

**Funktionelle Charakterisierung des 2-Oxoglutarat/Malat-  
Translokators in sich entwickelnden Samen von *Pisum sativum***

**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

Erik Riebeseel

geb. am 20.09.1977 in Wolmirstedt

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Wobus
2. Prof. Dr. R. B. Klösgen
3. Prof. Dr. A. P. M. Weber

Halle (Saale), den 26.10.2009



*„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:  
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,  
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,  
wieder wegzuwerfen.“*

Albert Einstein (1879-1955)



# Inhalt

**Inhaltsverzeichnis ..... I**

**Abkürzungsverzeichnis ..... V**

**I. Einleitung ..... 1**

1.	Die Samenentwicklung bei Leguminosen.....	1
2.	Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus sind eng miteinander verknüpft .....	2
3.	Ammonium wird auf verschiedenen Wegen synthetisiert .....	3
4.	Die Ammoniumassimilation erfolgt durch zwei plastidäre Enzyme im GS/GOGAT-Zyklus .....	4
5.	Die Biosynthese der Aminosäuren und deren komplexe Regulation in Pflanzen .....	6
6.	Viele verschiedene plastidäre Transportproteine sind für den Metabolitaustausch mit dem Cytosol notwendig .....	8
7.	Isocitrat-Dehydrogenase und Aspartat-Aminotransferase generieren 2-Oxoglutarat für den GS/GOGAT-Zyklus .....	10
8.	Der plastidäre Import von 2-Oxoglutarat durch den 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator ist entscheidend für die Ammoniumassimilation .....	12
9.	Zielsetzung der Arbeit .....	13

**II. Material und Methoden..... 15**

1.	Material .....	15
1.1.	Chemikalien und Enzyme .....	15
1.2.	Geräte .....	15
1.3.	Organismen/Stämme .....	17
1.4.	Anzucht von Pflanzen und Probennahme .....	18
1.5.	Plasmide und Primer .....	19
2.	Methoden.....	22
2.1.	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.1.1.	Isolierung von genomischer DNA.....	22

2.1.2.	Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA .....	23
2.1.3.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen .....	23
2.1.4.	Hybridisierungsexperimente .....	24
2.1.4.1.	Southern-Analyse .....	24
2.1.4.2.	RNA-Gelblot-Analyse.....	25
2.1.5.	Erzeugung, Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten .....	25
2.1.6.	Generierung einer cDNA-Phagen Bank.....	26
2.1.7.	<i>Genome Walking</i> .....	27
2.1.8.	<i>Real time quantitative PCR</i> .....	28
2.1.9.	Mikroarray: Hybridisierung und Datenauswertung .....	29
2.1.10.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Transformation .....	29
2.1.10.1.	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
2.1.10.2.	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	30
2.1.10.3.	Transformation von <i>Pisum sativum</i> .....	30
2.1.11.	Histologische Analysen von Samen.....	31
2.1.12.	Ultrastrukturanalyse von Samen .....	32
2.1.13.	Statistische Auswertung von Ergebnissen.....	32
2.2.	Biochemische Methoden .....	33
2.2.1.	Elementaranalyse .....	33
2.2.2.	Photometrische Bestimmung des Gehaltes von Saccharose und Stärke.....	33
2.2.3.	Photometrische Bestimmung des Gehaltes an Speicherproteinen .....	34
2.2.4.	Photometrische Bestimmung des Ammoniumgehaltes.....	35
2.2.5.	Bestimmung des Gehaltes freier Aminosäuren mittels <i>reverse phase</i> HPLC.....	35
2.2.6.	Bestimmung des Gehaltes von Lipiden mittels Gaschromatographie.....	36
2.2.7.	Bestimmung des Gehaltes von organischen Säuren mittels Ionenchromatographie.....	37
2.2.8.	Bestimmung des Gehaltes an Abscisinsäure mittels LC-ESI-MS .....	37
2.2.9.	Metabolitanalyse mittels GC-MS.....	38
2.2.10.	Enzymassays .....	38
2.2.10.1.	Bestimmung der Enzymaktivität der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP; EC 2.7.7.27) .....	38
2.2.10.2.	Bestimmung der Enzymaktivität der Aspartat-Aminotransferase (ASAT, früher GOT; EC 2.6.1.1).....	39
2.2.10.3.	Bestimmung der Enzymaktivität der Glutamin-Synthetase	

	(GS; EC 6.3.1.2).....	39
2.2.10.4.	Bestimmung der Enzymaktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31) .....	40
2.2.10.5.	Bestimmung der Enzymaktivität der Saccharosesynthase (SUSI; EC 2.4.1.13) .....	40
2.2.11.	Bestimmung der Transportaktivität des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators (OMT) .....	41
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
1.	Charakterisierung des plastidären 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators (OMT) in sich entwickelnden Samen von <i>Pisum sativum</i> .....	43
1.1.	Isolation der cDNA und Sequenzanalyse.....	43
1.2.	Generierung von transgenen Pflanzen.....	48
1.2.1.	Antisense-Konstrukt des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators .....	48
1.2.2.	Transformation des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator-antisense-Konstruktes in Erbsenpflanzen.....	49
1.2.3.	Überexpressionskonstrukt des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators.....	50
1.2.4.	Transformation der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator-sense-Konstrukte in Erbsenpflanzen .....	52
1.2.5.	Überexpressionskonstrukt des Phosphoenolpyruvat-Translokators.....	53
1.2.6.	Transformation der Phosphoenolpyruvat-Translokator-sense-Konstrukte in Erbsenpflanzen .....	54
1.2.7.	Übersicht der Konstrukte und erzeugten homozygoten Erbsenlinien.....	55
1.3.	Phänotyp der transgenen asOMT-Erbsenpflanzen.....	57
1.4.	Histologische Analysen von asOMT-Erbsen .....	58
1.5.	Transkriptanalyse von sich entwickelnden asOMT-Erbsen.....	59
1.6.	Microarray-Analyse von asOMT-Erbsen.....	60
1.7.	Transportaktivität des 2-Oxoglutarat/Malat-Translocators (OMT) .....	65
1.8.	Stickstoff- und Kohlestoffgehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbsen .....	67
1.9.	Saccharose- und Stärkegehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbsen .....	68
1.10.	Albumin- und Globulingehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbsen .....	69
1.11.	Ammoniumgehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbsen .....	71
1.12.	Aminosäuregehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbsen .....	72
1.13.	Gehalt von Fettsäuren in reifen Samen der asOMT-Erbsen .....	75

1.14.	Veränderter Gehalt an organischen Säuren in sich entwickelnden Samen von asOMT-Erbesen .....	76
1.15.	Gehalte an Abscisinsäure von asOMT-Erbesen der Linie 3 .....	77
1.16.	Metabolitanalyse von asOMT-Erbesen der Linie 3 .....	78
1.17.	Aktivitäten ausgewählter Enzyme in sich entwickelnden asOMT-Samen .....	81
<b>IV.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
1.	Alle drei asOMT-Linien zeigen eine samenspezifische Repression des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators.....	84
2.	Die samenspezifische OMT-Inhibierung hat Einfluss auf die Samenentwicklung und das Pflanzenwachstum.....	85
3.	Die OMT-Inhibierung bewirkt eine Veränderung der Samen-Inhaltsstoffe .....	86
4.	Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator kontrolliert die Biosynthese der Aminosäuren.....	88
5.	Die OMT-Inhibierung verändert den Saccharosemetabolismus, die Glykolyse und den Fettsäuremetabolismus .....	90
6.	Durch OMT-Repression entwickeln die Plastiden Chloroplasten-ähnliche Merkmale .....	92
7.	Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator beeinflusst den Export von Reduktionsäquivalenten .....	93
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>97</b>
<b>VI.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>99</b>
<b>VII.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>VIII.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>i</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABA	engl. <i>abscisic acid</i> ; dt. <i>Abscisinsäure</i>
Abb.	Abbildung
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin
ATP, ADP	Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AS	Aminosäuren
BAP	6-Benzylaminopurin
Bo	<i>Brassica oleracea</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin / Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> ; dt. <i>komplementäre DNS</i> )
CKX	Cytokininoxidase
CTP	Cytosintriphosphat
C-Terminus	Carboxyl-Ende der Aminosäurenkette
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAF	engl. <i>day after flowering</i> ; dt. <i>Tage nach der Blüte</i>
ddWasser	doppelt destilliertes Wasser
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat
DNA / DNS	eng. <i>desoxyribonucleic acid</i> , dt. <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
EST	Expressed Sequenze Tag
et al.	lat. <i>et alii</i> , dt. <i>und andere</i>
Fe	Eisen
G	Guanin
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GTP, GDP	Guanosintriphosphat, Guanosindiphosphat
h	Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonic acid]
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
km <sup>r</sup>	Kanamycin
konz.	Konzentriert
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Broth
lux	SI-Einheit der Beleuchtungsstärke
max.	maximal
m, mm, µm, nm	Meter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM, µM, nM	Molar, Millimolar, Mikromolar, Nanomolar
min.	Minute
mind.	mindestens
MeOH	Methanol
mol, mmol, µmol	Mol, Millimol, Mikromol
nmol, pmol	Nanomol, Pikomol
MOPS	N-morpholinoprooanesulfonic acid
MS	Murashige and Scoog basal medium
MW	Molekulargewicht
N	Stickstoff
NAA	engl. <i>naphthalene acetic acid</i>
N-Terminus	Amino-Ende der Aminosäurenkette
OD	optischer Dichte
OMT	plastidärer 2-Oxoglutarat/Malat-Translocator
P	Phosphat
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPT	plastidärer Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translocator Phosphinotricin
Ps	<i>Pisum sativum</i>
RNA / RNS	eng. <i>ribonucleic acid</i> , dt. <i>Ribonukleinsäure</i>
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec, msec	Sekunde, Millisekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T	Thymin / Tesla
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
USP	engl. <i>unkown seed protein</i>
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen-zu-Volumen-Verhältnis
VF	Verdünnungsfaktor
vis	engl. <i>visible</i> , dt. sichtbar
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel



# I. Einleitung

## 1. Die Samenentwicklung bei *Pisum sativum*

Die Samenentwicklung ist eine wichtige Phase in der Entwicklung von höheren Pflanzen. Nach der Bestäubung entsteht durch Verschmelzung der Eizelle mit einem der beiden Spermakerne die diploide Zygote, aus der sich der Embryo entwickelt. Durch Querteilungen der Zygote bildet sich zunächst ein Zellfaden, der Proembryo. Aus dem einen Ende des Proembryos entwickelt sich der eigentliche Embryo. Die restlichen Zellen haben die Funktion eines Embryoträgers. Der Embryo differenziert in die Keimblätter, das Sproßmeristem und die Wurzelanlage.

Der wachsende Leguminosensame besteht aus der maternalen Samenschale und den Befruchtungsprodukten Endosperm und Embryo. Die Entwicklung der Samenschale beginnt bereits vor der Befruchtung. Die Embryogenese der Leguminosen ist unterteilt in drei Phasen mit hohen Wachstumsraten, die jeweils durch zwei Phasen mit niedrigen Wachstumsraten unterbrochen werden (Hedley and Ambrose, 1980). In der ersten Phase erfolgt die aktive Zellteilung des Endosperms, während in der zweiten Entwicklungsphase die Embryogenese stattfindet. Die dritte Entwicklungsphase ist charakterisiert durch Zellstreckung, welche die Reifung des Samens einleitet.

Während der Samenentwicklung der Leguminosen werden Reservestoffe in die Kotyledonen eingelagert. Die Entwicklung der Leguminosensamen kann auch unterteilt werden in die Vorspeicherphase, Speicherphase (Reifung) und die Austrocknungsphase (Weber *et al.*, 2005). Die Vorspeicherphase ist charakterisiert durch eine hohe Zellteilungsaktivität (Smith, D. L., 1973). In diesem frühen Entwicklungsstadium kontrolliert die Samenschale den Fluss der Metabolite. Hierbei spielen zellwandgebundene Invertasen eine entscheidende Rolle. (Weber *et al.*, 1995). Diese spalten Saccharose in Hexosen, deren Transport in den Embryo durch Transportproteine vermittelt wird (Weber *et al.*, 1997). Junge Embryonen erzeugen ATP über Respiration, welches durch den ATP/ADP-Translokator in die Plastiden importiert wird (Rawsthorne S., 2002). Im Übergang von der Vorspeicherphase zur Speicherphase beginnen die inneren (adaxialen) Kotyledonenzellen mit der Einlagerung von Speicherstoffen, während die äußeren (abaxialen) Zellen noch mitotisch aktiv sind (Weber *et al.*, 2005). Dies erzeugt einen Entwicklungsgradienten im reifenden Samen. Während der Umwandlung von meristematischen Zuständen in hochspezialisiertes Speichergewebe initiiert ein Netzwerk von

Regulatoren wie Saccharose (Koch, 2004; Smeekens, 2000), ABA (Radchuk *et al.*, 2006), GA (Swain *et al.*, 1995) und Kinasen wie z. B. SnRK1 (Radchuk *et al.*, 2006) auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene die Speicherung von Reservestoffen. Saccharose ist nicht nur die Transportform des Kohlenstoffs, sondern auch ein Signalmolekül. Sie aktiviert auf transkriptioneller Ebene die Enzyme Saccharosesynthase und ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (Heim *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1998). Die Genexpression der Enzyme Saccharosephosphat-Synthase (SPS) und Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC) wird ebenfalls durch Saccharose beeinflusst (Weber *et al.* 1996a; Golombek *et al.*, 1999). Durch die erhöhte Aufnahme von Saccharose in die Embryonen wird die Zellstreckung und die Endopolyploidisierung induziert (Weber *et al.*, 1996b). Während der Übergangsphase differenzieren die embryonalen Zellen zu photosynthetisch aktiven Geweben, die Energie in Form von ATP durch Photosynthese erzeugen. Der erhöhte ATP-Gehalt erlaubt die Synthese von Stärke und Proteinen. Dabei werden vor allem Glutamin und/oder Asparagin über das Phloem importiert (Mifflin, B.J. and Lea P.J., 1977). Die mRNA-Expression der Aminosäuretransporter korreliert mit dem Beginn der Proteinspeicherung (Miranda *et al.*, 2001). Die C-Gerüste der Aminosäurebiosynthese werden durch die Reaktion der PEPC erzeugt (Turpin *et al.*, 1990). Zusätzlich zu den Aminosäuretransportern werden die Peptidtransporter während der Samenentwicklung stark expremiert. Diese werden wahrscheinlich durch andere Metabolite und/oder Seneszenzsignale reguliert (Miranda *et al.*, 2003).

## 2. Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus sind eng miteinander verknüpft

Für die Embryoentwicklung werden Assimilate in Form von Aminosäuren und Saccharose benötigt. Während der Speicherphase bei *Pisum sativum* werden die Assimilate in Stärke und Proteine umgewandelt und im Samen eingelagert. Die Pflanzen als autotrophe Organismen erzeugen die Kohlenhydrate durch Assimilation von Kohlendioxid in der Photosynthese. Bis zu 55% des photosynthetisch fixierten Kohlenstoffes wird bei der Stickstoffassimilation benötigt (Huppe & Turpin, 1994). Dies zeigt die enge Verknüpfung des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus. Verschiedene Arbeiten an Tabakpflanzen haben gezeigt, dass eine reduzierte Kohlenstofffixierung nicht nur zu einer Verminderung der Kohlenhydrate und der organischen Säuren führt, sondern auch zu einem niedrigerem Aminosäuregehalt (Matt *et al.*, 1998, 2002; Klein *et al.*, 2000; Stitt & Krapp, 1999, Geiger *et al.*, 1998). Umgekehrt führt die

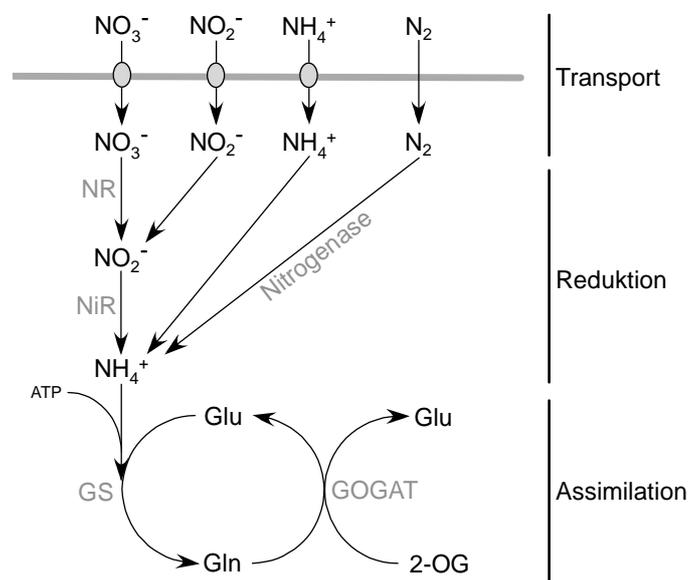
Reduktion der Nitratassimilation zu einer Verminderung aller Aminosäuren, Kohlenhydrate und Carbonsäuren (Scheible *et al.*, 1997b; Matt *et al.*, 2001 a, b). Durch samenspezifische Überexpression der Aminosäurepermease VfAAP1 in *Pisum sativum* konnte ein enger regulatorischer Zusammenhang zwischen C, N und ABA festgestellt werden. Die Mitochondrien haben bei der Kontrolle der Balance zwischen Kohlenstoff und Stickstoff eine entscheidene Bedeutung (Weigelt *et al.*, 2008).

### 3. Ammonium wird auf verschiedenen Wegen synthetisiert

Bei der Entwicklung der Pflanzen und Samen ist Stickstoff ein limitierender Faktor. Etwa 99% des organischen Stickstoffes in der Biosphäre stammt aus der Nitratassimilation (Huppe & Turpin, 1994). Pflanzen nehmen mit Hilfe dreier Aufnahmesysteme Nitrat über die Wurzel auf. Diese unterscheiden sich in den jeweiligen Aufnahmekinetiken. Es existieren ein niedrigaffines System (LATS) (Tsay *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996; Lauter *et al.*, 1996; Touraine *et al.*, 1997), ein konstitutiv exprimiertes hochaffines System (CHATS) (Trueman *et al.*, 1996; Poa *et al.*, 1998) und eine induzierbares hochaffines System (IHATS) (Aslam *et al.*, 1992). Das Nitrat wird in den Symplasten der Wurzelzellen aufgenommen. Dort gibt es vier Möglichkeiten der Nutzung: (I) Reduktion zu Nitrit durch die Nitratreduktase; (II) Efflux in den Apoplasten der Wurzelzelle; (III) Transport und Lagerung in der Vakuole und (IV) Transport in das Xylem für die Translokation in andere Pflanzenorgane. Die Orte der Nitratassimilation in der Pflanze variieren zwischen den Spezies (Andrews, 1986). Es werden drei Gruppen unterschieden: (I) Pflanzen, die Nitrat sowohl in den Wurzeln als auch im Spross assimilieren (einjährige Nicht-Leguminosen gemäßigter Klimazonen); (II) Pflanzen, die Nitrat vorwiegend in den Blättern assimilieren (tropische und subtropische Leguminosen und Nicht-Leguminosen); (III) Pflanzen, die Nitrat vorwiegend in der Wurzel assimilieren (mehrjährige und einjährige Leguminosen) (Márquez *et al.*, 2005).

Die Reduktion des Nitrats erfolgt durch die Nitratreduktase (NR) im Cytosol (Solomon and Barber, 1990). Die Nitratreduktase wird streng reguliert. Hierbei wirken Nitrat, Kohlenhydrate und Licht induzierend auf die Genexpression. Um eine Akkumulation von Nitrit im Dunkeln zu verhindern, erfolgt eine reversible Phosphorylierung des Serinrestes 68. Dadurch können Magnesiumionen und ein Inhibitorprotein (NIP) an das Enzym binden, wodurch das Enzym inaktiviert wird (Bachmann *et al.*, 1996). Glutamin und andere Aminosäuren haben eine reprimierende Wirkung auf die Enzymaktivität.

Das entstehende Nitrit wird in den Plastiden durch die Nitritreduktase (NiR) zu Ammonium reduziert (Lea *et al.*, 1990a; Temple *et al.*, 1998). Die Leguminosen bilden eine Symbiose mit Rhizobien, die in der Lage sind, atmosphärischen Stickstoff direkt zum Ammonium zu reduzieren (Heichel *et al.*, 1981; Schönbeck *et al.*, 2000). Die Stickstofffixierung erfolgt in den Wurzelknöllchen der Leguminosen durch die Aktivität des Nitrogenase-Komplexes (Triplett *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2001). Innerhalb des pflanzlichen Stoffwechsels entsteht Ammonium in signifikanten Mengen vor allem bei der Photorespiration (Keys *et al.*, 1978), bei der Phenylpropanoid Biosynthese und dem Aminosäurekatabolismus (Lam *et al.*, 1996). Das aus verschiedenen Quellen anfallende Ammonium muss effizient weiterverarbeitet werden, da es eine toxische Wirkung auf die Pflanzenzellen hat.



**Abb. 1 Nitrataufnahme, -reduktion und -assimilation in Pflanzen.**

NR – Nitratreduktase, NiR – Nitritreduktase, GS – Glutamin-Synthetase, GOGAT – Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase

#### 4. Die Ammoniumassimilation erfolgt durch zwei plastidäre Enzyme im GS/GOGAT-Zyklus

Die Glutamat-Synthase (Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase, GOGAT) und die Glutamin-Synthetase (GS) sind Schlüsselenzyme bei der Assimilation von Ammonium im pflanzlichen Stoffwechsel (Lea and Mifflin, 1974; Lea *et al.*, 1990a; Sechley *et al.*, 1992). Die Glutamin-Synthetase katalysiert die ATP-abhängige Aminierung von Glutamat, wobei Glutamin entsteht. Der reduktive Transfer der Amidgruppe vom Glutamin auf das Kohlenstoffgerüst 2-Oxoglutarat (2-OG) wird durch die Glutamat-Synthase katalysiert

(Boland and Benny, 1977). Hierbei entstehen zwei Moleküle Glutamat. Das gebildete Glutamat füllt den Glutamat-*pool* für die Glutamin-Synthetase-Reaktion wieder auf und ist Ausgangsprodukt für die Synthese weiterer Aminosäuren sowie anderer Stickstoff-enthaltener Moleküle. Beide Reaktionen werden auch als GS/GOGAT-Zyklus bezeichnet (Lea *et al.*, 1990b). Im Phloemsaft wurden hohe Gehalte der beiden Aminosäuren Glutamin und Asparagin gefunden, die als Transportform des Stickstoffes innerhalb der Pflanze fungieren (Urquhart *et al.*, 1982; Sieciechowicz *et al.*, 1988).

In höheren Pflanzen ist die Glutamin-Synthetase (EC 6.3.1.2) ein octamerisches Enzym von 320 – 380 kDa. Basierend auf ihrer subzellulärer Lokalisation konnten zwei Typen von Isoenzymen nachgewiesen werden (McNally and Hirel, 1983). Die cytosolische Isoform (GS1) wird von einer kleinen Genfamilie codiert, die plastidäre Isoform (GS2) hingegen von nur einem Gen (Tingey *et al.*, 1988; Standford *et al.*, 1993). Die beiden Isoformen haben auch eine unterschiedliche metabolische Funktion. Die plastidäre Glutamin-Synthetase ist hauptsächlich für die Reassimilation des Ammoniums aus der Photorespiration in den Blättern zuständig. Ihre Gene werden durch Licht reguliert (Peterman and Goodman, 1991; Elmlinger and Mohr, 1992). Die GS1 ist für die Synthese des Glutamins zuständig, welches in die anderen Pflanzenorgane transportiert wird (Edwards *et al.*, 1990; Kamachi *et al.*, 1992). Die Glutamin-Synthetase wurde charakterisiert in Leguminosen (Cock *et al.*, 1991; Cullimore *et al.*, 1992), *Arabidopsis* (Peterman and Goodman, 1991), Mais (Sakakibara *et al.*, 1992) und Tabak (Tingey *et al.*, 1987).

Von der GOGAT sind in höheren Pflanzen zwei Isoformen bekannt. Eine Ferredoxin-abhängige, die Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1) und eine NADH-abhängige, die N-GOGAT (EC 1.4.1.14) (Gregerson *et al.*, 1993; Lancien *et al.*, 2000). Zusätzlich zu ihrer Coenzym-Abhängigkeit unterscheiden sich beide Isoenzyme hinsichtlich ihrer Molekularmasse, Enzymkinetik, Antigenizität und metabolischen Funktion (Suzuki and Gadal, 1984; Avila *et al.*, 1987; Sakakibara *et al.*, 1991). Sie werden durch unterschiedliche Gene kodiert, werden unterschiedlich reguliert und haben möglicherweise unterschiedliche evolutionäre Ursprünge (Valentin *et al.*, 1993).

Die Fd-GOGAT ist die Hauptform der GOGAT in grünem Gewebe (Vance *et al.*, 1995) und konnte in *Arabidopsis thaliana* (Suzuki and Rothstein, 1997), *Zea mays* (Sakakibara *et al.*, 1991), *Pisum sativum* und *Vicia faba* (Wallsgrave *et al.*, 1977) nachgewiesen werden. Die N-GOGAT ist im Gegensatz zur Fd-GOGAT vor allem in den Plastiden von nicht photosynthetischen Geweben wie Wurzeln und Leitbündeln von Bedeutung, bzw in den sich entwickelnden Blättern und Samen. Vollständige cDNA-Sequenzen sind aus *Medicago sativa*

(Gregerson *et al.*, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Lam *et al.*, 1996) und *Oryza sativa* (Goto *et al.*, 1998) bekannt. In den Wurzelknöllchen von Leguminosen ist N-GOGAT zusammen mit der cytosolischen Form der Glutamin-Synthetase am Fixieren des Ammoniums beteiligt, welches durch die Rhizobien exportiert wird (Temple *et al.*, 1998). In den Wurzelknöllchen von *Phaseolus vulgaris* konnten zwei Isoformen der N-GOGAT nachgewiesen werden (Chen and Cullimore, 1989).

## 5. Die Biosynthese der Aminosäuren und deren komplexe Regulation in Pflanzen

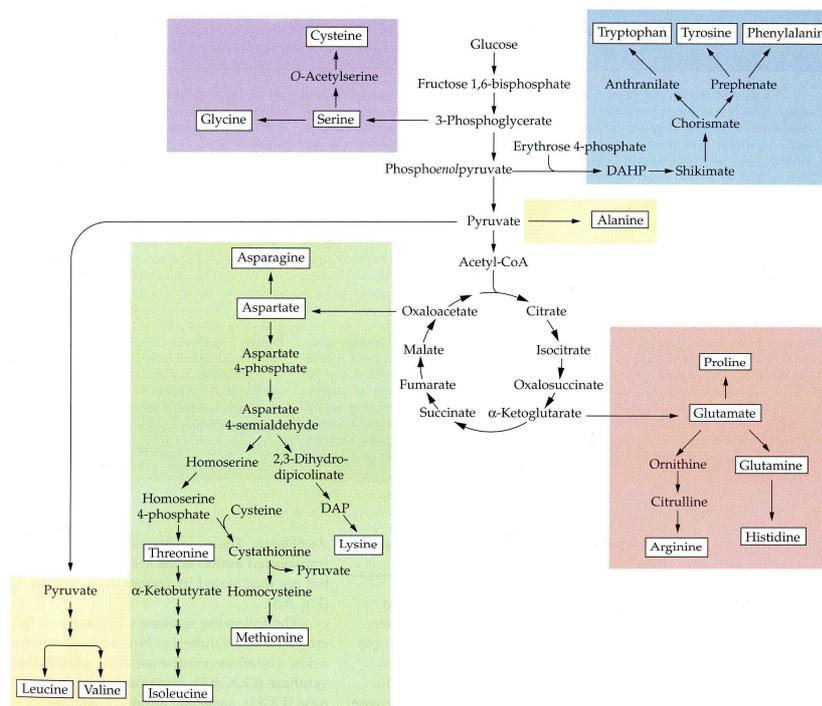
Die Endprodukte der Nitratassimilation sind die Aminosäuren. Die Aminosäuren sind die Bausteine der Proteine sowie Vorstufen zahlreicher pflanzlicher Sekundärstoffe. Ebenfalls sind sie an der Nukleotid-Biosynthese beteiligt. Man unterscheidet die „Hauptaminosäuren“ und die „kleinen Aminosäuren“. Zu den mengenmäßig sehr häufig vorkommenden Aminosäuren (Hauptaminosäuren) zählen Glutamin, Glutamat, Asparagin, Aspartat, Alanin, Glycin und Serin.

Die zentralen Aminosäuren für die Biosynthese entstehen durch verschiedene Transaminierungsreaktionen. Hierbei erfolgt eine reduktive Übertragung der Amidgruppe von Glutamat auf eine Dicarbonsäure. Die Bildung des Alanins erfolgt durch Transaminierung von Pyruvat durch die Alanin-Aminotransferase (ALAT; EC 2.6.1.2). Bei der Reaktion der Aspartat-Aminotransferase (ASAT; EC 2.6.1.1.) wird unter Bildung von Aspartat die Amidgruppe auf Oxalacetat übertragen. Aus Aspartat entstehen über Zwischenstufen die Aminosäuren Threonin, Isoleucin, Methionin und Lysin. Aus der im GS/GOGAT-Zyklus gebildeten Aminosäure Glutamat werden die Aminosäuren Prolin und Arginin synthetisiert, über die Zwischenstufe Glutamin entsteht Histidin. Die Enzyme Asparaginsynthetase bzw. Glutamin-Synthetase katalysieren unter ATP-Verbrauch die Aminierung von Aspartat zu Asparagin bzw. Glutamat zu Glutamin. Die Synthese von Valin und Leucin erfolgt aus zwei Molekülen Pyruvat. Die Aminosäuren Glycin und Serin werden hauptsächlich während der Photorespiration gebildet. Über den Shikimatweg werden aus Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gebildet.

Die pflanzliche Aminosäurebiosynthese ist vor allem durch Feedback-Regulationsmechanismen reguliert. Beispiele hierfür sind von den Aminosäuren bekannt, die vom Aspartat abstammen. Die Aspartatkinase wird sowohl von Lysin als auch von Threonin inhibiert. Von

diesem Enzym gibt es zwei Isoformen, wobei eine sensitiv für Lysin, die andere für Threonin ist (Azevedo *et al.*, 1990). Die Aktivität des Enzyms Cystathionin- $\gamma$ -Synthase wird durch die Menge an akkumuliertem Methionin beeinflusst (Kim and Leustek, 2000; Hesse *et al.*, 2001). Das Schlüsselenzym Dihydrodipicolinat-Synthase (DHDPS) wird durch die Aminosäure Lysin inhibiert (Galili, 1995; Azevedo *et al.*, 1997). Das Isoleucin inhibiert die Threonin-Desaminase (TD), welche den Initiierungsschritt zur Isoleucinsynthese katalysiert (Giovannelli *et al.*, 1988; Szamosi *et al.*, 1994). Die Aminosäuren Leucin und Valin wirken inhibierend auf das Enzym Acetolactat-Synthase (ALS), das aus zwei Pyruvatmolekülen Acetolactat synthetisiert (Singh and Shaner, 1995).

Das bakterielle PII-Protein, das regulatorischen Einfluss auf C- und N-Level in Bakterien hat, wurde in *Arabidopsis thaliana* (Smith *et al.*, 2002) und *Oryza sativa* (Sugiyama *et al.*, 2004) identifiziert. Das PII-Protein aus *Arabidopsis* wurde aufgereinigt und charakterisiert (Hsieh *et al.*, 1998). Das Protein bindet an 2-Oxoglutarat sowie ATP und bildet mit der N-acetyl-Glutamat-Kinase (NAGK) einen Proteinkomplex (Sugiyama *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). Das Enzym spielt in der Argininsynthese eine wichtige Rolle. Unter Stickstoffmangelbedingungen zeigten PII-Mutanten einen erhöhten Kohlenhydrat- sowie einen reduzierten Ammonium- und Aminosäuregehalt (Ferrario-Méry *et al.*, 2005).



**Abb. 2 Übersicht über die Biosynthese von Aminosäuren in Pflanzen.**

(aus „Biochemistry & Molecular Biology of Plants“, Buchanan – Grissem – Jones, 2000)

## 6. Viele verschiedene plastidäre Transportproteine sind für den Metabolitaustausch mit dem Cytosol notwendig

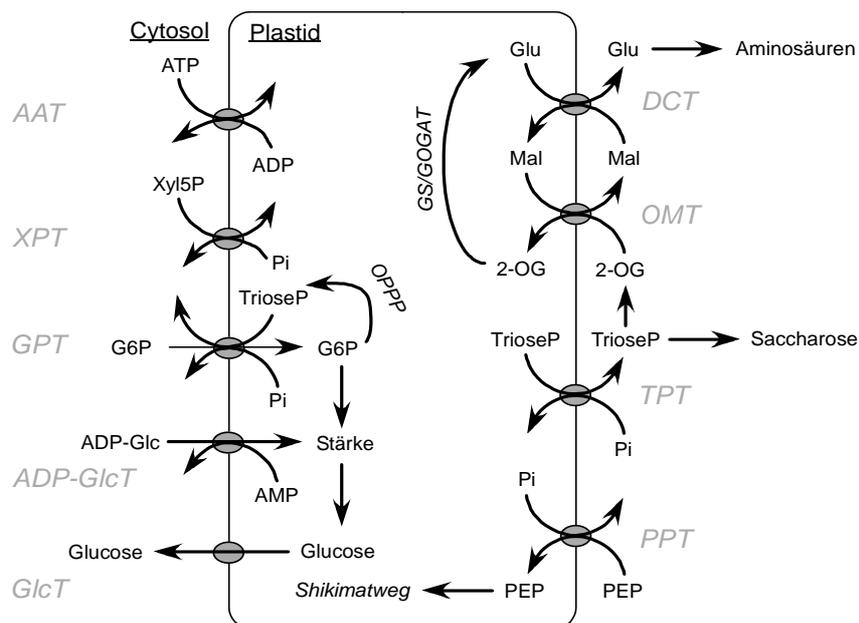
Plastiden sind pflanzliche Zellorganellen, welche von Proplastiden abstammen. Diese nicht ausdifferenzierten Plastiden sind im Meristem von Wurzel und Spross zu finden. Sie sind maternalen Ursprungs. Nach der Zelldifferenzierung entstehen Chloroplasten, Leukoplasten und Chromoplasten. Die Chloroplasten als Ort der Photosynthese enthalten im Stroma assimilatorische Stärke. Diese tagsüber gebildete Stärke dient als Reserve für die folgende Nacht. Ebenfalls findet man häufig Plastoglobuli, die aus Lipiden und Plastochinonen bestehen. Diese spielen unter Seneszenzbedingungen eine entscheidende Rolle. Nichtgrüne Gewebe wie z. B. Wurzeln oder Knollen enthalten Amyloplasten, eine Sonderform von Leukoplasten. Die Amyloplasten haben die Funktion von Stärkespeichern. Bei sich entwickelnden Samen wird die assimilatorische Stärke in den Chloroplasten und Amyloplasten gespeichert. Die Chromoplasten sind durch eine Einlagerung von Carotinoiden gekennzeichnet.

In den Chloroplasten sind verschiedene biochemische Reaktionswege lokalisiert, wie z. B. die Photosynthese, Stickstoff- sowie Schwefelassimilation, Fettsäurebiosynthese und Aminosäurebiosynthese. In höheren Pflanzen sind die Chloroplasten von einer doppelten Membran umgeben. Durch integrierte, spezifische Transportproteine in der inneren Plastidenmembran erfolgt die Selektion der Moleküle. Alle bis jetzt charakterisierten Translokatoren sind kerncodierte, hydrophobische,  $\alpha$ -helikale Membranproteine. Im Genom von *Arabidopsis* konnten ungefähr 140 putative plastidäre Transporter identifiziert werden (Schwacke *et al.*, 2003). Diese Proteine werden als Vorläuferproteine an cytosolischen Ribosomen synthetisiert, in die Chloroplasten importiert und dort in die fertige Form prozessiert. Für den Chloroplastenimport ist eine N-terminale Signalsequenz notwendig.

Der Austausch von phosphorylierten Kohlenhydraten mit anorganischen Phosphat (Pi) erfolgt durch Phosphattranslokatoren (PTs). Es können vier Klassen definiert werden: der Triose-Phosphat/Phosphat-Translokator (TPT), der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT), der Xylose-5-Phosphat/Phosphat-Translokator (XPT) sowie der Glucose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator (GPT). Im *Arabidopsis*-Genom konnten sechs Gene identifiziert werden, die für Phosphattranslokatoren codieren. Jeweils ein Gen codiert für den TPT und XPT, jeweils zwei Gene für den PPT und GPT. In einer EST-Bank von *Pisum sativum* konnten homologe Gene für die jeweiligen Vertreter aus *Arabidopsis* identifiziert werden.

Die Hauptaufgabe des TPT ist der Export von fixiertem Triosephosphat aus dem reduktiven Pentosephosphatweg in das Cytosol. Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator importiert Phosphoenolpyruvat (PEP) in die Plastiden. PEP ist Vorläufer für die Synthese aromatischer Aminosäuren, von Fettsäuren und Lipiden sowie von sekundären Pflanzenstoffen (Fischer *et al.*, 1997). Der XPT vorsorgt den oxidativen Pentosephosphat-Pathway (OPPP) mit C-Gerüsten in Form von Xylose-5-Phosphat (Eicks *et al.*, 2002). Der Import von Glucose-6-phosphat in die Plastiden für Stärkesynthese und OPPP erfolgt über den GPT. Dieser wird vorwiegend in nicht-photosynthetisch aktiven Plastiden benötigt (Fischer and Weber, 2002).

Ein weiteres Substrat für die Stärkesynthese ist ADP-Glucose. Dieses wird bei Monokotyledonen über den ADP-Glucose/Adenylat-Translokator in die Plastiden importiert. Bei Dikotyledonen erfolgt die Synthese von ADP-Glucose in den Chloroplasten. Die aus dem Stärkeabbau frei werdende Glucose wird mittels eines Glucose-Translokators in das Cytoplasma exportiert. Der Import von 2-Oxoglutarat als C-Gerüst für die Aminosäurebiosynthese erfolgt über den 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator (OMT). Die im



**Abb. 3 Transportproteine der inneren Plastidenmembran (modifiziert nach Flüge U.I., 1998)**

AAT – ADP/ATP-Translokator; XPT – Xylose-5-phosphat/Phosphat-Translokator; GPT – Glucose-6-phosphat/Phosphat-Translokator; ADP-GlcT – ADP-Glucose/Adenylat-Translokator; GlcT – Glucose-Translokator; DCT – Glutamat/Malat-Translokator; OMT – 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator; TPT – Triosephosphat/Phosphat-Translokator; PPT – PEP/Phosphat-Translokator.

ADP-Glc – ADP-Glucose; 2-OG – 2-Oxoglutarat; G6P - Glucose-6-phosphat; Glu – Glutamat; GS – Glutamin-Synthetase; GOGAT – Glutamatsynthase; Mal – Malat; OPPP – oxidativer Pentosephosphatweg; Pi – inorganisches Phosphat; TrioseP – Triosephosphat.

GS/GOGAT-Zyklus synthetisierte Aminosäure Glutamat wird über den Glutamat/Malat-Translokator (DCT) in das Cytosol exportiert. Die Biosynthesewege in Plastiden sind sehr energieabhängig. Über den ATP/ADP-Translokator (AAT) sowie die Photosynthese werden sie mit Energie in Form von ATP versorgt (Neuhaus *et al.*, 1997).

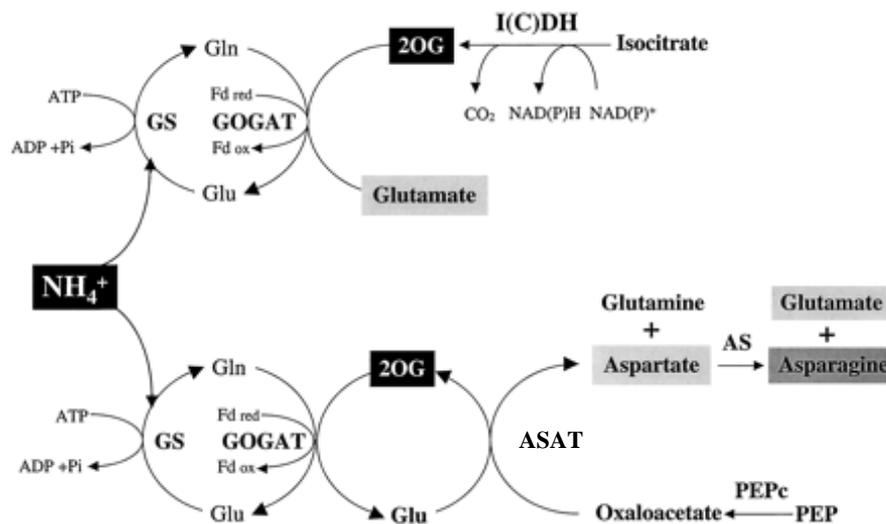
## 7. Isocitrat-Dehydrogenase und Aspartat-Aminotransferase generieren 2-Oxoglutarat für den GS/GOGAT-Zyklus

Die Isocitratdehydrogenase decarboxyliert Isocitrat zu 2-Oxoglutarat (2-OG) unter Verwendung eines Reduktionsäquivalentes. Es existieren zwei Typen der Isocitratdehydrogenase. Die IDH verwendet NAD als Cofaktor, die ICDH hingegen NADP. (Lancien *et al.*, 2000; Hogdes, 2002). Die IDH ist ein Enzym des Tricarbonsäurezyklus und kommt nur im Mitochondrium vor. Verschiedene Isoenzyme der ICDH wurden im Cytosol, Mitochondrium, Plastiden und Peroxisomen gefunden. Die genaue physiologische Funktion der ICDH ist unbekannt (Gálvez *et al.*, 1999).

Für die Produktion des 2-Oxoglutarats mit Hilfe der Isocitratdehydrogenase gibt es zwei Hypothesen. Das im TCA-Zyklus produzierte 2-OG verlässt die Mitochondrien über einen Transporter und wird in die Plastiden importiert. Als indirekter Nachweis für diese Theorie könnte angesehen werden, dass nach Nitratzugabe auf unter Nitratmangel gehaltenen Tabakpflanzen eine koordinierte Expression der IDH mit Genen des TCA-Zyklus, der Nitratreduktion sowie der Ammoniumassimilation erfolgt (Lancien *et al.*, 1999). Das Citrat des Tricarbonsäurezyklus wird in das Cytosol exportiert, wo es durch die cytosolische Aconitase in Isocitrat umgewandelt wird. Dieses kann zu 2-OG durch die ICDH umgesetzt und in die Plastiden importiert werden. In Tabakpflanzen mit einer Nitratreduktase (NR)-Defizienz konnte eine signifikante Erhöhung von ICDH, GS2, Fd-GOGAT, PEPC und PK-Transkriptmengen beobachtet werden (Scheible *et al.*, 1997). Dies kann als funktionelle Coordination der cytosolischen ICDH, GS2 und Fd-GOGAT interpretiert werden. Nach induzierter Seneszenz in Kartoffelblättern konnte eine erhöhte ICDH-Aktivität gemessen werden, obwohl alle Proteine abgebaut wurden (Fieuw *et al.*, 1995). Die ICDH könnte somit eine Rolle bei der Remobilisierung der Proteine sowie dem Export der Aminosäuren spielen. Diese Argumente sprechen für eine Beteiligung der ICDH an der 2-OG-Produktion für die Ammoniumassimilation. In Kartoffeln mit signifikant reduzierter ICDH-Aktivität konnte keine Veränderung im Phänotyp, des C- oder N-Metabolismus sowie der Aminosäure-

Niveaus festgestellt werden (Kruse *et al.*, 1998). Das widerspricht einer Beteiligung der ICDH am GS/GOGAT-Zyklus.

Die Aspartat-Aminotransferase (ASAT) generiert 2-OG, indem die Amidgruppe vom Glutamin auf Oxalacetat übertragen wird. Die ASAT hat eine Bedeutung sowohl im Transport von Redoxäquivalenten als auch im Stickstofftransfer auf das Transportmolekül Aspartat. Die Isoenzyme der ASAT sind in Plastiden, im Cytosol, in Mitochondrien und in Peroxisomen lokalisiert (Ireland and Lea, 1999), wobei die cytosolische und plastidäre Isoform dominant in Pflanzen ist. Studien an der Arabidopsis-Mutante *asp2* zeigten, dass die cytosolische Isoform verantwortlich für die Aufbau eines Aspartat-pools im Licht ist. Dieser wird im Dunkeln zu Asparagin umgewandelt, welches für den Stickstofftransport innerhalb der Pflanze verwendet wird (Schultz *et al.*, 1998). Während der Entwicklung der Wurzelknöllchen der Leguminosen konnte eine Erhöhung des ASAT-Transkriptlevel nachgewiesen werden. Dieser Anstieg ließ sich auf die Expression der plastidären Isoform AAT2 zurückführen (Vance *et al.*, 1994). Dies weist auf eine erhöhte 2-OG-Produktion aus Oxalacetat hin sowie auf einen erhöhten Transfer von Redoxäquivalenten.



**Abb. 4 Ammoniumassimilation im GS/GOGAT-Zyklus in Pflanzen.**

(aus "Enzyme Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plant Ammonium Assimilation", Lancien *et al.*, Plant Phys., 2000)

## 8. Der plastidäre Import von 2-Oxoglutarat durch den 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator ist entscheidend für die Ammoniumassimilation

Die Dicarbonsäure 2-Oxoglutarat wird in verschiedenen Zellkompartimenten wie im Mitochondrium und/oder im Cytosol synthetisiert. Verschiedene mitochondriale 2-OG-Translokatoren aus *Panicum miliaceum* für den 2-OG-Export wurden isoliert und charakterisiert (Taniguchi and Sugiyama, 1996). In der inneren Chloroplastenmembran wurden zwei Translokatoren identifiziert, die für den Dicarbonsäuretransport zuständig sind (Woo *et al.*, 1987a; Flüge *et al.*, 1988). Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator (OMT, DiT1) akzeptiert vor allem Dicarbonsäuren (2-Oxoglutarat, Malat, Succinat, Fumarat), wogegen der Glutamat/Malat-Translokator (DCT, DiT2) noch zusätzlich die Aminosäuren Glutamat und Aspartat transportiert. Es wurde ein 2-Translokator-Modell für den Transport des 2-OGs und des Glutamats postuliert (Weber and Flüge, 2002). Der OMT transportiert das Kohlenstoffgerüst 2-OG in die Plastiden im Austausch gegen Malat. Durch den GS/GOGAT-Zyklus erfolgt die Aminierung des 2-OG zu Glutamat. Durch den DCT wird das Glutamat in das Cytosol exportiert, wogegen Malat aus dem Cytosol importiert wird. Es erfolgt somit kein Netto-Malat-Transport. Auf der Grundlage kinetischer Studien für verschiedene Substrate wurde ein push-und-pull-Mechanismus für den Dicarbonsäuretransport vorgeschlagen (Yu and Woo, 1992a, b).

Durch eine Säulenchromatographie von Membranproteinen sowie Transportmessung mittels Liposomen konnte 1993 durch Menzlaff und Flüge der plastidäre 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator (OMT) aus Spinat identifiziert werden. Die vollständige cDNA des OMT codiert für ein hoch hydrophobes Protein mit 569 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 60,3 kDa (Weber *et al.*, 1995). Es hat einen kalkulierten isoelektrischen Punkt von 9,6 sowie ein N-terminales Plastidenlokalisierungssignal. Das OMT-Protein ist ein Dimer mit zwei identischen Untereinheiten zu je sechs  $\alpha$ -Helices. Zu den Dicarbonsäuretransportern der Mitochondrien konnte keine signifikante Ähnlichkeit festgestellt werden (Taniguchi and Sugiyama, 1996). Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator konnte in weiteren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Taniguchi *et al.*, 2002), *Zea mays* (Taniguchi *et al.*, 2004), *Oryza sativa* (Ohyanagi *et al.*, 2006) und *Sorghum bicolor* (Renne *et al.*, 2003) identifiziert werden.

Um die beiden Dicarbonsäuretransporter im vegetativem Gewebe funktionell zu charakterisieren, wurden verschiedene Mutanten erzeugt. Die Arabidopsis-Mutante *dct*, welche nur unter hohen CO<sub>2</sub>-Bedingungen wuchs und einen verminderten Dicarbon-

säuretransport hatte, wies einen Defekt im plastidären Glutamat/Malat-Translokator auf (Somerville and Somerville, 1985). Eine ähnliche Mutante wurde in Gerste beschrieben (Wallsgrave *et al.*, 1986). Die antisense-Repression des OMT in Tabakblättern hatte einen verminderten 2-Oxoglutarattransport (Schneiderei *et al.*, 2006) zur Folge. Es kam zu einer massiven Akkumulation von Glutamin, der Gehalt an Glutamat und der restlichen Aminosäuren war reduziert. Der respiratorische Phänotyp, charakterisiert durch Akkumulation von Ammonium sowie Ausbleichen der Blätter, wurde ebenfalls beschrieben. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der postulierten Funktion des OMTs in Blättern.

## 9. Zielsetzung der Arbeit

Leguminosen wie z. B. die Ackerbohne (*Vicia faba*) und die Erbse (*Pisum sativum*) spielen in der Landwirtschaft sowie in der Tierhaltung eine wichtige Rolle. Aufgrund der Symbiose mit Bakterien der Gattung *Rhizobium* sind sie in der Lage, mit Hilfe dieser Bakterien Luftstickstoff zu fixieren und der Pflanze als Ammonium zur Aminosäurebiosynthese zur Verfügung zu stellen. Als einer der Hauptspeicherstoffe werden in den Leguminosensamen Proteine eingelagert. Die Verteilung der Metabolite im Samen wird vom Metabolismus innerhalb der Speicherparenchymzellen reguliert. Dabei spielen die Plastiden eine entscheidene Rolle. Plastidäre Biosynthesewege sind abhängig vom Import der Vorstufen sowie der Interaktion zwischen den Biosynthesewegen. Es sind eine Vielzahl von plastidären Translokatoren bekannt, die molekular sowie biochemisch charakterisiert waren.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von plastidären Translokatoren auf Transportprozesse der Metabolite während der Samenentwicklung von *Pisum sativum* näher untersucht werden. Hierfür sollte der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator in Erbsensamen funktionell charakterisiert werden. Hierfür sollten transgene Linien erzeugt werden, in denen der OMT eine verringerte sowie eine erhöhte Metabolitransportrate aufweist. Die veränderten Metabolitflüsse und Metabolitverteilungen geben Auskunft über den Einfluss auf den C/N-Haushalt im Samen. Ein weiterer plastidärer Translokator, der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT), sollte in Erbsensamen überexpressiert werden mit dem Ziel, Metabolitflüsse und Metabolitverteilungen zu verändern.



## II. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Biozym Diagnostik (Hess. Oldendorf), Difco (Detroit MI, USA), Duchefa (Niederlande), Fluka (Schweiz), Gibco-BRL (heute Invitrogen, Paisley, Großbritannien), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Boehringer (Mannheim) gekauft. Es wurde Taq-DNA-Polymerase von Roche Diagnostics (Mannheim) eingesetzt. Die verwendete Chromatographie-Matrix stammte von der Firma Waters (Eschborn). Zur Plasmid-Isolation sowie Gelelektion wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden) und Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die verwendeten Nylonmembranen, Labeling Kits für die Markierung der DNA-Sonden sowie die Radioaktivität stammten von den Firmen Amersham (Braunschweig), Hartmann Analytic (Braunschweig) und Ge Healthcare (Großbritannien).

#### 1.2. Geräte

Es wurden folgende Geräte von folgenden Firmen verwendet:

7900HT Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems
Lichtmikroskop Axioskop	Zeiss
Biofuge fresco, Biofuge 15, Multifuge 3 S-R	Heraeus
BioPhotometer	eppendorf
CelloShaker Variospeed	Chemetron
Centrifuge 5415 C / R	eppendorf
Cleanbench LaminAir HB 2448	Heraeus
Eagle-Eye® II Still Video System	Stratagene
Elektronenmikroskop 902	Zeiss
Elementaranalyseanlage Vario El III	elementar Analysesysteme GmbH
Eraser	raytest
Feinwaage LA120S, LC 2200 P	Sartorius

Gefriertrocknung Alpha 1-4 mit LDC-1M	Martin Christ Gefriertrocknung GmbH
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems
HBQ-Kammer (055770), Klimaschrank HPS 1500/S	Heraeus/Vötsch
hp color LaserJet 3700 dn, hp scanjet 5590	Hewlett-Packard
HPLC-Anlage (AS-50 Thermal Compartment, AS-50 Autosampler, EG40 Eluent Generator, ED50 Electrochemical Detector, GS50 Gradient Pump Software Comeleon)	Dionex (Idstein)
HPLC-Anlage (Gradientenpumpe, Entgasungsmodul, Gekühlte Microtiterplatte mit Autosampler, Fluorescencedetector 2475, Software EmPower)	Waters GmbH
Hybridisierungsöfen OV5	Biometra
LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter	Beckman Coulter GmbH
Mastercycler eppgradient	eppendorf
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	peqLab
OKI Microline 320 Tube, 9 Pin Printer	OKI
Perfect Blue™ Gelsystem Mini S	peqLab
Perfect Blue™ Breitformat Gelsystem Mini ExM	peqLab
Perfect Blue™ Gelsystem Maxi S & M	peqLab
Phosphoimager FLA-5100	Fujifilm
Powersupply BIO 105 LVD Ce	Biometra
Pflanzenzell-Kulturschrank RUMED® 1602	Rubarth Apparate GmbH
Refrigerated Vapo Trap RVT 100	Savat
Rührer IKAMAG® RH	IKA
Schüttler 3033	GFL
Schüttler IKA-VIBRAX Typ VX 2E	IKA
Series 900 mini-monitor	Wellhöfer Dosimetrie
SLAB Gel Dreyer	Appligene
Spectrophotometer UVIKON 900	Goebel Instrumentelle Analytik
Tissue Lyser	Quiagen/Retsch
Thermomixer 5436 / 5437 / compact / comfort	eppendorf
Univapo 100H Speedvac	Uniquip
UV Stratalinker® 2400	Stratagene
Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Inc.
Wasserbadschüttler 1083	GFL

1.3. Organismen/Stämme

***Escherichia coli***

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
DH5 $\alpha$	$F^-$ , <i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ), <i>hsdR17</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> <i>relA1</i> , <i>recA56</i>	Klonierung Transformation Amplifikation	Clontech, Hanahan, 1983
One Shot® TOP10	$F^-$ <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD</i> 139 $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> ( <i>Str<sup>R</sup></i> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Klonierung Transformation Amplifikation	Invitrogen
XL-1 Blue MRF'	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [ <i>F'</i> <i>proAB</i> <i>lacI<sup>d</sup>Z</i> $\Delta$ <i>M15</i> <i>Tn10</i> ( <i>Tet<sup>r</sup></i> )]	In vivo Excision	Stratagene, La Jolla, USA
XL0LR	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>lac</i> [ <i>F'</i> <i>proAB</i> <i>lacI<sup>d</sup>Z</i> $\Delta$ <i>M15</i> <i>Tn10</i> ( <i>Tet<sup>r</sup></i> )] <i>Su<sup>-</sup></i> ( <i>nonsuppressing</i> ) $\lambda^r$ ( <i>lambda resistant</i> )	In vivo Excision	Stratagene, La Jolla, USA

***Agrobacterium tumefaciens***

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
EHA101	<i>Agropin/Succinamopin-Typ, L, L-Succinamopin vir-Region, disarmed, hypervirulent, kan<sup>r</sup></i>	Transformation	Hood <i>et al.</i> , 1993
EHA105	<i>Agropin/Succinamopin-Typ, L, L-Succinamopin vir-Region (pTiBo542<math>\Delta</math>T, A281), disarmed, hypervirulent, kan<sup>s</sup></i>	Transformation	Hood <i>et al.</i> , 1993
AGL1	<i>AGL0</i> <i>recA::bla</i> <i>pTiBo542<math>\Delta</math>T</i> <i>Mop<sup>+</sup></i> <i>Cb<sup>R</sup></i>	Transformation	Lazo <i>et al.</i> , 1991

***Arabidopsis thaliana***

Bezeichnung	Verwendung
<i>Arabidopsis thaliana</i> L. cv Columbia	Transformation

***Nicotiana tabacum***

Bezeichnung	Verwendung
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Samsun	Transformation
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Havana	Transformation

***Pisum sativum***

Bezeichnung	Verwendung
<i>Pisum sativum</i> L. cv Eiffel	Transformation
<i>Pisum sativum</i> L. cv Erbi	Transformation

***Vicia narbonensis***

Bezeichnung	Verwendung
<i>Vicia narbonensis</i> L.	Transformation

1.4. Anzucht von Pflanzen und Probennahme

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* L. cv Columbia erfolgte im Klimaraum bei 20 °C, 16 h Licht (8.000 lux) (Lichtphase) und 60-65 % relativer Luftfeuchte, und 18 °C, 8 h (Dunkelphase). Für die Transformation wurden Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte verwendet (vor dem Samenansatz) (Lloyd *et al.*, 1986). Diese wurden nach der Agrobacterium-Infektion für 1 d liegend inkubiert, danach wieder aufrecht gestellt. Die Samen der F1-Generation wuchsen nach Stratifikation (2 d, 4 °C im Dunkeln) *in vitro* auf selektivem MS-Medium unter Standard-Gewächshausbedingungen (16 h Licht [1.700 lux] bei 22 °C; 8 h Dunkelheit, keine Veränderung der Temperatur).

Die Anzucht der Tabakpflanzen erfolgte unter gleichen Bedingungen wie die von *Arabidopsis thaliana* (siehe oben). Die Blätter von 4 Wochen-alten Pflanzen wurden für die Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* verwendet. Die transformierten Explantate sowie Jungpflanzen wurden auf selektivem Medium kultiviert. Nach dem Umsetzen in Erde erfolgte das weitere Wachstum im Gewächshaus (16 h Licht bei 21 °C, 8 h Dunkelheit bei 19 °C).

Die Erbsenpflanzen für die Transformation wuchsen in der Klimakammer bei einem 16 h Licht (19 °C, 25.000 lux)/ 8 h Dunkelheit (16 °C)-Zyklus auf, bis die Samen das Stadium mit dem maximalen Gewicht erreicht hatten. Die Embryonalachse dieser Samen wurde dann für die Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* verwendet (Saalbach *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 1993). Die Explantate wurden im Klimaschrank (16 h Licht bei 22 °C, 2.000 lux, 16 °C in der Dunkelphase) auf MS-Medium mit Phosphinotricin unter Sterilbedingungen weiter kultiviert. Aus den Explantaten sich entwickelnde Jungpflanzen wurden auf Wurzeln älterer Erbsenpflanzen gepfropft. Diese wuchsen dann in der Klimakammer bei 16 h Licht (18 °C, 25.000 lux), 8 h Dunkelheit (16 °C) weiter.

Zur Untersuchung der transgenen Erbsenpflanzen wurde die F1-Generation unter veränderten Bedingungen (16 h Licht bei 22 °C, 25.000 lux, 8 h Dunkelheit bei 20 °C) vorkultiviert. Nach 2 Wochen Wachstum erfolgte die Probenahme von Blättern, das Umtopfen sowie das weitere Wachstum unter Standardbedingungen (16 h Licht bei 19 °C, 25.000 lux; 8 h Dunkelheit bei 16 °C). Die antisense-Pflanzen wurden ab dem Tag der Blüte bei erhöhter Temperatur weiterkultiviert (16 h bei 23 °C, 18.000 lux, 8 h Dunkelheit bei 16 °C; 70 % Luftfeuchte). Die Blüten der selbstbestäubenden Pflanzen wurden im Zustand voller Blüte etikettiert. Ab dem 12. day after flowering (DAF) wurden Samen zur weiteren Analyse geerntet. Von jeder Hülse wurden die mittleren Samen entnommen, die Samenschale entfernt, das Gewicht bestimmt und sofort im flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bei – 80 °C gelagert.

### 1.5. Plasmide und Primer

<b>Plasmid</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Quelle</b>
pBluescript II KS+	Klonierung	Stratagene, La Jolla, USA
pBK-CMV	Klonierung (cDNA-Bank)	Stratagene, La Jolla, USA
pCR®2.1-TOPO®	Klonierung	invitrogen, Paisley, UK
pCR®4-TOPO®	Klonierung	invitrogen, Paisley, UK
pBar	Klonierung, Expression	Dr. Isolde Saalbach

Die Primer wurde von der Firma metabion international AG (Martinsried) bezogen. Die Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA GmbH (Berlin) durchgeführt.

Primer	Basenfolge 5' → 3'	Verwendung
<u>pCR®2.1-TOPO/pCR®4-TOPO</u>		
T3	AATTAACCCCTCACTAAAGGG	Sequenzierung
T7 (prom)	GTAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
M13-24F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Sequenzierung
M13-24R	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA	Sequenzierung
<u>Genome Walking mit BD GenomeWalker™ Universal Kit</u>		
GSP1	GACAAATCAGCCATGGAATTGGATCGCC	Genome Walking
GSP2	GCCGGAGAATGCAGCAACGAAGGGTAG	Genome Walking
<u>Antisense-Konstrukt des Oxoglutarat/Malat-Translocators aus <i>Pisum sativum</i></u>		
OMTforBamH1	AAGGATCCGGTATTTTGGTTCTCCTATACTT <i>BamHI</i>	Klonierung in pBar PCR-Nachweis
OMTrevBamH1	AAGGATCCTTACCACAAGCCAATGGCTT <i>BamHI</i>	Klonierung in pBar PCR-Nachweis
<u>Sense-Konstrukt des Oxoglutarat/Malat-Translocators aus <i>Arabidopsis thaliana</i></u>		
AtOMTBamH1for	AATGGATCCCGCCGACGACGCTACAAC <i>BamHI</i>	Klonierung in pBar PCR-Nachweis
AtOMTBamH1rev	CGAGGATCCAAGATTGGTGTATGGTGGTCC <i>BamHI</i>	Klonierung in pBar PCR-Nachweis
AtOMT367-393	CCCGACGATGGTGGCGAGGAAGATCGC	Sequenzierung PCR-Nachweis
<u>Sense-Konstrukt des PEP/P-Translocators aus <i>Brassica oleracea</i></u>		
BoPPTBamH1for	CTAGAATCCAGATCTCCCACGATGCAG <i>BamHI</i>	Klonierung in pBar PCR-Nachweis
BoPPTBamH1rev	CGCGGATCCAGTAGCAGATAGTTTGCTTAG <i>BamHI</i>	Klonierung in pBar PCR-Nachweis
<u>Sense- und antisense-Konstrukt der Cytokininoxidase aus <i>Pisum sativum</i></u>		
PsCKXBamH1for	CCAGGATCCGAAATCAAGAAACAATGGC <i>BamHI</i>	Klonierung in pBar PCR-Nachweis
PsCKXBamH1rev	CTAGGATCCATTTTGTGCTGCTGCATTACAT <i>BamHI</i>	Klonierung in pBar PCR-Nachweis

Legumin B4-Promotor aus *Vicia faba*

LegB4prom+	ACAGTGATTTGCAAAGAGTAGATG	Klonierung in PCR-Nachweis
LegB4rev	TATATTCTTTTGTCTTTCATCT	Klonierung in PCR-Nachweis

Promotor des USP(unkown seed protein)-Gen aus *Vicia faba*

USPSmaIfor	ATACCCGGGCTGCAGCAAATTTACACATT <i>SmaI</i>	Klonierung in PCR-Nachweis
USPBamHIrev	CGCGGATCCCTGGCTATGAAGAAATTATAA <i>BamHI</i>	Klonierung in PCR-Nachweis

Octopine synthase (ocs) Terminator

OCSfor	ACACCGAGCGGCGAACTAATAACG	PCR-Nachweis
OCS_240b	CGTAACTTTCGGTAGAGC	PCR-Nachweis

Real time quantitative PCR

qRT-1272for	AACCTTATGGGCGGCCTTACT	qRT-PCR-Nachweis
qRT-1322rev	AAAACACTGGAGCTGACCCAA	qRT-PCR-Nachweis
PsActin774-794for	ATGCCCTGAAGTTCTGTTCCA	qRT-PCR-Nachweis (Quantifizierung)
PsActin830-810rev	TGGATACCCGGAGATTCCATG	qRT-PCR-Nachweis (Quantifizierung)

## 2. Methoden

### 2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1. Isolierung von genomischer DNA

Die Methode zur Isolierung genomischer DNA wurde entwickelt von P. M. Rogowsky *et al.*, 1991 und entsprechend den Ausgangsmaterialien variiert. 400 mg Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff mittels Stahlkugel und Schwingmühle zerkleinert und anschließend in gleichen Teilen Extraktionspuffer und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) resuspendiert. Diese Suspension wurde 2 Minuten unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 5.000 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 Vol. Isopropanol versetzt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 15.000 rpm, 4 °C), zur Pelletierung der DNA. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und danach in sterilem Wasser aufgenommen. Zur Entfernung von RNA aus der genomischen DNA folgte eine RNase-Behandlung (40 µg/ml RNase in TE, pH 8,0) für 30 Minuten bei 37 °C. Die genomische DNA wurde weiterverwendet oder bei –20 °C gelagert.

Eine weitere in dieser Arbeit verwendete Methode zur Isolation genomischer DNA ist die Methode von Edwards *et al.* 1991. Hierbei werden die Zellen mittels SDS aufgeschlossen, und die DNA durch Zugabe von 5 M Kaliumacetat und Isopropanol wird ausgefällt. Es erfolgt keine Abtrennung von Proteinen mittels Phenol/Chloroform. Nach dem Waschen mit Ethanol wird das DNA-Pellet in Wasser aufgenommen. Aufgrund der Verunreinigungen kann die DNA für Southernblot-Analysen nicht verwendet werden und ist nur für Analysen mittels PCR verwendbar.

Um hochreine genomische DNA zu erhalten, wurde die Methode von Saghai-Maroff *et al.*, 1984 verwendet. Nach Zellaufschluss und Abtrennung der Proteine wird die obere wässrige Phase mit kaltem 96 %igem Ethanol versetzt und der sich bildende DNA-Strang wird mittels eines Glasstabes aufgenommen. Es folgt eine nochmalige Phenol/Chloroform-Behandlung sowie die Fällung durch 7,5 M Ammoniumacetat und Isopropanol. Nach dem Waschen mit Ethanol und Aufnahme des Pellets in Wasser wird die DNA mit RNase behandelt.

### 2.1.2. Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA

Zur Transkriptanalyse muss zunächst RNA präpariert werden. Von grundlegender Bedeutung ist dabei der Ausschluss von RNasen (Tragen von Schutzhandschuhen, Verwendung RNase-freier Materialien und Lösungen).

Die Methode zur RNA-Isolation wurde beschrieben in Heim *et al.*, 1993 und entsprechend des Materials variiert. 200 mg in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Gewebe wurden im Mörser zerkleinert und mit jeweils 700 µl Extraktionspuffer und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) versetzt. Nach anschließender 2minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm sowie nochmaliger Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die obere wässrige Phase mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 96%igem EtOH versetzt. Die RNA fällt man für eine halbe Stunde bei -80 °C. Durch 5minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde das Präzipitat pelletiert. Das Lösen des Pellets in Wasser erforderte 2-3 Stunden. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden dem Überstand 200 µl 4 M LiCl zugegeben. Dieser Fällungsschritt erfolgt über Nacht auf Eis. Das Pellet wurde nach der Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 Minuten mit 2 M LiCl sowie mit 70%igem Ethanol gewaschen und in RNAase freiem Wasser aufgenommen.

Die gewonnene Gesamt-RNA kann für verschiedene Zwecke verwendet werden. Für die Herstellung einer Phagen-cDNA-Bank muss aus der Gesamt-RNA mRNA gewonnen werden. Hierfür wurde der Dynabeads® mRNA Purification Kit verwendet. Die Durchführung ist dem Kit-Handbuch der Firma Dynal Biotech zu entnehmen. Schlüsselkomponenten sind die oligo (dT)<sub>25</sub>-Primer, die an superparamagnetische Polystyrolkugeln gebunden sind. Der Poly-A-Schwanz der mRNA bindet kovalent an die Poly-T-Ketten und kann dadurch vom Rest separiert werden. Nach Abtrennung der mRNA von den Poly-T-Ketten kann diese für die cDNA-Synthese verwendet werden.

### 2.1.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die Messung der optischen Dichte (OD) verwendet. Die Nukleinsäuren besitzen ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 260 nm, welches auf der Absorption der aromatischen Ringe der Basen beruht (Bioanalytik, 2006). Mit Hilfe der Beziehung  $OD_{260\text{nm}} = 1 \equiv 50 \mu\text{g/ml}$  für doppelsträngige DNA sowie  $OD_{260\text{nm}} = 1 \equiv 40 \mu\text{g/ml}$  für RNA ist es möglich, die Konzentration zu berechnen.

$$c \left[ \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{\text{OD}_{260} \cdot 50 \cdot \text{VF}}{1000} \quad \text{bzw.} \quad c \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{\text{OD}_{260} \cdot 50 \cdot \text{VF}}{1000 \cdot M_w(\text{DNA})}$$

Zur Bestimmung der Reinheit kann man das Verhältnis von  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  und  $\text{OD}_{280\text{nm}}$  ( $\text{OD}_{260\text{nm}} : \text{OD}_{280\text{nm}}$ ) berechnen. Ein Verhältnis von 1,8 – 2 weist auf eine proteinfreie Nukleinsäurelösung hin. Jedoch ist dieses Verhältnis von pH-Wert und Salzgehalt abhängig und kann deshalb sehr variieren (Wilfinger *et al.*, 1997). Für die photometrische Konzentrationsbestimmung benötigt man relativ viel DNA bzw. RNA ( $> 0,25 \mu\text{g/ml}$ ).

Um geringe Mengen an DNA abschätzen zu können, wurde ein Agarosegel mit Ethidiumbromid verwendet (Nachweisgrenze bei ca. 20 ng). Zur Abschätzung der Konzentration kann eine Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration eingesetzt werden.

#### 2.1.4. Hybridisierungsexperimente

##### 2.1.4.1. Southern-Analyse

Bei der Southern-Hybridisierung werden DNA-Fragmente, die vorher mittels Restriktionsenzymen erzeugt wurden, mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und auf eine Membran fixiert. Durch Hybridisierung mit markierten Sonden werden einzelne Fragmente spezifisch nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde die von Southern (1975) entwickelte Methode in modifizierter Form verwendet. Dafür wurden 15  $\mu\text{g}$  genomischer DNA mit 10  $\mu\text{l}$  Restriktionsenzym (10 U/ $\mu\text{l}$ ) versetzt und inkubiert. Die Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegels aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Übertragung auf eine Membran erfolgte eine Behandlung des Geles mit 0,25 M HCl zur Depurinierung sowie weiterer Fragmentierung der DNA, gefolgt von einem Denaturierungs- und Neutralisierungsschritt (Meinkoth *et al.*, 1984). Die DNA wurde durch *semi-dry blotting* mit 20x SSC-Puffer auf eine Nylonmembran Hybond N+ (GE Healthcare) transferiert. Nach UV-Fixierung der DNA erfolgte die Prähybridisierung mit Church-Puffer (Church *et al.*, 1984). Die DNA-Sonde wurde mit radioaktivem [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] -dCTP (Amersham & Hartmann Analytic) und dem Rediprime II Random Prime Labelling System (GE Healthcare) markiert (Feinberg *et al.*, 1983; Feinberg *et al.*, 1984). Die Hybridisierung wurde bei 65 °C über Nacht durchgeführt (Sambrook *et al.*, 2001). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 20

min mit vorgewärmter Spüllösung gewaschen. Die Auswertung erfolgte autoradiographisch mittels des Phosphoimagers (FLA-5100, Fujifilm).

### 2.1.4.2. RNA-Gelblot-Analyse

Bei der Northern-Hybridisierung wird denaturierte RNA auf eine Membran fixiert, und mit markierten Sonden werden spezifische Transkripte nachgewiesen. Hierfür wurde pro Spur 10 µg RNA in einem denaturierenden 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Davis *et al.*, 1986) und auf eine Nylonmembran Hybond N+ (GE Healthcare) mittels der *semi-dry* Methode geblottet (Sambrook *et al.*, 2001). Die folgende Immobilisierung der RNA durch UV-Licht auf die Membran (Khandjian *et al.*, 1987) sowie Prähybridisierung und Hybridisierung mit der radioaktiv [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP (Amersham & Hartmann Analytic) markierten Sonde erfolgte wie bei der Southern-Analyse beschrieben. Die Auswertung wurde ebenfalls über den Phosphoimager durchgeführt. Zur Quantifizierung des Northern-Signales (siehe Rolletschek *et al.*, 2007) wurde 25S-RNA verwendet. Die Auswertung des Autoradiogramms erfolgte mittels der Software „Aida Image Analyzer v.4.06“ der Firma raytest Isotopenmeßgeräte GmbH.

### 2.1.5. Erzeugung, Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden entweder durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder durch Restriktion von entsprechenden Plasmiden gewonnen. Die PCR wurde nach Sambrook *et al.*, 2001 durchgeführt. Als thermostabile DNA-Polymerase wurde die Taq-Polymerase verwendet. Das PCR-Produkt wurde mittels des Kits „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, <http://www1.qiagen.com>) gereinigt oder durch Auftrennung in einem Agarosegel mit anschließender Gelelution mit Hilfe der Kits „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) oder „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen).

Die sequenzspezifische Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsenzymen wurde unter Beachtung der vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und optimalen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Zu je 1 µg DNA wurde 1 bis 5 U Restriktionsenzym zugesetzt und bei 37 °C für mehrere Minuten (Fast Digest, Fermentas, <http://fermentas.selfip.net/fermentas-shop>) oder mehrere Stunden inkubiert. Die Isolation und Reinigung gespaltener DNA erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Elution

der Fragmente. Zur Entfernung von Restriktionsenzymen sowie Nukleotiden wurde der Kit „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (Quiagen) verwendet.

Die bei der PCR eingesetzte Taq-Polymerase hängt ein 3'-überhängendes Adenosin-Nucleotid an das PCR-Produkt an. Das ermöglicht die Ligation der Fragmente in die pCR®2.1-TOPO®- oder pCR®4-TOPO®-Vektoren über die Topoisomerasefunktion entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>). Der Ligationsansatz wurde durch Hitzeschock-Behandlung in One Shot® TOP10 *E. coli*-Zellen transformiert (Hanahan D., 1983). Mit Hilfe der Primerpaare M13-24F/M13-24R und T3/T7 (prom) erfolgte die Sequenzierung des amplifizierten Produktes durch die Firma AGOWA GmbH, Berlin.

Weitere DNA-Fragmente wurden mittels T4-Ligase in entsprechend linearisierte Vektoren kloniert. Hierfür wurden der „Rapid DNA Ligation Kit“ (Fermentas & Roche) verwendet. Für den Ligationsansatz wurde das Fragment mit der Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von mindestens 3:1 gemischt. Die Ligation erfolgte mit 5 U T4-Ligase über Nacht bei 4 °C. Um die Effizienz der Ligation zu erhöhen, wurde der linearisierte Vektor mit „Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)“ (Fermentas) für 30 Minuten bei 37 °C dephosphoryliert.

Anzucht und Umgang mit *E. coli* erfolgte wie in Sambrook *et al.*, 2001 beschrieben. Für die Transformation der Bakterien wurde die Hitzeschockmethode angewendet (Hanahan D., 1983). Für die Plasmidextraktion und -reinigung aus *E. coli*-Zellen wurden die Kits „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Quiagen) und „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey-Nagel) verwendet. Eine weitere Methode zur schnellen Plasmidpräparation von Birnhoim *et al.*, 1979 wurde ebenfalls angewendet.

### 2.1.6. Generierung einer cDNA-Phagen Bank

Aus sich entwickelnden Samen von *Pisum sativum* wurde Gesamt-RNA isoliert. Mittels des „Dynalbeads® mRNA Purification Kit“ der Firma Dynal wurde mRNA für die cDNA-Synthese gewonnen. Für die cDNA-Synthese sowie für die Generierung der Phagen-Bank wurden der „ZAP Express® cDNA Synthesis Kit and ZAP Express® cDNA Gigapack® III Gold Cloning Kit“ sowie „Gigapack® III Gold Packaging Extract, Gigapack® III Plus Packaging Extract, and Gigapack® III XL Packaging Extract“ der Firma Stratagene (<http://www.stratagene.com>) verwendet. Aus 5 µg poly(A)<sup>+</sup> RNA wurden cDNA-Fragmente generiert. Die Fragmente wurden mit *blunt ends* versehen, mit *EcoRI*-Adaptoren ligiert und phosphoryliert. Zur gerichteten Klonierung in den ZAP Express® Vector mussten die

Fragmente mit *XhoI* gespalten werden. Um die Qualität der Bank weiter zu erhöhen, wurden die cDNA-Fragmente über eine Gelfiltrationsäule mit Sepharcry® S-500 (<http://www.invitrogen.com>) der Größe nach aufgetrennt. Aliquots aus den Fraktionen wurden auf einem denaturierenden RNA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, um zu entscheiden mit welchen Fraktionen weiter gearbeitet werden sollte. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Aufreinigung der ausgewählten Fraktionen zur Entfernung von Proteinen. Die gereinigte cDNA wurde mittels T4-Ligase in den ZAP Express® Vector kloniert, und die cDNA-Bank in die XL1-Blue MRF'-Zellen transformiert. Der Titer der Bank wurde mittels einer Konzentrationsreihe bestimmt.

Um spezifische cDNA-Fragmente in der Bank zu finden, wurden auf Agar-Platten mit Kanamycin (50 mg/l) jeweils ca. 50.000 Klone ausplattiert. Mit Hilfe des EST-Klones PSC35H04 wurden Doppelfilter hybridisiert und durch Abgleich dieser die Positivklone bestimmt. Der Titer der ausgestochenen Positivklone wurde nochmals mit Hilfe einer Konzentrationreihe ermittelt. Diese Klone wurden erneut ausplattiert und mit dem Fragment hybridisiert. Mit eindeutig positiven Klonen wurde die *in vivo* Exzision durchgeführt, wobei durch Zugabe eines Helferphagens aus dem ZAP Express® Vector der pBK-CMV Phagemid-Vector gebildet wurde, um eine Massenvermehrung mittels Bakterien erreichen zu können. Die Fragmente im pBK-CMV-Vector wurden mit den T3- und T7-Primer durch die Firma AGOWA GmbH, Berlin vollständig sequenziert. Die Arbeiten zur Generierung der cDNA-Phagen Bank wurden durch die Technische Assistentin Elsa Fessel unterstützt.

### 2.1.7. Genome Walking

Zur Vervollständigung einer DNA-Sequenz kann die Methode des „Genome Walking“ angewendet werden. Als Ausgangsmaterial wurde qualitativ hochwertige genomische DNA genutzt (Saghai-Maroff *et al.*, 1984). Es wurde der „BD Genome Walker™ Universal Kit“ der Firma BD Bioscience Clontech (<http://www.bdbiosciences.com>) verwendet. Die Qualitätskontrolle der DNA erfolgte durch einen Verdau der extrahierten genomischen DNA sowie einer Kontroll-DNA (menschliche genomische DNA) mittels des Restriktionsenzym *DraI*. Durch vier *blunt-end* schneidene Restriktionsenzyme (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* und *StuII*) erfolgte die Generierung von 4 genomischen Banken bei 37 °C über Nacht. Parallel dazu wurde die Kontroll-DNA ebenfalls über Nacht mit *PvuII* verdaut. Nach Überprüfung des Verdaues wurden die Enzyme mittels einer Chloroform/Phenol-Extraktion entfernt. Eine erneute Kontrolle erfolgte auf einem 1%igem Agarosegel. An die gereinigten DNA-

Fragmente wurden die BD GenomeWalker Adaptoren mit Hilfe der T4-Ligase ligiert. An diese Adaptoren binden die mitgelieferten Primer AP1 und AP2. Sequenzspezifische Primer wurden mit Hilfe des Programmes „DNASTAR Lasergene, PrimerSelect V 7.0“ abgeleitet. Der Bereich zwischen der bekannten Sequenz und den Adaptoren wird mittels PCR amplifiziert. Nachdem das Ergebnis auf einem Agarosegel überprüft wurde, wurde die Prozedur in Form einer *nested* PCR wiederholt. Das Fragment der vorhergegangenen PCR wurde als Ausgangs-DNA für die 2. PCR verwendet. Das 2. Primerpaar lag hierbei zwischen dem ersten. Die amplifizierten Banden wurden aus dem 1%igen Agarosegel ausgeschnitten, in den TOPO-Vector kloniert und bei der Firma AGOWA GmbH, Berlin sequenziert.

### 2.1.8. Quantitative Real time PCR

Die verwendete RNA wurde, wie in Heim *et al.*, 1993 beschrieben, isoliert. Nach erfolgter DNase-Behandlung mit 4 U TURBO DNase (Ambion) sowie Konzentrationsbestimmung mittels des NanoDrop-Spektrophotometers wurde 1 µg RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Hierfür wurde der Kit „SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ der Firma Invitrogen eingesetzt. Hierbei erfolgt für 5 Minuten bei 65 °C die Anlagerung der oligo(dT)-Primern. Die eigentliche cDNA-Synthese wird nach Zugabe der SuperScript<sup>TM</sup> III RT (200 U/µl) bei 50 °C für 50 Minuten durchgeführt. Nach Termination der Reaktion bei 85 °C für 5 Minuten erfolgt die Behandlung mit RNAas H für 20 Minuten bei 37 °C.

Für die Herstellung der Primer wurde das Programm „Primer Express 2.0“ von Applied Biosystems verwendet. Folgende Einstellungen wurden für die Primergenerierung verwendet: T<sub>m</sub> – Min: 57 °C, Max: 63 °C; Opt: 60 °C; GC-Gehalt - Min: 45 %, Max: 55 %; Primerlänge – Min: 18 bp, Max: 22 bp, Opt: 20 bp; Amplicon zwischen 50 – 200 bp. Für die Real time PCR wurde das Gerät 7900HT Fast Real Time PCR System der Firma Applied Biosystems verwendet. Im PCR-Ansatz hatten die generierten Primer eine Konzentration von 0,5 µM. Neben den Primern wurde 1 µl der cDNA sowie 5 µl Power SYBR®Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems) eingesetzt. Für die Quantifizierung des spezifischen PCR-Produktes wurden Primer für Aktin aus *Pisum sativum* (Acc. Nr. U81047.1) verwendet. Folgendes PCR-Programm wurde 45mal durchlaufen: 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, 15 sec 95 °C, 1 min 60 °C, 15 sec 95 °C, 15 sec 60 °C, 15 sec 95 °C. Die Ermittlung der Ct-Werte erfolgte mit dem Programm „Sequence Detection Systems, Version 2.2.1“. Mit dem Programm „LinRegPCR“ wurde die Basis  $e$  für die Berechnung von  $e^{-\Delta C_t}$  ermittelt. Dieser Wert musste zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.1.9. Mikroarray: Hybridisierung und Datenauswertung

Die Isolation der Samen-RNA erfolgte nach der Methode nach Heim *et al.*, 1993. Nach DNase-Behandlung mit 4 U TURBO DNase (Ambion) sowie Aufreinigung durch Microcon YM-30 30kDa (<http://www.millipore.com>) erfolgte die Einstellung der RNA-Konzentration auf 1 µg/µl. Die Hybridisierung der Mikroarrays wurde an der Universität Bielefeld am Institut für Genomforschung in der Arbeitsgruppe „Genomics von Leguminosenpflanzen“ (Leiter PD Dr. Helge Küster) durchgeführt. 20 µg RNA wurde zur Synthese der Cy3- und Cy5-markierten cDNA-Sonden verwendet (Küster *et al.*, 2004). Für die Hybridisierung der Mikroarray-Chips wurden drei unabhängige biologische Replikate von vier unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Erbse verwendet. Die Analyse der Expressionsdaten erfolgte wie bei Hohnjec *et al.*, 2005 beschrieben. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der EMMA 2.0 Software (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/emma/cgi-bin/login.cgi>) (Dondrup *et al.*, 2003). Unter Anwendung der *lowess*-Normalisierung für jede Hybridisierung und des Student's t-Test wurden die differenziell exprimierten Gene identifiziert ( $P < 0,05$ ) (Weigelt *et al.*, 2008).

### 2.1.10. *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation

Mit der auf Höfgen und Willmitzer (1988) zurückgehenden Methode zur Herstellung von kompetenten Agrobakterien und zur Übertragung isolierter DNA wurden Transformanten erzeugt. Die verwendeten, nicht-onkogenen L,L-Succinamopin/Agropin-Stämme sind als hochvirulent für Pflanzenzellen, insbesondere für Leguminosenarten beschrieben (Grant *et al.*, 1995; Bean *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 2003; Pniewski *et al.*, 2005). Der verwendete binäre Vector enthielt als Selektionsmarker für rekombinante Bakterien das Spectinomycin-Gen außerhalb des T-DNA-Bereiches. Auf der T-DNA befand sich zur Selektion transformierter Pflanzen ein dominant vererbtes Phosphinotricin (PPT)-Gen. Dessen Expression wird durch den Promotor des Nopalin-Synthase Genes (p-nos) gesteuert. Die Transkriptionstermination für das PPT-Gen stammt ebenfalls aus dem Nopalin-Synthase Gen (nos A).

Aus Agrobakterien, welche sich in Anwesenheit von Spectinomycin vermehrten, wurde DNA isoliert (Sambrook *et al.*, 2001). Diese wurde mittels PCR (Saiki *et al.*, 1988) auf das Insert getestet. Die Transformationsarbeiten wurden unterstützt von Petra Hoffmeister (AG Pflanzliche Reproduktionsbiologie und Elke Liemann (AG Genregulation).

#### 2.1.10.1. Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzen wurden zur Transformation für etwa 6 Wochen unter Langtagbedingungen bis zur Blüte angezogen. Die Agrobakterien-vermittelte Transformation erfolgte nach der Blünten-tauchmethode (*floral dip*) (Clough und Brent, 1998). Hierfür wurden die Blütensprosse mehrfach in die Agrobacterium-Suspension (enthält Silwet L-77) getaucht und danach liegend für 24 h inkubiert. Das weitere Wachstum bis zur Samenreife erfolgte im Klimaraum unter Langtagbedingungen. Die reifen Samen wurden stratifiziert und sterilisiert. Zur Selektion transgener Pflanzen erfolgte zuerst die Kultivierung auf MS-Medium mit Phosphinotricin (10 mg/l), danach das Umsetzen resistenter Keimlinge auf Erde sowie die Kultivierung im Klimaraum. Der Test auf das inserierte Fragment wurde mittels BASTA-Test, PCR und Southern-Analyse durchgeführt

#### 2.1.10.2. Transformation von *Nicotiana tabacum*

Die Transformation von Tabak wurde nach der *leaf disc*-Methode durchgeführt (Horsch *et al.*, 1985, Rosahl *et al.*, 1987). Hierfür wurden aus jungen Blättern ca. 1 cm<sup>2</sup> große Stücke herausgeschnitten und auf MS-Medium mit 2-Benzylaminopurine (BA) und 1-Naphthyllessigsäure (NAA) kultiviert (Medienzusammensetzung siehe Anhang: Transformation von *Pisum sativum*). Nach 3 Tagen erfolgte die Inkubation mit transformierten Agrobakterien für 30 Minuten. Danach wurden die infizierten Blattstückchen auf das Medium zurückgelegt und weiterkultiviert. Nach weiteren 3 Tagen erfolgte das Umlegen des Blattmaterials auf Medium mit Phosphinotricin (10 mg/l). Anschließend wurden die Blattstückchen mit unterschiedlichen Konzentrationen von BA und NAA weiterkultiviert bis sich bewurzelte Sprosse gebildet hatten. Diese wurden in Erde überführt.

#### 2.1.10.3. Transformation von *Pisum sativum*

Die Erbsentransformationsmethode wurde entwickelt von Schroeder *et al.*, 1993 und modifiziert wie in Saalbach *et al.*, 2001 beschrieben. Unreife Samen mit dem höchsten Frischgewicht wurden für die Transformation geerntet. Diese wurden mit 70%igem Ethanol sowie 5%igem Hypochlorid für jeweils 10 Minuten sterilisiert und mit sterilem Wasser gewaschen. Nach 3 Tagen Inkubation bei 4 °C in flüssigem B5-Medium wurden die

Erbsenschalen entfernt, der Embryo präpariert und dieser mittels einer Rasierklinge in Längsrichtung in dünne Schnitte zerteilt. Diese wurden 30 Minuten in die Agrobakterium-Suspension inkubiert, danach auf B5-Medium überführt. Nach dreitägiger Inkubation im Pflanzenkulturraum wurden die Explantate fünfmal mit flüssigem B5-Medium gewaschen und auf P1-Medium mit Phosphinotricin (10 mg/l) überführt. Zur Sproßbildung erfolgte nach ca. 1 Woche der Transfer auf MS4BA-Medium (mit reduziertem Ammoniumnitrat). Alle 2 bis 3 Wochen wurden die Explantate auf frisches Medium umgesetzt sowie abgestorbene Zellen entfernt. Nach ca. 2 Monaten wurde die Konzentration des Phosphinotricin von 10 mg/l auf 5 mg/l herabgesetzt. Sprosse, welche sich aus den Explantaten entwickelt hatten, wurden auf 5-7 Tage alte Wurzelstöcke von Wildtyp-Erbesen gepfropft. Der gepfropfte Keimling wuchs auf ½ MS-Medium für ca. 14 Tage weiter. Danach erfolgte das Umsetzen auf Erde und die weitere Kultivierung in der Klimakammer.

### 2.1.11. Histologische Analyse von Samen

Eine lichtmikroskopische Untersuchung der Samen-Zellstruktur sowie –inhaltsstoffe ist durch Anfärbung mit spezifischen Lösungen möglich. Die frisch geernteten Samen wurden in FAA (50% Ethanol, 5% Eisessig, 4% Formaldehyd) über Nacht bei 5 °C eingebettet. Nach zweimal 30minütigen Waschschritten erfolgte die Dehydratation mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (60% bis 100%) für jeweils 1 h. Die folgende Infiltration wurde mit einer Roti-Histolreihe (Roth) durchgeführt (30% bis 100%). Die Samen wurden durch tropfenweise Zugabe von Paraplast (Sigma) eingebettet. Nach der Überführung in die Einbettungsformen konnten die erstarrten, eingebetteten Samen mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (RM2165, Leica) geschnitten werden.

Die Anfärbung der Samenzellstruktur erfolgte mit 0,1%iger Toluidinblau-Lösung. Dadurch wurden die Zellwände bläulich angefärbt und konnten unter dem Hellfeldmikroskop (Axioplan, Zeiss) ausgewertet werden.

Die LUGOLsche Lösung (Roth) enthält ein Gemisch von Kaliumiodid und Iod im Verhältnis von 2:1 (v/v) und führt zu einer blau-schwarzen Anfärbung der Stärke in den Pflanzenzellen. Hierfür wurde der Objektträger mit den Schnitten für ca. 5 min in der LUGOLschen Lösung inkubiert, kurz mit Wasser gewaschen und unter dem Mikroskop ausgewertet.

Die Anfärbung der Proteinkörper im Samen wurde durch eine Inkubation der Schnitte für 30 min in Coomassie-Lösung erreicht. Anschließend wurde der Objektträger kurz in 7 % Essigsäure gespült und mit Hilfe des Axioplan-Mikroskops (Leica) ausgewertet.

#### 2.1.12. Ultrastrukturanalyse von Samen

Eine genauere Analyse der Zellstruktur vom Embryogewebe ist mit dem Transmissions-elektronenmikroskop (TEM) möglich. Die Methode zur chemischen Fixierung und Einbettung wurde beschrieben in Borisjuk *et al.*, 2005. Nachdem dem Schneiden der eingebetteten Proben erfolgte die Kontrastierung mit 4 % Uranylacetat und Bleicitrat. Die bildliche Auswertung wurden am Zeiss 902 Elektronenmikroskop bei 80 kV durchgeführt. Das Einbetten und die Kontrastierung der Proben wurden von Monika Wiesner aus der Arbeitsgruppe Strukturelle Zellbiologie am IPK durchgeführt.

#### 2.1.13. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Aussagekraft von Messergebnissen wird mit Hilfe statistischer Analysen überprüft. Aufgrund der Tatsache, dass häufig eine geringe Anzahl von Messwerten je Messpunkt vorlagen, wurde als Anpassungstest auf Normalverteilung der Kolmogorov-Smirnov-Test herangezogen. Mit Hilfe des F-Testes wurde entschieden, ob sich zwei Stichproben aus unterschiedlichen Populationen hinsichtlich ihrer Varianz wesentlich unterscheiden. Ungewöhnliche Messwerte wurden durch den Ausreißer-Test nach Grubbs eliminiert. Die Signifikanz zweier normal verteilter Grundgesamtheiten konnte durch Anwendung des Student t-Test überprüft werden. Zur graphischen Darstellung wurde die dreistufige Sternsymbolik verwendet:

[\*]  $0,05 \geq P > 0,01$

[\*\*]  $0,01 \geq P > 0,001$

[\*\*\*]  $0,001 \leq P$

## 2.2. Biochemische Methoden

### 2.2.1. Elementaranalyse

Um eine quantitative Aussage über den Gehalt an Kohlenstoff und Stickstoff im Samen treffen zu können, werden Proben mittels Elementaranalyse untersucht. Es wurde das Gerät „vario EL III“ verwendet. Dabei wird nach dem Prinzip der katalytischen Rohrverbrennung unter Sauerstoffzufuhr und hohen Temperaturen gearbeitet. Die gefriergetrockneten Proben wurden zu Pulver zermalen, mittels einer Feinwaage abgewogen und in Zinnfolie verpackt. Über einen Probenteller erfolgte die Beschickung des Verbrennungsrohres. Die vollständige Verbrennung in einer hochsauerstoffhaltigen Atmosphäre erfolgt explosionsartig, wobei die Oxidationsprodukte  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_x$  sowie flüchtige Halogenverbindungen entstehen. Als Spül- und Trägergas dient Helium. Dem Verbrennungsrohr ist das Reduktionsrohr mit Kupferspänen nachgeschaltet, in dem die Stickoxide quantitativ zu  $\text{N}_2$  reduziert sowie der überschüssige Sauerstoff gebunden wird. Die flüchtigen Halogenverbindungen werden am Ausgang des Reduktionsrohres mit Silberwolle aus dem Gasstrom entfernt. Nachdem der Gasstrom ein wasserabsorbierendes U-Rohr (Indikator Phosphorpentoxid) durchlaufen hat, enthält dieser nur noch die Komponenten  $\text{CO}_2$  und  $\text{N}_2$ . Das modifizierte Trennsystem mit dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) kann nicht spezifisch zwischen den verschiedenen Komponenten unterscheiden. Somit müssen die jeweilig gewünschten Reaktionsprodukte einzeln und nacheinander in die Messzelle gespült werden. Hierzu wird  $\text{CO}_2$  an eine Absorbionssäule gebunden, sodass der Messstrom nur noch Stickstoff und Helium enthält. Nach der  $\text{N}_2$ -Messung, erfolgt die thermische Desorbierung des  $\text{CO}_2$ . Der Detektor besteht aus zwei Messzellen (Referenz- sowie Messzelle), welche über eine elektrische Messbrücke miteinander verbunden sind. Die Zellausgangsspannung wird in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet, digitalisiert, integriert und als Integralzahl dargestellt.

### 2.2.2. Photometrische Bestimmung des Gehaltes an Saccharose und Stärke

Die Gehaltsbestimmung der Saccharose erfolgte mittels Ethanolextraktion, gefolgt von der basischen Extraktion der Stärke (Bergmeyer H. U., 1983; Radchuk *et al.*, 2006; Rolletschek *et al.*, 2007). Hierfür wurde 20 mg getrocknetes Samenpulver mit 1 ml 80 % Ethanol bei 60 °C

eine halbe Stunde extrahiert. Der Überstand nach dem Zentrifugationsschritt wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und im Vakuum eingedampft. Die Extraktion wurde zweimal mit 0,5 ml 80 % Ethanol wiederholt, der Überstand wurde ebenfalls eingedampft. Die getrockneten Proben wurden in 0,5 ml ddWasser aufgenommen. Zur Entfernung von freien Glucose- und Fructosemolekülen wurden im Messansatz die Enzyme Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6DH; EC 1.1.1.49) und Hexokinase (HK; EC 2.7.1.1) vorgelegt und 10minütig inkubiert. Die freien Glucose- und Fructosemoleküle werden mit Hilfe der Hexokinase in ihre Phosphatform umgewandelt, welche durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase unter Bildung von NADH in ihre entsprechende Gluconatform überführt wird. Der Messansatz wurde bei 340 nm photometrisch vermessen. Durch Zugabe der Fructosidase (EC 3.2.1.26) spaltete man das Disaccharid Saccharose. Nach 30 Minuten wurde der Ansatz erneute photometrisch vermessen. Aus der Differenz der optischen Dichten und mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes wurde der Saccharosegehalt ermittelt.

Zur Stärkeextraktion wurde das Pellet in 0,5 M KOH für 1 h bei 95 °C erhitzt. Zur Neutralisation verwendet man 5 N HCl. 5 µl der Suspension werden in eine Amyloglucosidase/Citrat-Lösung gegeben und 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Der Bestimmungspuffer enthielt ATP, NAD, MgCl<sub>2</sub> und Imidazol. Nach Zugabe von G6DH erfolgte die 10minütige Inkubation. Danach wurde der Messansatz mit HK versetzt und für 25 Minuten inkubiert. Aus dem ermittelten Messwert sowie dem Blindwertes vor der Zugabe von HK wurde die Differenz gebildet und durch Anwendung des Gesetzes nach Lambert und Beer der Gehalt an Stärke errechnet.

### 2.2.3. Photometrische Bestimmung des Gehaltes an Speicherproteinen

Zur Bestimmung des Albumin-/Globulingehaltes wurden 50 mg getrocknetes Samenpulver eingewogen und nacheinander mit jeweils 1 ml Sluytermann-Puffer sowie Phosphatpuffer extrahiert (Rolletschek *et al.*, 2007). Hauptbestandteil des Sluytermann-Puffers ist der Acetatpuffer, in dem sich bevorzugt die Albumine lösen. Unterstützt wird dies durch DMSO und n-Butanol. Die Globuline lösen sich während des Extraktionsprozesses bevorzugt in Phosphatpuffer mit einer hohen Salzkonzentration. Die Extraktion erfolgte für 15 Minuten bei 4 °C, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Die Extraktion wurde zweimal mit je 0,5 ml Puffer wiederholt. Insgesamt wurden jeweils 2 ml Überstand bei der Albumin- sowie Globulinextraktion erhalten. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte photometrisch unter Verwendung von Bradford-Reagenz

(Biorad). Es wurde ein Zweistrahlphotometer (UVIKON 900, Goebel Elektro GmbH) verwendet, womit zwei Wellenlängen gemessen werden konnten. Die spezifische Wellenlänge für Bradford-Bestimmungen ist 595 nm, der Korrekturwert wurde bei 700 nm ermittelt. Zur Quantifizierung der Gehalte wurde eine Eichreihe mit BSA im Bereich von 0,05 µg/µl bis 1 µg/µl erstellt.

### 2.2.4. Photometrische Bestimmung des Ammoniumgehaltes

Die einfachste Methode der Ammoniumbestimmung ist die enzymatische Reaktion der Glutamat Dehydrogenase (GLDH; EC 1.4.1.2), bei der Ammonium unter Oxidation von NADH mit 2-Oxoglutarat reagiert, wobei L-Glutamat entsteht (Bergmeyer, H. U., 1983). Die Extraktion der Proben erfolgte mit dem Universalextraktionspuffer. Die Oxidation von NADH kann photometrisch bei 340 nm verfolgt werden. Da die Menge des umgesetzten NADH stöchiometrisch mit der Ammoniummenge übereinstimmt, kann diese somit berechnet werden. Zusätzlich zu den Reaktanten wurde eine geringe Menge ADP zur Aktivierung der Glutamat Dehydrogenase hinzugesetzt. Als Reaktionsstarter wurden 5 U des Enzyms verwendet, welches nach einer Präinkubationszeit von 2 min hinzugegeben wurde. Nach einer Reaktionszeit von 20 min wurde die Differenz gebildet aus dem Messwert sowie dem Blindwert vor Reaktionsstart. Aus dieser Differenz wurde der Gehalt an Ammonium unter Verwendung einer Eichreihe (Bereich von 20 bis 0,5 µmol) berechnet

### 2.2.5. Bestimmung des Gehaltes freier Aminosäuren mittels *reverse phase* HPLC

Eine weitere Aussage über den Speichermetabolismus der Samen kann man durch die Ermittlung des Gehaltes an freien Aminosäuren erhalten. Hierfür erfolgte die Probenextraktion mit Ethanol. Um eine HPLC-Analyse freier Aminosäuren durchführen zu können, müssen diese erst mit dem Fluoreszenz-Reagenz AQC (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate) derivatisiert werden (AccQ-Fluor<sup>TM</sup> Reagent Kit, Waters, <http://www.waters.com>). 3 mg AQC wurde in 1 ml Acetonitril gelöst und für 10 Minuten bei 55 °C inkubiert. Danach ist es für 6 Wochen bei 4 °C haltbar. Für die Derivatisierung jeder Probe (0,08 ml 0,2 M Borat-Puffer, pH 8,8 und 0,02 ml Extrakt) wurde 0,02 ml des Fluoreszenz-Reagenz verwendet (Rolletschek *et al.*, 2002; Tognetti *et al.*, 2007).

Für die Analyse der Proben wurde ein *reverse phase* HPLC System verwendet (Alliance

2795, Waters GmbH). Der Fluoreszenzdetektor war eingestellt auf eine Anregungswellenlänge von 300 nm und eine Aufnahmewellenlänge von 400 nm. Die Chromatogramme wurde mit Hilfe der Software „Empower“ aufgenommen und ausgewertet. Der Gradient wurde erzeugt mittels dreier Puffer (A: 140 mM Natriumacetat (Merck), 7 mM Triethanolamin (Sigma); B: Acetonitril, Roth; C: Reinstwasser, Millipore). Zur Separierung der Aminosäuren wurde eine *reverse phase* Säule (XBridge, 150 nm, 5 µm) verwendet, welche eine Silicatmatrix mit modifizierten apolaren C18-Gruppen enthält. Die Säule wurde äquilibriert mit Puffer A bei einer Flussrate von 0,6 ml pro min. Folgender Konzentrationsgradient für Puffer B wurde während der Messung verwendet: 1 % bei 0,5 min, 5 % bei 27 min, 9 % bei 28,5 min, 18 % bei 44,5 min, 60 % bei 47,5 min und 0 % bei 50,5 min (Tognetti *et al.*, 2007). Die Säule wurde die gesamte Messzeit bei 37 °C temperiert. Die Regenerierung erfolgte für 10 min mit Puffer A.

### 2.2.6. Bestimmung des Gehaltes an Lipiden mittels Gaschromatographie

Eine etablierte Methode zur Bestimmung von Fettsäuren ist die Methode der sauren Methylierung (Miquel & Browse, 1992). Hierbei wurden 20 mg Samenpulver für 60 min bei 80 °C in einer Schwefelsäure/Dimethoxypropan/Methanol-Lösung inkubiert. Zur Verhinderung der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren erfolgte die Überschichtung mit Argongas. Nach Zugabe von 0,2 ml gesättigter NaCl-Lösung und 2 ml n-Hexan wurden die Fettsäuren durch Mischen in die organische Phase extrahiert. Nach der Phasentrennung durch 10minütige Zentrifugation bei 1.500 rpm überführt man die obere Phase in ein neues Gefäß und extrahiert erneut mit 2 ml n-Hexan. Die organischen Phasen wurden nach Vereinigung unter einem Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus 2 ml n-Hexan und 2 ml Reinstwasser aufgenommen. Nach dem Durchlauf von Natriumsulfat-Säulen zur Entfernung des Wassers wurde der Durchfluss im Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wurde in Acetonitril gelöst und kann bei -20 °C gelagert werden.

Die Trennung der Fettsäuren erfolgte durch Gaschromatographie mit einer 15 m x 0,25 mm J&W Scientific GC-Säule (Agilent, [www.agilent.de](http://www.agilent.de)) und wurde im Flammenionendetektor analysiert. Der Gaschromatograph (GC-2014, Shimadzu) war auf eine Initialisierungstemperatur von 150 °C für 1 min programmiert, gefolgt von einer Erhöhung um 8 °C/min bis 200 °C. Danach erhöhte man die Temperatur auf 250 °C mit 25 °C/min. Diese Temperatur wurde für 6 min gehalten.

### 2.2.7. Bestimmung des Gehaltes an organischen Säuren mittels Ionenchromatographie

Für die Extraktion der Carbonsäuren aus den Erbsensamen wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden ausgetestet. Zuerst wurde 1 M Perchlorsäure als Extraktionsmittel verwendet, nachdem man die Samenproben unter Stickstoff zerkleinert hatte. Nach der Zentrifugation erfolgte die Neutralisierung des Überstandes mittels 5 M Kaliumcarbonat gefolgt von einer Filtrierung durch eine Microtiterfilterplatte (Microcon, 10 kD, Millipore) (Häusler *et al.*, 2000). Das Extraktionsmittel der zweiten Methoden war Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis 1:3:1 (v/v/v). Nach 20minütiger Inkubation und Zentrifugation wurde der Überstand im Vakuum eingedampft. Das Pellet wurde in 0,4 ml Reinstwasser resuspendiert und die Proben vor der Analyse filtriert (Microcon, 10 kD, Millipore) (Gullberg *et al.*, 2004).

Für die Messung der Anionen von organischen Säuren wurde ein Dionex System verwendet, welches aus einer Gradientenpumpe, einem Entgasungsmodul, dem Autosampler sowie dem Konduktionsdetektor bestand. Die Trennung der anionischen Komponenten erfolgte durch Verwendung einer Ionenaustausch-Säule mit hoher Kapazität (AS11-HC, 250 x 2 mm) mit vorgeschalteter Vorsäule des gleichen Materials (AG 11-HC, 10 x 2 mm). Zwischen dem Eluenten und der Trennsäule wurde eine ATC-1 Säule gesetzt, um die Anionen aus der Lösung zu entfernen. Der Gradient bestand aus Puffer A (Reinstwasser, Millipore) und Puffer B (100 mM Natriumhydroxid, Baker). Die Säule wurde äquilibriert mit einem Mix von Puffer A (96 %) und Puffer B (4 %) bei einer Flussrate von 0,5 ml pro min. Der Gradient wurde durch Konzentrationsänderungen von Puffer B produziert: 0-8 min bei 4 %, 8-28 min bei 30 %, 28-38 min bei 60 %, 38-51 min bei 100 %, 51-54 min bei 4 % und 54-64 min bei 4 % (Chen *et al.*, 2005). Die Säule hatte während der gesamten Messung eine Temperatur von 30 °C. Die erzeugten Chromatogramme wurden mit Hilfe der mitgelieferten Software bearbeitet und ausgewertet.

### 2.2.8. Bestimmung des Gehaltes an Abscisinsäure mittels LC-ESI-MS

Die Bestimmung des Gehaltes an Abscisinsäure wurde durchgeführt nach einem modifizierten Protokoll von Chiwocha *et al.*, 2003. Die Messung wurde durchgeführt an der Trent University, Peterborough, Canada im Department of Biology bei Ph.D. R. J. Neil Emery. 25 mg gefriergetrocknete Samen wurde zweimal in 750 µl Ethanol extrahiert und in

der Speed Vac eingedampft. Das Pellet wurde in 85 µl 60 % Acetonitril aufgenommen. Als quantitativer interner Standard wurden 20 ng (2H6)-trans, trans-ABA hinzugegeben. Die Analyse erfolgte durch ein Dionex HPLC System mit LC-(-)ESI-MS/MS. 10 µl der Probe wurde auf eine Phenomenex-Säule (Luna 3-µm C18(2) 100A, 150 x 2-mm) aufgeladen. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur in einem isokratischen Modus mit 65 % B (A: HPLC-geeignetes Wasser mit 0,04 % Essigsäure (v/v); B: Acetonitril) und einer Flussrate von 0,15 ml pro min. Das MS/MS hatte folgende Einstellungen: 263 > 152,7 (269 > 158,7) ([M-H]-); Kollisionsgas, 2 mTorr/10 V; API Trockengas, 300 °C/21 psi; API Vernebelungsgas, 50 psi; Scanzeit 1 s; SIM width 0,7 amu; Nadel, -4500 V, Schild, -600 V, Capillare, -40 V; Detektor, 1575 V.

### 2.2.9. Metabolitanalyse mittels GC-MS

Die Metabolitanalyse wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in der Arbeitsgruppe „Zentraler Metabolismus“ von Dr. Alisdair Fernie durchgeführt. Es wurde mit einem für Arabidopsis optimierten GC-TOF Protokoll gearbeitet (Lisec *et al.*, 2006). Die relativen Metabolitkonzentrationen wurden berechnet wie in Roessner *et al.*, 2001 beschrieben. Für die Peak-Identifikation wurde TAGfinder verwendet (Luedemann *et al.*, 2008). Zur Auswertung der Massenspektren wurde die Golm Metabolome Database GMD verwendet (Kopka *et al.*, 2005) (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/gmd.html>).

### 2.2.10. Enzymassays

#### 2.2.10.1. Bestimmung der Enzymaktivität der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP; EC 2.7.7.27)

Der entscheidende Schritt in der Stärkesynthese ist die Aktivierung des Glucose-1-phosphats durch die Reaktion mit ATP zu ADP-Glucose unter Freisetzung von Pyrophosphat. Diese reversible Reaktion wird durch das in den Plastiden lokalisierte Enzym ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) katalysiert.

In diesem Enzymassay wird durch Umwandlung von Glucose-1-phosphat durch eine nachgeschaltete Phosphoglucomutase unter Bildung von 6-Phosphogluconat der Stärkeabbau initiiert (Bergmeyer H. U., 1983). Nach der Probenextraktion mittels eines Phosphatpuffers

erfolgte die Vermessung in einem HEPES-Puffer. Nach einer 2minütigen Vorinkubationszeit nach Probenzugabe sowie einer 5minütigen Äquilibrierungszeit erfolgte die Zugabe des Pyrophosphats als Reaktionsstarters. In 5 Minuten-Abständen wurden die Werte der  $OD_{340\text{ nm}}$  ermittelt, die Steigung mit dem Blindwert abgeglichen und daraus die Enzymaktivität errechnet.

### 2.2.10.2. Bestimmung der Enzymaktivität der Aspartat-Aminotransferase (ASAT; früher GOT; EC 2.6.1.1)

Eine von drei wichtigen Transaminierungsreaktionen im Pflanzenmetabolismus ist die Umwandlung von Oxalacetat durch Glutamat zu Oxoglutarat und Aspartat, aus welchen eine Reihe weiterer Aminosäuren gebildet wird. Diese Reaktion wird durch die Aspartat-Aminotransferase, früher Glutamat-Oxalacetat-Aminotransferase (GOT) katalysiert.

Die Probenextraktion erfolgte mittels des Universalpuffers (siehe Anhang). Der Bestimmungspuffer enthielt als Ausgangssubstrat Asparaginsäure, als Aktivator Pyridoxalphosphat sowie die Enzyme Malat-Dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) und Lactat-Dehydrogenase (L-LDH; EC 1.1.1.27). Diese entfernen aus dem Reaktionsgemisch Malat und Lactat, welche auf die Enzymaktivität störenden Einfluss haben. Als Reaktionsstarter wurde 12 mM 2-Oxoglutarat verwendet. Für jede Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Alle 20 sec erfolgte die automatische Ermittlung der optischen Dichte bei 340 nm. Aus der Steigung der Messwerte  $OD_{340\text{ nm}}$  berechnete man die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase.

### 2.2.10.3. Bestimmung der Enzymaktivität der Glutamin-Synthetase (GS; EC 6.3.1.2)

Zur Messung der Aktivität der Glutamin-Synthetase wurde ein mit der Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) gekoppelter Assay verwendet. Die Reaktion der Glutamin-Synthetase erfolgt unter Bildung von ADP. Dieses wird bei der Reaktion der PK verwendet, um aus Phosphoenolpyruvat Pyruvat zu bilden, welches die LDH unter Oxidation von NADH Lactat bilden kann. Die Extraktion und der Assay wurden durchgeführt wie bei Scheible *et al.*, 1997 sowie Lea *et al.*, 1990 beschrieben. Die Zusammensetzung des Extraktionsmediums ist dem Anhang zu entnehmen. Aufgrund der gekoppelten Bildung von  $NAD^+$  konnte die Reaktion bei 340 nm verfolgt werden. Als Reaktionsstarter wurden 1 mM  $NH_4Cl$  und 15 mM

Glutamat verwendet. Aus der Steigung der Messpunkte wurde die GS-Aktivität der jeweiligen Proben errechnet. Der Nachweis für eine spezifische GS-Aktivität erfolgte durch 15minütige Präinkubation von Extrakten mit und ohne 10 mM Methioninsulfoximin (MSO).

#### 2.2.10.4. Bestimmung der Enzymaktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31)

Durch das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase reagiert Phosphoenolpyruvat mit  $\text{HCO}_3^-$  zu Oxalacetat. Der entstehende Enolester ist sehr energiereich, wodurch die Reaktion irreversibel ist.

Die Proben wurden mit einem HEPES-Puffer (siehe Anhang) extrahiert. Als Bestimmungspuffer verwendete man einen Tris/HCl-Puffer (pH 8), der  $\text{KHCO}_3$ , NADH sowie  $\text{MgCl}_2$  als Aktivator enthielt (Ashton *et al.*, 1990). Vor dem Reaktionsstart wurde Malat-Dehydrogenase hinzugesetzt. Dieses Enzym wandelt Oxalacetat unter Oxidation von NADH zu Malat um. Nach 3minütiger Vorinkubation erfolgte die Zugabe von Phosphoenolpyruvat als Reaktionsstarter. Die Proben wurden als Doppelbestimmungen bei 340 nm gemessen. Aus der Steigung der Messpunkte sowie des Extinktionskoeffizienten für den NADH-Abbau konnte die PEPC-Aktivität errechnet werden.

#### 2.2.10.5. Bestimmung der Enzymaktivität der Saccharosesynthase (SUSI; EC 2.4.1.13)

Das Enzym Saccharosesynthase ist das entscheidende Enzym beim Abbau der Stärke und ist an der Verteilung von Saccharose in den verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt.

Zur Aktivitätsmessung dieses Enzyms mussten die Proben in einem MOPS-Puffer (siehe Anhang) extrahiert werden. Der Bestimmungspuffer I war ein HEPES/KOH-Puffer mit  $\text{MgCl}_2$  als Aktivator und Saccharose als Substrat. Durch Inkubation bei 95 °C erfolgte die Spaltung der Saccharose in Fructose und UDP-Glucose durch die Saccharosesynthase in den Probenextrakten. Nach Zugabe von 0,75 ml Bestimmungspuffer II wurde 3 µl UDP-Glucose-Dehydrogenase (UDP-G-DH) hinzusetzt. In diesem Puffer war NAD enthalten, welches durch dieses Enzym unter Bildung von Glucose zu NADH reduziert wurde. Somit konnte diese Reaktion bei 340 nm verfolgt werden und aus der korrigierten Steigung die Enzymaktivität ermittelt werden.

### 2.2.11. Bestimmung der Transportaktivität des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators (OMT)

Die Transportaktivität kann durch Einbau von Membranproteinen in künstliche Liposomen direkt gemessen werden. Diese Methode beruht auf Arbeiten von Flügge und Weber (1994) und wurde für Samen von *Vicia narbonensis* erfolgreich angewendet (Rolletschek *et al.*, 2007). Die Transportmessungen wurden am Botanischen Institut der Universität Köln in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. U. I. Flügge durchgeführt und erfolgte unter Anleitung von Dr. Rainer E. Häusler.

Als Ausgangsmaterial wurden Erbsensamen (18 – 22 DAF) unter Stickstoff zermahlen und mit Extraktionsmedium (Verhältnis 1g /5 ml) versetzt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mit Triton X-100 (Endkonzentration 4 % v/v) gemischt. Von diesem Extrakt wurden 0,6 ml mit 0,5 ml vorbeladenen Liposomen versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Liposomen wurden aus gereinigten Phospholipiden (20 % Endkonzentration, Typ IV-S) hergestellt und mit dem jeweiligem Substrat Oxoglutarat, Malat und als Kontrolle Na-Gluconat vorbeladen (30 mM Endkonzentration), welche im Liposomenpräparationspuffer gelöst waren. Die Liposomenbildung erfolgte durch 10 minütige Ultraschallbehandlung (Branson sonifier 250).

Die Mischung aus eingefrorenen Extrakt und vorbeladenen Liposomen wurde langsam auf Eis aufgetaut, wobei die Bildung der Proteoliposomen erfolgte. Nach einer zweiten Ultraschallbehandlung wurden die Proteoliposomen mittels einer Gelfiltration durch eine PD10-Säulen von externem Substrat befreit. Die Säulen wurden vor und nach der Filtration mit PD10-Puffer äquilibriert. Für die Transportmessungen mischte man 850 µl der gereinigten Proteoliposomen mit 50 µl C<sup>14</sup>-Malat/C<sup>12</sup>Malat (0,3 mM Endkonzentration), um eine spezifische Aktivität von 6.000 cpm nmol<sup>-1</sup> zu erhalten. Um Zeitkinetiken bestimmen zu können, wurden die Transportreaktionen nach 15, 30, 45 und 60 sec beendet, indem man Aliquots von 200 µl auf Dowex Anionenaustauschsäulen (AG1 x 8, mesh size 100-200, Biorad) gab. Diese waren vorher mit 0,2 M Natriumacetat äquilibriert worden. Die aufgenommene Radioaktivität der Proteoliposomen wurde quantifiziert im Scintillation Counter (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, Beckman Coulter GmbH) nach Zugabe von Rotizint. Substrat spezifischer Transport wurde korrigiert mit Transportraten von vorbeladenen Proteoliposomen mit Na-Gluconat.



### III. Ergebnisse

#### 1. Charakterisierung des plastidären 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators (OMT) in sich entwickelnden Samen von *Pisum sativum*

##### 1.1. Isolation der cDNA und Sequenzanalyse

Aus der EST-Kollektion von *Pisum sativum* (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/index.php>; Künne *et al.*, 2005) wurde ein EST-Klon (Klon-ID PSC35H04) mit einer Länge von 326 bp identifiziert, der dem 3'-terminalen Ende des 2-Oxoglutarat/Malat Translokators zugeordnet werden konnte. Um die Gesamt-cDNA zu isolieren, wurde eine  $\lambda$ ZAP Express-Phagen-cDNA-Bank hergestellt (siehe Material und Methoden). Als Sonde zum Screening der ausplattierten Phagen wurde der EST-Klon PSC35H04 verwendet. Aufgrund der Signale von Doppelfiltern konnten 15 positive Klone identifiziert werden. Die cDNA-Inserts dieser Klone zeigten in der Southern Blot-Analyse eine Länge zwischen 650 und 2600 bp. Nach der Sequenzierung konnten neun Klone mit Teilsequenzen des OMTs identifiziert werden. Im Sequenzvergleich (BLASTX, Altschul *et al.*, 1997) mit der kompletten cDNA-Sequenz des OMTs von *Spinacea oleracea* (SODiT1, Weber *et al.*, 1995) sowie *Arabidopsis thaliana* (ATDiT1, Taniguchi *et al.*, 2002) konnte die Erbsen-OMT-Sequenz auf eine Länge von 1444 bp erweitert werden (Acc. Nr. FN297817). Alle erhaltenen Teilsequenzen konnten dieser Sequenz zugeordnet werden.

Die cDNA-Sequenz von *Spinacea oleracea* hat eine Gesamtlänge von 1710 bp, die von *Arabidopsis thaliana* von 1674 bp. Zur vollständigen cDNA-Sequenz aus *Pisum sativum* fehlen zwischen 260 und 230 bp. Die ermittelte Nucleotidsequenz kodiert für ein Protein von 481 aa mit einer kalkulierten molaren Masse von 51,39 kDa und einem pI von 9,0 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>, Gasteiger *et al.*, 2005). Im Sequenzvergleich fehlen dem Protein 5'-seitig zwischen 87 und 77 Aminosäuren (Abb. 5).

Das Protein zeigt eine Sequenzähnlichkeit von 84,3 % zum OMT aus *Arabidopsis thaliana* (Taniguchi *et al.*, 2002), 83,3 % zu *Spinacia oleracea* (Weber *et al.*, 1995), 80,6 % zu *Zea mays* (Taniguchi *et al.*, 2004), 46,9 % zu *Oryza sativa* (Ohyanagi *et al.*, 2006) sowie 44,8 % zu *Sorghum bicolor* (Renne *et al.*, 2003).

### III. Ergebnisse

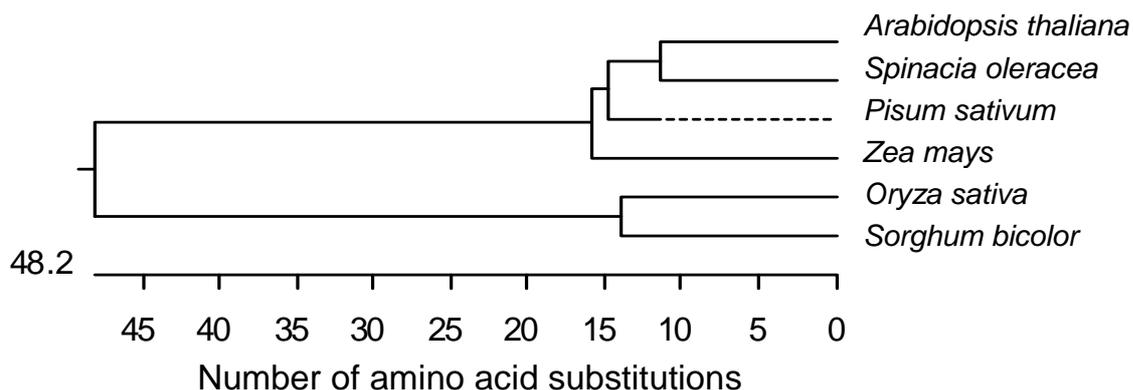
	M A S - L A L A - - - - - S X S A A L P L P S R S L	Konsensus Sequenz
	-----+-----+-----	
	10 20 30	
1	M A S - L A L S - - - - - G S C S L A F P L K S R S L	<i>Arabidopsis thaliana</i>
1	M E R - L R V A I S - - - - - H H R A A L P L P T H H N	<i>Oryza sativa</i>
1	M E S S I R L A D T - - - - - L R P S S L P A P A S - A	<i>Sorghum bicolor</i>
1	M A S - M A L S - - - - - L T S S P T Y S L S F R S L	<i>Spinacia oleracea</i>
1	M A S - S T A A S P L T C H H L G S V G A R P R L P S L S I	<i>Zea mays</i>
1	- -	<i>Pisum sativum</i>
	S L R R R H S S S Q - L T - S S X S L S S X F S L S P S P X	Konsensus Sequenz
	-----+-----+-----	
	40 50 60	
22	S L P R P P S S S L N L T K P L R S L D S R F S L L K S P L	<i>Arabidopsis thaliana</i>
23	H F R R R H L Q L Q P F P - S S L S L S L P I S P - - - Q	<i>Oryza sativa</i>
23	H L R R R H L Y L H R L P R T S S S S S L F F S P S H H H R	<i>Sorghum bicolor</i>
22	P S L K P L S K S Q - P S I S L P S L R S N A S K S P S L S	<i>Spinacia oleracea</i>
30	S L R R R S S S S K P T S L S H S L P S K H S L A P P P A	<i>Zea mays</i>
1	- -	<i>Pisum sativum</i>
	L S P X P R R X S L L V P A S A S A A A S A P - P A P P P	Konsensus Sequenz
	-----+-----+-----	
	70 80 90	
52	P V S L R R R S S T L V K A S S T V A S A S S S - P T P P L	<i>Arabidopsis thaliana</i>
48	L S P A P P R R H L L P P L L A S A S A A Q A A G P A P A R	<i>Oryza sativa</i>
53	L C P T P - R H D L L Q P L A A A S G A A K L V P A S P A	<i>Sorghum bicolor</i>
51	H K H F L S P P S L L L P H K L K P I S A S S P - T N P P P	<i>Spinacia oleracea</i>
60	A S A S S R R G L T P V P A S A S A A A P A P D P V P V P	<i>Zea mays</i>
1	- -	<i>Pisum sativum</i>
	A P A P V P - P - P - - - - - - - - - W Q G A A I K P L L A	Konsensus Sequenz
	-----+-----+-----	
	100 110 120	
81	V P A P V P - - - - - - - - - - - W Q G A A I K P L L A	<i>Arabidopsis thaliana</i>
78	A A G G G - - - - - - - - - - - G G A K P V P L L V	<i>Oryza sativa</i>
82	P A D S S P E P K P - - - - - - - - - S G A K L V P L V I	<i>Sorghum bicolor</i>
80	P A P V P S P A P V S A P A Q V Q P W Q G A S I K P L L A	<i>Spinacia oleracea</i>
90	A P A P A P A P A P A A P P K K - P A L Q G A A I K P L L A	<i>Zea mays</i>
4	V P A - V P - - - - - - - - - - - W Q G A A I K P L L A	<i>Pisum sativum</i>
	S I A T G V I I W F L P P - P A G V S R N A W Q L L A I F L	Konsensus Sequenz
	-----+-----+-----	
	130 140 150	
98	S I A T G L I L W F V P V - P E G V T R N A W Q L L A I F L	<i>Arabidopsis thaliana</i>
94	S L A V G L A V R F L A P R P A E V T P Q A W Q L L S I F L	<i>Oryza sativa</i>
102	S L A V G L A V R F L A P R P A E V S P R A W Q L L S I F L	<i>Sorghum bicolor</i>
110	S I L T G V I I W F I P T - P E G V S R N A W Q L L A I F L	<i>Spinacia oleracea</i>
119	S I A T G V L I W L I P P - P A G V P R N A W Q L L A I F L	<i>Zea mays</i>
20	S I A T G V I I W F L P T - P E G V S R N A W Q L L A I F L	<i>Pisum sativum</i>

**Abb. 5 Vergleich der Aminosäuresequenzen** von OMT-Proteinen verschiedener Pflanzen-Spezies. Die OMT-Sequenz von *Pisum sativum* (Acc. Nr. FN297817) wurde mit anderen OMT-Sequenzen verglichen (ClustalW Methode, Thompson *et al.*, 1994): *Arabidopsis thaliana* (Acc. Nr. NM\_001125744.1), *Oryza sativa* (Acc. Nr. NM\_001073417.1), *Sorghum bicolor* (Acc. Nr. AY123844.1), *Spinacia oleracea* (Acc. Nr. U13238.1) und *Zea mays* (Acc. Nr. AB112936.1). Die Aminosäuren, die mit der Konsensus-Sequenz übereinstimmen, sind grau unterlegt. Die fehlende N-terminale Sequenz aus Erbse wurde durch waagerechte, rote Stiche ersetzt.

Die vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Pflanzen-Spezies zeigt, dass die OMT-Sequenz aus *Pisum sativum* hohe Ähnlichkeit zu der von *Arabidopsis thaliana* und *Spinacia oleracea* aufweist (Abb. 6). Die Sequenz von *Zea mays* konnte ebenfalls diesem Cluster zugeordnet werden. Eine eigenständige Gengruppe bilden die OMT-Sequenzen von *Oryza sativa* und *Sorghum bicolor*.

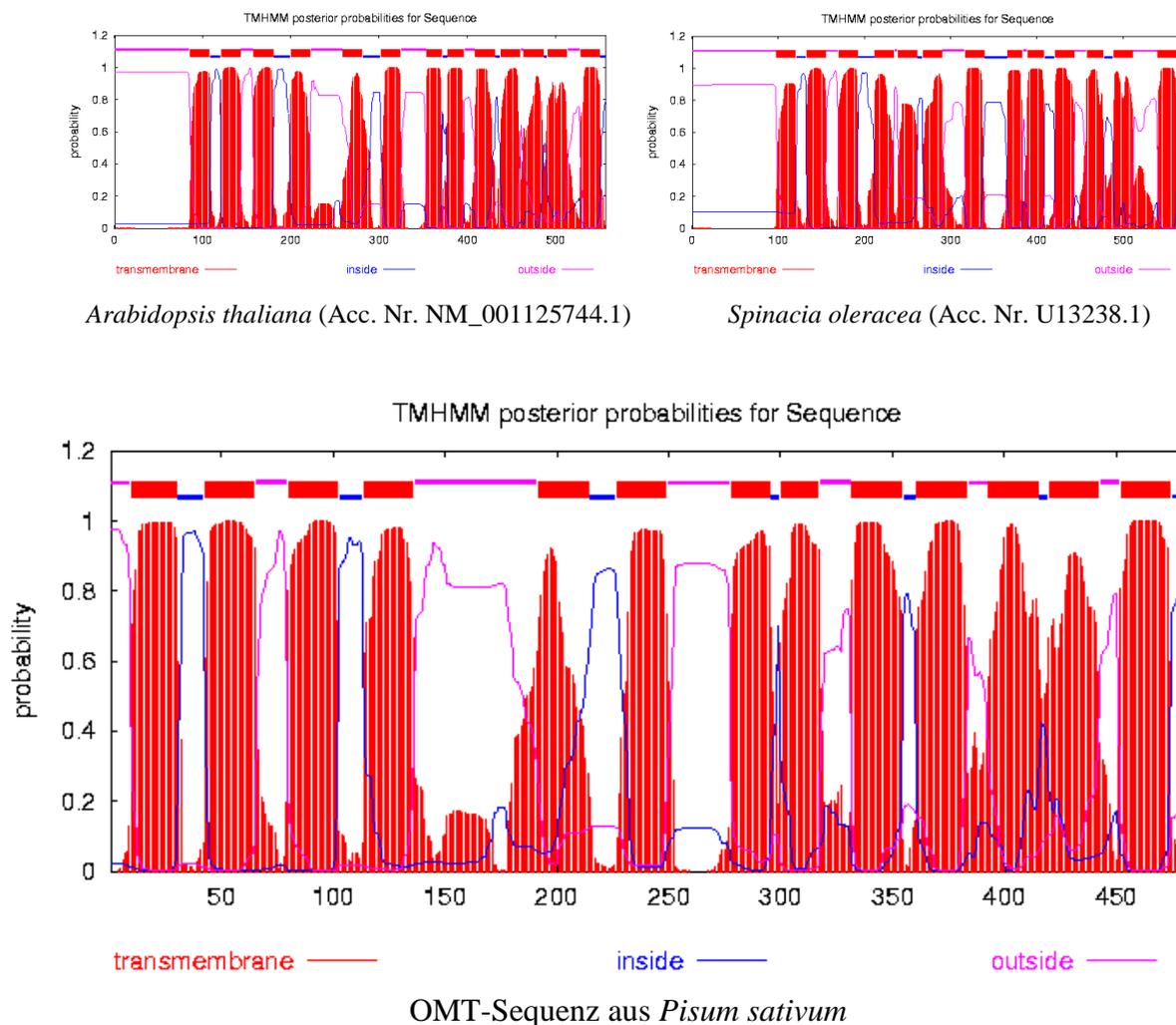
In den kompletten cDNAs aus Arabidopsis und Spinat kann ein N-terminales Lokalisierungssignal identifiziert werden. Bei der Analyse der OMT-Teilsequenz der Erbse wurde kein Chloroplasten-Lokalisierungssignal gefunden (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>, Emanuelsson *et al.*, 1999), möglicherweise aufgrund des fehlenden 5'-Endes. Der Vergleich der Vorhersage von Transmembranhelices (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>, Krogh *et al.*, 2001) im OMT-Protein von Arabidopsis, Spinat und Erbse zeigt eine vergleichbare Verteilung der Domänen (Abb. 7). Man sieht in den Abbildungen, dass bei allen drei Sequenzen 13 Transmembran-Domänen vorhergesagt werden, die sich zu zwei Komplexen von je 6 und 7 Domänen anordnen.

Unter Verwendung der Programme „CDART: Conserved Domain Architecture Retrieval Tool“ (Geer *et al.*, 2002) sowie „Conserved Domain Search“ (Marchler-Bauer *et al.*, 2007) können ebenfalls über die gesamte Aminosäuresequenz 13 Transmembrandomänen identifiziert werden. Diese Domänen zeigen starke Homologien zum Citrattransporter CitT aus *Escherichia coli* (Pos *et al.*, 1998) sowie zu dem 2-Oxoglutarat/Malat-Transporter aus *Spinacia oleracea* (Weber *et al.*, 1995).



**Abb. 6 Phylogenetische Baum der OMT-Sequenzen verschiedener Pflanzenarten.**

Die OMT-Aminosäuresequenzen verschiedener Pflanzenarten wurden miteinander verglichen (verwendete Methode: ClustalW, Thompson *et al.*, 1994). Die 2-Oxoglutarat/Malat-Translokatoren können in zwei Gruppen untergliedert werden. Die Aminosäure-Sequenz der Erbse zeigt hohe Ähnlichkeit zu der von Arabidopsis, Spinat und Mais.



**Abb. 7 Vorhersage von Transmembranhelices im PsOMT-Protein** mit dem TMHMM-Programm nach Krogh *et al.*, 2001 (aktuelle Version TMHMM 2.0c – 2007).

Durch das Programm TMHMM2.0c wurden Transmembranhelices in den Aminosäuresequenzen vorhergesagt. Das Programm beruht auf einem hidden Markov-Modell und hat eine Vorhersagewahrscheinlichkeit von 97-98%. Als Vergleichssequenzen zu der ermittelten cDNA-OMT-Sequenz aus Erbse wurden die cDNAs aus Arabidopsis und Spinat herangezogen.

Bei der Analyse der Phosphorylierungsstellen der PsOMT-Sequenz wurden vier Serine, vier Threonine und ein Tyrosin vorhergesagt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>, Blom *et al.*, 1999). Hierbei liegt das Ser – 148 auf der vorhergesagten Transmembran-Domäne V, das Thr – 32 auf der Transmembrandomäne I sowie das Thr – 318 der Transmembrandomäne IX. Auf der Transmembrandomäne X können Thr – 331 und Tyr – 344 phosphoryliert werden. Ein weiteres Screening der Phagen cDNA-Bank mit einer zweiten OMT-Sonde ergab positive Klone mit Fragmenten einer Länge von 1,7 und 2,1 kb. Die Sequenzen dieser Fragmente konnten der bereits bekannten PsOMT-Sequenz zugeordnet werden. Keines der Inserts enthielt jedoch den fehlenden 5'-Bereich des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators.

Zur Vervollständigung der OMT-Sequenz wurde, basierend auf der Sequenz von *Arabidopsis thaliana*, eine heterologe Sonde erstellt. Diese Sonde umfasste den fehlenden 5'-Bereich der OMT-Sequenz und hatte eine Länge von 420 bp. Die cDNA-Bank wurde mit dieser heterologen AtOMT-Sonde erneut gescreent. Die positiven Klone enthielten Inserts von 1,1 bis 2,5 kb Länge. Die Sequenzierung ergab schon bekannte Teilsequenzen des PsOMT bzw. nicht OMT-spezifische Sequenzen.

Eine weitere Methode zur Generierung von Sequenzen ist das „Genome Walking“. Als Grundlage musste ein spezifischer Typ einer genomischen Bank hergestellt werden (siehe Material und Methoden). Hierzu wurde hoch qualitativ hochwertige genomische DNA aus sich entwickelnden Erbsensamen (12 – 18 DAF) mit vier Restriktions-Enzymen verdaut. Nach Aufreinigung und Ligation von Adaptoren konnte mittels zweier spezifischer Primerpaare Fragmente generiert werden. In der *nested* PCR wurden DNA-Banden mit einer Größe 0,9, 1,5 sowie 1,7 kb amplifiziert. Die Sequenzierung ergab schon bekannte Sequenzen des OMTs sowie nicht OMT-spezifische Sequenzen. Die neuen OMT-Sequenzen konnten der bekannten Sequenz des Translokators zugeordnet werden. Auch ein weiterer Versuch unter Verwendung einer neuen genomischen Bank sowie mit neuen OMT-spezifischen Primern führte zu keiner weiteren Verlängerung der Sequenz.

## 1.2. Generierung von transgenen Pflanzen

Der Einfluss von plastidären Translokatoren auf die Samenentwicklung von Leguminosen wurde bisher wenig untersucht. Als Modellpflanze hierfür wurde die Leguminose *Pisum sativum* ausgewählt. Es wurden verschiedene Konstrukte generiert. Die Bedeutung von Stickstoff als ein limitierender Faktor sowie Bestandteil der Aminosäuren und Proteine sollte durch die Inhibition und Überexpression des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators näher untersucht werden. Der Anteil der aromatischen Aminosäuren im Samen sollte durch die Überexpression des Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokators verändert werden.

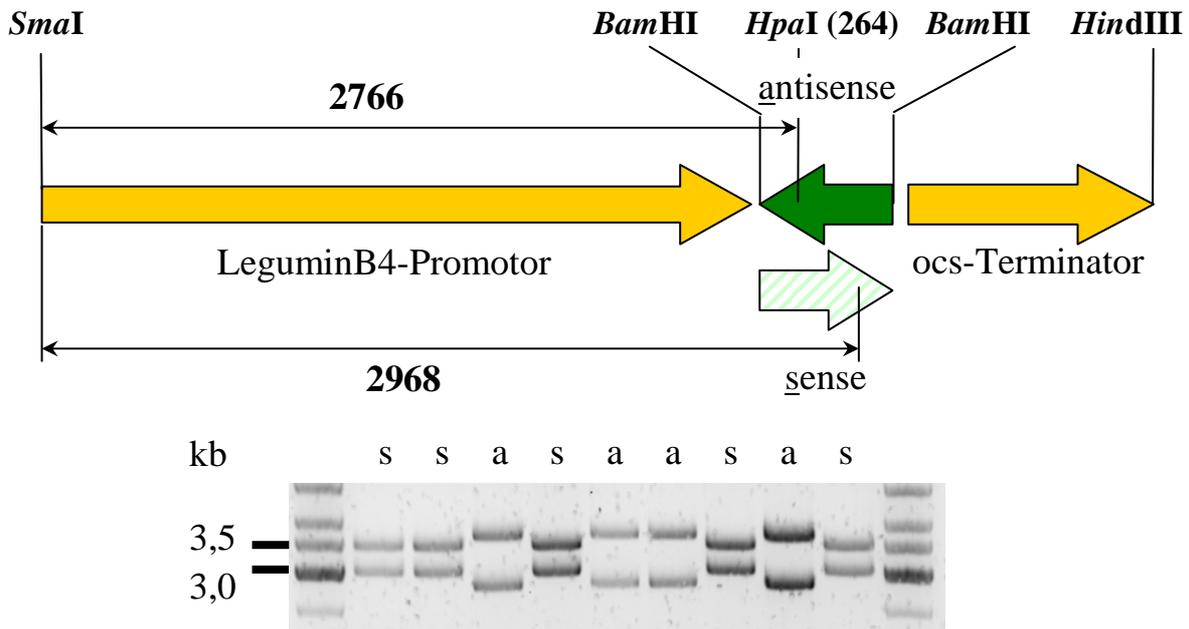
### 1.2.1. Antisense-Konstrukt des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators

Für das 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator (OMT)-antisense-Konstrukt wurde der EST-Klon PSC35H04 (3'-terminales Ende der cDNA) verwendet. Dieser enthielt einen Sequenzabschnitt von 326 bp. Dieses Fragment wurde mit modifizierten Primern amplifiziert, so dass an beiden Enden eine *Bam*HI-Schnittstelle entstand. Für die Sequenzierung erfolgte die Klonierung in den pCR®2.1-TOPO-Vector. Unter zu Hilfenahme der Primer M13-24F und M13-24R wurde das Insert vollständig sequenziert. Durch Verdau mit *Bam*HI wurde das Fragment herausgeschnitten und in einen pUC18-Vector kloniert, der den LeguminB4-Promotor von *Vicia faba* (X03677.1; Bäumlein *et al.*, 1992) sowie den OCS-Terminator des Klonierungsvector pHellsgate 8 aus *Agrobacterium tumefaciens* (AF489904.1; Helliwell, C.A. and Waterhaus P.M.) enthielt. Vor der Ligation erfolgte eine Dephosphorylierung des Vectors mit alkalischer Phosphatase. Positive Klone wurden mit *Bam*HI sowie *Hpa*I/*Sma*I gespalten, um die Orientierung zu überprüfen (Abb. 8).

Die erzeugte Expressionskassette mit dem PsOMT-Fragment in antisense-Orientierung wurde mit *Hind*III/*Sma*I herausgeschnitten und in den binären pBar-Vektor (siehe Anhang) kloniert. Dieser Vektor enthält als bakteriellen Selektionsmarker ein Spectinomycin-Resistenzgen und vermittelt zur Selektion der transgenen Pflanzen eine Phosphinotricin-Resistenz. Das gesamte Konstrukt wurde vor der Transformation in *Agrobacterium tumefaciens* nochmals vollständig sequenziert.

Anschließend wurde das Konstrukt mittels Hitzeschock in *A. tumefaciens* EHA105 transferiert. Die transformierten Agro-Bakterien wurden für die Transformation von

*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun und *Pisum sativum* L. cv. Eiffel verwendet.



**Abb. 8** Konstrukt für die antisense-Inhibition des PsOMT (oben) und Bestimmung der Orientierung des OMT-Fragmentes.

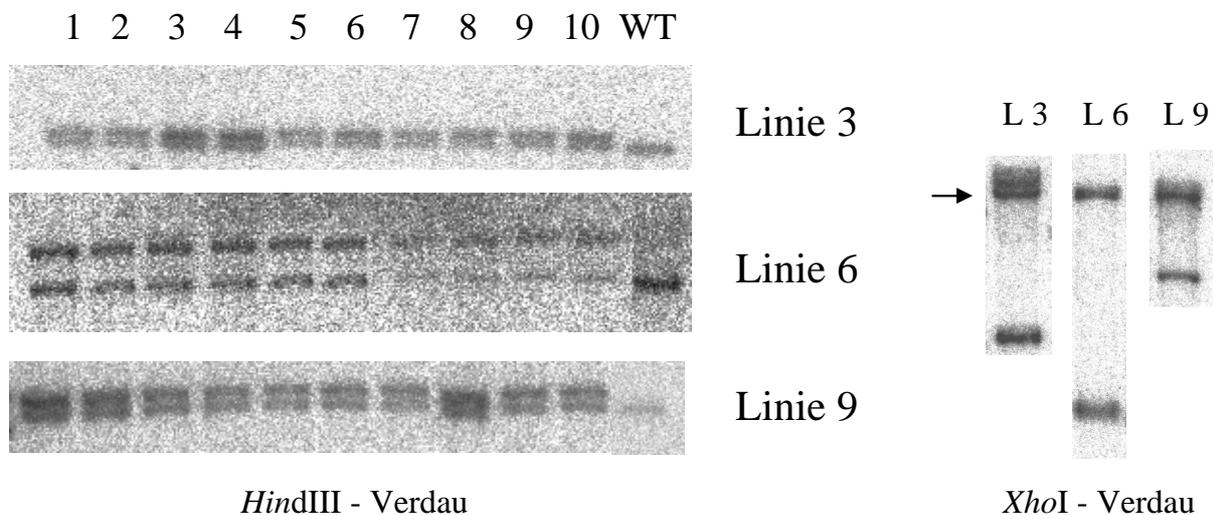
Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Expressionskassette mit dem PsOMT-Konstrukt in sense- und antisense-Orientierung. Als Promotor wurde der LeguminB4-Promotor aus *Vicia faba* verwendet. Der ocs-Terminator entstammt *A. tumefaciens*. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Zur Bestimmung der Orientierung des OMT-Fragmentes erfolgte ein Verdau mit *SmaI* und *HpaI* und eine Auftrennung der Fragmente auf einem 1%igen Agarosegel. Die sense-Orientierung ist durch „s“, die antisense-Orientierung ist durch „a“ gekennzeichnet.

### 1.2.2. Transformation des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator-antisense-Konstruktes in Erbsenpflanzen

Die transformierten Agrobakterien wurden zwei Tage vor der Transformation angeimpft, so dass sie sich zum Transformationszeitpunkt im exponentiellen Stadium der Zellteilung befanden. Um eine hohe Effizienz bei der Transformation zu gewährleisten, wurden die behandelten Explantate auf P1-Medium mit hoher Phosphinotricin-Konzentration (10 mg/l) kultiviert. Die Spross-Bildung erfolgte bei einer Phosphinotricin-Konzentration von 5 mg/l. Es wurden fünf Transformationsansätze durchgeführt, wobei je Ansatz ca. 400 Explantate mit den transgenen Agrobakterien behandelt wurden. Aus den Explantaten entwickelten sich 48 Sprosse, die auf eine Wildtyp-Unterlage gepfropft wurden. Daraus resultierten 43 transgene Pflanzen, die in der Klimakammer unter Standardbedingungen kultiviert wurden.

PCR-Analyse wurden 34 Pflanzen positiv auf das PsOMT-Fragment getestet. Diese Pflanzen entstammten 21 unabhängigen Kalli. Hieraus wurden die transgenen asOMT-Linien 2, 3, 5, 6, 8 und 9 entwickelt (Abb. 9).

Als Kontrolle für die Erbsentransformation wurde Tabak transformiert. Aus drei Transformationsansätzen in *Nicotiana tabacum* konnten 16 Tabakpflanzen generiert werden. Davon konnten 14 Tabakpflanzen positiv auf das PsOMT-Fragment getestet werden. Mit den transformierten Tabakpflanzen wurden keine weiteren Versuche durchgeführt. In ebenfalls drei Ansätzen wurde versucht, *Vicia narbonensis* zu transformieren. Es konnten jedoch keine transgenen Pflanzen generiert werden.



**Abb. 9 Southern-Analyse der transgenen Erbsen-asPsOMT-Linien 3, 6 und 9.**

In der Abbildung ist eine Southern-Analyse für 10 Pflanzen der T3-Generation der asOMT-Linie 3, 6 und 9 zu sehen. 15 µg genomische DNA wurden mit dem Restriktionsenzym *Hind*III gespalten. Durch semi-dry Blot erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran. Als Sonde wurde das Fragment des EST-Klons PSC35H04 (siehe Text) verwendet. In jeder transgenen Pflanze jeder Linie sind zwei Banden sichtbar. Die untere Bande entspricht dem endogenen Gen, wie der Vergleich mit dem Wildtyp zeigt. Zur Überprüfung der drei asOMT-Linien wurden Einzelpflanzen mit *Xho*I verdaut. Die mit einem Pfeil gekennzeichnete Bande ist endogenen Ursprungs. In der Linie 3 ist über der endogenen Bande noch eine zweite Bande erkennbar, die vermutlich durch unvollständige Verdau der genomischen DNA zustande gekommen ist.

### 1.2.3. Überexpressionskonstrukt des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators

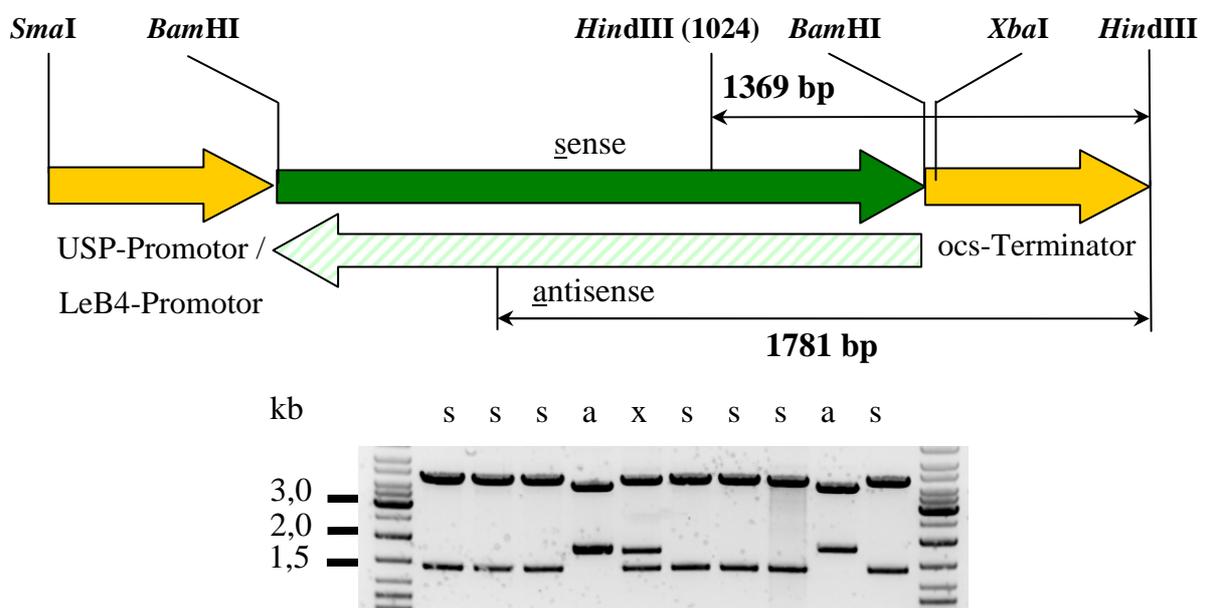
Für die Überexpression des OMTs wurde ein Konstrukt erzeugt, welches die Sequenz des Translokators von *Arabidopsis thaliana* (AtDiT1, Taniguchi *et al.*, 2002) in sense-Orientierung enthielt. Für die PCR wurden die Primer mit jeweils einer *Bam*HI-Schnittstelle versehen. Das verwendete Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Taniguchi

“Laboratory of plant resources and environment”, Nagoya University Japan, zur Verfügung gestellt.

Als Promotor wurde ein 683 bp langes Fragment des USP-Promotor aus *Vicia faba* (X56240.1, Bäumlein *et al.*, 1993) verwendet. Zur PCR-Amplifikation dieses Fragments wurde ein pUC18-Vektor benutzt, welcher den gesamten USP-Promotor (3539 bp) enthielt. Der forward-Primer enthielt eine *Sma*I-Schnittstelle, der reverse-Primer eine *Bam*HI-Schnittstelle. Beide Fragmente wurden in den pCR®4-TOPO-Vektor kloniert und mit den Primern M13-24F und M13-24R vollständig sequenziert.

Aus dem pUC18/LeB4-Vektor wurde der LeguminB4-Promotor mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sma*I ausgeschnitten und mit Hilfe derselben Schnittstellen durch den USP-Promotor ersetzt. Zur Erzeugung der Expressionskassette wurde über die *Bam*HI-Schnittstelle die gesamte OMT-Sequenz aus *A. thaliana* eingefügt. Mit Hilfe des Restriktionsenzym *Hind*III wurde die Orientierung des AtOMT-Fragmentes bestimmt (Abb. 10).

Ein pBar-Vektor mit ocs-Terminator wurde durch aufeinanderfolgenden Verdau mit *Sma*I und *Xba*I linearisiert. Beide Schnittstellen sind eng benachbart. Die Behandlung mit beiden Restriktionsenzymen führt zum Verlust eines 10 bp-Fragmentes. Die USP/sAtOMT-



**Abb. 10** Konstrukt für die Überexpression des AtOMT (oben) und Bestimmung der Orientierung des OMT-Fragmentes (unten).

Als Promotor wurde der USP-Promotor aus *Vicia faba* verwendet. Der ocs-Terminator entstammt *A. tumefaciens*. Die Orientierung der OMT-cDNA wurde durch Verdau mit *Hind*III bestimmt. Die sense-Orientierung ist durch „s“, die antisense-Orientierung ist durch „a“ gekennzeichnet. Die mit „x“ gekennzeichnete Stelle gibt einen Klon mit Doppelinsertion an, der ein Fragment sowohl in sense als auch in antisense-Orientierung enthält.

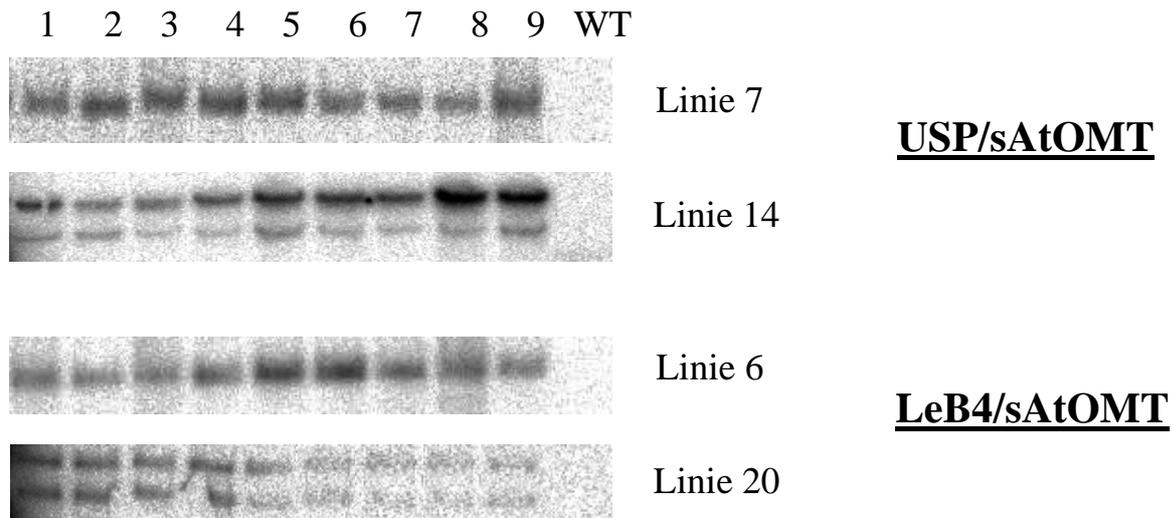
Expressions-kassette (SmaI/XbaI-Fragment, siehe Abb. 10) wurde nach Dephosphorylierung mittels der T4-Ligase in den pBar-Vektor kloniert. Positive Klone wurden über einen *Bam*HI- und *Sma*I/*Xba*I-Verdau ermittelt. Anschließend wurden die USP/sAtOMT-Konstrukte vollständig sequenziert. Eines der Konstrukte mit fehlerfreier Sequenz wurde in *A. tumefaciens* EHA105 transferiert. Die transgenen Agrobakterien wurden zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* L. cv Columbia, *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun und *Pisum sativum* L. cv Erbi verwendet.

Außer dem USP/sAtOMT-Konstrukt wurde noch ein LeB4/sAtOMT-Konstrukt generiert. Hierzu wurde aus dem LeB4/asPsOMT-Konstrukt (siehe Abb. 8) das Insert ausgetauscht. Die Orientierung der sense-cDNA wurde durch einen *Sma*I/*Hind*III Verdau sowie durch Sequenzierung überprüft. Dieses Konstrukt wurde sowohl in *A. tumefaciens* EHA101 als auch AGL1 transformiert. Es wurden transgene Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* L. cv Columbia, *Nicotiana tabacum* L. cv Havana und *Pisum sativum* L. cv Erbi generiert.

#### 1.2.4. Transformation der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator-sense-Konstrukte in Erbsenpflanzen

Es wurden insgesamt 13 Transformationsansätze mit dem USP/sAtOMT-Konstrukt durchgeführt. Aus den ersten 5 Ansätzen konnten keine Pflanzen generiert werden. 53 Pflanzen wurden gepfropft, 43 Pflanzen konnten mittels PCR getestet werden. Davon konnten 18 Pflanzen positiv auf die AtOMT-cDNA getestet werden. Diese Pflanzen entstammten von 9 verschiedenen Kalli. Hieraus wurden die transgenen USP/sAtOMT-Linien 7, 5 und 14 herangezogen. Mit dem LeB4/sAtOMT-Konstrukt wurden 7 Ansätze durchgeführt, aus denen 41 Pflanzen gepfropft wurden. Von 25 getesteten Pflanzen waren 9 positiv. Von diesen Pflanzen konnten die Linien 2, 4, 6 und 20 generiert werden.

Parallel zur Erbsentransformation wurden Tabak und *Arabidopsis* als Kontrolle transformiert. Beim USP/sAtOMT-Konstrukt konnten von 15 Tabakpflanzen 7 positiv getestet werden, hingegen bei *Arabidopsis* wurden von 24 Pflanzen 18 positiv getestet. Von 15 mit dem LeB4/sAtOMT-Konstrukt transformierten Tabakpflanzen waren 8 positiv, von 36 *Arabidopsis*-Pflanzen hatten 17 die AtOMT-cDNA. Mit den transformierten Tabakpflanzen und *Arabidopsis*pflanzen wurden keine weiteren Versuche durchgeführt. Es wurde ebenfalls versucht in drei Ansätzen *Vicia narbonensis* zu transformieren. Es konnten keine transgenen Pflanzen generiert werden.



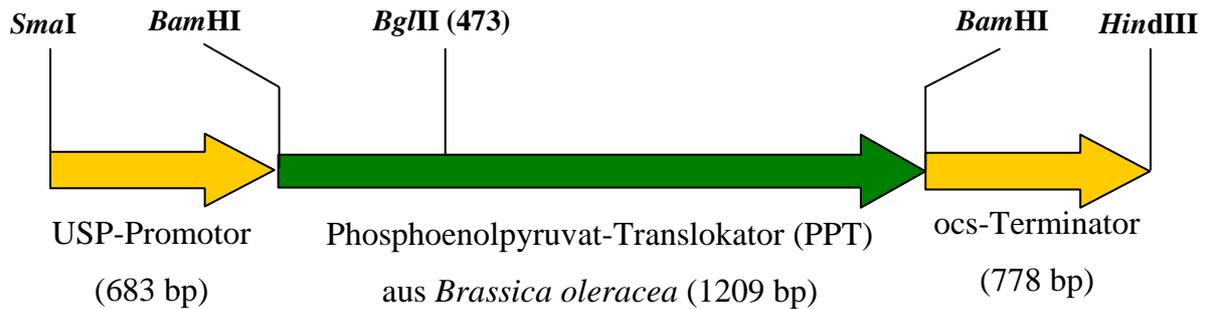
**Abb. 11 Southern-Analyse der transgenen sAtOMT-Linien und des Wildtyps.**

In der Abbildung ist eine Southern-Analyse für 9 Pflanzen der T3-Generation der USP/sOMT-Linie 7 und 14 sowie der LeB4/sAtOMT-Linie 6 und 20 zu sehen. Es wurden 15 µg genomische DNA durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Hind*III gespalten. Durch semi-dry Blot erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran. Als Sonde wurde die gesamt cDNA des OMTs aus *Arabidopsis thaliana* verwendet. Die Linien 6 und 7 enthalten je eine Kopie des Inserts, die Linien 14 und 20 je zwei Kopien des Inserts.

### 1.2.5. Überexpressionskonstrukt des Phosphoenolpyruvat-Translokators

Für das PPT-sense-Konstrukt wurde die cDNA des Phosphoenolpyruvat-Translokators (PPT) von *Brassica oleracea* (U13632, Weber *et al.*, 1994) verwendet. Für die Amplifikation wurden Primer mit jeweils einer *Bam*HI-Schnittstelle verwendet. Das Amplifikat wurde in den pCR®4-TOPO-Vector kloniert und mit den Primern T7(prom.) und T3 vollständig sequenziert. Aus dem bereits erstellten binären Vektor des USP/sAtOMT-Konstruktes wurde das AtOMT-Insert durch *Bam*HI-Verdau herausgeschnitten, so dass die BoPPT-Sequenz nur noch eingefügt werden musste. Durch einen Doppelverdau mit *Bg*III und *Xho*I konnte die Orientierung der BoPPT-Sequenz bestimmt werden. Hierbei lag die *Bg*III-Schnittstelle asymmetrisch in der BoPPT-Sequenz (473), die *Xho*I-Schnittstelle lag hingegen im Vector (Abb. 12).

Die Sequenz der gesamten Expressionskassette wurde unter Verwendung der Klonierungsprimer bestimmt und die Orientierung des Insertes bestätigt. Ein fehlerfreies USP/sBoPPT-Konstrukt wurde mittels Hitzeschock in *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 transformiert. Mit Hilfe dieser Bakterien wurden *Arabidopsis thaliana* L. cv Columbia,



**Abb. 12 Konstrukt für die Überexpression des PPT.**

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Expressionskassette des USP/sBoPPT-Konstrukts. Als Promotor wurde der USP-Promotor aus *Vicia faba* (X56240.1, Bäumlein *et al.*, 1993) verwendet. Die verwendete gesamte cDNA stammte aus *Brassica oleracea* (U13632, Weber *et al.*, 1994). Der ocs-Terminator entstammte aus *A. tumefaciens* (AF489904.1; Helliwell, C.A. and Waterhaus, P.M.). Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Die Orientierung der BoPPT-cDNA wurde durch Verdau mit *Bgl*III und *Xho*I sowie Sequenzierung bestimmt.

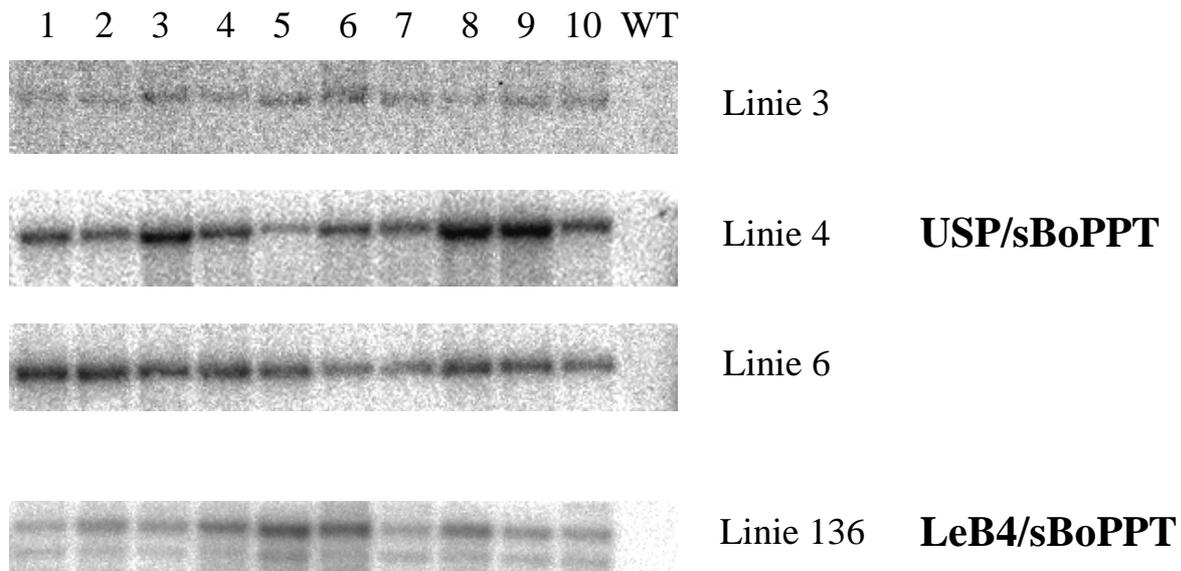
*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun und *Pisum sativum* L. cv Erbi transformiert.

Durch Austausch der Fragmente des LeB4/asPsOMT-Konstruktes mit dem BoPPT-Fragment über die *Bam*HI-Schnittstellen wurde ein weiteres Konstrukt erzeugt, das anstatt dem USP-Promotor den LeguminB4-Promotor besaß. Mit dem *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 sowie AGL1 wurden *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun und *Pisum sativum* L. cv Erbi transformiert.

#### 1.2.6. Transformation der Phosphoenolpyruvat-Translokator-sense-Konstrukte in Erbsenpflanzen

Für das USP/sBoPPT-Konstrukt wurden 8 Transformationsansätze durchgeführt. 34 Pflanzen wurden gepfropft, 21 Pflanzen wurden mittels PCR getestet. Davon waren 12 positiv für die BoPPT-Sequenz. Die transgenen Linien 3, 4 und 6 wurden generiert. Für das LeB4/sBoPPT-Konstrukt wurden zwei Transformationsansätze durchgeführt. Es wurden 4 Pflanzen gepfropft sowie durch PCR getestet. 3 Pflanzen wurden positiv getestet, aus denen eine transgene Linie gezogen werden konnte.

Als Kontrolle zur Erbsentransformation wurde Tabak parallel transformiert. Bei den Tabakpflanzen, mit dem USP/sBoPPT-Konstrukt waren von zwölf 8 positiv auf das Fragment getestet wurden. Von den 13 generierten LeB4/sBoPPT-Pflanzen wurden 8 positiv getestet. Mit den transformierten Tabakpflanzen wurden keine weiteren Versuche durchgeführt. Es wurde ebenfalls versucht in drei Ansätzen *Vicia narbonensis* zu transformieren, wobei keine Pflanzen generiert werden konnten.



**Abb. 13 Southern-Analyse der transgenen sBoPPT-Linien und dem Wildtyp.**

In der Abbildung ist eine Southern-Analyse für 10 Pflanzen der T3-Generation der USP/sBoPPT-Linie 3, 4 und 6 sowie der LeB4/sBoPPT-Linie 136 zu sehen. Es wurden 15 µg genomische DNA durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *HindIII* gespalten. Durch semi-dry Blot erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran. Als Sonde wurde die *full length* cDNA des BoPPT aus *Brassica oleracea* verwendet. Die USP/sBoPPT-Linien enthalten je eine Kopie des Transgenes, die LeB4/sBoPPT-Linie 136 zwei Kopien des Inserts.

### 1.2.7. Übersicht der Konstrukte und erzeugten homozygoten Erbsenlinien

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von Konstrukten plastidären Translokatoren generiert. Eine Übersicht sind in Tabelle 1 zu sehen. Alle erzeugten Erbsenlinien waren ab der T4-Generation homozygot. Es wurde entschieden, weitere Analysen mit den homozygoten LeB4/asPsOMT-Linien durchzuführen. Diese zeigten einen eindeutig identifizierbaren Phänotyp. Aufgrund der begrenzten Zeit für diese Arbeit konnten keine Analysen der homozygoten Linien der anderen Konstrukte mehr durchgeführt werden. Die anderen generierten Erbsenlinien werden in zukünftigen Arbeiten der Arbeitsgruppe näher charakterisiert und analysiert. Die transformierten Tabak- und Arabidopsispflanzen wurden als Transformationskontrollen verwendet und nicht weiter charakterisiert.

Tabelle 1.

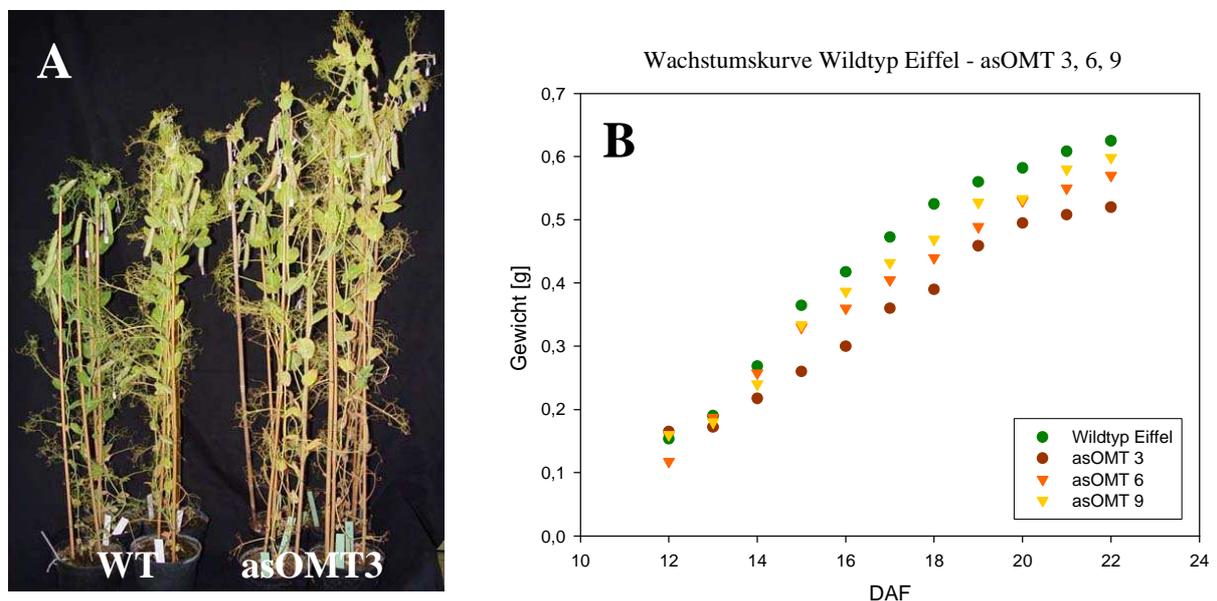
Zusammenfassung der Konstrukte und der erzeugten homozygoten transgenen Erbsenlinien

<b>Konstrukt</b>	<b>transformierte Pflanze</b>	<b>positiv getestet Pflanzen</b>	<b>generierte homozygote Linie Nr.</b>
LeB4/asPsOMT	<i>Pisum sativum</i> cv. Eiffel	43	2, 3, 5, 6, 8, 9
USP/sAtOMT	<i>Pisum sativum</i> cv. Erbi	18	7, 5, 14
LeB4/sAtOMT	<i>Pisum sativum</i> cv. Erbi	9	2, 4, 6, 20
USP/sBoPPT	<i>Pisum sativum</i> cv. Erbi	12	3, 4, 6
LeB4/sBoPPT	<i>Pisum sativum</i> cv. Erbi	3	136

### 1.3. Phänotyp der transgenen asOMT-Erbsepflanzen

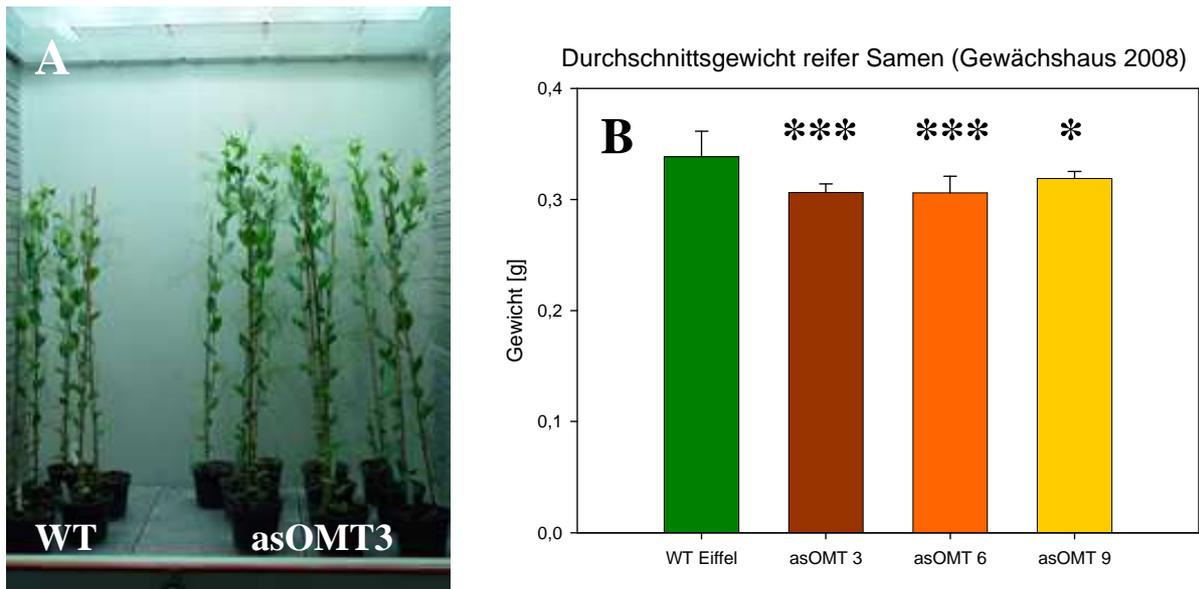
Aus den transgenen asOMT-Linien von *Pisum sativum* (2, 3, 5, 6, 8 und 9; sechs Linien) wurden 3 Linien ausgewählt, die phänotypische Veränderungen aufwiesen (Linie 3, 6, 9). Die Pflanzen zeigen einen veränderten Habitus. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Wuchshöhe verändert; die Pflanzen sind größer. Bei der Linie 3 ist dieser Effekt am stärksten ausgeprägt (Abb. 16A). Dieser Effekt lässt sich verstärken, wenn die Pflanzen bei erhöhter Temperatur (Lichtphase 16 h bei 23 °C) wachsen (Abb. 17A). Die Linien 6 und 9 zeigen eine weniger starke Ausprägung dieses Effektes.

Die transgenen Erbsensamen zeigen keine sichtbaren Veränderungen. In den Wachstumskurven (Abb. 16B) ist der graphische Verlauf der Zunahme des Gewichtes der sich entwickelnden Samen für die drei transgenen Linien im Vergleich zur Gewichtszunahme der Wildtypsamen dargestellt. Ab dem 14. Tag nach der Blüte weisen die Samen aller transgenen Linien ein geringeres Gewicht auf als der Wildtyp. Linie 3 zeigt die stärkste Reduktion des Frischgewichtes. Es sind nur die Mittelwerte ohne Standardabweichung von durchschnittlich acht Samengewichten dargestellt. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch unter Gewächshausbedingungen wiederholbar ist, wurden die gleichen Linien im Jahr 2008 in



**Abb. 16 Vergleich des Phänotyps der transgenen Linien mit dem des Wildtyps unter Normalbedingungen.**

- (A) Vergleich von Wildtyppflanzen und Pflanzen der Linie asOMT3, die unter Normalbedingungen in der Klimakammer (16 h Tag, 19 °C) gewachsen waren.
- (B) Graphische Darstellung der Samengewichte als Wachstumskurve während der Entwicklung vom 12 DAF bis 22 DAF. Dargestellt sind nur die Mittelwerte von mehreren Samengewichten (N>8).



**Abb. 17 Vergleich des Phänotyps der transgenen asOMT3 Linien mit dem des Wildtyps bei erhöhter Temperatur (A) und Durchschnittsgewicht reifer Samen (B).**

- (A) Vergleich von Wildtyppflanzen und Pflanzen der Linie asOMT3, die bei einer erhöhten Temperatur im Klimaschrank (16 h Tag, 23 °C) gewachsen waren.
- (B) Graphische Darstellung der Durchschnittsgewichte reifer Samen (N>20). Das Wachstum erfolgte in kleinen Gewächshäusern im Jahr 2008. Die Gewichtsdaten wurden mittels einer statistischen Analyse ausgewertet (siehe Material und Methoden).

einem kleinen Gewächshaus unter Feldbedingungen herangezogen. Die reifen, abgetrockneten Samen der asOMT-Linien zeigen ein geringeres Samengewicht im Vergleich zu den Wildtypsamens (Abb. 17B). Hierbei wird deutlich, dass die Linien 3 und 6 die stärkste Gewichtsreduktion aufweisen.

#### 1.4. Histologische Analysen von asOMT-Erbсен

Die histologische Untersuchung von Erbsen der asOMT-Linien 3, 6 und 9 wurden lichtmikroskopisch sowie mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops durchgeführt. Im Lichtmikroskop wurden je transgener Linie drei Samenentwicklungsstadien (13, 19, 24 DAF) mit den entsprechenden Entwicklungsstadien des Wildtypsamens verglichen. Die Strukturanalyse der Zellen (Zellgröße, Zellgeometrie) ergab keine Veränderung in den transgenen Samen im Vergleich zum Wildtypsamens. Ebenfalls wurden keine Unterschiede der Stärke- und Proteinkörper im Lichtmikroskop bei maximaler Vergrößerung sichtbar.

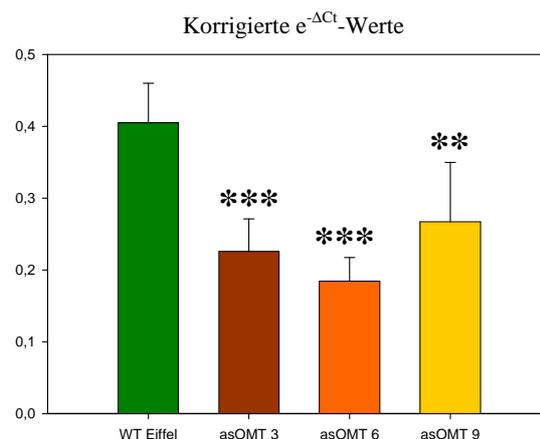
Die Ultrastrukturanalyse wurde mit nur einem Entwicklungsstadium (15 DAF) je asOMT-Linie durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im adaxialen, im abaxialen sowie im Mittelbereich des Kotelydonen. Sehr gut zu erkennen waren vor allem die Proplastiden sowie die Proteinkörper. Die vergleichende Analyse der Aufnahmen der kontrastierten

Ultradünnschnitte zwischen den transgenen Samen mit den Wildtypsamensamen ergab keine strukturellen Veränderungen und keine Veränderungen bei den eingelagerten Proteinkörpern (Bilder nicht gezeigt).

### 1.5. Transkriptanalyse von sich entwickelnden asOMT-Erbsen

Um zu überprüfen, ob die OMT-spezifischen Transkripte reduziert sind, wurde eine Transkriptanalyse durchgeführt. Bei der RNA-Gelblot-Analyse wurden Transkripte aus sich entwickelnden Erbsensamen analysiert (11 DAF bis 24 DAF). Als Sonde wurde das 326 bp-lange OMT-Fragment verwendet. Die Quantifizierung der RNA erfolgte mittels der 25S-RNA. Nach Abgleich der Banden zwischen der transgenen asOMT-Linie 3 und des Wildtypes ergab keine signifikante Reduktion. In den transgenen Proben konnte eine endogene OMT-Bande sowie eine antisense-OMT-Bande identifiziert werden.

Aufgrund der höheren Sensitivität der qRT-PCR für spezifische Transkripte wurden vom Entwicklungsstadium 15 DAF von jeder der asOMT-Linie sowie vom Wildtyp drei Samen geerntet und mit Hilfe von OMT-spezifischen Primern auf Expression des Transgens getestet. Als interner Standard wurde Aktin aus Erbse (Acc. Nr. U81047.1) verwendet. Die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte für alle drei asOMT-Linien sind im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert. (Linie 3 - 1,9fach weniger, Linie 6 - 2,2fach, Linie 9 - 1,6fach weniger). Für die Normalisierung mit der internen Kontrolle wurde der  $e^{-\Delta\text{Ct}}$ -Wert berechnet. Mit Hilfe des Programms LineRegPCR wurden die PCR-Effizienz-Werte „e“ ermittelt. In der Abbildung 18 sind die ermittelten  $e^{-\Delta\text{Ct}}$ -



**Abb. 18 Vergleich der korrigierten  $e^{-\Delta\text{Ct}}$ -Werte** der asOMT-Linien 3, 6 und 9 mit dem des Wildtyps. Je Linie wurden am 15 DAF drei biologische Wiederholungen sowie drei technische Wiederholungen durchgeführt. Hieraus errechnete man die Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden).

Werte des Wildtypes sowie aller drei asOMT-Linien dargestellt. Diese Werte sind bei allen drei transgenen Linien niedriger als im Wildtyp. Durch Errechnen des  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Wertes kann das Verhältnis der Transkriptmenge in den transgenen Proben zu den Wildtypproben bestimmt werden ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Wert für die Linie 3 – 0,52; Linie 6 – 0,43; Linie 9 – 0,66). Hieraus ist ersichtlich, dass die Transkriptmenge auf 43 % (Linie 6), 52% (Linie 3) bzw. 66 % (Linie 9) der Transkriptmenge des Wildtypes reduziert ist.

## 1.6. Microarray-Analyse von asOMT-Erbesen

Unter Verwendung von Microarrays wurde das Transkriptom der Samen der asOMT-Linie 3 und des Wildtypes analysiert (zur Methode, siehe Weigelt *et al.*, 2008). Es wurden drei Entwicklungsstadien (15, 17, 22 DAF) analysiert. Gene, die eine Veränderung gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 1,5 aufwiesen, wurden als differenziell exprimiert betrachtet. Für die Darstellung von herunterregulierten Genen gegenüber dem Wildtyp, wurde vor dem Faktor ein Minus-Zeichen eingefügt. In der nachfolgenden Tabellen (Seite 62 – 64) sind die unterschiedlich exprimierten Gene dargestellt.

In der Auswertung wurden 162, 343 und 346 Gene (3,1%, 6,5%, 6,6% von 5246) am 15., 17. und 22. DAF annotiert. Davon sind 80, 48, und 190 Gene (1,5%, 0,9%, 3,62% von 5246) am 15., 17. und 22. DAF in der transgenen Linie geringer exprimiert. Die Funktion von 23, 11 und 70 Genen mit geringerer Expression in den transgenen Samen (23%, 11 % und 70% der herunterregulierten Gene) ist unbekannt. Am 15., 17. und 22. DAF sind 82, 295 und 156 Gene (1,6%, 5,6% und 3% von 5246) höher exprimiert. Von den hochregulierten Genen zeigen 23, 40 und 21 Gene keine Homologie zu annotierten Sequenzen (28%, 14% und 14% der hochregulierten Gene). Es ist erkennbar, dass die Anzahl exprimierter Gene während der Samenentwicklung zunimmt. Am 17. DAF sind fast doppelt soviel unterschiedlich exprimierte Gene annotiert wie am 15. DAF. Die Anzahl der hochregulierten Gene am 17. DAF ist mehr als fünfmal so hoch wie die der herunterregulierten Gene. Am 22. DAF sind mehr annotierte Gene herunterreguliert als hochreguliert. Vielfach sind Gene vertreten, die für ribosomale Proteine und Histone codieren, was auf eine erhöhte Genaktivität und Proteinbiosynthese hinweist. In mehreren analysierten Entwicklungsstadien konnten sechs Gene der Albuminbiosynthese zugeordnet werden, die alle während der Samenentwicklung herunterreguliert sind. Sechs Gene der Leguminspeicherproteine zeigen sowohl eine hoch-

als auch Herunterregulation. Albumine und Legumine gehören zu den Hauptspeicherproteinen der Leguminosen.

In den asOMT3-Samen sind 44 Gene, die für Speicherproteine codieren, differenziell exprimiert (Tabelle 2). Zu den 14 Genen, die hochreguliert sind, gehören das Vicillin (4 Gene), das Legumin (7 Gene) und das Vicillin-ähnliche USP (unknown seed protein) (3 Gene). 34 Sequenzen von Speicherproteinen sind herunterreguliert. Dazu gehören die Albumine (6 Gene), die Legumine (6 Gene), das Convicillin (3 Gene), das Vicillin (6 Gene), das Vicillin-ähnliche USP (9 Gene), das Saccharosebindende Protein (2 Gene) sowie die Oleosine (2 Gene) und jeweils eine Sequenz für das Glycinin und das Conglutinin. Es ist erkennbar, dass am 15. DAF eine große Mehrzahl von Genen (27 Gene) herunterreguliert ist. Hingegen am 17. DAF sind es 7 Gene, am 22. DAF sind es 14 Gene. Die hochregulierten Gene verteilen sich wie folgt: 0 Gene am 15. DAF, 9 Gene am 17. DAF und 11 Gene am 22. DAF.

In den transgenen Samen sind 13 Gene der Aminosäurebiosynthese differenziell exprimiert (Tabelle 3). Hiervon sind fünf Gene geringer und acht Gene stärker exprimiert. Zu den herunterregulierten Genen gehören die L-Asparaginsase (2 Gene, 17 und 22 DAF), die Homoserin Kinase, die Serin/Glycin Hydroxymethyltransferase und die 3-Isopropylmalat Dehydratase. Die Asparaginsase spielt beim Abbau des Asparagins eine entscheidende Rolle. Die hochregulierten Genen sind folgende: Methionin Synthase (3 Gene), Ketol-acid Reductoisomerase (2 Gene, plastidär), die Acetohydroxy-acid Synthase, die 3-Isopropylmalat Dehydratase und Glycin decarboxylase. Die Gene der Aminosäuresynthese sind in den früheren Stadien hochreguliert, am 22. DAF allerdings herunterreguliert.

Eine Vielzahl von Genen (58 Gene), die Proteine mit plastidärer Funktion codieren, sind in den asOMT3-Samen differenziell exprimiert (Tabelle 4). Über 75% dieser Gene (45 Gene) sind hochreguliert, nur 13 Gene sind herunterreguliert. Zu den differenziell hochregulierten Genen zählen 2 Gene der Chlorophyllbiosynthese (Porphobilinogen deaminase, Mg-protoporphyrin IX monomethyl-Estercyclase), 5 Gene codieren für die Rubisco (Rubisco-Aktivase, Rubisco subunit binding-protein  $\beta$ , Rubisco small chain), 6 Gene gehören zum PSI-Protein, 3 Gene zum PSII-Protein. Für ein weiteres Thylakoidprotein, das Plastocyanin, codiert 1 Gen, für das Chlorophyll-binding Protein codieren 13 Gene sowie jeweils ein Gen für das Ferredoxin, die GAPDH A, die GAPDH B, den Precursor des CP12-Proteins, den Triosephosphat/3-Phosphoglycerat-Translokator, die ATP-Synthase ( $\gamma$ -Untereinheit) und das MinD-Protein. Desweiteren sind die plastidären Gen für ein Porin (VDAC1.1), das Acyl-

Tabelle 2.

**Differenziell exprimierte Gene der Proteinspeicherung**

Von drei Entwicklungsstadien (15, 17, 22 DAF) sind die differenziell exprimierten Gene des Proteinspeichermetabolismus ( $P < 0,05$ ) dargestellt. Bei Genen, die im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert sind, wurde ein Minus-Zeichen vor dem Faktor gesetzt.

DAF	Seq. ID	Annotation	Faktor	Funktion
17, 22	P04635	Vicilin, 47K	<b>2,6; 4,0</b>	Speicherprotein
17, 22	P04615, P04616, P04038	Vicilin (3)	<b>1,7; 1,8; 2,2</b>	Speicherprotein
17, 22	P04997, P04998, PS02001, P01284	Legumin B (4)	<b>1,7; 2,2; 2,3</b>	Speicherprotein
17, 22	PCPS13, P04996	Legumin J (2)	<b>2,4; 3,5</b>	Speicherprotein
17, 22	P04995	Legumin K	<b>1,7; 2,3</b>	Speicherprotein
17, 22	P01331, P01275, NCPS06	USP (3)	<b>1,5; 1,6</b>	Speicherprotein
15	P04531	Albumin	<b>-3,1</b>	Speicherprotein
15, 17	P04536, P04536	Albumin-1 B (2)	<b>-4,1; -17,8; -2,0</b>	Speicherprotein
17	P02079, PCPS14	Albumin 1 (2)	<b>-3,6; -2,0</b>	Speicherprotein
17, 22	P04441	Albumin-2	<b>-8,4; -2,6</b>	Speicherprotein
15	P04448	Legumin A	<b>-3,0</b>	Speicherprotein
15	P02001, P01284, P04998, P04997	Legumin B (4)	<b>-2,2; -1,8; -2,0; -1,6</b>	Speicherprotein
15	P04995	Legumin K	<b>-1,7</b>	Speicherprotein
15, 22	P00637, P03879, P01001	Convicilin (3)	<b>-2,6; -2,5; -1,9; -1,5</b>	Speicherprotein
15, 22	P04032, P00636	62K sucrose-binding protein (2)	<b>-2,2; -1,7; -2,7</b>	Speicherprotein
15	P04533, P04038	Vicilin A (2)	<b>-1,8; -2,3</b>	Speicherprotein
15	PCPS22, P02195	Vicilin (2)	<b>-1,7; -1,7</b>	Speicherprotein
15	P04635, P00633	Vicilin, 47K (2)	<b>-1,5; -1,5</b>	Speicherprotein
15, 22	P01331, P00635, PCPS20, P01292, P02121, P04579, NCPS06, P04364, P01146	USP (9)	<b>-2,0; -1,8; -2,6; -2,1, -1,6; -1,5; -1,5; -1,6</b>	Speicherprotein
17, 22	P04214	Oleosin, 15.8 kDa	<b>-2,5; -1,8</b>	Speicherprotein
17, 22	P04150	Oleosin	<b>-3,3; -1,7</b>	Speicherprotein
17	P04532	Glycinin subunit G7	<b>-4,0</b>	Speicherprotein
22	P03963	Conglutin gamma	<b>-1,7</b>	Speicherprotein

Tabelle 3.

**Differenziell exprimierte Gene des Aminosäuremetabolismus**

Von drei Entwicklungsstadien (15, 17, 22 DAF) sind die differenziell exprimierten Gene des Aminosäuremetabolismus ( $P < 0,05$ ) dargestellt. Bei Genen, die im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert sind, wurde ein Minus-Zeichen vor dem Faktor gesetzt.

DAF	Seq. ID	Annotation	Faktor	Funktion
15, 17	P00936, P01003	P04228, Methionine synthase (3)	<b>2,1; 1,9; 1,6</b>	Aminosäuremetabolismus
17	P02505, P01422	Ketol-acid reductoisomerase,	<b>2,0; 1,6</b>	Aminosäure-

### III. Ergebnisse

17	P01320	plastidial (2) Acetohydroxy- acid synthase small subunit	<b>1,6</b>	metabolismus Aminosäure- metabolismus
17	P02844	3-isopropylmalate dehydratase, small su.	<b>1,7</b>	Aminosäure- metabolismus Aminosäure- metabolismus
15	P03823	Gly decarboxylase P, mitochondrial	<b>2,4</b>	Aminosäure- metabolismus
17, 22	P03654, P03495	L-asparaginase (2)	<b>-2,4; -3,4; -3,0</b>	Aminosäure- metabolismus
22	P04004	Homoserine kinase, plastidial	<b>-1,7</b>	Aminosäure- metabolismus
22	P04128	Serine hydroxymethyltransferase, mitoch.	<b>-4,4</b>	Aminosäure- metabolismus
22	P00330	3-isopropylmalate dehydratase large su,	<b>-3,4</b>	Aminosäure- metabolismus

Tabelle 4.

#### Differenziell exprimierte Gene mit plastidärer Funktion

Von drei Entwicklungsstadien (15, 17, 22 DAF) sind die differenziell exprimierten Gene mit plastidärer Funktion ( $P < 0,05$ ) dargestellt. Bei Genen, die im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert sind, wurde ein Minus-Zeichen vor dem Faktor gesetzt.

DAF	Seq. ID	Annotation	Faktor	Funktion
17, 22	P01185	Porphobilinogen deaminase	<b>1,6; 1,8</b>	Chlorophyll- bioynthese
15	P04067	Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclise	<b>2,0</b>	Chlorophyll- bioynthese
15	P04802	Rubisco activase	<b>1,8</b>	Calvin-Zyklus
15, 17	P04885	Rubisco subunit binding-protein beta	<b>2,2; 2,6</b>	Calvin-Zyklus
17, 22	P04369, P05083, P04368	Rubisco, small chain (3)	<b>7,0; 2,7; 1,9</b>	Calvin-Zyklus
15, 17, 22	P02684, P03722, P04710, P04200, P01410, P00436	PS I protein (6)	<b>2,0; 2,4; 2,7; 1,6; 2,2; 3,1; 2,6; 2,4; 2,6; 2,4</b>	Thylakoidprotein
15, 17, 22	P01039, P01038, P05119	PSII I-protein (3)	<b>2,9; 1,5; 1,6; 2,2</b>	Thylakoidprotein
22	P04283	Plastocyanin, chloroplast	<b>1,7</b>	Thylakoidprotein
15, 17, 22	P00519, P05170, P04327, P05007, P05005, P01663, P00854, P05010, P00875, P04271, P04272, P03175, P05008	Chlorophyll a/b binding protein (13)	<b>4,2; 4,3; 1,9; 2,8; 3,4; 4,0; 1,8; 1,9; 2,0; 4,2; 7,1</b>	Chlorophyll a/b binbing Protein
17, 22	P01497	Ferredoxin-1	<b>1,6; 2,7</b>	Ferredoxin
17, 22	P00460	GAPDH A, NADP	<b>2,0; 1,8</b>	Calvin-Zyklus
15	P00908	GAPDH B, NADP	<b>2,6</b>	Calvin-Zyklus
17	P03482	CP12 protein precursor, chloroplast	<b>2,3</b>	Proteininteraktion
17	P04339	Triose-P/3-phosphoglycerate/P translocator	<b>1,9</b>	Transport
15	P04415	ATP synthase gamma chain, chloroplast	<b>1,7</b>	ATP-Synthese
17	P02124	Septum site-determining protein MinD	<b>1,7</b>	Plastidenteilung

### III. Ergebnisse

17	P04405	Outer plastidial membrane protein porin, VDAC1.1	<b>1,8</b>	Transport
15	P04591	Acyl carrier protein 1, chloroplast	<b>1,7</b>	Fettsäurebiosynthese
22	P00356	Chaperone protein dnaJ 8, chloroplast	<b>2,8</b>	Chaperone
15	P01245, P00342	Ferritin 3	<b>2,2; 1,5</b>	Metall-Homeostase
15	P04298	Adenosine 5'-phosphosulfate reduct. plastid	<b>1,8</b>	Schwefelmetabolismus
17	P04607	Sugar epimerase, plastid	<b>1,6</b>	Zuckermetabolismus
22	P04628	AGP large subunit	<b>-3,7</b>	Stärkebiosynthese
22	P02052	4-alpha-glucanotransferase (D-enzyme)	<b>-1,7</b>	Stärkebiosynthese
22	P03815	Granule-bound starch synthase 1	<b>-1,6</b>	Stärkebiosynthese
15	P04525	Stearoyl-ACP desaturase (SSI2)	<b>-1,6</b>	Fettsäurebiosynthese
15, 17, 22	P01543	Hexose transporter	<b>-1,7; -2,1; -1,7</b>	Transport
22	PCPS12	GPT	<b>-1,6</b>	Transport
17, 22	P00852, P03956	OEP16.1 (2)	<b>-8,1; -6,8; -2,9</b>	Transport
15, 17, 22	P01176	OEP16.2	<b>-7,2; -2,9; -2,5</b>	Transport
22	P02762	Zinc transporter 4, chloroplast	<b>-2,2</b>	Transport
17	P04369	Rubisco, small chain	<b>-2,3</b>	Calvin-Zyklus
17	P02333	Chloroplast chaperonin 10	<b>-2,0</b>	Chaperonin
22	P00801	Thioredoxin	<b>-1,7</b>	Thioredoxin

Tabelle 5.

#### Differenziell exprimierte Gene des Kohlenhydratmetabolismus und -transportes

Von drei Entwicklungsstadien (15, 17, 22 DAF) sind die differenziell exprimierten Gene des Kohlenhydratmetabolismus und -transportes ( $P < 0,05$ ) dargestellt. Bei Genen, die im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert sind, wurde ein Minus-Zeichen vor dem Faktor gesetzt.

DAF	Seq. ID	Annotation	Faktor	Funktion
15	P00560	SUT1	<b>1,7</b>	Saccharosetransport
15, 17, 22	P04390, P03580, P01278, PCPS16,	Sucrose synthase 1 (4)	<b>1,6; 1,6; 5,1; 5,4; 5,7, 11</b>	Saccharosespaltung
17	P05147	Fructokinase	<b>1,6</b>	Glykolyse
15, 17, 22	PCPS23, P01920, P02459, P02459	GAPDH, cytosolic (4)	<b>1,6; 1,6; 1,6; 3,8; 2,9; 5,4; 5,7</b>	Glykolyse
17	P03813	PPi-dependent phosphofruktokinase (PFK)	<b>2,1</b>	Glykolyse
17	P01309	Phosphoglucomutase, cytoplasmic	<b>1,7</b>	Glykolyse
22	P04847	Phosphoglycerate kinase, cytosolic	<b>1,6</b>	Glykolyse
22	P04539	Pyruvate kinase, cytosolic	<b>1,7</b>	Glykolyse
22	P00560	SUT1	<b>-2,8</b>	Saccharosetransport
22	P02303	Sucrose-phosphate synthase	<b>-2,4</b>	Saccharosesynthese
22	P03795	Phosphoglyceromutase, cytosolic	<b>-2,0</b>	Glykolyse

Carrierprotein, das Chaperonprotein dnaj8, das Ferritin (2 Gene), die Adenosin 5'-phosphosulfate Reductase sowie die Saccharose-Epimerase hochreguliert. Es ist erkennbar, dass eine große Mehrheit von Genen hochreguliert sind, die eine Funktion in der Photosynthese ausüben.

Zu den herunterregulierten Genen gehören vor allem Gene, die in der Stärkebiosynthese involviert sind sowie Gene, die für plastidäre Transportproteine codieren (Tabelle 5). Hierzu gehören der Hexosentransporter, der Glucose-6-phosphat/Phosphat-Transporter (GPT), der OEP16.1 (2 Gene), der OEP16.2 sowie der Zinktransporter 4. Folgende Gene der Stärkebiosynthese sind herunterreguliert: ACP (große Untereinheit), 4-Alpha-Glucanotransferase, Stärkesynthase I. Ebenfalls sind die Gene der Stearyl-ACP Desaturase (SSI2), der Rubisco (kleine Untereinheit), des Chaperonin 10 und des Thioredoxins herunterreguliert.

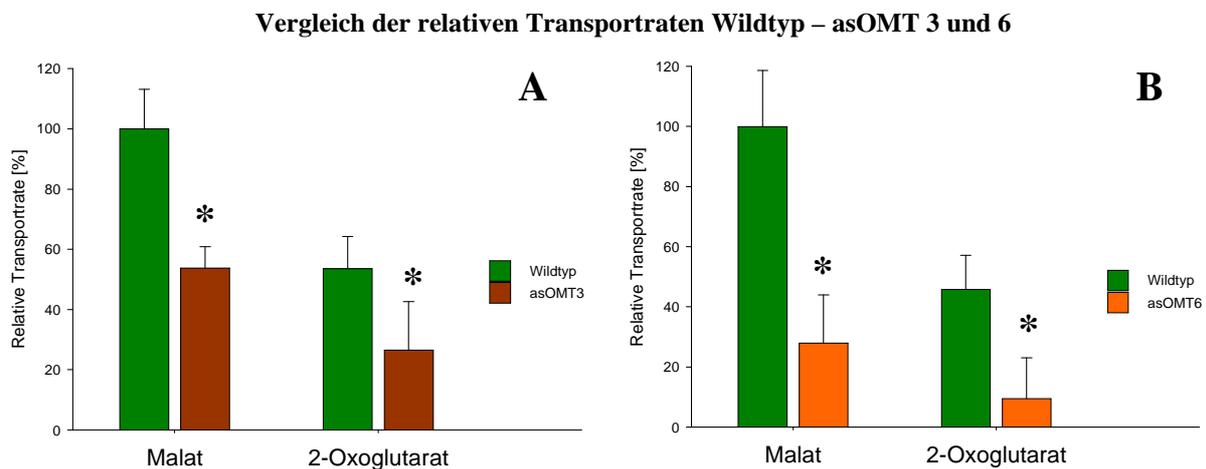
In den asOMT3-Samen sind 16 Gene differenziell exprimiert, die im Kohlenhydratmetabolismus sowie dem Kohlenhydrattransport involviert sind. Hiervon sind 14 Gene hochreguliert. Das Gen des Saccharosetransporters SUT1 ist am 15. DAF hochreguliert, am 22. DAF herunterreguliert. Desweiteren sind Gene der Saccharosesynthase 1 (4 Gene), der Fructokinase, der GAPDH (4 Gene, cytosolisch), der PPI-abhängigen Phosphofruktokinase (PFK), der Phosphoglucomutase, der Phosphoglycerat-Kinase sowie der Pyruvatkinase hochreguliert. Das Gen der Saccharosephosphat Synthase und der Phosphoglyceromutase sind am 22. DAF herunterreguliert. Am 15. und 17. DAF ist der Kohlenhydrattransport und der Kohlenhydratmetabolismus stimuliert.

#### 1.7. Transportaktivität des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators (OMT)

Die Transportaktivität des Oxoglutarat/Malat-Translokators wurde durch Aufnahme von C14-markierten Malat in künstliche Proteoliposomen bestimmt. Hierzu wurden Samen der transgenen Linien 3 und 6 verwendet, deren OMT-Transportaktivität im Vergleich zur OMT-Transportaktivität von Wildtypsamens gemessen wurde. Als Ausgangsmaterial wurden Erbsensamen im späten Stadium der Entwicklung verwendet (18 – 22 DAF). Die Proteoliposomen wurden mit verschiedenen Substraten (Malat, 2-Oxoglutarat, Gluconat) vorbeladen. Durch Import von <sup>14</sup>C-Malat konnte eine Zeitkinetik erstellt werden, woraus die spezifischen Transportraten ermittelt werden konnten. Die Effizienz der Inkorporation der Membranproteine in die Proteoliposomen liegt nicht bei 100 %, so dass die absoluten

Transportraten unter den *in vivo*-Raten liegen und somit nur ein Vergleich untereinander sinnvoll ist.

Als Richtwert wurde die Transportrate für Malat im Wildtyp auf 100 % gesetzt. Der Vergleich der relativen Malat-Transportraten zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp zeigt eine Reduktion auf 54 % für die Linie 3 und auf 28 % für die Linie 6 (Abb. 19). Die relative Transportrate des 2-Oxoglutarats ist in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp auf 50 % (Linie 3) und 21 % (Linie 6) inhibiert. Es ist erkennbar, dass die Dicarbonsäure 2-Oxoglutarat im Wildtyp mit einer um die Hälfte geringeren Transportrate transportiert wird als das Malat (54 % in der Linie 3, 46 % in der Linie 6). Die Transportrate des 2-Oxoglutarats der transgenen Linien ist im Vergleich zum Malat auf 50 % (Linie 3) sowie 34 % (Linie 6) reduziert. Zur Kontrolle der Qualität der Proteoliposomen wurden Transportmessungen mit Natrium-Gluconat durchgeführt. Diese Substanz wird vom 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator nicht transportiert und wird somit zur Bestimmung des Blindwertes verwendet. Der Transport des Gluconats ist im Durchschnitt mit 17 % an dem Transport des Malates beteiligt, bei 2-Oxoglutarat sind es im Durchschnitt 30 %. Der Gluconattransport ist beim 2-Oxoglutarat fast doppelt so groß wie beim Malat. Aufgrund der höheren strukturellen Ähnlichkeit des Gluconats zum 2-Oxoglutarats als zum Malat ist dieser Effekt erklärbar. Die gemessenen Transportraten für Malat und 2-Oxoglutarat wurden mit dem jeweiligen Blindwert korrigiert.



**Abb. 19 Relative Transportraten für Malat und 2-Oxoglutarat in den Erbsen-asOMT-Linien 3 (A) und 6 (B).**

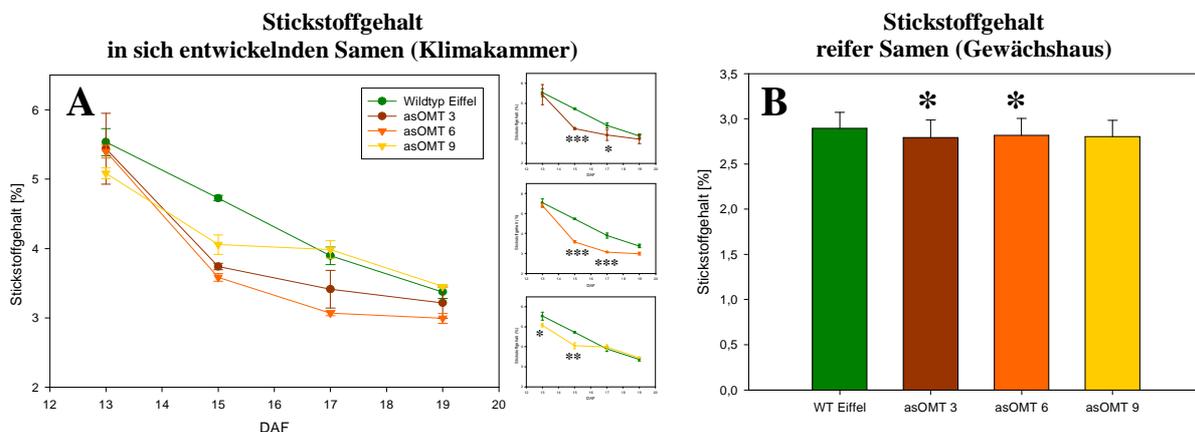
Die Malattransportrate des Wildtyps ist gleich 100 %. Dargestellt ist der Mittelwert aus sieben (Linie 3) bzw. fünf (Linie 6) ermittelten Transportraten sowie die Standardabweichung. Die Raten sind gegen die Transportrate des Gluconats als Blindwert korrigiert wurden. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden).

## 1.8. Stickstoff- und Kohlenstoffgehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbсен

Aus den Samen wurde das Wasser durch Gefriertrocknung entzogen und die gefriergetrockneten Samen zu Pulver zermahlen. Der Gesamt-Stickstoff- und –Kohlenstoffgehalt der gefriergetrockneten Samen wurde mittels Elementaranalyse bestimmt. Die Gehaltsangaben sind bezogen auf das Trockengewicht.

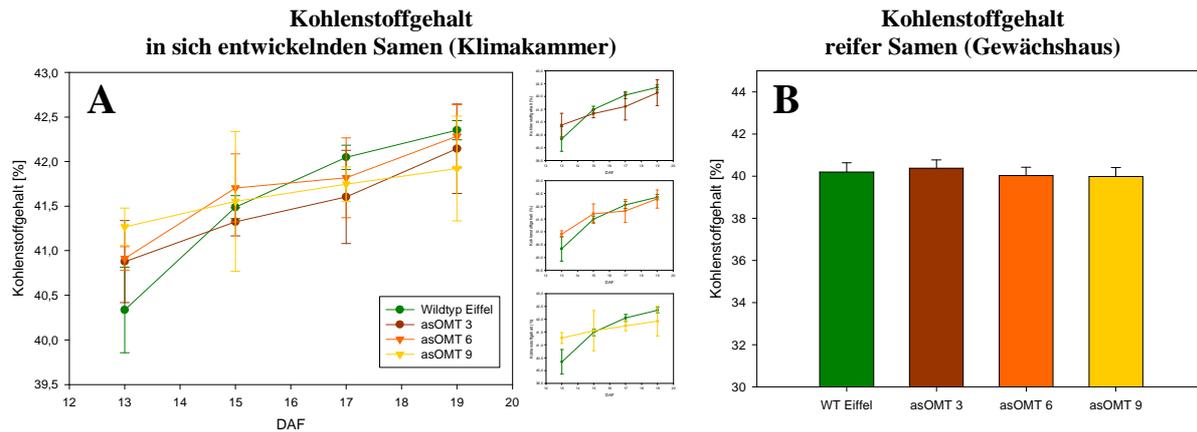
Während der Samenentwicklung zeigt die asOMT-Linie 9 am 15. DAF einen geringeren Stickstoffgehalt als der Wildtyp (Abb. 20A). Diese Reduktion ist ebenfalls für die Linien 3 und 6 zum gleichen Zeitpunkt hoch signifikant nachweisbar. Für die Linien 3 und 6 ist diese Veränderung noch am 17. DAF nachweisbar, allerdings nicht mehr am 19. DAF. Linie 9 zeigt bereits ab dem 17. DAF keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp. Im Gewächshaus zeigen die reifen Samen der Linien 3 und 6 eine Reduktion des Stickstoffgehaltes (Abb. 20 B), welche für die Linie 9 nicht nachweisbar ist.

Der Kohlenstoffgehalt der transgenen Samen zeigt während der Samenentwicklung keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Kohlenstoffgehalt der Wildtypsamens (Abb. 21A). Ebenfalls ist keine Veränderung im Kohlenstoffgehalt der Samen aller drei asOMT-Linien im Vergleich zu den Wildtypsamens erkennbar, die unter Freilandbedingungen aufwuchsen (Abb. 21B).



**Abb. 20** Gehalt an Stickstoff während der Samenentwicklung (A) und im reifen Samen (B) in den asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

(A) Von vier verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung zwischen 13 – 19 DAF wurden aus 10 Wiederholungen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. (B) Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurde aus 22 Wiederholungen bestimmt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.



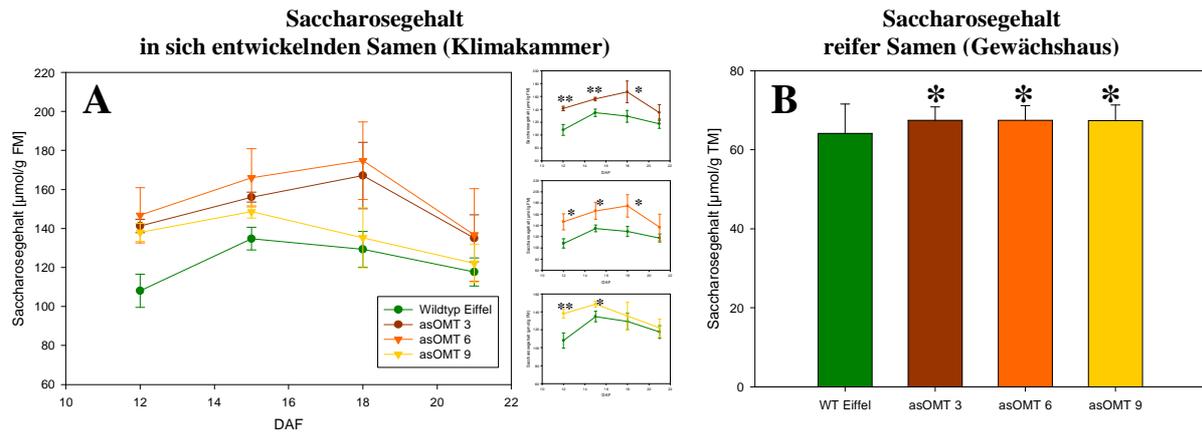
**Abb. 21** Gehalt an Kohlenstoff während der Samenentwicklung (A) und im reifen Samen (B) in den asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

(A) Von vier verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung zwischen 13 – 19 DAF wurden aus 10 Wiederholungen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. (B) Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurde aus 22 Wiederholungen bestimmt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.

### 1.9. Saccharose- und Stärkegehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbсен

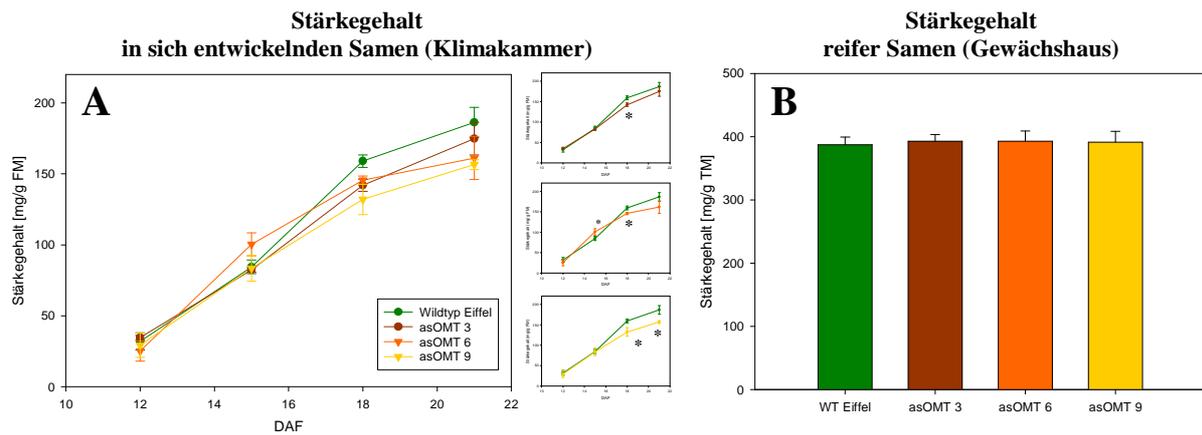
Während der Samenentwicklung ist für den 12. DAF und 15. DAF aller drei asOMT-Linien ein erhöhter Saccharosegehalt gegenüber dem Wildtyp nachweisbar (Abb. 22A). Die Samen der asOMT-Linie 9 haben im späteren Entwicklungsstadium (18 DAF und 21 DAF) keinen erhöhten Gehalt an Saccharose mehr. Für die Samen der Linien 3 und 6 ist am 18. DAF noch ein erhöhter Saccharosegehalt nachweisbar, allerdings am 21. DAF ist keine Veränderung mehr belegbar. Die reifen Samen des Freilandversuches haben in allen drei asOMT-Linien einen erhöhten Saccharosegehalt im Vergleich zu den Wildtypsamen (Abb. 22B).

Der Stärkegehalt ist während der Samenentwicklung in den transgenen asOMT-Linien 3, 6 und 9 kaum verändert (Abb. 23A). Am 18. DAF ist für alle drei Linien eine Reduktion der Stärke im Samen nachweisbar. Diese Veränderung kann für den 21. DAF nur noch für die Samen der asOMT-Linie 9 gezeigt werden. Im frühen Entwicklungsstadium ist nur für die Linie 6 ein erhöhter Samenstärkegehalt belegbar (15 DAF). Die beiden Linien 3 und 9 zeigen am 12. und 15. DAF keine Veränderungen im Stärkegehalt der Samen. In den reifen Samen aller drei transgener asOMT-Linien des Freilandversuches ist keine Veränderung des Stärkegehaltes im Vergleich zum Stärkegehalt der Wildtypsamen nachweisbar (Abb. 23B).



**Abb. 22** Gehalt an Saccharose während der Samenentwicklung (A) und im reifen Samen (B) in den asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

(A) Von vier verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung zwischen 12 – 21 DAF wurden aus 10 Wiederholungen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. (B) Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurde aus 22 Wiederholungen bestimmt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.

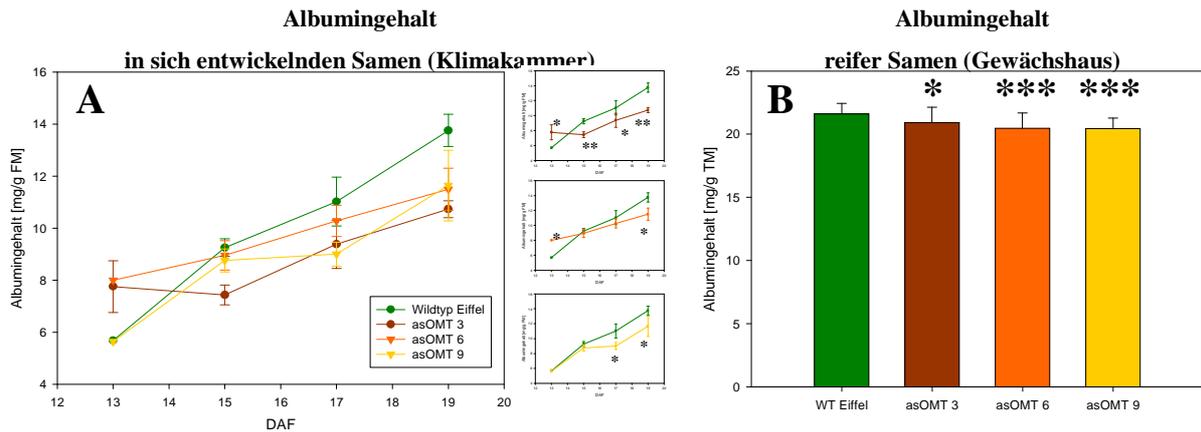


**Abb. 23** Gehalt an Stärke während der Samenentwicklung (A) und im reifen Samen (B) in den asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

(A) Von vier verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung zwischen 12 – 21 DAF wurden aus 10 Wiederholungen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. (B) Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurde aus 22 Wiederholungen bestimmt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.

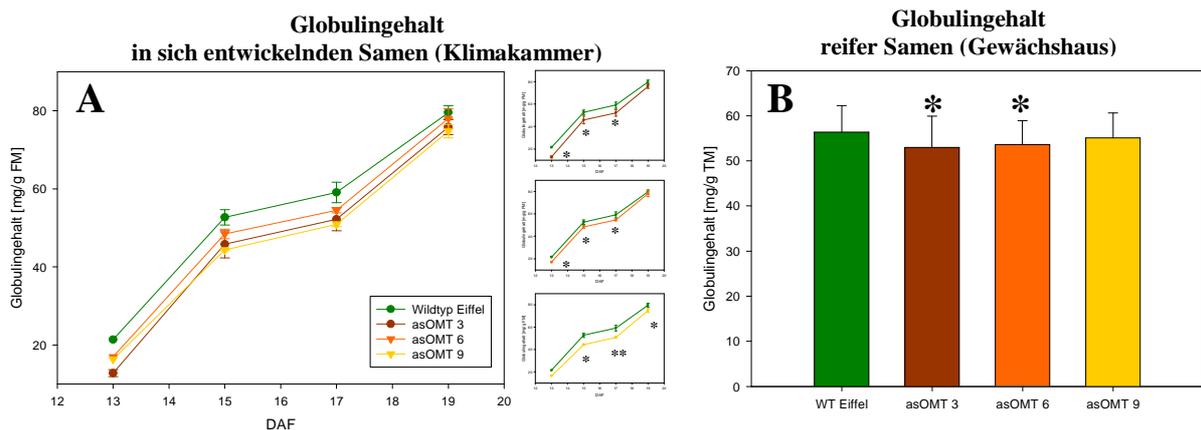
### 1.10. Albumin- und Globulingehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbсен

In der späten Samenentwicklung zeigen die Erbsensamen einen verringerten Gehalt an Albuminen. Ab dem 15. DAF ist diese Verringerung der Albumine signifikant in den Samen



**Abb. 24** Gehalt an Albuminen während der Samenentwicklung (A) und im reifen Samen (B) in den asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

(A) Von vier verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung zwischen 13 – 19 DAF wurden aus 10 Wiederholungen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. (B) Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurde aus 22 Wiederholungen bestimmt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.



**Abb. 25** Gehalt an Globulinen während der Samenentwicklung (A) und im reifen Samen (B) in den asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

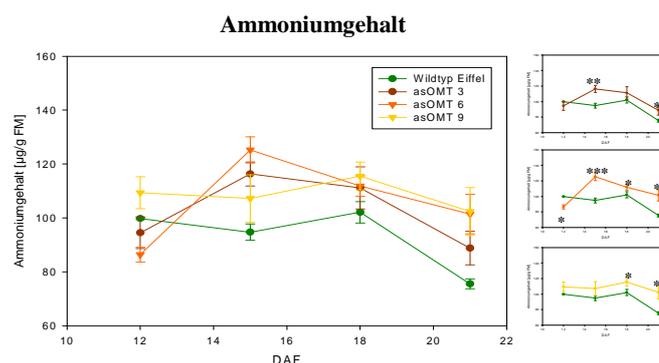
(A) Von vier verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung zwischen 13 – 19 DAF wurden aus 10 Wiederholungen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. (B) Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurde aus 22 Wiederholungen bestimmt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.

der asOMT-Linie 3 nachweisbar (Abb. 24A). Die Samen der Linien 6 und 9 zeigen zu diesem Zeitpunkt keine Veränderung. Diese Reduktion zeigt sich erst ab dem 17. DAF für die Linie 9 und ab dem 19. DAF für die Linie 6. Besonders ausgeprägt ist die Verringerung bei der Linie 3 im späten Entwicklungsstadium der Samen. In der frühen Samenentwicklung (13 DAF) ist für die Linie 3 und 6 ein erhöhter Albumingehalt der Samen gegenüber den Samen des Wildtypes nachweisbar. Aufgrund des geringen Samengewichtes kann es schon bei einem geringen Verlust an Ausgangsmaterial zu erheblichen Abweichungen im Albumingehalt

kommen. Die reifen ausgetrockneten Samen aller drei asOMT-Linien des Freilandversuches enthielten einen signifikant verringerten Albumingehalt im Vergleich zu dem Albumingehalt der Wildtypsamens (Abb. 24B). Dabei ist bei den asOMT-Linien 6 und 9 eine hoch signifikante Reduktion nachweisbar. Die Samen der Linie 3 zeigen eine Verringerung des Albumingehaltes gegenüber dem Wildtyp, allerdings nicht wie bei den anderen beiden Linien. Der Globulingehalt ist während der Samenentwicklung in den asOMT-Linien 3 und 6 ab dem 13. DAF bis 17. DAF im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (Abb. 25A). Am 19. DAF zeigen die beiden Linien keine Veränderungen im Globulingehalt zum Globulingehalt des Wildtypes. Die Samen der asOMT-Linie 9 zeigt diese signifikante Reduktion erst ab dem 15. DAF. Der Globulingehalt ist in dieser Linie auch am 19. DAF nachweisbar verringert. In den reifen abgetrockneten Samen des Freilandversuches ist eine signifikante Reduktion der Globuline in den Linien 3 und 6 nachweisbar (Abb. 25B).

### 1.11. Ammoniumgehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbсен

Während der Samenentwicklung nimmt der Gehalt an Ammonium ab dem 12. DAF bis 21. DAF in den Wildtyppflanzen langsam ab (Abb. 26). Der Ammoniumgehalt der drei transgenen asOMT-Linien ist am 12. DAF kaum unterschiedlich zum Ammoniumgehalt des Wildtypes. Am 15. DAF ist in den Samen der Linien 3 und 6 ein signifikant höherer Ammoniumgehalt nachweisbar. Dieser bleibt in den Samen der beiden Linien bis zum 21. DAF auf erhöhtem Niveau. In der Linie 9 ist diese Erhöhung erst ab dem 15. DAF und 21. DAF nachweisbar.



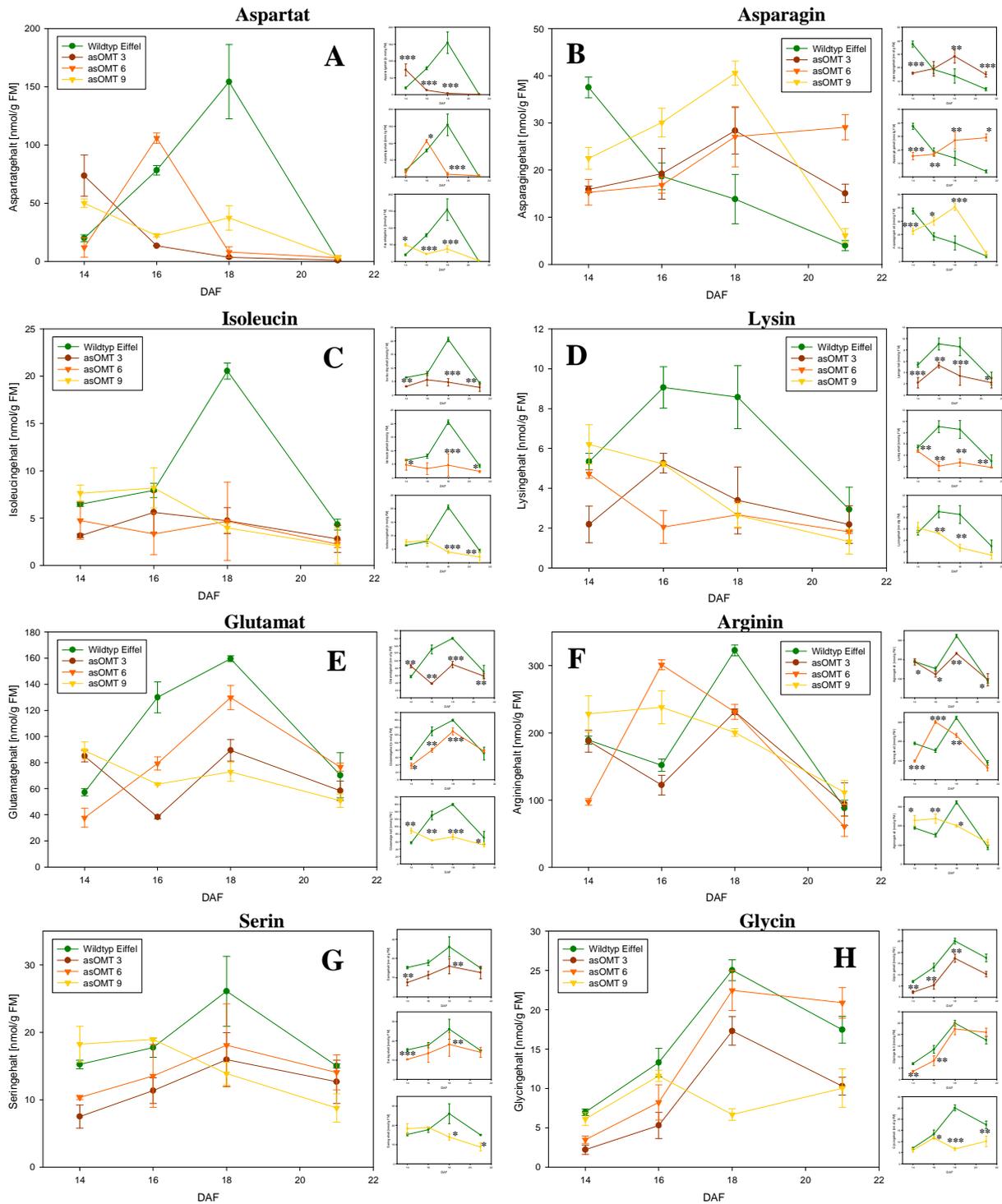
**Abb. 26 Konzentration an Ammonium während der Samenentwicklung** in den asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

Von vier verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung zwischen 12 – 21 DAF wurden aus 10 Wiederholungen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.

## 1.12. Aminosäuregehalt von sich entwickelnden asOMT-Erbсен

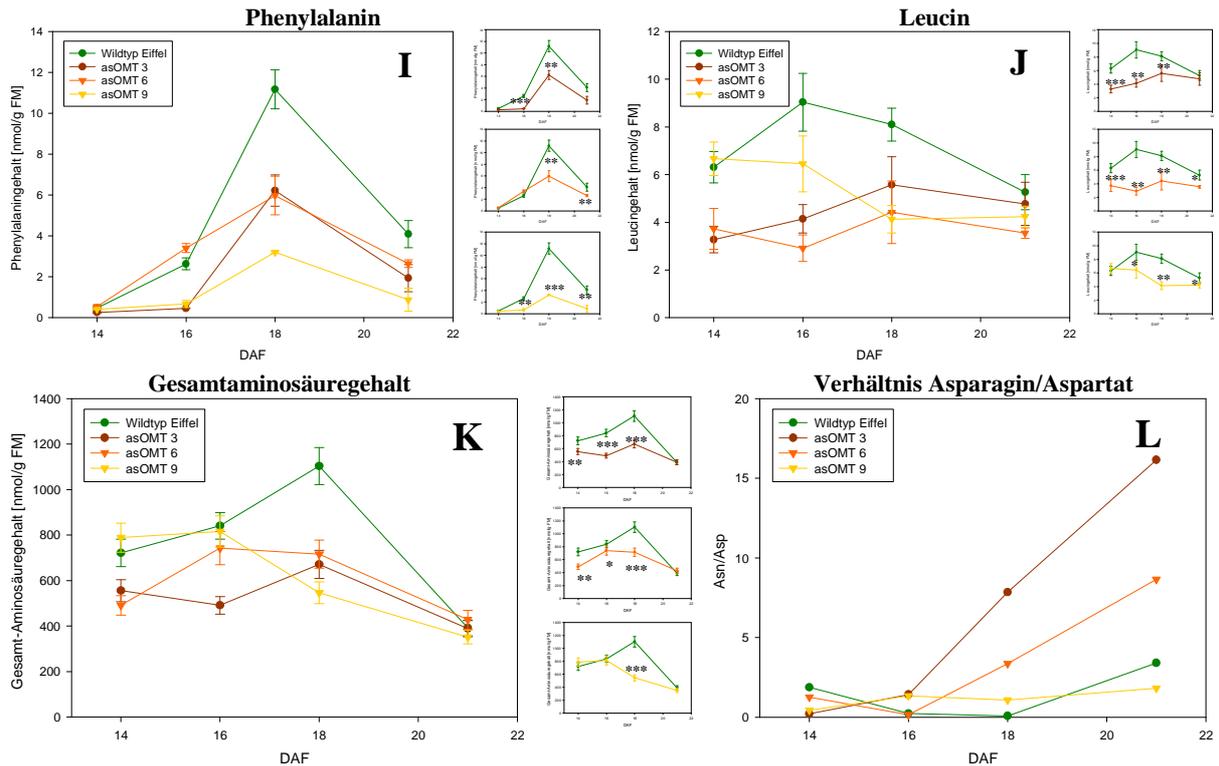
Durch Transaminierung der Carbonsäure Oxalacetat mit Glutamat entsteht Aspartat als Vorstufe für fünf weitere Aminosäuren. Die Reaktion wird vermittelt durch das Enzym Aspartat Aminotransferase. Während der Samenentwicklung (14 – 21 DAF) steigt der Aspartatgehalt im Wildtyp bis zum 18. DAF rapide an (Abb. 27A). Dieser Anstieg ist für die asOMT-Linien 3 und 9 nicht nachweisbar. Die Linie 6 hat einen erhöhten Aspartatgehalt gegenüber dem Wildtyp am 16. DAF, fällt danach ebenfalls stark ab. Durch Amidierung von Aspartat wird Asparagin bildet. In allen drei asOMT-Linien ist am 14. DAF ein geringerer Gehalt nachweisbar (Abb. 27B). Dieses Niveau steigt zum 18. DAF gegenüber dem Wildtyp stark an. In der Samen der asOMT-Linie 9 ist das Asparaginniveau am stärksten ausgeprägt. Im späten Entwicklungsstadium der Samen (21 DAF) bleibt das Niveau für die Linien 3 und 6 gegenüber dem Wildtyp sehr hoch. Aus Aspartat werden weitere Aminosäuren gebildet, wie z. B. Isoleucin und Lysin. Das Isoleucin-Niveau ist in den Samen aller drei asOMT-Linien am 18. DAF gegenüber dem Wildtyp stark reduziert (Abb. 27C). Diese Reduktion ist schon bei den Linie 3 und 6 in der frühen Entwicklungsphase der Samen zu beobachten. Der Lysingehalt ist in den Linien 3 und 6 während der gesamten Entwicklung signifikant reduziert (Abb. 27D). Diese Reduktion ist für die Linie 9 nur für den 15. DAF und 18. DAF nachweisbar.

In einer zweiten Transaminierungsreaktion wird aus 2-Oxoglutarat Glutamat gebildet. In allen drei asOMT-Linien ist ein reduzierter Glutamatgehalt für den 16. DAF und 18. DAF nachweisbar (Abb. 27E). Für die Linien 3 und 9 kann eine Reduktion auch für den 21. DAF gezeigt werden. Diese Linien haben in der frühen Samenentwicklung (14 DAF) einen erhöhten Glutamatgehalt, die asOMT-Linie 6 hingegen einen reduzierten Glutamatgehalt. Aus Glutamat wird über Ornithin und Citrullin die Aminosäure Arginin gebildet. Diese ist im Erbsensamen in einer sehr hohen Konzentration vertreten (Abb. 27F) und dient in Leguminosen als Stickstoffspeicher (Rolletschek *et al.*, 2005). Im Wildtyp ist am 18. DAF eine sehr hohe Konzentration gemessen worden. In den Samen der asOMT-Linien ist das Arginin-Niveau zu diesem Zeitpunkt signifikant um 1/3 reduziert. Am 16. DAF kann für die Samen der Linien 6 und 9 ein erhöhtes Niveau gegenüber den Arginingehalt der Wildtypsamens nachgewiesen werden. Bei den Samen der Linie 9 kann diese Steigerung schon am 14. DAF gezeigt werden.



**Abb. 27** Gehalt ausgewählter Aminosäuren in sich entwickelnden Samen der asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

Von vier verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung zwischen 14 – 21 DAF wurden aus 4 Wiederholungen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.



**Abb. 27** Gehalt von Phenylalanin, Leucin, des Gesamtaminosäurehaushaltes sowie des Asparagin/Aspartat-Verhältnisses in sich entwickelnden Samen der asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

Von vier verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung zwischen 14 – 21 DAF wurden aus 4 Wiederholungen die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.

Während der Photorespiration werden die Aminosäuren Serin und Glycin als Zwischenprodukte gebildet. Für die Samen der Linien 3 und 6 kann vom 14. DAF bis 18. DAF eine Reduktion des Seringehaltes gegenüber dem Seringehalt der Wildtypsamens gezeigt werden (Abb. 27G). Für die Samen der asOMT-Linie 9 ist dieses erst für den 18. DAF und 21. DAF möglich. Der Glycingehalt verhält sich ähnlich (Abb. 27H). In den Samen der Linie 3 und 6 ist eine Reduktion im frühen Entwicklungsstadium nachweisbar (14 und 16 DAF). Für die asOMT-Linie 9 ist ein reduzierter Glycingehalt ab dem 16. DAF zu erkennen.

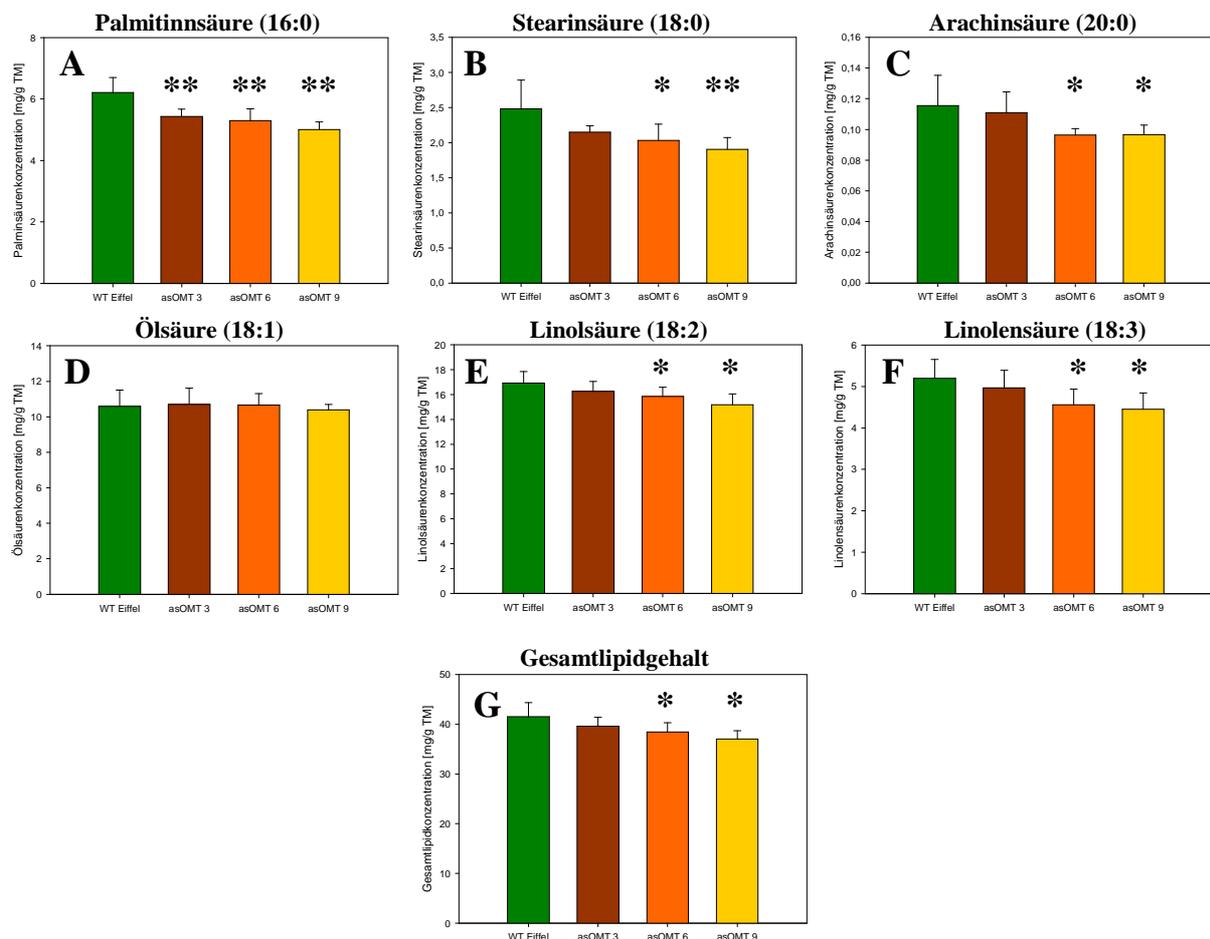
Die aromatischen Aminosäuren werden aus Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat gebildet. Das Phenylalanin ist ein Vertreter dieser Aminosäuren. Während der Entwicklung der Samen nimmt der Gehalt an Phenylalanin bis zum 18. DAF im Wildtyp stark zu (Abb. 27I). Das Niveau von Phenylalanin ist in den Samen der Linien 3 und 6 für 18. DAF auf die Hälfte reduziert, für die Linie 9 sogar auf ein Viertel. Diese Reduktion ist in den asOMT-Linien 3 und 9 kann schon früher nachgewiesen werden (16 DAF).

Ein Vertreter der hydrophoben Aminosäuren ist das Leucin, das über Zwischenstufen aus zwei Molekülen Pyruvat gebildet wird. In den asOMT-Linien 3 und 6 kann ab dem 14. DAF und bis 18. DAF ein geringerer Gehalt nachgewiesen werden (Abb. 27J). Für die Linie 9 ist dies erst ab dem 16. DAF möglich.

Der Gesamtgehalt aller freien Aminosäuren ist in den Samen der Linien 3 und 6 ab 14. DAF bis 18. DAF signifikant reduziert (Abb. 27K). Für die Samen der Linie 9 ist diese Reduktion nur für 18. DAF nachweisbar. Das Verhältnis von Asparagin zu Aspartat weicht in den asOMT-Linien 3 und 6 sehr stark vom Verlauf im Wildtyp ab (Abb. 27L). In der Samen der Linie 9 sind die Verhältnisse sehr ähnlich zum Wildtyp.

### 1.13. Gehalt von Fettsäuren in reifen Samen der asOMT-Erbсен

Mit Hilfe der Methode der sauren Methylierung und anschließender Gaschromatographie



**Abb. 28** Gehalt von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren im reifen Samen in den asOMT-Linien 3, 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp.

Die Mittelwerte sowie die Standardabweichung wurden aus 10 Wiederholungen berechnet und dargestellt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft.

konnte ein Spektrum von Fettsäuren in reifen Erbsensamen identifiziert werden. Die kürzeste gemessene gesättigte Fettsäure ist die Palmitinsäure (16:0). In reifen Samen aller drei asOMT-Linien konnte ein signifikant reduzierter Gehalt nachgewiesen werden (Abb. 28A). Diese Reduktion lässt sich für die Linien 6 und 9 auch für die Stearinsäure (18:0) und Arachinsäure (20:0) nachweisen (Abb. 28B, C). Bei den ungesättigten Fettsäuren zeigt sich ebenfalls eine Reduktion. Hierbei kann für die Gehalte von Linol- und Linolensäure eine Reduktion in den reifen Samen der Linien 6 und 9 festgestellt werden (Abb. 28E, F). Die Samen der asOMT-Linie 3 zeigen bei den ungesättigten Fettsäuren keine Veränderungen (Abb. 28D, E, F). Der Gesamtlipid-Gehalt der Samen ist signifikant in den Linien 6 und 9 reduziert (Abb. 28G).

#### 1.14. Veränderter Gehalt an organischen Säuren in sich entwickelnden Samen von asOMT-Erbsen

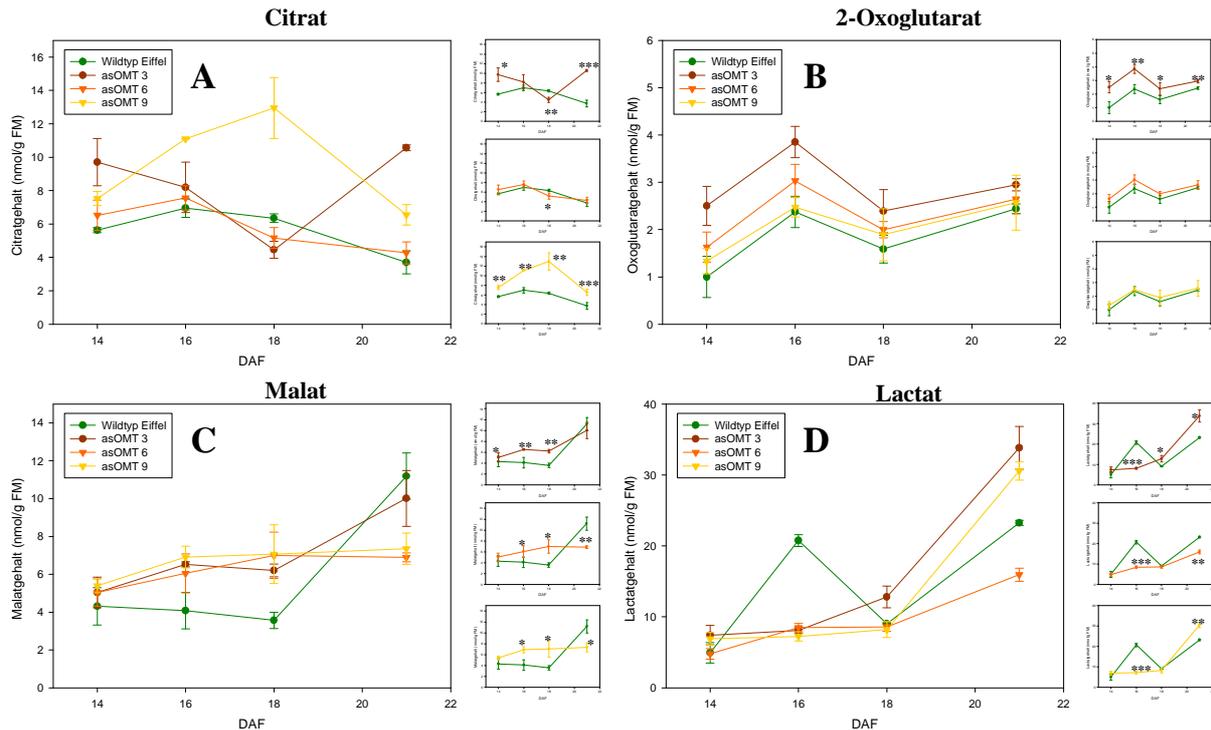
Bei der Messung der organischen Säuren mittels Ionenchromatographie wurde von vier Entwicklungsstadien (14, 16, 18 und 21 DAF) der Gehalt von vier Carbonsäure-Anionen (Citrat, 2-Oxoglutarat, Malat, Lactat) bestimmt.

Während der Samenentwicklung nimmt der Citratgehalt im Wildtyp ab dem 18. DAF stetig ab (Abb. 29A). Ein ähnliches Verhalten zeigt die asOMT-Linie 6. In der Linie 9 ist der Gehalt an Citrat für alle vier Messpunkte signifikant erhöht. Im frühen (14 DAF) und späten Entwicklungsstadium (21 DAF) zeigen die Samen der Linie 3 ebenfalls einen erhöhten Citratgehalt. Im mittleren Stadium (18 DAF) weist diese asOMT-Linie einen reduzierten Gehalt an Citrat auf.

Der Gehalt an 2-Oxoglutarat nimmt während der Samenentwicklung im Wildtyp zu (Abb. 29B). In der asOMT-Linie 3 ist der 2-Oxoglutaratgehalt signifikant erhöht. Die Samen der Linien 6 und 9 zeigen eine Tendenz zu erhöhten Gehalten. Allerdings sind diese Messwerte von denen des Wildtyps nicht signifikant verschieden.

Der Malatgehalt ist in Samen aller asOMT-Linien im mittleren Stadium (16 und 18 DAF) signifikant höher als im Samen des Wildtyps (Abb. 29C). Bei der Linie 3 ist die Erhöhung am stärksten ausgeprägt und zeigt sich bereits in der frühen Entwicklungsphase. Am 21. DAF entspricht der Malatgehalt der Samen der asOMT-Linie 3 dem des Wildtyps. Die Linien 6 und 9 zeigen in diesem Stadium einen geringeren Gehalt als der Wildtyp.

Lactat ist nicht Bestandteil des Tricarbonsäurezyklus, sondern ein Fermentationsprodukt des Pyruvats. Die Samen der asOMT-Linien zeigen während der Entwicklung eine stetige Zunahme an Lactat (Abb. 29D). Diese Zunahme ist in den Linien 3 und 9 im späten Stadium



**Abb. 29** Gehalte an vier organischen Säuren in sich entwickelnden Samen der asOMT-Linien 3, 6 und 9 und des Wildtyps.

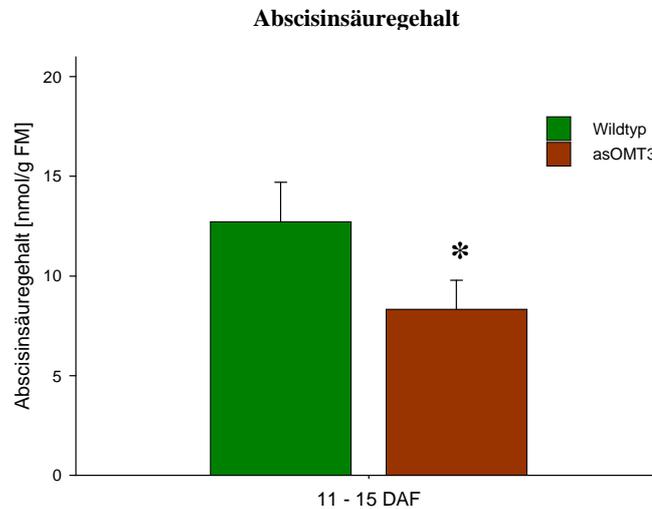
Von vier verschiedenen Zeitpunkten (14, 16, 18 und 21 DAF) sind die errechneten Mittelwerte aus vier Wiederholungen sowie der Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.

am stärksten gegenüber dem Wildtyp ausgeprägt. Während der Entwicklung der Samen wurde am 16. DAF eine hoch signifikante Reduzierung des Malatgehaltes in den asOMT-Samen gegenüber den Wildtypsamen beobachtet. Dieser Ausreißer könnte auf einen methodischen Fehler beruhen.

### 1.15. Gehalte an Abscisinsäure von asOMT-Erbсен der Linie 3

Um zu überprüfen, ob der reduzierte Proteingehalt und Aminosäuregehalt sich auch auf regulatorischer Ebene auswirkt, wurde der Gehalt an Abscisinsäure bestimmt. Die Gehalte an Abscisinsäure wurden in drei Stadien der frühen Samenentwicklung (11, 13 und 15 DAF) bestimmt. Allerdings konnten je Stadium nur eine bzw. zwei biologische Wiederholungen durchgeführt werden. Um eine statisch relevante Aussage treffen zu können, wurden alle Messwerte der drei Entwicklungsstadien des Wildtypes und der asOMT-Linie 3 zusammengefasst und ausgewertet.

In der Abbildung 30 ist erkennbar, dass in sich entwickelnden Samen der Erbse vom 11 bis zum 15 DAF ein signifikant reduzierter Gehalt an Abscisinsäure im Vergleich zum Wildtyp vorhanden ist. Dieser ist im Durchschnitt um 35 % geringer als bei Wildtyppflanzen.



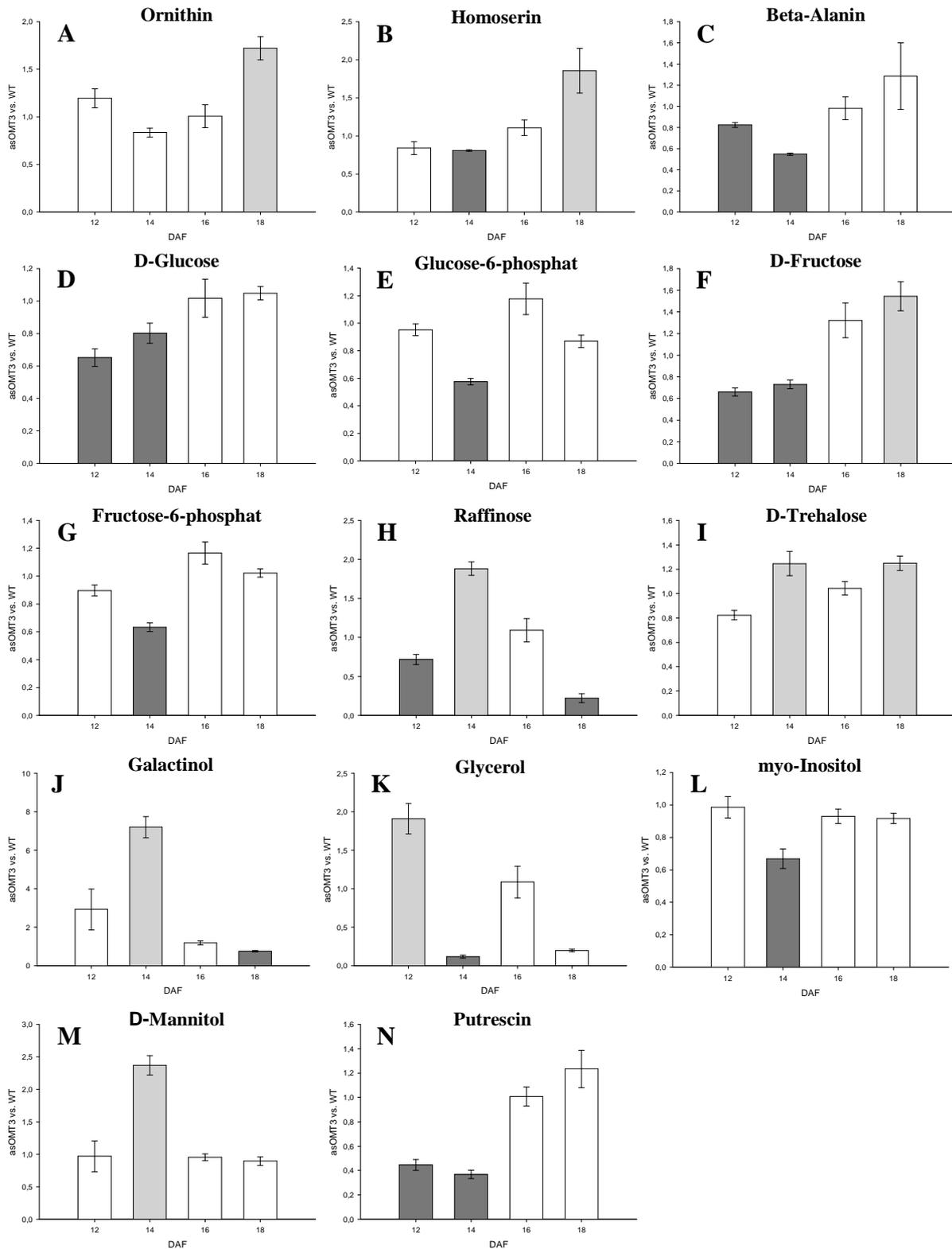
**Abb. 30** Gehalte an Abscisinsäure in der frühen Entwicklung der asOMT-Samen der Linie 3 und des Wildtyps.

Von drei verschiedenen Zeitpunkten (11, 13, 15 DAF) wurde die Konzentration an Abscisinsäure bestimmt. Aus diesen Messwerten wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung errechnet und dargestellt. Die Signifikanz wurde durch eine statistische Analyse überprüft.

### 1.16. Metabolitanalyse von asOMT-Erbse der Linie 3

Die Analyse der Metabolite durch Gaschromatographie-Massenspektroskopie wurde am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm durchgeführt. Hierfür wurden vier Entwicklungsstadien (12, 14, 16 und 18 DAF) mit je sechs Wiederholungen verwendet. Bei den Messungen erfolgte keine Quantifizierung der Menge des jeweiligen Metaboliten, sondern es wurde der Gehalt bezogen auf das Gewicht ermittelt und zwischen transgener asOMT-Erbse und Wildtyp-Erbse verglichen. In der Auswertung wurde der Signalwert des Wildtyps gleich eins gesetzt und der Wert der transgenen Probe damit verglichen.

Von der Metabolitanalyse erhält man Aussagen über den Gehalt an Aminosäuren und organischen Säuren sowie Fettsäuren. Diese Metabolite wurde bereits quantitativ mit Hilfe anderer Methoden am IPK bestimmt. Die Ergebnisse aus der GC-MS-Messung für die Aminosäuren, organische Säuren und Fettsäuren sind im Anhang dargestellt. Zusätzliche Metabolite werden hier noch gezeigt und besprochen.



**Abb. 31** Relative Veränderungen von ausgewählten Metaboliten in asOMT3-Erbse im Vergleich zum Wildtyp.

Vier Entwicklungsstadien mit je sechs Wiederholungen der asOMT3-Linie wurden mittels GC-MS analysiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ausgewählter Metabolite sind als relative Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Als Signifikanztest wurde der Student-Test durchgeführt. Ein signifikant erhöhter Gehalt ist mit hellgrau unterlegt, ein signifikant reduzierter Gehalt ist mit dunkelgrau unterlegt ( $P < 0,05$ ).

Durch Kondensation der sekundäre Aminosäure Ornithin mit einem aktiviertem Kohlensäureamid entsteht über die Zwischenstufe Citrullin die primäre Aminosäure Arginin. Am 12, 14 und 16 DAF ist keine Veränderung im Ornithingehalt der asOMT-Erbesen gegenüber dem Wildtyp erkennbar (Abb. 31A). Erst am 18. DAF ist der Gehalt an Ornithin signifikant erhöht. Für die Threoninsynthese muss ein Aspartat-Semialdehyd zu Homoserin reduziert werden. Am 12. und 14. DAF ist ein geringerer Gehalt an Homoserin in den asOMT-Erbesen vorhanden (Abb. 31B). Für den 14. DAF ist dieser Wert signifikant verringert, am 12. DAF ist eine Tendenz erkennbar. Der Homoseringehalt steigt danach an. Am 18. DAF ist dieser deutlich erhöht. Die Aminosäure Beta-Alanin ist Bestandteil der Pantothersäure (Vitamin B5), welche am Aufbau des Coenzym A beteiligt ist. Am 12. und 14. DAF ist Beta-Alanin in den asOMT-Erbesen signifikant gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 31C). In der späteren Entwicklungsphase steigt der Gehalt an.

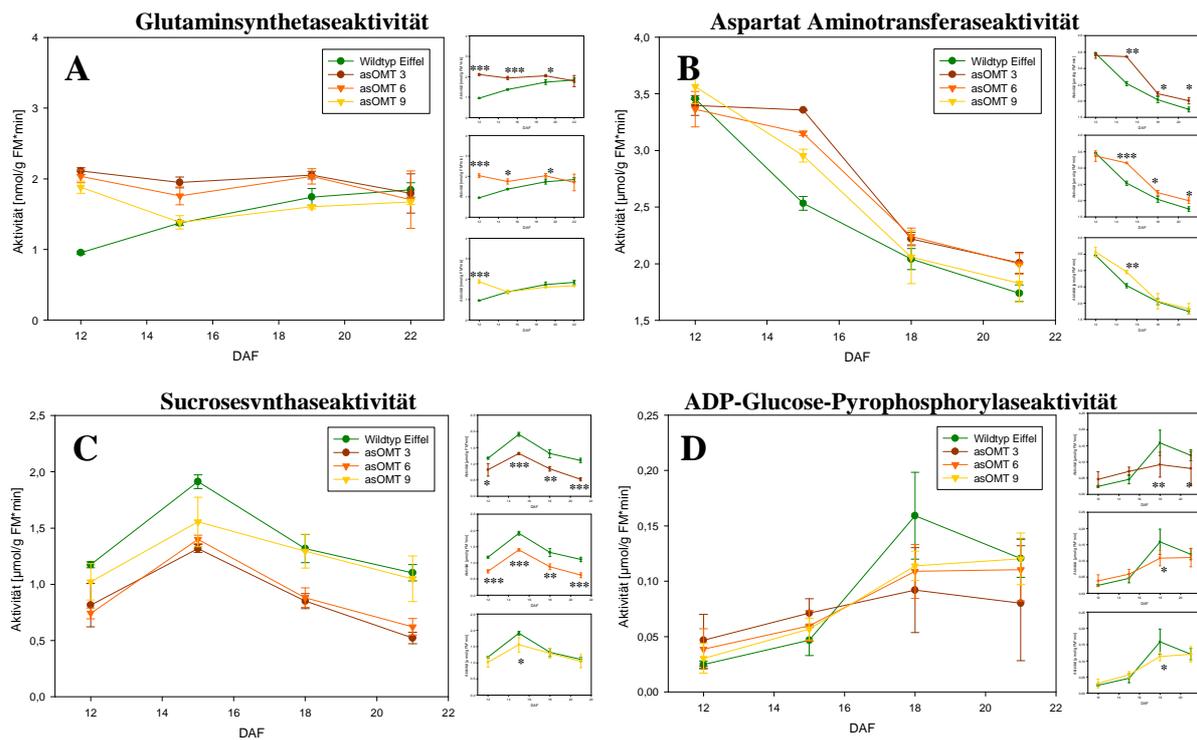
Die ersten Schritte der Glykolyse sind die Phosphorylierung von Glucose und die Umwandlung zu Fructose-6-Phosphat. Die Kohlenhydrate D-Glucose und D-Fructose sind an den 12. und 14. DAF in den asOMT-Erbesen gegenüber dem Wildtyp signifikant reduziert (Abb. 31D, F). Diese Reduktion ist bei den phosphorylierten Formen Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat nur für 14. DAF nachweisbar (Abb. 31E, G). Am 18. DAF ist nur für die D-Fructose ein erhöhter Gehalt im Samen feststellbar. Das Trisaccharid Raffinose besteht aus Glucose, Fructose und Galactose und wird in der Pflanze auch als Speicherkohlenhydrat verwendet. In der frühen (12 DAF) und in der späten Entwicklungsphase (18 DAF) der Samen ist der Raffinosegehalt signifikant im transgenen Ansatz im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 31H). Am 14. DAF ist jedoch ein erhöhter Level nachweisbar. Für das Disaccharid D-Trehalose kann man in der späteren Entwicklung (14 – 18 DAF) der asOMT-Erbesen einen erhöhten Gehalt nachweisen (Abb. 31I). Dies ist für 14. und 18. DAF signifikant erhöht.

Durch Transfer eines Galactosylrestes von Galactinol auf Saccharose entsteht Raffinose und myo-Inositol. Am 14. DAF ist ein extrem erhöhter Galactinolgehalt nachweisbar (Abb. 31J). Dieser nimmt rapide ab, bis der Galactinolgehalt am 18. DAF signifikant reduziert ist. Das myo-Inositol ist die strukturelle Basis für verschiedene sekundäre Messenger und ist nur am 14. DAF signifikant reduziert (Abb. 31K). Im frühen Stadium (14 DAF) der asOMT-Erbesen ist ein signifikant erhöhter Glycerolgehalt im Vergleich zum Glycerolgehalt des Wildtypes vorhanden. Dieser sinkt rapide in der weiteren Entwicklung ab (Abb. 31L). Am 16. DAF ist schon ein reduzierter Gehalt nachweisbar. Mannitol entsteht durch Hydrierung von Fructose.

In den asOMT-Samen ist am 14. DAF ein erhöhter Gehalt nachweisbar (Abb. 31M). Der Mannitolgehalt ist in den anderen Stadien unverändert. Im Katabolismus entsteht durch Decarboxylierung von Ornithin das Putrescin, ein biogenes Amin. Am 12. und 14. DAF ist ein signifikant reduzierter Putrescingehalt nachweisbar (Abb. 31N).

### 1.17. Aktivitäten ausgewählter Enzyme in sich entwickelnden asOMT-Samen

Das wichtigste regulatorische Enzym des GS/GOGAT-Zyklus ist die Glutamin-Synthetase (GS). Während der Entwicklung von Wildtyp-Samen der Erbse nimmt die Aktivität langsam und stetig zu. In allen drei asOMT-Linien konnte im frühesten Entwicklungsstadium eine erhöhte Aktivität gemessen werden (Abb. 32A). Diese Aktivitätserhöhung ist ebenfalls in den Linien 3 und 6 für 15. und 18. DAF nachzuweisen. In Samen der Linie 9 entspricht die GS-Aktivität ab dem 15. DAF der der Wildtyp-Samen. Im späten Stadium (21 DAF) ist in den



**Abb. 32 Enzymaktivitäten in sich entwickelnden Samen der asOMT-Linien 3, 6 und 9 und des Wildtyps.**

Von vier verschiedenen Zeitpunkten 12,15,19 und 21 DAF sind die errechneten Mittelwerte aus vier Wiederholungen sowie die Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Messwerte wurde durch eine statistische Analyse überprüft (siehe Material und Methoden). Die Signifikanzen der Messwerte der drei asOMT-Linien sind als kleine Abbildungen neben der Hauptabbildung dargestellt.

Samen der asOMT-Linien keine Veränderung der GS-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar.

Die Aspartat-Aminotransferase (ASAT) ist eines von drei Transaminierungsenzymen. Die Samen aller drei asOMT-Linien zeigen am 15. DAF eine erhöhte ASAT-Aktivität (Abb. 32B). Diese Erhöhung ist für 18. und 21. DAF in den Linien 3 und 6 weiter nachweisbar, aber wesentlich geringer ausgeprägt. Im frühen Entwicklungsstadium zeigen alle drei Linien keine Unterschiede zum Wildtyp.

Ein Schlüsselenzym im C/N-Metabolismus ist die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC). Dieses Enzym bildet Oxalacetat durch Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat. Oxalacetat stellt das Grundgerüst für die aus Aspartat gebildeten Aminosäuren zur Verfügung. In den sich entwickelnden Samen der asOMT-Linien konnte im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Aktivität der PEPC festgestellt werden.

Die Saccharosesynthase und die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGP, EC 2.7.7.27) sind wichtige Enzyme in der Stärkebiosynthese. Die Samen der asOMT-Linien 3 und 6 zeigen eine signifikant geringere Aktivität der Saccharosesynthase während der gesamten Entwicklung (Abb. 32C) im Vergleich zu den Wildtypsamen. Für die Linie 9 ist diese Reduktion nur für den 15. DAF nachweisbar.

Die Aktivität der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase ist in der frühen Entwicklungsphase (12. und 15. DAF) der asOMT-Samen nicht signifikant gegenüber dem Wildtyp verändert (Abb. 32D). Ab dem 18. DAF ist eine Aktivitätssteigerung im Wildtyp nachweisbar, jedoch in allen drei Linien nur in geringem Maße. Für den 21. DAF sind keine Veränderungen der AGPase-Aktivität der Linien 6 und 9 im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. In der Linie 3 ist die Aktivität reduziert.

## IV. Diskussion

Die plastidären Translokatoren spielen im zellulären Metabolismus eine entscheidende Rolle. Diese Transmembranproteine vermitteln die Verbindung der cytosolischen Biosynthesewege mit den plastidären Stoffwechselwegen, wie z.B. der Aminosäurebiosynthese. Im vegetativen Gewebe wurden schon eine Vielzahl von Translokatoren und deren Bedeutung für die Pflanzenzelle näher untersucht.

Das Anliegen dieser Arbeit war es, die Bedeutung von plastidären Translokatoren in generativem Gewebe zu charakterisieren. Aufgrund der Größe der Samen wurde als Modellpflanze *Pisum sativum* ausgewählt. Für den in verschiedenen anderen Pflanzenspezies gut untersuchten 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator wurden transgene Modelle generiert, in denen dieser reprimiert bzw. überexprimiert werden sollte. Der begrenzte Zeitrahmen dieser Arbeit erlaubte es nur, ein transgenes Modell molekular sowie biochemisch zu untersuchen. Die generierten homozygoten Linien für die Repression des OMTs zeigten einen markanten Phänotyp, wobei die asOMT-Linien 3, 6 und 9 für weitere Analysen ausgewählt wurden. Für das Überexpressionskonstrukt des OMTs wurden zwei samenspezifische Promotoren verwendet. Aus den transformierten Erbsenpflanzen konnten drei homozygote Linien mit dem USP-Promotor sowie vier homozygote Linie mit dem LeguminB4-Promotor generiert werden. Diese Linien stehen für weitere Arbeiten der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

Ausgehend von einer EST-Kollektion von *Pisum sativum* wurde mit Hilfe einer  $\lambda$ ZAP Express-Phagen-cDNA-Bank die OMT-Sequenz in 5'-Richtung weiter verlängert. Die cDNA-Sequenz ist nicht komplett. Es fehlen wahrscheinlich für die gesamte cDNA zwischen 230 bp und 260 bp. Unter Verwendung eines Vorhersage-Programmes konnten Transmembranhelices identifiziert werden, deren Verteilung starke Ähnlichkeit mit den OMTs von Arabidopsis und Spinat haben. Das fehlende plastidäre Lokalisierungssignal kann möglicherweise auf die fehlende 5'-Sequenz zurückzuführen sein.

Von einem weiteren plastidären Translokator, dem Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT), wurden mit Hilfe eines Überexpressionskonstruktes homozygote Erbsenlinien generiert, die nicht weiter molekular und biochemisch untersucht werden konnten. Für die Überexpressionskonstrukte kamen ebenfalls der samenspezifische USP und LeguminB4-Promtor zum Einsatz. Diese Linien können für weitere Arbeiten verwendet werden.

## 1. Alle drei asOMT-Linien zeigen eine samenspezifische Repression des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators

Die mit dem LeB4/asPsOMT-Konstrukt transformierten Erbsenpflanzen wurden mittels PCR- und Southernblot-Analyse auf das Vorhandensein der Expressionskassette getestet. Durch die Southern-Analyse wurde festgestellt, dass in den asOMT-Linien 3, 6 und 9 je eine Kopie der LeB4/asPsOMT-Expressionskassette in das Genom integriert wurde. Durch Verwendung der Restriktionsenzyme *Hind*III und *Xho*I zur Spaltung der genomischen DNA konnte gezeigt werden, dass die drei asOMT-Linien auf unabhängige Transformationsereignisse zurückzuführen sind.

Transkriptanalysen des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators in verschiedenen *sink*- und *source*-Gewebe von nicht transformierten (Wildtyp) Erbsenpflanzen zeigten, dass der Transporter vorwiegend in Wurzel, Blüte sowie in sich entwickelnden Erbsenembryonen exprimiert wird (Promotionsarbeit Ha Thuy Nguyen, 2008). Hingegen konnte in der Samenschale kaum Expression nachgewiesen werden. In *sink*- und *source*-Blättern sowie in Stängel und Hülse wurde ebenfalls OMT-mRNA durch RNA-Gelblot-Analyse nachgewiesen. Der Glutamat/Malat-Translokator (DiT2), der zweite plastidäre Dicarboxylattransporter, wird sehr stark in der Blüte exprimiert, hingegen nur sehr schwach in sich entwickelnden Erbsensamen oder anderen Geweben. Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator ist für die Samenentwicklung der Erbse von entscheidender Bedeutung. In Mais konnte eine sehr hohe OMT-Expression in den Kolben umgebenen Blättern nachgewiesen werden (Taniguchi *et al.*, 2004). In *Arabidopsis* war eine starke Expression in der Schote nachweisbar (Taniguchi *et al.*, 2002). Dies weist darauf hin, dass in Pflanzenorganen, die die Samen unmittelbar mit Metabolite versorgen, der OMT sehr benötigt wird.

Sich entwickelnde Samen aller drei asOMT-Linien wurden am 15. DAF mittels quantitativer *real-time* PCR auf die OMT-Transkriptmenge getestet. Die Analyse ergab, dass die OMT-Transkriptmenge auf 43 % (Linie 6), 52 % (Linie 3) und 66 % (Linie 9) im Vergleich zum Wildtyp verringert ist. Dieses Ergebnis beweist die Reduktion der OMT-mRNA-Menge in den antisense-Samen und damit die Aktivität des antisense-Konstruktes. Somit ist es möglich mit nur einem kurzen Fragment des 3'-Endes der OMT-cDNA einen antisense-Effekt samenspezifisch zu erzeugen. In Tabakpflanzen wurde diese antisense-Inhibierung unter Verwendung der gesamten *Nt*OMT-cDNA sowie des 35S-Promotors generiert (Schneidereit *et al.*, 2006).

Für die asOMT-Linien 3 und 6 wurde die Transportaktivität des OMTs unter Verwendung künstlicher Proteoliposomen bestimmt. Bei der Messung der Transportraten wurde im Wildtyp ein Verhältnis der Transportrate von Malat zu 2-Oxoglutarat von 2:1 ermittelt. Das entspricht dem Transportratenverhältnis der Dicarboxylat-Translokatoren, das an Blattchloroplasten aus *Spinacea oleracea* gemessen wurde (Flügge *et al.*, 1994). Somit sind die Transportraten der Blattchloroplasten und der Plastiden der Erbsensamen vergleichbar. In den Samen der beiden asOMT-Linien zeigt die relative Transportrate für Malat eine Reduktion auf 54 % (Linie 3) bzw. 28 % (Linie 6) im Vergleich zum Wildtyp. Ebenfalls ist der 2-Oxoglutarat-Transport in den beiden transgenen asOMT-Linien verringert (50 % in Linie 3, 21 % in Linie 6). Diese Ergebnisse korrelieren mit den reduzierten OMT-Transkriptmengen. Die asOMT-Linie 6 zeigt die stärkste Reduktion der Transkriptmenge und auch die stärkste Reduktion der Transportaktivität. Für die Transportraten der Linie 9 konnten keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden, ein Ergebnis, das mit der geringen as-Reduktion der Transkriptmenge und der schwachen Ausprägung des Phänotyps (siehe unten) korreliert.

## 2. Die samenspezifische OMT-Inhibierung hat Einfluss auf die Samenentwicklung und das Pflanzenwachstum

Bei der parallelen Anzucht von asOMT- und Wildtyp-Erbsepflanzen in Klimakammern und unter Glas in natürlichem Boden zeigten die transgenen Pflanzen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Bis zur Blüte der Pflanzen waren die transgenen Erbsen genauso groß wie die Wildtyp-Pflanzen. Mit Beginn der Samenentwicklung prägten sich Größenunterschiede aus (asOMT-Erbsepflanzen größer als der Wildtyp). Die Höhendifferenz verstärkte sich während der weiteren Entwicklung und betrug im Stadium der Samenreife bis zu 10 cm. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei transgenen *Vicia narbonensis*-Pflanzen beobachtet, in denen durch antisense-Inhibierung das Gen *VnGPT1* im Samen reprimiert wurde (Rolletschek *et al.*, 2007). In beiden Fällen hat die antisense-Inhibierung eines plastidären Transportproteins offensichtlich ähnliche Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum.

Die Veränderung der Wuchshöhe korreliert mit einem geringeren Samengewicht der asOMT-Erbsen, die ab dem 13. (Linie 3) bzw. 14. DAF (Linie 6) signifikant nachweisbar ist (Abb. 16B). Durch quantitative *real-time* PCR konnte gezeigt werden, dass ab dem 15. DAF eine Reduktion der OMT-Transkriptmenge nachweisbar ist. Der Beginn der Promotoraktivität in

*Vicia faba*-Samen (10. – 12. DAF, Bäumlein *et al.*, 1992) sowie die beginnende Reduktion der OMT-Transkriptmenge stehen im Einklang mit dem Beginn der Reduktion der Samengewichte. Die stärkste Reduktion von OMT-Transkriptmenge und Transportaktivität waren für die asOMT-Linie 6 nachweisbar. Die stärkste Gewichtsreduktion der Samen wäre somit bei der Linie 6 zu erwarten, was allerdings nur bedingt zutrifft. Die reifen, trockenen Samen von Linie 3 und 6 zeigten im Gewächshausversuch ähnliche Samengewichte. Während der Entwicklung haben die Samen der Linie 3 die größte Gewichtsreduktion im Vergleich zum Wildtyp. Die asOMT-Linie 9, welche sich phänotypisch am wenigsten vom Wildtyp unterschied, zeigte sowohl in der Klimakammer als auch unter Glas wie erwartet die geringste Gewichtsreduktion. Offensichtlich hat ab einem bestimmten Schwellenwert die weitere Reduktion der OMT-Transkriptmengen wenig oder keinen Einfluss auf das Samengewicht. Ob und welche OMT-Transkriptmengen zum Überleben des Samens notwendig sind, ist unbekannt.

Die Größe der asOMT-Pflanzen und ihr geringeres Samengewicht deuten darauf hin, dass die verringerte *sink*-Stärke möglicherweise zu einer besseren Versorgung des Sprossmeristems mit Assimilaten führen könnte, Grund für höhere Zellteilungsraten und positive Einflüsse auf das Pflanzenwachstum. Eine Messung von Metabolitflüssen innerhalb der Pflanze und deren Veränderung in den asOMT-Pflanzen wurden nicht durchgeführt, um diese Vermutung zu bestätigen. Ein Wachstum in der Klimakammer bei erhöhter Temperatur (23 °C) während der Tagphase verstärkt sowohl den Einfluss auf die Wuchshöhe als auch auf die Reduktion des Samengewichts. Diese Beobachtung lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass der Effekt der Repression des OMTs sich bei erhöhter Temperatur stärker auf die Metabolitflüsse auswirkt als bei normaler Wachstumstemperatur. Dies ist ein indirekter Nachweis für die Veränderung der Metabolitflüsse.

### 3. Die OMT-Inhibierung bewirkt eine Veränderung der Samen-Inhaltsstoffe

Die Samen von Leguminosen bestehen zu 40 bis 50 % aus Speicherproteinen. Die Hauptspeicherproteinklasse in Hülsenfrüchten sind die Globuline (75 % der gesamten Speicherproteine der Ackerbohne sind Globuline), wobei das Legumin ein Vertreter dieser Reserveproteinklasse ist. Die reduzierten Samengewichte lassen vermuten, dass der Gehalt an Speicherproteinen vermindert ist. Die Gehalte an Globulinen sowie an Albuminen zeigen eine nachweisbare Reduktion und bestätigen somit die Vermutung. Die Repression des OMT-

Genes beeinflusst demzufolge den Stickstoff-Metabolismus und in Verbindung damit die Menge der stickstoffhaltigen Metabolite, eine Vermutung, die durch die Verringerung des Gesamtstickstoffgehalt von sich entwickelnden Samen (Abb. 20A) und reifen Samen (Abb. 20B) unterstützt wird.

Auch auf transkriptioneller Ebene sind die Reserveproteine verändert. Die Transkriptmenge der Albumine ist vermindert, hingegen ist die der Globuline deutlich erhöht. Aufgrund der verringerten Aminosäurebiosynthese können die erhöhten Transkriptmengen der Globuline nicht translatiert werden, was einen verringerten Globulingehalt zur Folge hat. Diese Daten deuten auf eine unterschiedliche Regulation der Albumine und Globuline hin. Durch Generierung von Mutanten der prozessierenden Enzyme konnte in Samen von *Arabidopsis thaliana* eine Regulation der 12 S Globuline auf translationaler Ebene nachgewiesen werden (Shimada *et al.*, 2003).

Der Stärkegehalt zeigt während der Samenentwicklung nur geringe Unterschiede zwischen transgenen Linien und Wildtyp (nur am 18. DAF). In reifen Samen ist keine Veränderung des Stärkegehalts nachweisbar. Der Gehalt an Saccharose ist sowohl in sich entwickelnden als auch in reifen Samen erhöht. Offensichtlich korreliert der verringerte plastidäre 2-Oxoglutarat-Import vermutlich mit einem reduzierten Saccharose-Abbau durch die Glykolyse, was eine Akkumulation von Saccharose zur Folge hat. Ähnliche Effekte zeigen Erbsensamen, bei denen die ADP-Glucose Pyrophosphorylase durch RNAi inhibiert wurde (Weigelt *et al.*, 2009). Die ADP-Glucose Pyrophosphorylase ist das Schlüsselenzym in der Stärkebiosynthese und für den Kohlenstoffmetabolismus von entscheidender Bedeutung (Tetlow *et al.*, 2004). Mutanten mit Defekten in der Stärkebiosynthese akkumulieren oft Saccharose und zeigen Veränderungen im Gehalt der Speicherproteine (Casey *et al.*, 1998).

Die Analyse der asOMT3-Samen auf histologischer Ebene zeigte sowohl im Lichtmikroskop als auch im Transmissionselektronenmikroskop keine Veränderungen der Anzahl oder Morphologie der Proteinkörper. Der Farbstoff Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und Proteine unspezifisch anfärbt (Kang *et al.*, 2002). Daher ist es schwierig bei einer Veränderung des Globulingehaltes um ca. 20% eine sichtbare Reduktion nachzuweisen. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie bilden sich Fixierungsartefakte, die auf die Stärke der Kontrastierung Einfluss nehmen (persönliche Mitteilung Dr. Rutten, AG Strukturelle Zellbiologie). Eine Dekondensierung der Proteinkörper in Folge der Proteinreduktion ist aufgrund der verwendeten Kontrastierungsmittel nicht nachweisbar, da alle Proteinkörper gleich angefärbt werden. Um Unterschiede nachweisen zu können, müssten die Zahl der

Proteinkörper statistisch ausgewertet werden, indem man die Anzahl und die Größe für die gleichen Gewebeareale bestimmt. Eine weitere Möglichkeit wäre die Anwendung von Immunoassays.

#### 4. Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator kontrolliert die Biosynthese der Aminosäuren

Die Biosynthese von Aminosäuren erfolgt in pflanzlichen Zellen hauptsächlich in Chloroplasten (Slocum, 2005; Azevedo *et al.*, 2006). Im plastidären GS/GOGAT-Zyklus (Hirel and Lea, 2001) erfolgt die Aminierung des Kohlenstoffgerüsts 2-Oxoglutarat durch Ammonium unter Bildung der Aminosäure Glutamat. Aus dieser Aminosäure gehen alle weiteren Aminosäuren hervor, indem die Aminogruppe durch Aminotransferasen auf andere Aminosäuren und/oder Dicarbonsäuren transferiert werden. Die direkt aus Glutamat hervorgehenden Aminosäuren Arginin, Prolin, Histidin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure zeigen in der HPLC-Analyse sowie der Metabolitanalyse mittels GC-MS reduzierte Gehalte im Vergleich zum Wildtyp. Die Aminosäure Glutamat ist in allen drei asOMT-Linien nachweisbar reduziert, was sich durch einen geringeren Import von 2-Oxoglutarat in die Plastiden erklären lässt (Abb. 27E). Die Akkumulation von 2-Oxoglutarat infolge des verminderten 2-Oxoglutaratimports in die Plastiden konnte nachgewiesen werden (Abb. 29B). Ebenfalls zeigen die aus Pyruvat gebildeten Aminosäuren Leucin, Valin und Alanin in den Analysen reduzierte Gehalte. Die über den Shikimat-Biosyntheseweg gebildeten aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan) werden ebenfalls beeinflusst. Die aromatischen sowie die aus Pyruvat gebildeten Aminosäuren entstehen aus Metaboliten der Glykolyse. Dies ist ein Hinweis darauf, dass dieser zentrale Stoffwechselweg ebenfalls inhiert ist. Durch die Metabolitanalyse kann diese Vermutung bestätigt werden (Abb. 31D - G). Durch die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (ASAT; EC 2.6.1.1.) wird die Aminogruppe des Aspartats auf 2-Oxoglutarat unter Bildung von Glutamat und Oxalacetat übertragen. Für dieses Enzym konnte eine erhöhte Aktivität in allen drei asOMT-Linien nachgewiesen werden (Abb. 32B). Durch die erhöhte ASAT-Enzymaktivität kann der verminderte Asparatgehalt erklärt werden. Aus Aspartat werden weitere Aminosäuren wie Threonin, Methionin und Lysin gebildet. Diese zeigen in der HPLC-Analyse sowie Metabolitanalyse reduzierte Gehalte im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu ist ein deutlich erhöhter Aminosäuregehalt für Asparagin nachweisbar (Abb. 27B).

In Leguminosen wie z. B. *Pisum sativum* erfolgt die direkte Nitratreduktion in den Wurzelknöllchen durch den Nitrogenase-Komplex. In den Wurzelzellen werden durch die cytosolischen Glutamin-Synthetase die Aminosäuren Glutamin und Asparagin synthetisiert, welche als Transportform des Stickstoffes in Pflanzen beschrieben sind (Urquhart *et al.*, 1982). Diese Aminosäuren werden über das Phloem zu den Samen transportiert. Durch die Aktivität von Aminosäure- und Peptidtransportern (Miranda *et al.*, 2001, 2003) werden diese Metabolite in die Kotyledonenzellen aufgenommen. Die Aminosäure Asparagin wird durch das Enzym Asparaginase zu Aspartat deaminiert. Dabei wird Stickstoff in Form von Ammonium freigesetzt. Da Ammonium sehr reaktiv und somit schädlich für die Pflanzenzelle ist, muss dieser sehr effizient im plastidären GS/GOGAT-Zyklus reassimiliert werden (Sieciechowicz *et al.*, 1988).

Der nachgewiesene erhöhte Asparagingehalt spiegelt sich auch in veränderten Verhältnis Asparagin/Aspartat wieder (Abb. 27L). Die gleichzeitige Anreicherung von Asparagin sowie Abbau von Aspartat lässt das Asparagin/Aspartat-Verhältnis stark ansteigen. Die Transkriptmenge der Asparaginase ist nachweislich um den Faktor zwei bis drei im mittleren und späten Entwicklungsstadium verringert. Der verringerte Asparaginabbau sowie die verminderte Reassimilierung im GS/GOGAT-Zyklus führt zu einem Anstieg des Ammoniumgehaltes in den asOMT-Samen (Abb. 26). Einen direkten Nachweis, dass Ammonium die Transkription und/oder die Translation der Asparaginase beeinflusst gibt es nicht.

In den Chloroplasten vom Blattgewebe wird Ammonium hauptsächlich durch die Decarboxylierung von Glycin während der Photorespiration (Taira *et al.*, 2004) freigesetzt. Durch eine antisense-Inhibierung des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators in Tabakpflanzen erfolgte eine Anreicherung von Ammonium in Blättern, was ein Hinweis für eine limitierte 2-Oxoglutarat-Aufnahme ist (Schneidereit *et al.*, 2006). Durch die toxische Wirkung des angereicherten Ammoniums kam es zur Verfärbung der Blätter. Die plastidäre Glutamin-Synthetase der Blätter zeigte eine erhöhte Enzymaktivität (Häusler *et al.*, 1994). Diese erhöhte GS-Aktivität sowie eine Akkumulation von Ammonium konnte ebenfalls während der Samenentwicklung der Erbse beobachtet werden (Abb. 26, 32A). Dies sind Anzeichen, das es zu einer Substratlimitierung bei der Ammonium-Reassimilation gekommen ist. Der Gehalt von Glyoxylaten wurde nicht bestimmt. Die Photorespiration und somit die Transaminierung von Glyoxylaten, als Lieferant von Ammonium, spielt in sich entwickelnden Leguminosensamen eine untergeordnete Rolle.

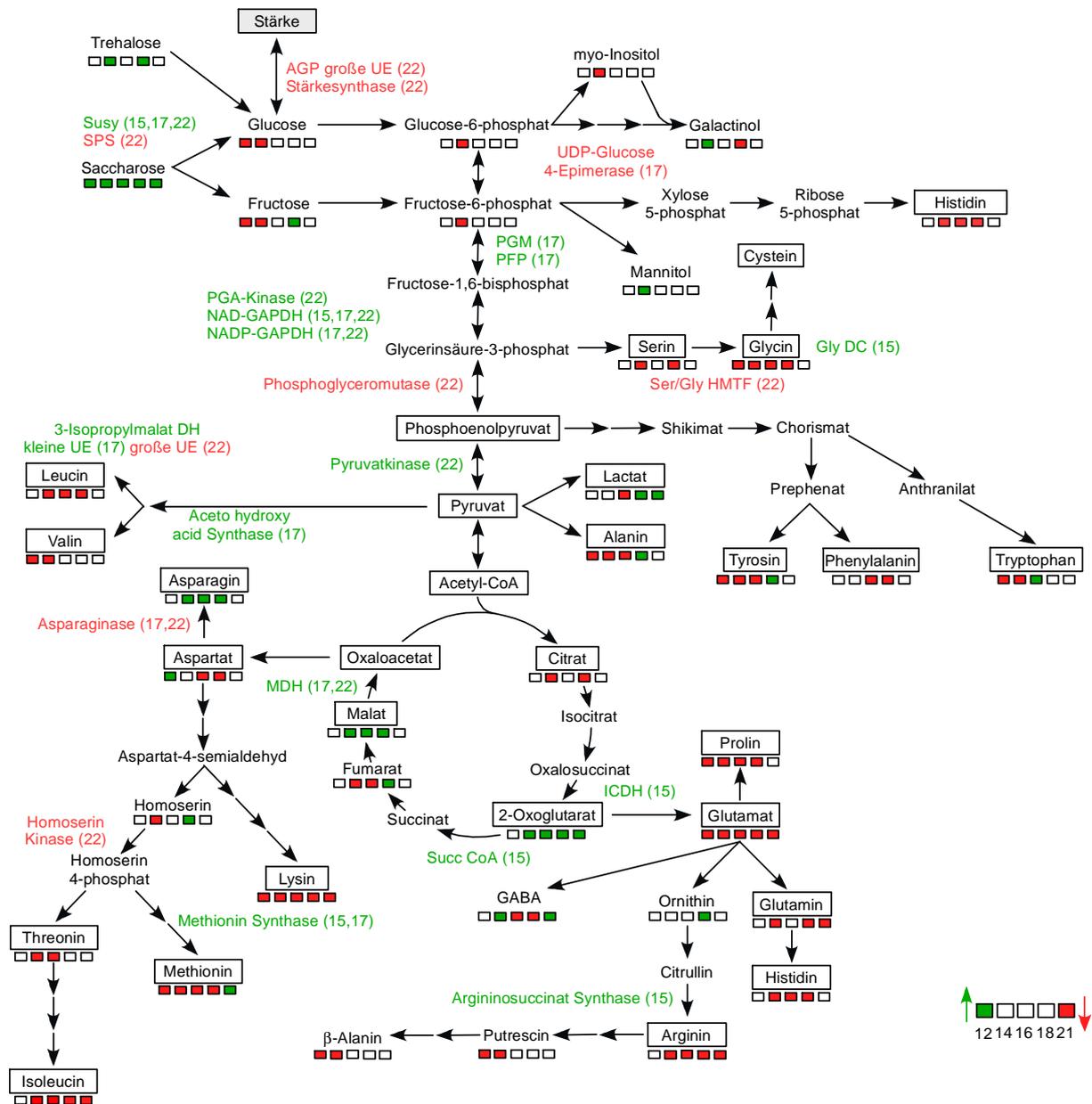
## 5. Die OMT-Inhibierung verändert den Saccharosemetabolismus, die Glykolyse und den Fettsäuremetabolismus

Das in den Mesophyllzellen der Blätter gebildete Photoassimilat Saccharose wird in sich entwickelnden Samen unter anderem für die Synthese der Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren benötigt. In den asOMT3-Samen ist der Saccharosegehalt sowie die mRNA von Saccharose-abbauenden Enzymen (Saccharose Synthase 1) sowie glykolytischen Enzymen (Tabelle 5) deutlich erhöht. Die mehrfache Messung der Aktivität der Saccharose-Synthase zeigte überraschenderweise in allen drei transgenen Linien eine deutlich verringerte Aktivität. In Blättern der Erbsenpflanze konnten drei Isoenzyme dieses Enzymes nachgewiesen werden (Barratt *et al.*, 2001). Die kinetischen Daten der rekombinant exprimierten Isoenzyme hatten hohe  $K_m$ -Werte für Saccharose, was auf die bevorzugte Bildung von Saccharose hindeutet. In Mais konnte gezeigt werden, dass die Regulation und die Lokalisierung des Enzyms durch Proteinphosphorylierung gesteuert wird (Winter und Huber, 2000). Die Saccharosesynthase in Wurzelknöllchen von Leguminosen wird auf transkriptioneller und post-translationeller Ebene durch den zellulären Redoxstatus beeinflusst (Marino *et al.*, 2008). Durch diese Modifikationen könnte die reduzierte Enzymaktivität erklärt werden.

Hexosen sowie deren phosphorylierte Formen sind deutlich reduziert. Der gleiche Effekt beobachtete man in Tabakblättern, bei denen der OMT durch antisense-Inhibierung reprimiert wurde (Schneidereit *et al.*, 2006). Erhöhte Gehalte von organischen Säuren sowie erhöhte Enzymaktivitäten wiesen auf eine Hochregulation des Tricarbonsäure-Zyklus hin. In den asOMT-Linien konnten ebenfalls erhöhte Gehalte von Dicarbonsäuren gemessen werden (Abb. 29B, C). Der erhöhte Gehalt an 2-Oxoglutarat kann durch den inhibierten Import mittels des OMTs und die dadurch reduzierte Aminosäurebiosynthese erklärt werden.

Die Reduktion der Glykolyseintermediate ist ebenfalls an Aminosäuren nachweisbar, die direkt von glykolytischen Metaboliten abstammen (Leucin, Valin, Alanin gebildet von Pyruvat; Serin, Glycin gebildet von Glycerinsäure-3-phosphat; siehe Abb. 33). Aus dem Acetyl-CoA werden in den Chloroplasten die Fettsäuren gebildet (Ohlrogge and Browse, 1995). Die Messung des Gehaltes von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in reifen Samen der AsOMT-Linien zeigt eine Reduktion im Vergleich zum Wildtyp. In Samen der Arabidopsis-Mutante *tag1* wurde ebenfalls ein reduzierter Fettsäuregehalt sowie eine Akkumulation von Saccharose nachgewiesen (Katavic *et al.*, 1995). Eine reduzierte Glykolyse wurde in Samen der Arabidopsis-Mutante *wrinkled1* auf Transkript- und

Metabolitebene festgestellt, deren Samen eine 80%ige Reduktion von Lipiden aufwiesen (Focks and Benning, 1998).



**Abb. 33 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse von Transkript- und Metabolitanalyse der asOMT3-Samen im Vergleich zum Wildtyp.**

Die Transkriptanalyse wurde von drei Entwicklungsstadien (15, 17, 21 DAF) unter Verwendung der Microarray-Technik durchgeführt. Die veränderten Transkripte der Enzyme wurden in der jeweiligen Farbcodierung neben den Metabolitdaten gesetzt. Die Metabolitdaten wurde wie folgt gemessen: Aminosäuren mittels HPLC, organische Säuren mittels Ionenchromatographie sowie weitere Metabolite mittels GC-MS. (rot: niedrigere Transkript- bzw. Metabolit-Konzentration , grün: höhere Transkript- bzw. Metabolit-Konzentration )

## 6. Durch OMT-Repression entwickeln die Plastiden Chloroplasten-ähnliche Merkmale

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) reguliert agronomisch wichtige Aspekte der Pflanzenentwicklung wie die Synthese und Einlagerung von Reserveproteinen und Lipiden (Finkelstein *et al.*, 2002). In Erbsenembryonen, in denen die SnRK1 Kinase durch antisense-Inhibierung reprimiert wurde, konnte eine Veränderung von ABA-sensitiven Genen beobachtet werden (Radchuk *et al.*, 2006). Dies hatte Defekte in der Samenreifung sowie einen erhöhten Saccharosegehalt zur Folge, was auf eine verminderte Einlagerung von Reservestoffen hinwies. Ein verringertes Samengewicht sowie ein verminderter Proteingehalt konnte ebenfalls in Erbsensamen nachgewiesen werden, bei denen rekombinante Antikörper gegen ABA exprimiert wurden (Saalbach *et al.*, 2001). In der asOMT-Linie 3 konnte ein verminderter ABA-Level, ein erhöhter Saccharoselevel sowie ein verminderter Gehalt an Reserveproteine nachgewiesen werden. Dies bestätigt den Einfluss des Phytohormons ABA auf die Synthese und Einlagerung von Reservestoffen in Leguminosensamen. Der Mechanismus der ABA-Regulation ist noch unbekannt.

Einen erhöhten Saccharoselevel und einen reduzierte ABA-Gehalt konnte ebenfalls in Erbsensamen nachgewiesen werden, in denen die AGPase inhibiert wurde (Weigelt *et al.*, 2009). In diesen Samen wurde ebenfalls eine veränderte Expression von plastidären Genen beobachtet. Das ABA ein entscheidender Regulator für die späte Samenentwicklung ist und die plastidäre Differenzierung kontrolliert, konnte in Arabidopsis-Samen nachgewiesen werden (Rohde *et al.*, 2000). In Embryonen mit reduzierter SnRK1 Kinase-Aktivität und reduziertem ABA-Level wurden Gene der Metabolitspeicherung ebenfalls beeinflusst (Radchuk *et al.*, 2006).

In Erbsenembryonen werden während der Samenentwicklung aus den photosynthetisch aktiven Chloroplasten Reservestoffspeichernde Plastiden (Smith *et al.*, 1990). Somit erfolgt ein Wechsel vom photoautotrophen zum heterotrophen Metabolismus (Neuhaus and Emes, 1997). In den asOMT3-Embryonen wurden Gene herunterreguliert, die in der Stärkebiosynthese (AGP large subunit, 4-alpha-glucanotransferase, granule-bound starch synthase1) und der Lipidbiosynthese (Stearyl-ACP desaturase) involviert sind. Ein verminderter Stärkegehalt sowie eine Reduktion der Fettsäuren konnte in den asOMT-Linien beobachtet werden. Des weiteren sind Gene herunterreguliert, die am Metabolittransport involviert sind (Hexosentransporter, GPT, OEP16, Zinktransporter). Der GPT importiert Glucose-6-phosphat für die Stärkesynthese und wird vorwiegend in nicht-photosynthetisch aktiven Plastiden exprimiert (Fischer and Weber, 2002). Die Aktivität des GPT kann durch

Zugabe von Glucose erhöht werden (Quick *et al.*, 1995). Hingegen wurde die Aktivität des TPT in Weizenchloroplasten (Sun *et al.*, 2006) sowie durch Saccharose in Tabakchloroplasten inhibiert (Knight *et al.*, 1994). Dies weist auf eine Metaboliten-kontrollierte Regulation der plastidären Translokatoren hin. OEP (outer envelope protein of 16 kDa) ist ein Transporterprotein in der äußeren Chloroplastenmembran und hoch selektiv für den Aminosäuretransport (Pohlmeyer *et al.*, 1997). Die Aktivität der ADP-Glucose Pyrophosphorylase ist in den asOMT3-Samen reduziert (Abb. 32D). Erbsenembryonen mit verminderter AGP-Aktivität hatten einen erhöhten Saccharoselevel, einen reduzierten Stärkegehalt sowie reduzierte mRNA des OEP16 (Weigelt *et al.*, 2009).

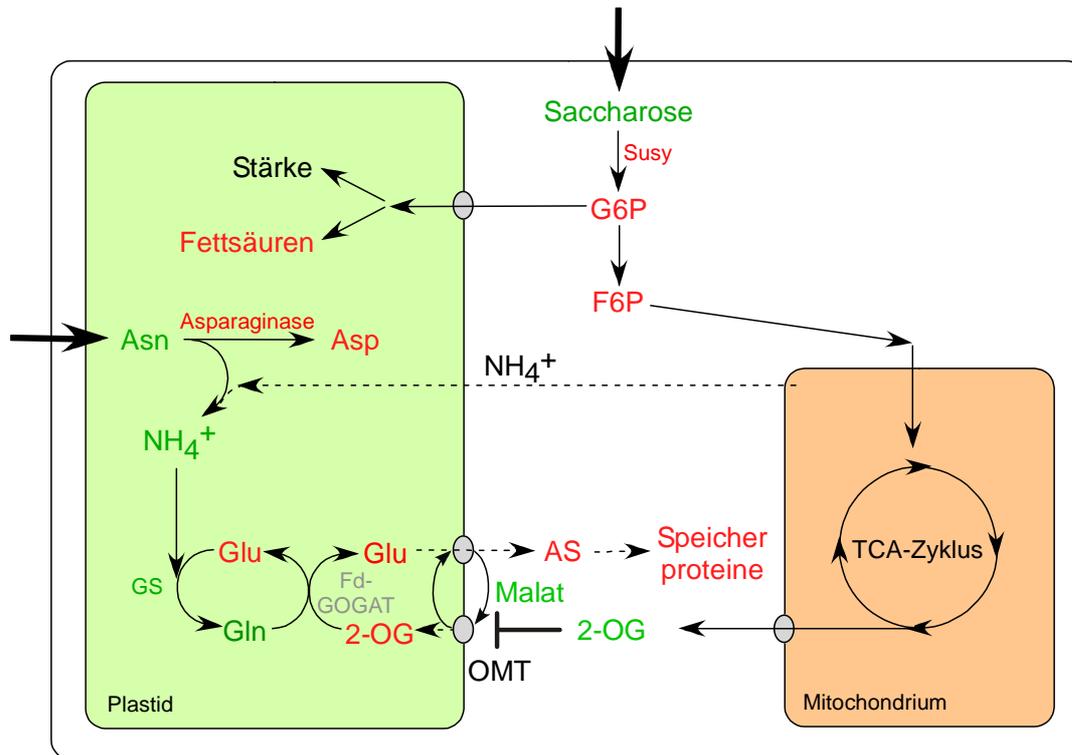
44 Gene mit Funktionen in Chloroplasten sind in den asOMT3-Samen hochreguliert. Diese sind an der Chlorophyllbiosynthese, dem Calvin-Zyklus, dem Photosystem I und II, der ATP-Synthese sowie am Transport von Triosen und der Chlorophyll-Bindung beteiligt. Dies weist darauf hin, dass in den asOMT3-Samen die Plastiden noch vorwiegend Merkmale von grünen Plastiden haben und es somit zu einer Verschiebung der Entwicklung zum Plastiden mit Speicherfunktion gekommen ist. Die Entwicklungsverschiebung konnte nur auf Transkriptebene gezeigt werden. Eine Messung von Photosyntheseraten in asOMT-Samen im Vergleich zum Wildtyp würde dies bestätigen. In *Vicia narbonensis*-Samen mit GPT-Inhibition konnte ebenfalls eine verschobene Plastidenentwicklung beobachtet werden (Rolletschek *et al.*, 2007). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Plastidendifferenzierung durch die Verfügbarkeit von Kohlenstoff kontrolliert wird. Der direkte Nachweis dafür fehlt allerdings. In Erbsenembryonen konnte durch Zugaben von Glutamin und 2-Oxoglutarat eine Stimulierung des Glucose-6-phosphat Metabolismus nachgewiesen werden (Foster and Smith, 1993). Die Aminosäurebiosynthese sowie die Stärkesynthese sind abhängig vom Vorhandensein von reduziertem Ferredoxin, welches im oxidativen Pentosephosphatweg (OPPP) synthetisiert wird. Die reduzierte Expression von Genen der Stärkebiosynthese sowie des GPT könnten diese Verbindung zwischen der Ammoniumassimilation und der Stärkesynthese bestätigen.

## 7. Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator beeinflusst den Export von Reduktionsäquivalenten

Die im Plastiden synthetisierten Reduktionsäquivalente werden über dem Oxalacetat/Malat-Translokator und Triosephosphat/phosphat-Translokator (TPT) in das Cytosol transportiert (Heineke *et al.*, 1991; Scheibe, 2004). Es konnte bei rekonstituierten OMT *in vitro* gezeigt

werden, dass das Oxalacetat auch im Austausch mit Malat transportiert wird (Taniguchi *et al.*, 2002). Es wurde vermutet, dass der OMT *in vivo* ebenfalls die Funktion eines Oxalacetat/Malat-Transporters hat (Renné *et al.*, 2003). Der Oxalacetat-Transport durch den Oxalacetat/Malat-Translokator wird kompetitiv inhibiert durch Malat und 2-Oxoglutarat (Hatch *et al.*, 1984). Der in den asOMT-Samen nachgewiesene erhöhte 2-Oxoglutarat- und Malatgehalt inhibiert somit den Export von Oxalacetat und somit von Reduktionsäquivalenten aus den Plastiden. Sowohl der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator als auch der Oxalacetat/Malat-Translokator ist in asOMT-Samen nicht in der Lage Reduktionsäquivalente zu exportieren. Eine erhöhte Expression des Triosephosphat/phosphat-Translokators (TPT) (Tabelle 4) lässt vermuten, dass die Reduktionsäquivalente durch Umwandlung in Triosephosphate mit anschließendem Export ins Cytosol transportiert werden und dort wieder zurückgewandelt werden. Diese Reduktionsäquivalente werden sowohl in der Glykolyse als auch in der mitochondrialen Respirationskette benötigt. Für die reversible Umwandlung von Malat in Oxalacetat ist die Malatdehydrogenase (MDH) notwendig. Diese konnte sowohl im Cytosol, Chloroplast und Mitochondrium nachgewiesen werden (Drincovich *et al.*, 2001). Die cytosolische und mitochondriale Isoform der MDH ist in den asOMT3-Samen hochreguliert, was auf eine vermutlich verstärkte Umwandlung in Oxalacetat schließen lässt. Der Gehalt an Oxalacetat in den asOMT-Samen wurde nicht bestimmt.

Alle Ergebnisse der Transkript- und Metabolitanalyse wurden in einer zusammenfassenden Darstellung abgebildet (Abb. 33). Hieraus wurde eine zweite Abbildung abgeleitet, die vereinfacht die entscheidenden Veränderungen im Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus von asOMT-Samen zeigt (Abb. 34). In dieser vereinfachten Abbildung wurde die zelluläre Lokalisierung der einzelnen Biosynthesewege beachtet. Durch die Repression des OMTs in sich entwickelnden Erbsensamen erfolgt eine Akkumulation der Dicarbonsäure 2-Oxoglutarat. Dadurch wird der plastidäre GS/GOGT-Zyklus weniger mit Kohlenstoffgerüsten versorgt, was eine verringerte Synthese von Glutamat zur Folge hat. Alle nachfolgenden Aminosäuren sowie Speicherproteine zeigen eine deutliche Gehaltsreduktion. Diese Beobachtungen stimmen mit denen in Blättern der antisense-Tabakpflanzen überein (Schneidereit *et al.*, 2006). Die auf Transkript- und Transportaktivitätsebene nachgewiesene Repression des OMTs zeigt die erwarteten Veränderungen im Samen. Die Substratlimitierung der Ammonium-Assimilation im GS/GOGAT-Zyklus wird auch durch einen erhöhten Gehalt von Ammonium sowie eine erhöhte Aktivität der Glutamin-Synthetase bestätigt. Die



**Abb. 34 Vereinfachte Darstellung der wichtigsten Veränderungen auf Metabolit- sowie auf Transkriptebene in Bezug auf die zelluläre Lokalisierung.**

(rot: niedrigere Transkript- bzw. Metabolitlevel, niedrigere Enzymaktivität, grün: höhere Transkript- bzw. Metabolitlevel, höhere Enzymaktivität)

Analyse der Aminosäuren ergab, dass Asparagin als einzige Aminosäure erhöht ist. Die Aminosäuren Asparagin und Glutamin sind als Transportform für Stickstoff innerhalb der Pflanze beschrieben (Urquhart et al., 1982), was vermuten lässt, dass diese den Stickstoff in die Samen transportieren. Dort erfolgt die Deaminierung in Aspartat durch die Asparaginase, wobei Ammonium freigesetzt wird. Dies unterscheidet sich zur Situation in den Blättern. Dort wird Ammonium durch die primäre oder durch die sekundäre Nitratassimilation generiert. Im Samen spielt die Nitratassimilation vermutlich eine untergeordnete Rolle.

In den asOMT-Samen war ein erhöhter Gehalt an Saccharose zu messen, was auf einen verminderten Abbau durch die Glykolyse zu erklären war. Der gemessene Gehalt an Glucose und Fructose sowie deren phosphorylierte Formen war erniedrigt und bestätigt den verminderten Saccharoseabbau. Die Saccharosesynthase als das entscheidende Saccharoseabbauende Enzym hatte eine verringerte Aktivität. Es ist zu vermuten, dass dieses Enzym für den erhöhten Saccharosegehalt verantwortlich ist, obwohl erhöhte Transkriptmengen der Saccharosesynthase gefunden wurden. Eine verminderte Glykolyse hat auch Folgen auf andere Stoffwechselwege. Die Synthese von Fettsäuren durch die  $\beta$ -Oxidation war vermutlich verringert, da ein vermindertes Fettsäuregehalt ermittelt werden konnte. In den Blättern der

antisense-Tabakpflanzen wurde ein verminderter Gehalt an Hexosen, phosphorylierte Hexosen und Saccharose gemessen (Schneiderei *et al.*, 2006). Erhöhte Enzymaktivitäten sowie Gehalte von Metaboliten der Synthesewege von Di- und Tricarbonsäuren wurde gemessen, was auf eine Hochregulation dieser Synthesewege im Blatt hindeutete. In den asOMT-Samen konnte die Hochregulation nicht beobachtet werden.

Um die ermittelten Daten bestätigen zu können, wäre eine komplette Analyse der mit dem Überexpressionkonstrukt transformierten Erbsenlinien sehr sinnvoll. Vermutlich kämen noch ergänzende und detailliertere Informationen über die Funktion des 2-Oxoglutarat/Malat-Translokators bei der Samenentwicklung noch hinzu.

## V. Zusammenfassung

Die Erbsen als Vertreter der Leguminosen spielen eine wichtige Rolle in der Landwirtschaft. Diese Pflanzen sind in der Lage, aufgrund der Symbiose mit Bakterien der Gattung *Rhizobium* Luftstickstoff direkt zu fixieren und in Ammonium umzuwandeln. In der Pflanzenzelle wird Ammonium durch den plastidären GS/GOGAT-Zyklus für die *de novo*-Aminosäurebiosynthese verwendet. Die Hauptspeicherstoffe von Leguminosensamen sind Speicherproteine wie z. B. die Globuline und Albumine. Die Speicherparenchymzellen regulieren die Verteilung und die Speicherung der Metabolite. Plastidäre Biosynthesewege spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Diese sind abhängig vom Austausch der Metabolite mit dem umgebenden Zytoplasma. In der inneren plastidären Membran eingebettete Transportproteine regulieren diesen Metabolitaustausch. Eine Vielzahl von Transportproteinen wurde molekularbiologisch und biochemisch in verschiedenen Pflanzenspezies analysiert.

Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator (OMT) ist für den Import des Kohlenstoffgerüsts 2-Oxoglutarat in die Plastiden zuständig. Dieses wird durch die Glutamin-Synthetase (GS) und die Glutamat-Synthase unter Bildung von Glutamat aminiert. Der zweite Dicarboxylat-Translokator, der Glutamat/Malat-Translokator, exportiert die gebildete Aminosäure Glutamat, die Ausgangsprodukt aller weiteren Aminosäuren ist. Die funktionelle Charakterisierung des OMTs ist aufgrund der hohen Expression während der Samenentwicklung sowie der hohen Transportspezifität von entscheidender Bedeutung. Hierzu wurden transgene Erbsenmodelle generiert, die diesen plastidären Translokator durch antisense-Inhibierung reprimierten oder durch Überexpression vermehrt exprimieren. Aufgrund des begrenzten Zeitrahmens der vorliegenden Arbeit konnten nur die antisense-Linien analysiert werden. Mittels Southern-Analyse konnte gezeigt werden, dass das Genom der asOMT-Linien 3, 6 und 9 jeweils nur eine transgene Kopie der Expressionkassette enthält. Die Integration des Transgens in die unterschiedlichen Linien ist auf unabhängige Transformationsereignisse zurückzuführen. Die Analyse der OMT-Transkripte ergab eine Reduktion auf 66 % bis 43 % der im Wildtyp vorhandenen Menge. Mit Hilfe von künstlichen Proteoliposomen konnte für die asOMT-Linien 3 und 6 eine Reduktion des 2-Oxoglutarat-Transportes auf 50 % (Linie 3) und 21 % (Linie 6) festgestellt werden. Somit war die Inhibierung des OMTs auf sowohl auf Transkript- als auch auf Aktivitätsebene nachgewiesen. Die Pflanzen aller drei asOMT-Linien hatten ab der Blüte eine höhere Wuchshöhe im

Vergleich zum Wildtyp. Eine Reduktion des Samengewichtes konnte ab dem 13. DAF (Linie 3) bzw. 14. DAF (Linie 6) signifikant nachgewiesen werden. Ein reduzierter Gesamtstickstoffgehalt sowie ein verminderter Gehalt an Speicherproteinen bestätigen den direkten Einfluss des OMTs auf die Stickstoffmetabolismus. Die asOMT-Erbesen zeigen ein höheres Asparagin/Aspartat-Verhältnis sowie einen höheren Gehalt an organischen Säuren und Ammonium. Dies sind deutliche Anzeichen, dass es durch die Substratlimitierung des plastidären GS/GOGAT-Zyklus zu einer Akkumulation der Kohlenstoffgerüste und des Stickstoff kommt, die als Grundlage für die Biosynthese der Aminosäuren dienen. Ein reduzierter Gehalt aller anderen Aminosäuren bestätigt den verminderten Import von 2-Oxoglutarat. Erhöhte Enzymaktivitäten für die Glutamin-Synthetase sowie Aspartat-Aminotransferase in den asOMT-Embryonen deuten ebenfalls auf Veränderungen im Stickstoffmetabolismus hin.

Ein verminderter Gehalt an Kohlenhydraten sowie deren phosphorylierten Formen und eine reduzierte Expression von Genen der Stärkebiosynthese bestätigen die enge Verknüpfung von Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus. Einen deutlich erhöhter Saccharosegehalt sowie reduzierte ABA-Gehalte weisen auf eine Veränderung in der Samenreifung und Reservestoffeinlagerung hin. Beide Verbindungen sind als Regulatoren der Samenentwicklung bekannt. Durch eine vermehrte Expression von Genen mit Funktionen im Chloroplasten ist eine verschobene Plastidenentwicklung in asOMT-Erbesen nachweisbar. Weiterhin deutet die Reduktion der Fettsäuren auf eine Veränderung im Lipidmetabolismus hin. Die OMT-Inhibierung hat auch einen Einfluss auf den Export von Reduktionsäquivalenten aus den Plastiden. Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translokator spielt im Metabolismus von Erbsensamen eine zentrale Rolle und hat nicht nur Einfluss auf den Stickstoffmetabolismus, sondern auch auf andere Biosynthesewege.

## **VI. Danksagung**

Diese Arbeit wurde angefertigt am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern dieser Institution, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Bei meinem Betreuer Herrn Dr. Hans Weber bedanke ich mich für seine langjährige Betreuung und Hilfe sowie für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit. Besonders bedanke ich mich bei meiner zweiten Betreuerin Dr. Winfriede Weschke für ihre intensive Unterstützung und ihre Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen. Für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit bedanke ich mich ebenfalls bei ihr.

Ich bedanke mich bei Dr. Hardy Rolletschek und Dr. Mohammad-Reza Hajirezaei für ihre Unterstützung bei der Bedienung der Messgeräte sowie Durchführung von Metabolitmessungen. Für die vorbereitenden Arbeiten sowie die Auswertung am Elektronenmikroskop bedanke ich mich bei Monika Wiesner und Dr. Twan Rutten.

Mein weiterer Dank gilt Kirsten Bell und Dr. Rainer E. Häusler aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. U.-I. Flügge des Botanischen Instituts der Universität Köln für ihre Hilfe bei den Transportmessungen mittels künstlicher Liposomen. Ich bedanke mich bei Dr. Adriano Nunes Nesi aus der Arbeitsgruppe von Dr. Alisdair Fernie für die Metabolitmessung durch GC-MS. Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Helge Küster, Universität Hannover (ehemals Universität Bielefeld) für die Durchführung des Microarray-Experimentes.

Für Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich bei Dr. Marc Strickert. Ebenfalls bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Bioinformatik-Arbeitsgruppen des Instituts für die Hilfestellung bei Problemen der Bioinformatik.

Ohne die Anzucht und Pflege des Pflanzenmaterials wäre die Arbeit nicht möglich gewesen. Daher gilt mein Dank Herrn Enk Geyer und den Mitarbeiterinnen der Gärtnerei. Für die Hilfe bei der Transformation der Pflanzen bedanke ich mich bei Petra Hoffmeister und Elke Liemann. Besonders bedanke ich mich bei Katrin Blaschek, Elsa Fessel und Gabi Einert für ihre exzellente technische Hilfe. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Samenentwicklung (ehemals Genwirkung) für ihre Hilfe und Unterstützung.

Mein besonderer Dank für die uneingeschränkte Unterstützung in finanzieller und materieller Hinsicht gilt meiner Mutter. Ohne ihre Hilfe hätte ich diese Arbeit nicht anfertigen können. Ich sage „Danke“ allen meinen Freunden, Bekannten und Verwandten für die Freundschaft und Unterstützung.



## VII. Literaturverzeichnis

**Anderson, J. W. and Walker, D. A.** (1983):

Oxygen evolution by a reconstituted spinach chloroplast system in the presence of L-glutamine and 2-oxoglutarate; *Planta* 159: 77-83

**Andrews, M.** (1986):

The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants; *Plant Cell Environ* 9: 511-519

**Aslam, M., Travis, R. L. and Huffacker, R. C.** (1992):

Comparative genetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in root of uninduced and induced barley seedlings; *Plant Phys* 92: 1124-1133

**Avila, C., Botella, J. R., Canovas, F. M., Nuniez de Castro, I. N. and Valpuesta, V.** (1987):

Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of *Lycopersicon esculentum*; *Plant Phys* 85: 1036-1039

**Azevedo, R. A., Arana, J. L. and Arruda, P.** (1990):

Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonineresistant mutant Ltr\*1 with *opaque2* maize mutant; *Plant Sci* 70: 81-90

**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

**Azevedo, R. A., Lancien, M., and Lea, P. J.** (2006):

The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants; *Amino Acids* 30: 143-162

**Bachmann, M., Huber, J. L., Liao, P.-C., Gage, D. A. and Huber, S. C.** (1996):

The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein; *FEBS Letters* 387: 127-131

**Barratt, D. H., Barber, L., Kruger, N. J., Smith, A. M., Wang, T. L. and Martin, C.** (2001):

Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea; *Plant Phys* 127(2): 655-664

**Bäumlein, H., Nagy, I., Villaroel, R., Inzé, 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 J* 2(2): 233-239

**Bean, S. J., Gooding, P. S., Mullineaux, P. M. and Davies, D. R.** (1997):

A simple system for pea transformation; *Plant Cell Reports* 16: 513-519

**Bergmeyer, H. U.** (1989):

Methods of Enzymatic Analysis; Third Edition, VCH Verlagsgesellschaft mbH

- Birnhoim, H. C. and Doly, J.** (1979):  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA;  
*Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523
- Blom, N., Gammeloft, S. and Brunak, S.** (1999):  
Sequence and Structure-based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites;  
*J Mol Biol* 294: 1351-1362
- Boland M. J. and Benny, A. G.** (1977):  
Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: purification and properties of  
NADH-dependent glutamate synthase from lupine nodules; *Eur J Biochem* 79: 355-  
362
- Borek, D. and Jaskólski, M.** (2001):  
Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity; *Acta Bio Pol* 48(4): 893-902
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Wobus, U. and Weber H.** (2003):  
Differentiation of legume embryo cotyledons as related to metabolic gradients and  
assimilate transport into seeds; *J Exp Bot* 54(382): 503-512
- 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., Nguyen, T. H., Neuberger, T., Rutten, T., Tschiersch, H., Claus, B., Feussner,  
I., Webb, A. G., Jakob, P., Weber, H., Wobus, U. and Rolletschek, H.** (2005):  
Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing  
soybean seeds; *New Phytologist* 167(3): 761-776
- Bowsher, C. G., Boulton, E. L., Rose, J., Nayagam, S. and Emes, M. J.** (1992):  
Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate  
pathway in non-photosynthetic root plastids; *Plant J* 2(6): 893-898
- Cánovas, F., Avila, C., Cantón, F. R. Canas, R. A. and de la Torre, F.** (2007):  
Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers; *J Exp Bot* 58(9):  
2307-2318
- Casey, S., Demoney, C., Forster, C., Hedley, C., Hitchin, E. and Wang, T.** (1998):  
The effect of modifying carbohydrate metabolism on seed protein gene expression in  
peas; *J Plant Phys* 152: 636-640
- Chen, F. L. and Cullimore, J. V.** (1989):  
Location of two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules  
of *Phaseolus vulgaris* L.; *Planta* 179: 441-447
- Chen, S., Hajirezaei, M., Peisker, M., Tschiersch, H., Sonnewald, U. and Börnke, F.** (2005):  
Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits  
photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth; *Planta* 221: 479-  
492

- Chen, Y. M.,** Ferrar, T. S., Lohmeir-Vogel, E., Morrice, N., Mizuno, Y., Berenger, B., Ng, K. K. S., Muench, D. G. and Moorhead G. B. G. (2006):  
The PII signal transduction protein of *Arabidopsis thaliana* forms an arginine-regulated complex with plastid N-Acetyl Glutamate Kinase; *JBC* 281: 5726-5733
- Chiwocha, S. D. S.,** Abrams, S. R., Ambrose, S. J., Cutler, A. J., Loewen, M., Ross, A. R. S. and Kermod, A. R. (2003):  
A method for profiling classis 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 J* 35: 405-417
- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984):  
Genomic sequencing; *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995
- Clough, S. J. and Bent, A. F.** (1998):  
Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*; *Plant J* 16(6): 735-743
- Cock, J. M.,** Mould, R. M., Bennett, M. J. and Cullimore, J. V. (1990):  
Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of *Phaseolus vulgaris* following changes in the ammonium supply and infection with various *Rhizobium* mutants; *Plant Mol Biol* 14: 549-560
- Cullimore, J. V.** (1992):  
Nitrogen assimilation in the legume root nodule: current status of the molecular biology of the plant enzymes; *Can J Microbiol* 38: 461-466
- Delgado-Alvarado, A.,** Walker, R. P. and Leegood, R. C. (2007):  
Phosphoenolpyruvate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in solute transport and is nitrogen-responsive; *Plant Cell Envir* 30: 225-235
- Dondrup, M.,** Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., Rupp, O., Sczyrba, A., Pühler, A. and Meyer, F. (2003):  
EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data; *J Biotechnol* 106: 135-146
- Drincovich, M. F.,** Casati, P. and Andreo, C. S. (2001):  
NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways; *FEBS Letters* 490: 1-6
- Edwards, J. W.,** Walker, E. L. and Coruzzi, G. M. (1990):  
Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase; *PNAS* 87: 3459-3463
- Edwards, K.,** Johnstone, C. and Thompson, C. (1991):  
A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis; *Nucleic Acids Res* 19(6): 1349

- Eicks, M.,** Maurino, V., Knappe, S., Flügge, U.-I. and Fischer, K. (2002):  
The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants; *Plant Phys* 128: 512-522
- Elmlinger, M. W. and Mohr, H.** (1992):  
Glutamine synthetase in Scots pine seedlings and its control by blue light and light absorbed by phytochrome; *Planta* 188: 396-402
- Emanuelsson, O.,** Nielsen, H. and von Heijne, G. (1999):  
ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites; *Protein Science* 8: 978-984
- Emes, M. J. and Neuhaus, H. E.** (1997):  
Metabolism and transport in non-photosynthetic plastids; *J Exp Bot* 48(317): 1995-2005
- Feinberg, A. P. and Vogelstein B.** (1983):  
A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity; *Anal Biochem* 132: 6-13
- Feinberg, A. P. and Vogelstein B.** (1984):  
A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity; *Anal Biochem* 137: 266-267
- Ferrario-Mery, S.,** Bouvet, M., Leleu, O., Savino, G., Hodges, M. and Meyer, C. (2005):  
Physiological characterization of Arabidopsis mutants affected in expression of the putative regulatory protein PII; *Planta* 223: 28-39
- Fieuw, S.,** Müller-Röber, B., Gálvez, S. and Willmitzer, L. (1995):  
Cloning and expression analysis of the cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase from potato; *Plant Phys* 107: 905-913
- Finkelstein, R. R.,** Gampala, S. S. and Rock, C. D. (2002):  
Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings; *Plant Cell Supplement*: S15-S45
- Fischer, K.,** Kammerer, N., Gutensohn, M., Arbinger, B., Weber, A., Häusler, R. E. and Flügge, U.-I. (1997):  
A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter; *Plant Cell* 9: 453-462
- Fischer, K. and Weber, A.** (2002):  
Transport of carbon in non-green plastids; *Trends in Plant Science* 7(8): 345-351
- Flügge, U. I.,** Woo, K. C. and Heldt, H. W. (1988):  
Characteristics of 2-oxoglutarate and glutamate transport in spinach chloroplasts; *Planta* 174: 534-541
- Flügge, U. I. and Weber A.** (1994):  
A rapid method for measuring organelle-specific substrate transport in homogenates

from plant tissues; *Planta* 194: 181-185

**Flügge, U. I.** (1998):

Metabolite transporters in plastids; *Curr Opin Plant Biol* 1: 201-206

**Flügge, U. I.** (2000):

Metabolite Transport Across the Chloroplast Envelope in C<sub>3</sub>-Plants; *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*: 137-152

**Focks, N. and Benning, C.** (1998):

*wrinkled1*: A Novel, Low-Seed-Oil Mutant of Arabidopsis with a Deficiency in the Seed-Specific Regulation of Carbohydrate Metabolism; *Plant Phys* 118: 91-101

**Forde, B. G. and Lea, P. J.** (2007):

Glutamate in plants: metabolism, regulation and signalling; *J Exp Bot* 58(9): 2339-2358

**Foster, J. M. and Smith, A. M.** (1993)

Metabolism of glucose 6-phosphate by plastids from developing pea embryos; *Planta* 190: 17-24

**Galili, G.** (1995):

Regulation of lysine and threonine synthesis; *Plant Cell* 7: 899-906

**Gálvez, S., Lancien, M. and Hodges, M.** (1999):

Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis?; *Trends in Plant Science* 4: 484-490

**Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A.** (2005):

Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press: 571-607

**Geer, L. Y., Domrachev, M. and Lipman, D. J.** (2002):

CDART: Protein Homology by Domain Architecture; *Genome Res* 12: 1619-1623

**Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Harnecker, J., Schulze E.-D., Ludewig, F., Sonnewald, U., Scheible, W.-R. and Stitt, M.** (1998):

Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants; *Plant Cell Environ* 21: 253-268

**Gibon, Y., Blaesing, O. E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J. H. M., Palacios, N., Cross, J. Selbig J. and Stitt, M.** (2004):

A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in Arabidopsis Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcripts Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness; *Plant Cell* 16: 3304-3325

- Giovanelli, J., Mudd, S. and Datko, A. (1988):**  
 In vivo regulation of threonine and isoleucine biosynthesis in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6746; *Plant Phys* 86: 369-374
- Golombek, S., Heim, U., Horstmann, C., Wobus, U. and Weber, H. (1999):**  
 PEP-carboxylase in developing seeds of *Vicia faba*. Gene expression and metabolic regulation; *Planta* 208: 66-72
- Gordon, A. J., Lea, P. J., Rosenberg, C. and Trichant, J. C. (2001):**  
 Nodule formation and function. In: Lea, P.J., Morot-Gaudry J-F, eds.; *Plant nitrogen*. Berlin: Springer-Verlag, 101-146
- Goto, S., Akagawa, T., Kojima, S., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (1998):**  
 Organization and structure of NADH-dependent glutamate synthase from rice roots; *Biochim Biophys Acta* 1387(1-2): 298-308
- 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; *J Exp Bot* 58(12): 3183-3195
- Grant, J. E., Cooper, P. A., McAra A. E. and Frew T. J. (1995):**  
 Transformation of peas (*Pisum sativum* L.) using immature cotyledons; *Plant Cell Reports* 15: 254-258
- Grant, J. E., Thomson, L. M. J., Pither-Joyce, M. D., Dale, T. M. and Cooper, P. A. (2003):**  
 Influence of *Agrobacterium tumefaciens* strain on the production of transgenic peas (*Pisum sativum* L.); *Plant Cell Reports* 21: 1207-1210
- Gregerson, R. G., Miller, S. S., Twary, S. N., Gantt, J. S. and Vance, C. P. (1993):**  
 Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules; *Plant Cell* 5: 215-226
- Grunstein, M. and Hogness, D. S. (1975):**  
 Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene; *Proc Nat Acad Sci USA* 72(10): 3961-3965
- Gullberg, J., Jonsson, P., Nordström, A., Sjöström, M. and Moritz, T. (2004):**  
 Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry; *Anal Biochem* 331(2): 283-295
- Hanahan, D. (1983):**  
 Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids; *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hanning, I., Baumgarten, K., Schott, K. and Heldt, H. W. (1999):**  
 Oxalacetate Transport into Plant Mitochondria; *Plant Physiol* 119: 1025-1031

- Hatch, M. D.,** Dröscher, L., Flügge, U. I. and Heldt, H. W. (1984):  
A specific translocator for oxalacetate transport in chloroplasts; *FEBS Letters* 178(1): 15-19
- Häusler, R. E.,** Blackwell, R. D., Lea, P. J. and Leegood, R. C. (1994):  
Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase; *Planta* 194: 406-417
- Häusler, R. E.,** Fischer, K. L. and Flügge, U. I. (2000):  
Determination of Low-Abundant Metabolites in Plant Extracts by NAD(P)H Fluorescence with a Microtiter Plate Reader; *Anal Biochem* 281: 1-8
- Hedley, C. L. and Ambrose, M. J.** (1980):  
An Analysis of Seed Development in *Pisum sativum* L.; *Annals of Botany* 46: 89-105
- Heichel, G. H.,** Barnes, D. K. and Vance, C. P. (1981):  
Nitrogen fixation of alfalfa in the seedling year; *Crop Science* 21: 330-335
- Heim, U.,** Weber, H., Bäumlein 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
- Heineke, D.,** Riens, B., Grosse, H., Hoferichter, P., Peter, U., Flügge, U. I. and Heldt, H. W. (1991):  
Redox Transfer across the Inner Chloroplast Envelope Membrane; *Plant Phys* 95: 1131-1137
- Hesse, H.,** Kreft, O., Maimann, S., Zeh, M., Willmitzer, L. and Hoefgen, R. (2001):  
Approaches towards understanding methionine biosynthesis in higher plants; *Amino Acids* 20: 281-289
- Hirel, B. and Lea, P. J.** (2001):  
Ammonia assimilation. In Plant Nitrogen (Lea, P. J. and Morot-Gaudry, J. F., eds). Berlin: Springer-Verlag, 79-100
- Hirel, B.,** Le Gouis, J., Ney, B. and Gallais, A. (2007):  
The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches; *J Exp Bot* 58(9): 2369-2387
- Hodges, M.** (2002):  
Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation; *J Exp Bot* 53(370): 905-916
- Höfgen R. and Willmitzer L.** (1988):  
Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation; *Nucleic Acids Res* 16(20): 9877
- Hohnjec, N.,** Vieweg, M. F., Pühler, A., Becker, A. and Küster, 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 Physiol* 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
- Horsch, R. B.,** Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985):  
A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants; *Science* 227: 1229-1231
- Hsieh, M. H.,** Lam, H. M., van de Loo, F. J. and Coruzzi, G. (1998):  
A PII-like protein in Arabidopsis: putative role in nitrogen sensing; *PNAS* 95: 13965-13970
- Huang, N. C.** (1996):  
CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system of Arabidopsis and shows cell type specific expression in roots; *Plant Cell* 8: 2183-2191
- Huppe, H. C. and Turpin, D. H.** (1994):  
Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algae cells; *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 577-607
- Ireland, R. J. and Lea, P. J.** (1999):  
The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate metabolism. In: Singh BK, ed. *Plant amino acids. Biochemistry and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 49-109
- Kamachi, K.,** Yamaya, T., Hayakawa, T., Mae, T. and Ojima, K. (1992):  
Vascular Bundle-Specific Localization of Cytosolic Glutamine Synthetase in Rice Leaves; *Plant Phys* 99: 1481-1486
- Kang, D.,** Gho, Y. S., Suh, M. and Kang, C. (2002):  
Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis; *Bull Korean Chem Soc* 23(11): 1511-1512
- Katavic, V.,** Reed, D. W., Taylor, D. C., Giblin, E. M., Barton, D. L., Zou, J., MacKenzie, S. L., Covello, P. S. and Kunst, L. (1995):  
Alteration of Seed Fatty Acid Composition by an Ethyl Methanesulfonate-Induced Mutation in *Arabidopsis thaliana* Affecting Diacylglycerol Acyltransferase Activity; *Plant Phys* 108: 399-409
- Keys, A. J.,** Bird, I. F., Cornelius, M. J., Lea, P. J., Wallsgrove, R. M. and Mifflin B. J. (1978):  
The photorespiratory nitrogen cycle; *Nature* 275: 741-743
- Kim, J. and Leustek, T.** (2000):  
Repression of cystathionine c-synthase in *Arabidopsis thaliana* produces partial methionine auxotrophy and developmental abnormalities; *Plant Sci* 151: 9-18

- Klein, D.,** Morcuende, R., Stitt, M. and Krapp, A. (2000):  
Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level; *Plant Cell Environ* 23(8): 863-871
- Knight, J. S. and Gray, J. C.** (1994):  
Expression of genes encoding the tobacco chloroplast phosphate translocator is not light-regulated and is repressed by sucrose; *Mol Gen Genet* 242: 586-594
- Koch, K.** (2004):  
Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development; *Curr Opin Plant Biol* 7: 235-246
- Kopka, J.,** Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., Dörmann, 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(8), 1635-1638
- Krogh, A.,** Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. L. (2001):  
Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes; *J Mol Biol* 305: 567-580
- Kruse, A.,** Fieuw, S., Heineke, F. and Müller-Röber, B. (1998):  
Antisense inhibition of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in transgenic potato plants; *Planta* 205: 82-91
- Küster, H.,** Hohnjec, N., Krajinski, F. et al. (2004):  
Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to explore root endosymbioses in the model legume *Medicago truncatula*; *J Biotech* 108: 95-113
- Lam, H.-M.,** Coschigano, K., Oliveira, I., Melo-Oliveira, R. and Coruzzi, G. M. (1996):  
The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants; *Annu Rev Plant Mol Biol* 47: 569-593
- Lancien, M.,** Ferrario-Mery, S., Roux, Y., Bismuth, E., Masclaux, C., Hirel, B., Gadal, P. and Hodges, M. (1999):  
Simultaneous expression of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase and other Krebs cycle genes after nitrate re-supply to short-term starved *Nicotiana tabacum*; *Plant Phys* 120: 717-726
- Lancien, M.,** Gadal, P. and Hodges, M. (2000):  
Enzyme Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plant Ammonium Assimilation; *Plant Phys* 123: 817-824
- Lauter, R. R.** (1996):  
Preferential expression of ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato; *PNAS* 93: 8139-8144

- Lazo, G. R.,** Stein, P. A. and Ludwig, R. A. (1992):  
A DNA Transformation-Competent *Arabidopsis* Genomic Library in *Agrobacterium*;  
*Bio/Technology* 9: 963-967
- Lea, P. J. and Mifflin B. J.** (1974):  
Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants; *Nature* 251: 614-616
- Lea, P. J.,** Blackwell, R. D., Chen, F.-L. and Hecht, U. (1990a):  
Enzymes of ammonia assimilation; *In Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 3, P. J. Lea, ed (London: Academic Press Limited): 257-276
- Lea, P. J.,** Robinson, S. A. and Steward, G. R. (1990b):  
The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine; *The Biochemistry of Plants*, Academic Press, New York, Vol. 16: 121-159
- 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(1): 387-396
- Lloyd, A. M.,** Barnason, A. R., Rogers, S. G., Byrne, M. C., Fraley, R. T. and Horsch, R. B. (1986):  
Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*; *Science* : 464-466
- Lottspeich, F. und Engels, J. W.** (2006): *Bioanalytik*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- 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(5): 732-737
- Marchler-Bauer, A.,** Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hao, L., He S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D. and Bryant, S. H. (2006):  
CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis; *Nucleic Acids Res* 35: 237-240
- Marino, D.,** Hohnjec, N., Küster, H., Moran, J. F., González, E. M. and Arrese-Igor, C. (2008):  
Evidence for Transcriptional and Post-Translational Regulation of Sucrose Synthase in Pea Nodules by the Cellular Redox State; *MPMI* 21(5): 622-630
- Márquez, A. J.,** Betti, M., García-Calderón, M., Pal'ove-Balang, P., Díaz, P. and Monza, J. (2005):  
Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*; *J Exp Bot* 56(417): 1741-1749
- Masclaux-Daubresse, C.,** Reisdorf-Cren, M., Pageau, K., Lelandais, M., Grandjean, O., Kronenberger, J., Valadier, M.-H., Feraud, M., Jouglet, T. and Suzuki, A. (2006):

Glutamine Synthetase-Glutamate Synthase Pathway and Glutamate Dehydrogenase Play Distinct Roles in the Sink-Source Nitrogen Cycle in Tobacco; *Plant Phys* 140: 444-456

**Matt, P.,** Schurr, U., Krapp, A. and Stitt, M. (1998):

Growth of tobacco in short day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes of the *NIA* transcript and low nitrate reductase activity and an inhibition of amino acid synthesis; *Planta* 207: 27-41

**Matt, P.,** Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Krapp, A. and Stitt, M. (2001a):

The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: A major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period; *Plant Cell Environ* 24: 177-190

**Matt, P.,** Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Krapp, A. and Stitt, M. (2001b):

Elevated carbon dioxide increase nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate; *Plant Cell Environ* 24: 1119-1137

**Matt, P.,** Krapp, A., Haake, V., Mock, H.-P. and Stitt, M. (2002):

Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense *RBCS* transformants; *Plant J* 30: 663-677

**McNally, S. F.,** Hirel, B., Gadai, P., Mann, A. F. and Stewart, G. R. (1983):

Glutamine synthetases of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf; *Plant Phys* 72: 22-25

**Meinkoth, J. and Wahl G.** (1984):

Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on Solid Supports; *Anal Biochem* 138: 267-284

**Mifflin, B.J. and Lea P.J.** (1977):

Amino acid metabolism; *Annu Rev Plant Physiol* 28: 299-329

**Miquel, M. and Browse, J.** (1992):

Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis; *JBC* 267(3): 1502-1509

**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 storage protein synthesis and is regulated by amino acid supply; *Plant J* 28: 61-72

**Miranda, M.,** Borisjuk, L., Tewes, A., Dietrich, D., Rentsch, D., Weber, H. and Wobus U. (2003):

Peptide and Amino Acid Transporters Are Differentially Regulated during Seed

- Development and Germination in Faba Bean; *Plant Phys* 132: 1950-1960
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987):  
Specific Synthesis of DNA *in Vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction;  
*Methods of Enzymology* 155: 335-350
- Murray M. G. and Thompson W. F.** (1980):  
Rapid isolation of high molecular weight plant DNA; *Nucleic Acids Res* 8 (19): 4321-4325
- Neuhaus, H. E., Thom, E., Möhlmann, T., Steup, M. and Kampfenkel, K.** (1997):  
Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana* L.; *Plant J* 11: 73-82
- Nguyen, T. H.** (2008):  
Novel plastidial phosphate translocators and their role during legume seed development; Dissertation, Universität Greifswald
- Nomura, M., Mai, H. T., Fujii, M., Hata, S., Izui, K. and Tajima, S.** (2006):  
Phosphoenolpyruvate Carboxylase Plays a Crucial Role in Limiting Nitrogen Fixation in *Lotus japonicus* Nodules; *Plant Cell Physiol* 47(5): 613-621
- Ohlrogge, J. and Browse, J.** (1995):  
Lipid Biosynthesis; *Plant Cell* 7: 957-970
- Ohyanagi, H., Tanaka, T., Sakai, H., Shigemoto, Y., Yamaguchi, K., Habara, T., Fuji, Y., Antonio, B. A., Nagamura, Y., Imanishi, T., Ikeo, K., Iton, T., Gojobori, T. and Sasaki, T.** (2006):  
The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. *Japonica* genome information; *NAR* 34: Database issue
- Peterman, T. K. and Goodman, H. M.** (1991):  
The glutamine synthase family of *Arabidopsis thaliana*: lightregulation and different expression in leaves, roots and seeds; *Mol Gen Genet* 230: 145-154
- Picault, N., Palmieri, L., Pisano, I., Hodges, M. and Palmieri, F.** (2002):  
Identification of a Novel Transporter for Dicarboxylates and Tricarboxylates in Plant Mitochondria; *JBC* 277(27): 24204-24211
- Pniewski, T. and Kapusta, J.** (2005):  
Efficiency of transformation of Polish cultivars of pea (*Pisum sativum* L.) with various regeneration capacity by using hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strains; *J Appl Genet* 46(2): 139-147
- Poa, S. S., Paulsen, I. T. and Saier, M. H. Jr.** (1998):  
Major facility superfamily; *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1-34
- Pohlmeier, 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; *PNAS* 94: 9504-9509

- Pos, K. M.,** Dimroth, P. and Boot, M. (1998):  
The *Escherichia coli* Citrate Carrier CitT: a Member of a Novel Eubacterial Transporter Family Related to the 2-Oxoglutarate/Malate Translocator from Spinach Chloroplasts; *J Bacteriol* 180(16): 4160-4165
- Quick, W. P.,** Scheibe, R. and Neuhaus, H. E. (1995):  
Induction of Hexose-Phosphate Translocator Activity in Spinach Chloroplasts; *Plant Phys* 109: 113-121
- Radchuk, R.,** Radchuk, V., Weschke, W., Borisjuk, L. und 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 Phys* 140: 263-278
- Rawsthorne, S.** (2002):  
Carbon flux and fatty acid synthesis in plants; *Prog Lipid Res* 41: 182-196
- Renne, P.,** Dressen, U., Hebbeker, U., Hille, D., Flügge, U. I., Westhof, P. and Weber, A. P. M. (2003):  
The Arabidopsis mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2; *The Plant Journal* 35: 316-331
- 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
- Rogowsky, P. M.,** Guidet, F. L. Y., Langridge, P., Shepherd, K. W. and Koebner, R. M. D. (1991):  
Isolation and characterization of wheat-rye recombinants involving chromosome arm 1DS of wheat; *Theor Appl Genet* 82: 537-544
- Rohde, A.,** De Rycke, R., Beeckman, T., Engler, G., Van Montagu, M. and Boejan, W. (2000):  
ABI3 Affects Plastid Differentiation in Dark-Grown Arabidopsis Seedlings; *Plant Cell* 12: 35-52
- Rolletschek, H.,** Borisjuk, L., Koschorreck, M., Wobus, U. and Weber H. (2002):  
Legume embryos develop in a hypoxic environment; *J Exp Bot* 53(371): 1099-1107
- Rolletschek, H.,** Hajirezaei, MR., 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.,** 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 Biotech J* 2: 211-219

- 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 Phys* 137: 1236-1249
- Rolletschek, H.**, Nguyen, T. H., Häusler, R. H., Rutten, T., Göbel, C., Feussner, I., Radchuk, R., Tewes, A., Claus, B., Klukas, C., Linemann, U., Weber, H., Wobus U. and Borisjuk L. (2007):  
Antisense inhibition of the plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocator in *Vicia* seeds shifts cellular differentiation and promotes protein storage; *The Plant Journal* 51: 468-484
- Rosahl, S.**, Schell, J. and Willmitzer, L. (1987):  
Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants: demonstration of an esterase activity; *The EMBO Journal* 6(5): 1155-1159
- Saalbach, I.**, Giersberg, M. and Conrad, U. (2001):  
High-level expression of a single-chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds; *J. Plant Physiol.* 158, 529-533
- Saghai-Marroof, M. A.**, Soliman, K. M., Jorgensen R. A. and Allard R. W. (1984):  
Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics; *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014-8018
- Saiki, R. K.**, Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988):  
Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase; *Science* 239: 487-491
- Sakakibara, H.**, Watanabe, M., Hase, T. and Sugiyama, T. (1991):  
Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf; *JBC* 266: 2028-2035
- Sakakibara, H.**, Watanabe, M., Takahashi, H., Hase, T. and Sugiyama, T. (1992):  
Molecular Cloning of the Family of Glutamine Synthetase Genes from Maize: Expression of Genes for Glutamine Synthetase and Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase in Photosynthetic and Non-Photosynthetic Tissues; *Plant Cell Physiol* 33(1): 49-58
- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2001):  
Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Third Edition  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Scheibe, R.** (2004):  
Malate valves to balance cellular energy supply; *Physiologia Plantarum* 120: 21-26
- Scheible, W.-R.**, González-Fontes, A., Lauerer, M., Müller-Röber, B., Caboche, M. and Stitt, M. (1997a):  
Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch

Metabolism in Tobacco; *Plant Cell* 9: 783-798

- Scheible, W.-R.**, González-Fontes, A., Morcuende, R., Lauerer, M., Geiger, M., Glaab, J., Gojon, A., Schulze, E.-D. and Stitt, M. (1997b):  
Tobacco mutants with a decreased number of functional nia genes compensate by modifying the diurnal regulation of transcription, posttranslational modification and turnover of nitrate reductase; *Planta* 203: 304-319
- Schneiderei, J.**, Häusler, R. E., Fiene, G., Werner, M. K. and Weber A. P. M. (2006):  
Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism; *Plant J* 45: 206-224
- Schönbeck, M. A.**, Temple, S. J., Trepp, G. B., Blumenthal, J. M., Samac, D. A., Gantt, J. S., Hernandez, G. and Vance, C. P. (2000):  
Decreased NADH glutamate synthase activity in nodules and flowers of alfalfa (*Medicago sativa* L.) transformed with an antisense glutamate synthase transgene; *J Exp Bot* 51(342): 29-39
- Schroeder, H. E.**, Schotz, A. H., Wardley-Richardson, T., Spencer, D. and Higgins, T. J. V. (1993):  
Transformation and Regeneration of Two Cultivars of Pea (*Pisum sativum* L.); *Plant Phys* 101: 751-757
- Schultz, C. J.**, Hsu, M., Miesak, B. and Coruzzi, G. M. (1998):  
*Arabidopsis* mutants define an *in vivo* role for isoenzymes of aspartate aminotransferase in plant nitrogen assimilation; *Genetics* 149: 491-499
- Schwacke, R.**, Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, WB, Flügge, U.-I. and Kunze, R. (2003):  
ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins; *Plant Phys* 131: 16-26
- Sechley, K. A.**, Yamaya, T. and Oaks A. (1992):  
Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants; *Int Rev Cyt* 134: 85-163
- Shimada, T.**, Yamada, K., Kataoka, M., Nakaune, S., Koumoto, Y., Kuroyanagi, M., Tabata, S., Kato, T., Shinozaki, K., Seki, M., Kobayashi, M., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2003):  
Vacuolar Processing Enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*; *JBC* 278(34): 32292-32299
- Sieciechowicz, K. A.**, Joy, K. W. and Ireland, R. J. (1988):  
The Metabolism of Asparagine in plants; *Phytochemistry* 27(3): 663-671
- Singh, B. K. and Shaner D. L.** (1995):  
Biosynthesis of branched chain amino acids: From test tube to field; *Plant Cell* 7: 935-944

- Slocum, R. D.** (2005):  
Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants; *Plant Phys Biochem* 43: 729-745
- Smeekens, S.** (2000):  
Sugar-induced signal transduction in plants; *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 49-81
- Smith, A. M.,** Quinton-Tulloch, J. and Denyer, K. (1990):  
Characterisation of plastids responsible for starch synthesis in developing pea embryos; *Planta* 180: 517-523
- Smith, C. S.,** Zaplachinski, S. T., Muench, D. and Moorhead, G. B. G. (2002):  
Expression and purification of the chloroplast putative nitrogen sensor PII of *Arabidopsis thaliana*; *Protein Expr Purif* 25: 2-7
- Smith, D. L.** (1973):  
Nucleic Acid, Protein, and Starch Synthesis in Developing Cotyledons of *Pisum arvense* L.; *Annals of Botany* 37: 795-804
- Solomonson, L. P. and Barber, M. J.** (1990):  
Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation; *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 41, 225-253
- Somerville, S. C. and Somerville, C. R.** (1985):  
A mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplasts dicarboxylate transport is missing an envelope protein; *Plant Sci Lett* 37: 317-320
- Southern, E. M.** (1975):  
Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis; *J Mol Biol* 98, 503-517
- Stanford, A. C.,** Larsen, K., Barker, D. G. and Cullimore, J. V. (1993):  
Differential Expression within the Glutamine Synthetase Gene Family of the Model Legume *Medicago truncatula*; *Plant Phys* 103: 73-81
- Stitt, M. and Krapp, A.** (1999):  
The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background; *Plant Cell Environ* 22: 583-621
- Sugiyama, K.,** Hayakawa, T., Kudo, T., Ito, T. and Yamaya, T. (2004):  
Interaction of N-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice; *Plant Cell Phys* 45: 1768-1778
- Sun, J. Y.,** Chen, Y. M., Wang, Q. M., Chen, J. and Wang, X. C. (2006):  
Glucose inhibits the expression of triose phosphate/phosphate translocator gene in wheat via hexokinase-dependent mechanism; *Int J Biochem Cell Biol* 38(7): 1102-1113

- Suzuki, A. and Gadai, P.** (1984):  
 Glutamate synthase: physiochemical and functional properties of different forms in higher plants and other organisms; *Physiol Veg* 22: 461-471
- Suzuki, A. and Rothstein, S.** (1997):  
 Structure and regulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Arabidopsis thaliana*; *Eur J Biochem* 34(5): 708-718
- Suzuki, A. and Knaff, D. B.** (2005):  
 Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism; *Photosyn Res* 83: 191-217
- Swain, S.M., Ross, J.J., Reid, J.B. and Kamiya, Y.** (1995):  
 Gibberellins and pea seed development. Expression of the lhi, ls and le5839 mutations; *Planta* 195: 426-433
- Szamosi, I. T., Shaner, D. L. and Singh, B. K.** (1994):  
 Inhibition of three nine dehydratase is herbicidal; *Plant Phys* 106: 1257-1260
- Taira, M., Valtersson, U., Burkhardt, B. and Ludwig, R. A.** (2004):  
*Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts; *Plant Cell* 16: 2048-2058
- Tan, S., Evans, R. and Singh, B.** (2006):  
 Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops; *Amino Acids* 30: 195-204
- Taniguchi, M. and Sugiyama, T.** (1996):  
 Isolation, characterization and expression of cDNA clones encoding a mitochondrial malate translocator from *Panicum miliaceum* L.; *Plant Mol Biol* 30: 51-64
- Taniguchi, M., Taniguchi, Y., Kawasaki, M., Takeda, S., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Miyake, H. and Sugiyama, T.** (2002):  
 Identifying and Characterizing Plastidic 2-Oxoglutarate/Malate and Dicarboxylate Transporters in *Arabidopsis thaliana*; *Plant Cell Physiol.* 43(7): 706-717
- Taniguchi, M., Abiko, T. and Yamaya, T.** (2007):  
 Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.); *J Exp Bot* 58(9): 2319-2327
- Taniguchi, Y., Nagasaki, J., Kawasaki, M., Miyake, H., Sugiyama, T. and Taniguchi, M.** (2004):  
 Differentiation of Dicarboxylate Transporters in Mesophyll and Bundle Sheath Chloroplasts of Maize; *Plant Cell Physiol.* 45(2): 187-200
- Temple, S. J., Vance, C. P. and Gantt, J. S.** (1998):  
 Glutamate synthase and nitrogen assimilation; *Trends in Plant Science*, Review 3(2): 51-56

- Tetlow, I. J.,** Morell, M. K. and Emes, M. J. (2004):  
Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants; *J Exp Bot* 55(406): 2131-2145
- Thieme, R.,** Darsow, U., Gavrilenko, T., Dorokhov, D. and Tiemann H.(1997):  
Production of somatic hybrids between *S. tuberosum* L. and late blight resistant Mexican wild potato species; *Euphytica* 97: 189-200
- Tingey, S. V. and Coruzzi, G. M.** (1987):  
Glutamine Synthetase of *Nicotiana plumbaginifolia*; *Plant Phys* 84: 366-373
- Tingey, S. V.,** Tsai, F. Y., Edwards, J. W. and Coruzzi, G. M. (1988):  
Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed in vivo; *JBC* 263: 9651-9657
- Tognetti, V. B.,** Zurbriggen, M. D., Morandi, E. N., Fillat, M. F., Valle, E. M., Hajirezaei, M.-R. and Carrillo, N. (2007):  
Enhanced plant tolerance to iron starvation by functional substitution of chloroplast ferredoxin with a bacterial flavodoxin; *Proc Natl Acad Sci USA* 104(27): 11495-11500
- Touraine, B. and Glass, A. D. M.** (1997):  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> fluxes in the *chl1 5* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Does the CHL1-5 gene encode a low affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter?; *Plant Phys* 114: 137-144
- Triplett, EW.** (2000):  
Prokaryotic nitrogen fixation; *Wyomdham Horizon Scientific Press*
- Trueman, L. J.,** Richardson, A. and Forde, B. G. (1996):  
Molecular cloning of higher plant homologues of the high affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*; *Gene* 175: 223-231
- Tsay, Y. F.,** Schroeder, J. I., Feldman, K. A. and Crawford, N. M. (1993):  
The herbicide sensitive gene *chl1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible transporter; *Cell* 72: 705-713
- Turpin, D.H. and Weger, H. G.** (1990):  
Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation. In *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, ed. DT Dennis, DH Turpin: 422-433. Singapore: Longman Scientific
- Urquhart, A. A. and Joy K. W.** (1982):  
Transport, Metabolism, and Redistribution of Xylem-Borne Amino Acids in Developing Pea Shoots; *Plant Phys* 69: 1226-1232
- Valentin, K.,** Kostrzewa, M. and Zetsche, K. (1993):  
Glutamate synthase is plastid-encoded in a red alga: implications for the evolution of glutamate synthases; *Plant Mol Biol* 23: 77-85
- Vance, C. P.,** Gregerson, R. G., Robinson, D. L., Miller, S. S and Gantt, J. S. (1994):  
Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes

- involved; *Plant Science* 101: 51-64
- Vance, C. P.**, Miller, S. S., Gregerson, R. G., Samac, D. A., Robinson, D. L. and Gantt, J. S. (1995):  
Alfalfa NADH-dependent glutamate synthase: structure of the gene and importance in symbiotic N<sub>2</sub> fixation; *Plant J* 8(3): 345-358
- Wallsgrave, R. M.**, Harel, E., Lea, P. J. and Mifflin, B. J. (1977):  
Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants; *J Exp Bot* 28: 588-596
- Wallsgrave, R. M.**, Kendall, A. C., Hall, N. P., Turner, J. C. and Lea, P. J. (1986):  
Carbon and nitrogen metabolism in a barley (*Hordeum vulgare* L.) mutant with impaired chloroplast dicarboxylate transport; *Plant* 168: 324-329
- Weber, A.**, Menzlaff, E., Arbinger, B., Gutensohn, M., Eckerskorn, C. and Flügge, U. I. (1995):  
The Oxoglutarate/Malate Translocator of Chloroplast Envelope Membranes: Molecular Cloning of a Transporter containing a 12-Helix Motif and Expression of the functional protein in yeast cells; *Biochemistry* 34: 2621-2627
- Weber, A. P. M. and Flügge, U. I.** (2002):  
Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants; *J Exp Bot* 53(370): 865-874
- Weber, A. P. M.** (2004):  
Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma; *Curr Opin Plant Biol* 7: 247-253
- Weber, H.**, Borisjuk, L., Heim, U., Buchner, P. and Wobus, U. (1995):  
Seed Coat-Associated Invertases of Fava Bean Control Both Unloading and Storage Functions: Cloning of cDNAs and Cell Type-Specific Expression; *Plant Cell* 7: 1835-1846
- Weber, H.**, Buchner, P., Borisjuk, L. and Wobus, U. (1996a):  
Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression pattern, metabolic regulation and implications on seed development; *Plant J* 9: 841-850
- Weber, H.**, Borisjuk, L. and Wobus, U. (1996b):  
Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state; *Plant J* 10: 823-834
- Weber, H.**, Borisjuk, L. and Wobus, U. (1997):  
A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in faba bean seeds; *Plant Cell* 9: 895-908
- Weber, H.**, Heim, U., Golombek, S., Borisjuk, L. and Wobus, U. (1998):  
Assimilate uptake and the regulation of seed development; *Seed Sci Res* 8: 331-345

- 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 J* 24(1): 33-43
- Weber, H.,** Borisjuk, L. and Wobus, U. (2005):  
Molecular Physiology of Legume Seed Development; *Annu Rev Plant Biol* 56: 253-279
- 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 J* 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 Phys* 149: 1-17
- Winter, H. and Huber, S. C.** (2000):  
Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes; *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 253-289
- Woo, K. C.,** Flügge, U. I. and Heldt, H. W. (1987a):  
A Two-Translocator Model for the Transport of 2-Oxoglutarate and Glutamate in Chloroplasts during Ammonia Assimilation in the Light; *Plant Physiol* 84: 624-632
- Woo, K. C.,** Boyle, F. A., Flügge, U. I. and Heldt, H. W. (1987b):  
15N-Ammonia Assimilation, 2-Oxoglutarate Transport and Glutamate Export in Spinach Chloroplasts in the Presence of Dicarboxylates in the Light; *Plant Physiol* 85: 621-625
- Yu, J. and Woo, K. C.** (1992a):  
Ammonia assimilation and metabolic transport in isolated chloroplasts. I. Kinetic measurement of 2-oxoglutarate and malate uptake via the 2-oxoglutarate translocator in oat and spinach chloroplasts; *Austr J Plant Phys* 19: 653-658
- Yu, J. and Woo, K. C.** (1992b):  
Ammonia assimilation and metabolic transport in isolated chloroplasts. II. Malate stimulates ammonia assimilation in chloroplasts isolated from leaves of decotyledonous but not monocotyledonous species; *Austr J Plant Phys* 19: 659-669

## VIII. Anhang

### 1. Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Die Chemikalien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, kamen von den Firmen Biozym Diagnostik (Hess. Oldendorf), Difco (Detroit MI, USA), Duchefa (Niederlande), Fluka (Schweiz), Gibco-BRL (heute Invitrogen, Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden geliefert von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Boehringer (Mannheim).

#### 1.1. Lösungen für Molekularbiologische Methoden

##### 1.1.1. Isolation pflanzlicher genomischer DNA

##### 1.1.1.1. Isolationsmethode nach Rogowsky *et al.*, 1991

Extraktionspuffer	1 % N-Lauryl-Sarcosin 100 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM NaCl 10 mM EDTA pH 8,0	4 °C
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	25 : 24 : 1	4 °C
Natriumacetat	3 M	4 °C
Isopropanol		4 °C
Ethanol	70 % (v/v)	- 20 °C
RNase	40 µg/ml	- 20 °C

##### 1.1.1.2. Isolationsmethode nach Edwards *et al.*, 1991

Extraktionspuffer	200 mM Tris/HCl pH 8,0 250 mM NaCl 25 mM EDTA 0,5 % SDS (v/v)	4 °C
-------------------	--	------

Kaliumacetat	5 M	4 °C
Isopropanol		4 °C
Ethanol	80 % (v/v)	- 20 °C

1.1.1.3. Isolationsmethode nach Saghai-Maroff *et al.*, 1984

Extraktionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 0,2 M NaCl 10 mM DTT 10 mM EDTA 0,2 % SDS (v/v)	4 °C
Phenol/TE		4 °C
Chloroform		RT
Ethanol	96 % (v/v)	- 20 °C
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0	RT
NH <sub>4</sub> -Acetat	7,5 M	4 °C
Ethanol	70 % (v/v)	- 20 °C

## 1.1.2. Agarosegel für DNA

50 x TAE	400 mM Tris 30 mM Na-Acetat 10 mM EDTA	RT
	→ zur Verwendung als Laufpuffer auf 1 x TAE verdünnen (100 ml in 5 l)	
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	100 µl Konzentrat (0,5 mg DNA/ml) + 100 µl 6 x Ladepuffer + 400 ddWasser	4 °C
6 x Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylencyanol (w/v) 30 % Glycerin (v/v) 10 mM EDTA	4 °C
Spermidin	40 mM	- 20 °C
1 % Agarose	1 g Agarose	RT

- + 100 ml 1 x TAE
- + 1  $\mu$  Ethidiumbromid

## 1.1.3. Southern-Blot

20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat	RT
Depurinierung	0,25 M HCl	RT
Denaturierung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH	RT
Neutralisierung	0,5 M Tris/HCl pH 8,0 3 M NaCl	RT
Spüllösung	40 mM Phosphatpuffer pH 7,0 1 % SDS 2 mM EDTA	RT

## 1.1.4. RNA-Präparation

Extraktionspuffer	1 M Tris pH 9,0 1 % SDS 10 mM EDTA	4 °C
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	25 : 24 : 1	4 °C
Natriumacetat	3 M	4 °C
Ethanol	96 % (v/v)	4 °C
Lithiumchlorid	4 M	4 °C
Lithiumchlorid	2 M	4 °C
Ethanol	70 % (v/v)	- 20 °C

## 1.1.5. Denaturierendes RNA-Agarose-Gel

Probenpuffer	500 $\mu$ l Formamid + 100 $\mu$ l 10 x MOPS + 160 $\mu$ l 37 % Formaldehyd	RT
1 % Agarosegel	100 ml 1 g Agarose + 10 ml 10 x MOPS	RT

+ 73 ml H<sub>2</sub>O (DEPC)

→ aufkochen, auf 50 °C abkühlen lassen  
+ 17 µ 37 % Formaldehyd

10 x MOPS	0,2 M MOPS 0,05 M Na-Acetat pH 7,0 0,01 M EDTA	RT
-----------	--	----

→ zur Verwendung als Laufpuffer auf 1 x MOPS verdünnen

### 1.1.6. Northern-Blot

20 x SSPE	3,6 M NaCl 20 mM EDTA 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 0,02 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (· 2 H <sub>2</sub> O)	RT
-----------	---	----

→ zur Verwendung als Spüllösung auf 2 x SSPE verdünnen

### 1.1.7. Hybridisierung

Na-Phosphatpuffer	0,5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	RT
-------------------	--	----

→  $\frac{2}{3}$  Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7,0 einstellen

Churchpuffer	0,5 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0 2 mM EDTA 1 % BSA (w/v) 7 % SDS (v/v)	- 20 °C
--------------	---	---------

Sonicated Salmon Sperm DNA	10 mg/ml	- 20 °C
----------------------------	----------	---------

Spüllösung	40 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 2 mM EDTA 1 % SDS (v/v)	RT
------------	--	----

Lösung I zum Strippen	0,1 x SSC (v/v) 0,1 % SDS (v/v) 0,2 M Tris/HCl pH 7,5	RT
-----------------------	---	----

Lösung II zum Strippen	0,4 M NaOH	RT
------------------------	------------	----

Lösung III zum Strippen	0,1 x SSC 0,1 % SDS (v/v)	RT
-------------------------	------------------------------	----

1.1.8. Kulturmedia für *Escherchia coli*

LB-Medium	1 l	5 g Trypton + 5 g Hefeextrakt + 10 g Natriumchlorid pH 7,4 (NaOH), autoklavieren für Festmedium + 15g Agar	RT
-----------	-----	--	----

1.1.9. Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherchia coli*  
(nach Sambrook et al., 2001)

Lösung I	1 ml	250 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 1 % Glucose (w/v) → + 4 mg Lysozym, mit ddWasser auffüllen	RT
Lösung II		200 mM NaOH 1 % SDS (w/v)	RT
Lösung III		5 M Kaliumacetat	RT
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol		25 : 24 : 1	4 °C
Chloroform			RT
Ethanol		96 % (v/v)	- 20 °C
TE		10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0	RT

1.1.10. Kulturmedia für *Agrobacterium tumefaciens*

YEB-Medium	1 l	0,5 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O + 5 g Fleischextrakt + 2 g Hefeextrakt + 5 g Pepton + 5 g Saccharose pH 5,8 (NaOH), autoklavieren für Festmedium + 15g Agar	RT
------------	-----	--	----

1.1.11. Isolation von genomische DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*

TE		10 mM Tris pH 8,0	RT
----	--	-------------------	----

	1 mM EDTA pH 8,0	
Sarkosyl	5 % gelöst in TE	RT
Proteinase K	2,5 mg/ml TE	RT
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	25 : 24 : 1	4 °C
Chloroform		RT
Natriumacetat	5 M	4 °C
Ethanol	96 % (v/v)	- 20 °C
Tris	1 M Tris/HCl pH 8,0	4 °C
EDTA	0,5 M EDTA pH 8,0	4 °C

#### 1.1.12. Generierung einer Phagen c-DNA-Bank aus Samen von *Pisum sativum*

TEN-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 0,1 mM EDTA 25 mM NaCl	RT
MgSO <sub>4</sub>	10 mM	RT
SM-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM NaCl 1 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mg Gelantine je 100 ml	RT
Spüllösung I	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl	RT
Spüllösung II	0,5 M Tris/HCl pH 8,0 1,5 M NaCl	RT

#### 1.1.13. Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Vitaminlösung	100 ml	10 mg Thiamin-HCl + 5 mg Pyridoxin-HCl + 5 mg Nicitinsäure + 5 g Morpholinoethansulphonsäure + 1 g Inosit	- 20 °C
---------------	--------	---	---------

→ in Aliquots zu 10 ml einfrieren

Infektionsmedium	1 l	2,652 g MS Mikro- und Makrosalze (Duchefa M0222) + 50 g Saccharose (5 %) + 10 ml Vitaminlösung	4 °C
	→	auf 1 l auffüllen, pH 6,0 einstellen + 400 µl Silwet L-77	
Wachstumsmedium	1 l	4,6 g MS + Mikro- und Makrosalze (Duchefa M0222) + 10 g Saccharose + 10 ml Vitaminlösung	4 °C
	→	auf pH 5,9 einstellen, zu 5 x 200 ml abfüllen (je 1,6 g Agar)	
Ethanol		70 % (v/v)	RT
Sterilisierung		5 % NaOCl (v/v) 0,02 % Triton X-100 (v/v)	RT

1.1.14. Transformation von *Pisum sativum*

Ethanol		70 % (v/v)	RT
Sterilisierung		5 % NaOCl (v/v)	RT
B5-Medium	1 l	2070 mg KNO <sub>3</sub> + 1029 mg CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O + 500 mg MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O + 134 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 150 mg NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O + 30 g Saccharose  + 10 mg Glutathion + 800 mg Glutamin + 1 mg Adenin + 100 mg Serin + 1 mg 2,4 D + 0,2 mg Kinetin  + 2 g Mikroelemente (Duchefa M0301) + 112 g Vitamine B5	4 °C
	→	pH 5,8 einstellen, autoklavieren für Festmedium zusätzlich  + 5 g/l Gelrite (Duchefa G 1101) + 200 mg 3,5 – Dimethoxy-4-hydroxy-acetohenone + 1 mg Cystein	
Vitamin B5	1 l	100 mg myo-Inositol	4 °C

		+ 1 mg Nikotinsäure + 1 mg Pyridoxin + 10 mg Thiamin	
P1-Medium	1 l	4,3 g MS-Medium including B5 Vitamine (Duchefa M0231) + 30 g Saccharose + 2 mg 2-Benzylaminopurine + 2 mg 1-Naphthylethylsäure + 5 g Gelrite	4 °C
		→ pH 5,8 einstellen, autoklavieren; + 400 mg Ticarcillin + 10 mg Phosphinotricin	
MS4BA-Medium	1 l	4,4 g MS-Medium Mod. Nr. 4 (Duchefa M0238) + 0,004 g 2-Benzylaminopurine + 2 g 2-(N-morpholino)ethanesulfonsäure + 30 g Saccharose + 5 g Gelrite	4 °C
		→ pH 5,7 einstellen, autoklavieren; + 0,0001 g 3-Indolylbuttersäure (IBS) + 400 mg Ticarcillin + 10 mg / 5 mg Phosphinotricin	

### 1.1.15. Histologische Analysen von Samen

FAA	50 % Ethanol (v/v) 5 % Eisessig (v/v) 4 % Formaldehyd (v/v)	RT
Ethanol	50 %, 60 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 %	RT
Roti-Histol	30 %, 60 %, 100 % (v/v)	RT
Paraplast		RT
Toluidinblau	0,1 % in Ethanol	RT
Lugolsche Lösung	Kalimiodid : Iod (2 : 1)	RT
Coomassie-Lösung	0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol	RT

## 1.2. Lösungen für Biochemische Methoden

## 1.2.1. Bestimmung des Gehaltes von Saccharose und Stärke

Extraktionspuffer	80 % Ethanol (v/v)	4 °C
Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6DH)	2 U/ml	4 °C
Hexokinase (HK)	7,5 U/ml & 3,8 U/ml	4 °C
Phosphoglucoseisomerase (PGI)	5 U/ml	4 °C
Citratpuffer	0,32 M pH 4,6	4 °C
Fructosidase	1812 U/ml Citratpuffer	4 °C
Lösung 1	100 mM Imidazol pH 6,9 5 mM MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	4 °C
Lösung 2	2 mM NAD	4 °C
Lösung 3	1 mM ATP	4 °C
Bestimmungspuffer	Lösung 1, 2, 3 im Verhältnis 90 : 5 : 5 mischen	
Citratpuffer	0,32 M pH 4,6	4 °C
Amyloglucosidase		4 °C

## 1.2.2. Bestimmung des Gehaltes von Speicherproteinen

Sluytermann-Puffer	100 ml	10 ml DMSO + 0,5 ml N-Butanol + 50 ml 0,05 M Acetatpuffer pH 4,5 + 0,74 g KCl	4 °C
Acetatpuffer		0,1 M Essigsäure 0,1 M Natriumacetat	RT
		→ Essigsäure mit Natriumacetat auf pH 4,5 einstellen	
Phosphat-Puffer	250 ml	3,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 4,45 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O + 9,25 g KCl	4 °C
		→ auf pH 7,0 einstellen	

## 1.2.3. Bestimmung des Ammoniumgehaltes

Extraktionspuffer	5 x Universalextraktionspuffer	4 °C
Bestimmungspuffer	100 mM Tris/HCl pH 7,8 0,4 mM NADH 0,01 mM ADP 0,1 mM Oxoglutarat	4 °C
	→ Starter: 5U Glutamindehydrogenase (GIDH)	

1.2.4. Bestimmung des Gehaltes freier Aminosäuren mittels *reverse phase* HPLC

Puffer A	7 mM Triethanolamin Hydrochlorid 140 mM Natriumacetat	RT
	→ pH 5,8 mit Essigsäure einstellen	
Puffer B	Acetonitril	RT
Puffer C	Millipore-Wasser	RT

## 1.2.5. Bestimmung des Gehaltes von Lipiden mittels Gaschromatographie

FAME-Lösung	2,5 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/v) 2 % Dimethoxypropan (v/v) gelöst in Methanol	4 °C
Glyceryl-Triheptadecanat	10 mg/ml Toluol	
NaCl-Lösung	gesättigt	RT
n-Hexan		RT
Acetonitril		RT

## 1.2.6. Bestimmung des Gehaltes von organischen Säuren mittels Ionenchromatographie

Perchlorsäure	1 M	RT
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 M	RT

Chloroform/Methanol/Wasser	1 : 3 : 1 (V/V/V)	RT
Puffer A	Millipore-Wasser	RT
Puffer B	100 mM Natriumhydroxyd	RT
<b>1.2.7. Enzymassays</b>		
Universalextraktionspuffer	100 mM MOPS pH 7,4 10 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 1 mM EGTA 2 mM DTT 1 mM PMSF	4 °C
<b>1.2.7.1. ADP-Glucose-Pyrophosphorylase-Aktivitätsassays</b>		
Extraktionspuffer	50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,0 5 mM EDTA 5 mM DTT	4 °C
Bestimmungspuffer	100 mM HEPES pH 7,8 5 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM ADP-Glucose 0,5 mM NAD → Starter: 2 mM Natrium-Pyrophosphat	4 °C
Phosphoglucomutase	2 U	4 °C
Glucose-6-Phosphodehydrogenase	5 U	4 °C
<b>1.2.7.2. Aspartat-Aminotransferase-Aktivitätsassays</b>		
Extraktionspuffer	5 x Universalextraktionspuffer	4 °C
Bestimmungspuffer	200 mM L-Asparaginsäure 100 mM Tris/HCl pH 7,8 0,4 mM NADH 0,11 mM Pyridoxalphosphat 1 U/ml Malat Dehydrogenase (MDH) 0,5 U/ml L-Lactat Dehydrogenase (LDH) → Starter: 12 mM Oxoglutarat	4 °C

## 1.2.7.3. Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivitätsassays

Extraktionspuffer	50 mM HEPES 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 5 mM DTT 10 % Glycerin (w/v) 1 mM EGTA	4 °C
Bestimmungspuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,0 5 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 1 mM KHCO <sub>3</sub> 0,2 mM NADH 5 mM Glucose-6-phosphat 4 U/ml Malat Dehydrogenase (MDH) 50 mM Phosphoenolpyruvat	4 °C

## 1.2.7.4. Glutaminsynthetase-Aktivitätsassays

Extraktionsspuffer	100 mM Tris/HCl pH 7,8 1 mM EDTA 1 mM DTT 10 mM MgSO <sub>4</sub> 100 mM KCl 0,1 % 2-Mercaptoethanol (v/v) 0,5 % Triton X-100 20 % Glycerin (v/v)	4 °C
Bestimmungspuffer	100 mM Tris/HCl pH 7,8 10 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 10 % Glycerin 0,2 mM NADH 1 mM PEP 5 mM ATP 5,5 U L-Lactat Dehydrogenase (LDH) 5 U Pyruvatkinase (PK)	4 °C
	→ Starter: 1 mM NH <sub>4</sub> Cl + 15 mM Glutamat	

Inhibitor	10 mM Methioninsulfoximin	4 °C
-----------	---------------------------	------

## 1.2.7.5. Saccharosesynthase-Aktivitätsassays

Extraktionspuffer	100 mM MOPS 10 mM MgCl <sub>2</sub> (· 6 H <sub>2</sub> O)	4 °C
-------------------	---	------

	1 mM EDTA 2 mM DTT 1 mM PMSF	
Bestimmungspuffer Lösung I	75 mM HEPES/KOH pH 7,5 7 mM MgCl <sub>2</sub> (· 6 H <sub>2</sub> O) 4 mM Uridin-5'-diphosphat 200 mM Saccharose	4 °C
Bestimmungspuffer Lösung II	200 mM Glycin 5 mM MgCl <sub>2</sub> (· 6 H <sub>2</sub> O) 1 mM NAD	4 °C
	→ auf pH 8,8 einstellen	
UDP-Glucose-Dehydrogenase	2 U in 1 ml 1 mM DTT-Lösung	4 °C

### 1.2.8. Transportmessungen

Liposomenpräparation	440 mM Tricine/KOH pH 7,8 220 mM K-Gluconat	4 °C
Austauschsubstrat	132 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaOH pH 7,8 132 mM Malat 132 mM Oxoglutarat 132 mM Na-Gluconat	4 °C
Extraktionsmedium	0,2 M Tricine/KOH pH 8,0 10 mM EDTA 6 mM Ascorbat/KOH pH 8,0 4 mM DTT 0,1 % BSA (w/v) 0,1 % Polycar AT	4 °C
PD-10-Puffer	100 mM Na-Gluconat 50 mM K-Gluconat 10 mM Tricine/KOH pH 7,6	4 °C
Triton X-100	20 % (v/v)	RT
Natriumacetat	0,2 M	4 °C
Rotizint		RT
HCl	1 M	RT
Natriumazid	0,1 % (v/v)	RT



VIII. Anhang

	<b>S I A T G V I I W F L</b> P P - P A G V S R N A W Q <b>L L A I F L</b>	Majority
	-----+-----+-----+-----	
	130 140 150	
98	S I A T G L I L W F V P V - P E G V T R N A W Q L L A I F L	AtOMT.pro
94	S L A V G L A V R F L A P R P A E V T P Q A W Q L L S I F L	OsOMT.pro
102	S L A V G L A V R F L A P R P A E V S P R A W Q L L S I F L	SbOMT.pro
110	S I L T G V I I W F I P T - P E G V S R N A W Q L L A I F L	SoOMT.pro
119	S I A T G V L I W L I P P - P A G V P R N A W Q L L A I F L	ZmOMT.pro
20	S I A T G V I I W F L P T - P E G V S R N A W Q L L A I F L	PsOMT.pro
	<b>S T I V G I I T Q P L P L G A V A L L</b> G L G A S V L T K T L	Majority
	-----+-----+-----+-----	
	160 170 180	
127	A T I V G I I T Q P L P L G A V A L M G L G A S V L T K T L	AtOMT.pro
124	T T I A G L V L G P L P V G A W A F L G L T A T V A T R T L	OsOMT.pro
132	S T I A G L V L G P L P V G A W A F L G L T A A V A T H T L	SbOMT.pro
139	S T I V G I I T Q P L P L G A V A L M G L G A S V L T K T L	SoOMT.pro
148	S T I V G I I T Q P L P L G A V A L L G L G A A V L S R T L	ZmOMT.pro
49	G T I V G I I T Q P L P L G A V A I L G L G V S V L T K T L	PsOMT.pro
	T F A A A F S A F G D P I P W <b>L I A L A F F F A R G F I K T</b>	Majority
	-----+-----+-----+-----	
	190 200 210	
157	T F A A A F S A F G D P I P W L I A L A F F F A R G F I K T	AtOMT.pro
154	P F T A A F G A F T N E V I W L I V I S F F F A R G F V K T	OsOMT.pro
162	P F A A A F A A F T N E I I W L I V I S F F F A R G F V K T	SbOMT.pro
169	T F S A A F S A F G D P I P W L I A L A F F F A R G F I K T	SoOMT.pro
178	T F A A A F S A F G D P I P W L I A L A F F F A R G F I K T	ZmOMT.pro
79	P F V A A F S G F G D P I P W L I C L A F F F A K G F I K T	PsOMT.pro
	<b>G L G</b> N R V A Y Q <b>F V K L F G S S S L G L G Y S L V F S</b> E A	Majority
	-----+-----+-----+-----	
	220 230 240	
187	G L G N R V A Y Q F V R L F G S S S L G L G Y S L V F S E A	AtOMT.pro
184	G L G D R V A T Y F V K W L G R S T L G L S Y G L A I S E A	OsOMT.pro
192	G L G N R V A T Y F V K W L G K S T L G L S Y G L A L G E A	SbOMT.pro
199	G L G N R I A Y Q F V K L F G S S S L G L G Y S L V F S E A	SoOMT.pro
208	G L G S R V A Y A F V A A F G S S S L G L G Y S L V F A E A	ZmOMT.pro
109	G L G N R V A Y Q F V S L F G S S S L G L G Y S L V F S E A	PsOMT.pro
	L L <b>A P A I P S V S A R A G G I F L P L V K S L C V A</b> C G S	Majority
	-----+-----+-----+-----	
	250 260 270	
217	L L A P A I P S V S A R A G G I F L P L V K S L C V A C G S	AtOMT.pro
214	C I A P A M P S T T A R A G G V F L P I V K S L S L S A G S	OsOMT.pro
222	C I A P A M P S T A A R A G G I F L P I I K S L S L S A G S	SbOMT.pro
229	L L A P A I P S V S A R A G G I F L P L V K S L C I A C G S	SoOMT.pro
238	L L A P A I P S V S A R A G G I F L P L V K S L C E A C G S	ZmOMT.pro
139	L L A P A I P S V S A R A G G I F L P L V K S L C V A C G S	PsOMT.pro
	N V G D G T E R K <b>L G S W L M L T C F Q T S V I S S A M F L</b>	Majority
	-----+-----+-----+-----	
	280 290 300	
247	N V G D G T E H R L G S W L M L T C F Q T S V I S S S M F L	AtOMT.pro
244	K P N D P S A R K L G S Y L V Q S Q L Q A S G N S S A L F L	OsOMT.pro
252	K P N H P S S R K L G T Y L V M S Q F Q A A S S S A L F L	SbOMT.pro
259	N V G D G T E R K L G A W L M L T C F Q T S V I S S S M F L	SoOMT.pro
268	R A G D G T E R R L G A W L M L T C F Q T S V V S S A M F L	ZmOMT.pro
169	N V G D G T E N K L G S W L M L T C F Q T S C I S S A M F L	PsOMT.pro
	<b>T A M A</b> A N P L S A N L A E N T - I G I A I G W T D W A K A	Majority
	-----+-----+-----+-----	
	310 320 330	
277	T A M A A N P L S A N L A F N T - I K Q T I G W T D W A K A	AtOMT.pro
274	T A A A Q N L L C L K L A E E I G V K I A N P W I S W F K V	OsOMT.pro
282	T A G A Q N L L C L N L A E K F V I I A N P W V T W F K A	SbOMT.pro
289	T A M A A N P L S A T L T F N T - I G K A I G W M D W A K A	SoOMT.pro
298	T A M A A N P L S A N L T A A T - I G E G I G W T L W A K A	ZmOMT.pro
199	T A M A A N P L C A T L T L N S - I N Q T I G W L D W G K S	PsOMT.pro
	<b>A I V P G L V S - L L A V P L L L Y V I</b> Y P P E I K S S P D	Majority

VIII. Anhang

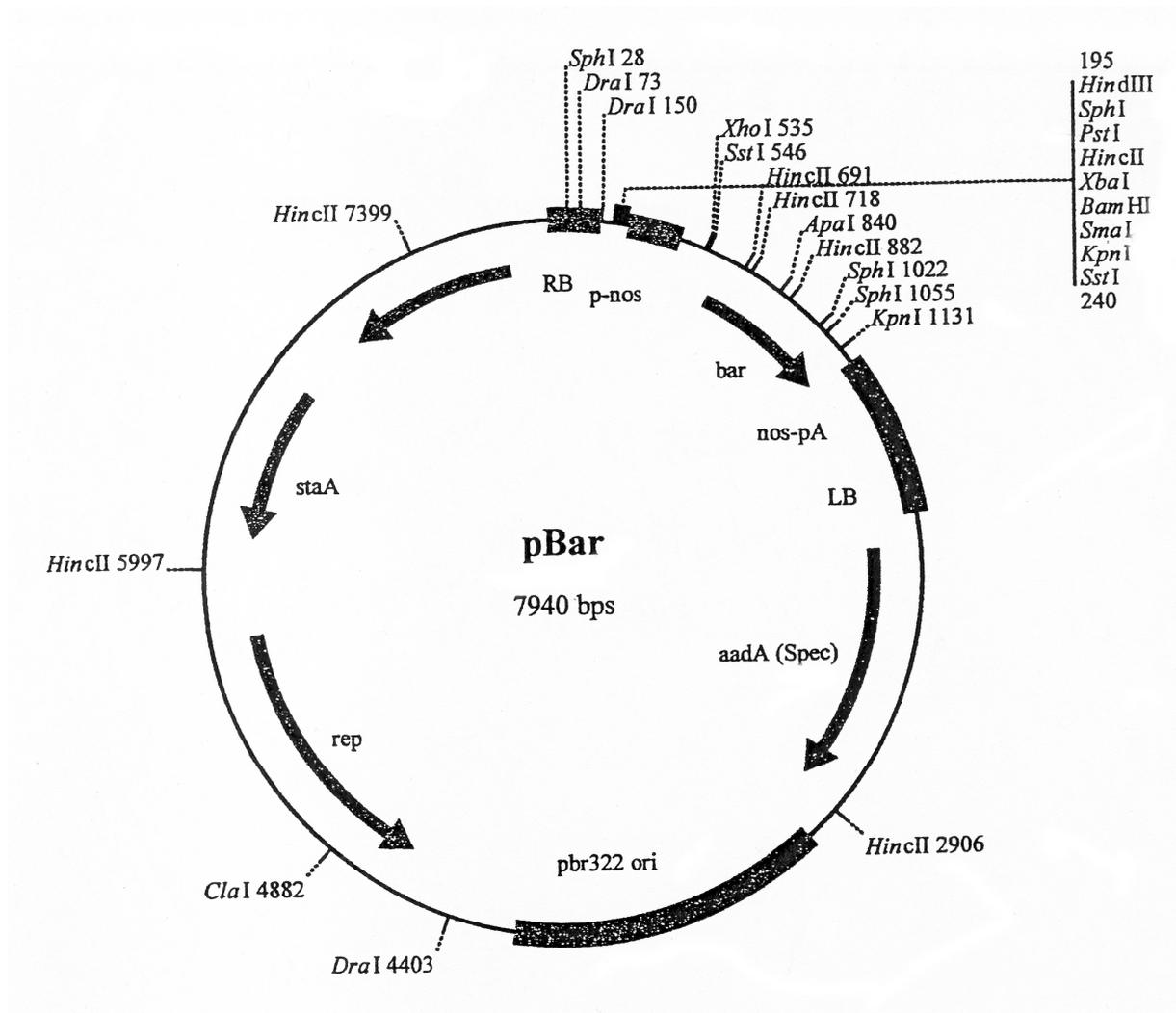
	340	350	360	
306	A I V P G L V S - L I V V P F L L Y L I Y P P T V K S S P D			AtOMT.pro
304	A S L P A I I S - L L A T P Y L L Y K I F P P E I K D T P E			OsOMT.pro
312	A S L P A I V S - L L A T P Y L L Y K I F P P E I K D T P E			SbOMT.pro
318	A F V P G L V S - L I V V P L L L Y V V Y P P E I K S S P D			SoOMT.pro
327	A I V P G L L S - L V L V P L I L Y V I Y P P E V K A S P D			ZmOMT.pro
228	C Y C A W F W C R W F W V P L I L Y I I Y P P T M K S S P D			PsOMT.pro
	A P A L A A E K L A K M G P M S K N E W I M A A T L L L T V			Majority
	370	380	390	
335	A P K L A Q E K L D K M G P M S K N E L I M A A T L F L T V			AtOMT.pro
333	A P A I A A Q K L K N M G P V T R N E W I M V A T M I L A V			OsOMT.pro
341	A P A L A A E K Q K Q M G P V T K N E W A M I G T M I L A V			SbOMT.pro
347	A P R L A K E K L D K M G P M T K N E S I M A V T L L L T V			SoOMT.pro
356	A P R L A K E R L A K M G P M S K E E T I M A G T L L L T V			ZmOMT.pro
258	A P K L A R E R L A K M G P M S A N E K I M T A T L F L T V			PsOMT.pro
	G L W I F G G K L G V D A V T A A I L G L S V L L I T G V V			Majority
	400	410	420	
365	G L W I F G A K L G V D A V T A A I L G L S V L L V T G V V			AtOMT.pro
363	S L W I F G D T I G V S S V V A A M I G L S I L L L L G V L			OsOMT.pro
371	A L W I F G D A I G V S S V V A A M L G L S I L L L L G V L			SbOMT.pro
377	G L W V F G G K L G V D A V T A A I L G L S V L L I T G V V			SoOMT.pro
386	G L W I F G G M L N V D A V S A A I L G L A V L L I S G V V			ZmOMT.pro
288	G L W V F G G L L N V D A V T S A I L G L A V L L I T G V V			PsOMT.pro
	T W K E C L A E S V A W D T L T W F A A L I A M A G Y L N K			Majority
	430	440	450	
395	T W K E C L A E S V A W D T L T W F A A L I A M A G Y L N K			AtOMT.pro
393	N W E D C L N E K S A W D T L A W F A I L V G M A G Q L T N			OsOMT.pro
401	D W A D I L N E K S A W D T L A W F S V L V G M A A Q L T S			SbOMT.pro
407	T W K E C L A E S V A W D T L T W F A A L I A M A G Y L N K			SoOMT.pro
416	T W K E C L A E S V A W D T L T W F A A L I A M A G Y L N K			ZmOMT.pro
318	T C K E C L A E G V A W D T L T W F A A L I A M A G Y L N K			PsOMT.pro
	Y G L I S W F S E T V V K F V G G L G L S W Q L S F G V L V			Majority
	460	470	480	
425	Y G L I E W F S Q T V V K F V G G L G L S W Q L S F G I L V			AtOMT.pro
423	L G I V S W M S N C V A K V L Q S F S L S W P A A F G V L Q			OsOMT.pro
431	L G I V S W M S S C I A N L L Q S F S L S W P A A F C V L Q			SbOMT.pro
437	Y G L I T W F S E N V V K V V G G L G L S W Q M S F G V L V			SoOMT.pro
446	F G L I S W F S E T V V K F V G G L G M S W Q L S F G V L V			ZmOMT.pro
348	Y G L I S W F S Q T V V K F V G G L G L S W Q L S F G I L V			PsOMT.pro
	L L Y F Y S H Y F F A S G A A H I G A M F T A F L S V A S A			Majority
	490	500	510	
455	L L Y F Y T H Y F F A S G A A H I G A M F T A F L S V S T A			AtOMT.pro
453	A S Y F F I H Y L F A S Q T A H V G A L Y S A F L A M H L A			OsOMT.pro
461	A S Y L V I H Y L F A S Q T G H V G A L Y S A F L A M H V A			SbOMT.pro
467	L L Y F Y S H Y F F A S G A A H I G A M F T A F L S V A S A			SoOMT.pro
476	L L Y F Y S H Y F F A S G A A H I G A M F T A F L S V A S A			ZmOMT.pro
378	L L Y F Y S H Y F F A S G A A H I G A M F T A F L S V A T A			PsOMT.pro
	L G T P P F L A A L V L S F L S N L M G G L T H Y G I G S A			Majority
	520	530	540	
485	L G T P P Y F A A L V L A F L S N L M G G L T H Y G I G S A			AtOMT.pro
483	A G V P A I L S A L A L T Y N S N L F G A L T H Y S S G Q S			OsOMT.pro
491	A G V P S V L S A L A L A F N T D L F G G I T H Y S S G Q A			SbOMT.pro
497	L G T P P F L A A I V L S F L S N L M G G L T H Y G I G S A			SoOMT.pro
506	L G T P S L F A A M V L S F L S N L M G G T T H Y G I G S A			ZmOMT.pro
408	L G T P P F F G A M V L S F L S N L M G G L T H Y G I G S A			PsOMT.pro
	P V F Y G A G Y V P L A D W G Y G F V I S I V N I I I W L			Majority

## VIII. Anhang

	550	560	570
	+-----+	+-----+	+-----+
515	P I F Y G A N Y V P L A K	W W G Y G F L I S I V N I L I W L	AtOMT.pro
513	A V Y Y G A G Y V D L P D	V F K L G F T T A A I N A V I W G	OsOMT.pro
521	A V Y F G A G Y L D L P D	V F R I G F I S T L I N T L I W G	SbOMT.pro
527	P V F Y G A N Y V P L P Q	W W G Y G F L I S I V N L I I W L	SoOMT.pro
536	P V F Y G A G Y V P L A Q	W W G Y G F V I S V V N I I I W L	ZmOMT.pro
438	P V F F G A N Y V P L A K	W W G Y G F V I S I V N I I I W L	PsOMT.pro
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		
	+-----+		
	-----		
	+-----+		
	580		

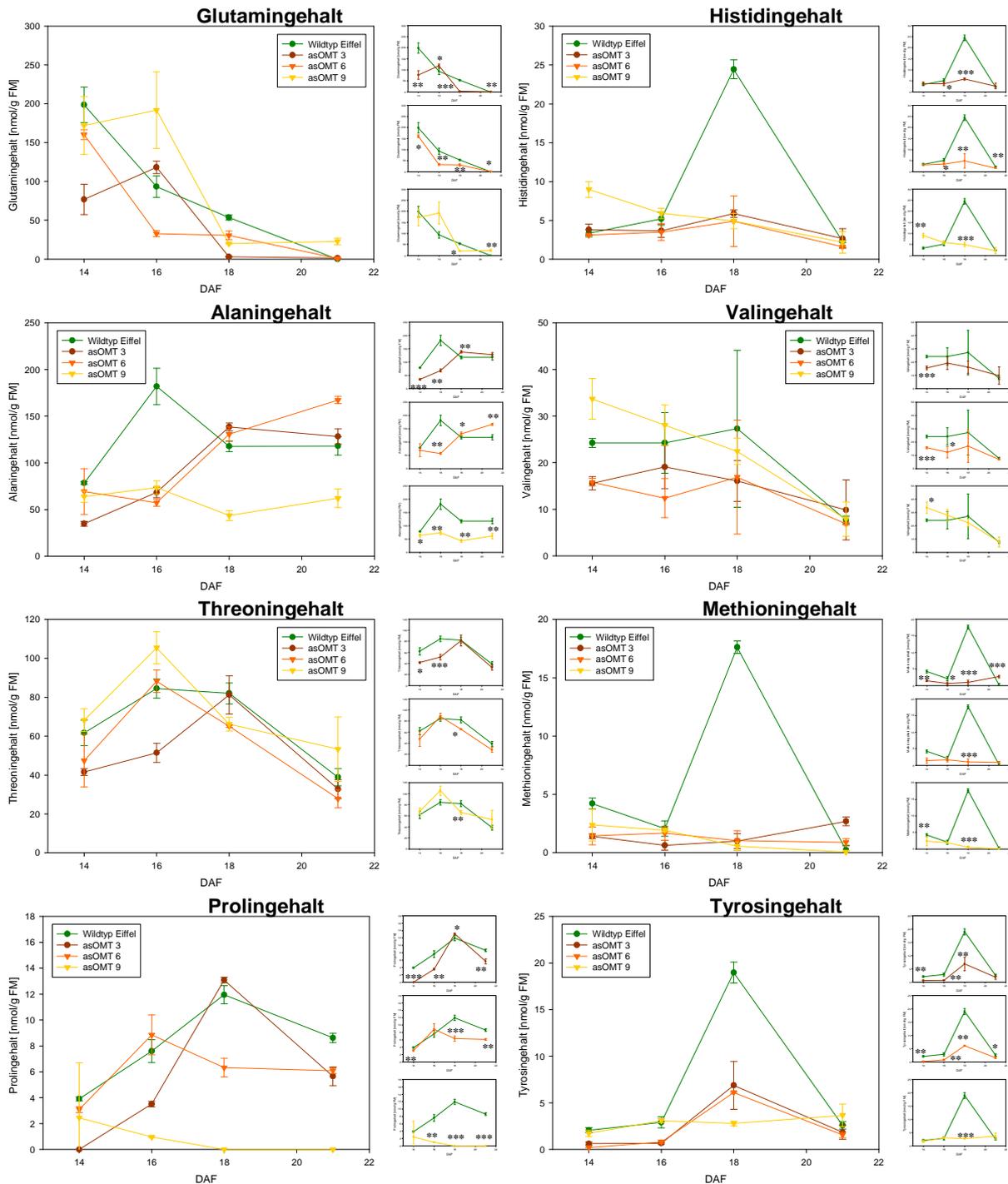
### 3. Verwendeter pBar-Vector zur Klonierung und Transformation

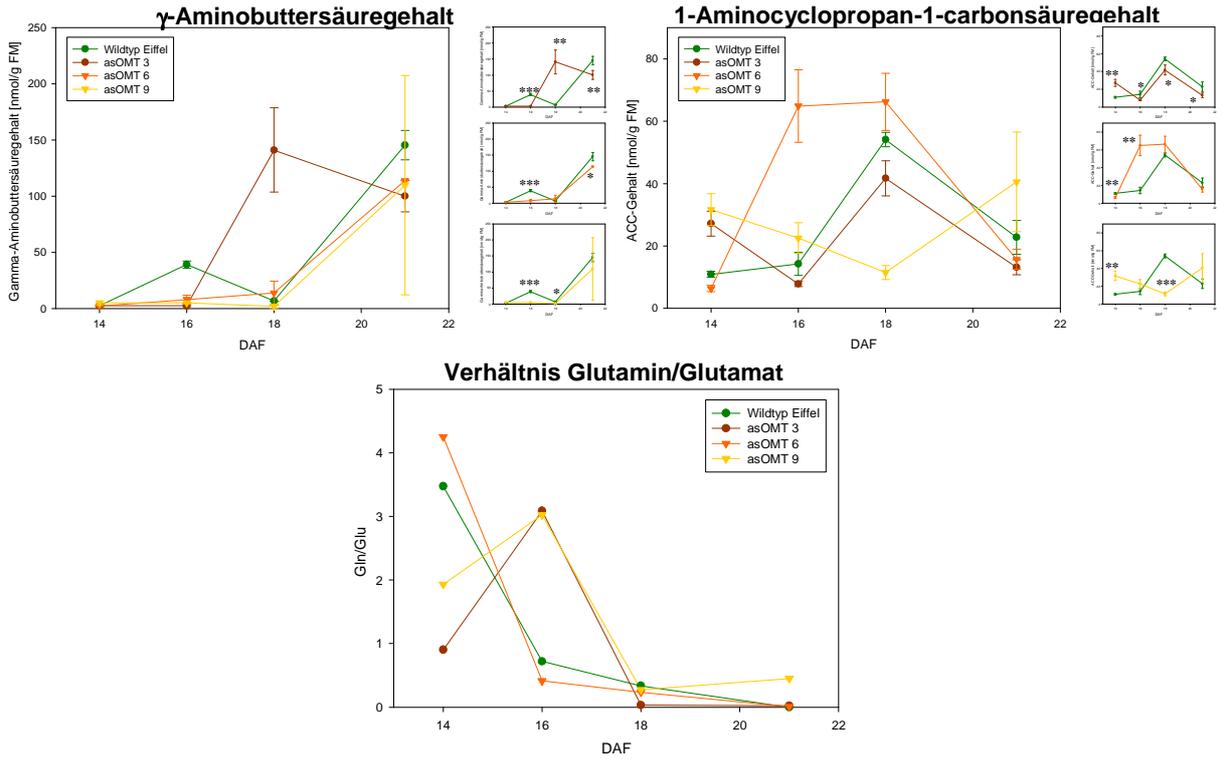
Der binäre pBar-Vector wurde verwendet, um die Konstrukte zu erstellen sowie für die Transformation des *Agrobacterium tumefaciens*. Dieser Vector enthält die right border-Sequenz (RB) sowie left border-Sequenz (LB) zur Integration in das Genom des Bakteriums. Des Weiteren ist der Promotor des Nopalin-Synthase Genes (p-nos), gefolgt vom Bar-Gen und dem Transkriptionsterminationssignal nos-pA enthalten. Vor dem Promotor ist die multiple Cloningsite eingefügt. Ebenfalls auf dem Vector sind ein Stabilisierungselement (staA) sowie der Start der Replikation (pbr322ori) enthalten. Dieser Vector wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Isolde Saalbach, Abteilung Molekulare Zellbiologie, Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie.



## 4. Absolute Aminosäuregehalte während der Samenentwicklung von asOMT-Erbsen

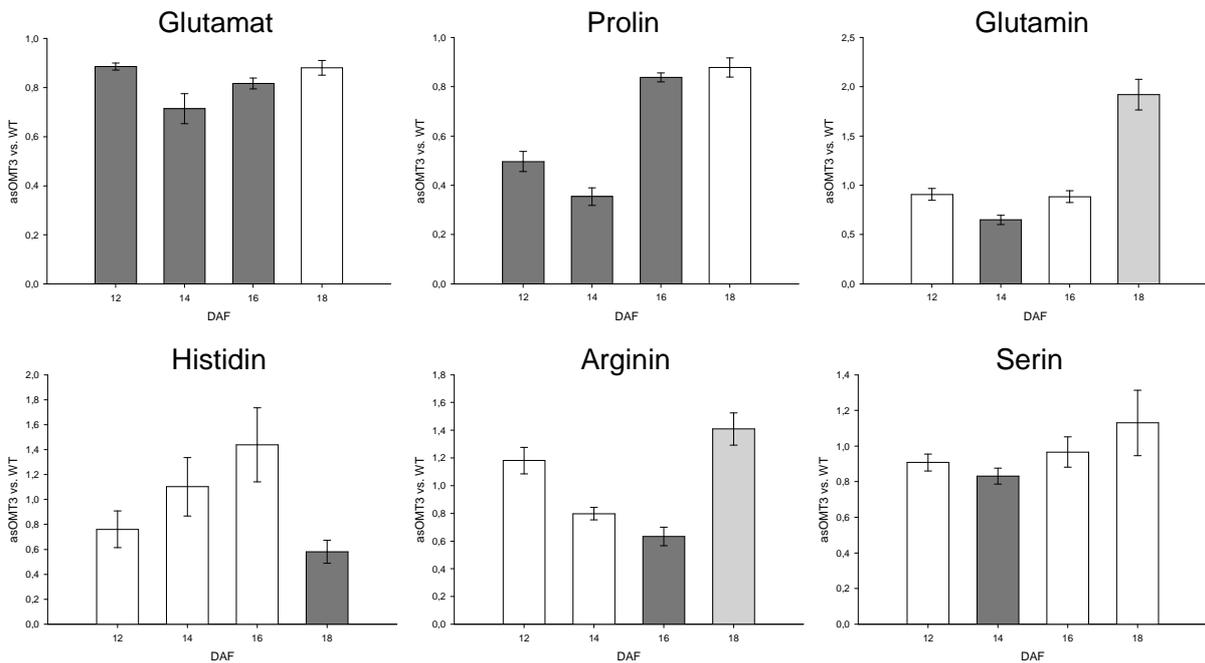
Die hier abgebildeten absoluten Aminosäuregehalte wurden im Ergebnissteil Kapitel 1.12 nicht dargestellt. Alle in dieser Arbeit dargestellten Aminosäurewerte gehören zu einer Messreihe. Die Signifikanzen jeder asOMT-Linie im Vergleich zum Wildtyp sind als kleine Abbildung neben der Hauptabbildung dargestellt.

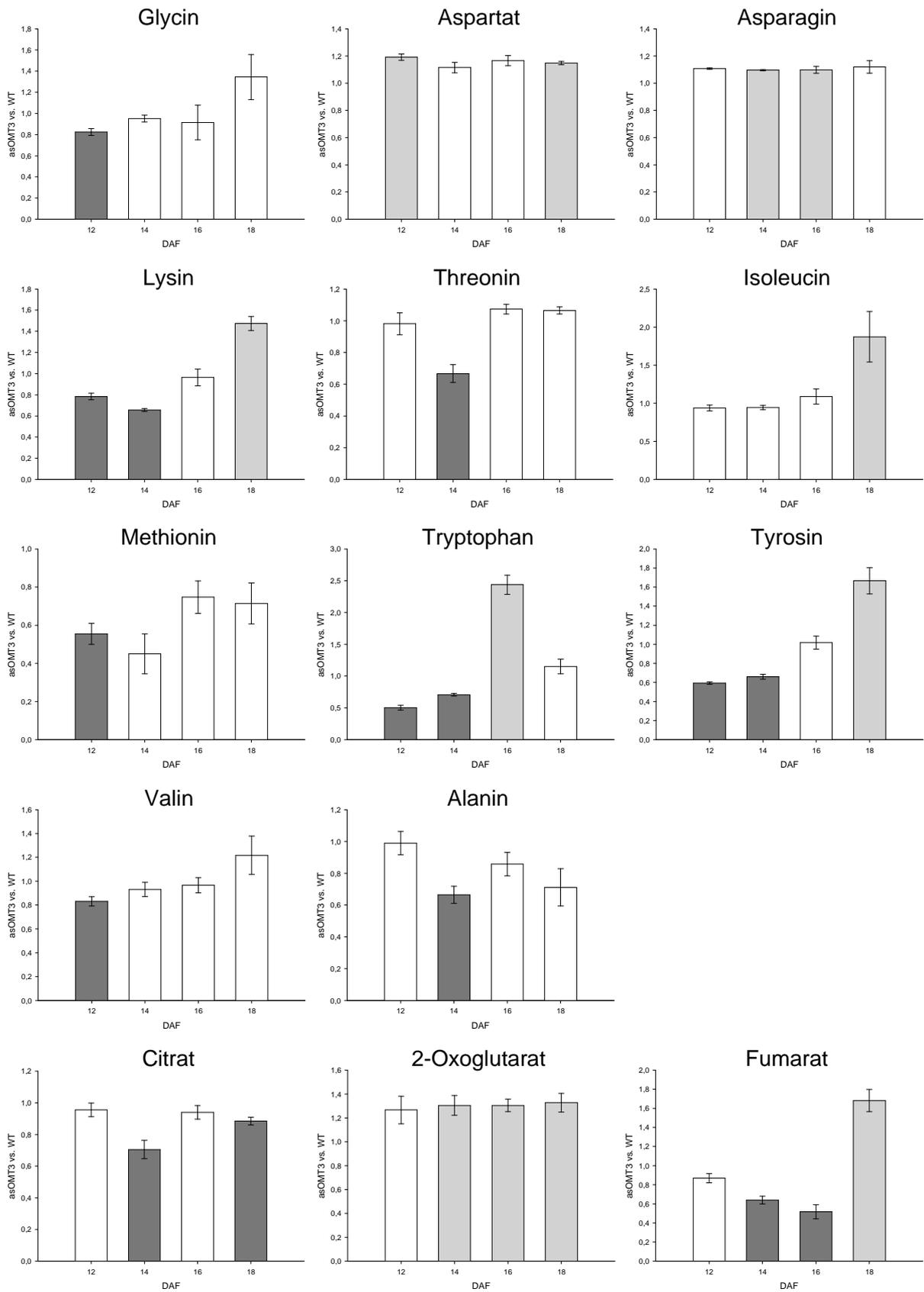


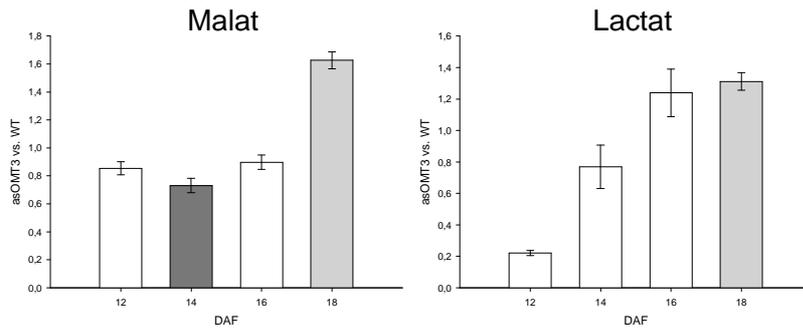


## 5. Nicht dargestellte Daten der Metabolitanalyse von asOMT-Erbsen im Vergleich zum Wildtyp

Die hier abgebildeten Diagramme gehören zu der Metabolitanalyse der asOMT-Erbsen im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind die gemessenen Aminosäuren, organischen Säuren und Fettsäuren. ( $P < 0,05$ ; erhöhter Gehalt ist hellgrau, verminderter Gehalt dunkelgrau unterlegt)







## Publikationen

- 2009 Erik Riebeseel, Rainer E. Häusler, Thuy Ha Nguygen, Mohammed Hajirezaei, R. J. Neil Emery, Helge Küster, Ruslana Radchuk, Adriano Nunes-Nesi, Alisdair R. Fernie, Winfriede Weschke und Hans Weber  
**2-oxoglutarate/malate translocator controls amino acid and storage protein biosynthesis and plastidial differentiation in pea embryos**  
(submitted)

## Vorträge

- 23.-25.06.2005 1. ISC – First IPK student conference, Gatersleben  
Riebeseel, Erik:  
**2-oxoglutarat/malate translocator – the connection between nitrogen and carbon metabolism**

## Poster

- 29.05.-01.06.2006 2. ISC – Second IPK student conference, Gatersleben  
Erik Riebeseel, Ha Thuy Nguyen, Ruslana Radchuk, Hans Weber:  
**The role of plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator (OMT) in carbon and nitrogen metabolism**
- 05.06.-08.06.2007 PSSC – plant science student conference, Halle (Saale)  
Erik Riebeseel, Hans Weber:  
**Antisense-Inhibition of the 2-oxoglutarate/malate translocator in seed of *Pisum sativum***



# Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

Name: Erik Riebeseel  
Wohnort: Alte Dorfstrasse 12a  
39179 Barleben OT Meitzendorf  
Geburtsdatum: 20.09.1977  
Geburtsort: Wolmirstedt  
Eltern: Gerhard Riebeseel, Ingenieur (FH)  
Irma Riebeseel, Ingenieur  
Familienstand: ledig

## **Schulbildung**

01.09.1984 – 31.08.1991 POS „Adolf Hennecke“-Oberschule Dahlenwarsleben  
01.09.1991 – 22.06.1996 „Friedrich-Ludwig-Jahn“-Gymnasium Haldensleben  
Abschluss Abitur  
01.07.1996 – 30.08.1996 H&B OMEGA Europa GmbH, Praktikum  
01.09.1996 – 30.08.1998 Bundeswehr

## **Studium**

01.10.1998 – 30.06.2003 Studiengang „Biologie“ an der TU Braunschweig  
23.08.2000 Vordiplom  
07.03.2002 – 01.06.2002 USA-Aufenthalt  
30.06.2003 Diplom

## **Beruflicher Werdegang**

seit 01.01.2005 Arbeitsgruppe Genwirkung/Samenentwicklung  
Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)  
01.01.2004 – 31.12.2004 Institut für Experimentelle Innere Medizin  
Medizinische Fakultät, Otto-von-Guericke Universität  
01.10.2003 – 31.12.2003 Praktikum  
Medizinische Fakultät, Otto-von-Guericke Universität

Meitzendorf, den 20.05.2009

Erik Riebeseel



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Promotionsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, 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.

Meitzendorf, den 20.05.2009

---

Erik Riebeseel