

2. Zielsetzung

Die metabolische Rolle der Pyruvat, Phosphat Dikinase in C_3 -Pflanzen ist bis heute noch nicht klar, obwohl ihre Induktion unter Salztress und Anaerobiose auf eine Rolle in der Stressantwort hindeutet (Moons *et al.*, 1998). Deshalb wurde in früheren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe die Überexpression des Enzyms aus *Mesembryanthemum crystallinum* in einer Pflanze mit C_3 -Stoffwechsel (*Nicotiana tabacum*) durchgeführt. In Vorarbeiten wurde von Sheriff (1994) die PPDK in Tabak mit einem konstitutiven Promotor überexprimiert. Da sowohl Stickstoff als auch Aluminium in erste Linie die Wurzeln der Pflanzen betreffen, wurden von Stenzel (1997) transgene Tabakpflanzen hergestellt, die die PPDK mit einem wurzelspezifischer Promotor überexprimieren.

Zunächst soll im Rahmen dieser Arbeit die erfolgreiche Expression der Pyruvat, Phosphat Dikinase in diesen transgenen Tabakpflanzen geprüft und anschließend der Einfluss der genannten Überexpression auf verschiedene Aspekte des Stoffwechsels charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sind die überexprimierten PPDK-Tabakpflanzen bezüglich bestimmter Stickstoff- und Aluminium- Stressbedingungen untersucht worden.

1) Stickstoffdüngung: Stickstoff wird durch die Pflanze in Form von NO_3^- und NH_4^+ aufgenommen. Beide Ionen haben einen deutlichen Einfluss auf den pH-Wert des Außenmediums. Bei Nitraternahrung wird im Gegensatz zur Ernährung mit Ammonium eine beachtliche Menge an H^+ über den H^+/NO_3^- -Cotransport aus dem Außenmedium in das Cytosol transportiert, deshalb wirkt sie auf das Außenmedium pH-Wert-erhöhend. Ammoniumernahrung wirkt auf das Außenmedium pH-Wert-erniedrigend, da die von der ATPase an das Außenmedium abgegebenen H^+ -Ionen weitgehend dort verbleiben. In der Tat hat die Zelle das Bestreben den pH-Wert des Cytosols konstant zu halten. Eigentlich sollte man erwarten, dass Ammonium die bevorzugte N-Quelle für die Pflanze ist, weil die Ammoniumassimilierung weniger Energie als die Nitratassimilierung verbraucht. Nur wenige Spezies tolerieren NH_4^+ als einzige oder beherrschende N-Quelle, d.h. Ammonium stellt einen Stressfaktor für die Pflanze dar. Andererseits sind bei gestörter N-Ernährung der Pflanzen Spross und Wurzel kleiner, und der Ertrag verringert sich. Der Stickstoff-Stoffwechsel steht in einem engen Zusammenhang mit dem Kohlenstoff-Stoffwechsel und die PPDK könnte an der Versorgung mit Kohlenstoff für die

Stickstoffassimilierung beteiligt sein. Zu diesem Zweck werden gemeinsame N-Quelle-/N-Defizitexperimente durchgeführt.

Um die Funktion der PPDK in Bezug auf unterschiedliche N-Quellen und Konzentration untersuchen zu können, sollen noch weitere Parameter näher betrachtet werden. Durch die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in den Blättern der behandelten Pflanzen, sowie deren Protein- und Aminosäurenkonzentration soll Aufschluss über die N-Verarbeitung in Pflanzen gewonnen werden. Des Weiteren werden auch die Protein- und Aminosäurekonzentrationen in den Wurzeln der behandelten transgenen Pflanzen gemessen, um direkte Aussagen über die N-Assimilation am Ort der Nährstoffaufnahme zu erhalten. Weitere ergänzende Parameter wie Sprosslänge, Frischgewicht, Blattfläche und Samenertrag werden gemessen, da sich hier Wachstum und Produktionsänderungen in Folge von variablen Nährstoffangeboten detektieren lassen sollten. Einen weiteren Anhaltspunkt über die Wirkung der PPDK in C₃-Pflanzen soll die densitometrische Messung der RUBISCO- und PEPC-Immunoblots ergeben. Die PEPC als Indikator der CO₂-Fixierung in C₄-Pflanzen sollte in den transgenen C₃-Pflanzen ein erhöhtes Vorhandensein als Antwort auf die PPDK-Aktivität geben. Die parallele Messung des Enzyms RUBISCO soll Aufschluss über ihr Verhältnis zur PEPC in den zu untersuchenden Pflanzen geben.

2) Aluminium-Behandlung: Aluminium hat keine spezifische Funktion im Stoffwechsel der höheren Pflanzen, sondern ist für sie ein toxisches Agens. Nach Miyao *et al.* (2001) hat die Überexpression des C₄-Enzyms PEPC aus Mais in transgenen Reispflanzen die Al-Toleranz erhöht. Aus dieser Annahme heraus, und da die PPDK die Bildung von PEP katalysiert, welches wiederum als Substrat der PEPC gilt, könnten beide Enzyme in der Pflanzenantwort auf Al-Stress teilnehmen. Einer der Aluminium-Toleranzmechanismen, die die Pflanzen entwickelt haben, ist die Ausscheidung von organischen Säuren. Da die PPDK eine Vorstufe in der Bildung von organischen Säuren als Antwort auf Aluminium bedeuten kann, sind die PPDK-überexprimierten Tabakpflanzen mit Aluminium behandelt worden, damit einige biochemische Abläufe (z. B. Anregung des Zitronensäure-Zyklus, mögliche Ausscheidung von organischen Säuren) überprüft werden können. Des Weiteren sollen Parameter wie Wurzellängenwachstum und Al-Akkumulierung in den Wurzeln untersucht werden, um eine mögliche Al-Toleranz näher charakterisieren zu können.