

## 5. Diskussion

### 5.1. PPDK-Überexpression in Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*)

Die PPDK-Funktion im C<sub>3</sub>-Stoffwechsel ist noch unklar. Bis heute gibt es mehrere Berichte über transgene C<sub>3</sub>-Pflanzen, die die Pyruvat, Phosphat Dikinase überexprimieren. Unter anderem konnte in transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Ishimaru *et al.*, 1997), Kartoffeln (Ishimaru *et al.*, 1998) und Reis (Nomura *et al.*, 2000; Fukayama *et al.*, 2001) die PPDK aus Mais im Chloroplasten überexprimiert werden. Ebenso ist beschrieben, dass *Arabidopsis thaliana* die PPDK aus *Flaveria trinervia* überexprimiert (Voll *et al.*, 2003) und transgenene Tabakpflanzen die PPDK aus *M. crystallinum* (Sheriff *et al.*, 1998). In allen diesen Berichten wurden keine Veränderungen in den photosynthetischen Eigenschaften der Transformanden beobachtet, nicht einmal in den transgenen Reispflanzen mit einer 40-fach höheren PPDK-Aktivität als Wildtypreispflanzen (Fukayama *et al.*, 2001). Einige Änderungen im Niveau und in der Komposition von organischen Säuren waren in den transgenen Tabakpflanzen beschrieben worden (Sheriff *et al.*, 1998). Die PPDK-Überexpression in Chloroplasten steigerte die Samenanzahl und das Samengewicht pro Kapsel um 40 bzw. 20 % in den transgenen Tabakpflanzen, die eine 1,5-fach Erhöhung in der PPDK-Aktivität in Blättern in Vergleich zum WT zeigten (Sheriff *et al.*, 1998). Eine kleine Steigerung im Wert von  $\delta^{13}\text{C}$  wurde in den transgenen Kartoffelpflanzen beobachtet, aber dieser Unterschied war von geringerer Bedeutung (Ishimaru *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurde mit zwei Linien von Sheriff *et al.*, 1998 und sechs weiteren Linien, die Stenzel (1997) hergestellt hat, gearbeitet. Es wurden zwei unterschiedliche Promotoren für die Überexpression der PPDK aus *M. crystallinum* benutzt: der 35S- und der B33-Promotor. Der 35S-Promotor ist ein konstitutiver d.h. nicht gewebespezifischer Promotor, der in Blättern und Wurzeln aktiv ist (Benfy und Chua, 1990), während der B33-Promotor wurzelspezifisch ist (Liu *et al.*, 1991).

Durch Western Blot- und Northern Blot-Analysen sollte die Expression der PPDK bei den ausgewählten Linien nachgewiesen werden. Beide Analysen wurden an Wurzelgewebe durchgeführt, um die Wirkung beider Promotoren gleichzeitig zu überprüfen. Aufgrund der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die Tabakpflanzen mit dem *ppdk*-Gen transformiert wurden (s. Abb. 4-1A und 4-1B). Die Promotoren in einer Enzymüberexpression beeinflussen nicht nur die Zeit und den Ort, sondern auch die Stärke der Expression. Obwohl in der PPDK-Überexpression zwei unterschiedliche Promotoren benutzt wurden, sind ähnliche Signale mit beiden Promotoren gefunden worden. Auf Protein-Ebene zeigten die transgenen Tabakwurzeln große Ähnlichkeit mit den salzgestressten Blättern aus *M. crystallinum*, sowohl in der Intensität des Western-Blot-Signals als auch in der Größe des PPDK-Proteins. Das in der Western Blot Analyse ermittelte Molekulargewicht der PPDK von ~ 94 kDa stimmt mit den beschriebenen Molekulargewichten von Fißlthaler *et al.* (1995) und Sheriff *et al.* (1998) überein. Die mRNA-Signale der transgenen Tabakwurzeln waren schwächer als die der salzgestressten *M. crystallinum*-Wurzeln, besonders in den cytosolischen Linien. Es gab eine positive Korrelation zwischen der Überexpression des PPDK-Gens aus *Mesembryanthemum crystallinum* auf Transkriptions- und Translations-Niveau ( $r^2=0.69$ ) (s. Abb. 4-1C).

## 5.2. Stickstoffstoffwechsel und die Pyruvat, Phosphat Dikinase

Die Rolle der PPDK in CAM- und C<sub>4</sub>-Pflanzen ist weitgehend aufgeklärt. In CAM-Pflanzen initiiert das Enzym die Glukoneogenese, in C<sub>4</sub>-Pflanzen regeneriert es den primären CO<sub>2</sub>-Akzeptor PEP (Kondo *et al.*, 2000; Häusler *et al.*, 2002). Die PPDK als ein Enzym der C<sub>4</sub>-Photosynthese spielt auch eine Rolle bei der Stickstoffassimilation in den Pflanzen (Matsuoka *et al.*, 1998).

Die Assimilierung des anorganischen Stickstoffs in höheren Pflanzen ist einer der entscheidenden Faktoren für Wachstum und Ertrag. Dennoch gibt es viele weitere komplexe Stoffwechselfvorgänge, an denen die assimilierten Stickstoffverbindungen

beteiligt sind. Diese sind unter anderem die Speicherung und Remobilisierung von Nitrat in verschiedenen Bestandteilen der Pflanze, die *de novo* Ammoniumassimilierung, das Recycling des Ammoniums während der Photorespiration, die Distribution des Stickstoffs zwischen den Stoffwechselwegen der Aminosäurebiosynthese und die vielfältigen Verzweigungen von Aminosäuren, welche exportiert, in den Vakuolen gespeichert, oder zu sekundären Stoffwechselwegen abgelenkt werden können. Es gibt auch komplizierte Interaktionen mit dem Stoffwechsel des Kohlenstoffs, beispielsweise die Reaktionen in der Photosynthese oder die Umwandlung von Kohlenhydraten zur Produktion der Reduktionsäquivalente für die Reduktion des Nitrats zu Ammonium (Stitt *et al.*, 2002). Mit anderen Worten sind Kohlenstoff- und Stickstoff-Stoffwechsel eng miteinander verzahnt und voneinander abhängig (z. B. Matt *et al.*, 2001).

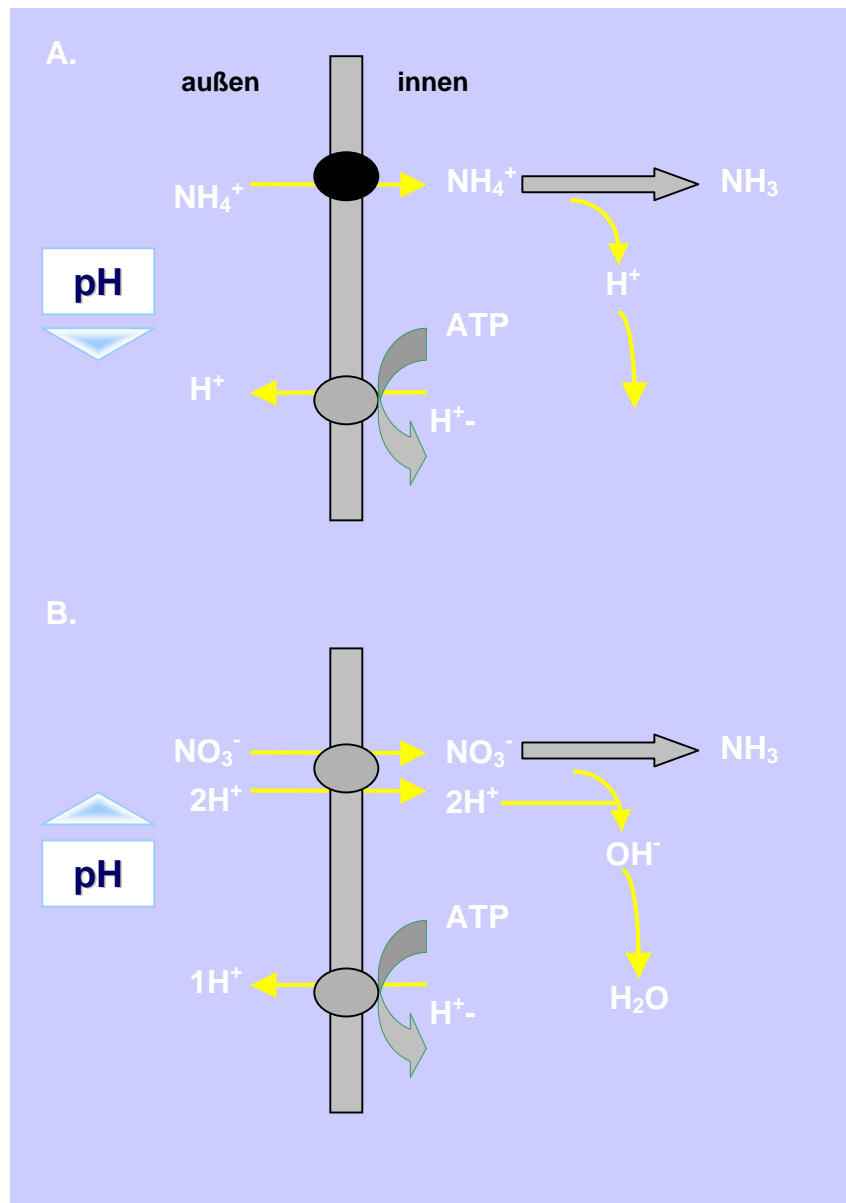
In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Aspekte, die für den Stickstoffstoffwechsel relevant sind, diskutiert.

Die höheren Pflanzen sind fähig den Stickstoff in Form von  $\text{NO}_3^-$  oder  $\text{NH}_4^+$  aufzunehmen (Brix *et al.*, 2002; Marschner, 2002). Die Nitrat- oder Ammonium-Ernährung hat einen deutlichen Einfluss auf den pH-Wert des Außenmediums. Eine primäre physiologische Reaktion der Pflanze bei Ammoniumzugabe als einzige N-Quelle ist eine starke Ansäuerung des umliegenden Wurzelmediums. Durch die Depolarisierung der Membran tritt Ammonium eher als Ammoniak in die Wurzelzellen ein. Eine erhöhte Konzentration an  $\text{H}^+$  in der Rhizosphäre resultiert relativ unwahrscheinlich aus einer  $\text{NH}_4^+$ -Deprotonation vor dem Transport in die Wurzel. Der erhöhte  $\text{H}^+$ -Spiegel in der Rhizosphäre kann durch die Aktivität einer  $\text{H}^+$ -ATPase verursacht werden; als Folge der Membrandepolarisierung.

Dagegen ist die Nitrataufnahme ein Prozess, der  $\text{H}^+$  im Außenmedium verbraucht. Zwei  $\text{H}^+$  treten in die Zelle durch einen Symport von  $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  ein und führen zur Neutralisierung des  $\text{OH}^-$ -Ions (während der Nitritreduktion erzeugt). Ein Proton wird über die  $\text{H}^+$ -ATPase in die Rhizosphäre ausgeschieden. Somit werden weniger  $\text{H}^+$ -Ionen ausgeschieden, als aufgenommen werden und es ergibt sich eine pH-Wert-Veränderung in der Rhizosphäre zu Gunsten einer Alkalisierung (Abb. 5-1).

Aus verschiedene Berichten ist bekannt, dass die Mehrheit der Pflanzen Ammonium als einzige Stickstoffquelle nicht duldet (Givan, 1979; Van der Eerden, 1982;

Gerendas *et al.*, 1997). Normalerweise sind die Pflanzen mit Nitratquellen gedüngt, häufig mit einer Mischung von Nitrat und Ammonium (Errebhi und Wilcox, 1990; Jeong *et al.*, 1992).



**Abb. 5-1:** Physiologische Antwort der Wurzel auf das Angebot von Ammonium oder Nitrat als Hauptstickstoffquelle (von Wirén *et al.*, 2001).

A. Ammoniumaufnahme. B. Nitrataufnahme.

ATP: Adenosintri-phosphat;  $\text{H}^+$ : Wasserstoff-Ion;  $\text{H}^+$ -ATPase: Protonenpumpe;  $\text{H}_2\text{O}$ : Wasser;  $\text{NH}_3$ : Ammoniak;  $\text{NH}_4^+$ : Ammonium-Ion;  $\text{NO}_3^-$ : Nitrat-Ion;  $\text{OH}^-$ : Hydroxid-Ion; pH: negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration.

Ammonium ist die einzige anorganische Stickstoffverbindung, die als direkter Vorläufer für die Biosynthese von organischen Stickstoffprodukten beschrieben ist (Migge *et al.*, 2000). Trotzdem hat Ammonium als einzige Stickstoffquelle negative Auswirkungen auf das Wachstum und die Morphogenese verschiedener Pflanzen gezeigt (Ramage und Williams, 2002). Bei WT-Tabakpflanzen berichteten Walch-Liu *et al.* (2000), dass die Zunahme der Spross- und Wurzelbiomasse nach einer relativ kurzen Ammoniumbehandlung (24 Stunden) reduziert wurde. Mittels mikroskopischer Analyse der Epidermis des Blattes wurde eine Abnahme der Zellzahl beziehungsweise Zellgröße um ca. 50 % bzw. 30 % ermittelt. Eine Reduktion des Wachstums beim Wildtyp zeigten auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten WT-Pflanzen (s. [Abb. 4-2](#) und [4-3](#)).

Die hier untersuchten transgenen Tabakpflanzen zeigen bei einer Ammoniumzufuhr dagegen einen positiven Effekt. Besonders die Linien, die die PPDK mit einem wurzelspezifischen Promotor überexprimieren, bevorzugen häufig diese N-Quelle ( $\text{NH}_4^+$ ) (s. [Abb. 4-6](#) und [4-7](#)). Dagegen bevorzugen die  $\Delta 35\text{S}$ - und  $35\text{S}$ -Linien tendenziell neben Ammonium auch Nitrat als Quelle (s. [Abb. 4-4](#) und [4-5](#)). Diese Ergebnisse lassen sich sehr gut in die bereits in der Literatur beschriebenen Untersuchungen einreihen (Moons *et al.*, 1998). Bei Salzstress, Wasserdefizit und Anaerobiose zeigten Reispflanzen ebenso eine Aktivierung der PPDK in den Wurzeln. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die PPDK in den  $\text{C}_3$ -Pflanzen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Stressfaktoren einnimmt.

Die Ammoniumernährung der Pflanze hat zur Folge, dass in der Zelle ein hoher Anteil an Kationen im Verhältnis zu Anionen vorliegt. Die Assimilierung des Ammoniuns führt zur Protonenproduktion in etwa äquimolaren Anteilen. Zeigen höhere Pflanzen im Spross eine begrenzte Kapazität für die Entsorgung von Protonen dann können diese mittels der Ammoniumassimilierung in den Wurzeln aus der Pflanzen transportiert werden (Marschner, 2002). Bei einem Ammoniumangebot wurde beobachtet, dass die Photosyntheseleistung und folglich die Produktion von Sucrose und Stärke reduziert wird, folglich hat die Ammoniumassimilation eine regulatorische Wirkung auf das Angebot von Reduktionsäquivalenten und Kohlenstoffverbindungen im Stoffwechsel der Pflanze (Sood *et al.*, 2002). Dies zeigt das enge Stoffwechselverhältnis zwischen der

Stickstoffassimilierung und dem Kohlenstoffkreislauf. Da die transgenen Pflanzen, die mit Ammonium ernährt wurden, ein höheres Wachstum zeigten, kann man vermuten, dass die PPDK in den Transformanten eine Rolle in der glukoneogenetischen Regeneration der Kohlenstoffverbindungen durch die Produktionssteigerung des Substrates (PEP) der PEPC spielt. Die PEPC-Aktivität führt zu einer Produktion von Oxalacetat, das wiederum den Zitronensäure-Zyklus auffüllt (anaplerotische Funktion) und auf diese Weise den Kohlenstoffkreislauf begünstigt (González *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit ist in Blättern von transgenen Tabakpflanzen ein geringerer Chlorophyll-Gehalt als in denen vom Wildtyp festgestellt worden (s. [Abb. 4-10](#) und [4-11](#)). Diese Tendenz ist unabhängig von der Form der Stickstoffversorgung. Nach Mackown und Sutton (1996) steht der Chlorophyll-Gehalt in Tabakblättern in einer stark signifikanten und einem positiv engem Zusammenhang zum Stickstoff-Gehalt und den Erträgen. Folglich wäre anzunehmen, dass die transgenen Tabakpflanzen einen geringeren Stickstoffanteil als im WT zeigen. Dies wird jedoch durch die Ergebnisse bei der Messung von löslichen Protein und freien Aminosäuren widerlegt. Es gab eine starke Erhöhung des Verhältnisses Chl a/Chl b in den transgenen Pflanzen bei Stickstoffmangel und Ammoniumangebot, beim Wildtyp lag dagegen das Verhältnis bei einer Nitrat/Ammonium-Ernährung stets niedriger (s. [Abb. 4-12](#)). Das Verhältnis Chla/Chlb ist ein Indikator für die relative Abundanz des Photosystems II und Photosystems I (Terashima und Hikosaka, 1995; Voll *et al.*, 2003). Je höher das Verhältnis von Chl a/Chl b ist, desto größer ist das Verhältnis PSI/PSII (Jensen *et al.*, 2000). Man kann festhalten, dass der Wildtyp unter Ammonium-Stressbedingung eine bedeutende Absenkung im Photosystem I zeigt. Bei Ammoniumszugabe zeigen auch hier die transgenen Pflanzen ein günstigeres Chl a/Chl b-Verhältnis als beim Wildtyp (s. [Abb. 4-12](#)).

Zur Abschätzung des Effekts der Überexpression von PPDK bei der Stickstoff-Assimilierung wurde die Menge an freien Aminosäuren und an löslichen Proteinen analysiert.

Es ist bekannt, dass in Pflanzen die Konzentration von Aminosäuren zweifellos durch Umweltfaktoren bezüglich ihrer Biosynthese reguliert wird (Yanagisawa *et al.*, 2004). Deswegen können ermittelte Konzentrationen sehr starken Fluktuationen

unterliegen. Außerdem sind die Aminosäuren als eine kurzfristige Stickstoffreserve anzusehen (Delrot *et al.*, 2001). Es gab eine Erhöhung der Menge an freien Aminosäuren in den Blättern der transgenen Pflanzen, jedoch signifikant nur in den plastidären Linien bei Ammoniumernährung (s. [Abb. 4-13](#)). Diese erhöhte Konzentration der freien Aminosäuren spricht für eine Anregung der Assimilation von Stickstoff in den Wurzeln und ist Folge eines effektiven Aminosäuretransports zum Spross. Evident sind auch große Unterschiede in der Menge an freien Aminosäuren in Wurzeln zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen mit Ammoniumbehandlung (s. [Abb. 4-13C](#)). In den Wurzeln des Wildtyps ist fast die doppelte Menge an Aminosäuren wie in den transgenen Pflanzen zu finden (s. [Abb. 4-14](#)). Die Remobilisierung von Aminosäuren und deren Transport aus den Wurzeln zum Spross (d. h. Aufnahme von Stickstoff) könnte durch die Stickstoffnachfrage der Pflanze reguliert werden (Glass *et al.*, 2002). Unter Ammonium-Stress ist der Gehalt an freien Aminosäuren in den transgenen Tabakpflanzen in den Wurzeln erheblich niedriger, im Spross dagegen stark erhöht (s. [Abb. 4-14C](#)). Andreo *et al.* (1987) haben beschrieben, dass die PPKK möglicherweise an der Synthese von Aminosäuren beteiligt ist.

Die Proteinkonzentration in den Blättern der transgenen Linien war bei einer Kombination von Nitrat und Ammonium und bei Nitrat größer als im Wildtyp (s. [Abb. 4-15A](#), [4-15B](#)). Interessanterweise hatten bei einem Ammoniumangebot nicht alle transgenen Linien mehr lösliches Protein in den Blättern als der Wildtyp, obwohl der Pool von Aminosäuren in den Wurzeln bei dieser Behandlung größer war (s. [Abb. 4-15C](#)). Dieses Phänomen ist, entweder als eine Inhibition der Proteinsynthese oder eine Beschleunigung in der Proteindegradation in den transgenen Pflanzen unter Stressbedingungen zu verstehen (Yanagisawa *et al.*, 2004). Auf Grund der Ergebnisse bei niedriger N-Menge wird die erste Annahme verworfen, da die Menge an löslichen Protein in Blättern transgener Pflanzen mindestens doppelt so hoch war, wie die Menge im Wildtyp (s. [Abb. 4-15D](#)). Diese Ergebnisse zeigen, dass  $\text{NH}_4^+$  die bevorzugte Stickstoffquelle für die Proteinsynthese war. Möglicherweise zeigen transgene PPKK-Pflanzen eine Beschleunigung der Proteinsynthese, während der WT relativ mehr Zeit braucht, um die erhaltenen Aminosäuren zu verstoffwechseln.

Der unterschiedliche Einfluss auf die Aminosäuren- und Protein-Menge bei Ammonium- beziehungsweise Nitrat-Düngung zeigt, dass die Assimilierung und der Transport von Ammonium und Nitrat unterschiedlich sind. Während Ammonium-Ionen in den Wurzeln assimiliert und als Aminosäuren zu den Blättern transportiert werden (Tobin und Yamaya, 2001), werden Nitrat-Ionen größtenteils direkt zu den Blättern transportiert (Faure *et al.*, 2001; Black *et al.*, 2002).

Während des Photosyntheseprozesses in Pflanzen gibt es zwei Enzyme für die Fixierung von CO<sub>2</sub>; die RUBISCO und PEPC. Die Biosynthese beider Enzyme in Blättern ist von der Stickstoffquelle und ihre Verfügbarkeit moduliert (Hikosaka und Hirose, 2000; Chinthapalli *et al.*, 2002). Dennoch sind die Ergebnisse widersprüchlich. Beispielsweise ist nach Chinthapalli *et al.* (2002) bei Ammoniumangebot die Biosynthese von PEPC und ihre *in vitro* Aktivität stark induziert, ebenso in *Digitaria sanguinalis* (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996), während die maximale Aktivierung im Weizen bei Nitratgabe gefunden wurde (Duff und Chollet, 1995). Es gab eine Erhöhung des PEPC-Signals bei Nitratzugabe in den transgenen Tabakpflanzen und im Wildtyp. Die Erhöhung des PEPC-Signals war beim Wildtyp besonders stark. Unter Nährstoffstress (N-Defizit) wurden die PEPC-Signale von transgenen Tabakpflanzen eindeutig verstärkt (s. [Abb. 4-17](#) und [4-18](#)).

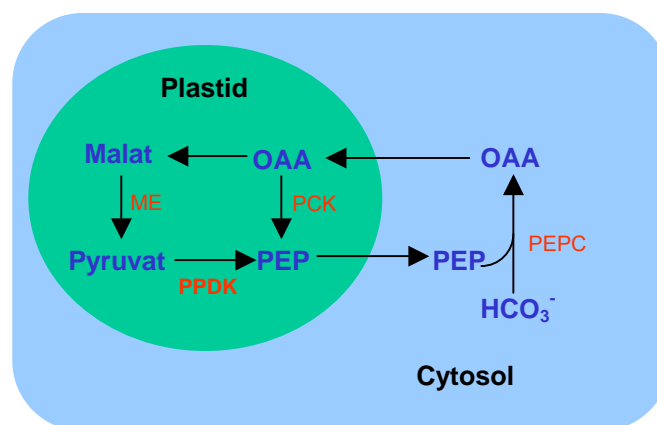
Bei WT-Tabakpflanzen haben Matt *et al.* (2002) berichtet, dass die RUBISCO-Aktivität bei Ammonium- und Nitratdüngung gleich hoch war. Die Ergebnisse der RUBISCO-Signale, stimmen nicht voll mit der Beobachtung von Matt *et al.*, (2002) überein. Es gab bei einigen transgenen Linien sehr unterschiedliche RUBISCO-Signale in Abhängigkeit von Nitrat oder Ammonium als N-Quelle. Interessanterweise wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und transgenen Tabakpflanzen beobachtet. Bei niedriger Stickstoffkonzentration wurden die RUBISCO-Signale stark reduziert (s. [Abb. 4-19](#) und [4-20](#)). Ähnliche Resultate bei Stickstoffmangel wurden von Fichtner *et al.* (1993) und Matt *et al.* (2002) berichtet.

Bei einem N-Defizit (Kontrolle) gab es eine Verminderung der Intensität von RUBISCO-Signalen, sowohl im WT, als auch in den transgenen Tabakpflanzen, während eine Erhöhung der PEPC-Signale nur in den transgenen Linien beobachtet wurde. Stitt *et al.* (2002) beobachteten, dass eine Reduktion in der RUBISCO-



Expression in Tabak die Konzentration von Pyruvat und PEP erhöht. Diese Bestätigung erlaubt, an eine Verstärkung von Expression und Aktivität der PPDK zu denken (s. [Abb. 4-20](#)).

Der genannte Anstieg in der Intensität von PEPC-Signalen spiegelt sich im Verhältnis RUBISCO/PEPC wider (s. [Abb. 4-21](#)). Bei den transgenen Tabakpflanzen war das Verhältnis am niedrigsten. Mit anderen Worten, es kann eine Stimulierung des photosynthetischen C<sub>4</sub>-Wegs bedeuten, welcher speziell in überexprimierenden PPDK-Tabakpflanzen beobachtet wurde. Ähnliche Ergebnisse sind von transgenen Pflanzen, die Abänderungen im PEPC/RUBISCO-Verhältnis haben, berichtet worden (Matsuoka *et al.*, 2001). In verschiedenen C<sub>3</sub>-Pflanzen wurde die Anregung von C<sub>4</sub>-Wegen durch Überexpression von C<sub>4</sub>-Enzymen unter Stressbedingungen berichtet, obwohl es den C<sub>3</sub>-Pflanzen an einer Kranzanatomie mangelt ([Abb. 5-2](#)). In der genannten Berichten wurden die C<sub>4</sub>-Enzyme in den Chloroplasten überexprimiert (Rademacher *et al.*, 2002).



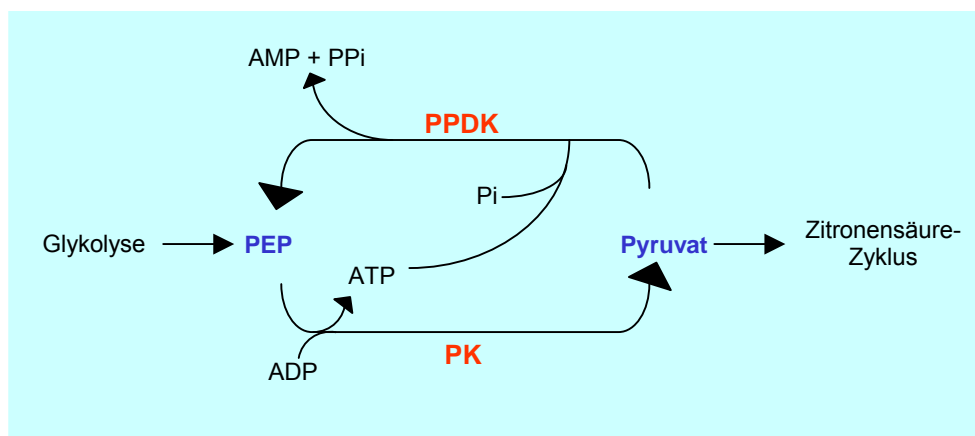
**Abb. 5-2:** C<sub>4</sub>-Weg in C<sub>3</sub>-Pflanzen (ohne Kranzanatomie) durch Überexpression von C<sub>4</sub>-Enzymen (Rademacher *et al.*, 2002).

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Bicarbonat-Ion; ME: Malat-Enzym; OAA: Oxalacetat; PCK: Pyruvat-Carboxykinase; PEP: Phosphoenolpyruvat; PEPC: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; PPDK: Pyruvat, Phosphat Dikinase.

Die Anzahl der Kapseln pro Pflanze definiert nicht in direkter Weise die Erträge der transgenen Tabakpflanzen, da viele von ihnen entweder leer oder mit weniger Samen waren (s. [Abb. 4-23](#)). Die PPDK erhöhte die Samenproduktion in den

transgenen Linien bei Stickstoffgabe, unabhängig von der Stickstoffquelle. Dieses gilt sowohl für plastidäre, als auch für cytosolische Linien (s. [Abb. 4-25](#)).

Sheriff *et al.*, (1998) berichteten, dass mit der Überexpression der PPDK in Plastiden aus *M. crystallinum* in Tabak mit dem Promotor 35S die Anzahl der Samen pro Kapsel und somit der Ertrag gesteigert wurden. Im Gegensatz dazu ist in dieser Arbeit der Ertragszuwachs offensichtlich in der Linie mit der 35S-Promotor-PPDK-Überexpression im Cytosol im Vergleich zum WT gemindert. Sheriff *et al.* (1998) berichteten keine Düngungsbehandlung. Die Ergebnisse für die PPDK-Überexpression im Cytosol wurden von Sheriff *et al.* (1998) als ein Resultat eines Leerlaufprozesses interpretiert. Das produzierte PEP wird durch die cytosolische PPDK in einer anschließenden Reaktion von einer Pyruvat Kinase (PK) wieder zu Pyruvat umgewandelt ([Abb. 5-3](#)). Die PK generiert bei ihrer Reaktion ein ATP, die Rückreaktion der PPDK verbraucht jedoch zwei energiereiche Phosphatgruppen. Die Konsequenz eines solchen leeren Zyklus wäre ein bedeutender Energieverlust (Stenzel, 1997).



**Abb. 5-3:** Stoffwechselschema für eine cytosolisch überexprimierte PPDK (Stenzel, 1997).

ADP: Adenosindiphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; ATP: Adenosintriphosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; Pi: Phosphat; PK: Pyruvat Kinase; PPDK: Pyruvat, Phosphat Dikinase; PPi: Pyrophosphat.

In den hier erhaltenen Ergebnissen wurde eine Erhöhung im Samenertrag in den cytosolischen PPDK-Linien mit B33-Promotor im Vergleich zum Wildtyp beobachtet,

und der Samenertrag war sogar bei Nitrat/Ammonium-Behandlung höher als in den plastidären Linien (s. [Abb. 4-25A](#)). Aus diesen Grund kann man vermuten, dass die Hypothese von Sheriff zumindestens in der wurzelspezifischen PPK-Überexpression nicht gilt.

Obwohl über die cytosolische PPK als Anreger der Synthese von Speicherproteinen in Samen aus Mais und Weizen berichtet wurde (Aoyagi und Bassham, 1984; Aoyagi und Chua, 1988), ist ihre direkte Rolle bei der Erhöhung der Samenproduktion bis heute noch nicht in eindeutiger Weise geklärt. Es besteht die Hypothese, dass die cytosolische PPK nicht an der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Fixierung, welche zur Zuckerbildung führt, teilnimmt (Aoyagi *et al.*, 1984).

Interessanterweise wurden unter Ammoniumbehandlung höhere Erträge in den plastidären Linien beobachtet (s. [Abb. 4-25C](#)). Aufgrund dieser Ergebnisse kann man feststellen, dass unter Stressbedingungen, wie eine Senkung des pH-Werts, sowohl in der Zelle als auch in der Rhizosphäre als Folge der Ammoniumernährung, die plastidären Linien (besondere die Linien mit dem wurzelspezifischen Promotor), eine bessere Adaptierung oder eine bessere Regulierung zeigten.

Sheriff *et al.* (1998) haben gezeigt, dass die plastidäre PPK unter der Kontrolle des in allen Organen aktiven 35S-Promotors wachstums- und ertragssteigernd wirkt. Mit den hier aufgeführten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine PPK-Expression mittels eines wurzelspezifischen Promotors in der Wurzel hinreichend ist, um diesen Effekt zu verursachen.

Es ist bekannt, dass die Stickstoffnutzung bei den C<sub>4</sub>-Pflanzen effektiver als in C<sub>3</sub>-Pflanzen ist (Ku *et al.*, 1996). Der erhöhte Energieaufwand für den zusätzlichen C<sub>4</sub>-Zyklus wirkt sich nicht gravierend aus, da im Gegenzug weniger Energie im oxidativen C<sub>2</sub>-Cyclus verbraucht wird (Kluge, 1999). Daneben kann die PPK-Aktivität durch die Zufuhr von PEP (Substrat der PEPC) des Stickstoff- und Kohlenstoffstoffwechsels reguliert werden. Wie schon in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, spielt eine Erhöhung der PEPC-Aktivität bei der Umleitung der Assimilate zur Aminosäuresynthese eine wichtige Rolle (Duff und Chollet, 1995; Li *et al.*, 1996).

### 5.3. Pyruvat, Phosphat Dikinase führt zu erhöhter Aluminium-Toleranz

Eine essentielle Funktion im Stoffwechsel der höheren Pflanzen hat das Aluminium nicht. Verschiedene Pteridophyten benötigen dagegen Al. Die pflanzenbauliche Problematik des Aluminiums liegt in seiner Toxizität (Mengel, 1991). Die Mechanismen der Al-Toleranz in Pflanzen sind in zwei Kategorien gruppiert worden: externe und interne Entgiftung (Kochian, 1995). Der Hauptunterschied zwischen den beiden Mechanismen liegt in der Lokalisierung der Al-Entgiftung; entweder im Symplasten (intern) oder im Apoplasten (extern). Die diskutierten externen Mechanismen beinhalten eine Al-Immobilisierung an der Zellwand, eine selektive Permeabilität an der Plasmamembran, eine pflanzliche-induzierte pH-Barriere in der Rhizosphäre, Ausscheidung von Chelat-Bildern, Ausscheidung von Phosphaten und Al-Ausscheidung (Kochian, 1995). Dagegen schließt die interne Entgiftung Chelatbildung im Cytosol durch organische Säuren, Proteine oder andere organische Liganden, Separierung in der Vakuole, Evolution Al-toleranter Enzyme und erhöhte Enzymaktivität ein (Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2004).

Eine beachtliche Akkumulation von löslichen Proteinen wurde bei Al-Behandlung (von 0  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$  Al) in den Wurzeln transgener Tabakkeimlinge beobachtet (s. [Abb. 4-28](#)). Eine entgegengesetzte Tendenz hat der Wildtyp gezeigt. Ich stelle die Hypothese auf, dass die Erhöhung der Proteinmenge ein Schutzmechanismus der Pflanzen sein könnte. Diese Behauptung kann man mit Ergebnissen, die unter verschiedenen Stressbedingungen erhalten wurden, unterstützen. Für Kieferkeimlinge (*Pinus banksiana* Lamb.) ist berichtet worden, dass die Akkumulation von Membranproteinen in Wurzeln in direkter Weise mit dem Überleben der Keimlinge nach zwei progressiven Dürrezyklen korreliert. Die Akkumulation der löslichen Proteine wurde dabei auch erhöht. Es kann vermutet werden, dass diese Proteine eine Rolle in der Steigerung der Dürretoleranz spielen könnten (Mayne *et al.*, 1994). Eine Akkumulation von Proteinen ist auch in Wurzeln von Genotypen der Gerste, die salztolerant sind, beobachtet worden (Hurkman *et al.*, 1989). Ähnliche Ergebnisse unter Salzstress gibt es für Tomatenwurzeln (Chen und Tabaeizadeh, 1991; Chen und Plant, 1999); und salztolerantem amphiploiden Weizen (Gulick und Dvorak, 1987).

Die Inhibition des Wurzelwachstums ist das erste und wichtige Symptom von Al-Toxizität. Dieses Symptom ist in Abhängigkeit von der Spezies innerhalb einiger Stunden oder sogar Minuten beobachtet worden (Sivaguru und Horst, 1998; Ahn *et al.*, 2001, Ma *et al.*, 2002). Die Inhibition des Wurzelwachstums im Fall von Wildtyp-Keimlingen ist nach zwei Tagen Al-Behandlung beobachtet worden (s. [Abb. 4-29](#) und [4-30](#)). Im Gegensatz zum Wildtyp, zeigten die transgenen Keimlinge diese Inhibition erst nach vier bis fünf Tagen (s. [Abb. 4-31](#) und [4-32](#)).

Die transgenen Keimlinge haben eine eindeutige niedrigere Inhibition des Wurzelwachstums als der Wildtyp gezeigt. Die plastidären Linien zeigten die geringste Inhibition des Wurzelwachstums. Der Wildtyp zeigte eine Reduktion des Wurzelwachstums von fast 50 % (s. [Abb. 4-33](#)). Obwohl Zellteilung und Zellelongation das Wurzelwachstum beeinflussen, ist Ersteres relevanter. So könnte die anfängliche Al-induzierte Inhibition des Wurzelwachstums in Folge die Inhibition der Zellelongation verursachen (Ma, 2000). Bis heute ist kaum etwas darüber bekannt, wie Al bei der Inhibition der Zellelongation wirkt.

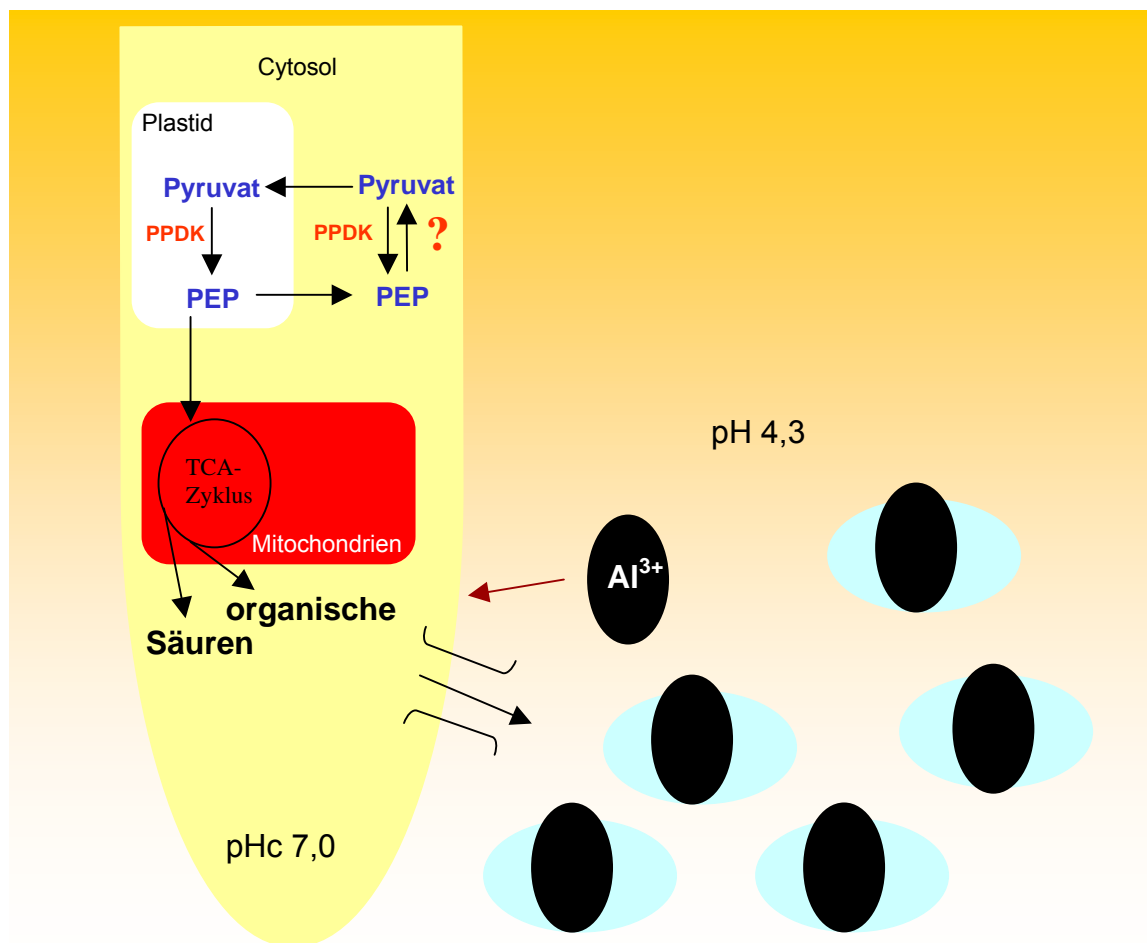
Es gibt zahlreiche Anzeichen, dass die organischen Säuren eine wichtige Rolle sowohl in der internen als auch in der externen Al-Entgiftung der Pflanze spielen (Delhaize *et al.*, 1993; Pellet *et al.*, 1995; Ma, 2000). Die Ausscheidung von organischen Säuren aus den Wurzeln führt zur Komplexbildung des Aluminiums außerhalb der Wurzel, so dass es die Membranen nicht passieren kann. Auf diese Weise kann die Al-Aufnahme vermieden werden (Kochian *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde die Ausscheidung von Zitronensäure und Äpfelsäure bestimmt. Die Ergebnisse der transgenen Tabakpflanzen heben sich von denen des Wildtyps eindeutig ab. In allen Fällen scheiden die transgenen Tabakpflanzen als Folge der Al-Behandlung eine höhere Menge von organischen Säuren aus als der Wildtyp (s. [Abb. 4-34](#) und [4-35](#)). Unter unseren Versuchsbedingungen war die Exkretion von Äpfelsäure höher als von Zitronensäure. Die Art der aus Wurzeln ausgeschiedenen organischen Säuren bei Aluminiumbehandlung ist zwischen den Spezies unterschiedlich. Aus Weizen (*Triticum aestivum*) wurde hauptsächlich Äpfelsäure als organische Säure, aus Hülsenfrüchten Zitronensäure und aus Buchweizen Oxalacetat ausgeschieden (Osawa und Matsumoto, 2001). Von transgenen Tabakpflanzen und Papaya wurde berichtet, dass die Ausscheidung von

Zitronensäure den Zitronensäure-Zyklus begünstigt (De la Fuente *et al.*, 1997). Es wurde auch berichtet, dass Zitronensäure (als Anion des Zitronensäure-Zyklus, d. h. Zitat<sup>3-</sup>) stärker als die Dicarboxylic- Äpfelsäure<sup>2-</sup> (Anion) das Aluminium chelatiert. In dieser Hinsicht wäre die Zitronensäure effektiver in der Al-Entgiftung als Äpfelsäure (Kochian *et al.*, 2004). Da die transgenen Tabakpflanzen in Anwesenheit von Aluminium ein höheres Niveau von Zitronensäure ausscheiden, kann angenommen werden, dass die PPK ein effizientes Enzym für die Anregung der Synthese der Zitronensäure ist, folglich zur Erhöhung der Al-Toleranz in der Pflanze führt (s. [Abb. 4-34](#)) Eine frühere Studie, die die Überexpression eines *Pseudomonas aureginosa* Citrat-Synthase Genes in Tabak zum Ziel hatte, konnte weder die Zunahme der Zitronensäure-Akkumulation, noch der Zitronensäure-Ausscheidung demonstriert werden (Delhaize *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse der Ausscheidung von organischen Säuren zeigen in gleicher Weise wie die Ergebnisse des Wurzelwachstums, dass die plastidären PPK-Linien mit wurzelspezifischen Promotor, eine größere Al-Toleranz haben.

Der Wirkungs-Ort der Al-Toxizität ist der Wurzelapex, wo Aluminium an verschiedene zelluläre Bestandteile binden kann. Diese umfassen Zellwand, Plasmamembran, Cytoskelett und Kern (Kochian *et al.*, 2004). Der Nachweis von Al-Bindung in den Wurzeln mittels Färbung mit Eriochrome Cyanine-R ist für verschiedenen Anbaupflanzen erfolgreich berichtet worden (Aniol, 1995; Ma *et al.*, 1998; Devi *et al.*, 2001). Bei der Färbung von Tabakwurzeln sind definierte Antworten auf die Al-Behandlung gefunden worden. Im Gegensatz zu den transgenen Pflanzen haben die Wurzeln aus dem Wildtyp Al angehäuft (s. [Abb. 4-36](#) und [4-37](#)). Der Wildtyp könnte möglicherweise eine interne Al-Entgiftung durchführen. Aber die positive Korrelation zwischen der Reduktion des Wurzelwachstums und der Intensität der Färbung im Wildtyp erlaubt diese Hypothese auszuschließen. Die gefundenen Ergebnisse der Färbung in den Wurzeln transgener Tabakpflanzen, zusammen mit den Ergebnissen von der Ausscheidung organischer Säuren, beweisen eindeutig die externe Al-Entgiftung, an der ein Zusammenspiel der PPK und PEPC beteiligt ist ([Abb. 5-4](#)).



**Abb. 5-4:** Mögliche Beteiligung des Enzyms PPDK in der externen Al-Entgiftung in transgenen Tabakpflanzen mit PPDK-Überexpression in Wurzeln.

PPDK regt bei Al-Präsenz die Ausscheidung von organischen Säuren an. Die ausgeschiedenen organischen Säuren komplexieren das Aluminium, um seine Aufnahme zu verhindern.

PEP: Phosphoenolpyruvat; pH: pH-Wert im externen Medium; pHc: pH-Wert im Cytosol; PPDK: Pyruvat, Phosphat Dikinase; TCA-Zyklus: Zitronensäure-Zyklus.

#### 5.4. Richtung der PPDK-Reaktion in Cytosol und Plastiden

Auch wenn durch die PPDK-Lokalisierung in der Zelle ihre verschiedenen Rollen in der C<sub>4</sub>-Photosynthese und bei CAM-Pflanzen abweichend definiert werden, gilt es jedoch hauptsächlich, dass die PPDK in den Chloroplasten lokalisiert ist (Osmond und Holtum, 1981; Edwards *et al.*, 1985). Dennoch ist die cytosolische PPDK in

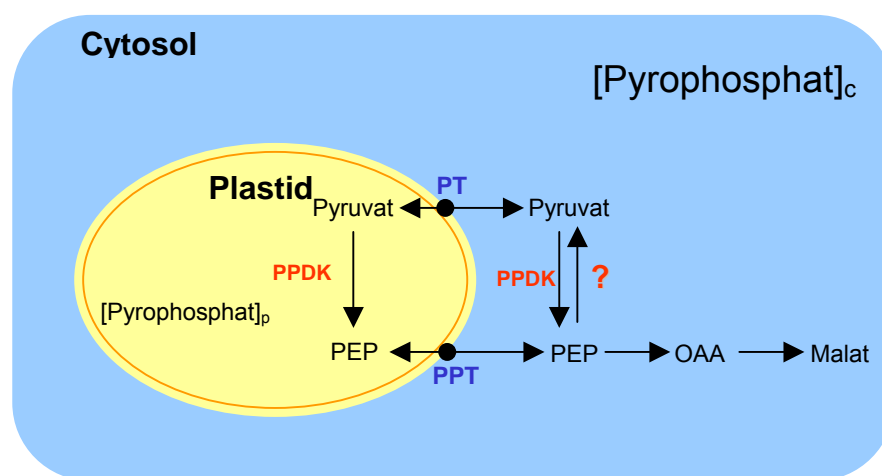
Samen von Mais und Weizen gefunden worden. Die reversible PPDK-Reaktion wird in den Plastiden durch die hohe Pyrophosphatase-Aktivität (Weiner *et al.*, 1987) in Richtung Phosphoenolpyruvat verschoben. Das PEP dient als Substrat zur Bildung von Oxalacetat durch die PEPC. OAA kann in einer anaplerotischen Reaktion den Zitrat-Zyklus auffüllen oder direkt zu Malat reduziert werden (González *et al.*, 2003). Die Erhöhung der Versorgung von PEP in den plastidären Linien begünstigt die anaplerotische Funktion der PEPC, und die Depletion des Zitronensäure-Zyklus wird vermieden (Latzko und Kelly, 1983).

In Weizensamen ist die PPDK im weißen Gewebe des Endosperms und in der grünen Fruchtwand (Perikarp) lokalisiert. Ihr unterschiedliches entwicklungsfähiges Profil weist darauf hin, dass ihre Hauptrolle im Samen nicht in der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Fixierung, sondern in der Anregung der Synthese von Speicherproteinen liegt (Aoyagi *et al.*, 1984; Aoyagi and Chua, 1988). Es wurde berichtet, dass die cytosolische PPDK bei Sauerstoffstress, Wassermangel und durch Abscisinsäure in Reiswurzeln induziert wird (Moons *et al.*, 1998). Möglicherweise ist die Richtung der von der PPDK-katalysierten Reaktion im Cytosol nicht so eindeutig bestimmt, wie in den Plastiden. Das Gleichgewicht der PPDK-Reaktion hat eine kleine freie Aktivierungsenthalpie ( $\Delta G$ ) von  $K_{eq} \approx 1 \times 10^2$  (bestimmt in *Clostridium symbiosum* von Mehl *et al.*, 1994). Dies bedeutet, dass die PPDK-Reaktion leicht reversibel ist. In den Plastiden bildet die PPDK PEP aus Pyruvat. Diese glukoneogenetische Richtung ist wegen der hohen Pyrophosphatase-Aktivität in den Plastiden gesichert und infolgedessen wird die Rück-Reaktion verhindert. Da es im Cytosol an Pyrophosphatase-Aktivität mangelt, ist die Pyrophosphat-Konzentration dort höher, folglich die Rückreaktion leichter (Weiner *et al.*, 1987). In *Arabidopsis thaliana* wurde beobachtet, dass das Pyruvat in den Plastiden aus dem Cytosol kommen kann und zwar durch die Aktivierung eines Pyruvat-Transporters (PT) (Voll *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2004). Dies bedeutet, dass es einen Austausch nicht nur von Phosphoenolpyruvat, sondern auch von Pyruvat zwischen Plastiden und Cytosol gibt (Abb. 5-5).

Der Transport von Phosphoenolpyruvat erfolgt durch den Phosphoenolpyruvat-Translokator (PPT). Die Richtung des Transports ist dabei bidirektional (Häusler *et al.*, 2002). Ein weiterer wichtiger Punkt, der die Richtung der Reaktion definiert, ist



die Pyrophosphatase, z. B. in *Trypanosoma cruzi*, wo keine Pyrophosphatase in den Glykosomen ist. Die PPDK-Reaktion in den Glykosomen läuft in Richtung der Pyruvatproduktion (Acosta *et al.*, 2004). In Pflanzen mangelt es dem Cytosol an löslicher inorganischer Pyrophosphatase, und als Folge sind die Pyrophosphatkonzentrationen in Cytosol ca. 0.5 mM (Stitt, 1998). Aus diesen Gründen kann man vermuten, dass im Cytosol von Pflanzen die PPDK-Reaktion in die Richtung der Pyruvatsynthese läuft (Abb. 5-5).



**Abb. 5-5:** PPDK-Reaktion in Pflanzen. Austausch von Pyruvat und Phosphoenolpyruvat zwischen Plastid und Cytosol durch die Aktivität von Transportern. Die Konzentration von Pyrophosphat im Cytosol ist höher als die im Plastid.

PEP: Phosphoenolpyruvat; PPDK: Pyruvat, Phosphat Dikinase; PT: Pyruvat-Transporter; PPT: Phosphoenolpyruvat-Translokator [Pyrophosphat]<sub>c</sub>: höhere Pyrophosphatkonzentration im Cytosol; [Pyrophosphat]<sub>p</sub>: niedrige Pyrophosphatkonzentration in die Plastiden.

Bei Ammoniumernährung zeigten die plastidären überexprimierten Linien eine erhöhte Samenproduktion. Diese Ergebnisse stimmten mit dem Bericht von Sheriff *et al.* (1998) überein, wo die in Plastiden unter dem 35S-Promotor überexprimierte PPDK aus *M. crystallinum*, die Anzahl der Samen pro Kapsel und das Samengewicht um 40 % beziehungsweise 20 % im Vergleich zum Wildtyp erhöhten.

Im Gegensatz dazu erhielten Sheriff *et al.* (1998) eine geringere Samenproduktion als der Wildtyp, wenn die PPDK im Cytosol mit dem 35S-Promotor überexprimiert wurde.

Bei der PPDK-Überexpression mit dem wurzelspezifischen B33-Promotor hat man die gegenteilige Antwort bekommen. Das heißt, dass die cytosolischen Linien mit PPDK-Überexpression mit dem B33-Promotor eine ähnliche Samenproduktion wie die plastidären Linien mit Nitrat/Ammonium-Behandlung zeigen.

In dieser Arbeit wurden Unterschiede in bezug auf den PPDK-Überexpressionsort (Plastiden oder Cytosol) nur beobachtet, wenn die Pflanzen unter Stress-Bedingungen (Al- und Ammonium-Behandlung) gehalten wurden. Die plastidären Linien zeigten immer eine höhere Fähigkeit zur Stressadaptation (Ammonium- und Al-Behandlung).

Da die transgenen Tabakpflanzen mit der PPDK-Überexpression im Cytosol unter der Kontrolle des wurzelspezifischen B33-Promotors ähnliche Antworten wie die plastidären Linien sowohl auf Stickstoffdüngung als auch auf Al-Behandlung zeigten, schliesse ich die Möglichkeit einer ähnlichen Reaktionsrichtung in beiden Kompartimenten der Zelle nicht aus.

## **5.5. Ausblick**

Mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Pflanzen konnte die Rolle der PPDK im C<sub>3</sub>-Pflanzen-Stoffwechsel in Bezug auf den Stickstoffhaushalt der Pflanzen näher charakterisiert werden. Die transgenen Pflanzen zeigten bei Ammoniumbehandlung, die zu bekannten Stressreaktionen führt, ein deutlich besseres Wachstum und einen besseren Ertrag gegenüber Wildtyppflanzen. In Zukunft könnten weitere Untersuchungen von Enzymen, die an der Ammoniumassimilierung teilnehmen, wie Glutamin Synthetase (GS) und Glutamat Synthase (GOGAT) und deren Aktivitätsverhältnis zur PPDK Aufschluss über ihre Funktion geben.

Des Weiteren kann die Bestimmung von speziellen Aminosäuren, sowie bestimmten Kohlenstoffverbindungen die in einem engen Zusammenhang mit der PPDK und dem Stickstoffstoffwechsel stehen, zum Verständnis der Rolle der PPDK in C<sub>3</sub>-Pflanzen beitragen.

Besonders interessant ist die Funktion der PPDK im C<sub>4</sub>-Stoffwechsel bzw. deren Rolle in C<sub>3</sub>-Pflanzen, die unter bestimmten Bedingungen auf den C<sub>4</sub>-Stoffwechsel umsteigen können. Hier spielen Stressfaktoren, die sowohl auf die Ammoniumassimilierung, als auch auf den Kohlenstoffhaushalt wirken, eine große Rolle. Die Untersuchung von PPDK-abhängigen Metaboliten (z. B. Pyruvat und PEP) und deren Enzymen können zum Verständnis der stressinduzierten PPDK-Aktivität beitragen.

In einem größeren Zusammenhang betrachtet soll die Charakterisierung der PPDK in C<sub>3</sub>-Pflanzen, sowohl unter normalen Umweltbedingungen, als auch in Stresssituationen zum Ziel haben, Einfluss auf Ertrag und Wachstum auf nährungsrelevante Pflanzen (z. B. Reis und Bohnen) in der Landwirtschaft zu nehmen.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde die bereits Analyse eines stressinduzierenden Agens, hier das Schwermetall Al<sup>3+</sup> in Abhängigkeit der PPDK-Rolle untersucht. Transgene Pflanzen zeigten eine hohe Ausscheidung von organischen Säuren über die Wurzel und zudem keine Al-Akkumulation in der Zelle. Eine solche externe Al-Entgiftung könnte eine landwirtschaftliche Rolle spielen. Zur näheren Charakterisierung des Einflusses der PPDK bei der Metall-Toleranz müssen Untersuchungen bezüglich dessen Vorkommen in weiteren Pflanzenorganen durchgeführt werden. Untersuchung zum Wachstum und Samenertrag spielen ebenso eine wichtige Rolle. Die Möglichkeit bei Al-Stress, aber auch grundsätzlich bei Schwermetallstress und anderen Stressfaktoren eine Änderung des Stoffwechsels ohne wachstum- und ertragsmindernde Auswirkungen zu zeigen, herbeizuführen, stellt ein großes Potential bei der Bekämpfung der immer häufiger auftretenden landwirtschaftlichen Katastrophen (Dürre, Überschwemmung, etc.) und somit dem Grundnahrungsmittelverlust dar.

Sowohl die erhöhte Al-Toleranz als auch die Adaption der transgenen Pflanzen bei NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Zugabe lassen auf eine mögliche Rolle der PPDK als stressinduziertes Enzym

schließen. Daher ist es nun von großer Bedeutung ihre Rolle im Detail und unter weiteren Stressbedingungen weiter aufzuklären.

Die transgenen Pflanzen müssen morphologisch und physiologisch auf breitgefächerte Parameter unter abiotischen und biotischen Bedingungen charakterisiert werden. Von weiterer Bedeutung ist somit auch die PPK-Überexpression in weiteren C<sub>3</sub>-Pflanzen.