

**Transkriptionelle und biochemische
Untersuchungen des veränderten
Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus
in genetisch modifizierten Erbsensamen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Kathleen Weigelt

geboren am 02.08.1979 in Zeitz

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Klaus Humbeck
2. Prof. Dr. Ulrich Wobus
3. Prof. Dr. Helge Küster

Halle (Saale), 09. Februar 2010

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TABELLEN UND ABBILDUNGEN

1	EINLEITUNG	1
1.1	Samenentwicklung	1
1.2	Regulation der Samenentwicklung	3
1.3	Bedeutung von Stickstoff für das Pflanzenwachstum	5
1.4	Aminosäuretransport in Pflanzen	6
1.5	Pflanzliche Aminosäuretransporter	6
1.6	Aminosäuretransporter aus Leguminosen	8
1.7	Speicherproteinbiosynthese	9
1.8	Stärkebiosynthese	10
1.9	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP)	12
1.10	Regulation der Stärkebiosynthese	12
1.11	Zielstellung der Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	MATERIAL	16
2.1.1	Pflanzenmaterial	16
2.1.2	Bakterienstämme	16
2.1.3	Plasmide und Vektoren	16
2.1.4	Oligonucleotide	17
2.1.5	Primer für RT-PCR und qRT-PCR	17
2.1.6	Medien	17
2.1.7	Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Kits	18
2.1.8	Speziallabormaterial	19
2.1.9	Geräte und Apparaturen	20
2.1.10	Software, Datenbanken und interaktive Webprogramme	20
2.2	METHODEN	21
2.2.1	Klonierung, Transformation und Sequenzierung	21
2.2.2	Pflanzentransformation und Selektion	22
2.2.3	Reprimierung der Genexpression durch RNA-Interferenz (RNAi) Mechanismus	23
2.2.4	Pflanzenanzucht und Materialentnahme	23
2.2.5	DNA-Isolierung und Southern Blot	25
2.2.6	RNA-Isolierung und Northern Blot	25
2.2.7	Quantitative <i>real time</i> PCR (qRT-PCR)	26
2.2.8	Inhaltsstoffanalyse sich entwickelnder und reifer Samen	26
2.2.9	Ermittlung der Hormonkonzentrationen	29
2.2.10	Analyse der Enzymaktivitäten	30
2.2.11	<i>Ps6kOL11</i> Microarrays, Microarray-Hybridisierung und Auswertung der Daten	31
2.2.12	Mikroskopische Techniken	32

3	ERGEBNISSE	34
3.1	Überexpression der Aminosäurepermease aus <i>Vicia faba</i> (VfAAP1)	34
3.1.1	Herstellung stabiler VfAAP1-überexprimierender Linien	34
3.1.2	Analyse VfAAP1-überexprimierender Samen unter Gewächshausbedingungen	36
3.1.3	VfAAP1-Effekt unter Freilandbedingungen	37
3.1.4	Inhaltsstoffanalyse sich entwickelnder AAP1-Samen	39
3.1.5	Transkriptionsanalyse sich entwickelnder VfAAP1-überexprimierender Samen	45
3.1.6	Bestimmung von Metaboliten des Samenstoffwechsels in AAP1-Embryonen	50
3.2	Phloem- und samenspezifische Überexpression von VfAAP1	53
3.2.1	Herstellung stabiler VfAAP1-exprimierender Linien	53
3.2.2	Charakterisierung der transgenen Linie sucAAP5	55
3.2.3	Kreuzung und Identifizierung doppelt homozygoter Pflanzen	56
3.2.4	Charakterisierung der doppelt homozygoten Pflanzen	57
3.3	Reprimierung des Enzyms ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	59
3.3.1	Herstellung stabiler AGP-reprimierter Erbsenlinien	59
3.3.2	Charakterisierung der AGP-reprimierten homozygoten Linien (iAGP)	60
3.3.3	AGP-Inhibierung bewirkt veränderte Zusammensetzung der Sameninhaltsstoffe	63
3.3.4	Veränderungen der Zellmorphologie in AGP-reprimierten Samen	67
3.3.5	Transkriptionsanalyse sich entwickelnder iAGP-3 Embryonen	68
3.3.6	Ermittlung von Metaboliten des Samenstoffwechsels in iAGP-3 Embryonen	75
3.3.7	Hormonelle Veränderungen in den AGP-reprimierten Samen	77
4	DISKUSSION	80
4.1	Die Überexpression von VfAAP1 in Erbsenembryonen beeinflusst den N- und Speicherproteingehalt auch unter Freilandbedingungen	80
4.1.1	VfAAP1-Überexpression verstärkt die Aufnahmekapazität von Aminosäuren in die Erbsensamen	81
4.1.2	Die vermehrte Aminosäurezufuhr stimuliert die Proteinbiosynthese und erhöht das N:C Verhältnis im Samen	82
4.2	Verstärkung des VfAAP1-Effektes durch phloem- und samenspezifische Expression der Aminosäurepermease	83
4.3	Die Reprimierung des Enzyms ADP-Glucose-Pyrophosphorylase führt zur Reduzierung des Stärkegehaltes und gleichzeitig zur Proteinerhöhung im Samen	84
4.3.1	iAGP-3 Samen haben höhere Proteingehalte aber verringerte Samengewichte	86
4.3.2	Veränderte Aminosäurezusammensetzung in den iAGP-Embryonen	87
4.3.3	Veränderte osmotische Verhältnisse in den iAGP-Embryonen beeinflussen die Zellmorphologie	88
4.4	Charakterisierung der komplexen Samenphänotypen mittels transkriptioneller und metabolischer Analysemethoden	89
4.5	Transkript- und Metabolitdaten der AAP1-Embryonen	90
4.5.1	Die ektopische Expression von VfAAP1 verstärkt die Stickstoffaufnahme im Samen und stimuliert den Aminosäurestoffwechsel	90

4.5.2	<i>VfAAP1</i> -Überexpression bewirkt Aminosäureabbau unter Beteiligung mitochondrialer Aktivitäten	92
4.5.3	Limitierung an Kohlenstoff in den AAP1-Samen beeinflusst den Kohlenhydratstoffwechsel	93
4.5.4	Die vermehrte Stickstoffaufnahme in die AAP1-Samen beeinflusst die Synthese von Speicherproteinen	94
4.5.5	Hormonelles Signalnetzwerk ist an Prozessen der Speicherstoffsynthese in den AAP1-Samen beteiligt	95
4.6	Transkript- und Metabolitdaten der iAGP-Samen	97
4.6.1	AGP-Inhibierung stimuliert den Stoffwechsel sowie die Mobilisierung von Kohlenhydraten	97
4.6.2	AGP-Reprimierung beeinflusst den Aminosäurestoffwechsel und verstärkt die Synthese von Speicherproteinen	98
4.6.3	Hormonelle Signalnetzwerke beeinflussen in Interaktion mit löslichen Zuckern die Samenspeicherstoffsynthese	99
4.7	Die gesteigerte Speicherproteinsynthese verändert das Verhältnis von N und C im Samen und führt zu kompensatorischen Effekten	101
4.8	Stressbedingte Abwehrreaktionen	102
4.9	Fazit und weiterführende Arbeiten	105
5	ZUSAMMENFASSUNG	108
6	LITERATURVERZEICHNIS	110
A	ANHANG	I
A.1	Schema der für die Co-Transformation verwendeten Vektoren	I
A.2	Zusammenfassung der Transkript- und Metabolitdaten	III

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen für Aminosäuretransporterfamilien (z.B. APC), Chemikalien (z.B. NaOH), Enzymbezeichnungen (z.B. *Taq*), Länder (u.a. USA) bzw. Staaten (u.a. CA), Maßeinheiten (z.B. g, mM), Metalle bzw. Metallionen (u.a. Ca, Fe), Aminosäuren (z.B. Asp, Glu) sowie Puffer und Medien, die im Text näher erläutert sind, werden nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Bei zusammengesetzten Abkürzungen, wie Gen- und Enzymbezeichnungen, sind die jeweiligen Teile getrennt angegeben. Aus dem Englischen bzw. dem Latein übernommene Begriffe sowie Gene werden in der Arbeit kursiv hervorgehoben.

Nucleobasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Abkürzungen

2,4D	2,4-dichlorophenoxyessigsäure
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AA	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
aadA	Aminoglycosid-3-Adenyltransferase
AAP	Aminosäurepermease
ABA	Abscisinsäure (<i>abscisic acid</i>)
Abb.	Abbildung
ABI	<i>abscisic acid intensive</i>
Abt.	Abteilung
ADP	Adenosindiphosphat
AGP	ADP-Glucose Pyrophosphorylase
Ag	Arbeitsgruppe
Amp ^r	Ampicillinresistenz
ASN	Asparagin-Synthase
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BAP	6-Benzylaminpurin
BAR	Phosphinotricin-Acetyltransferase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bt	<i>brittle</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff (<i>carbon</i>)
ca.	circa

CaMV	<i>cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CeBiTec	Center for Biotechnology
cv.	Sorte (<i>cultivar</i>)
Da	Dalton
DAP	Tage nach der Befruchtung (<i>days after pollination</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	Dehydrogenase
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat, Gemisch aus Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP)
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-tetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
EST	<i>expressed sequence tag</i>
ETC	Elektronentransferkette (<i>electron transfer chain</i>)
F ₁	Filialgeneration 1
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FG	Frischgewicht
Frc	Fructose
FUS	<i>fusca</i>
GA	Gibberellinsäure (<i>gibberellic acid</i>)
GABA	γ -Aminobutyrat
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GBSS	granulärgebundene Stärke-Synthase (<i>granule-bound starch synthase</i>)
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
Glc-6-P	Glucose-6-Phosphat
GS	Glutamin-Synthetase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSP	Heat shock protein
IBS	β -Indolyl-Buttersäure
ICK	cyclinabhängige Kinaseinhibitoren
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
JA	Jasmonsäure (<i>jasmonic acid</i>)
Km ^r	Kanamycinresistenz
LB	linke Bordersequenz
LEA	<i>late embryogenesis abundant</i>
LeB	Legumin B

LEC	<i>leafy cotyledon</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mito.	mitochondrial
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MS	Murashige und Skoog Basalmedium (nur in Kapitel 2)
MST	Monosaccharidtransporter
N	Stickstoff (nitrogen)
NA	Numerische Apertur
NAA	<i>naphthalene acetic acid</i>
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduzierte Form von NAD
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes NADP
NAGS	N-Acetylglutamat-Synthase
NOS	Nopalinsynthase
Nr.	Nummer
OCS	Octopinsynthase
OG	Oxo-Glutarat
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
ORF	<i>open reading frame</i>
<i>ori</i>	Replikationsursprung (<i>origin</i>)
Oxac	Oxalacetat
Oxi	Oxidase
P	Phosphat/Phosphor
p	Promotor
p	Signifikanzniveau (p-Wert)
<i>P. sativum</i>	<i>Pisum sativum</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PGA	Phosphoglycerinsäure
PGI	Phosphoglucoisomerase
PGM	Phosphoglucomutase
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
plast.	plastidär
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pot	<i>potato</i>
PPi	Pyrophosphat
PPT	Phosphinotricin
Ps	<i>Pisum sativum</i>
PTGS	<i>post transcriptional gene silencing</i>
PTR	Peptidtransporter
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR
<i>r</i>	<i>rugosus</i>

RB	rechte Bordersequenz
rDNA	ribosomale DNA
RISC	<i>induced silencing complex</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
RNase	Ribonuclease
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
S	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>S. hygroscopicus</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
SAM	s-Adenosylmethionin
SBE	Stärke-Verzweigungsenzym (<i>starch branching enzym</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
sh	<i>shrunk</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SnRK	<i>sucrose nonfermenting-1-related protein kinase</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
Spec ^r	Spectinomycinresistenz
SSS	lösliche Stärke-Synthase (<i>soluble starch synthase</i>)
Suc	Saccharose (<i>sucrose</i>)
SUC/SUT	Saccharosetransporter
Susy	Saccharose-Synthase
t	Terminator
T ₁	Transgen-Generation 1
Tab.	Tabelle
TCA	Zitronensäurezyklus (<i>tricarmonic acid</i>)
TG	Trockengewicht
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
UDP	Uridindiphosphat
UE	Untereinheit
ün	über Nacht
USP	<i>unknown seed protein</i>
UV	ultraviolett
<i>V. faba</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>V. narbonensis</i>	<i>Vicia narbonensis</i>
Vf	<i>Vicia faba</i>
VP	<i>viviparous</i>
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
zyto.	zytosolisch

Tabellen und Abbildungen

Tabelle

Tab. 3.1	<i>VfAAP1</i> -transgenpositive Pflanzen nach der Co-Transformation in Erbse	35
Tab. 3.2	Bestimmung des Gesamt-N-Gehaltes der transgenen Linien	36
Tab. 3.3	<i>VfAAP1</i> -Effekt unter Freilandbedingungen	38
Tab. 3.4	Charakterisierung der transgenen <i>sucAAP</i> -Pflanzen	54
Tab. 3.5	Bestimmung des N-, C- und Speicherproteingehaltes in reifen <i>sucAAP</i> -Samen	54
Tab. 3.6	Inhaltsstoffanalyse reifer Samen der Linie <i>sucAAP5/8</i>	56
Tab. 3.7	Analyse der Inhaltsstoffe reifer Samen der Linien <i>iAGP-1</i> , <i>iAGP-2</i> und <i>iAGP-3</i>	62
Tab. 3.8	Zusammensetzung der Sameninhaltsstoffe der Linie <i>iAGP-3</i>	63
Tab. A.1	Annotierte Gene und ihre mögliche Funktion im Samenstoffwechsel mit erhöhter Transkriptmenge der <i>AAP1</i> -Embryonen	VI
Tab. A.2	Annotierte Gene und ihre mögliche Funktion im Samenstoffwechsel mit reduzierter Transkriptmenge der <i>AAP1</i> -Embryonen	VIII
Tab. A.3	Annotierte Gene und ihre mögliche Funktion im Samenstoffwechsel mit erhöhter Transkriptmenge der <i>iAGP</i> -Embryonen	VIII
Tab. A.4	Annotierte Gene und ihre mögliche Funktion im Samenstoffwechsel mit reduzierter Transkriptmenge der <i>iAGP</i> -Embryonen	XI

Abbildung

Abb. 1.1	Stadien der Samenentwicklung	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung des Langstreckentransports von Aminosäuren und Zuckern über das Phloem	7
Abb. 1.3	Schema der Stärkebiosynthese	11
Abb. 3.1	Northern Blot Analyse zur Bestimmung der <i>VfAAP1</i> -Transkriptakkumulation der Linien 10, 14, 18 und 20	35
Abb. 3.2	Bestimmung des Gesamt-N-Gehaltes der transgenen Linien	36
Abb. 3.3	Aufnahmen des Freisetzungversuches der transgenen <i>VfAAP1</i> -überexprimierenden Pflanzen	37
Abb. 3.4	Bestimmung der Inhaltsstoffe <i>VfAAP1</i> -überexprimierender Samen verschiedener Entwicklungsstadien	39
Abb. 3.5	Bestimmung der Samenspeicherkomponenten, Gesamt-Gehalt an freien Aminosäuren und die Saccharose-Synthase Aktivität in <i>VfAAP1</i> -überexprimierenden Samen	41
Abb. 3.6	Gehalte an freien Aminosäuren in <i>AAP14/10</i> und Wildtypsamen	43
Abb. 3.7	Bestimmung der Phytohormone Cytokinin, dessen aktive Isoformen und ABA in den <i>AAP1</i> -Embryonen	44
Abb. 3.8	Gesamtanteil der induzierten und reduzierten Gene je Stadium in den <i>AAP14/10</i> -Embryonen	45
Abb. 3.9	Gesamtanteil der annotierten hoch/herunterregulierten Gene der <i>AAP14/10</i> -Embryonen	47
Abb. 3.10	Metabolite des Samenstoffwechsels von <i>AAP1</i> -Samen	52
Abb. 3.11	Charakterisierung der transgenen <i>sucAAP</i> -Pflanzen	54
Abb. 3.12	Kreuzungsschema der F_1 und F_2 Generation	57

Abb. 3.14	Charakterisierung von Embryonen stabiler Erbsenlinien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 verschiedener Entwicklungsstadien (15, 20, 25, 30 und 35 DAP)	60
Abb. 3.15	Bestimmung des Stärkegehaltes und der Transkriptmengen von Vicilin bzw. Legumin B in Samen der transgenen Linien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3	61
Abb. 3.16	Analyse der Sameninhaltsstoffe von Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien der transgenen Linie iAGP-3	64
Abb. 3.17	Bestimmung der freien Aminosäuren in iAGP-3 und Wildtypembryonen	66
Abb. 3.18	Phänotyp reifer AGP-reprimierter Samen	67
Abb. 3.19	Histologische Aufnahmen der iAGP-3 Embryonen	68
Abb. 3.20	Gesamtheit der Gene pro Entwicklungsstadium in den iAGP-3 Embryonen	68
Abb. 3.21	Gesamtanteil der annotierbaren hoch/herunterregulierten Gene je Stadium 20, 25, 30 und 35 DAP der iAGP-3 Embryonen	70
Abb. 3.22	Schema verschiedener Stressantworten der iAGP-Samen	74
Abb. 3.23	Metabolite des Samenstoffwechsels von iAGP-3 Embryonen	76
Abb. 3.24	Bestimmung der Phytohormone Cytokinin, dessen Isoformen und Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) in iAGP-3 Embryonen	77
Abb. 3.25	Bestimmung der Gehalte an OPDA, JA und Derivate in iAGP-3 Samen	78
Abb. A.1	Schematische Darstellung der binären Vektoren pLeB4/VfAAP1/PZP200 und pCambia3300	I
Abb. A.2	Schema der Binärvektoren pLeB4/iAGP/PZP200 und pCambia3300	II
Abb. A.3	Schema des Binärvektors pAtSUC2/VfAAP1/pBAR	II
Abb. A.4	Schematische Darstellung transkriptioneller und metabolischer Veränderungen in den AAP1-Embryonen	IV
Abb. A.5	Schematische Darstellung transkriptioneller und metabolischer Veränderungen in den iAGP-Embryonen	V

1 Einleitung

Der Same ist die typische Überdauerungs- und Verbreitungsform bei Pflanzen. Für Mensch und Tier sind die Samen der Kulturpflanzen die Grundlage für die Ernährung, da in ihnen Reservestoffe synthetisiert und akkumuliert werden. Laut FAO werden 70% des Energiebedarfs über die Samen der Getreide und Leguminosen und die restlichen 30% über tierische Produkte gedeckt. Gerade die Samen der Hülsenfrüchte sind ernährungsphysiologisch wichtige Proteinlieferanten, da sie einen hohen Anteil an Speicherproteinen in den Kotyledonen akkumulieren (Müntz, 1982). Doch pflanzliche Proteine sind arm an essentiellen Aminosäuren. Da Menschen diese essentiellen Aminosäuren nicht selbst synthetisieren können, müssen sie über die Nahrung täglich zugeführt werden. Die Proteine der Getreide weisen generell einen Mangel an Lysin und Tryptophan auf. Im Gegensatz dazu sind bei den Leguminosen die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein die limitierenden Komponenten und bedingen durch ihren geringen Anteil die relativ niedrige biologische Wertigkeit des Proteins. Untersuchungen von Kofranyi and Jekat (1964) haben gezeigt, dass letztlich ausgewählte Kombinationen pflanzlicher Proteine eine hohe biologische Wertigkeit aufweisen. Grundsätzlich wird die Proteinqualität anhand der Aminosäurezusammensetzung des Proteins definiert. Die Erhöhung des Proteingehaltes sowie die Verbesserung der Proteinqualität sind bedeutende züchterische Ziele bei Leguminosen. Für eine effektive Modifikation des Samenstoffwechsels ist es deshalb wichtig, die Prozesse der pflanzlichen Samenentwicklung und deren Regulationsmechanismen zu verstehen und zu erforschen.

1.1 Samenentwicklung

Der Lebenszyklus höherer Landpflanzen beginnt mit der Fusion eines Pollenschlauchkerns und der Eizelle zur Zygote aus der dann der diploide Embryo entsteht. Der zweite Pollenschlauchkern vereinigt sich mit dem sekundären Embryosackkern und bildet in der Folge das triploide Endosperm, das Nährgewebe. Embryo und Endosperm als filiales Gewebe werden von maternalen Geweben, den Integumenten, umhüllt aus denen sich die Samenschale entwickelt. Dieser Zyklus gliedert sich in drei große Entwicklungsabschnitte, die durch physiologische und morphologische Veränderungen gekennzeichnet sind: die Embryogenese, die vegetative und die generative Entwicklung. Die Embryogenese wird wiederum in drei Phasen unterteilt (Dure, 1975; Müntz, 1978). Die erste Phase geht mit Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen einher. In diesem Stadium werden Kotyledonen, Spross- und Wurzelmeristeme angelegt. Der Embryo durchläuft verschiedene charakteristische Entwicklungsphasen, wie Globulär-, Herz-, Torpedo- und Kotyledonenstadium, die durch eine gesteigerte Mitoseaktivität der Zellen gekennzeichnet sind (Goldberg *et al.*, 1989; 1994). Die zweite Phase ist durch Zellstreckungswachstum charakterisiert.

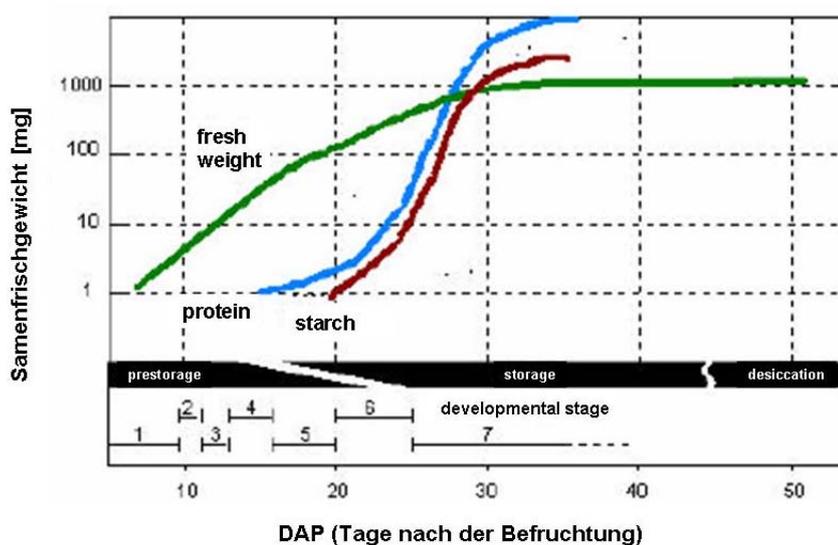
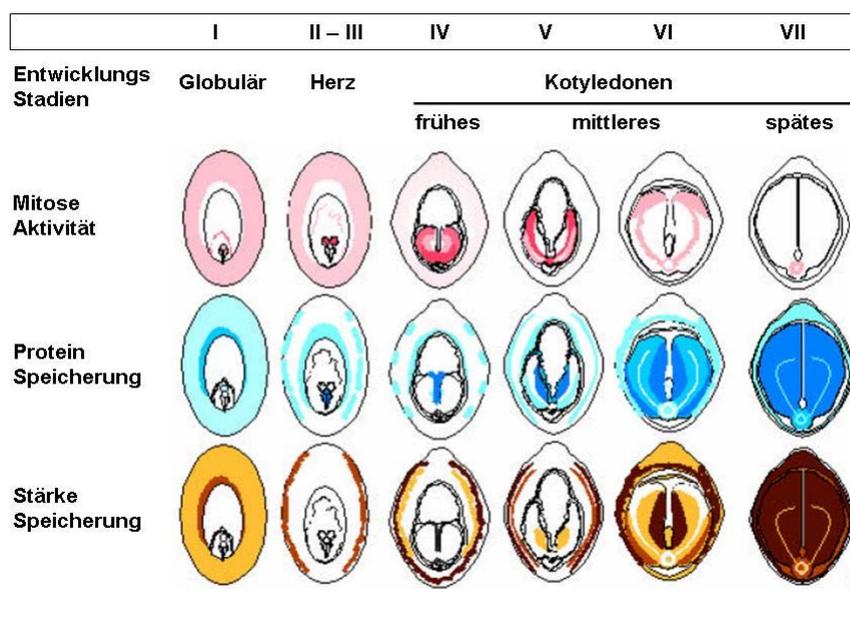


Abb. 1.1 Stadien der Samenentwicklung (Weber *et al.*, 1997a). Anhand morphologischer und physiologischer Veränderungen von *Vicia faba* Samen erfolgte die Einteilung der Samenentwicklung für Leguminosen in sieben Stadien (Borisjuk *et al.*, 1995). In den Stadien I-III finden Organogenese und Morphogenese statt, gekennzeichnet durch eine gesteigerte Mitoseaktivität (rote Regionen), gefolgt von Differenzierung zu Speichergeweben sowie Akkumulation von Reservestoffen, wie Proteine (blaue Regionen) und Stärke (braune Regionen). Die Kotyledonen erreichen in Stadium VII ihre physiologische Reife. Die verschiedenen Farbtintensitäten verdeutlichen eine stärkere oder verringerte Mitoseaktivität bzw. Akkumulation von Speicherstoffen. Im unteren Schema sind die Veränderungen der Gehalte an Stärke und Proteine sowie Samenfrischgewichte abhängig vom Entwicklungsstadium abgebildet.

In dieser Phase findet die Samenreifung mit den Prozessen der Speicherstoffakkumulation und dem Erwerb der Austrocknungstoleranz statt (Goldberg *et al.*, 1989; 1994). Während der Speicherung werden Reservestoffe, wie Kohlenhydrate, Proteine und Lipide, als Nährstoffquellen in unterschiedlichen Geweben des Samens angelegt. Bei den Leguminosen werden hauptsächlich Stärke und Proteine sowie zu einem geringen Anteil Lipide im Embryo

gespeichert. In der dritten und zugleich Endphase der Samenreifung findet die Austrocknung des Samens statt. Der Same verliert immer mehr Wasser bis zum maximalen Austrocknungsgrad. Seine Gen- und Stoffwechselaktivitäten werden auf ein Minimum reduziert und der Embryo tritt in die Dormanz ein (Goldberg *et al.*, 1989; 1994; West and Harada, 1993). Speziell für Leguminosen wurden anhand morphologischer Zellveränderungen von *Vicia faba* Samen sieben Stadien der Samenentwicklung beschrieben (Abb. 1.1; Borisjuk *et al.*, 1995). In den Stadien I-III finden Organogenese und Morphogenese statt, in den Phasen IV-VII die Differenzierung zu Speichergewebe sowie die Akkumulation von Nährstoffen. Während der Transitionsphase (Stadium V) sind die inneren Zellen durch Streckungswachstum und die äußeren Zellen weiterhin durch Zellteilungsprozesse gekennzeichnet. Die Phase VI ist die Hauptspeicherphase. Danach werden Zellstreckung und Nährstoffakkumulation beginnend in der Mitte und dann graduell in den Außenregionen reduziert. Die Prozesse der Samenentwicklung erfolgen wellenartig. Es entstehen zeitliche und räumliche Entwicklungsgradienten zwischen und innerhalb der sich differenzierenden Gewebe des Samens. Die Kotyledonen erreichen im Stadium VII ihre physiologische Reife (Borisjuk *et al.*, 2004).

Die verschiedenen Prozesse der Samenentwicklung von der Embryonalentwicklung bis zur Samenreifung und der Übergang zur Keimung müssen zeitlich und räumlich reguliert werden. Neben hormonellen und metabolischen Einflüssen spielen bei der Regulation der Samenentwicklung sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Vorgänge eine wichtige Rolle.

1.2 Regulation der Samenentwicklung

An der Regulation der verschiedenen Entwicklungsprozesse sind unter anderem Hormone beteiligt. Ein Vertreter ist das Phytohormon Abscisinsäure (ABA). Es reguliert Prozesse der pflanzlichen Samenentwicklung sowie die Synthese von Samenspeicherstoffen (Finkelstein and Gibson, 2002). Schon in geringen Konzentrationen hemmt es die Samenkeimung und löst die Samenruhe aus und ist somit am Erwerb der Austrocknungstoleranz beteiligt (Leung and Giraudat, 1998). Weiterhin wird ABA unter stressbedingten Situationen, wie Wasser- und Trockenstress, Salz- und Kältebehandlung sowie bei der Wund- und Pathogenabwehr, verstärkt akkumuliert (Leung and Giraudat, 1998; Rook *et al.*, 2000; 2001). Während der Samenentwicklung konnten zwei Höchstwerte der ABA-Akkumulation ermittelt werden. Der erste ABA-Gipfel wird von den maternalen Geweben direkt vor der Samenreifung synthetisiert (Karssen *et al.*, 1983; Raz *et al.*, 2001), um eine vorzeitige Keimung des Embryos schon am Ende der Zellteilungsphase zu verhindern. Der zweite Gipfel ist von der ABA-Synthese des Embryos selbst abhängig (Karssen *et al.*, 1983) und ist besonders wichtig für die Ausbildung der Samenruhe. Anhand molekularbiologischer Methoden wurden verschiedene ABA-regulierte Gene und entsprechende Transkriptionsfaktoren für die ABA-abhängige Signalkette identifiziert. Das Gen *ABI3* von *A. thaliana* (Giraudat *et al.*, 1992) und sein funktionelles Homolog *VP1* (*Viviparous1*) im Mais (McCarty *et al.*, 1991) kodieren beide für Transkriptionsfaktoren der Familie der B3-Domänen und übernehmen wichtige Funktionen bei der Regulation der Samenreifung.

Der Gegenspieler der Abscisinsäure ist das Phytohormon Gibberellinsäure (GA). Es kontrolliert verschiedene Bereiche der Pflanzenentwicklung, wie das Blatt- und Stengelwachstum, die Pflanzenblüte und die Samenentwicklung (Roitsch and Ehneß, 2000). Weiterhin bewirkt es die Aufhebung der Samenruhe und führt zur Samenkeimung (Bewley, 1997; Ogawa *et al.*, 2003). Letztlich werden GA zwei wichtige Funktionen während der Keimung zugeordnet. Als erstes wird GA zum Überwinden der mechanischen Barriere zwischen Embryo und umgebendem Gewebe, wie Aleuron bzw. Samenschale, benötigt. Zweitens scheint GA das Wachstumspotential des Embryos zu erhöhen (Karssen *et al.*, 1989).

Stoffwechselprodukte, wie Glucose, Saccharose und Stickstoff, sind nicht nur wichtige Nährstoffe für die Pflanze, sondern regulieren als Signalstoffe die Prozesse der Samenreifung (Wobus and Weber, 1999a; Smeekens, 2000; Borisjuk *et al.*, 2002). Dabei spielen der Zuckerstatus und die daraus resultierenden osmotischen Verhältnisse in den Zellen und Geweben eine entscheidende Rolle. In den Kotyledonen der Leguminosen entsteht ein Glucosegradient, der sich während der Samenentwicklung verändert (Borisjuk *et al.*, 1998). Der Zuckerstatus im Samen wird durch die spezifische Expression zellwandgebundener Invertasen in der maternalen Samenschale (Weber *et al.*, 1995) sowie durch die Aktivität von Hexose- und Saccharosetransportern in der Epidermis des Embryos (Weber *et al.*, 1997a) verändert.

Lösliche Zucker, wie Glucose und Saccharose, wirken unterschiedlich auf die Kotyledonenentwicklung ein. Eine hohe Konzentration an Hexosen, hauptsächlich Glucose, bewirkt eine verstärkte Mitoseaktivität und somit Zellteilung, wogegen eine Akkumulation an Saccharose die Zellstreckung und Samenspeicherungsprozesse beeinflusst (Weber *et al.*, 1997a; Borisjuk *et al.*, 2002). Dabei interagiert Saccharose im Samen mit dem Phytohormon ABA (Finkelstein *et al.*, 2002). Der Gehalt an ABA nimmt während der frühen Samenreifung zu und bewirkt die Expression cyclinabhängiger Kinaseinhibitoren (ICK1; Wang *et al.*, 1998a), wodurch die Mitoseaktivitäten im Samen herunterreguliert werden (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Anhand zuckersensibler Mutanten wurde die Rolle von ABA bei der Zuckerregulation nachgewiesen (Rook *et al.*, 2001). So sind Mutanten mit Defekten in der ABA-Synthese (*aba1*, *aba2*, *aba3*) und ABA-Sensibilität (*abi3*, *abi4*, *abi5*, *abi8*) auch gegenüber Zucker unempfindlich (Finkelstein *et al.*, 2002; Brocard-Gifford *et al.*, 2003; Gibson, 2004).

Für ABA und Zucker wurden sowohl antagonistische als auch ähnliche Effekte während der Samenentwicklung aufgezeigt (Finkelstein and Gibson, 2002). Während Glucose und ABA eher eine gegensätzliche Wirkung auf den Zellzyklus haben, scheinen Saccharose und ABA in gleicher Weise die Akkumulation von Speicherstoffen anzuregen. Somit ist die Zuckersignalkette von einer funktionellen ABA-Signalkette abhängig. Möglicherweise erhöht Saccharose sogar die Sensibilität oder die Gehalte von ABA. In Keimungsexperimenten mit Arabidopsis-Samen erhöhte die Zugabe von Zucker die internen ABA-Konzentrationen, entweder durch eine gesteigerte ABA-Synthese oder durch die Inhibierung der Abbauprozesse (Price *et al.*, 2003).

Auch Proteinkinasen, wie die SnRK1-Kinase, interagieren mit der ABA-Signalkette und haben somit entscheidenden Einfluss auf Prozesse der Samenreifung (Radchuk *et al.*, 2006). Funktionell ist SnRK1 an der Anpassung des Stoffwechsels auf veränderte Umweltbedingungen, wie Nährstoffe, Energie und Stress, beteiligt (Hardie, 1999). In Erbsenembryonen mit reduzierter SnRK1-Aktivität wurde eine Veränderung des Saccharosestoffwechsels durch verringerte ABA-Gehalte gefunden.

Weiterhin ist Stickstoff (N) als Signalmolekül mit regulatorischer Funktion während der Samenentwicklung bekannt (Crawford and Glass, 1998). Für Zucker und Nitrat wurden komplementäre Effekte auf die Aminosäurebiosynthese gezeigt (Stitt, 1999). Hohe Konzentrationen an Saccharose stimulieren die Umwandlung von Nitrat zur Aminosäure Glutamin bzw. von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Oxoglutarat, dem Ausgangsstoff für die Synthese von Aminosäuren, wie Glutamat, Prolin und Glutamin (MacKintosh, 1998). Bei niedrigen Zuckergehalten erfolgt eine negative Regulation der Nitratreduktase und hebt dadurch die Signalwirkung vom N-Stoffwechsel auf (Matt *et al.*, 1998).

1.3 Bedeutung von Stickstoff für das Pflanzenwachstum

Stickstoff ist eine essentielle Komponente für viele biologische Moleküle, wie Proteine, Nucleinsäuren, Chlorophyll und Hormone. Die Aufnahme von Stickstoff ist daher von besonderer Bedeutung für das Pflanzenwachstum und erfolgt über die Wurzel bzw. die Blätter abhängig von der Spezies und den Umweltbedingungen. Laut Liebig's Hypothese beeinflusst immer der Nährstoff das Wachstum von Pflanzen, der in limitierender Form vorliegt (Frommer *et al.*, 1994).

Leguminosen bilden mit Hilfe von Knöllchenbakterien (*Rhizobium leguminosarum*) an der Wurzel Knötchen aus. Die Rhizogenesbakterien fixieren atmosphärischen Stickstoff und machen ihn so für die Pflanze nutzbar. Somit ist die Stickstoffversorgung auch auf stickstoffarmen Böden gesichert. Im Gegensatz dazu hemmt ein hoher Stickstoffanteil im Boden die Bildung von Knöllchenbakterien (Minchin *et al.*, 1989).

Die Hauptstickstoffquellen im Boden sind Nitrat, Ammonium und in wenigen Fällen auch Aminosäuren (von Wirén *et al.*, 1997). Junge Pflanzen nehmen Stickstoff vorwiegend aus dem Boden auf. Erst mit der Knöllchenbildung beginnt die Fixierung von Luftstickstoff, erreicht den höchsten Wert während der Samenfüllung und nimmt dann mit fortlaufender Samenentwicklung ab (Sagan *et al.*, 1993). Nach der transportervermittelten Aufnahme erfolgt die Reduzierung und Fixierung des Stickstoffs direkt in der Wurzel. Anschließend wird der reduzierte Stickstoff in Form von Aminosäuren, Amiden und Ureiden über das vaskuläre System transportiert. Alternativ dazu kann Nitrat auch über das Xylem zu den Blättern transportiert und dort zu Aminosäuren verstoffwechselt werden (Andrews, 1986).

Reduzierter Stickstoff wird übergangsweise in vegetativen Organen, wie Wurzeln und Blättern, oder im Speichergewebe von Samen akkumuliert. Während der Pflanzenentwicklung wird der gespeicherte Stickstoff dann wieder remobilisiert (Salon *et al.*, 2001) und in Form von Aminosäuren über das Phloem in der Pflanze verteilt. Dabei sind Wurzeln und Blätter wichtige Exportquellen während der Samenreifung bzw. Endosperm und

Kotyledonen während der Keimung (Frommer *et al.*, 1994). Für die Umverteilung von Stickstoff in der Pflanze sind aktive Transporter in der Plasmamembran notwendig. Aminosäuretransporter spielen dabei eine entscheidende Rolle.

1.4 Aminosäuretransport in Pflanzen

Pflanzen nehmen als Stickstoffquellen vorrangig Nitrat und Ammonium aber auch Aminosäuren über aktive Systeme aus dem Boden auf (von Wirén *et al.*, 1998). In der Wurzel erfolgt dann die Assimilierung von Stickstoff in Aminosäuren und anschließender Exportierung über das Xylem in die Blätter. Aminosäuren stellen prinzipiell die Langstreckentransportform für organischen Stickstoff dar.

Die Umverteilung von Aminosäuren von *source*- (Blättern) zu *sink*- (Samen) Organen erfolgt über das Phloem, daher ist ein Transfer zwischen Xylem und Phloem notwendig (Frommer *et al.*, 1994; Atkins, 2000). Proteinogene Aminosäuren sind mit einer Konzentration von 100-200mM im Phloem und mit 10-20mM im Xylem vertreten, wobei Amine (Glutamin und Asparagin) und saure Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure) überwiegen. An der Umverteilung von Aminosäuren zwischen den verschiedenen Kompartimenten sind Aminosäuretransporter beteiligt. Dabei werden Aminosäuren von der Plasmamembran der Geleitzellen in die Zellwand freigesetzt und anschließend ins Phloem mittels protonengekoppelten Symport entladen (Abb. 1.2; Bush, 1993). Die dafür notwendige Energie wird von der H⁺-ATPase produziert. In Pflanzenwurzeln sind verschiedene Transportsysteme an der Aufnahme der Aminosäuren, der Mobilisierung aus den Wurzeln ins Xylem, der Entladung aus dem Phloem zurück in die Wurzeln und möglicherweise am direkten Transfer zwischen Phloem und Xylem beteiligt (Williams and Miller, 2001).

In Blättern existieren zwei Systeme für die Phloembeladung bei Translokationsprozessen und zusätzlich für die Aminosäureaufnahme aus dem Xylem. In *sink*-Organen, wie Samen, sind mindestens zwei Transportsysteme notwendig, eines im maternalen Gewebe zur Phloementladung und eines für die Aufnahme in den sich entwickelnden Embryo, der symplastisch vom maternalen Gewebe getrennt ist (Frommer *et al.*, 1994).

1.5 Pflanzliche Aminosäuretransporter

In Pflanzen existiert eine Vielzahl von Aminosäuretransportern, die aufgrund ihrer Substratspezifität bzw. ihrer zell- und gewebespezifischen Expression unterschieden werden. Die biochemischen Eigenschaften von pflanzlichen Aminosäuretransportern wurden erstmalig anhand isolierter Membranvesikel beschrieben. Die meisten der in Pflanzen beschriebenen Aminosäuretransporter sind so genannte Protonen-Aminosäure-Symporter (Bush, 1993). Die Aufnahme der Aminosäuren erfolgt über ein protonengekoppeltes Carriersystem, welches gleichzeitig Aminosäuren und H⁺-Protonen bindet (Abb. 1.2). Die dafür notwendige Energie wird über einen elektrochemischen Protonengradienten durch eine ATPase in der Plasmamembran erzeugt (Sze *et al.*, 1999).

Die funktionelle Komplementierung von heterologen Genen in Hefemutanten ermöglichte die Identifizierung und Charakterisierung vieler Transportergene (André, 1995). Im Genom von *Arabidopsis thaliana* sind 53 und bei Reis etwa 59 putative Aminosäuretransportergene bekannt. Diese lassen sich in zwei Überfamilien gliedern (Fischer *et al.*, 1995), die APC-Familie (*amino acid-polyamine-choline transporter*) und die ATF-Familie (*amino acid transporter family*).

Die Mitglieder der APC-Familie besitzen 12-14 Transmembrandomänen und werden in drei Unterfamilien eingeteilt: die kationischen Aminosäuretransporter (CAT), die L-Typ Aminosäuretransporter (LAT) und die GABA-Permeasen (GAP).

Zur ATF-Familie gehören Transporter mit 9-11 Transmembrandomänen, welche in sechs Unterfamilien gegliedert werden: die Aminosäurepermeasen (AAP), die Lysin-Histidin-Transporter (LHT), die Prolintransporter (ProT), die GABA-Transporter (GAT), die Auxin-Transporter (AUX) und die neutralen Aminosäuretransporter (ANT).

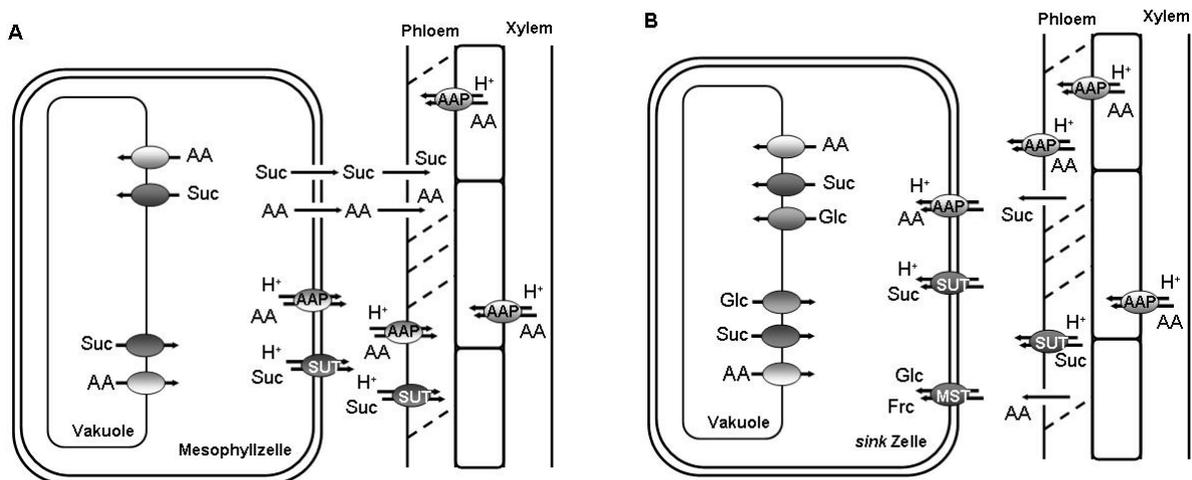


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des Langstreckentransports von Aminosäuren und Zuckern über das Phloem (Lalonde *et al.*, 2004). A: Von der Mesophyllzelle werden Saccharose und Aminosäuren durch Plasmodesmata oder protonengekoppelten Symport mittels membrangebundener Transporter in das Phloem entladen. Durch hydrostatischen Druck wird der Phloensaft in Richtung *sink*-Gewebe geleitet. B: Zunächst erfolgt die Entladung von Saccharose und Aminosäuren in den Apoplasten und anschließend der Import in die *sink*-Zelle über Plasmodesmata oder membrangebundene Transporter. Des Weiteren wird Saccharose durch Invertasen im Apoplasten hydrolytisch in Hexosen gespalten, wodurch auch Glucose oder Fructose über Transporter aufgenommen werden. AA: Aminosäuren, AAP: Aminosäurepermease, Suc: Saccharose, SUT: Saccharosetransporter, Glc: Glucose, Frc: Fructose, MST: Monosaccharidtransporter.

Die wohl am besten charakterisierte Gruppe ist die Familie der AAP-Transporter mit insgesamt acht Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana*. Der erste Aminosäuretransporter dieser Familie, der AtAAP1/NAT2, wurde 1993 von zwei unabhängigen Forschergruppen isoliert (Frommer *et al.*, 1993; Hsu *et al.*, 1993). Danach folgte die Identifikation von AAP2 (Kwart *et al.*, 1993), AAP3-5 (Fischer *et al.*, 1995) und AAP6-8 (Okumoto *et al.*, 2002). Die AAPs zeigen ein ähnliches Substratspektrum. Die Aminosäuretransporter AtAAP1, AtAAP2, AtAAP4 und AtAAP6 haben eine Präferenz für neutrale und saure Aminosäuren. Dagegen transportieren AtAAP3 und AtAAP5 zusätzlich noch basische Aminosäuren (Rentsch *et al.*,

1998). Trotz ihrer überlappenden Substratspezifität sind AAPs nicht redundant, da sie in verschiedenen Zelltypen und entwicklungsabhängig exprimiert werden (Fischer *et al.*, 1998). AtAAP1, AtAAP2, AtAAP4 und AtAAP5 sind an der Phloembeladung von Aminosäuren aus *source*-Geweben beteiligt (Hsu *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 1995; Hirner *et al.*, 1998). Weiterhin wird *AtAAP1* im Endosperm und in den Kotyledonen von sich entwickelnden Samen exprimiert und ist somit an der Aminosäureversorgung des Embryos beteiligt (Delrot *et al.*, 2000; Ortiz-Lopez *et al.*, 2000).

1.6 Aminosäuretransporter aus Leguminosen

Während der reproduktiven Wachstumsphase ist der Same die Hauptspeicherform für organischen Stickstoff. Dazu erfolgt die Remobilisierung des in Blättern zwischengespeicherten Stickstoffs (Salon *et al.*, 2001), wobei der meiste Stickstoff aus dem enzymatischem Abbau von Proteinen während Seneszenzprozessen stammt. Bei Leguminosen erfolgt die Nährstoffversorgung der sich entwickelnden Embryonen durch die umgebende Samenschale. Aminosäuren werden über das Phloem und den Funikulus zur Samenschale transportiert und anschließend symplastisch entladen (Offler and Patrick, 1993). Die Aminosäuren müssen daher von der Samenschale in den Apoplasten transportiert werden, bevor sie vom Endosperm und Embryo aufgenommen werden können. Die Entladung der Aminosäuren in den Apoplasten erfolgt durch passive Diffusion mit Hilfe nicht selektiver Poren (deJong *et al.*, 1997). An der Aufnahme der Aminosäuren in den Embryo sind Transferzellen beteiligt. Transferzellen bilden die innere Oberfläche zwischen Samenschale und externer Epidermis der Kotyledonen (Weber *et al.*, 1997b; Tegeder *et al.*, 1999). Sie sind durch sekundäre Zellwandinwüchse charakterisiert, wodurch die Membranoberfläche vergrößert und somit der Nährstofftransport verstärkt wird (Offler *et al.*, 2003).

Biochemische Untersuchungen zeigten, dass auch in Embryonen von Leguminosen Transporter bei der Aufnahme von Aminosäuren beteiligt sind (Bennett and Spanswick, 1983; Lanfermeijer *et al.*, 1990). Für *Pisum sativum* wurden zwei Aminosäuretransporter der AAP-Familie beschrieben, PsAAP1 und PsAAP2. Die Forschergruppe um Tegeder *et al.* (2000) wies eine Expression von *PsAAP1* in der Samenschale, in den embryonalen Transferzellen und den Speicherparenchymzellen sowie in vegetativen Geweben nach. Somit könnte der Transporter eine Rolle bei der Rückgewinnung von Aminosäuren aus dem Apoplasten während des Transports durch die Samenschale spielen. PsAAP1 transportiert ein breites Spektrum an Aminosäuren, darunter saure und neutrale Aminosäuren, Citrullin und die basische Aminosäure Lysin. Sequenzanalysen zeigten eine Ähnlichkeit von *PsAAP1* zu *AtAAP3*, welches in den Wurzeln exprimiert wird (Fischer *et al.*, 1995). Die Expression von *PsAAP2* konnte dagegen mittels Northern Analysen nicht nachgewiesen werden (Tegeder *et al.*, 2000).

Für die Leguminosenpflanze *Vicia faba* sind sieben AAPs bekannt. Aus einer samenspezifischen cDNA-Bank konnten drei vollständige Klone von *Vicia faba* isoliert werden: *VfAAP1*, *VfAAP3* und *VfAAP4* (Miranda *et al.*, 2001). *VfAAP1* transportiert ein breites Spektrum an Aminosäuren mit einer Präferenz für Cystein und stimmt zu über 90% in

der Aminosäuresequenz mit dem Transporter aus Erbse, PsAAP2, überein. Weiterhin wird die Aminosäurepermease vor Beginn der Speicherproteinbiosynthese in sich entwickelnden Embryonen exprimiert, besonders in den Speicherparenchymzellen der Kotyledonen sowie in verschiedenen vegetativen Geweben und in der Samenschale. Der höchste Expressionswert von *VfAAP1* korreliert mit den Transkripten von Speicherproteinen. Somit scheint dieser Transporter eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Aminosäuren für die Speicherproteinbiosynthese zu spielen (Miranda *et al.*, 2001).

1.7 Speicherproteinbiosynthese

Die Samen von Leguminosen synthetisieren und speichern neben Stärke zu einem großen Anteil auch Proteine in den Kotyledonen während der frühen bis späten Entwicklungsphase. Speicherproteine werden in speziellen Geweben, den so genannten Proteinkörperchen, akkumuliert und dienen als Nährstoffquelle an Kohlenstoff, Stickstoff und Sulfat für den wachsenden Keimling. Der Proteingehalt von Erbsensamen liegt je nach Sorte und Umweltbedingungen zwischen 20% bis 25%.

Die Speicherproteine werden auf Grund ihres Extraktionsverhaltens und der Löslichkeit in Wasser (Albumine), in verdünnter Salzlösung (Globuline), im Alkohol/Wasser-Gemisch (Prolamine) und in verdünnter Säure oder Base (Gluteline) in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Hauptspeicherproteine bei den Leguminosen sind Albumine und Globuline, wobei Globuline den höheren Anteil (etwa dreimal mehr) darstellen.

Die 2S Albumine werden anhand ihres Sedimentationskoeffizienten von 2 als eigene Gruppe beschrieben (Youle and Huang, 1981). Trotz Unterschieden in Struktur und Synthese sind alle Albumine kompakt globuläre Proteine mit konservierten Cysteinresten. Auf Grund ihres hohen Gehaltes an Methionin wurden gerade die Albumine für gentechnische Ansätze zur Verbesserung der Aminosäurezusammensetzung des Speicherproteins verwendet (Youle and Huang, 1981; Altenbach *et al.*, 1987; 1992; Tabe *et al.*, 1993).

Die Einteilung der Globuline erfolgt in die 7S Viciline und die 11S Legumine. Beide Gruppen unterscheiden sich anhand ihrer Struktur, die durch posttranslationale Veränderungen entsteht. Globuline enthalten nur geringe Mengen der essentiellen Aminosäuren Cystein und Methionin (Shewry *et al.*, 1995). Aminosäuren, als Grundbausteine der Proteinbiosynthese, werden über das Phloem in das maternale Samengewebe aufgenommen und weiter über den Samenapoplast in den symplastischen Embryo transportiert. Die Synthese der Samenspeicherproteine wird von der Verfügbarkeit und Verteilung von Assimilaten, wie Zuckern und Stickstoff, während der Samenfüllung kontrolliert (Weber *et al.*, 1997a; 1998b; Wobus and Weber, 1999b). Somit kann die Proteinzusammensetzung durch die Nährstoffzufuhr beeinflusst werden. Daher ist es wichtig, dass Aminosäuren und reduzierter Stickstoff für die Proteinbiosynthese verfügbar gemacht werden (Balconi *et al.*, 1997). Mit steigender Konzentration an freien Aminosäuren erhöht sich auch der Speicherproteingehalt in den Kotyledonen (Barratt, 1982).

1.8 Stärkebiosynthese

Erbsenembryonen speichern nicht nur Proteine, sondern akkumulieren über die Hälfte des Kohlenstoffs als Stärke. Die Speicherform Stärke dient dabei als wichtiger Energie- und Kohlenstofflieferant in Pflanzen, aber auch als Nährstoffquelle für Mensch und Tier sowie zur industriellen Verwertung. Stärke ist ein Polysaccharid aus D-Glucose-Einheiten und besteht strukturell aus einem Gemisch von 20-30% Amylose und 70-80% Amylopektin (Smith *et al.*, 1995). Stärke wird in Plastiden synthetisiert und gespeichert. Dabei erfolgt die Akkumulation in photosyntheseaktiven Organen, wie Blättern, vorübergehend in Chloroplasten und in nicht aktiven Geweben für einen längeren Zeitraum in Amyloplasten des Samenspeichergewebes (Okita, 1992).

Saccharose ist das Ausgangssubstrat der Stärkesynthese und wird während der Photosynthese in grünen Blättern gebildet. Pflanzen verwenden vorrangig das Disaccharid als Langstreckentransportform aber auch als Reservekomponente in speziellen Speicherzellen, wie bei Zuckerrohr, Zuckerrüben oder Karotten. Die Stärkeakkumulation im Embryo beginnt während der Zellstreckungsphase und mit Zunahme des Samenfrischgewichtes. Wie in anderen Speicherorganen auch entstehen in den Erbsenkotyledonen Entwicklungsgradienten. Die Zellen der inneren Schicht enthalten größere Stärkekörner als die Zellen der Kotyledonenperipherie und somit auch einen höheren Stärkeanteil pro Volumeneinheit (Boyer, 1981; Smith *et al.*, 1990). In Erbsenpflanzen wird Saccharose in den Blättern oder der Samenhülse synthetisiert (Flinn and Pate, 1970), über das Phloem zum Funikulus transportiert, über diesen vom Samen aufgenommen und dann weiter über die Samenschale verteilt (Hardham, 1976). Von dort aus erfolgt der Transfer apoplastisch in die Kotyledonen und dann mittels carriervermittelten Austausch in die Parenchymzellen (Patrick and McDonald, 1980).

Im Zytoplasma der Zellen wird dann Saccharose entweder hydrolytisch durch eine Invertase zu Hexosezuckern, Glucose und Fruktose, oder durch die Saccharose-Synthase (Susy) zu UDP-Glucose und Fruktose gespalten (Kavakli *et al.*, 2000), wobei das Enzym Susy einen größeren Anteil im Saccharosestoffwechsel hat (Edwards and ap Rees, 1986). Die entstandenen Hexosezucker oder die UDP-Glucose werden in der Glycolyse zu Glucose-1-Phosphat, dann zu Glucose-6-Phosphat und schließlich zu den Triosephosphaten, Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), umgewandelt. Die Hexosephosphatzucker, Glucose-1-Phosphat und Glucose-6-Phosphat, werden mittels Hexose-Phosphat-Translokatoren in die Amyloplasten importiert (Tetlow *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu erfolgt der Transport von Triosephosphaten in die Chloroplasten durch Triosephosphat-Translokatoren (Heldt *et al.*, 1991). Experimente mit ^{14}C markierten Zuckern zeigten, dass Amyloplasten der Erbse vorwiegend [^{14}C]-Glucose-6-Phosphat in Stärke umwandeln und deshalb eine Präferenz für die Aufnahme von Glucose-6-Phosphat mittels Glucose-6-Phosphat-Translokatoren besteht (Hill and Smith, 1991; Tetlow *et al.*, 1994).

Innerhalb der Amyloplasten wird Glucose-6-Phosphat durch das Enzym Phosphoglucomutase zu Glucose-1-Phosphat und danach durch die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase unter ATP-Verbrauch zu ADP-Glucose verstoffwechselt (Smith *et al.*, 1991). Die Forschergruppe um Akazawa (Pozueta-Romero *et al.*, 1991) erklärten erstmalig

einen alternativen, nur bei monokotylen Pflanzen vorkommenden, Transportweg für Kohlenstoff in die Plastiden. Dabei wird ADP-Glucose direkt im Zytosol synthetisiert und dann mit Hilfe von Adenylat-Translokatoren durch die Plastidenmembran transportiert. Im Endosperm von Mais und Gerste wurde sogar die höchste Aktivität der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase im Zytosol ermittelt (Denyer *et al.*, 1996; Thorbjornsen *et al.*, 1996).

Durch die Aktivität von Stärke-Synthasen und Stärke-Verzweigungsenzymen erfolgt letztlich die Strukturbildung zu Amylopektin- und Amylose-Polymeren. Es existieren zwei verschiedene Klassen der Stärke-Synthasen in Plastiden: die löslichen (SSS) und die granulärgebundenen Stärke-Synthasen (GBSS). Sie katalysieren die Übertragung eines Glycosylrestes von ADP-Glucose auf das nicht reduzierende Ende eines schon existierenden linearen Amylosestranges, wobei eine α -1,4-glykosidische Bindung geknüpft wird. Danach werden weitere Glucosereste nacheinander angehängt. Die Bildung des verzweigt-kettigen Amylopektins erfolgt durch Stärke-Verzweigungsenzyme. Diese Enzyme spalten die α -1,4-glykosidische Verknüpfung am Amylosestrang und verbinden das getrennte Ende etwa alle 20 Monomere weiter mit einem Glucosemolekül am C6-Atom über eine α -1,6-glykosidische Verknüpfung, wodurch Seitenverzweigungen im Stärkemolekül entstehen (Smith *et al.*, 1991; 1995; Wang *et al.*, 1998b).

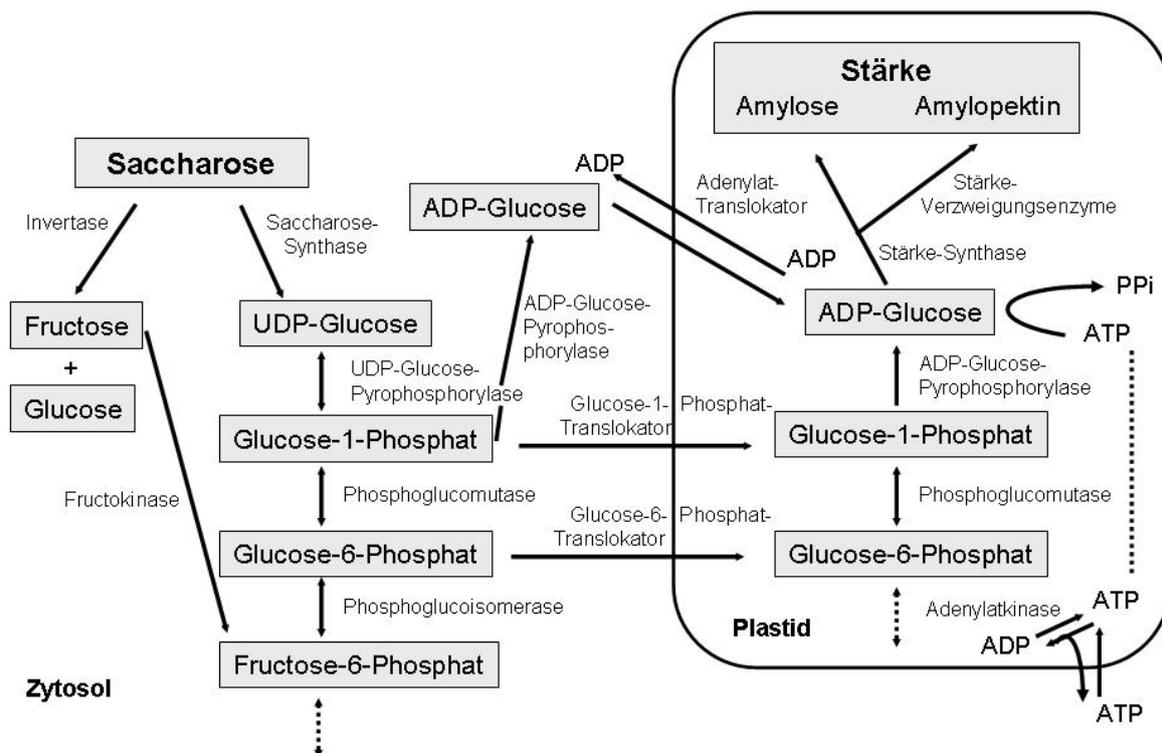


Abb. 1.3 Schema der Stärkebiosynthese. Die Saccharose, als Ausgangsstoff der Stärkebildung, wird im Zytosol über mehrere Zwischenschritte zu Glucose-1-Phosphat und Glucose-6-Phosphat verstoffwechselt, die dann über Hexose-Phosphat-Translokatoren in die Plastiden aufgenommen und durch die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP) zu ADP-Glucose umgewandelt werden. Die Strukturbildung zu Amylopektin- und Amylose-Polymeren erfolgt durch Stärke-Synthasen und Verzweigungsenzyme. Im Endosperm von Mais und Gerste kann ADP-Glucose direkt im Zytosol gebildet und weiter über Translokatoren in die Plastiden transportiert werden, da Monokotyle neben plastidären auch zytosolische Formen von AGP besitzen.

1.9 ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP)

Die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP) kommt sowohl in Chloroplasten als auch in Amyloplasten höherer Pflanzen vor und katalysiert die Reaktion von D-Glucose-1-Phosphat und ATP zu Pyrophosphat und ADP-Glucose. In den Plastiden ist diese Reaktion irreversibel, da eine anorganische Pyrophosphatase das Reaktionsprodukt Pyrophosphat hydrolysiert und somit gleich verwertet (Smith *et al.*, 1990). Die gebildete ADP-Glucose dient weiter als Substrat für die Stärke-Synthasen. AGP ist in allen stärkesynthetisierenden Organen aktiv und somit ein Schlüsselenzym der Stärkebiosynthese (Preiss *et al.*, 1991; Okita, 1992). Im Endosperm von monokotylen Pflanzen, wie z.B. in Mais, Reis, Weizen und Gerste, wurden neben der plastidären auch zytosolische Isoformen nachgewiesen (Thorbjornsen *et al.*, 1996).

Das AGP-Enzym von höheren Pflanzen ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten, die anhand ihres Molekulargewichtes (50-56 bzw. 51-60kDa) und immunologischer Eigenschaften unterschieden werden (Preiss *et al.*, 1991). Mittlerweile wurden cDNA-Sequenzen, die für große und kleine Untereinheiten kodieren, aus verschiedenen Organismen und Geweben isoliert z.B. aus Blättern von Arabidopsis, Endosperm von Mais, Weizen und Gerste, Kartoffelknollen sowie Samen von Reis (Preiss *et al.*, 1991). Anhand des Sequenzvergleiches erfolgte dann die Einteilung in drei Typen: (1) die kleine Untereinheit, die sowohl in Photosynthese- als auch in Nichtphotosynthesegewebe exprimiert wird, (2) eine große Untereinheit in photosyntheseaktiven Geweben und (3) eine große Untereinheit, die in nichtphotosynthetisch aktiven Geweben exprimiert wird. Für Erbsenpflanzen konnten bisher drei cDNA-Klone identifiziert werden, von denen zwei für die kleine Untereinheit und der dritte für die große Untereinheit kodieren (Burgess *et al.*, 1997).

AGP von photosyntheseaktiven Geweben, auch von einigen nicht aktiven Geweben, wird durch 3-Phosphoglycerinsäure (3-PGA) aktiviert und durch Pyrophosphat (PPi) inhibiert (Ghosh and Preiss, 1966). Dabei gilt das Verhältnis von PPi und 3-PGA als Regulator der Stärkesynthese in grünen Geweben. In Embryonen von Erbse und *Vicia faba* aber auch im Endosperm von Gerste und Weizen scheinen die Enzyme anders reguliert zu werden, da sie gegenüber PPi und 3-PGA unempfindlich sind (Hylton and Smith, 1992; Kleczkowski *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1995). Mutanten mit Defekten im AGP-Enzym von Mais und Erbse zeigten eine drastische Reduzierung des Stärkegehaltes im Samen (Dickinson and Preiss, 1969; Smith *et al.*, 1989). Zusätzlich bewirkte die Bereitstellung an Kohlenstoffgerüsten eine Erhöhung der Speicherproteingehalte (Perez *et al.*, 1993; Casey *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2000). Im Endosperm von Reis und Kartoffelknollen korrelierten die mRNA-Gehalte von AGP mit der Akkumulation von Stärke (Perez *et al.*, 1975; Okita *et al.*, 1990). Als Schlüsselenzym der Stärkebiosynthese kontrolliert und reguliert AGP wahrscheinlich die Bildung der Stärke.

1.10 Regulation der Stärkebiosynthese

Durch Mutationen oder genetische Modifikationen veränderte Stoffwechselwege bieten gute Möglichkeiten, um Effekte auf die Syntheserate und Strukturbildung von Metaboliten, wie bei der Stärkebiosynthese, zu analysieren. Anhand der Daten lassen sich Kontrollkoeffizienten

errechnen, die generell Erkenntnisse über den Einfluss des jeweiligen Enzyms auf den Stoffwechsel oder die Metabolitkonzentration geben (Sen, 1996). Mittlerweile existiert eine Vielzahl von Mutanten verschiedener Pflanzenspezies mit Enzymdefekt im Stärkestoffwechsel. Obwohl sie unterschiedliche Defekte und Auswirkungen auf den Metabolismus haben, weisen die Mutationen doch einen gemeinsamen Phänotyp auf. Die verminderte Bildung des Speicherproduktes Stärke führt zu einer Akkumulation von löslichen Zuckern, was wiederum eine verstärkte Wasseraufnahme und die Ausbildung des schrumpeligen Samenphänotyps nach sich zieht (Weber *et al.*, 2000).

Der Verlust der Enzymfunktion des Stärke-Verzweigungsenzyms SBE1 durch eine Mutation im *r* Locus bewirkte eine drastische Verringerung des Enzymgehaltes in Erbsenembryonen (Lloyd *et al.*, 1996). Dies beeinflusste nicht nur die Struktur der Stärke, sondern führte auch zu einer reduzierten Syntheserate, obwohl SBE1 nicht den entscheidenden Syntheseweg im Stärkestoffwechsel katalysiert.

Die plastidäre Stärkesynthese über AGP benötigt Energie in Form von ATP. In den Blättern wird ATP über Photophosphorylierung direkt in Chloroplasten gebildet. In nicht photoautotrophen Geweben erfolgt die ATP-Bildung über die mitochondriale Atmungskette und wird dann in die Amyloplasten transportiert. Mit Hilfe molekularer Ansätze konnten die Adeninnucleotidspiegel in transgenen Kartoffelknollen manipuliert und dadurch die Stärkegehalte verändert werden (Regierer *et al.*, 2002). Die Bestimmung der Kontrollkoeffizienten zeigte, dass drei Enzyme das Gleichgewicht des Stärkestoffwechsels am stärksten verschoben: die Hexokinase, AGP und die plastidäre Pyrophosphatase. Für zwei dieser Enzyme sind bereits seit längerem regulatorische Eigenschaften bekannt. So wird die Hexokinase durch ihre Reaktionsprodukte Hexosephosphat und ADP inhibiert. AGP wird durch PPi gehemmt und durch Phosphoglycerinsäure (3-PGA) aktiviert.

Der limitierende Schritt der Stärkebiosynthese ist die Bildung von ADP-Glucose aus Glucose-1-Phosphat und ATP, katalysiert durch AGP. Wahrscheinlich übt dieses Enzym die stärkste Kontrolle auf den Stärkestoffwechsel aus (Stark *et al.*, 1992). Dies wurde an verschiedenen AGP-Mutanten, wie in Mais (*sh2* und *bt2*; Dickinson and Preiss, 1969) und in Erbse (*rb* Locus; Smith *et al.*, 1989), gezeigt. Bei Erbsenembryonen führten Mutationen im *rb* Locus zu einer starken Verringerung der AGP-Enzymaktivität und des Stärkegehaltes (Hylton and Smith, 1992). Weiterhin veränderte sich das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin.

Veränderte Gehalte an ADP-Glucose beeinflussen die Produktion von Amylose in Pflanzen (Van den Koornhuysen, 1996). Die Stärke-Synthase GBSS ist vorrangig für die Bildung von Amylose und die SSS-Isoform für die Amylopektin-Produktion verantwortlich (Smith *et al.*, 1997). Veränderungen der ADP-Glucose-Konzentration in den Plastiden wirken sich stärker auf die GBSS als auf die lösliche Isoform aus, basierend auf einer niedrigeren Enzymaffinität von GBSS zu ADP-Glucose (MacDonald and Preiss, 1985; Delrue *et al.*, 1992).

Die meisten Samenmutationen haben nicht nur Einfluss auf das embryonale sondern auch auf das maternale Gewebe. Zum Beispiel führt die *rb* Mutation in Erbsensamen zu einem verringerten Stärkegehalt sowie Samentrockengewicht im Embryo und zusätzlich zu einem reduzierten Wachstum der Samenschale (Rochat *et al.*, 1995). Bei der *rug3* Mutante kommt

es zur veränderten Aktivität der plastidären Phosphoglucomutase (PGM) und zur verringerten Stärkeakkumulation im Embryo als auch in den Blättern (Harrison *et al.*, 1998).

Genetische Modifikationen von Stoffwechselwegen stellen eine weitere und aussagekräftige Methode zur Analyse der Samenentwicklung dar. So wurden transgene Pflanzen von Weizen (Meyer *et al.*, 2004; Smidansky *et al.*, 2007), Kartoffeln (Müller-Röber *et al.*, 1992; Okita, 1992) und *Vicia narbonensis* (Weber *et al.*, 2000; Rolletschek *et al.*, 2002) generiert, die vorrangig eine verstärkte Expression oder Inhibierung von AGP im Samen bzw. Knollen verursachen. In Kartoffeln, die mit einem *antisense* Konstrukt der großen Untereinheit von AGP transformiert wurden, verringerte sich die Enzymaktivität und der Stärkegehalt (Müller-Röber *et al.*, 1992; Okita, 1992). Der gleiche Effekt konnte für die *antisense*-Inhibierung der kleinen Untereinheit von AGP in Leguminosen gezeigt werden (Weber *et al.*, 2000; Rolletschek *et al.*, 2002). Dagegen akkumulierten transgene Kartoffelknollen, die AGP aus *Escherichia coli* konstitutiv exprimierten, deutlich mehr Stärke (Stark *et al.*, 1992).

Aus dem generellen Zusammenhang zwischen AGP-Aktivität und Stärkeakkumulation lässt sich die Kontrollfunktion dieses Enzyms auf den Stärkestoffwechsel ableiten. In Blättern von Arabidopsis oder *sink*-Organen, wie Kartoffelknollen, wurden hohe Kontrollkoeffizienten gefunden (Neuhaus and Stitt, 1990; Sweetlove *et al.*, 1999). Dagegen wurde in Samen von Leguminosen nur ein Kontrollkoeffizient unter 0,1 ermittelt (Denyer *et al.*, 1995a; Rolletschek *et al.*, 2002).

1.11 Zielstellung der Arbeit

Aufgrund ihres hohen Speicherproteingehaltes stellen die Samen der Leguminosen eine wichtige pflanzliche Proteinquelle dar. In Europa werden Erbsenpflanzen vor allem für die tierische Ernährung angebaut. Die Erhöhung der Proteinmenge sowie die Verbesserung der Proteinqualität sind daher wünschenswert und von großer züchterischer Bedeutung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Gesamtanteil an Speicherproteinen in den Kotyledonen der Kulturpflanze Erbse (*Pisum sativum*) gesteigert werden. Dazu wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt, die mittels genetischer Modifikationen gezielt in Prozesse des Samenstoffwechsels eingreifen und letztlich zu einer Akkumulation von Reservestoffen führen sollten: (1) Die gesteigerte Expression der Aminosäurepermease 1 aus *Vicia faba* (VfAAP1) könnte eine verstärkte Aminosäurezufuhr in die Erbsenkotyledonen bewirken und schließlich zu einer Erhöhung der Stickstoff- und Proteingehalte führen (Rolletschek *et al.*, 2005). (2) Durch einen RNAi-vermittelten *loss of function* Ansatz sollte die Enzymaktivität der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP) inhibiert und dadurch die Stärkesynthese reduziert werden, was sich letztlich in einem gesteigerten Speicherproteingehalt auswirken könnte (Perez *et al.*, 1993; Casey *et al.*, 1998).

Als erstes Ziel sollten transgene Erbsenpflanzen regeneriert werden, die stabil das jeweilige Transgen VfAAP1 bzw. AGP über mehrere Generationen exprimieren. Die Transformation der Erbsenpflanzen mit den jeweiligen Konstrukten wurde bereits in einem Vorläuferprojekt von F. Hosein (IPK, Gatersleben) durchgeführt. Darauf aufbauend erfolgte die Selektion stabiler homozygoter Linien mit reduzierter AGP-Transkriptmenge. Für die Überexpression

von *VfAAP1* konnte die bereits regenerierte homozygote Linie AAP14/10 verwendet werden. Zusätzlich war geplant, diese Linie in Freilandversuchen zu testen und somit die erhaltenen Ergebnisse unter Gewächshausbedingungen zu bestätigen.

Anhand der regenerierten stabilen Pflanzenlinien sollte als nächstes eine ausführliche Charakterisierung der ausgeprägten Samenphänotypen erfolgen. Dazu sollten die Gehalte und die Zusammensetzung einzelner Speicherstoffkomponenten im Samen bestimmt werden. Dies könnte Aufschluss über die Effektivität der gewählten transgenen Ansätze hinsichtlich einer Steigerung der Speicherproteingehalte geben. Bisherige Kenntnisse über Aminosäuretransporter bezogen sich überwiegend auf Untersuchungen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Die *VfAAP1*-Überexpression in *P. sativum* könnte neue Aspekte über die spezifische Transporterfunktion von *VfAAP1* während der Samenreifung und den limitierenden Einfluss auf die Akkumulation von Speicherproteinen liefern.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte in ausführlichen Analysen der veränderte N- und C-Haushalt der beiden transgenen Modelle und daraus resultierende Einflüsse sowie Interaktionen zu anderen Stoffwechselwegen untersucht werden. Kulturpflanzen wie Erbse, die auf Ertrag gezüchtet wurden und über weitaus größere Stoffflüsse und *pool*-Größen bestimmter Metabolite verfügen, als z.B. *Arabidopsis*, sind wichtige Modelle zur Untersuchung des Samenstoffwechsels, der Samen-*sink*-Stärke sowie effektiver Verteilungsprozesse in der Pflanze. Die Kombination aus transkriptionellen (Oligonucleotid-Microarray Expressionsanalyse) und metabolischen (GC-MS Analyse) Methoden schien zur Untersuchung der komplexen Samenphänotypen bestens geeignet (Cossegal *et al.*, 2008; Usadel *et al.*, 2008). Dadurch sollten neue Erkenntnisse bezüglich regulatorischer Mechanismen während der Samenentwicklung aber auch kompensatorischer Effekte, bedingt durch die gesteigerten Gehalte an N und C im Samen, gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 MATERIAL

2.1.1 Pflanzenmaterial

Nicotiana tabacum L. cv SNN

Pisum sativum L. cv Eiffel

2.1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli

DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZ ΔM15) hsd17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
XL1 Blue	<i>supE44 hsd17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac⁻ F'[proAB+ lacI^q lacZ ΔM15 Tn10 (tet^r)]</i> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
One Shot [®] TOP10	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i> (Invitrogen, Karlsruhe)

Agrobacterium tumefaciens

EHA 105	C58 pTiBo542, T-region::aph, Km(S), A281, super-virulent (Hood <i>et al.</i> , 1993)
---------	--

2.1.3 Plasmide und Vektoren

pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Amp ^r (Invitrogen, Karlsruhe)
pCR [®] 4-TOPO [®]	Amp ^r (Invitrogen, Karlsruhe)
pUC18/19	Amp ^r (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pBluescript II SK(-)	Amp ^r (Stratagene, Heidelberg)
PZP200	Spec ^r (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994)
pCambia3300	Spec ^r , Basta [®] (Original von Cambia GPO Box 3200, Canberra, ACT 2601, Australia)
pBAR	Spec ^r , Basta [®] (von Dr. I. Saalbach, IPK-Gatersleben, zur Verfügung gestellt)

2.1.4 Oligonucleotide

Die folgenden synthetisch hergestellten Oligonucleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Die Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung dargestellt:

AAPf1	AGA ACA CTC TAC AGA AGC TGC
AAPr1	TTG CGC GTC AAC TTG GTA TGC
LegF	TTG ATT CAT TCG ATG GAG GAG G
AAPr1	TTG CGC GTA AAC TTG GTA TGC
AtSUC2	CTA TGC CTC AAG GCT CTC TTA
VfAAP1	CAC CAA TTG TGT ATC CTA CTG
ihpAGPf	CGT TGC CAA TGG ATG AAA AG
ihpAGPr	ACT GCT TTC GGT TTG ATG A

2.1.5 Primer für RT-PCR und qRT-PCR

AGPF	TGT TGA AGT TCT TGC TGC T
AGPr1	CAA TGT CTT CCC AGT AGC C
RT_VfAAP1a	TTG CTA ACG CCG CTC TCA TAA TTC ATC TTG
RT_VfAAP1b	CAC TGA TCC AAC AAA AGC CAC AAC TGA TAC
RT_PsActin_1156a	TGT CTG GAT CGG AGG CTC TA
RT_PsActin_1561b	AGG CCA ATC AGA ACA TTG GA
qRT3'VfAAP1_a	TTG TCA CCA GGA AAC TTA
qRT3'VfAAP1_b	TGA GAG CGG CGT TAG CAA
qRT3'PsActin_a	GCT CTA TTT TGG CAG CCC TCA
qRT3'PsActin_a	GCC TTT GCA ATC CAC ATC TGT

2.1.6 Medien

Die *E.coli*-Bakterien wurden auf LB-Medium bzw. SOC-Medium nach Sambrook et al. (1989) mit dem entsprechendem Antibiotikum zur Selektion angezogen. Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte auf YEB- oder CPY-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums. Die festen Medien enthielten zusätzlich 1,5% Agar.

LB	1% NaCl, 0,5% Trypton, 0,5% Hefeextrakt (pH 7,4)
SOC	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl, 20mM Glucose, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ (pH 7,4)
YEB	0,5% Fleischextrakt, 0,5% Pepton, 0,5% Saccharose, 0,1% Hefeextrakt, 2mM MgSO ₄
CPY	0,1% Hefeextrakt, 0,5% pankreatisches Pepton, 0,5% Saccharose; 20g Difco; 200mM MgSO ₄ ·7H ₂ O

Für die Kultivierung der Pflanzen unter sterilen Bedingungen wurden folgende Medien verwendet:

B5	207mg/l KNO ₃ , 102mg/l CaCl ₂ ·2H ₂ O, 50mg/l MgSO ₄ ·7H ₂ O, 13mg/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15mg/l NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 1x MS Mikrosalze (Murashige and Skoog, 1962), 1x B5 Vitamine (Gamborg <i>et al.</i> , 1968), 3% Saccharose, 10mg/l Glutathion, 800mg/l Glutamin, 1mg/l Adenin, 100mg/l Serin, 1mg/l 2,4D-Glucose, 0,2mg/l Kinetin, 2,5mM MES, PPT (pH 5,8)
P1	1x MS Mikro-und Makrosalze, 1x B5 Vitamine, 3% Saccharose, 2mg/l BAP, 2mg/l NAA, 2,5mM MES, 400mg/l Ticarcillin, 10mg/l PPT (pH 5,8)
MS	1x MS Mikro-und Makrosalze, 1x MS Vitamine, 3% Saccharose, 1mg/l BAP, 0,1mg/l NAA, 300mg/l Ticarcillin, 10mg/l PPT, MES (pH 5,8)
MS^{1/2}	1x MS Mikrosalze, 0,5x MS Makrosalze, 1x MS Vitamine, 1% Saccharose (pH 5,7)
MS4	1x modifizierte MS4 Mikro-und Makrosalze, 1x MS Vitamine, 2% Saccharose, NH ₄ NO ₃ , 4mg/l BAP, 100mg/l myo-Inositol, 0,1mg/l IBS, 400mg/l Ticarcillin, 10mg/l PPT, 10mM MES (pH 5,8)

2.1.7 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Kits

Agar Scientific (Essex, CM24, UK)	Paraformaldehyd
Ambion (Austin, TX, USA)	TURBO DNFree™ (DNase)
Applied Biosystems (Foster City, USA)	Power SYBR® Green PCR Master Mix
BASF (Ludwigshafen am Rhein)	Perfekthion
BioRad (Richmond, CA, USA)	30% Acrylamid/Bis
Biozym (Oldendorf)	Saekem LE Agarose
Difco (Detroit, MI, USA)	Bacto®-Agar, Bacto®-Trypton, Bacto®-Pepton, Fleischextrakt
Duchefa (Amsterdam, Niederlande)	Murashige Skoog Vollmedium Festsubstanz, Kanamycin, PPT, Spectinomycin, Ticarcillin
Dynal (Oslo, Norwegen)	Dynabeads® mRNA Purification Kit
Ferak (Berlin)	Kristallviolett
Fermentas (St. Leon Rot)	GeneRuler™ DNA Ladder Mix, T4 DNA-Ligase Restriktionsendonucleasen, Rapid DNA Ligation Kit, Shrimp Alkaline Phosphatase
Fluka (Buchs, Schweiz)	DEPC, Aminosäuren, Fuchsin (basisch), Propylenoxid, Amylose, Amylopektin
GE Healthcare (Braunschweig)	[α ³²]dCTP, RediPrimell Labeling System, Restriktionsendonukleasen
Hoechst (Frankfurt am Main)	Basta®
Invitrogen (Karlsruhe)	Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase-Assay Kit, Superskript® III First-Strand Synthesis

	System for RT-PCR Kit, TOPO TA Cloning [®] Kit, EDTA
Macherey-Nagel (Düren)	Nucleospin [®] Extract II
Merck (Darmstadt)	Di-Natriumhydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumsulfat, Polyethylenglykol, Acetanilid
Millipore (Bedford, MA, USA)	Microcon YM-30 Zentrifugalfilter
Polyscience AG (Cham, Schweiz)	SPURR Resin
Qiagen (Hilden)	Qiagen Plasmid Mini Kit, Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiaquick Nucleotide Removal Kit, Qiaquick PCR Purification Kit, Taq DNA-Polymerase Kit, Qiaprep Spin Miniprep Kit, DNeasy Plant Mini Kit
Roche (Basel, Schweiz)	BSA, dNTPs, Rapid DNA Ligation Kit, RNase, ATP, NAD, Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, EGTA, UDP-Glucose-Dehydrogenase, Hexokinase, Fructosidase, Phosphoglucomutase, PMSF, Amyloglucosidase, Amylase, Natriumpyrophosphat, Proteinase K, Taq Polymerase, Restriktionsendonucleasen
Roth (Karlsruhe)	Euparal, Formaldehyd, Chloroform, Phenol, Glycerin, Phenol/Chloroform, Isopropanol, Ethanol, Methanol, 2-Propanol, Butanol, Hexan, Essigsäure, Salzsäure, Acetonitril, MOPS, DMSO, SDS, DTT, Natriumdihydrogenphosphat, Glycin, Tris, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumcitrat, Ethanolamin, Diethanolamin,
Serva (Heidelberg)	BICINE, Ovalbumin, Aminosäuren
Sigma (Louis MO, USA)	Aminosäuren, Glutaraldehyd, N-Lauryl-Sarcosin, 4-Nitrophenylphosphat, Norleucin, ADP-Glucose, HEPES
Zeneca Agro (Bad Homburg)	Karat

2.1.8 Speziallabormaterial

Applied Biosystems (Foster City, USA)	Optical Adhesive Covers, Abdeckfolien
Fujifilm (Düsseldorf)	Imaging Plate BAS-MS 2040
GE Healthcare (Braunschweig)	Nylonmembran (Hybond N ⁺)
G. Kisker GbR (Steinfurt)	Quali PCR Platten 384 Loch
Nalgene (Rochester NY, USA)	Syringe Filters 0,2µm, 0,45µm (Sterilfilter), Kryokonservierungsröhrchen
Nunc (Roskilde, Dänemark)	96 Loch Mikrotiterplatten (Immuno Plate, Maxisorp)

Schleicher und Schüll (Dassel) Nitrocellulosemembran Protran[®], Gel-Blotting-Papier

2.1.9 Geräte und Apparaturen

Applied Biosystems (Foster City, USA)	Thermocycler 7900HT
Biometra (Göttingen)	Hybridisierungsöfen
Brand (Wertheim)	Transferpipette [®] -8
Christ (Osterode)	Gefriertrocknung Alpha1-4
Elementar (Hanau)	Elementaranalysator Vario EL III
Eppendorf (Hamburg)	Thermomixer comfort, Thermomixer 5436/5437, Tischzentrifuge 5415R, Mastercycler „ep gradient“
GFL (Burgwedel)	Schüttelinkubator, Präzisionspipette, Wasserbad
Gilson (Abimed Langenfeld)	Präzisionspipetten
Heracus Holding GmbH (Hanau)	Brutschränke, Zentrifuge Sorvall RC5C Plus, Biofuge fresco, Vortex Genie 2 [™]
Kontron Ag (Eching/München)	Uvikon Spectrophotometer 922
Liebherr (Ochsenhausen)	Kühlschränke, Tiefkühlschränke
Peqlab (Erlangen)	Horizontalelektrophoresen
Perkin Elmer (New Jersey, USA)	Thermocycler 9700
Raytest (Straubenhardt)	Phosphorimager FLA 5100, Eraser
Retsch (Haan)	TissueLyser MM2000
Sanyo (Bad Nenndorf)	Ultratiefkühlschränke
Sartorius Ag (Göttingen)	Analysenwaage
Schütt (Göttingen)	Vortex Genie 2 [™] ,
Stratagene (Heidelberg)	Geldokumentation Eagle Eye [™] II, PicoFuge [™] , UV Stratalinker [®] 2400
Uniequip (Martinsried)	Speed Vac Univapo100H
Zeiss (Jena)	Zeiss Axiovert 135 Lichtmikroskop, AxioCam

2.1.10 Software, Datenbanken und interaktive Webprogramme

Software

Adobe Systems GmbH (München)	Adobe Photoshop 7.0, Adobe Reader 7.0
Applied Biosystems (Foster City, USA)	SDS 2.2.1 Sequence Detection System, Primer Express 2.0
Corel GmbH (Unterschleißheim)	CorelDraw Graphics Suite X3
DNASTAR Inc. (Madison, WI, USA)	Lasergene [®] Sequence Analysis
EndNote, Thomson Reuters (USA)	EndNoteX2
Microsoft Corporation (USA)	Microsoft Office [®] 2003
Raytest (Straubenhardt)	TINA 2.09, AIDA Image Analyzer v 4.06
Systat Software GmbH (Erkrath)	SigmaPlot 9.0

Datenbanken und interaktive Webprogramme

BLAST - Basic local alignment search tool (Altschul *et al.*, 1990)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

CR-EST - Crop-EST, öffentliche Datenbank mit Zugang zu Sequenz-, Klassifizierungs-, Clustering- und Annotationsdaten von Kulturpflanzen EST Projekten des IPK (Künne *et al.*, 2005) <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/>)

KEGG - Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes

<http://www.genome.jp/kegg/>

NCBI – National Center for Bio**te**chnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ArrayLIMS - Laboratory Information Management System

Speicherung und Verwaltung von Microarray-Experimentdaten

<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/arraylims/cgi-bin/start.cgi>

EMMA – Plattform für stetige Speicherung sowie automatischer und manueller Analyse von Microarray-Daten über Web-Interface

<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/emma/cgi-bin/login.cgi>

SAMS - Sequencing Analysis and Management System

Automatische und manuelle Analyse von Sequenzdaten über Web-Interface

https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/sams/cgi-bin/sams_login.cgi

2.2 METHODEN

2.2.1 Klonierung, Transformation und Sequenzierung

Die Standardmethoden, wie Bakterienanzucht, Restriktionsspaltung, Klonierungsschritte, DNA-Gelelektrophorese und Bestimmung der DNA-Konzentration, wurden wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt. Zuerst erfolgte die Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte der Größe nach auf einem Agarosegel mit anschließender Reinigung mit dem „Qiaquick Gel Extraction Kit“ laut Herstelleranleitung. Dann wurden die gereinigten Fragmente mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten, mit dem „PCR Purification Kit“ erneut gereinigt und für die Ligation unter Verwendung des „Rapid Ligation Kit“ (Fermentas) eingesetzt. Die Subklonierung der amplifizierten PCR-Produkte wurde mit dem „TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing“ (Invitrogen) laut der Herstelleranleitung durchgeführt. Für die anschließende Transformation wurde der im Kit enthaltene Bakterienstamm TOP10 verwendet. Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Qiaprep Spin Miniprep Kit“. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und mit „Shrimp Alkaline Phosphatase“ vor der Ligation dephosphoryliert. Die Transformation der *E.coli*-Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock-Methode (Cohen *et al.*, 1972) und die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* nach der *freeze-thaw* Methode (Höfgen and Willmitzer, 1988). Die DNA-Sequenzierung wurde am IPK Gatersleben durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Lasergene® Sequence Analysis (DNASTAR).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte, Plasmide und transgenen Pflanzen wurden bereits in einem Vorläuferprojekt hergestellt. Die dazu notwendigen Arbeiten führte F. Hosein (IPK, Gatersleben) durch.

2.2.2 Pflanzentransformation und Selektion

Transformation von *Nicotiana tabacum*

Die Transformation von Tabakpflanzen diente zum Testen der Konstrukte in dikotylen Pflanzen, bevor diese für die Transformation in Erbsenpflanzen eingesetzt wurden. Die Tabaktransformation erfolgte nach der Blattscheiben (*leaf disk*)-Methode. Da Agrobakterien bei Pflanzen eine Wundinfektion hervorrufen, wurden sterile Tabakblätter 4 Wochen alter Pflanzen verwundet, indem die Hauptrippe und der Blattrand mit einem Skalpell entfernt und die Blätter in 1x1cm große Stücke (*leaf disk*) geschnitten wurden. Danach wurden die Blattscheiben mit der Blattunterseite auf MS-Medium für zwei Tage bei 21°C unter Schwachlicht vorkultiviert. 0,5ml einer Agrobakterien-Übernachtskultur, die den entsprechenden Vektor für die Pflanzentransformation enthielt, wurden in 10ml flüssigem MS-Medium resuspendiert und die Blattscheiben, nach 30min Inkubation in dieser Agrobakterien-Suspension, für 2-3 Tage bei 21°C unter Schwachlicht auf MS-Medium kokultiviert. In der anschließenden Regenerationsphase wurden die Blattscheiben auf Selektionsmedium (MS, 10mg/l PPT, 200mg/l Ticarcillin) überführt und bei 24°C im Schwachlicht kultiviert. Danach erfolgte alle zehn Tage eine Umlage der Explantate auf frisches MS-Medium. Regenerierte Sprosse wurden bei einer Höhe von 1cm abgeschnitten, bis zur Wurzelbildung auf MS-Medium (10mg/l PPT, 200mg/l Ticarcillin) im Lichtschrank bei 21-24°C weiterkultiviert und dann in Erde überführt.

Transformation von *Pisum sativum*

Die Agrobakterium-vermittelte Erbsentransformation basierte auf einem modifiziertem Protokoll der von Schroeder *et al.* (1993) beschriebenen Methode mit ergänzenden Veränderungen in Rolletschek *et al.* (2002). Dazu erfolgte die Ernte unreifer Hülsen 2-5 Tage nach Erreichen des maximalen Frischgewichtes. Die Hülsen wurden jeweils für 15min in 70% Ethanol und 15min in 50% Domestos sterilisiert und anschließend fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen. Danach wurden die Samen aus den Hülsen entfernt, in flüssiges B5-Medium überführt und für 3 Tage im Kühlschrank vorkultiviert. Die Samenschale wurde von den Kotyledonen entfernt und dann die Explantate für die Transformation aus der Embryoachse geschnitten. Dazu wurde das Wurzelende abgetrennt und die Bereiche des Epikotyls und des Apikalmeristems, die so genannte Plumula, in feine Längsschnitte geteilt. Die Schnitte wurden für 30min in der Agrobakterien-Suspension inkubiert, auf festes B5-Medium übertragen und für 3 Tage bei 21°C und 16h Schwachlicht kokultiviert. Danach erfolgte das Waschen der Schnitte mit flüssigem B5-Medium. Zur Kallusbildung wurden die Explantate für eine Woche auf P1-Medium mit PPT (10mg/l) gegeben und nach 15 Tagen für die Sprossbildung auf MS4-Medium mit PPT (10mg/l) überführt. Alle drei Wochen (3-4 Mal) wurde das MS4-Medium erneuert. Primär gebildete Sprosse aus bereits vorhandenen

Meristemen wurden entfernt und verworfen. Nach einem Zeitraum von etwa zwei Monaten wurde die Konzentration von PPT im Medium auf 5mg/l herabgesetzt. Schließlich wurden die selektionsresistenten regenerierten Sprosse abgeschnitten und *in vitro* auf Wurzelstöcke mit einer Mindestlänge von 0,5cm gepfropft, die von 5-7 Tage alten im Dunkeln angezogenen *Pisum sativum* Keimlingen stammten. Nach etwa zehn Tagen erfolgte dann das Auspflanzen der gepfropften Pflanzen in Erde und die weitere Anzucht in der Klimakammer.

Zur Selektion von transgenen Pflanzen wurde der so genannte Basta®-Blatt-Test durchgeführt. Dazu wurden einzelne Blätter der transformierten Pflanzen mit Erreichen des 4-6 Knotenstadiums mit einer 0,5%-igen Lösung des Herbizids Basta® (Hoechst) bestrichen und Basta® -resistente Pflanzen als transgenpositiv selektiert.

2.2.3 Reprimierung der Genexpression durch RNA-Interferenz (RNAi) Mechanismus

Durch den Mechanismus des RNA *interference* (RNAi) kann die Expression von Genen in Zellen posttranskriptionell gehemmt werden. Das so genannte *post transcriptional gene silencing* (PTGS) wird durch exogene doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelöst, die von einem Proteinkomplex (Dicer) erkannt, in kleine, meist 21-23bp lange, siRNA-Moleküle (*small interfering RNA*) gespalten und in einen RNA *induced silencing complex* (RISC) eingebaut werden. Diese kurzen siRNAs vermitteln dann die sequenzspezifische mRNA-Hemmung, in dem die Zelle auf die siRNA reagiert und die mRNA, welche die komplementäre Nucleotidsequenz zur siRNA besitzt, zerstört. Somit werden von dieser mRNA kodierte Proteine nicht mehr produziert. Zur Inhibierung der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP) durch RNAi wurde ein 550bp langes AGP-Fragment mittels RT-PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer (AGPF und AGPr1) wurden von der mRNA des AGPS2-Gens aus *Pisum sativum* (X96765.1; Burgess *et al.*, 1997) abgeleitet. Zur Herstellung eines so genannten *Hairpin*-Konstruktes wurde das AGP-Fragment in *sense* und *antisense* Richtung, getrennt durch das Intron Gibberellin-20-Oxidase-Gen von *Solanum tuberosum* (*potGA20oxi*), wie in Chen *et al.* (2003) beschrieben, zusammengeführt. Das *Hairpin*-Konstrukt unter Kontrolle des *LeB4*-Promotors (Bäumlein *et al.*, 1992) wurde dann in die entsprechenden Vektoren überführt und in *Pisum sativum* transformiert. Die Konstruktherstellung und die Transformation wurden in einem Vorläuferprojekt von F. Hosein und Dr. I. Saalbach (IPK, Gatersleben) durchgeführt.

2.2.4 Pflanzenanzucht und Materialentnahme

Nicotiana tabacum

Die Anzucht der Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. SNN) erfolgte *in vitro* in Pflanzenkulturräumen bei 16h Licht/8h dunkel und 22°C. Für die Agrobakterium-vermittelte Transformation wurden Blätter 4 Wochen alter Pflanzen eingesetzt. Die Transformation von Tabakpflanzen diente zum Testen der Konstrukte in dikotylen Pflanzen, bevor diese für die Transformation in Erbsenpflanzen eingesetzt wurden. Regenerierte Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 23°C und 16h Tag-Nacht-Rhythmus weiter kultiviert.

Pisum sativum

Die Erbsenpflanzen (*Pisum sativum* L. cv. Eiffel) wurden zur Verwendung für die Transformation in Klimakammern bei 16h Licht (18°C) und 8h dunkel (16°C) angezogen. Die Ernte der Hülsen erfolgte 2-5 Tage nach Erreichen des maximalen Frischgewichtes. Danach wurden die unreifen Samen für den Agrobakterium-vermittelten Gentransfer verwendet. Folgegenerationen der transgenen Pflanzen wurden zum Teil in Klimakammern (16h Licht/18°C und 8h dunkel/16°C), in Freilandversuchen oder in Außengewächshäusern ohne zusätzliche Licht- und Temperaturregulation (März bis Juli) angezogen. Zur Inhaltsstoff- und Expressionsanalyse der transgenen Samen wurden selbstbestäubte Blüten am Tag der Befruchtung etikettiert (DAP 0) und die Samen in der Mitte der Lichtphase am entsprechenden Tag der Samenreife geerntet. Dazu wurde die Samenschale von den Kotyledonen entfernt und die Embryonen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Freisetzungsversuch

Die Freilandversuche wurden mit der homozygoten Linie AAP14/10 (Generation T₅ und T₆) im Frühling bzw. Frühsommer der Jahre 2005 und 2006 durchgeführt. Auf einem 100m² großem Feld wurden 100 Pflanzen der Linie AAP14/10 und 100 Wildtyppflanzen als Kontrolle angebaut. Die Versuchsfläche lag 111,5m über dem Meeresspiegel und wies fruchtbare Schwarzerde auf. Laut Messungen der Wetterstation in Gatersleben der letzten 50 Jahre wurden im Durchschnitt eine Niederschlagsmenge von 492,1mm und eine Temperatur von 8,5°C ermittelt. Laut Genehmigungsvorschrift wurde das gesamte Versuchsfeld eingezäunt und mit einem Vogelschutznetz überspannt, um eventuell unkontrollierte Verbreitung von gentechnisch veränderten Erbsensamen durch Tiere zu verhindern. Weitere Schutzmaßnahmen waren die Aussaat einer Mantelsaat um das Versuchsfeld mit Phacelia sowie Klee und das Eintüten der Pflanzen mit Beginn der Samenreife. Für die Analyse der Inhaltsstoffe und der Expression verschiedener entwicklungsabhängiger Gene im Samen wurden Blüten am Tag der Selbstbestäubung etikettiert (DAP 0). Die Ernte der Samen erfolgte am Morgen des jeweiligen Tages entsprechend dem Reifegrad von 18, 22, 26, 30 und 35 DAP. Dazu wurde die Samenschale von den Kotyledonen entfernt und die Embryonen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die eingetüteten Pflanzen wurden mit Samenreife am Stengel abgeschnitten und die Samen im Labor zur weiteren Analyse geerntet. Als Schädlingsbekämpfungsmittel wurden „Karat“ (Zeneca Agro) und „Perfekthion®“ (BASF) eingesetzt. Die Durchführung der Freilandversuche erfolgte mit Genehmigung des Landes Sachsen-Anhalt (Az.6786-01-0158).

Kreuzung von zwei Pflanzenlinien

Pflanzen der homozygoten Linie sucAAP5/8 wurden mit der ebenfalls homozygoten Linie AAP14/10 gekreuzt. Dazu wurden Samen dieser Linien gleichzeitig ausgelegt, um einen vergleichbaren Blühzeitpunkt zu erreichen. Die Blüten der einen Elternlinie wurden kastriert,

also die noch unreifen Antheren entfernt, und die Blüten dann mit fremden Pollen der anderen Elternlinie bestäubt. Sowohl sucAAP5/8- und AAP14/10-Pflanzen dienten dabei als Pollenspender und Pollenempfänger. Die Kreuzungsprodukte in der F₁-Generation waren für beide Konstrukte heterozygot. Über Segregationsanalysen in den folgenden Generationen wurden dann doppelt homozygote Pflanzen erzeugt.

2.2.5 DNA-Isolierung und Southern Blot

Genomische DNA wurde nach den Protokollen von DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) laut Vorschrift und der Methode nach Waite isoliert. Das gefrorene Blattmaterial (ca. 200mg) wurde direkt im Reaktionsgefäß in der Schwingmühle oder in einem Mörser zerkleinert und anschließend mit DNA-Extraktionspuffer (1% N-Lauryl-Sarcosin, 100mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8, 100mM NaCl) und einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) versetzt. Anschließend wurde zentrifugiert (5000rpm, 3min, RT) und der Überstand mit 3M Natriumacetat pH 5,2 und Isopropanol gefällt. Danach wurde erneut zentrifugiert (13000rpm, 19min, 4°C) und das entstandene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in 1mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert. Zum Abschluss erfolgte noch eine RNase-Behandlung (1h, 37°C), um mögliche RNA-Verunreinigungen zu entfernen.

Zur Erkennung von DNA anhand spezifischer Basensequenzen wurde die Southern Blot Technik angewendet. Dazu wurden 10µg doppelsträngiger DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen in Fragmente gespalten und diese in einem 1%-igen Agarosegel in 1xTAE-Puffer (40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA) aufgetrennt. Danach erfolgte die Behandlung des Gels mit 0,25M HCl und anschließender Denaturierung (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) sowie Neutralisierung (0,5M Tris-HCl pH 8, 3M NaCl). Die DNA-Fragmente wurden durch einen 20xSSC-Pufferfluss (3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat) auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺) übertragen und durch UV-Quervernetzung (UV Stratalinker® 2400) auf dieser Membran fixiert. Anschließend wurde die Membran mit einer [α -³²P]dCTP radioaktiv markierten Sonde mit komplementären Sequenzen zur gesuchten DNA (RediPrimell Labeling System) in modifiziertem Church Puffer (0,5M Natriumphosphat, 7% SDS, 1% BSA, 2mM EDTA; Church and Gilbert, 1984) bei 65°C hybridisiert und dann mit Spüllösung (40mM Natriumphosphat pH 7,2; 1% SDS, 2mM EDTA) gewaschen. Durch Auflage eines Phosphormager-Screens wurde die Membran autoradiographiert und konnte mittels Phosphormager ausgelesen werden.

2.2.6 RNA-Isolierung und Northern Blot

Gesamt-RNA wurde wie in Heim *et al.* (1993) beschrieben isoliert und mittels Northern Blot Analyse bestimmt. Dazu wurden 10µg Gesamt-RNA nach ihrer Größe in einem 1%-igen Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit 20xSSPE (3,6M NaCl, 0,2M Natriumphosphat, 0,02M EDTA pH 7,7) als Transferpuffer auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺) übertragen und durch UV-Quervernetzung (UV Stratalinker® 2400) auf der Membran immobilisiert. Die anschließende Hybridisierung erfolgte nach Church and Gilbert (1984) und wie unter Punkt 2.2.5 für den Southern Blot beschrieben. Zur Bestimmung der relativen

RNA-Menge pro Slot wurde eine Sonde aus 25S rDNA auf die Membran hybridisiert. Die Signale auf den Membranen wurden mit einem Phosphorimager ausgelesen und die Daten mit dem Programm TINA ausgewertet.

2.2.7 Quantitative *real time* PCR (qRT-PCR)

Die Bestimmung der Transkriptmengen mittels qRT-PCR wurde in Kooperation mit Dr. C. Seiler durchgeführt (Seiler, 2008). Gesamt-RNA wurde wie in Heim *et al.* (1993) beschrieben isoliert und davon 2µg für die cDNA-Synthese eingesetzt. Mit dem First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Invitrogen) erfolgte laut Herstellerangaben die Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA. Alle Reaktionen wurden in 10µl Reaktionsvolumen und unter Anwendung des Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) nach folgendem Standardprogramm durchgeführt: 1.) 2min, 50°C; 2.) 10min, 95°C; 3.-47.) 15sek, 95°C und 1min. 60°C; 48.) 15sek, 95°C; 49.) 15sek, 60°C; 50.) 15sek, 95°C. Zum Nachweis des *VfAAP1*-Transkriptes unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors in Blättern wurden spezifische Primer aus den 5'- und 3'-Bereichen der *VfAAP1*-cDNA mit Hilfe des Programms Primer Express abgeleitet. Als Kontrolle diente das konstitutiv exprimierte *PsAktin*-Gen. Die Auswertung der qRT-PCR Reaktion erfolgte mit der SDS 2.2.1 Software (Applied Biosystems).

2.2.8 Inhaltsstoffanalyse sich entwickelnder und reifer Samen

Probenvorbereitung

Für die einzelnen Bestimmungen der Inhaltsstoffe wurden die Samen entsprechend vorbereitet. Die Verarbeitung reifer Samen erfolgte in einer Schwingmühle zu feinem Pulver und anschließender Nach Trocknung des Mehles üN bei 60°C. Unreife Samen wurden entsprechend ihrem Entwicklungsstadium geerntet, indem die Samenschale von den Kotyledonen entfernt und die Embryonen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Danach wurden die unreifen Samen für drei Tage gefriergetrocknet und ebenfalls in der Schwingmühle gemahlen.

Bestimmung von Speicherproteinen

Die Hauptspeicherproteine bei den Leguminosen sind Globuline und Albumine, wobei Globuline den höheren Anteil (etwa dreimal mehr) darstellen. Für die Bestimmung der einzelnen Proteinfractionen wurden 50mg getrocknetes Samenpulver eingewogen. Für die Extraktion der Albumine wurde das Pulver mit Slytermannpuffer (50mM Acetat, 1mM KCl, 10% DMSO, 0,5% Butanol, pH 4,5) versetzt, für 15min bei 4°C geschüttelt, dann zentrifugiert (15min, 13000rpm, 4°C) und der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt. Der gesamte Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das entstandene Pellet mit Phosphatpuffer (100mM KH₂PO₄, 100mM Na₂HPO₄, 500mM KCl, pH 7) für die Extraktion der Globuline versetzt und, wie für die Albuminextraktion beschrieben, behandelt. Die Konzentration der löslichen Proteinfractionen im Überstand wurde mit Hilfe eines

Spektrophotometers nach der Methode von Bradford (1976) mit BSA als Standardprotein gemessen.

Ermittlung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes

Zur Bestimmung des relativen Gesamtgehaltes an Kohlenstoff und Stickstoff wurden 3mg des getrockneten Samenpulvers eingewogen und mit einem Elementaranalysator (VarioEL) nach Dumas Verbrennungsmethode unter kontrollierter Sauerstoffzufuhr bei hohen Verbrennungstemperaturen vermessen.

Extraktion und Bestimmung von freien Aminosäuren

Für die Extraktion der Aminosäuren wurden 20mg getrocknetes Mehl eingewogen, jeweils 20µl Standardlösung 5mM Norleucin und 730µl 80% Ethanol zugegeben und für 30min bei 60°C geschüttelt. Danach wurden die Proben zentrifugiert (10min, 13000rpm, 4°C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das entstandene Pellet erneut mit 750µl 80% Ethanol versetzt. Zum Lösen des Pellets wurden die Proben zuerst für 10min bei RT und dann für 30min bei 60°C geschüttelt. Nach der Zentrifugation (10min, 13000rpm, 4°C) wurde der Überstand mit dem ersten im Reaktionsgefäß vereinigt.

Für die Aminosäurebestimmung mittels HPLC wurden 100µl Ethanolextrakt unter Vakuumeinfluss verdampft und das Pellet in 250µl H₂O resuspendiert. Nach der Zentrifugation (5min, 14000rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bei -20°C gelagert. Die Derivatisierung der Proben erfolgte nach der AccQ•Tag Methode (Waters, Milford, MA, USA) laut Herstelleranleitung. Die Auftrennung der Derivate wurde mit einer AccQ•Tag 3,9x150mm Säule im Waters HPLC System (600 Gradientenpumpe, 717plus Autosampler) bei 37°C durchgeführt. Dabei wurde folgender Gradientenlauf: t=0min (100% A, 0% B, 0% C), t=0,5min (97% A, 3% B, 0% C), t=17min (95,5% A, 4,5% B, 0% C), t=19min (95,5% A, 4,5% B, 0% C), t=26min (95% A, 5% B, 0% C), t=30min (91% A, 9% B, 0% C), t=34min (90% A, 10% B, 0% C), t=36min (87% A, 13% B, 0% C), t=73min (86% A, 14% B, 0% C), t=75min (78% A, 22% B, 0% C), t=77min (0% A, 60% B, 40% C), t=80min (100% A, 0% B, 0% C), t=90min (100% A, 0% B, 0% C) mit den entsprechenden Pufferlösungen: A) 140mM Natriumacetat pH 5,8; 7mM Triethanolamin B) Acetonitril C) H₂O verwendet. Die Flussrate betrug 1ml/min. Die Aminosäurederivate wurden mit einem Jasco FP-1520 Fluoreszenzdetektor (Ex=300nm, Em=400nm) bestimmt. Die Kalibrierung wurde jeweils mit 1, 10, 100 und 1000pmol jeder detektierten Aminosäure durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Waters Empower Programm.

Ermittlung des Gesamtfettgehaltes

Für die Bestimmung des Gesamtfettgehaltes wurden 250mg Samenmehl in 10ml Hexan/Isopropanol-Gemisch (3:2) gelöst und für einige Stunden geschüttelt. Dann wurde das Gemisch zentrifugiert (15min, 13000rpm, RT) und der Überstand über Rundfilterpapier (MN616) gereinigt. Unter Verwendung eines Schüttlers wurde das Extrakt bei 60°C

eingedampft. Der entstandene Rest wurde gewogen und ins Verhältnis zur Probeneinwaage gesetzt.

Bestimmung von Saccharose und Stärke

Die Bestimmung von Saccharose und Stärke beruht auf der Messung von NADPH, welches beim enzymatischen Abbau von Stärke gebildet wird. Dazu werden dem Probenextrakt die Enzyme Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glc-6-P-DH) zugegeben. Stärke wird durch das Enzym Amyloglucosidase bei einem pH-Wert von 4,6 zu D-Glucose gespalten. D-Glucose wird unter Verbrauch von ATP durch Hexokinasen phosphoryliert. Dabei entstehen D-Glucose-6-Phosphat (Glc-6-P) und ADP. Glc-6-P wird durch Glc-6-P-DH und NADP zu D-Gluconat-6-Phosphat oxidiert, wobei NADPH entsteht. Die gebildete Menge an NADPH wird photometrisch bei 340nm gemessen und ist der durch die Stärkehydrolyse gebildeten D-Glucose-Menge proportional. Es werden zwei Messungen vorgenommen, eine vor und die zweite nach der enzymatischen Inversion. Der Saccharosegehalt ergibt sich aus der Differenz der Glucosekonzentrationen. Auch hier wird die gebildete Menge an NADPH bei 340nm bestimmt.

Für die Extraktion von Saccharose wurden 20mg getrocknetes Samenmehl eingewogen, mit 1ml 80% Ethanol versetzt und für 30min bei 60°C geschüttelt. Dann wurde das Gemisch zentrifugiert (10min, 13000rpm, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde erneut mit 500µl 80% Ethanol versetzt, die Prozedur zweimal wiederholt und die Überstände vereinigt.

Für die Saccharosebestimmung wurde der gesamte Überstand unter Vakuumeinfluss eingedampft und der entstandene Rest in 500µl H₂O aufgenommen. Dann wurden 10µl Probe mit 750µl Bestimmungspuffer (100mM Imidazol pH 6,9; 5mM MgCl₂·6H₂O, 2mM NAD, 1mM ATP) und 2µl Glc-6-P-DH gemischt und für 10min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5µl Hexokinase (Verdünnung 1:1), weitere 5min Inkubation und die erste Vermessung. Danach wurden 10µl β-Fruktosidase zugeführt, für 30min inkubiert und erneut bei 340nm gemessen.

Für die Extraktion und Bestimmung der Stärke wurde das entstandene Pellet, nach der Ethanolbehandlung, in 1-2ml 0,5M KOH gelöst und für eine Stunde bei 95°C gekocht. Danach wurden 5µl des Extraktes mit 100µl Amyloglucosidase-Puffer (75U/ml Amyloglucosidase in 100mM tri-Natriumcitrat·2H₂O pH 4,6) versetzt und für 30min bei 60°C geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde mit 750µl Bestimmungspuffer (100mM Imidazol pH 6,9; 5mM MgCl₂·6H₂O, 2mM NAD, 1mM ATP) und 2µl Glc-6-P-DH gemischt, für 10min inkubiert und dann das erste Mal vermessen. Danach wurden 10µl Hexokinase (1:1 verdünnt) zugegeben, die Mischung für weitere 25min bei RT inkubiert und anschließend das zweite Mal gemessen. Zur Bestimmung des Saccharose- und Stärkegehaltes wurden die Proben mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 340nm vermessen.

Bestimmung des Amylose-Anteils der Stärke

Die Ermittlung des relativen Gehaltes an Amylose in Stärke erfolgte nach der Methode von Hovenkamp-Hermelink *et al.* (1988) mit ergänzenden Veränderungen von Rolletschek *et al.* (2002). Die Extraktion und Bestimmung der Stärke wurden wie im vorherigen Punkt beschrieben durchgeführt.

Ermittlung des Gehaltes an Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Der Gehalt an H₂O₂ wurde mittels „Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit“ (Invitrogen) in unreifen Erbsenkotyledonen verschiedener Stadien der Samenreifung (25 und 30 DAP) bestimmt. Diese vereinfachte Ein-Schritt-Reaktionsmethode basiert auf der Farbstoffumwandlung des Amplex® Red Reagenz (10-Acetyl 3,7-Dihydroxyphenoxazin) in Anwesenheit des Enzyms Peroxidase. Dabei reagiert H₂O₂ mit dem Reagenz zu einem rot-fluoreszierenden Oxidationsprodukt, dem Resorufin. Dieses wird dann bei einer Absorption von 560nm photometrisch gemessen. Die Extraktion und Bestimmung des H₂O₂-Gehaltes wurde laut Herstelleranleitung durchgeführt. Als Eichgerade wurden verschieden definierte Konzentrationen an H₂O₂ (2, 5, 10, 20, 50, 75 und 100µM) in den Reaktionslösungen vermessen.

Metabolitanalyse mittels Gaschromatography-Massenspektrometer (GC-MS)

Die Analyse verschiedener Stoffwechselprodukte wurde mit Hilfe von Dr. A. Fait und Dr. A. R. Fernie (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm) unter Verwendung des Gaschromatography-Massenspektrometers (GC-MS) durchgeführt. Die Extraktion und die Messung der Metabolite erfolgte nach einem optimierten GC-TOF Protokoll für Arabidopsis (Lisec *et al.*, 2006). Die relativen Gehalte der Metabolite wurden wie in Roessner *et al.* (2001) beschrieben berechnet. Die Identifizierung der einzelnen Peaks erfolgte mit dem Programm TAGfinder (Luedemann *et al.*, 2008) unter Anwendung der in Golm befindlichen und entwickelten Spectral-Bibliothek *Golm Metabolome Database* (Kopka *et al.*, 2005).

2.2.9 Ermittlung der Hormonkonzentrationen

Bestimmung von Abscicinsäure (ABA)

Die Bestimmung von Abscicinsäure (ABA) erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Chiwocha *et al.* (2003). 20mg gefriergetrocknetes Samenmehl wurden in 750µl 96% Ethanol gelöst, für 15min bei 15°C geschüttelt, zentrifugiert (10min, 13000rpm, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde das Pellet erneut mit 500µl 96% Ethanol versetzt, geschüttelt (15min, 15°C) und zentrifugiert (10min, 13000rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, mit dem ersten vereinigt und in einer Speed Vac eingedampft. Die Rückstände wurden in 90µl 28% Acetonitril aufgenommen, für 10min bei 15°C geschüttelt und durch einen Spitzenfilter (Phenomenex, Nylon 0,2µm) gereinigt. Als internen Standard wurden 20ng (2H6)-trans, trans-ABA während der Extraktion zugegeben.

Die Bestimmung von ABA erfolgte mittels LC(-)ESI-MS/MS in einem Dionex HPLC-System (Dionex, Idstein). Dazu wurden 10µl Extrakt auf eine 3µm C18(2) 100A, 150x2mm Phenomenex Luna Säule gegeben und bei RT eluiert. Ein Gradient von 28% bis 100% Acetonitril in 5min und folgende Laufmittel A) Acetonitril und B) H₂O mit 0,04% Essigsäure wurden verwendet. Die Flussrate betrug 0,15ml/min. Die Analyse der aufgetrennten Komponenten erfolgte in einem MS/MS Varian 1200L.

Messung der Cytokiningehalte

Die Ermittlung der Cytokininkonzentrationen wurde in Kooperation mit Prof. Dr. R. J. Neil Emery (Biology Department, Trent University, Peterborough, ON, Canada) durchgeführt. Die Extraktion, Aufreinigung und Quantifizierung der Cytokinine erfolgte wie in Ferguson *et al.* (2005) beschrieben nach einer Methode mit verdünnten Isotopen. Als quantitativ interne Standards wurden deuterierte Cytokinine [²H₆]iP, [²H₆][9R-MP]iP, *trans*-[²H₅]DZ, *trans*-[²H₅][9R]Z, [²H₃][9R]DZ, [²H₆][9R-MP]iP und [²H₆][9R-MP]DHZ der Firma OlchemIm Ltd. (Olomouc, Czechische Republik) verwendet. Die Bestimmung der Cytokin-Nucleotide erfolgte durch die Umwandlung in nucleosidische Verbindungen. Die Auftrennung und Analyse der gereinigten Cytokinine wurde mittels LC-(+)ESI-MS/MS unter Verwendung des Waters 2680 Allinze HPLC-Systems (Waters, Milford, USA), welches an ein Quattro-LC triple Quadrupole MS (Micromass, Altrincham, UK) gekoppelt war, durchgeführt.

Bestimmung von 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) und Jasmonatderivaten

Die Gehalte an OPDA, Jasmonsäure und deren Metabolite wurden mit Hilfe von Dr. O. Miersch und Prof. Dr. C. Wasternack (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale) gemessen. Die Extraktion und quantitative Analyse der 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), dinor-OPDA, Jasmonsäure (JA), 11-Hydroxyjasmonat (11-OH-JA), 12-Hydroxyjasmonat (12-OH-JA) und 12-Hydroxyjasmonat Glycoside (12-OGlc JA) wurde wie in Miersch *et al.* (2008) beschrieben durchgeführt.

2.2.10 Analyse der Enzymaktivitäten

Bestimmung der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP)-Aktivität

Die Enzymaktivität von AGP wurde durch die Umkehrreaktion von Pyrophosphat und ADP-Glucose zu ATP und Glucose-1-Phosphat basierend auf der in Smith *et al.* (1990) beschriebenen Methode bestimmt. Dazu wurde die Synthese von Glucose-1-Phosphat spektralphotometrisch gemessen. Für die Extraktion wurden 20mg Samenmehl eingewogen und mit dreifachen Volumen an Extraktionspuffer [50mM Natriumphosphatpuffer (Na₂HPO₄x2H₂O + NaH₂PO₄xH₂O), 5mM DTT und 5mM EDTA] versetzt. Die Proben wurden gemischt, dann zentrifugiert (15min, 13000rpm, 4°C) und 30µl des Überstandes mit 700µl Bestimmungspuffer (100mM HEPES, 5mM NaCl₂, 2mM ADP-Glucose, 0,5mM NAD, 2U Phosphoglucomutase und 5U NAD-gebundenes Glucose-6-Phosphat) versetzt. Zum Starten

der Reaktion wurden nach 5min Inkubation 2mM Natriumpyrophosphat zugegeben. Nach weiteren 5min erfolgte dann die Messung mit einem Spektralphotometer bei 340nm.

Ermittlung der Enzymaktivität der Saccharose-Synthase (Susy)

Die Bestimmung der Saccharose-Synthase (Susy)-Aktivität beruht auf der photometrischen Messung des gebildeten NADH. Zuerst erfolgt die Spaltung von Saccharose und UDP durch das Enzym Susy zu Fructose und UDP-Glucose. In einem weiteren Reaktionsschritt wird die UDP-Glucose durch UDP-Glucose-Dehydrogenase (UDP-Glc-DH) zu UDP-Glucuronsäure oxidiert, wobei NAD^+ zu NADH reduziert wird. Die Bildung des NADH wird dann photometrisch bei 340nm gemessen.

Für die Extraktion wurden gefrorene Erbsenkotyledonen mit flüssigem Stickstoff gemörsert und mit fünffachen Volumen des Kotyledonengewichtes an Extraktionspuffer (100mM MOPS pH 7,4; 10mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 1mM EGTA, 2mM DTT und 1mM PMSF) versetzt. Nach der Zentrifugation (10min, 13000rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und Aliquots davon bei -20°C zur Lagerung eingefroren. Zur Bestimmung wurden 10µl Extrakt mit 150µl Bestimmungslösung 1 (75mM HEPES pH 7,5; 7mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4mM UDP und 200mM Saccharose) in zwei Ansätzen gemischt. Der erste Ansatz wurde sofort für 5min bei 95°C gekocht und somit die Reaktion gestoppt. Wogegen der zweite erst für 10min bei 25°C inkubiert und dann gekocht wurde. Danach wurden beide Ansätze gleich behandelt. Nach der Zugabe von 750µl Bestimmungslösung II (200mM Glycin, 5mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 1mM $\text{NAD} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) und 8µl UDP-Glc-DH wurden die Proben für 30min bei 37°C geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10min, 13000rpm, 4°C). Der gesamte Überstand wurde in eine Küvette übertragen und danach bei 340nm vermessen. Zur Berechnung der Susy-Aktivität wurde dann der Extinktionswert des Ansatzes 1 ohne Inkubationszeit von dem Wert des Ansatzes 2 mit 10min schütteln abgezogen.

2.2.11 *Ps6kOLI1* Microarrays, Microarray-Hybridisierung und Auswertung der Daten

Die Expression spezifischer Gene während der Samenentwicklung kann anhand der Array-Technik analysiert und quantifiziert werden. Dabei erhält man Daten über den molekularen Phänotyp von Transgenen und Wildtyppflanzen. Im Rahmen des EU-Projektes GRAIN LEGUMES standen Oligonucleotid-Microarrays bestehend aus über 5220 EST-Clustern von 11930 *Pisum sativum* ESTs, hauptsächlich aus Samenschale und Kotyledonen (>90%; Radchuk *et al.*, 2006), zur Verfügung. Der *Ps6kOLI1* Microarray besteht aus 5246 verschiedenen Oligonucleotiden mit jeweils einer Länge von 70 Basenpaaren, die dreifach als technische Kontrolle gespottet wurden (*Pisum sativum* Genome Oligo Set Version 1.0, Operon Biotechnologies). Gene wurden als unterschiedlich exprimiert eingestuft, wenn sie einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,05$ und einen Faktor, resultierend aus der Differenz der Signalintensitäten, von mindestens 1,7 aufwiesen. Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde die Extraktionsmethode wie unter 2.2.6 beschrieben verwendet. Die RNA-Extrakte wurden einer DNase-Behandlung (TURBO DNase[™], Ambion, Austin, USA) laut Herstellerprotokoll unterzogen und anschließend mit Microcon-30-Filter-Säulen

(Millipore) nach Herstellerangaben gereinigt. 20µg Gesamt-RNA wurden für die Synthese der cDNA mit gleichzeitigem Einbau der Cy3- oder Cy5-Farbstoffe wie in Küster *et al.* (2004) beschrieben eingesetzt. Die Hybridisierung der *Ps6kOLI1* Microarrays wurde mit drei unabhängigen biologischen Wiederholungen durchgeführt. Die Hybridisierung, das Einlesen der hybridisierten Microarrays und die Analyse der Daten erfolgte wie in Hohnjec *et al.* (2005) beschrieben. Dabei wurde die Hybridisierungsstation HS4800 und der LS Reloaded Microarray Scanner (Tecan, Crailsheim) verwendet. Der Cy3-Farbstoff wurde bei einer Wellenlänge von 550nm und der Cy5-Farbstoff bei 647nm gescannt. Die Auswertung der gescannten Bilder und erhaltenen Daten erfolgte mit der Software ArrayLIMS und EMMA 2.0 (Dondrup *et al.*, 2003). Dazu wurde die Lowess-Normalisierung für jeden hybridisierten Microarray und der Student t-Test für die statistische Auswertung angewendet. Die cDNA-Synthese, der gleichzeitige Einbau der Cy3- und Cy5-Farbstoffe, die Hybridisierung und das Einlesen der Microarrays wurden in Kooperation mit Prof. Dr. H. Küster (ehemals CeBiTec-Center der Universität Bielefeld, aktuell Leibniz-Universität Hannover) und seinen technischen Assistentinnen durchgeführt.

2.2.12 Mikroskopische Techniken

Die Herstellung der Ultradünnschnitte von Erbsensamen, die Färbungen und die mikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. T. Rutten (IPK, Gatersleben) durchgeführt. Reife Samen wurden vor der Einbettung in Kunstharz für drei Tage in Wasser im Kühlschrank vorgequollen. Unreife, sich noch entwickelnde, Samen wurden ohne Vorbehandlung verwendet. Die Fixierung der Samen erfolgte in 2% Paraformaldehyd und 2% Glutaraldehyd in 20mM Phosphat-Puffer pH 7,0 und 0,02% Triton X-100. Danach wurden die Proben dreimal für 20min in 20mM Phosphat-Puffer + 0,02% Triton X-100 gewaschen. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, gefolgt von zwei zusätzlichen Waschschrritten in 100% Propylenoxid. Die Infiltration mit dem Kunstharz Spurr erfolgte in Stufen von 25%, 50%, 75% und 100%, wobei jede Stufe mindestens 6h dauerte. Infiltrierte Proben wurden in LR-White Flachbodenkapseln überführt und mit Spurr aufgefüllt. Zur Polymerisation des Spurrs wurden die Kapseln für 16h in einem Ofen bei 70°C inkubiert. Mit Hilfe eines Diamantmessers erfolgte von den eingebetteten Proben die Herstellung semidicker (700nm) Schnitte am Ultramikrotom Ultracut S der Firma Leica (Leica, Wien, Österreich). Diese Semischnitte wurden auf Objektträger gelegt und bei 80°C eingebacken. Danach folgten die Färbungen mit Fuchsin/Kristallviolett oder Jod-Kalium-Jodid-Lösung.

Für die Färbung der Proteinvakuolen wurden die Schnitte für 20min bei 60°C mit 1% Fuchsin in 20% Ethanol gelegt. Danach erfolgte eine Nachfärbung mit 2% Kristallviolett für nicht länger als 10sec bei 80°C. Unter diesen Bedingungen ergänzten sich beide Farbstoffe und es ergab sich eine differenzierte Färbung. Die gefärbten Proben wurden mit Euparal zur Eindeckelung behandelt. Bei 50°C für einige Stunden auf einer Heizplatte liegend erfolgte die Aushärtung des Euparals. Weil die in Euparal eingedeckelten Proben langsam entfärben, wurden alle Proben innerhalb einer Woche fotografiert. Zur Anfärbung der Stärkekörner (Amyloplasten) wurde ein Tropfen Jod-Kalium-Jodid-Lösung auf die Schnitte pipettiert,

welche gleich mit einem Deckgläschen abgedeckt und anschließend fotografiert wurden. Digitale Aufnahmen entstanden an einem Zeiss Axiovert 135 Lichtmikroskop (Zeiss, Jena), ausgestattet mit einer Axiocam. Übersichtsaufnahmen wurden mit einem 5x Objektiv gemacht. Detailaufnahmen wurden mit einem 40x/NA 1.2 Wasserobjektiv aufgenommen. Die Bildgröße betrug 1300x1000 Pixel. Bilder wurden nachträglich mit der Software Photoshop bearbeitet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei transgene Ansätze ausgewählt, die gezielt in unterschiedliche Stoffwechselwege des Samens eingreifen und somit den Kohlenstoff- und Stickstoffhaushalt verändern sollten: (1) Erhöhung der Aminosäurezufuhr in den Samen durch die samenspezifische Überexpression eines Aminosäuretransporters und (2) Verringerung der Stärkebiosynthese durch Reprimierung eines Schlüsselenzyms des Stärkestoffwechsels, der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase.

3.1 Überexpression der Aminosäurepermease aus *Vicia faba* (VfAAP1)

Die Synthese von Speicherproteinen wird durch verschiedene Einflüsse und Prozesse während der Samenreifung reguliert. Ein wichtiger Faktor ist dabei die Verteilung und Verfügbarkeit von Stickstoff als ein essentieller Bestandteil vieler pflanzlicher Komponenten, wie z.B. Proteine und Nucleinsäuren. Die prinzipielle Haupttransportform für organischen Stickstoff sind Aminosäuren. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer erhöhten Aminosäurezufuhr in den Samen von Erbsenpflanzen hinsichtlich der Speicherung von Reserveproteinen untersucht. Dafür wurde der bereits funktionell charakterisierte Aminosäuretransporter aus *Vicia faba* verwendet (VfAAP1; Miranda *et al.*, 2001).

3.1.1 Herstellung stabiler VfAAP1-überexprimierender Linien

In einem Vorläuferprojekt wurden die transgenen VfAAP1-überexprimierenden Pflanzen hergestellt. Die dafür notwendigen Arbeiten führten F. Hosein und Dr. I. Saalbach (IPK, Gatersleben) durch. Für die Konstruktherstellung wurde die 1590bp lange vollständige cDNA der Aminosäurepermease aus *Vicia faba* (VfAAP1; Miranda *et al.*, 2001) und der 2753bp lange Legumin B4 Promotor (*LeB4*), der samenspezifisch während der frühen und späten Samenreifung exprimiert wird (Bäumlein *et al.*, 1992), verwendet. Das Konstrukt wurde in den Binärvektor PZP200 kloniert (Abb. A.1) und anschließend in Erbse (*Pisum sativum*, cv. Eiffel) transformiert. Als Transformationsmethode wurde die Agrobakterium-vermittelte Transformation gewählt (Schroeder *et al.*, 1993; Pickardt *et al.*, 1998; Giersberg *et al.*, 2004). Bei der Co-Transformation werden zwei Plasmide übertragen (Rolletschek *et al.*, 2005). Das eine Plasmid PZP200 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) trägt das VfAAP1-Transgen unter Kontrolle des *LeB4*-Promotors und als Terminator die 3'-Region des Octopinsynthase-Gens (*ocs*). Auf einem separaten Plasmid pCambia3300 (Original von Cambia GPO Box 3200, Canberra, ACT 2601, Australia) ist das Resistenzgen *bar* unter Einfluss des konstitutiven 35S-CaMV-Promotors (Promotor des *Cauliflower Mosaic Virus*) mit dem 35S-PolyA-Terminator lokalisiert (Abb. A.1). Der Selektionsmarker *bar* (Phosphinotricin-Acetyltransferase) aus *Streptomyces hygrosopicus* vermittelt die Basta[®]-Resistenz und somit eine Selektionsmethode von transgenen Pflanzen. Die Co-Transformation erlaubt die Herstellung transgener markergenfreier Pflanzen. Denn bei ungekoppelter Integration der

seperaten Plasmide ins Genom kann in den folgenden Generationen basierend auf der Vererbung unabhängiger Merkmale nach Mendel (1866) das markergentragende Plasmid entfernt werden.

Nach der Co-Transformation konnten 47 Pflanzen als putativ transgen regeneriert werden, davon erwiesen sich 21 Pflanzen als Basta[®] resistent. Mittels PCR-Technik wurden dann 8 Pflanzen als transgenpositiv für *VfAAP1* getestet (Primer-Kombination: AAPf1 + AAPr1, LegF + AAPr1). Zur Bestimmung der Kopienanzahl des *VfAAP1*-Transgens im Genom wurden die transgenpositiv getesteten Linien mittels Segregationsanalyse der T₁-Generation unter Verwendung der PCR und Southern Blot Technik untersucht (Tab. 3.1). Bei den Pflanzenlinien 7, 9, 10, 18, 20 und 35 wurden zwei oder mehr Kopien integriert. Die Linie 14 wies als einzige nur eine Kopie des Transgens auf.

Tab. 3.1 *VfAAP1*-transgenpositive Pflanzen nach der Co-Transformation in Erbse. Charakterisierung der transgenen Pflanzen mittels PCR (Primer-Kombination: AAPf1 + AAPr1, LegF + AAPr1) und Southern Blot.

Linien T ₀ Nummer	PCR positive für <i>VfAAP1</i> -Gen	Segregation T ₁ (+/-)	Insert Anzahl T ₀
7	+	9:1	2
9	+	16:1	2
10	+	19:1	>2
14	+	7:3	1
18	+	9:1	2
20	+	10:0	>2
35	+	8:1	2

Zur Bestimmung der *VfAAP1*-Transkriptmenge in den transgenen Samen wurden Northern Blot Analysen mit extrahierter Gesamt-RNA aus Erbsenkotyledonen des Stadiums der mittleren Samenreife (28 DAP) durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde das radioaktivmarkierte cDNA-Fragment von *VfAAP1* (Miranda *et al.*, 2001) verwendet. Die Pflanzenlinien 10, 14, 18 und 20 zeigten eine verstärkte Expression des *VfAAP1*-Transgens im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3. 1). Die schwache Bande im Wildtyp lässt sich auf die in Erbse endogen vorkommende Aminosäurepermease zurückführen, da *VfAAP1* eine große Homologie in der Aminosäuresequenz zu PsAAP2 aufweist.

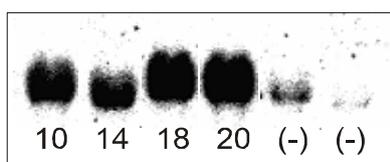
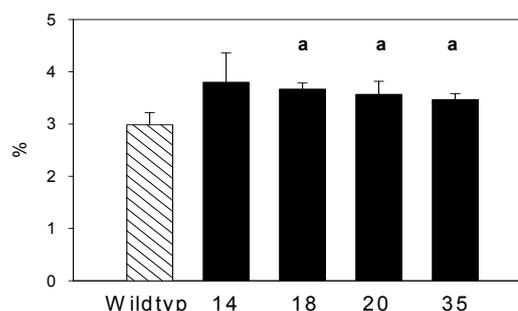


Abb. 3.1 Northern Blot Analyse zur Bestimmung der *VfAAP1*-Transkriptakkumulation. Jeweils 10µg Gesamt-RNA von Erbsenembryonen der Linien 10, 14, 18, 20 und der Wildtypkontrolle (-) wurden mit der radioaktivmarkierten cDNA des *VfAAP1*-Fragments hybridisiert.

Die transgenen Pflanzen wurden hinsichtlich ihrer Insertanzahl und der Expression des *VfAAP1*-Gens positiv getestet. Danach erfolgte der Nachweis, welchen Effekt das *VfAAP1*-Transgen auf den Samenstoffwechsel und auf den Proteingehalt hat. Durch eine Inhaltsstoffanalyse wurde der Gesamt-N-Gehalt reifer T₂-Samen der transgenen AAP1-Linien bestimmt (Tab. 3.2 und Tab. 3.2). Die Linien 10, 14, 18 und 20, die das Transgen stark exprimierten, hatten einen signifikant erhöhten Gesamt-N-Gehalt von bis zu 20% gegenüber Wildtypsamens. Für weitere Analysen hinsichtlich Veränderungen des Samenmetabolismus wurde die Linie AAP14 verwendet. Diese Linie hatte als einzige nur eine Kopie des Transgens. In nachfolgenden Generationen wurde mittels Segregationsanalysen die homozygote markergenfreie Linie AAP14/10 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Als interne negative Kontrolle wurde die Linie AAP14/3 mitgeführt. Bei dieser Linie erfolgte die Aussegregation des Transgens und des Selektionsmarkers.

Tab. 3.2 und Abb. 3.2 Bestimmung des Gesamt-N-Gehaltes der transgenen Linien im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Die Werte wurden aus drei Messungen mit T₂-Samen gemittelt und die Standardabweichung ± SD berechnet. Statistisch signifikant höhere Werte nach dem Student t-Test: a ≤ 0.05, b ≤ 0.01, c ≤ 0.001.

Transgene Linie	PCR positiv für VfAAP1-Gen	Gesamt-N [%] T₂-Samen
14	+	3.80 ± 0.56
18	+	3.67 ± 0.12 ^a
20	+	3.57 ± 0.25 ^a
35	+	3.47 ± 0.12 ^a
Wildtyp	-	2.98 ± 0.24



3.1.2 Analyse *VfAAP1*-überexprimierender Samen unter Gewächshausbedingungen

Untersuchungen der T₂-Samen der heterozygoten *VfAAP*-Linien 10, 14, 18 und 20 zeigten, dass eine Überexpression der Aminosäurepermease zu einer Erhöhung des Gesamt-N-Gehaltes der Samen führt (Tab. 3.2 und Tab. 3.2). In weiteren Experimenten mit Pflanzen der Folgegeneration T₃ gewachsen in der Phytokammer und im Gewächshaus konnte dieser Effekt bestätigt werden (Rolletschek *et al.*, 2005). Dazu wurde die homozygote markergenfreie Linie AAP14/10 mit der internen negativen Kontrolle AAP14/3 verglichen. Die reifen Samen der Linie AAP14/10 hatten 20% mehr Gesamt-N und einen höheren Gehalt an Gesamt-C. Bei den Speicherproteinen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Globulinfraction um 43%, während die Albumine nicht verändert wurden. Das Samengewicht der transgenen Linie AAP14/10 war leicht signifikant um 5% höher als bei der Kontrolle AAP14/3.

3.1.3 VfAAP1-Effekt unter Freilandbedingungen

Die Ergebnisse unter den Anzuchtbedingungen im Gewächshaus sollten im Freilandversuch reproduziert und bestätigt werden. Dazu wurden auf einem 100m² großem Feld 100 Pflanzen der Linie AAP14/10 (Generation T₅ und T₆) und 100 Wildtyppflanzen als Kontrolle in zwei aufeinander folgenden Jahren, 2005 und 2006, im Freisetzungversuch (März-Juni) angezogen und untersucht (Abb. 3.3). Zusätzlich wurden Pflanzen der transgenen Linie AAP14/10 und Wildtyp im darauf folgenden Jahr 2007 in einem Außengewächshaus im Erdbeet unter freilandähnlichen Bedingungen ohne Licht- oder Temperaturregulierung getestet.



Abb. 3.3 Aufnahmen des Freisetzungversuches der transgenen VfAAP1-überexprimierenden Pflanzen. Linie AAP14/10 und Vergleichskontrolle Wildtyp im Versuchsjahr 2005. Laut Genehmigungsvorschrift wurde das gesamte Versuchsfeld eingezäunt, mit einem Vogelschutznetz überspannt (rechtes Bild) und die einzelnen Pflanzen mit Beginn der Samenreife eingetütet (linkes Bild).

In den zwei Freisetzungversuchen war die Samenanzahl pro Pflanze zwischen AAP14/10 und Wildtyp unverändert, aber im Vergleich zur Anzucht im Gewächshaus produzierten die Pflanzen die zweifache Samenmenge. Im Experiment unter Gewächshausbedingungen hatten die Pflanzen der AAP14/10-Linie im Durchschnitt 38 Samen pro Pflanze und der Wildtyp lag bei 35 Samen/Pflanze. Im Freilandversuch 2005 hatten die transgenen Pflanzen eine Samenanzahl von 70 und die Wildtypkontrolle von 71.

Reife Samen der zwei Feldversuche und des Experiments im Außengewächshaus wurden hinsichtlich der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe analysiert. In Tab. 3.3 wurden die Messungen der Gehalte an N, C, Albumine, Globuline, Stärke und Saccharose der drei Jahre zusammengefasst. Der Gesamt-N-Gehalt war über die drei Versuchsjahre in den AAP14/10-Samen mit N-Werten um die 4,3% bis 4,5% gegenüber dem Wildtyp <4% signifikant erhöht. Bei den Speicherproteinen erhöhte sich der Gehalt bei den Globulinen, als die Hauptspeicherfraktion der Erbsenproteine, mit den höchsten Werten in den Feldversuchen 2005 und 2006 mit jeweils 93mg/g TG und 115mg/g TG gegenüber der Kontrolle mit 70mg/g TG bis 100mg/g TG. Die Albuminfraktion hatte indes mit 20mg/g TG unveränderte oder sogar signifikant niedrigere Werte (Feldversuch 2006) als der Wildtyp. Weiterhin ist deutlich zu sehen, dass die transgenen Samen weniger Kohlenstoff akkumulierten. Das zeigte sich zum einen in dem signifikant reduzierten Gehalt an Gesamt-C und Saccharose im Feldversuch 2006.

ERGEBNISSE

Tab. 3.3 VfAAP1-Effekt unter Freilandbedingungen. Bestimmung der Gehalte von N, C, Proteine, Stärke und Saccharose in reifen AAP14/10 und Wildtypsamen der Freilandversuche 2005 + 2006 sowie Außengewächshaus 2007. Berechnung der Standardabweichung \pm SD und Signifikanz Student t-Test. Signifikant höhere Werte: a \leq 0.05, b \leq 0.01, c \leq 0.001 und signifikant niedrigere Werte: x \leq 0.05, y \leq 0.01, z \leq 0.001.

	<i>Freilandversuch</i> 2005		<i>Freilandversuch</i> 2006		<i>Außengewächshaus</i> 2007	
	<i>AAP14/10</i>	<i>Wildtyp</i>	<i>AAP14/10</i>	<i>Wildtyp</i>	<i>AAP14/10</i>	<i>Wildtyp</i>
Stickstoff [%]	4.30 \pm 0.31^a	3.96 \pm 0.19	4.33 \pm 0.28^c	4.02 \pm 0.27	4.49 \pm 0.11^c	3.53 \pm 0.17
Kohlenstoff [%]	42.27 \pm 0.65	42.33 \pm 0.68	41.57 \pm 0.30^y	41.98 \pm 0.69	43.09 \pm 0.09	43.19 \pm 0.41
Albumine [mg/g]	18.57 \pm 1.94	20.26 \pm 2.83	21.11 \pm 1.43^z	23.00 \pm 2.27	20.74 \pm 0.98	21.10 \pm 0.62
Globuline [mg/g]	93.01 \pm 7.17^c	79.33 \pm 7.69	115.15 \pm 10.56^c	100.77 \pm 0.55	87.08 \pm 3.55^c	68.52 \pm 6.91
Stärke [mg/g]	367.82 \pm 17.21^x	384.79 \pm 17.29	383.03 \pm 35.38^x	404.14 \pm 30.64	380.56 \pm 16.76	385.56 \pm 15.88
Saccharose [mg/g]	65.54 \pm 14.04	66.66 \pm 7.63	57.37 \pm 5.80^y	63.20 \pm 7.11	71.59 \pm 4.47	76.46 \pm 7.67
Samengewicht (mg)	320 \pm 10.46	325.5 \pm 6.36	270.51 \pm 33.01^x	286.76 \pm 55.96	286.53 \pm 8.30^z	311.57 \pm 10.74

Des Weiteren war in den transgenen Samen der Gehalt an Stärke besonders in den Feldversuchen 2005 und 2006 verringert. Der Stärkeanteil betrug im Freiland 2006 ca. 380mg/g TG im Vergleich zum Wildtyp mit über 400mg/g TG. Eine Veränderung ist auch in der Samengröße erkennbar. Die AAP14/10-Samen wiesen im Feldversuch 2006 und im Außengewächshaus 2007 mit 270mg und 286mg gegenüber 286mg und 311mg im Wildtyp ein verringertes Samengewicht auf. Die Ergebnisse der Freilandversuche zeigten, dass das *VfAAP1*-Transgen den Samenstoffwechsel mit Veränderungen im N- und C-Metabolismus beeinflusst. Diese Erkenntnisse bestätigen die früheren Resultate unter Gewächshausbedingungen.

3.1.4 Inhaltsstoffanalyse sich entwickelnder AAP1-Samen

Die Samenreifung bei den Leguminosen wird durch verschiedene Signalnetzwerke reguliert. An der Regulation der Entwicklungsprozesse sind Stoffwechselprodukte und Hormone, wie Abscisinsäure (ABA), beteiligt. Um den Einfluss der verschiedenen Metabolite während der Samenentwicklung zu untersuchen, wurden N- und C-Gehalt, Stärke, Saccharose, Aminosäuren, Cytokinine und ABA gemessen. Dazu wurden Embryonen zu verschiedenen Entwicklungsstadien (15, 18, 22, 26, 30 und 35 DAP) zwischen der frühen und späten Samenreife geerntet (Freilandversuch 2006, Außengewächshaus 2007).

Freisetzungsversuch 2006

Das Stadium der Samenreifung ist bei Leguminosen durch Zellwachstum und Speicherung gekennzeichnet. Bevor der Same in die Ruhephase übergeht, erreicht er nach Akkumulation von Nährstoffen sein maximales Trockengewicht. Im Feldversuch 2006 nahm das Samenfrischgewicht während der untersuchten Entwicklungsphasen 18, 22, 26 und 30 DAP steigend zu, da vermehrte Speicherstoffe gebildet und eingelagert wurden. Im Vergleich der transgenen Samen zur Kontrolle zeigte sich, dass die AAP14/10-Samen ein verringertes Samenfrischgewicht gegenüber dem Wildtyp hatten, signifikant während der mittleren Samenreife am 22. und 26. DAP (Abb. 3.4-D). Die Gehalte an Gesamt-N und Gesamt-C stiegen während der Samenentwicklung an (Abb. 3.4-A, B). Wobei der Anstieg des N-Gehaltes in den AAP14/10-Samen von 4,8% auf 5,0% schwächer als im Wildtyp von 4,1% auf 4,8% war (Abb. 3.4-A). Die transgenen Samen akkumulierten gegenüber dem Wildtyp deutlich mehr N während der mittleren Samenreife (22 und 26 DAP), wogegen der Gesamt-C-Gehalt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transgenen und dem Wildtyp aufwies (Abb. 3.4-B). Der Gehalt an Saccharose in den Samen nahm vom frühen Entwicklungsstadium mit 60mg/g TG bis zur Speicherphase mit ca. 20mg/g TG ab, aber ohne signifikante Veränderungen zwischen AAP14/10 und Wildtyp (Abb. 3.4-C).

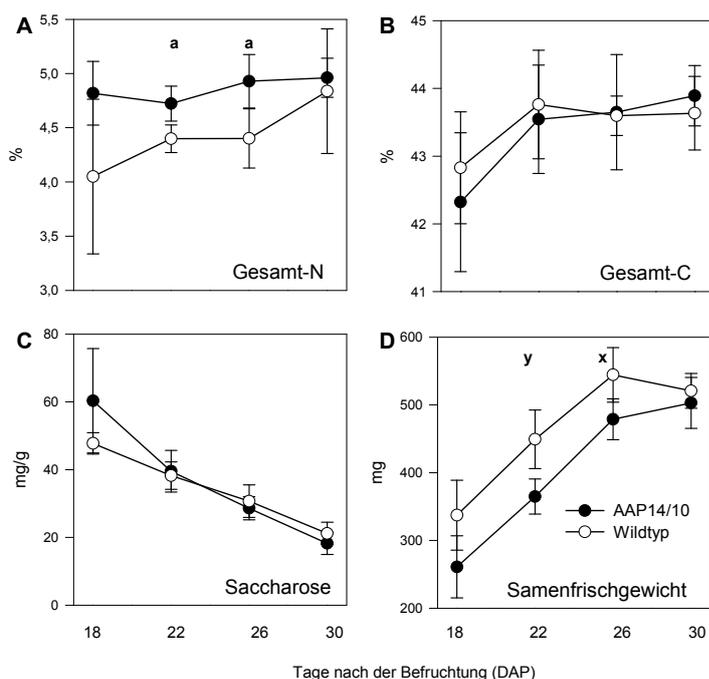


Abb. 3.4 Analyse der Inhaltsstoffe VfAAP1-überexprimierender Samen verschiedener Entwicklungsstadien (18, 22, 26 und 30 DAP) gewachsen im Freilandversuch 2006. A: Gesamt-N, B: Gesamt-C, C: Saccharose, D: Samenfrischgewicht. Für die statistische Auswertung wurden 5 Pflanzen verwendet, die Werte gemittelt und Standardabweichung \pm SD berechnet. Signifikant höhere Werte: $a \leq 0.05$, $b \leq 0.01$, $c \leq 0.001$ und signifikant niedrigere Werte: $x \leq 0.05$, $y \leq 0.01$, $z \leq 0.001$.

Außengewächshaus 2007 (freilandähnliche Bedingungen)

Zur Bestätigung der Daten des Freilandversuchs 2006 wurden Samen im darauf folgenden Jahr in einem Außengewächshaus im Erdbeet unter freilandähnlichen Bedingungen ohne Licht- oder Temperaturregulierung getestet. Die Analyse erfolgte an Embryonen der Linie AAP14/10 und dem Wildtyp der Entwicklungsstadien 18, 22, 26, 30 und 35 DAP. Wie auch schon im Freilandversuch 2006 zu sehen war, wiesen die AAP14/10-Samen ein reduziertes Samenfrischgewicht auf, signifikant am 18. DAP und während der späten Samenreifung am 30. und 35. DAP (Abb. 3.5-G). Die gleiche Aussage lässt sich auf das Samentrockengewicht übertragen (Abb. 3.5-H). Auch da waren die transgenen Samen leichter als der Wildtyp (signifikant 18 und 30 DAP). Während der frühen Samenentwicklung (18 DAP) war der Gesamt-N-Gehalt in allen Samen mit durchschnittlich 4,6% recht hoch (Abb. 3.5-A). Danach sank der Wert am 22. DAP in den Transgenen auf 4,4% und im Wildtyp drastischer auf 3,7% ab. Während der Reifungsphase war keine weitere Veränderung der N-Gehalte in der AAP14/10-Linie und im Wildtyp zu erkennen. Die Werte blieben auf dem Level um die 4,4% und 3,5%, wobei die transgenen Samen von 22-35 DAP signifikant mehr Gesamt-N akkumulierten als der Wildtyp. Der Gesamt-C-Gehalt war nur am 26. DAP in den Transgenen gegenüber dem Wildtyp erhöht (Abb. 3.5-B). Die anderen Entwicklungsstadien waren unverändert. Um Aussagen über die Veränderungen des Proteingehaltes zu machen, wurden die einzelnen Proteinfractionen Albumine und Globuline bestimmt. Der Gehalt an Albuminen stieg zu Beginn der Samenentwicklung von 5mg/g TG auf 25–27mg/g TG am 35. DAP an (Abb. 3.5-C). Während dem gesamten Entwicklungsverlauf war der Albumingehalt in den AAP14/10-Samen signifikant verringert verglichen mit den Wildtypsamen. Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich bei den Globulinen (Abb. 3.5-D). Die Konzentration der Globulinfraction stieg drastisch von 20mg/g TG (18 DAP) auf 70-75mg/g TG (22 DAP) an und erreichte ihr Maximum am 30. DAP mit ca. 90mg/g TG.

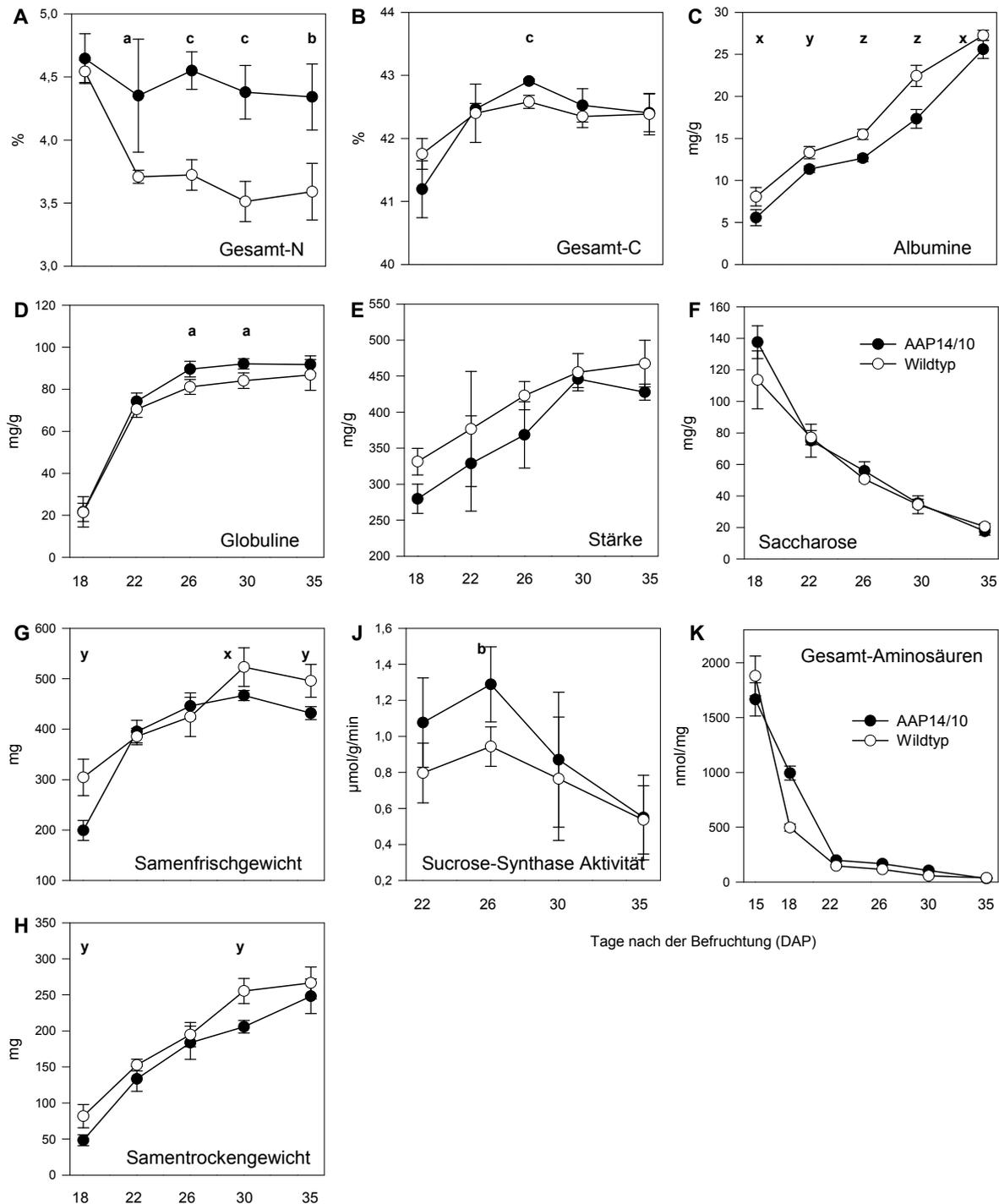


Abb. 3.5 Bestimmung der Samenspeichercomponenten, Gesamt-Gehalt an freien Aminosäuren und die Saccharose-Synthase Aktivität in VfAAP1-überexprimierenden Samen verschiedener Entwicklungsstadien (18, 22, 26, 30 DAP) gewachsen im Freilandversuch 2006. Vergleich Linie AAP14/10 und Wildtyp. A: Gesamt-N, B: Gesamt-C, C: Albumine, D: Globuline, E: Stärke, F: Saccharose, G: Samenfrischgewicht, H: Samentrockengewicht, J: Saccharose-Synthase-Aktivität, K: Gesamt-Aminosäuren. Signifikant höhere Werte: $a \leq 0.05$, $b \leq 0.01$, $c \leq 0.001$ und signifikant niedrigere Werte: $x \leq 0.05$, $y \leq 0.01$, $z \leq 0.001$.

Zu Beginn der Samenreife (18 und 22 DAP) war kein Unterschied im Globulingehalt zwischen Transgene und Wildtyp zu erkennen. Erst während der mittleren und späten Stadien (26-30 DAP) hatten die Samen einen signifikant höheren Globulingehalt. Weiterhin ist deutlich zu sehen, dass mehr Stärke in den Erbsenkotyledonen während der Samenentwicklung von 18 DAP mit ca. 300mg/g TG zu 35 DAP mit 450 mg/g TG gespeichert wurde (Abb. 3.5-E), wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den AAP14/10- und Wildtypsamen gab. Entgegen dem Kurvenverlauf der Stärkespeicherung verlief die Akkumulation von Saccharose. In der frühen Phase war ein hoher Anteil mit etwa 100mg/g TG an freien Zuckern in den Samen, der dann bis zur späten Phase der Samenreife auf ca. 20mg/g TG abnahm (Abb. 3.5-F). Auch hier gab es keine messbaren Unterschiede zwischen den Transgenen und der Kontrolle. Messungen des Enzyms Saccharose-Synthase zeigten einen Anstieg der Aktivität vom 22. DAP zum 26. DAP und anschließend eine drastische Verringerung um die Hälfte zum 35. DAP (Abb. 3.5-J). In den transgenen Embryonen wurde eine verstärkte Aktivität gegenüber dem Wildtyp, besonders während der mittleren Samenentwicklung (signifikant 26 DAP), gemessen.

Aminosäurezusammensetzung

Die transgenen Samen der Linie AAP14/10 zeigten in der Northern Blot Analyse eine deutlich erhöhte Expression von *VfAAP1*. Zur Bestimmung der *VfAAP1*-Transkriptmenge in den transgenen Samen wurden Northern Blot Analysen mit extrahierter Gesamt-RNA aus Erbsenkotyledonen des Stadiums der mittleren Samenreife (28 DAP) durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde das radioaktivmarkierte cDNA-Fragment von *VfAAP1* (Miranda *et al.*, 2001) verwendet. Die Pflanzenlinien 10, 14, 18 und 20 zeigten eine verstärkte Expression des *VfAAP1*-Transgens im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3. 1). Um eine verstärkte Funktion dieses Transporters und somit auch eine erhöhte Zufuhr an Aminosäuren in den Samen nachzuweisen, wurde der Gehalt an freien Aminosäuren im Embryo während der Samenentwicklung bestimmt. Dazu wurden Embryonen sechs verschiedener Stadien (15, 18, 22, 26, 30 und 35 DAP; Außengewächshaus 2007) geerntet und die relativen Gehalte von 18 Aminosäuren sowie von γ -Aminobutyrat (GABA) und Citrullin mittels HPLC gemessen (Abb. 3.6). Der Gesamtgehalt der Aminosäuren war während der frühen Samenentwicklung (15 DAP) im Wildtyp und in den transgenen Samen am höchsten und sank in der weiteren Entwicklung (18 und 22 DAP) drastisch ab (Abb. 3.5-K). Die meisten Aminosäuren hatten ihren höchsten Wert am 15. DAP, wie bei Lysin, Isoleucin, Methionin, Histidin, Glutamin, Glutaminsäure, Citrullin, Leucin, Alanin, Valin, Serin, Phenylalanin und Tyrosin (Abb. 3.6). In den AAP14/10-Embryonen war am 18. DAP der Gehalt an freien Aminosäuren fast doppelt so hoch als in der Kontrolle. Dieser Unterschied verringerte sich genauso wie der Gesamtanteil an freien Aminosäuren im Samen während der späteren Stadien (22-35 DAP). Im Vergleich zum Wildtyp waren in den transgenen Samen die Aminosäuren Isoleucin, Methionin, Histidin, Glutamin, Glutaminsäure, Leucin, Alanin, Valin, Glycin, Serin, und Phenylalanin nur in diesem frühen Stadium (18 DAP) signifikant erhöht in den transgenen AAP14/10-Samen. Asparaginsäure (26 und 30 DAP), Threonin (22 DAP) und Arginin (26 DAP) wiesen noch zu einem späteren Entwicklungsstadium einen erhöhten Gehalt auf.

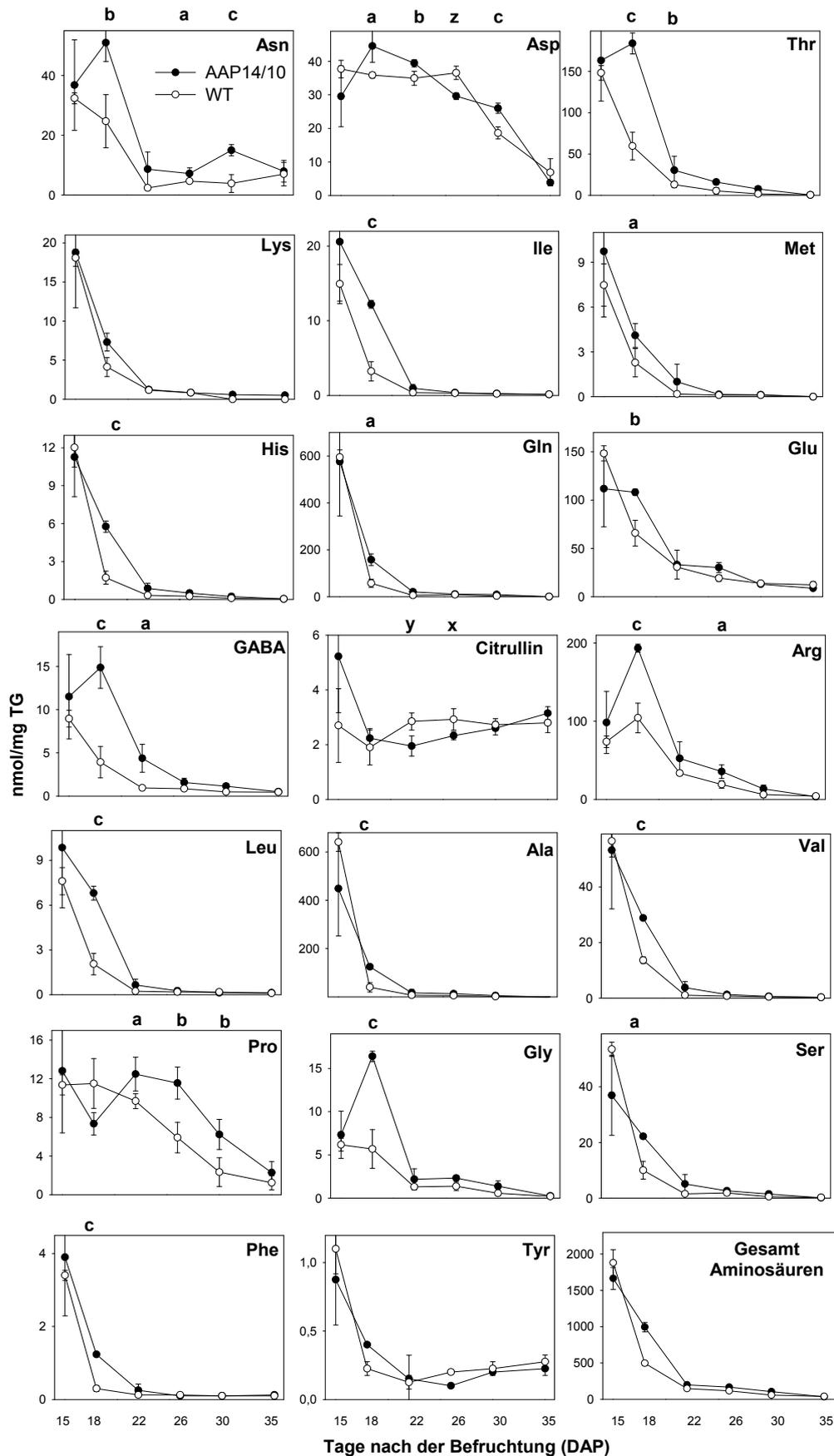


Abb. 3.6 Gehalte an freien Aminosäuren in AAP14/10- und Wildtypsamen während der Samenentwicklung (15, 18, 22, 26, 30 und 35 DAP) gewachsen im Außengewächshaus 2007. Signifikant höhere Werte: $a \leq 0.05$, $b \leq 0.01$, $c \leq 0.001$ und signifikant niedrigere Werte: $x \leq 0.05$, $y \leq 0.01$, $z \leq 0.001$.

Bei Prolin war in der mittleren Samenreife (22–30 DAP) ein signifikant höherer Anteil im Samen messbar. Lysin und Tyrosin wiesen über den gesamten Messzeitraum der Samenentwicklung keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp auf. Für Asparagin wurden am 18, 22. und 30. DAP deutlich höhere Werte gemessen, wogegen nur am 26. DAP ein verringerter Anteil dieser Aminosäure in den transgenen Samen zu finden war. Citrullin, ein Zwischenprodukt des Arginin-Stoffwechsels, war während der mittleren Samenreife (22 und 26 DAP) signifikant erniedrigt. Im Gegensatz dazu konnten für GABA erhöhte Werte zwischen 18 und 22 DAP bestimmt werden.

Hormonelle Veränderungen in den *VfAAP1*-überexprimierenden Samen

Um mögliche hormonelle Einflüsse auf Genexpression und Samenreifung zu untersuchen, wurden die Phytohormone ABA und Cytokine bestimmt. Die Ermittlung der Cytokininkonzentration erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. R. J. Neil Emery (Biology Department, Trent University, Peterborough, ON, Canada). Der Gesamtgehalt an Cytokinin war in den transgenen Samen während der mittleren Samenreife (22-30 DAP) signifikant verringert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.7-A). In beiden Genotypen war der Cytokingehalt am 18. DAP mit Werten um die 350 pmol/mg FG am höchsten und fiel dann im weiteren Entwicklungsverlauf auf ein Viertel der Werte ab, mit einem kleinen Anstieg zum 35. DAP.

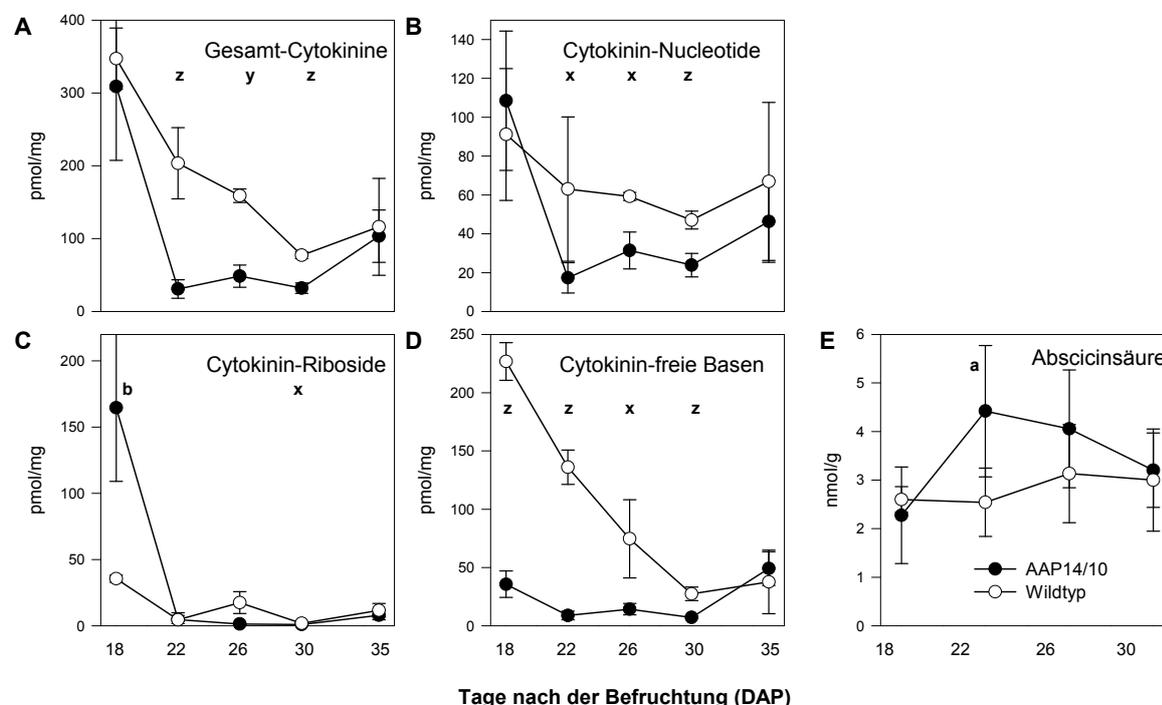


Abb. 3.7 Bestimmung der Phytohormone Cytokinin, dessen aktive Isoformen und ABA in den *AAP1*-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp. A: Gesamt-Cytokinine, B: Cytokinin-Nucleotide, C: Cytokinin-Riboside, D: Cytokinin-freie Basen, E: Abscisinsäure. Signifikant höhere Werte: a \leq 0.05, b \leq 0.01, c \leq 0.001 und signifikant niedrigere Werte: x \leq 0.05, y \leq 0.01, z \leq 0.001.

Der Gehalt an Cytokinin-Nucleotiden wurde in den AAP1-Samen während der mittleren Samenentwicklung (22-30 DAP) deutlich reduziert (Abb. 3.7-B). Während der anderen Stadien (18 und 35 DAP) zeigte sich kein Unterschied zum Wildtyp. Auch die Werte der aktiven Isoform Cytokinin-freie Basen waren von der frühen bis späten Samenreife (18-30 DAP) stark verringert in den transgenen Embryonen gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3.7-D). Der Gehalt war in den Kontrollsamens am 18. DAP mit 250pmol/mg FG am höchsten und fiel dann drastisch auf 50pmol/mg FG ab, wogegen die Transgenen schon zu Beginn sehr niedrige Werte aufwiesen, die zum späteren Zeitpunkt (35 DAP) noch anstiegen. Im Gegensatz dazu waren die Gehalte an Cytokinin-Ribosiden in den AAP1-Samen signifikant am 18. DAP erhöht, aber am 30. DAP schon wieder reduziert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.7-C). Auch der Hormongehalt an ABA stieg während der Samenreife an (Abb. 3.7-E). Eine drastische Erhöhung an ABA war in der Linie AAP14/10 am 22. DAP zu sehen. Danach fielen die Gehalte wieder auf den Wert vom Wildtyp ab.

3.1.5 Transkriptionsanalyse sich entwickelnder VfAAP1-überexprimierender Samen

Für die Analyse der Expression spezifischer Gene während der Samenentwicklung wurde die Array-Technik angewendet. Im Rahmen des EU-Projektes GRAIN LEGUMES standen Oligonucleotid-Microarrays von *Pisum sativum* (*Ps6kOL1*) zur Verfügung, bestehend aus 5246 verschiedenen Oligonucleotiden, jeweils dreifach als technische Kontrolle gespottet, basierend auf EST-Clustern, hauptsächlich (>90%) aus Samenschale und Kotyledonen (Radchuk *et al.*, 2006). Die Microarray-Expressionsanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Küster (ehemals CeBiTec-Center der Universität Bielefeld, aktuell Leibniz-Universität Hannover). Embryonen der Linie AAP14/10 und vom Wildtyp, gewachsen im Freilandversuch 2006, wurden zu vier verschiedenen Entwicklungszeitpunkten (18, 22, 26 und 30 DAP) geerntet und hinsichtlich ihrer Genexpression verglichen. Dabei wurden Gene als differenziell exprimiert eingestuft, wenn sie einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,05$ und einen Faktor, resultierend aus der Differenz der Signalintensitäten, von mindestens 1,7 aufwiesen.

Basierend auf der Tatsache, dass die exprimierte Menge bestimmter Transkripte nicht endgültig etwas über transkriptionelle Aktivitäten, Proteinmengen oder Enzymaktivitäten aussagt, sind alle folgenden Ergebnisse und Aussagen bezüglich Übereinstimmungen von Genen und ihren Funktionen als möglicherweise anzusehen. Zur Vereinfachung wurden alle erhöhten oder verringerten Transkriptmengen resultierend aus dem Vergleich der Transgenen mit den Wildtypsamens als hoch- oder herunterreguliert bezeichnet. In Abb. 3.8 sind die Gesamtanteile der induzierten und reprimierten Gene pro Entwicklungsstadium dargestellt.

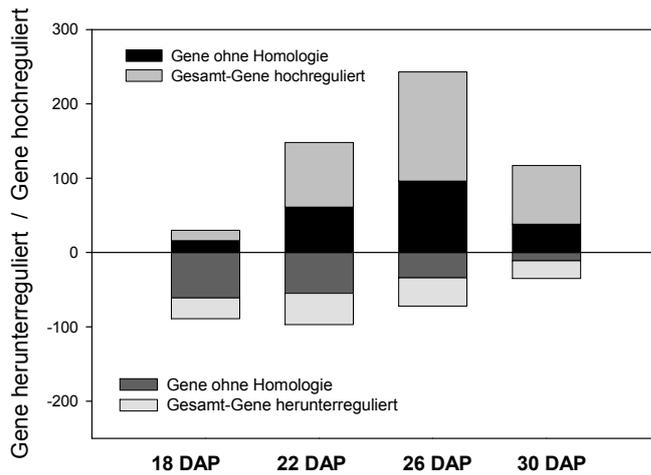


Abb. 3.8 Gesamtanteil der induzierten und reduzierten Gene je Stadium (18, 22, 26 und 30 DAP) in den AAP14/10-Embryonen laut Daten der Oligonucleotid-Microarray Analyse. Einteilung der Gesamt-Gene hoch/ herunterreguliert und Gene ohne annotierbare Sequenzhomologie.

Im Gesamten wurden 30, 151, 258 und 117 Gene entsprechend dem jeweiligen Stadium 18, 22, 26 und 30 DAP hochreguliert. Bezogen auf die Gesamtheit von 5200 gespotteten ESTs pro Microarray entspricht dies einem prozentualen Anteil von 0,6; 2,9; 5,0 und 2,3%. Von diesen induzierten Genen zeigten letztlich 16, 61, 96 und 38 Gene (entspricht 53, 40, 37 und 32% der hochregulierten Gene) keine Homologie zu annotierten Sequenzen. Im Gegensatz dazu war die Expression von 41, 96, 74 und 35 Genen (0,8; 1,8; 1,4 und 0,7%) am Tag 18, 22, 26 und 30 DAP reduziert. Auch hier wiesen 16, 55, 34 und 11 Gene (39, 57, 46 und 31% der reprimierten Gene) keine Homologie zu annotierten Sequenzen auf. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl der exprimierten Gene während der Samenentwicklung vom 18. DAP bis zur mittleren Samenreife (22, 30 DAP) deutlich anstieg und dann im späteren Stadium wieder etwas abfiel. Dieser Kurvenverlauf stimmt mit dem zeitlichen Profil der Aktivität des verwendeten *LeB4*-Promotors (Bäumlein *et al.*, 1992) überein. Weiterhin ist auffällig, dass außer am 18. DAP 2-3mal so viele Gene in den transgenen Samen hoch- als herunterreguliert wurden. Die Überexpression von *VfAAP1* scheint die Expression bestimmter Gene in Erbsensamen verstärkt zu stimulieren. Die Gene, die eine Homologie zu annotierten Sequenzen aufwiesen, wurden in sechs funktionelle Gruppen eingeteilt: (1) Stoffwechsel, (2) Stress- und Pathogenabwehr, (3) Transkription und Translation, (4) Samenreifung, Wachstum und Entwicklung, (5) Transport und Proteinprozessierung sowie (6) Signalweiterleitung (Abb. 3.9). Die differenziell exprimierten Gene und ihre möglichen Funktionen wurden im Anhang Tab. A.1 und Tab. A.2 sowie in den Schemata Abb. A.4 zusammengefasst und werden im Folgenden näher beschrieben.

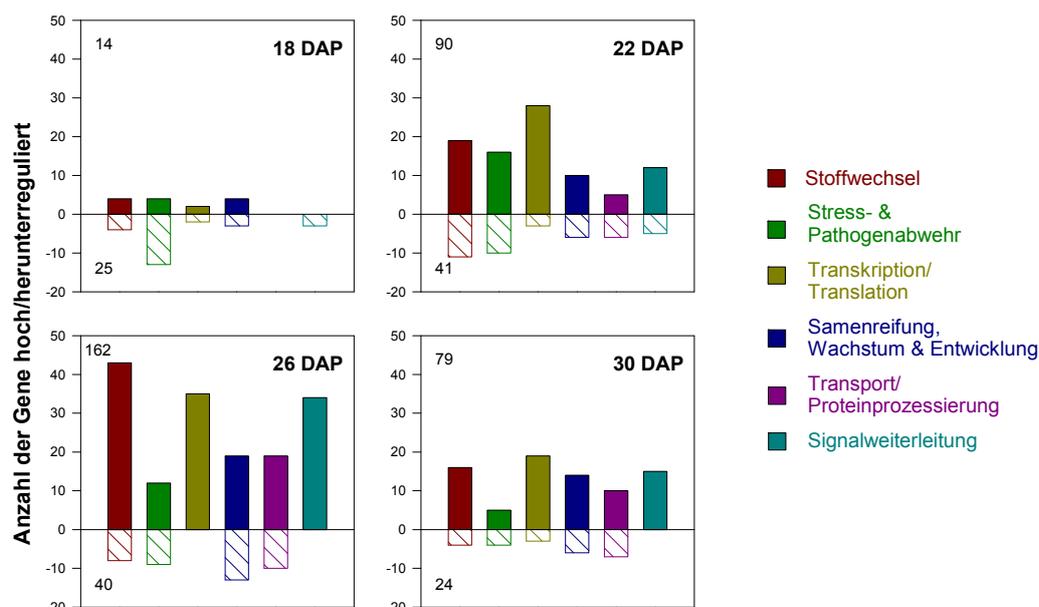


Abb. 3.9 Gesamtanteil der annotierten hoch/herunterregulierten Gene je Stadium 18, 22, 26 und 30 DAP der AAP14/10-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp. Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen: (1) Stoffwechsel, (2) Stress- und Pathogenabwehr, (3) Transkription und Translation, (4) Samenreifung, Wachstum und Entwicklung, (5) Transport und Proteinprozessierung sowie (6) Signalweiterleitung.

Differenziell regulierte Gene der funktionellen Gruppe „Transkription und Translation“

Der größte Anteil differenziell exprimierter Gene, vorrangig induziert während der mittleren Samenreife (26, 30 DAP), wurde funktionell der Gruppe „Transkription und Translation“ zugeordnet. Gene dieser Gruppe kodieren hauptsächlich für ribosomale Proteine, Histone, Replikations-, Initiations- und Elongationsfaktoren (*Supplemental Table S1 - S4*; Weigelt *et al.*, 2008). Weiterhin wurden verstärkt Gene exprimiert, die für verschiedene Histone kodieren, besonders während der mittleren Samenreife (26 DAP). Fast dreimal so viele Vertreter dieser Proteine waren im Vergleich zu den anderen Stadien zu finden. Den größten Anteil der Gruppe machten Gene aus, die für ribosomale Proteine kodieren, besonders während des frühen Stadiums (22 DAP). Zusätzlich wurden transkriptionelle Regulatoren identifiziert, die möglicherweise an der Stoffwechselregulation oder an N-Signalprozessen beteiligt sind. Darunter waren zwei Transkriptionsfaktoren (22, 26 DAP), die erstmalig in Samen von *Vicia faba* beschrieben wurden, ein AP2/EREBP Transkriptionsfaktor ERF-2 (22, 26 DAP), zwei Transkriptionsfaktoren ATB2 mit einer bZIP Domäne (26, 30 DAP), ein HD ZIP homeotisches Protein (26 DAP) sowie ein BTF3 Transkriptionsfaktor (26 DAP).

VfAAP1-Überexpression beeinflusst Gene des Aminosäure- und Zuckerstoffwechsels

In den AAP14/10-Samen wurde ein erhöhter Zufluss an Aminosäuren gemessen (Abb. 3.5-K). Dieser geht mit der verstärkten Expression von 14 Genen einher, deren Proteine funktionell am Aminosäurestoffwechsel beteiligt sind. Darunter waren Gene, die für Enzyme der Aminosäuresynthese kodieren, wie die Aspartat-Aminotransferase (18 DAP),

Serin/Glycin-Hydroxymethyltransferase (26, 30 DAP, mito.), Asparagin-Synthase ASN1 (22, 26, 30 DAP), Threonin-Synthase (22 DAP, plast.), Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase (26 DAP), Methionin-Synthase (30 DAP) und Glutamin-Synthetase GS1 (26 DAP). Weiterhin wurden auch Gene induziert, deren Proteine in Verbindung mit dem Abbau von Aminosäuren stehen, wie die Arginin-Decarboxylase (22 DAP), die pyridoxalabhängige Decarboxylase (26 DAP) mit Homologie zur Arginin-Decarboxylase, die Aminomethyltransferase (22 DAP, mito.) und die Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase IV-DH (26 DAP). Für 3 weitere Sequenzen (Threonin-Aldolase, 18, 22 DAP; Glutamin-Synthetase GS1, 22 DAP, zyto. und Acetohydroxysäure-Synthase AHAS, 26 DAP, plast.) wurden dagegen verringerte Transkriptmengen gefunden.

Die Überexpression von VfAAP1 beeinflusst auch den Kohlenhydratstoffwechsel. Insgesamt wurden 15 Gene verstärkt exprimiert, deren Proteine in Verbindung mit Saccharosespaltung und Glycolyse stehen. Davon wurden fünf Sequenzen während der frühen Samenentwicklung (18, 22 DAP) induziert, die für Saccharose-Synthasen kodieren. Dies stimmt mit der gemessenen Erhöhung der Susy-Aktivität überein (Abb. 3.5-J). Zusätzlich wurden erhöhte Transkriptmengen am 22. DAP und reduzierte während eines späteren Stadiums (26 DAP) für ein Gen gefunden, welches für die neutrale Invertase kodiert. Sieben Gene wurden während der frühen Entwicklung (22 DAP) hochreguliert, deren Enzyme in glycolytische Stoffwechselwege involviert sind (Phosphoglycerat-Kinase, zyto; Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, zyto; eine Enolase und Triosephosphat-Isomerase). Zu einem späteren Stadium (26 DAP) erfolgte die verringerte Expression von Genen, die für zytosolische Isoformen der Phosphoglyceratkinase und Phosphoglucomutase kodieren.

Es wurden erhöhte Transkriptmengen für spezifische Gene des UDP-Galaktose- (UDPG-4-Epimerase, 26, 30 DAP) und UDP-Glucose-Stoffwechsels (UDP-Glucose-6-Dehydrogenase, 26, 30 DAP und UDP-Glucuronat-Decarboxylase, 26 DAP) gefunden. Zusammen mit weiteren induzierten Genen am 26. DAP, wie Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase, UDP-Glycosyltransferase, Polygalacturonase, α -L-Arabinofuranosidase und Cinnamylalkohol-Dehydrogenase, spielen sie eine Rolle bei der Zellwandbiosynthese (*Supplemental Table S1-S4*; Weigelt *et al.*, 2008). Bei der Reaktion von UDP-Galaktose mit Myo-Inositol entsteht Galactinol, dessen Gehalt in metabolischen Analysen in den transgenen AAP14/10-Samen erhöht war (Abb. 3.10). Die Gene, die für Xyloglucan-Endotransglycosylase und Beta-Xylosidase kodieren, wurden im mittleren Stadium (26 DAP) herunterreguliert. Durch die Zellwandbiosynthese ergibt sich ein Mehrbedarf an Kohlenstoff, der wiederum in Verbindung mit der verstärkten Expression von zwei Genen steht, deren Proteine zum einen in Prozesse des Stärkeabbaus, wie die plastidäre Stärke-Phosphorylase (22 DAP) und Glucan-Wasser-Dikinase (26 DAP; Edner *et al.*, 2007), und zum anderen in Transportvorgänge (Hexose-Transporter, 22 DAP) involviert sind.

VfAAP1-Überexpression stimuliert die Expression mitochondrialer Gene

In den transgenen AAP1-Samen ist eine deutliche Stimulierung der Expression von 16 Genen zu sehen, deren Produkte am mitochondrialen Stoffwechsel beteiligt sind. Diese Gene wurden ausschließlich während der mittleren Samenreife (26 DAP) induziert und kodieren für Proteine, die hauptsächlich beim Abbau der Aminosäuren Glycin, Leucin, Valin und Serin eine Rolle spielen (Aminomethyltransferase, 22 DAP; Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase, 26 DAP; Serin/Glycin-Hydroxymethyltransferase, 26, 30 DAP). Die Produkte von vier hochregulierten Genen konnten funktionell dem Zitronensäurezyklus zugeordnet werden, die Pyruvat-Dehydrogenase E1 und E2, Succinyl-CoA-Ligase und Succinat-Dehydrogenase. Drei weitere induzierte Gene kodieren für Proteine, die funktionell an der Atmungskette und somit an der Bildung des Energieträgers ATP beteiligt sind. Die Flavoprotein:Ubiquinone Oxidoreduktase, Komplex 1 (ETFQO) und zwei Ubiquinol-Cytochrom-C Reduktasen, Komplex 3 (UQCytC) sind Teil der Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran, die Elektronen über den Flavinenzymkomplex und über Chinone transportieren. Weiterhin waren zwei Gene hochreguliert, kodierend für die γ -Aminobutyrat-Transaminase und die Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase *gabD*, die eine Rolle im GABA-Shunt spielen (Fait *et al.*, 2008). Auch der mitochondriale Transport von Proteinen war in den transgenen Samen stimuliert. Die Gene der Proteine TIM17/22 und TIM50, Translokasen der mitochondrialen Innenmembran, waren am 26. und 30 DAP induziert. Zwei weitere Gene, die für die mitochondrial prozessierte Peptidase beta und das dnaK-Typ molekular Chaperon kodieren, sind an der Proteinprozessierung beteiligt.

Verstärkte Expression von Genen beteiligt an Prozessen der Samenreifung

Während der Samenreifung spielen unter anderem Hormone eine wichtige Funktion bei der Regulation der verschiedenen Entwicklungsprozesse. Ein Vertreter ist das Phytohormon Abscisinsäure. Schon in geringen Konzentrationen hemmt es die Samenkeimung und löst die Samenruhe aus (West and Harada, 1993). VfAAP1-überexprimierende Samen hatten einen erhöhten Gehalt an ABA (Abb. 3.7-E), besonders während der mittleren Samenreife (22 DAP). Dies steht in Verbindung mit der verstärkten Expression der zwei Gene ABA-2 und 9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase 1 (26 DAP), die beide für Schlüsselenzyme der ABA-Biosynthese kodieren. Eine Überexpression dieser Gene bewirkte in Samen von Arabidopsis und Tabak eine Erhöhung der ABA-Gehalte (Qin and Zeevaart, 2002; Lin *et al.*, 2007). Weiterhin wurde die Expression von zwei Genen induziert, die für das auxin- und ethylengesteuerte GH3-ähnliche Protein (22, 30 DAP) sowie das auxinresistente Protein AXR1 (30 DAP) kodieren, die an der hormonellen Signalwirkung beteiligt sind.

Die Erhöhung der ABA-Gehalte und die hochregulierten Enzyme der ABA-Biosynthese stehen in Verbindung mit der verstärkten Expression von 14 Genen, die an Prozessen der Samenspeicherung und Samenreifung beteiligt sind. Die Hauptspeicherfraktionen der Leguminosen sind Albumine und Globuline, wobei die Globuline den größten Anteil mit den zwei Speicherproteinen 7S Vicilin und 11S Legumin ausmachen (Domoney and Casey, 1985). Während der späten Samenreifung (30 DAP) wurden 8 Gene hochreguliert, die für 6

Viciline und 2 Legumine kodieren. Des Weiteren wurde ein Gen induziert, welches für ein hydrophiles LEA-Protein kodiert, das eine wichtige Funktion beim Austrocknungsschutz als so genannter Osmoprotektant hat (Delseny *et al.*, 2001). Vier hochregulierte Sequenzen kodieren für Ferritine, die zusammen mit den LEA-Proteinen durch ABA induziert werden (Lobreaux *et al.*, 1993).

Differenziell exprimierte Gene der funktionellen Gruppe „Transport und Proteinprozessierung“

Es wurden verschieden exprimierte Gene gefunden, welche für Proteine kodieren, die an Transportvorgängen und Proteinprozessierung beteiligt sind. In den transgenen AAP14/10-Samen waren sechs Sequenzen hochreguliert, kodierend für Chaperone und Chaperonine, die verantwortlich für Proteinveränderungen und dem Proteintransport durch Membranen sind (zwei DnaJ Molekularchaperone, 26, 30 DAP; ein HSP20-ähnliches Chaperon, 26 DAP; dnaK-Typ Molekularchaperon PHSP1, 26 DAP; CSS1, 30 DAP sowie das Chaperonin TCP-1, 26 DAP). Weiterhin wurden Gene induziert, deren Proteine in Verbindung mit vakuolären Transportprozessen (zwei H⁺-transportierende ATPasen, 22 DAP; die inorganische Pyrophosphatase, 26, 30 DAP; die ATPase, UE H, 26, 30 DAP und das α -Tonoplast Intrinsische Protein, α -TIP, 30 DAP) und dem Vesikeltransport (Hexose-Transporter, 22 DAP; Zink/Eisen-Transporter, 26 DAP) stehen. Zusätzlich wurden Gene verstärkt exprimiert, die für einen plastidären Aminosäurekanal der äußeren Membran, OEP16 (26, 30 DAP; (Pohlmeyer *et al.*, 1997) und zwei Translokasen der inneren Mitochondrien Membran TIM17/22 (26 DAP) und TIM50 (30 DAP) kodieren. Dagegen wurden auch Gene mit reduzierter Transkriptmenge in den transgenen AAP1-Samen gefunden, kodierend für verschiedene Chaperone (Kupfer-Chaperon-Homolog CCH, 26 DAP und Chaperon BiP-A, 26 DAP), zwei Aminosäurepermeasen (26 DAP) und einen Monosaccharid-Transporter (26 DAP).

3.1.6 Bestimmung von Metaboliten des Samenstoffwechsels in AAP1-Embryonen

Zur genauen Untersuchung der Veränderungen im Samenstoffwechsel wurden *VfAAP1*-überexprimierende Embryonen mittels GC-MS Technik mit Hilfe von Dr. A. Fait und Dr. A. R. Fernie (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm) analysiert. Mit dieser Technik konnten 65 verschiedene Metabolite der Glycolyse und des Zitronensäurezyklus (TCA) sowie 26 Aminosäuren und 8 Zucker bestimmt werden. Die transgenen Pflanzen wurden in Phytokammern unter konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen angezogen. Für die Metabolitanalyse wurden unreife Samen der transgenen Linie AAP14/10 und des Wildtyps verschiedener Entwicklungsstadien (18, 22, 26, 30 und 35 DAP) verwendet. Eine Veränderung der Stoffwechselprodukte wird als entsprechender Faktor (in Klammern) dargestellt, der aus der Differenz zwischen den beiden Vergleichsproben berechnet wurde.

Bei den transgenen Pflanzen war genau wie bei der Transkriptanalyse auffällig, dass sich die Veränderungen fast nur als signifikante Erhöhung der Metabolite in den transgenen Samen

darstellten (Abb. 3.10). Bereits in der vorangegangenen Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung mittels HPLC-Technik (Abb. 3.6) war deutlich zu sehen, dass sich die größten Veränderungen während der frühen Samenentwicklung (15, 18 DAP) zeigten. Bei der GC-MS Analysemethode wurden erhöhte Werte für die Aminosäuren Asparagin (11), Ornithin (9), Arginin (9), Threonin (7), Glutamin (6), Homoserin (6), Isoleucin (4), Serin (2), Asparaginsäure (2) und Methionin (2) gemessen. In späteren Stadien konnte allerdings keine weitere Veränderung festgestellt werden. Nur die Werte von Threonin (2) und Serin (2) waren noch am 35. DAP leicht erhöht. Weiterhin zeigte sich eine leichte Erhöhung bei Tyrosin, Glycin und Prolin während der späten Samenreifung (35 DAP), wogegen die Aminosäuren Lysin, Glutaminsäure, Alanin, Phenylalanin und Tryptophan während der ganzen Entwicklung unverändert blieben. Die Gehalte des Polyamins Putrescin waren während der frühen Samenreifung (18, 22 DAP) jeweils um den Faktor 2 signifikant erhöht, während Spermidin nicht verändert wurde. In Pflanzen wird das Polyamin Putrescin durch Decarboxylierung von Arginin und Ornithin synthetisiert (Groppa and Benavides, 2008). Für Arginin und Ornithin wurden jeweils um den Faktor 9 erhöhte Gehalte am 22. DAP gefunden. Zusätzlich zeigten die Transkriptdaten eine verstärkte Expression der Arginin-Decarboxylase am 22. DAP. Die Werte an β -Alanin, was in Verbindung mit dem Abbau von Polyaminen steht (Cona *et al.*, 2006), waren in den transgenen Embryonen während der frühen Stadien (18, 22 DAP) und der späteren Samenreifung (35 DAP) signifikant um den Faktor 2 erhöht. Eine Erhöhung zeigte sich auch bei dem Zuckeralkohol Galactinol. Die Werte waren während der frühen bis mittleren Samenentwicklung (22–30 DAP) jeweils um das Zweifache erhöht. Des Weiteren konnten mittels GC-MS Analyse veränderte Metabolite der Glycolyse und des TCA bestimmt werden. Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde während der mittleren Samenreife am 26. und 30. DAP jeweils um den Faktor 2 erhöht. Die Gehalte an Citrat (2), Iso-Citrat (5) und Aconitat (2) waren am 22. DAP signifikant erhöht, wogegen Succinat, Fumarat, Malat und 2-Oxo-Glutarat keine signifikanten Veränderungen aufwiesen. Das letztere war sogar am 30. DAP leicht verringert. Diese Veränderungen der Metabolite des TCA-Zyklus stimmen mit den Daten der stimulierten Expression mitochondrialer Gene überein (Tab. A.1).

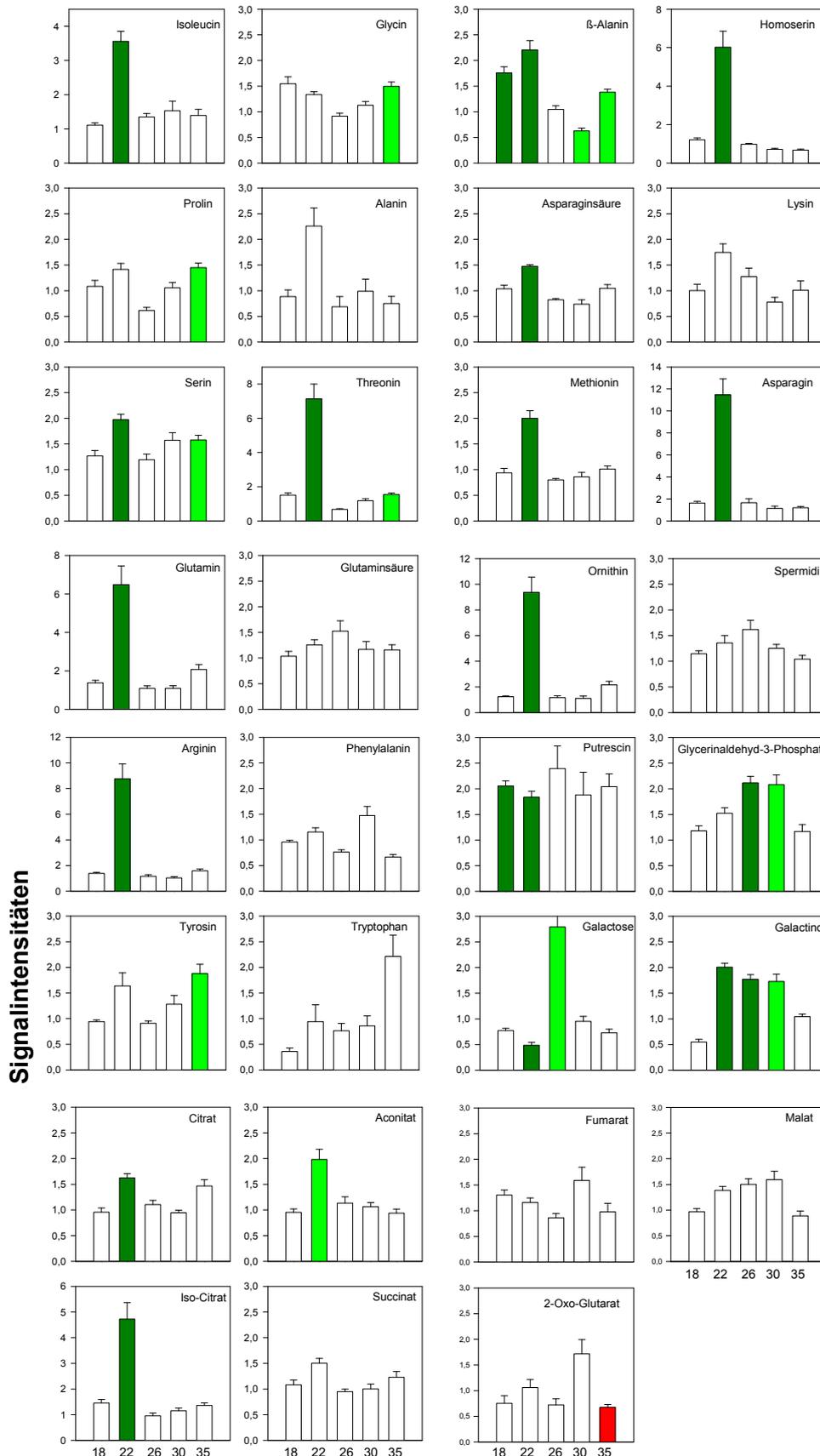


Abb. 3.10 Metabolite des Samenstoffwechsels von AAP1-Samen im Vergleich zum Wildtyp. Gemessen mittels GC-MS Analysetechnik. Die Werte von je 6 Pflanzen wurden gemittelt und die Standardabweichung \pm SD und Student t-Test berechnet. Signifikant höhere Werte: Balken in dunkelgrün ≤ 0.05 , hellgrün ≤ 0.1 und signifikant niedrigere Werte: Balken in dunkelrot ≤ 0.05 .

3.2 Phloem- und samenspezifische Überexpression von *VfAAP1*

Die bisher gezeigten Ergebnisse befassten sich mit dem Einfluss der Aminosäurepermease *VfAAP1* unter Kontrolle des samenspezifischen Legumin B4 Promotors auf den Samenstoffwechsel. In diesem Teil der Arbeit soll der funktionell charakterisierte N-Transporter aus *Vicia faba* unter Kontrolle eines phloemspezifischen Promotors exprimiert werden. Dazu wurde der Promotor des Saccharosetransporters 2 aus *Arabidopsis thaliana* (*AtSUC2*; Truernit and Sauer, 1995) verwendet (bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Dr. N. Sauer, Erlangen). *AtSUC2* ist in den Geleitzellen des Phloems aktiv und wird in *source*- sowie *sink*-Blättern, in Wurzeln und sich entwickelnden Hülsen exprimiert (Truernit and Sauer, 1995; Stadler *et al.*, 2005). In früheren Experimenten mit diesem Promotor konnte seine Aktivität im heterologen System (*Nicotiana tabacum*) gezeigt werden (Wright *et al.*, 2003). Daher folgte die Annahme, diesen Promotor auch im heterologen System von *Pisum sativum* zu verwenden. Eine Expression von *VfAAP1* unter *AtSUC2* könnte die Translokation von Aminosäuren ins Phloem erhöhen und somit die Beladung des Phloems verbessern. In einem weiteren Ansatz sollte dann die verstärkte Expression der Aminosäurepermease unter Kontrolle des samen- und phloemspezifischen Promotors kombiniert in einer Pflanze erfolgen. Dadurch könnte die Versorgung der wachsenden Samen mit N-Metaboliten gesteigert und somit der Speicherproteingehalt der reifen Samen erhöht werden.

3.2.1 Herstellung stabiler *VfAAP1*-exprimierender Linien

Die Herstellung und Charakterisierung *VfAAP1*-exprimierender Pflanzenlinien unter Kontrolle des phloemspezifischen Promotors *AtSUC2* wurde in Zusammenarbeit mit Dr. C. Seiler (IPK, Ag Samenentwicklung) durchgeführt. Im Rahmen ihrer Promotionsarbeit fertigte sie die Überexpressionskassette p*AtSUC2*-*VfAAP1* an (Seiler, 2008). Für die Konstruktherstellung wurde die vollständige 1590bp lange cDNA der Aminosäurepermease aus *Vicia faba* (*VfAAP1*; Miranda *et al.*, 2001), das 2128bp große DNA-Fragment des *AtSUC2*-Promotors (Truernit and Sauer, 1995) und das 760bp lange Fragment der 3'-Region des Octopinsynthase-Gens (*ocs*) als Terminator verwendet. Die Expressionskassette und der *ocs*-Terminator wurden in den Binärvektor pBAR kloniert (Zur Expression von *VfAAP1* unter Kontrolle des phloemspezifischen Promotors *AtSUC2* wurde die Überexpressionskassette p*AtSUC2*-*VfAAP1* (Seiler, 2008) mit dem *ocs*-Terminator in den pBAR-Vektor kloniert und anschließend der entstandene Binärvektor p*AtSUC2*/*VfAAP1*/pBAR in Erbse (*Pisum sativum*, Abb. A.3) und anschließend in Erbse (*Pisum sativum*, cv. Eiffel) mittels *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA105 transformiert. Auf dem Binärvektor pBAR ist als Selektionsmarker das *bar*-Gen (Phosphinotricin-Acetyltransferase, vermittelt Basta[®]-Resistenz) unter Einfluss des Promotors (*pnos*) und Terminators (*tnos*) der Nopalinsynthase lokalisiert. Mit Hilfe des Markergens können transgene Pflanzen mit Phosphinotricin selektiert werden.

Nach der Transformation wurden 20 unabhängige Pflanzen regeneriert, von denen 18 anhand der PCR-Technik (Primer-Kombination: *AtSUC2* + *VfAAP1*) als transgenpositiv getestet wurden. Mit den fünf transgenen AAP-Linien 5, 6, 7, 8 und 12 wurde

weitergearbeitet (Tab. 3.4). Zur Bestimmung der Kopienanzahl des Transgens im Genom wurden die selektierten Pflanzen mittels Southern Blot Analyse untersucht. Als Probe für die Hybridisierung wurde das cDNA-Fragment von *VfAAP1* (Miranda *et al.*, 2001) verwendet. Die Pflanzenlinien 5, 7 und 8 trugen eine Kopie des *VfAAP1*-Transgens im Genom. Die AAP-Linie 6 wies zwei Insertionen und die Linie 12 drei bis vier Kopien auf (Tab. 3.4 und Abb. 3.11).

Tab. 3.4 und Abb. 3.11 Charakterisierung der transgenen *sucAAP*-Pflanzen durch Segregationsanalyse der T₁-Pflanzen unter Verwendung von PCR (Primer-Kombination: AtSUC2 + *VfAAP1*) und Southern Blot Technik. Jeweils 10µg genomische DNA aus Blättern wurde mit *HIND*III geschnitten, auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit dem radioaktivmarkiertem *VfAAP1*-cDNA-Fragment hybridisiert.

Linien Nummer	PCR positive für <i>VfAAP1</i>	Basta resistant	Segregation T ₁ (+/-)	Insert Anzahl
5	+	+	8:2	1
6	+	+	7:2	2
7	+	+	8:2	1
8	+	+	8:2	1
9	-	-	0:10	-
12	+	+	10:0	3-4

Die transgenen Pflanzen wurden hinsichtlich ihrer Insertanzahl des *VfAAP1*-Gens getestet. Danach wurde in den reifen Samen der T₂ Generation der Gehalt an Gesamt-N und die Proteinfractionen, Albumine und Globuline, bestimmt (Tab. 3.5).

Tab. 3.5 Bestimmung des N-, C- und Speicherproteingehaltes in reifen *sucAAP*-Samen. Statistische Berechnung der ± SD Standardabweichung und Student t-Test. Signifikant höhere Werte: a ≤ 0.05, b ≤ 0.01, c ≤ 0.001 und signifikant niedrigere Werte: x ≤ 0.05, y ≤ 0.01, z ≤ 0.001.

	<i>sucAAP1</i> Kontrolle	<i>sucAAP5</i>	<i>sucAAP6</i>	<i>sucAAP7</i>	<i>sucAAP8</i>	<i>sucAAP12</i>
PCR/Basta-Test	-	+	+	+	+	+
Stickstoff [%]	2.51±0.22	2.70±0.08	2.64±0.18	2.63±0.12	2.88±0.57	3.15±0.67
Kohlenstoff [%]	43.00±0.14	43.28±0.19	43.56±0.09	43.45±6.28	43.32±0.16	43.55±0.17
Albumine [mg/g]	31.58±0.22	31.44±1.39	31.99±1.44	30.94±0.62	30.21±0.86	32.37±2.56
Globuline [mg/g]	39.77±5.40	48.76±2.41^a	39.61±4.23	40.13±4.15	41.05±7.28	39.01±14.16

Alle fünf transgenen Linien zeigten keinen signifikanten Unterschied im Gehalt an Gesamt-N und Gesamt-C im Vergleich zur nicht transgenen (intern negativ) Kontrolle *sucAAP1*. Der Globulingehalt war leicht signifikant erhöht in der Linie *sucAAP5*, wogegen die Albuminfraktion bei allen Linien unverändert blieb. Die Linie *sucAAP5* trug eine Kopie des Transgens im Genom und wies als einzige eine Veränderung im Proteingehalt auf, nämlich

in der Globulinfraktion. Deshalb wurde für weitere Untersuchungen hinsichtlich Veränderungen des Samenmetabolismus die Linie sucAAP5 verwendet.

3.2.2 Charakterisierung der transgenen Linie sucAAP5

In der nachfolgenden Generation T₃ konnten von der Linie sucAAP5 über Segregationsanalyse mittels Basta[®]-Blatt-Test die homozygoten Linien 5/3 und 5/8 identifiziert werden. Mit der stabilen Linie sucAAP5/8 erfolgten dann weitere Untersuchungen hinsichtlich der *VfAAP1*-Transkriptmenge und der Sameninhaltsstoffe.

Zum Nachweis der Expression von *VfAAP1* in den transgenen Pflanzen wurde eine quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) mit *source*-Blättern (4 DAP) der homozygoten Linie sucAAP5/8 durchgeführt (Seiler, 2008). In dem Blattgewebe und zu diesem Zeitpunkt sollte der Promotor aktiv sein. Die Primer der qRT-PCR wurden aus der 3'-nicht-translatierten Region von *VfAAP1* abgeleitet. In diesem Sequenzbereich ist die Homologie zu der endogen vorkommenden Aminosäurepermease aus *Pisum sativum* am geringsten. Die Nachkommen der transgenen Linie zeigten deutlich eine Expression des *VfAAP1*-Transgens in den *source*-Blättern im Vergleich zum Wildtyp, wo kein Produkt amplifiziert werden konnte. Der AtSUC2-Promotor ist also in Blättern aktiv und exprimiert dort das *VfAAP1*-Gen. Während des Wachstums wurden keine phänotypischen Veränderungen der Pflanzen festgestellt. Ertragsrelevante Parameter, wie Anzahl der Hülsen, Anzahl der Samen pro Hülse und Pflanze sowie das Samengewicht, waren im Vergleich zum Wildtyp unverändert.

Inhaltsstoffanalyse reifer Samen der *VfAAP1*-exprimierenden Linie sucAAP5

Die transgenen sucAAP-Pflanzen wurden in Phytokammern unter konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen und im darauf folgenden Jahr in Außengewächshäusern ohne zusätzliche Licht- und Temperaturregulation (März bis Juli) angezogen. Zur Untersuchung der Sameninhaltsstoffe wurden aus reifen Samen der N- und C-Gehalt, Proteine, Stärke und Saccharose bestimmt (Tab. 3.6). Das Transgen *VfAAP1* hatte einen Einfluß auf den Speicherproteingehalt in den Samen. In beiden Anzuchtjahren war der Proteingehalt, in dem Fall die Globulinfraktion, in den transgenen Samen signifikant um 15% gegenüber der Wildtypkontrolle erhöht. Bei der Albuminfraktion zeigte sich keine Veränderung. Ebenfalls waren die N- und C-Gehalte unverändert. Bei dem letzteren zeigte sich sogar eine leichte Erhöhung unter Phytokammer-Wachstumsbedingungen, die im darauf folgenden Jahr aber nicht bestätigt werden konnten. Der Anteil an Saccharose war in den transgenen sucAAP5-Samen signifikant von jeweils 84mg/g TG auf 80mg/g TG in den Wildtypsamen verringert. Der Stärkeanteil und das Samengewicht waren in beiden Versuchsjahren unverändert.

Tab. 3.6 Inhaltsstoffanalyse reifer Samen der Linie sucAAP5/8 und Wildtyp gewachsen in der Phytokammer 2006 und im Außengewächshaus 2007. Bestimmung der Gehalte von N, C, Proteine, Stärke und Saccharose. Berechnung der Standardabweichung \pm SD und Student t-Test. Signifikant höhere Werte: $a \leq 0.05$, $b \leq 0.01$, $c \leq 0.001$ und signifikant niedrigere Werte: $x \leq 0.05$, $y \leq 0.01$, $z \leq 0.001$.

	Phytokammer 2006		Außengewächshaus 2007	
	T ₄ -Samen		T ₅ -Samen	
	<i>sucAAP5/8</i>	<i>Wildtyp</i>	<i>sucAAP5/8</i>	<i>Wildtyp</i>
Stickstoff [%]	3.90 \pm 0.20	3.83 \pm 0.20	3.60 \pm 0.21	3.52 \pm 0.19
Kohlenstoff [%]	43.97\pm0.11^b	43.59 \pm 0.16	42.83 \pm 0.11	42.82 \pm 0.10
Albumine [mg/g]	21.62 \pm 1.50	22.95 \pm 1.21	20.16 \pm 1.10	21.10 \pm 0.62
Globuline [mg/g]	83.12\pm11.18^a	71.26 \pm 4.88	75.49\pm3.81^a	65.88 \pm 4.13
Stärke [mg/g]	425.70 \pm 22.51	425.60 \pm 17.61	425.00 \pm 22.51	425.60 \pm 17.61
Saccharose [mg/g]	80.62\pm3.05^x	84.00 \pm 3.07	80.62\pm3.05^x	84.01 \pm 3.07
Samengewicht [mg]	298.26 \pm 22.46	278.26 \pm 42.70	317.84 \pm 8.17	311.57 \pm 10.74

Die Expression der Aminosäurepermease *VfAAP1* unter dem phloemspezifischen Promotor *AtSUC2* brachte nur leichte Veränderungen hinsichtlich einer Proteinerhöhung im Samen, die ausschließlich die Globulinfraktion betraf. Daher wird angenommen, dass eine Kopie des *VfAAP1*-Gens in den Pflanzen nur zu geringen Veränderungen des Speicherproteingehaltes führte. Weiterhin ist es den Pflanzen wahrscheinlich nicht möglich, die gesteigerte Translokation von N-Metaboliten im Phloem in den Samen zu übertragen und somit die Versorgung zu verbessern. Deshalb wurde der zusätzliche Ansatz geplant, die Aminosäurepermease *VfAAP1* unter Kontrolle des samen- (*LeB4*) und phloemspezifischen (*AtSUC2*) Promotors kombiniert in einer Pflanze zu exprimieren.

3.2.3 Kreuzung und Identifizierung doppelt homozygoter Pflanzen

Die homozygote Linie *sucAAP5/8* wurde mit der homozygoten markergenfreien Linie *AAP14/10* gekreuzt. Der Binärvektor pBAR der Linie *sucAAP5/8* trägt auf einer T-DNA das Nutzgen *VfAAP1* und das Markergen *bar* (vermittelt Basta[®]-Resistenz), wodurch beide Transgene gekoppelt an einen Locus ins Genom integriert werden. Somit erleichtert das Vorhandensein eines Selektionsmarkers in den *sucAAP*-Pflanzen die Analyse der Kreuzungsprodukte. Nach der Kreuzung wurden doppelt homozygote *VfAAP1*-exprimierende Erbsenpflanzen erzeugt. Dadurch sollten die Translokation von Reservestoffen im Phloem und die Beladung von N-Metaboliten, wie Aminosäuren, in den sich entwickelnden Samen verbessert werden.

Die Erzeugung doppelt homozygoter *VfAAP1*-exprimierender Pflanzen erfolgte wie im Kreuzungsschema (Abb. 3.12) dargestellt durch Segregationsanalysen in den Folgegenerationen mittels Basta[®]-Blatt-Test und Southern Blot Analyse. Nach der Kreuzung der *sucAAP5/8* mit den *AAP14/10* Pflanzen waren die Samen als Kreuzungsprodukte (F₁) uniform, d. h. heterozygot für beide Allele unter den zwei verschiedenen Promotoren. Alle F₁-

Nachkommen waren beim Basta-Blatt-Test resistent gegenüber Phosphinotricin. Laut den Vererbungsgesetzen nach Mendel müssten für die folgende F₂-Generation 6,25% der Pflanzen homozygot für beide Gene, 12,5% homozygot für das eine und heterozygot für das andere Gen sowie 25% heterozygot für beide Gene sein. Insgesamt wurden 58 Pflanzen analysiert und spalteten in der F₂-Generation entsprechend dem Schema. Bei 25% der Pflanzen segregierte das *VfAAP1*-Transgen wieder heraus (3:1 Spaltung), so dass diese sensitiv auf Basta® reagierten. In der F₃-Generation konnten dann vier (6,9% von 58 Pflanzen) doppelt homozygote Pflanzen mit den Nr. 27, 52, 56 und 58 mittels PCR und Southern Blot Analyse identifiziert werden.

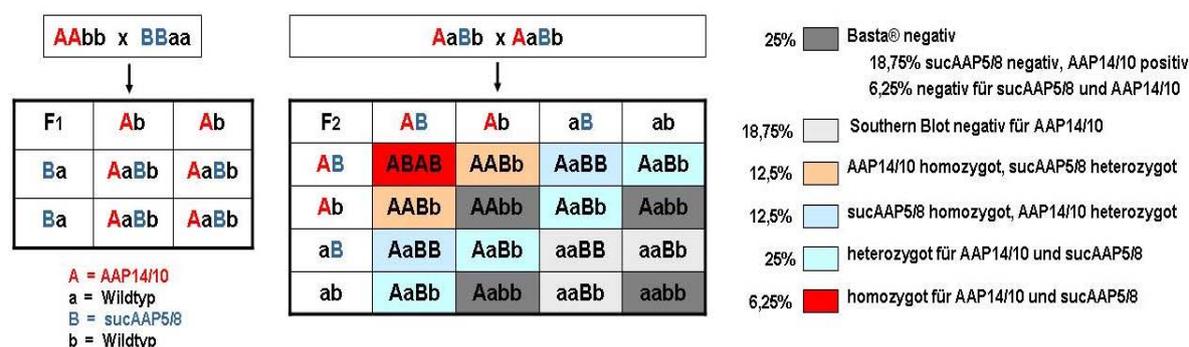


Abb. 3.12 Kreuzungsschema der F₁ und F₂ Generation. Schematische Darstellung aller genetischen Möglichkeiten nach den Gesetzen von Mendel bei der Kreuzung der homozygoten Linie AAP14/10 (A) mit der homozygoten Linie sucAAP5/8 (B); a, b: Wildtyp-Allele.

3.2.4 Charakterisierung der doppelt homozygoten Pflanzen

Zum Nachweis der Expression von *VfAAP1* unter Kontrolle des *AtSUC2* Promotors wurde eine qRT-PCR unter Verwendung der 3'-*VfAAP1*-Primer mit *source*-Blättern durchgeführt (Seiler, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass in allen vier Kreuzungspflanzen Nr. 27, 52, 56 und 58 sowie in der Elternlinie sucAAP5/8 als Kontrolle das Transgen *VfAAP1* in den Blättern exprimiert wurde. Am größten war die Transkriptmenge in den Pflanzen 27 und 58. Im Wildtyp und in der Elternlinie AAP14/10, die *VfAAP1* nur samenspezifisch exprimierte, konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Für die folgenden Inhaltsstoffanalysen wurden die Kreuzungsprodukte 27 und 58 mit der größten *VfAAP1*-Transkriptmenge verwendet.

Inhaltsstoffanalyse reifer Samen der doppelt homozygoten Pflanzen

Von den doppelt homozygoten Kreuzungsprodukten 27 und 58 sowie den Elternpflanzen sucAAP5/8 und AAP14/10 und dem Wildtyp als Kontrolle wurden der N- und C-Gehalt, Proteine (Albumine und Globuline), Stärke und Saccharose bestimmt (Abb. 3.13). Dazu wurden die Pflanzen in Außengewächshäusern ohne Licht- und Temperaturregulation angezogen und die reifen Samen analysiert. Die Samen der Kreuzungsprodukte 27 und 58

hatten einen um 32% bzw. 17% höheren Gehalt an Gesamt-N gegenüber dem Wildtyp und der Elternpflanze sucAAP5/8 (Abb. 3.13-A). Auch der Gesamt-C-Gehalt ist in den beiden Linien signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp und der Linie sucAAP5/8 (Abb. 3.13-B). Gegenüber der anderen Elternlinie AAP14/10 zeigte sich keine Erhöhung im N- und C-Gehalt. Der Proteingehalt, besonders die Globulinfraction, war in den Kreuzungen 27 und 58 sowie bei beiden Elternpflanzen sucAAP5/8 und AAP14/10 im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht (Abb. 3.13-D), wogegen die Albuminfraction unverändert blieb (Abb. 3.13-C). Bei der Kreuzung 27 lag sogar ein geringerer Anteil im Samen vor. Der Saccharosegehalt war in den Elternlinien sucAAP5/8 und AAP14/10 gegenüber dem Wildtyp nicht verändert (Abb. 3.13-F). Die Kreuzungsprodukte 27 und 58 hatten einen signifikant niedrigeren Gehalt an Saccharose im Samen. Bei der Stärke (Abb. 3.13-E) und dem Samengewicht (Abb. 3.13-G) zeigte sich in den Linien sucAAP5/8, AAP14/10 und den beiden Kreuzungen keine Veränderung. Das Samengewicht war sogar in der Linie AAP14/10 signifikant niedriger als im Wildtyp.

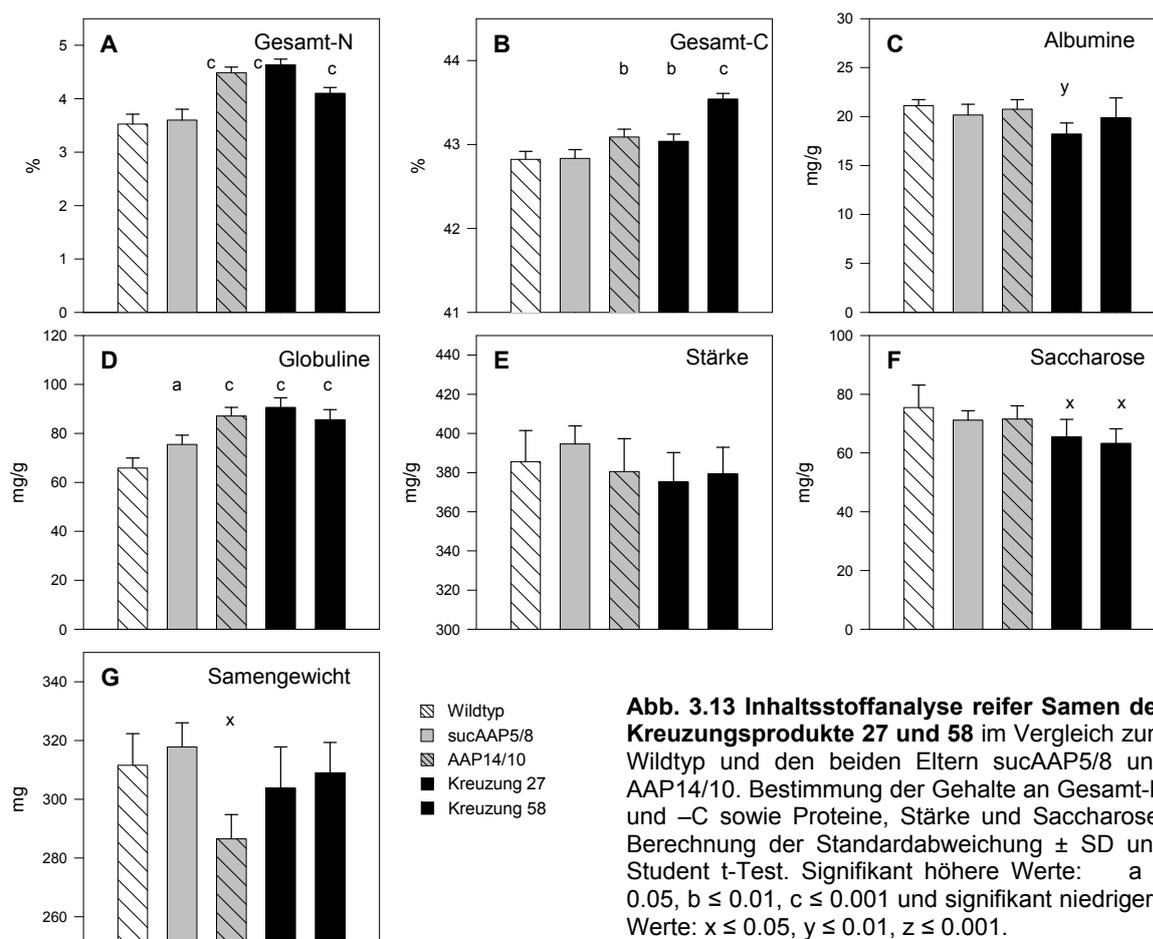


Abb. 3.13 Inhaltsstoffanalyse reifer Samen der Kreuzungsprodukte 27 und 58 im Vergleich zum Wildtyp und den beiden Eltern sucAAP5/8 und AAP14/10. Bestimmung der Gehalte an Gesamt-N und -C sowie Proteine, Stärke und Saccharose. Berechnung der Standardabweichung \pm SD und Student t-Test. Signifikant höhere Werte: $a \leq 0.05$, $b \leq 0.01$, $c \leq 0.001$ und signifikant niedrigere Werte: $x \leq 0.05$, $y \leq 0.01$, $z \leq 0.001$.

Durch die Kreuzung der homozygoten Linien sucAAP5/8 und AAP14/10 wurde eine deutliche Steigerung des N- und C-Gehaltes sowie der Speicherproteine gegenüber dem Wildtyp bewirkt. Doch im Vergleich zur Elternlinie AAP14/10 zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Letztlich konnte der VfAAP1-Effekt auf den Samenmetabolismus nicht wesentlich durch eine zusätzliche Expression der Aminosäurepermease im Phloem gesteigert werden.

3.3 Reprimierung des Enzyms ADP-Glucose-Pyrophosphorylase

Das Enzym ADP-Glucose Pyrophosphorylase (AGP) katalysiert die Umwandlung von Glucose-1-Phosphat und ATP zu Pyrophosphat und ADP-Glucose, welches dann als Substrat für die Stärkebiosynthese dient. AGP-Mutanten von Mais und Erbse weisen einen verringerten Gehalt an Stärke im Samen auf (Dickinson and Preiss, 1969; Smith *et al.*, 1989). Durch die veränderte Stärkebiosynthese in diesen Mutanten kommt es im Samen zu einer Akkumulation von löslichen Zuckern, anstelle der Stärke, was wiederum zu einer vermehrten Wasseraufnahme und folglich zum verschrumpelten Samenphänotyp führt (Rolletschek *et al.*, 2002). Weiterhin bewirkt die vermehrte Bereitstellung an Kohlenstoffgerüsten, die im Samen für die Aminosäurebiosynthese benötigt werden (Mifflin and Lea, 1977), eine Erhöhung des Speicherproteingehaltes (Perez *et al.*, 1993; Casey *et al.*, 1998). So erfolgt eine Umverteilung der Assimilate von Stärke zum ernährungsphysiologisch höherwertigen Protein im Samen der Leguminosen.

3.3.1 Herstellung stabiler AGP-reprimierter Erbsenlinien

In einem Vorläuferprojekt, welches von F. Hosein und Dr. I. Saalbach (IPK, Gatersleben) bearbeitet wurde, erfolgte die Herstellung transgener AGP-reprimierter Pflanzenlinien. Für die Inhibierung des *AGP*-Gens wurde die RNAi-Methode angewendet. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Erbsenkotyledonen wie in Heim *et al.* (1993) beschrieben isoliert und dann mittels RT-PCR ein 550bp langes Fragment der kleinen Untereinheit von AGP amplifiziert. Die Ableitung der verwendeten Primer (AGPF und AGPr1) erfolgte von der mRNA des *AGPS2*-Gens aus *Pisum sativum* (X96765.1; Burgess *et al.*, 1997). Zur Herstellung des *Hairpin*-Konstruktes wurde das *AGP*-Fragment in *sense* und *antisense* Richtung, getrennt durch das Intron Gibberellin-20-Oxidase-Gen von *Solanum tuberosum* (*potGA20oxi*), wie in Chen *et al.* (2003) beschrieben, zusammengeführt. Das *Hairpin*-Konstrukt unter Kontrolle des 2753bp langen Legumin B4 Promotors (*LeB4*), der samenspezifisch während der frühen und späten Samenreifung exprimiert wird (Bäumlein *et al.*, 1992), und der Terminator der 3'-Region des Octopinsynthese-Gens (*ocs*) wurden dann in den Binärvektor PZP200 kloniert und anschließend in Erbse (*Pisum sativum*, cv. Eiffel) mittels Agrobakterium-vermittelter Co-Transformation (Rolletschek *et al.*, 2005) überführt (Abb. A.2). Auf einem separaten Plasmid pCambia3300 (Original von Cambia GPO Box 3200, Canberra, ACT 2601, Australia) ist das Resistenzgen *bar* unter Einfluss des konstitutiven 35S-*CaMV*-Promotors (Promotor des *Cauliflower Mosaic Virus*) mit dem 35S-*PolyA*-Terminator lokalisiert (Abb. A.2). Der

Selektionsmarker *bar* (Phosphinotricin-Acetyltransferase) aus *Streptomyces hygroscopicus* vermittelt die Basta®-Resistenz und somit eine Selektionsmethode von transgenen Pflanzen.

Meine Aufgabe bestand darin, stabile homozygote markergenfreie Linien herzustellen. Nach der Co-Transformation konnten 37 Pflanzen als putativ transgen regeneriert werden. Mittels PCR-Technik wurden dann fünf Pflanzen als iAGP-transgenpositiv getestet (Primer-Kombination: LegF + ihpAGPf, LegF + ihpAGPr). Die Folgegeneration (T_2) der transgenen Pflanzen wurde mittels PCR und Southern Blot Technik hinsichtlich der Kopienanzahl des integrierten *AGP-Hairpin*-Konstruktes untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass noch drei Linien transgenpositiv waren. Sie hatten das Konstrukt nur einmal ins Genom eingebaut und wurden als *single* Inserts für die Herstellung stabiler AGP-reprimierter Linien weiter verwendet. In den folgenden Generationen konnten dann homozygote markergenfreie Linien selektiert werden, die als iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 bezeichnet wurden. Die anderen zwei Pflanzenlinien zeigten weder den schrumpeligen Samenphänotyp, noch konnte im Southern Blot das Transgen nachgewiesen werden. Das RNAi-Konstrukt wurde nicht stabil in die nächste Generation übertragen.

3.3.2 Charakterisierung der AGP-reprimierten homozygoten Linien (iAGP)

Die homozygoten markergenfreien Linien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 wurden hinsichtlich der *AGP*-Transkriptmenge, der AGP-Enzymaktivität und der Sameninhaltsstoffe untersucht. Dazu wurden Erbsenkotyledonen der Entwicklungsstadien 15, 20, 25, 30 und 35 DAP geerntet und entsprechend aufgearbeitet. Zur Bestimmung der *AGP*-Transkriptmenge in den transgenen Samen wurden Northern Blot Analysen mit extrahierter Gesamt-RNA aus Erbsenkotyledonen durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde das 550bp lange *PsAGPS1*-cDNA-Fragment als Probe verwendet (Abb. 3.14-A).

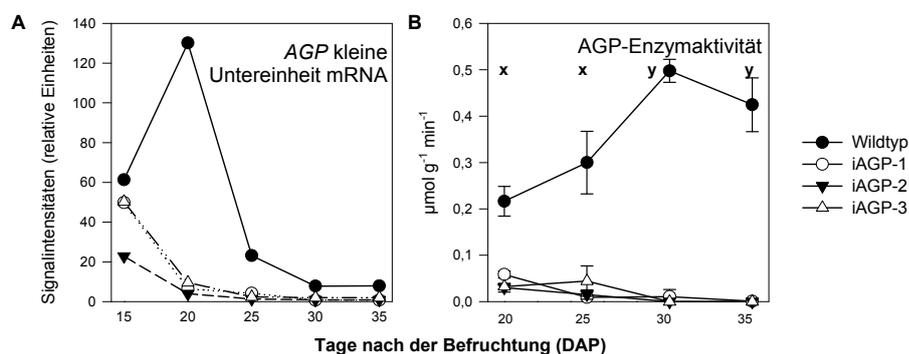


Abb. 3.14 Charakterisierung von Embryonen stabiler Erbsenlinien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 verschiedener Entwicklungsstadien (15, 20, 25, 30 und 35 DAP). Northern Blot Analyse der *AGP*-Transkripte der kleinen Untereinheit (A) und Bestimmung der AGP-Enzymaktivität (B). Jeweils 10µg Gesamt-RNA wurden mit dem P^{32} -gelabelten *PsAGPS1*-cDNA-Fragment hybridisiert. Signifikant niedrigere Werte: $x \leq 0.05$, $y \leq 0.01$, $z \leq 0.001$.

In den Wildtypsamen stieg der Gehalt an *AGP*-mRNA vom 15. DAP zum 20. DAP um fast das Dreifache an und sank dann während der mittleren bis späten Samenreife (25-35 DAP) wieder drastisch ab. In den transgenen Samen war der Gehalt an *AGP*-mRNA am 15. DAP am größten und sank dann sofort in den folgenden Entwicklungsstadien fast auf Null ab. Zu Beginn der frühen Samenentwicklung zeigte sich zwischen den Transgenen und den Wildtypkotyledonen keine Veränderung in der Transkriptmenge der kleinen *AGP*-Untereinheit (15 DAP). Dies korreliert mit dem Expressionsmuster des Legumin B4 Promotors. Dieser wird erst wenig später aktiv (Panitz *et al.*, 1997; Pickardt *et al.*, 1998). Erst ab dem 20. DAP war ein deutlicher Unterschied zwischen iAGP-Samen und Kontrolle festzustellen. In den transgenen Kotyledonen war die Expression von *AGP* drastisch reduziert. Dies ging mit der verringerten *AGP*-Enzymaktivität einher (Abb. 3.14-B). Die Aktivität des *AGP*-Enzyms war signifikant während der frühen bis späten Samenreife über 90% verringert. Während die Werte in den Wildtypsamen vom 20. DAP bis zum 30. DAP auf das Zweifache anstiegen, war in den transgenen Samen schon ab dem 20. DAP fast keine Aktivität mehr messbar. Die Verringerung der mRNA-Gehalte des *AGP*-Gens und der Enzymaktivität zeigen deutlich, dass das RNAi-Konstrukt funktioniert und somit die Aktivität des endogenen *AGP*-Enzyms ausgeschaltet wurde.

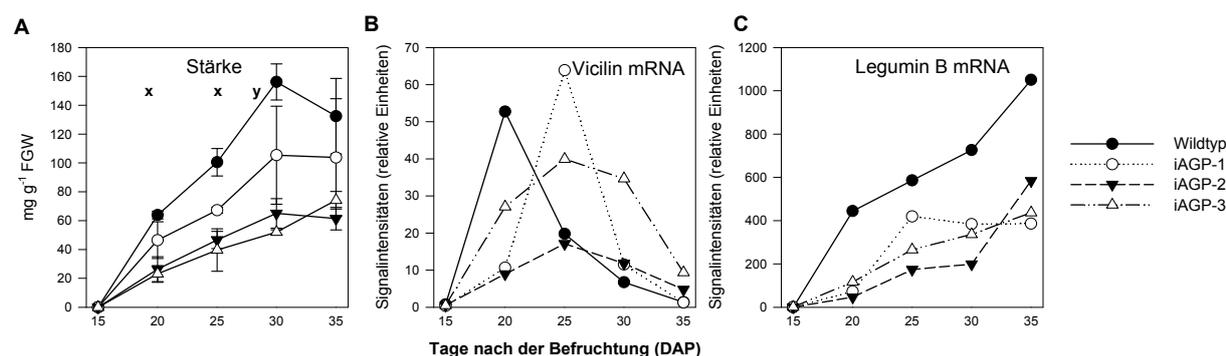


Abb. 3.15 Bestimmung des Stärkegehaltes (A) und der Transkriptmengen von Vicilin (B) und Legumin B (C) in Samen der transgenen Linien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 im Vergleich zum Wildtyp. Signifikant niedrigere Werte: $x \leq 0.05$, $y \leq 0.01$, $z \leq 0.001$.

Der Stärkegehalt war in allen drei iAGP-Linien vom 20. DAP bis 30. DAP signifikant um jeweils 50% verringert gegenüber den Wildtypsamen (Abb. 3.15-A). Wobei die Linie iAGP-3 die stärkste Reduzierung aufwies und die Linie iAGP-1 den geringsten Effekt. Die gezeigte Reduzierung der *AGP*-Enzymaktivität von über 90% und letztlich die Verringerung des Stärkegehaltes von nur 50% lässt auf einen kleinen Kontrollkoeffizienten des *AGP*-Enzyms auf die Stärkebiosynthese in Erbsensamen schließen. Des Weiteren war in den iAGP-Samen ein Einfluß auf die Expression der Hauptspeicherproteine Vicilin und Legumin B erkennbar (Abb. 3.15-B, -C). Zur Ermittlung der Transkriptmengen der Speicherproteingene wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Als Proben zur Hybridisierung wurden das 500bp lange Vicilin-Fragment (aus *pVc28*; Wobus *et al.*, 1986) und das 520bp lange cDNA-Fragment von Legumin B (aus *pVc70*; Wobus *et al.*, 1986) von *V. faba* verwendet. In den

Wildtypembryonen war die mRNA-Menge von Vicilin am 20. DAP am größten und sank dann in den späteren Entwicklungsstadien (25-35 DAP) drastisch ab (Abb. 3.15-B). In den transgenen Embryonen zeigten sich dagegen ein Anstieg bis zum 25. DAP und danach ein Absinken der Transkriptgehalte. Ab diesem Zeitpunkt war die Expression von Vicilin in den Transgenen deutlich höher als im Wildtyp, mit dem größten Unterschied in der Linie iAGP-3. Dagegen waren die mRNA-Gehalte von Legumin B in den drei iAGP-Linien um 40% reduziert (Abb. 3.15-C). Während der Samenentwicklung stieg die Expression von Legumin B fast linear an, sie lag aber immer deutlich niedriger in den transgenen Samen als im Wildtyp.

Analyse der Inhaltsstoffe reifer AGP-reprimierter Samen

Reife AGP-reprimierte Samen aus Anzuchten in Phytokammern mit konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen wurden hinsichtlich der Zusammensetzung der Sameninhaltsstoffe untersucht. In Tab. 3.7 wurden die Messungen der Gehalte an N, C, Albumine, Globuline, Stärke, Saccharose, Lipide und Amylose zusammengefasst. Der Gesamt-N-Gehalt im Wildtyp von 3% war in allen drei transgenen Linien signifikant auf 3,6% bis 3,85% erhöht. Die beiden Hauptspeicherfraktionen Albumine und Globuline waren ebenfalls erhöht. Weiterhin erfolgte eine Erhöhung der Gehalte an Gesamt-C, Saccharose und Lipide in den AGP-reprimierten Samen. Dagegen war die Stärke signifikant um 40-50% im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Außerdem veränderte sich die Stärkezusammensetzung in den Transgenen mit einer Verringerung des Amyloseanteils von 20-30%. Weiterhin konnte eine Veränderung im Samentrockengewicht festgestellt werden. Die iAGP-Samen waren um 20-30% leichter als der Wildtyp.

Tab. 3.7 Analyse der Inhaltsstoffe (Gesamt-N und -C, Albumine, Globuline, Stärke, Saccharose, Lipide und Amylose) reifer Samen der Linien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 im Vergleich zum Wildtyp. Berechnung der Standardabweichung \pm SD und Signifikanztest Student t-Test. Signifikant höhere Werte: a \leq 0.05, b \leq 0.01, c \leq 0.001 und signifikant niedrigere Werte: x \leq 0.05, y \leq 0.01, z \leq 0.001.

	<i>iAGP-1</i>	<i>iAGP-2</i>	<i>iAGP-3</i>	<i>Wildtyp</i>
Stickstoff [%]	3.59 \pm 0.25 ^c	3.72 \pm 0.38 ^b	3.86 \pm 0.40 ^c	2.98 \pm 0.27
Kohlenstoff [%]	43.91 \pm 0.23 ^b	44.25 \pm 0.29 ^c	44.35 \pm 0.18 ^c	43.25 \pm 0.34
Albumine [mg/g]	21.76 \pm 1.50 ^b	23.32 \pm 1.31 ^c	24.10 \pm 1.59 ^c	19.14 \pm 1.02
Globuline [mg/g]	61.37 \pm 10.87 ^a	60.50 \pm 9.45 ^a	64.50 \pm 8.29 ^c	51.68 \pm 2.72
Stärke [mg/g]	316.04 \pm 20.62 ^z	255.78 \pm 27.97 ^z	242.46 \pm 22.29 ^z	466.10 \pm 57.18
Saccharose [mg/g]	93.13 \pm 11.50 ^b	87.42 \pm 7.11 ^a	109.20 \pm 23.20 ^b	71.54 \pm 10.61
Lipide [mg/g]	48.00 \pm 1.41 ^a	59.50 \pm 1.84 ^b	57.60 \pm 0.00 ^c	40.90 \pm 0.71
Amylose [mg/g]	36.60 \pm 0.85 ^y	30.80 \pm 3.11 ^x	32.70 \pm 0.28 ^z	43.25 \pm 0.21
Samengewicht (mg)	291.75 \pm 16.72 ^y	252.57 \pm 25.08 ^z	302.03 \pm 15.66 ^x	354.02 \pm 42.29

Die Unterschiede der Sameninhaltsstoffe zeigten sich in allen drei AGP-reprimierten Linien, wobei die Linie iAGP-3 jeweils die größten Unterschiede und die Linie iAGP-1 die kleinsten aufwies. Letztlich zeigen die Ergebnisse, dass eine Inhibierung der AGP-Funktion einen drastischen Effekt auf den Samenstoffwechsel mit Veränderungen im N- und C-Metabolismus hat.

3.3.3 AGP-Inhibierung bewirkt veränderte Zusammensetzung der Sameninhaltsstoffe

Eine genaue Analyse der Samenzusammensetzung wurde mit der transgenen Linie iAGP-3 durchgeführt. Diese Linie zeigte in früheren Untersuchungen die stärksten Veränderungen unter den drei stabilen transgenen Linien. Die Pflanzen wurden im Außengewächshaus im Erdbeet unter freilandähnlichen Bedingungen ohne Licht- oder Temperaturregulierung angezogen. Die Untersuchungen erfolgten einerseits an reifen Samen und andererseits an Embryonen der Entwicklungsstadien 20, 25, 30 und 35 DAP.

Bestimmung der Inhaltsstoffe reifer iAGP-3 Samen

Zur Analyse der veränderten Zusammensetzung der Sameninhaltsstoffe wurden die Gehalte an N und C sowie die Proteinfractionen, Albumine und Globuline, und die Stärke in reifen AGP-reprimierten Samen bestimmt (Tab. 3.8). Wie schon in vorherigen Untersuchungen der drei stabilen iAGP-Linien gezeigt wurde, beeinflusste die Inhibierung des Enzyms AGP die Stärkeproduktion und auch den Speicherproteingehalt im Samen. Der Proteingehalt war signifikant in den transgenen Samen erhöht. Der Anteil der Albuminfraktion wurde in den iAGP-3 Samen von 32mg/g TG im Vergleich zum Wildtyp mit 21mg/g TG um 50% und der Globulinanteil mit 76mg/g TG und 66mg/g TG in der Kontrolle um fast 15% erhöht. Diese Erhöhung konnte auch für den N-Gehalt gezeigt werden. Sowohl der Gesamt-N- als auch der Gesamt-C-Gehalt waren in den transgenen Samen signifikant erhöht. Des Weiteren veränderte sich der Stärkeanteil mit einer Verringerungen um 40% in den AGP-reprimierten Samen. Das Samentrockengewicht wurde auch reduziert.

Tab. 3.8 Zusammensetzung der Sameninhaltsstoffe (Gesamt-N und –C, sowie Proteine und Stärke) der Linie iAGP-3 und Wildtypkontrolle. Signifikant höhere Werte: a ≤ 0.05, b ≤ 0.01, c ≤ 0.001; signifikant niedrigere Werte: x ≤ 0.05, y ≤ 0.01, z ≤ 0.001.

	<i>iAGP-3</i>	<i>Wildtyp</i>
Stickstoff [%]	4.33 ± 0.21^c	3.53 ± 0.17
Kohlenstoff [%]	44.03 ± 0.07^c	43.19 ± 0.41
Albumine [mg/g]	31.80 ± 1.83^c	21.10 ± 0.62
Globuline [mg/g]	76.33 ± 4.42^c	65.87 ± 4.13
Stärke (mg/g)	284.02 ± 5.53^z	467.43 ± 32.48
Samengewicht (mg)	279.03 ± 5.04^z	311.57 ± 10.74

Veränderung der Inhaltsstoffe sich entwickelnder iAGP-Samen

Für einen genaueren Einblick hinsichtlich der veränderten Komponenten des Samenstoffwechsels wurden Untersuchungen an Embryonen der stabilen transgenen Linie iAGP-3 und dem Wildtyp der Entwicklungsstadien 20, 25, 30 und 35 DAP durchgeführt. Eine Inhibierung des *AGP*-Gens durch RNAi spiegelte sich auch in der Enzymaktivität wieder. Die *AGP*-Aktivität war in allen untersuchten Stadien deutlich verringert in den transgenen Samen gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.16-A). Die Messung der Saccharose-Synthase zeigte dagegen eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität während der frühen (20 DAP) und mittleren (30 DAP) Samenreifung (Abb. 3.16-B). Der Gehalt an Gesamt-N war deutlich erhöht, signifikant am 30. und 35. DAP (Abb. 3.16-C). Fast das gleiche zeigte sich für den C-Gehalt. Dieser war am 20. und 35. DAP erhöht (Abb. 3.16-D).

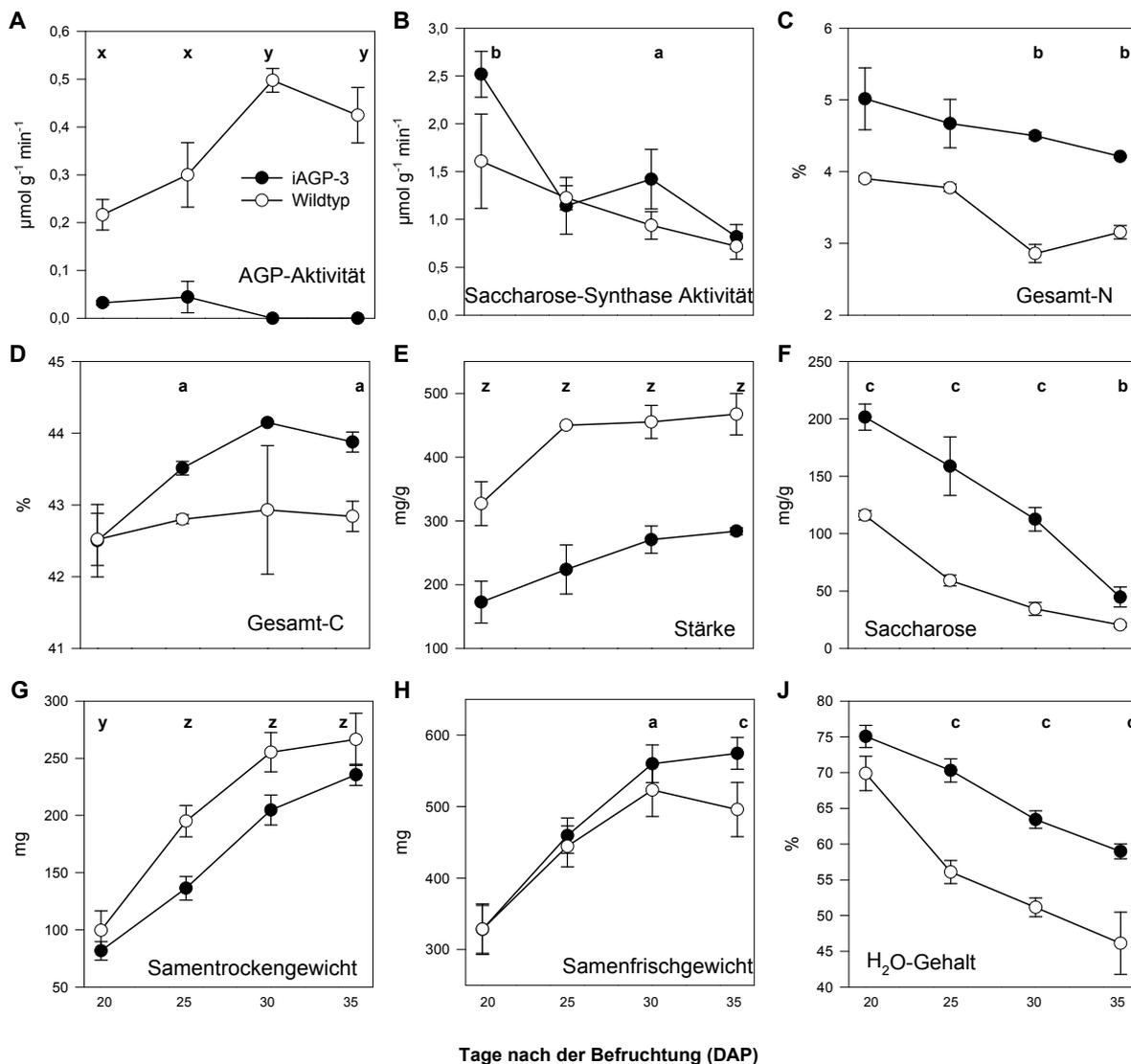


Abb. 3.16 Analyse der Sameninhaltsstoffe von Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (20, 25, 30 und 35 DAP) der transgenen Linie iAGP-3 und der Wildtypkontrolle. A: AGP-Aktivität, B: Saccharose-Synthase Aktivität, C: Gesamt-N, D: Gesamt-C, E: Stärke, F: Saccharose, G: Samentrockengewicht, H: Samenfrischgewicht, J: H₂O-Gehalt. Signifikant höhere Werte: a ≤ 0.05, b ≤ 0.01, c ≤ 0.001 und signifikant niedrigere Werte: x ≤ 0.05, y ≤ 0.01, z ≤ 0.001.

Stärke wurde dagegen in den iAGP-3 Embryonen im Vergleich zum Wildtyp um 40-50% weniger gespeichert (Abb. 3.16-E). Der Gehalt nahm konstant von 70mg/g TG (20. DAP) auf über 140 mg/g TG (35. DAP) zu, lag aber in den Transgenen deutlich unter dem Wert des Wildtyps. Dafür wiesen die transgenen Samen signifikant erhöhte Gehalte an Saccharose während der Samenentwicklung auf (Abb. 3.16-F). Zwischen der frühen (20 DAP) und mittleren (30 DAP) Samenreifung wurde fast jeweils das Doppelte an Saccharose in den iAGP-3 Samen gespeichert. Das Samenfrischgewicht war in den transgenen Embryonen zur späten Samenreifung (30, 35 DAP) signifikant erhöht (Abb. 3.16-H). Das Samentrockengewicht wurde zu allen Entwicklungszeitpunkten reduziert (Abb. 3.16-G). Letztlich akkumulierten die iAGP-3 Embryonen mehr Wasser in den Zellen als die Kontrolle, bedingt durch den gesteigerten Zuckergehalt, was in dem signifikant erhöhten Wassergehalt vom 25. bis 35. DAP messbar war (Abb. 3.16-J).

Aminosäurezusammensetzung

Der relative Gehalt von 18 freien Aminosäuren sowie von γ -Aminobutyrat (GABA) und Citrullin wurde mittels HPLC gemessen (Abb. 3.17). Dazu wurden Embryonen der Linie iAGP-3 und vom Wildtyp verschiedener Entwicklungsstadien von der frühen bis späten Samenreifung (15, 20, 25, 30 und 35 DAP) verwendet. Der Gesamtanteil der Aminosäuren war in den Transgenen und Wildtypsamen während der frühen Samenentwicklung (15 DAP) am höchsten und sank dann drastisch im weiteren Verlauf (20, 25 DAP) ab, mit den niedrigsten Werten am 35. DAP. Fast alle Aminosäuren hatten ihren höchsten Wert am 15. DAP außer Arginin mit dem höchsten Peak am 20. DAP. Einige Aminosäuren wiesen während der Samenreifung in den transgenen Samen höhere Gehalte als im Wildtyp auf. Dies waren Glutaminsäure (20, 25, 30 DAP), GABA (20, 25, 30 DAP), Valin (25, 30 DAP), Prolin (15, 20 DAP), Glycin (30, 35 DAP), Serin (20, 25, 30 DAP) und Tyrosin (20 DAP). Es gab auch Aminosäuren mit signifikant niedrigeren Gehalten. Dazu gehörten Asparagin (20, 35 DAP), Asparaginsäure (20, 25 DAP), Glutamin (20 DAP) und Citrullin (20, 25, 30, 35 DAP). Der größte Anteil der freien Aminosäuren veränderte sich nicht in den transgenen Embryonen. Dies waren Threonin, Lysin, Isoleucin, Methionin, Histidin, Arginin, Leucin, Alanin und Phenylalanin. Auch wenn sich einzelne Aminosäuren in ihren Gehalten veränderten, so war jedoch kein Unterschied im Gesamtgehalt der freien Aminosäuren in den iAGP-3 Samen gegenüber der Wildtypkontrolle messbar.

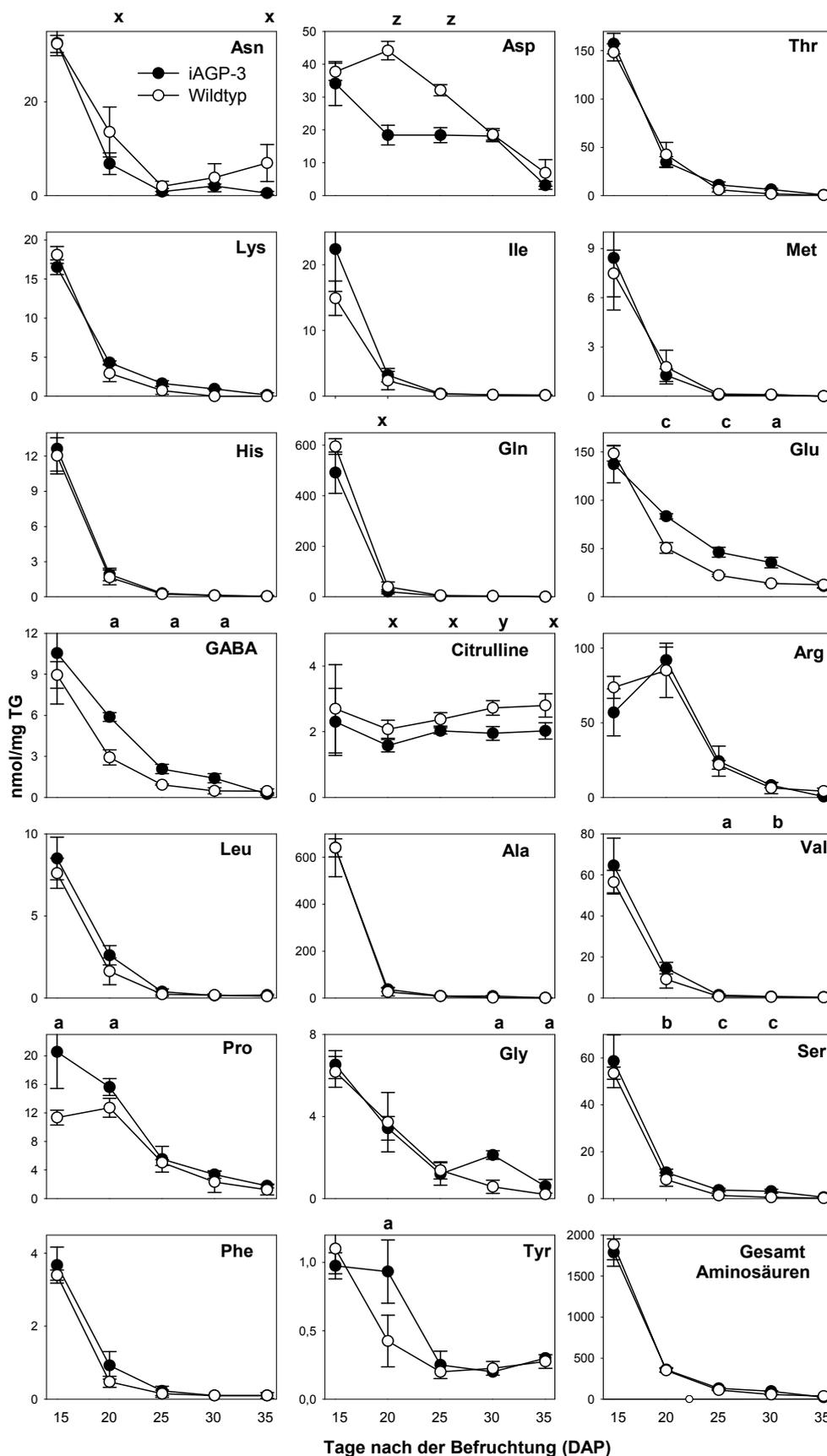


Abb. 3.17 Bestimmung der freien Aminosäuren in iAGP-3 und Wildtypembryonen während der Samenreifung (15, 20, 25, 30 und 35 DAP). Die Datenpunkte wurden aus 4 biologischen Replikaten gemittelt. Berechnung der Standardabweichung \pm SD und Signifikanztest Student t-Test. Signifikant höhere Werte: a \leq 0.05, b \leq 0.01, c \leq 0.001 und signifikant niedrigere Werte: x \leq 0.05, y \leq 0.01, z \leq 0.001.

3.3.4 Veränderungen der Zellmorphologie in AGP-reprimierten Samen

Reife trockene Samen der transgenen Linien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 zeigten alle den typischen Samenphänotyp (Abb. 3.18). Sie waren verschrumpelt im Vergleich zu den runden Wildtypsamensamen mit glatter Oberfläche.



Abb. 3.18 Phänotyp reifer AGP-reprimierter Samen. Vergleich der transgenen Linien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 mit dem Wildtyp. Die Inhibierung des Enzyms AGP bewirkte einen schrumpeligen Samenphänotyp.

Zur Untersuchung veränderter Zellstrukturen während der Samenentwicklung wurden von iAGP-3 und Wildtypembryonen der Stadien 20, 25, 30 und 35 DAP Ultradünnschnitte mit Hilfe von Dr. T. Rutten (IPK, Gatersleben) angefertigt. Danach erfolgte die Färbung dieser Schnitte jeweils mit Fuchsin/Kristallviolett zum Nachweis der Proteinvakuolen und mit Jod-Kalium-Jodid-Lösung zum Stärkenachweis (Abb. 3.19). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Embryonen während der frühen Samenreifung (20 DAP) zeigten, dass die Zellen der transgenen Samen gestreckte, eher länglich aussehende Stärkekörner (Abb. 3.19-A) im Vergleich zum Wildtyp mit größeren und fülligeren Stärkekörnern enthielten (Abb. 3.19-B). Zu diesem Stadium waren noch keine Proteinvakuolen in den Transgenen (Abb. 3.19-C) zu erkennen. Der Wildtyp wies vereinzelt kleine Proteinvesikel auf (Abb. 3.19-D).

Ein Stadium später (25 DAP) enthielten die Zellen der iAGP-3 Embryonen weniger und kleinere Stärkekörner (Abb. 3.19-E) als die Kontrolle (Abb. 3.19-F), die dafür größere aber weniger dicht gefüllte Proteinvesikel hatte (Abb. 3.19-G, -H).

Am 30. DAP zeigte sich fast das gleiche Bild wie ein Stadium früher. Die Stärkekörner waren in geringer Anzahl in den iAGP-3 Zellen vorhanden und zudem nur leicht bräunlich gefärbt (Abb. 3.19-I), während im Wildtyp die Körner größer und dunkelblau gefärbt waren (Abb. 3.19-J). Die Proteinvakuolen waren dagegen in den Transgenen größer aber weniger dicht gepackt (Abb. 3.19-K) als bei der Kontrolle (Abb. 3.19-L).

Während der späten Samenreifung (35 DAP) waren die Stärkekörner ebenfalls weniger und kleiner vorhanden sowie leicht bräunlich gefärbt (Abb. 3.19-M) als in den Wildtypembryonen mit deutlich größeren und dunkelviolett aussehenden Körnern (Abb. 3.19-N). Zu diesem Zeitpunkt schien es keinen Unterschied in der Größe der Proteinvesikel zwischen den Transgenen (Abb. 3.19-O) und den Wildtypsamensamen (Abb. 3.19-P) zu geben. Auffällig war jedoch, dass die Vakuolen weniger dicht gepackt waren. Während des Entwicklungsverlaufs verdeutlichte sich, dass die Zellen der iAGP-3 Samen kleinere und hellbräunlich gefärbte Stärkekörner enthielten, was auf eine verringerte Synthese und Einlagerung von Stärke im

Samen schließen lässt. Bei den Proteinvakuolen war der Unterschied dagegen nicht so deutlich. In den iAGP-3 Zellen schienen die Proteinvesikel weniger dicht zusammengelagert zu sein als in den Wildtypzellen.

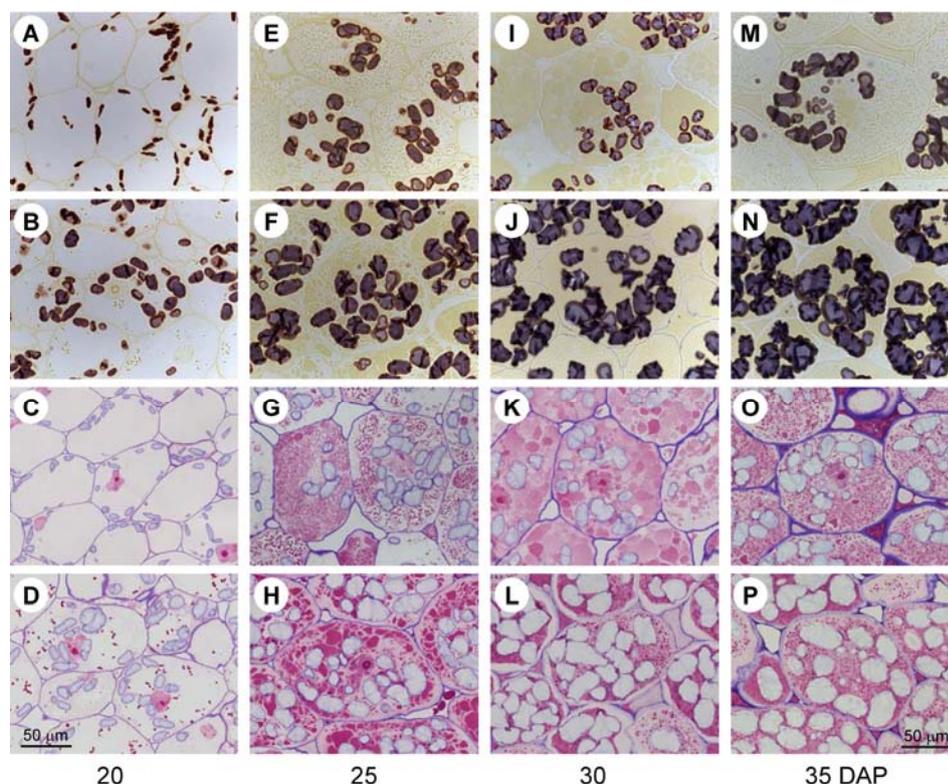


Abb. 3.19 Histologische Aufnahmen der iAGP-3 Embryonen der Entwicklungsstadien 20 DAP (A, C); 25 DAP (E, G); 30 DAP (I, K) und 35 DAP (M, O) im Vergleich zu Wildtypembryonen als Kontrolle der Stadien 20 DAP (B, D); 25 DAP (F, H); 30 DAP (J, L) und 35 DAP (N, P). Färbung der Ultradünnschnitte jeweils mit Jod-Kalium-Jodid-Lösung (Stärkenachweis: A + B, E + F, I + J, M + N) und mit Fuchsin/Kristallviolett (Nachweis der Proteinvesikel: C + D, G + H, K + L, O + P).

3.3.5 Transkriptionsanalyse sich entwickelnder iAGP-3 Embryonen

Für die Analyse der Expression spezifischer Gene während der Samenentwicklung wurden iAGP-3 und Wildtypembryonen, gewachsen unter Phytokammerbedingungen, verschiedener Stadien (20, 25, 30 und 35 DAP) mittels Oligonucleotid-Microarray Technik (siehe 3.1.4) untersucht. Die Microarray-Expressionsanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Küster (ehemals CeBiTec-Center der Universität Bielefeld, aktuell Leibniz-Universität Hannover). Dabei wurden Gene als verschieden exprimiert eingestuft, wenn sie einen statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,05$ und einen Faktor von mindestens 2 aufwiesen. Basierend auf der Tatsache, dass die exprimierte Menge bestimmter Transkripte nicht endgültig etwas über transkriptionelle Aktivitäten, Proteinmengen oder Enzymaktivitäten aussagt, sind alle folgenden Ergebnisse und Aussagen bezüglich Übereinstimmungen von Genen und ihre Funktionen als möglicherweise anzusehen. Zur Vereinfachung wurden alle erhöhten oder verringerten Transkriptmengen resultierend aus

dem Vergleich der Transgenen mit den Wildtypsamen als hoch- bzw. herunterreguliert bezeichnet. In Abb. 3.20 ist jeweils die Gesamtanzahl der Gene pro Entwicklungsstadium dargestellt, die hoch- und herunterreguliert wurde.

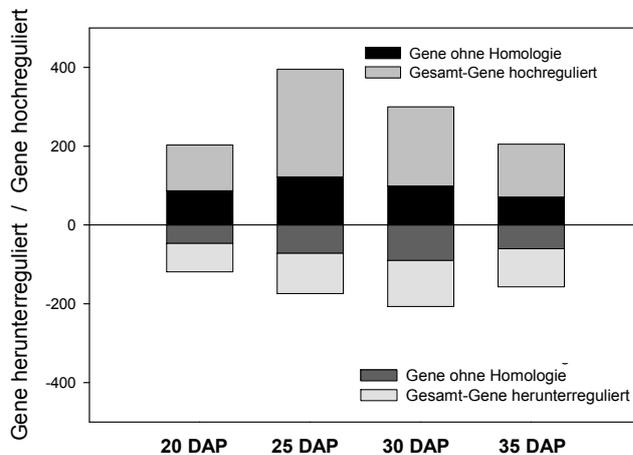


Abb. 3.20 Gesamtanteil der induzierten und reduzierten Gene je Stadium (20, 25, 30 und 35 DAP) in den iAGP-3 Embryonen laut Daten der Oligonucleotid-Microarray Analyse. Einteilung der Gesamt-Gene hoch/ herunterreguliert und Gene ohne annotierbare Sequenzhomologie.

Es wurden insgesamt 203, 395, 300 und 205 Gene entsprechend dem jeweiligen Stadium 20, 25, 30 und 35 DAP hochreguliert. Bezogen auf die gesamten 5200 gespotteten ESTs pro Microarray entspricht dies einem Anteil von 3,9; 7,5; 5,7 und 3,9%. Von diesen hochregulierten Genen zeigten letztlich 87, 122, 99 und 71 Gene (entspricht 43, 31, 33 und 35% der hochregulierten Gene) keine Homologie zu annotierten Sequenzen. Im Gegensatz dazu waren 119, 174, 207 und 157 Gene (2,3; 3,3; 3,7 und 3,0% aller Gene) am Tag 20, 25, 30 und 35 DAP herunterreguliert. Davon wiesen 47, 72, 90 und 60 Gene (39, 42, 43 und 60% der herunterregulierten Gene) keine Homologie zu annotierten Sequenzen auf. Die Anzahl der verschiedenen exprimierten Gene war am 25. und 30. DAP am größten und wesentlich niedriger am 20. und 35. DAP. Des Weiteren wurden 2-3mal so viele Gene in den transgenen Samen hoch- als herunterreguliert. Gene mit annotierbarer Sequenz wurden in zehn funktionelle Gruppen eingeteilt: (1) Stoffwechsel, (2) Transport, (3) Proteinprozessierung, (4) Proteinumwandlung, (5) Zellproliferation, (6) Speicherung, (7) Stress- und Pathogenabwehr, (8) Signalweiterleitung, (9) Photosynthese sowie (10) Transkription und Translation (Abb. 3.21). Die differenziell exprimierten Gene und ihre möglichen Funktionen wurden im Anhang Tab. A.3 und Tab. A.4 sowie in den Schemata Abb. A.5 zusammengefasst und werden im Folgenden näher erläutert.

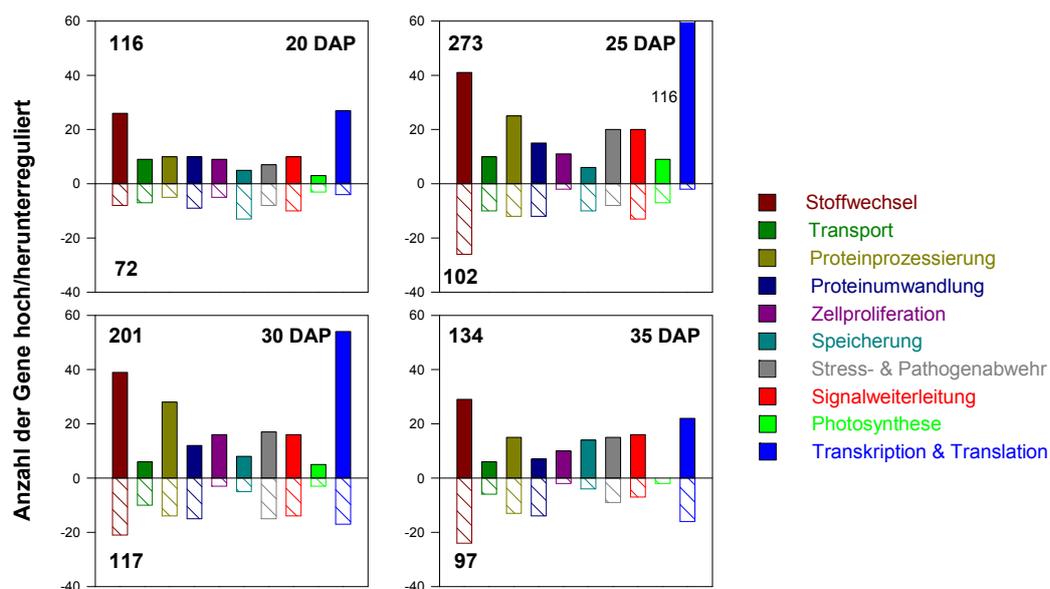


Abb. 3.21 Gesamtanteil der annotierbaren hoch/herunterregulierten Gene je Stadium 20, 25, 30 und 35 DAP der iAGP-3 Embryonen im Vergleich zum Wildtyp. Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen: (1) Stoffwechsel, (2) Transport, (3) Proteinprozessierung, (4) Proteinumwandlung, (5) Zellproliferation, (6) Speicherung, (7) Stress- und Pathogenabwehr, (8) Signalweiterleitung, (9) Photosynthese und (10) Transkription und Translation.

Gene der funktionellen Gruppe „Transkription und Translation“

Der größte Anteil verschieden regulierter Gene wurde der funktionellen Gruppe „Transkription und Translation“ vorrangig mit induzierten Genen während der mittleren Samenreife am 25. DAP (116) und 30. DAP (54) zugeordnet. Die Gene dieser Gruppe kodieren hauptsächlich für ribosomale Proteine, Histone, Translationsinitiationsfaktoren und RNA-Prozessierungsenzyme (*Supplemental Table S2*; Weigelt *et al.*, 2009). Über den Entwicklungsverlauf verteilt wurden transkriptionelle Regulatoren identifiziert, die möglicherweise an Stoffwechselregulation oder an N-Signalprozessen beteiligt sind. Darunter waren verstärkt aber auch reduziert exprimierte Gene, die hauptsächlich für verschiedene Transkriptionsfaktoren kodieren.

AGP-Inhibierung beeinflusst Gene des Kohlenhydratstoffwechsels in verschiedenen Zellkompartimenten (Zytosol, Mitochondrien und Plastiden)

Insgesamt wurden 32 differenziell exprimierte Gene gefunden, die für Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in verschiedenen Zellkompartimenten, wie Zytosol, Mitochondrien und Plastiden, kodieren. Im Zytosol wurden vorrangig Gene induziert, deren Proteine an der Umwandlung von Saccharose und Hexosephosphat beteiligt sind, wie die Saccharosephosphat-Synthase 2 (20, 30, 35 DAP), Saccharose-Phosphatase (20 DAP), Saccharose-Synthase 1 (PsSUS1; 20, 25 DAP), UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (30, 35 DAP), Phosphoglucoisomerase (25, 30, 35 DAP) und Phosphoglucomutase (PGM; 20 DAP). Im Gegensatz dazu erfolgte eine verringerte Expression von Genen, welche für die

vakuoläre Invertase Psl-1 (25 DAP), die neutrale Invertase (25 DAP) und Saccharose-Synthase 3 (PsSUS3; 25, 35 DAP) kodieren. Weiterhin wurden Sequenzen in den iAGP-Samen induziert, kodierend für Enzyme der Glycolyse, wie die Enolase (35 DAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; 25, 30, 35 DAP), aber auch verringert exprimiert, wie die Phosphoglyceratmutase (20, 25, 30, 35 DAP) und Fructosebiphosphat-Aldolase (20, 35 DAP). Zwei weitere hochregulierte Gene kodieren für die Untereinheiten A und B der ATP-Citrat-Lyase, die eine wichtige Funktion bei der Bereitstellung von Acetyl-CoA, als Vorstufe der Lipidbiosynthese, im Zytosol spielt (Fatland *et al.*, 2000).

In den transgenen iAGP-Embryonen wurden verschiedene plastidäre Gene verstärkt exprimiert, deren Enzyme am Kohlenhydratstoffwechsel und der Glycolyse beteiligt sind, wie die NADP-Malat-Dehydrogenase (20, 25 DAP), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; 20, 25 DAP), Phosphoglucomutase (PGM; 20, 30 DAP) und Fructosebiphosphat-Aldolase (35 DAP). Aber auch verringert exprimiert, wie die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (20, 25, 30, 35 DAP) und die Pyruvat-Kinase (25, 30 DAP). Zusätzlich konnten Gene identifiziert werden, deren Proteine funktionell an der Stärkebiosynthese (Stärke-Synthase 1, granulärgebunden, 35 DAP) aber auch am Stärkeabbau (Stärke-Phosphoralyse L, 25, 30, 35 DAP; Phosphoglucon-Wasser-Dikinase, 35 DAP und das Stärke-Entzweigungsenzym 2, 30 DAP) in den Plastiden involviert sind. Wie erwartet wurde das Gen, welches für die kleine Untereinheit der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase kodiert, während aller untersuchten Entwicklungsstadien in den iAGP-3 Embryonen herunterreguliert, genauso wie die große Untereinheit von AGP (25 DAP) und die beta-Amylase (25, 35 DAP).

Mitochondriale Gene, die für Enzyme der Glycolyse und des Zitronensäurezyklus kodieren, wurden in den transgenen Samen hochreguliert, wie die Pyruvat-Dehydrogenase, Isoform E1- α und - β (20, 25 DAP und 30, 35 DAP), Pyruvat-Dehydrogenase E2 (25 DAP) und 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, E1 (20, 25 DAP). Weiterhin war ein Gen am 25, 30. und 35. DAP induziert, welches für die Nucleosidzucker (Nudix)-Hydratase kodiert, welche an der Spaltung von Nucleosidphosphatzuckern beteiligt ist.

AGP-Inhibierung stimuliert den Aminosäurestoffwechsel und die Proteinbiosynthese

In den iAGP-3 Samen ist eine deutliche Stimulation der Expression von 18 Genen des Aminosäurestoffwechsels erkennbar. So wurden verschiedene Gene hochreguliert, die für Enzyme kodieren, welche am Metabolismus aromatischer Aminosäuren, der Arginin-Biosynthese, am Asparagin-Stoffwechsel sowie am Serin/Glycin- und Cystein-Stoffwechsel beteiligt sind. Darunter waren für den Stoffwechsel aromatischer Aminosäuren die 3-Dehydroquinat-Synthase (25 DAP), Indol-3-Glycerolphosphat-Synthase (30 DAP) und die Fumarylacetoacetase (30 DAP); für die Arginin-Biosynthese die Argininosuccinat-Synthase (25, 30 DAP) und die bifunktionelle Ornithin-Acetyltransferase/N-Acetylglutamat-Synthase (25 DAP); für den Asparagin-Stoffwechsel die Ketolsäure-Reduktoisomerase (25, 30 DAP) und die Methionin-Synthase (20, 25, 30 DAP) sowie für den Serin/Glycin- und Cystein-

Stoffwechsel die Threonin Aldolase (20 DAP), Phosphoserin-Phosphatase (30 DAP), Serin-Acetyltransferase (25 DAP) und O-Acetyl-Serin (Thiol)-Lyase (25, 30 DAP). Weiterhin wurde ein Gen während aller untersuchten Entwicklungsstadien verstärkt exprimiert, welches für die Asparaginase kodiert, die an der N-Mobilisierung beteiligt ist (Murray and Kennedy, 1980). Dessen Stoffwechselprodukt, die Aminosäure Aspartat, wurde durch die Aspartat-Transaminase (am 20. DAP hochreguliert) zu Glutamin umgewandelt. Zwei Sequenzen, die für 3-Isopropylmalat-Dehydratase (20 DAP) und Glutamin-Synthetase (GS1; 25, 30, 35 DAP) kodieren, waren reduziert exprimiert.

Die Reprimierung der AGP-Aktivität wirkte sich nicht nur auf den Aminosäurestoffwechsel aus, sondern auch auf eine stimulierte Proteinbiosynthese, was sich anhand verstärkt exprimierter Gene, die für Speicherproteine kodieren, zeigte. Zusätzlich wurde in den iAGP-3 Samen ein erhöhter Gehalt an Albuminen und Globulinen gemessen (Tab. 3.8). Trotzdem wiesen die Vicilin- und Legumin-Transkriptdaten diesbezüglich kein eindeutiges Bild auf. Verschiedene Sequenzen, die für Speicherproteine, wie Viciline, Vicilin A, vicilinähnliche USP-Proteine, Albumin 1 und Ferritin 3, kodieren, waren während der gemessenen Stadien der Samenreife induziert. Im Gegensatz dazu wurden herunterregulierte Sequenzen gefunden, die für das Speicherprotein Legumin (Legumin B, 20, 25, 35 DAP; Legumin A2, 20, 25, 30 DAP und Legumin K, 20, 25, 30, 35 DAP) kodieren. Die Legumine machen den größten Anteil der Globuline als Hauptspeicherfraktion der Leguminosensamen aus. Die Ergebnisse der Microarray-Analyse konnten mittels Northern Blot Technik bestätigt werden (Abb. 3.15). Die Expression von Vicilin war ab dem 25. DAP in den Transgenen deutlich höher als im Wildtyp (Abb. 3.15-B). Dagegen waren die mRNA-Gehalte von Legumin B um 40% reduziert in den drei iAGP-Linien im Vergleich zur Wildtypkontrolle (Abb. 3.15-C). Weiterhin wurden Speicherproteingene vermindert exprimiert, die für Albumin (20, 25 DAP), Albumin 2 (20, 25, 30 DAP) und Glycinin (20, 25, 30 DAP) kodieren.

Differenziell regulierte Gene der funktionellen Gruppe „Transport“

Es wurden verschieden exprimierte Gene gefunden, die für Proteine kodieren, welche an plastidären Transportvorgängen beteiligt sind. So wurden Gene verstärkt exprimiert, die für Glucose-6-Phosphat-Translokator (20, 30 DAP), ATP/ADP-Translokator (20, 25 DAP), zwei ATP-Synthasen- δ (25 DAP) und das Transportprotein Tic22 (innere Membran, 35 DAP) kodieren. Zusätzlich wurden verringerte Transkriptmengen für Sequenzen gefunden, die für einen Glucose-Transporter (25 DAP), einige Zink-Transporter-Gene (20, 25, 30 DAP), zwei Isoformen des OEP16 (plastidärer Aminosäurekanal der äußeren Membran, 20, 25, 30 DAP; (Pohlmeier *et al.*, 1997) und zwei Aquaporine, PIP-Typ 7a (Turgor gesteuert; 25, 30, 35 DAP; Guerrero *et al.*, 1990) kodieren.

Des Weiteren erfolgte in den iAGP-Embryonen die verstärkte Expression von Genen, die für mitochondriale Transportproteine kodieren, wie drei ATP-Synthasen- δ (20, 25, 30, 35 DAP), drei Untereinheiten der ATP-Synthase (25, 30 DAP), innere Membran Translokase TIM50 (25, 35 DAP), zwei Untereinheiten der NADH-Ubiquinon-Oxidoreductase Komplex 1 (25, 35

DAP), das entkoppelte Protein (25, 30, 35 DAP) sowie verschiedene Zucker-, Peptid- und Metallionentransporter. Ein Gen, kodierend für ein bortransportähnliches Protein, war am 20. DAP herunterreguliert.

AGP-Inhibierung verändert die Expression von Genen des Zellzyklus

Ingesamt wurden 23 Gene verstärkt exprimiert, deren Proteine an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, wie sechs Annexine (20, 25, 30, 35 DAP), ein Tubulin alpha (30, 35 DAP), drei Tubulin beta (20, 25, 35 DAP), tubulinspezifische Chaperone C und A (30 und 35 DAP), zwei Aktine (20, 25 DAP), ein aktindepolymerisierender Faktor (20 DAP) sowie ein Ca^{2+} -reguliertes aktinbindendes Protein (20, 25, 30, 35 DAP). Weiterhin wurden auch Gene induziert, die für ein Zellteilungskontrollprotein (AAA-Typ ATPasen, 25 DAP) und ein Prohibitin (30, 35 DAP) kodieren. Letzteres ist an der mitochondrialen Biogenese und am Schutz vor Stress und Seneszenz in Pflanzenzellen beteiligt (Ahn *et al.*, 2006). Zwei Gene, die für ein Cyclin D3 und B kodieren, deren Expression durch die Verfügbarkeit von Zucker gesteuert wird (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000), wurden auch verändert.

AGP-Reprimierung bewirkt hormonelle und stressbedingte Veränderungen

In den iAGP-3 Samen wurden mögliche stressbedingte und hormonelle Veränderungen auf Genexpressionsebene untersucht. Insgesamt wurden 12 Gene verstärkt induziert, die für Proteine mit Funktion im Jasmonsäure (JA)-Stoffwechsel, Gibberellinsäure (GA)-Metabolismus, Auxin-Reaktionen und Cytokinin-Stoffwechsel kodieren. Darunter waren für den JA-Stoffwechsel die S-Adenosyl-L-Methionin:Jasmonsäurecarboxyl-Methyltransferase (20, 25 DAP), Allenoxid-Cyclase 4 (25 DAP) und 12-Oxo-Phytodiensäure-10,11-Reduktase (25, 30, 35 DAP); für den Gibberellinsäure (GA)-Metabolismus die Ent-Kaurensäure-Oxidase CyP450 (88A3; 20, 30 DAP), GA-reguliertes Protein GAST1 (25 DAP) und ein Transkriptionsfaktor der GRAS/DELLA/GAI-Familie; für die Auxin-Reaktionen ein auxingesteuertes Protein IAA8 (25, 35 DAP) und die IAA-Amido-Synthetase (20, 25 DAP) sowie für den Cytokinin-Stoffwechsel die Cytokinin-Dehydrogenase 5 und ARR5 (jeweils 35 DAP). Zusätzlich wurde eine Sequenz hochreguliert, kodierend für die Proteinphosphatase 2A (20 DAP) als negativer Regulator der ABA-Signalwirkung. Und ein weiteres Gen verringert exprimiert, dessen Protein für die 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase (NCED9; 30 DAP), ein Schlüsselenzym der ABA-Biosynthese, kodiert.

Der veränderte Kohlenhydratstoffwechsel und die vermehrte Speicherung von freien Zuckern in den iAGP-Samen führte zur verstärkten Expression von Genen, deren Proteine an stressbedingten Reaktionen beteiligt sind. So wurden für verschiedene Gene induzierte Transkriptmengen gefunden, die für Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, wie die Serin/Threonin-Proteinkinase SAPK7 (20, 25, 30, 35 DAP), die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase CPK1 (20, 30, 35 DAP), einige MAP-Kinasen (30, 35 DAP) und MAPK-Kinasen (30 DAP), sowie verschiedene Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (20, 35 DAP) und Proteinphosphatasen 2A (20 DAP) und 2C (35 DAP) kodieren. Dagegen wurden auch

Gene verringert exprimiert, die für Proteinkinasen, wie die Proteinkinase APK1A (20, 30 DAP), SnRK1, β -Untereinheit 1 (20 DAP) und GSK-3-ähnliche Proteinkinase, Msk4 (20 DAP), sowie einige Proteinphosphatasen, wie Protein-Tyrosin-Phosphatase (30, 35 DAP) und Proteinphosphatase (35 DAP), kodieren.

Stressbedingte Reaktionen in den iAGP-Samen äußerten sich in der verstärkten Expression von Genen (Abb. 3.22), deren Proteine an der osmotischen Stresssignalwirkung, der Produktion von Polyaminen und Ascorbaten, der Aktivierung des Jasmonsäure/Oxylipin-Stoffwechsels, der Flavonoid- und Riboflavinsynthese sowie dem Energieverbrauch in den Mitochondrien beteiligt sind. Weiterhin waren Gene hochreguliert, deren Proteine an der ROS-Abwehrreaktion, am Schutz von Proteinen und Lipiden, an der Proteolyse sowie am Chlorophyllabbau mitwirken (*Supplemental Table S2*; Weigelt *et al.*, 2009). Zusätzlich wurden noch Gene differenziell exprimiert, die in Verbindung mit abiotischen (Dehydrationsprotein, 20, 25 DAP; Quinon-Reduktase, 20, 25, 30, 35 DAP; Mdo-Keto-Reduktase, 20 DAP; LEA-Proteine, 25 DAP) und biotischen Stress (O-Diphenyl-O-Methyl-Transferase, 20, 25, 30, 35 DAP; Pathogeneseprotein, 25 DAP; Chitinase, 25 DAP) stehen (*Supplemental Table S2*, Weigelt *et al.*, 2009).

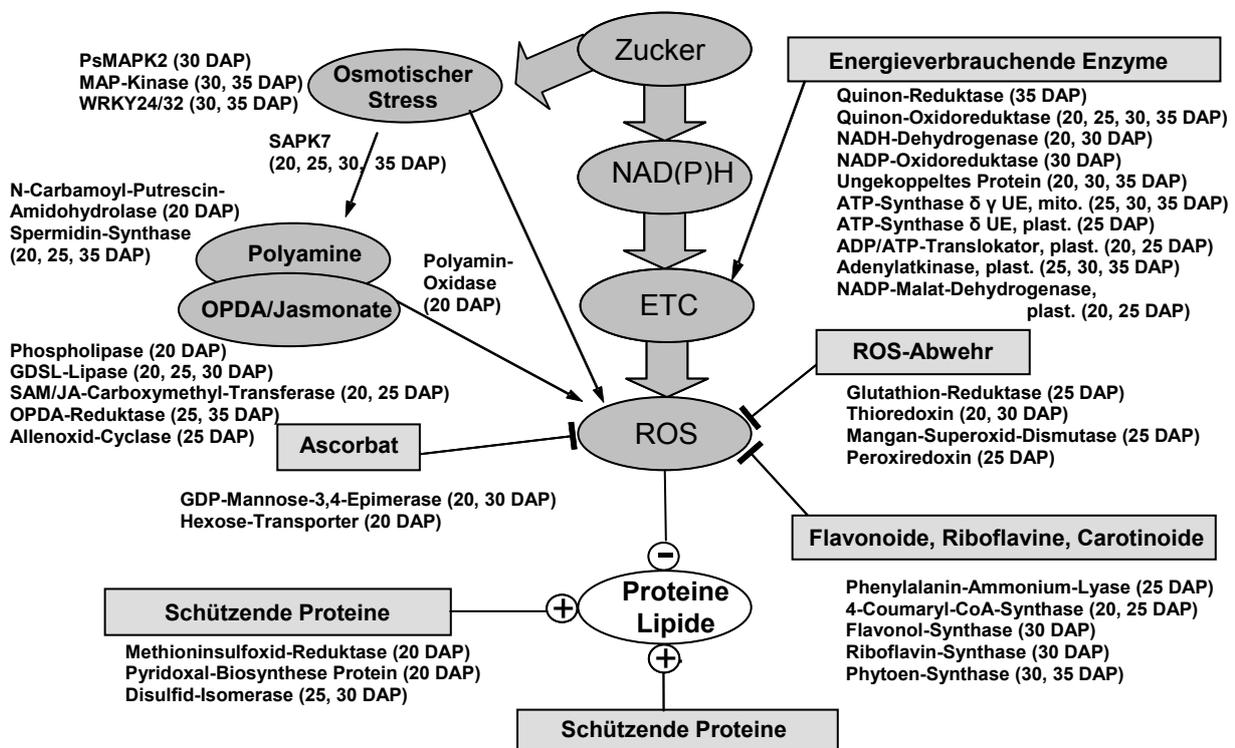


Abb. 3.22 Schema verschiedener Stressantworten der iAGP-Samen. Im Schema wurden verstärkt exprimierte Gene (basierend auf Expressionsdaten der Microarray-Analyse, *Supplemental Table S2*, Weigelt *et al.*, 2009) und deren mögliche Proteinfunktionen bei stressbedingten Reaktionen in der Zelle dargestellt. In Klammern: untersuchte Entwicklungsstadien (20, 25, 30 und 35 DAP).

3.3.6 Ermittlung von Metaboliten des Samenstoffwechsels in iAGP-3 Embryonen

Zur genauen Untersuchung der Veränderungen im Samenstoffwechsel wurden AGP-reprimierte und Wildtypembryonen verschiedener Entwicklungsstadien (20, 25, 30 und 35 DAP), gewachsen in Phytokammern unter konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen, mittels GC-MS Technik mit Hilfe von Dr. A. Fait und Dr. A. R. Fernie (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm) analysiert. Mit dieser Technik konnten 65 verschiedene Metabolite des Glycolyse- und Zitronensäurezyklus (TCA) sowie 26 Aminosäuren und 8 Zucker bestimmt werden (Abb. 3.23). Eine Veränderung der Stoffwechselprodukte wird als entsprechender Faktor (in Klammern) dargestellt. Der Faktor wurde als Differenz der Messwerte der beiden Vergleichsproben berechnet. Bei der GC-MS Analyse wurden erhöhte Werte jeweils um den Faktor 2 in den transgenen Embryos gegenüber dem Wildtyp hauptsächlich während der frühen Samenentwicklung (20 DAP) für die Aminosäuren Methionin, Serin, Prolin, Phenylalanin, Glutamin, β -Alanin und GABA (20 und 25 DAP) gemessen. Andere Aminosäuren hatten dagegen verringerte Werte in den iAGP-3 Samen während der mittleren bis späten Samenreife (25-35 DAP), wie Asparagin (25, 30 DAP; entsprechend um Faktor 3 und 2), Asparaginsäure (25, 30, 35 DAP; 5, 2, 4), Threonin (25 DAP; 2), Methionin (25, 30 DAP; 4, 2), Glutamin (25, 30 DAP; 3, 2), Arginin (30 DAP; 2), Glycin (25 DAP; 2), Homoserin (25, 30, 35 DAP; 2, 3, 2), Tyrosin (30 DAP; 2), β -Alanin (25, 30 DAP, 5, 3) und Ornithin (30 DAP, 2). Keine veränderten Gehalte wiesen Lysin, Isoleucin, Glutaminsäure, Alanin und Tryptophan auf. Weiterhin zeigte sich eine Erhöhung bei dem Polyamin Putrescin in allen Stadien, wogegen Spermidin höhere Gehalte am 20. und 25. DAP aufwies, die aber nicht signifikant waren. Diese Ergebnisse stimmen mit den verstärkt exprimierten Genen, die für Proteine der Polyamin-Synthese kodieren, überein. Eine Auswahl der differenziell regulierten Gene in den transgenen AAP1- bzw. iAGP-Samen, die Einfluss auf Glycolyse, TCA-Zyklus, Aminosäure- und Stärkestoffwechsel haben, wurde in Kombination mit den veränderten Metaboliten in den Schemata Abb. A.45). Ein gegensätzliches Bild zeigte sich für die Aminosäuren Methionin, Glutamin und β -Alanin, deren Gehalte am 20. DAP erhöht waren, aber verringerte Werte am 25. und 30. DAP gegenüber dem Wildtyp hatten. Eine signifikante Erhöhung konnte auch in den iAGP-3 Embryonen im Vergleich zum Wildtyp bei den Zuckern Glucose (25, 30, 35 DAP), Fructose (25, 30, 35 DAP), Galactose (25, 30, 35 DAP), Glucose-6-Phosphat (25, 30, 35 DAP), Fructose-6-Phosphat (20 DAP) und Zuckeralkoholen, wie myo-Inositol (30, 35 DAP), Galactinol (30, 35 DAP) und Threitol (30, 35 DAP), bestimmt werden. Des Weiteren wurden mittels GC-MS Analyse veränderte Metabolite der Glycolyse und des TCA ermittelt. Glycerinaldehyd-3-Phosphat war während der mittleren Samenreife am 25. und 30. DAP erhöht. Die Gehalte an organischen Säuren, wie Malat (25, 30, 35 DAP), 2-Oxo-Glutarat (25, 30 DAP), Succinat (30 DAP) und Isocitrat (20 DAP), waren signifikant erhöht, wogegen Isocitrat am 25. und 30. DAP auch erniedrigte Werte aufwies.

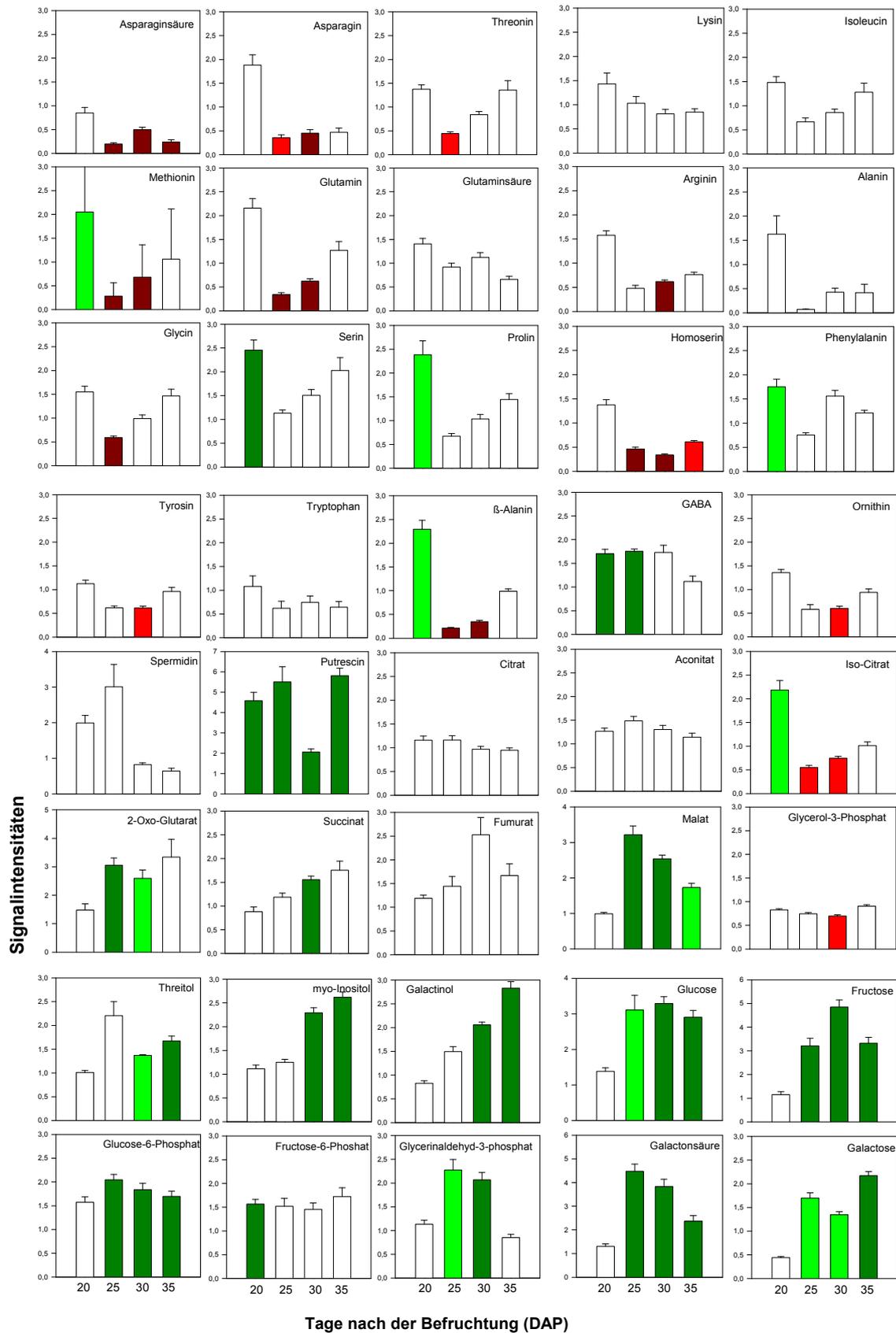


Abb. 3.23 Metabolite des Samenstoffwechsels von iAGP-3 Embryonen im Vergleich zum Wildtyp. Gemessen mittels GC-MS Analysetechnik. Für die statistische Auswertung wurden 6 Pflanzen vermessen, die Werte gemittelt \pm SD Standardabweichung und Student t-Test berechnet. Signifikant höhere Werte: Balken in dunkelgrün ≤ 0.05 , hellgrün ≤ 0.1 und signifikant niedrigere Werte: Balken in dunkelrot ≤ 0.05 , hellrot ≤ 0.1

3.3.7 Hormonelle Veränderungen in den AGP-reprimierten Samen

Die vermehrte Akkumulation von löslichen Zuckern in den iAGP-Zellen bewirkte einen verstärkten Wassereintrag und somit Stress für die Zelle. Um mögliche stressbedingte und auch hormonelle Einflüsse auf Genexpression und Samenreifung zu untersuchen, wurden verschiedene Phytohormone, wie ABA, Cytokinine, Jasmonsäure, 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), und deren Stoffwechselprodukte sowie die Konzentration an Wasserstoffperoxid bestimmt. Die Messung der Cytokinin-Konzentrationen wurde in Kooperation mit Prof. Dr. R. J. Neil Emery (Biology Department, Trent University, Peterborough, ON, Canada) durchgeführt. Dazu wurden iAGP-3 und Wildtypembryonen der Entwicklungsstadien 20, 25, 30 und 35 DAP, gewachsen unter konstanten Licht- und Temperaturbedingungen in der Phytokammer, verwendet. Als erstes erfolgte die Analyse der Cytokinine und deren aktive Isoformen Cytokinin-Nucleotide, Cytokinin-Riboside und Cytokinin-freie Basen (Abb. 3.24).

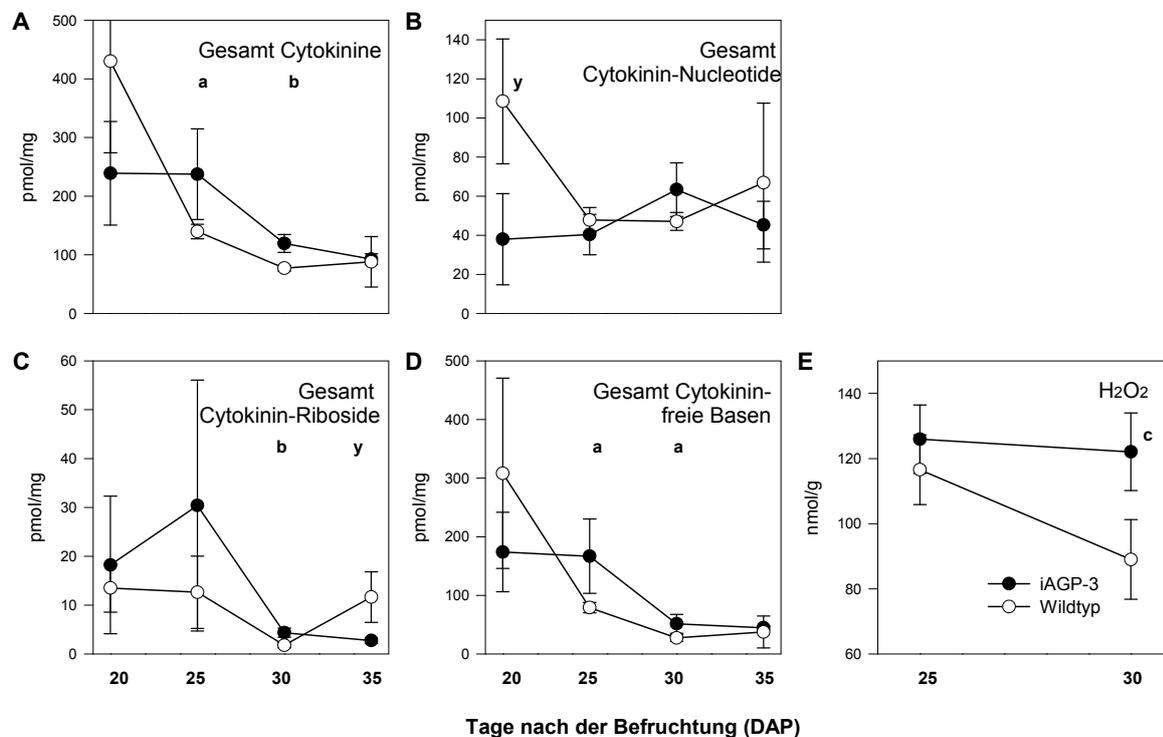


Abb. 3.24 Bestimmung der Phytohormone Cytokinin, dessen Isoformen und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in iAGP-3 Embryonen im Vergleich zum Wildtyp. A: Gesamt-Cytokinine, B: Cytokinin-Nucleotide, C: Cytokinin-Riboside, D: Cytokinin-freie Basen, E: H₂O₂. Signifikant höhere Werte: a ≤ 0.05, b ≤ 0.01, c ≤ 0.001 und signifikant niedrigere Werte: x ≤ 0.05, y ≤ 0.01, z ≤ 0.001.

Der Gesamtgehalt an Cytokinin war in den transgenen Samen signifikant am 25. und 30. DAP gegenüber dem Wildtyp erhöht (Abb. 3.24-A). In den Wildtypsamen sank der Cytokiningehalt von der frühen bis zur späten Samenreifung drastisch von 440 pmol/mg FG auf 100 pmol/mg FG ab, wogegen in der transgenen Linie nur ein leichter Abfall der Werte von 250 pmol/mg FG auf 100 pmol/mg FG erfolgte. Der Gehalt an Cytokinin-Nucleotiden, reversible Konjugate des aktiven Cytokinins, war dagegen in den iAGP-3 Samen signifikant

erniedrigt am 20. DAP. Die anderen Stadien zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp (Abb. 3.24-B). Weiterhin waren die Werte der aktiven Isoformen Cytokinin-Riboside (30 DAP) und Cytokinin-freie Basen (25 und 30 DAP) in den AGP-reprimierten Samen signifikant gegenüber der Wildtypkontrolle erhöht (Abb. 3.24-C, -D).

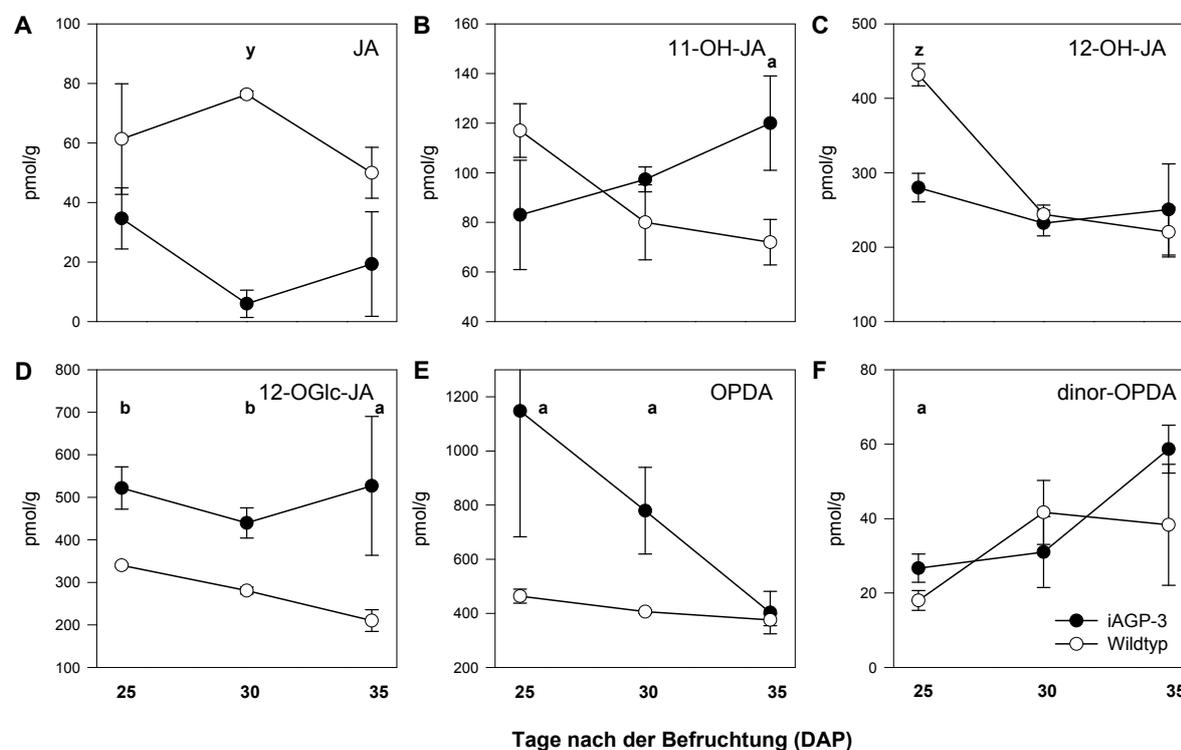


Abb. 3.25 Bestimmung der Gehalte an OPDA, JA und Derivate in iAGP-3 Samen im Vergleich zum Wildtyp. A: Jasmonsäure (JA), B: 11-Hydroxyjasmonsäure (11-OH-JA), C: 12-Hydroxyjasmonsäure (12-OH-JA), D: 12-Hydroxyjasmonat-Glycosid (12-OGlc JA), E: 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), F: dinor-OPDA . Signifikant höhere Werte: a ≤ 0.05, b ≤ 0.01, c ≤ 0.001 und signifikant niedrigere Werte: x ≤ 0.05, y ≤ 0.01, z ≤ 0.001.

Stressbedingte Situationen können zur Synthese spezifischer Signalstoffe führen und somit Stressantworten in der Pflanze auslösen. Um mögliche Stressreaktionen der iAGP-3 Samen zu untersuchen, wurden die Signalsubstanzen 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), dinor-OPDA, Jasmonsäure und deren Metabolite (Abb. 3.25) mit Hilfe von Dr. O. Miersch und Prof. Dr. C. Wasternack (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Saale) sowie der Gehalt von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bestimmt (Abb. 3.24-E). Der Gesamtgehalt an Jasmonsäure war in den transgenen Samen signifikant am 30. DAP gegenüber den Wildtypsamen reduziert (Abb. 3.25-A). Das hydroxylierte Jasmonat 11-Hydroxyjasmonsäure (11-OH-JA) war während der späten Samenreife am 35. DAP in den iAGP-3 Embryonen erhöht (Abb. 3.25-B), wogegen das 12-Hydroxyjasmonat (12-OH-JA) am 25. DAP reduziert war im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.25-C). Das 12-Hydroxyjasmonat-Glycosid (12-OGlc JA) war deutlich zu allen untersuchten Entwicklungsstadien in den transgenen Samen höher als in der Kontrolle (Abb. 3.25-D). Die Vorstufe der Jasmonsäure, die 12-Oxo-Phytodiensäure

(OPDA), wie im Wildtyp einen konstanten Wert während der Samenreifung mit 450 pmol/g FG auf (Abb. 3.25-E). In den iAGP-3 Samen war der Gehalt mit fast 1200 pmol/g FG am 25. DAP stark erhöht und fiel dann im weiteren Verlauf auf den Wert im Wildtyp ab. Trotzdem hatten die transgenen Samen eine signifikante Erhöhung an OPDA am 25. und 30. DAP gegenüber dem Wildtyp. Dagegen zeigte sich beim Derivat dinor-OPDA nur eine Erhöhung am 25. DAP in den AGP-reprimierten Samen (Abb. 3.25-F).

Die Messungen von Wasserstoffperoxid zeigten eine signifikante Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration in den iAGP-3 Samen am 30. DAP gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.24-E). Während der Gehalt in den transgenen Samen konstant blieb, fiel die Konzentration im Wildtyp vom 25. zum 30. DAP fast um die Hälfte ab. Die Gehalte an ABA wurden in drei unterschiedlichen Experimenten unter verschiedenen Anzuchtbedingungen und biologischen Wiederholungen gemessen. Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Transgenen und Wildtypsamen, jedoch waren die Messungen im Vergleich untereinander widersprüchlich und es konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene transgene Ansätze gewählt, die gezielt in Stoffwechselprozesse des Samens eingreifen und so die Verfügbarkeit von Stickstoff und Kohlenstoff verändern sollten, was sich in einer gesteigerten Akkumulation von Reservestoffen auswirken könnte. Zum einen erfolgte die verstärkte Aminosäurezufuhr in die Erbsenkotyledonen durch die samenspezifische Überexpression der Aminosäurepermease 1 aus *Vicia faba* (VfAAP1), was dann zu einer Erhöhung der Stickstoff- und Proteingehalte führte. Des Weiteren bewirkte eine Verringerung der Stärkebiosynthese durch die Reprimierung des Schlüsselenzyms des Stärkestoffwechsels, der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, eine Reduzierung der Stärkegehalte sowie die Akkumulation von löslichen Zuckern. Die vermehrte Bereitstellung an Kohlenstoffgerüsten führte dann zur Erhöhung der Speicherproteingehalte (Perez *et al.*, 1993; Casey *et al.*, 1998). Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Erzeugung stabiler transgener Erbsenlinien und anschließender Analyse dieser Pflanzen hinsichtlich veränderter Speicherstoffkomponenten des Samens. Durch Kombination von transkriptionellen und metabolischen Untersuchungsmethoden erfolgte im zweiten Teil eine ausführliche Analyse des veränderten Stickstoff- und Kohlenstoffhaushalts sowie möglicher Einflüsse und Interaktionen zu anderen Stoffwechselwegen, um so einen Gesamtüberblick über Stoffwechselprozesse und regulatorische Mechanismen während der Samenentwicklung zu erhalten.

4.1 Die Überexpression von VfAAP1 in Erbsenembryonen beeinflusst den N- und Speicherproteingehalt auch unter Freilandbedingungen

Die Aminosäurepermease 1 aus *Vicia faba* (VfAAP1) wurde unter Kontrolle des samenspezifischen Legumin B4 Promotors in Erbsenembryonen überexprimiert. VfAAP1, ortholog zu PsAAP2, transportiert ein breites Spektrum an Aminosäuren und wird vor Beginn der Proteinbiosynthese in sich entwickelnden Embryonen, besonders in den Speicherparenchymzellen der Kotyledonen, sowie in verschiedenen vegetativen Geweben und in der Samenschale, exprimiert. Somit scheint dieser Transporter eine wichtige Funktion bei der Bereitstellung von Aminosäuren für die Proteinbiosynthese zu haben (Golombek *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2001). Der hier verwendete *LeB4*-Promotor bewirkt die spezifische Expression des Transgens *VfAAP1* in den Speicherparenchymzellen des Embryos während der frühen bis späten Samenreifung zum Zeitpunkt der Proteinbiosynthese (Pickardt *et al.*, 1998). *LeB4* ist der Promotor des *Legumin B4* Gens aus *V. faba*, ein Mitglied der 11S Globulin-Genfamilie.

In einem Vorläuferprojekt wurden nach der Co-Transformation verschiedene Pflanzenlinien regeneriert, die eine verstärkte Expression des Transgens *VfAAP1* im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Heterozygote T₂-Samen der vier transgenen AAP1-Linien zeigten eine signifikante Erhöhung von bis zu 20% im Gesamt-N-Gehalt. Reife T₃-Samen der

homozygoten markergenfreien Linie AAP14/10 akkumulierten unter Gewächshausanzuchten deutlich mehr Stickstoff sowie verstärkt Speicherproteine (Rolletschek *et al.*, 2005).

Mit der Anzucht im Gewächshaus versucht man optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen. Trotzdem sind so wichtige Veränderungen, wie die Proteinerhöhung im Samen, erst von Bedeutung, wenn dieses Merkmal auch unter Freilandbedingungen reproduzierbar ist. Deshalb wurden Pflanzen der Linie AAP14/10 (Generation T₅ und T₆) und vom Wildtyp in zwei unabhängigen Freilandversuchen und zusätzlich im Außengewächshaus im Erdbeet angezogen und jeweils die Sameninhaltsstoffe in reifen und in sich noch entwickelnden Embryonen analysiert. Die Ergebnisse der Gewächshausanzuchten konnten auch im Freiland bestätigt werden.

In den drei Versuchsjahren wurde eine Erhöhung des Gesamt-N-Gehaltes in den AAP1-Samen im Vergleich zum Wildtyp gemessen, die im Freiland mit 8% nicht ganz so hoch ausfiel wie unter den freilandähnlichen Bedingungen im Außengewächshaus oder in der Phytokammer mit über 20%. In den Freilandversuchen war es möglich, eine größere Pflanzenanzahl zu vergleichen (jeweils 100 AAP14/10- und Wildtyppflanzen). Bedingt durch die natürliche Variabilität reagiert jede Pflanze anders auf bestimmte Umwelteinflüsse und entsprechend unterschiedlich stark fällt der Effekt auf den Proteingehalt aus. Zusätzlich scheinen die optimalen Bedingungen, wie Licht-, Temperatur- und Wasserregulierung sowie nährstoffreiche Bodenerde, einen positiven Einfluss auf die Speicherstoffsynthese zu haben. Die N-Erhöhung spiegelt sich in den Speicherproteinen wieder. In den transgenen Samen war die Hauptspeicherfraktion die Globuline deutlich erhöht. Die Albuminfraktion zeigte keine Veränderung oder sogar signifikant niedrigere Werte (Freiland 2006) als der Wildtyp. Die verstärkte Zufuhr bestimmter Aminosäuren in die AAP1-Samen scheint die Synthese der Globuline stärker zu stimulieren, als die der Albumine.

4.1.1 VfAAP1-Überexpression verstärkt die Aufnahmekapazität von Aminosäuren in die Erbsensamen

Durch die verstärkte Aktivität der Aminosäurepermease wurden mehr Aminosäuren in die Kotyledonen aufgenommen. Der Gesamtanteil der freien Aminosäuren war während der frühen Samenentwicklung (15, 18. DAP) in den AAP1-Embryonen deutlich höher als im Wildtyp. Im weiteren Entwicklungsverlauf war kein Unterschied mehr messbar. Während der frühen gemessenen Stadien findet noch keine Proteinsynthese statt, deshalb wurde in den Kotyledonen so ein hoher Gehalt an freien Aminosäuren bestimmt. Mit Beginn der Proteinbiosynthese (Abb. 1.1) werden die Aminosäuren verwertet und die Konzentration an freien Aminosäuren nimmt mit fortlaufender Syntheserate ab (Barratt, 1982). Deshalb war nur ein geringer Anteil an freien Aminosäuren während der späteren Stadien, mit der höchsten Syntheserate von Reservestoffen, messbar.

Auch die Einzelgehalte der meisten Aminosäuren waren besonders während der frühen Stadien erhöht. Gerade die Aminosäuren Glutamin und Asparagin, die bevorzugt in die Kotyledonen von Leguminosen transportiert und als Stickstoffquelle verwendet werden (Mifflin and Lea, 1977), waren erhöht. Weiterhin wurde eine Erhöhung der Aminosäuren

Threonin, Methionin, Histidin, Arginin, Leucin, Glycin und Serin in den AAP1-Samen gefunden. In Experimenten mit Hefemutanten wurde gezeigt, dass VfAAP1 unter anderem diese Aminosäuren transportiert (Miranda *et al.*, 2001). Zusätzlich wurden die Gehalte von GABA in den transgenen AAP1-Samen während der frühen Samenreife gesteigert, welches bei der Umwandlung von Glutaminsäure durch die Glutamat-Decarboxylase gebildet werden kann.

4.1.2 Die vermehrte Aminosäurezufuhr stimuliert die Proteinbiosynthese und erhöht das N:C Verhältnis im Samen

Durch die stimulierte Synthese von Speicherproteinen erhöht sich auch der Bedarf an den Ausgangsstoffen Stickstoff und Kohlenstoff. Der Mehrbedarf an Stickstoff wird unter anderem durch eine gesteigerte Aminosäurezufuhr, wie die bevorzugt aufgenommenen Aminosäuren Glutamin und Asparagin mit ihrem hohen N:C Verhältnis, gedeckt. Die importierten Aminosäuren werden desaminiert und der daraus entstandene Stickstoff wird zur Synthese weiterer Aminosäuren verwendet. Für die Aminosäurebildung muss neben Stickstoff auch Kohlenstoff zur Verfügung stehen. Dafür werden Reservestoffe, wie Saccharose und Stärke, gespalten, remobilisiert und über Glycolyse und Zitronensäurezyklus der Aminosäurebiosynthese zugeführt. Die Stoffwechselprodukte Oxalacetat und α -Ketoglutarat dienen z.B. als Kohlenstoffgerüste für die Synthese von Asparaginsäure und Glutaminsäure.

In den AAP1-Samen herrscht ein verändertes N:C Verhältnis. Durch den verstärkten Aminosäureeintrag und die stimulierte Proteinsynthese wurde eher der Stickstoffanteil zu Lasten von Kohlenstoff erhöht. Diese Limitierung an Kohlenstoff ist in den transgenen Pflanzen nachweisbar. In reifen AAP1-Samen wurden verringerte Gehalte an Gesamt-C, Stärke- und Saccharose gemessen. Somit scheint der als Saccharose und Stärke gespeicherte Kohlenstoff in den transgenen Samen gespalten und weiter in der Aminosäurebiosynthese verstoffwechselt zu werden.

Weiterhin war auffällig, dass die AAP1-Samen ein niedriges Samengewicht und Samenfrischgewicht in den Versuchen im Freiland und im Außengewächshaus hatten, wogegen die Samenanzahl pro Pflanze unverändert blieb. Dieses Phänomen der negativen Korrelation von Proteinerhöhung zu Lasten des Ertrages ist gut bekannt (Sinclair, 1998). Es basiert darauf, dass für die Synthese von Speicherproteinen wesentlich mehr Kohlenstoff pro Gramm Same verarbeitet werden muss, als für die Bildung von Stärke. Demzufolge ist die Produktion von Speicherproteinen energetisch aufwendiger als die von Stärke (Vertregt and Devries, 1987).

Die Mehrverarbeitung von Kohlenstoff in Proteine führt letztlich zu einem verringerten Samengewicht. *Vicia narbonensis* Samen mit verstärkter VfAAP1-Expression, gewachsen unter Gewächshausbedingungen, hatten sogar eine signifikante Erhöhung des Samengewichtes von 20-30% (Rolletschek *et al.*, 2005; Götz *et al.*, 2007). Möglicherweise lassen sich die Unterschiede durch die verschiedenen Arten, die in den Untersuchungen verwendet wurden, erklären. Anders als bei der Kulturpflanze Erbse ist *V. narbonensis* wenig

züchterisch bearbeitet. Weiterhin könnten die Unterschiede auf verschiedene Anzuchtbedingungen beruhen. Zum einen gibt es Unterschiede zwischen Phytokammer und Freiland bezüglich Licht- und Temperatureinfluss, zum anderen sind Bedingungen von aufeinander folgenden Jahren nicht identisch. Wahrscheinlich hatten die Pflanzen im Gewächshaus bessere Wachstumsbedingungen und somit einen höheren Stickstoffeintrag. Letztlich scheint die N-Aufnahme und Verteilung in den Samen von den Umweltbedingungen und von der gesamten Pflanze abhängig zu sein (Barneix, 2007; Götz, 2007).

4.2 Verstärkung des VfAAP1-Effektes durch phloem- und samenspezifische Expression der Aminosäurepermease

Die *VfAAP1*-Überexpression hat einen Effekt auf den Samenstoffwechsel, der aber in seiner Ausprägung stark von den Umweltbedingungen abhängig ist. Eine Möglichkeit, um diesen Effekt stärker und somit stabiler auszuprägen, wäre eine gesteigerte Expression der Aminosäurepermease durch Mehrkopien des Transgens in den Pflanzen. Untersuchungen der Erbsenlinie AAP18 mit zwei Kopien des *VfAAP1*-Transgens zeigten zunächst eine Erhöhung der Stickstoff- und Globulingehalte (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Unterschiede waren allerdings nicht sehr groß und in den nächsten Generationen nicht konstant, da die Pflanzen heterozygot waren und somit der Effekt entsprechend der Segregationsspaltung des Transgens nicht stabil ausfiel.

Des Weiteren ist auch möglich, dass zwar eine größere Aufnahmekapazität an Aminosäuren in die Kotyledonen bewirkt wurde, aber letztlich die N-Verfügbarkeit unverändert blieb. Denn die Akkumulation von Speicherproteinen im Samen wird von der N-Verfügbarkeit der gesamten Pflanze reguliert (Barratt, 1982; Balconi *et al.*, 1991; Lhuillier-Soundele *et al.*, 1999a; 1999b). Zur Erhöhung der Samenproteingehalte wäre eine effektivere Gestaltung der Remobilisierung von Reserven und deren Verteilung innerhalb der Pflanze sinnvoll. Darauf beruht der transgene Ansatz, die Aminosäurepermease *VfAAP1* unter Kontrolle des samen- (*LeB4*) und phloemspezifischen (*AtSUC2*) Promotors kombiniert in einer Pflanze zu exprimieren und somit die Translokation im Phloem und gleichzeitig die Beladung von Aminosäuren in den Samen zu verbessern. Dazu wurde der Promotor des Saccharosetransporters 2 aus *Arabidopsis thaliana* (*AtSUC2*) verwendet, welcher in Geleitzellen des Phloems sowie in *source*- und *sink*-Blättern aktiv ist (Truernit and Sauer, 1995; Stadler *et al.*, 2005).

Die homozygote Linie *sucAAP5/8*, die das Transgen *VfAAP1* unter Kontrolle von *AtSUC2* exprimiert, zeigte hauptsächlich in der Globulinfraktion eine Veränderung im Proteingehalt. Nach Kreuzung der Linien AAP14/10 und *sucAAP5/8* konnten vier doppelt homozygote *VfAAP1*-überexprimierende Pflanzen selektiert werden. Die Analyse der Inhaltsstoffe erfolgte mit Samen der Kreuzungsprodukte Nr. 27 und 58, welche im Nachweis mittels qRT-PCR die stärkste Expression von *VfAAP1* in *source*-Blättern hatten. Verglichen wurden die Kreuzungsprodukte mit dem Wildtyp und den beiden Elternlinien AAP14/10 und *sucAAP5/8*. Es wurde eine deutliche Steigerung des Gehaltes an Gesamt-N und Gesamt-C sowie der Speicherproteine, der Globulinfraktion, gegenüber dem Wildtyp und der Linie *sucAAP5/8*

gemessen. Weiterhin speicherten die Kreuzungsprodukte weniger Saccharose im Vergleich zum Wildtyp und den Elternlinien, was auf eine verringerte Stärkesynthese zugunsten der Speicherproteinbiosynthese deutet. Allerdings blieben die Albuminfraktion, der Stärkeanteil und das Samengewicht unverändert. Nur die Elternlinie AAP14/10 hatte ein verringertes Samengewicht, wie schon in vorherigen Analysen gezeigt wurde.

Da die Ausgangslinie sucAAP5/8 keine signifikante N-Erhöhung zeigte, basieren die höheren Werte des Gesamt-N-Gehaltes der Kreuzungsprodukte auf dem Einfluss des pLeB4/VfAAP1 Konstruktes. Die Kreuzung von AAP14/10 und sucAAP5/8 bewirkte zwar im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung des N-Gehaltes sowie der Speicherproteine, jedoch zeigte sich im Vergleich zur Elternlinie AAP14/10 keine signifikante Veränderung. Somit wurde der Effekt von VfAAP1 auf den Samenstoffwechsel durch den Einfluss der Elternlinie AAP14/10 erzielt.

Durch die zusätzliche Expression der Aminosäurepermease im Phloem wird eine höhere Kapazität der Aminosäureaufnahme geschaffen, die allerdings auch eine vermehrte N-Aufnahme aus dem Boden, der N-Verteilung sowie Remobilisierung aus vegetativen Geweben erfordert. Inwieweit dies tatsächlich realisiert werden kann, um effektiv mehr Aminosäuren in den Samen aufzunehmen und mehr Speicherproteine zu synthetisieren, konnte anhand dieses Versuches nicht abschließend geklärt werden. Andererseits bestätigt dies frühere Erkenntnisse über den direkten Zusammenhang der Speicherproteinsynthese und der Stickstoffverfügbarkeit in der Pflanze (Balconi *et al.*, 1991; Lhuillier-Soundele *et al.*, 1999a; 1999b).

Weiterhin könnten die nicht eindeutigen Ergebnisse auch an dem geringen Probenumfang liegen, der vermessen wurde. In weiteren Analysen müssten deutlich mehr Samen und biologische Wiederholungen verwendet werden, um messbar signifikante Unterschiede zu bestimmen. Letztlich konnte durch die zusätzliche Expression der Aminosäurepermease im Phloem der schon gezeigte Effekt von VfAAP1 auf den Speicherproteingehalt nicht noch mehr gesteigert werden. Folglich führte dieser Ansatz zu keiner weiteren Erhöhung der Reservestoffe, insbesondere des Proteingehaltes, im Samen.

4.3 Die Reprimierung des Enzyms ADP-Glucose-Pyrophosphorylase führt zur Reduzierung des Stärkegehaltes und gleichzeitig zur Proteinerhöhung im Samen

Das Schlüsselenzym der Stärkebiosynthese, die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP), katalysiert die Reaktion von Glucose-1-Phosphat zu Pyrophosphat und ADP-Glucose unter ATP-Verbrauch. Das AGP-Enzym von höheren Pflanzen ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten (Preiss *et al.*, 1991). Für Erbsenpflanzen konnten bisher drei cDNA-Klone identifiziert werden, von denen zwei für die kleine Untereinheit und der dritte für die große Untereinheit kodieren (Burgess *et al.*, 1997). Mittels RNAi-Technik sollte die Expression des Gens, welches für die kleine Untereinheit von AGP kodiert, inhibiert und somit auch die Enzymaktivität reprimiert werden. Dafür wurde ein 550bp langes Fragment der kleinen Untereinheit von AGP (X96765.1; Burgess *et al.*, 1997) zur Herstellung des *Hairpin*-Konstruktes verwendet. Für die samenspezifische Expression dieses

Hairpin-Konstruktes in den Speicherparenchymzellen des Embryos während der frühen bis späten Samenreifung wurde der Legumin B4 (*LeB4*) Promotor verwendet (Pickardt *et al.*, 1998).

Mit Hilfe der Co-Transformationstechnik wurden transgene Pflanzen hergestellt, von denen in den nächsten Generationen drei homozygote markergenfreie Linien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 selektiert werden konnten. Der mRNA-Gehalt der kleinen AGP-Untereinheit wurde in den transgenen Linien ab dem 20. DAP der Samenreifung drastisch auf unter 5% reduziert. In früheren untersuchten Stadien (15 DAP) zeigte sich noch kein Unterschied. Dies korreliert mit dem Expressionsmuster des *LeB4*-Promotors, der erst wenig später aktiv wird (Panitz *et al.*, 1997; Pickardt *et al.*, 1998). Weiterhin wurde in diesen Linien eine Verringerung der AGP-Enzymaktivität von über 90% gemessen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das RNAi-Konstrukt funktioniert und somit die Aktivität des endogenen AGP-Enzyms ausgeschaltet wurde.

Reife Samen der drei iAGP-Linien, gewachsen in der Phytokammer, wurden hinsichtlich der Inhaltsstoffe analysiert. Der Stärkegehalt war in allen drei iAGP-Linien signifikant um 50% gegenüber dem Wildtyp verringert. Obwohl eine Reduzierung der Enzymaktivität von über 90% erfolgte, nahm der Stärkegehalt in den iAGP-Samen nur um die Hälfte ab. Die restlichen 10% Aktivität schienen ausreichend für die Stärkebildung zu sein. Daraus ergibt sich ein kleiner Kontrollkoeffizient von AGP auf den Stärkestoffwechsel. Offensichtlich scheint AGP in Leguminosen nur einen geringen Einfluss auf die Stärkebiosynthese zu haben. In *Vicia narbonensis* Samen und Erbsenembryonen der *rb* Mutante führte eine Inhibierung von AGP auch nur zu einem kleinen Kontrollkoeffizienten von unter 0.1 (Denyer *et al.*, 1995a; Rolletschek *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wurden in Blättern von *Arabidopsis* oder in anderen *sink*-Organen, wie Kartoffelknollen, höhere Kontrollkoeffizienten gefunden (Neuhaus and Stitt, 1990; Sweetlove *et al.*, 1999).

Weitere Analysen der Inhaltsstoffe reifer iAGP-Samen zeigten, dass der Gesamt-C-Anteil und der Gehalt an Saccharose deutlich erhöht waren. Zusätzlich akkumulierten die transgenen Samen mehr Gesamt-N und Speicherproteine. Nicht nur der Stärkegehalt, sondern auch die Stärkezusammensetzung, veränderte sich in den transgenen Samen. Der Anteil an Amylose war in den iAGP-Samen um 20-30% gegenüber dem Wildtyp verringert. Gleiche Veränderungen fand man in Erbsenembryonen mit Mutationen im *rb* Locus (Hylton and Smith, 1992). Eine mögliche Erklärung könnten die reduzierten ADP-Glucose Konzentrationen in den Plastiden sein (Martin and Smith, 1995; Van den Koornhuise, 1996). Die amylosesynthetisierende Stärke-Synthase GBSS hat eine niedrigere Affinität zu ADP-Glucose als die amylopektinsynthetisierende Isoform (SSS). Somit beeinflusst eine geringere Konzentration an ADP-Glucose die Amylose-Produktion wesentlich stärker als die von Amylopektin (Clarke *et al.*, 1999).

Neben den Hauptspeicherformen Stärke und Protein wurden auch die Lipidgehalte in den transgenen Samen analysiert. Bei reifen Erbsensamen macht der Lipidanteil 2-3% des Trockengewichtes aus, während schrumpelige Embryonen 4-5% enthalten können (Coxon and Davies, 1982). In den schrumpeligen iAGP-Samen erhöhte sich der relative Lipidanteil um über 40% gegenüber dem Wildtyp. Dabei wird der größte Anteil der Lipide als

Membranlipide gespeichert und weniger in anderen Formen, wie speziellen Ölspeichervakuolen (Bettey and Smith, 1990). Durch die erhöhte Akkumulation von löslichen Zuckern kommt es zum verstärkten Wassereintrag der Zellen und folglich zur veränderten Zellgröße. Die schrumpeligen Embryonen besitzen daher eine vergrößerte Zellmembran, wodurch vermehrt Membranlipide gebildet werden müssen. Des Weiteren waren die Gehalte an 3-Phosphoglycerat erhöht, welches über die Glycolyse zu Acetyl-CoA verstoffwechselt wird, dem Ausgangssubstrat für die Fettsäuresynthese. Zusätzlich wurde in den iAGP-3 Embryonen ein Gen induziert, welches für eine langkettige Fettsäure-CoA-Ligase (25 DAP) kodiert. Spezifische Veränderungen der Stoffwechselflüsse von der Stärkebildung hin zur Proteinbiosynthese wurden stellvertretend an der Linie iAGP-3 genauer untersucht.

4.3.1 iAGP-3 Samen haben höhere Proteingehalte aber verringerte Samengewichte

Pflanzen der Linie iAGP-3, die den stärksten Samenphänotyp ausprägten, wurden unter freilandähnlichen Bedingungen in einem Außengewächshaus angezogen und die Sameninhaltsstoffe von reifen und sich entwickelnden Embryonen analysiert. Wie schon unter Phytokammerbedingungen gezeigt, wurde in den iAGP-3 Embryonen im Vergleich zum Wildtyp 40-50% weniger Stärke synthetisiert und gespeichert. Die Inhibierung von AGP bewirkte eine verminderte Flussrate des Kohlenstoffs in Stärke und somit einen geringeren Stärkegehalt. Die reduzierte Speicherung des Kohlenstoffs in Form von Stärke führt folglich zur Akkumulation von löslichen Zuckern im Samen (Weber *et al.*, 2000). Dies wirkt sich auf den Gesamt-C-Gehalt der Samen aus. In reifen und sich entwickelnden iAGP-Embryonen waren die Gehalte an Gesamt-C und Saccharose signifikant während der Samenreifung erhöht. Wegen der reduzierten Stärkesynthese wird weniger Saccharose in Stärke umgewandelt, die dann im Samen akkumuliert (Stickland and Wilson, 1983). Die Aufnahmekapazität von Saccharose in den Embryo scheint dagegen unverändert zu sein (Rolletschek *et al.*, 2002), wobei von vornherein schon größere Mengen an Saccharose in den Samen aufgenommen, als dann metabolisiert, werden (Edwards and ap Rees, 1986; Weber *et al.*, 1998b).

Die reifen AGP-reprimierten Samen akkumulierten deutlich mehr Speicherproteine als der Wildtyp. Anders als bei den AAP1-Linien erhöhten sich die Gehalte beider Proteinfractionen, die Albumine und die Globuline. Weiterhin bewirkte die Inhibierung von AGP eine veränderte Zusammensetzung der Speicherglobuline. In den iAGP-3 Samen waren die mRNA-Gehalte von Vicilin ab dem 25. DAP um das Doppelte höher als im Wildtyp. Dagegen wurden für Legumin B stark reduzierte Transkriptmengen bestimmt. Dadurch hatten die iAGP-Embryonen ein reduziertes Legumin zu Vicilin Verhältnis. Die Expression der Speicherproteingene kann durch erhöhte Zuckergehalte oder durch veränderte osmotische Bedingungen beeinflusst werden (Giroux *et al.*, 1994). Besonders die Stabilität der Legumin-mRNA reagiert sehr sensitiv auf höhere Zuckerlevel (Turner *et al.*, 1990). Dagegen führen verringerte Zuckergehalte, wie in den transgenen PEPC-Pflanzen, eher zu hochregulierten Legumin- als Vicilin-Transkripten (Rolletschek *et al.*, 2004).

Der Stickstoffgehalt in den Samen ist ein guter Indikator für den Gesamtproteingehalt. In den AGP-reprimierten Samen wurde ein erhöhter Gesamt-N-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp

gemessen. Eine Erhöhung der N-Werte im Samen stimuliert die Syntheserate der Speicherproteine (Rolletschek *et al.*, 2005; Götz *et al.*, 2007), was wiederum die erhöhten Proteingehalte im Samen erklärt. Die stimulierte Produktion des energetisch aufwendigeren Speicherproteins (Vertregt and Devries, 1987) führt zu einem erhöhten N-Gehalt und somit gesteigertem N:C Verhältnis im Samen. Dieser Mehrbedarf an Stickstoff und Kohlenstoff für die Proteinbiosynthese kann durch eine Reduktion des Stärkegehaltes und zusätzlich des Samengewichts ausgeglichen werden. Die negative Korrelation von Proteinerhöhung zu Lasten des Ertrages zeigte sich bei den iAGP-Samen durch ein verringertes Samengewicht. Zusätzlich bewirkte die Akkumulation von löslichen Substanzen, wie Zucker, ein verändertes osmotisches Potential und führte zur verstärkten Wasseraufnahme in die Samen. Die iAGP-Kotyledonen hatten signifikant höhere Samenfrischgewichte während der mittleren bis späten Samenreifung basierend auf dem erhöhten Wassergehalt, wobei die Samentrockengewichte verringert waren. Dies erklärt auch den schrumpfligen Samenphänotyp, der nach dem Wasserverlust während der Austrocknungsphase entsteht. Anders als bei *V. narbonensis* Samen mit *antisense* iAGP-Konstrukt war die Dauer der Samenfüllung unverändert (Weber *et al.*, 2000). Weiterhin zeigte sich kein Unterschied in der Samenanzahl pro Pflanze.

4.3.2 Veränderte Aminosäurezusammensetzung in den iAGP-Embryonen

Die stimulierte Proteinbiosynthese spiegelt sich bei den AGP-reprimierten Embryonen nicht in einer gesteigerten Zufuhr oder Synthese von Aminosäuren wieder. Der Gesamtanteil an freien Aminosäuren war sowohl in den transgenen Samen als auch im Wildtyp während der frühen Samenreifung (15 DAP) am höchsten und sank dann im weiteren Entwicklungsverlauf drastisch ab, aber gegenüber der Kontrolle waren die gemessenen Gehalte unverändert. Dagegen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der iAGP-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp. Fast alle Aminosäuren hatten den höchsten Wert während der frühen Samenentwicklung am 15. DAP sowie Arginin am 20. DAP.

Eine Erhöhung des Gehaltes gegenüber dem Wildtyp wurde für die Aminosäuren Glutaminsäure, Valin, Glycin, Serin und Tyrosin gemessen. Weiterhin waren die Werte von Prolin und GABA zwischen dem 15. und 20. DAP deutlich erhöht, welche in Verbindung mit osmotisch bedingten Stressantworten gebracht werden (Verbruggen and Hermans, 2008). Eine veränderte Aminosäurezusammensetzung zeigte sich auch in verringerten Werten von Asparaginsäure und Citrullin. Des Weiteren waren die Gehalte der Aminosäuren Glutamin und Asparagin, die sonst bevorzugt in die Kotyledonen transportiert und als Stickstoffquelle verwendet werden (Mifflin and Lea, 1977), in den iAGP-Samen reduziert. Dies könnte auf einen stimulierten Stoffwechsel in den *sink*-Organen und somit auf eine gesteigerte Mobilisierung hindeuten. Anders als in den AAP1-Erbisenembryonen, wo Asparagin als Stickstoffspeicher diente und unter N-Überfluss oder C-Limitierung akkumulierte, erfolgte in den iAGP-Samen eine gesteigerte Verwertung der Aminosäure. Weiterhin ist auffällig, dass der Gehalt an Arginin, welches in Leguminosen akkumuliert wird (Micallef and Shelp, 1989a; 1989b; Slocum, 2005), während der frühen Samenreifung erniedrigt war.

Die verringerten Gehalte der Aminosäuren Glutamin, Asparagin und Arginin in den iAGP-Embryonen deuten auf einen Abbau dieser Aminosäuren und folglich die Bereitstellung des

gespeicherten Stickstoffs für die Synthese weiterer benötigter Aminosäuren hin. Denn die stimulierte Proteinbiosynthese in den iAGP-Samen führt zu einem gesteigerten N-Bedarf, der über die Des- oder Transaminierung bestimmter Aminosäuren gedeckt und ausgeglichen werden kann.

4.3.3 Veränderte osmotische Verhältnisse in den iAGP-Embryonen beeinflussen die Zellmorphologie

Die Inhibierung von AGP führt bei reifen trockenen Samen zum schrumpeligen Samenphänotyp (Weber *et al.*, 2000; Rolletschek *et al.*, 2002). Die Samen der homozygoten Linien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 hatten alle drei diesen typischen Phänotyp. Durch die gestörte Stärkebiosynthese akkumulieren diese Samen vermehrt lösliche Zucker in den Kotyledonen. Dadurch verändern sich die osmotischen Verhältnisse, es kommt zur vermehrten Wasseraufnahme und zur Vergrößerung der Zellen. Der komplette Same vergrößert sein Volumen und Gewicht. Mit Ende der Samenreifung, bevor der Same in die Dormanz übergeht, verliert er immer mehr Wasser bis zum maximalen Austrocknungsgrad, wodurch die vergrößerte Oberfläche der Samenschale zusammenschrumpelt.

Mittels Lichtmikroskopie wurden Kotyledonen der iAGP-3 Linie und vom Wildtyp verschiedener Entwicklungsstadien hinsichtlich veränderter Zellstrukturen des Samens untersucht. Ultradünnschnitte wurden jeweils zum Nachweis der Proteinvakuolen mit Fuchsin/Kristallviolett und zum Stärkenachweis mit Jod-Kalium-Jodid gefärbt. Während des Entwicklungsverlaufs verdeutlichte sich, dass die Zellen der iAGP-3 Kotyledonen weniger, kleinere und hellbräunlich gefärbte Stärkekörner enthielten. Dies lässt auf eine reduzierte Stärkeeinlagerung basierend auf einer verringerten Stärkesynthese schließen. Die Inhibierung von AGP in *V. narbonensis* Embryonen und im Mais Endosperm führte zu einer reduzierten Anzahl und Größe der Stärkekörner (Weber *et al.*, 2000; Cossegal *et al.*, 2008).

Weiterhin zeigte die unterschiedliche Färbung der Stärkekörner von dunkelviolett im Wildtyp und hellbraun in den Transgenen, dass sich die Stärkezusammensetzung veränderte. Die Stärke der iAGP-3 Kotyledonen enthielt weniger Amylose zu Gunsten des Amylopektins. Das Jod der zum Stärkenachweis verwendeten Jod-Kaliumjodid-Lösung lagert sich ins Innere der spiralförmigen Amylose und produziert dort eine starke Indigo-Färbung. Stärkekörner von Mutanten mit einem geringen Amylosegehalt verfärbten sich nur schwach oder mit rot-bräunlicher Färbung (Denyer *et al.*, 1995b).

Anhand der Färbung zum Proteinnachweis war zu sehen, dass die Zellen der iAGP-3 Embryonen größere und weniger dicht gefüllte Proteinvakuolen enthielten. Des Weiteren zeigte sich zu Anfang der untersuchten Entwicklungsstadien eine verzögerte Bildung der Proteinvakuolen. Dies lässt auf eine verzögerte Zelldifferenzierung und Entwicklung schließen. Die hellere Färbung der transgenen Proteinvakuolen könnte auf eine veränderte Proteinzusammensetzung zurückzuführen sein.

Bei den untersuchten Entwicklungsstadien der iAGP-3 Kotyledonen wurde optisch kein Unterschied in der Zellgröße festgestellt. Sich entwickelnde transgene Samen waren aber wesentlich schwerer, größer und akkumulierten mehr Wasser. Somit müssten auf zellulärer

Ebene Veränderungen zur Anpassung stattgefunden haben. Entweder bildete sich der Phänotyp erst nach den untersuchten Stadien aus oder es veränderte sich anstatt der Zellgröße die Zellanzahl, um so das zusätzliche Wasser zu speichern. Eine genaue Aussage kann jedoch nicht gemacht werden, da keine ausgedehnte quantitative Messung der Zellgröße bzw. Zellanzahl erfolgte.

4.4 Charakterisierung der komplexen Samenphänotypen mittels transkriptioneller und metabolischer Analysemethoden

Die gezielten Eingriffe in den Samenstoffwechsel mit Hilfe transgener Modelle führten zu drastischen Veränderungen in den Gehalten und der Zusammensetzung der Reservestoffe. Obwohl die gewählten Ansätze in unterschiedliche Prozesse eingreifen, scheinen beide Modifikationen den gleichen Effekt auf die Proteinbiosynthese, besonders mit verstärkter Akkumulation von Speicherproteinen, zu haben. Da stellt sich die Frage, welche Stoffwechselprozesse und Regulationsmechanismen haben sich jeweils in den transgenen Samen verändert, um so eine Anpassung an die vermehrte Proteinbiosynthese zu bewirken. Mittels Kombination aus transkriptionellen und metabolischen Analysemethoden sollten wesentliche Aspekte des veränderten N- und C-Haushalts und daraus resultierende Einflüsse sowie Interaktionen zu anderen Stoffwechselwegen geklärt werden.

Die Expression spezifischer Gene während der Samenentwicklung wurde anhand der cDNA-Microarray Technik analysiert. Der *Ps6kOLI* Microarray besteht aus über 5200 verschiedenen Oligonucleotiden, hauptsächlich aus Samenschale und Kotelydonen von *Pisum sativum* ESTs (>90%; Radchuk *et al.*, 2006). Die Anzahl der differenziell exprimierten Gene stieg vom frühen (18, 20 DAP) bis zum mittleren (22, 25, 36 DAP) Entwicklungsstadium an und fiel dann zur späteren Samenreife (30, 35 DAP) wieder ab. Dieser Kurvenverlauf stimmt mit dem zeitlichen Aktivitätsprofil des verwendeten LeB4-Promotors überein (Bäumlein *et al.*, 1992; Pickardt *et al.*, 1998). Mit vermehrter Expression des jeweiligen Transgens nimmt der Einfluss auf die Expression spezifischer Gene der Samenentwicklung zu.

Bezogen auf die Gesamtheit von 5200 gespotteten ESTs pro Microarray wurde der prozentuale Anteil der hoch- und herunterregulierten Gene je Stadium berechnet. Letztlich scheint mit dem höchsten Wert von 5% für die AAP1-Samen und 7,5% für die iAGP-Embryonen nur ein geringer Anteil differenziell exprimierter Gene mittels Expressionsanalyse erfasst zu sein. Dafür konnte aber für über 50% der bestimmten Sequenzen eine Proteinfunktion annotiert und somit abgesichert eine Funktion im Stoffwechsel beschrieben werden, was letztlich doch einen repräsentativen Ausschnitt der möglichen Veränderungen auf Transkriptionsebene darstellt.

Weiterhin ist erkennbar, dass in beiden transgenen Linien zwei- bis dreimal so viele Gene induziert als reprimiert wurden, wobei in den untersuchten iAGP-Samen mehr Sequenzen differenziell exprimiert wurden als in den AAP1-Embryonen. Neben den Funktionsgruppen Transkription/Translation, Stoffwechsel und Signalweiterleitung wurden in den iAGP-Samen

zusätzlich noch Gene differenziell exprimiert, deren Proteine an Zellproliferation, Stress- und Erregerabwehr, Photosynthese und Proteinumwandlung beteiligt sind.

Die Bestimmung verschiedener Stoffwechselprodukte der Glycolyse, TCA-Zyklus sowie von Aminosäuren und Zuckern erfolgte mit Hilfe der GC-MS Technik. Die metabolischen Veränderungen der AAP1-Samen zeigten sich fast nur als signifikante Erhöhung der Aminosäuren und Metabolite des TCA-Zyklus. Wogegen sich in den iAGP-Samen neben der Zusammensetzung an freien Aminosäuren auch die Stoffwechselprodukte der Glycolyse und dem TCA-Zyklus sowie einige Zucker und deren phosphorylierte Zwischenprodukte veränderten.

Ausgewählte Daten der Transkript- und Metabolitanalyse, die den Aminosäure- und Kohlenhydratstoffwechsel betreffen, wurden in den Schemata Eine Auswahl der differenziell regulierten Gene in den transgenen AAP1- bzw. iAGP-Samen, die Einfluss auf Glycolyse, TCA-Zyklus, Aminosäure- und Stärkestoffwechsel haben, wurde in Kombination mit den veränderten Metaboliten in den Schemata Abb. A.4 und Eine Auswahl der differenziell regulierten Gene in den transgenen AAP1- bzw. iAGP-Samen, die Einfluss auf Glycolyse, TCA-Zyklus, Aminosäure- und Stärkestoffwechsel haben, wurde in Kombination mit den veränderten Metaboliten in den Schemata Abb. A.4.5 zusammengestellt. In beiden transgenen Ansätzen sind auf Genexpressionsebene eine gesteigerte Speicherproteinbiosynthese aber auch deutliche Unterschiede in verschiedenen regulierten Stoffwechselprozessen erkennbar. Im Folgenden werden die Daten der Expressions- und Metabolitanalyse für jeden transgenen Ansatz ausführlich diskutiert. Zur Vereinfachung werden die differenziell regulierten Gene jeweils als ihre annotierten Proteine bezeichnet und diese als induziert oder verringert exprimiert dargestellt. Als Beispiel würde das induzierte Gen, welches für eine Asparaginase kodiert, als induzierte Asparaginase bezeichnet.

4.5 Transkript- und Metabolitdaten der AAP1-Embryonen

4.5.1 Die ektopische Expression von *VfAAP1* verstärkt die Stickstoffaufnahme im Samen und stimuliert den Aminosäurestoffwechsel

Anhand der Expressionsdaten wurden verschiedene Gene identifiziert, die für Enzyme des Aminosäurestoffwechsels kodieren, hauptsächlich der Synthese von Aminosäuren, wie Asparagin, Threonin, Methionin, Glutamin und Arginin. Insgesamt wurden in den AAP1-Samen deutlich höhere Gehalte an freien Aminosäuren gegenüber dem Wildtyp gemessen, vor allem während der frühen Samenreifung (15, 18 DAP). Der Gehalt an Asparagin, das bevorzugt als Zwischenspeicher und Stickstoffquelle in die Kotyledonen aufgenommen wird (Mifflin and Lea, 1977), war signifikant am 18, 26. und 30. DAP gegenüber dem Wildtyp erhöht. Unter Bedingungen, wie Kohlenstofflimitierung, und stressbedingten Situationen, wie Seneszenz, wird Asparagin verstärkt akkumuliert (Baldet *et al.*, 2002; Devaux *et al.*, 2003). In den AAP1-Samen wurden verringerte Gehalte an Gesamt-C, Saccharose und Stärke bestimmt, was auf eine Limitierung von Kohlenstoff hindeutet. Die Synthese von Asparagin aus Asparaginsäure und Glutamin unter ATP-Verbrauch wird von der Asparagin-Synthase ASN1 katalysiert (induziert am 22, 26, 30 DAP). Besonders unter Stickstoffüberfluss und

Zuckermangel wird ASN1 hochreguliert (Brouquisse *et al.*, 1992; Chevalier *et al.*, 1996), um so den zusätzlichen Stickstoff in Zwischenspeichern zu lagern.

In den iAGP-Embryonen mit vermehrter Zuckerakkumulation war die Expression der Asparagin-Synthase unverändert, wogegen in diesen Samen die Asparaginase, welche die Spaltung von Asparagin zu Asparaginsäure katalysiert, verstärkt exprimiert wurde (20, 25, 30, 35 DAP). Eine Veränderung der Asparaginase wurde in den AAP1-Samen nicht gefunden, dafür aber erhöhte Konzentrationen an Asparaginsäure am 18, 22. und 30. DAP. Die Synthese von Asparaginsäure kann auch aus Oxalacetat, katalysiert durch die Aspartat-Aminotransferase (hochreguliert am 18. DAP), erfolgen. Eine zusätzliche Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten in Form von Oxalacetat für den TCA-Zyklus durch die anaplerotische Reaktion der PEP-Carboxylase, die auf ein erhöhtes N-Angebot reagiert, erhöht die Aminosäurebildung von Glutamat und Aspartat (Rontein *et al.*, 2002). In *V. narbonensis* Samen, die die PEP-Carboxylase überexprimierten, kam es zur Anreicherung von organischen Säuren und zur erhöhten Proteinsynthese, wogegen die Gehalte an Saccharose und Stärke verringert waren (Rolletschek *et al.*, 2004; Radchuk *et al.*, 2007).

Durch die vermehrte Asparaginsynthese scheint die Bildung weiterer Aminosäuren, die Asparagin als Ausgangssubstrat verwenden, angeregt worden zu sein. Dies zeigte sich an den erhöhten Gehalten von Threonin, Isoleucin, Methionin, Leucin und Valin. Lysin wurde nicht verändert, was möglicherweise auf einer *feedback* Reaktion von Lysin, durch Inhibierung der entsprechenden Synthase, beruht (Azevedo *et al.*, 1997). An der Bildung von Threonin aus Homoserin ist die Threonin-Synthase beteiligt, dessen kodierendes Gen in den transgenen Samen hochreguliert wurde (22 DAP). Die Akkumulation von Threonin könnte auch durch Minimierung des Threoninabbaus bewirkt worden sein. Während der frühen Samenreifung erfolgte nämlich eine verringerte Expression der Threonin-Aldolase (18, 22 DAP), die Threonin zu Acetaldehyd sowie zu Glycin abbaut. Gleichzeitig war eine aktivierte Synthese von Methionin durch die hochregulierte Methionin-Synthase (22 DAP) sowie von Glutamin durch die induzierte Glutamin-Synthetase GS1 (26, 30 DAP) zu erkennen. Glutamin mit dem erhöhten N:C Verhältnis dient als Speicherpool und N-Quelle für weitere Verbindungen. Das Enzym GS1 überträgt unter ATP-Verbrauch Ammonium auf Glutamat zur Entstehung von Glutamin. Allerdings wurde GS1 am 22. DAP herunterreguliert, was auch mit höheren Werten besonders an diesem Zeitpunkt an Glutamat sowie den Folgeprodukten Ornithin, Citrullin und Arginin einhergeht.

Somit scheint während der frühen Samenreifung die Glutaminsynthese zu Gunsten von Arginin reduziert zu sein. Die Aminosäure Arginin dient als weiterer Stickstoffspeicher, die fast 40% des Gesamt-N in den Speicherproteinen ausmacht und auch zum größten Anteil als freie Aminosäure in Leguminosen akkumuliert wird (Micallef and Shelp, 1989a; 1989b; Slocum, 2005). Der Gehalt an Arginin war in den AAP1-Samen während der frühen und mittleren Samenreifung deutlich erhöht (18, 22, 26 DAP). Die Erhöhung der Stickstoffgehalte stimulierte den Aminosäurestoffwechsel und weiterhin die Speicherproteinbiosynthese. Vorrangig erfolgte die Synthese und Akkumulation der Aminosäuren Asparagin und Arginin als Stickstoffzwischenspeicher.

4.5.2 *VfAAP1*-Überexpression bewirkt Aminosäureabbau unter Beteiligung mitochondrialer Aktivitäten

Die Überexpression der Aminosäurepermease *VfAAP1* führte nicht nur zu einer stimulierten Biosynthese von Aminosäuren, interessanterweise wurden verstärkte Expressionen verschiedener Gene gefunden, die für mitochondriale Enzyme des Aminosäurekatabolismus kodieren. Die Mitochondrien gelten als Kraftwerk der Zelle, da sie verwertbare Energie über Abbauprozesse, wie dem Zitronensäurezyklus, dem oxidativen Fettsäureabbau sowie der Atmungskette der inneren Mitochondrienmembran, produzieren.

In den *AAP1*-Samen wurde die Aminomethyltransferase (22 DAP) verstärkt exprimiert, welche den Abbau von Glycin in den Mitochondrien katalysiert (Li *et al.*, 2003). Die Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase (induziert am 26. DAP) spaltet unter Beteiligung des Kofaktors FAD die Aminosäuren Valin und Leucin (Daschner *et al.*, 2001).

Zum gleichen Entwicklungszeitpunkt wurden Gene induziert, deren Proteine funktionell Bestandteil des Enzymkomplexes der Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran sind. Die Enzyme Flavoprotein:Ubiquinon-Oxidoreduktase Komplex 1 (ETFQO) und zwei Ubiquinol-Cytochrom-C-Reduktasen Komplex 3 (UQCytC) sind Teil der Atmungskette und somit am Elektronentransport und der Energiegewinnung beteiligt. Dabei entsteht das Koenzym FAD als Elektronencarrier bei Reaktionen, wie der dehydrierten Decarboxylierung der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Leucin (Sweetlove *et al.*, 2007).

In den *AAP1*-Samen scheint auch der Stoffwechsel von Methionin angeregt worden zu sein. Durch die erhöhten Gehalte der Aminosäure (18. DAP) und der hochregulierten Methionin-Synthase (22 DAP) könnte man auf eine stimulierte Methionin-Synthase schließen. Doch zu späteren Entwicklungsstadien wurden noch weitere Enzyme des Methionin-Stoffwechsels, wie die SAM-Synthase (30 DAP) und die SAM-Decarboxylase (26 DAP), verstärkt exprimiert, welche an Abbauprozessen von Methionin beteiligt sind. Die SAM-Synthase wandelt unter ATP-Verbrauch das Methionin in die stoffwechselaktive Form S-Adenosylmethionin (SAM) um, welche dann die Methylgruppen für Methylierungsreaktionen, z.B. von Nucleinsäuren und Proteinen, bereitstellen kann. Die SAM-Decarboxylase ist an der Biosynthese wichtiger Polyamine, wie Spermidin und Spermin, beteiligt. Dies deutet nicht auf eine Akkumulation von Methionin, sondern auf eine Umwandlung zu SAM und dann weiter zu Polyaminen. Die Messungen der Metabolite zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Spermidinkonzentration in den *AAP1*-Samen gegenüber dem Wildtyp. Dies könnte an einem aktivierten Stoffwechsel und somit der schnellen Verwertung und Umwandlung der Polyamine liegen. Denn in den transgenen Samen wurde vermehrt das Reaktionsprodukt β -Alanin (18, 22, 30, 35 DAP) akkumuliert, welches als biogenes Amin der Asparaginsäure aus Polyaminen synthetisiert wird. In Stängeln von Maispflanzen ging die Akkumulation von β -Alanin mit dem verstärkten Abbau von Polyaminen einher (Terano and Suzuki, 1978; Cona *et al.*, 2006).

Weiterhin wurde auch der Arginin-Katabolismus angeregt. Die hochregulierte Arginin-Decarboxylase (22 DAP) katalysiert über mehrere Reaktionsschritte die Verstoffwechslung von Arginin zu Putrescin. Für Putrescin wurden am 18. und 22. DAP erhöhte Werte in den

AAP1-Samen gemessen. In weiteren Reaktionen könnte dann die Umwandlung von Putrescin über die Polyamine Spermidin und Spermin zu β -Alanin (erhöht am 18, 22, 30, 35. DAP) erfolgen. Ein alternativer Weg wäre die Verstoffwechslung von Putrescin durch die Diaminoxidase zu GABA, dessen Werte am 18. und 22. DAP deutlich erhöht waren. Die nicht proteinogene Aminosäure GABA könnte aber auch direkt über die Decarboxylierung von Glutaminsäure im Zytosol gebildet worden sein (Fait *et al.*, 2008). Über noch unbekannte Transporter erfolgte dann der Transport in die Mitochondrien und die weitere Umwandlung zu Succinat.

Der so genannte GABA-Shunt beinhaltet drei wesentliche Reaktionen, katalysiert durch die Glutamat-Decarboxylase, die GABA-Transaminase und die Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase. Die letzten beiden waren in den AAP1-Samen am 26. DAP deutlich erhöht. Mittels der Succinat-Dehydrogenase (induziert am 26. DAP) erfolgte dann die Umwandlung zu Fumarat. Durch den GABA-Shunt wird der direkte Stoffwechselweg von 2-Oxoglutarat zu Succinat umgangen. Über die Bildung von Glutamat zu GABA erfolgt dann die Einschleusung in die Mitochondrien, die weitere Verwertung über den TCA und zusätzliche Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten. Somit ist der GABA-Shunt wesentlich am Stickstoffmetabolismus und am Ausgleich des N:C Verhältnisses beteiligt (Bouché and Fromm, 2004). Die stimulierte Aktivität des TCA ist auch anhand der hochregulierten Enzyme Pyruvat-Dehydrogenase E1 und E2 (26. DAP) deutlich zu sehen. Weiterhin waren die Gehalte der TCA-Stoffwechselprodukte Citrat und Isocitrat am 22. DAP erhöht.

4.5.3 Limitierung an Kohlenstoff in den AAP1-Samen beeinflusst den Kohlenhydratstoffwechsel

Offensichtlich führt die stimulierte Proteinbiosynthese zur Kohlenstofflimitierung in den AAP1-Samen. Dadurch kommt es vermehrt zur Saccharosespaltung mit weiterer Verstoffwechslung der Kohlenhydrate in Glycolyse und TCA, um so das gestörte Gleichgewicht von N und C wiederherzustellen. In den transgenen Samen wurden für verschiedene Gene verstärkte Transkriptmengen gefunden, die in Verbindung mit Saccharosespaltung, Glycolyse und TCA-Stoffwechsel stehen. Davon kodieren fünf Gene für Saccharose-Synthasen und eins für die neutrale Invertase, welche aber während der frühen Samenreifung (22 DAP) verringert exprimiert wurde. Dies deutet auf eine alleinige Funktion der Saccharose-Synthase bei der Zuckerspaltung hin. Im Zytoplasma der Zellen wird Saccharose entweder hydrolytisch durch Invertasen zu Glucose und Fructose oder durch Saccharose-Synthasen (Susy) zu UDP-Glucose und Fructose gespalten, wobei Saccharose-Synthasen den größeren Anteil im Saccharosestoffwechsel haben (Edwards and ap Rees, 1986). In Leguminosensamen hat dieses Enzym eine wichtige Funktion bei der Remobilisierung von Kohlenstoff (Heim *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1996). Die gemessenen Enzymaktivitäten unterstützen die Transkriptdaten, denn in den AAP1-Samen war der Gehalt an Susy signifikant erhöht (26 DAP).

Durch die gesteigerte Susy-Aktivität wurde vermehrt Saccharose zu UDP-Glucose gespalten, welches als Substrat für die Synthese von Zellwandpolysacchariden dient (Brett, 2000). Anhand der Expressionsdaten wurden auch verschiedene Gene identifiziert, deren

Proteine im Zusammenhang mit dem Zellwandstoffwechsel stehen. Somit scheint es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Mehrbedarf an C, dem Abbau von Saccharose und der Zuckerverwertung während der Glycolyse sowie der gleichzeitigen Stimulierung von saccharoseabhängigen Prozessen, wie der Zellwandbiosynthese, zu geben.

Zusätzlich wurden während der frühen Samenreifung (22 DAP) verschiedene Enzyme der Glycolyse stimuliert. Die hochregulierte Triosephosphat-Isomerase katalysiert die Umwandlung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat, dessen Gehalt in den transgenen Samen erhöht war (26, 30 DAP). Mit Hilfe der Enzyme GAPDH, Phosphoglyceratkinase, Enolase sowie Phosphoglyceratmutase (induziert am 22. DAP, letztere am 30. DAP) erfolgte dann die weitere Verstoffwechslung zu Phosphoenolpyruvat.

Weiterhin ist die Remobilisierung von Kohlenstoff anhand stärker exprimierter Gene zu sehen, deren Proteine am Stärkeabbau (plastidäre Phosphorylase, 22 DAP) und am Zuckertransport (Hexose-Transporter, 22 DAP) beteiligt sind. Dadurch werden gespeicherte Kohlenstoffreserven in Form von Stärke wieder freigesetzt und über entsprechende Transporter weitergeleitet (Heldt *et al.*, 1991; Okita, 1992). Zusätzlich waren die Gehalte an Saccharose und Stärke in den AAP1-Samen reduziert, was die Vermutung des Saccharose- und Stärkeabbaus sowie der C-Mobilisierung bestätigt.

4.5.4 Die vermehrte Stickstoffaufnahme in die AAP1-Samen beeinflusst die Synthese von Speicherproteinen

Die Akkumulation von Speicherproteinen in Leguminosensamen hängt wesentlich von der Aufnahme und Verfügbarkeit von Stickstoff ab (Lhuillier-Soundele *et al.*, 1999a; Golombek *et al.*, 2001; Salon *et al.*, 2001). Der verstärkte Aminosäureeintrag in die AAP1-Kotyledonen sowie die Erhöhung der N-Gehalte beeinflusste den Aminosäure- und Kohlenhydratstoffwechsel und führte zur vermehrten Synthese von Speicherproteinen. Diese stimulierte Proteinsynthese ist einerseits durch die gemessene Erhöhung der Albumin- und Globulinfraktionen aber auch deutlich auf Transkriptebene erkennbar. So wurden Gene verstärkt exprimiert, deren Proteine an Prozessen der Proteinbiosynthese, des Proteintransportes und der Prozessierung sowie der Samenreifung beteiligt sind (Tab. A.1). Weiterhin wurden vorrangig Gene induziert, kodierend für 7S Viciline und 11S Legumine, die zwei Hauptklassen der Globuline. Die Expression von Speicherproteingenen kann durch die Nährstoffzufuhr beeinflusst werden. In *V. faba* Samen wurden durch die Zugabe der Aminosäure Glutamin *in vitro* verstärkt mRNA-Gehalte von Vicilin und Legumin akkumuliert (Weber *et al.*, 1998a; Miranda *et al.*, 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Hordein-Promotors von Gerste durch Stickstoffassimilate erfolgte (Müller and Knudsen, 1993). So scheint die verstärkte Zufuhr bestimmter Aminosäuren in den AAP1-Samen vorrangig die Expression von Genen der Globulinfraktion zu stimulieren, als die der Albumine. Die Expression der überwiegend hochregulierten Vicilin-Gene könnte durch das Hormon ABA beeinflusst worden sein. Eine Reprimierung der SnRK1-Kinaseaktivität führte zu verringerten ABA-Gehalten sowie reduzierten Globulingehalten, wobei vorrangig die Expression von Vicilinen, als die der Legumine, beeinflusst wurde (Radchuk *et al.*, 2006).

Weiterhin wurden in den AAP1-Samen zu späteren Stadien verstärkt hydrophile LEA-Proteine exprimiert, die eine wichtige Rolle, als so genannte Osmoprotektanten, beim Austrocknungsschutz spielen (Delseny *et al.*, 2001). LEA-Proteine können Ionen oder Metabolite während der Austrocknungsphase binden und so die osmotische Stresstoleranz erhöhen (Xu *et al.*, 1996). Sechs Sequenzen für Chaperone und Chaperonine waren in den transgenen Embryonen hochreguliert. Chaperone verhelfen neusynthetisierten Proteinen zur korrekten Faltung und regulieren weiterhin die Proteinkonformation beim Transport durch Membranen (Buchner, 2002).

Zusätzlich wurden durch die erhöhten Werte an Aminosäuren Gene induziert, deren Proteine in Transportprozesse involviert sind. Die Translokasen TIM17/22, TIM50 und OEP16 gehören zur Familie der PRAT-Proteine und sind funktionell am mitochondrialen und plastidären Aminosäure- und Präproteintransport beteiligt (Kurz *et al.*, 1999; Lister *et al.*, 2007). Während TIM17/22 und TIM50 in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, erfolgt der Aminosäuretransport durch OEP16 über die äußere Hüllmembran der Chloroplasten. Daraus ergibt sich eine mögliche Funktion von OEP16 an der Aminosäuresynthese in den AAP1-Plastiden sowie der Translokasen TIM17/22 und TIM50 am verstärkten Aminosäureimport in die Mitochondrien mit Abbauprozessen.

Interessanterweise wurden auch zwei Aminosäurepermeasen AAP am 30. DAP verringert exprimiert. Wahrscheinlich beruht dies auf einer negativen *feedback* Reaktion, um dadurch einen Überschuss an Aminosäuren auszugleichen. Denn in *V. faba* Samen bewirkte die erhöhte Zugabe von Glutamin eine Inhibierung von VfAAP1 (Miranda *et al.*, 2001).

4.5.5 Hormonelles Signalnetzwerk ist an Prozessen der Speicherstoffsynthese in den AAP1-Samen beteiligt

Die stimulierte Synthese der Speicherproteine verursacht einen erhöhten Bedarf an Stickstoff, der in vegetativen Organen während der frühen bis mittleren Samenentwicklung gespeichert und zu späteren Stadien durch Remobilisierung verfügbar gemacht wird. Dieser Bedarf kann entweder über gesteigerte Verteilungsprozesse in der Pflanze oder über die vermehrte Aufnahme durch die Wurzel gedeckt werden, was wiederum eine Signalweiterleitung des Stickstoffbedarfs innerhalb der gesamten Pflanze voraussetzt (Crawford and Glass, 1998; Gansel *et al.*, 2001). An Arabidopsis-Pflanzen wurde gezeigt, dass der Stickstoffgehalt der gesamten Pflanze die Aufnahme von mineralischem Stickstoff über ein Langstreckensignalnetzwerk kontrollieren kann (Tillard *et al.*, 1998; Lejay *et al.*, 1999). Stickstoffkomponenten, wie Nitrat, agieren dabei als Signalstoff und können Stoffwechselprozesse, wie die Speicherproteinbiosynthese und Entwicklung, stimulieren (Sreedhar and Bewley, 1998; Stitt, 1999; Scheible *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005).

Zusätzlich führen erhöhte Gehalte des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) während der mittleren Embryogenese zur verstärkten Akkumulation von Speicherstoffen (Wobus and Weber, 1999a; Rook *et al.*, 2001; Finkelstein *et al.*, 2002). In den AAP1-Samen waren die ABA-Gehalte signifikant erhöht. Auch auf Transkriptebene ist eine stimulierte ABA-Synthese durch die induzierten Gene, die für ABA-2 und NCDE-9 kodieren (jeweils 26 DAP),

erkennbar. Dies geht mit erhöhten Transkriptmengen von Genen einher, deren Proteine an der Samenreifung und Speicherung beteiligt sind. ABA ist ein wichtiger Regulator der Samenreifung und wird selbst durch Nährstoffe, wie Zucker, beeinflusst (Wobus and Weber, 1999b; 2005). Im Zuckerstoffwechsel und bei der Mobilisierung scheint ABA eine regulatorische Funktion zu haben (Gibson, 2004). Dabei interagiert das Phytohormon mit der Proteinkinase SnRK1. Eine Reduzierung der SnRK1-Aktivität in Erbsensamen verringerte die ABA-Gehalte und erhöhte die Werte an Saccharose (Radchuk *et al.*, 2006). Zusätzlich wurden in diesen Samen Veränderungen im Saccharosestoffwechsel mit einer verminderten Umwandlung von Saccharose in Speicherstoffe gefunden. Dagegen erfolgte in den AAP1-Samen eine verstärkte Synthese von ABA sowie von Speicherproteinen, was zur Verknappung an Kohlenstoffgerüsten, folglich zur Aktivierung des Kohlenhydratstoffwechsels und zur Zuckermobilisierung mit reduzierten Saccharose- und Stärkegehalten führte.

Neben ABA sind auch Cytokinine an der Regulation des Zuckerstoffwechsels und Transports beteiligt. Ihnen wird eine entscheidende Rolle bei *sink/source* Interaktionen zugeteilt (Roitsch and Ehneß, 2000). Sie induzieren die Expression zellwandgebundener Invertasen und Hexosetransportern, wodurch der Zuckertransport beeinflusst wird (Ehneß and Roitsch, 1997). Weiterhin regulieren sie in enger Wechselwirkung mit anderen Phytohormonen, wie ABA, vielfältige pflanzliche Wachstums- und Differenzierungsprozesse. Charakteristisch sind die Stimulierung der Cytokinese (Zellteilung) in Kallusgeweben und die Förderung des Streckungswachstums der Pflanze. Zusammen mit Saccharose induzieren Cytokinine die Expression von Cyclinen, die an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt sind und die Funktion cyclinabhängiger Kinasen (CdKs) aktivieren (Pines, 1995). In den AAP14/10-Embryonen war die Aktivität der Cytokinine reduziert. Dies zeigte sich in verringerten Gehalten der Gesamt-Cytokinine und der aktiven Isoformen. Zusammen mit den reduzierten Gehalten an Saccharose scheint in den AAP1-Samen die Zellproliferation gehemmt zu sein, was sich unter anderem auch im reduzierten Samengewicht äußerte. Zusätzlich wurden Gene verringert exprimiert, kodierend für Cyclin D und die Proteinkinase MAD2, die an der Ausbildung des Spindelapparates und an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Chen *et al.*, 1996). Weiterhin wurde die Expression eines Annexins reduziert, welches als membrangebundenes Protein in Verbindung mit der Cytokinese gebracht wird (Tomas *et al.*, 2004).

Dagegen zeigte sich in *V. narbonensis* Samen mit Überexpression von *VfAAP1* und erhöhten Gehalten an N und Speicherproteinen ein anderes Bild (Götz *et al.*, 2007). Dort ergaben Messungen der Cytokiningehalte eine 10-fache Steigerung gegenüber dem Wildtyp. Die Cytokininsynthese kann durch erhöhte Stickstoffgehalte stimuliert werden (Simpson *et al.*, 1982) und führt dann zu gesteigerten Wachstumsprozessen. Die Kohlenstofflimitierung in den AAP1-Embryonen scheint einen größeren Einfluss auf die Samenentwicklung als die Stickstoffverfügbarkeit der gesamten Pflanze zu haben und führt somit zur Hemmung von Wachstumsprozessen.

4.6 Transkript- und Metabolitdaten der iAGP-Samen

4.6.1 AGP-Inhibierung stimuliert den Stoffwechsel sowie die Mobilisierung von Kohlenhydraten

Die Inhibierung des Enzyms AGP bewirkte eine Hemmung der Stärkesynthese und folglich eine Reduzierung der Stärkegehalte im Samen. Dies führte zur Akkumulation von löslichen Zuckern. In reifen und sich entwickelnden iAGP-Samen waren die Gehalte an Saccharose während der Samenreife erhöht. Wie schon an *V. narbonensis* Samen (Weber *et al.*, 2000; Rolletschek *et al.*, 2002) und an Maiskörnern (Cossegal *et al.*, 2008) gezeigt, stimuliert dieses Überangebot an freien Zuckern verschiedene Stoffwechselprozesse des Saccharoseabbaus, der Glycolyse sowie des TCA-Zyklus im Zytosol, den Plastiden und Mitochondrien. Dadurch erfolgte die Verstoffwechslung und Umverteilung der freien Zucker, wodurch die Kohlenstoffgerüste anderen Stoffwechselwegen zugänglich gemacht wurden.

In den iAGP-Samen ist dies anhand der induzierten Gene im Zytoplasma erkennbar, deren Proteine am Abbau und Stoffwechsel von Saccharose sowie der Glycolyse beteiligt sind. So erfolgte die verstärkte Expression der Saccharose-Synthase (Susy; 20, 30, 35 DAP), die den Abbau der Saccharose zu UDP-Glucose katalysiert. Dagegen wurden eine vakuoläre und neutrale Invertase während der mittleren Samenreife (25 DAP) herunterreguliert. Dies deutet auf eine alleinige Enzymfunktion der Susy bei der Saccharosespaltung und somit die vermehrte Bildung von UDP-Glucose hin. Wahrscheinlich wurde dadurch der Anteil an freien Hexosen reduziert und mögliche zuckerinduzierte Signalreaktionen verhindert (Koch *et al.*, 1996).

Das Zwischenprodukt UDP-Glucose könnte dann weiter über die hochregulierte UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (30, 35 DAP) zu Glucose-1-Phosphat abgebaut werden, welches durch die Phosphoglucomutase (PGM; induziert am 25. DAP) zu Glucose-6-Phosphat und weiter durch die verstärkt exprimierte Phosphoglucoisomerase (PGI; 20, 25 DAP) zu Fructose-6-Phosphat verstoffwechselt wurde. Andererseits könnte UDP-Glucose auch unter Beteiligung von Fructose-6-Phosphat über das Zwischenprodukt Saccharose-6-Phosphat in Saccharose umgewandelt worden sein. Diese Reaktion wird durch die verstärkt exprimierten Enzyme Saccharose-6-Phosphat-Phosphatase (SP-PP; 20 DAP) und Saccharose-6-Phosphat-Synthase (SPS; 20, 30, 35 DAP) katalysiert, wodurch beide an der Regulation der Saccharosesynthese und somit der Kohlenhydratverteilung beteiligt sind.

Weiterhin ist ein stimulierter Zuckerstoffwechsel anhand der aktivierten Prozesse der Glycolyse und dem TCA-Zyklus erkennbar. In den iAGP-Samen erfolgte eine verstärkte Expression zytosolischer (PGM, PGI, Enolase und GAPDH), mitochondrialer (Pyruvat-Dehydrogenase E1 + E2, 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase) und plastidärer (GAPDH, PGM, Fructosebiphosphat-Aldolase) Enzyme dieser Stoffwechselwege. Zusätzlich wurden erhöhte Gehalte der Glycolyse- und TCA-Stoffwechselprodukte, wie Glycerinaldehyd-3-Phosphat (25, 30 DAP), Malat (25, 30, 35 DAP), 2-Oxoglutarat (25, 30 DAP) und Succinat (30 DAP), bestimmt. Dagegen war Citrat unverändert, was möglicherweise auf einer sofortigen Umwandlung durch die induzierte ATP-Citratlyase (Fatland *et al.*, 2000; 20, 35 DAP) zu Acetyl-CoA und Oxalacetat beruht.

Acetyl-CoA ist das Ausgangssubstrat für die Fettsäuresynthese in den Plastiden. In den iAGP-3 Embryonen war die langkettige Fettsäure-CoA-Ligase (Ichihara *et al.*, 2003) hochreguliert und zusätzlich wurden auch erhöhte Gehalte des Gesamtlipidanteils gemessen, was auf eine verstärkte Fettsäuresynthese hindeutet.

Weiterhin erfolgte in den iAGP-Samen eine Stimulierung des Stärkestoffwechsels. Durch die Hemmung der AGP-Enzymaktivität wurde verringert ADP-Glucose, das Substrat der Stärke-Synthesen, gebildet (Rolletschek *et al.*, 2002). Dies könnte zur Aktivierung anderer Stoffwechselwege führen, um die limitierten Ausgangsstoffe, die für die Stärkesynthese notwendig sind, auszugleichen. In den iAGP-Samen wurden Gene induziert, deren Proteine an der Stärkespaltung beteiligt sind, wie die Stärke-Phosphorylase (25, 30, 35 DAP), die Phosphoglucan-Wasser-Dikinase (35 DAP) und das Stärke-Entzweigungsenzym 2 (30 DAP). Dadurch erfolgte die Spaltung der Stärke aus Zwischenspeichern, wie den Chloroplasten (Okita, 1992; Smith and Denyer, 1992), um so die Produktion der Ausgangsstoffe, z.B. von Glucose-1-Phosphat, zu erhöhen und der Stärkesynthese in den Amyloplasten zugänglich zu machen. Weiterhin ist eine angeregte Stärkesynthese in den Plastiden auch durch die verstärkte Expression des Glucose-6-Phosphat Translokators (20, 30 DAP) sowie der Enzyme PGM (20, 30 DAP), der Stärke-Synthase 1 (35 DAP) und GBSS1 (35 DAP) erkennbar.

Durch den stimulierten Kohlenhydratstoffwechsel wird vermehrt NADH produziert, welches über Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette oxidiert und dadurch der Energieträger ATP gebildet wird. Verschiedene Gene wurden verstärkt exprimiert, die für mitochondriale Enzyme, wie zwei NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktasen (20, 25, 30, 35 DAP), drei ATP-Synthasen (25, 30, 35 DAP) und dem entkoppelten Protein (25, 30, 35 DAP), kodieren. Diese Proteine sind entweder als Enzymkomplex der Atmungskette oder an der Bildung von ATP in den Mitochondrien beteiligt und liefern so die nötige Energie für Oxidationsprozesse.

4.6.2 AGP-Reprimierung beeinflusst den Aminosäurestoffwechsel und verstärkt die Synthese von Speicherproteinen

Der stimulierte Kohlenhydratstoffwechsel in den iAGP-3 Samen führte zur vermehrten Bereitstellung an Kohlenstoffgerüsten, die wiederum als Ausgangsstoffe für die Aminosäuresynthese genutzt werden. So wird das Stoffwechselprodukt Oxalacetat durch die Aspartat-Transaminase (induziert am 20. DAP) zur Bildung von Asparaginsäure verwendet, dessen Gehalte in den transgenen Embryonen verringert waren. Dies deutet auf eine schnelle Verstoffwechslung von Aspartat zu Methionin (hochregulierte Methionin-Synthase; 20, 25, 30 DAP) und weiter zu β -Alanin hin. Für die Cystein-Synthese, katalysiert durch die induzierte Serin-Acetyltransferase (25 DAP) und die O-Acetyl-Serin-(Thiol)-Lyase (25, 30 DAP), wird Acetyl-CoA als Substrat genutzt. Weiterhin dient das Stoffwechselprodukt 3-Phosphoglycerat zur Synthese der Aminosäure Serin durch die Phosphoserin-Phosphatase (induziert am 30. DAP).

Obwohl sich der Gesamtanteil der freien Aminosäuren nicht veränderte, zeigten sich deutliche Unterschiede in den Einzelgehalten der Aminosäuren gegenüber dem Wildtyp, was wiederum auf einen stimulierten Aminosäurestoffwechsel hindeutet. Auf Transkriptebene verdeutlichte sich dieses Bild. Insgesamt wurden 18 Gene verstärkt exprimiert, deren Proteine an Prozessen der Aminosäuresynthese beteiligt sind. So wurde die Biosynthese der Aminosäuren Valin (hochregulierte Acetohydroxysäure-Synthase, 20, 25 DAP und Ketolsäure-Reduktoisomerase, 25, 30 DAP) und Arginin (induzierte Argininosuccinat-Synthase, 25, 30 DAP und Acetyltransferase/N-Acetylglutamat-Synthase, 25 DAP) sowie einiger aromatischer Aminosäuren angeregt. Die Gehalte von Valin waren während der späten Samenreifung erhöht, wogegen die Gehalte von Arginin reduziert wurden, was auf eine schnelle Verwertung der Aminosäure hindeutet.

Ein ähnlicher Befund von verringerten Werten liegt bei den Aminosäuren Glutamin und Asparagin vor. Die drei Aminosäuren dienen in Leguminosen als Stickstoffspeicher. Die stimulierte Proteinbiosynthese in den iAGP-Samen bewirkte einen Mangel an Stickstoff und somit auch einen gesteigerten N-Bedarf, der durch die Verwertung der Stickstoffspeicherpools in Form der Aminosäuren Asparagin und Arginin ausgeglichen wird.

Die reifen AGP-reprimierten Samen akkumulierten deutlich mehr Speicherproteine als der Wildtyp, wobei beide Proteinfractionen, die Albumine und die Globuline, erhöht wurden. Auf Transkriptebene wurden Gene induziert, deren Proteine an Prozessen der Transkription und Translation, des endomembranen Transports sowie der Proteinprozessierung beteiligt sind. Weiterhin wurde auch die Expression der Speicherproteingene, wie verschiedene Viciline, Albumin 1 und USP, angeregt. Dagegen waren die Sequenzen der Legumine eindeutig verringert exprimiert. Dies konnte anhand der Northern Blot Analyse bestätigt werden. Die mRNA-Werte von Vicilin waren doppelt so hoch wie im Wildtyp, wogegen die Transkriptmengen von Legumin B reduziert waren. Die Expression der Speicherproteingene kann durch Nährstoffe beeinflusst werden. So reagiert die Legumin-mRNA sehr sensitiv auf erhöhte Zuckerspiegel (Turner *et al.*, 1990). In PEPC-Samen mit verringerten Zuckergehalten wurde die Expression von Legumin verstärkt und die von Vicilin eher reduziert (Rolletschek *et al.*, 2004).

Die gestörte Stärkebildung in den Samen erhöhte die Kohlenstoffgehalte und gleichzeitig erfolgte eine Aktivierung der Aminosäure- sowie Speicherproteinsynthese. Dies wiederum führte zum verstärkten N-Bedarf und folglich zum Abbau und Verwertung der Stickstoffspeicherpools in Form der Aminosäuren Asparagin und Arginin.

4.6.3 Hormonelle Signalnetzwerke beeinflussen in Interaktion mit löslichen Zuckern die Samenspeicherstoffsynthese

Die verringerte Stärkebildung stimulierte den Kohlenhydratstoffwechsel und führte zur Akkumulation von freien Zuckern in den Erbsenembryonen. Dabei dienen die freien Zucker nicht nur als Nährstoff, sondern verändern auch das osmotische Verhältnis der Zellen und regulieren andererseits als Signalstoff in Interaktion mit dem Phytohormon ABA (Finkelstein *et al.*, 2002) die Prozesse der Speicherstoffsynthese (Weber *et al.*, 1997a; 2005). In den iAGP-

Samen scheint die ABA-Aktivität vermindert zu sein. So wurde die Proteinphosphatase 2A, ein Inhibitor der ABA-Funktion, hochreguliert (20 DAP). Dagegen erfolgte die verringerte Expression der 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase (30 DAP), dem Hauptenzym der ABA-Biosynthese. Die Konzentration an ABA wurde in drei unterschiedlichen Experimenten unter verschiedenen Anzuchtbedingungen und biologischen Wiederholungen bestimmt (Daten nicht gezeigt). Dabei ergaben sich zwar signifikante Unterschiede zwischen den Transgenen und den Wildtypsamen, jedoch waren die Ergebnisse im Vergleich der einzelnen Versuche widersprüchlich und konnten für eine eindeutige Aussage nicht verwendet werden. Gerade bei Hormonen sind nur geringe Konzentrationen notwendig, um eine Wirkung zu erzielen. Dies erschwert die Bestimmung der Gehalte und somit auch eine eindeutige Aussage bezüglich der Hormonkonzentrationen. Andererseits könnte die ABA-Signalkette durch den osmotischen Stress in den iAGP-Zellen verändert worden sein.

Anhand physiologischer und genetischer Studien wurden für ABA und Zucker antagonistische aber auch gleiche Effekte während der Samenreifung gezeigt (Finkelstein and Gibson, 2002). Glucose und ABA haben eher eine gegensätzliche Wirkung auf den Zellzyklus, wogegen Saccharose und ABA in gleicher Weise die Akkumulation von Speicherstoffen anregen. Die Signalwirkung von Zucker, besonders des Signalmoleküls Saccharose, ist also von einer intakten ABA-Signalkette abhängig. Durch die erhöhten Gehalte an freien Zuckern in den iAGP-Embryonen müsste es eigentlich zu einer stimulierten ABA-Synthese und höheren ABA-Gehalten kommen. Wahrscheinlich führte die Akkumulation an Saccharose zu osmotischen Veränderungen und zu Stressreaktionen in den Zellen, die wiederum die Signalweiterleitung beeinflussten. Als Anpassung an diese Stresssituationen erfolgte auf Transkriptionsebene eine Verringerung der ABA-Wirkung.

Weiterhin wurde auch die β -Untereinheit der Proteinkinase SnRK1 in den iAGP-Samen herunterreguliert. In Leguminosensamen interagiert SnRK1 mit der ABA-Signalkette und ist somit ein entscheidender Regulator der Samenentwicklung (Radchuk *et al.*, 2006). Eine Reduzierung der SnRK1-Aktivität führte zu verringerten ABA-Gehalten und Veränderungen des Saccharosestoffwechsels. Wahrscheinlich hat SnRK1 eine regulatorische Funktion im Stoffwechsel der iAGP-Samen. Somit beeinflussen die erhöhten Zuckergehalte in den iAGP-Embryonen in Verbindung mit stressbedingten Reaktionen die Signalwirkung einzelner Hormone.

Neben ABA wurden auch Cytokinine in den iAGP-3 Embryonen verändert. Die Gehalte an Cytokinin und der aktiven Isoformen Cytokinin-Riboside sowie Cytokinin-freie Basen waren signifikant erhöht. Die Verfügbarkeit von Zuckern in Verbindung mit Cytokinen spielt eine entscheidende Rolle als Signalstoff bei Prozessen der Zellproliferation (Roitsch and Ehneß, 2000). Die Akkumulation von freien Zuckern in den AGP-reprimierten Samen führte wahrscheinlich zu einer verstärkten Synthese an Cytokinen und deren stimulierten Aktivität, was wiederum einen regulatorischen Effekt auf die Expression verschiedener Gene des Zellzyklus hatte. Insgesamt wurden 23 Gene hochreguliert, deren Proteine, wie verschiedene Annexine und Tubuline, an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Besonders die Expression der induzierten Cycline (Cyclin D3 und Cyclin B) wird durch die Verfügbarkeit von Zuckern und durch Cytokinine reguliert (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Weiterhin wurde noch

das MCM3-Protein, welches an der DNA-Replikation und an der transkriptionellen Regulation verschiedener Gene in *Saccharomyces* beteiligt ist, induziert. In Hefezellen wurde dieses Protein posttranskriptionell durch veränderte Flussraten der Glycolyse reguliert (Chen and Tye, 1995).

Die verstärkte Zuckerverfügbarkeit agiert als Signalstoff in den Zellen und stimuliert in Interaktion mit Hormonen, mitunter von Cytokinin ausgelösten Reaktionen, die Zellproliferation. Doch führt die Zuckerakkumulation auch zu negativen Effekten, wie osmotischem Stress, worauf die Zelle mit Abwehrmechanismen reagiert.

4.7 Die gesteigerte Speicherproteinsynthese verändert das Verhältnis von N und C im Samen und führt zu kompensatorischen Effekten

Während der Samenentwicklung erfolgt in verschiedenen Entwicklungsstadien neben der Ausbildung des Embryos auch die Synthese und Speicherung von Reservestoffen (Borisjuk *et al.*, 1995). Gerade in dieser Phase findet ein stimulierter Stoffwechsel statt. Untersuchungen der Samenreifung an verschiedenen Leguminosenpflanzen zeigten deutlich, dass es durch die aktivierten Stoffwechselprozesse zu einer Limitierung an Ausgangsstoffen im Samen kommt (Weber *et al.*, 2009). Die gesteigerte Biosynthese der Speicherproteine in den transgenen AAP1- und iAGP-Samen führte zu einem höheren Verbrauch der, für die Synthese notwendigen, Metaboliten und bewirkte dadurch eine C- und N-Limitierung im Samen.

Die Überexpression der Aminosäurepermease VfAAP1 erhöhte den Aminosäureeintrag sowie die Gehalte an Stickstoff und Speicherproteinen in den Erbsenembryonen. Dieses Überangebot an N aktivierte Prozesse der Aminosäuresynthese, vorrangig in Form der N-Speicherpools Asparagin und Arginin, und führte dadurch zu einer Limitierung an Kohlenstoffgerüsten. Anders verhält es sich bei den iAGP-Samen, die keine Kohlenstofflimitierung sondern eher einen Überschuss aufwiesen. Das Überangebot an freien Zuckern stimulierte den Kohlenhydratstoffwechsel und somit die Umverteilung der Kohlenstoffgerüste in andere Stoffwechselreaktionen, wie der Aminosäurebildung und folglich der Speicherproteinsynthese. Allerdings erhöhte dies den N-Bedarf und veränderte das N:C Verhältnis zu Gunsten von Kohlenstoff.

Jede kleinste Veränderung des N:C Haushaltes scheint zu kompensatorischen Antwortreaktionen zu führen, um das verschobene Verhältnis effektiv anzupassen. In den AAP1-Kotyledonen wurden über einen stimulierten Kohlenhydratstoffwechsel C-Gerüste aus Speichern, wie Stärke und Saccharose, remobilisiert. Gleichzeitig wurden der GABA-Shunt und mitochondriale Stoffwechselprozesse, wie der Aminosäureabbau, aktiviert, um die C-Limitierung zu beheben und somit das N:C Gleichgewicht wieder herzustellen. In den iAGP-Samen erfolgte eher ein Abbau und Remobilisierung der N-Speicherpools Asparagin und Arginin, um so die N-Limitierung auszugleichen. Weiterhin wurden mitochondriale Enzyme induziert, die, unter anderem als Enzymkomplexe der Atmungskette, die nötige Energie für die Kohlenhydratoxidation bereitstellten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein ausgewogenes Verhältnis zwischen N und C für die normale Samenentwicklung entscheidend ist und streng kontrolliert wird (Jenner *et al.*, 1991), wobei dieses Gleichgewicht wichtiger ist als die Einzelgehalte an N und C an sich. Erbsensamen, die hauptsächlich Stärke und Proteine während der Samenreife akkumulieren, besitzen effektive Kontrollmechanismen um auf kleinste Veränderungen im N:C Haushalt zu reagieren und diesen wirksam auszugleichen. Dabei scheinen Mitochondrien eine wesentliche Rolle zu spielen. So erfolgt ein verstärkter Aminosäureabbau, um C- und N-Komponenten bereitzustellen. Weiterhin werden verschiedene Prozesse der mitochondrialen Atmung und somit der Energiegewinnung aktiviert.

Anhand der analysierten Modelle AAP1 und iAGP wird deutlich, dass es nicht so einfach ist, den Samenstoffwechsel hinsichtlich einer gezielten Erhöhung der Reservestoffe zu manipulieren, ohne gleichzeitig Nebeneffekte auszulösen. Denn offensichtlich wird die gesteigerte Produktion bestimmter Metabolite oder Speicherstoffe an anderer Stelle im Stoffwechsel kompensiert, um das Gleichgewicht in der Pflanze wiederherzustellen. Dieser Ausgleich wirkt sich meist negativ auf Samengewicht, -anzahl sowie -fülldauer oder sogar auf das gesamte Pflanzenwachstum aus (Sinclair, 1998; Götz *et al.*, 2007). So wurde die vermehrte N-Zufuhr für eine gesteigerte Speicherproteinsynthese in der AAP1-Linie durch ein reduziertes Samengewicht ausgeglichen.

In den iAGP-Samen war die Stoffwechselkomponente Zucker erhöht. Saccharose, einerseits Nährstoff und Transportform, ist andererseits als Signalmolekül in Interaktion mit ABA an der Regulation von Genexpression und Samenreife beteiligt (Borisjuk *et al.*, 2002; Koch, 2004; Weber *et al.*, 2005). Während eine Limitierung des Nährstoffs schädlich für die Pflanze ist, führt ein Überschuss an löslichen Zuckern zu Stressreaktionen in der Zelle. Diese werden entweder durch das Molekül selbst (Price *et al.*, 2003) oder durch indirekte Effekte, wie osmotische Veränderungen durch verstärkten Wassereintrag (Rolletschek *et al.*, 2002), ausgelöst. In den iAGP-Samen kam es durch die reduzierte Stärkesynthese zur Akkumulation an löslichen Zuckern. Dies führte durch die veränderten osmotischen Verhältnisse in den Zellen und gleichzeitig durch die Stimulierung der Signalnetzwerke zu Stressbedingungen, wodurch verschiedene Abwehrreaktionen mit hormonellen, metabolischen und transkriptionellen Veränderungen in den iAGP-Samen aktiviert wurden.

4.8 Stressbedingte Abwehrreaktionen

In aeroben Stoffwechselreaktionen der Mitochondrien, aber auch in Plastiden, kommt es unvermeidlich zur Produktion reaktiver Sauerstoffsubstanzen (ROS), die von der Pflanze sogar als Abwehr gegen Pathogene verwendet werden (Møller, 2001). ROS kann aber auch Proteine, Lipide sowie DNA schädigen und dadurch reduzierte Enzymaktivitäten, erhöhte Membranpermeabilitäten und Mutationen bewirken (Halliwell and Gutteridge, 2007). Deshalb muss die Bildung und Entfernung dieser Substanzen streng kontrolliert werden. Die erhöhten Zuckergehalte in den iAGP-Samen bewirkten eine Stimulation der Glycolyse und TCA-Stoffwechselwege im Zytosol, den Plastiden und Mitochondrien. Dadurch wurde in diesen Stoffwechselreaktionen vermehrt NADH gebildet, was wiederum zu einer überreduzierten

Atmungskette führte und die freien Elektronen mit Sauerstoff zu Superoxidionen reagieren konnten (Møller, 2001). Anzeichen für eine stimulierte Aktivität der mitochondrialen Elektronentransferkette sind induzierte Gene, die für Enzyme, wie die NADH-Ubichinon Oxidoreduktase Komplex 1 (25, 35 DAP) und F₁F₀-ATP-Synthase (UE δ , γ ; 20, 25, 30, 35 DAP), kodieren. Das erst genannte Enzym ist für die Reduktion von NADH verantwortlich und die ATP-Synthase katalysiert die Synthese von ATP.

Die ROS-Bildung scheint in den AGP-reprimierten Samen auch durch den stimulierten Polyaminstoffwechsel begünstigt zu sein. Bei der Oxidation von Polyaminen entsteht H₂O₂, welches als Signalmolekül zu hypersensitiven Reaktionen, der Expression von Abwehrgenen sowie zum Zelltod führen kann (Cona *et al.*, 2006). Die Gehalte von Putrescin, Spermidin und H₂O₂ waren in den iAGP-Samen signifikant erhöht, wogegen die Werte der Aminosäure Arginin verringert waren. Dies deutet auf einen schnellen Abbau von Arginin durch die hochregulierte N-Carbamoyl-Putrescin-Amidohydrolase (20 DAP) zu Putrescin und anschließender Verstoffwechslung über die hochregulierten Spermidin-Synthasen 1 und 2 (20, 25, 35 DAP) zu Spermidin. Putrescin könnte aber auch als Ausgangsstoff für die GABA-Synthese dienen, dessen Werte in den transgenen Samen deutlich erhöht waren.

Hyperosmotischer Stress agiert als Signalstoff und bewirkt über eine Signalkaskade die Auslösung verschiedener Abwehrreaktionen. An dieser Signalweiterleitung sind unter anderem stressinduzierte Transkriptionsfaktoren, aber auch ABA sowie Proteinkinasen und Phosphatasen involviert (Chinnusamy *et al.*, 2004). Verschiedene Gene, die für Proteinkinasen, wie die Serin/Threonin-Proteinkinase SAPK7, die Ca²⁺-abhängige Proteinkinase CPK1 und drei MAP-Kinasen, sowie einige Phosphatasen kodieren, wurden während der Samenreife in den iAGP-3 Embryonen verstärkt exprimiert.

Weiterhin reagieren Pflanzen auf osmotischen Stress mit der Synthese von Hormonen, wie der Jasmonsäure (JA) und deren Methylester sowie der gemeinsamen Vorstufe 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA; Miersch *et al.*, 2008). Neben der stressinduzierten Bildung verändern sich die JA-Konzentrationen auch organspezifisch (Miersch *et al.*, 2004) und abhängig vom Entwicklungsstadium (Wasternack, 2007). In den gestressten iAGP-Samen waren die Gehalte der Vorstufen OPDA und dinor-OPDA sowie von 11-Hydroxyjasmonsäure (11-OH-JA) und dem Glycosid 12-O-Glc-JA signifikant erhöht. Die Werte an Jasmonsäure selbst waren verringert, was auf eine Verstoffwechslung zu 11-OH-JA oder zu 12-O-Glc-JA hindeutet.

Auf Transkriptebene ist eine Stimulation der JA-Biosynthese erkennbar. Die Synthese von Jasmonsäure erfolgt ausgehend von α -Linolensäure über mehrere Schritte zu OPDA, katalysiert durch die hochregulierte Allenoxid-Cyclase (25 DAP). OPDA wird über die verstärkt exprimierte OPDA-Reduktase (25, 30, 35 DAP) reduziert und dann β -oxidiert zur stabilen JA. Das Phytohormon Jasmonsäure gilt als Schlüsselregulator von Signalkomponenten bei Abwehr- und Entwicklungsprozessen (Wasternack, 2007). Viele Stressgene werden nur durch JA oder JA-Methylester aber nicht durch 12-OH-JA oder 12-O-Glc-JA induziert (Miersch *et al.*, 2008). Die Hydroxylierung von JA zu 11-OH-JA sowie Umwandlung zu 12-O-Glc-JA führt zur Verringerung der JA-Konzentrationen und zur Feinregulierung der Expression JA-abhängiger Gene (Stintzi *et al.*, 2001; Miersch *et al.*,

2008). So wird eine stressinduzierte Überreaktion der Zellen bedingt durch eine gesteigerte JA-Synthese verhindert oder minimiert.

Ein Großteil der ROS-Produktion findet in den Mitochondrien aber auch in den Plastiden statt. In diesen Zellkompartimenten existieren verschiedene Mechanismen, um als erstes die Bildung von ROS vorzubeugen und, wenn doch erfolgt, mögliche Schäden zu reparieren. Als erste Abwehrbarriere wird die Vermeidung der ROS-Bildung eingestuft. In den iAGP-Samen wurden sowohl mitochondriale als auch plastidäre Gene verstärkt exprimiert, deren Proteine an der Energiegewinnung beteiligt sind. Durch die Expression energieverbrauchender Enzyme könnte der Bildung freier Elektronen und somit von ROS vorgebeugt werden. In den Plastiden wurde die ATP-Synthese (hochregulierte F_1F_0 -ATP-Synthase, UE δ , 25 DAP) und der ATP-Export aus den Plastiden (induzierter ADP/ATP-Translokator, 20, 25 DAP) stimuliert. Zusätzlich erfolgte die verstärkte Expression der Adenylatkinase (25, 30, 35 DAP), die als Schlüsselenzym des Energiestoffwechsels die Umwandlung von ADP zu ATP und umgekehrt katalysiert und dadurch das Gleichgewicht zwischen ADP und ATP aufrechterhält. Zur Vermeidung einer überreduzierten Elektronentransferkette wurde der Energieverbrauch in den Mitochondrien durch die hochregulierten Enzyme NADH-Quinon-Oxidoreduktase, Komplex 1 (25, 35 DAP) und ATP-Synthasen (20, 25, 30, 35 DAP) angeregt. Das entkoppelte Protein der inneren Mitochondrienmembran (induziert am 25, 30, 35. DAP), welches durch den Verbrauch des Protonengradienten Wärme statt ATP produziert, ist auch an einer ROS-Reduzierung beteiligt.

Erfolgte doch die ROS-Synthese in den Zellen, müssen die reaktiven Substanzen so effektiv wie möglich in der zweiten Abwehrbarriere entgiftet und entfernt werden. Zur Entgiftung werden die entstandenen ROS mit Hilfe der Superoxid-Dismutase (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt. In den iAGP-3 Embryonen waren die Gehalte an H_2O_2 signifikant erhöht und auch das Gen, welches für die Mangan-Superoxid-Dismutase kodiert, wurde verstärkt exprimiert (25 DAP). Über den Ascorbat/Glutathion-Zyklus wird dann unter Verwendung von Glutathion H_2O_2 reduziert und das oxidierte Glutathion schließlich durch die induzierte Glutathion-Reduktase (25 DAP) regeneriert. Weiterhin sind auch Thioredoxin und Peroxiredoxin (hochreguliert am 20, 30, 35. DAP) sowie einige Antioxidantien, wie Flavonoide, Riboflavine und Carotinoide, als Radikalfänger an der Entgiftung von ROS und H_2O_2 beteiligt. In den iAGP-Samen erfolgte die verstärkte Expression von Genen, deren Proteine an der Biosynthese dieser antioxidativen Substanzen beteiligt sind, wie die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (25 DAP), die 4-Coumaryl-CoA-Synthase (20, 25 DAP), die Flavonol-Synthase (30 DAP), die Riboflavin-Synthase (30 DAP) sowie die Phytoen-Synthase (30, 35 DAP).

Anhand der Transkript- und Metabolitdaten der transgenen iAGP-Samen ist deutlich zu sehen, dass Veränderungen des Samenstoffwechsels nicht nur einseitig hinsichtlich einer Steigerung der Speicherstoffe wirken, sondern diese Reservekomponenten auch als Signalstoffe negative Stressreaktionen auslösen können, worauf die Pflanze wiederum mit Abwehrmechanismen reagieren muss. Die Erbsensamen haben spezifische und effektive Mechanismen, um Stresssignale, wie z.B. durch Jasmonsäure ausgelöst, zu reduzieren (Stintzi *et al.*, 2001; Miersch *et al.*, 2008) und somit Zellschäden vorzubeugen. Weiterhin wird

die Expression von Genen unterdrückt, die durch Stresssignale reguliert werden und letztlich zu Seneszenz und Apoptose führen könnten (Puppo *et al.*, 2005).

4.9 Fazit und weiterführende Arbeiten

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Anteil an Speicherproteinen in Erbsensamen über die züchterischen Möglichkeiten hinaus zu erhöhen und mit Hilfe transgener Modelle detaillierte Erkenntnisse über den veränderten Stickstoff- und Kohlenstoffhaushalt im Samen zu erhalten. Für eine effektive Veränderung des Samenstoffwechsels wurden Erbsenpflanzen mittels Agrobakterium-vermittelter Co-Transformation gentechnisch manipuliert. Für die beiden Ansätze, die Überexpression der Aminosäurepermease 1 und die Inhibierung des Stärkestoffwechsellzyms ADP-Glucose Pyrophosphorylase, konnten transgene stabile Pflanzenlinien regeneriert werden, die über mehrere Generationen eine Erhöhung des Proteingehaltes im Samen aufwiesen. Dieser Effekt prägte sich bei den iAGP-Pflanzen deutlich stärker und vor allem stabiler über mehrere Generationen und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen aus. Bei der AAP1-Linie fiel die Erhöhung des Proteingehaltes dagegen geringer aus und schwankte abhängig von den Umwelteinflüssen.

Die gesteigerten Proteinmengen wirkten sich negativ auf die Samengewichte aus. Gezielte Veränderungen hinsichtlich einer Steigerung der Reservestoffe können zu kompensatorischen Effekten bei den Samen, wie verringerte Mengen, Gewichte und Wachstumsraten, führen (Sinclair, 1998). Diese negative Korrelation zwischen Speicherproteinerhöhung und Reduzierung des Ertrages ist auch bei den transgenen Erbsenlinien erkennbar. Unter den Wachstumsbedingungen im Freiland bzw. freilandähnlichen Bedingungen im Außengewächshaus konnten retragsrelevante Parameter, wie Samengewicht und Samenanzahl pro Pflanze, bestimmt werden. Die Samentrockengewichte der AAP1- und iAGP-Linien waren signifikant niedriger als die der Wildtypkontrolle, wobei sich die Anzahl der Samen pro Pflanze (Daten nicht gezeigt) nicht veränderte. Die Reduzierung des Samengewichtes erfolgte bei mehreren iAGP-Linien deutlich ausgeprägter als bei den AAP1-Embryonen. Gleiches ist für die Samenfrischgewichte mit verringerten Werten bei den AAP1-Pflanzen erkennbar. Die iAGP-Linien wiesen dagegen erhöhte Gehalte auf, bedingt durch den verstärkten Wassereintrag in die Samen.

Bezieht man also die gemessenen Gehalte an Speicherproteinen auf ertragsrelevante Parameter, wie Samengewicht und Samenanzahl pro Pflanze, ergibt sich letztlich nur eine geringe Erhöhung der Proteingehalte. Anhand detaillierter Analysen des Samenstoffwechsels wurden auf Transkriptebeine verschiedene kompensatorische Mechanismen identifiziert, wodurch dieser negative Effekt in den transgenen Samen erklärt werden konnte. Unter Beteiligung mitochondrialer Prozesse im Samen wurden Reaktionen aktiviert, um die N-Defizite in den iAGP-Samen bzw. die C-Limitierung in den AAP1-Embryonen auszugleichen, was im Endeffekt zu einem verringerten Samengewicht führte. Zur Verbesserung des Gehaltes an Speicherproteinen wäre es daher sinnvoll, die Stickstoff- und Kohlenstofflevel effektiv zu erhöhen.

So könnte beispielsweise die Überexpression einer Aminosäurepermease und eines Saccharosetransporters gleichzeitig in einer Pflanze erfolgen, um neben dem Aminosäureeintrag auch die Saccharosezufuhr im Samen zu steigern. In der Arbeitsgruppe Samenentwicklung (IPK, Gatersleben) wurde bereits begonnen, die transgene Linie AAP14/10 mit dem Konstrukt zur samenspezifischen Expression des Saccharosetransporters SUT1 aus *V. faba* (Kohl, 2008) zu transformieren. Bis zum jetzigen Stand konnten transgene Pflanzen regeneriert werden. In den nächsten Generationen sollen stabile Linien selektiert und die Samen bezüglich Veränderungen in der Zusammensetzung der Reservestoffe, besonders der Speicherproteine, analysiert werden.

Als weiterführende Analysemöglichkeiten bieten sich Markierungsexperimente an, die Aufschluss über Aufnahme, Fixierung und Allokation von N und C in den veränderten AAP1- und iAGP-Pflanzen geben könnten. Sich füllende Samen stellen ein starkes *sink*-Organ für Nährstoffe, wie Stickstoff und Kohlenstoff, dar, was wiederum zu einem erhöhten Bedarf dieser Komponenten führt. Daher setzt mit fortlaufender Samenreifung die Remobilisierung von Reservestoffen aus vegetativen Geweben, wie Blättern und Stängeln, ein (Salon *et al.*, 2001). Zur Bestimmung der veränderten Metabolitkonzentrationen in der gesamten Pflanze werden [¹⁵N] markierte Aminosäuren sowie [¹³C] markierte Kohlenstoffkomponenten (Bariumcarbonat) direkt in Wurzel, Stängel, Blätter oder Kotyledonen injiziert und anschließend deren Verteilung innerhalb der Pflanze analysiert (Götz *et al.*, 2007).

Zur weiteren Klärung verschiedener Fragestellungen im Bereich des Primärstoffwechsels mit Fokus auf Prozesse der Samenreifung und Akkumulation von Speicherstoffen werden die transgenen Erbsenlinien AAP1 und iAGP neben anderen Vertretern, wie *Medicago truncatula* und Gerste, als Untersuchungsobjekte von der Arbeitsgruppe Systembiologie (IPK, Gatersleben) genutzt. Als thematischer Schwerpunkt sollen biochemische und molekularbiologische Vorgänge im Samenmetabolismus unter Anwendung systembiologischer Methoden untersucht werden. Dabei werden mathematische Modelle von Stoffwechselwegen erstellt, die auf Experimenten beruhen, in denen Metabolitkonzentrationen, Enzymaktivitäten und Stoffflüsse gemessen werden.

Leguminosen, wie Erbse, werden in Europa vorrangig für die tierische Ernährung angebaut. Weltweit sind Weizen, Reis, Mais und Gerste als monokotyle Kulturpflanzen die bedeutendsten landwirtschaftlich genutzten Fruchtarten. Die Züchtung backtechnologischer hochwertiger Weizensorten in den letzten Jahrzehnten führte zur Selektion glutenreicherer Sorten. Diese Proteinfraction reduziert allerdings durch niedrige Lysingehalte die biologische Wertigkeit des Proteins, was im konventionellen Landbau über N-Düngung und daraus gesteigerte Gesamtproteingehalte kompensiert wird (Hagel *et al.*, 1998). Als Grundlage für eine weitere Verbesserung der Weizenproteinmenge sowie der Qualität könnten transgene Phänotypen dienen, die die Erkenntnisse über den Samenmetabolismus der Leguminosen nutzen. In Freisetzungsversuchen mit transgenem Winterweizen, der die Aminosäurepermease aus *V. faba* samenspezifisch exprimiert, wurde eine Erhöhung des Proteingehaltes im Samen gefunden. Zukünftige Analysen sollen Aufschluss über eine mögliche Veränderung der Zusammensetzung sowie der biologischen Qualität des Proteins liefern.

Ein ähnlicher Ansatz könnte zur verbesserten Versorgung des Samens mit N- und C-Gerüsten, als Grundbausteine der Speicherproteinsynthese, führen. Dazu wurden bereits in der Arbeitsgruppe Samenentwicklung (IPK, Gatersleben) transgene Weizenpflanzen generiert, die einen Saccharosetransporter im Samen überexprimieren. In weiterführenden Arbeiten könnten durch Kreuzung dieser Pflanzen mit den *VfAAP1*-überexprimierenden Weizenpflanzen entsprechend Linien erzeugt werden, bei denen gleichzeitig die Aminosäure- und Saccharosezufuhr in den Samen erhöht und somit die Speicherproteingehalte gesteigert werden.

5 Zusammenfassung

Die Samen der Leguminosen speichern einen hohen Anteil an Proteinen in den Kotyledonen, wodurch sie ernährungsphysiologisch eine der wichtigsten pflanzlichen Proteinquellen sind. Im Wesentlichen ist die Proteinbiosynthese von der Zufuhr von Kohlenstoff und Stickstoff in den Samen sowie von der Nährstoffverfügbarkeit in der Pflanze und somit der Remobilisierung von Reservestoffen aus vegetativen Geweben abhängig (Miranda *et al.*, 2001, Salon *et al.*, 2001). Gerade bei Kulturpflanzen, wie der Erbse, sind die klassischen Züchtungsmethoden bezüglich der Erhöhung des Proteingehaltes an ihre Grenzen gelangt. Eine viel versprechende Möglichkeit zur effektiven Steigerung der Speicherproteingehalte scheint dabei die genetische Modifikation des Samenstoffwechsels zu bieten. Mittels zwei transgener Ansätze sollte gezielt in die Stoffwechselwege des Samens eingegriffen und dadurch verstärkt Speicherstoffe akkumuliert werden: (1) die Überexpression der Aminosäurepermease 1 aus *Vicia faba* und (2) die Inhibierung der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung des veränderten N- und C-Stoffwechsels der transgenen Samen sowie Untersuchungen möglicher Stoffwechselinteraktionen und Regulationsmechanismen mit Einfluss auf die Samenentwicklung.

Die genetische Modifikation der Erbsenpflanzen erfolgte mittels Agrobakterium-vermittelter Co-Transformation. Vier verschiedene AAP1-Pflanzenlinien exprimierten das Transgen *VfAAP1* in den Kotyledonen während der frühen bis späten Samenreife. Für weitere Analysen wurde die homozygote transgene Linie AAP14/10 verwendet, die am stärksten den Phänotyp der Proteinerhöhung ausprägte. Für die Inhibierung von AGP konnten drei homozygote stabile Pflanzenlinien selektiert werden. In den Linien iAGP-1, iAGP-2 und iAGP-3 wurde der mRNA-Gehalt der kleinen AGP-Untereinheit auf unter 5% reduziert und gleichzeitig die AGP-Enzymaktivität um 90% verringert.

Die Überexpression von *VfAAP1* verstärkte die Aufnahmekapazität von Aminosäuren in die Kotyledonen. Dies stimulierte die Synthese der Speicherproteine, hauptsächlich der Globulinfraktion, und erhöhte dadurch den N-Gehalt im Samen, was wiederum das N:C Verhältnis zu Gunsten von N erhöhte und zur C-Limitierung führte. Dies äußerte sich in kompensatorischen Veränderungen, wie reduzierten Gehalten an Gesamt-C, Stärke und Saccharose sowie verringerten Samengewichten. In zwei unabhängigen Freilandversuchen konnten diese Effekte auf den Samenstoffwechsel bestätigt werden.

Zur Verstärkung des *VfAAP1*-Effektes auf den Samenstoffwechsel erfolgte die Expression der Aminosäurepermease *VfAAP1* unter Kontrolle des samen- (*LeB4*, Linie AAP14/10) und phloemspezifischen (*AtSUC2*, Linie sucAAP5/8) Promotors kombiniert in einer Pflanze. Die doppelt homozygoten Kreuzungsprodukte der Linien AAP14/10 und sucAAP5/8 wiesen eine Erhöhung des N-Gehaltes sowie der Speicherproteine auf. Im Vergleich zur Elternlinie

AAP14/10 zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung. Somit konnte der Effekt von VfAAP1 auf den Samenstoffwechsel nicht wesentlich mehr durch eine zusätzliche Expression der Aminosäurepermease im Phloem gesteigert werden.

Durch die Inhibierung der AGP-Aktivität wurde die Stärkebiosynthese gehemmt, was zu reduzierten Stärkegehalten von bis zu 50% und zur Akkumulation von löslichen Zuckern führte. Die iAGP-Samen prägten den typisch schrumpeligen Samenphänotyp aus. Durch den verringerten Kohlenstofffluss in die Stärkesynthese wurden die C-Gerüste in alternative Stoffwechselwege umverteilt und dadurch die Biosynthese der Speicherproteine, Albumine und Globuline, stimuliert. Allerdings verstärkte sich dadurch der N-Bedarf und führte zu einem erhöhten C:N Verhältnis im Samen.

Die detaillierte Charakterisierung der komplexen Samenphänotypen erfolgte durch Kombination transkriptioneller und metabolischer Analysemethoden unter Verwendung des *Ps6kOLI* Microarrays und der GC-MS Technik.

Das Überangebot an Stickstoff in den AAP1-Embryonen aktivierte Prozesse der Aminosäuresynthese, vorrangig in Form der N-Speicherpools Asparagin und Arginin, und stimulierte die Speicherproteinbiosynthese, was wiederum zur Limitierung an Kohlenstoffgerüsten führte. Zum Ausgleich des vermehrten C-Bedarfs und des erhöhten N:C Verhältnisses wurde der Kohlenhydratstoffwechsel angeregt, um C-Gerüste aus Speichern, wie Stärke und Saccharose, zu remobilisieren. Gleichzeitig wurden der GABA-Shunt und mitochondriale Stoffwechselprozesse, wie der Aminosäureabbau, aktiviert.

In den iAGP-Samen stimulierte das Überangebot an freien Zuckern den Kohlenhydratstoffwechsel und somit die Umverteilung der C-Gerüste in andere Stoffwechselreaktionen, wie der Aminosäurebildung und folglich der Synthese von Speicherproteinen. Allerdings erhöhte dies den N-Bedarf und veränderte das N:C Verhältnis zu Gunsten von Kohlenstoff. Um die N-Limitierung auszugleichen, erfolgten Abbau und Remobilisierung der N-Speicherpools Asparagin und Arginin. Weiterhin wurden mitochondriale Enzyme induziert, die unter anderem als Enzymkomplexe der Atmungskette die nötige Energie für die Kohlenhydratoxidation bereitstellten.

Die metabolischen und osmotischen Veränderungen in den iAGP-Samen lösten verschiedene stressbedingte Abwehrreaktionen aus. Erbsensamen haben spezifische und effektive Abwehrmechanismen, um Stresssignale zu reduzieren und somit Zellschäden vorzubeugen.

Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen N und C ist für die normale Samenentwicklung entscheidend und wird streng kontrolliert, wobei dieses Gleichgewicht wichtiger ist, als die Einzelgehalte an N und C an sich. Leguminosensamen besitzen effektive Kontrollmechanismen um auf kleinste Veränderungen im N:C Haushalt zu reagieren und diesen wirksam auszugleichen. Dabei spielen Mitochondrien eine wesentliche Rolle.

6 Literaturverzeichnis

- Ahn, C. S., Lee, J. H., Hwang, A. R., Kim, W. T. and Pai, H. S.** (2006) Prohibitin is involved in mitochondrial biogenesis in plants. *Plant Journal* **46**, 658-667.
- Altenbach, S. B., Kuo, C. C., Staraci, L. C., Pearson, K. W., Wainwright, C., Georgescu, A. and Townsend, J.** (1992) Accumulation of a brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine. *Plant Molecular Biology* **18**, 235-245.
- Altenbach, S. B., Pearson, K. W. and Sun, S. S. M.** (1987) Transfer of a sulfur-rich protein gene from brazil nuts to other plants. *Journal of Cellular Biochemistry* **46-46**.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- André, B.** (1995) An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1575-1611.
- Andrews, M.** (1986) The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell and Environment* **9**, 511-519.
- Atkins, C.** (2000) Biochemical aspects of assimilate transfers along the phloem path: N-solutes in lupins. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 531-537.
- Azevedo, R. A., Arruda, P., Turner, W. L. and Lea, P. J.** (1997) The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* **46**, 395-419.
- Balconi, C., Bosio, D., Rizzi, E., Nembrini, L. and Motto, M.** (1997) Effects of organic and inorganic N supplies on protein and carbohydrates accumulation in high and low protein maize endosperms grown in vitro. *Maydica* **42**, 257-264.
- Balconi, C., Rizzi, E., Manzocchi, L., Soave, C. and Motto, M.** (1991) Analysis of in vivo and in vitro grown endosperms of high and low protein strains of maize. *Plant Science* **73**, 1-9.
- Baldet, P., Devaux, C., Chevalier, C., Brouquisse, R., Just, D. and Raymond, P.** (2002) Contrasted responses to carbohydrate limitation in tomato fruit at two stages of development. *Plant Cell and Environment* **25**, 1639-1649.
- Barratt, D. H. P.** (1982) Changes during development in the nitrogen, uncombined amino acid and carbohydrate contents of cotyledons from different cultivars and lines of field bean (*Vicia faba* L.). *Annals of Botany* **49**, 761-768.
- Bäumlein, H., Nagy, I., Villarroel, R., Inze, D. and Wobus, U.** (1992) Cis-analysis of a seed protein gene promotor: The conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. *Plant Journal* **2**, 233-239.
- Bennett, A. B. and Spanswick, R. M.** (1983) Depression of amino acid H⁺ co-transport in developing soybean embryos. *Plant Physiology* **72**, 781-786.
- Betty, M. and Smith, A. M.** (1990) Nature of the effect of the r locus on the lipid content of embryos of peas (*Pisum sativum* L.) *Planta* **180**, 420-428.
- Bewley, J. D.** (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Radchuk, R., Weschke, W., Wobus, U. and Weber, H.** (2004) Seed development and differentiation: A role for metabolic regulation. *Plant Biology* **6**, 375-386.
- Borisjuk, L., Walenta, S., Rolletschek, H., Mueller-Klieser, W., Wobus, U. and Weber, H.** (2002) Spatial analysis of plant metabolism: Sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *Plant Journal* **29**, 521-530.
- Borisjuk, L., Walenta, S., Weber, H., Mueller-Klieser, W. and Wobus, U.** (1998) High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *Plant Journal* **15**, 583-591.

- Borisjuk, L., Weber, H., Panitz, R., Manteuffel, R. and Wobus, U.** (1995) Embryogenesis of *Vicia faba* L: Histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. *Journal of Plant Physiology* **147**, 203-218.
- Boyer, C. D.** (1981) Starch granule formation in developing seeds of *Pisum sativum* L: Effekt of genotype. *American Journal of Botany* **68**, 659-665.
- Bradford, M. M.** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brett, C. T.** (2000) Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. In: *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 199*, ed, pub. by pp. 161-199.
- Brocard-Gifford, I. M., Lynch, T. J. and Finkelstein, R. R.** (2003) Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar and light signaling. *Plant Physiology* **131**, 78-92.
- Brouquisse, R., James, F., Pradet, A. and Raymond, P.** (1992) Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. *Planta* **188**, 384-395.
- Buchner, J.** (2002) Introduction: The cellular protein folding machinery. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 1587-1588.
- Burgess, D., Penton, A., Dunsmuir, P. and Dooner, H.** (1997) Molecular cloning and characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase cDNA clones isolated from pea cotyledons. *Plant Molecular Biology* **33**, 431-444.
- Bush, D. R.** (1993) Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 513-542.
- Casey, R., Domoney, C., Forster, C., Hedley, C., Hitchin, E. and Wang, T.** (1998) The effect of modifying carbohydrate metabolism on seed protein gene expression in peas. *Journal of Plant Physiology* **152**, 636-640.
- Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon, E. D. and Murray, A. W.** (1996) Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. *Science* **274**, 242-246.
- Chen, S., Hofius, D., Sonnewald, U. and Bornke, F.** (2003) Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *Plant Journal* **36**, 731-740.
- Chen, Y. R. and Tye, B. K.** (1995) The yeast MCM1 protein is regulated posttranscriptionally by the flux of glycolysis. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 4631-4639.
- Chevalier, C., Bourgeois, E., Just, D. and Raymond, P.** (1996) Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L) root tips. *Plant Journal* **9**, 1-11.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. and Zhu, J. K.** (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* **55**, 225-236.
- Chiwocha, S. D. S., Abrams, S. R., Ambrose, S. J., Cutler, A. J., Loewen, M., Ross, A. R. S. and Kermode, A. R.** (2003) A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: An analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant Journal* **35**, 405-417.
- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984) Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **81**, 1991-1995.
- Clarke, B. R., Denyer, K., Jenner, C. F. and Smith, A. M.** (1999) The relationship between the rate of starch synthesis, the adenosine 5'-diphosphoglucose concentration and the amylose content of starch in developing pea embryos. *Planta* **209**, 324-329.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 2110-2114.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. and Tavladoraki, P.** (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* **11**, 80-88.

- Cossegal, M., Chambrier, P., Mbello, S., Balzergue, S., Martin-Magniette, M. L., Moing, A., Deborde, C., Guyon, V., Perez, P. and Rogowsky, P.** (2008) Transcriptional and metabolic adjustments in ADP-glucose pyrophosphorylase-deficient bt2 maize kernels. *Plant Physiology* **146**, 1553-1570.
- Coxon, D. T. and Davies, D. R.** (1982) The effect of the ra and rb loci on the lipid content of the seed of *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* **64**, 47-50.
- Crawford, N. M. and Glass, A. D. M.** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* **3**, 389-395.
- Daschner, K., Couee, I. and Binder, S.** (2001) The mitochondrial isovaleryl-coenzyme A dehydrogenase of Arabidopsis oxidizes intermediates of leucine and valine catabolism. *Plant Physiology* **126**, 601-612.
- deJong, A., KoerselmanKooij, J. W., Schuurmans, J. and Borstlap, A. C.** (1997) The mechanism of amino acid efflux from seed coats of developing pea seeds as revealed by uptake experiments. *Plant Physiology* **114**, 731-736.
- Delrot, S., Atanassova, R. and Maurousset, L.** (2000) Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**, 281-306.
- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J. M., Vandenkoornhuysse, N., Maddelein, M. L., Fournet, B. and Ball, S.** (1992) Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: Monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *Journal of Bacteriology* **174**, 3612-3620.
- Delseny, M., Bies-Etheve, N., Carles, C., Hull, G., Vicent, C., Raynal, M., Grellet, F. and Aspart, L.** (2001) Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein gene regulation during Arabidopsis seed maturation. *Journal of Plant Physiology* **158**, 419-427.
- Denyer, K., Barber, L. M., Burton, R., Hedley, C. L., Hylton, C. M., Johnson, S., Jones, D. A., Marshall, J., Smith, A. M., Tatge, H., Tomlinson, K. and Wang, T. L.** (1995b) The isolation and characterization of novel low-amylose mutants of *Pisum sativum* L. *Plant Cell and Environment* **18**, 1019-1026.
- Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjornsen, T., Keeling, P. and Smith, A. M.** (1996) The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiology* **112**, 779-785.
- Denyer, K., Foster, J. and Smith, A. M.** (1995a) The contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase and starch-branching enzyme to the control of starch synthesis in developing pea embryos. *Planta* **197**, 57-62.
- Devaux, C., Baldet, P., Joubes, J., Dieuaide-Noubhani, M., Just, D., Chevalier, C. and Raymond, P.** (2003) Physiological, biochemical and molecular analysis of sugar-starvation responses in tomato roots. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1143-1151.
- Dickinson, D. and Preiss, J.** (1969) Presence of ADP-glucose pyrophosphorylase in Shrunken-2 and Brittle-2 mutants of maize endosperm. *Plant Physiology* **44**, 1058-1062.
- Domoney, C. and Casey, R.** (1985) Measurement of gene number for seed storage proteins in *Pisum*. *Nucleic Acids Research* **13**, 687-699.
- Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., Rupp, O., Sczyrba, A., Puhler, A. and Meyer, F.** (2003) EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *Journal of Biotechnology* **106**, 135-146.
- Dure, L. S.** (1975) Seed formation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **26**, 259-278.
- Edner, C., Li, J., Albrecht, T., Mahlow, S., Hejazi, M., Hussain, H., Kaplan, F., Guy, C., Smith, S. M., Steup, M. and Ritte, G.** (2007) Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial beta-amylases. *Plant Physiology* **145**, 17-28.
- Edwards, J. and ap Rees, T.** (1986) Metabolism of UDP-glucose by developing embryos of round and wrinkled varieties of *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **25**, 2033-2039.
- Ehneß, R. and Roitsch, T.** (1997) Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant Journal* **11**, 539-548.

- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G. and Fernie, A. R.** (2008) Highway or byway: The metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science* **13**, 14-19.
- Fatland, B., Anderson, M., Nikolau, B. J. and Wurtele, E. S.** (2000) Molecular biology of cytosolic acetyl-CoA generation. *Biochemical Society Transactions* **28**, 593-595.
- Ferguson, B. J., Wiebe, E. M. K., Emery, R. J. N. and Guinel, F. C.** (2005) Cytokinin accumulation and an altered ethylene response mediate the pleiotropic phenotype of the pea nodulation mutant R50 (sym16). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **83**, 989-1000.
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L. and Rock, C. D.** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14**, S15-S45.
- Finkelstein, R. R. and Gibson, S. I.** (2002) ABA and sugar interactions regulating development: Cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 26-32.
- Fischer, W. N., Andre, B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Breitzkreuz, K. and Frommer, W. B.** (1998) Amino acid transport in plants. *Trends in Plant Science* **3**, 188-195.
- Fischer, W. N., Kwart, M., Hummel, S. and Frommer, W. B.** (1995) Substrate-specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 16315-16320.
- Flinn, A. M. and Pate, J. S.** (1970) A quantitative study of carbon transfer from pod and subtending leaf to ripening seeds of field pea (*Pisum arvense* L.). *Journal of Experimental Botany* **21**, 71-82.
- Frommer, W. B., Hummel, S. and Riesmeier, J. W.** (1993) Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5944-5948.
- Frommer, W. B., Kwart, M., Hirner, B., Fischer, W. N., Hummel, S. and Ninnemann, O.** (1994) Transporters for nitrogenous compounds in plants. *Plant Molecular Biology* **26**, 1651-1670.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K.** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**, 151-158.
- Gansel, X., Munos, S., Tillard, P. and Gojon, A.** (2001) Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes AtNRT2.1 and AtAMT1.1 in *Arabidopsis*: Relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant Journal* **26**, 143-155.
- Ghosh, H. P. and Preiss, J.** (1966) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase: A regulatory enzyme in biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* **241**, 4491-4504.
- Gibson, S. I.** (2004) Sugar and phytohormone response pathways: Navigating a signaling network. *Journal of Experimental Botany* **55**, 253-264.
- Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. and Goodman, H. M.** (1992) Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**, 1251-1261.
- Giroux, M. J., Boyer, C., Feix, G. and Hannah, L. C.** (1994) Coordinated transcriptional regulation of storage product genes in the maize endosperm. *Plant Physiology* **106**, 713-722.
- Goldberg, R. B., Barker, S. J. and Perezgrau, L.** (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* **56**, 149-160.
- Goldberg, R. B., Depaiva, G. and Yadegari, R.** (1994) Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science* **266**, 605-614.
- Golombek, S., Rolletschek, H., Wobus, U. and Weber, H.** (2001) Control of storage protein accumulation during legume seed development. *Journal of Plant Physiology* **158**, 457-464.
- Götz, K. P., Staroske, N., Radchuk, R., Emery, R. J. N., Wutzke, K. D., Herzog, H. and Weber, H.** (2007) Uptake and allocation of carbon and nitrogen in *Vicia narbonensis* plants with increased seed sink strength achieved by seed-specific expression of an amino acid permease. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3183-3195.
- Groppa, M. D. and Benavides, M. P.** (2008) Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids* **34**, 35-45.

- Guerrero, F. D., Jones, J. T. and Mullet, J. E.** (1990) Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted: Sequence and expression of 3-inducible genes. *Plant Molecular Biology* **15**, 11-26.
- Hagel, I., Spieß, H. and Schnug, E.** (1998) Protein quality of old and modern winter wheat cultivars. In: *Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V.* Dresden, pp. 165-170.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P.** (1994) The small, versatile PPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* **25**, 989-994.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.** (2007) *Free radicals in biology and medicine* 4. edn, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hardham, A. R.** (1976) Structural aspects of pathways of nutrient flow to developing embryo and cotyledons of *Pisum sativum* L. *Australian Journal of Botany* **24**, 711-721.
- Hardie, D. G.** (1999) Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. In: *Biochemical Society Symposium, Cellular Responses to Stress*, Downes, C. P., Wolf, C. R. and Lane, D. P. ed, pub. by Portland Press Ltd London W1N 3AJ, England pp. 13-27.
- Harrison, C. J., Hedley, C. L. and Wang, T. L.** (1998) Evidence that the rug3 locus of pea (*Pisum sativum* L.) encodes plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate. *Plant Journal* **13**, 753-762.
- Heim, U., Weber, H., Baumlein, H. and Wobus, U.** (1993) A sucrose-synthase gene of *Vicia faba* L.: Expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* **191**, 394-401.
- Heldt, H. W., Flugge, U. I. and Borchert, S.** (1991) Diversity of specificity and function of phosphate translocators in various plastids. *Plant Physiology* **95**, 341-343.
- Hill, L. M. and Smith, A. M.** (1991) Evidence that glucose-6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastids of developing pea embryos. *Planta* **185**, 91-96.
- Hirner, B., Fischer, W. N., Rentsch, D., Kwart, M. and Frommer, W. B.** (1998) Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of Arabidopsis. *Plant Journal* **14**, 535-544.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L.** (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research* **16**, 9877-9877.
- Hohnjec, N., Vieweg, M. E., Puhler, A., Becker, A. and Kuster, H.** (2005) Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **137**, 1283-1301.
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. and Hoekema, A.** (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* **2**, 208-218.
- Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Devries, J. N., Adamse, P., Jacobsen, E., Witholt, B. and Feenstra, W. J.** (1988) Rapid estimation of the amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. *Potato Research* **31**, 241-246.
- Hsu, L. C., Chiou, T. J., Chen, L. S. and Bush, D. R.** (1993) Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7441-7445.
- Hylton, C. and Smith, A. M.** (1992) The rb mutation of peas causes structural and regulatory changes in ADP-glucose pyrophosphorylase from developing embryos. *Plant Physiology* **99**, 1626-1634.
- Ichihara, K., Kobayashi, N. and Saito, K.** (2003) Lipid synthesis and Acyl-CoA synthetase in developing rice seeds. *Lipids* **38**, 881-884.
- Jenner, C. F., Ugalde, T. D. and Aspinall, D.** (1991) The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**, 211-226.
- Karszen, C. M., Brinkhorst-vanderswan, D. L. C., Breeklund, A. E. and Koornneef, M.** (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: Studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**, 158-165.

- Karszen, C. M., Zagorski, S., Kepczynski, J. and Groot, S. P. C.** (1989) Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany* **63**, 71-80.
- Kavakli, I. H., Slattery, C. J., Ito, H. and Okita, T. W.** (2000) The conversion of carbon and nitrogen into starch and storage proteins in developing storage organs: An overview. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 561-570.
- Kleczkowski, L. A., Volland, P., Luthi, E., Olsen, O. A. and Preiss, J.** (1993) Intensity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiology* **101**, 179-186.
- Koch, K.** (2004) Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 235-246.
- Kofranyi, E. and Jekat, F.** (1964) Zur Bestimmung der biologischen Wertigkeit von Nahrungsproteinen. 8. Die Wertigkeit gemischter Proteine. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* **335**, 174-&.
- Kohl, S.** (2008) Modifikation der Saccharoseaufnahme in Erbsenembryonen: Genotypische und phänotypische Analyse transgener Samen und Pflanzen. Diplomarbeit. In: Naturwissenschaften, Pflanzenphysiologie, Universität Kassel, Kassel.
- Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., Dormann, P., Weckwerth, W., Gibon, Y., Stitt, M., Willmitzer, L., Fernie, A. R. and Steinhauser, D.** (2005) GMD@CSB.DB: The Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* **21**, 1635-1638.
- Künne, C., Lange, M., Funke, T., Miede, H., Thiel, T., Grosse, I. and Scholz, U.** (2005) CR-EST: A resource for crop ESTs. *Nucleic Acids Research* **33**, D619-D621.
- Kurz, M., Martin, H., Rassow, J., Pfanner, N. and Ryan, M. T.** (1999) Biogenesis of TIM proteins of the mitochondrial carrier import pathway: Differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 2461-2474.
- Küster, H., Hohnjec, N., Krajinski, F., El Yahyaoui, F., Manthey, K., Gouzy, J., Dondrup, M., Meyer, F., Kalinowski, J., Brechenmacher, L., van Tuinen, D., Gianinazzi-Pearson, V., Puhler, A., Gamas, P. and Becker, A.** (2004) Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to explore root endosymbioses in the model legume. *Medicago truncatula. Journal of Biotechnology* **108**, 95-113.
- Kwart, M., Hirner, B., Hummel, S. and Frommer, W. B.** (1993) Differential expression of 2 related amino acid transporters with differing substrate-specificity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **4**, 993-1002.
- Lalonde, S., Wipf, D. and Frommer, W. B.** (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 341-372.
- Lanfermeijer, F. C., Koerselmankooij, J. W. and Borstlap, A. C.** (1990) Effects of medium osmolarity on the release of amino acids from isolated cotyledons of developing pea seeds: Evidence for vacuolar amino acid release at increased turgor. *Planta* **181**, 568-575.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F. D., Filleur, S., Daniel-Vedele, F. and Gojon, A.** (1999) Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant Journal* **18**, 509-519.
- Leung, J. and Giraudat, J.** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 199-222.
- Lhuillier-Soundele, A., Munier-Jolain, N. G. and Ney, B.** (1999a) Influence of nitrogen availability on seed nitrogen accumulation in pea. *Crop Science* **39**, 1741-1748.
- Lhuillier-Soundele, A., Munier-Jolain, N. G. and Ney, B.** (1999b) Dependence of seed nitrogen concentration on plant nitrogen availability during the seed filling in pea. *European Journal of Agronomy* **11**, 157-166.
- Li, R., Moore, M. and King, J.** (2003) Investigating the regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **44**, 233-241.
- Lin, P. C., Hwang, S. G., Endo, A., Okamoto, M., Koshiba, T. and Cheng, W. H.** (2007) Ectopic expression of ABSCISIC ACID 2/GLUCOSE INSENSITIVE 1 in *Arabidopsis* promotes seed dormancy and stress tolerance. *Plant Physiology* **143**, 745-758.

- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. and Fernie, A. R.** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**, 387-396.
- Lister, R., Carrie, C., Duncan, O., Ho, L. H. M., Howell, K. A., Murcha, M. W. and Whelan, J.** (2007) Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *Plant Cell* **19**, 3739-3759.
- Lloyd, J. R., Wang, T. L. and Hedley, C. L.** (1996) An analysis of seed development in *Pisum sativum*: 19. Effect of mutant alleles at the r and rb loci on starch grain size and on the content and composition of starch in developing pea seeds. *Journal of Experimental Botany* **47**, 171-180.
- Lobreaux, S., Hardy, T. and Briat, J. F.** (1993) Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *Embo Journal* **12**, 651-657.
- Luedemann, A., Strassburg, K., Erban, A. and Kopka, J.** (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**, 732-737.
- MacDonald, F. D. and Preiss, J.** (1985) Partial purification and characterization of granule-bound starch synthases from normal and waxy maize. *Plant Physiology* **78**, 849-852.
- MacKintosh, C.** (1998) Regulation of cytosolic enzymes in primary metabolism by reversible protein phosphorylation. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 224-229.
- Martin, C. and Smith, A. M.** (1995) Starch biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 971-985.
- Matt, P., Schurr, U., Klein, D., Krapp, A. and Stitt, M.** (1998) Growth of tobacco in short-day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes in the Nia transcript and low nitrate reductase activity, and inhibition of amino acid synthesis. *Planta* **207**, 27-41.
- McCarty, D. R., Hattori, T., Carson, C. B., Vasil, V., Lazar, M. and Vasil, I. K.** (1991) The Viviparous-1 developmental gene of Maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* **66**, 895-905.
- Mendel, G.** (1866) Versuche über Pflanzenhybride. In: *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn*, ed. pub. by Brünn, pp.
- Meyer, F. D., Smidansky, E. D., Beecher, B., Greene, T. W. and Giroux, M. J.** (2004) The maize Sh2r6hs ADP-glucose pyrophosphorylase (AGP) large subunit confers enhanced AGP properties in transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Science* **167**, 899-911.
- Micallef, B. J. and Shelp, B. J.** (1989a) Arginine metabolism in developing soybean cotyledons: I. Relationship to nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **90**, 624-630.
- Micallef, B. J. and Shelp, B. J.** (1989b) Arginine metabolism in developing soybean cotyledons: III. Utilization. *Plant Physiology* **91**, 170-174.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I. and Wasternack, C.** (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist* **177**, 114-127.
- Miersch, O., Weichert, H., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Feussner, I. and Wasternack, C.** (2004) Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves. *Phytochemistry* **65**, 847-856.
- Mifflin, B. J. and Lea, P. J.** (1977) Amino acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **28**, 299-329.
- Minchin, F. R., Becana, M. and Sprent, J. I.** (1989) Short-term inhibition of legume N₂ fixation by nitrate: II. Nitrate effects on nodule oxygen diffusion. *Planta* **180**, 46-52.
- Miranda, M., Borisjuk, L., Tewes, A., Heim, U., Sauer, N., Wobus, U. and Weber, H.** (2001) Amino acid permeases in developing seeds of *Vicia faba* L.: expression precedes storage protein synthesis and is regulated by amino acid supply. *Plant Journal* **28**, 61-71.
- Møller, I. M.** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 561-591.

- Müller-Röber, B., Sonnewald, U. and Willmitzer, L.** (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *Embo Journal* **11**, 1229-1238.
- Müller, M. and Knudsen, S.** (1993) The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. *Plant Journal* **4**, 343-355.
- Müntz, K.** (1978) Cell specialisation processes during embryogenesis and storage of proteins in plant seeds. In: *Proc Int Conf, Halle, Regulation of developmental processes in plants*, H.R. Schütt, D. G. ed, pub. by VEB Fischer, Jena, pp. 70-97.
- Müntz, K.** (1982) Seed development: Nucleic acids and proteins in plants. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, Springer, New York, D Boulter, B. P. ed, pub. by Springer, New York, pp. 505-558.
- Neuhaus, H. E. and Stitt, M.** (1990) Control analysis of photosynthate partitioning: Impact of reduced activity of ADP-glucose pyrophosphorylase or plastid phosphoglucomutase on the fluxes to starch and sucrose in *Arabidopsis thaliana* (L). *Planta* **182**, 445-454.
- Offler, C. E., McCurdy, D. W., Patrick, J. W. and Talbot, M. J.** (2003) Transfer cells: Cells specialized for a special purpose. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 431-454.
- Offler, C. E. and Patrick, J. W.** (1993) Pathway of photosynthate transfer in the developing seed of *Vicia faba* L: A structural assessment of the role of transfer cells in unloading from seed coat. *Journal of Experimental Botany* **44**, 711-724.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwalhara, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S.** (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**, 1591-1604.
- Okita, T. W.** (1992) Is there an alternative pathway for starch synthesis. *Plant Physiology* **100**, 560-564.
- Okita, T. W., Nakata, P. A., Anderson, J. M., Sowokinos, J., Morell, M. and Preiss, J.** (1990) The subunit of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* **93**, 785-790.
- Okumoto, S., Schmidt, R., Tegeder, M., Fischer, W. N., Rentsch, D., Frommer, W. B. and Koch, W.** (2002) High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 45338-45346.
- Ortiz-Lopez, A., Chang, H. C. and Bush, D. R.** (2000) Amino acid transporters in plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**, 275-280.
- Panitz, R., Manteuffel, R., Bäumlein, H. and Wobus, U.** (1997) Biphasic expression of a *Vicia faba* legumin B gene in developing seeds of transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology* **150**, 115-126.
- Patrick, J. W. and McDonald, R.** (1980) Pathway of carbon transport within developing ovules of *Phaseolus vulgaris* L. *Australian Journal of Plant Physiology* **7**, 671-684.
- Perez, C. M., Perdon, A. A., Resurreccion, A. P., Villareal, R. M. and Juliano, B. O.** (1975) Enzymes of carbohydrate metabolism in developing rice grain. *Plant Physiology* **56**, 579-583.
- Perez, M. D., Chambers, S.J., Bacon, J.R., Lambert, N., Hedley, C.L., Wang, T.** (1993) Seed protein content and composition of near-isogenic and induced mutant pea lines. *Seed Science Research* **3**, 187-194.
- Pickardt, T., Ziervogel, B., Schade, V., Ohi, L., Baumlein, H. and Meixner, M.** (1998) Developmental-regulation and tissue-specific expression of two different seed promoter GUS-fusions in transgenic lines of *Vicia narbonensis*. *Journal of Plant Physiology* **152**, 621-629.
- Pines, J.** (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: A biochemical view. *Biochemical Journal* **308**, 697-711.
- Pohlmeyer, K., Soll, J., Steinkamp, T., Hinnah, S. and Wagner, R.** (1997) Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9504-9509.

- Pozueta-Romero, J., Ardila, F. and Akazawa, T. (1991) ADP-glucose transport by the chloroplast adenylate translocator is linked to starch biosynthesis. *Plant Physiology* **97**, 1565-1572.
- Preiss, J., Ball, K., Smithwhite, B., Iglesias, A., Kakefuda, G. and Li, L. (1991) Starch biosynthesis and its regulation. *Biochemical Society Transactions* **19**, 539-547.
- Price, J., Li, T. C., Kang, S. G., Na, J. K. and Jang, J. C. (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. *Plant Physiology* **132**, 1424-1438.
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M. M., de Felipe, M. R., Harrison, J., Vanacker, H. and Foyer, C. H. (2005) Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist* **165**, 683-701.
- Qin, X. Q. and Zeevaart, J. A. D. (2002) Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology* **128**, 544-551.
- Radchuk, R., Radchuk, V., Goetz, K. P., Weichert, H., Richter, A., Emery, R. J. N., Weschke, W. and Weber, H. (2007) Ectopic expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Vicia narbonensis* seeds: Effects of improved nutrient status on seed maturation and transcriptional regulatory networks. *Plant Journal* **51**, 819-839.
- Radchuk, R., Radchuk, V., Weschke, W., Borisjuk, L. and Weber, H. (2006) Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiology* **140**, 263-278.
- Raz, V., Bergervoet, J. H. W. and Koornneef, M. (2001) Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. *Development* **128**, 243-252.
- Regierer, B., Fernie, A. R., Springer, F., Perez-Melis, A., Leisse, A., Koehl, K., Willmitzer, L., Geigenberger, P. and Kossmann, J. (2002) Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants. *Nature Biotechnology* **20**, 1256-1260.
- Rentsch, D., Boorer, K. J. and Frommer, W. B. (1998) Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *Journal of Membrane Biology* **162**, 177-190.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. M. S. and Murray, J. A. H. (2000) Sugar control of the plant cell cycle: Differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 4513-4521.
- Rochat, C., Wuilleme, S., Boutin, J. P. and Hedley, C. L. (1995) A mutation at the rb gene, lowering ADPGPPase activity, affects storage product metabolism of pea seed coats. *Journal of Experimental Botany* **46**, 415-421.
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L. and Fernie, A. R. (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* **13**, 11-29.
- Roitsch, T. and Ehneß, R. (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* **32**, 359-367.
- Rolletschek, H., Borisjuk, L., Radchuk, R., Miranda, M., Heim, U., Wobus, U. and Weber, H. (2004) Seed-specific expression of a bacterial phosphoenolpyruvate carboxylase in *Vicia narbonensis* increases protein content and improves carbon economy. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 211-219.
- Rolletschek, H., Hajirezaei, M. R., Wobus, U. and Weber, H. (2002) Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars and leads to higher water and nitrogen uptake. *Planta* **214**, 954-964.
- Rolletschek, H., Hosein, F., Miranda, M., Heim, U., Götz, K. P., Schlereth, A., Borisjuk, L., Saalbach, I., Wobus, U. and Weber, H. (2005) Ectopic expression of an amino acid transporter (VfAAP1) in seeds of *Vicia narbonensis* and pea increases storage proteins. *Plant Physiology* **137**, 1236-1249.

- Rontein, D., Dieuaide-Noubhani, M., Dufourc, E. J., Raymond, P. and Rolin, D. (2002) The metabolic architecture of plant cells: Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43948-43960.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C. and Bevan, M. W. (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signaling. *Plant Journal* **26**, 421-433.
- Rook, F., Hadingham, S.A., Li, Y. and Bevan, M.W. (2000) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell and Environment* **29**, 426-434.
- Sagan, M., Ney, B. and Duc, G. (1993) Plant symbiotic mutants as a tool to analyze nitrogen nutrition and yield relationship in field-grown peas (*Pisum sativum* L). *Plant and Soil* **153**, 33-45.
- Salon, C., Munier-Jolain, N. G., Duc, G., Voisin, A. S., Grandgirard, D., Larmure, A., Emery, R. J. N. and Ney, B. (2001) Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: A review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie* **21**, 539-552.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual* 2. edn, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K. and Stitt, M. (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiology* **136**, 2483-2499.
- Schroeder, H. E., Schotz, A. H., Wardleyrichardson, T., Spencer, D. and Higgins, T. J. V. (1993) Transformation and regeneration of 2 cultivars of pea (*Pisum sativum* L). *Plant Physiology* **101**, 751-757.
- Seiler, C. (2008) Funktionelle Charakterisierung von Peptid- und Aminosäuretransportern in Leguminosen und Gerste in Relation zur Proteinakkumulation im Samen Dissertation. In: Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale.
- Sen, A. K. (1996) On the sign pattern of metabolic control coefficients. *Journal of Theoretical Biology* **182**, 269-275.
- Shewry, P. R., Napier, J. A. and Tatham, A. S. (1995) Seed storage proteins: Structure and biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 945-956.
- Simpson, R. J., Lambers, H. and Dalling, M. J. (1982) Kinetin application to roots and its effect on uptake, translocation and distribution of nitrogen in wheat (*Triticum aestivum*) grown with a split root system. *Physiologia Plantarum* **56**, 430-435.
- Sinclair, T. R. (1998) Historical changes in harvest index and crop nitrogen accumulation. *Crop Science* **38**, 638-643.
- Slocum, R. D. (2005) Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 729-745.
- Smeeckens, S. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 49-81.
- Smidansky, E. D., Meyer, F. D., Blakeslee, B., Weglarz, T. E., Greene, T. W. and Giroux, M. J. (2007) Expression of a modified ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit in wheat seeds stimulates photosynthesis and carbon metabolism. *Planta* **225**, 965-976.
- Smith, A. M., Bettley, M. and Bedford, I. D. (1989) Evidence that the rb locus alters the starch content of developing pea embryos through an effect on ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* **89**, 1279-1284.
- Smith, A. M. and Denyer, K. (1992) Starch synthesis in developing pea embryos. *New Phytologist* **122**, 21-33.
- Smith, A. M., Denyer, K. and Martin, C. (1997) The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 65-87.

- Smith, A. M., Denyer, K. and Martin, C. R.** (1995) What controls the amount and structure of starch in storage organs. *Plant Physiology* **107**, 673-677.
- Smith, A. M., Martin, C. and Denyer, K.** (1991) The pathway of starch synthesis in developing pea embryos. *Biochemical Society Transactions* **19**, 547-550.
- Smith, A. M., Quinton-Tulloch, J. and Denyer, K.** (1990) Characteristics of plastids responsible for starch synthesis in developing pea embryos. *Planta* **180**, 517-523.
- Sreedhar, L. and Bewley, J. D.** (1998) Nitrogen- and sulfur-containing compounds enhance the synthesis of storage reserves in developing somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science* **134**, 31-44.
- Stadler, R., Wright, K. M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K. J. and Sauer, N.** (2005) Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant Journal* **41**, 319-331.
- Stark, D. M., Timmerman, K. P., Barry, G. F., Preiss, J. and Kishore, G. M.** (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science* **258**, 287-292.
- Stickland, R. G. and Wilson, K. E.** (1983) Sugars and starch in developing round and wrinkled pea seeds. *Annals of Botany* **52**, 919-921.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. and Farmer, E. E.** (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12837-12842.
- Stitt, M.** (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 178-186.
- Sweetlove, L. J., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Williams, T. and Fernie, A. R.** (2007) The mitochondrion: An integration point of cellular metabolism and signaling. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**, 17-43.
- Sweetlove, L. J., Muller-Rober, B., Willmitzer, L. and Hill, S. A.** (1999) The contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers. *Planta* **209**, 330-337.
- Sze, H., Li, X. H. and Palmgren, M. G.** (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* **11**, 677-689.
- Taber, L. M., Higgins, C. M., McNabb, W. C. and Higgins, T. J. V.** (1993) Genetic engineering of grain and pasture legumes for improved nutritive value. *Genetica* **90**, 181-200.
- Tegeder, M., Offler, C. E., Frommer, W. B. and Patrick, J. W.** (2000) Amino acid transporters are localized to transfer cells of developing pea seeds. *Plant Physiology* **122**, 319-325.
- Tegeder, M., Wang, X. D., Frommer, W. B., Offler, C. E. and Patrick, J. W.** (1999) Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *Plant Journal* **18**, 151-161.
- Terano, S. and Suzuki, Y.** (1978) Formation of beta-alanine from spermine and spermidine in maize shoots. *Phytochemistry* **17**, 148-149.
- Tetlow, I. J., Blissett, K. J. and Emes, M. J.** (1994) Starch synthesis and carbohydrate oxidation in amyloplasts from developing wheat endosperm. *Planta* **194**, 454-460.
- Thorbjornsen, T., Villand, P., Denyer, K., Olsen, O. A. and Smith, A. M.** (1996) Distinct isoforms of ADP-glucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *Plant Journal* **10**, 243-250.
- Tillard, P., Passama, L. and Gojon, A.** (1998) Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO₃⁻ uptake in *Ricinus communis* plants? *Journal of Experimental Botany* **49**, 1371-1379.
- Tomas, A., Futter, C. and Moss, S. E.** (2004) Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis. *Journal of Cell Biology* **165**, 813-822.
- Truernit, E. and Sauer, N.** (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**, 564-570.

- Turner, S. R., Barratt, D. H. P. and Casey, R. (1990) The effect of different alleles at the r locus on the synthesis of seed storage proteins in *Pisum sativum*. *Plant Molecular Biology* **14**, 793-803.
- Usadel, B., Blasing, O. E., Gibon, Y., Retzlaff, K., Hoehne, M., Gunther, M. and Stitt, M. (2008) Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in Arabidopsis rosettes. *Plant Physiology* **146**, 1834-1861.
- Van den Koornhuysse, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Carton, A., Preiss, J. and Ball, S. (1996) Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 16281-16287.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids* **35**, 753-759.
- Vertregt, N. and Devries, F. (1987) A rapid method for determining the efficiency of biosynthesis of plant biomass. *Journal of Theoretical Biology* **128**, 109-119.
- von Wirén, N., Gazzarrini, S. and Frommer, W. B. (1997) Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil* **196**, 191-199.
- Wang, H., Qi, Q. G., Schorr, P., Cutler, A. J., Crosby, W. L. and Fowke, L. C. (1998a) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant Journal* **15**, 501-510.
- Wang, T. L., Bogracheva, T. Y. and Hedley, C. L. (1998b) Starch: As simple as A, B, C? *Journal of Experimental Botany* **49**, 481-502.
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **100**, 681-697.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N. and Wobus, U. (1997b) A role for sugar transporters during seed development: Molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* **9**, 895-908.
- Weber, H., Borisjuk, L. and Wobus, U. (1997a) Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science* **2**, 169-174.
- Weber, H., Borisjuk, L. and Wobus, U. (2005) Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 253-279.
- Weber, H., Buchner, P., Borisjuk, L. and Wobus, U. (1996) Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: Expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *Plant Journal* **9**, 841-850.
- Weber, H., Golombek, S., Heim, U., Borisjuk, L., Panitz, R., Manteuffel, R. and Wobus, U. (1998a) Integration of carbohydrate and nitrogen metabolism during legume seed development: Implications for storage product synthesis. *Journal of Plant Physiology* **152**, 641-648.
- Weber, H., Heim, U., Borisjuk, L. and Wobus, U. (1995) Cell-type specific, coordinate expression of 2 ADP-glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *Vicia faba* L. *Planta* **195**, 352-361.
- Weber, H., Heim, U., Golombek, S., Borisjuk, L., Manteuffel, R. and Wobus, U. (1998b) Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *Plant Journal* **16**, 163-172.
- Weber, H., Radchuk, R., Weigelt, K. and Saalbach, I. (2009) Changing metabolic pathways to manipulate legume seed maturation and composition. In: *Modification of seed composition to promote health and nutrition*, Krishnan, H. ed, pub. by American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI 53711, USA, pp. 55-77
- Weber, H., Rolletschek, H., Heim, U., Golombek, S., Gubatz, S. and Wobus, U. (2000) Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds of *Vicia narbonensis* moderately decreases starch but increases protein content and affects seed maturation. *Plant Journal* **24**, 33-43.

- Weigelt, K., Küster, H., Radchuk, R., Müller, M., Weichert, H., Fait, A., Fernie, A. R., Saalbach, I. and Weber, H.** (2008) Increasing amino acid supply in pea embryos reveals specific interactions of N and C metabolism and highlights the importance of mitochondrial metabolism. *Plant Journal* **55**, 909-926.
- Weigelt, K., Küster, H., Rutten, T., Fait, A., Fernie, A. R., Miersch, O., Wasternack, C., Emery, R. J. N., Desel, C., Hosein, F., Müller, M., Saalbach, I. and Weber, H.** (2009) ADP-glucose pyrophosphorylase deficient pea embryos reveal specific transcriptional and metabolic changes of carbon-nitrogen metabolism and stress responses. *Plant Physiology* **149**, 395-411.
- West, M. A. L. and Harada, J. J.** (1993) Embryogenesis in higher plants: An overview. *Plant Cell* **5**, 1361-1369.
- Williams, L. E. and Miller, A. J.** (2001) Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 659-688.
- Wobus, U., Baumlein, H., Bassuner, R., Heim, U., Jung, R., Muntz, K., Saalbach, G. and Weschke, W.** (1986) Characteristics of two types of legumin genes in the field bean (*Vicia faba* L. var. minor) genome as revealed by cDNA analysis. *Febs Letters* **201**, 74-80.
- Wobus, U. and Weber, H.** (1999a) Seed maturation: Genetic programmes and control signals. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 33-38.
- Wobus, U. and Weber, H.** (1999b) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biological Chemistry* **380**, 937-944.
- Wright, K. M., Roberts, A. G., Martens, H. J., Sauer, N. and Oparka, K. J.** (2003) Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to AtSUC2 promoter activity. *Plant Physiology* **131**, 1555-1565.
- Xu, D. P., Duan, X. L., Wang, B. Y., Hong, B. M., Ho, T. H. D. and Wu, R.** (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* **110**, 249-257.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Youle, R. J. and Huang, A. H. C.** (1981) Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. *American Journal of Botany* **68**, 44-48.

A Anhang

A.1 Schema der für die Co-Transformation verwendeten Vektoren

Zur Überexpression der Aminosäurepermease 1 aus *Vicia faba* wurde das Konstrukt, bestehend aus *LeB4*-Promotor, Transgen *VfAAP1* und *ocs*-Terminator, in den Vektor PZP200 kloniert. Anschließend erfolgte die Agrobacterium-vermittelte Co-Transformation der beiden Binärvektoren pLeB4/*VfAAP1*/PZP200 und pCambia3300 in Erbse (*Pisum sativum*, Abb. A.1).

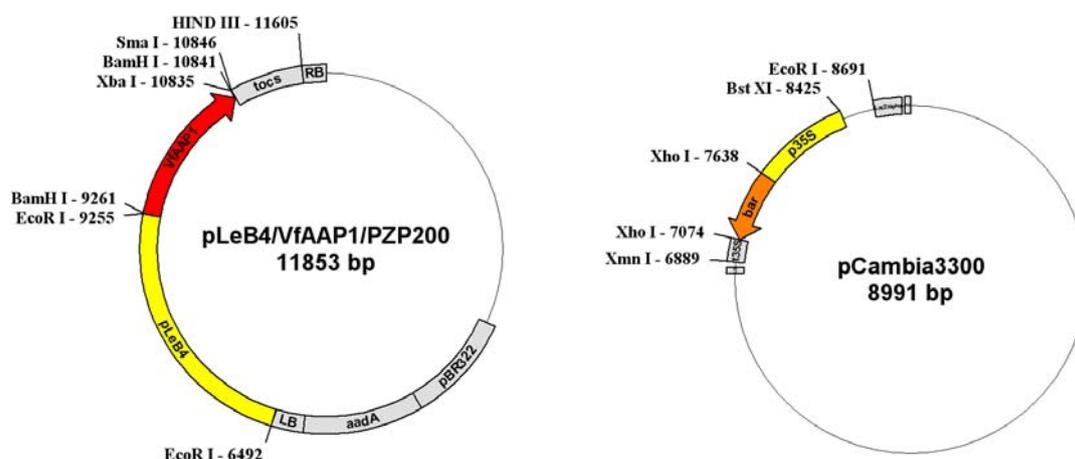


Abb. A.1 Schematische Darstellung der binären Vektoren pLeB4/*VfAAP1*/PZP200 und pCambia3300.

Binärvektor pLeB4/*VfAAP1*/PZP200; LeB4: Legumin B4 Promotor, *VfAAP1*: Aminosäurepermease 1 aus *V. faba*, tocs: Terminator des Octopinsynthesegens aus *A. tumefaciens*, pBR322 (ori): Replikationsstart des Plasmids pBR322, *aadA*: bakterielle Aminoglycosid-3-Adenyltransferase vermittelt Spectinomycin und Streptomycin Resistenz, LB und RB: linke und rechte Bordersequenz

pCambia3300; p35S: CaMV35S-Promotor, bar: Phosphinotricin-Acetyltransferase aus *S. hygroscopicus* vermittelt Basta®-Resistenz, t35S: CaMV35S-PolyA-Terminator, LacZ alpha: β-Galactosidase zur Blau/Weiß-Detektion transformierter Bakterien, LB und RB: linke und rechte Bordersequenz

Die Inhibierung der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase erfolgte mittels RNAi-vermittelten *loss of function* Ansatz. Dazu wurde das *Hairpin*-Konstrukt, bestehend aus AGP-Fragment in *sense* und *antisense* Richtung, getrennt durch das *potGA20oxi*-Intron, zusammen mit dem *LeB4*-Promotor und *ocs*-Terminator in den Binärvektor PZP200 kloniert. Danach erfolgte die Co-Transformation der Vektoren pLeB4/*iAGP*/PZP200 und pCambia3300 mit dem Selektionsmarker in Erbse (*Pisum sativum*, Abb. A.2).

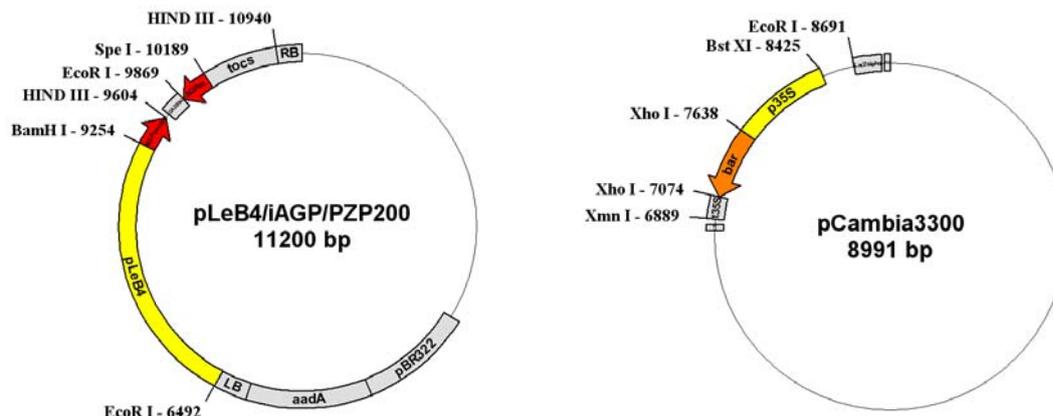


Abb. A.2 Schema der Binärvektoren pLeB4/iAGP/PZP200 und pCambia3300

Binärvektor pLeB4/iAGP/PZP200; LeB4: Legumin B4 Promotor, AGPsense und AGPas: Gen der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase in *sense* und *antisense* Orientierung, potGA20oxi: Intron der Gibberellin-20-Oxidase von *S. tuberosum*, tocs: Terminator des Octopinsynthasegens aus *A. tumefaciens*, pBR322 (ori): Replikationsstart des Plasmids pBR322, aadA: bakterielle Aminoglycosid-3-Adenyltransferase vermittelt Spectinomycin und Streptomycin Resistenz, LB und RB: linke und rechte Bordersequenz
 Binärvektor pCambia3300; p35S: CaMV35S-Promotor, bar: Phosphinotricin-Acetyltransferase aus *S. hygroscopicus* vermittelt Basta®-Resistenz, t35S: CaMV35S-PolyA-Terminator, LacZ alpha: β-Galactosidase zur Blau/Weiß-Detektion transformierter Bakterien, LB und RB: linke und rechte Bordersequenz

Zur Expression von *VfAAP1* unter Kontrolle des phloemspezifischen Promotors *AtSUC2* wurde die Überexpressionskassette pAtSUC2-VfAAP1 (Seiler, 2008) mit dem ocs-Terminator in den pBAR-Vektor kloniert und anschließend der entstandene Binärvektor pAtSUC2/VfAAP1/pBAR in Erbse (*Pisum sativum*, Abb. A.3) transformiert.

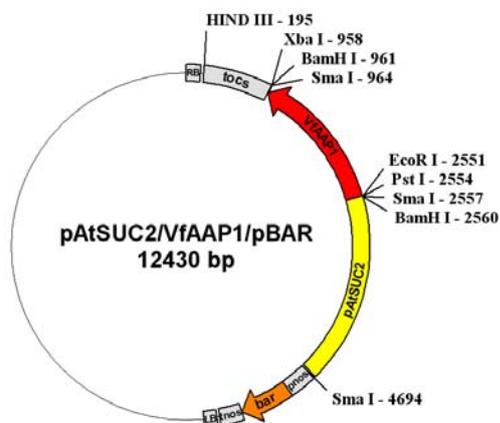


Abb. A.3 Schema des Binärvektors pAtSUC2/VfAAP1/pBAR.

AtSUC2: Promotor des Saccharosetransporters 2 aus *A. thaliana*, VfAAP1: Aminosäurepermease 1 aus *V. faba*, tocs: Terminator des Octopinsynthasegens aus *A. tumefaciens*, pnos und tnos: Promotor bzw. Terminator des Nopalinsynthasegens, bar: Phosphinotricin-Acetyltransferase aus *S. hygroscopicus* vermittelt Basta®-Resistenz, LB und RB: linke und rechte Bordersequenz

A.2 Zusammenfassung der Transkript- und Metabolitdaten

Eine Auswahl der differenziell regulierten Gene in den transgenen AAP1- bzw. iAGP-Samen, die Einfluss auf Glycolyse, TCA-Zyklus, Aminosäure- und Stärkestoffwechsel haben, wurde in Kombination mit den veränderten Metaboliten in den Schemata Abb. A.4 bzw. Abb. A.5 dargestellt. Die folgenden Tabellen (Tab. A.1 – Tab. A.4) listen die verschiedenen exprimierten Gene und ihre Funktionen in den unterschiedlichen Stoffwechselprozessen auf. Hierbei enthält Tab. A.1 und Tab. A.3 die Gene mit erhöhter Transkriptmenge (hochreguliert) und Tab. A.2 und Tab. A.4 mit reduzierter Transkriptakkumulation (herunterreguliert) in den AAP1- bzw. iAGP-Samen im Vergleich zum Wildtyp.

Die vollständige Liste der annotierten Gene der AAP1- bzw. iAGP-Samen ist im Anhang der Veröffentlichungen Weigelt et al., 2008 bzw. 2009 zu finden: *Table S1* bis *S4* für AAP1-Embryonen (Weigelt et al., 2008) und *Supplemental Table S2* für iAGP-Embryonen (Weigelt et al., 2009).

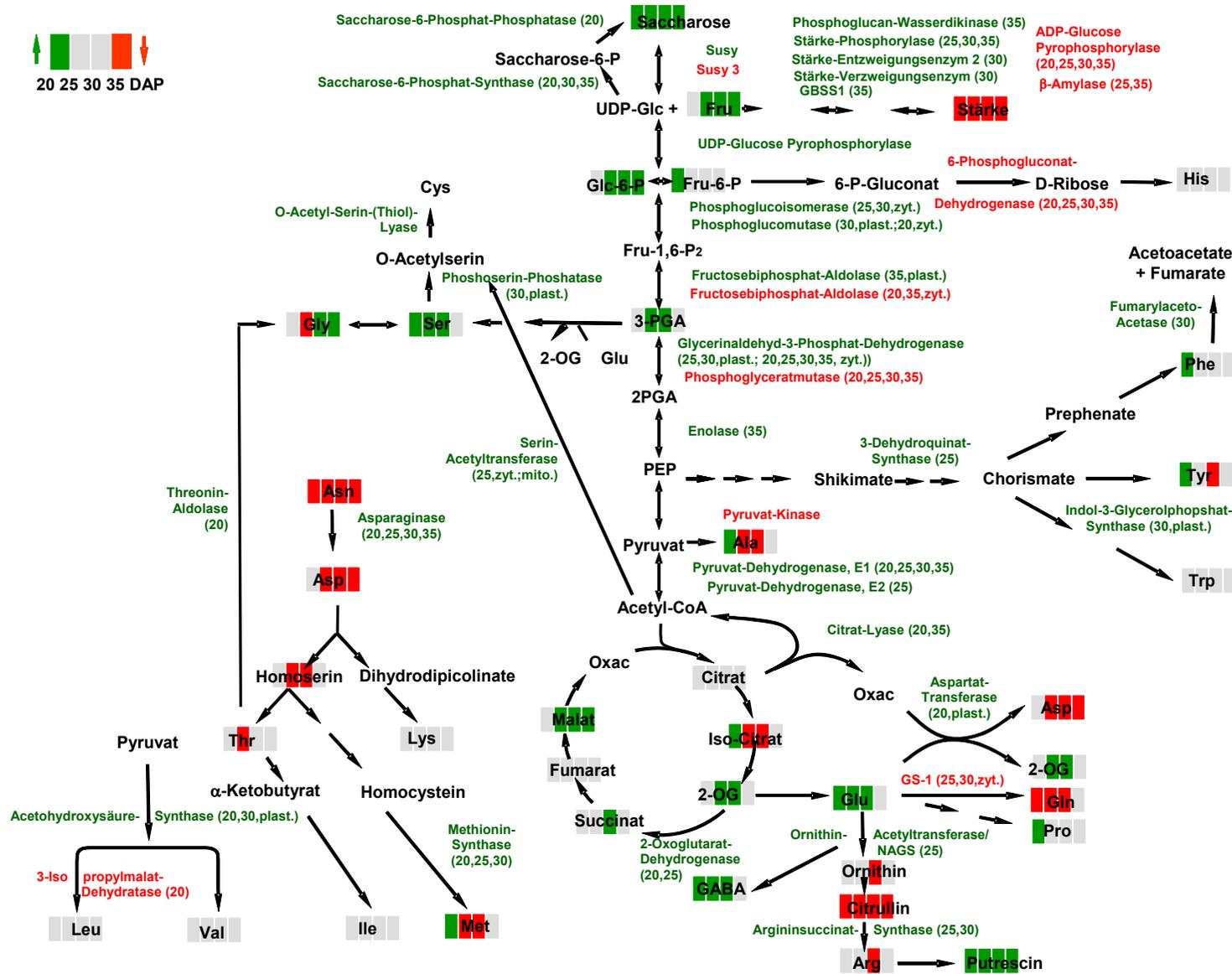


Abb. A.5 Schematische Darstellung transkriptioneller und metabolischer Veränderungen in den iAGP-Embryonen

Das Schema zeigt ausgewählte Prozesse des Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsels. Zusammenfassung differenziell expremierter Gene verschiedener Stadien (20, 25, 30, 35; in Klammern) basierend auf den Daten der Microarray-Analyse Tab. A.3 und Tab. A.4 kombiniert mit Daten der Metabolitanalyse (Abb. 3.23) mittels GC-MS. Entwicklungsstadien (20, 25, 30, 35) als Kästchen je Zeitpunkt dargestellt. Farbcode; grün: verstärkt exprimiertes Gen, erhöhter Metabolitgehalt; rot: verringert exprimiertes Gen, erniedrigter Metabolitgehalt in den iAGP-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp.

Tab. A.1 Annotierte Gene und ihre mögliche Funktion im Samenstoffwechsel mit erhöhter Transkriptmenge der AAP1-Embryonen mittels Microarray-Analyse (Faktor ≥ 1.7 , p-Wert ≤ 0.05). DAP: Entwicklungsstadien 18, 22, 26, 30; Oligo-ID: Bezeichnung 70bp Oligonucleotid von *P. sativum*.

Oligo-ID	Annotation	DAP	Faktor	Funktion
Transkriptionsfaktoren				
PSOLI04321	Transkriptionsfaktor, <i>V.faba</i>	22	2.0	Regulation der Transkription
PSOLI04336	AP2/EREBP Transkriptionsfaktor ERF-2	22, 26	1.7, 1.8	Regulation der Transkription
PSOLI04407	bZIP Transkriptionsfaktor	26, 30	1.9, 1.8	Regulation der Transkription
PSOLI04538	bZIP Transkriptionsfaktor ATB2	30	2.3	Regulation der Transkription
PSOLI03119	HD ZIP homeotisches Protein	26	2.8	Regulation der Transkription
PSOLI04756	BTF3 Transkriptionsfaktor	26	1.7	Regulation der Transkription
PSOLI04774	Transkriptionsfaktor, <i>V.faba</i>	26	1.7	Regulation der Transkription
Aminosäurestoffwechsel				
PSOLI09092	Aspartat-Aminotransferase	18	1.7	Asparaginsäure-Stoffwechsel
PSOLI04409	Asparagin-Synthase, ASN1	22,26,30	1.9, 3.5, 2.1	Asparaginsäure-Synthese
PSOLI05021	Threonin-Synthase, plast.	22	2.3	Threonin-Synthese
PSOLI04128	Serin/Glycin-Hydroxymethyltransferase, mito.	26,30	2.9, 2.9	Serin/Glycin-Umwandlung
PSOLI01308	Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase	26	2.1	Histidin-Synthese
PSOLI04228	Methionin-Synthase	30	2.1	Methionin-Synthese
PSOLI00518	Glutamin-Synthetase GS1	26	1.9, 1.8	Glutamin-Synthese
PSOLI04625	Arginin-Decarboxylase; P.s.	22	2.1	Arginin-Katabolismus
PSOLI04364	Aminomethyltransferase, mito.	22	2.0	Glycin-Katabolismus
PSOLI03136	Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase	26	6.2	Leucin- u. Valin-Katabolismus
PSOLI02433	Pyridoxal-abhängige Decarboxylase	26	1.8	Aminosäure-Decarboxylierung
Kohlenhydratstoffwechsel				
PSOLI01278, PSOLI04390, PSOLI03580	Saccharose-Synthase 1 (3x)	18,22	2.7, 2.5, 2.4	Saccharosespaltung
PSOLI0443	Saccharose-Synthase 3	18	1.8	Saccharosespaltung
PSOLI03580	Saccharose-Synthase	22	3.2	Saccharosespaltung
PSOLI04847	Phosphoglyceratkinase, zyto.	22	1.9	Glycolyse
PSOLI04285, PSOLI02459	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, zyto. (2x)	22	3.0, 2.1	Glycolyse
PSOLI04156, PSOLI04213	Enolase (2x)	22	1.8, 1.7	Glycolyse
PSOLI04424, PSOLI01749	Triosephosphat-Isomerase (2x)	22	1.7, 1.7	Glycolyse
PSOLI05180	Neutrale Invertase	26	2.0	Saccharosespaltung
PSOLI02303	Saccharosephosphat-Synthase	26	1.9	Saccharosesynthese
PSOLI01342	Phosphoglyceratmutase	30	6.4	Glycolyse
Zellwandbiosynthese				
PSOLI00739	Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase, M.t	26	3.1	Zellwandstoffwechsel
PSOLI00535, PSOLI00615	UDP-Glucose-4-Epimerase, P.s. (2x)	26, 30	2.2, 2.0, 2.2	Zellwandstoffwechsel
PSOLI01267	UDP-D-Glucuronat-Decarboxylase	26	2.2	Zellwandstoffwechsel
PSOLI00398	UDP-Glucosyltransferase	26, 30	2.1, 4.9	Zellwandstoffwechsel
PSOLI03776	UDP-Glucose-6-Dehydrogenase	26	2.1	Zellwandstoffwechsel
PSOLI04316, PSOLI03170	Umkehrbares glycosylierendes Polypeptid-2 (2x)	26	2.0, 1.7	Zellwandstoffwechsel
PSOLI04435	Polygalacturonase	26	1.9	Zellwandstoffwechsel
PSOLI03554	Endoxyloglucan-Transferase	26	1.8	Zellwandstoffwechsel
PSOLI00974	Alpha-L-Arabinofuranosidase	26	1.8	Zellwandstoffwechsel
PSOLI03998	Cinnamylalkohol-Dehydrogenase	26	2.3	Zellwandstoffwechsel
PSOLI04473	dTDP-Glucose-4-6-Dehydratase	30	2.1	Zellwandstoffwechsel
PSOLI00142	Pektin-Acetylerase	30	1.9	Zellwandstoffwechsel
Mitochondrialer Stoffwechsel				
PSOLI04364	Aminomethyltransferase	22	2.0	Glycin-Katabolismus
PSOLI03136	Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase	26	6.2	Leucin- u. Valin-Katabolismus

PSOLI04128	Serin/Glycin Hydroxymethyltransferase	26, 30	2.9, 2.9	Serin/Glycin-Umwandlung
PSOLI04151	Flavoprot:Ubiquinon-Oxidoreduktase, Komplex 1	26	1.7	Atmung
PSOLI05077,	Ubiquinol-Cytochrome-C Reduktase, Komplex 3	26	1.7, 1.8	Atmung
PSOLI03247	(2x)			
PSOLI02739	Pyruvat-Dehydrogenase, E1	26	1.8	Glycolyse/Zitronensäurezyklus
PSOLI03519	Pyruvat-Dehydrogenase, E3	26	1.8	Glycolyse/Zitronensäurezyklus
PSOLI00209	Succinyl-CoA-Ligase	26	1.7	Zitronensäurezyklus
PSOLI03915	Succinat-Dehydrogenase	26	2.0	Zitronensäurezyklus
PSOLI00802	gamma-Aminobutyrat-Transaminase	26	1.8	GABA-Shunt
PSOLI01944	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase gabD	26	1.8	GABA-Shunt
PSOLI01338	Mitochondrial prozessierte Peptidase beta	26	2.1	Proteinprozessierung
PSOLI00166	dnaK-Typ molekular Chaperon PHSP1	26	1.9	Chaperone
PSOLI01176	TIM17/22 Mitoch. Innere Membran Translokase	26	1.7	Proteintransport
PSOLI01371	TIM50 Mitoch. Innere Membran Translokase	30	4.7	Proteintransport
Hormonstoffwechsel				
PSOLI01719	Auxin- u. ethylengesteuertes GH3-ähnliches Protein	22, 30	2.1, 1.7	Hormonelle Signalwirkung
PSOLI02168	Auxinresistentes Protein AXR1	30	2.2	Signalübertragung
PSOLI04459	GAST-ähnliches Protein, GA-reguliert, Snakin-1	22	1.7	Breites Funktionsspektrum
PSOLI04341,	ABA-2 tasselseed (2x)	26	2.7, 2.3	ABA-Synthese
PSOLI03779				
PSOLI04123	9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase 1	26	2.0	ABA-Synthese
Samenreifung				
PSOLI01245,	Ferritin (2x)	18,26	2.5, 4.0,	Eisenspeicherung
PSOLI03272			3.3, 4.0	
PSOLI00263	Austrocknungsgesteuertes Protein, Ankyrin-Domäne	22	2.0	Samenreifung
PSOLI05042	Reifeprozessähnliches Protein	22	1.9	Samenreifung
PSOLI04249,	Samenruheverbundenes Protein (3x)	22,26	1.9, 2.0,	Samenreifung
PSOLI05000,			1.7	
PSOLI04987				
PSOLI05134	LEA-Protein, ABA-induziert	26	3.3	Samenreifung
PSOLI04876	Cystein-Proteinase-Inhibitor	26	2.0	Samenreifung
PSOLI04615	Vicilin	22	1.8	Proteinspeicherung
PSOLI04635,	Vicilin, 47K (2x)	30	4.9, 2.3	Proteinspeicherung
PSOLI00633				
PSOLI04038,	Vicilin A (2x)	30	3.2, 2.2	Proteinspeicherung
PSOLI02231				
PSOLI04616	Vicilin	30	2.8	Proteinspeicherung
PSOLI02001,	Legumin B (2x)	30	2.4, 2.2	Proteinspeicherung
PSOLI01284				
Transportprozesse und Proteinprozessierung				
PSOLI03706,	DnaJ Molekularchaperon (2x)	26,30	4.4, 3.0,	Chaperon
PSOLI00356			2.7	
PSOLI03872	HSP20-ähnliches Chaperon	26	1.9	Chaperon
PSOLI00166	dnaK-Typ Molekularchaperon PHSP1, mito.	26	1.9	Chaperon
PSOLI01241	dnaK-Typ Molekularchaperon CSS1	30	1.8	Chaperon
PSOLI04537	TCP-1 Chaperonin	26	1.7	Chaperonin
PSOLI04745,	H ⁺ -transportierende ATPase, vakuol. (2x)	22	2.0, 1.8	Vakuolärer Transport
PSOLI03557				
PSOLI04864,	Inorganische Pyrophosphatase, vakuol. (3x)	26,30	2.3, 2.2,	Vakuolärer Transport
PSOLI04481,			2.0, 2.4,	
PSOLI00768			1.8	
PSOLI02443,	Vakuoläre ATPase, UE H (2x)	26,30	1.8, 2.0	Vakuolärer Transport
PSOLI04008				
PSOLI04384	α-Tonoplast Intrinsisches Protein (α-TIP)	30	1.8	Vakuolärer Transport
PSOLI01543	Hexose-Transporter	22	1.9	Hexose-Transport
PSOLI02916	Zn/Fe-Transporter ZIP	26	1.9	Transport
PSOLI03956,	OEP16 (2x)	26,30	1.8, 2.4	Transport

PSOLI00852				
PSOLI03513	Sec-61-ähnliche Proteintranslokase	22	1.7	Proteintranslokation
PSOLI01176	Innere Membran Translokase TIM17/22, mito.	26	1.7	Proteintransport
PSOLI01371	Innere Membran Translokase TIM50, UE, mito.	30	4.7	Proteintransport

Tab. A.2 Annotierte Gene und ihre mögliche Funktion im Samenstoffwechsel mit reduzierter Transkriptmenge der AAP1-Embryonen mittels Microarray-Analyse (Faktor ≥ 1.7 , p-Wert ≤ 0.05). DAP: Entwicklungsstadien 18, 22, 26, 30; Oligo-ID: Bezeichnung 70bp Oligonucleotid von *P. sativum*.

Oligo-ID	Annotation	DAP	Faktor	Funktion
Aminosäurestoffwechsel				
PSOLI02292	Threonin-Aldolase	18,22	1.9, 2.3	Threonin/Glycin-Umwandlung
PSOLI02864	Glutamin-Synthetase GS1, zyto.	22	2.6	Glutamin-Synthese
PSOLI01320	Acetohydroxysäure-Synthase, kleine UE, plast.	26	2.1	Valin-Biosynthese
Kohlenhydratstoffwechsel				
PSOLI05180	Neutrale Invertase	22	3.0	Saccharosespaltung
PSOLI04847	Phosphoglyceratkinase, zyto.	26	1.9	Glycolyse
PSOLI01309	Phosphoglucomutase, zyto.	26	2.8	Glycolyse
Zellwandbiosynthese				
PSOLI04051	Xyloglucan-Endotransglycosylase	26	1.7	Zellwandstoffwechsel
PSOLI04392	Beta-Xylosidase	26	1.7	Zellwandstoffwechsel
Transportprozesse und Proteinprozessierung				
PSOLI01176	Innere Membran Translokase, UE, mito.	18	1.7	Proteintranslokation
PSOLI01771	COP9 Signalosom, Komplex UE 3	22	4.3	Proteintranslokation
PSOLI03944	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase	22	2.7	Proteinfaltung
PSOLI04217	Proteindisulfid-Isomerase	26	2.7	Proteinprozessierung
PSOLI03657	Kupfer-Chaperon-Homolog CCH	26	2.0	Chaperon
PSOLI03407	Chaperon BiP-A	26	2.5	Chaperon
PSOLI00930, PSOLI00900	Aminosäurepermease AAP (2x)	30	2.0, 1.8	Transport
PSOLI03056	Monosaccharid-Transporter, Tonoplast	30	2.1	Transport

Tab. A.3 Annotierte Gene und ihre mögliche Funktion im Samenstoffwechsel mit erhöhter Transkriptmenge der iAGP-Embryonen mittels Microarray-Analyse (Faktor ≥ 2.0 , p-Wert ≤ 0.05). DAP: Entwicklungsstadien 20, 25, 30, 35; Oligo-ID: Bezeichnung 70bp Oligonucleotid von *P. sativum*.

Oligo-ID	Annotation	DAP	Faktor	Funktion
Transkriptionsfaktoren				
PSOLI02122	MYB-112/50 Transkriptionsfaktor	20,25,30	3.1, 2.6, 2.0	Transkriptionsfaktor
PSOLI01092	Transkriptionsfaktor Myb-Familie	30	3.0, 2.5	Transkriptionsfaktor
PSOLI01758	WRKY-24/32 Transkriptionsfaktor	30,35	2.1	Transkriptionsfaktor
PSOLI01940	bZIP-Transkriptionsfaktor, Dc3-Promotorbindung	35	5.3	Transkriptionsfaktor
PSOLI04334	FUSCA3	30	2.5	Transkriptionsfaktor
Kohlenhydratstoffwechsel, zytosolisch				
PSOLI00898	Saccharosephosphat-Synthase 2	20,30,35	3.7, 3.2, 2.7	Saccharosestoffwechsel
PSOLI02786	Saccharose-Phosphatase	20	2.1	Saccharosestoffwechsel
PSOLI01278, PSOLI03580	Saccharose-Synthase 1, PsSUS1 (2x)	20,25	3.7, 10.8, 3.0, 2.5	Saccharosestoffwechsel
PSOLI01502	UDP-Glucose-Pyrophosphorylase	30,35	2.1, 2.3	Kohlenhydratstoffwechsel
PSOLI02370	Phosphoglucoisomerase	25,30,35	2.0, 2.1	Glycolyse
PSOLI01309	Phosphoglucomutase	20	2.8	Glycolyse
PSOLI01043	Enolase	35	4.4	Glycolyse
PSOLI02543	ATP-Citrat-Lyase B	20	3.2	Kohlenhydratstoffwechsel
PSOLI04097	ATP-Citrat-Lyase A	35	2.0	Kohlenhydratstoffwechsel
PSOLI02459	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	25,30,35	2.9, 4.7,	Glycolyse

			2.4	
Kohlenhydratstoffwechsel, plastidär				
PSOLI03899,	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (3x)	20,25	3.8, 3.4,	Glycolyse
PSOLI00908,			2.6	
PSOLI00460				
PSOLI03836	Phosphoglucomutase	20,30	2.0, 2.0	Glycolyse
PSOLI00816	Fructosebiphosphat-Aldolase	35	2.1	Glycolyse
PSOLI04257,	NADP-Malat-Dehydrogenase (2x)	20,25	2.8, 6.2	Kohlenhydratstoffwechsel
PSOLI01798				
PSOLI01976	Stärke-Phosphoralyse, L	25,30,35	3.8, 7.5,	Stärkestoffwechsel
			2.2	
PSOLI03815	Stärke-Synthase 1, Granule gebunden	35	4.5	Stärkestoffwechsel
PSOLI00897	Phosphoglucan-Wasser-Dikinase	35	2.0	Stärkestoffwechsel
PSOLI02446	Stärke Entzweigungsenzym 2	30	3.2	Stärkestoffwechsel
Kohlenhydratstoffwechsel, mitochondrial				
PSOLI01595	Pyruvat-Dehydrogenase E1- α	20,25	2.4, 2.8	Glycolyse/Zitronensäurezyklus
PSOLI01841,	Pyruvat-Dehydrogenase E1- β (2x)	30,35	2.3, 2.0	Glycolyse/Zitronensäurezyklus
PSOLI02739				
PSOLI01033	Pyruvat-Dehydrogenase E2	25	2.1	Glycolyse/Zitronensäurezyklus
PSOLI02802	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, E1	20,25	2.1, 2.3	Zitronensäurezyklus
PSOLI01847	Nucleosidzucker (Nudix)-Hydratase	25,30,35	2.3, 2.8,	Nucleosidzucker-Katabolismus
			3.0	
Aminosäurestoffwechsel				
PSOLI01320	Acetohydroxysäure-Synthase, kleine UE	20,25	3.6, 2.7	Isoleucin/Valin- Biosynthese
PSOLI00936,	Methionin-Synthase (3x)	20,25,30	2.2, 3.5,	Methionin-Synthese
PSOLI04228,			2.4	
PSOLI01003				
PSOLI02211	L-Allo-Threonin-Acetaldehyd-Lyase (Threonin-Aldolase)	20	2.0	Threonin/Glycin-Umwandlung
PSOLI03092	Aspartat-Transaminase	20	2.0	Aminosäurestoffwechsel
PSOLI02005	L-Asparaginase	20,25,30,35	2.0, 2.1,	Aminosäurestoffwechsel
PSOLI02064	O-Acetyl-Serin (Thiol)-Lyase, plast.	25,30	3.0, 2.0	Cystein-Biosynthese
PSOLI92204	Serin-Acetyltransferase, zyto.	25	7.1, 5.9	Cystein-Biosynthese
PSOLI03651	Serin-Acetyltransferase, mito.	25	7.0	Cystein-Biosynthese
PSOLI02505	Ketolsäure-Reduktoisomerase, plast.	25,30	2.0	Leucin-, Valin- und Isoleucin- Biosynthese
			3.3, 4.7	
PSOLI04292,	Argininosuccinat-Synthase, plast. (2x)	25,30	2.9, 2.8	Arginin-Biosynthese
PSOLI01261				
PSOLI00532	Bifunktionelles Ornithin-Acetyltransferase/ N-Acetylglutamat-Synthase	25	2.0	Arginin-Biosynthese
PSOLI02083	3-Dehydroquinat-Synthase	25	2.2	Biosynthese aromatischer Aminosäuren
PSOLI03804	Phosphoserin-Phosphatase, plast.	30	2.1	Serin-Biosynthese
PSOLI01351	Indol-3-Glycerolphosphat-Synthase, plast.	30	2.0	Biosynthese aromatischer Aminosäuren
PSOLI02008	Fumarylacetoacetase	30	2.5	Phenylalanin/Tyrosin-Abbau
Samenreifung				
PSOLI02195,	Vicilin (2x)	20,25,30	3.6, 3.9,	Speicherprotein
PSOLI04635			2.2, 3.8	
			6.0, 2.5	
PSOLI04038,	Vicilin A (3x)	25,30,35	4.4, 10.8,	Speicherprotein
PSOLI04533,			11.1, 4.8,	
PSOLI02231			3.5	
PSOLI00430	Albumin 1	25	3.5	Speicherprotein
PSOLI00940,	USP (9x)	20,25,30,35	7.4, 6.2,	Speicherprotein
PSOLI01844,			2.0, 8.9,	
PSOLI00635,			3.1, 2.0,	
PSOLI01146,			78.2, 9.5,	
PSOLI01292,			7.0, 6.0,	

PSOLI01331,			4.4, 4.2,	
PSOLI04466,			3.8, 2.0,	
PSOLI02121,			3.1,	
PSOLI04363				
PSOLI01245	Ferritin 3	20,30	4.8, 2.0	Speicherprotein
Transportprozesse				
PSOLI02071	Glucose-6-Phosphat-Translokator, plast.	20,30	5.4, 4.4	Metabolittransport
PSOLI01923	ATP/ADP-Translokator, plast.	20,25	2.2, 3.5	ATP/ADP-Transport
PSOLI04427,	ATP-Synthase- δ , mito. (2x)	20,25,30,35	2.0, 10.0,	ATP-Synthese
PSOLI04485			5.1, 3.3	
PSOLI04234	ATP-Synthase- γ , mito.	25	2.1	ATP-Synthese
PSOLI03984	ATP-Synthase- β , mito.	25	2.0	ATP-Synthese
PSOLI01453,	ATP-Synthase- δ , plast. (2x)	25	7.9, 2.5	ATP-Synthese
PSOLI02609				
PSOLI01149,	H ⁺ -ATPasen, UE (2x)	25,30	5.3, 2.2,	H ⁺ -Transport
PSOLI02092			2.8	
PSOLI01734	Innere MembranTransportprotein Tic22, plast.	35	3.4	Chloroplastischer Translokator
PSOLI01371	Innere Membran Translokase TIM50, mito.	35	3.1	Mitochondrialer Translokator
PSOLI02225	Entkoppeltes Protein, mito.	25,30,35	4.1, 3.4,	Kontrolle der Atmung
			2.9	
PSOLI03530	Hexose-Transporter	20	4.4	Zuckertransport
PSOLI01343	Monosaccharid-Transporter (VfSTP1)	20	4.0	Zuckertransport
PSOLI00853	Bor-Transporter	20,35	2.3, 2.4	Metallionentransport
PSOLI00784	Peptid-Transporter PTR2	25,30,35	8.3, 7.4,	Peptidtransport
			2.4	
Zellproliferation				
PSOLI03116,	Annexin (6x)	20,25,30,35	3.6, 6.2,	Zellproliferation
PSOLI00079,			5.1, 2.7,	
PSOLI04306,			2.1, 2.0,	
PSOLI01280,			4.1, 8.1,	
PSOLI00178,			2.5, 2.3,	
PSOLI02931			2.7, 2.7,	
			2.1, 2.0	
PSOLI02837	Tubulin alpha	30,35	2.0, 2.1	Zellproliferation
PSOLI00033,	Tubulin beta (3x)	20,25,30,35	2.6, 2.7,	Zellproliferation
PSOLI02637,			2.0, 2.7,	
PSOLI04322			2.0, 2.1	
PSOLI02170	Tubulin-spezifisches Chaperon C	30	4.5	Zellproliferation
PSOLI01817	Tubulin-spezifisches Chaperon A	30,35	2.2, 2.2	Zellproliferation
PSOLI04421	Aktin	20,25	2.1, 4.5	Zellproliferation
PSOLI02409	Aktindepolymerisierender Faktor	20	4.0	Zellproliferation
PSOLI02077	Ca ²⁺ -reguliertes aktinbindendes Protein	20,25,30,35	3.0, 2.3,	Zellproliferation
			2.5, 2.4	
PSOLI00843	Zellteilungszyklusprotein	20,30	2.1, 2.8	Zellproliferation
PSOLI04096	AAA-Typ ATPasen Zellteilungskontrolprotein	25	2.0	Zellproliferation
PSOLI00153	Cyclin D3	30	3.9	Zellproliferation
PSOLI00657	Cyclin B	30	2.4	Zellproliferation
PSOLI01910	Prohibitin	30,35	2.8	Zellproliferation
PSOLI02293	MCM3 (Minichromosom Wartungsprotein)	35	4.1	Zellproliferation
PSOLI00884	Ycf1 Protein, plast.	35	3.4	Zellproliferation
Hormonstoffwechsel				
PSOLI04716	S-Adenosyl-L-Methionin:Jasmonsäure-carboxyl-Methyltransferase	20,25	2.9, 2.9	Jasmonsäure-Biosynthese
PSOLI00392	Allenoxid-Cyclase 4, plast.	25	2.0	Jasmonsäure-Biosynthese
PSOLI04233	12-Oxo-Phytodiensäure-10,11-Reduktase	25,30,35	2.0, 2.1,	Jasmonsäure-Biosynthese
			2.0	
PSOLI04005	Ent-Kaurensäure-Oxidase, CyP450 88A3	20,30	2.4, 2.1	Gibberillinsäure-Biosynthese
PSOLI04475	Gibberellinreguliertes Protein (GAST1)	25	2.3	Gibberillinsäure-Funktion
PSOLI01656	Auxingesteuertes Protein IAA8	25,35	7.2, 2.5	Auxin-Funktion

PSOLI01142	Cytokinin-Dehydrogenase 5	35	2.0	Cytokinin-Abbau
PSOLI02114	ARR5, 2-Komponentengesteuerter Regulator	35	4.2	Cytokinin-Funktion
PSOLI02146	Proteinphosphatase 2A	20	2.1	ABA-Signalwirkung
Signalweiterleitung				
PSOLI01965	SAPK7, Serin/Threonin-Proteinkinase (durch osmotischen Stress und ABA aktiviert)	20,25,30,35	2.6, 3.9, 2.0, 2.4	Proteinkinase
PSOLI02807	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase CPK1	20,30,35	2.5, 2.3, 2.1	Proteinkinase
PSOLI00010	Rezeptorähnliche Proteinkinase 4	20,30	2.1, 2.2	Proteinkinase
PSOLI01377	Rezeptor-Proteinkinase (Leucinreiche Wiederholungen)	25	2.6	Proteinkinase
PSOLI01224	Rezeptor-Proteinkinase	25	2.4	Proteinkinase
PSOLI02825	Rezeptorähnliche Proteinkinase 3	30,35	3.3, 2.8	Proteinkinase
PSOLI02441	MAP-Kinase, PsMAPK2	30	4.5	Proteinkinase
PSOLI00766	MAPKK	30	4.4	Proteinkinase
PSOLI01662	MAP-Kinase, Medicago	30,35	2.1, 2.9	Proteinkinase
PSOLI00642	Proteinkinase	25	2.2	Proteinkinase
PSOLI00484	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase CPK1	35	2.0	Proteinkinase
PSOLI02753	Proteinphosphatase (Tyrosin-spezifisch)	25	2.1	Proteinphosphatase
PSOLI00997	Serin/Threonin-Proteinphosphatase PP1	35	5.6	Proteinphosphatase
PSOLI01017	Serin/Threonin-Proteinphosphatase	20	2.3	Proteinphosphatase
PSOLI02146	Proteinphosphatase 2A	20	2.1	Proteinphosphatase
PSOLI01639	Proteinphosphatase 2C	35	2.8	Proteinphosphatase

Tab. A.4 Annotierte Gene und ihre mögliche Funktion im Samenstoffwechsel mit reduzierter Transkriptmenge der iAGP-Embryonen mittels Microarray-Analyse (Faktor ≥ 2.0 , p-Wert ≤ 0.05). DAP: Entwicklungsstadien 20, 25, 30, 35; Oligo-ID: Bezeichnung 70bp Oligonucleotid von *P. sativum*.

Oligo-ID	Annotation	DAP	Faktor	Funktion
Transkriptionsfaktoren				
PSOLI04599	LEC1	30,35	2.2, 2.1	Transkriptionsfaktor
PSOLI04407	bZIP-Transkriptionsfaktor ATB2_2	30	2.0	Transkriptionsfaktor
Kohlenhydratstoffwechsel, zytosolisch				
PCPS17	Saccharose-Synthase 3, PsSUS3	25,35	2.5, 4.9	Saccharosestoffwechsel
PCPS21	Vakuoläre Invertase Psl-1	25	2.2	Saccharosestoffwechsel
PSOLI05180	Neutrale Invertase	25	2.8	Saccharosestoffwechsel
PSOLI03795	Phosphoglyceratmutase	20,25,30,35	2.3, 2.2, 2.3, 2.4	Glycolyse
PSOLI04974	Fructosebiphosphat-Aldolase	20,35	2.0, 2.4	Glycolyse
Kohlenhydratstoffwechsel, plastidär				
PSOLI03767	Pyruvat-Kinase	25,30	2.0, 2.3	Glycolyse
PSOLI04337	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	20,25,30,35	2.3, 2.1, 2.9, 2.3	Pentosephosphat-Zyklus
PSOLI05197	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase,	20,25,30,35	5.9, 4.8,	Stärkestoffwechsel
PSOLI04162,	kleine UE (3x)		4.0, 6.0	
PSOLI00655,				
PCPS09	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, große UE	25	2.0	Stärkestoffwechsel
PSOLI04791,	beta-Amylase (2x)	25,35	2.0, 2.0	Stärkestoffwechsel
PSOLI02602				
Aminosäurestoffwechsel				
PSOLI04622	3-Isopropylmalat-Dehydratase	20	7.2	Biosynthese verzweigt-kettiger Aminosäuren
PSOLI02864	Glutamin-Synthetase, GS1, zyto.	25,30,35	2.1, 2.0, 2.1	Glutaminsäure-Biosynthese
Samenreifung				
PSOLI04998,	Legumin B (4x)	20,25,35	4.5, 3.8,	Speicherprotein
PSOLI04997,			3.0, 2.0,	

PSOLI04996,			2.1, 4.6	
PSOLI02001				
PSOLI04448	Legumin A2	20,25	3.5, 2.8	Speicherprotein
PSOLI04495	Legumin K	20,25,30,35	2.0, 2.7, 2.0, 3.4	Speicherprotein
PSOLI04441	Albumin 2	20,25,30	23.8, 2.8, 2.3	Speicherprotein
PSOLI04535	Albumin	20,25	17.7, 6.7	Speicherprotein
PSOLI04532	Glycinin	20,25,30	17.2, 12.6, 3.1	Speicherprotein
Transportprozesse				
PSOLI01543	Glucose-Transporter, plast.	25	2.8	Zuckertransport
PSOLI02762,	Zink-Transporter, plast. (3x)	20,25,30	2.9, 2.5,	Metalltransport
PSOLI00469,			2.0, 2.0,	
PSOLI03790			3.0,	
PSOLI00510	Bortransportähnliches Protein	20	3.9	Metallionentransport
PSOLI00852,	OEP16, plast. (2x)	20,25,30	2.9, 5.6,	Äußere Membran Protein
PSOLI01176			2.0, 4.2	
PSOLI04982,	Aquaporine, PIP-Typ 7a, Turgorgesteuert (2x)	25,30,35	2.0, 2.2,	Wassertransport
PSOLI03093			2.0, 2.1	
Hormonstoffwechsel				
PSOLI03467	Indol-3-Essigsäure (IAA)-Amido-Synthetase	20,25	5.0, 2.0	Auxin-Abbau
PSOLI04123	9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase	30	2.8	ABA-Synthese
PSOLI04812	GRAS Transkriptionsfaktor, DELLA/GAI	20,25,30,35	2.1, 2.2, 2.6, 2.4	Repressor der GA-Funktion
Signalwirkung				
PSOLI00915	Proteinkinase APK1A, plast.	20,30	3.2, 2.0	Proteinkinase
PCPS10	SnRK1, β -UE 1	20	2.6	Proteinkinase
PSOLI03764	GSK-3-ähnliche Proteinkinase, MsK4	20	2.4	Proteinkinase
PSOLI03111	Serin/Threonin-Proteinkinase	25	2.7	Proteinkinase
PSOLI03681	Rezeptorähnliche Serin/Threonin-Kinase	30	2.0	Proteinkinase
PSOLI02886	Proteinkinase	35	2.3	Proteinkinase
PSOLI01646	Protein-Tyrosin-Phosphatase	30,35	2.1, 2.1	Proteinphosphatase
PSOLI05090	Proteinphosphatase	35	2.2	Proteinphosphatase

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir in den letzten Jahren tatkräftig zur Seite standen und durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beitrugen. Da es nicht möglich ist, alle Namen an dieser Stelle aufzuführen, bitte ich die nicht erwähnten Personen vielmals um Verzeihung. Ich habe Euch nicht vergessen.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Isolde Saalbach und Herrn Dr. Hans Weber für ihr unermüdliches Interesse an meiner Arbeit, ihre fachliche und kompetente Betreuung sowie ihre stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während dieser Zeit.

Dem Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben sowie Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus danke ich für die Möglichkeit, hier meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Klaus Humbeck vom Institutsbereich Pflanzenphysiologie danke ich für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Ein Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Helge Küster vom Institutsbereich Pflanzengenomforschung der Leibniz Universität Hannover (ehemals am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld) für die Durchführung der Microarray-Analysen und die Unterstützung bei der Auswertung der Daten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Aaron Fait und Dr. Alisdair R. Fernie vom Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm für die Untersuchungen der Metabolite mittels GC-MS Analysetechnik.

Herrn Prof. Dr. E. R. Neil Emery der Trent University of Peterborough, ON, Canada danke ich für die Durchführung der Cytokininmessungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Claus Wasternack und Herrn Dr. Otto Miersch vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) bedanke ich mich für die Bestimmung der Jasmonate.

Ich danke Frau Prof. Dr. Christine Desel der Christian-Alberts Universität zu Kiel für die Unterstützung bei der Analyse reaktiver Sauerstoffspezies.

Herrn Dr. Richard Thompson und Frau Dr. Judith Burstin vom INRA-Institut in Dijon, Frankreich, danke ich für die Möglichkeit und Unterstützung bei der Erlernung der 2-SDS-Page Methode zur Identifizierung von Proteinen. Diese Daten sind in der vorliegenden Arbeit leider nicht aufgeführt.

Für die Anfertigung der lichtmikroskopischen Aufnahmen möchte ich mich bei Herrn Dr. Twan Rutten vom IPK bedanken.

Ein Dankeschön auch an die Gärtner der Gewächshäuser und Klimakammern „Chemie“ und „Genetik“ sowie den Grafikern und der Fotografin Frau Heike Ernst vom IPK.

Weiterhin gilt mein Dank der Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie vom IPK für die Einführung in die Transformationstechnik von Kulturpflanzen und die Unterstützung bei den Freilandversuchen. Besonders erwähnen möchte ich dabei Herrn Dr. Jochen Kumlehn, meine Mentorin Frau Dr. Isolde Saalbach, Frau Petra Hoffmeister und Frau Susanne Knüpffer sowie Frau Felicia Hosein, die Vorarbeiten zu diesem Thema leistete und es mir ermöglichte, nahtlos daran anzuschließen.

Ich möchte mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Samenentwicklung vom IPK für die freundliche und herzliche Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Hierzu zählen vor allem:

Frau Dr. Ruslana Radchuk für die Unterstützung bei der Auswertung der Microarray-Daten;

Frau Dr. Christiane Seiler für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Phänotypisierung der sucAAP-Pflanzen;

Herr Heiko Weichert und Frau Katrin Blaschek für die Einarbeitung und Unterstützung bei den chemisch-analytischen Verfahren der Metabolitanalyse und der Enzymassays; sowie der Ag-Leiterin Frau Dr. Winfriede Weschke fürs Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie: meinen Eltern, meinem Bruder und seiner kleinen Familie sowie meinem Freund & Lebenspartner Stephan. Ihnen danke ich von ganzem Herzen für die Liebe, das Verständnis und die ständige Unterstützung und Aufmunterung in allen Lebenslagen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden und all denen bedanken, die mich während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

- DANKE -

PUBLIKATIONSLISTE

Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit sind in folgende Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge eingegangen.

VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

Weigelt, K., Küster, H., Radchuk, R., Müller, M., Weichert, H., Fait, A., Fernie, A. R., Saalbach, I. and Weber, H. (2008) Increasing amino acid supply in pea embryos reveals specific interactions of N and C metabolism and highlights the importance of mitochondrial metabolism. *Plant Journal* **55**, 909-926.

Weigelt, K., Küster, H., Rutten, T., Fait, A., Fernie, A. R., Miersch, O., Wasternack, C., Emery, R. J. N., Desel, C., Hosein, F., Müller, M., Saalbach, I. and Weber, H. (2009) ADP-glucose pyrophosphorylase deficient pea embryos reveal specific transcriptional and metabolic changes of carbon-nitrogen metabolism and stress responses. *Plant Physiology* **149**, 395-411.

Weber, H., Radchuk, R., Weigelt, K. and Saalbach, I. (2009) Changing metabolic pathways to manipulate legume seed maturation and composition. In: *Modification of seed composition to promote health and nutrition*, Krishnan, H. ed, pub. by American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI 53711, USA, pp. 55-77

TAGUNGSBEITRÄGE - VORTRÄGE

Weigelt, K.: Manipulation of seed metabolism in transgenic pea plants to increase protein content. 1st IPK Student Conference, 22. - 25.06.2005, Gatersleben, Deutschland.

Weigelt, K.: Repression of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds of transgenic pea (*Pisum sativum*) changes starch and protein metabolism. 3rd Plant Science Student Conference, 05. - 08.06.2007, Halle/Saale, Deutschland.

Weigelt, K.: Manipulation of seed metabolism in transgenic pea plants to increase protein content. Workshop "Neue Impulse in der Grundlagenforschung für angewandte Pflanzenbiotechnologie", Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie e.V. AK Gentechnik, 12./13.07.2007, Neustadt/Weinstraße, Deutschland.

Weigelt, K.: Repression of the ADP-glucose pyrophosphorylase in developing embryos affects seed metabolism. 6th European Conference on Grain Legumes, 12. - 16.11.2007, Lissabon, Portugal.

TAGUNGSBEITRÄGE - POSTER

Weigelt, K., Hosein, F., Rutten, T., Saalbach, I. and Weber, H.: Manipulation of seed metabolism in transgenic pea plants (*Pisum sativum*). 2nd IPK Student Conference, 30.05. - 01.06.2006, Gatersleben, Deutschland.

Weigelt, K., Küster, H., Saalbach, I. and Weber, H.: Over-expression of a *V. faba* amino acid permease in developing seeds of transgenic pea (*Pisum sativum*) changes protein metabolism. Botanikertagung, 03. – 07.09.2007, Hamburg, Deutschland.

Weigelt, K., Rutten, T., Küster, H., Saalbach, I. and Weber, H.: Repression of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing embryos affects seed metabolism. 6th European Conference on Grain Legumes, 12. - 16.11.2007, Lissabon, Portugal.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name	Kathleen Weigelt
Anschrift	Otto-Arndt-Str. 6 06449 Aschersleben
Geburtsdatum	02.08.1979
Geburtsort	06712 Zeitz
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schul Ausbildung

09/1986 – 07/1991	Polytechnische Oberschule „Völkerfreundschaft“ Zeitz
09/1991 – 07/1998	Geschwister-Scholl-Gymnasium Zeitz Abschluss: Abitur (Note 1,8)

Studium und beruflicher Werdegang

10/1998 – 08/2004	Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena Abschluss: „Diplom Ernährungswissenschaftlerin“ (Note 2,2) Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben mit dem Thema: „Pflanzliche Samenentwicklung, Funktionelle Charakterisierung der Transkriptionsfaktoren AtMYB44 und AtMYB77“
seit 09/2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, Abt. Molekulare Genetik, Ag Samenentwicklung

Gatersleben, Juli 2009

Kathleen Weigelt

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe. Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Gatersleben, Juli 2009

Kathleen Weigelt