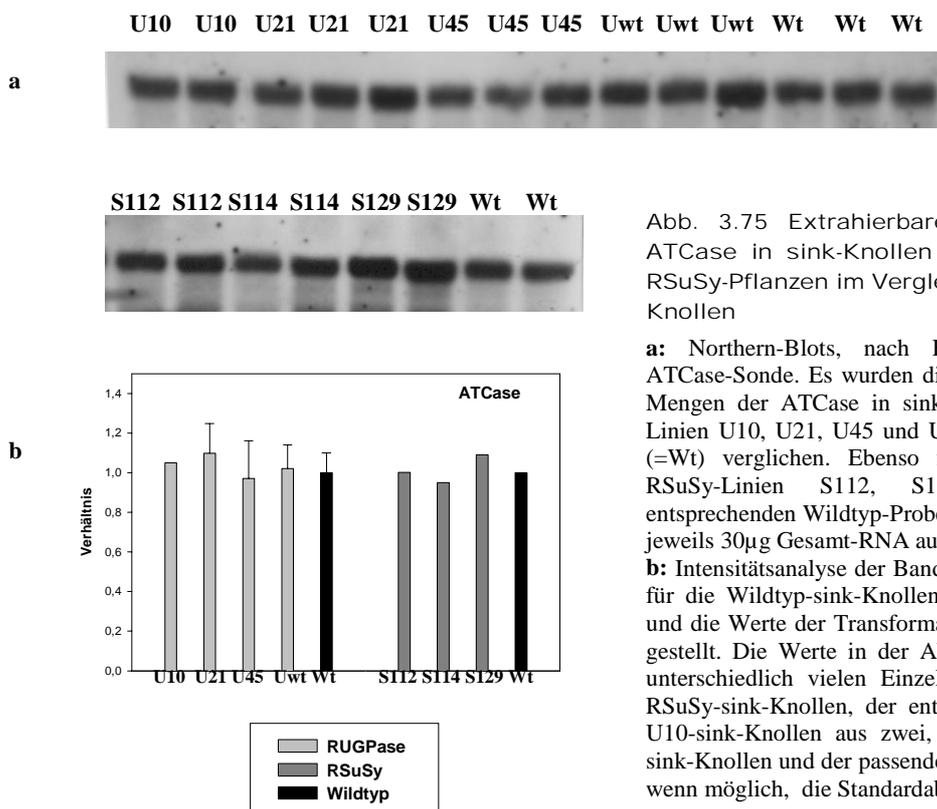


Abb. 3.75 Extrahierbare mRNA-Menge von ATCase in sink-Knollen von RUGPase- bzw. RSuSy-Pflanzen im Vergleich mit Wildtyp-sink-Knollen

**a:** Northern-Blots, nach Hybridisierung mit der ATCase-Sonde. Es wurden die extrahierbaren mRNA-Mengen der ATCase in sink-Knollen der RUGPase-Linien U10, U21, U45 und Uwt mit Wildtyp-Proben (=Wt) verglichen. Ebenso fand ein Vergleich der RSuSy-Linien S112, S114 und S129 mit entsprechenden Wildtyp-Proben (=Wt) statt. Es wurden jeweils 30µg Gesamt-RNA aufgetragen.

**b:** Intensitätsanalyse der Banden der Blots. Die Werte für die Wildtyp-sink-Knollen wurden je = 1 gesetzt und die Werte der Transformanten dazu ins Verhältnis gestellt. Die Werte in der Abbildung setzen sich aus unterschiedlich vielen Einzelwerten zusammen: Alle RSuSy-sink-Knollen, der entsprechende Wildtyp und U10-sink-Knollen aus zwei, alle anderen RUGPase-sink-Knollen und der passende Wildtyp aus drei. Es ist, wenn möglich, die Standardabweichung angegeben.

### Fazit:

Aus Knollen von Gegensinn-UGPase-, Gegensinn-SuSy- und Wildtyp-Kartoffelpflanzen wurden gleiche Mengen der mRNA der ATCase extrahiert.

## 4. Diskussion

Viele Bereiche der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese sind in Pflanzen bisher nur fragmentarisch untersucht und bekannt. Aufgrund molekularbiologischer und biochemischer Beweise wird angenommen, daß in Pflanzen die gleichen Reaktionen stattfinden wie in anderen, besser untersuchten Organismen (Wagner und Backer, 1992).

Bei der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese wird UMP in sechs Schritten aus Hydrogencarbonat, ATP, PRPP, Glutamin und Aspartat gebildet. In höheren Pflanzen sind die ersten vier Enzymaktivitäten (CPSase, ATCase, Orotase und DHODH) auf jeweils separaten Polypeptiden lokalisiert (Doremus und Jagendorf, 1985; Doremus, 1986), wobei CPSase aus zwei Untereinheiten besteht: CPSase SU (ca. 40 kDa) mit der vermutlichen Glutaminaseaktivität (Brandenburg et al., 1997) und CPSase LU (ca. 130kDa) mit der eigentlichen Synthetase-Aktivität (Williamson et al., 1996; Brandenburg et al., 1997). Die letzten beiden Schritte der UMP-Synthese (OPRTase und OMPdecase) sind auf dem bifunktionellen Polypeptid UMP-Synthase lokalisiert (Walther et al., 1984; Maier et al., 1995).

Mit der Veröffentlichung des komplett sequenzierten Genoms von *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) besteht nun die Chance, die genomische Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme erstmals in Pflanzen näher zu untersuchen. Über die Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme und deren Regulation ist hingegen nur sehr wenig bekannt. Auch die subzelluläre Lokalisation dieses Stoffwechselweges ist in Pflanzen noch nicht im Detail geklärt.

Im folgenden sollen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur genomischen Organisation und zur Regulation der Expression auf mRNA- und Proteinebene diskutiert werden.

## 4.1 Die genomische Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme in Tabak und Kartoffel ist einfach.

Mit der kompletten Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) war es erstmals möglich, die genomische Organisation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme in Pflanzen genauer zu betrachten. Es zeigte sich, daß CPSase LU, CPSase SU, ATCase, Orotase, DHODH und UMP-Synthase nur von einem einzigen Gen repräsentiert werden, während für UMP-Kinase zwei Gene vorhanden sind (siehe hierzu auch <http://mips.gsf.de>).

Die dargestellten Untersuchungen zur genomischen Organisation aller Genprodukte dieses Stoffwechselweges in Tabak und Kartoffel zeigen auch für Solanaceen eine einfache Struktur (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Alle Genprodukte außer CPSase SU scheinen nur durch ein oder sehr wenige Gene im Genom von Tabak bzw. Kartoffel vertreten zu sein. Dies entspricht der Situation im Genom von *Arabidopsis thaliana* und gilt auch für ATCase. Für dieses Genprodukt wurden in *Pisum sativum* drei verschiedene mRNAs mit unterschiedlicher gewebespezifischer Expression nachgewiesen (Williamson und Slocum, 1994). Ob das Auftreten vieler verschiedener Isoformen der ATCase im Zusammenhang mit den besonderen Bedürfnissen des Leguminosenstoffwechsels zu sehen ist, wird sich in zukünftigen Untersuchungen zeigen müssen.

Die einfache genomische Organisation der Genprodukte der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in Solanaceen wird auch durch die Isolierung von jeweils nur einer oder weniger, fast hundertprozentig identischer cDNAs bestätigt (Maier et al., 1995; Giermann et al., 2002).

Die Hybridisierungssignale im Falle von CPSase SU sprechen für die Anwesenheit mehrerer Gene, es konnte jedoch aus Tabak bisher nur eine cDNA für CPSase SU isoliert werden (Giermann et al., 2002). Allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß nur eine einzige, wenig komplexe cDNA-Bank betrachtet wurde (Greiner et al., 1998). Weiterhin muß bedacht werden, daß im Genom von *Arabidopsis thaliana* auf Chromosom 3 eine Region mit Ähnlichkeit zum CPSase SU-Gen existiert, die als nicht transkribiertes Pseudogen annotiert ist. Eine ähnliche Situation könnte eventuell auch in Tabak vorliegen, auch wenn es dafür bisher noch keinerlei Beweise gibt.

In punktuellen früheren Untersuchungen (Nasr et al., 1994) sowie bei der Betrachtung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, daß in Pflanzen die an der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese beteiligten Genprodukte von separaten Genen codiert werden. Es konnten dort keine zusammenhängenden Strukturen nachgewiesen werden. Jedoch existieren Untersuchungen für *Medicago sativa*, die eine bicistronische mRNA für CPSase LU und CPSase SU zeigen (Zhou et al., 2000). Eine ähnliche Situation kann für Tabak derzeit nicht völlig ausgeschlossen werden, da die Bandenmuster, die für CPSase LU und CPSase SU bei beiden Restriktionen nach Southern-Hybridisierung erhalten wurden, im oberen Bereich der Blots (zwischen 6000 und 10000 bp) eine gewisse Ähnlichkeit aufwiesen (Abb. 3.1). Die aus Tabak isolierten cDNAs für CPSase SU und CPSase LU sowie deren nach Northern-Hybridisierung detektierbaren mRNAs (Abb. 3.3 und Abb. 3.6) liefern dafür keinerlei Anhaltspunkte. In Bakterien wurde gezeigt, daß beide Untereinheiten von einem einzigen Operon codiert werden, getrennt durch einen kurzen intercistronischen Bereich (Kilstrup et al., 1988; Wong und Abdelal, 1990). Ob in Tabak eine ähnliche Situation vorliegt, könnte eine Ermittlung der genauen Positionen der Gene von CPSase LU bzw. CPSase SU im Tabakgenom zeigen.

Die meisten eukaryotischen Gene stellen Mosaiken aus nicht-codierenden Introns und Exons mit der genetischen Information dar (Brown, 1993a). Bei Durchführung der in Abb. 3.1 und 3.2 dargestellten Analysen wurden Sonden benutzt, die auf cDNAs beruhen. Die Gewinnung von cDNA erfolgt mittels reverser Transkription aus mRNA, die nur die Exon-Sequenzen enthält, da die Introns beim Spleißen der unreifen mRNA entfernt wurden (Brown, 1993b). Die Sequenzen der cDNAs (also die Exon-Sequenzen) der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme wurden hinsichtlich der Anzahl an Schnittstellen von Eco RI, Hind III und Xho I betrachtet (Tab. 3.1). Dabei konnten in jedem Fall nur wenige Restriktionsstellen festgestellt werden. Dies paßt mit den erhaltenen Bandenmustern zusammen. CPSase SU stellt hierbei eine Ausnahme dar, da der Exon-Bereich nur einmal (Eco RI) bzw. gar nicht (Hind III) geschnitten wird. Allerdings ist über die Anzahl der Schnittstellen in den Intron-Bereichen nichts bekannt, was selbstverständlich auch für die anderen Gene der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese gilt.

Alle diese Befunde sprechen demnach für eine einfache genomische Organisation der an der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese beteiligten Enzyme in Tabak und Kartoffel.

## 4.2 Die Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme wird von internen und externen Faktoren beeinflusst.

Die Kenntnis der Expression von Genen und ihrer Beeinflussung durch äußere und innere Faktoren erlaubt es, ihre Rolle im Gesamtstoffwechsel genauer zu verstehen. Um die an der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese beteiligten Genprodukte besser zu charakterisieren, wurden Variationen in der Expression unter verschiedenen Bedingungen betrachtet. Die Analysen fanden vorwiegend auf mRNA-Ebene und – wenn möglich – auch auf Proteinebene statt.

### 4.2.1 Die an der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese beteiligten Enzyme können auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Die Basis einer Expressionsanalyse eines Enzyms auf mRNA-Ebene ist der erfolgreiche generelle Nachweis der mRNA. Es konnten die mRNAs aller in Pflanzen an der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese beteiligten Genprodukte nachgewiesen werden (Abb. 3.3 und Abb. 3.4). Es konnten ferner die ungefähren Größen der jeweiligen mRNAs bestimmt werden (Tab. 3.2). Ein Vergleich mit den entsprechenden cDNAs (Tab. 2.1) ergibt, daß die festgestellte Transkriptgröße mindestens der Größe der jeweiligen cDNA entspricht oder in den meisten Fällen etwas darüber liegt. Hierbei muß bedacht werden, daß am Anfang und Ende einer mRNA noch zusätzliche nicht-codierende Bereiche vorhanden sind, so daß die komplette mRNA u.U. entsprechend größer ist als die jeweilige cDNA.

Zusätzlich konnten mit den gleichen Methoden auch die mRNAs der UMP-Kinase aus dem Energiestoffwechsel (Abb. 3.5) sowie der UPPase aus den Pyrimidinnukleotid-Wiederverwertungsreaktionen (Abb. 3.7) nachgewiesen werden und einer ungefähren Größenbestimmung unterzogen werden (Tab. 3.2). Auch hier passen die erhaltenen Daten mit den bekannten Größen der cDNAs zusammen (Tab. 2.1).

Da Kartoffel und Tabak zur Familie der *Solanaceae* (Nachtschattengewächse) gehören, haben viele Proteine und damit auch die dazugehörigen mRNAs einen hohen Verwandtschaftsgrad (persönliche Mitteilung von Dr. Rita Zrenner, MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Deutschland). Dementsprechend konnten mit den benutzten DNA-Sonden aus einer Kartoffel-cDNA-Bank (ATCase- und Orotase-cDNA) auch die entsprechenden mRNAs in Tabak nachgewiesen werden (z.B. Abb. 3.6) und umgekehrt (z.B. Abb. 3.10).

4.2.2 CPSase LU, CPSase SU und ATCase können auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Um eine Analyse der Expression auf Proteinebene durchführen zu können, müssen Antikörper gegen das jeweilige Protein vorhanden sein. Ausgehend von cDNAs für CPSase LU, CPSase SU und ATCase fanden jeweils Proteinüberexpressionen in *E.coli* statt, womit Antikörper gewonnen werden konnten (siehe Abschnitt 2.1.5). Mit diesen Antikörpern konnten alle drei Proteine sowohl in Tabak (Abb. 3.8) als auch in Kartoffel (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden, wofür erneut die Verwandtschaft der beiden Pflanzenarten den Grund liefert. Weiterhin konnten die ungefähren Proteingrößen ermittelt werden (Tab. 3.3), die mit bereits publizierten Werten für andere Spezies übereinstimmen (CPSase LU: Williamson et al., 1996; CPSase SU: Brandenburg et al., 1997; ATCase: Williamson und Slocum, 1994).

In Tabakwurzeln war das detektierte ATCase-Protein reproduzierbar etwas kleiner als in Tabakblättern (Abb. 3.8). Möglicherweise liegt hier eine gewebespezifische Modifikation des ATCase-Proteins vor. Denn eine zweite Isoform dieses Enzyms ist nach den in Abschnitt 4.1 dargestellten Ergebnissen nicht zu erwarten.

4.2.3 Die extrahierbare mRNA- und Proteinmenge von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen hängt von Art und Alter des Gewebes ab.

4.2.3.1 Der Nachweis ist auf mRNA- und Proteinebene in jedem untersuchten Gewebe möglich, allerdings besonders ausgeprägt in wachsenden Geweben.

Zellteilungsaktivität und Nukleinsäuresynthese hängen eng miteinander zusammen (Burgess, 1985). Dies bedingt auch einen erhöhten Bedarf an Nukleotiden. Demnach ist ein Zusammenhang zwischen der Expression der an der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese beteiligten Gene und der Teilungsaktivität des Gewebes zu vermuten.

(1) Die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Gene weisen Charakteristika von „Haushalts“-Genen auf.

In jedem untersuchten Gewebe (sink- und source-Blätter, sowie die heterotrophen Gewebe Tabakwurzel und Kartoffelknolle) konnte der Nachweis für jeden Schritt der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese auf mRNA- (Abb. 3.3 und Abb. 3.4) und - soweit möglich - auch auf Proteinebene (Abb. 3.8) erfolgreich durchgeführt werden. Zwar war der extrahierbare mRNA- und Protein-Gehalt der einzelnen Genprodukte von Gewebe zu Gewebe

unterschiedlich, aber nie unterhalb der Detektionsgrenze. Entsprechendes gilt auch für UMP-Kinase (Energiestoffwechsel) und UPPase (Pyrimidinnukleotid-Wiederverwertung) (Abb. 3.5 und Abb. 3.7). Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß die betreffenden Gene für das Funktionieren des Metabolismus in jedem der untersuchten Gewebe exprimiert sein müssen. Eventuell kommt ihnen sogar die Rolle von sogenannten „Haushalts“-Genen (*engl.: „house-keeping“ genes*) zu. Damit bezeichnet man Gene, deren Expression für die Aufrechterhaltung des Grundstoffwechsels ständig gegeben sein muß.

(2) Wachsende Gewebe enthalten größere Mengen der untersuchten Expressionsprodukte.

Weiterhin konnte an Tabak und Kartoffel gezeigt werden, daß in wachsenden sink-Blättern in der Regel wesentlich mehr mRNA (Abb. 3.3 - 3.7) und Protein (Abb. 3.8) der an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Gene vorhanden ist als in ausgewachsenen source-Blättern. Da sink-Blätter ihre Entwicklung noch nicht abgeschlossen haben, liegt in ihnen eine starke Zellteilungsaktivität sowie Streckungswachstum der Zellen vor. Daraus resultiert ein erhöhter Bedarf an Nukleotiden, was einen Einfluß auf jeden Schritt haben kann, der mit der Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden zusammenhängt – Biosynthese und Wiederverwertung.

(3) Der Nachweis der untersuchten Expressionsprodukte ist auch in heterotrophen Geweben möglich.

Auch in heterotrophen Geweben wie Tabakwurzeln (Abb. 3.3 und Abb. 3.8) und wachsenden Kartoffelknollen (Abb. 3.4) konnten die Expressionsprodukte der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Gene erfolgreich nachgewiesen werden. Wurzeln stellen ein zumindest in der Spitzenregion teilungsaktives Gewebe dar (Silk, 1984; Beemster und Baskin, 1998), während wachsende sink-Knollen keine Zellteilungsaktivität mehr zeigen, sondern nur noch eine Zunahme des Zellvolumens und Akkumulation von Speicherstärke aufweisen (Peterson et al., 1985). Beide Organe stellen sink-Gewebe dar, die auf den Netto-Import von Kohlenhydraten angewiesen sind (Turgeon, 1989). Bei der Umsetzung von Saccharose, der wichtigsten Transportform von Kohlenhydraten in vielen Pflanzen (z.B. Saccharose-Abbau zur Synthese der Speicherstärke in Knollen, Zellwandsynthese und Proteinglycosylierung), sind Uridinnukleotide als Cofaktoren essentiell nötig (Abb. 1.5), was die beobachteten mRNA- und Proteinmengen der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme erklären könnte.

4.2.3.2 Die extrahierbaren mRNA- und Proteinmengen der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme sind entwicklungsabhängig und (mit Ausnahme der ATCase) aufeinander abgestimmt.

Während der Entwicklung eines Blattes finden ab einem bestimmten Zeitpunkt keine Zellteilungsprozesse mehr statt (Poethig und Sussex, 1985), sondern nur noch reines Streckungswachstum. Um dies in einem Zusammenhang mit der Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme betrachten zu können, wurden verschiedene Entwicklungsstadien von Tabakblättern auf mRNA- und Proteinebene untersucht (Abb. 3.6-3.8).

(1) Die koordinierte, entwicklungsabhängige Expression scheint mit den Nukleotidgehalten korreliert zu sein.

Mit Ausnahme der ATCase war bei allen anderen untersuchten Genprodukten, die an der Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden beteiligt sind, ein aufeinander abgestimmtes und entwicklungsabhängiges Expressionsmuster zu beobachten: Auf einen mehr oder weniger starken Anstieg der jeweiligen extrahierbaren mRNA-Menge in den frühen Entwicklungsstadien der Blätter (bis zu einer Größe von ca. 4-6cm, Abb. 3.6 und Abb. 3.7, Spur B1-B2 bzw. in einigen Fällen B3) folgte eine Abnahme während des weiteren Blattwachstums (Abb. 3.6 und Abb. 3.7, Spur B3-B8). Ein aufeinander abgestimmtes und entwicklungsabhängiges Expressionsmuster war auch bei den Untersuchungen auf Proteinebene festzustellen (Abb. 3.8). Dieses Verteilungsmuster ist nicht nur auf die Expressions-Ebene beschränkt: In früheren Untersuchungen von Tabakblättern (Meyer und Wagner, 1986) konnte gezeigt werden, daß in Blättern sowohl der Gesamtnukleotidgehalt als auch die Konzentration einzelner Nukleotide vom Blattalter abhängig war und in alten bzw. seneszierenden Blättern stark abnahm.

(2) Die koordinierte Expression scheint mit Wachstumsprozessen korreliert zu sein.

Die Korrelation vom Entwicklungsstadium des Blattes mit den extrahierbaren Mengen an Expressionsprodukten der an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzyme läßt sich mit einem erhöhten Bedarf an Pyrimidinnukleotiden aufgrund von Zellteilungs- und Wachstumsprozessen erklären: In Tabakblättern bis ungefähr 2cm Größe zeigen alle Zellen mitotische Aktivität. Die Teilungsaktivität wird zuerst in den Spitzenregionen der Blatt-Lamina eingestellt und beschränkt sich auf basale Teile der Lamina (Poethig und Sussex, 1985). Schließlich wird jegliche Zellteilung eingestellt, wenn die Blätter ungefähr die Hälfte ihrer endgültigen Größe erreicht haben (Poethig und Sussex, 1985). Das weitere Blattwachstum beruht völlig auf Zellstreckung (Walter und Schurr, 2000). In vielen

wachsenden Geweben spielt zusätzlich die Endoreduplikation eine Rolle (Joubès und Chevalier, 2000), die bei 90% der Angiospermen auftritt (D'Amato, 1984). Dabei handelt es sich um DNA-Synthesen ohne mitotische Aktivität, wobei Chromosomen mit 2<sup>n</sup> Chromatiden entstehen. In Blättern von Tomate wurde gezeigt, daß mit zunehmendem Alter die Polyploidie der Zellkerne zunahm (Smulders et al., 1994). Bei all diesen Prozessen besteht ein erhöhter Bedarf an Pyrimidinnukleotiden.

(3) Die Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme findet auch in ausgewachsenen Geweben statt.

Wie nun die Expressionsmuster der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme zeigen, sind die extrahierbaren mRNA- und Proteinmengen in wachsenden Geweben größer, aber nicht alleine darauf beschränkt. Auch in ausgewachsenen Blättern völlig ohne weitere Zellteilungsaktivität bzw. Streckungswachstum ist der Nachweis der jeweiligen mRNAs bzw. Proteine möglich. Die Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden muß anscheinend während der gesamten Blattentwicklung und darüber hinaus gegeben sein und ist demnach für die Aufrechterhaltung des Metabolismus essentiell.

#### 4.2.4 Die extrahierbare mRNA-Menge von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen wird von externen Faktoren beeinflusst.

4.2.4.1 Die extrahierbaren mRNA-Mengen der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme unterliegen einem diurnalen Rhythmus.

Viele Prozesse in Pflanzen wie Nitratreduktion, Synthese von Chlorophyll-Protein-Komplexen oder die Zellteilung werden in Pflanzen von der Tageszeit beeinflusst (Beator und Kloppstech, 1996). Es wurde für mehrere Pflanzenarten gezeigt, daß Blattwachstum einem diurnalen Rhythmus unterliegt (Schmundt et al., 1998; Schurr et al., 2000; Walter und Schurr, 2000).

Da in Abschnitt 4.2.3 Zusammenhänge zwischen Blattwachstum und extrahierbarer mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme aufgezeigt worden sind, kann man vermuten, daß sie ebenfalls einem diurnalen Rhythmus unterliegen. Tatsächlich wurde bei der Northern-Analyse der extrahierbaren mRNA-Menge von CPSase LU und DHODH in wachsenden sink-Blättern festgestellt, daß diese einem diurnalen Rhythmus folgten (Abb. 3.9): Die Maxima der extrahierbaren spezifischen mRNA-Mengen von CPSase LU und DHODH lagen gegen Ende der Lichtphase sowie während der Dunkelphase, während die Minima im Bereich der Lichtphase lagen. Untersuchungen zum Blattwachstum bei *Ricinus*

*communis* und *Nicotiana tabacum* (Schmundt et al., Schurr et al., 2000; Walter und Schurr, 2000) zeigten einen Anstieg des Wachstums während der Dunkelphase, das Erreichen des Maximums beim Wechsel zwischen Dunkel- und Lichtphase sowie die niedrigsten Werte des Wachstums während der Lichtphase. Dies korreliert mit den Ergebnissen im vorliegenden Fall. Die extrahierbare mRNA-Menge der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme ist mit der Intensität des Blattwachstums abgestimmt. Allerdings ist die jeweilige extrahierbare mRNA-Menge zu keinem Zeitpunkt jenseits der Detektionsgrenze, was einen Bedarf an Pyrimidinnukleotiden auch in Phasen geringerer Wachstumstätigkeit vermuten läßt.

Für UMP-Kinase hingegen war der diurnale Rhythmus der extrahierbaren mRNA-Menge wenig ausgeprägt (Abb. 3.9). Hier kann vermutet werden, daß aufgrund der Verbindung dieses Enzyms zum Energiestoffwechsel ein ständiger, relativ konstanter Bedarf gegeben ist.

4.2.4.2 Die Sauerstoffverfügbarkeit und extrahierbare mRNA-Mengen der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme hängen in Kartoffelknollen zusammen.

(1) Auch bei unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit scheinen Nukleotidgehalte und die Expression der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Gene korreliert zu sein.

Während die Reaktionen auf Sauerstoffmangel in tierischen Systemen gut untersucht sind (Hochachka, 1990; Hochachka et al., 1996), existieren für pflanzliche Systeme nur wenige Informationen. Es wurde analog zu den Untersuchungen in tierischen Geweben gezeigt, daß in inkubierten Kartoffelknollenscheiben niedrige externe Sauerstoffbedingungen energiereiche biosynthetische Prozesse hemmen (Geigenberger et al., 2000): Betroffen sind die Biosynthese von Stärke, Aminosäuren, Proteinen und Lipiden sowie der Saccharoseabbau. Ebenso wurde mit der Abnahme der Sauerstoffverfügbarkeit ein Sinken der ATP- sowie der Gesamt-Purinnukleotid-Gehalte beobachtet. Bei den Pyrimidinnukleotiden wurde eine Abnahme der Konzentrationen von UTP und UDP-Glucose festgestellt, während der UDP-Gehalt bei sehr niedrigen externen Sauerstoffkonzentrationen stark zunahm. Die Verhältnisse ATP/ADP bzw. UTP/UDP waren unter diesen Bedingungen stark auf die Seite der Nucleosid-Diphosphate verschoben (Bologa, 2001).

In diesem Zusammenhang wurde die Expression von an der Bereitstellung von Pyrimidinnukleotiden beteiligten Enzymen unter verschiedenen externen Sauerstoffkonzentrationen auf mRNA-Ebene untersucht (Abb. 3.10): Alle drei untersuchten Genprodukte (CPSase LU, DHODH und UMP-Kinase) zeigten eine deutliche Abnahme der jeweiligen Transkriptmenge mit dem Sinken der externen Sauerstoffkonzentration. Diese Abnahmen korrelieren deutlich mit den Nukleotid-Gehalten. Ein Zusammenhang zwischen

Pyrimidinnukleotid- bzw. Gesamtnukleotid-Gehalten und der Expression der an der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese beteiligten Gene scheint gegeben zu sein. Dies ähnelt frappierend der Situation während der Blattentwicklung (siehe Abschnitt 4.2.3.2).

(2) Bei unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit scheint eine Koordination von Purin- und Pyrimidin-konzentrationen gegeben zu sein.

Es gibt deutliche Hinweise, daß im Metabolismus eine Abstimmung der Purin- und Pyrimidinnukleotidsynthese stattfindet (O'Neal und Naylor, 1976; Denis-Duphil, 1989). Die in Kartoffelscheiben beobachtete Abnahme der Gesamt-Purinnukleotid-Gehalte (Bologa, 2001) geht einher mit einer Abnahme der UTP- und UDP-Glucose-Konzentrationen. Ob eine regulierende Wirkung des Gesamt-Purinnukleotid-Gehaltes, der Energieträger (z.B. ATP) oder einzelner Komponenten des Purinstoffwechsels auf die Synthese der Pyrimidinnukleotide vorliegt (und umgekehrt) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Offensichtlich ist jedoch, daß die Synthese von Pyrimidinnukleotiden eine sehr energieintensive Reaktionsfolge darstellt (Abb. 1.1 und 1.2), die im Fall der UMP-Kinase und auch der CPSase direkt auf ATP als Substrat angewiesen ist.

4.2.5 Fazit: Die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme werden wie „Haushalts“-Gene exprimiert, wobei es situationsbedingte Unterschiede gibt.

Aufgrund der im Abschnitt 4.2 diskutierten Punkte kann der Schluß gezogen werden, daß den Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen im Metabolismus eine so wichtige Rolle zukommt, daß die Expression in jeder Situation gewährleistet sein muß. Solche Gene, die für das Funktionieren des zellulären Metabolismus essentiell sind und ständig auf einem gewissen Niveau exprimiert sein müssen, werden als „Haushalts“-Gene (*engl.*: „*house-keeping*“ *genes*) bezeichnet. Den Promotoren dieser Gene fehlt üblicherweise die sonst bei Eukaryoten-Genen typischerweise vorhandene TATA-Box und sie weisen GC-reiche Regionen (die sogenannten GC-Boxen) auf (Buselmaier und Tariverdian, 1999). Bei der kompletten Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) wurde gezeigt, daß pflanzliche Promotoren nicht von denen anderen Eukaryoten abweichen.

Zwar konnten in den in diesem Abschnitt diskutierten Expressionsanalysen Unterschiede festgestellt werden, die mit der Art und dem Entwicklungsstand der untersuchten Gewebe zusammenhängen (z.B. die Beziehung zwischen Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese und Wachstumsprozessen) oder durch äußere Faktoren bestimmt wurden. Aber in jedem

untersuchten Gewebe, zu jeder Tageszeit und in jeder analysierten Situation konnte der Nachweis der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme auf mRNA- und so weit möglich - auch auf Protein-Ebene erfolgen. Dies wurde in früheren Untersuchungen bereits für CPSase LU festgestellt (Giermann, 1997): Im Rahmen jener Analysen konnte die mRNA für CPSase LU sogar in abgeernteten und 4 Wochen bei 4°C gelagerten Kartoffelknollen detektiert werden.

Ferner konnte eine Koordination der Expression der Pyrimidinnukleotid-Gene sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden, was auch mit den jeweiligen Nukleotidgehalten korrelierte. Hiermit ergab sich eine Möglichkeit, die Regulation des Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel zu untersuchen, indem auf diese Korrelation und Abstimmung Einfluß genommen wurde. Die dazu durchgeführten Untersuchungen sollen im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

### 4.3 Die externe Zufuhr von diversen Metaboliten beeinflusst den Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel.

Regulation von Stoffwechselabläufen über Substrate, Zwischen- und Endprodukte der beteiligten Reaktionen ist für den Metabolismus unverzichtbar, um auf interne oder externe Änderungen und Signale schnell, flexibel und gerichtet reagieren zu können. Welche Metabolite für die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in dieser Hinsicht eine Rolle spielen könnten, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand verschiedener Systeme untersucht.

#### 4.3.1 Das Substrat Phosphat hat Auswirkungen auf den Nukleotidstoffwechsel.

Phosphat ist einer der wichtigsten Nährstoffe für den pflanzlichen Organismus. Membranaufbau, der Energiestoffwechsel oder auch die Synthese von Nukleinsäuren sind ohne Phosphat nicht denkbar. Die Rolle von Phosphat für den pflanzlichen Organismus sowie die Reaktionen auf einen Phosphatmangel wurden bereits vielfach untersucht (Raghothama, 1999), aber über die Bedeutung für die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese ist kaum etwas bekannt.

Phosphat tritt als PRPP in die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese ein und stellt somit ein Substrat der Reaktionen dar (siehe Abb. 1.1). Der Einfluß einer Veränderung des internen

Phosphatgehaltes in den Versuchspflanzen auf den Nukleotidstoffwechsel und andere Aspekte des Metabolismus wird im folgenden diskutiert.

4.3.1.1 Der Phosphatgehalt kann in den Versuchspflanzen verändert werden.

Um den Einfluß von Phosphat auf den Nukleotidstoffwechsel untersuchen zu können, war vor allem eine signifikante Änderung des internen Phosphatgehaltes in den untersuchten Tabakpflanzen nötig.

Bei der Etablierung eines geeigneten Systems brachte eine Erhöhung der externen Phosphatkonzentration im Anzuchtmedium von 0,1mM auf 2mM keine Veränderungen im Pflanzen-internen Phosphatgehalt mit sich (Abb. 3.11). Anscheinend reichen 0,1mM Phosphat in hydroponischer Anzucht aus, um den Phosphatbedarf der Pflanzen vollkommen abzusättigen. Aus diesem Grund wurde entschieden, den umgekehrten Weg zu gehen und den Pflanzen das Phosphat zu entziehen. Eine viertägige Anzucht ohne Phosphat im Medium senkte den Phosphatgehalt in den untersuchten Pflanzenorganen Wurzel und source-Blatt deutlich (Abb. 3.12). Aufbauend auf diesen Vorversuchen war es möglich, eine Manipulation des Pflanzen-internen Phosphatgehaltes vorzunehmen. Dazu wurde eine neue Pflanzenanzucht über einen längeren Zeitraum ohne Phosphat gehalten. Bei darauf folgender Zugabe von Phosphat ins Anzuchtmedium der Pflanzen wurde bereits nach drei Stunden ein deutlicher Anstieg des Phosphatgehaltes in den untersuchten Geweben beobachtet (Abb. 3.13). Basierend auf bisherigen physiologischen Analysen ist der Umfang der beobachteten Phosphataufnahme zu den gegebenen Zeiten in den untersuchten Geweben möglich (persönliche Mitteilung von Dr. Ulrich Schurr, Forschungszentrum Jülich).

4.3.1.2 Der veränderte Phosphatgehalt beeinflusst den Metabolismus.

Bei der Analyse der angezogenen Pflanzen wurden Unterschiede zwischen den Pflanzen mit bzw. ohne Phosphat im Medium festgestellt, die verschiedene Aspekte des Metabolismus betrafen. Da die Pflanzen zum Zeitpunkt der Probenentnahmen kurz vor dem Eintritt in die Blühphase standen, war das Wachstum im wesentlichen abgeschlossen. Es konnten keine morphologischen Veränderungen in diesem kurzen Versuchszeitraum festgestellt werden.

(1) Die Phosphatverfügbarkeit beeinflusst den Protein- und Aminosäurestoffwechsel.

In den phosphatverarmten Pflanzen wurden in jedem untersuchten Gewebe (source-Blatt und Wurzel) wesentlich größere Gesamt-Aminosäure-Gehalte festgestellt als in den wieder mit Phosphat versorgten Pflanzen (Abb. 3.17). Entsprechende Beobachtungen wurden bereits in

Suspensionskulturen von *Catharanthus roseus* (Ukaji und Ashihara, 1987; Nagano und Ashihara, 1993), in *Medicago sativa* (Gleiter und Parker, 1957) und *Cucurbita pepo* (Rabe und Lovatt, 1986) gemacht. Diese Befunde werden einerseits mit gesteigerter *de novo* Synthese begründet (Ukaji und Ashihara, 1987). Beispielsweise wurde gezeigt, daß unter Phosphatmangel der Ammoniumgehalt ansteigt, was zu gesteigerter Arginin-Synthese führt (Rabe und Lovatt, 1986). Andererseits wird die Abnahme des Proteingehaltes in den betroffenen Geweben für die erhöhten Konzentrationen an freien Aminosäuren verantwortlich gemacht (Ukaji und Ashihara, 1987; Nagano und Ashihara, 1993). Eine Abnahme des Gesamt-Protein-Gehaltes unter Phosphatmangel wurde ebenfalls in Blättern von Spinat (Dietz, 1989), Mais, Weizen und Sonnenblume (Jacob und Lawlor, 1991) festgestellt. Dies wurde jedoch im vorliegenden Fall nicht bemerkt.

(2) Die Phosphatverfügbarkeit beeinflusst den Kohlenhydratstoffwechsel.

Die Konzentrationen der freien Zucker Glucose, Fructose und Saccharose waren in den untersuchten Geweben in phosphatverarmten Pflanzen höher als bei den wieder mit Phosphat versorgten Pflanzen (Abb. 3.18). Derartige Beobachtungen sind auch aus Blättern und Wurzeln anderer Spezies bekannt (Ciereszko und Rychter, 1995; Ciereszko und Barbachowska, 2000) und scheinen eine generelle Reaktion auf unterschiedliche Phosphatverfügbarkeit darzustellen.

In den wieder mit Phosphat versorgten Pflanzen wurde in den untersuchten Geweben eine höhere Konzentration von Hexose-Phosphaten festgestellt als in den phosphatverarmten Pflanzen (Abb. 3.19). Dies wurde auch in verschiedenen anderen Pflanzengeweben festgestellt, die einer Phosphatverarmung ausgesetzt worden waren (Nagano und Ashihara, 1993; Ciereszko und Rychter, 1995). In Blättern von phosphatverarmten Spinat-Pflanzen konnte wie in Abb. 3.19 ebenfalls eine Erholung der Hexose-Phosphat-Gehalte beobachtet werden, wenn dem Nährmedium Phosphat zugefügt worden war (Dietz, 1989). Vermutlich ist der Umstand, daß externes Phosphat wieder für Phosphorylierungsprozesse benutzt werden kann, der direkte Grund für diese rasche Erholung aller Hexose-Phosphat-Konzentrationen.

Weiterhin wurde eine Untersuchung der Expression der beiden Enzyme durchgeführt (Abb. 3.23; Abb. 3.24), die eine Schnittstelle zwischen dem Kohlenhydrat- und dem Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel bilden: UGPase und SuSy (siehe Abb. 1.5). In *Arabidopsis thaliana* konnte sowohl in Wurzeln als auch in Blättern von Pflanzen unter Phosphatmangel eine Hochregulierung der Expression der UGPase auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden (Ciereszko et al., 2000). Entsprechende Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit

in Tabak sowohl für UGPase als auch für SuSy erhalten. Als Erklärung könnte dienen, daß beide Enzyme auf Transkriptions- bzw. Translationsebene regulierte Schritte im Saccharose-Stoffwechsel darstellen, die dazu beitragen sollen, auch bei Phosphatmangel homöostatische Verhältnisse im Nährstoffhaushalt aufrecht zu erhalten. Bei den *in vivo* reversiblen Reaktionen von SuSy und UGPase sind hierbei Pyrimidinnukleotide (insbesondere UDP-Glucose) essentiell nötig. Der Einfluß der unterschiedlichen Phosphatverfügbarkeit auf den Nukleotidstoffwechsel wird im nächsten Punkt diskutiert.

4.3.1.3 Die unterschiedliche Phosphatverfügbarkeit hat Auswirkungen auf einige Bereiche des Nukleotidstoffwechsels.

(1) Die UDP-Glucose-Konzentration wird durch die unterschiedliche Phosphatverfügbarkeit beeinflusst.

UDP-Zucker stellen einen beträchtlichen Teil der in Pflanzenzellen vorhandenen Pyrimidinnukleotid-Derivate dar (Meyer und Wagner, 1986), wobei UDP-Glucose wegen seiner zentralen Position im Kohlenhydratstoffwechsel eine besonders wichtige Rolle zukommt (Abb. 1.5). Es konnte in den Versuchspflanzen festgestellt werden, daß die Konzentration dieses Metabolites in den wieder mit Phosphat versorgten Pflanzen in allen untersuchten Geweben größer war als bei den phosphatverarmten Pflanzen (Abb. 3.14). Die externe Verfügbarkeit von Phosphat hatte einen direkten Einfluß auf die Konzentration von UDP-Glucose in den analysierten Geweben.

(2) Bei verändertem Phosphatangebot werden veränderte Nukleotidgehalte festgestellt.

Der veränderte Phosphatgehalt hat in Tabak auch Einfluß auf die Nukleotidgehalte. So konnte im Gegensatz zu den phosphatverarmten Pflanzen in den source-Blättern der wieder mit Phosphat versorgten Pflanzen eine geringere Konzentration an ADP und ATP festgestellt werden (Abb. 3.15), wobei das Verhältnis dieser beiden Nukleotide in Richtung ADP verschoben war (Abb. 3.16). Dies steht im Gegensatz zu früheren Beobachtungen (Dietz, 1989; Nagano und Ashihara, 1993), bei denen gezeigt wurde, daß in Geweben mit Phosphatzufuhr die ATP-Konzentration größer war, während ADP unbeeinflusst blieb. Entsprechende Feststellungen konnten im vorliegenden Fall in den Wurzeln der Tabakpflanzen gemacht werden (Abb. 3.15). Eine mögliche Erklärung der abweichenden Verhältnisse im den source-Blättern könnte in einem erhöhten Bedarf an energiereichen Intermediaten wie ATP liegen, die in den zahlreichen, bei Wiedertzufuhr von Phosphat nun verstärkt stattfindenden Phosphorylierungen (wie im Fall der Hexose-Phosphate, Abb. 3.19) verbraucht werden.

(3) Das veränderte Phosphatangebot hat Einfluß auf die Expression der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Gene.

Neben den oben bereits diskutierten Veränderungen in den extrahierbaren mRNA-Mengen der SuSy und UGPase wurden auch die extrahierbaren mRNA-Mengen von CPSase LU und UMP-Kinase durch die unterschiedliche Phosphatverfügbarkeit beeinflusst: In den Wurzeln der phosphatverarmten Pflanzen stiegen die extrahierbaren spezifischen mRNA-Mengen von CPSase LU und UMP-Kinase mit der Zeit (Abb. 3.20 und Abb. 3.21). In den source-Blättern waren die Unterschiede zwischen den Pflanzen mit verschiedener externer Phosphatverfügbarkeit weniger stark ausgeprägt. Die Zunahme der extrahierbaren spezifischen mRNA-Mengen von CPSase LU und UMP-Kinase in den Wurzeln ist eventuell – wie es für UGPase postuliert wurde (siehe Abschnitt 4.3.1.2) – ein Ausdruck transkriptioneller Regulation als Antwort auf den Phosphatmangel. Dies könnte dazu beitragen, auch bei Phosphatmangel homöostatische Verhältnisse im Phosphat- und damit auch Nukleotidhaushalt aufrecht zu erhalten. Bei Betrachtung der Expression von an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Enzymen konnten auf Proteinebene allerdings keine Auswirkungen der unterschiedlichen Phosphatverfügbarkeit in den untersuchten Geweben detektiert werden (Abb. 3.22). Es liegen jedoch keine Daten zur Aktivität der betreffenden Enzyme vor. Die unterschiedliche Phosphatverfügbarkeit könnte einen Einfluß auf die Phosphorylierung der Enzyme durch Proteinkinasen haben. In Säugetieren ist die Phosphorylierung des multifunktionalen Proteins, das die Aktivitäten von CPSase, ATCase und Orotase trägt (siehe Abschnitt 1.2.2.1), durch Proteinkinase A (Carrey und Hardie, 1988) und MAP Kinase (Graves et al., 2000) als Regulationsmöglichkeit bekannt. Entsprechende konservierte Konsensus-Sequenzen für Proteinkinase A und MAP Kinase finden sich auch bei pflanzlichen CPSasen, z.B. bei Tabak (Giermann et al., 2002).

#### 4.3.2 Die externe Zufuhr von verschiedenen Nukleotidvorstufen hat unterschiedliche Auswirkungen auf den Nukleotidstoffwechsel.

Regulation von Stoffwechselwegen über Zwischen- und Endprodukte ist ein im Metabolismus häufig zu beobachtendes Phänomen. Es wurde bereits gezeigt, daß Pyrimidinnukleotide in Pflanzen an der Regulation ihres Syntheseweges beteiligt sein können (O'Neal und Naylor, 1976; Santoso und Thornburg, 1998 und 2000), wobei stets nur Teilaspekte des Nukleotidstoffwechsels betrachtet wurden. Im folgenden werden die Auswirkungen der externen Zufuhr von Nukleotidvorstufen auf verschiedene Bereiche des Nukleotid-

stoffwechsels dargestellt. Dabei soll auch auf andere Stoffwechselwege eingegangen werden, die mit dem Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel eng zusammenhängen.

(1) Um die Auswirkungen der Inkubation mit Metaboliten direkt im zellulären Metabolismus betrachten zu können, empfiehlt sich die Verwendung von Zellkulturen.

Die Verwendung von ganzen Pflanzen als Versuchsobjekte ergab keine signifikante Reaktion auf die externe Zufuhr von Nukleotidvorstufen (siehe Abschnitt 3.3.2.1 und Abb. 3.25). Weder war in diesem System gewährleistet, daß die betreffenden Substanzen überhaupt in ausreichendem Maße aufgenommen, noch in den Pflanzen selbst in zufriedenstellender Weise transportiert und metabolisiert worden waren. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche heterotrophe Tabakzellkulturen (Schlitzberger, 1981; Beiderbeck und Knoop, 1984) verwendet, um die Auswirkungen der Inkubation mit verschiedenen Nukleotidvorstufen direkt im zellulären Metabolismus betrachten zu können.

Es wurden Inkubationen mit Orotat, Uridin und Adenin betrachtet. Mit der Verwendung von Orotat, das eine Zwischenstufe der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese darstellt (siehe Abb. 1.1), sollte direkt in die Neusynthese der Pyrimidinnukleotide eingegriffen werden. Die Inkubation mit Uridin, einer Zwischenstufe der Pyrimidin-Wiederverwertungsreaktionen, sollte das Verhältnis Neusynthese zu den Wiederverwertungsreaktionen verändern. Mit der externen Zufuhr von Adenin sollte schließlich das Verhältnis Purin- zu Pyrimidinnukleotide variiert werden. Dabei wurden die Inkubationszeiten abgewandelt, um sowohl kurz- (6h) als auch mittel- (18h) und langfristige (1-8 Tage) Effekte betrachten zu können. Die erfolgreiche Aufnahme und Umsetzung der verwendeten Metabolite wurde in Zellkulturen von *Picea glauca* (Weiß-Fichte) gezeigt (Ashihara et al., 2000).

(2) Zwischen dem Wachstum der Zellkultur, den Veränderungen von Metabolit-Konzentrationen und der Expression von Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Genen besteht ein Zusammenhang.

Ausgangspunkt aller Versuche waren immer 1 Woche alte Tabakzellkulturen (= Nullwert). Obwohl die Zellkulturen nach einer Woche Inkubation immer noch eine Frischgewichtszunahme zeigten (Abb. 3.26), waren die relativen Wachstumsraten (bezogen auf das Ausgangsgewicht) zurückgegangen (Daten nicht dargestellt). Mit diesen Versuchsbedingungen wurde sichergestellt, daß sich die Zellen bei jedem Versuch in möglichst identischem und reproduzierbarem Zustand befanden.

Bei der Versuchsvorbereitung wurden die Zellen in neues, nährstoffreiches Medium überführt. Die sofortige Inkorporation der Nährstoffe aus der Umgebung in die Zellen wurde am Beispiel von Phosphat untersucht (Abb. 3.27). Es wurde bereits an verschiedenen

Zellkulturen gezeigt, daß Phosphat ein limitierender Faktor im Wachstum von Zellkulturen darstellt (Amino et al., 1983; Sano et al., 1999). Wie in Abschnitt 4.3.1.3 diskutiert wurde, führt Phosphatverarmung zu einem Anstieg der extrahierbaren mRNA-Mengen der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Gene. Dementsprechend konnte in den Zellkulturen, die in neues, phosphatreiches Medium überführt wurden, im Vergleich zum Nullwert ein kurzfristiges Absinken der extrahierbaren mRNA-Mengen der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Gene beobachtet werden (nach 6h Inkubation, vgl. Null- und Kontroll-Werte in Abb. 3.40 und Abb. 3.66). Im längeren Versuchsablauf (18h Inkubation) konnte im Vergleich zum Nullwert eine Zunahme des Frischgewichtes der Inkubationsansätze festgestellt werden (Abb. 3.43), was auf eine hohe Teilungsaktivität der Zellen schließen läßt. Wie in Abschnitt 4.2 gezeigt worden ist, scheinen Teilungsaktivität und Wachstum mit verstärkter Expression der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Gene gekoppelt zu sein. In der Tat konnte in den 18h inkubierten Zellen eine Zunahme der extrahierbaren mRNA-Mengen der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Gene festgestellt werden (vgl. Null- und Kontrollwerte in Abb. 3.51). Auf Proteinebene war dies jedoch nicht der Fall (Abb. 3.52). Es zeigte sich zudem, daß bei Überführung der Zellen in neues Medium die zellulären Konzentrationen fast aller Metabolite (u.a. auch die Nukleotid-Konzentrationen) stark anstiegen (vgl. Null- und Kontrollwerten in den Abbildungen 3.33-3.39, 3.44-3.50, 3.62-3.65). Die Korrelation zwischen Wachstum, Nukleotidkonzentrationen und Expression der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Gene (zumindest auf mRNA-Ebene) scheint auch in sich teilenden Zellkulturen gegeben zu sein.

4.3.2.1 Die Inkubation von Tabakzellkulturen mit Orotat bzw. Uridin beeinflusst einige Aspekte des Pyrimidinnukleotidstoffwechsels, ansonsten sind keine signifikanten Auswirkungen festzustellen.

Bei der Inkubation von Zellkulturen von *Picea glauca* mit Orotat bzw. Uridin wurde festgestellt, daß die Nukleotidvorstufen von den Zellen aufgenommen und in Form von Uridinnukleotiden (vor allem UTP und UDP-Glucose) inkorporiert wurden (Ashihara et al., 2000). Entsprechendes wurde auch bei Kartoffelscheiben-Inkubationen gezeigt (Loef et al., 1999).

(1) Die Inkubation mit Orotat hat nur geringe Auswirkungen auf den Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel.

Durch die Inkubation mit Orotat kann direkt in die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese eingegriffen werden, da bei einer ausreichenden Versorgung der Zellen mit Orotat die Enzymreaktionen, die zur Orotatbildung führen, weniger von Bedeutung sind.

Die Inkubation mit 5mM Orotat brachte bei den mittel- und langfristigen Versuchen eine Änderung in den Konzentrationen einzelner Pyrimidinnukleotide mit sich: Während 6h nach Versuchsbeginn keinerlei Unterschiede zu den Kontrollen vorlagen (Abb. 3.34), konnte 18h nach Versuchsbeginn eine Erhöhung der zellulären UTP-Konzentration festgestellt werden (Abb. 3.45). Bei der mehrtägigen Inkubation mit Orotat lagen (zumindest in den ersten Versuchstagen) die UTP- und auch die UDP-Konzentrationen über den Kontrollwerten (Abb. 3.29).

Ohne nennenswerte Auswirkung blieb die Inkubation mit Orotat auf die untersuchten extrahierbaren mRNA-Mengen von an der Pyrimidinnukleotid-Bereitstellung beteiligten Genprodukten (Abb. 3.40 und Abb. 3.51). Dies galt sowohl für die Enzyme, die Reaktionen katalysieren, die zur Bildung von Orotat führen (CPSase LU, DHODH) und bei externer Orotat-Zufuhr weniger notwendig sein sollten, als auch für UMP-Kinase, die ein Orotat nachgeschalteter Schritt hin zur Synthese von UTP darstellt, dessen Konzentration in den Zellen nach 18h Orotat-Inkubation über dem Kontrollwert lag. Die extrahierbare mRNA-Menge der UPPase, einem Enzym aus den Wiederverwertungsreaktionen, wurde durch die Orotat-Inkubation ebenfalls nicht beeinflusst, obwohl durch die externe Orotat-Zufuhr eine zusätzliche Pyrimidinquelle zur Verfügung gestellt wurde, welche die Wiederverwertungsreaktionen weniger bedeutend für die zelluläre Pyrimidinnukleotid-Versorgung machen sollte. Langfristige Aussagen über die Expression auf mRNA-Ebene können nicht getroffen werden, da aufgrund der Auseinanderentwicklung der einzelnen Inkubationsansätze die Northern-Blots des mehrtägigen Experimentes in dieser Hinsicht nicht auswertbar waren (Abb. 3.31). Auch auf Proteinebene (CPSase SU und ATCase) waren zu keiner Zeit signifikante Auswirkungen festzustellen (Abb. 3.32, Abb. 3.41 und Abb. 3.52). Eine eventuelle regulierende Wirkung von der Orotat-Inkubation selbst oder eines Endproduktes der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese auf Expressionsebene konnte nicht gezeigt werden. Es liegen jedoch keine Daten zur Aktivität der betreffenden Enzyme vor.

(2) Bei Inkubation mit Uridin werden einige Bereiche des Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsels beeinflusst.

Bei einer Uridin-Inkubation wird den Zellen eine Pyrimidinnukleotid-Quelle zur Verfügung gestellt, die möglicherweise dazu führt, daß die Biosynthese verglichen mit den Wiederverwertungsreaktionen an Bedeutung verliert.

Auch bei den Inkubationen mit Uridin konnte in den untersuchten Tabakzellen erst im mittel- und langfristigem Versuch ein deutlicher Einfluß auf den Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel festgestellt werden: 6 Stunden nach Versuchsbeginn war nur die UDP-Konzentration im

Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht und dies auch nur bei hohen Uridinkonzentrationen (Abb. 3.34). Eine deutlichere Erhöhung von Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen bei allen eingesetzten Uridinmengen war erst mit längerer Inkubationsdauer von 18h (Abb. 3.45) bis zu mehreren Tagen (Abb. 3.29) festzustellen. Dabei hatte die Inkubation der Zellen mit 10mM Uridin einen größeren Einfluß auf die zellulären Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen als die Inkubation mit 2mM Uridin (Abb. 3.45).

Die Inkubation mit Uridin blieb, abgesehen von einer Erhöhung der extrahierbaren mRNA-Menge von CPSase LU und DHODH bei 6stündiger Inkubation mit 10mM Uridin (Abb. 3.40), völlig ohne Wirkung auf die extrahierbaren mRNA-Mengen der an der *de novo* Synthese von Pyrimidinnukleotiden beteiligten Genprodukte (Abb. 3.40 und Abb. 3.51). Ferner konnte im Vergleich zu den Kontrollen auch keine signifikante und eindeutige Veränderung der Proteinmengen der untersuchten Genprodukte bei Inkubation mit Uridin beobachtet werden (Abb. 3.32, Abb. 3.41 und Abb. 3.52). Weder Uridin-Inkubation selbst noch die dadurch bedingte Erhöhung der zellulären Konzentrationen von Uridenylaten wie UTP (Abb. 3.45) hatte damit einen signifikanten Einfluß auf die Expression von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen. Es existieren aber keine Daten zur Aktivität der jeweiligen Enzyme in dieser Situation: Es ist möglich, daß eine ausreichende Versorgung des zellulären Metabolismus mit Pyrimidinnukleotiden Auswirkungen auf die Aktivität der *de novo* Synthese-Enzyme hat.

Im Gegensatz dazu konnte bei beiden Uridin-Konzentrationen sowohl nach 6 als auch nach 18 Stunden Inkubation im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der extrahierbaren mRNA-Menge von UMP-Kinase festgestellt werden (Abb. 3.40 und Abb. 3.51). Die Inkorporation von Uridin geschieht in Pflanzenzellen vermutlich über die in Abb. 1.4 dargestellten Wiederverwertungsreaktionen. Als Endprodukt dieser Reaktionen entsteht UMP, das weiter umgesetzt wird zu UDP und UTP, deren zelluläre Konzentrationen in den Uridin-Ansätzen leicht erhöht waren. In diesem Zusammenhang wäre die Kenntnis der zellulären UMP-Konzentration interessant, allerdings existierte zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine zuverlässige Methode zur Bestimmung der UMP-Konzentration in den Zellkulturextrakten. Die Umsetzung von UMP zu UDP – das weiter zu UTP verarbeitet wird – geschieht mittels der UMP-Kinase (Abb. 1.2). Dies könnte bedeuten, daß die in den Uridin-Ansätzen detektierten erhöhten extrahierbaren mRNA-Mengen der UMP-Kinase mit einer transkriptionellen Regulierung zusammenhängen. Dies könnte durch Uridin selbst, einen anderen Bestandteil der Wiederverwertungsreaktionen oder UMP vermittelt werden.

Auf die extrahierbare mRNA-Menge der UPPase hatte die Inkubation mit Uridin ebenso wie Orotat keinen Einfluß (Abb. 3.51). Eventuell ist UPPase nicht Gegenstand transkriptioneller Kontrolle durch eines seiner Substrate bzw. eines Endprodukts der Wiederverwertungsreaktionen. Oder die zellulären Konzentrationen dieser Metabolite waren noch nicht hoch genug, um eine Wirkung auf die extrahierbare mRNA-Menge der UPPase zu entfalten.

(3) Die Inkubation mit Orotat bzw. Uridin hat kaum Auswirkungen auf den übrigen Metabolismus.

Die Purinnukleotidkonzentrationen wurden im Gegensatz zu den Pyrimidinnukleotidkonzentrationen durch die Orotat- bzw. Uridin-Inkubation nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 3.28, Abb. 3.33 und Abb. 3.44). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Inkubationsexperimenten mit Kartoffelscheiben gemacht (Loef, 1999). Obwohl im Metabolismus eine Koordination beider Nukleotidspiegel vorliegt, scheint eine gewisse und vor allem kurzfristige Verschiebung der Verhältnisse tolerierbar zu sein.

Bei Zellkulturen von *Picea glauca* konnte die Inkorporation von Orotat und Uridin in Nukleinsäuren festgestellt werden (Ashihara et al., 2000). Auswirkungen auf die Nukleinsäuresynthese (DNA und RNA) konnten bei Orotat- bzw. Uridin-Inkubation nach 18 Stunden gezeigt werden (Abb. 3.47).

Andere Aspekte des zellulären Metabolismus waren so gut wie nicht betroffen. Obwohl Orotat und Uridin eine Stickstoffquelle darstellen, waren die Gesamtproteinmengen durch dieses zusätzliche Stickstoffangebot nur wenig verändert (Abb. 3.37 und Abb. 3.48). Auch die untersuchten Kohlenhydrat-Konzentrationen (Abb. 3.38-3.39 und Abb. 3.49-3.50) wurden in allen drei Experimenten nur sehr wenig durch die Orotat- bzw. Uridin-Inkubation beeinflusst.

Eine Betrachtung der Expression von Enzymen, die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese und Kohlenhydratstoffwechsel verbinden – UGPase und SuSy (Abb. 1.5) – zeigte bei der Orotat-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle kaum Veränderungen (Abb. 3.42 und Abb. 3.53). Bei den Inkubationen mit 2mM bzw. 10mM Uridin war die spezifische mRNA-Menge sowohl der UGPase als auch der SuSy größer als in den Kontrollen (Abb. 3.42). Eine Stimulierung der Transkription beider Enzyme durch die erhöhten zellulären UDP- und UTP-Konzentrationen erscheint möglich, auch wenn dies keine Folgen auf die tatsächlich vorhandene Proteinmenge hatte (konnte nur für UGPase untersucht werden, Abb. 3.53).

4.3.2.2 Die Inkubation mit Adenin beeinflusst in Tabakzellkulturen verschiedene Bereiche des Metabolismus, besonders aber den Nukleotidstoffwechsel.

(1) Die Inkubation mit Adenin hat erhebliche Auswirkungen auf die Purinnukleotid-Konzentrationen.

Mit einer Adenin-Inkubation kann das Verhältnis zwischen den Purin- und den Pyrimidinnukleotiden manipuliert werden. Tatsächlich hatte die Inkubation von Tabakzellkulturen in 10mM Adenin weitreichende Folgen für den Nukleotidstoffwechsel in den betroffenen Zellen, wobei zwischen kurz-, mittel- und langfristigen Effekten unterschieden werden muß: Die Konzentrationen aller untersuchten Purinnukleotide waren bereits 6 Stunden nach Versuchsbeginn um ein Vielfaches höher als die entsprechenden Kontrollwerte (Abb. 3.33). Dies war auch nach 18 Stunden Inkubation der Fall (Abb. 3.44) und wurde auch bei den Ansätzen beobachtet, die mehrere Tage inkubiert worden waren (Abb. 3.28). Allerdings wurde der Abstand zu den Kontrollwerten mit der Zeit geringer und gegen Ende des Versuchs (Tag 8) waren die Kontrollwerte erreicht (Abb. 3.28). Ein Anstieg der Purinnukleotid-Konzentration wurde auch in mit Adenin inkubierten Kartoffelscheiben beobachtet (Loef et al., 2001). Eine schnelle Aufnahme und Umsetzung von Adenin auch zu Versuchsbeginn konnte in Zellkulturen von *Picea glauca* gezeigt werden (Ashihara et al., 2000). Damit kann auch im vorliegenden Fall davon ausgegangen werden, daß das extern zugeführte Adenin schnell aufgenommen und inkorporiert wurde, was zu den beträchtlichen Zunahmen aller Purinnukleotid-Konzentrationen führte.

(2) Bei der Inkubation mit Adenin wird auch der Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel stark beeinflusst.

In den mit Adenin inkubierten Zellen wurden kurzfristig die extrahierbaren Mengen von UDP und UTP im Vergleich zu den Kontrollwerten beträchtlich reduziert (Abb. 3.34) bzw. der sonst zu beobachtende Anstieg der Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen gleich nach dem Umsetzen der Zellkultur blieb aus. Mittel- und langfristig stiegen die Konzentrationen aller untersuchten Pyrimidinnukleotide an (Abb. 3.45 und Abb. 3.29), und übertrafen die Kontrollwerte. Wie bereits in vielen anderen Fällen und auch hier gezeigt wurde, findet im Metabolismus eine Abstimmung der Purin- und Pyrimidinnukleotidsynthese statt (O'Neal und Naylor, 1976; Denis-Duphil, 1989). Allerdings war das Verhältnis zwischen Purin- und Pyrimidinnukleotiden nicht nur nach 6 Stunden Inkubation (Abb. 3.35), sondern auch darüber hinaus deutlich auf die Seite der Purinnukleotide verschoben (Abb. 3.46 und Abb. 3.30), was sich erst nach einigen Tagen Inkubation abschwächte, um schließlich ebenfalls Kontrollwerte zu erreichen (Abb. 3.30). Anscheinend brachte die schnelle Aufnahme und Umsetzung von Adenin den Metabolismus dazu, kurzfristig den übrigen Nukleotidstoffwechsel

herunterzufahren, um die Adenin-Inkorporation zu bevorzugen. Davon waren vermutlich auch die Nukleinsäuresynthesen betroffen, denn die Mengen an genomischer DNA und Gesamt-RNA waren in den mit Adenin inkubierten Zellen 6 bzw. 18 Stunden nach Versuchsbeginn kleiner als die Kontroll- und Nullwerte (Abb. 3.36 und Abb. 3.47).

Die Auswirkungen der Adenin-Aufnahme waren auch auf Expressionsebene sichtbar: Während die Northern-Blots des mehrtägigen Inkubationsversuches aus den genannten Gründen nicht auswertbar waren (Abb. 3.31 und Abschnitt 4.3.2.1), lagen bei der 6stündigen Adenin-Inkubation die extrahierbaren mRNA-Mengen der an der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese beteiligten Genprodukte (CPSase LU und DHODH) unter den Kontrollwerten (Abb. 3.40). Eine negative Rückkopplung von Purinnukleotiden auf die Transkription scheint in diesem Zusammenhang möglich. Beim 18stündigen Versuch waren die extrahierbaren mRNA-Mengen von CPSase LU, DHODH sowie von UPPase in den mit Adenin inkubierten Zellen ebenfalls kleiner als die Kontrollwerte (Abb. 3.51). Neben negativer Rückkopplung durch die unverändert hohen Purinnukleotid-Konzentrationen ist auch ein negativer Effekt der angestiegenen Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen auf die Transkription denkbar. Dabei muß aber bedacht werden, daß bei den in Abschnitt 4.3.2.1 beschriebenen Inkubationen mit Orotat bzw. Uridin ebenfalls eine Erhöhung der zellulären Uridinnukleotid-Konzentrationen stattfand, die keinen derartigen Effekt auf die extrahierbaren spezifischen mRNA-Mengen hatte.

Demgegenüber waren die extrahierbaren spezifischen mRNA-Mengen der UMP-Kinase beim 6- und 18stündigen Versuch größer als die Kontrollwerte (Abb. 3.40 und Abb. 3.51). UMP-Kinase stellt ein Verbindungsglied zwischen Pyrimidin- und Purinnukleotid-Stoffwechsel dar (siehe Abb. 1.2), was auch die höheren Transkriptmengen für dieses Enzym erklären könnte, da der Metabolismus um einen Ausgleich beider Nukleotidspiegel bemüht ist.

Auf Proteinebene konnte für CPSase SU und ATCase kein signifikanter Einfluß der Adenin-Inkubation festgestellt werden (Abb. 3.32, Abb. 3.41 und Abb. 3.52). Die veränderten mRNA-Mengen gingen nicht mit gleichfalls veränderten Proteinmengen einher. Über die Aktivität dieser Enzyme liegen keine Daten vor.

(3) Die Inkubation mit Adenin beeinflusst auch andere Bereiche des Metabolismus.

Auch andere Bereiche des Metabolismus der mit Adenin inkubierten Zellen waren betroffen: Die Frischgewichte lagen bei der mehrtägigen Betrachtung weit unter den Kontrollwerten (Abb. 3.26). Eine etwas größere Zunahme an Frischgewicht konnte erst gegen Versuchsende beobachtet werden – zu dem Zeitpunkt hatten sich die Nukleotidkonzentrationen den Kontrollwerten angeglichen (Abb. 3.28 und Abb. 3.29). Anscheinend war der gesamte Metabolismus vorrangig mit der Umsetzung der Purinnukleotide beschäftigt, so daß eine größere Zunahme an Frischgewicht erst bei abnehmenden Nukleotidgehalten möglich war. Eine etwaige toxische Wirkung von derartigen Konzentrationen ist ebenfalls nicht auszuschließen.

Besonders deutlich sind die Auswirkungen der Adenin-Inkubation auf den Kohlenhydratstoffwechsel: Die Konzentrationen von Glucose und Fructose lagen bei jedem untersuchten Zeitpunkt (6 bzw. 18 Stunden) weit unter den Kontroll- und Nullwerten (Abb. 3.38 und Abb. 3.49). Ebenfalls unter den Kontroll- aber über den Nullwerten lagen die Konzentrationen der meisten Hexosephosphate (Abb. 3.39 und Abb. 3.50). Als Erklärung könnte dienen, daß bei der Umsetzung der Stickstoffbase Adenin zu Purinnukleotiden jeweils eine Ribosegruppe benötigt wird, was vermutlich zu Lasten der Hexosephosphat-Spiegel geht. Es wurde außerdem bereits in Kartoffelscheiben gezeigt, daß Inkubation mit Adenin die Atmung steigert (Loef et al., 2001). Demgegenüber war die zelluläre Saccharosekonzentration bei der 6stündigen (Abb. 3.38) und vor allem der 18stündigen Adenin-Inkubation (Abb. 3.49) größer als der entsprechende Kontrollwert, was vermutlich mit einer erhöhten Saccharoseaufnahme der Zellen aus dem Medium zusammenhängt, um den größeren Bedarf an Zuckerresten zu befriedigen.

Bei Anwesenheit von Adenin im Zellkulturmedium waren die zellulären extrahierbaren mRNA-Mengen von SuSy und UGPase größer als in den entsprechenden Kontrollproben (Abb. 3.42). Beide Enzyme sind wichtige Bestandteile bei der Mobilisierung von Saccharose (Abb. 1.5). Eventuell fand aufgrund der vermutlich erhöhten Aufnahme von Saccharose sowie des erhöhten Bedarfes an Zuckerresten im Verlauf der Adenin-Inkorporation eine transkriptionelle Hochregulierung dieser beiden Genprodukte statt. Allerdings wurde die Menge an UGPase-Protein davon nicht beeinflusst (Abb. 3.53), eine entsprechende Untersuchung der SuSy-Proteinmenge ergab mit dem verwendeten Antikörper keine Signale (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Die Inkubation von Tabakzellen mit Arginin sowie seinen Vorstufen Ornithin und Citrullin beeinflusst den Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel.

In Pflanzen versorgt eine einzige CPSase sowohl die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese als auch die Argininbiosynthese mit Carbamoylphosphat (O'Neal und Naylor, 1976; siehe auch Abschnitt 1.1.3.1). Aus Carbamoylphosphat und Ornithin entsteht mittels Ornithin-Transcarbamoylase Citrullin, woraus schließlich Arginin gebildet wird. Dieses Enzym wurde in Sojabohnen-Zellkulturen in den Plastiden lokalisiert (Shargool et al., 1978), was auch als mutmaßlicher Aufenthaltsort der ersten Schritte der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese gilt (siehe Abschnitt 1.2.2.2). Somit besteht eine Verbindung beider Stoffwechselwege sowohl räumlich als auch in der gemeinsamen Verfügung über CPSase und ihr Produkt, das Carbamoylphosphat. Eine koordinierte Regulation beider Stoffwechselwege wurde in *Daucus carota* festgestellt (Jacques und Sung, 1981). In Blättern von *Pisum sativum* wurde gezeigt, daß Ornithin aktivierend auf die Enzymtätigkeit von CPSase wirkte (O'Neal und Naylor, 1976). Dabei wurde postuliert, daß steigende Ornithin-Konzentrationen eine Aktivierung der CPSase auf Enzymebene bewirken, um eine ausreichende Versorgung mit Carbamoylphosphat zu gewährleisten, damit eine weitere Umsetzung stattfinden kann.

Um festzustellen, ob die Koordinierung beider Stoffwechselwege auch auf Expressionsebene sichtbar ist, wurden Tabakzellkulturen mit Arginin und seinen Vorstufen Citrullin und Ornithin 6 Stunden inkubiert und anschließend analysiert.

4.3.3.1 Arginin, Citrullin und Ornithin werden von den Tabakzellen aufgenommen und metabolisiert.

Alle drei Aminosäuren wurden von den Zellen erfolgreich aufgenommen und metabolisiert. Die zelluläre Arginin- bzw. Citrullin-Konzentration war in den Arginin- bzw. Citrullin-Ansätzen um ein vielfaches höher als in den Kontrollen (Abb. 3.55). Da Ornithin direkt nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 3.3.3.2), mußte der Nachweis der erfolgreichen Aufnahme bei diesen Ansätzen indirekt erfolgen. Da die zellulären Konzentrationen von Arginin und Citrullin auch bei den mit Ornithin inkubierten Proben deutlich über den Kontrollwerten lagen (Abb. 3.55), kann von einer erfolgreichen Aufnahme und Weiterverarbeitung ausgegangen werden. Ebenso war die zelluläre Arginin-Konzentration bei den Citrullin-Ansätzen sowie die zelluläre Citrullin-Konzentration bei den Arginin-Ansätzen größer als bei den Kontrollen (Abb. 3.55), woraus ebenfalls eine erfolgreiche Umsetzung dieser Metabolite als gesichert gilt.

Bei den Inkubationen mit Ornithin und Arginin waren auch Auswirkungen auf den übrigen Aminosäurestoffwechsel festzustellen: Die zellulären Konzentrationen der meisten anderen untersuchten Aminosäuren lagen über den Kontrollwerten (Abb. 3.56 – Abb. 3.60), was auch für den Gesamt-Aminosäure-Gehalt galt (Abb. 3.61). Der gesamte Aminosäurestoffwechsel steht miteinander in Verbindung, da bei der Synthese von Aminosäuren aus Kohlenwasserstoff-Skeletten Transaminierungsreaktionen stattfinden, wobei Glutaminsäure eine besonders wichtige Rolle zukommt (Heldt, 1996). Die Konzentration dieser Aminosäure war in den beiden Inkubationsansätzen ebenfalls jeweils höher als in den Kontrollen (Abb. 3.56).

Die Inkubation mit Citrullin hatte einen weniger starken Einfluß auf die zellulären Konzentrationen der übrigen Aminosäuren (Abb. 3.56 – Abb. 3.60): Die Konzentrationen nur weniger Aminosäuren waren größer als die entsprechenden Kontrollwerte, wobei dieser Effekt dann weniger ausgeprägt war als bei den Ansätzen mit Arginin bzw. Ornithin. Offensichtlich wird Citrullin von den Zellen aufgenommen, hat aber ansonsten kaum Auswirkungen auf den übrigen Aminosäurestoffwechsel. Die beobachtete Höhe des Gesamt-Aminosäure-Gehaltes bei den Citrullin-Ansätzen (Abb. 3.61) erklärt sich vorrangig in der Akkumulation von Citrullin.

4.3.3.2 Arginin, Citrullin und Ornithin beeinflussen die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU und darüber hinaus auch andere Aspekte des Nukleotidstoffwechsels.

(1) Die Inkubation mit Arginin bzw. seinen Vorstufen scheint die Expression von CPSase LU zu beeinflussen.

Bei den Inkubationen von Tabakzellen mit Arginin, Ornithin und auch Citrullin war die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU jeweils größer als in den Kontrollen (Abb. 3.66). Dabei kam Ornithin die stärkste Wirkung zu, gefolgt von Arginin und schließlich Citrullin. In mit diesen Aminosäuren inkubierten Kartoffelscheiben wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (Abb. 3.54): Auch hier hatte Ornithin den größten Effekt auf die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU, gefolgt von Citrullin und schließlich Arginin. Es scheint möglich, daß CPSase aufgrund ihrer zentralen Position im Arginin- und im Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel durch Zwischen- bzw. Endprodukte der Arginin-Biosynthese transkriptionell reguliert wird. Möglicherweise kommt Ornithin diese Rolle zu, da bei beiden Inkubationsversuchen Ornithin den größten Einfluß auf die extrahierbare mRNA-Menge von CPSase LU hatte. Bei den Inkubationen mit Arginin bzw. Citrullin ist entweder ein direkter Einfluß dieser beiden Aminosäuren auf die extrahierbare mRNA-Menge

der CPSase LU denkbar oder indirekt über die Umsetzung dieser beiden Aminosäuren zu Ornithin im Verlauf des Argininstoffwechsels. Die extrahierbare CPSase-LU-Proteinmenge wurde jedoch durch die Inkubationen mit Arginin, Ornithin und Citrullin nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

(2) Auch die Expression von anderen Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Genen scheint durch die Inkubation mit Arginin bzw. Ornithin beeinflusst zu sein.

Auch die extrahierbaren mRNA-Mengen der DHODH und der UMP-Kinase waren in den mit Ornithin und (in geringerem Ausmaße) in den mit Arginin inkubierten Zellen größer als in den Kontrollen (Abb. 3.66), während die Inkubation mit Citrullin in dieser Hinsicht völlig ohne Wirkung war. Auffällig ist dabei, daß bei den Inkubationen mit Ornithin und Arginin auch die meisten zellulären Aminosäure-Konzentrationen weit über den Kontrollwerten lagen (siehe Abschnitt 4.3.3.1). Dies gilt insbesondere für die Aminosäuren Glutamin, Asparaginsäure und Glycin, die direkte Vorstufen bei der Nukleotid-Synthese sind (Abb. 3.56, Abb. 3.58 und Abb. 3.59). Eine transkriptionelle Regulation von DHODH, UMP-Kinase und auch CPSase LU durch diese Vorstufen der Nukleotid-Synthese ist denkbar.

(3) Die Nukleotid-Gehalte werden durch die Inkubation mit Arginin bzw. seinen Vorstufen nicht einheitlich beeinflusst.

Es waren keine einheitlichen Auswirkungen der Inkubationen mit Ornithin, Arginin und Citrullin auf die zellulären Nukleotid-Konzentrationen zu beobachten: Einzelne Nukleotid-Konzentrationen waren verändert (Abb. 3.62 – Abb. 3.63), aber bei Betrachtung der Gesamt-Purin- und Gesamt-Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen wich nur die Gesamt-Pyrimidinnukleotid-Konzentration bei der Arginin-Inkubation signifikant von den Kontrollwerten ab (Abb. 3.64). Auffällig war, daß die Inkubation mit allen drei Aminosäuren im Vergleich zum Nullwert und den Kontrollen eine Verschiebung des NTP/NDP-Verhältnisses in Richtung NTP mit sich brachte (Abb. 3.64). Eventuell bedeutet die Aufnahme und Umsetzung der Aminosäuren eine Veränderung im zellulären Metabolismus, die sich auch auf die Energieträger NTP und NDP niederschlägt und deren Konzentrationsverhältnis beeinflusst. Weitere Untersuchungen über die Aufnahme und Verarbeitung von Arginin, Citrullin und Ornithin in Inkubationsexperimenten sind in Zukunft nötig, um diese Veränderungen genauer zu analysieren.

4.3.4 Fazit: Die externe Zufuhr von Metaboliten beeinflusst Aspekte des Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsels.

In verschiedenen pflanzlichen Systemen wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche durchgeführt, die eine Änderung der extrahierbaren Mengen der Expressionsprodukte von Genen des Pyrimidinnukleotidstoffwechsels bewirken sollten. Dies sollte durch die externe Zufuhr von Metaboliten erreicht werden, die im Pyrimidinnukleotidstoffwechsel eine Rolle als Substrat oder Zwischen- bzw. Endprodukte spielen.

In den meisten Fällen führte die Inkubation mit den gewählten Metaboliten im Vergleich zu den parallel durchgeführten Kontrollinkubationen zu einer Änderung der Nukleotidspiegel, die mit Veränderungen der extrahierbaren mRNA-Mengen der Gene des Pyrimidinnukleotidstoffwechsels einhergingen. Hingegen waren keine signifikanten, durch die verschiedenen Inkubationen verursachten Änderungen der spezifischen extrahierbaren Proteinmengen festzustellen. Die in Abschnitt 4.2 festgestellte Korrelation der Expression der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese-Gene auf mRNA- und Proteinebene war nicht vorhanden. Allerdings liegen keinerlei Daten zur Aktivität der betreffenden Enzyme bei den verschiedenen Inkubationsbedingungen vor. Diese sollten in Zukunft bestimmt werden, um alle Regulationsmöglichkeiten der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme zu analysieren. Hierbei sollte ein besonderes Augenmerk auch auf die Untersuchung der Modifikation der betreffenden Enzyme durch z.B. Phosphorylierung gelegt werden.

#### 4.4 Transgene Pflanzen bieten eine weitere Möglichkeit, die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese in Pflanzen zu untersuchen.

Durch die Verwendung von Pflanzen, in denen eine definierte Veränderung in der Expression oder Aktivität eines bestimmten Enzyms bzw. im Ablauf eines ganzen Stoffwechselweges vorliegt, ist es möglich, eine Untersuchung in Hinblick auf Wachstum, Entwicklung und Stoffwechsel der betroffenen Pflanze durchzuführen.

Dies können zum einen Mutanten sein, in denen die Expression eines bestimmten Genproduktes nicht stattfindet (sogenannte „*knock-out*“-Mutanten) oder verändert ist. Für *Arabidopsis thaliana* beispielsweise existieren Mutanten-Datenbanken und -Saatgut-sammlungen. Jedoch ist bisher für kein Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzym eine

*A.thaliana* „knock-out“-Mutante bekannt. Für *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana glauca* vorhandene UMP-Synthase-Mutanten existieren nur in Zellkultur (Santos und Thornburg, 1992, 1998 und 2000).

Zum anderen besteht über transgene Pflanzen (Stitt und Sonnewald, 1995) die Möglichkeit, gezielte Eingriffe in den Pflanzenmetabolismus vorzunehmen. Dabei können zum einen völlig fremde Gene im Zielorganismus zur Expression gebracht werden oder es kann zum anderen die Expression endogener Gene inhibiert werden. Beide Arten transgener Pflanzen sollen im folgenden besprochen werden.

#### 4.4.1 Erste Versuche mit Pflanzen, die mit Hefe-UDPase transformiert wurden, zeigen eine gewisse Beeinflussung.

4.4.1.1 Die Transformation von Tabak mit Hefe-UDPase ist möglich und kann auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Hemicellulosen und Pektine, wichtige Bestandteile pflanzlicher Zellwände, werden im Golgi-Apparat synthetisiert (Driouch et al., 1993; Staehelin und Moore, 1995). Den Transfer der Zucker-Gruppe übernehmen Glycosyltransferasen (Brett und Waldron, 1996), während das Nucleosid-Diphosphat frei wird. Bei der Umsetzung von UDP-Glucose entsteht demnach UDP. Es wurde gezeigt, daß UDP und auch andere Nucleosid-Diphosphate Glycosyltransferasen inhibieren (Ray et al., 1969; Fredrikson und Larsson, 1992). In Zusammenhang mit der Eliminierung von UDP im Golgi-Apparat wird die UDPase gesehen (Dauwalder et al., 1969; Ray et al., 1969; Mitsui et al., 1994; Orellana et al., 1997; Neckelmann und Orellana, 1998), welche die Umsetzung von UDP zu UMP und  $P_i$  katalysiert.

Es wurde Hefe-UDPase, die unter Kontrolle des konstitutiven 35S-*CaMV*-Promotors (Frank et al., 1980) stand (Abb. 2.1), in Tabak eingeführt. Damit sollte das im Verlauf der Polysaccharidsynthese entstehende UDP schneller in UMP und  $P_i$  gespalten werden, wovon Auswirkungen auf den gesamten Pyrimidinnucleotid-Stoffwechsel erhofft wurden. Dabei sollte auch geklärt werden, ob eine zusätzliche UDPase-Aktivität überhaupt einen Einfluß auf den Metabolismus hat, da die natürlich vorhandene UDPase-Aktivität so hoch ist, daß sie bei der Isolierung von Golgi-Apparaten als Marker dient (Ray et al., 1969).

Zur Durchmusterung der 18 erfolgreich regenerierten RNUDP-Pflanzen wurde die Expression der Hefe-UDPase auf mRNA-Ebene in Blättern untersucht (Abb. 3.67): Damit sollten zum einen erfolgreich transformierte Pflanzen identifiziert werden, in denen die Transkription des

Hefe-UDPase-Gens stattfindet. In den meisten regenerierten Pflanzen war dies der Fall. Zum anderen war es möglich, Pflanzen auszuwählen, in denen verschieden große Mengen an mRNA der Hefe-UDPase vorhanden waren, was Rückschlüsse auf eine verschieden starke Expression zuläßt, die möglicherweise unterschiedlich starke Effekte auf den Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel hat. Es wurden folgende Linien ausgewählt: RNUDP 3 und RNUDP 6 mit vergleichsweise größerer Menge an extrahierbarer mRNA der Hefe-UDPase, sowie RNUDP 9 und RNUDP 17 als Vertreter für eine mittlere bis schwächere detektierbare spezifische mRNA-Menge.

4.4.1.2 Der Nachweis auf Proteinebene war bisher noch nicht erfolgreich.

Um die erfolgreiche Expression eines Transgens in transformierten Pflanzen beweisen zu können, reicht der Nachweis auf mRNA-Ebene nicht aus. Wichtig ist auch ein Nachweis auf Proteinebene, um die erfolgreiche Translation der mRNA zu zeigen. Schließlich gibt eine Messung der Enzymaktivität Aufschluß über die korrekte Weiterverarbeitung und Funktion des translatierten Proteins.

Der Nachweis auf Proteinebene war nicht erfolgreich. Ein zur Verfügung gestellter Antikörper aus *Saccharomyces cerevisiae* (Gao et al., 1999) erbrachte weder in den Tabakpflanzen noch in Hefe selbst den Nachweis (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression eines Teilfragmentes der UDPase, um einen eigenen Antikörper gewinnen zu können, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr vollendet werden (Daten nicht gezeigt) und muß in künftigen Arbeiten durchgeführt werden.

Eine Analyse der UDPase-Aktivität (mit UDP als Substrat) in den ausgewählten RNUDP-Pflanzen ergab im Vergleich zum Wildtyp geringfügige Unterschiede (Abb. 3.74). In den Linien mit höherer extrahierbarer mRNA-Menge der Hefe-UDPase (RNUDP 3 und RNUDP 6) waren im Vergleich zum Wildtyp tendenziell höhere UDPase-Aktivitäten zu beobachten. Dies könnte mit der künstlich etablierten Hefe-UDPase zusammenhängen.

Bei der Bestimmung der UDPase-Aktivität muß bedacht werden, daß die natürlich vorhandene pflanzliche UDPase ebenfalls UDP umsetzt und so hoch ist (Ray et al., 1969), daß das künstlich etablierte Signal eventuell überlagert wird. Da Hefe-UDPase relativ unspezifisch ist und auch andere Nukleotide als Substrat akzeptiert (Gao et al., 1999), wurden in der vorliegenden Arbeit Aktivitätsmessungen mit GDP als Substrat durchgeführt (Abb. 3.74). Dabei war entsprechend den Ergebnissen mit UDP als Substrat eine tendenzielle Erhöhung der Aktivität bei den Linien RNUDP 3 und RNUDP 6 zu beobachten. Ansonsten

waren keine wesentlichen Unterschiede zum Wildtyp festzustellen. Auch hier besteht wieder die Möglichkeit, daß die hohen Aktivitäten der natürlich vorhandenen pflanzlichen NDPasen das Hefe-UDPase-Signal überlagern.

4.4.1.3 Einige RNUDP-Linien zeigen phänotypische Unterschiede zum Wildtyp.

Es wurden je 4 Pflanzen jeder RNUDP-Linie bzw. des Wildtyps nach 24 bzw. 31 Tagen geerntet. Mit der Wahl von zwei verschiedenen langen Anzuchtzeiten sollten entwicklungsabhängige Unterschiede berücksichtigt werden.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigte keine der ausgewählten RNUDP-Linien herausragende morphologische Veränderungen (Abb. 3.68). Die Pflanzen der Linien RNUDP 3 und 6 waren geringfügig größer und hatten ein größeres Frischgewicht (sowohl von Wurzel als auch von Sproß, Abb. 3.69), sowie eine größere Blattfläche (Abb. 3.70) als der Wildtyp. Da Organismen zu einem großen Teil aus Wasser bestehen, treten viele physiologische Unterschiede erst zu Tage, wenn man die Betrachtung auf die Menge der Inhaltsstoffe ohne Wasser beschränkt. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich eine Trockengewichtsbestimmung von Sproß und Wurzel durchgeführt (Abb. 3.69): Dabei war das Trockengewicht vom Sproß bei den Linien RNUDP 3 und RNUDP 6 analog zum Frischgewicht ebenfalls größer als beim Wildtyp. Das Trockengewicht der Wurzeln dieser Linien war bei der 1. Ernte ebenfalls größer als beim Wildtyp, bei der 2. Ernte gleich dem entsprechenden Wildtyp-Wert. Die Linien RNUDP 9 und 17 entsprachen in allen diesen Punkten im wesentlichen dem Wildtyp (Abb. 3.69 und Abb. 3.70).

Innerhalb der 7 Tage, die zwischen den beiden Ernten lagen, nahm das Frisch- und Trockengewicht des Sprosses bei den Linien RNUDP 3 und 6 stärker zu als beim Wildtyp oder den anderen RNUDP-Linien zu (Abb. 3.69). Im Gegensatz dazu war die Frischgewichtszunahme der Wurzel bei den Linien RNUDP 3 und RNUDP 6 genauso groß wie beim Wildtyp, während die Trockengewichtszunahme wesentlich geringer als beim Wildtyp war. Hierbei ist zu bedenken, daß die Pflanzen nach 31 Tagen Anzucht auf Sand an das Limit der idealen Bedingungen gelangt waren, was sowohl den zur Verfügung stehenden Platz als auch die Nährstoffversorgung betraf. Dies hatte auf das Wurzelwachstum Auswirkungen und galt vor allem für die Pflanzen mit der größten Wurzel-Biomasse – die Pflanzen der Linien RNUDP 3 und RNUDP 6.

Bei Betrachtung aller Phänotyp-Daten ergibt sich, daß die Linien mit der höchsten extrahierbaren mRNA-Menge der Hefe-UDPase (RNUDP 3 und RNUDP 6) auch die größten

Auswirkungen auf den Phänotyp zeigten, während die anderen Linien mit weniger extrahierbarer mRNA-Menge der Hefe-UDPase (RNUDP 9 und RNUDP 17) dem Wildtyp glichen. Dies liefert zwei wichtige Hinweise: Zum einen kann aufgrund der Korrelation von größter extrahierbarer mRNA-Menge der Hefe-UDPase mit den stärksten Auswirkungen auf den Phänotyp geschlossen werden, daß die Etablierung der Hefe-UDPase einen Einfluß auf den Metabolismus hatte. Zum anderen liefert es den indirekten Hinweis dafür, daß Hefe-UDPase in den Pflanzen korrekt und vollständig exprimiert wurde und auch aktiv war.

4.4.1.4 Es gibt Hinweise auf mögliche Verschiebungen der Pyrimidinnukleotid-Spiegel in den RNUDP-Pflanzen.

(1) Die Nukleotid-Gehalte sind in den RNUDP-Pflanzen nicht eindeutig verändert.

Bei Analyse der Nukleotid-Verhältnisse in den RNUDP-Pflanzen konnte im Vergleich zum Wildtyp keine eindeutige Änderung diagnostiziert werden (Abb. 3.71 und Abb. 3.72). Dies galt auch für die UDP-Konzentrationen, auf die eine besonders große Wirkung aufgrund der konstitutiv exprimierten UDPase erwartet wurde. In einzelnen Geweben einiger RNUDP-Pflanzen zu verschiedenen Erntezeitpunkten war die UDP-Konzentration deutlich niedriger als im Wildtyp. Aber dies konnte nicht in allen Geweben bzw. zu jedem Erntezeitpunkt festgestellt werden. Wenn außerdem UDP in Geweben von RNUDP-Pflanzen deutlich reduziert war, so galt das durchweg auch für alle anderen Nukleotide, auch aus dem Purinnukleotid-Stoffwechsel (vgl. Abb. 3.71 und Abb. 3.72). Die zuverlässige Bestimmung der UMP-Konzentration, einem Produkt der UDPase-Reaktion, war zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht möglich. Das Verhältnis Purin- zu Pyrimidinnukleotide war in keinem Fall signifikant verändert (Daten nicht gezeigt).

(2) Die Verhältnisse UTP/UDP bzw. UDP-Zucker/UDP sind in den RNUDP-Pflanzen von UDP weg verschoben.

Ein Hinweis auf eine Veränderung der RNUDP-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp ergibt sich bei Betrachtung der Verhältnisse von UDP zu anderen Metaboliten (Abb. 3.73), die in direkter Verbindung damit stehen: UDP-Zucker und UTP (siehe auch Abb. 1.2 und Abb. 1.5). Zum Beispiel entsteht UDP im Golgi-Apparat während den dort stattfindenden Polysaccharidsynthesen mit UDP-Glucose als Substrat (siehe Abschnitt 1.1.3.2). Zwar ist auch bei den hier vorliegenden Ergebnissen nur eine Tendenz erkennbar, aber zumindest war in den Geweben einiger Linien das Verhältnis UTP zu UDP bzw. UDP-Zucker zu UDP im Vergleich zum Wildtyp von UDP weg verschoben (Abb. 3.73). Dies galt vor allem für die

Linien RNUDP 3 und 6, bei denen aufgrund der extrahierten spezifischen mRNA-Menge der Hinweis auf eine besonders starke Expression der Hefe-UDPase besteht. Im Vergleich dazu konnten beim Verhältnis ATP zu ADP in den meisten Fällen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den RNUDP-Linien und dem Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3.71).

In diesem Zusammenhang sollten in künftigen Experimenten die extrahierbaren mRNA-Mengen von Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzymen in den RNUDP-Linien im Vergleich zum Wildtyp betrachtet werden. Eine Verschiebung der Verhältnisse UTP zu UDP bzw. UDP-Zucker zu UDP könnte darauf einen Einfluß haben. Von besonderem Interesse ist hierbei die UMP-Kinase, die UDP aus UMP synthetisiert.

4.4.1.5 Fazit: Die transformierten Pflanzen zeigen keine signifikante morphologische Veränderung, aber leicht erhöhte Wachstumsraten.

Es wurde gezeigt, daß die Hefe-UDPase in den Pflanzen erfolgreich transkribiert wird, jedoch konnte bisher nicht die Anwesenheit von aktivem und korrekt lokalisiertem UDPase-Protein in den Pflanzen nachgewiesen werden. Es konnten aber in den Linien mit der größten extrahierbaren mRNA-Menge der Hefe-UDPase (RNUDP 3 und 6) auch die größten Einflüsse auf das Wachstum (Frischgewicht und Blattfläche) sowie einzelne Aspekte des Nukleotid-Stoffwechsels (Verhältnisse UTP zu UDP, UDP-Zucker zu UDP) beobachtet werden, was zumindest die Anwesenheit aktiven UDPase-Proteins nahelegt. Dies müssen weitere Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern und eine Optimierung der Aktivitätsmessung zeigen. Aufgrund der veränderten Trockengewichte in den Linien RNUDP 3 und 6 sollten in Zukunft auch die Zellwand und ihre Zusammensetzung näher analysiert werden, da UDPase direkten Einfluß auf die Polysaccharid-Synthese im Golgi-Apparat hat.

Die relativ schwach ausgeprägten Unterschiede der UDPase-exprimierenden Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen können auch durch die natürlich vorhandene und in allen Zellen und Wachstumsphasen ausreichende UDPase-Aktivität erklärt werden (Ray et al., 1969), so daß diese künstlich eingeführte UDPase keine Rolle mehr spielt.

4.4.2 Die extrahierbare mRNA-Menge der ATCase ist in Gegensinn-UGPase- und Gegensinn-SuSy-Kartoffelpflanzen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

UDP-Glucose macht einen beträchtlichen Anteil der in Zellen vorhandenen Pyrimidinnukleotide aus (Meyer und Wagner, 1986). Zwei Enzyme, die eine wichtige Rolle im pflanzlichen UDP-Glucose-Stoffwechsel spielen, sind UGPase und SuSy. Durch eine gezielte Inhibierung dieser beiden Enzyme könnten Erkenntnisse über die Auswirkungen auf die Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese gewonnen werden. Dazu wurden Gegensinn-UGPase- (RUGPase, Zrenner et al., 1993) und Gegensinn-SuSy-Pflanzen (RSuSy, Zrenner et al., 1995) verwendet, in denen je nach Linie das betreffende Enzym in Expression und Aktivität unterschiedlich stark inhibiert ist. Dies hat z.T. erhebliche Auswirkungen auf den gesamten Kohlenhydratstoffwechsel (Zrenner et al., 1993 und 1995).

(1) In den Knollen der Gegensinn-UGPase- und Gegen-SuSy-Pflanzen sind im Vergleich zum Wildtyp die Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen verändert.

In den Knollen dieser Gegensinn-UGPase- und Gegen-SuSy-Pflanzen waren im Vergleich zum Wildtyp Veränderungen in den Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen festzustellen (persönliche Mitteilung von Dr. Rita Zrenner, MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Deutschland, beruht auf die in Zrenner et al., 1993 und 1995 dargestellten Analysen): In sink-Knollen der Gegensinn-SuSy-Pflanzen war mit zunehmendem Inhibierungsgrad der SuSy der UDP-Glucose-Gehalt deutlich kleiner als der Kontrollwert, während die Konzentrationen von UTP und (nur bei S112) von UDP darüber lagen. Bei Betrachtung der Gegensinn-UGPase-Knollen zeigte die Linie U10 keine von den Kontrollwerten abweichende Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen. In sink-Knollen von U49 jedoch – einer stark inhibierten Linie, die zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht mehr zur Verfügung stand – war die UDP-Glucose-Konzentration größer als der entsprechende Kontrollwert, während der UTP-Gehalt kleiner war. Die UDP-Konzentration unterschied sich auch in dieser Gegensinn-UGPase-Linie nicht vom Wildtyp.

(2) Die extrahierbare mRNA-Menge der ATCase ist jedoch nicht verändert.

Während in den Knollen der Gegensinn-UGPase- und Gegensinn-SuSy-Pflanzen die Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen z.T. erheblich verändert waren, hatte dies keinerlei Auswirkungen auf die extrahierbare mRNA-Menge der ATCase, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert wurde: Weder in wachsenden sink-Knollen (Abb. 3.75) noch in gelagerten source-Knollen samt ihren austreibenden Sproßachsen (Daten nicht gezeigt)

konnten Unterschiede detektiert werden. Entweder hatten die veränderten Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen keinen Einfluß auf die Expression der Pyrimidinnukleotid-Synthese-Gene. Oder ATCase wird durch veränderte Pyrimidinnukleotid-Konzentrationen nicht transkriptionell reguliert. Eine Korrelation zwischen Nukleotidgehalten und der Expression der ATCase scheint im Gegensatz zu anderen in dieser Arbeit diskutierten Fällen (siehe Abschnitt 4.2.3.2 und 4.2.4.2) nicht gegeben zu sein.

## 4.5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige Aspekte der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese näher analysiert werden: Es wurde eine einfache genetische Organisation der daran beteiligten Genprodukte aufgezeigt. Weiter konnte dargestellt werden, daß die Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Gene weitgehend koordiniert verläuft und von externen Faktoren wie der Tageszeit abhängig ist. Ebenfalls wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Gene und der Entwicklung und dem Wachstum der Pflanzen gezeigt. Dabei lag die extrahierbare mRNA-Menge dieser Gene niemals unterhalb der Detektionsgrenze, was möglicherweise bedeutet, daß es sich bei ihnen um „Haushaltsgene“ handelt. Schließlich konnten Anzeichen für eine Regulation durch Phosphat sowie Bestandteile des Nukleotid- und Argininstoffwechsels gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wird empfohlen, in künftigen Untersuchungen insbesondere den Einfluß der Stickstoffverfügbarkeit näher zu untersuchen: Einerseits ist Stickstoff ein elementarer Baustein der Pyrimidinnukleotide und andererseits beeinflusst die Stickstoffverfügbarkeit das Wachstum insgesamt und damit auch den Bedarf an Nukleotiden.

Weiterhin sollte das Analysespektrum dahingehend ausgedehnt werden, daß Aktivitätsassays für die betreffenden Enzyme entwickelt werden. So kann die Regulation der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese auch auf Aktivitätsebene untersucht werden. Hierbei kann beispielsweise für CPSase (Pierson, 1980) und ATCase (Prescott und Jones, 1969) auf bestehende Methoden zurückgegriffen werden, die für Pflanzenverhältnisse noch optimiert werden müßten. Erste Untersuchungen zur Etablierung einer Methode zur Bestimmung der ATCase-Aktivität in Pflanzengewebe sind vielversprechend verlaufen (Ritter, 2000).

Weitere Untersuchungen zur Regulation der Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Enzyme durch Metabolite sollten vorrangig in Tabakzellkulturen stattfinden, um Probleme mit verschiedenen Organ- und Transportsystemen zu vermeiden. Hierbei empfiehlt sich künftig die Etablierung und Verwendung synchronisierter Zellkulturen, um auch eine differenziertere Analyse der Expression in definierten Phasen der Zellteilung zu ermöglichen.

Bei der Untersuchung der transgenen Hefe-UDPase-Pflanzen konnten erste interessante Anzeichen für eine Beeinflussung des UDP-Stoffwechsels gezeigt werden. Vorrangig muß aber in nächster Zeit die erfolgreiche Translation und Lokalisation der Hefe-UDPase in den transformierten Pflanzen durch Verwendung eines geeigneten Antikörpers nachgewiesen werden. Zudem ist eine Optimierung des UDPase-Aktivitätsassays zu empfehlen, um sicher zu stellen, daß in den RNUDP-Pflanzen aktives Hefe-UDPase-Protein vorhanden ist.

## 5. Zusammenfassung

Bei der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese wird UMP aus  $\text{HCO}_3^-$ , ATP, PRPP, Glutamin und Aspartat gebildet. Dies wird in Pflanzen von 5 Enzymen durchgeführt. Pyrimidinnukleotide sind ein Bestandteil von Nukleinsäuren und wichtig für zahlreiche zelluläre Prozesse wie z.B. als Energieträger im Kohlenhydratstoffwechsel oder als Vorstufe in der Vitaminsynthese.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden erstmals umfassende Analysen der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese auf Genom-, mRNA- und Protein-Ebene in *Nicotiana tabacum* (Tabak) und *Solanum tuberosum* (Kartoffel) durchgeführt. Durch Southern-Analyse von Tabak- und Kartoffel-DNA konnte eine einfache genomische Organisation aller beteiligten Gene gezeigt werden.

Durch mRNA-Analysen wurde bewiesen, daß die einzelnen Enzyme der *de novo* Synthese wie „Haushalts“-Gene exprimiert werden: Der Nachweis konnte in jedem Gewebe zu jeder gewählten Bedingung erfolgen und lag niemals unterhalb der Detektionsgrenze. Dabei konnten entwicklungsabhängige Unterschiede gezeigt werden, die einen Bezug zur Zellteilung und Wachstumsprozessen vermuten lassen.

Weiterhin konnte eine Abhängigkeit der Expression der Pyrimidinnukleotid *de novo* Synthese-Gene von Umwelteinflüssen wie der Tageszeit oder den vorhandenen Sauerstoff-Konzentrationen festgestellt werden.

Es wurde auch der Einfluß von Nährstoffen wie Phosphat und von verschiedenen Metaboliten wie Nukleotidvorstufen und Bestandteilen des Argininstoffwechsels (die Synthese von Carbamoylphosphat stellt ein gemeinsamer Schritt beider Stoffwechselwege dar) untersucht. Dabei konnte zwar jeweils eine Beeinflussung des Nukleotidstoffwechsels gezeigt werden, der jedoch nicht immer Auswirkungen auf die Expression der untersuchten Gene hatte, wie Analysen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ergaben.

Weiterhin wurden Tabakpflanzen mit Hefe-UDPase transformiert, um das im Verlauf der Polysaccharidsynthese entstehende UDP schneller in UMP und  $\text{P}_i$  zu spalten. Die Transformation konnte bisher auf mRNA-Ebene und durch schwache phänotypische Veränderungen bewiesen werden. Die Transformanten zeigten abhängig von der UDPase-spezifischen mRNA-Menge im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen in der Morphologie, jedoch erhöhte Wachstumsraten und schwache Veränderungen in den Nukleotidgehalten.

## 6. Summary

In the pyrimidine nucleotide *de novo* synthesis, UMP is formed of  $\text{HCO}_3^-$ , ATP, PRPP, glutamine and aspartate. In plants, this is done by 5 enzymes. Pyrimidine nucleotides are part of nucleic acids and important for many cellular processes such as the function of energy-carriers in the carbohydrate-metabolism or as precursor in the vitamin-synthesis.

In the course of this work, extensive analysis of the pyrimidine nucleotide *de novo* synthesis was done for the first time on the genomic, mRNA- and protein-level in *Nicotiana tabacum* (tobacco) and *Solanum tuberosum* (potato). By Southern-analysis of tobacco- and potato-DNA it was possible to show a simple genomic organization of all involved genes.

By mRNA-analysis it was proved that the single enzymes of the *de novo* synthesis are expressed like house-keeping genes: In every tissue at every chosen condition, specific mRNAs and proteins could be detected. There were developmental differences shown that might have a connection to cell division and processes of expansion.

Furthermore, it was possible to show a dependency on the expression of the pyrimidine nucleotide *de novo* synthesis genes of environmental influences such as the time of day or the existing oxygen-concentrations.

The influence of nutrients like phosphate and of several metabolites such as nucleotide-precursors and components of the arginine-metabolism (the synthesis of carbamoylphosphate is a corporate step of both pathways) was investigated, too. It was possible to show an influence on the nucleotide-metabolism. However, based on the analysis of mRNA- and protein-levels, there wasn't always an effect on the expression of the investigated genes.

In addition, tobacco plants were transformed with yeast UDPase in order to convert the UDP that was developed during the polysaccharide synthesis faster into UMP and  $\text{P}_i$ . So far, the transformation could be shown on mRNA-level and by weak modifications of the phenotype. In comparison to the wild-type, the transformants showed, depending on the amount of UDPase-specific mRNA, no modifications in morphology but increased rates of expansion and weak modifications in the nucleotide-contents.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abdelal, A.T.H. and Ingraham, J.L.** (1975) Carbamoylphosphate synthetase from *Salmonella typhimurium*. Regulation, subunit composition, and function of the subunits. *J. Biol. Chem.* **250**: 4410-4417.
- Amino, S.; Fujimura, T. and Komamine, A.** (1983) Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* **59**: 393-396.
- Ashihara, H.; Stasolla, C.; Loukanina, N. and Thorpe, T.A.** (2000) Purine and pyrimidine metabolism in cultured white spruce (*Picea glauca*) cells: Metabolic fate of <sup>14</sup>C-labeled precursors and activity of key enzymes. *Physiol. Plant.* **108**: 25-33.
- Beator, J. and Klopstech, K.** (1996) Significance of circadian gene expression in higher plants. *Chronobiol. Internat.* **13**: 319-339.
- Beckwith, J.R.; Pardee, A.B.; Austrian, R. and Jacob, F.** (1962) Coordination of the synthesis of the pyrimidine pathway of *E.coli*. *J. Mol. Biol.* **5**: 618-634.
- Beemster, G.T.S. and Baskin, T.I.** (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116**: 1515-1526.
- Beiderbeck, R. und Knoop, B.** (1984) Ein Adsorbens als Speicher für Phytohormone in einer pflanzlichen Suspensionskultur. *Z. Naturforsch.* **39 c**: 45-49.
- Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M. and Hannon, G.J.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.
- Bevan, M.** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* **12**: 8711-8721.
- Bologa, K.L.** (2001): Die Bedeutung der Sauerstoffverfügbarkeit für den Metabolismus wachsender Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum* L.). Diplomarbeit Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Bouchez, D. and Camilleri, C.** (1998): High molecular weight DNA extraction from *Arabidopsis*. In: Martinez-Zapater, J.M.; Salinas, J. (eds) *Methods in Molecular Biology; Arabidopsis protocols*. Human Press Inc., New Jersey: 61-70.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brandenburg, Sheri A.; Williamson, C.L. and Slocum, R.D.** (1997) Further characterization of a bacterial-like carbamoyl phosphate synthetase from *Arabidopsis*. Supplement to *Plant Physiol.* **114**: 148.
- Brett, C.T. and Waldron, K.W.** (1996) Cell wall formation. In: Brett, C.T.; Waldron, K.W. (eds) *Physiology and Biochemistry of plant cell walls*, Ed.2. Chapman & Hall, London: 75-111.
- Brisson, L.F.; Zelitch, I. and Havir, E.A.** (1998) Manipulation of catalase levels produces altered photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* **116**: 259-269.
- Brown, E.G. and Turan, Y.** (1995) Pyrimidine metabolism and secondary product formation: Biogenesis of albizziine, 4-hydroxyhomoarginine and 2,3-diaminopropanoic acid. *Phytochem.* **40**: 763-771.
- Brown, T.A.** (1993) *Moderne Genetik*. Spektrum akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Oxford, Berlin: a: 54-57; b: 110-118, 429.
- Burgess, J.** (1985) *An introduction to plant cell development*. Cambridge University Press, UK: 24-40.
- Buselmaier, W. und Tariverdian, G.** (1999) *Humangenetik*, 2.Auflage. Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York: 25.

- Carrey, E.A. and Hardie, D.G.** (1988) Mapping of catalytic domains and phosphorylation sites in the multifunctional pyrimidine-biosynthetic protein CAD. *Eur. J. Biochem.* **171**: 583-588.
- Chen, J.J. and Jones, M.E.** (1976) The cellular location of dihydroorotate dehydrogenase: relation to *de novo* biosynthesis of pyrimidines. *Arch. Biochem. Biophys.* **176**: 82-90.
- Chouini-Lalanne, N.; Malet-Martino, C.; Martino, R. and Michel, G.** (1989) Study of the metabolism of flucytosine in *Aspergillus* by <sup>19</sup>K nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob. Agents Chemother* **33**: 1939-1945.
- Ciereszko, I. and Barbachowska, A.** (2000) Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J. Plant Physiol.* **156**: 640-644.
- Ciereszko, I.; Johansson, H.; Hurry, V. and Kleczkowski, L.A.** (2000) Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and *pho* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* **212**: 598-605.
- Ciereszko, I. and Rychter, A.M.** (1995) Metabolic changes in the roots as affected by phosphate deficiency. *Wiadomosci Botaniczne* **39**: 81-90.
- Coleman, P.F.; Suttle, P. and Stark, G.R.** (1977) Purification from hamster cells of the multifunctional protein that initiates *de novo* synthesis of pyrimidine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **252**: 6379-6385.
- Cunin, R.; Glansdorff, N.; Pierard, A. and Stalon, V.** (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**: 314-352.
- D'Amato, F.** (1984) Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. In: Johri, B.M. (ed) *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, New York, USA: 519-566.
- Dancer, J.; Neuhaus, H.E. and Stitt, M.** (1990) Subcellular compartmentation of uridine nucleotides and nucleoside-5'-diphosphate kinase in leaves. *Plant Physiol.* **92**: 637-641.
- Dauwalder, M.; Whaley, W.G. and Kephart, J.E.** (1969) Phosphatases and differentiation of the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* **4**: 455-497.
- Deblaere, R.; Bytebier, B.; de Geve, H.; Debroek, F.; Schell, J.; van Montagu, M. and Leemans, J.** (1985) Efficient octopine Ti Plasmid-derived vectors of *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.* **13**: 4777-4788.
- Delmer, D.P. and Stone, B.A.** (1988) Biosynthesis of plant cell walls. *Biochem. Plants* **14**: 373-420.
- Denis-Duphil, M.** (1989) Pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the *ura2* cluster gene, its multifunctional enzyme product, and other structural or regulatory genes involved in *de novo* UMP synthesis. *Biochem. Cell Biol.* **67**: 612-631.
- Dietz, K.J.** (1989) Recovery of spinach leaves from sulfate and phosphate deficiency. *J. Plant Physiol.* **134**: 551-557.
- Doremus, H.D.** (1986) Organization of the pathway of *de novo* pyrimidine nucleotide biosynthesis in pea (*Pisum sativum* L. cv Progress No. 9) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**: 112-119.
- Doremus, H.D. and Jagendorf, A.T.** (1985) Subcellular localization of the pathway of *de novo* pyrimidine nucleotide biosynthesis in pea leaves. *Plant Physiol.* **79**: 856-861.
- Doremus, H.D. and Jagendorf, A.T.** (1987) Site of synthesis of the enzymes of the pyrimidine biosynthetic pathway in oat (*Avena sativa* L.) leaves. *Plant Physiol.* **83**: 657-658.
- Driouch, A.; Face, L. and Staehelin, A.** (1993) The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 210-214.
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S. and von Heijne, G.** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**: 1005-1016.

- Flynn, P.J. and Reece, R.J.** (1999) Activation of transcription by metabolic intermediates of the pyrimidine biosynthetic pathway. *Mol. Cell Biol.* **19**: 882-888.
- Franck, A.; Guilley, H.; Jonard, G.; Richards, K. and Hirth, L.** (1980) Nucleotide sequence of Cauliflower Mosaic Virus DNA. *Cell* **21**: 285-294.
- Fredrikson, K. and Larsson, C.** (1992) Activators and inhibitors of the plant plasma membrane 1,3- $\beta$ -glucan synthase. *Biochem. Sci. Trans.* **20**: 710-713.
- Gao, X.D.; Kaigorodov, V. and Jigami, Y.** (1999) *YND1*, a homologue of *GDA1*, encodes membrane-bound apyrase required for Golgi N- and O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**: 21450-21456.
- Geigenberger, P.; Fernie, A.R.; Gibon, Y.; Christ, M. and Stitt, M.** (2000) Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol. Chemistry* **381**: 723-740.
- Geigenberger, P.; Lerchl, J.; Stitt, M. and Sonnewald, U.** (1996) Phloem specific expression of pyrophosphatase inhibits long distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant Cell Environ.* **19**: 43-55.
- Geigenberger, P.; Reimholz, R.; Geiger, M.; Merlo, L.; Canale, V. and Stitt, M.** (1997) Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta* **201**: 502-518.
- Geigenberger, P. and Stitt, M.** (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* **189**: 329-339.
- Geigenberger, P. and Stitt, M.** (2000) Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and *AGPS* transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. *The Plant J.* **23**: 795-806.
- Gerhart, J.C.** (1970) A discussion of the regulatory properties of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*. *Curr. Topics Cell. Reg.* **2**: 275-325.
- Gielen, J.; de Beuckeleer, M.; Seurinck, J.; Debroeck, H.; de Greve, H.; Lemmers, M.; van Montagu, M. and Schell, J.** (1984) The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* **3**: 835-846.
- Giermann, N.** (1997): Untersuchungen zur Expression der großen Untereinheit der Carbamoylphosphat synthetase in Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*). Diplomarbeit Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Giermann, N.; Schröder, M.; Ritter, T. and Zrenner, R.** (2002) Molecular analysis of *de novo* pyrimidine synthesis in *Solanaceous* species. Eingereicht bei *Plant Mol. Biol.*
- Gleiter, M.E. and Parker, H.E.** (1957) The effect of phosphorus deficiency on the free amino acids of alfalfa. *Arch. Biochem. Biophys.* **71**: 430-436.
- Gojon, A.; Dapoigny, L.; Lejay, L.; Tillard, P. and Rufty, T.W.** (1998) Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-<sup>15</sup>N uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant Cell Environ.* **21**: 43-53.
- Graves, L.M.; Guy, H.I.; Kozlowski, P.; Huang, M.; Lazarowski, E.; Pope, R.M.; Collins, M.A.; Dahlstrand, E.N.; Earp III, H.S. and Evans, D.R.** (2000) Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* **403**: 328-332.
- Greiner, S.; Krausgrill, S. and Rausch, T.** (1998) Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor: proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiol.* **116**: 733-742.
- Guillerez, J.; Vorisek, J.; Lacroute, F.; Hervé, G. and Nagy, M.** (1988) Subcellular location of dihydroorotate dehydrogenase in two yeast species: *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **4**: S242.

- Hager, S.E. and Jones, M.E.** (1967) A glutamine-dependent enzyme for the synthesis of carbamyl phosphate for pyrimidine biosynthesis in fetal rat liver. *J. Biol. Chem.* **242**: 5674-5680.
- Heldt, H.W.** (1996): Pflanzenbiochemie. Spektrum akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Oxford, Berlin: 286-298.
- Heyworth, P.G.; Gutteridge, W.E. and Ginger, C.D.** (1984) Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* **176**: 55-60.
- Hiroyuki, I.; Miwa, F.; Setsuko, I.; Maki, K.; Maki, M.; Yoko, T.; Takashi, Y.; Katsuhiko, Y. and Mitsuo, I.** (1996) Molecular cloning of a human cDNA encoding a trifunctional enzyme of carbamoyl-phosphate synthetase-aspartate transcarbamoylase-dihydroorotase in *de novo* pyrimidine synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**: 249-255.
- Hochachka, P.W.** (1990) Metabolic strategies of defence against hypoxia in animals. In: Jackson, M.B.; Davies, D.D.; Lambers, H. (eds) *Plant life under oxygen deprivation*. SPB Academic Publishing bv, Den Haag, Netherlands: 121-128.
- Hochachka, P.W.; Buck, L.T.; Doll, C.J. and Land, S.C.** (1996) Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proceed. Nat. Academic. Sciences* **93**: 9493-9498.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L.** (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9877.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L.** (1992) Transgenic potato plants depleted for the major tuber protein via expression of antisense RNA. *Plant Science (Limerick)* **87(1)**: 45-54.
- van den Hoff, M.; Jonker, A.; Beintema, J.J. and Lamers, W.H.** (1995) Evolutionary relationships of the carbamoylphosphate synthetase genes. *Mol. Evol.* **41**: 813-832.
- Itaya, K. and Ui, M.** (1966) A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clin. Chim. Acta* **14**: 361-366.
- Jacob, F. and Monod, J.** (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**: 318-356.
- Jacob, J. and Lawlor, D.W.** (1991) Stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in phosphate deficient sunflower, maize and wheat plants. *J. Exp. Botany* **42**: 1003-1012.
- Jaques, Z. and Sung, R.** (1981) Regulation of pyrimidine and arginine biosynthesis investigated by the use of phaseolotoxin and 5-fluorouracil. *Plant Physiol.* **67**: 287-291.
- Jelitto, T.; Sonnewald, U.; Willmitzer, L.; Hajirezaei, M. and Stitt, M.** (1992): Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol. *Planta* **188**: 238 – 244.
- Jones, M.E.** (1972) Regulation of uridylic acid synthesis in eukaryotic cells. *Curr. Topics Cell. Reg.* **6**: 227-265.
- Joubès, J. and Chevalier, C.** (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol. Biol.* **43**: 735-745.
- Kanamori, I.; Ashihara, H. and Komamine, A.** (1980) Subcellular distribution and activity of enzymes involved in uridine-5'-monophosphate synthesis in *Vinca rosea* cells. *Z Pflanzenphysiol.* **96**: 7-16.
- Kasahara, M. and Ohmori, M.** (1997) Carbamoyl Phosphate Synthetase of the Cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.* **38**: 734-739.
- Kholti, A.; Charlier, D.; Gigot, D.; Huysveld, N.; Roovers, M. and Glansdorff, N.** (1998) pyrH-encoded UMP-kinase directly participates in pyrimidine-specific modulation of promoter activity in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **280**: 571-582.

- Khyse-Anderson, J.** (1984) Electroblothing of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209.
- Kilstrup, M.; Lu, C.D.; Abdelal, A. and Neuhard, J.** (1988) Nucleotide sequence of the *carA* gene and regulation of the *carAB* operon in *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* **176**: 421-429.
- van der Krol, A.R.; Lenting, P.E.; Veenstra, J.; van der Meer, I.M.; Koes, R.E.; Gerats, A.G.M.; Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R.** (1988a) An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* **333**: 866-869.
- van der Krol, A.R.; Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R.** (1988b) Antisense genes in plants: an overview. *Gene* **72**: 45-50.
- Lacroute, F.; Pierard, A.; Grenson, M. and Wiame, J.M.** (1965) The biosynthesis of carbamoylphosphate synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **40**: 127-142.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lehrach, H.; Diamond, D.; Wozney, J.M. and Boedtke, H.** (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem. J.* **16**: 4743-4751.
- Lindmark, D.G. and Jaroll, E.L.** (1982) Pyrimidine metabolism in *Giardia lamblia* trophozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **5**: 291-296.
- Logemann, J.; Schell, J. and Willmitzer, L.** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**: 21-26.
- Loef, I.; Geigenberger, P. and Stitt, M.** (1999) Orotate leads to a specific increase in uridine nucleotide levels and a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis in discs from growing potato tubers. *Planta* **209**: 314-323.
- Loef, I.; Stitt, M. and Geigenberger, P.** (2001) Increased levels of adenine nucleotides modify the interaction between starch synthesis and respiration when adenine is supplied to discs from growing potato tubers. *Planta* **212**: 782-791.
- Lovatt, C.J.; Albert, L.S. and Tremblay, G.C.** (1979) Regulation of pyrimidine biosynthesis in intact cells of *Cucurbita pepo*. *Plant Physiol.* **64**: 562-569.
- Lowry, O.H. and Passoneau, J.V.** (1972) A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, Inc., New York.
- Ludwig, R.A.** (1991) Plants shuttle CO<sub>2</sub> equivalents as carbamoyl phosphate from mitochondria to chloroplasts. In: Huang, A.H.C.; Taiz, L. (eds) *Molecular approaches to compartmentation and metabolic regulation*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD: 99-112.
- Maier, T.; Zhou, L. and Thornburg, R.W.** (1995) Nucleotide sequence of a cDNA encoding UMP synthase from *Nicotiana tabacum* (GenBank U22260). *Plant Physiol.* **108**: 1747.
- Majeau, N.; Arnoldo, M.A. and Coleman, J.R.** (1994): Modification of carbonic anhydrase activity by antisense and over-expression constructs in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **25**: 377-385.
- Meyer, R. and Wagner, K.G.** (1986) Nucleotide pools in leaf and root tissue of tobacco plants: influence of leaf senescence. *Physiol. Plant.* **67**: 666-672.
- Miller, R.W.** (1975) A high molecular weight dihydroorotate dehydrogenase of *Neurospora crassa*. Purification and properties of the enzyme. *Canad. J. Biochem.* **53**: 1288-1300.
- Mitsui, T.; Honma, M.; Kondo, T.; Hashimoto, N.; Kimura, S. and Igaue, I.** (1994) Structure and function of the Golgi complex in rice cells. Purification and characterization of Golgi membrane-bound nucleoside diphosphatase. *Plant Physiol.* **106**: 119-125.

- Mol, J.N.M.; van der Krol, A.R.; van Tunen, A.J.; van Blokland, R.; de Lange, P. and Stuitje, A.R.** (1990) Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS Lett.* **268**: 427-430.
- Morell, S. and ap Rees, T.** (1986) Sugar metabolism in developing tubers of *Solanum tuberosum*. *Phytochem.* **25**: 1579-1585.
- Mori, M.; Ishida, H. and Tatibana, M.** (1975) Aggregation states and catalytic properties of the multienzyme complex catalyzing the initial steps of pyrimidine biosynthesis in rat liver. *Biochemistry* **14**: 2622-2630.
- Muñoz, P.; Norambuena, L. and Orellana, A.** (1996) Evidence for a UDP-glucose transporter in Golgi apparatus-derived vesicles from pea and its possible role in polysaccharide biosynthesis. *Plant Physiol.* **112**: 1585-1594.
- Nagahashi, J. and Kane, A.P.** (1982) Triton-stimulated nucleoside diphosphatase activity: subcellular localization in corn root homogenates. *Protoplasma* **112**: 167-173.
- Nagano, M. and Ashihara, H.** (1993) Long-term phosphate starvation and respiratory metabolism in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Cell Physiol.* **34**: 1219-1228.
- Nagy, M.; Laporte, J.; Penverne, B. and Herve, G.** (1982) Nuclear localization of aspartate transcarbamoylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **92**: 790-794.
- Nakai, K. and Kanehisa, M.** (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**: 897-911.
- Nakanishi, S.; Ito, K. and Tatibana, M.** (1968) Two types of carbamoylphosphate synthetase in rat liver: chromatographic resolution and immunological distinction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**: 774-781
- Napoli, C.; Lemieux, C. and Jorgensen, R.** (1990) Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* **2**: 279-289.
- Nasr, F.; Bertauche, N.; Dufour, M.E.; Minet, M. and Lacroute, F.** (1994) Heterospecific cloning of *Arabidopsis thaliana* cDNAs by direct complementation of pyrimidine auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Cloning and sequence analysis of two cDNAs catalysing the second, fifth and sixth steps of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 23-32.
- Natale, P.J. and Tremblay, G.C.** (1969) On the availability of intramitochondrial carbamoylphosphate for the extramitochondrial biosynthesis of pyrimidines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**: 512-517.
- Neckelmann, G. and Orellana, A.** (1998) Metabolism of uridine 5'-diphosphate-glucose in Golgi vesicles from pea stems. *Plant Physiol.* **117**: 1007-1014.
- O'Donovan, G.A. and Neuhard, J.** (1970) Pyrimidine metabolism in microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **34**: 278-343.
- O'Neal, T.D. and Naylor, A.W.** (1976) Some regulatory properties of pea leaf carbamoyl phosphate synthetase. *Plant Physiol.* **57**: 23-28.
- Ong, B.L. and Jackson, J.F.** (1972) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Phaseolus aureus*. *Biochem. J.* **129**: 583-593.
- Orellana, A.; Neckelmann, G. and Norambuena, L.** (1997) Topography and function of Golgi uridine-5'-diphosphatase from pea stems. *Plant Physiol.* **114**: 99-107.
- Parker, N.F. and Jackson, J.F.** (1981) Control of pyrimidine biosynthesis in synchronously dividing cells of *Helianthus tuberosus*. *Plant Physiol.* **67**: 363-366.
- Paulus, T.J. and Switzer, R.L.** (1979) Characterization of pyrimidine-repressible and arginine-repressible carbamyl phosphate synthetases from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **137**: 82-91.
- Paxton, W.C.** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 185-214.

- Peterson, R.L.; Barker, W.G. and Howarth, M.J.** (1985) Development and structure of tubers. In: Li, P.H. (ed) *Potato Physiology*, Academic Press, USA: 123-152.
- Pierard, A.; Gransdorff, N.; Mergeay, M. and Wiame, J.M.** (1965) Control of the biosynthesis of carbamoyl phosphate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **14**: 23-36.
- Pierson, D.L.** (1980) A rapid colorimetric assay for carbamyl phosphate synthetase I. *J. Biochem. Biophys. Methods* **3**: 31-37.
- Poethig, R.S. and Sussex, I.M.** (1985) The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. *Planta* **165**: 158-169.
- Prescott, L.M. and Jones, M.E.** (1969) Modified methods for the determination of carbamyl aspartate. *Anal. Biochem.* **32**: 408-419.
- Rabe, E. and Lovatt, C.J.** (1986) Increased arginine biosynthesis during phosphorus deficiency: A response to the increased ammonia content of leaves. *Plant Physiol.* **81**: 774-779.
- Raghothama, K.G.** (1999) Phosphate Acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 665-693.
- Rathod, P.K.; Leffers, N.P. and Young, R.D.** (1992) Molecular target of 5-fluoroorotate in human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother* **36**: 704-711.
- Ray, P.M.; Shininger, T.L. and Ray, M.M.** (1969) Isolation of  $\beta$ -glucan synthase particles from plant cells and identification with Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**: 605-612.
- Remus, M.** (1999) Molekulargenetische Charakterisierung und Manipulation der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2A in Tabak (*Nicotiana tabacum*). Doktorarbeit Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Reyes, P. and Gubanig, M.E.** (1975) Studies on a pyrimidine phosphoribosyltransferase from murine leukemia P15 34J. Partial purification, substrate specificity, and evidence for its existence as a bifunctional complex with orotidine 5-phosphate decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **250**: 5097-5108.
- Ritter, T.M.** (2000): Untersuchungen zur Bedeutung der Aspartat-Transcarbamoylase in Pflanzen. Diplomarbeit Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Rosahl, S.; Schelöl, J. and Willmitzer, L.** (1987) Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants. Demonstration of an esterase activity. *EMBO J.* **6**: 1155-1159.
- Rost, T.L. and Bryant, J.A.** (1996) Review Article: Root organization and gene expression patterns. *J. Exp. Botany* **47**: 1613-1628.
- Rubio, V. and Cervera, J.** (1995) The carbamoyl-phosphate synthase family and carbamate kinase: structure-function studies. *Biochem. Society Transactions* **23**: 879-883.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sano, T.; Kuraya, Y.; Amino, S. and Nagata, T.** (1999) Phosphate as a limiting factor for the cell division of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* **40**: 1-8.
- Santoso, D. and Thornburg, R.W.** (1992) Isolation and characterization of UMP synthase mutants from haploid cell suspensions of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* **99**: 1216-1225.
- Santoso, D. and Thornburg, R.W.** (1998) Uridine 5'-monophosphate synthase is transcriptionally regulated by pyrimidine levels in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* **116**: 815-821.
- Santoso, D. and Thornburg, R.W.** (2000) Fluoroorotic acid –selected *Nicotiana plumbaginifolia* cell lines with a stable thymine starvation phenotype have lost the thymine-regulated transcriptional program. *Plant Physiol.* **123**: 1517-1523.

- Schlitzberger, A.** (1981): Etablierung von isogenen Normal- und Tumorgewebekulturen für Pfropfexperimente. Diplomarbeit Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Schmundt, D.; Stitt, M.; Jähne, B. and Schurr, U.** (1998) Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *The Plant J.* **16**: 505-514.
- Schurr, U.; Heckenberger, U.; Herdel, K.; Walter, A. and Feil, R.** (2000) Leaf development in *Ricinus communis* during drought stress: dynamics of growth processes, of cellular structure and of sink-source transition. *J. Exp. Botany* **51**: 1515-1529.
- Shargool, P.D.; Steeves, T.; Weaver, M. and Russell, M.** (1978) The localization within plant cells of enzymes involved in arginine biosynthesis. *Canad. J. Biochem.* **56**: 273-279.
- Sharp, P.A.** (1999) RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev.* **13**: 139-141.
- Shibata, H.; Ochiai, H.; Sawa, Y. and Miyoshi, S.** (1986) Localization of carbamoylphosphate synthetase and aspartate carbamoyltransferase in Chloroplasts. *Plant Physiol.* **80**: 126-129.
- Silk, W.K.** (1984) Quantitative descriptions of development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **35**: 479-518.
- Smulders, M.J.M.; Rus-Kortekaas, W. and Gilissen, L.J.W.** (1994) Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science (Limerick)* **97**: 53-60.
- Sonneward, U. and Willmitzer, L.** (1992) Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiol.* **99**: 1267-1270.
- Souciet, J.L.; Potier, S.; Hubert, J.C. and Lacroute, F.** (1987) Nucleotide sequence of the pyrimidine specific carbamoylphosphate synthetase, a part of the yeast multifunctional protein encoded by the *URA2* gene. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 314-319.
- Staelin, L.A. and Moore, I.** (1995) The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 261-288.
- Stitt, M.** (1995): The use of transgenic plants to study the regulation of plant carbohydrate metabolism. *Aust. J. Plant Physiol.* **22**: 635-646.
- Stitt, M.; Cseke, C. and Buchanan, B.** (1984) Regulation of fructose-2,6-bisphosphate concentration in spinach leaves. *Eur. J. Biochem* **143**: 89-93.
- Stitt, M.; Mieskes, G.; Söling, H.-D. and Heldt, H.W.** (1982): On a possible role of fructose-2,6-bisphosphate in regulating photosynthetic metabolism in leaves. *FEBS Lett.* **145**: 217 – 222.
- Stitt, M. and Sonneward, U.** (1995) Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 341-368.
- Stitt, M.; Wirtz, W. and Heldt, H.W.** (1980): Metabolite levels during induction in the chloroplast and extra-chloroplast compartments of spinach protoplasts. *Biochem. Biophys. Acta* **593**: 85 – 102.
- Stryer, L.** (1996) Biochemie, 4.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin - Oxford: 517-537; 627-653.
- Syvanen, J.M. and Roth, J.R.** (1973) Structural genes for catalytic and regulatory subunits of aspartate transcarbamylase. *J. Mol. Biol.* **76**: 363-378.
- Taiz, L. and Zeiger, E.** (1991) Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., USA: 102.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

- Trotta, P.P.; Burt, M.E.; Haschemeyer, R.H. and Meister, A.** (1971) Reversible dissociation of carbamyl phosphate synthetase into a regulated synthesis subunit and a subunit required for glutamine utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2599-2603.
- Trotta, P.P.; Pinkus, L.M.; Haschemeyer, R.H. and Meister, A.** (1974) Reversible dissociation of the monomer of glutamine-dependent carbamoylphosphate synthetase into catalytically active heavy and light subunits. *J. Biol. Chem.* **249**: 492-499.
- Turgeon, R.** (1989) The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 253-281.
- Turner, R.J.; Bonner, E.R.; Grabner, G.K. und Switzer, R.L.** (1998) Purification and characterization of *Bacillus subtilis* PyrR, a bifunctional pyr mRNA-binding attenuation protein/uracil phosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **273**: 5932-5938.
- Ukaji, T. and Ashihara, H.** (1987) Effect of inorganic phosphate on the levels of amino acids in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Annals of Botany* **60**: 109-114.
- Wagner, K.G. and Backer, A.I.** (1992) Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. *Internat. Rev. Cyt.* **134**: 1-84.
- Walter, A. and Schurr, U.** (2000) Spatio-temporal variation of leaf growth and function. In: Marshall, B., Roberts, J. (eds) *Leaf development and canopy growth*. Sheffield: Sheffield Academic Press.
- Walther, R.; Wald, K.; Glund, K. and Tewes, A.** (1984) Evidence that a single polypeptide catalyses the two step conversion of orotate to UMP in cells from a tomato suspension culture. *J. Plant Physiol.* **116**: 301-311.
- Wee, E.G-T; Sherrier, D.J.; Prime, T.A. and Dupree, P.** (1998) Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell* **10**: 1759-1768.
- Williamson, C.L.; Lake, M.R. and Slocum, R.D.** (1996) Cloning and characterization of a bacteria-like carbamoyl phosphate synthetase from *Arabidopsis*. Supplement to *Plant Physiol.* **111**: 105.
- Williamson, C.L. and Slocum, R.D.** (1994) Molecular cloning and characterization of the *pyrB1* and *pyrB2* genes encoding aspartate transcarbamoylase in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* **105**: 377-384.
- Wirtz, W.; Stitt, M. and Heldt, H.W.** (1980) Enzymic determination of metabolites in the subcellular compartments of spinach protoplasts. *Plant Physiol.* **66**: 187-193.
- Wong, S.C. and Abdelal, A.T.** (1990) Unorthodox expression of an enzyme: evidence for an untranslated region within *carA* from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **172**: 630-642.
- Zhou, Z.; Metcalf, A.E.; Lovatt, C.J. and Hyman, B.C.** (2000) Alfalfa (*Medicago sativa*) carbamoylphosphate synthetase gene structure records the deep lineage of plants. *Gene* **243**: 105-114.
- Zrenner, R.; Salanoubat, M.; Willmitzer, L. and Sonnewald, U.** (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant J.* **7**: 97-107.
- Zrenner, R.; Willmitzer, L. and Sonnewald, U.** (1993) Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. *Planta* **190**: 247-252.
- Zupan, J.R. and Zambryski, P.** (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* **107**: 1041-1047.

### **Erklärung zur Rechtschreibung:**

Die vorgelegte Dissertation wurde nach den alten Rechtschreibregeln erstellt. Die neue amtliche Rechtschreibung wurde am 01.08.1998 eingeführt, bis 2005 gelten Schreibungen nach dem alten Regelwerk jedoch nicht als Fehler (Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG, 2001).