

Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Mark Stitt

**DER EINFLUSS DES PRIMÄREN STICKSTOFFSTOFFWECHSELS
AUF DEN AMINOSÄURE- UND SEKUNDÄRSTOFFWECHSEL IN
NICOTIANA TABACUM L.**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Molekulare Pflanzenphysiologie"**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
Christina Fritz**

Potsdam, den 15.05.2006

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	I
2	Abkürzungsverzeichnis	IV
3	Einleitung	1
3.1	Die Nitrataufnahme und -assimilation	2
3.2	Die Aminosäurebiosynthese	3
3.3	Der Aminosäurekatabolismus	7
3.4	Der Shikimatweg als wichtige Verbindungsstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel	9
3.5	Der Sekundärstoffwechsel	10
3.5.1	Die Alkaloide	11
3.5.2	Die Phenylpropanoide	13
3.6	Interaktion von Primär- und Sekundärstoffwechsel	16
3.7	Fragestellungen	17
4	Material und Methoden	18
4.1	Pflanzenmaterial	18
4.1.1	Wildtyp	18
4.1.2	Transformanten	18
4.2	Pflanzenanzucht	19
4.2.1	Klimakammerbedingungen	19
4.2.2	Tabakanzucht	19
4.2.3	Nährlösungen	20
4.2.4	Pflanzenernte	21
4.2.5	Anzucht der Rubisco-antisense Pflanzen (übernommen aus Petra Matt, Dissertation 2001)	21
4.2.6	Anzucht mit verschiedenen Lichtstärken (übernommen aus Petra Matt, Dissertation 2001)	22
4.3	Physiologische und biochemische Methoden	22
4.3.1	Extraktionsmethoden	22
4.3.2	Quantifizierung von Metaboliten und anderen Zellinhaltsstoffen	23
4.3.3	Bestimmung von Enzymaktivitäten	27
4.3.4	Histologische Färbung von Lignin	28
4.4	Molekularbiologische Methoden	29
4.4.1	Extraktion der Gesamt-RNA	29
4.4.2	cDNA Synthese	29
4.4.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
4.4.4	Quantitative RT-PCR	30
4.4.5	Extraktion der mRNA und cDNA-Synthese mit Dynabeads Oligo (dT) ₂₅	32
4.4.6	Hybridisierung des Oligonukleotidmikroarrays	35
4.5	Statistische Methoden	36

5	Ergebnisse.....	38
5.1	Beschreibung der Pflanzen in Bezug auf ihren Stickstoff- und Kohlenstoffhaushalt ..	39
5.1.1	Phänotypische Charakterisierung.....	40
5.1.2	Diurnale und genotypisch bedingte Änderungen der Nitratreduktase-Aktivität im Blatt.....	41
5.1.3	Diurnale und genotypisch bedingte Veränderungen des Nitratgehaltes im Blatt.....	43
5.1.4	Genotypisch bedingte Veränderungen der Proteingehalte.....	43
5.1.5	Diurnal und genotypisch bedingte Veränderungen der löslichen Kohlenhydrate und Stärke.....	44
5.1.6	Diurnale und genotypische Veränderung der Chlorophyllgehalte.....	46
5.2	Einfluss des Stickstoffstatus der Pflanzen auf die Aminosäuren.....	47
5.2.1	Diurnale und genotypisch bedingte Veränderung der Aminosäuregehalte	48
5.2.1.1	Die Hauptaminosäuren.....	48
5.2.1.2	Die „kleinen“ Aminosäuren.....	52
5.2.2	Wechselbeziehungen der Aminosäuren in verschiedenen Stickstoff- und Kohlenhydratmangelzuständen.....	58
5.2.2.1	Hauptkomponentenanalyse (PCA).....	59
5.2.2.2	Korrelationsanalysen der Aminosäuren in Stickstoffmangelzuständen.....	62
5.2.2.3	Verhalten der Aminosäuren in Kohlenhydratmangelzuständen.....	65
5.2.2.4	Verhalten der Aminosäuren in Stickstoff- und Kohlenhydratmangelzuständen zusammen.....	67
5.2.2.5	Verhalten der Aminosäuren in Abhängigkeit des Gesamtaminosäuregehaltes.....	70
5.3	Identifizierung regulatorischer Interaktionen zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel.....	95
5.3.1	Nikotin.....	95
5.3.2	Die Phenylpropanoide.....	97
5.3.2.1	Bestimmung ausgewählter Phenylpropanoidmetabolite im Blatt.....	97
5.3.3	Identifizierung der regulatorischen Ebene des Nitrats auf den Phenylpropanoidstoffwechsel.....	105
5.3.3.1	Bestimmung von Phenylalanin.....	106
5.3.3.2	Transkriptmessung durch Oligomikroarrays.....	107
5.3.3.3	Transkriptmessung durch quantitative RT-PCR.....	110
6	Diskussion.....	117
6.1	Die Auswirkungen von Kohlenstoff- und Stickstoffstatus auf das Verhalten der Aminosäuren in Tabakblättern.....	117
6.1.1	Die absoluten Konzentrationen der meisten Aminosäuren zeigen die gleichen diurnalen Muster in Kontrollbedingungen, aber bei der Analyse unter Kohlenstoff- bzw. Stickstoffmangelbedingungen zeigen einige Aminosäuren individuelle Antworten.....	117

6.1.2	Die individuellen Antworten einiger Aminosäuren auf den Kohlenstoff - und Stickstoffstatus der Pflanze, auf überreduzierte Elektronentransportkette, Nitrat und Licht	119
6.1.2.1	Individuelle Reaktionen auf Licht	119
6.1.2.2	Individuelle Reaktionen auf reduzierten Stickstoffstatus.....	120
6.1.2.3	Individuelle Reaktionen auf verringerten Kohlenstoffstatus	122
6.1.3	Glutamat zeigt in fast allen Situationen stabile Konzentrationen und Anteile am Gesamtaminosäuregehalt.....	123
6.1.4	Die Biosynthese der Aminosäuren muss flexibel auf externe Einflüsse reagieren können, wie das Beispiel von Phenylalanin zeigt	124
6.1.5	Schlussbemerkung und Ausblick.....	125
6.2	Einfluss von Nitrat auf Nikotin und den Phenylpropanoidstoffwechsel.....	125
6.2.1	Nitrat hat keinen regulatorischen Einfluss auf die Nikotinbiosynthese	125
6.2.2	Stickstoffmangel führt zu einer Stimulation des Phenylpropanoidstoffwechsels.....	126
6.2.3	Nitratreduktase reduzierte Transformanten weisen keinen erhöhten Phenylpropanoidstoffwechsel auf. Dadurch kann Nitrat als regulatorisches Element identifiziert werden	127
6.2.4	Die Lignifizierung der nitratverhungerten Wildtypen ist im Stammgewebe erheblich erhöht.....	128
6.2.5	Zellwandgebundene Ferulasäure zeigt in nitratmangelernährten Wildtypen keine Änderung, zellwandgebundene p-Coumarsäure dagegen ist signifikant erhöht	128
6.2.6	Transkripte des Shikimatstoffwechsels zeigen keine signifikanten Veränderungen innerhalb der Genotypen	129
6.2.7	Transkripte des Phenylpropanoidstoffwechsels sind in nitratverhungerten Wildtypen signifikant erhöht	130
6.2.8	Schlussbemerkung und Ausblick.....	131
7	Zusammenfassung	132
8	Anhang	134
8.1	Absolute Aminosäuregehalte in Pflanzen mit reduzierter Rubisco-Aktivität und Pflanzen gewachsen unter suboptimalen Lichtbedingungen (Matt et al., 2002)	134
8.1.1	Die Hauptaminosäuren	134
8.1.2	Die „kleinen“ Aminosäuren.....	135
8.2	Verhältnisanalyse der unter Kapitel 5.2.2.5.2 und 5.2.2.5.3 nicht aufgeführten Aminosäuren	137
8.2.1	Aminosäuren mit reduziertem Stickstoffstatus	137
8.2.2	Aminosäuren mit reduziertem Kohlenstoffstatus.....	140
8.3	Tabelle der Expressionsdaten für verschiedene Transkriptionsfaktoren	141
9	Literaturverzeichnis	142

2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A_{260}	Strahlenabsorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA bzw.	Rinderserumalbumin (<i>englisch</i>) beziehungsweise
C	Kohlenstoff
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGA	Chlorogensäure (<i>englisch</i>)
Chl	Chlorophyll
City	Citrullin
4 Cl	4-Coumerat-CoA-Ligase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cv.	Kultivar
DAHPS	3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>englisch</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethyl-) N,N,N',N', - tetraacetat
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
g/v	Gewicht pro Volumen
Gaba	γ -Aminobuttersäure
Gln	Glutamin

Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GOGAT	Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
His	Histidin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>englisch</i>)
HQT	Hydroxycinnamoyl-CoA Quinat:Hydroxycinnamoyl Transferase
Ile	Isoleucin
KNO ₃	Kaliumnitrat
Leu	Leucin
LKR	Lysinketoglutarat-Reduktase
Lys	Lysin
M	Molarität
μE	μmol Photonen bzw. Lichtquanten m ⁻² s ⁻¹
μmol	Mikromol
Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>englisch: messenger ribonucleic acid</i>)
N	Stickstoff
NAD(P)(H)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (-phosphat) (reduziert)
NAGK	N-Acetyl-Glutamat-Kinase
NH ₄ ⁺	Ammonium
NIA	kodierendes Gen für Nitratreduktase
nm	Nanometer
NR	Nitratreduktase
NRA	Nitratreduktase Aktivität
Orn	Ornithin
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>englisch</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>englisch</i>)
PEP	Phosphoeno/pyruvat
Phe	Phenylalanin
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid

<i>rbcS</i>	kodierendes Gen für Rubisco
RH	relative Luftfeuchte
RNA	Ribonukleinsäure (<i>englisch</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>englisch</i>)
RT	Reverse Transkriptase
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase
s, sec	Sekunde
SDH	Saccharopine-Dehydrogenase
SDS	Natriumlaurylsulfat
Ser	Serin
ShDH	Shikimat-Dehydrogenase
-sre.	Säure
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
ssDNA	Einzelstrang Desoxyribonukleinsäure (<i>englisch</i>)
Tab.	Tabelle
TAL	Tyrosin-Ammonium-Lyase
TCA	Trichloressigsäure (<i>englisch</i>)
TE	Tris-EDTA
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton X-100	Polyoxyethylen-(9,10) <i>p-t</i> -octylphenol
Trp	Tryptophan
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaureat
Tyr	Tyrosin
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>englisch: unit</i>)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Val	Valin
WT	Wildtyp

3 Einleitung

Viele biochemische Hauptfunktionen des pflanzlichen und tierischen Lebens werden durch stickstoffhaltige Biomoleküle ermöglicht. Proteine zum Beispiel stehen im Mittelpunkt jedes biologischen Prozesses. Sie agieren als Katalysatoren in allen Stoffwechselprozessen, sie transportieren und speichern biologisch relevante Substanzen und koordinieren mechanische Bewegungen. Nukleinsäuren dagegen sind Träger der genetischen Information eines Organismus und Aminosäuren sind nicht nur Bausteine aller Proteine, sondern auch Bausteine oder Vorläufermoleküle wichtiger Botenstoffe und Stoffwechselintermediate. Wachstum und Entwicklung eines Organismus ist dementsprechend eng an die Verfügbarkeit von Stickstoff gebunden.

Pflanzen als autotrophe Organismen gewinnen ihren Kohlenstoff über die Photosynthese. Die Tatsache, dass bis zu 55% des photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs in der Stickstoffassimilation verwendet wird (Huppe & Turpin, 1994) zeigt, wie eng Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus verknüpft sind. Es hat sich in vielen Arbeiten auf diesem Gebiet herausgestellt, dass eine Kohlenstoffverarmung nicht einfach nur zu einem Anstieg aller stickstoffhaltigen Metabolite führt und eine Nitratverarmung keineswegs zu einem Anstieg der kohlenstoffhaltigen Metabolite. Vielmehr führt eine Reduzierung der Photosynthese oder Kohlenstofffixierung parallel zu einer Verminderung der Kohlenhydrate, organischen Säuren und Aminosäuren (Matt et al., 1998, 2002; Klein et al., 2000; Stitt und Krapp, 1999; Geiger et al., 1998). Eine Reduktion der Nitratassimilation führt ebenfalls zu einer koordinierten Verminderung aller Aminosäuren, Kohlenhydrate und organischen Säuren (Scheible et al., 1997; Matt et al., 2001a, 2001b). Die lange gültige Annahme, dass reduzierter Kohlenstoff bzw. reduzierter Stickstoff zu einer reziproken Veränderung des jeweils anderen wichtigen Metabolismus führt, resultiert aus der verallgemeinerten Beschreibung des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus. Durch Kohlenstoffverarmung erreicht man global betrachtet sehr wohl einen Anstieg des Stickstoffgehaltes innerhalb der Pflanze, doch dies resultiert lediglich aus einer starken Zunahme an Nitrat. Ebenso erreicht man durch Stickstoffverarmung einen Anstieg des Kohlenstoffgehaltes, doch dieser resultiert hauptsächlich aus der starken Zunahme an Stärke. Eine detaillierte Analyse aller primären Pflanzeninhaltsstoffe zeigt jedoch, dass sich kohlenstoff- und stickstoffhaltige Metabolite parallel zueinander ändern.

Für optimales Wachstum und Entwicklung der Pflanze in einer bestimmten Umgebung gehört auch deren Interaktion mit ihrem Lebensraum. Eine Pflanze muss auf Fraß, Krankheit, mechanische Verletzung und vom Menschen produzierte Stressfaktoren reagieren können. Dafür existiert neben dem Primärstoffwechsel der Sekundärstoffwechsel innerhalb der Pflanze. Inwiefern diese beiden Stoffwechselwege miteinander koordiniert sind, ist weitgehend unerforscht. Im Allgemeinen stand der Fluss der primären Ressourcen wie Aminosäuren und Kohlenhydrate, aber auch Reduktionsäquivalente in den Sekundärstoffwechsel der Pflanzen in der Literatur oft zur Diskussion. Es wurde bisher deutlich, dass die Synthese sekundärer Pflanzenstoffe auf der einen Seite zum Überleben der Pflanze erheblich beiträgt, indem dadurch auf biotische und abiotische Stressfaktoren geantwortet werden kann. Zum anderen ist die Synthese energieaufwendig und verbraucht wichtige Primärmetabolite, die für Wachstum, Entwicklung und Vermehrung benötigt werden. Es stellt sich die Frage, wie eine Pflanze ökonomisch mit der Sekundärstoffsynthese umgeht.

Hierzu wurden bisher verschiedene Hypothesen aufgestellt. Lange Zeit wurde die „*Optimal Defense Hypothesis*“ angenommen, die besagt, dass sich die Pflanzen bei Bedarf aus dem Pool der Primärmetabolite einfach bedienen. Nach der „*Growth-Difference-Balance-Hypothesis*“ (Van Dam et al., 1996) werden Sekundärstoffe bzw. Abwehrstoffe nur unter günstigen Wachstumsbedingungen synthetisiert. Im Gegensatz dazu besagt die „*Carbon-Nutrient-Balance*“ Hypothese nach Coley et al. (1985), dass sich die Qualität der Sekundärstoffe in einer Pflanze nach der Verfügbarkeit der dazu notwendigen Ressource richtet. Doch die zahlreichen Untersuchungen zu den einzelnen Hypothesen ergaben äußerst widersprüchliche Ergebnisse (*Details dazu siehe Kapitel 3.6*).

3.1 Die Nitrataufnahme und -assimilation

Heterotrophe Lebewesen decken ihren Bedarf an Stickstoff durch die Aufnahme stickstoffhaltiger organischer Moleküle. Autotrophen Organismen dagegen stehen auch anorganische Stickstoffquellen zur Verfügung. Hierfür gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten. Zum einen können einige wenige Bakterien, darunter die Cyanobakterien, molekularen Stickstoff aus der Luft fixieren. Einige Pflanzenspezies machen sich diese Eigenschaft zu Nutze, indem sie Symbiosen mit N₂-fixierenden Bakterien eingehen und dadurch mit organisch gebundenem Stickstoff versorgt werden. Zum anderen stammt etwa 99% des organisch gebundenen Stickstoffs der Biosphäre aus der Nitratassimilation (Huppe und Turpin, 1994). Durch den Abbau organischer Materie wird gebundener Stickstoff zu Nitrit und letztendlich zu Nitrat oxidiert und dem Boden in anorganischer Form zugeführt. Pflanzen nehmen mit Hilfe von drei Aufnahmesystemen, jeweils unterschiedlicher Kinetik, über die Wurzel Nitrat auf. Es existiert 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., 1996b; Poa et al., 1998) und ein induzierbares hochaffines System (IHATS) (Aslam et al., 1992). Der Transport des Nitrats verläuft über Xylembeladung und anschließendem Langstreckentransport in das Blatt.

In den meisten krautigen Pflanzen findet die Nitratreduktion in den Blättern statt. Schlüsselenzym dieses zentralen Prozesses ist die Nitratreduktase (NR). Es handelt sich um ein Homodimer (Campbell & Kinghorn, 1990; Solomonson & Barber, 1990) mit den Cofaktoren FAD, Häm und Molybdän. Nitrat wird zu Nitrit reduziert. Als Elektronendonator dient NADH. Die Elektronen werden über die Cofaktoren zum Nitrat transportiert und Nitrit entsteht. Die folgenden Schritte der Nitratassimilation finden in den Chloroplasten statt. Nitritreduktase (NiR) überträgt 6 Elektronen auf Nitrit und Ammonium entsteht. Glutaminsynthetase (GS) bindet das Ammonium an Glutamat. Das entstandene Glutamin ist entweder ein Endprodukt der primären Stickstoffassimilation oder wird über die Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase (GO-GAT) mit einem Molekül α -Ketoglutarat zu zwei Molekülen Glutamat umgesetzt. Reduziertes Ferredoxin dient dabei als Reduktionsmittel.

Nicotiana tabacum L. besitzt zwei homologe NR-Gene *NIA1* und *NIA2* (Müller & Mendel, 1989; Vaucheret et al., 1989). Die Nitratreduktase ist ein außergewöhnlich streng reguliertes Enzym. Auf der Ebene der Genexpression wirken Nitrat und lösliche Zucker induzierend. Licht und Photosynthese, deren Endprodukte letztendlich die regulatorischen Kohlenhydrate sind, wirken indirekt induzierend (Solomonson et al., 1990). Glutamin und andere Aminosäuren dagegen inhibieren die Genexpression der NR. Um eine Akkumulation des Nitrits im Dunklen zu verhindern, wird NR durch eine schnelle posttranslationale Inhibierung reguliert.

Durch reversible Phosphorylierung des Serinrestes 68 bei Verdunkelung können Magnesiumionen und ein Inhibitorprotein (NIP) aus der Familie der 14-3-3 Proteine (Bachmann et al., 1996) an das Enzym binden. NR ist dann inaktiviert. Durch Dephosphorylierung spaltet sich das NIP ab und NR wird aktiviert. Der Prozess der Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist stark lichtreguliert (Spill & Kaiser, 1994; Bachmann et al., 1995; MacKintosh, 1995; Huber et al., 2002; Lillo et al., 2004).

3.2 Die Aminosäurebiosynthese

Aminosäuren gehen direkt oder indirekt aus der primären Nitratassimilation hervor. Sie unterteilen sich in die „Hauptaminosäuren“, d.h. die mengenmäßig häufig vorkommenden Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Asparagin, Aspartat, Alanin, Glycin und Serin und die mengenmäßig gering vorkommenden „kleinen“ Aminosäuren. Aminosäuren selbst wiederum haben zahlreiche Funktionen. Sie sind Bausteine der Proteine, dienen als Vorstufe zahlreicher pflanzlicher Sekundärstoffe und sind an der Nukleotidbiosynthese beteiligt.

Die Kohlenstoffgerüste, welche für die pflanzliche Aminosäurebiosynthese notwendig sind, werden von der Glykolyse, der photosynthetischen Kohlenstoffreduktion, dem oxidativen Pentosephosphatweg und dem Citratzyklus bereitgestellt.

Glutamin und Glutamat entstehen während der Reduktion von Nitrit zu Ammonium unter der Verwendung von einem Molekül α -Ketoglutarat (Abb. 3.1).

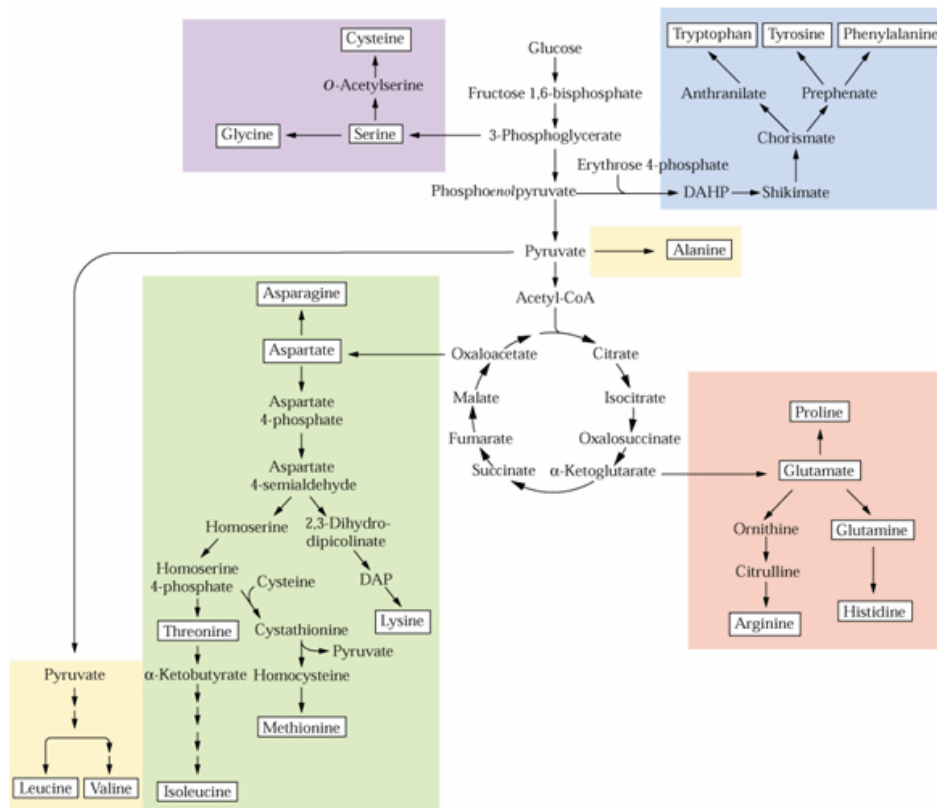


Abb.3.1: Schematische Darstellung über die Biosynthese aller proteinogenen Aminosäuren (aus Buchanan, Grussem und Jones 2000)

Aspartat und Alanin entstehen durch den Transfer einer Aminogruppe von Glutamat auf Oxalacetat bzw. Pyruvat (Abb. 3.1). Asparaginsynthetase katalysiert die Übertragung einer Ami-

nogruppe von Glutamin auf Aspartat unter Verbrauch von ATP. Glycin und Serin entstehen in Blättern hauptsächlich aus der Photorespiration.

Generell werden die restlichen proteinogenen („kleinen“) Aminosäuren von einer der zentralen Aminosäure ausgehend synthetisiert bzw. ein Intermediat des Kohlenstoffmetabolismus dient als Vorläufer und Glutamat als Donor der Aminogruppe. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan entstehen durch den Shikimatweg aus Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat (Abb. 3.1). Vorläufer von Leucin und Valin ist Pyruvat (Abb. 3.1), Arginin entsteht aus Glutamat über Ornithin und Citrullin und Histidin geht aus Glutamin hervor (Abb. 3.1). In einem sehr verzweigten Stoffwechselweg, ausgehend von Aspartat, entstehen Threonin, Isoleucin, Lysin und Methionin (Abb. 3.1).

Die vorgeschlagenen Stoffwechselwege für die Biosynthese der pflanzlichen Aminosäuren sind zum großen Teil von den Biosynthesewegen abgeleitet, die in *E. coli* und Hefe beschrieben wurden. Die Regulation pflanzlicher Aminosäurebiosynthese dagegen ist noch weitgehend unbekannt. Auch hier nimmt man an, dass einige Bereiche der Aminosäurebiosynthese genauso kontrolliert werden, wie es für mikrobielle Organismen bekannt ist. Man geht jedoch davon aus, dass die pflanzliche Aminosäurebiosynthese und deren Regulation wesentlich komplexer als die der Mikroorganismen ist.

Die Regulation der Aminosäurebiosynthese in Mikroorganismen

Für die **transkriptionelle Regulation** der Aminosäurebiosynthese in Mikroorganismen und Pilzen wird eine generelle Kontrolle angenommen (Guerzoni, 1972; Schürch et al., 1974, Delforge et al., 1975; Wolfner et al. 1975). Gene in mehreren Aminosäurebiosynthesewegen werden bei Mangel oder einem gestörten Gleichgewicht einer einzelnen Aminosäure gemeinsam aktiviert. Diese Kontrollmechanismen resultieren in einer Aktivierung der Expression dieser Gene, einem erhöhten Enzymspiegel spezifisch für die Aminosäurebiosynthese und einem erhöhten Aminosäurepool.

Genauere Mechanismen wurden in Untersuchungen an *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert. Im ersteren Fall spielt das Gen *CPC-1* und im zweiten *GCN4* als wichtige Regulatoren der Aminosäurebiosynthese eine Rolle. Sie kodieren für zwei Polypeptide Cpc1p und Gcn4p, die als transkriptionelle Faktoren agieren. Die Synthese von Gcn4p wird bei Aminosäuremangel auf Translationsebene reguliert. Aufgrund von Aminosäuremangel akkumuliert ungeladene tRNA, diese aktiviert eine Kinase Gcn2p, die den Translationsapparat so modifiziert, dass die Translation von Gcn4p angeschaltet wird. Gcn4p wiederum aktiviert die Transkription von mehr als 30 Genen, die spezifisch für die Aminosäurebiosynthese sind (Dever et al., 1992; Pain, 1994). Cpc1p agiert auf ähnliche Weise.

In Cyanobakterien hat das Protein PII, welches in Mikroorganismen eine zentrale Verwaltungseinheit des Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffhaushaltes darstellt (Forchhammer, 2004, Ninfa und Jiang, 2005), einen regulatorischen Effekt auf die globale transkriptionelle Aktivierung von NtcA (Paz et al., 2003; Fadi Aldehni et al., 2003) und die Argininbiosynthese (Heinrich et al., 2004). In Cyanobakterien ist NtcA ein Transkriptionsaktivator stickstoffregulierter Gene, wie z.B. der Glutaminsynthetaseuntereinheiten (glnA) und Glutaminsynthetase III (glnN) (Vega-Palas et al., 1992). Der metabolische Stickstoffstatus der Cyanobakterien wird über den Phosphorylierungszustand von PII bzw. dessen Bindung mit α -Ketoglutarat und ATP abgeschätzt (Forchhammer et al., 1994) und über Protein-Protein-Interaktion, z.B. mit *N*-acetyl-Glutamat Kinase (NAGK) weitergeleitet (Burillo et al., 2004). Diese produzieren in der Zelle eine angemessene Anpassung über Genexpression oder GS-Aktivität (Arconde-

guy, 2001; Magasanik, 2000). *E. coli* dagegen schätzt den Stickstoffstatus über den Glutamingehalt der Zelle ab und gibt die Information über Uridylierung von PII weiter (Arcondeguy et al., 2001; Magasanik, 2000).

Posttranslational konnten komplexe Feedback-Regulationsmechanismen einiger Aminosäurebiosynthesewege nachgewiesen werden (siehe Lea and Forde, 1994). Das Endprodukt eines Stoffwechselweges inhibiert das Enzym, welches den ersten Schritt der eigenen Biosynthese katalysiert, kann aber auch die Synthese einer anderen Aminosäure aus der gleichen Familie stimulieren. Ein simpler Feedback-Mechanismus wurde z.B. bei der Isoleucinsynthese in *E. coli* beschrieben. Isoleucin wird aus Threonin abgeleitet und hemmt bei Akkumulation Threonin-Desaminase (E.C. 4.2.1.16), das Schlüsselenzym dieses Biosyntheseweges (Eisenstein, 1995). Ein sequentieller Feedback-Mechanismus wurde erstmals für den stark verzweigten Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren bei *Bacillus subtilis* beschrieben. Das Endprodukt jedes Zweiges hemmt den ersten enzymatischen Schritt des vorangegangenen Zweiges. Die aromatischen Aminosäuren hemmen also nicht nur die Enzyme ihres gemeinsamen Biosyntheseweges, welcher zu Shikimat, Chorismat und Prephenat führt (Nester et al., 1967). Diese Möglichkeit bietet der Zelle die Flexibilität, das Niveau der aromatischen Aminosäuren an ihren augenblicklichen Bedarf anzupassen.

E. coli dagegen bedient sich eines völlig anderen Mechanismus, um die Synthese der aromatischen Aminosäuren zu kontrollieren. Ihr Regulationssystem wurde unter dem Namen Enzymmultiplizität bekannt und basiert darauf, dass *E. coli* drei verschiedene Enzyme in den frühen Schritten der Shikimatbiosynthese besitzt (DHAPS). Jedes dieser Enzyme ist unter allosterischer Kontrolle seines Aminosäureendprodukts (Herrmann, 1995).

Die Regulation der Aminosäurebiosynthese in Pflanzen

Es gibt einige Hinweise auf die Existenz **transkriptioneller Kontrolle** der Aminosäurebiosynthese in Pflanzen. Opaque-2, ein Transkriptionsfaktor der bZIP-Familie (Hartings et al., 1989, Schmidt et al., 1992), reguliert sowohl die Transkription vieler Gene der Glykolyse und von Speicherproteinen im Endosperm vieler Getreidepflanzen, als auch die einiger Gene der Aminosäurebiosynthese. Dies geschieht entweder auf direktem oder indirektem Weg (Azevedo et al., 1990; Cord-Neto et al., 1995; Brennecke et al., 1996; Damarval und Le Guilloux, 1998). Studien mit „high lysine“ Mutanten verschiedener Pflanzenspezies zeigten, dass Opaque-2 nicht nur eine regulatorische Rolle in der Biosynthese einiger Aminosäuren hat, sondern auch in deren Katabolismus. Speziell dahingehend wurde die Biosynthese der aus Aspartat hervorgehenden Aminosäuren (Azevedo et al., 1990; Brennecke et al., 1996; Wang und Larkins, 2001; Wang et al., 2001) und der Lysinkatabolismus untersucht (Arruda et al., 2000; Kemper et al., 1999; Lefèvre et al., 2002; s. auch *Kapitel 3.3 Aminosäurekatabolismus*). PII Homologe konnten in Pflanzen eindeutig identifiziert werden (Hsieh et al., 1998; Ferrario-Mery et al., 2005).

Die funktionale Rolle von PII in höheren Pflanzen konnte bis heute nicht ganz geklärt werden. Das pflanzliche Protein zeigt 54% Übereinstimmung mit PII der Cyanobakterien; auch potentielle Phosphorylierungsstellen wurden gefunden (Smith et al., 2002), wobei die Regulation von PII in Pflanzen über Phosphorylierung nicht bewiesen werden konnte (Smith et al., 2004). PII in Pflanzen bindet α -Ketoglutarat und ATP (Smith et al., 2002, Smith et al., 2004) und bildet einen Proteinkomplex mit *N*-acetyl-Glutamat Kinase (NAGK) (Sugiyama et al., 2004; Chen, 2006), ein Enzym, welches in der Ornithin- bzw. Argininsynthese eine Rolle spielt. Ferrario-Mery et al. (2005) konnten in PII-Arabidopsismutanten einen erhöhten C/N – Quo-

biosynthese Dihydrodipicolinat Synthase (DHDPS) (Galili 1995; Azevedo und Lea, 2001) konnte Lysin als Inhibitor der DHDPS-Aktivität identifiziert werden (Azevedo et al., 1997) (Abb. 3.2). Threonin-Desaminase (TD) in Pflanzen wird ebenfalls durch sein Endprodukt Iso-leucin inhibiert (Dougall, 1970; Sharma und Mazumder, 1970; Szamosi et al., 1993; Giovannelli et al., 1988; Szamosi et al., 1994; Singh et al., 1995). Ähnliche Kontrollmechanismen wurden auch für die Biosynthese von Leucin und Valin (Singh und Shaner, 1995 und Zitate daraus) und die der aromatischen Aminosäuren beschrieben (*Zitate aus Kapitel 3.4*).

Die bisher ungenügend geklärte Koordination der Regulation pflanzlicher Aminosäurebiosynthese führt zu der Frage, ob es in pflanzlichen Organismen ebenfalls eine generelle Kontrolle der Aminosäurebiosynthese gibt, ähnlich dem Beispiel von *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae*. Nach dem heutigen Wissensstand ist die Antwort sowohl ja als auch nein.

Radwanski et al. (1995) konnte eine erhöhte Expression von Enzymen der Tryptophansynthese bei Verarmung an aromatischen und verzweigten Aminosäuren oder Methionin feststellen. Eine Induktion der Expression anderer Aminosäurebiosynthesewege wurde jedoch nicht nachgewiesen. In Versuchen mit *Arabidopsis thaliana* wurde die Synthese von Histidin mit IRL 1803, einem spezifischen Inhibitor der Imidazol-Glyzerol-Phosphat Dehydratase (IGPD), verhindert. Es kam zu einer Akkumulation von mRNA codierend für 8 Enzyme, die in die Biosynthese von aromatischen Aminosäuren, Lysin, Histidin und Purinen involviert sind (Guyer et al. 1995).

Für eine koordinierte Aminosäurebiosynthese der „kleinen“ Aminosäuren sprechen auch die Experimente von Lea et al. (1988) mit Glycin-Decarboxylase Weizenmutanten, in denen die Aminosäuregehalte der „kleinen“ Aminosäuren in den Mutanten die gleichen Korrelationen zueinander zeigen wie die der Wildtypen.

Unterstützend dazu fanden Noctor et al. (2002) einen linearen Zusammenhang der einzelnen „kleinen“ Aminosäuren zum Gesamtgehalt aller „kleinen“ Aminosäuren in Blattgeweben von Weizen, Gerste und Kartoffel mit unterschiedlicher Photosyntheseaktivität. Zhao et al. (1998) dagegen argumentieren, dass eine generelle Kontrolle der proteinogenen Aminosäuren unangebracht ist, da Aminosäuren wesentlich weiter reichende Zwecke im pflanzlichen Stoffwechsel haben als die Synthese von Proteinen. Untersuchungen der Tryptophanbiosynthese ergaben zwar eine Induktion einiger Gene des Tryptophanstoffwechsels, hervorgerufen durch Mangel an einigen Aminosäuren, jedoch konnte gezeigt werden, dass dies eher als eine generelle Stressantwort zu bewerten ist als eine direkte Antwort auf den Aminosäuremangel (Zhao et al., 1998).

3.3 Der Aminosäurekatabolismus

Der Abbau von Aminosäuren ist meist verknüpft mit der Umverteilung von Stickstoffressourcen. Für bakterielle und tierische Organismen steht der Aminosäurekatabolismus im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung von Energiezuständen unter Nährstoffmangel, Reorganisation des aufgenommenen Stickstoffs und Verfügbarkeit essentieller Aminosäuren für die Proteinbiosynthese (Christensen et al., 1999). Der pflanzliche Aminosäurekatabolismus wurde bisher in samenkeimungsspezifischen Prozessen und bei Blattseneszenz untersucht, ist aber wenig verstanden (Van Etten et al., 1967; Beevers 1976).

Es existieren generell vier verschiedene Systeme, die den Aminosäurekatabolismus einleiten. Das System der Transaminasen überträgt die Aminogruppe der entsprechenden Aminosäure auf eine verfügbare Ketosäure. Es entsteht meist Oxalacetat oder Glutamat. Transaminasen benötigen dazu Pyridoxalphosphat (PLP), ein Derivat des Vitamin B₆, als prosthetische Gruppe. Das zweite System der Desamination findet immer im Zusammenspiel mit Transaminasen statt. Nur wenige Aminosäuren können desaminiert werden. Als Beispiel einer Desaminierung kann Glutamin durch Glutamin-Dehydrogenase (GDH) genannt werden. Bei dieser Reaktion entsteht α -Ketoglutarat, NH_4^+ und NAD(P)H. Durch eine Transaminasereaktion entsteht wieder Glutamin und eine α -Ketosäure. Diese kann zur Energiegewinnung, zur Glucose- oder Fettsäuresynthese verwendet werden. Die Dehydrierung durch Dehydratasen stellt das dritte System zur Einleitung des Aminosäurekatabolismus dar. Ein Beispiel für diese Reaktion ist die Dehydrierung von Serin durch Serin-Dehydratase, dessen Produkte Pyruvat und NH_4^+ sind. Das letzte System des einleitenden Aminosäurekatabolismus stellen die Oxidasen von D- und L- Aminosäuren in den Peroxisomen dar. Eine Aminosäure wird durch FAD zu einer α -Ketosäure, FADH_2 und NH_3 oxidiert. FADH_2 reagiert mit Sauerstoff und FAD ist wieder hergestellt. Das entstandene H_2O_2 wird durch Katalase zu Wasser und Sauerstoff degradiert (Stryer „Biochemie“).

In all diesen Reaktionen entsteht NH_3 . Die meisten an Land lebenden tierischen Organismen verarbeiten das entstandene NH_3 im Harnstoffzyklus und scheiden es aus.

Eingeleitet wird dieser Zyklus durch die Carbamyl-Phosphat-Synthase, welche durch den allosterischen Aktivator N-Acetylglutamat aktiviert wird. N-Acetylglutamat Synthase, welche diesen Aktivator synthetisiert, wird wiederum aktiviert, wenn der zelluläre Glutamatgehalt hoch ist und somit einen Überschuss an freien Aminosäuren signalisiert. Carbamyl-Phosphat wird durch den Zusammenschluss mit Ornithin zu Citrullin metabolisiert. Citrullin wiederum reagiert mit Aspartat zu Argininosuccinat. Die folgende Reaktion spaltet Argininosuccinat zu Fumarat und Arginin. Arginase lässt Harnstoff und Ornithin entstehen (aus Stryer „Biochemie“).

Dieser Zyklus wurde auch für Pflanzen beschrieben, spielt dort jedoch eher eine Nebenrolle in der Degradierung von Arginin zur Stickstoffmobilisierung während der Samenkeimung (Van Etten et al., 1967; Chou und Splittoessner, 1972; Zonia, 1995) und der Synthese von Putrescin und Polyaminen (Villanueva und Huang, 1993; Huang und Villanueva, 1992). Harnstoff wird durch Urease direkt zu NH_3 und Kohlendioxid metabolisiert (Sehgal und Naylor, 1966; Stebbins und Polacco, 1995; Zonia et al., 1995). In der Regel wird in Pflanzen gewonnenes Ammonium durch den GS/GOGAT-Zyklus wieder in die Aminosäurebiosynthese eingeschleust oder zur Synthese von Nukleotiden verwendet.

Ansätze, Kulturpflanzen biotechnologisch zu verändern, um ihre Ernährungsqualität zu verbessern, zeigten, dass Aminosäurekatabolismus ein nicht zu vernachlässigender Stoffwechselweg ist, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Maissamen z.B. haben niedrige Konzentrationen an den essentiellen Aminosäuren Lysin und Threonin. Azevedo und Lea (2001) kamen zu dem Ergebnis, dass Lysinüberproduktion und -akkumulation in bestimmten Getreidesamen ein kombinatorischer Effekt aus der genetischen Manipulation von Lysinbiosynthese und Lysindegredierung ist. Unterstützt wird diese Annahme einerseits von der Tatsache, dass eine höhere Lysinkonzentration in Leguminosensamen Folge der drastischen Reduktion des Lysinabbaus in diesen Zellen ist und dass die Maismutante Opaque-2 denselben Effekt zeigt (Azevedo und Lea 2001; Molina et al., 2001). Es stellte sich heraus, dass Opaque-2 nicht nur das Gen der lysinsensitiven Aspartatkinase reguliert (Azevedo et al., 1990; Brennecke et al., 1996), sondern auch transkriptionelle Kontrolle auf die lysindegredie-

renden Enzyme Lysinketoglutarat-Reduktase (LKR) und Saccharopine-Dehydrogenase (SDH) ausübt (Arruda et al. 2000; Lefèvre et al., 2002). Das Beispiel der Opaque-2 Mutante zeigt, dass Aminosäurebiosynthese und Aminosäurekatabolismus in einigen speziellen Fällen eng miteinander verknüpft sein können.

3.4 Der Shikimatweg als wichtige Verbindungsstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel

Der Shikimatweg wird als Hauptstoffwechselweg für die Biosynthese aromatischer Verbindungen in Bakterien, Pilzen und Pflanzen angesehen (Herrmann, 1995a; Herrmann und Weaver, 1999; Schmid und Amrhein, 1995). In Pflanzen gilt er als wichtige Schnittstelle zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel (Jensen, 1985; Herrmann, 1995a). Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind die Endprodukte und aus ihnen und einigen Intermediaten des Shikimatweges gehen eine ganze Reihe sekundärer Pflanzenstoffe hervor (Abb. 3.3). Man geht davon aus, dass unter normalen Bedingungen 20% des fixierten Kohlenstoffs in den Shikimatweg fließen (Haslam 1993).

Der Shikimatweg läuft vollständig in den Plastiden ab (Herrmann und Weaver, 1999). Die cDNA's aller am Shikimatweg beteiligten Gene codieren einen Abschnitt, der im N-terminalen Bereich des späteren Proteins für den Transport in den Plastiden verantwortlich ist. Es sind jedoch auch cytosolische Isoformen für einige Enzyme bekannt, deren Funktion aufgrund biochemischer Daten nicht im Bereich der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren angenommen wird (Siehl, 1999).

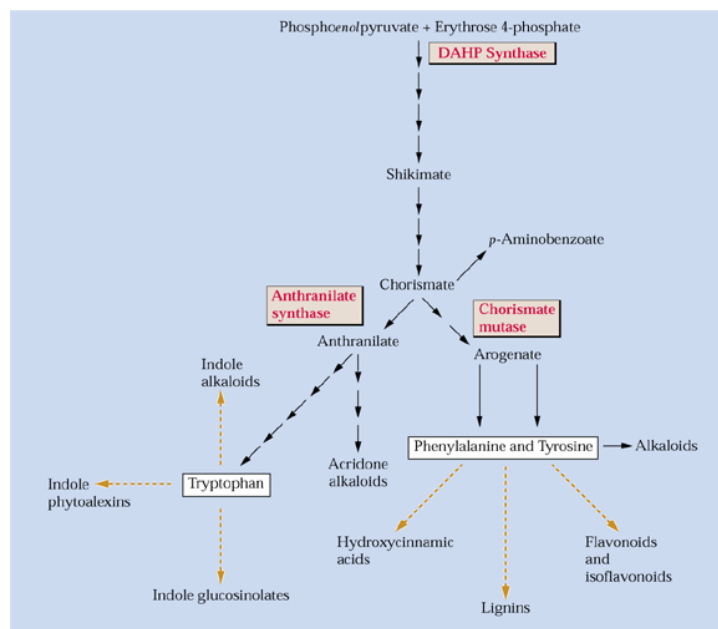


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Shikimatweges und der daraus resultierenden Sekundärstoffe (aus Buchanan)

Ausgangssubstanzen für den Shikimatweg sind Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat aus dem Calvin-Zyklus und der Glykolyse (Jensen 1985). Es entsteht 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat (DAHP). Die folgenden sechs enzymatischen Schritte bis zur Kondensation zum Chorismat sind allen drei aromatischen Aminosäuren gemein (Herr-

mann, 1995). Ab hier folgt eine Verzweigung des Shikimatweges. Chorismat kann einerseits über das Intermediat Anthranilat zu Tryptophan synthetisiert werden (Radwanski und Last, 1995) oder andererseits über die Intermediate Prephenat und Arogenat zu Phenylalanin und Tyrosin (Schmid und Amrhein, 1995).

Der Shikimatweg wird über einen komplexen Feedback-Mechanismus reguliert. Da der Shikimatweg ein reich verzweigter Biosyntheseweg ist, inhibiert jedes endgültige Produkt des Shikimatweges das Enzym, welches am Anfang seines Verzweigungsweges steht. Chorismatmutase wird inhibiert durch eine hohe Konzentration von Phenylalanin und Tyrosin, wobei es durch Tryptophan aktiviert wird (Goers und Jensen, 1984b; Connelly, 1984; Kuroski und Conn, 1988b; Hertel et al., 1991b; Benesova und Bode, 1992). Anthranilatsynthase hingegen wird inhibiert durch mikromolare Konzentrationen seines Endproduktes Tryptophan (Poulsen und Verpoorte, 1991; Radwanski et al., 1995). Arogenatdehydrogenase, welches die Konversion von Arogenat zu Tyrosin katalysiert, wird durch Tyrosin inhibiert, ebenso wird Arogenatdehydratase, das finale Enzym im Phenylalaninbiosyntheseweg, durch sein Endprodukt inhibiert und durch Tyrosin aktiviert (Connelly and Conn, 1986; Siehl and Conn, 1988). Durch diese mehrteilige Kontrolle wird der Fluss der konkurrierenden Stoffwechselwege reguliert (Abb. 3.3) und ermöglicht der Pflanze, die Konzentration der aromatischen Aminosäuren ihrem tatsächlichen Bedarf anzupassen.

Die Notwendigkeit hierzu besteht, weil die aromatischen Aminosäuren nicht nur ihrer Funktion als Proteinbausteine nachkommen, sondern auch eine sehr zentrale Rolle als Vorläufermoleküle sekundärer Pflanzenstoffe spielen. Die wohl größte Bedeutung kommt dabei den Ligninvorstufen und dem daraus entstehenden Lignin zu. Aber auch wichtige Verteidigungssubstanzen, ob gegen biotische oder abiotische Stressfaktoren, gehen aus den aromatischen Aminosäuren hervor. Diese Annahme wird durch die Tatsache untermauert, dass die Expression der zentralen Enzyme des Shikimatweges, wie z.B. die DAHPS durch UV-Licht, Verwundung und Pathogenbefall induziert wird (Henstrand, 1992; Dyer et al., 1989; McCue und Conn, 1989; Keith et al., 1991; Görlach et al., 1995).

Der Shikimatweg ist stark mit dem Kohlenstoff-, dem Aminosäure- und damit mit dem Nitratmetabolismus, aber auch mit dem Sekundärstoffwechsel vernetzt. In dieser Arbeit ist sein Verhalten in unterschiedlichen Nitratumgebungen aufgrund seiner Schnittstellenfunktion zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel ebenfalls von Interesse.

3.5 Der Sekundärstoffwechsel

Definitionsgemäß sind die Sekundärstoffe der Pflanze an keinem der primären Stoffwechselprozesse wie Photosynthese, Photorespiration, Nährstoffassimilation und Differenzierung beteiligt. Primäre Pflanzenstoffe sind im gesamten Pflanzenreich zu finden. Die Sekundärstoffe hingegen sind unterschiedlich innerhalb einer bestimmten Spezies, Pflanzenfamilie und des gesamten Pflanzenreiches verteilt. Sie beschreiben sehr heterogene chemische Strukturen und komplexe Biosynthesewege.

Pflanzliche Sekundärstoffe agieren als Schutzsubstanzen gegen Fraßfeinde (Hartmann, 1991) und Pythopathogene. Sie dienen als Lockstoff für bestäubende Organismen oder für solche, die den Samen einer Pflanze verbreiten. Sie agieren als Schutz bei abiotischem Stress oder erhöhen die Konkurrenzfähigkeit eines Individuum oder einer Population an einem bestimmten Standort. Sekundäre Pflanzenstoffe tragen erheblich zum Überleben der

Pflanze bei und vergrößern deren Fitness in ihrer Umgebung und der Umwelt beträchtlich (Taiz und Zeiger, 2000; Buchanan, Grisseem und Jones, 2000).

Ökonomisch betrachtet spielen sie ebenfalls eine große Rolle. Sekundärstoffe liefern den Menschen pflanzliche Fasern, die in der Papierindustrie oder Textilbranche verwendet werden (Baucher et al., 1998 und Zitate daraus). In der Medizin werden sie als heilende Drogen eingesetzt (Kutchan, 1995; Tyler, 1994; Scinto et al., 1994) und in der Kosmetikindustrie als Duftstoffe (Buchanan, Grisseem und Jones, 2000). In der Nahrungsmittelindustrie gewinnen sie neuerdings Bedeutung bei der Herstellung von „functional food“ oder „Nutraceuticals“ (Niggeweg et al., 2004; Barnes und Parasin, 2005 und Zitate daraus). Dieser Begriff beschreibt Lebensmittel mit Zusätzen bzw. Extrakte aus Lebensmitteln, denen eine gesundheitsfördernde Wirkung nachgesagt wird. Des Weiteren liefern sie Farbstoffe, Öle, Wachse und Polymere, die allesamt nachwachsen und Alternativen zu den nicht nachwachsenden Rohstoffen darstellen (Buchanan, Grisseem und Jones, 2000).

Demnach stehen die sekundären Pflanzenstoffe neben der Erforschung ihrer Funktion und Biosynthese auch im Zentrum biotechnologischen Interesses.

Chemisch betrachtet teilen sich die Sekundärstoffe in drei große Gruppen: Terpenoide, Phenylpropanoide und stickstoffhaltige Alkaloide. Terpenoide sind Kohlenstoffketten, die aus C_5 -Einheiten (Isoprengrundkörper) hervorgehen. Phosphorylierte C_5 -Einheiten werden zu vielfältigen aliphatischen oder zyklischen Substanzen zusammensetzt. Das Phytohormon Gibberellin, Carotine, Latex und eine große Menge an Duftstoffen gehören dieser Gruppe an. Bis heute wurden ca. 25000 verschiedene Terpenoide beschrieben und somit bilden sie die heterogenste Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe (Gershenzon und Croteau, 1993; McGarvey und Croteau, 1995; Cane, 1999). Die ca. 8000 Phenylpropanoide gehen aus den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin hervor und bilden z.B. Ligninvorstufen, Flavonoide und Isoflavonole (Harborne, 1988; Hahlbrock, 1981; Hahlbrock und Scheel, 1989; Baucher et al., 1998). Die stickstoffhaltigen Alkaloide mit ca. 12000 Mitgliedern gehen aus verschiedenen proteinogenen und nicht proteinogenen Aminosäuren hervor (Southon und Buckingham, 1989). Im Fokus dieser Arbeit stehen hauptsächlich Phenylpropanoide und Alkaloide. Aus diesem Grund werden diese beiden Gruppen ausführlicher vorgestellt.

3.5.1 Die Alkaloide

Die ursprüngliche Definition der Alkaloide ist die einer pharmazeutisch wirksamen, stickstoffhaltigen Substanz pflanzlichen Ursprungs. Wie keine andere Gruppe der Sekundärstoffe stehen die Alkaloide im Zentrum medizinischen Interesses. Aus ihr gehen viele Antitussiva, Sedativa und Purgativa hervor, allen voran die wohl berühmtesten Sekundärstoffe Morphinum und Codein. Der physiologische Grund, warum eine Pflanze überhaupt Stickstoff und Energie in Substanzen investiert, die nicht in die primären Stoffwechselprozesse involviert sind, ist die mitunter starke toxische Aktivität der Alkaloide gegenüber Organismen tierischen Ursprungs. Alkaloide dienen der Pflanze als Abschreckungsmittel gegen Fraßfeinde, haben unter anderem starke antibiotische Wirkung und helfen bei Infektionen mit phytopathogenen Mikroorganismen. Ihre Aktionsmechanismen können sehr vielfältig sein. Sie interagieren mit DNA oder RNA und können deren Alkylierung bewirken. Sie können die Neurotransmitterfunktion von Adrenalin, Dopamin, Serotonin, Gaba und Acetylcholin übernehmen oder deren Abbau verhindern. Bekannt sind auch Alkaloide, die Membraninteraktionen im tierischen Organismus haben oder Ionenkanäle beeinflussen. Sie agieren als Inhibitoren wichtiger Enzy-

me, wie z.B. Adenylatcyclasen oder Phosphodiesterasen. Da ihr Synthesort meist nicht dem Wirkungsort bzw. Akkumulationsort entspricht, existieren verschiedene Transportmechanismen. Der Langstreckentransport wird sowohl vom Phloem als auch vom Xylem übernommen. Hydrophile Alkaloide werden über kurze Strecken über ein Carriersystem mit Protonen-Antiport transportiert, während die lipophilen Alkaloide meist über kurze Strecken hinweg diffundieren. Das toxische Potential der Alkaloide macht eine Kompartimentierung innerhalb der pflanzlichen Zelle erforderlich. Sie werden meistens in der Vakuole gespeichert, manchmal auch an Komplexbildner gebunden. Morphin aus *Papaver somniferum* wird sogar in einem speziellen Zelltyp, den Latexvesikeln der Schlafmohnkapsel, gespeichert.

Synthetisiert werden die Alkaloide aus 6 proteinogenen Aminosäuren und zwei nicht proteinogenen Aminosäuren (Abb. 3.4) und kommen in vielen verschiedenen

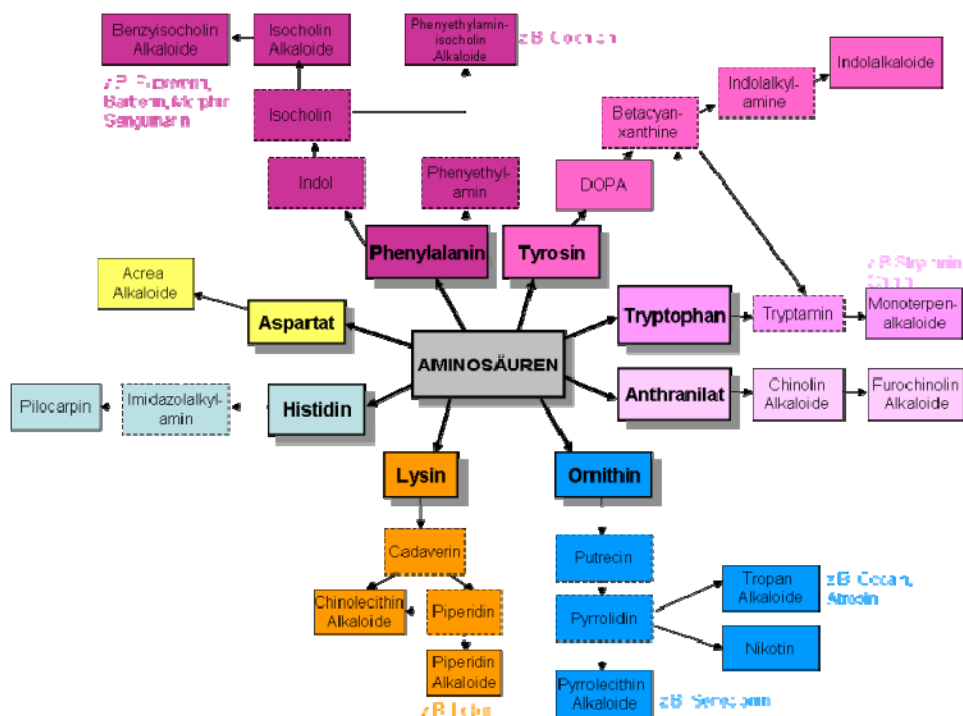


Abb. 3.4: Schematische Übersicht über die Herkunft der Alkaloidgruppen.

Pflanzenfamilien vor. Zu ihnen gehören die Solanaceae, Papaveraceae, Scrophulariaceae, Berberidaceae, Fabaceae, Boraginaceae, Asclapiaceae, Rubiaceae und Ranunculaceae.

Nikotin

Nikotin ist ein Alkaloid spezifisch für Tabakpflanzen. In der Geschichte der Landwirtschaft ist es eines der ersten Insektizide und bis heute eines der effektivsten.

Nikotin wird hauptsächlich in der Wurzel synthetisiert und über das Xylem zu seinem Wirkungsort, den Blättern, transportiert (Dawson, 1942; Baldwin, 1991). Dort agiert es als Gift gegen Fraßfeinde. Nikotin wird aus der proteinogenen Aminosäure Arginin oder Ornithin synthetisiert, wobei Arginin wahrscheinlich der bevorzugte Vorläufer ist (Boswell et al., 1993; Abb. 3.5).

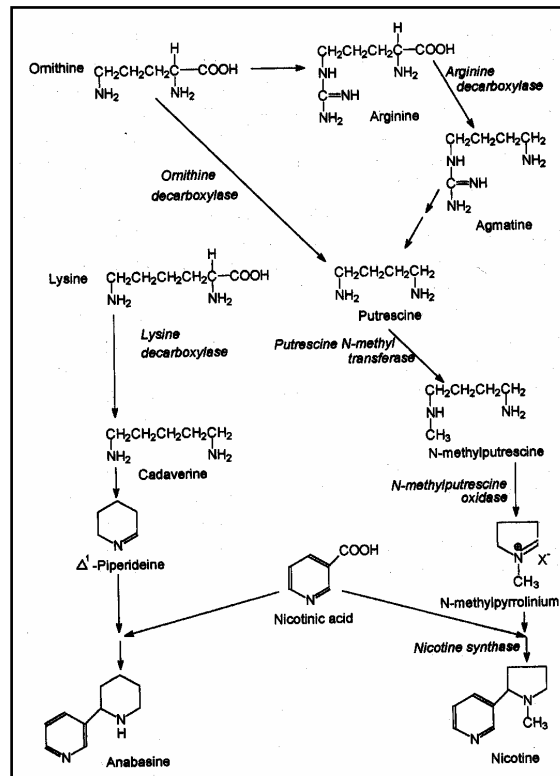


Abb. 3.5: Schematische Übersicht über den Biosyntheseweg von Nikotin (aus Wink „Biochemistry of plant secondary metabolism“, 1999).

Eine Tabakpflanze baut etwa 5 – 8 % ihrer Stickstoffressourcen in Nikotin ein (Baldwin 1994). In ungestressten Pflanzen akkumuliert konstitutiv bis zu 0.1 – 1.0 % Nikotin in der Blattoberfläche (Baldwin, 1999). Bei bestimmten Stimuli wie z.B. Verwundung wird es zusätzlich synthetisiert (Baldwin, 1988; Baldwin und Ohnmeiss, 1993; MacCloud und Baldwin, 1997; Baldwin et al. 1997). Dabei kann Nikotin bis auf das 10-fache ansteigen. In der induzierten Nikotinbiosynthese spielt das Signalmolekül Jasmonat eine große Rolle, dessen Synthese bei Verwundung aktiviert wird. Durch den Phloemstrom wird es zur Wurzel transportiert, um dort letztendlich die Nikotinbiosynthese anzuschalten (Baldwin et al. 1997; Zhang und Baldwin 1997). Alkaloide zählen zu den Abwehrstoffen mit einem hohen „turn-over“ (Coley, 1985; Waller and Nowacki, 1978) deren Synthesekosten hoch sind (Baldwin, 1999) und die, nachdem sie ihren Verwendungszweck erfüllt haben, schnell wieder abgebaut werden. Verteilungsuntersuchungen ergaben, dass junge Blätter, Stamm und für die Fortpflanzung Pflanzenteile verantwortlich die höchsten Nikotingehalte haben, während alte Blätter und Wurzeln eher niedrige Gehalte aufweisen (Baldwin und Karb, 1995; Euler und Baldwin, 1996; Ohnmeiss et al., 1997). Aufgrund der engen Verknüpfung der Alkaloide bzw. in diesem speziellen Fall Nikotin zum Stickstoffmetabolismus ist die Frage nach den Konsequenzen für die Nikotinbiosynthese bei verändertem Stickstoffstoffwechsel sehr von Interesse.

3.5.2 Die Phenylpropanoide

Die Phenylpropanoide haben in pflanzlichen Geweben die unterschiedlichsten Funktionen. Als Lignin sind sie eine strukturelle Substanz im sekundären Dickenwachstum der Zellwand

und des wasserleitenden Xylems (Vance et al, 1980; Lewis und Yamamoto, 1990). Dem Lignin kommt insofern eine besondere Bedeutung zu, da es neben Zellulose das zweithäufigste Biopolymer ist und somit das hauptsächliche Schicksal des fixierten Kohlenstoffs widerspiegelt (Bate et al, 1994). Die Anthocyane stellen die größte Gruppe an Farbstoffen im Pflanzenreich dar und die restlichen Flavonoide agieren als Verteidigungssubstanzen gegen Fraßfeinde, Signalmoleküle, UV-Schutz und Verteidigungsstoffe. Die Coumarine, Furanocoumarine und Stilbene sind natürlich vorkommende Fungizide und antibakterielle Substanzen. Sie verhindern die Samenkeimung und wirken ebenfalls als Abschreckung gegen Pflanzenfraß (Buchanan, Grisse und Jones, 2000).

Phenylpropanoide sind überall im Pflanzenreich vertreten und in allen Pflanzengewebe zu finden.

Die einleitende Synthese dieser heterogenen Gruppe geht von der Desaminierung der Aminosäure Phenylalanin durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) (①) aus. Es entsteht Zimtsäure, ein Intermediat, welches PAL hemmt (Mavandad et al., 1990). Die PAL-Reaktion wurde durch Produkthemmung und Studien mit PAL-defizienten Pflanzen als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt identifiziert (Harborne, 1988; Hahlbrock und Scheel, 1989; Lewis und Yamamoto, 1990; Dixon et al., 1992). Alternativ zur Desaminierung von Phenylalanin kann auch die Aminosäure Tyrosin desaminiert werden. Das Enzym Tyrosin-Ammonium-Lyase (TAL) (②) synthetisiert direkt p-Coumarsäure. Aber nur wenige Pflanzenspezies haben die TAL-Reaktion als hauptsächlich einleitenden enzymatischen Schritt etabliert. Die PAL katalysierte Produktion von Zimtsäure ist in den meisten Arten die bevorzugte Reaktion.

In der Regel wird Zimtsäure nicht in der Pflanzenzelle akkumuliert und durch das Enzym Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) (③) zu p-Coumarsäure hydroxyliert. p-Coumarsäure kann nun mehrere Schicksale haben. Erstens kann das Monolignol p-Coumarylalkohol in mehreren Schritten synthetisiert werden. Das Enzym, welches diesen Biosyntheseweg einleitet, ist 4 Coumarat-CoA Ligase (4 Cl) (⑤). Zweitens zweigt von diesem Syntheseweg die Flavonoidbiosynthese ab, welche von Chalcon-Synthase (CHS) (⑨) eingeleitet wird und drittens wird durch eine Hydroxylase (④) die Biosynthese der Coumarine eingeleitet. Viertens wird ebenfalls durch eine Hydroxylase (④) Kaffeesäure synthetisiert, ein weiteres Intermediat des Phenylpropanoidstoffwechsels. Kaffeesäure ist wiederum der Vorläufer zweier weiterer Monolignolvorstufen und der Chlorogensäure (CGA). Letzteres entsteht durch die Konjugation mit Chinasäure aus dem Shikimatweg durch das Enzym Hydroxycinnamoyl-CoA-Quinat:Hydroxycinnamoyltransferase (HQT) (Dixon und Paiva, 1995). Die Vorläufer der Monolignole Coniferylalkohol und Sinapylalkohol sind Ferulasäure bzw. Sinapinsäure. Ferulasäure entsteht aus der Methylierung von Kaffeesäure und Sinapinsäure aus einem zweifachen Schritt bestehend aus Hydroxylierung der Ferulasäure und anschließender Methylierung (Abb. 3.6). Enzyme des eben beschriebenen Abschnitts der Synthese der Phenylpropanoidintermediate und Monolignole sind Hydroxylase (④), CoA Ligasen (⑤), O-Methyltransferasen (OMT) (⑥), Cinnamoyl-CoA-Oxidoreduktasen (CCR) (⑦) und Cinnamoyl-Alkohol-Dehydrogenasen (CAD) (⑧) (Abb. 3.6).

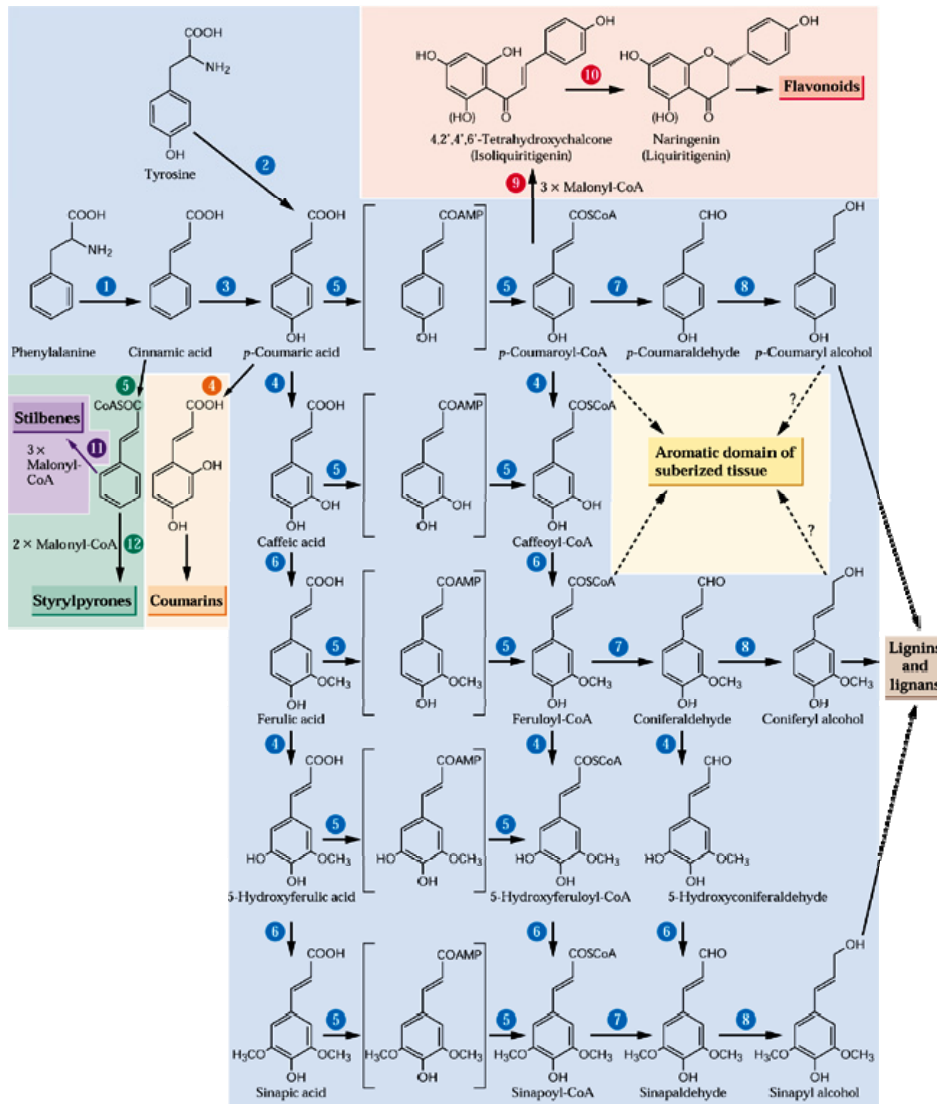


Abb. 3.6: Schematische Übersicht über den Biosyntheseweg der Phenylpropanoide. Dargestellt sind ebenfalls die Verzweigungen zu den Flavonoiden, Coumarinen, Stilbenen, Styrylpyronen und Lignin. ① Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), ② Tyrosin-Ammonium-Lyase (TAL), ③ Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H), ④ Hydroxylasen, ⑤ CoA Ligasen, die an der Ligierung von AMP und CoA beteiligt sind, ⑥ O-Methyltransferasen (OMT), ⑦ Cinnamoyl-CoA-Oxidoreduktasen (CCR), ⑧ Cinnamoyl-Alkohol-Dehydrogenasen (CAD), ⑨ Chalcon Synthase (CHS), ⑩ Chalcon Isomerase, 11 Stilben- Synthase und 12 Styrylpyron Synthase (nach Buchanan, 2000).

Pflanzen erhöhen die Synthese von Phenylpropanoiden oft als Stressantwort, wobei PAL ein wichtiger Kontrollpunkt für den Fluss der Kohlenhydrate durch den Phenylpropanoidstoffwechsel ist. Die Regulation von PAL stand aus diesem Grund oft im Zentrum der Phenylpropanoidforschung. PAL wird neben seiner Produkthemmung durch Zimtsäure (Mavandad et al., 1990) auch durch andere pflanzeninterne Faktoren reguliert. Hormone spielen eine Rolle, ebenso wie Transkriptionsfaktoren der Myb-Familie (Hauffe et al., 1993; Sablowski et al., 1994; Tamagnone et al., 1998).

Inzwischen geht man von einer koordinierten Expression mehrerer Enzyme des Phenylpropanoidstoffwechsels aus. Man fand in den koordinierten Genen gemeinsame Sequenzbereiche in der Promoterregion, die dem Motiv der DNA-bindenden Myb-Transkriptionsfaktoren entsprechen (Dixon und Harrison, 1990; Mol et al, 1996; Weisshaar und Jenkins, 1998; Tamagnone et al., 1998).

3.6 Interaktion von Primär- und Sekundärstoffwechsel

Die Synthese von sekundären Pflanzenstoffen benötigt nicht nur Kohlenstoffskelette und Stickstoff, sondern ist auch energieintensiv. Bei der Synthese hochreduzierter Terpene beispielsweise werden verhältnismäßig große Mengen an Reduktionsäquivalenten verbraucht (Gershenzon, 1994). Dies und die Tatsachen, dass schätzungsweise 20% des fixierten Kohlenstoffs in den Shikimatweg fließen (Haslam, 1993), Lignin das zweithäufigste Biopolymer ist (Bate et al., 1994) und z.B. eine Tabakpflanze bis zu 5 – 8 % ihrer Stickstoffressourcen in das Alkaloid Nikotin einbaut (Baldwin, 1994), führten zur Diskussion verschiedener Hypothesen über die Regulation der Sekundärstoffwechselsynthese und deren Interaktion mit dem Primärstoffwechsel. Die „Optimal-Defense“ Theorie (ODT) geht davon aus, dass die Sekundärstoffe nach Bedarf synthetisiert werden. Es wird angenommen, dass durch Stressfaktoren, z.B. Pythopathogenbefall oder Pflanzenfraß, bestimmte Signale eine auf den Stress abgestimmte Abwehrantwort in der Pflanze induzieren (MacKey, 1974; Feeny, 1976; Rhoades und Cates, 1976). Die „Growth-Difference-Balance“ Hypothese (Van Dam et al., 1996) besagt, dass Abwehrstoffe nur unter günstigen Wachstumsbedingungen synthetisiert werden. Coley et al. (1985) vertritt mit der „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese die Ansicht, dass unter Stickstoffmangelbedingungen die Sekundärstoffwechselbiosynthese kohlenstoffreicher Abwehrstoffe begünstigt wird und umgekehrt. Diese Hypothese wird kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten unterstützen diese Annahme (Bryant et al., 1993; Fajer et al., 1992; Hoeft et al., 1996; Gebauer et al., 1998; Wilkens et al., 1996; Tosserams et al., 2001; Cipollini et al., 2002; Coley et al., 2002; Leser et al., 2005) und andere nicht (Baldwin et al., 1993; Baldwin und Ohnmeiss 1994; Cronin und Hay, 1996; Iason und Hester, 1993; Kinney et al., 1997; Lynds und Baldwin, 1998; Lamontagne et al., 2000; Close et al., 2003).

Diese Unstimmigkeiten kommen wahrscheinlich dadurch zustande, dass bei der Untersuchung der Sekundärstoffe unter diesen Gesichtspunkten die komplexe Vernetzung des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels nicht in Betracht gezogen wurde. Man ging immer davon aus, dass der interne Pool kohlenstoff- und stickstoffreicher Metabolite das externe Angebot widerspiegelt. Es wurde bereits gezeigt, dass die koordinierte Regulation von Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus eher zu einer parallelen als zu einer wechselseitigen Änderung der Metabolite führt, und dass das Kohlenstoff- zu Stickstoffverhältnis eher ein schlechter Indikator für den physiologischen Zustand einer Pflanze ist (Scheible, 1997a; Matt et al., 1998, 2001a, 2001b, 2002; Geiger et al., 1998, 1999; Stitt und Krapp, 1999). Matt et al. (2002) konnte zeigen, dass die Modifikation des Kohlenstoffangebots durch geringe Lichtqualität oder Inhibierung der Rubisco-Aktivität durch antisense *rbcS* nicht zu der erwarteten Verlagerung von kohlenstoffreichen zu stickstoffreichen Sekundärstoffen führte und das ein Anstieg des Zucker:Aminosäure-Verhältnisses nicht mit dem Verhältnis der kohlenstoffreichen Sekundärmetabolite (Chlorogensäure und Rutin) zu den stickstoffreichen Sekundärmetaboliten (Nikotin) korreliert. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sowohl der interne Aminosäure- als auch der interne Kohlenhydratpool sinkt. Des Weiteren zeigt diese Arbeit deutlich, dass die Untersuchung regulatorischer Mechanismen der Sekundärstoffwechselbiosynthese und deren Vernetzung mit dem Primärstoffwechsel eine genaue Dokumentation des physiologischen Zustandes der Pflanze bedarf.

Eine Reihe von Untersuchungen, in denen das Verhalten pflanzlicher Sekundärstoffe unter Stickstoffmangel analysiert wurde, zeigten eine Akkumulation von Phenylpropanoiden und Flavonoiden (Fajer et al., 1992; Bryant et al., 1993; Van De Vijver et al. 1993; Van Der Werf et al., 1993; Hakulinen et al., 1998; Gebauer et al., 1998; Cipollini et al., 2002; Lou et al.

2004). Es stellt sich hier die Frage, ob das ein indirekter Effekt auf die Akkumulation kohlenstoffhaltiger Metabolite ist oder eher eine direkte Antwort auf veränderte Aminosäuregehalte. Möglicherweise sind die erhöhten Phenylpropanoidgehalte aber auch eine Anpassung an das Stickstoffangebot. Alle Untersuchungen dazu bieten keine Antwort auf diese Fragen, da die primären Metabolite nicht genau analysiert wurden und der pflanzliche Stickstoffmangel immer in C/N-Verhältnissen Ausdruck fand. In diesem Zusammenhang war es im Laufe der vorliegenden Arbeit von Interesse, eine Untersuchung der Sekundärmetabolite unter Stickstoffmangel gekoppelt mit einer genauen Dokumentation des Primärstoffwechsels durchzuführen.

3.7 Fragestellungen

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit teilt sich in die Untersuchung der Auswirkung eines reduzierten Stickstoffstoffwechsels auf die Koordination der Aminosäurebiosynthese und auf die Interaktion dieses manipulierten Stickstoffstoffwechsels mit dem Sekundärstoffwechsel.

Zur Beeinflussung des Stickstoffstoffwechsels wurden sowohl Tabakwildtyp-Pflanzen unter Nitratmangelernährung als auch Transformanten mit moderat und stark reduzierter Nitratreduktase-Aktivität verwendet. Letztere erlauben eine Nitratakkumulation unabhängig vom organischen Stickstoffstatus der Pflanze und ermöglichen nitratgesteuerte Stoffwechselprozesse von denen zu unterscheiden, die durch den Stickstoffstatus der Pflanzen beeinflusst werden.

Zur Untersuchung der Auswirkung des reduzierten Stickstoffstoffwechsels auf die Aminosäurebiosynthese wurden alle proteinogenen Aminosäuren außer Cystein und Prolin zu verschiedenen Tageszeitpunkten in den unterschiedlich ernährten Tabakwildtyppflanzen und NIA-Transformanten analysiert. Die diurnale Analyse aller individuellen Aminosäuren in diesen Pflanzen in Kombination eines Aminosäuredatensatzes erzeugt von Matt et al. (2002) unter kohlenstofflimitierten Bedingungen, sollte verwendet werden, um Änderungen der individuellen Aminosäuren auf reduzierten Stickstoff- und Kohlenstoffstatus zu untersuchen. Mit Hilfe statistischer Analysen der Datensätze sollte die Hypothese nach einer koordinierten Biosynthese der Aminosäuren in Pflanzen geprüft werden.

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel sollten Nikotin und einige ausgewählte Phenylpropanoide analysiert werden. Die biologische Fragestellung diesbezüglich war es, den Einfluss veränderter Nitrat- und Aminosäuregehalte auf das Spektrum der Sekundärmetabolite zu untersuchen.

4 Material und Methoden

4.1 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an verschiedenen Genotypen von *Nicotiana tabacum* L. vorgenommen, die sich in Bezug auf die Nitratreduktaseaktivität unterscheiden. Die Genotypen und deren Erzeugung werden im folgenden beschrieben (Scheible 1996, Matt 1998)

4.1.1 Wildtyp

Der Wildtyp enthält ein amphidiploides Genom ($2n = 48$), auf welchem sich zwei Nitratreduktase Strukturgene (*Nia1* und *Nia2*) auf ungekoppelten Loci befinden. Der Genotyp wird wie folgt beschrieben: *Nia1/Nia1*; *Nia2/Nia2*, Varietät Gatersleben.

4.1.2 Transformanten

Es wurden die Transformantenlinien F23xNia30(145) und Nia30(145) mit verminderter Nitratreduktaseaktivität (NRA) verwendet. Die Linie F23xNia30(145) besitzt ein funktionelles Strukturgen der Nitratreduktase *Nia2*. Zusätzlich wurde das *Nia2* Gen in die Pflanze transformiert. Sie beschreibt folgenden Genotyp: *nia1/Nia2* ; *nia1/nia2* ; *Nia2* und verfügt über eine messbare NRA von 40% der Wildtype Aktivität. Die Linie Nia30(145) ist eine homozygote Doppelmutante mit zusätzlich transformiertem *Nia2* Gen. Sie beschreibt folgenden Genotyp: *nia1/nia1*; *nia2/nia2* ; *Nia2* und verfügt über eine messbare NRA von 1 – 3% der Wildtyp Aktivität.

Zur Erzeugung der Transformante wurden amphihaploide Tabak-Zellsuspensionen mit Nitrosomethyl-Harnstoff mutagenisiert. Eine Selektion auf Chlorat-Resistenz führt zur Isolierung von NRA-defizienten Zelllinien mit einer Auxothrophie für reduzierten Stickstoff (Müller & Grafe, 1978). Von 16 Zelllinien, die Defekte im NADH-NR-Apoprotein hatten (*Nia*-Typ), wurden nach spontaner Chromosomen-Verdoppelung fertile, amphiploide Pflanzen und Samen erhalten (Müller 1978, 1983) Bei diesen Pflanzen handelt es sich um homozygote Doppelmutanten (Genotyp: *nia1/nia1* ; *nia2/nia2*). Es wurden zwei vollständige NRA-Doppelmutanten Nia28 und Nia30 erhalten. Durch Kreuzung der Nia28 Mutante mit dem Wildtyp und intensivem Rückkreuzen der F₂- Generation wurden die homozygote Einzelmutante F23 (Genotyp: *nia1/nia1* ; *Nia2/Nia2*) erhalten (Müller, 1983).

In Blatt-Mesophyll-Protoplasten der Nia30-Doppelmutante wurde mittels Elektroporation ein 12 kb Genprodukt transformiert, welches die komplette Sequenz (Introns und Exons) des Wildtyp *nia2*-Gens enthält, sowie dessen unmittelbare „upstream“ (5 kb) und „downstream“ (2 kb) Regionen enthält. Zur Selektion wurde ein Plasmid mit Aminoglycosid-Resistenz ko-elektroporiert. Es wurden Pflanzen regeneriert, wobei die Linie Nia30(145) fähig war, mit eigener Wurzel auf Nitrat mit einziger Stickstoffquelle zu wachsen. Es folgt eine Kreuzung der homozygoten Einzelmutanten F23 und der Transformante Nia30(145), was zur Entstehung des in der Arbeit verwendeten Geotyp F23xNia30(145) (*nia1/Nia2* ; *nia1/nia2* ; *Nia2*) führte.

4.2 Pflanzenanzucht

4.2.1 Klimakammerbedingungen

Die Tabak-Genotypen wurden in einer begehbaren Klimakammer des Typs Weiß-Umwelttechnik (Reiskirchen) angezogen. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60%, die Temperatur wurde konstant auf 25°C gehalten. Die Lichtbedingungen folgten einem 12 Stunden Licht- und Dunkelrhythmus bei 500 $\mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

Folgeexperimente wurden entweder in einer begehbaren Klimakammer des Typs York Refrigeration (Dänemark) oder im Gewächshaus angezogen. In der Klimakammer betrug die relative Luftfeuchtigkeit ebenfalls 60%, die Temperatur betrug in den Lichtperioden 25°C und in den Dunkelperioden 23°C. Die Lichtbedingungen folgten einem 12 Stunden Licht- und Dunkelrhythmus bei 500 $\mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$. Klimabedingungen im Gewächshaus betrug 16 Stunden Beleuchtung der Stärke 400 $\mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ und die relative Luftfeuchte betrug konstant 55%. Die Temperatur in den Lichtperioden betrug 25°C und in den Dunkelperioden 20°C.

Hoch CO₂ Experimente erfolgten in einer nicht begehbaren Klimakammer (York International, Dänemark). Die Lichtstärke betrug ca. 500 $\mu\text{mol Quanten} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$, die Temperatur 25°C und die relative Luftfeuchte 60%. Diese Klimakammer enthielt einen zusätzlichen Gasanschluss, durch welchen die CO₂-Konzentration der Luft geregelt werden konnte.

4.2.2 Tabakanzucht

Die Tabaksamen wurden in einem 1,4 l Plastiktopf, gefüllt mit Quarzsand (Korngröße 0,3 – 0,8 mm und 0,6 – 1,2 mm im Mischverhältnis 1:1), ausgestreut. Der Quarzsand wurde vorher mit demineralisiertem Wasser gewaschen und befeuchtet. Um die Luftfeuchtigkeit in den Töpfen hochzuhalten, wurden während der Keimungsphase die Töpfe mit Frischhaltefolie abgedeckt. Während der ganzen Keimungs- und Wachstumsphase standen die Töpfe in einer Klimakammer (entweder Typ Weiß-Umwelttechnik oder Typ York Refrigeration). Nach dem Auskeimen wurde die Folie entfernt und die Pflanzen mit einer 1mM Nitratlösung alle zwei Tage gegossen. Die Nährlösung wurde von Plastikuntersetzern aufgefangen und verblieb dort.

Die Tabaksamen der Folgeexperimente wurden wie folgt sterilisiert. 140 mg Tabaksamen wurden mit 1 ml 70% Ethanol für 2 Minuten geschüttelt. Der Ethanol wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und kurz mit sterilisiertem Wasser gewaschen. Die Samen wurden danach 15 Minuten in einer 0,1%igen Hypochloritlösung mit einigen Tropfen Tween20 inkubiert. Es erfolgte abermals die Abnahme mit Hilfe einer Pasteurpipette und eine dreimalige Waschung der Samen mit sterilisiertem Wasser. Die Lagerung des sterilisierten Samen erfolgte in einem Reaktionsgefäß gefüllt mit 0,15%igem und sterilisiertem Selectagar. Die Samen waren bis zu 8 Monaten nach der Sterilisation noch keimungsfähig.

Zur Keimung der Pflanzen wurden die Samen in 1.4 l Plastiktöpfe gefüllt mit angefeuchteter Pflanzenerde überführt. Um die Luftfeuchtigkeit während der Keimungsprozess hoch zu halten wurden die Samentöpfe in Keimungsbehälter gestellt. Nach Keimung wurde der Deckel des Keimungsbehälters entfernt. Während des ganzen Prozesses wurden in den Schalen der Keimungsbehälter permanent Leitungswasser, versetzt mit dem Fungizid Proplant,

gehalten. Die Pflanzentöpfe standen bis zum Pikieren der Tabakpflanzen in einer Klimakammer (York Refrigeration) mit einer Beleuchtung von $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

Die Versuchspflanzen wurden je nach Genotyp in einem Alter von 14 bis 25 Tagen in Plastiktöpfe mit 16 cm Durchmesser transferiert. Diese enthielten entweder die oben erwähnte Quarzsandmischung oder Pflanzenerde, die je nach Behandlung variierte. Pflanzen, die mit ausreichend Nitrat versorgt wurden, erhielten normale Topferde und Pflanzen, die unter Nitratmangel aufwuchsen, erhielten Nullerde. Zur Düngung wurden die Pflanzen alle drei Tage mit der entsprechenden Nährlösung gegossen (ausreichende Nitratversorgung: 12 mM KNO_3 ; Nitratmangel: 0.2 mM KNO_3). Die Versuchspflanzen, die in Quarzsand wuchsen wurden einmal am Tag nach 4 Stunden Licht mit 200 ml der entsprechenden Nährlösung gegossen (ausreichende Nitratversorgung: 12 mM KNO_3 ; Nitratmangel: 0.2 mM KNO_3).

4.2.3 Nährlösungen

In den verschiedenen Versuchsansätzen wurden die Tabakpflanzen, Wildtypen und Transformanten in unterschiedlichem Nitratangebot (12 und 0.2 mM) kultiviert bzw. mit unterschiedlichen Nährlösungen gedüngt.

Gesamt-N	mM	Ammoniumnitrat-	Kaliumnitrat-Nährlösung	
		12	12	0.2
NH_4NO_3	mM	6	--	--
KNO_3	mM	--	4	0.133
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	mM	--	4	0.067
KH_2PO_4 pH 5.6	mM	3	3	3
MgSO_4	mM	3	1	3.6
NaCl	mM	1	1	1.3
KCl	mM	2	--	1.3
MCl_2	mM	--	--	2.6
K_2SO_4	mM	--	--	1
$\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	g l ⁻¹	0.6	0.6	0.6
NaFe-EDTA	mg l ⁻¹	8	8	8
Mikronährelement-Lösung	‰ (v/v)	0.4	0.4	0.4

pH 5.8 - 5.9

Mikronährelement-Lösung:

150 mM H_3BO_3 , 35 mM MnSO_4 , 2.5 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1.5 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM NiCl_2 , 0.75 mM HMoO_4 , 50 μM CoCl_2

4.2.4 Pflanzenernte

Alle in Rahmen dieser Arbeit angezogenen Pflanzen wurden im Rosettenstadium geerntet. Es erfolgte eine diurnale Ernte, bei welcher alle 4 Stunden eine Blattprobe genommen wurde. Alle übrigen Ernten erfolgten in der zweiten Hälfte des Tages nach 8 Stunden Licht. Es wurde immer das jüngste vollentwickelte Blatt geerntet. Es wurde bei den Beprobungen im Licht darauf geachtet, dass dem Blatt möglichst schnell die Mittelrippe entfernt wurde und so wenig Beschattung wie möglich erfolgte. Alle Proben wurden so schnell wie möglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

Aufgrund unterschiedlicher Genotypen und unterschiedlichen Behandlungen variierte die Wachstumsrate der Pflanzen erheblich. Dementsprechend war das Alter der Pflanzen zum Erntezeitpunkt unterschiedlich. Durch eine Ernte jeweils kurz vor der Internodienstreckung wird jedoch angenommen, dass ein vergleichbares physiologisches Alter gewährleistet ist.

4.2.5 Anzucht der Rubisco-antisense Pflanzen (übernommen aus Petra Matt, Dissertation 2001)

Es wurden Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havanna SR1) verwendet, die einen reduzierten Gehalt an Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase) aufweisen (Rodermeil et al. 1988). Rubisco ist ein multimerer Proteinkomplex bestehend aus 16 Untereinheiten. Die eine Hälfte der Untereinheiten sind chloroplastidär (große Untereinheit) und die andere Hälfte sind nuklear (kleine Untereinheit) kodiert. Expression der antisense-DNA Sequenz der kleinen Untereinheit im Tabakgenom reduziert die Akkumulation sowohl der mRNA wie auch des Proteins dieser kleinen Untereinheit der Rubisco. Infolgedessen wird der Proteingehalt der großen Untereinheiten im Blattgewebe vermindert. Die Reduktion des Rubiscopehaltes ist umso größer, je mehr Kopien der *anti-rbcS* im Genom vorhanden sind (Rodermeil et al. 1988). Diese transgenen Pflanzen variieren stark in ihrer Biomasse, korrelierend mit der Anzahl der antisense Gene.

Samen von den folgenden drei Pflanzentypen wurden in den Versuchen eingesetzt:

- untransformierte Pflanzen (Wildtyp)
- selbstbestäubte Pflanzen, die eine Kopie der *anti-rbcS* im Genom enthalten (*ant3*); Pflanzen aus diesen Samen besitzen somit 0, 1 oder 2 Kopien im Verhältnis 1:2:1
- selbstbestäubte Pflanzen, die mindestens vier Kopien der *anti-rbcS* im Genom enthalten (*ant5*); Pflanzen aus diesen Samen besitzen somit bis zu 8 Kopien.

Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer (ca. $500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 60 % relative Luftfeuchte; 12 h Licht/ 25°C und 12 h Dunkel/ 25°C) auf mit Wasser angefeuchtetem Quarzkristallsand (Dorsilit, Durchmesser 0.3-0.8 mm und 0.6-1.2 mm, 1:1 gemischt) ausgesät. Der Saattopf wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt. Nach dem Auskeimen wurden die Pflanzen mit 12 mM Ammoniumnitrat-Nährlösung (*siehe oben*) bewässert und langsam an die niedrigere Luftfeuchte der Klimakammer gewöhnt. Alle Genotypen wurden 16 Tage nach Aussaat in mit Quarzsand gefüllte Töpfe (Durchmesser 8 cm) vereinzelt und von nun an mit der jeweiligen Nährlösung (*siehe oben*) einmal pro Tag bewässert. Die Wildtyp-Pflanzen wurden nach 25 Tagen erneut pikiert, der Topfdurchmesser betrug nun 15 cm. Alle Genotypen wurden nach 41 Tagen für die Analyse gleich alter Pflanzen geerntet. Das jüngste, voll expandierte Blatt wurde nach Entfernung der Mittelrippe in den jeweiligen

Licht- und Dunkelbedingungen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Bei den Genotypen ant3 und ant5 mit geringer Biomasse wurden immer die Blätter von 2 Pflanzen vereinigt.

4.2.6 Anzucht mit verschiedenen Lichtstärken (übernommen aus Petra Matt, Dissertation 2001)

Es wurden Wildtyp-Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havanna SR1) unter den gleichen Anzuchtbedingungen wie in *Abschnitt 4.2.5* beschrieben, angezogen. Allerdings wurden die Pflanzen 10 Tage nach dem ersten Pikieren drei verschiedenen Lichtstärken ausgesetzt: ca. $400\text{ }\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ca. $150\text{ }\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und ca. $80\text{ }\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Die niedrigen Lichtstärken wurden durch Abschatten mit 3 Lagen Gartenvlies und einer Kombination aus Gartenvlies und schwarzer Nadelfolie erreicht. Alle Pflanzen wurden nach 34 Tagen wie oben beschrieben geerntet.

4.3 Physiologische und biochemische Methoden

Die Pflanzenproben wurden in einer Retschmühle MM 300 (Retsch, Haan, Deutschland) homogenisiert. Die zur Mühle gehörenden Metallgefäße und Retschkugeln wurden in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das tiefgefrorene Blattmaterial wurde in die Metallgefäße mit jeweils einer Retschkugel (Durchmesser: 2 cm) überführt und bei einer Frequenz von 30/Sekunde 45 Minuten homogenisiert. Das erhaltene Pflanzenpulver wurde in vorgekühlten 15 ml Falcon- oder Eppendorf Schraubdeckelreaktionsgefäße bei -80 °C gelagert.

4.3.1 Extraktionsmethoden

- **Ethanolische Extraktion**

Ca. 20 mg des homogenisierten Pflanzenmaterials wurden in ein 1.5 ml Eppendorf Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden nach Zugabe von $250\text{ }\mu\text{l}$ 80% (v/v) Ethanol mit 3 mM Hepes pH 7.5 für 20 Minuten bei 80 °C extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min; 14000 rpm) wurde der Überstand abgehoben und auf Eis in einer „96 deep well“ (Sarsted, Newton) Platte gelagert. Das Sediment wurde erneut mit $150\text{ }\mu\text{l}$ 80% (v/v) Ethanol mit 3 mM HEPES pH 7.5 extrahiert. Es folgte eine abschließende Extraktion mit $250\text{ }\mu\text{l}$ 50% (v/v) Ethanol mit 3 mM Hepes pH 7.5. Die von den 3 Extraktionsschritten vereinigten Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Sediment wurde zur Stärke- und Proteinbestimmung verwendet (*siehe unten*).

- **Trichloressigsäure Extraktion**

Ca. 80 mg des homogenisierten Pflanzenmaterials wurde mit $400\text{ }\mu\text{l}$ einer eisgekühlten 16% (g/v) Trichloressigsäure/Diethylether-Mischung versetzt, gut geschüttelt und für 15 – 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde auf Eis vorgekühlte 16% Trichloressigsäure/Wasser-Lösung, die zusätzlich 5 mM EGTA (zum Komplexbilden von Ca^{2+} , welches sonst phosphathaltige Verbindungen fällen würde) enthielt, auf das oben genannte Homogenisat gegeben und für mindestens 3 Stunden auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 14000 rpm und 4 °C wurde die wässrige Phase in vorgekühlte 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße über-

führt. Um die Trichloressigsäure auszuschütteln wurden 500 µl in Wasser gesättigter Diethylether auf die wässrige Phase gegeben und gut geschüttelt. Es wurde erneut bei 4°C, 14000rpm 10 min zentrifugiert. Der Ether wurde abgenommen und verworfen. Dieser Waschvorgang wurde 2-mal wiederholt. Abschließend wurde die wässrige Phase durch die Zugabe sehr geringer Mengen (0.5 – 5 µl) 5 M KOH/ 1 M Triethanolamin neutralisiert. Die Extrakte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

- **Extraktion löslicher und zellwandgebundener Phenole und Nicotin**

Zur Extraktion der *löslichen Phenole und des Nikotins* wurde ca. 100 mg des homogenisierten Pflanzenmaterials 30 min bei 65°C in 500 µl 100% Methanol bei häufigem Schütteln extrahiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde erneut mit 250 µl 100% Methanol 15 min bei 65°C und danach erneut mit 250 µl 50% Methanol 15 min bei 65°C extrahiert. Die erhaltenen Überstände wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Extraktion der *zellwandgebundenen Phenole* wurde das aus der oben beschriebenen Extraktion erhaltene Sediment mit 400 µl 1 N NaOH aufgenommen, komplett gelöst und bei 40°C mindestens 12 h inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 – 2 angesäuert. Die in Lösung gegangenen Phenole wurden mit einem Volumenanteil Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die organische Phase abgenommen und die wässrige erneut mit Ethylacetat versetzt (*siehe oben*). Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden zur Trockenen eingeeengt und in 100 µl 50% Methanol aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C zwischengelagert.

4.3.2 Quantifizierung von Metaboliten und anderen Zellinhaltsstoffen

Das Aliquotieren der Proben fand mit einem Pipettierroboter (Hewlett Packard, Böblingen, Deutschland) statt. Alle Proben wurden in 96 well Mikrotiterplatten (Sarsted, Newton) pipettiert. Die Messungen fanden in 96 well Mikrotiterplatten an einem Elisaplatten Photometer statt (mit einem Gerät der Marke BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland entweder Typ „Synergy“ oder Typ „ELX-800 uv“).

- **Chlorophyll a und b**

Aus dem ethanolschen Extrakt wurden nach vorangegangener 5 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm in einem Verhältnis 1:2.4 mit 99,8% EtOH (p.a./nicht vergällt) Duplikate jeder Probe in 96 well Mikrotiterplatten pipettiert und bei einer Wellenlänge von 645 und 665 nm an einem Photometer gemessen.

Der Chlorophyllgehalt wurde über die erhaltene Extinktion nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Chl a} = 5.21A_{665} - 2.07A_{645}$$

$$\text{Chl b} = 9.29A_{645} - 2.74A_{665}$$

- **„Lösliche Zucker“**

Zur Bestimmung der Gehalte an Glukose, Fruktose und Saccharose wurden die ethanolischen Extrakte einem gekoppelten Enzymtest unterzogen. Der Nachweis erfolgt dadurch, dass das zu bestimmende Kohlenhydrat über enzymatische Reaktionen an die Bildung von NADPH gekoppelt wurde. Diese Umsetzung wurde bei einer Wellenlänge von 334 nm an einem Elisaplatten Photometer ELX-800 uv gemessen. Es wurden jeweils Duplikate jeder Probe in eine 96 well Mikrotiterplatte pipettiert.

Es wurde mit folgendem Testansatz gemessen:

100 mM	Hepes/KOH, 3 mM MgCl ₂ , pH 7.0
60mg/ml	ATP
36mg/ml	NADP
0.14 U	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Sukzessive Zugaben von:

0.42 U	Hexokinase
0.7 U	Phosphoglucoisomerase
80 U	Invertase

- **Gesamtprotein**

Das bei der ethanolischen Extraktion verbliebene Sediment wurde mit 400 µl 0.1 M NaOH für 30 min bei 95°C inkubiert. Es wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und danach wurden Duplikate in eine 96 well Mikrotiterplatte pipettiert und mit einer 1:5 verdünnten Bradford Lösung versetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Die Kalkulation der Proteingehalte erfolgte über die Steigung einer Kalibrierungskurve.

- **Stärke**

Das für die Gesamtproteinmessung mit NaOH inkubierte Pellet wurden mit 80 µl 0.5 M HCl + Essigsäure/NaOH 0.1 M pH 4.9 neutralisiert. Danach wurde ein Aliquot des Sediments mit folgendem Degradierungsansatz versetzt über Nacht (ca. 16 h) inkubiert:

1,4 U	Amyloglucosidase
2 U	α-Amylase

Nach Zentrifugation 2 min bei 2000 rcf wurde die im Überstand enthaltene Glucose enzymatisch gemessen (*siehe Abschnitt „lösliche Zucker“*)

- **Nitrat**

Für die Nitratbestimmung (Gebauer et al., 1984) wurden ethanolische Extrakte verwendet. Die Auftrennung erfolgte an einer Anionenaustauschsäule auf Silicabasis (Vydac 302 IC) in einem isokratischen Lauf bei Raumtemperatur mittels einer HPLC Anlage (Kontron, Eichingen). Das Laufmittel setzte sich wie folgt zusammen:

45 mM	KH ₂ PO ₄ /HCl, pH 2.7
-------	--

Die Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 1.6 ml/min. Die Extrakte wurden bei Bedarf verdünnt und in einem auf 4°C vorgekühlten automatischen Probengeber (Autosampler SA 360, Kontron, Eichingen) gestellt. Die Detektion erfolgte bei 210 nm durch einen UV-Detektor. Für die Aufzeichnung und Integration der Signale wurde das Datensystem 450-MT (Kontron, Eichingen) eingesetzt. Der Nitratgehalt wurde durch Flächenintegration der erhaltenen Signale im Vergleich zu einem externen Nitratstandard quantifiziert.

- **Individuelle Aminosäuren**

Die Auftrennung der proteinogenen Aminosäuren wurde durch Einsatz der ethanolischen Extraktion unter Verwendung einer HPLC-Anlage (Kontron, Eichingen) vorgenommen. Das Prinzip dieses Nachweisverfahrens beruht auf einer fluorometrischen Detektion, indem die primäre Aminogruppe der Aminosäuren (mit Ausnahmen von Prolin und Cystein) durch Bindung mit o-Phthalsäuredialdehyd (OPA) in ein fluoreszierendes Derivat umgesetzt wurde.

Ein Probengeber (Autosampler 465, Kontron, Eichingen) injizierte dazu in 35 µl Extrakt 35µl Derivatisierungsreagenz, welches sich wie folgt zusammensetzt:

- 5% (g/v) OPA/Methanol
- 0,8 M Boratpuffer (mit KOH auf pH 10.4 eingestellt)
- 3-Mercaptopropionsäure
- Verhältnis: 10:90:1 (v/v/v)

Nach 100 Sekunden bei 4°C wurde 20µl der derivatisierten Probe injiziert. Die Trennung fand mit einer Hypersil ODS-Säule (3µl Partikelgröße, 150mm Länge, 4,6mm Durchmesser; Knauer GmbH, Berlin) statt. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde eine kurze Vorsäule (gefüllt mit Hypersil ODS, s.o., Säulenlänge: 5 mm; Säulendurchmesser: 2 mm) verwendet. Die Laufmittel setzten sich wie folgt zusammen:

Laufmittel A bestand aus einer Mischung aus 1000ml 12mM Na-Phosphat (pH 6,8; Einstellung mit H₃PO₄) und 2 ml Tetrahydrofuran.

Laufmittel B setzte sich aus 250 ml 2mM Na-Phosphat (pH 6,8; Einstellung mit KOH), 175 ml Methanol und 110 ml Acetonitril zusammen.

Für die Auftrennung der Aminosäuren wurde folgender Laufmittelgradient verwendet:

Zeitpunkt	Gradient	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
Minute 0	isokratisch	95	5
Minute 4.3	linearer Gradient auf	95	5
Minute 16.25	linearer Gradient auf	85	15
Minute 26.3	linearer Gradient auf	50	50
Minute 38.3	linearer Gradient auf	40	60
Minute 43	linearer Gradient auf	30	70
Minute 47	linearer Gradient auf	0	100
Minute 52	isokratisch	0	100
Minute 53.5	linearer Gradient auf	95	5
Minute 62	isokratisch	95	5

Die vom Fluorimeter (SFM25, Kontron, Eichingen) detektierten Signale (Excitationswellenlänge = 330nm, Emissionswellenlänge = 450nm) wurden mit dem Datensystem 450-MT (Kontron, Eichingen) ausgewertet.

- **Ammonium**

Zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration wurden die TCA Extrakte verwendet. Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, dass Glutamindehydrogenase unter Verwendung von Ammonium und NADH Glutamin synthetisiert. Man misst die NADH Abnahme bei 340 nm.

Es wurde folgender Testansatz verwendet:

150 mM	Tricin pH 8.5
100 mM	oxo-Glutarat
3 mM	NADH
100 mM	ADP (gelöst in 1 M KOH, Inkubation 10 min bei 60°C, Neutralisation mit konzentrierter HCl)
30 µl	TCA Extrakt

Start mit Glutamindehydrogenase in Glycerinlösung (12 U)

Es wurden jeweils Duplikate der Proben in eine Mikrotiterplatte pipettiert und bei 340 nm im Elisaplaten Photometer (ELX-800 uv) gemessen.

- **Phenylpropanoide und Nikotin**

Die Auftrennung löslicher und zellwandgebundener Phenole sowie Nicotin wurde unter Verwendung einer HPLC-Anlage (Kontron, Eichingen) vorgenommen. Die Messung erfolgte durch den Einsatz der methanolischen Extrakte. Um ein möglichst breites Spektrum an sekundären Metaboliten analytisch detektieren zu können, wurde ein Diode-Array-Detektor (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) verwendet. Ein Probengeber (Autosampler 465, Kontron, Eichingen) injizierte 20 µl Extrakt. Die Trennung fand mit einer Nucleosil 100 C18 (3µl Partikelgröße, 100mm Länge, 4 mm Durchmesser; Knauer GmbH, Berlin) statt. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde eine kurze Vorsäule (gefüllt mit Nucleosil 100, s.o., Säulenlänge: 5 mm; Säulendurchmesser: 2 mm) verwendet. Die Laufmittel setzten sich wie folgt zusammen:

Laufmittel A: 0.25 % (v/v) Phosphorsäure, pH 2.2 (NaOH)

Laufmittel B: 80 % Acetonitril

Für die Auftrennung der Aminosäuren wurde folgender Laufmittelgradient verwendet:

Zeitpunkt	Gradient	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
Minute 0 – 5	isokratisch	100	0
Minute 5 – 15	linearer Gradient auf	65	35
Minute 15 – 20	linearer Gradient auf	40	60
Minute 20 – 28	isokratisch	40	60
Minute 28 – 28.3	linearer Gradient auf	0	100
Minute 28.3 – 31.3	linearer Gradient auf	0	100
Minute 31.3 – 32	linearer Gradient auf	100	0
Minute 32 – 40	isokratisch	100	0

Der Diode-Array-Detektor maß zu folgenden Zeiten bei folgenden Wellenlängen:

Zeitpunkt	Wellenlänge	Metabolit
Minute 0 – 10.5	260 nm	Nicotin
Minute 10.5 – 20	325 nm	Chlorogensäure, Kaffeesäure, p-Coumarsäure, Sinapinsäure, Ferulasäure
Minute 20 – 27	200 nm	Benzoessäure, Salicylsäure, Zimtsäure

Die detektierten Signale wurden mit Hilfe eines externen Standards identifiziert. Wenn die Möglichkeit bestand und das detektierte Signal groß genug war, wurde das vom Detektor erzeugte Spektrum mit einer angelegten Spektrumsbibliothek verglichen. Die vom Diode-Array-Detektor detektierten Signale wurden mit dem Datensystem Kroma3000 (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) ausgewertet. Die Glaubwürdigkeit dieser HPLC-Methode und der Extraktion wurde getestet, indem zum gefrorenen Material vor der Extraktion kleine definierte Mengen an Nikotin und Phenolen dazugegeben. Die Reproduktivität lag bei 95 – 100% für Chlorogensäure, Rutin, Kaffeesäure, Zimtsäure, Benzoessäure, Salicylsäure und Ferulasäure in beiden Fraktionen und 75% für p-Coumarsäure für die unlösliche Fraktion.

4.3.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

- **Nitratreduktase (NR)**

Die Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität erfolgte nach MacKintosh (1992) über die Quantifizierung von gebildetem Nitrit mittels einer Farbreaktion in Form einer Azokupplung. Es kann zwischen einer maximalen Aktivität und einer Aktivität unter selektiven Bedingungen unterschieden werden. Dies wurde durch Variation der Magnesiumkonzentration im Inkubationsansatz ermöglicht. Unter nicht selektiven Bedingungen (- Mg^{2+}) ist die maximale Aktivität messbar, unter selektiven Bedingungen (+ Mg^{2+}) ist die stärker phosphorylierte Form dagegen völlig inaktiv (Huber et al., 1992).

Extraktion

50 mg des gemörserten und bei $-80^{\circ}C$ gelagerten Pflanzenmaterials werden mit folgendem Extraktionspuffer in einer 1:10 Verdünnung extrahiert.

- 100mM HEPES pH 7,5 (eingestellt mit KOH)
- 5mM Mg-Acetat pH 7,5
- 1mM EDTA

10% (v/v) Glycerin
 5mM DTT
 0,5% (v/v) Rinderserumalbumin
 0,1% Triton X-100
 0,5mM PMSF
 20µM FAD
 25µM Leupeptin
 5µM Na₂MoO₄
 1% (w/v) Poly-vinyl-polypyrrolidon (PVPP)

DTT, PMSF, FAD und Leupeptin wurden erst kurz vor der Extraktion zu dem Puffer zugegeben. Die Extrakte wurden mit einem Rührspatel gründlich gemischt, sofort auf Eis gestellt und nach maximal 5 Minuten für die Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Für die Messung der maximalen und selektiven Aktivität wurden je 825 µl Inkubationspuffer auf 30°C vorgewärmt, mit 165 µl Extrakt versetzt und bei 30°C inkubiert. Die Endkonzentration der Inkubationsansätze war wie folgt:

		maximal	selektiv	Standard
HEPES-KOH, pH 7.5	mM	100	100	100
KNO ₃	mM	5	5	5
EDTA, pH 7.5	mM	5	-	5
Magnesiumacetat	mM	-	10	-
Leupeptin	µM	15	15	15
FAD	µM	10	10	10
NADH	mM	0.5	0.5	0.5
DTT	mM	0.5	0.5	0.5
Na ₂ MoO ₄	µM	5	5	5
Natriumnitrit	mM	-	-	1

Zu drei Zeitpunkten (z.B. nach 2, 4, 6 min) wurde je ein Inkubationsansatz von 300 µl entnommen und die Reaktion sofort durch Vermischen mit 25 µl 0.6 M Zinkacetat gestoppt. Zur Bestimmung der internen Nitratmenge wurde ein 50 µl Extraktaliquot direkt mit 25 µl 0.6 M Zinkacetat in 250 µl Inkubationspuffer gestoppt. Als interner Standard wurde eine definierte Menge Nitrit (10 mmol/ml) zugegeben, um eventuell im Extrakt vorhandene Konkurrenzsubstrate für die Azokupplung mit Nitrit nachweisen zu können. Das unverbrauchte NADH in den abgestoppten Ansätzen wurde durch eine 15-minütige Dunkelinkubation mit 75 µl 0.25 mM Phenazinmethosulfit oxidiert. Anschließend wurden 300 µl 1 % (g/v) Sulfanilamid in 3 N HCl und 300 µl 0.02 % N-Naphthyl-ethylendiamin zugegeben. Nach weiteren 20 Minuten wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 14000 rpm) und die Extinktion des Überstandes bei 540 nm photometrisch (Uvikon 930, Kontron) bestimmt. Die Berechnung der Aktivität erfolgte mittels linearer Regression.

4.3.4 Histologische Färbung von Lignin

Die histologischen Präparate zur spezifischen Anfärbung des Lignins stammen aus Stammquerschnitten der Wildtyp Pflanzen beider Behandlungen und der Transformanten aller Behandlungen. Die Querschnitte wurden jeweils am jüngsten Teil des Stammes vorgenommen. Mit einer Rasierklinge wurden per Hand möglichst dünne Stammquerschnitte erzeugt, die auf

einen Objektträger transferiert wurden. Dort wurden die Schnitte 5 Minuten mit folgender Lösung angefärbt:

25 mg	Phloroglucinol
25 ml	Ethanol pur
25 ml	37 % HCl

Die Färbelösung wurde in einer lichtgeschützten Flasche angesetzt. Die Schnitte wurden mit bidestilliertem Wasser gewaschen und unmittelbar in einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) bei 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung betrachtet. Die Bilder wurden mit einer an das Mikroskop gekoppelten Digitalkamera (Visitron Systems GmbH, Puchenheim, Deutschland) erstellt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

Alle nicht aufgeführten molekularbiologischen Methoden wurden nach Sambrook et al. (1989) bzw. Ausubel (1987) durchgeführt.

4.4.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mit ca. 100 mg tiefgefrorenen und gemörserten Pflanzenmaterials durch Zugabe von 1 ml TriZol. Der Extrakt wurde gut durchmischt und auf Eis gestellt. Danach wurde 200 µl Chloroform zugegeben, erneut gut durchmischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4°C) und die Abnahme des wässrigen Überstandes. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde 500 µl Isopropanol zugegeben und für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine größere Ausbeute an Nukleinsäuren zu erhalten, wurde zum Teil auch über Nacht bei 4°C gefällt. Durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4°C) wurde das Präzipitat isoliert, der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, es sollte sich mindestens einmal von der Wand des Reaktionsgefäßes gelöst haben. Es wurde erneut durch Zentrifugation (12000 rpm, 5 min, 4°C) das Präzipitat isoliert. Es war nun durchsichtig und von gelatinöser Erscheinung. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet (ca. 30 min bis 2 Stunden) und in 50 µl sterilisiertem Wasser suspendiert. Falls es Schwierigkeiten beim Suspendieren des Pellets gab, konnte man die extrahierte RNA für maximal 6 Stunden bei 4°C inkubieren. Durch die Messung der Extinktion bei 280 nm und 260 nm wurde die Menge und Reinheit der erhaltenen RNA bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde RNase Inhibitor zur Probe gegeben und die RNA bei -80°C gelagert.

4.4.2 cDNA Synthese

Zu der in *Abschnitt 4.4.1* extrahierten und in sterilisiertem Wasser resuspendierten RNA wurde 1 µl DNase gegeben, um mögliche Verunreinigungen der Probe mit genomischer DNA zu beseitigen. Es wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Es wurde 50 µl sterilisiertes Wasser zugegeben. Die RNA wurde mit 100 µl 4 M Lithiumchlorid über Nacht bei 4°C gefällt. Nach einer Zentrifugation (12000 rpm, 5 min, 4°C) wurde das Präzipitat isoliert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut durch Zentrifugation (12000 rpm, 5 min, 4°C) isoliert und an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl sterilisiertem Wasser

gelöst. Bei Bedarf wurde die Probe für maximal 6 Stunden bei 4°C inkubiert. Falls es danach weiterhin Schwierigkeiten gab das Pellet zu lösen, wurde die Probe für maximal 20 Minuten bei 65°C erhitzt und bei Bedarf nach erneuter Zugaben von 50 µl sterilisiertem Wasser verdünnt. Die Quantifizierung und Qualitätsmessung der RNA erfolgte über die Messung der Extinktion bei 280 nm und 260 nm. Es wurde RNase Inhibitor zugegeben (0.3 µl in jede Probe).

Die cDNA Synthese wurde mit dem Reverse Transkriptase System von Promega (Madison, USA) durchgeführt. Es wurden für jeden Ansatz 2 µg RNA eingesetzt. Der Testansatz war wie folgt:

25 mM	MgCl ₂
10x	Puffer
10 mM	dNTP
20 U	RNase Inhibitor
15 U	AMV Reverse Transkriptase
0.5 µg	Oligo (dT) ₁₅

Das Volumen jedes Ansatzes wurde auf 20 µl mit der entsprechenden Menge extrahierter RNA und sterilisiertem Wasser ergänzt. Die Synthese erfolgte in einer PCR Maschine (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) 45 Minuten bei 42°C und eine Inaktivierungsphase von 5 Minuten bei 95°C. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Als Templat wurde die synthetisierte cDNA in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Ansatz:

1 µl	cDNA (1:5)
10x	Puffer
2 mM	dNTP
10 µM	Primer
5 U	Taq DNA Polymerase

Es wurde folgenden PCR – Bedingungen verwendet:

1. Denaturieren bei 95°C, 2 min
2. 30 Zyklen Denaturierung: 30 sec bei 95°C
Primerbindung: 1 min bei 52°C
Elongation: 2 min bei 72°C
3. Elongation bei 72°C, 2 min
4. abkühlen auf 4°C bis weitere Verwendung

Die erfolgreiche Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

4.4.4 Quantitative RT-PCR

Zur Detektion einiger Transkripte spezifisch für die Synthese von Phenylpropanoiden und spezifisch für den Shikimat Biosyntheseweg wurde quantitative PCR auf Basis von reverser

Transkriptase verwendet. Folgende Gene spezifisch für die Synthese von Phenylpropanoiden wurden amplifiziert:

- Phenylalanin Ammonium Lyase Isoform 1 (*PAL-1*; GI: 21496)
- 4-Coumerat CoA Ligase Isoform 2 (*4Cl-2*; GI: 1663723)
- Hydroxycinamoly-CoA Quinat : Hydroxycinnamoyl Transferase (*HQT*; GI: 40644898)

Folgende Gene spezifisch für den Shikimat Biosyntheseweg wurden verwendet:

- Shikimat Dehydrogenase Isoform 2 (*ShDH-2*; GI: 46371083)
- 3-Desoxy-D-Arabinohexulosonat-7-Phosphat Synthase (*DAHPS*; GI: 170224)
-

Primerspezifität wurde durch Klonen der PCR-Produkte in einem pGEM Vektor (Promega, Madison) und anschließender Sequenzierung (AGOWA, Berlin) nachgewiesen. Alle erhaltenen Produkte hatten eine 93 – 99 %ige Homologie zum jeweiligen Gen.

Um die Effizienz der cDNA-Synthese abzuschätzen, wurde Actin als Kontrollgen verwendet.

Die RT-PCR wurde in 384iger PCR-Platten mit einem Gene Amp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Um die Doppelstrang DNA-Synthese zu detektieren, wurde SYBR[®] Green verwendet. Ein RT-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 µl	SYBER [®] Green
1 µl	cDNA (unverdünnt)
4µl	0.5 µM Oligonukleotid

Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide war wie folgt:

Gen	Forward	Reverse	Tm
ShDH2	GCGGCCCTGCTAGTACTTT	CAAATGGTCGGGCAGAGGAA	50
PAL1	TCTGAAAGTGCAAGAGCTGGT	TGCACAAAATCCAGTAGTAACACC	50
4CL2	AATCAATCTGGAGAAATTTGCAT	CAATGAAAAGCTCGTCGTCA	55
HQT	GTTGTGTTACAGGCACACC	CCACGGATTAAAGCCGATAA	55
DAHPS	TGGTGGTCAGATGCCTGTTA	GTTACGTTGTCTCCCCTGT	55
Actin	TTTCCTGGAATTGCTGATAGGATGA	AGCCAAAATAGAACCTCCAATCCAA	50-60

Aufgrund der unterschiedlichen Schmelztemperaturen der aufgeführten Oligonukleotide wurden drei verschiedene PCR Ansätze durchgeführt:

1.	50°C	2 min	} 40 Zyklen
2.	95°C	10 min	
3.	95°C	15 sec	
4.	50, 55°C	1 min	
5.	95°C	15 sec	

Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte nach Czechowski et al. (2004).

4.4.5 Extraktion der mRNA und cDNA–Synthese mit Dynabeads Oligo (dT)₂₅

Puffer und Lösungen

Lysispuffer pH 8.0 (HCl)

100 mM	Tris
500 mM	Lithiumchlorid
10 mM	EDTA
1%	Lithium Laurylsulfat (LiDS)

Waschpuffer A; pH 8.0 (HCl)

10 mM	Tris
150 mM	Lithiumchlorid
1 mM	EDTA
0.1%	LiDS
0.05%	Tween 20

Waschpuffer B; pH 8.0 (HCl)

10 mM	Tris
150 mM	Lithiumchlorid
1 mM	EDTA
0.05%	Tween 20

SuperScript II Puffer

50 mM	Tris/HCl pH 8.3
75 mM	KCl
3 mM	MgCl ₂

20x SSC

3 M	NaCl
0.3 M	Natriumcitrat

35% Guanidinchlorid

Vorbereitung der Dynabeads Oligo (dT)₂₅

Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Dynal, Hamburg, Deutschland) wurden mindestens 1 Minute lang geschüttelt, um anschließend ein Aliquot von 125 µl in ein Eppendorf Reaktionsgefäß zu überführen. Die dynabeads wurden mit Hilfe eines Magnets von der Flüssigkeit getrennt. Der Überstand wurde verworfen und die dynabeads mit Lysispuffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in Lysispuffer aufbewahrt.

Extraktion

Zu 200 mg tiefgefrorenen und homogenisierten Blattmaterials wurde 1.5 ml Lysispuffer und 3 kleine Retschmühlen-Metallbälle gegeben und 45 Sekunden bei 25 Hz in einer Retschmühle extrahiert. Die Extrakte wurden 5 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Während dessen wurden die dynabeads mit einem Magnet von der flüssigen Phase separiert. 750 µl der Extrakte wurden zu den separierten dynabeads gegeben und mit weiteren 750 µl Ly-

sispuffer verdünnt. Es wurde genau darauf geachtet, dass keine Gewebeteile pipettiert wurden.

Isolierung der mRNA

Verdünnte Extrakte und dynabeads wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der ganzen Zeit wurden die Extrakte langsam gekippt. Die dynabeads wurden mit einem Magneten von den Extrakten getrennt. Der Überstand wurde verworfen. Die dynabeads wurden mit 1000 µl Waschpuffer A und anschließend mit 500 µl Waschpuffer B gewaschen.

Erststrang Synthese

Die dynabeads wurden mit 250 µl SuperScript II Puffer gewaschen. Danach wurde zu jeder Reaktion 95 µl SuperScript II Mix (Kit Komponenten) gegeben. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

45 µl	H ₂ O (RNase free)	
20 µl	5x Erststrang Puffer	(SuperScript II Kit, Invitrogen)
5 µl	10 mM dNTP	
10 µl	0.1 M DTT	(SuperScript II Kit, Invitrogen)
10 µl	BSA (Roche)	
5 µl	RNAse OUT	(40U/µl, Invitrogen)

Der Reaktionsansatz wurde für 2 Minuten bei 42°C vorgewärmt, danach wurden je 5 µl SSC II (200U/µl) (SuperScript II Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dazugegeben und bei 42°C 1 Stunde im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Es wurde alle 10 bis 15 Minuten kurz geschüttelt.

Nach der Inkubation wurden die dynabeads mit einem Magneten getrennt und der Überstand verworfen. Die dynabeads wurden 2 Mal mit 250 µl 1x SuperScript II Puffer + 0.05% Tween 20 gewaschen. Zur Eluierung der mRNA wurden die dynabeads mit 20 µl 10 mM Tris (pH 8.5) bei 95°C für 2 Minuten inkubiert. Sofort nach der Inkubation wurden die dynabeads mit einem Magneten separiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es wurde darauf geachtet, dass bei diesem Schritt das Reaktionsgemisch heiß war. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Danach wurden die dynabeads 2-mal mit 250 µl TE (pH 8.5) gewaschen.

Qualitätskontrolle der synthetisierten cDNA

Zur Ermittlung der Qualität der cDNA wurde das 3'/5'-Verhältnis mittels real time RT-PCR ermittelt. Für diesen Zweck wurden oben beschriebene Actin primer (*siehe Abschnitt 4.4.4*) verwendet. Es wurden 2 µl der gut gemischten dynabeads pro PCR-Ansatz verwendet. Für jede Probe wurden 2 Replika durchgeführt. Das 3'/5'-Verhältnis sollte nahe bei 1 liegen.

Zweitstrang Synthese

In folgendem Reaktionsmix wurde die Zweitstrang Synthese vorgenommen:

6 µl	dNTP (je 10 mM)
4 µl	Hexanukleotidmix (Roche, München)
2 µl	Klenow Enzym (2U/µl; Roche, München)
28 µl	H ₂ O (autoklaviert)

Der Reaktionsansatz wurde für 2.5 Stunden bei 37°C im Thermomixer inkubiert (alle 10 bis 15 Minuten wurde bei 12500 rpm geschüttelt).

Nach der Zweitstrang Synthese wurden die dynabeads mit einem Magnet separiert und 2-mal mit 200 µl 2x SSC gewaschen. Zur Eluierung der cDNA wurde mit 30 µl 10 mM Tris (pH 8.5) bei 95°C 2 Minuten inkubiert. Sofort nach der Inkubation wurden die dynabeads mit einem Magneten separiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Es wurde darauf geachtet, dass bei diesem Schritt das Reaktionsgemisch heiß war. Die dynabeads wurden 2-mal mit 250 µl TE (pH 8.5) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in TE mit 0.02% Natriumazid bei 4°C gelagert.

Aufreinigung der cDNA mit einem Qiaquick Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Die Aufreinigung erfolgte gemäß dem vom Hersteller beigefügten Protokoll. Die Eluierung der cDNA erfolgte mit 60 µl des folgenden Puffers:

5 mM	Tris/HCl (pH 8.5)
1 mM	EDTA

Der Puffer wurde direkt auf die Membran der Reinigungssäule platziert, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 10000 rpm 1 Minute zentrifugiert. Der Eluierungsschritt wurde mit dem Durchfluss wiederholt.

Um vergleichbare Mengen an cDNA bei der Hybridisierung zu verwenden, wurde nach dem Aufreinigungsschritt die Konzentration der Einzelstrang DNA (ssDNA) bei einer $OD_{230/260}$ in Photometer gemessen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Ein normaler Ertrag an Einzelstrang DNA (ssDNA) beträgt ca. 0.7 bis 1.5 µg ssDNA.

Volumenreduktion der Einzelstrang DNA mit einer Microcon YM-30 Säule (Amicon, Schwalbach, Deutschland)

Die Reduktion auf ein Volumen von ca. 20 µl Probe erfolgte gemäß dem vom Hersteller beigefügten Protokoll.

Markierung der cDNA mit Fluoreszenzfarbstoff

Zur Anfärbung der Nukleinsäuren wurde der Ulysis Alexa Fluor 532/647 Nucleic Acid Labeling Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Der Fluoreszenzfarbstoff wurde gemäß dem vom Hersteller beigefügten Protokoll behandelt. Es ist wichtig, ab diesem Schritt im Dunkeln zu arbeiten, da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind.

Die cDNA Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben direkt auf Eis gestellt wurden. Erfahrungswerte haben gezeigt, dass dieser Denaturierungsschritt zwar nicht notwendig für die Färbung der cDNA ist, die Effizienz der Färbung aber um 20 - 40% steigert.

Die jeweils zu vergleichenden Proben wurden wie folgt behandelt:

5 µl Ulysis Alexa Fluor 532 Farbstoff zu 20 µl Probe 1
5 µl Ulysis Alexa Fluor 647 Farbstoff zu 20 µl Probe 2

Die Proben wurden 15 Minuten bei 80°C inkubiert und danach auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen. Nun wurden die beiden Proben vereinigt.

Aufreinigung der gefärbten cDNA Probe mit einem Qiaquick Purification Kit

Die Aufreinigung der angefärbten cDNA Proben erfolgte gemäß dem vom Hersteller beigefügten Protokoll. Abweichend davon erfolgte ein Waschschriff mit 35% Guanidinhypochlorid in wässriger Lösung. Danach wurde 60 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Die folgenden Reinigungsschritte sind wieder dem vom Hersteller beigefügten Protokoll zu entnehmen.

Reduzierung des cDNA Probenvolumens mit einer Microcon YM-30 Säule

Die Volumenreduzierung auf 4 bis 5 µl erfolgte gemäß dem vom Hersteller beigefügten Protokoll.

4.4.6 Hybridisierung des Oligonukleotidmikroarrays

Der in dieser Arbeit verwendete Oligomikroarray enthält 1154 aufgedruckte Oligonukleotidsequenzen von Transkripten, die eine Rolle im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel spielen. Diese umfassen relevante Schlüsselenzyme, Transporter und Regulatoren. Entwickelt wurde dieser Array von *Research International, Cell Cybernetics (Wageningen, Niederlande)*. Die darauf befindlichen Sequenzen sind hauptsächlich aus Tomate, aber einige wenige auch aus Kartoffel, Petunie und Arabidopsis. Nicht pflanzliche Gene aus Hefe und das Luziferasegen des Glühwürmchens (*Lamprohiza splendidula*) sind zusätzlich als negative Kontrolle enthalten. Die Größe der Nukleotidsequenzen umfasst mehr als 256 Basenpaare. Der Array ist in verschiedene Blocks organisiert und jede Sequenz ist viermal aufgetragen, so dass der Array letztendlich 400 verschiedene Gene umfasst. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von Tomate und Tabak binden viele Tabakgene an ihre Tomatenorthologe (Moore et al., 2005).

Vorhybridisierung des Oligonukleotidmikroarrays

Der Glasobjektträger mit den aufgetragenen Oligonukleotidsequenzen (bzw. der Oligomikroarray) wurde in einem 50 ml Falcongefäß mit frisch sterilisiertem Hybridisierungspuffer folgender Zusammensetzung vorhybridisiert:

0.1%	SDS
25%	Formamid
5x	SSC
10 mg/ml	BSA Fraktion V
40 mM Na PP	(eine Mischung aus Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄) pH 6.8

Die Lösung wurde steril filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Der Oligomikroarray mit Hybridisierungspuffer wurde für 45 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach wurde 3 Minuten mit 2x SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 0.2x SSC für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Getrocknet wurden die Mikroarrays durch 3 minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Auf den Oligomikroarray wurde ein „Lifter slip“ (VWR, Darmstadt) platziert und bis zur weiteren Verwendung in einer Hybridisierungskammer (Scienion AG, Berlin) bei 42°C gelagert.

Hybridisierung

Der Hybridisierungspuffer wurde bei 56°C vorgewärmt. Zu den angefärbten cDNA Proben wurde 50 µl des vorgewärmten Hybridisierungspuffers und 2.5 µl Liquid block (Amersham Bioscience, Little Chalfont, England) gegeben. Es wurde kurz zentrifugiert und der Überstand

wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die denaturierten Proben wurden sehr vorsichtig an der Kante der jeweiligen Glasobjektträger und „Lifter slip“ (Deckglas für den Mikroarray) pipettiert. Die Probe wurde automatisch unter den „Lifter slip“ gezogen, da auf der Unterseite des „Lifter slips“ Platzhalter eingeschliffen waren. Von diesem Moment an durfte sich der „Lifter slip“ nicht mehr bewegen. Es musste ebenfalls darauf geachtet werden, dass die Befeuchungskammern in der Hybridisierungskammer mit Wasser gefüllt waren.

Die geschlossenen Hybridisierungskammern wurden über Nacht bei 42°C in einem abgedunkelten Wasserbad oder Hybridisierungssofen inkubiert.

Waschen des hybridisierten Oligonukleotidmikroarrays

Vor den folgenden Waschschrritten wurden die Oligomikroarrays für 40 Sekunden an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet.

Es wurde 1-mal 10 Sekunden mit 2x SSC bei 25°C gewaschen
Der Oligomikroarray wurde für 25 Sekunden getrocknet
Es wurde 4-mal für 5 Sekunden mit 2x SSC bei 25°C gewaschen
Es wurde 5-mal für 5 Sekunden mit 0.5x SSC bei 25°C gewaschen
Danach wurde für 25 Sekunden an der Luft getrocknet
Es wurde 1-mal ganz kurz in H₂O getaucht bei 25°C und durch 3 minütige Zentrifugation mit 1500 rpm getrocknet.

Scannen der hybridisierten Oligonukleotidmikroarrays

Die gewaschenen Oligomikroarrays wurden gleich anschließend mit einem Scanner (Fujifilm, Düsseldorf) bei folgenden Wellenlängen gescannt:

Filter 570nm DF20 bei 100%
Filter 635nm DF20 bei 100%

Auswertung

Die Auswertung und Bearbeitung der gescannten Oligomikroarrays erfolgte mittels der Software geneSpotter 2.3.9 (MicroDiscovery, Berlin, Deutschland). Die erhaltenen Signale wurden auf zwei verschiedene Arten normalisiert.

Es erfolgte eine Quantil-Normalisierung. Bei dieser Normalisierungsmethode werden die eigentlichen Signale der Größe nach geordnet. Danach werden alle Signale aller Arrays in einer Tabelle vereinigt. Die Signale wurden der Größe nach in Ränge sortiert. Es wurde der Mittelwert der Signale gleichen Ranges ermittelt. Bei diesem Wert handelt es sich um den normalisierten Wert (Bolstad et al., 2003; Degenkolbe et al., 2005). Die normalisierten Daten wurden durch die MapMan Software (Thimm et al., 2004) dargestellt.

4.5 Statistische Methoden

Die **Hauptkomponentenanalyse (PCA)** wurde mit Hilfe der statistischen Software statistiXL 1.5 (Alan Roberts and Philip Withers, 2002 <http://www.statistixl.com>) erstellt. Alle erstellten PCA beziehen sich auf eine Kovarianz Matrix, d.h. die verwendete Matrix der Variablen (Aminosäuren) besteht aus vergleichbaren Einheiten (oder Variablen, hier: Aminosäuren). Die Skalierung des Wertebereichs der Variablen (Aminosäuren) erfolgte über den prozentualen

Anteil jedes einzelnen Datenpunktes relativ zum Gesamtaminosäuregehalt bzw. Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Diese normalisierten Werte wurden nach Tageszeitpunkt und Genotyp gemittelt. Diese Werte wurden in der Software zur Erstellung der PCA eingesetzt. Zur Kontrolle wurde eine logarithmische Skalierung der gleichen Datensätze vorgenommen. Diese normalisierten Werte wurden wiederum in der Software zur Erstellung einer PCA verwendet. In beiden Fällen ergab die PCA das gleiche Ergebnis. Die in dieser Arbeit gezeigte PCA basiert auf den Werten der ersten Normalisierung.

Für die **Korrelationsanalyse** wurden die Aminosäurekonzentrationen aller verwendeter Aminosäuren verwendet. Dargestellt und diskutiert sind die Pearson Korrelationen der Aminosäuren. Berechnet wurde der Pearson Korrelationskoeffizient in MS Excel 2003 (Microsoft, USA).

Für die **Verhältnisanalyse** der Aminosäuredatensätze wurde für jeden Datenpunkt der prozentuale Anteil jeder einzelnen Aminosäure in Bezug auf den entsprechenden Gesamt- bzw. Gesamtaminosäuregehalt der „kleinen Aminosäuren“ berechnet. Dieses Verfahren ermöglicht eine sensitive Visualisierung ganzer Datenpunktwolken, die den einzelnen Genotypen zugeordnet werden können und deren Verhalten innerhalb eines kartesischen Koordinatensystems Aufschluss darüber gibt, ob eine Aminosäure ihre Gehalte relativ zu den anderen ändert oder nicht. Auf diese Weise ist eine Aussage über ein individuelles Verhalten einer einzelnen Aminosäure im Verhältnis zu den anderen möglich.

5 Ergebnisse

Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus sind eng miteinander verknüpft (Stitt und Krapp, 1999; Matt et al., 2001a, 2001b, 2002; Klein et al., 2000; Scheible et al., 1997a; 1997c). Die in der CO₂-Fixierung gewonnene Energie und die synthetisierten Kohlenstoffgerüste werden zu einem beträchtlichen Teil in der Stickstofffixierung und im Stickstoffmetabolismus verbraucht. Auf der anderen Seite beträgt der Proteinanteil, der zur photosynthetischen Gewinnung von Kohlenstoffen und Energie benötigt wird (Rubisco, Photosysteme), ca. 60% des pflanzlichen Gesamtproteins und ist damit abhängig von der Stickstoffassimilation.

Eingriffe in den primären Stickstoffmetabolismus wurden im Zuge dieser Arbeit auf zweierlei Wege vorgenommen. Zum einen wurden Wildtyppflanzen von *Nicotiana tabacum* cv. Gatersleben einer nitratarmen Umgebung ausgesetzt und zum anderen wurden Transformanten mit reduzierter Nitratreduktase-Aktivität untersucht, die Stickstoffmangel durch eine reduzierte Nitrataassimilation erfahren. Eine Reduktion der NR-Aktivität oder der Stickstoffernährung zieht eine Veränderung des Kohlenstoffmetabolismus nach sich (Scheible et al., 1997c). Die in dieser Arbeit beschriebenen Genotypen wurden aufgrund dieses engen Zusammenspiels in Hinblick auf ihren Kohlenstoffstatus ebenfalls untersucht und beschrieben. Die Analyse der Genotypen bezüglich des Kohlenstoffmetabolismus beschränkt sich auf Chlorophyll, die löslichen Zucker und Stärke. Eine intensivere Charakterisierung findet sich bei Scheible et al. (1997c).

Da Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus tageszeitlichen Schwankungen unterliegen, folgen diurnale Untersuchungen jeder individuellen Aminosäure aller vorgestellten Genotypen. In diesem Kapitel wird deutlich werden, dass die große Mehrzahl der Aminosäuren vergleichbare diurnale Muster zeigen. Daraus folgt die Annahme, dass der Aminosäurestoffwechsel koordiniert reguliert wird. Diese Schlussfolgerung wird weiter untersucht mit Hilfe statistischer Verfahren, wobei zusätzlich noch ein Aminosäuredatensatz integriert wurde, erstellt unter Kohlenstoffmangelbedingungen (Matt et al. 2002). Diese Analyse führt zu einer erweiterten und kritischen Betrachtung der aktuell diskutierten Hypothesen zur Regulation der Aminosäurebiosynthese.

Der zweite Teil dieser Arbeit untersucht die Interaktion des Stickstoffstoffwechsels mit dem Sekundärstoffwechsel. Die vorangegangene Dokumentation des primären Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels ermöglicht Aussagen darüber, welche Primärmetabolite eventuell einen Einfluss auf den Sekundärstoffwechsel haben können. Die Regulation von Stoffwechselfvorgängen durch Metabolite ist auch in Pflanzen ein bekannter Mechanismus (Rolland, Moore and Sheen, 2002 und Zitate daraus, Scheible et al., 1997c). Des Weiteren bietet das experimentelle System die Möglichkeit, durch den Vergleich mit nitratmangelernährten Wildtyppflanzen und der Nitrat akkumulierenden Transformante Nia30(145) Stoffwechselprozesse zu identifizieren, die durch Nitrat *per se* reguliert werden. Nikotin als mengenmäßig wichtigstes Alkaloid in Tabak und Phenylpropanoidmetabolite wurden diurnal analysiert. Die Ergebnisse aus dieser Analyse wurden durch Genexpressionsstudien erweitert.

5.1 Beschreibung der Pflanzen in Bezug auf ihren Stickstoff- und Kohlenstoffhaushalt

Die Ergebnisse dieses Kapitels dienen dazu die in Tabelle 5.1 vorgestellten Genotypen physiologisch in Bezug auf ihren Stickstoff- und Kohlenstoffstatus zu charakterisieren. Die Erzeugung der Transformanten wurde bereits in *Kapitel 4.1.1* und *4.2.1* beschrieben. Aufgrund des langsameren Wachstums der Genotypen mit niedriger Stickstoffversorgung oder Nitratassimilation wurden diese Pflanzen zu einem späteren Zeitpunkt geerntet (Tabelle 5.1). Der Erntezeitpunkt wurde noch im Rosettenstadium der Pflanzen gewählt, kurz vor der Internodienstreckung. Dies gewährleistet, dass Pflanzen eines ähnlichen physiologischen Alters verglichen werden. Die physiologische Charakterisierung aller in dieser Arbeit verwendeten Genotypen erfolgte bereits in vorangegangenen Arbeiten (Scheible et al., 1997b, 1997c; Matt et al., 1998). Ziel dieses Kapitels ist es, diese einerseits zu bestätigen und andererseits klare physiologische Verhaltensmuster der Genotypen als grundlegende Basis für die *Kapitel 5.2* und *5.3* herauszuarbeiten. Die folgenden Untersuchungen sind alle diurnal vorgenommen worden, da die primäre Nitratassimilation tageszeitlichen Schwankungen unterliegt (Vaucheret et al., 1990; Scheible et al., 1997b). Die verwendeten Genotypen sind in der NR-Expression verändert. Das *Nia*-Transkript im Wildtyp ist zu Beginn des Tages hoch und nimmt bis zum Ende der Lichtperiode ab. Während der Nacht erholt sich der Transkriptspiegel bis zu seinem Maximum am Ende der Nacht. Dieser Verlauf ist in den Transformanten nicht vorhanden. Die Transformante F23xNia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ zeigt lediglich nach 12 Stunden Licht signifikant reduzierte Transkriptmengen und die nahezu NR-defiziente Transformante (Nia30(145)) hat zu jedem Zeitpunkt des Tages eine signifikant höhere *Nia*-Transkriptmenge. Scheible et al. (1997b) konnte ebenso zeigen, dass die posttranslationelle Regulation der NR (*siehe Einleitung*) während der Dunkelheit in den verwendeten Transformanten kaum oder gar nicht stattfand und stellte eine Verbindung zwischen dem organischen Stickstoffstatus der Pflanze und der posttranslational regulierten NR-Aktivität her. Durch die Punktmutation in der verwendeten Transformanten ist also weder die Transkription noch die Proteinsynthese der NR beeinträchtigt, sondern nur deren Aktivität. Im Gegensatz dazu ist bei nitratmangelernährten Wildtypen das *Nia*-Transkript erniedrigt und steigt lediglich nach Gabe der Nitratnährlösung etwas an, wobei dies auf eine Induktion von Nitrat zurückzuführen ist. Im Verlauf dieses Kapitels wird herausgearbeitet, dass die moderat betroffene Transformante F23xNia30(145) im Vergleich zum Wildtyp einen leicht reduzierten Kohlenstoff- und Stickstoffstatus hat. Der nitratmangelernährte Wildtyp und die nahezu NR-defiziente Transformante Nia30(145) beider Nitratbehandlungen haben im Vergleich zum Kontrollwildtyp einen signifikant erniedrigten Kohlenstoff- und Stickstoffstatus, die sich untereinander aber vergleichen lassen. In Tabelle 5.1 werden noch einmal alle relevanten Fakten der verwendeten Genotypen zusammengefasst.

Name	Allele	NRA (%)	N-versorgung	Alter bei Ernte	Generelle Beschreibung
Wildtyp (Gatersleben)	<i>Nia1/Nia1;Nia2/Nia2</i>	100	12 mM Kaliumnitrat	6 Wochen	Wildtyp mit ausreichender Stickstoffversorgung
Wildtyp (Gatersleben)	<i>Nia1/Nia1;Nia2/Nia2</i>	100	0.2mM Kaliumnitrat	8.5 Wochen	Wildtyp mit Stickstoffmangel
F23xNia30(145)	<i>nia1/Nia2;nia1/nia2;Nia2</i>	40	12 mM Kaliumnitrat	6 Wochen	Moderat betroffene NR-defiziente Transformante mit ausreichender Stickstoffversorgung
Nia30(145)	<i>nia1/nia1;nia2/nia1;Nia2</i>	5	12 mM Kaliumnitrat	8.5 Wochen	Nahezu NR-defiziente Transformante mit ausreichender Stickstoffversorgung
Nia30(145)	<i>nia1/nia1;nia2/nia1;Nia2</i>	5	0.2mM Kaliumnitrat	15 Wochen	Nahezu NR-defiziente Transformante mit Stickstoffmangel

Tabelle 5.1: Zusammenstellung der Genotypen, Allelzusammensetzung, ermittelte Nitratreduktase-Aktivität relativ zum Wildtyp, die Stickstoffversorgung, das Alter bei der Ernte und die im Text oft verwendete Beschreibung.

5.1.1 Phänotypische Charakterisierung

Für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen wurden die Pflanzen im Rosettenstadium geerntet. Die Transformante F23xNia30(145) ernährt mit 12 mM KNO_3 unterschied sich phänotypisch nicht vom Wildtyp ernährt mit 12 mM KNO_3 (Abb. 5.1). Wildtyp und F23xNia30(145), beide unter ausreichenden Nitratbedingungen kultiviert, wurden ca. 30 – 34 Tage nach Aussaat geerntet.

Der verhungerte Wildtyp zeichnet sich durch langsames und zwergenhaftes Wachstum aus. Seine Blätter sind im ausgewachsenen Zustand und zum Zeitpunkt der Ernte, ca. 48 bis 59 Tage nach Aussaat, durchschnittlich 40% kleiner als beim ausreichend ernährten Wildtyp. Die Färbung der Blätter ist hellgrün (Abb. 5.1).

Die Transformante mit stark reduzierter NR-Aktivität Nia30(145), kultiviert in 12 mM KNO_3 zeigt ein dem verhungerten Wildtyp vergleichbares Erscheinungsbild, gekennzeichnet durch langsames und zwergenhaftes Wachstum. Die ausgewachsenen und geernteten Blätter im Alter von 59 bis 62 Tage nach Aussaat sind im Durchschnitt 34% kleiner als die des Kontrollwildtyps. Die Blätter sind ebenfalls hellgrün und zeichnen sich durch ein eher längliches Wachstum aus. Das verhungerte Stadium dieses Genotyps (Nia30(145) gewachsen mit 0.2 mM KNO_3) zeigt das Erscheinungsbild des gut ernährten Genotyps in wesentlich extremeren Zügen. Das Wachstum ist noch einmal zusätzlich verlangsamt. Die Blätter sind im ausgewachsenen Zustand und zum Zeitpunkt der Ernte, 105 Tage nach Aussaat, 64% kleiner als die des Kontrollwildtyps.

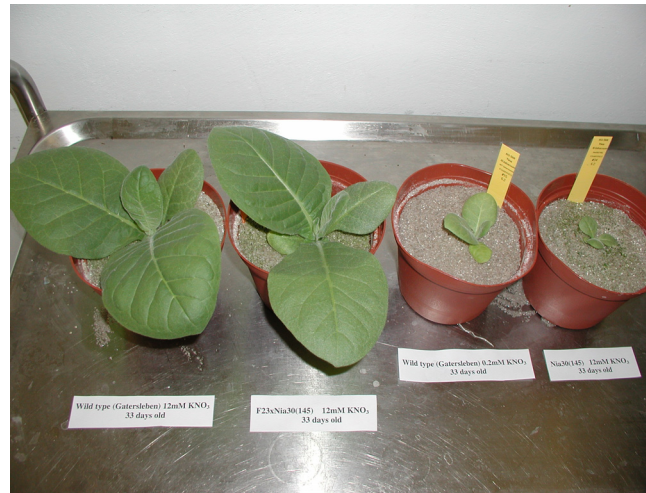


Abb. 5.1: (v.l.n.r) Dargestellt sind Wildtyp und F23xNia30(145), beide ernährt mit 12 mM KNO₃. Beide Genotypen zeigen keine Unterschiede betreffs der Größe und wurden zum Zeitpunkt der Ernte photographiert. Es folgt der verhungerte Wildtyp gleichen Alters, nicht jedoch zum Zeitpunkt der Ernte. Rechts außen steht die Transformante Nia30(145), ernährt mit 12 mM KNO₃, ebenfalls gleichen Alters, ebenfalls nicht zum Zeitpunkt der Ernte.

5.1.2 Diurnale und genotypisch bedingte Änderungen der Nitratreduktase-Aktivität im Blatt

Die Charakterisierung der Pflanzen bezüglich ihrer Reduktion der Nitratreduktase erfolgte über die Aktivitätsmessung dieses Enzyms. Diese Analyse soll auch gleichzeitig als Reproduktion der Ergebnisse vorangegangener Arbeiten mit diesen Genotypen unter ähnlichen Wachstumsbedingungen dienen (Scheible et al., 1997b, 1997c).

Die Nitratreduktase des Wildtyps mit ausreichender Nitratversorgung zeigt den charakteristischen Tagesgang (Scheible et al., 1997b). Die Aktivität erreicht ein Maximum nach 4 Stunden Licht und fällt dann sukzessive über den Tag hinweg ab. Während der Dunkelperiode erfolgt ein weiterer Abfall der Aktivität (Abb. 5.2). Durch paralleles Messen der Nitratreduktaseaktivität unter selektiven Bedingungen (Huber et al., 1992a; Kaiser und Huber, 1994a), konnte der Aktivierungsgrad bestimmt werden (MacKintosh et al., 1995). Die Wildtyp Pflanzen zeigen eine deutliche Reduktion des Aktivitätsgrades von 90% am Ende des Tages auf 40% während der Nacht (Abb. 5.2). Dies spiegelt die posttranslationelle Regulation durch Phosphorylierung des Enzyms wieder. Die phosphorylierte NR bindet in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen an ein Inhibitorprotein (NIP). Dadurch wird das Enzym inaktiv (*siehe Einleitung*).

Die Transformante mit moderater Reduzierung der NR zeigt eine 3-fach verringerte NR-Aktivität während der Lichtperiode (Abb. 5.2). Auch der für den Wildtyp charakteristische diurnale Verlauf der NR-Aktivität kommt zum Erliegen. Während der Nacht zeigen sich zum Kontrollwildtyp vergleichbare Aktivitätswerte (Abb. 5.2). Der Aktivierungsgrad von 80% zeigt, dass die Inaktivierung der NR während der Nacht bei den Transformanten kaum stattfindet. Diese Ergebnisse sind eine Bestätigung vorangegangener Untersuchungen bezüglich der Regulation der NR (Scheible et al., 1997c; Matt et al., 1998). Eine Reaktivierung der NR während der Dunkelperiode erklärt die ähnliche Biomasseentwicklung der F23xNia30(145) (*siehe Kapitel 5.1.1, Abb. 5.1*).

Der unter Nitrat-Mangelbedingungen angezogene Wildtyp zeigt im Vergleich zum Kontrollwildtyp eine um den Faktor 10 verringerte NR-Aktivität. Der Tagesgang ist im Vergleich zum ausreichend ernährten Wildtyp verschoben. Die Pflanzen zeigen ein Maximum der NR-

Aktivität nach 8 Stunden Licht. Dies ist ein Effekt des Giessens ca. 3 – 3.5 Stunden nach Beginn der Lichtperiode (Scheible et al., 1997c).

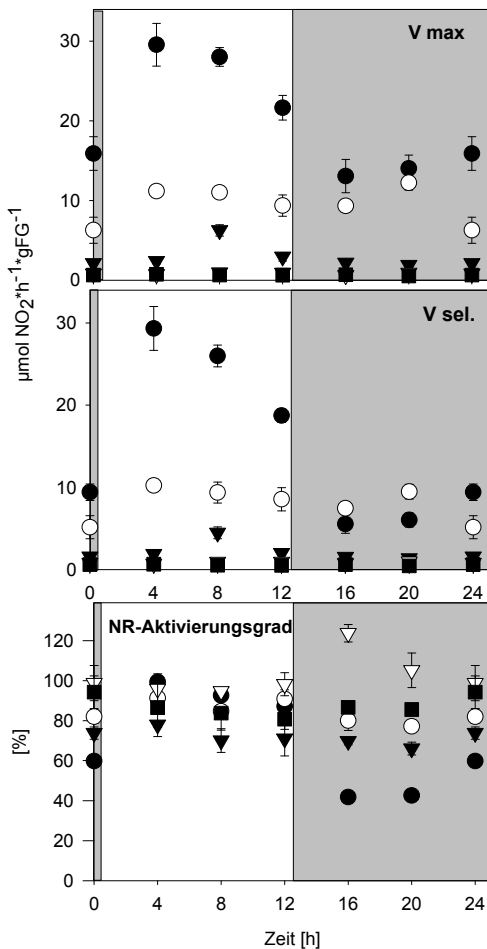


Abb. 5.2: Tagesgang der NR-Aktivität und des NR-Aktivierungsgrades des jüngsten vollexpandierten Blattes. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n=5) der maximalen Aktivität (V max), der Aktivität unter phosphoryliertem Zustand (V sel) und der Aktivierungsgrad der Nitratreduktase.

Der Aktivierungsgrad der NR präsentiert sich mit 70 – 80% erstaunlich stabil während des gesamten Tages. Selbst der signifikante Anstieg der NR-Aktivität nach 8 Stunden Licht, ausgelöst durch das Gießereignis, zeigt keinen Effekt auf den Aktivierungsgrad.

Die stark NR-reduzierten Transformanten Nia30(145) haben in beiden Ernährungszuständen jeden diurnalen Rhythmus verloren. Die Aktivitätswerte sind im Vergleich zum nitratmangel ernährten Wildtyp, der als Kontrolle angesehen werden kann, um den Faktor 3.75 niedriger. Die Aktivierungsgrade der Transformante Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ zeigen während der Lichtperiode und während der Nacht mit 95 – 100% signifikant höhere Werte als der mangelernährte Wildtyp. Die mangelernährten Transformanten zeigen Aktivierungsgrade zwischen 80 – 90%. Diese sind immer noch höher als die des nitratmangelernährten Wildtyps. Die Aktivierungsgrade der Transformanten bestätigen Ergebnisse von Scheible et al. (1997) und spiegeln den niedrigen Phosphorylierungszustand des Enzyms in diesen Genotypen wieder.

5.1.3 Diurnale und genotypisch bedingte Veränderungen des Nitratgehaltes im Blatt

Die Nitratgehalte zeigen deutlich, dass es bei stärkerer NR-Aktivitätsreduzierung zu einer Akkumulation von Nitrat im Blatt kommt.

Der gut nitratversorgte Wildtyp zeigt eine leichte Anreicherung von Nitrat während der Nacht. Die moderat NR-defiziente Transformante F23xNia30(145) mit ebenfalls ausreichender Nitratapplikation zeigt im Vergleich zum Kontrollwildtyp ungefähr doppelt so hohe Nitratgehalte (Abb. 5.3(A)). Nia30(145) mit 12 mM KNO₃ gewachsen zeigt um den Faktor 5 – 6 höhere Nitratgehalte im Vergleich zum Kontrollwildtyp (Abb. 5.3(A)).

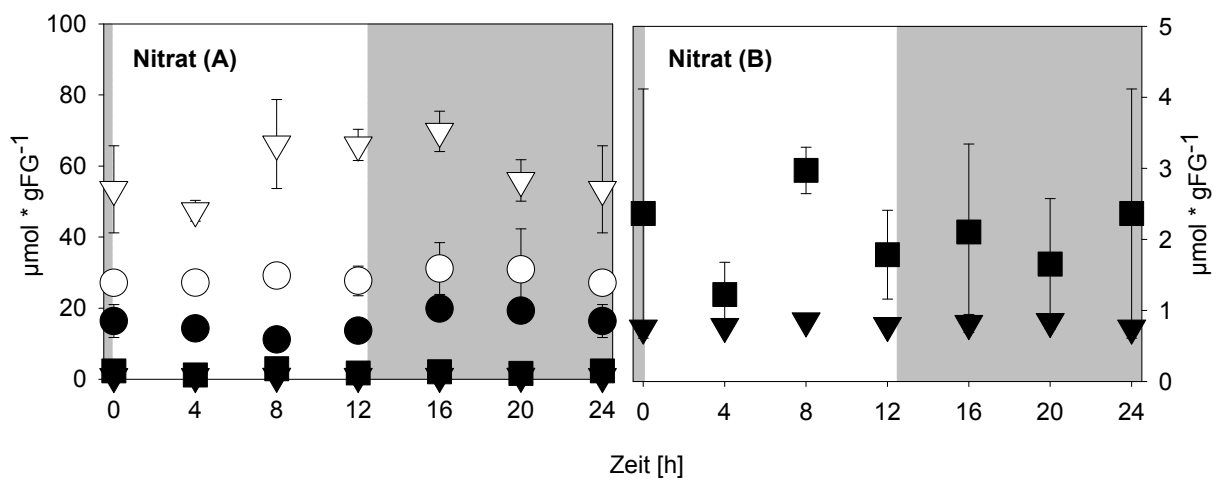


Abb. 5.3: (A) Tagesgänge der Nitratgehalte aller Genotypen des jüngsten vollexpandierten Blattes. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen $n = 5$. (B) Tagesgänge der Nitratgehalte der Genotypen Wildtyp und Nia30(145) in 0.2 mM KNO₃ gewachsen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. $n = 5$.

Mit abnehmendem Nitratangebot zeigt sich bei den Genotypen auch eine Abreicherung der Nitratgehalte. Der Kontrollwildtyp hat im Vergleich zum verhungerten Wildtyp um den Faktor 10 höhere Nitratgehalte. Die stark NR-reduzierte Transformante Nia30(145), in 0.2 mM KNO₃ kultiviert, zeigt um den Faktor 5 niedrigere Nitratgehalte (Abb. 5.3(A)) verglichen zum gut ernährten Wildtyp. Wenn man hier beide Genotypen gewachsen in 0.2 mM KNO₃ vergleicht, akkumuliert die Transformante Nitrat im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5.3(B)).

5.1.4 Genotypisch bedingte Veränderungen der Proteingehalte

Der organisch gebundene Stickstoff ist zum größten Teil in den Proteinen enthalten (Venekamp et al., 1987). Der Gesamtproteingehalt eignet sich aus diesem Grund gut als Indikator für den organischen Stickstoffstatus der Pflanze.

Genotypen mit ausreichender Nitratversorgung zeigen vergleichbare Gesamtproteingehalte (Wildtyp in 12mM KNO₃ und F23xNia30(145) in 12 mM KNO₃). Beide Genotypen haben einen vergleichbaren Stickstoffstatus (Abb. 5.4).

Genotypen mit unzureichender Stickstoffversorgung, erreicht durch Nitratmangelernährung oder stark reduzierte NR-Aktivität, haben vergleichbare Gesamtproteingehalte untereinander

(Abb. 5.4). Im Vergleich zu den gut ernährten Genotypen sind die Gesamtproteingehalte um den Faktor 4 reduziert (Abb. 5.4). Die stark reduzierte NR Transformante Nia30(145) zeigt keine starke Änderung des Gesamtproteins in Bezug auf die Nitraternährung. In beiden Fällen zeigt sich ein dem verhungertem Wildtyp vergleichbarer Stickstoffstatus (Abb. 5.4).

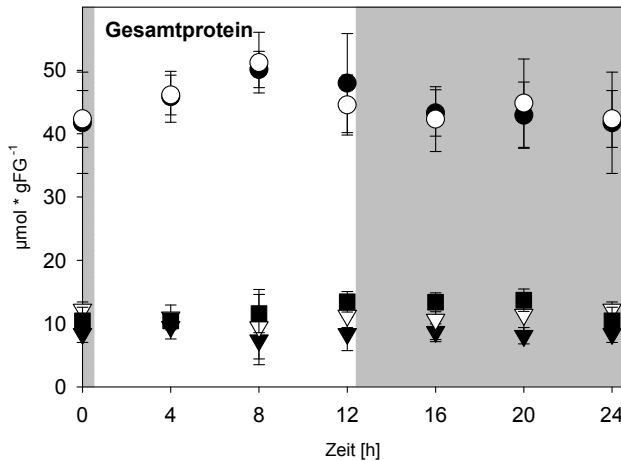


Abb. 5.4: Gesamtproteingehalte aller Genotypen im diurnalen Verlauf. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5.

5.1.5 Diurnal und genotypisch bedingte Veränderungen der löslichen Kohlenhydrate und Stärke

Die Glukose- und Fruktosegehalte der Kontrollwildtypen (Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO₃) zeigen einen charakteristischen Tagesgang. Glukose und Fruktose steigen nach 4 Stunden Licht zu einem Maximum an und fallen dann in der zweiten Hälfte des Tages sukzessive ab. In der Nacht fallen die Glukose- und Fruktosegehalte weiter und bleiben niedrig. Die Fruktosegehalte zeigen verglichen mit den Glukosegehalten zum Tagesmaximum hin um die Hälfte niedrigere Gehalte (Abb. 5.5). Die moderate Transformante F23xNia30(145), versorgt mit 12mM KNO₃, zeigt den gleichen Tagesgang im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Die Glukose- und Fruktosegehalte sind jedoch tendenziell niedriger verglichen mit dem Kontrollwildtyp. Auch hier sind die Fruktosegehalte zum Tagesmaximum hin verglichen mit den Glukosegehalten um die Hälfte niedriger (Abb. 5.5). Der Wildtyp im verhungerten Zustand zeigt ebenfalls die charakteristischen Ausprägungen des Tagesganges der Kontrollpflanzen, jedoch mit signifikant erniedrigten Glukose- und Fruktosegehalten. Tendenziell können erhöhte Glukosegehalte im Vergleich zum Kontrollwildtyp während der Nacht beobachtet werden (Abb. 5.5). Die Transformante mit stark erniedrigter NR-Aktivität Nia30(145) zeigt in beiden Ernährungszuständen signifikant verringerte Glukose- und Fruktosegehalte, verglichen mit dem Kontrollwildtyp. Auch der charakteristische Tagesgang kommt weitgehend zum Erliegen (Abb. 5.5).

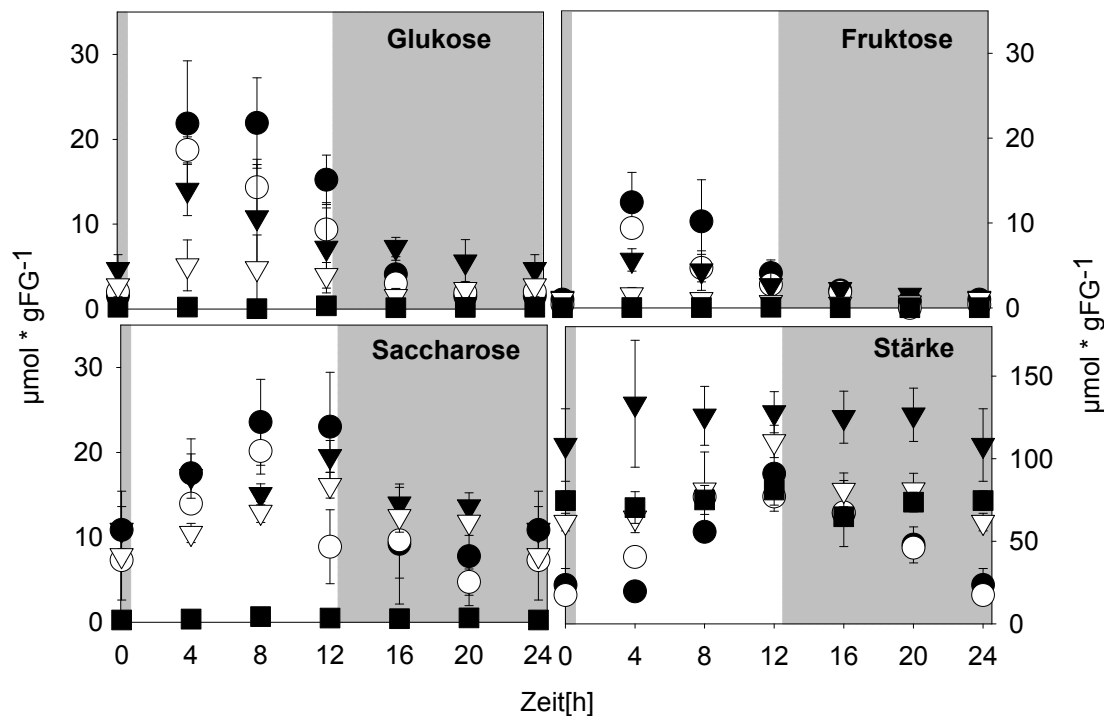


Abb. 5.5: Gehalte der löslichen Kohlenhydrate und Stärke des jüngsten vollexpandierten Blattes. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt ist der diurnale Verlauf der Metabolite. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 5.

Die Saccharosekonzentrationen steigen im Laufe der Lichtperiode sukzessive an und fallen dann im Laufe der Nacht auf ein Minimum. Alle Genotypen zeigen in den verschiedenen Bedingungen denselben charakteristischen diurnalen Verlauf. Reduzierte Nitratversorgung und verringerte NR-Aktivität führen zu tendenziell niedrigeren Saccharosegehalten während des Tages und einer leicht erhöhten Saccharosekonzentration während der Nacht. Die verhungerte Transformante jedoch zeigt im Vergleich zu allen anderen Genotypen signifikant niedrigere Saccharosegehalte und der charakteristische Tagesgang kommt zum Erliegen (Abb. 5.5).

Die Stärkegehalte des Kontrollwildtyps und der moderat NR-reduzierten Transformante F23xNia30(145) mit ausreichender Nitratversorgung unterscheiden sich nicht signifikant und zeigen während der Lichtperiode einen sukzessiven Anstieg. Es erfolgt eine Abnahme der Stärkegehalte während der Nacht (Abb. 5.5). Der verhungerte Wildtyp dagegen enthält erhöhte Stärkegehalte, vor allem weil der Abbau der Stärke während der Nacht ausbleibt (Abb. 5.5). Die gleiche Tendenz, jedoch mit niedrigeren Gehalten, zeigt die Transformante mit stark reduzierter NR-Aktivität Nia30(145) in beiden Ernährungszuständen. Der charakteristische Tagesgang verglichen mit dem Kontrollwildtyp ist tendenziell vorhanden und am Ende des Tages zeigt die Nia30(145) ähnliche Stärkegehalte verglichen mit dem Kontrollwildtyp (Abb. 5.5).

5.1.6 Diurnale und genotypische Veränderung der Chlorophyllgehalte

Der im Chlorophyll fixierte Stickstoff beträgt lediglich 2% (Scheible, Dissertation, 1996). Chlorophyll a ist in allen Reaktionszentren und Antennenkomplexen zu finden, Chlorophyll b lediglich in den Antennenkomplexen (Flachmann, 1997).

In keinen der untersuchten Genotypen mit ihren jeweiligen Nitratversorgungen ist ein tageszeitlich abhängiger Rhythmus zu erkennen.

Im Vergleich zum Kontrollwildtyp hat die moderat betroffene NRA reduzierte Transformante F23xNia30(145) gewachsen mit ausreichend Nitrat, die Tendenz zu verringerten Chlorophyll a Gehalten (Abb. 5.6).

Der nitratverhungerte Wildtyp zeigt um den Faktor 2.5 niedrigere Chlorophyll a Gehalte im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Die nahezu NR-defiziente Transformante Nia30(145) mit ausreichender Nitratversorgung zeigt eine ähnliche Reduzierung, wobei deren nitratverhungerte Variante im Vergleich dazu um den Faktor 6 niedrigere Chlorophyll a Gehalte aufweist (Abb. 5.6).

Chlorophyll b Gehalte sind aufgrund der sehr hohen Standardabweichungen innerhalb der verschiedenen Genotypen und deren jeweilige Nitratversorgung nicht signifikant unterschiedlich. Tendenziell zeigt die Transformante Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 leicht erhöhte Chlorophyll b Gehalte im Vergleich zu den anderen Genotypen (Abb. 5.6).

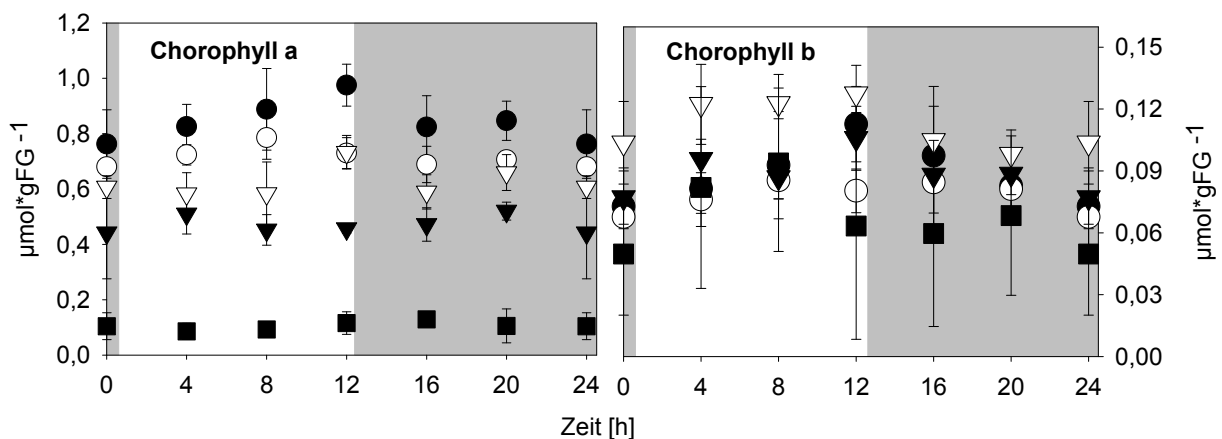


Abb. 5.6: Tagesgänge von Chlorophyll a und Chlorophyll b aller Genotypen. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO_3 und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO_3 . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. $n = 5$.

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass mit abnehmender Stickstoffversorgung und mit abnehmender Stickstoffassimilation der Chlorophyll a Gehalt erniedrigt ist. Es darf allerdings kein direkter Schluss auf die Photosyntheseleistung der Pflanzen gezogen werden. Es liegen keine Assimilationswerte und keine Aktivitätswerte über Rubisco vor. Scheible (Dissertation, 1996) konnte aber zeigen, dass die Assimilation in verhungerten Wildtypen im Vergleich zur Kontrolle nur um den Faktor 2 reduziert war. Die Transformanten mit starker Reduktion der NR-Aktivität, aber ausreichender Nitratversorgung zeigen im Vergleich zum Kontrollwildtyp jedoch eine 3.6-fache Reduktion der Assimilationsrate. Wahrscheinlich ist der Stärkemetabolismus der Nia30(145) dafür verantwortlich (Scheible, 1997c und Abb. 5.5): Die Expression der AGPase (*agpS2*) als geschwindigkeitbestimmender Schritt der Stärkesynthe-

se wird durch Nitrat gehemmt. Reduzierte Nitratsassimilation und verringerte Stärkesynthese führen dazu, dass Kohlenstoffgerüste nicht verbraucht werden und die Photosynthese Feedback-gehemmt wird (Scheible et al., 1997c).

Fazit

- Die in dieser Arbeit verwendeten Genotypen lassen sich nach dieser groben Beschreibung in Bezug auf ihren physiologischen Stickstoff- und Kohlenstoffhaushalt in Gruppen einteilen.
 - (1) Die Wildtyppflanzen und die Transformante F23xNia30(145), beide ausreichend mit Nitrat versorgt, zeigen in allen bisher gezeigten Parametern ähnliche Tendenzen. Obwohl die NR-Aktivität der F23xNia30(145) ca. 40% der Wildtypaktivität beträgt, sind die physiologischen Parameter vergleichbar. Wie der Aktivierungsgrad gezeigt hat, liegt während der Nacht ein niedrigerer Phosphorylierungszustand des Enzyms in den Transformanten vor. Das ist wahrscheinlich ein Kompensierungsprozess, um die während des Tages niedrigere Stickstoffreduzierung auszugleichen und einen vergleichbaren physiologischen Zustand zum Kontrollwildtyp zu erreichen (Scheible et al., 1997b).
 - (2) Der Wildtyp, gewachsen in stickstofflimitierten Bedingungen, und die stark NR reduzierte Transformante Nia30(145), gewachsen in 12 mM KNO₃, zeigen ebenfalls ähnliche physiologische Zustände in den vorgestellten Parametern mit Ausnahme des Nitratgehaltes. Diese unterscheiden sich in beiden Genotypen grundlegend voneinander. Dem Wildtyp stehen verringerte Nitratressourcen zur Verfügung, wohingegen die Transformante ein Problem mit der Assimilation des aufgenommenen Nitrats hat. Dies wird im Gegensatz zum schlecht ernährten Wildtyp in den Blättern akkumuliert. Auf diese Weise lassen sich Prozesse, die direkt von Nitrat reguliert werden gut von denen unterscheiden, in denen entweder der Stickstoffstatus der Pflanze an sich eine Rolle spielt oder Metabolite jenseits der Nitratreduktion.

5.2 Einfluss des Stickstoffstatus der Pflanzen auf die Aminosäuren

Aminosäuren werden von den Pflanzen aus der Assimilation anorganischen Stickstoffs gewonnen. Sie sind Bausteine für Proteine und gleichzeitig Vorläufer für eine große Anzahl von Pflanzenprodukten, wie z.B. Pigmente, Nukleinsäuren, Strukturmoleküle, Hormone, enzymatische Co-Faktoren und Verteidigungsstoffe. Sie stehen somit im Zentrum des Pflanzenwachstums und spielen eine entscheidende Rolle, mit welcher Fitness eine Pflanze ihrer Umgebung begegnet.

Die löslichen Aminosäuren kann man in zwei verschiedene Hauptgruppen teilen. Die Hauptaminosäuren stellen mengenmäßig den größten Anteil an frei vorliegenden Aminosäuren und sind zudem eng mit dem primären Kohlenstoffmetabolismus und der Nitratassimilation verbunden. Die Gruppe der „kleinen“ Aminosäuren stellen *per definitionem* mengenmäßig einen geringen Anteil der löslichen Aminosäuren, beinhalten allerdings alle für die menschliche Ernährung essentiellen Aminosäuren. Die meisten Biosynthesewege der „kleinen“ Ami-

nosäuren unterliegen einer starken Rückkoppelungskontrolle durch ihre Endprodukte (*siehe Einleitung*). Eine generelle Kontrolle der verschiedenen Biosynthesewege aller Aminosäuren wird oft diskutiert, ist aber nicht bewiesen bzw. identifiziert. Noctor et al. (2002) zeigten eine starke Korrelation (r^2) der individuellen Aminosäuregehalte der „kleinen“ Aminosäuren zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Dies deutet auf eine generelle Koordination der verschiedenen Biosynthesewege hin. In dieser Arbeit wurde ein großer Datensatz an Aminosäuregehalten in Tabakblättern erzeugt. Es sind tageszeitliche Schwankungen in Betracht gezogen worden. Der Einfluss des Nitratstatus und der Nitratassimilation wurde auf verschiedene Weise manipuliert. Ein bereits bestehender Aminosäuredatensatz aus Tabakblättern unter verschiedenen Kohlenstoff limitierenden Bedingungen konnte auch unter dem oben genannten Gesichtspunkt bearbeitet und mit in die Diskussion eingeschlossen werden. Manipuliert wurde die Kohlenstoffumgebung durch niedrige Lichtverhältnisse und durch verminderte Rubisco-Aktivität (Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase) (Petra Matt, Dissertation 2001). Diese Datensätze erlauben genaue Untersuchungen in verschiedener Hinsicht: Es ist eine genaue diurnale Analyse aller Aminosäuren unter verschiedenen Nitratmangel- und Nitratassimilationssituationen möglich. Der experimentelle Ansatz erlaubt Aminosäuren zu identifizieren, deren Gehalte spezifisch auf Nitrat reagieren. Hypothesen über eine generelle Koordination der Aminosäurebiosynthese unter verschiedenen Bedingungen können weiter untersucht, gegebenenfalls korrigiert und ergänzt werden.

5.2.1 Diurnale und genotypisch bedingte Veränderung der Aminosäuregehalte

Die folgenden Aminosäuredaten werden nach biochemisch verwandten Familien gruppiert und präsentiert.

5.2.1.1 Die Hauptaminosäuren

Glutamatgehalte des Wildtyps ernährt mit 12 mM KNO_3 sind sehr stabil über den ganzen Tag hinweg. Dies ist bei allen dargestellten Genotypen und in den entsprechenden Nitratbehandlungen zu sehen. Des Weiteren zeigen sich die Glutamatgehalte auch relativ stabil bezüglich der Nitratbehandlung. Keine der untersuchten Nitratmangelsituationen führt zu signifikant veränderten Glutamatgehalten in Tabakblättern (Abb. 5.7). Glutamat ist somit eine der wenigen Aminosäuren, die weder diurnale Schwankungen noch eine Änderung bezüglich des Stickstoffstatus der Pflanzen zeigt.

Glutamingehalte dagegen zeigen im Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 eine 6-fache Zunahme über die Lichtperiode hin bis zum Ende des Tages. Während der Nacht sinkt der Spiegel dieser Aminosäure wieder stetig ab bis zu einem Minimum von $1.8 \mu\text{mol} \cdot \text{gFG}^{-1}$ am Ende der Nacht (Abb. 5.7). Der diurnale Verlauf der Glutamingehalte der moderat NR-reduzierten Transformante F23xNia30(145), gewachsen in 12 mM KNO_3 , zeigt ebenfalls einen kontinuierlichen Anstieg über die Lichtperiode hinweg mit einem Maximum am Ende des Tages und einem kontinuierlichen Abstieg über die Nacht hinweg mit einem Minimum am Ende der Nacht. Die Glutamingehalte der Transformante sind allerdings im Vergleich zum Kontrollwildtyp über den Tag um den Faktor 3 niedriger (Abb. 5.7). Alle Nitratmangelsituatio-

nen (Wildtyp 0.2 mM KNO₃, Nia30(145) 12 und 0.2 mM KNO₃) dagegen zeigen signifikant erniedrigte Glutamingehalte und keinerlei Tagesgang mehr. Am Ende des Tages sind die Glutamingehalte um den Faktor 12 niedriger im Vergleich zum Kontrollwildtyp (Abb. 5.7).

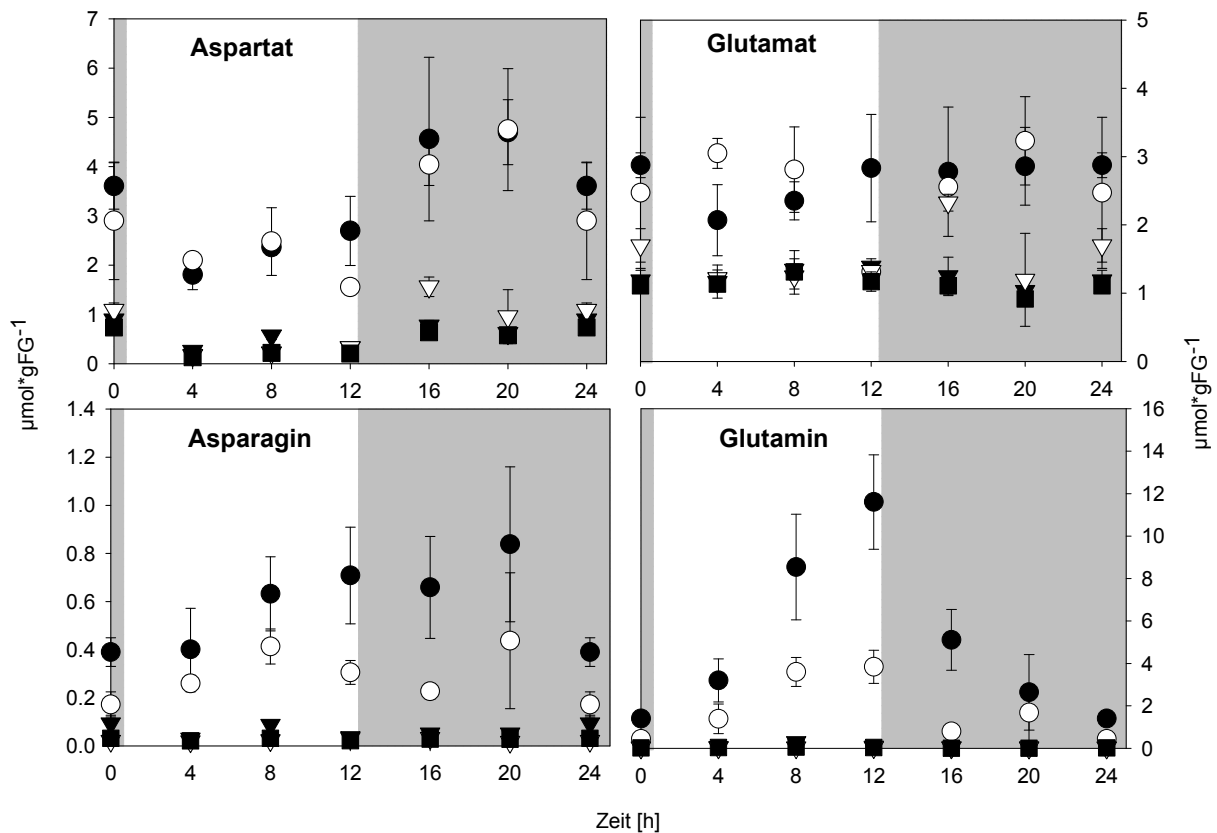


Abb. 5.7: Tageszeitlicher Verlauf der Gehalte von Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5.

Aspartatgehalte des Wildtyps gewachsen mit 12 mM KNO₃ zeigen während der Lichtperiode einen leichten Anstieg bis hin zum Ende des Tages. Während der Nacht steigen die Aspartatgehalte schnell an und zeigen nach 8 Stunden Dunkelheit ein Maximum von 5 µmol*gFG⁻¹ und sinken zu Beginn des Tages wieder (Abb. 5.7). Die moderate NR-reduzierte Transformante F23xNia30(145) gewachsen in 12 mM KNO₃ zeigt den gleichen charakteristischen Tagesgang im Vergleich zum Kontrollwildtyp (Abb. 5.7). Auch zeigen die Aspartatgehalte dieser Transformante keine signifikante Änderung im Vergleich zum Kontrollwildtyp (Abb. 5.7). Der verhungerte Wildtyp zeigt signifikant niedrigere Aspartatgehalte, wobei der charakteristische Tagesgang stark abgeschwächt vorhanden ist. Während der Nacht sind die Aspartatgehalte der nitratdefizienten Wildtypen durchschnittlich um den Faktor 4 höher als während der Lichtperiode. Nach 8 Stunden Licht ist jedoch eine Zunahme der Aspartatgehalte im verhungerten Wildtyp zu beobachten. Dieser einmalige Anstieg während der Lichtperiode hängt wahrscheinlich mit dem Gießereignis nach ca. 3 – 3.5 Stunden Licht zusammen. Das in das System gekommene Nitrat wird sofort in der Nitratassimilation verstoffwechselt (Abb. 5.7). Die Aspartatgehalte der stark NR-reduzierten Transformante Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ sind denen des verhungerten Wildtyps vergleichbar. Der cha-

rakteristische Tagesgang mit erhöhten Aspartatgehalten während der Nacht bleibt auch abgeschwächt erhalten. Die verhungerte Variante dieser Transformante zeigt ebenfalls die gleiche Tendenz verglichen mit den beiden anderen Nitratmangelzuständen (Abb. 5.7).

Asparagingehalte des Wildtyps gewachsen in 12 mM KNO_3 steigen während der Lichtperiode leicht an und erreichen ein Maximum am Ende des Tages. Während der Nacht bleibt Asparagin relativ stabil und fällt erst am Ende der Nacht stark ab (Abb. 5.7). Die moderat NR-reduzierte Transformante F23xNia30(145), gewachsen mit 12 mM KNO_3 , zeigt einen abgewandelten diurnalen Verlauf im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Asparagin steigt in den ersten 8 Stunden der Lichtperiode an und fällt in der zweiten Hälfte des Tages ab und bleibt während der Nacht stabil. Die Asparagingehalte sind im Vergleich zum Kontrollwildtyp erniedrigt, besonders in der zweiten Hälfte des Tages und während der Nacht (Abb. 5.7). Alle Nitratmangelsituationen (Wildtyp 0.2 mM KNO_3 , Nia30(145) 12 und 0.2 mM KNO_3) zeigen um den Faktor 8 und damit signifikant niedrigere Asparagingehalte im Vergleich zur Kontrollsituation. Auch der charakteristische Tagesgang kommt zum Erliegen (Abb. 5.7).

Seringehalte des Wildtyps gewachsen mit 12mM KNO_3 zeigen einen stetigen Anstieg während der Lichtperiode bis zu einem Maximum am Ende des Tages. Während der Nacht fallen die Seringehalte wieder auf ein Minimum ab (Abb. 5.8). Die moderat NR-reduzierte Transformante F23xNia30(145), gewachsen mit 12 mM KNO_3 , zeigt einen abgewandelten Tagesgang, indem das Maximum während der Lichtperiode schon nach 8 Stunden Licht erreicht wird. Danach folgt ein Abstieg der Seringehalte im Blatt, die während der Nacht dann stabil bleiben. Die Seringehalte der Transformante sind lediglich am Ende des Tages um den Faktor 3 signifikant niedriger verglichen mit dem Kontrollwildtyp (Abb. 5.8). Die Pflanzen in den Nitratmangelzuständen (Wildtyp 0.2 mM KNO_3 , Nia30(145) 12 und 0.2 mM KNO_3) zeigen maximal um den Faktor 10 niedrigere Seringehalte verglichen mit dem Kontrollwildtyp. Der verhungerte Wildtyp zeigt nach 8 Stunden Licht wieder einen leichten Anstieg. Dies ist ebenfalls auf das Gießereignis nach ca. 3 – 3.5 Stunden Licht zurückzuführen. Die Transformante Nia30(145), gewachsen in 12 mM KNO_3 zeigt während der Nacht leicht höhere Seringehalte im Vergleich zu den beiden anderen Nitratmangelsituationen (Abb. 5.8).

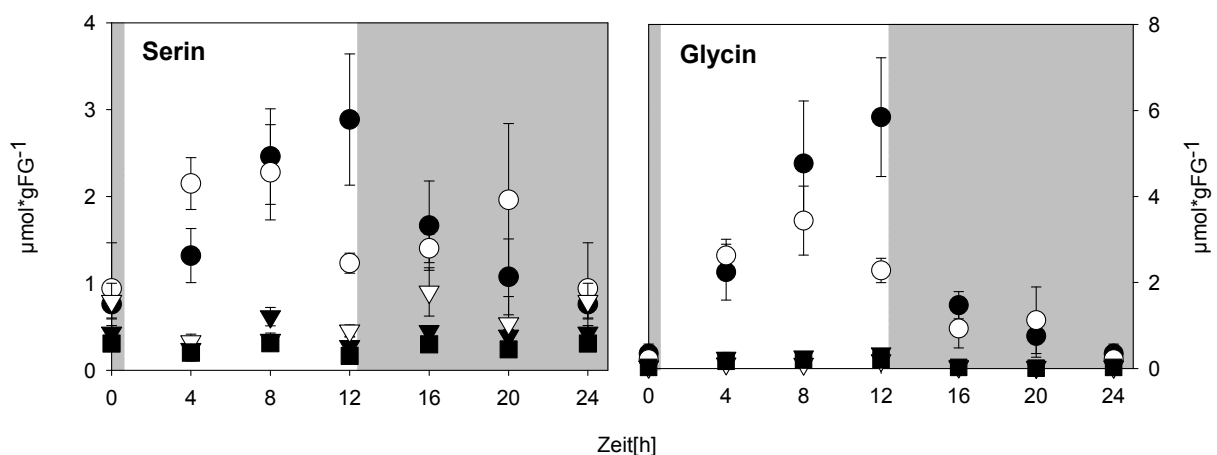


Abb. 5.8: Tageszeitlicher Verlauf der Gehalte von Serin und Glycin im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO_3 und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO_3 . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. $n = 5$.

Glycingehalte des Wildtyps gewachsen mit 12 mM KNO_3 zeigen einen vergleichbar charakteristischen Tagesgang verglichen mit den Seringehalten. Man beobachtet einen Anstieg während des Tages mit einem Maximum am Ende des Tages und einen drastischen Abfall, sobald die Nacht beginnt. Die Glycingehalte erreichen am Ende der Nacht ein Minimum (Abb. 5.8). Die Transformante F23xNia30(145), gewachsen mit 12 mM KNO_3 , zeigt, ähnlich der Seringehalte, einen abgewandelten Tagesgang. Das Tagesmaximum wird nach 8 Stunden Licht erreicht, danach folgt ein Abfall, der sich während der Nacht fortsetzt und am Ende der Nacht das Minimum erreicht. Die Seringehalte sind lediglich am Ende des Tages signifikant niedriger verglichen mit der Kontrollsituation, wiederum um den Faktor 3 (Abb. 5.8). Alle Nitratmangelsituationen (Wildtyp 0.2 mM KNO_3 , Nia30(145) 12 und 0.2 mM KNO_3) zeigen erheblich niedrigere Glycingehalte, sind untereinander aber vergleichbar. Auch der beobachtete Tagesgang des Kontrollwildtyps kommt gänzlich zum Erliegen (Abb. 5.8).

Alaningehalte des Kontrollwildtyps zeigen ebenfalls den charakteristischen Tagesgang der beiden vorangegangenen Aminosäuren. Man beobachtet einen kontinuierlichen Anstieg während des Tages mit einem Maximum am Ende des Tages von $3.2 \mu\text{mol} \cdot \text{gFG}^{-1}$. Es folgt während der Nacht ein Abfall der Alaningehalte im Blatt bis auf ein Minimum am Ende der Nacht (Abb. 5.9). Die Transformante F23xNia30(145) zeigt auch hier einen leicht abweichenden Tagesgang im Vergleich zur Kontrollsituation. Das Maximum der Alaningehalte ist nach 8 Stunden Licht erreicht, gefolgt von einem Abfall in der zweiten Hälfte der Lichtperiode und konstanten Alaningehalten während der Nacht (Abb. 5.9).

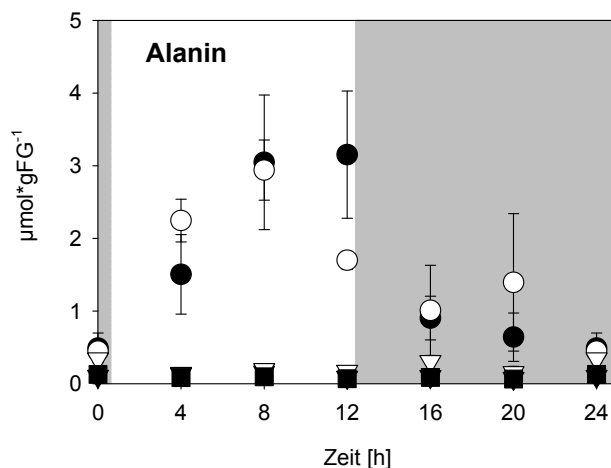


Abb. 5.9: Tageszeitlicher Verlauf der Alaningehalte im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO_3 und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO_3 . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. $n = 5$.

Die Gehalte zwischen F23xNia30(145) und Kontrollwildtyp sind nicht nennenswert unterschiedlich. Ausnahme bildet der Wert nach 12 Stunden Licht, dieser ist um den Faktor 1.5 niedriger im Vergleich zum Kontrollwildtyp (Abb. 5.9). Nitratverhungerter Wildtyp und die nahezu NR-defizienten Transformanten Nia30(145) in beiden Ernährungszuständen haben signifikant niedrigere Alaningehalte. Im Vergleich zum Kontrollwildtyp sind diese maximal um den Faktor 30 am Ende des Tages niedriger. Auch der charakteristische Tagesgang, der unter Standardbedingungen zu finden ist, kommt völlig zum Erliegen (Abb. 5.9).

5.2.1.2 Die „kleinen“ Aminosäuren

Die **aromatischen Aminosäuren** zeigen alle im Wildtyp, gewachsen mit 12 mM KNO_3 , den gleichen charakteristischen Tagesgang. Es erfolgt ein Anstieg der Gehalte über die Lichtperiode bis zu einem Maximum am Ende des Tages. Sobald die Nacht beginnt fallen die Gehalte der aromatischen Aminosäuren steil ab (Abb. 5.10). Die moderate NR-reduzierte Transformante F23xNia30(145), gewachsen mit 12 mM KNO_3 , zeigt wiederum einen leicht verschobenen diurnalen Rhythmus im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Die maximalen Gehalte der aromatischen Aminosäuren sind bereits nach 8 Stunden Licht erreicht und fallen in der zweiten Hälfte des Tages. Dies setzt sich während der Nacht fort und erreicht ein Minimum am Ende der Nacht (Abb. 5.10).

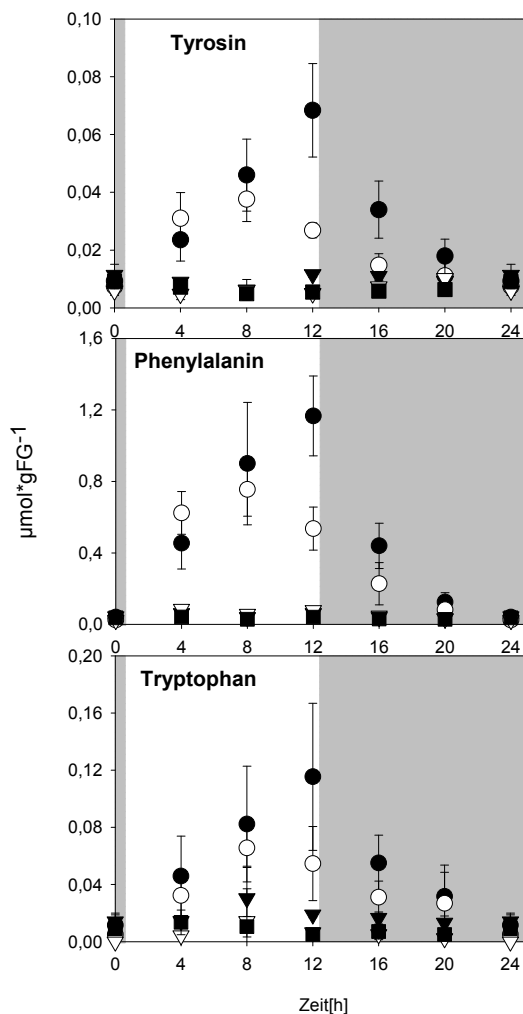


Abb. 5.10: Tageszeitlicher Verlauf der Tyrosin-, Phenylalanin- und Tryptophangehalte im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO_3 und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO_3 . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. $n = 5$.

Die Aromaten in den Blättern der Pflanzen gewachsen unter Stickstoffmangel zeigen alle signifikant niedrigere Gehalte während des Tages. Sie unterscheiden sich untereinander nicht nennenswert. Eine Ausnahme zeigen die Tryptophangehalte des verhungerten Wildtyps. Diese zeigen zum Teil leicht erhöhte Gehalte im Vergleich zu den Transformanten Nia30(145) in beiden Ernährungszuständen (Abb. 5.10). Die allgemeine Betrachtung der aromatischen Aminosäuren der Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus zeigt ebenfalls, dass jeder charakteristische diurnale Rhythmus zum Erliegen kommt. Wieder zeigen die Tryptophan-

tophangehalte des nitratverhungerten Wildtyps eine Ausnahme. Tendenziell ist der Tagesgang der F23xNia30(145), gewachsen mit 12 mM KNO₃, zu beobachten (Abb. 5.10).

Die im Folgenden dargestellten Aminosäuren **Threonin**, **Methionin**, **Lysin** und **Isoleucin** gehen aus der Aminosäure Aspartat hervor. Der Wildtyp mit ausreichender Nitratversorgung zeigt wieder den charakteristischen Tagesgang, der schon bei einigen der vorangegangenen Aminosäuren beschrieben wurde. Die Gehalte der entsprechenden Aminosäuren zeigen einen Anstieg über den Tag hinweg mit einem Maximum am Ende des Tages. Sobald kein Licht mehr vorhanden ist, fallen die Werte bis auf ein Minimum am Ende der Nacht (Abb. 5.11).

Die moderat betroffene NR-reduzierte Transformante F23xNia30(145) mit ausreichender Nitratversorgung zeigt nur bei den Aminosäuren Threonin und Isoleucin den bisher beschriebenen Tagesgang mit leichter Verschiebung im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Hier wird das Tagesmaximum der Konzentrationen der entsprechenden Aminosäure bereits nach 8 Stunden Licht erreicht. In der zweiten Hälfte der Nacht erfolgt ein Abfall an Threonin und Isoleucin bis auf ein Minimum am Ende der Nacht. Die Threoningehalte der Transformante sind vergleichbar mit denen des Kontrollwildtyps mit Ausnahme des Zeitpunktes nach 8 Stunden Licht. Zu diesem Zeitpunkt sind die Threoningehalte der F23xNia30(145) niedriger als im Kontrollwildtyp. Isoleucingehalte dieser beiden Genotypen sind aufgrund der hohen Schwankungen vergleichbar (Abb. 5.11).

Die Methioninkonzentrationen dieses Genotyps zeigen zwar ebenfalls einen verschobenen diurnalen Rhythmus, allerdings im Vergleich zu den bereits beschriebenen Aminosäuren schon nach 4 Stunden Licht. Danach folgt der Abfall von Methionin über die zweite Tageshälfte hinweg. Dieser setzt sich während der Nacht fort. Verglichen mit dem Kontrollwildtyp sind die Werte von Methionin lediglich nach 4 und 8 Stunden Licht signifikant niedriger im Vergleich zum Wildtyp gewachsen in 12 mM KNO₃ (Abb. 5.11). Lysingehalte der F23xNia30(145) zeigen keinerlei diurnalen Rhythmus. Tendenziell kann man niedrigere Werte während der Nacht beobachten. Verglichen mit dem Kontrollwildtyp sind die Lysingehalte signifikant niedriger nach 4 und 8 Stunden Licht und nach 4 Stunden Dunkelheit (Abb. 5.11). Während der Lichtperiode zeigt der verhungerte Wildtyp signifikant niedrigere Konzentrationen aller 4 Aminosäuren. Während der Nacht sind die Gehalte von Threonin und Methionin tendenziell niedriger verglichen mit dem Kontrollwildtyp, wobei sie am Ende der Nacht ähnliche Werte zeigen. Lysin und Isoleucingehalte dagegen zeigen während der gesamten Dunkelperiode vergleichbare Konzentrationen zwischen nitratverhungertem Wildtyp und Wildtyp mit ausreichender Nitratversorgung. Die Gehalte all dieser Aminosäuren sind im Nitratmangel ernährten Wildtyp während des gesamten Tag/Nachtzyklus hinweg relativ stabil und zeigen keinen ausgeprägten diurnalen Rhythmus (Abb. 5.11).

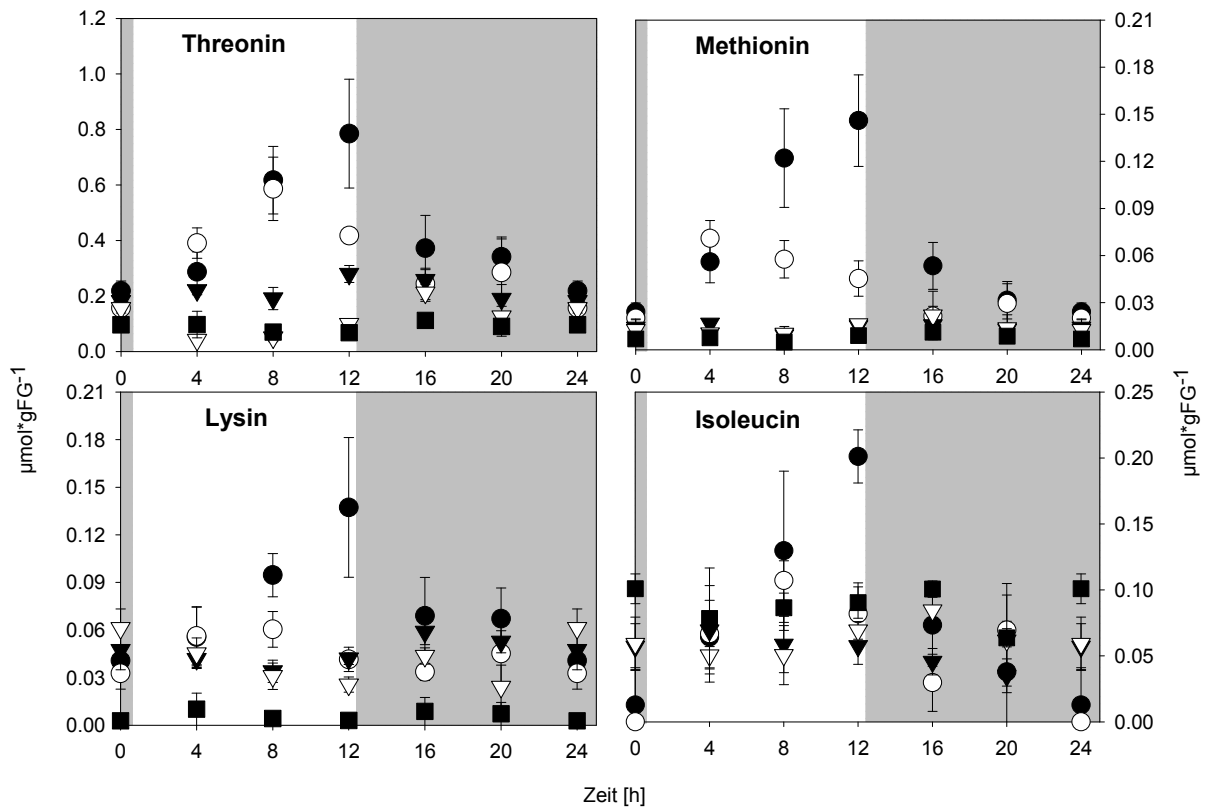


Abb. 5.11: Tageszeitlicher Verlauf der Gehalte von Threonin, Methionin, Lysin und Isoleucin im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5.

In den stark betroffenen NR-reduzierten Transformanten Nia30(145) sind in beiden Ernährungszuständen die Threonin- und Methioningehalte signifikant niedriger verglichen mit dem Kontrollwildtyp (Abb. 5.11). Der im Kontrollwildtyp charakteristische Tagesgang kommt hier völlig zum Erliegen. Die Threoningehalte der Nia30(145) in beiden Ernährungszuständen sind auch im Vergleich zum verhungerten Wildtyp um den Faktor 3 erniedrigt. Methionin dagegen zeigt im Vergleich aller Pflanzen in Stickstoffmangelsituationen vergleichbare Konzentrationen (Abb. 5.11). Die Lysingehalte der Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ zeigen um den Faktor 4 signifikant höhere Werte im Vergleich zur Nia30(145) gewachsen unter Nitratmangelbedingungen (Abb. 5.11). In beiden Situationen kommt der Tagesgang zum Erliegen. Die Transformante gewachsen mit 12 mM KNO₃ verhält sich dem nitratverhungerten Wildtyp vergleichbar. Die Isoleucingehalte von Nia30(145) in beiden Nitratsituationen zeigen stabile Werte dieser Aminosäure während des gesamten Tages, wobei die nitratmangelernährte Variante dieser Transformante tendenziell höhere Gehalte an Isoleucin aufweist im Vergleich zu Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃. Nia30(145) mit ausreichender Nitratapplikation verhält sich im Vergleich zum nitratmangelernährten Wildtyp ähnlich außer am Ende der Nacht, hier sind die Gehalte der Transformante um den Faktor 5 höher (Abb. 5.11). Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass Isoleucin aus Threonin hervorgeht und das Enzym, welches den ersten Schritt dieser Biosynthese katalysiert über eine starke Produkthemmung reguliert wird. Das könnte der Grund sein, warum sich diese beiden Aminosäuren sehr ähnlich verhalten, zumindest was beide Ernährungszustände des Wildtyps und die Transformante F23xNia30(145) betrifft. Weiter ist interessant zu bemerken, dass alle in diesem Abschnitt

beschriebenen Aminosäuren einen unterschiedlichen Tagesgang im Vergleich zu ihrem Vorläufer Aspartat zeigen. Bisher zeigten alle beschriebenen Aminosäuren im nitratverhungerten Wildtyp eine Reaktion auf das nach ca. 3 – 3.5 Stunden nach Lichtbeginn ausgeführte Gießereignis. In dieser Aminosäuregruppe ist das nicht der Fall.

Arginin entsteht aus Glutamat über **Ornithin** und **Citrullin**. **Histidin** dagegen geht aus Glutamin hervor. Alle Aminosäuren dieser Familie zeigen, wie bei den anderen Familien der „kleinen“ Aminosäuren, den für den Wildtyp mit ausreichender Nitratversorgung charakteristischen Tagesgang: Anstieg des Gehaltes der entsprechenden Aminosäure während der Lichtperiode mit einem Maximum am Ende des Tages und einem raschen und kontinuierlichen Abstieg in der Dunkelperiode mit einem Minimum am Ende der Nacht (Abb. 5.12). F23xNia30(145) mit ausreichender Nitratversorgung zeigt einen verschobenen diurnalen Rhythmus mit signifikant niedrigeren Gehalten zumindest während der Lichtperiode im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Das Maximum der entsprechenden Aminosäure wird nach 8 Stunden Licht erreicht, gefolgt von einem Abfall in der zweiten Tageshälfte und konstant niedrigen Gehalten während der Nacht (Abb. 5.12). Es kann aufgrund der hohen Standardabweichung der Ornithinmessungen für den Zeitpunkt nach 4 Stunden Licht nicht von einer Ausnahme zu diesem schon fast schematische verschobenen diurnalen Rhythmus ausgegangen werden (Abb. 5.12).

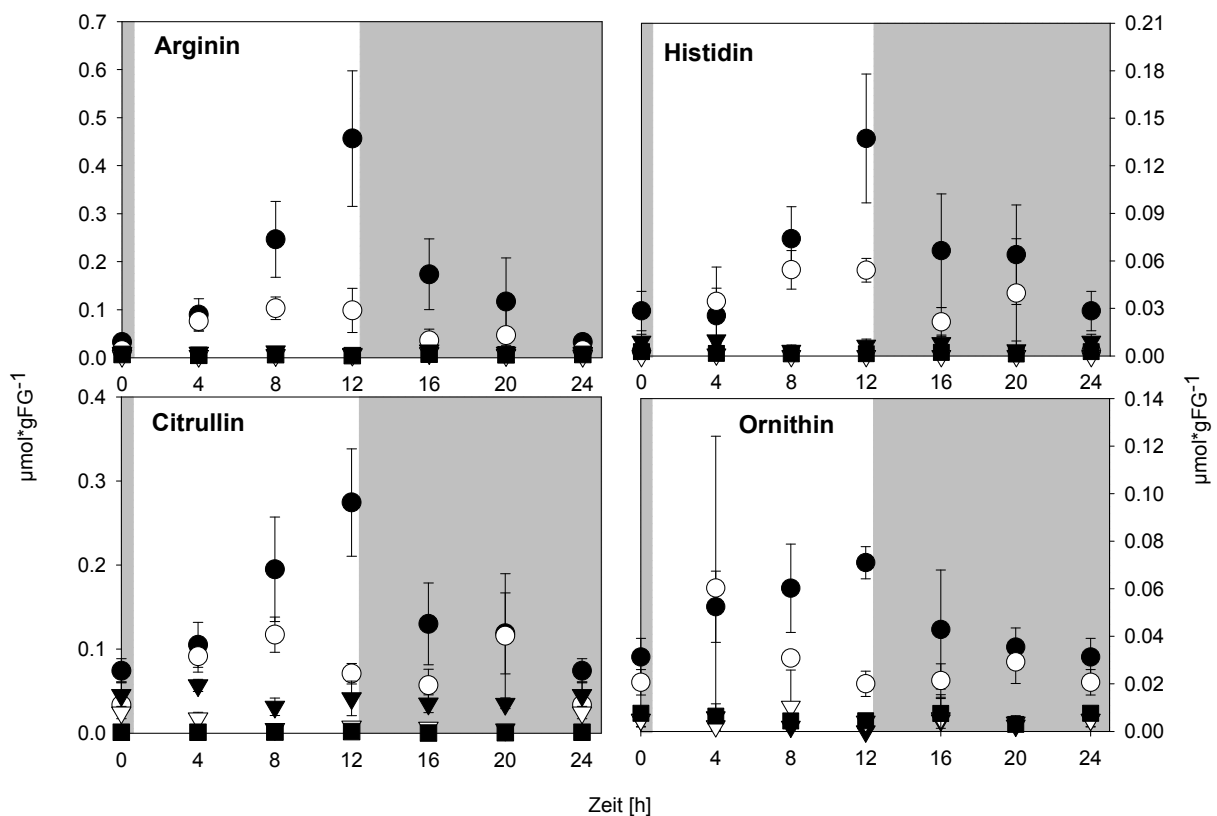


Abb. 5.12: Tageszeitlicher Verlauf der Gehalte von Arginin, Histidin, Citrullin und Ornithin im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5.

Alle Pflanzen gewachsen unter Nitratmangelzuständen zeigen deutlich verringerte Gehalte der entsprechenden Aminosäure verglichen mit dem Kontrollwildtyp und keinerlei diurnalen Rhythmus (Abb. 5.12). Arginin-, Histidin- und Ornithingehalte zeigen keinerlei Unterschiede in den Genotypen, deren Nitratversorgung oder Nitratassimilation reduziert ist. Citrullingehalte im verhungerten Wildtyp zeigen sich tendenziell erhöht im Vergleich zu den Nia30(145) in beiden Ernährungszuständen (Abb. 5.12).

Die hydrophobe Gruppe der „kleinen“ Aminosäuren **Valin** und **Leucin** zeigt für den ausreichend ernährten Wildtyp den bereits beschriebenen charakteristischen tageszeitlichen Verlauf. Es ist der Anstieg über den Tag zu beobachten mit einem Maximum am Ende des Tages, gefolgt von einem raschen Abstieg während der Nacht (Abb. 5.13). Die moderat betroffene NR-reduzierte Transformante F23xNia30(145), gewachsen mit 12 mM KNO₃, hat den leicht verschobenen diurnalen Rhythmus mit einem Maximum nach 8 Stunden Licht, wobei die Zeitpunkte nach 4 und 8 Stunden Licht signifikant niedrigere Werte im Vergleich zum Kontrollwildtyp zeigen (Abb. 5.13).

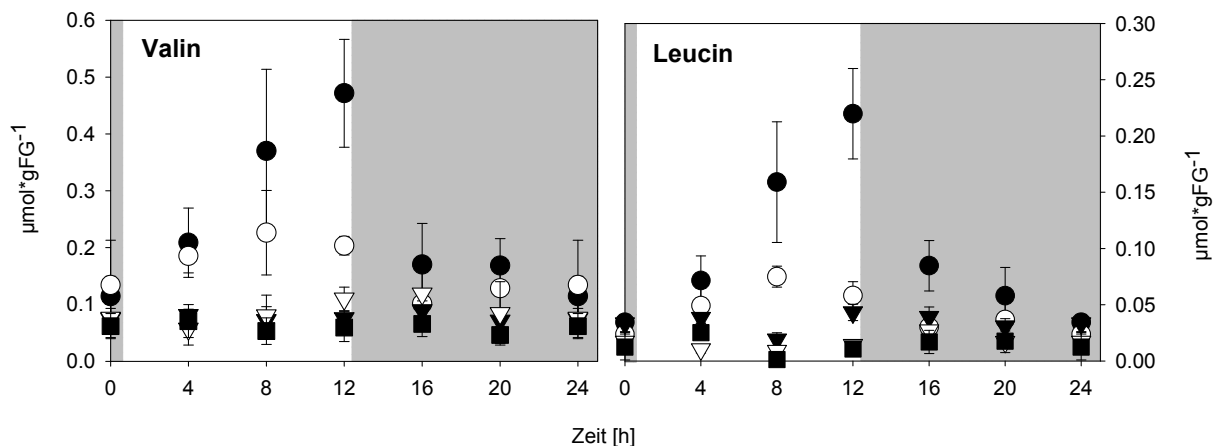


Abb. 5.13: Tageszeitlicher Verlauf der Gehalte von Valin und Leucin im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5.

Pflanzen in Stickstoffmangelzuständen oder mit stark erniedrigter Nitratassimilation (Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO₃, Nia30(145) gewachsen mit 12 mM und 0.2 mM KNO₃) zeigen erniedrigte Gehalte beider Aminosäuren im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Lediglich am Ende der Nacht zeigen alle Genotypen vergleichbare Gehalte beider Aminosäuren. Der für den Kontrollwildtyp charakteristische diurnale Rhythmus kommt auch hier völlig zum Erliegen (Abb. 5.13).

γ-Aminobuttersäure (Gaba) entsteht durch die Decarboxylierung von Glutamat. Ebenso wie Glutamat sind die Gehalte von Gaba im Wildtyp mit ausreichender Nitratversorgung relativ unabhängig gegenüber tageszeitlichen Schwankungen (Abb. 5.14). Die Gehalte der Transformante F23xNia30(145), ebenfalls mit ausreichender Nitratversorgung, unterscheiden sich aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant vom Kontrollwildtyp (Abb. 5.14). Die beiden nitratverhungerten Genotypen, Wildtyp und Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO₃,

zeigen niedrigere Gehalte an Gaba im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Untereinander sind die Gehalte vergleichbar, aber aufgrund der hohen Standardabweichungen kann diesbezüglich nur eine Tendenz beschrieben werden (Abb. 5.14). Nia30(145) mit ausreichender Nitratversorgung dagegen zeigt tendenziell dem Kontrollwildtyp vergleichbare Gehalte. Aufgrund der hohen Standardabweichungen kann auch hier nur von einer Tendenz gesprochen werden (Abb. 5.14).

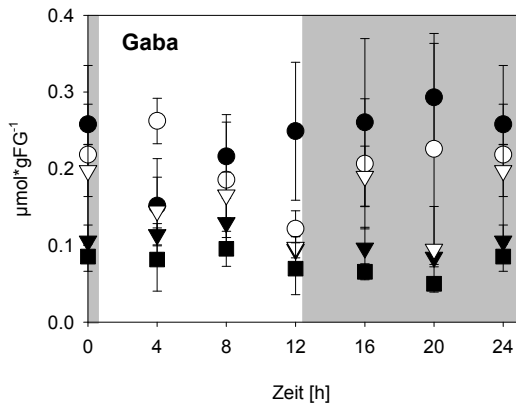


Abb. 5.14: Tageszeitlicher Verlauf der Gehalte von Gaba im jüngsten vollexpandiertem Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) und Nia30(145) (■) gewachsen in 0,2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5.

Fazit

- Fast alle „kleinen“ Aminosäuren zeigen in Wildtypen mit ausreichender Nitratversorgung einen charakteristischen Tagesgang: Ein Anstieg während der Lichtperiode der entsprechenden Aminosäure mit einem Maximum am Ende des Tages, gefolgt von einem raschen Abstieg in der ersten Hälfte der Nacht und einem Minimum am Ende der Nacht.
- Die moderat betroffene NR-reduzierte Transformante F23xNia30(145) mit ausreichender Nitratversorgung zeigt eine Verschiebung des oben beschriebenen diurnalen Rhythmus. In der ersten Hälfte des Tages werden die Aminosäuren akkumuliert, während es in der zweiten Hälfte des Tages zu einer Abnahme der Aminosäuren kommt. Die Gehalte der entsprechenden Aminosäure bleiben während der Nacht niedrig.
- Glutamatgehalte sind konstant über den ganzen Tag hinweg und zeigen auch unter den verschiedenen Genotypen und unter den verschiedenen Nitratbehandlungen kaum Unterschiede.
- Glutamin, Alanin, Serin und Glycin zeigen ebenfalls den charakteristischen Tagesgang, der für die „kleinen“ Aminosäuren beschrieben wurde. Auch die Transformante F23xNia30(145) mit ausreichender Nitratversorgung zeigt für diese Aminosäuren den für diesen Genotyp charakteristischen Tagesgang mit einer leichten Verschiebung im Vergleich zum Wildtyp.
- Pflanzen gewachsen unter Stickstoffmangel und Pflanzen mit stark reduzierter Nitratreduktase-Aktivität zeigen alle signifikant niedrigere Aminosäuregehalte im Vergleich zur Kontrollsituation (Ausnahme Glutamat). Der für die Kontrollwildtypen charakteristische Tagesgang kommt völlig zum Erliegen.

- Nitratmangelernährter Wildtyp und Nia30(145) gewachsen mit 12 mM Kaliumnitrat haben vergleichbar niedrige Gehalte der mengenmäßig gering vorkommenden Aminosäuren.

5.2.2 Wechselbeziehungen der Aminosäuren in verschiedenen Stickstoff- und Kohlenhydratmangelzuständen

Die bemerkenswert ähnlichen Muster der diurnalen Rhythmen fast aller „kleinen“ Aminosäuren und einiger Hauptaminosäuren im Kontrollzustand (Wildtyp in ausreichender Nitratversorgung und ausreichender Lichtqualität), so wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, führen zur Annahme, dass es eine koordinierte Biosynthese dieser Aminosäuren gibt. Noctor et al. (2002) nimmt dies auf Grund von sehr guten Korrelationen der individuellen kleinen Aminosäuren zum Gesamtgehalt der kleinen Aminosäuren an. Die Analysen wurden mit Kartoffel (*Solanum tuberosum* cv. Desiree), Weizen (*Triticum aestivum* cv. Cannon) und Gerste (*Hordeum vulgare* cv. Maris Mink) unterschiedlicher Photosyntheseleistungen vorgenommen und die Korrelationen erwiesen sich als sehr stabil. Zieht man den in dieser Arbeit erzeugten Aminosäure Datensatz mit in diese Betrachtung, stellen sich folgende Fragen:

- Die Existenz einer solchen koordinierten Aminosäurebiosynthese in Pflanzen ist sehr umstritten (Zhao et al, 1998). Falls eine solche generelle Kontrolle existiert, ist diese auch im Zustand von Stickstoffmangelernährung vorhanden?
- Gilt die angenommene koordinierte Biosynthese generell für alle („kleinen“) Aminosäuren oder sind nur die einzelnen biochemisch verwandten Familien davon betroffen?
- Bietet die ausschließliche Betrachtung über die Korrelationsanalyse von Noctor et al. (2002) ausreichend Informationen, um auf eine koordinierte Aminosäurebiosynthese schließen zu können?

Das experimentelle System der vorliegenden Arbeit liefert Daten über verschiedene Tageszeitpunkte und unterschiedliche Stickstoffmangelzustände. Eine Kombination dieses Datensatzes mit einem weiteren, erzeugt unter verschiedenen Kohlenstoff-limitierenden Bedingungen (Matt et al., 2002), soll die Möglichkeit bieten, die offenen Fragen nicht nur unter dem Gesichtspunkt des Nitratstoffwechsels, sondern auch unter dem Gesichtspunkt des Kohlenstoffstoffwechsels zu diskutieren. Die Kohlenstofflimitierung wurde durch zwei unterschiedliche Ansätze erreicht: Rubisco antisense Tabakpflanzen mit unterschiedlich reduzierter Rubisco-Aktivität und Wildtyp-Tabakpflanzen unter sehr guten bis suboptimalen Lichtverhältnissen. Im ersten Versuchsansatz geht die Reduzierung der Kohlenhydrate einher mit einer Überreduzierung der Elektronentransportkette. Hierzu wurden folgende Genotypen verwendet (siehe auch *Material und Methoden*):

- | | |
|---|-----------------------|
| • Rubisco-Aktivität des Wildtyps: | 826 ± 32.5 µmol/gFG/h |
| • Rubisco-Aktivität 3107 (ant3; Pseudowildtyp): | 818 ± 130.3µmol/gFG/h |
| • Rubisco-Aktivität 3203mittel (ant3): | 334 ± 28.8 µmol/gFG/h |
| • Rubisco-Aktivität 3206mittel (ant3): | 298 ± 53.8 µmol/gFG/h |
| • Rubisco-Aktivität 3206klein (ant3): | 251 ± 80.6 µmol/gFG/h |
| • Rubisco-Aktivität ant5: | 98 ± 11.6 µmol/gFG/h |

Im zweiten Versuchsansatz wurden Wildtyp Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv.SNN) unter verschiedenen Lichtintensitäten angezogen: 400 μ E, 150 μ E und 80 μ E. Die reduzierte Photosyntheseleistung in Pflanzen gewachsen unter niedrigen Lichtbedingungen, führte zu einer verringerten Synthese an Reduktionsäquivalenten NADPH und ATP und letztendlich zu erniedrigten Gehalten der Kohlenhydrate.

Die Aminosäuren wurden hier nur während eines Tagezeitpunktes analysiert.

Durch Hauptkomponentenanalyse, Korrelationsanalyse und Verhältnisanalyse soll kritisch zu den oben genannten Fragen Bezug genommen werden.

5.2.2.1 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Mit diesem Verfahren versucht man, gemessene Parameter (Variablen; hier: Aminosäuren) zu identifizieren, die einen großen Anteil an der Variabilität eines multidimensionalen Datensatz haben. Die PCA benutzt diese Parameter, um die Datenpunkte entlang einer geringen Anzahl von Achsen (Hauptkomponenten) zu trennen. Die Trennung entlang einer Achse wird meist durch mehrere gemessene Variablen definiert. Parameter, die eine stark trennende Wirkung haben, erhalten einen hohen Eigenwert (loading). Die Betrachtung der Eigenwerte zeigt diejenigen Parameter in einer Hauptkomponente an, die die höchste Variabilität und den größten Einfluss auf die Trennung von Datenpunkten haben. Ziel dieses Kapitels ist es, die Aminosäuren zu identifizieren, die den beiden vorliegenden Datensätzen ihre charakteristische Eigenschaften und deren Varianz verleihen. Im Zusammenhang mit der übergeordneten Fragestellung nach einer koordinierten Aminosäurebiosynthese kann die Interpretation der PCA Hinweise liefern, ob bestimmte Aminosäuren zu den Parametern gehören, die ausschlaggebend für die Varianz der Datensätze sind. In einem solchen Fall muss neu überdacht werden, ob dieser Aminosäure Teil einer koordinierten Biosynthese ist. Von Interesse ist ebenfalls die Frage, ob bei einem Vergleich des stickstoffbasierten Datensatzes (*siehe Kapitel 5.2.1*) mit dem kohlenstoffbasierten Datensatz (Matt et al., 2002 und Dissertation 2001) die gleichen Parameter (Aminosäuren) eigenschaftsbestimmend sind.

Hauptkomponentenanalyse des stickstoffbasierten Datensatzes

Das vorangegangene *Kapitel 5.2.1* zeigt unterschiedliche Verhaltensweisen der meisten Aminosäuren in Bezug auf die verschiedenen Genotypen und/oder die verschiedene Nitratversorgung und/oder die verschiedenen Tageszeitpunkte. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse sollen die Aminosäuren identifiziert werden, die trennend in den genannten Punkten agieren.

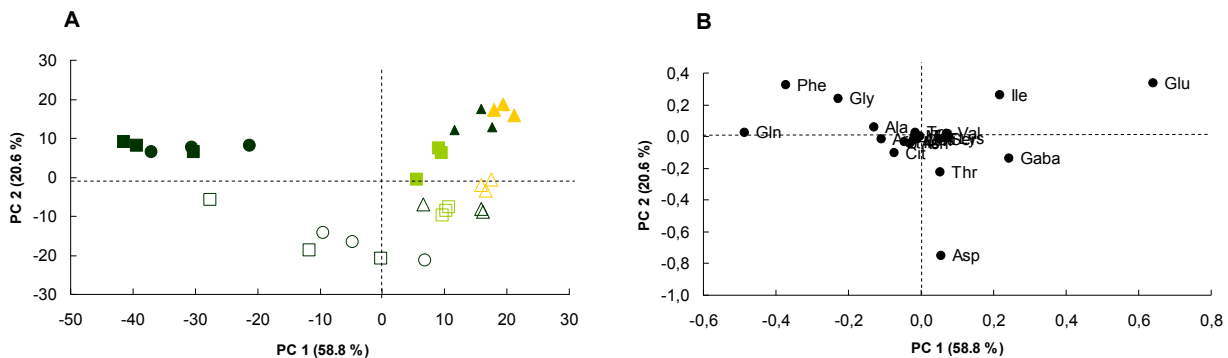


Abb. 5.15: (A) PCA der Aminosäuren aller Genotypen zu allen Zeitpunkten. Dargestellt sind Wildtyppflanzen (■/□) und Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) (●/○) und Nia30(145) (▲/△). Pflanzen ernährt mit 12 mM Kaliumnitrat sind dunkelgrün, Wildtyppflanzen ernährt mit 0.2 mM Kaliumnitrat sind hellgrün und Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM Kaliumnitrat sind gelb dargestellt. Geschlossene Symbole stellen Tagwerte, offene Symbole stellen Nachtwerte dar. (B) Loadings der PCA, d.h. Aminosäuren, deren hoher Eigenwert bestimmend für die charakteristische Trennung in (A) ist.

Abbildung 5.15A zeigt die Ergebnisse der PCA-Analyse des stickstoffbasierten Datensatzes. Die erste Hauptkomponente (PC 1) trennt die Pflanzen nach ihrem Stickstoffstatus entlang der x-Achse. Wildtyp und F23xNia30(145) bilden ein Cluster und die Pflanzen mit reduzierter Stickstoffversorgung bzw. stark reduzierter Nitratassimilation (Wildtyp und Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO_3 und Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO_3) bilden das andere Cluster. Abbildung 5.15B zeigt die für diese Trennung verantwortlichen Aminosäuren. Trennenden Eigenschaften entlang der x-Achse und demnach verantwortlich für eine Unterscheidung bezüglich des Stickstoffstatus sind Glutamat, Glutamin, Phenylalanin, Isoleucin, Glycin, Gaba und Threonin, wobei Glutamat, Glutamin und Phenylalanin die höchste Wertigkeit (loading) haben (Abb. 5.15B). Abbildung 5.15A zeigt auch, dass die zweite Hauptkomponente (PC 2) eine deutliche Trennung des Datensatzes entlang der y-Achse herbeiführt. Hier findet vor allem eine Unterscheidung der Proben statt, die während des Tages oder während der Nacht geerntet wurden. Aminosäuren, die für diese Trennung eigenschaftsbestimmend sind, sind Aspartat, Phenylalanin, Glutamat, Glycin, Isoleucin und Threonin (Abb. 5.15B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass

1. die PCA des stickstoffbasierten Datensatzes Pflanzen bezüglich ihres Stickstoffstatus und tageszeitlich abhängiger Faktoren unterscheiden kann. Bestimmend für diese Trennungen sind Glutamat, Glutamin, Aspartat, Glycin, Phenylalanin, Isoleucin, Threonin und Gaba.
2. die PCA zeigt ebenfalls eine leichte Trennung innerhalb der Pflanzen, deren Stickstoffstatus reduziert ist (Wildtyp, Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO_3 und Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO_3). Die Trennung findet entlang der x-Achse, also bezüglich des Stickstoffstatus statt. Die Transformanten beider KNO_3 -Behandlungen bilden eine Gruppe, die sich leicht vom Nitratmangel ernährten Wildtyp trennt.
3. Glutamat zeigt in Kapitel 5.2.1 kaum genotypische oder tageszeitlich bedingte Konzentrationsänderungen in den Blättern. Dennoch ist Glutamat ein eigenschaftsbestimmender Faktor.

4. die PCA konnte einige kleine Aminosäuren als eigenschaftsbestimmende Faktoren identifizieren. Phenylalanin, Isoleucin, Threonin und Gaba trennen sowohl Genotypen als auch Tageszeiten. Eine solche Eigenschaft lässt eine Beteiligung dieser Aminosäuren an einer koordinierten Biosynthese aller kleinen Aminosäuren auch unter Stickstoffmangel unwahrscheinlich erscheinen.

Hauptkomponentenanalyse des kohlenstoffbasierten Datensatzes

Die von Matt et al. (2002 und Dissertation 2001) analysierten Aminosäuregehalte der Blätter zeigen eine starke Abhängigkeit bezüglich des Genotyps innerhalb der Rubisco antisense Pflanzen und im Vergleich zum Kontrollwildtyp, als auch eine starke Abhängigkeit von der Lichtqualität im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier sollen mit Hilfe der PCA die Aminosäuren identifiziert werden, die einen trennenden Einfluss ausüben.

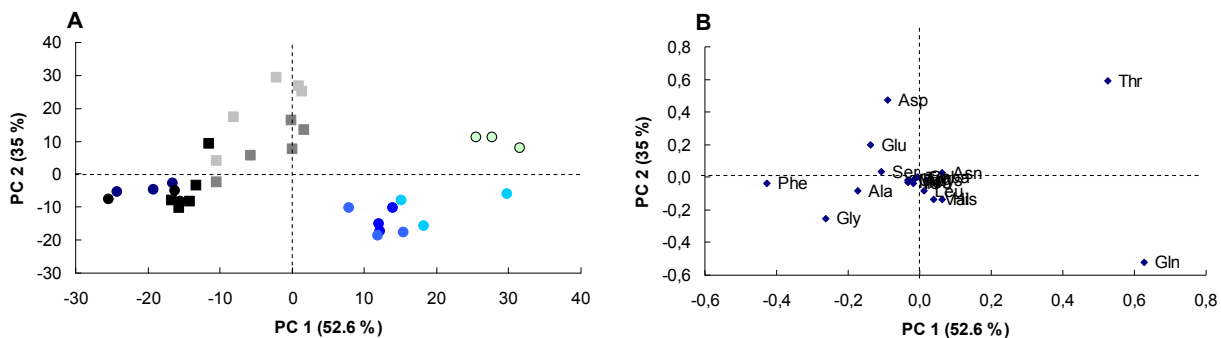


Abb. 5.16: (A) PCA der Aminosäuren Genotypen der Rubisco antisense Pflanze: Wildtyp SR 1 (●); ant3 Genotypen 3107 (●), 3203 (●), 3206 mittel (●), 3206 klein (●) und Genotyp ant5 (●). Ebenfalls dargestellt sind Wildtyp SNN mit 400 μ E (■), Wildtyp SNN mit 150 μ E (■) und Wildtyp SNN mit 80 μ E (■). (B) Loadings der PCA, d.h. Aminosäuren, deren hoher Eigenwert bestimmend für die charakteristische Trennung in (A) ist.

Die PCA zeigt eine deutliche Trennung der Wildtyp-Genotypen SR 1 und SNN von den anti-*rbcs* Pflanzen durch die erste Hauptkomponente (PC 1) entlang der x-Achse. In diesem Cluster der Pflanzen mit hohem Kohlenstoffstatus befindet sich auch der Pseudowildtyp ant3 (3107), der über eine sehr hohe Rubisco-Aktivität verfügt (Abb. 5.16A). Verantwortlich für diese Trennung sind Glutamin, Threonin, Phenylalanin und Glycin (Abb. 5.16B). Die zweite Hauptkomponente (PC 2) trennt die anti-*rbcs* Pflanzen untereinander noch einmal deutlich in die ant3 und ant5 Genotypen (Abb. 5.16A). Trennend wirken hier vor allem die Aminosäuren Glutamin und Threonin (Abb. 5.16B). Die PC 2 (Abb. 5.16A) zeigt auch eine deutliche Trennung der Tabakpflanzen gewachsen mit unterschiedlicher Lichtqualität entlang der y-Achse. Eigenschaftsbestimmende Aminosäuren sind hier Aspartat, Glutamat und Glycin (Abb. 5.16B). Interessanterweise zeigen diese drei Aminosäuren auch trennende Eigenschaften in Bezug auf den Tag/Nacht-Zyklus des stickstoffbasierten Datensatzes. Dort agiert aber auch Phenylalanin als eigenschaftsbestimmende Aminosäure. Dies ist in diesem Datensatz nicht der Fall. Reagieren Metabolitgehalte auf Licht bzw. Lichtqualität, kann das entweder die Folge von sich verändernden Gehalten der reduzierten Zucker sein oder von veränderten Lichtbedingungen direkt. Dieses Ergebnis kann ein Hinweis darauf sein, dass die Gehalte von Phenylalanin durch andere Faktoren beeinflusst werden als die der anderen drei Aminosäuren.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

1. Die PCA des kohlenstoffbasierten Datensatzes trennt die Pflanzen bezüglich ihres Genotyps entlang der x-Achse. Hier werden Pflanzen nach ihrer Rubisco-Aktivität getrennt. Bestimmend für diese Trennung sind Glutamin, Threonin, Phenylalanin und Glycin.
2. Die PCA trennt entlang der y-Achse die Pflanzen gewachsen unter suboptimalen Lichtbedingungen. Bestimmend für diese Trennung sind Aspartat, Glycin und Glutamat.
3. Die PCA unterscheidet die Pflanzen mit reduziertem Kohlenstoffstatus bezüglich der Qualität der Kohlenstofflimitierung, d.h. Pflanzen mit reduzierter Rubisco-Aktivität und Pflanzen gewachsen in Niedriglichtbedingungen bilden zwei verschiedene Cluster (Abb. 5.16A).
4. Die PCA des kohlenstoffbasierten Datensatzes identifiziert zwei „kleine“ Aminosäuren als trennende Faktoren. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass Phenylalanin und Threonin nicht einer koordinierten Aminosäurebiosynthese unter Kohlenstoffmangelbedingungen unterliegen.

Die PCA der Aminosäuren beider Datensätze konnte erfolgreich unterschiedliche Genotypen unterscheiden und die dafür hauptverantwortlichen Aminosäuren identifizieren. In beiden Fällen findet man dieselben trennenden Aminosäuren wieder. Glutamin, Glutamat, Aspartat, Glycin auf Seite der Hauptaminosäuren; Phenylalanin und Threonin auf Seite der kleinen Aminosäuren.

5.2.2.2 Korrelationsanalysen der Aminosäuren in Stickstoffmangelzuständen

Mit Hilfe von Korrelationsanalysen soll die Frage diskutiert werden, ob sich Aminosäurekonzentrationen zueinander parallel ändern oder nicht. Betrachtet werden die Korrelationen aller Aminosäuren sowohl im Normalzustand als auch in allen Stickstoffmangelbedingungen. Eine Korrelationsanalyse gibt Hinweise darauf, ob bestimmte Aminosäuren stark miteinander assoziiert sind. Dies kann eine koordinierte Biosynthese andeuten. Eine Korrelationsanalyse ist ein statistisches Verfahren, um solche Beziehungen aufzudecken, sie gibt jedoch keinerlei Aufschluss über die biologische Relevanz. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse stets bedacht werden. Sehr gute bzw. stark positive Korrelationen sind definiert von einem Wert von 0.99 bis 0.89, gute bzw. starke Korrelationen sind definiert von einem Wert von 0.89 bis 0.69 und moderat positive Korrelationen definiert von 0.69 bis 0.49. Die Werte werden in den folgenden Abbildungen durch verschiedene Farbcodierungen unterschieden (*siehe Legenden*). In den folgenden Datensätzen gibt es keine signifikant negativen Korrelationen.

Korrelationen der Aminosäuren des Wildtyps mit gutem Stickstoffstatus unter diurnalen Aspekten

Tabelle 5.2 zeigt die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der Aminosäuren, die während des Tag/Nacht-Zyklus im Wildtyp mit ausreichender Nitratversorgung analysiert wurden.

	Asp	Asn	Glu	Gln	Ser	Gly	Ala	Thr	Met	Ile	Lys	His	Cit	Arg	Orn	Val	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gaba
Asp	1	0,542	0,744	-0,18	-0,14	-0,4	-0,39	-0,09	-0,36	-0,27	-0,03	0,125	-0,08	-0,05	-0,32	-0,25	-0,25	-0,19	-0,23	-0,39	0,697
Asn	0,542	1	0,561	0,382	0,514	0,304	0,329	0,526	0,311	0,392	0,55	0,567	0,574	0,576	0,192	0,42	0,428	0,4	0,273	0,257	0,665
Glu	0,744	0,561	1	0,211	0,253	0,058	0,086	0,316	0,073	0,114	0,336	0,395	0,302	0,324	-0,01	0,181	0,186	0,188	0,081	0,033	0,731
Gln	-0,18	0,382	0,211	1	0,931	0,927	0,894	0,952	0,941	0,877	0,839	0,835	0,902	0,913	0,657	0,907	0,948	0,93	0,771	0,929	0,168
Ser	-0,14	0,514	0,253	0,931	1	0,834	0,93	0,97	0,946	0,897	0,912	0,826	0,954	0,947	0,725	0,932	0,963	0,955	0,795	0,926	0,283
Gly	-0,4	0,304	0,058	0,927	0,934	1	0,98	0,92	0,977	0,921	0,822	0,724	0,899	0,89	0,745	0,938	0,965	0,911	0,782	0,96	0,007
Ala	-0,39	0,329	0,086	0,894	0,93	0,98	1	0,908	0,96	0,87	0,817	0,678	0,888	0,849	0,72	0,948	0,942	0,878	0,745	0,936	0,069
Thr	-0,09	0,526	0,316	0,952	0,97	0,92	0,908	1	0,937	0,868	0,937	0,875	0,958	0,956	0,672	0,942	0,963	0,945	0,773	0,901	0,335
Met	-0,36	0,311	0,073	0,941	0,946	0,977	0,96	0,937	1	0,922	0,85	0,78	0,928	0,895	0,753	0,951	0,977	0,951	0,854	0,982	0,094
Ile	-0,27	0,392	0,114	0,877	0,897	0,921	0,87	0,868	0,922	1	0,785	0,792	0,906	0,901	0,808	0,889	0,944	0,91	0,847	0,919	0,082
Lys	-0,03	0,55	0,336	0,839	0,912	0,822	0,817	0,937	0,85	0,785	1	0,856	0,922	0,931	0,614	0,869	0,893	0,913	0,71	0,812	0,393
His	0,125	0,567	0,395	0,835	0,826	0,724	0,678	0,875	0,78	0,792	0,856	1	0,877	0,902	0,598	0,786	0,828	0,856	0,734	0,734	0,464
Cit	-0,08	0,574	0,302	0,902	0,954	0,899	0,888	0,958	0,928	0,906	0,922	0,877	1	0,962	0,723	0,945	0,95	0,94	0,819	0,899	0,369
Arg	-0,05	0,576	0,324	0,913	0,947	0,89	0,849	0,956	0,896	0,901	0,931	0,902	0,962	1	0,665	0,9	0,952	0,941	0,761	0,866	0,319
Orn	-0,32	0,192	-0,01	0,657	0,725	0,745	0,72	0,672	0,753	0,808	0,614	0,598	0,723	0,665	1	0,737	0,746	0,74	0,65	0,757	0,01
Val	-0,25	0,42	0,181	0,907	0,932	0,938	0,948	0,942	0,951	0,889	0,869	0,786	0,945	0,9	0,737	1	0,961	0,921	0,821	0,933	0,232
Leu	-0,25	0,428	0,186	0,948	0,963	0,965	0,942	0,963	0,977	0,944	0,893	0,828	0,96	0,952	0,746	0,961	1	0,971	0,84	0,964	0,175
Tyr	-0,19	0,4	0,188	0,93	0,955	0,911	0,878	0,945	0,951	0,91	0,913	0,856	0,94	0,941	0,74	0,921	0,971	1	0,873	0,957	0,216
Trp	-0,23	0,273	0,081	0,771	0,795	0,782	0,745	0,773	0,854	0,847	0,71	0,734	0,819	0,761	0,65	0,821	0,84	0,873	1	0,883	0,162
Phe	-0,39	0,257	0,033	0,929	0,926	0,95	0,936	0,901	0,982	0,919	0,812	0,734	0,899	0,866	0,757	0,933	0,964	0,957	0,883	1	0,04
Gaba	0,697	0,665	0,731	0,168	0,283	0,007	0,069	0,335	0,094	0,082	0,393	0,464	0,369	0,319	0,01	0,232	0,175	0,216	0,162	0,04	1

Tabelle 5.2: Pearson Korrelationskoeffizienten aller Aminosäuren des Wildtyps gewachsen mit 12 mM Kaliumnitrat untereinander. Die Tabelle unterliegt einer Farbkodierung. Dunkelblau unterlegt sind sehr gute/starke positive Korrelationen, türkis unterlegt sind gute/starke positive Korrelationen und hellblau unterlegt sind moderate positive Korrelationen.

Alle „kleinen“ Aminosäuren und die Hauptaminosäuren Glutamin, Glycin, Serin und Alanin zeigen sehr gute bis gute Korrelationen zueinander, sie ändern also ihre Konzentrationen parallel zueinander. Aspartat, Asparagin, Glutamat und Gaba verhalten sich komplett unabhängig zueinander und zu den anderen Aminosäuren. Diese außergewöhnlich guten Korrelationen im Normalzustand können andeuten, dass eine koordinierte Biosynthese der meisten Aminosäuren und im Besonderen der kleinen Aminosäuren besteht. Dies spiegelt die ähnlichen diurnalen Muster der Aminosäuren wider, die in den Abbildungen 5.7 (Glutamin) bis 5.13 des *Kapitels 5.2.1* beobachtet werden konnten.

Korrelationen der Aminosäuren der Genotypen eines reduzierten Stickstoffstatus unter diurnalen Aspekten

Tabelle 5.3 zeigt die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der Aminosäuren des Wildtyps mit ausreichender Stickstoffversorgung zu den Genotypen mit Stickstoffmangel oder reduzierter Stickstoffassimilation (F23xNia30(145), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ und Wildtyp und Nia30(145) gewachsen mit 0.2 mM KNO₃).

	Asp	Asn	Glu	Gln	Ser	Gly	Ala	Thr	Met	Ile	Lys	His	Cit	Arg	Orn	Val	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gaba
Asp	1	0,806	0,867	0,502	0,683	0,417	0,51	0,534	0,448	-0	0,439	0,61	0,62	0,484	0,566	0,488	0,425	0,463	0,398	0,38	0,766
Asn	0,806	1	0,721	0,79	0,789	0,713	0,717	0,761	0,727	0,323	0,684	0,844	0,864	0,798	0,705	0,743	0,74	0,735	0,668	0,667	0,697
Glu	0,867	0,721	1	0,529	0,772	0,542	0,632	0,615	0,566	0,134	0,519	0,599	0,644	0,529	0,618	0,589	0,497	0,551	0,429	0,51	0,838
Gln	0,502	0,79	0,529	1	0,818	0,918	0,837	0,869	0,93	0,607	0,788	0,915	0,903	0,948	0,707	0,909	0,938	0,916	0,828	0,895	0,49
Ser	0,683	0,789	0,772	0,818	1	0,89	0,937	0,884	0,878	0,495	0,747	0,832	0,875	0,814	0,762	0,858	0,797	0,871	0,756	0,864	0,695
Gly	0,417	0,713	0,542	0,918	0,89	1	0,959	0,903	0,955	0,645	0,745	0,854	0,884	0,895	0,736	0,914	0,906	0,939	0,834	0,971	0,449
Ala	0,51	0,717	0,632	0,837	0,937	0,959	1	0,888	0,898	0,559	0,696	0,81	0,852	0,807	0,733	0,878	0,818	0,89	0,785	0,939	0,525
Thr	0,534	0,761	0,615	0,869	0,884	0,903	0,888	1	0,894	0,537	0,831	0,878	0,911	0,861	0,675	0,885	0,904	0,925	0,819	0,884	0,548
Met	0,448	0,727	0,566	0,93	0,878	0,955	0,898	0,894	1	0,628	0,811	0,868	0,908	0,918	0,774	0,933	0,943	0,948	0,831	0,948	0,524
Ile	-0	0,323	0,134	0,607	0,495	0,645	0,559	0,537	0,628	1	0,495	0,561	0,519	0,656	0,392	0,608	0,646	0,636	0,604	0,64	0,099
Lys	0,439	0,684	0,519	0,788	0,747	0,745	0,696	0,831	0,811	0,495	1	0,804	0,856	0,849	0,635	0,816	0,866	0,832	0,692	0,729	0,573
His	0,61	0,844	0,599	0,915	0,832	0,854	0,81	0,878	0,868	0,561	0,804	1	0,92	0,924	0,75	0,853	0,885	0,906	0,827	0,833	0,573
Cit	0,62	0,864	0,644	0,903	0,875	0,884	0,852	0,911	0,906	0,519	0,856	0,92	1	0,917	0,754	0,889	0,927	0,902	0,828	0,849	0,622
Arg	0,484	0,798	0,529	0,948	0,814	0,895	0,807	0,861	0,918	0,656	0,849	0,924	0,917	1	0,696	0,901	0,949	0,922	0,816	0,867	0,513
Orn	0,566	0,705	0,618	0,707	0,762	0,736	0,733	0,675	0,774	0,392	0,635	0,75	0,754	0,696	1	0,723	0,706	0,763	0,645	0,727	0,558
Val	0,488	0,743	0,589	0,909	0,858	0,914	0,878	0,885	0,933	0,608	0,816	0,853	0,889	0,901	0,723	1	0,919	0,913	0,81	0,898	0,573
Leu	0,425	0,74	0,497	0,938	0,797	0,906	0,818	0,904	0,943	0,646	0,866	0,885	0,927	0,949	0,706	0,913	1	0,94	0,84	0,885	0,463
Tyr	0,463	0,735	0,551	0,916	0,871	0,939	0,89	0,926	0,948	0,636	0,832	0,906	0,902	0,922	0,763	0,913	0,94	1	0,871	0,954	0,507
Trp	0,398	0,668	0,429	0,828	0,756	0,834	0,785	0,819	0,831	0,604	0,692	0,827	0,828	0,816	0,645	0,81	0,84	0,871	1	0,864	0,403
Phe	0,38	0,667	0,51	0,895	0,864	0,971	0,939	0,884	0,948	0,64	0,729	0,833	0,849	0,867	0,727	0,896	0,885	0,954	0,864	1	0,437
Gaba	0,766	0,697	0,838	0,49	0,695	0,449	0,525	0,548	0,524	0,099	0,573	0,573	0,622	0,513	0,558	0,573	0,463	0,507	0,403	0,437	1

Tabelle 5.3: Pearson Korrelationskoeffizient aller Aminosäuren in Stickstoffmangelzuständen (F23xNia30(145), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃, Wildtyp und Nia30(145) gewachsen mit 0.2 mM KNO₃) und des Wildtyps mit ausreichender Nitratversorgung (Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO₃) untereinander. Die Tabelle unterliegt einer Farbkodierung. Dunkelblau unterlegt sind sehr gute/starke positive Korrelationen, türkis unterlegt sind gute/starke positive Korrelationen und hellblau unterlegt sind moderate positive Korrelationen.

Sobald sich die Tabakpflanzen in einer Situation von Stickstoffmangel befinden, ändern sich die sehr guten positiven Korrelationen der kleinen Aminosäuren untereinander zu meist schwächeren aber immer noch guten positiven Korrelationen, d.h. sie ändern ihre Konzentrationen immer noch in der gleichen Weise zueinander, jedoch mit wesentlich geringerer Signifikanz. Die Korrelationen von Lysin zu den anderen „kleinen“ Aminosäuren zeigen keine sehr guten Korrelationen mehr. Isoleucin zeigt nur noch eine moderate Korrelation zu den anderen „kleinen“ Aminosäuren. Die Korrelationen von Asparagin zu den „kleinen“ Aminosäuren verbessern sich sogar in Stickstoffmangelzuständen. In Tabelle 5.2 zeigt Asparagin moderate Korrelationen zu den „kleinen“ Aminosäuren, wogegen in Tabelle 5.3 sich hauptsächlich gute Korrelationen zeigen. Diesen Trend erkennt man ebenfalls bei Aspartat und Glutamat (Tabelle 5.2 und 5.3). Die Korrelationen von Histidin zu Citrullin, Arginin und Glutamin verbessern sich ebenfalls, sobald sich der Stickstoffstatus der Pflanzen reduziert. Diese Tatsache ist sehr interessant, da Histidin aus Glutamin hervorgeht und die einzige Aminosäure ist, für deren Biosynthese eine Koordination mit anderen Aminosäurebiosynthesewegen bewiesen werden konnte (Guyer et al. 1995). Chemisch verwandte Aminosäurefamilien zeigen unter Stickstoffmangel keine eindeutigen Korrelationen zueinander im Vergleich zu allen anderen, wobei dies zum Teil auch nicht zu erwarten war. Betrachtet man die Familie der aromatischen Aminosäuren zeigt sich, dass Phenylalanin und Tyrosin sehr gut miteinander korrelieren, nicht aber mit Tryptophan. Dies gilt sowohl für den Kontrollzustand (Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO₃), als auch in Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus. In der Einleitung *Kapitel 3.4* wurde gezeigt, dass diese beiden Synthesewege miteinander konkurrieren. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse stellen diesbezüglich eine Bestätigung dar. Im Zusammenhang mit der übergeordneten Fragestellung nach einer koordinierten Aminosäurebiosynthese zeigt die Korrelationsanalyse der Aminosäuren in Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus, dass eine eventuell vorhandene generelle Biosynthese unter Stickstoffmangelbedingungen nicht stabil ist.

5.2.2.3 Verhalten der Aminosäuren in Kohlenhydratmangelzuständen

Mit Hilfe der Korrelationsanalyse soll auch hier die Frage diskutiert werden, ob die „kleinen“ Aminosäuren ihre Konzentrationen sowohl im Normalzustand, als auch unter Kohlenhydratmangel parallel ändern.

Korrelationen der Aminosäuren der Wildtypen mit sehr guten Kohlenstoffstatus

In diesem Experiment wurden zwei verschiedene Wildtypen verwendet. Der genetische Hintergrund der anti-*rbcS* Mutanten stammt aus dem untransformierter Wildtyp *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 und die Kohlenstofflimitierung über reduzierte Lichtstärke wurde mit dem Wildtyp *Nicotiana tabacum* L. cv. SNN durchgeführt. Durch eine PCA-Analyse wurde sichergestellt, dass die Wildtypen miteinander vergleichbar sind. Es konnte in dieser Analyse keine Trennung zwischen SR1 und SNN festgestellt werden (*PCA-Daten nicht gezeigt*).

Tabelle 5.4 zeigt die Korrelationen aller individuellen Aminosäuren beider Wildtypen untereinander. Es zeigt sich, dass Pflanzen mit gutem Kohlenstoffstatus die Verhältnisse der meisten „kleinen“ Aminosäuren in gleicher Weise zueinander ändern (Tabelle 5.4). Histidin, Citrullin und Gaba zeigen keine besonders guten Korrelationen zu den anderen Aminosäuren. Lysin zeigt lediglich gute Korrelationen sowohl zu Asparagin und Arginin als auch zu den nächsten Mitgliedern der Aspartatfamilie Threonin und Isoleucin, nicht aber zu Methionin. Während Lysin, Threonin und Isoleucin die gleichen Enzyme dieses Biosyntheseweges über einen Feedback-Regulationsmechanismus inhibieren, verfügt Methionin über einen weiteren und separaten Regulationsmechanismus, indem es die Cystathioninsynthese inhibiert (*siehe Einleitung*). Andere chemisch verwandte Aminosäurefamilien zeigen keine auffälligen Korrelationen zueinander.

	Asp	Asn	Glu	Gln	Ser	Gly	Ala	Thr	Met	Ile	Lys	His	Cit	Arg	Val	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gaba
Asp	1	0,224	0,95	-0,12	0,674	0,518	0,404	0,46	0,567	0,461	0,178	-0,56	0,036	-0,01	0,323	0,334	0,838	0,55	0,741	0,433
Asn	0,224	1	0,422	0,899	0,82	0,869	0,817	0,922	0,689	0,82	0,725	0,297	0,307	0,879	0,841	0,952	0,547	0,892	0,676	-0,3
Glu	0,95	0,422	1	0,099	0,837	0,716	0,621	0,864	0,736	0,649	0,35	-0,41	0,233	0,222	0,537	0,542	0,95	0,718	0,884	0,27
Gln	-0,12	0,899	0,099	1	0,603	0,73	0,815	0,729	0,599	0,728	0,514	0,527	0,37	0,817	0,879	0,877	0,317	0,699	0,489	-0,41
Ser	0,674	0,82	0,837	0,603	1	0,977	0,944	0,948	0,907	0,905	0,579	-0,07	0,45	0,638	0,882	0,907	0,919	0,965	0,967	-0,12
Gly	0,518	0,869	0,716	0,73	0,977	1	0,984	0,96	0,913	0,911	0,578	0,074	0,526	0,698	0,931	0,96	0,858	0,96	0,936	-0,27
Ala	0,404	0,917	0,621	0,815	0,944	0,984	1	0,959	0,904	0,91	0,625	0,192	0,559	0,787	0,971	0,986	0,784	0,949	0,885	-0,28
Thr	0,46	0,922	0,664	0,729	0,948	0,96	0,959	1	0,795	0,967	0,712	0,09	0,418	0,82	0,912	0,937	0,769	0,962	0,848	-0,3
Met	0,567	0,689	0,736	0,599	0,907	0,913	0,904	0,795	1	0,708	0,381	0,01	0,659	0,519	0,849	0,864	0,881	0,857	0,952	-0,07
Ile	0,461	0,92	0,649	0,728	0,905	0,911	0,91	0,967	0,708	1	0,754	0,165	0,273	0,818	0,91	0,895	0,738	0,903	0,791	-0,2
Lys	0,178	0,725	0,35	0,514	0,579	0,578	0,625	0,712	0,381	0,754	1	0,506	0,423	0,764	0,664	0,594	0,426	0,541	0,415	-0,31
His	-0,56	0,297	-0,41	0,527	-0,07	0,074	0,192	0,09	0,01	0,165	0,506	1	0,4	0,396	0,34	0,224	-0,2	-0,09	-0,16	-0,43
Cit	0,036	0,307	0,233	0,37	0,45	0,526	0,559	0,418	0,659	0,273	0,423	0,4	1	0,326	0,486	0,49	0,458	0,361	0,504	-0,49
Arg	-0,01	0,879	0,222	0,817	0,638	0,698	0,787	0,82	0,519	0,818	0,764	0,396	0,326	1	0,823	0,787	0,359	0,722	0,481	-0,3
Val	0,323	0,841	0,537	0,879	0,882	0,931	0,971	0,912	0,849	0,91	0,664	0,34	0,486	0,823	1	0,974	0,706	0,888	0,808	-0,2
Leu	0,334	0,952	0,542	0,877	0,907	0,96	0,966	0,937	0,864	0,895	0,594	0,224	0,49	0,787	0,974	1	0,705	0,942	0,83	-0,31
Tyr	0,838	0,547	0,95	0,317	0,919	0,858	0,784	0,769	0,881	0,738	0,426	-0,2	0,458	0,359	0,706	0,705	1	0,8	0,972	0,08
Trp	0,55	0,892	0,718	0,699	0,965	0,96	0,949	0,962	0,857	0,903	0,541	-0,09	0,361	0,722	0,888	0,942	0,8	1	0,897	-0,17
Phe	0,741	0,676	0,884	0,489	0,967	0,936	0,885	0,848	0,952	0,791	0,415	-0,16	0,504	0,481	0,808	0,83	0,972	0,897	1	-0,01
Gaba	0,433	-0,3	0,27	-0,41	-0,12	-0,27	-0,28	-0,3	-0,07	-0,2	-0,31	-0,43	-0,49	-0,3	-0,2	-0,31	0,08	-0,17	-0,01	1

Tabelle 5.4: Pearson Korrelationskoeffizienten aller Aminosäuren der Wildtypen SR1 und SNN mit gutem Kohlenstoffstatus untereinander. Die Tabelle unterliegt einer Farbkodierung. Dunkelblau unterlegt sind sehr gute/starke positive Korrelationen, türkis unterlegt sind gute/starke positive Korrelationen und hellblau unterlegt sind moderate positive Korrelationen.

Ein Vergleich der Korrelationsanalyse des Normalzustandes des vorangegangenen *Kapitels* 5.2.2.2 bestätigt die sehr guten positiven Korrelationen der meisten kleinen Aminosäuren zueinander. Abweichungen zeigt z.B. Glutamin. Während der Wildtyp Gatersleben des *Kapitels* 5.2.2.2 sehr gute positive Korrelationen zu den meisten anderen Aminosäuren zeigt, finden wir in den Wildtypen SR 1 und SNN lediglich gute Korrelationen wieder. Asparagin dagegen zeigt im Wildtyp Gatersleben hauptsächlich gute Korrelationen, die sich in den Wildtypen SR 1 und SNN zum Teil zu sehr guten Korrelationen ändern. Maßgeblicher Unterschied zwischen diesen beiden Datensätzen ist die diurnale Analyse der Aminosäuren des Wildtyp Gatersleben und die Betrachtung lediglich eines Tageszeitpunktes der beiden anderen Wildtypen SR1 und SNN. Es besteht die Möglichkeit, dass dadurch eine nicht 100%ige Reproduzierbarkeit der in *Kapitel* 5.2.2.2 Tabelle 5.2 dargestellten Korrelationen zustande kommt.

Es kann ausgeschlossen werden, dass diese geringfügigen Unterschiede auf Grund der unterschiedlichen Wildtypen zustande kommt, da der Wildtyp Gatersleben in oben genannte PCA-Analyse miteinbezogen wurde und alle Wildtypen (Gatersleben, SR1 und SNN) nicht signifikant voneinander getrennt werden konnten (*siehe oben, PCA-Analyse nicht gezeigt*). Die leichten Unterschiede sind wahrscheinlich Ergebnis der biologischen Variabilität der Proben.

Ausgehend von der Ergebnisse dieser Korrelationsanalyse kann die Aussage des vorangegangenen Kapitels, dass es eine koordinierte Biosynthese der „kleinen“ Aminosäuren unter optimalen Bedingungen existiert, bestätigt werden.

Korrelationen der Aminosäuren der Pflanzen mit reduziertem Kohlenstoffstatus

Tabelle 5.5 zeigt die Korrelationen aller individuellen Aminosäuren des Wildtyps SR1, der Rubisco antisense Genotypen, des Wildtyps SNN unter optimalen (400 μ E) und suboptimalen Lichtbedingungen (150 und 80 μ E).

Die Analyse zeigt deutlich, dass sich in Kohlenhydratmangelzuständen die Korrelationen vieler Aminosäuren untereinander verschlechtern. In den meisten Fällen ändern sich sehr guten Korrelationen zu guten Korrelationen (Tabelle 5.4 und 5.5). Tryptophan z.B. zeigt keinerlei Korrelation zu irgendeiner anderen Aminosäure. Die Korrelationen von Lysin und Histidin zu den anderen Aminosäuren dagegen verbessern sich im Kohlenhydratmangelzustand (Tabelle 5.5). Interessanterweise zeigt auch hier Histidin unter Kohlenhydratmangelbedingungen verbesserte Korrelationen zu Glutamin, seiner Vorläuferaminosäure. Der gleiche Trend konnte schon bei Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus beobachtet werden (*Kapitel* 5.2.2.2 Tabelle 5.3). Generell kann festgestellt werden, dass unter Kohlenhydratmangelzuständen die Aminosäuren ihre Konzentrationen mit weit geringerer Signifikanz auf die gleiche Weise zueinander ändern.

	Asp	Asn	Glu	Gln	Ser	Gly	Ala	Thr	Met	Ile	Lys	His	Cit	Arg	Val	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gaba
Asp	1	0,093	0,827	-0,25	0,569	0,286	0,386	0,434	0,4	0,39	0,048	-0,25	0,29	0,352	0,159	0,146	0,484	0,195	0,558	0,317
Asn	0,093	1	0,49	0,762	0,676	0,789	0,793	0,742	0,685	0,821	0,725	0,567	0,329	0,748	0,859	0,878	0,66	0,155	0,648	0,382
Glu	0,827	0,49	1	0,208	0,873	0,653	0,791	0,733	0,78	0,706	0,511	0,201	0,451	0,737	0,591	0,596	0,821	0,235	0,86	0,595
Gln	-0,25	0,762	0,208	1	0,47	0,742	0,685	0,638	0,676	0,709	0,751	0,729	0,312	0,604	0,848	0,865	0,568	0,083	0,464	0,22
Ser	0,569	0,676	0,873	0,47	1	0,849	0,905	0,788	0,885	0,798	0,649	0,356	0,56	0,772	0,756	0,805	0,879	0,267	0,949	0,463
Gly	0,286	0,789	0,653	0,742	0,849	1	0,906	0,826	0,878	0,864	0,687	0,449	0,437	0,66	0,864	0,943	0,903	0,252	0,877	0,327
Ala	0,386	0,793	0,791	0,685	0,905	0,906	1	0,863	0,92	0,849	0,757	0,559	0,516	0,88	0,871	0,934	0,879	0,294	0,898	0,605
Thr	0,434	0,742	0,733	0,638	0,788	0,826	0,863	1	0,766	0,862	0,65	0,488	0,424	0,824	0,783	0,843	0,749	0,314	0,764	0,501
Met	0,4	0,685	0,78	0,676	0,885	0,878	0,92	0,766	1	0,823	0,747	0,516	0,509	0,763	0,871	0,88	0,925	0,145	0,909	0,477
Ile	0,39	0,821	0,706	0,709	0,798	0,864	0,849	0,862	0,823	1	0,803	0,493	0,27	0,764	0,877	0,881	0,841	0,066	0,81	0,439
Lys	0,048	0,725	0,511	0,751	0,649	0,687	0,757	0,65	0,747	0,803	1	0,697	0,422	0,79	0,845	0,807	0,721	0,014	0,617	0,465
His	-0,25	0,567	0,201	0,729	0,356	0,449	0,559	0,488	0,516	0,493	0,697	1	0,285	0,628	0,589	0,618	0,394	-0,12	0,326	0,473
Cit	0,29	0,329	0,451	0,312	0,56	0,437	0,516	0,424	0,509	0,27	0,422	0,285	1	0,522	0,481	0,444	0,415	0,336	0,417	0,078
Arg	0,352	0,748	0,737	0,604	0,772	0,66	0,88	0,824	0,763	0,764	0,79	0,628	0,522	1	0,785	0,785	0,667	0,269	0,692	0,667
Val	0,159	0,859	0,591	0,848	0,756	0,864	0,871	0,783	0,871	0,877	0,845	0,589	0,481	0,785	1	0,936	0,789	0,18	0,734	0,345
Leu	0,146	0,878	0,596	0,865	0,805	0,943	0,934	0,843	0,88	0,881	0,807	0,618	0,444	0,785	0,936	1	0,839	0,245	0,813	0,451
Tyr	0,484	0,66	0,821	0,568	0,879	0,903	0,879	0,749	0,925	0,841	0,721	0,394	0,415	0,667	0,789	0,839	1	0,183	0,952	0,5
Trp	0,195	0,155	0,235	0,083	0,267	0,252	0,294	0,314	0,145	0,066	0,014	-0,12	0,336	0,269	0,18	0,245	0,183	1	0,203	0,141
Phe	0,558	0,648	0,86	0,464	0,949	0,877	0,898	0,764	0,909	0,81	0,617	0,326	0,417	0,692	0,734	0,813	0,952	0,203	1	0,537
Gaba	0,317	0,382	0,595	0,22	0,463	0,327	0,605	0,501	0,477	0,439	0,465	0,473	0,078	0,667	0,345	0,451	0,5	0,141	0,537	1

Tabelle 5.5: Pearson Korrelationskoeffizienten aller Aminosäuren des Wildtyps SR1 und der Rubisco antisense Pflanzen sowie des Wildtyps SNN gewachsen mit 400 μ E und gewachsen unter suboptimalen Lichtbedingungen (150 μ E und 80 μ E). Die Tabelle unterliegt einer Farbkodierung. Dunkelblau unterlegt sind sehr gute/starke positive Korrelationen, türkis unterlegt sind gute/starke positive Korrelationen und hellblau unterlegt sind moderate positive Korrelationen

Im Zusammenhang zur übergeordneten Fragestellung nach einer koordinierten Aminosäurebiosynthese zeigt die Korrelationsanalyse der Aminosäuren in Pflanzen mit reduziertem Kohlenstoffstatus, dass eine eventuell koordinierte Biosynthese unter Kohlenstoffmangelbedingungen nicht stabil ist.

5.2.2.4 Verhalten der Aminosäuren in Stickstoff- und Kohlenhydratmangelzuständen zusammen

Um einerseits den Vergleich der beiden Datensätze aus Kapitel 5.2.2.2 und 5.2.2.3 leichter zu machen und andererseits weiterhin die Fragestellung, ob es eine stabile koordinierte Aminosäurebiosynthese gibt, diskutieren zu können, wurden beide Datensätze kombiniert.

Tabelle 5.6 zeigt die Korrelationen der Aminosäuren aller Wildtypen (Gatersleben, SR 1 und SNN), der Rubisco antisense Pflanzen, der Pflanzen gewachsen unter suboptimalen Lichtbedingungen (150 und 80 μ E), der Nitratmangel ernährten Wildtypen (Gatersleben), der Transformanten mit moderat reduzierter Nitratreduktase Aktivität (F23xNia30(145)) und der Transformante mit stark reduzierter Nitratreduktase Aktivität in beiden Ernährungszuständen (Nia30(145) gewachsen mit 12 und 0.2 mM KNO_3). Da die Analyse der Aminosäuren des kohlenstoffbasierten Datensatzes in der zweiten Hälfte der Lichtperiode stattfand, wurde aus dem stickstoffbasierten Datensatz in diese Korrelationsanalyse nur die Aminosäuren eines vergleichbaren Tageszeitpunktes mit einbezogen.

	Asp	Asn	Glu	Gln	Ser	Gly	Thr	Met	Ile	Lys	His	Cit	Arg	Ala	Val	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gaba
Asp	1	0.724	0.676	0.501	0.732	0.616	0.658	0.702	0.455	0.474	0.318	0.635	0.592	0.729	0.625	0.571	0.714	0.324	0.737	0.0926
Asn	0.724	1	0.471	0.889	0.757	0.828	0.748	0.873	0.649	0.718	0.644	0.726	0.787	0.866	0.909	0.878	0.774	0.326	0.79	0.0786
Glu	0.676	0.471	1	0.206	0.869	0.651	0.264	0.558	0.607	0.651	0.067	0.596	0.442	0.74	0.474	0.363	0.817	0.328	0.809	0.6393
Gln	0.501	0.889	0.206	1	0.531	0.776	0.804	0.86	0.597	0.6	0.804	0.591	0.798	0.757	0.913	0.938	0.596	0.245	0.618	-0.133
Ser	0.732	0.757	0.869	0.531	1	0.845	0.43	0.778	0.71	0.813	0.28	0.805	0.586	0.898	0.718	0.619	0.944	0.399	0.947	0.5079
Gly	0.616	0.828	0.651	0.776	0.845	1	0.677	0.892	0.821	0.736	0.515	0.691	0.72	0.93	0.87	0.875	0.874	0.385	0.901	0.2169
Thr	0.658	0.748	0.264	0.804	0.43	0.677	1	0.75	0.523	0.312	0.764	0.408	0.848	0.694	0.774	0.875	0.44	0.279	0.533	-0.293
Met	0.702	0.873	0.558	0.86	0.778	0.892	0.75	1	0.725	0.721	0.639	0.739	0.839	0.902	0.934	0.918	0.831	0.313	0.868	0.1279
Ile	0.455	0.649	0.607	0.597	0.71	0.821	0.523	0.725	1	0.636	0.409	0.506	0.659	0.773	0.741	0.7	0.742	0.22	0.777	0.2844
Lys	0.474	0.718	0.651	0.6	0.813	0.736	0.312	0.721	0.636	1	0.37	0.748	0.569	0.766	0.721	0.597	0.852	0.245	0.768	0.5463
His	0.318	0.644	0.067	0.804	0.28	0.515	0.764	0.639	0.409	0.37	1	0.336	0.766	0.57	0.68	0.768	0.313	0.015	0.362	-0.202
Cit	0.635	0.726	0.596	0.591	0.805	0.691	0.408	0.739	0.506	0.748	0.336	1	0.584	0.758	0.716	0.598	0.796	0.46	0.762	0.2907
Arg	0.592	0.787	0.442	0.798	0.586	0.72	0.848	0.839	0.659	0.569	0.766	0.584	1	0.811	0.845	0.883	0.577	0.334	0.653	0.0374
Ala	0.729	0.866	0.74	0.757	0.898	0.93	0.694	0.902	0.773	0.766	0.57	0.758	0.811	1	0.878	0.848	0.896	0.419	0.937	0.3086
Val	0.625	0.909	0.474	0.913	0.718	0.87	0.774	0.934	0.741	0.721	0.68	0.716	0.845	0.878	1	0.938	0.771	0.336	0.798	0.0752
Leu	0.571	0.878	0.363	0.938	0.619	0.875	0.875	0.918	0.7	0.597	0.768	0.598	0.883	0.848	0.938	1	0.663	0.33	0.729	-0.064
Tyr	0.714	0.774	0.817	0.596	0.944	0.874	0.44	0.831	0.742	0.852	0.313	0.796	0.577	0.896	0.771	0.663	1	0.369	0.966	0.5058
Trp	0.324	0.326	0.328	0.245	0.399	0.385	0.279	0.313	0.22	0.245	0.015	0.46	0.334	0.419	0.336	0.33	0.369	1	0.381	0.1584
Phe	0.737	0.79	0.809	0.618	0.947	0.901	0.533	0.868	0.777	0.768	0.362	0.762	0.653	0.937	0.798	0.729	0.965	0.381	1	0.4189
Gaba	0.093	0.079	0.639	-0.13	0.508	0.217	-0.29	0.128	0.284	0.546	-0.2	0.291	0.037	0.309	0.075	-0.06	0.506	0.158	0.419	1

Tabelle 5.6: Pearson Korrelationskoeffizienten aller Aminosäuren aller Genotypen des kohlenstoffbasierten Datensatzes aus Kapitel 5.2.2.3 und aller Genotypen des stickstoffbasierten Datensatzes zu einem vergleichbaren Tageszeitpunkt aus Kapitel 5.2.2.2. Die Tabelle unterliegt einer Farbkodierung. Dunkelblau unterlegt sind sehr gute/starke positive Korrelationen, türkis unterlegt sind gute/starke positive Korrelationen und hellblau unterlegt sind moderate positive Korrelationen

Allgemein gesehen zeigt die Tabelle 5.6 wenig sehr gute Korrelationen. Phenylalanin z.B. zeigt sehr gute Korrelationen zu Glycin, Serin, Alanin und Tyrosin. Es besteht hier also die Möglichkeit, dass die Biosynthese dieser Aminosäuren über einen ähnlichen Regulationsmechanismus gesteuert wird. Methionin aus der Aspartatfamilie zeigt auffällig gute Korrelationen zu Alanin, Valin und Leucin, d.h. Aminosäuren, die aus Pyruvat hervorgehen. Zu den anderen Mitgliedern der Aspartatfamilie zeigt Methionin lediglich Korrelationen um 0.72. Leucin und Alanin zeigen eine sehr gute Korrelation zueinander. Dies zeigt sich auch in Kohlenhydratmangelbedingungen (Tab. 5.5) und in Stickstoffmangelbedingungen (Tab. 5.3). Es scheint, dass die Verhältnisse dieser beiden Aminosäuren, die beide aus Pyruvat hervorgehen, meistens stabil sind. Tyrosin zeigt in allen experimentellen Gruppen und Genotypen stets eine sehr gute Korrelation zu seinem Familienmitglied Phenylalanin. Wie oben bereits spekuliert, kann dieses außergewöhnlich stabile Verhältnis zwischen Tyrosin und Phenylalanin daher rühren, dass ihre Biosynthese koordiniert abläuft bzw. über die gleichen Regulationsmechanismen abläuft. Beide Aminosäuren werden im ersten Schritt über das Enzym Chorismatmutase synthetisiert und beide haben starke inhibierende Wirkung auf dieses Enzym (siehe Einleitung). Phenylalanin ist in den meisten Pflanzenspezies Ausgangsprodukt des Phenylpropanoidstoffwechsels. In manchen monokotylen Spezies dient auch Tyrosin über die Desaminierung durch TAL (Tyrosin-Ammonium-Lyase) zu p-Coumarsäure dazu. 20% des fixierten Kohlenstoffs fließen in den Shikimatweg und von dort fließt Kohlenstoff in den Phenylpropanoidstoffwechsel, aus welchem die Ligninvorstufen hervorgehen. Lignin kommt z.B. in den Leitgeweben vor und stellt neben Zellulose das am häufigsten vorkommende Biopolymer dar (Bate et al. 1994). Diese Tatsache könnte ein weiteres Indiz sein, warum diese beiden Aminosäuren eventuell einer streng koordinierten Biosynthese unterliegen.

Die Hauptaminosäuren zeigen ein heterogenes Verhalten zu den anderen Aminosäuren. Asparagin, Serin, Glycin und Alanin zeigen eher gute Korrelationen zu allen anderen Aminosäuren. Glutamat und Aspartat dagegen zeigen sich in den meisten Fällen unabhängig. Glutamin z.B. zeigt keinerlei Korrelation zu den aromatischen Aminosäuren und zu Glutamat. Dies ist konstant für alle gezeigten Korrelationsanalysen (Tab. 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 und 5.6). Er-

staunlicherweise zeigen Glutamin und Glutamat nur in den Stickstoffmangelbedingungen eine moderate positive Korrelation zueinander (Tab. 5.3).

Die sehr guten Korrelationen der „kleinen“ Aminosäuren unter Kontrollbedingungen (Tab. 5.2 und Tab. 5.4) sind nicht stabil sobald die Pflanzen unter Mangelbedingungen wachsen. Auch zeigen die einzelnen Aminosäurefamilien keine besonders auffällige Korrelation untereinander. Threonin z.B. zeigt keine durchgängig gute Korrelation zu Methionin, Lysin oder Isoleucin; Histidin, Citrullin und Arginin ebenfalls. Tryptophan zeigt auch keine besonders auffälligen Korrelationen zu den anderen aromatischen Aminosäuren. Dies könnte die Folge konkurrierender Biosynthesewege sein (*siehe oben*).

In allen vorgestellten Versuchbedingungen sind es oft die gleichen kleinen Aminosäuren, deren Korrelationen selten sehr gut und meist nur moderat zu den anderen Aminosäuren sind. Das sind vor allem Isoleucin, Histidin, Citrullin, Arginin, Tryptophan und Gaba.

Valin, Leucin, Methionin und Tyrosin dagegen zeigen immer wieder die besten Korrelationen zu den anderen „kleinen“ Aminosäuren.

FAZIT

- Die Hauptkomponentenanalyse der Aminosäuren trennt Genotypen, Mangelbedingungen und tageszeitliche Änderungen voneinander. Unter den Aminosäuren, die einen eigenschaftsbestimmenden Einfluss haben sind auch die kleinen Aminosäuren Phenylalanin und Threonin sowohl für Stickstoff- und Kohlenstoffmangelbedingungen. Isoleucin hat einen trennenden Einfluss im stickstoffbasierten Datensatz. Trennende Eigenschaften besitzen auch die Hauptaminosäuren Glutamat, Glutamin, Aspartat und Glycin.
- Die Korrelationsanalyse der diurnalen Änderungen von Aminosäuren unter Normalbedingungen zeigt sehr gute bis gute positive Korrelationen aller kleinen Aminosäuren untereinander und von Glutamin, Glycin, Serin und Alanin.
- Unter Stickstoff- und Kohlenstoffmangelbedingungen verschlechtern sich diese stabilen Korrelationen signifikant.
- Es gibt jedoch immer wiederkehrende Muster. Besonders schlechte Korrelationen zu den anderen Aminosäuren zeigen in allen Mangelbedingungen Tryptophan, Gaba, Isoleucin, Lysin und Citrullin. Sie verhalten sich zwar im Vergleich zwischen Nitrat- und Kohlenstoffmangel leicht unterschiedlich, zeigen aber insgesamt betrachtet in keinem Mangelzustand besonders gute Korrelationen.
- Methionin, Tyrosin und Phenylalanin zeigen in allen Mangelzuständen die besten Korrelationen zu den anderen Aminosäuren.
- Glutamat zeigt sich in den meisten Fällen unabhängig zu allen anderen Aminosäuren.
- Die Hauptkomponentenanalyse und die Korrelationsanalyse geben widersprüchliche Hinweise. Das zeigt das Beispiel Phenylalanin. Während die PCA-Analyse Phenylalanin als trennenden Faktor identifiziert und damit andeutet, dass diese Aminosäure keiner generellen Kontrolle unterliegt, zeigt Phenylalanin in der Korrelationsanalyse generell eher gute Korrelationen zu allen anderen Aminosäuren und insbesondere zu Tyrosin. Das wiederum deutet an, dass Phenylalanin mit der Biosynthese anderer

Aminosäuren koordiniert ist. Doch wie einleitend schon festgestellt, ist die Korrelationsanalyse eine statistische Methode, die lediglich Hinweise über starke Assoziationen gibt aber nichts über eine biologische Relevanz aussagt.

5.2.2.5 Verhalten der Aminosäuren in Abhängigkeit des Gesamtamino-säuregehaltes

Mit Hilfe einer Verhältnisanalyse jeder einzelnen individuellen Aminosäure zum Gesamtaminosäuregehalt bzw. zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren sollen individuelle Verhaltensweisen oder wiederkehrende Muster einer einzelnen Aminosäure identifiziert werden. Die Verhältnisanalyse eignet sich besonders gut um aufzuzeigen, ob eine Aminosäure über alle Behandlungen hinweg ein stabiles Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt hat oder sich unabhängig zu den anderen Aminosäuren verhält. Wenn das Verhältnis einer individuellen Aminosäure konstant zum Gesamtaminosäuregehalt ist, zeigt die Darstellung eine horizontale Linie. Wenn sich der Anteil ändert, steigt oder fällt diese Linie. Dies ermöglicht eine sehr sensitive Visualisierung bezüglich Veränderungen einer speziellen Aminosäure relativ zu den anderen und kann Aufschluss im Zusammenhang mit der übergeordneten Fragestellung nach einer koordinierten Aminosäurebiosynthese geben. Außerdem kann ein unabhängiges Verhalten einer bestimmten Aminosäure einer spezifischen Ursache, wie z.B. tageszeitliche Abhängigkeiten, zugeordnet werden. Aus auflösungstechnischen Gründen werden die prozentualen Anteile der „kleinen“ Aminosäuren im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren berechnet und dargestellt. Die folgenden Kapitel diskutieren nur die Aminosäuren, die abweichende Effekte im Bezug zum Kontrollwildtyp zeigen und kein stabiles Verhalten entlang der Ordinatenachse.

Zuerst wird auf diurnale Effekte eingegangen, da diese in den dargestellten Graphen dieses Kapitels eine Streuung verursachen, die in der nachfolgenden Verhältnisanalyse des stickstoffbasierten Datensatzes dann nicht näher geklärt werden muss. Der Verhältnisanalyse des stickstoffbasierten Datensatzes folgt dann die des kohlenstoffbasierten Datensatzes.

5.2.2.5.1 Diurnale Effekte

Die diurnale Analyse des stickstoffbasierten Datensatzes ermöglicht, über die Verhältnisanalyse tageszeitlich abhängige Regulationen einer bestimmten Aminosäurebiosynthese zu identifizieren. Zur vereinfachten Darstellung wurden keine Unterscheidungen nach Genotypen vorgenommen, sondern lediglich Tag- und Nachtmessungen unterschieden. Werte, die in den Tagproben gemessen wurden, sind schwarz dargestellt und Werte, die in den Nachtproben gemessen wurden, weiß. Unterschiedliche Aminosäuregehalte bezüglich des diurnalen Rhythmus können auf regulierende Zucker zurückzuführen sein oder auf Effekte, die durch Licht direkt beeinflusst werden. Aufgrund des gewählten Zeitfensters von 4 Stunden kann mit dem stickstoffbasierten Datensatz nicht geklärt werden, welche dieser beiden Möglichkeiten eine regulatorische Rolle spielt. Reaktionen auf Lichtverhältnisse direkt sind meist kurzfristig zu beobachten, Ereignisse basierend auf veränderte Kohlenhydratgehalte sind meist längerfristig zu beobachten. Die Ergebnisse dieses Kapitels können somit nur mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen verglichen und diskutiert werden. Es wird voraus-

blickend darauf hingewiesen, dass die Graphen, die in diesem Abschnitt dargestellt sind zum Teil noch einmal im folgenden *Kapitel 5.2.2.5.2* mit einer farblichen Unterscheidung der Genotypen gezeigt werden.

Der Anteil an **Aspartat** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt zeigt eine klare Reaktion auf Licht. Während der Nacht sind die prozentualen Anteile an Aspartat um den Faktor 3 höher verglichen mit den Anteilen dieser Aminosäure während des Tages (Abb. 5.17). Eine tageszeitlich abhängige Aspartatsynthese zeigten auch schon die absoluten Aspartatgehalte auf. Diese waren während der Nacht in den Kontrollwildtypen signifikant höher als während des Tages. In *Kapitel 5.2.2.1* konnte mittels PCA des stickstoffbasierten Aminosäure Datensatzes Aspartat als trennende Aminosäure in Bezug auf tageszeitlich abhängige Faktoren identifiziert werden (siehe Abb. 5.15). Die PCA des kohlenstoffbasierten Aminosäure Datensatzes identifiziert Aspartat als trennende Aminosäure in Bezug auf Pflanzen, die in suboptimalen Lichtbedingungen gewachsen sind (siehe Abb. 5.16).

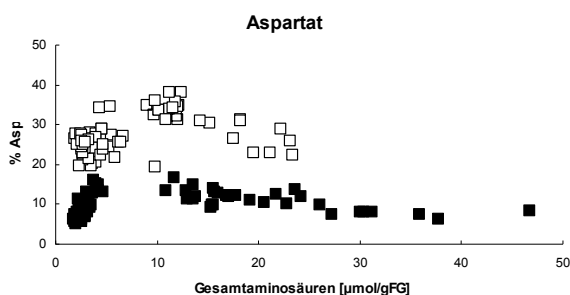


Abb. 5.17: Prozentualer Anteil von Aspartat im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Aufgetragen sind die Messwerte aller Genotypen. Wildtyp Gatersleben gewachsen in 12 und in 0.2 mM KNO₃, F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ und Nia30(145) gewachsen mit 12 und 0.2 mM KNO₃. Schwarz dargestellt sind die Tagwerte (■) und weiß die Nachtwerte (□).

Der Anteil an **Glycin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt ist eindeutig während des Tages höher (Abb. 5.18). Dieses Ergebnis wird auch durch die PCA-Analyse beider Datensätze bekräftigt. Im stickstoffbasierten Datensatz trägt Glycin dazu bei, Proben voneinander zu trennen, die entweder am Tag oder während der Nacht geerntet wurden (Abb. 5.15A und B). Im kohlenstoffbasierten Datensatz trägt Glycin dazu bei, Proben zu unterscheiden, die entweder bei optimaler oder suboptimaler Lichtqualität geerntet wurden (Abb. 5.17A und B). Für dieses Ergebnis gibt es zwei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: Für die Glycinsynthese gibt es in Pflanzen zwei Wege. Man unterscheidet den glykolytischen und den photorespiratorischen Weg, wobei der zweite der bevorzugte ist und die erhöhten Glycinanteile während des Tages bestätigen eine lichtabhängige bzw. die photorespiratorische Synthese. Eine andere Möglichkeit ergibt sich, wenn man in Betracht zieht, dass die Serinanteile stabil über den gesamten Tag hinweg sind (*Daten siehe Anhang*). Glycinkatabolismus während der Nacht könnte dazu dienen, die Serinanteile stabil zu halten. Sinha und Cossins lieferten bereits 1964 Hinweise darauf, dass der Bedarf an Glycin in nichtphotosynthetischen Geweben dazu dient, Serin zu produzieren.

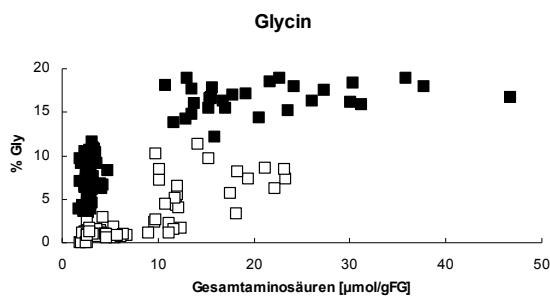


Abb. 5.18: Prozentualer Anteil von Glycin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Aufgetragen sind die Messwerte aller Genotypen. Wildtyp Gatersleben gewachsen in 12 und in 0.2 mM KNO₃, F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ und Nia30(145) gewachsen mit 12 und 0.2 mM KNO₃. Schwarz dargestellt sind die Tagwerte (■) und weiß die Nachtwerte (□).

Der Anteil an **Alanin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt ist während des Tages durchschnittlich um den Faktor 2 höher im Vergleich zur Nacht (Abb. 5.19). Auch bei der Alaninbiosynthese kann davon ausgegangen werden, dass entweder eine Lichtregulation stattfindet oder eine Regulation durch reduzierende Kohlenhydrate. Eine Korrelationsanalyse zwischen Alanin und den reduzierten Kohlenhydrate ergab eine moderat positive Korrelation von 0.63. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass niedrige Konzentrationen der Kohlenhydrate während der Nacht in Zusammenhang mit den reduzierten Alaninanteilen stehen.

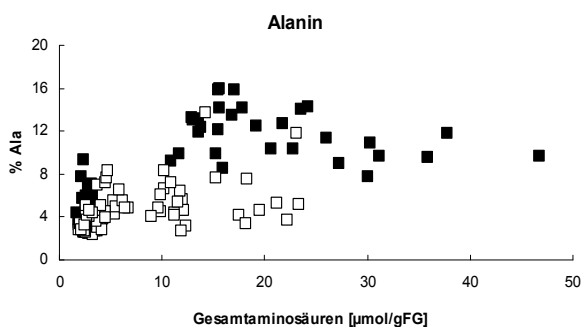


Abb. 5.19: Prozentualer Anteil von Alanin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Aufgetragen sind die Messwerte aller Genotypen. Wildtyp Gatersleben gewachsen in 12 und in 0.2 mM KNO₃, F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ und Nia30(145) gewachsen mit 12 und 0.2 mM KNO₃. Schwarz dargestellt sind die Tagwerte (■) und weiß die Nachtwerte (□).

Die einzige „kleine“ Aminosäure, die eine eindeutige Reaktion auf den Tag/Nacht-Zyklus zeigt, ist **Phenylalanin**. Der Anteil an Phenylalanin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren ist während des Tages durchschnittlich um den Faktor 3 höher als während der Nacht (Abb. 5.20). Abbildung 5.20 zeigt entlang der y-Achse deutlich zwei Cluster. Die oberen Datenpunkte gehören zu Genotypen mit hohem, die unteren Datenpunkte zu Genotypen mit niedrigem Stickstoffstatus. Dieses Ergebnis wird ausführlicher in *Kapitel 5.2.2.5.2* beschrieben.

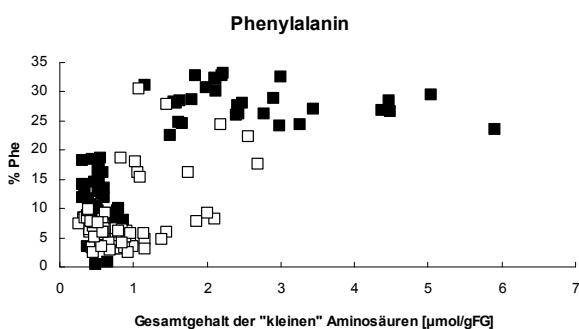


Abb. 5.20: Prozentualer Anteil von Phenylalanin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Aufgetragen sind die Messwerte aller Genotypen. Wildtyp Gatersleben gewachsen in 12 und in 0.2 mM KNO₃, F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ und Nia30(145) gewachsen mit 12 und 0.2 mM KNO₃. Schwarz dargestellt sind die Tagwerte (■) und weiß die Nachtwerte (□).

Die PCA des stickstoffbasierten Aminosäure Datensatzes identifizierte Phenylalanin als eine eigenschaftsbestimmende Aminosäure im Bezug auf tageszeitlich abhängige Faktoren (*siehe Kapitel 5.2.2.1, Abb. 5.15*). Interessanterweise trägt Phenylalanin in der PCA des kohlenstoffbasierten Datensatzes – im Gegensatz zu Aspartat und Glycin – nicht dazu bei, dass Pflanzen gewachsen mit unterschiedlicher Lichtqualität voneinander unterschieden werden können. Vielmehr trägt Phenylalanin dazu bei, dass die Genotypen unterschiedlicher Rubis-co-Aktivität voneinander getrennt werden (*siehe Kapitel 5.2.2.1, Abb. 5.16*).

Die bisher dargestellte Verhältnisanalyse konnte keine signifikanten Änderungen des Anteils an **Asparagin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt bezüglich der Tag- und Nachtwerte (*siehe Kapitel 5.2.2.5.2*) zeigen. Es gab allerdings Schwankungen in den Nachtwerten. Daher wurden die prozentualen Anteile von Asparagin gemittelt und in Bezug auf die Tageszeitpunkte dargestellt. In Abbildung 5.21 ist deutlich zu sehen, dass der Anteil an Asparagin im Kontrollwildtyp während der Nacht von durchschnittlich 0.03% auf durchschnittlich 0.05% am Ende der Nacht steigt. Tendenziell kann dieser Anstieg auch in der moderaten NR-reduzierten Transformante F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ verfolgt werden. In den Pflanzen mit niedrigem Stickstoff- bzw. Kohlenstoffstatus dagegen ist das nicht mehr zu beobachten. *Kapitel 5.2.2.5.3* (Verhältnisanalyse Kohlenhydratmangel) zeigt, dass die Anteile von Asparagin bei Kohlenhydratmangel steigen. Stärke und Zucker sinken im Laufe der Nacht. Die Zunahme der Asparaginanteile des Kontrollwildtyps im Laufe Nacht könnte auf diesen Faktor zurückzuführen sein. Die moderat betroffene Transformante F23xNia30(145) zeigt eine ähnliche Antwort; diese bleibt bei den Pflanzen mit niedrigen Stickstoffstatus aus. Man kann allerdings beobachten, dass der Asparaginanteil des verhungerten Wildtyps nach der Nitratapplikation von 0.01% auf 0.02% ansteigt. Diese Ergebnisse können ein Hinweis darauf sein, dass Asparaginsynthese vom Stickstoff- und Kohlenstoffstatus der Pflanzen abhängig ist und damit nur indirekt von Licht.

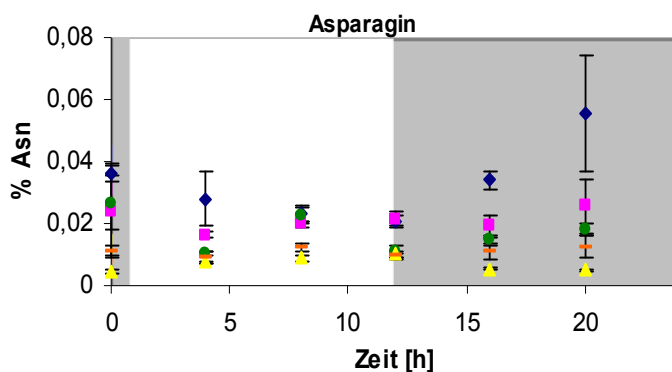


Abb. 5.21: Prozentualer Anteil von Asparagin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Aufgetragen sind die gemittelten Messwerte \pm Standardabweichung aller Genotypen gegen die entsprechende Tageszeit ($n = 5$). Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO₃ (blau), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ (pink), Wildtyp gewachsen mit 0,2 mM KNO₃ (grün), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO₃ (gelb) und mit 0,2 mM KNO₃ (orange).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Anteile von Glutamin, Aspartat, Glycin, Alanin und Phenylalanin abhängig von der Tageszeit im Verhältnis zu den anderen Aminosäuren ändern und Hinweise darauf liefern, dass die Regulation ihrer Biosynthese abhängig von Tag/Nacht-Zyklus ist, während Asparagin eine tageszeitliche Antwort zeigt, die eher auf eine Steuerung des Kohlenstoff- und Stickstoffstatus der Pflanze hindeutet.

5.2.2.5.2 Individuelle Antworten der Aminosäuren auf niedrigen Stickstoffstatus oder auf Nitrat

In diesem Kapitel kommt es zur Identifizierung von Aminosäuren, die eine Antwort auf einen reduzierten Stickstoffstatus der Pflanzen oder auf Nitrat selbst zeigen und ihr Verhältnis in Abhängigkeit des Gesamtaminosäuregehalts bzw. des Gesamtgehaltes der „kleinen“ Aminosäuren verändern. Das experimentelle System des stickstoffbasierten Aminosäuredatensatzes erlaubt durch den Vergleich des nitratmangelernährten Wildtyps und der Nitrat akkumulierenden Transformante (Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃) die Identifizierung nitratgesteuerter Effekte. Der Effekt wird weiterhin betätigt, wenn die nitratmangelernährte Transformante (Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO₃) ein dem verhungerten Wildtyp ähnliches Verhalten zeigt. Nitrat kann auf zwei unterschiedliche Arten agieren: Zum einen kann es einen Einfluss auf die Biosynthese der entsprechenden Aminosäure haben oder es kann deren Verbrauch für andere Stoffwechselprozesse (*siehe Einleitung*) entweder inhibieren oder stimulieren.

Im folgenden Kapitel wird die Unterscheidung zwischen Proben, die während des Tages und während der Nacht geerntet wurden beibehalten. Eine Streuung bezüglich des diurnalen Effektes kann so von einer Streuung unterschieden werden, die durch biologische Varianz der Proben, hervorgerufen durch die verwendeten Genotypen, oder technische Varianz der Analyse zustande gekommen ist. Zur Vereinfachung für den Betrachter wird in Tabelle 5.7 eine kurze Zusammenstellung der in diesem Kapitel verwendeten Symbole dargestellt.

Genotyp	Stickstoffangebot	Tag	Nacht
Wildtyp (Gatersleben)	12 mM KNO ₃	■	□
Wildtyp (Gatersleben)	0.2 mM KNO ₃	■	□
F23xNia30(145)	12mM KNO ₃	●	○
Nia30(145)	12 mM KNO ₃	▲	△
Nia30(145)	0.2 mM KNO ₃	▲	△

Tabelle 5.7: Zusammenstellung der in diesem Kapitel verwendeten Symbole

Die Hauptaminosäuren

Der Anteil an **Glutamat** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt steigt bei verringertem Stickstoffstatus der Pflanzen. Der prozentuale Anteil steigt von ca. 20% auf 35 – 55 % an (Abb. 5.22). Mehrere Gründe können dieses Phänomen erklären.

1. Der prozentuale Anteil an Glutamat erhöht sich auf Grund erhöhter Proteindegradierung in Pflanzen mit Stickstoffmangel.
2. Die Glutamatbiosynthese bleibt unter Stickstoffmangelbedingungen auf hohem Niveau, jedoch die Biosynthese der anderen Aminosäuren nimmt ab. Es kommt zu ei-

ner Verringerung des Gesamtaminosäuregehaltes und zu einem erhöhten Anteil an Glutamat.

Die stabilen absoluten Glutamatkonzentrationen aller Genotypen und Tageszeitpunkte in *Kapitel 5.2.1.1* in Kombination mit den verringerten Proteinkonzentrationen in *Kapitel 5.1.4* unterstützen Punkt 2. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, welche der oben genannten Punkte Gültigkeit hat.

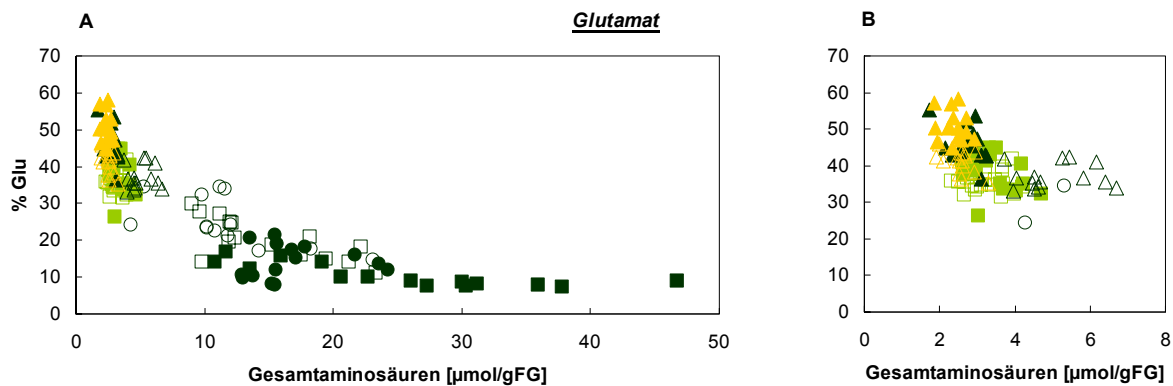


Abb. 5.22: Prozentualer Anteil an Glutamat im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO₃ (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO₃ (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO₃ (▲) und mit 0.2 mM KNO₃ (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (□), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).

Der Anteil an **Glutamin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt sinkt stark in Pflanzen mit verringertem Stickstoffstatus. Während der gut ernährte Wildtyp durchschnittlich 25% Glutamin in Abhängigkeit zum Gesamtaminosäuregehalt hat, sinkt der der moderat betroffenen Transformante F23xNia30(145) bereits auf durchschnittlich 13%. Der Anteil von Glutamin im nitratverhungerten Wildtyp beträgt nur noch durchschnittlich 5% und sinkt noch einmal in beiden Ernährungszuständen der Nia30(145) auf durchschnittlich 2% ab (Abb. 5.23). Alle Genotypen zeigen eine große Streuung. Das kann ein Hinweis darauf sein, dass Glutamingehalte innerhalb der Pflanze schnell auf äußere Einflüsse reagieren. Auch die PCA konnte Glutamin als eine der Aminosäuren identifizieren, die dazu beiträgt die Genotypen und experimentellen Gruppen voneinander zu trennen (Abb. 5.15).

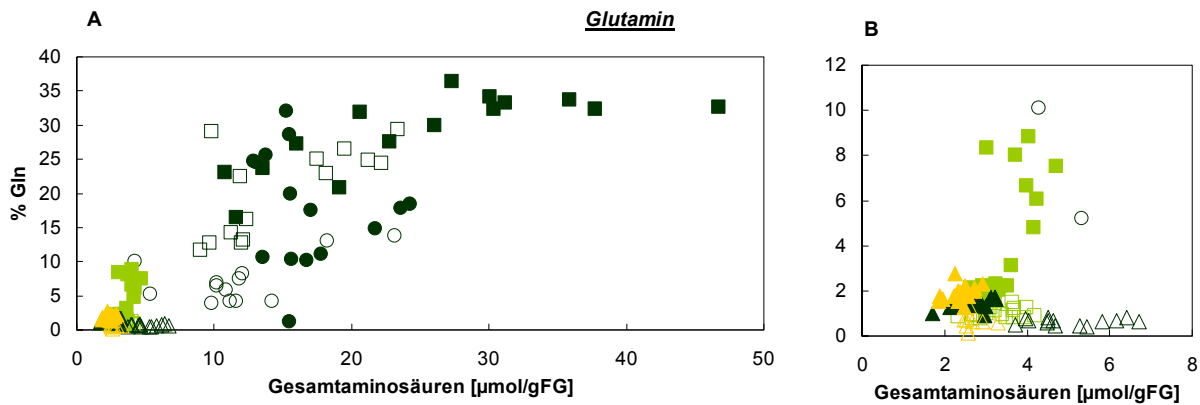


Abb. 5.23: Prozentualer Anteil an Glutamin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).

Der Anteil an **Asparagin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt verändert sich nur geringfügig in den Genotypen mit reduziertem Stickstoffstatus (Abb. 5.24A). Das ist ein eher unerwartetes Ergebnis, da Asparagin eine stickstoffreiche Aminosäure ist. Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 hat jedoch einen signifikant niedrigeren prozentualen Asparaganteil an den Gesamtaminosäuren im Vergleich zum nitratdefizienten Wildtyp. Dieser Effekt ist teilweise rückläufig in den nitratverhungerten Pflanzen der Transformante Nia30(145) (Abb. 5.24B). Dieses Ergebnis deutet an, dass hohe Nitratgehalte entweder die Asparaginsynthese inhibieren oder den Verbrauch von Asparagin stimulieren.

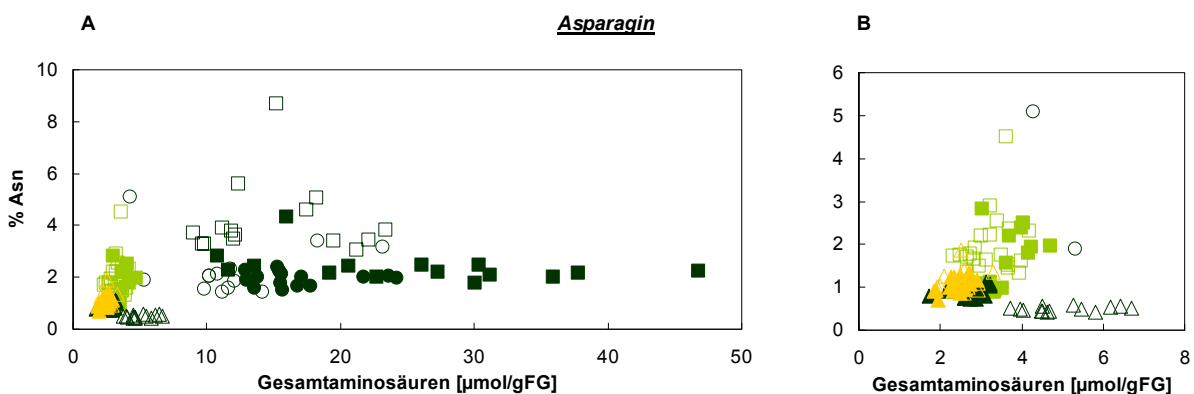


Abb. 5.24: Prozentualer Anteil an Asparagin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).

Der Anteil an **Glycin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt sinkt in Pflanzen mit stark erniedrigtem Stickstoffstatus (Abb. 5.25A). Der Glycinanteil des gut ernährten Wildtyps und der moderat betroffenen Transformante F23xNia30(145) beträgt während des Tages durchschnittlich 17.5%. Der Anteil der stark betroffenen Transformante Nia30(145) gewachsen mit hohem Nitratangebot sinkt auf durchschnittlich 5% ab. Die Glycinanteile des nitratverhungerten Wildtyps und der stark betroffenen Transformante Nia30(145) in Nitratmangelbedingungen steigen im Vergleich zur Nitrat akkumulierenden Transformante (Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3) von 5% auf durchschnittlich 9% während des Tages an (Abb. 5.25B). Dies deutet darauf hin, dass die Glycinbiosynthese aufgrund hoher Nitratgehalte in den Blättern reduziert sein kann oder dass der Verbrauch an Glycin stimuliert wird. Abbildung 5.25A und B zeigen die bereits in *Kapitel 5.2.2.5.1* dargestellten diurnalen Effekte der Glycinanteile.

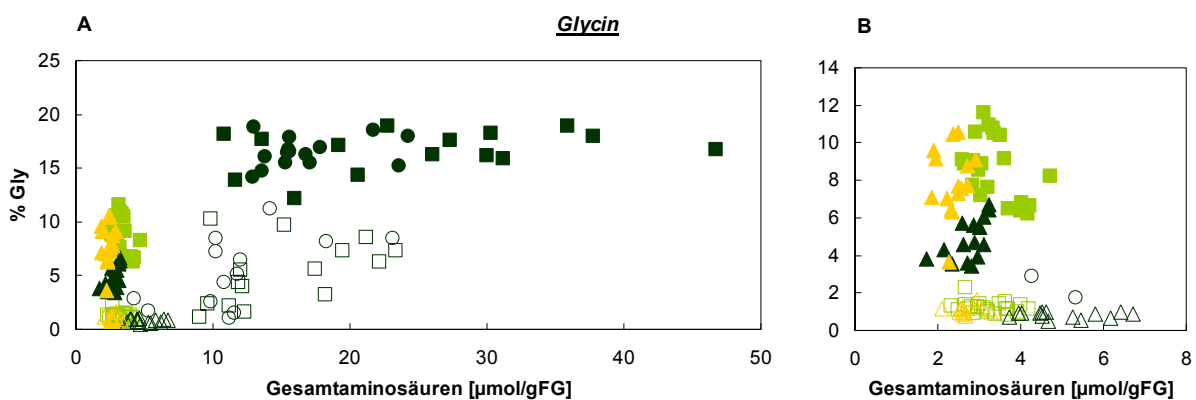


Abb. 5.25: Prozentualer Anteil an Glycin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. (A) Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. (B) zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (□), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).

Der Anteil an **Alanin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt sinkt in den Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus (Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 und Wildtyp und Nia30(145) gewachsen mit 0.2 mM KNO_3) durchschnittlich um den Faktor 2 (Abb. 5.26A). Die Alaninanteile im verhungerten Wildtyp sind im Vergleich zur Transformante Nia30(145) mit ausreichendem Nitratangebot deutlich niedriger (Abb. 5.26B). Dieser Effekt ist in der nitratverhungerten Variante dieser Transformante umgekehrt. Die Alaninanteile gleichen hier denen des nitratverhungerten Wildtyps. Dies kann als Hinweis angesehen werden, dass hohe Nitratgehalte einen Einfluss auf die Alaninbiosynthese oder deren Verbrauch haben können. Abbildung 5.26B zeigt auch, dass die diurnalen Effekte, die in den Pflanzen mit hohem Stickstoffstatus vorhanden sind, in Pflanzen mit niedrigem Stickstoffstatus nicht beobachtet werden können. Die diurnalen Effekte scheinen innerhalb der Genotypen nicht konsistent zu sein.

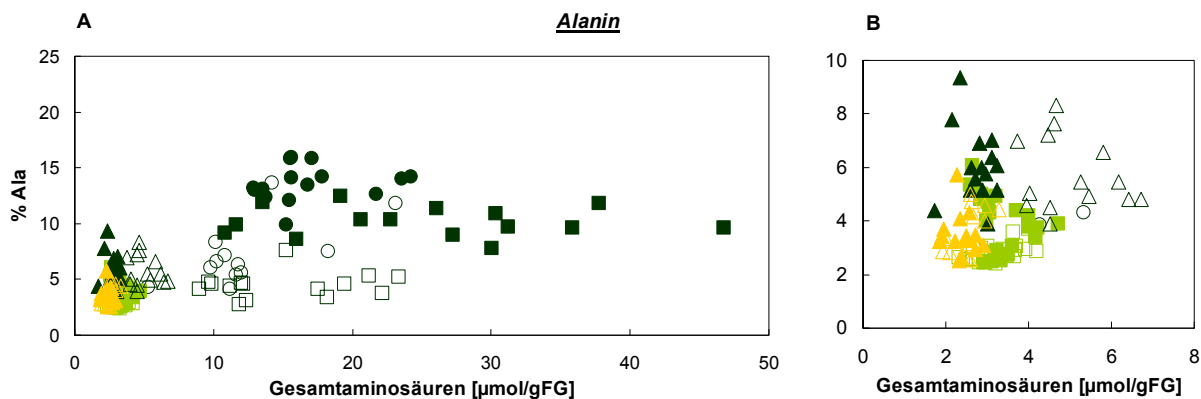


Abb. 5.26: Prozentualer Anteil an Alanin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO₃ (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO₃ (■), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO₃ (▲) und mit 0.2 mM KNO₃ (▲). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (▲).

Die „kleinen“ Aminosäuren

Der Anteil an **Phenylalanin** im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren sinkt in Pflanzen mit verringertem Stickstoffstatus (Abb. 5.27A). Der prozentuale Anteil während des Tages von durchschnittlich 20% in Pflanzen mit ausreichender Stickstoffversorgung (Wildtyp und F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃) sinkt auf ca. 15 % während des Tages in den Nitrat akkumulierenden Transformanten ab (Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃) (Abb. 5.27A). Die Phenylalaninanteile im nitratverhungerten Wildtyp sinken noch einmal um den Faktor 3 im Vergleich zu oben genannter Transformante (Abb. 5.27B). Diese Abnahme ist teilweise ebenfalls bei der nitratverhungerten Nia30(145) Transformante zu beobachten. Dies ist ein Hinweis auf einen nitratspezifische Stimulation auf die Phenylalaninbiosynthese bzw. auf einen inhibierenden Effekt von hohen Nitratgehalten auf den Verbrauch von Phenylalanin in anderen Stoffwechselprozessen. Abbildung 5.27A und B zeigen ebenfalls die diurnalen Unterschiede der Phenylalaninanteile, die in *Kapitel 5.2.2.5.1* beschreiben wurden und die große Streuung der Werte entlang der y-Achse erklären. Die individuellen Reaktionen der Phenylalaninanteile in Bezug auf Stickstoffstatus, Nitrat und den Tag/Nacht-Zyklus können den hohen Eigenwert dieser Aminosäure in der PCA-Analyse in *Kapitel 5.2.2.1* erklären. Interessanterweise zeigen die Anteile der anderen beiden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan keine Veränderungen relativ zu den anderen „kleinen“ Aminosäuren, weder in Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus noch bezüglich tageszeitlich abhängiger Faktoren (*Daten siehe Anhang*).

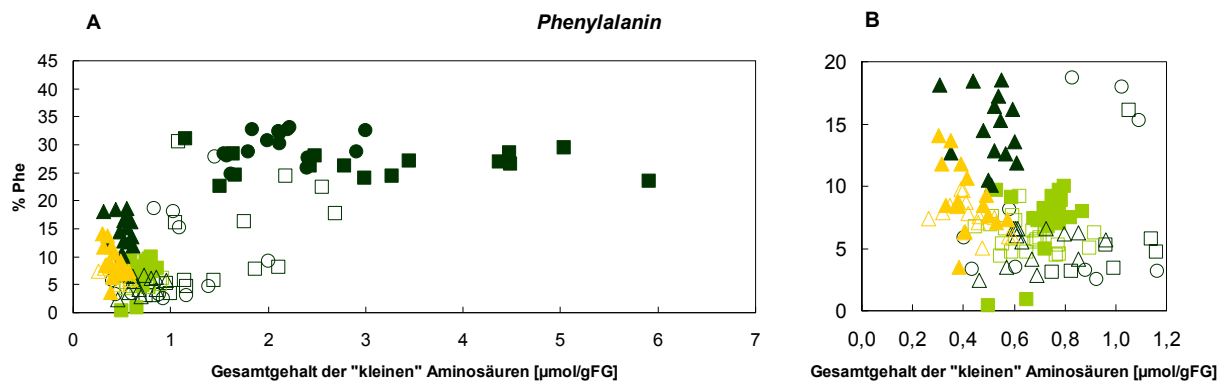


Abb. 5.27: Prozentualer Anteil an Phenylalanin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (■), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (▲). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (▲).

Der Anteil an **Lysin** relativ zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren steigt in Pflanzen mit verringertem Stickstoffstatus. Im Vergleich zu Kontrollwildtyp und F23xNia30(145) steigt der prozentuale Anteil von ca. 3% auf durchschnittlich 8% an (Abb. 5.28A). Eine verringerte Proteinbiosynthese in Pflanzen mit verringertem Stickstoffstatus bei gleich bleibender Lysinbiosynthese oder eine erhöhte Proteindegradierung könnten Gründe hierfür sein.

Kontrollwildtyp und F23xNia30(145) zeigen kaum eine Streuung entlang der y-Achse. Dagegen zeigen die Genotypen mit reduziertem Stickstoffstatus erhebliche Streuungen entlang dieser Achse (Abb. 5.28A und B), die nicht auf tageszeitlich abhängige Faktoren zurückzuführen sind. Dies könnte entweder ein Hinweis auf zunehmende biologische Varianz dieser Proben sein bzw. auf instabile Lysinbiosynthese in diesen Pflanzen. Eine weitere mögliche Erklärung für die hohe Variabilität dieser Datenpunkte ist die Tatsache, dass sich die Lysin-Konzentrationen in den Blättern der Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus am Quantifizierungs-Limit befanden.

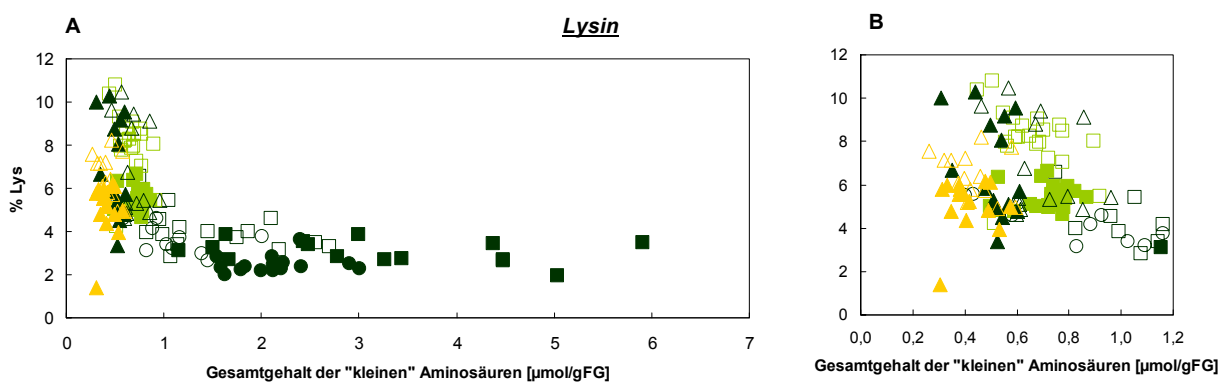


Abb. 5.28: Prozentualer Anteil an Lysin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (■), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (▲). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (▲).

Der Anteil an **Arginin** relativ zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren sinkt in Pflanzen mit verringertem Stickstoffstatus. Der prozentuale Anteil sinkt von durchschnittlich 8% auf durchschnittlich 1.5% (Abb. 5.29A und B).

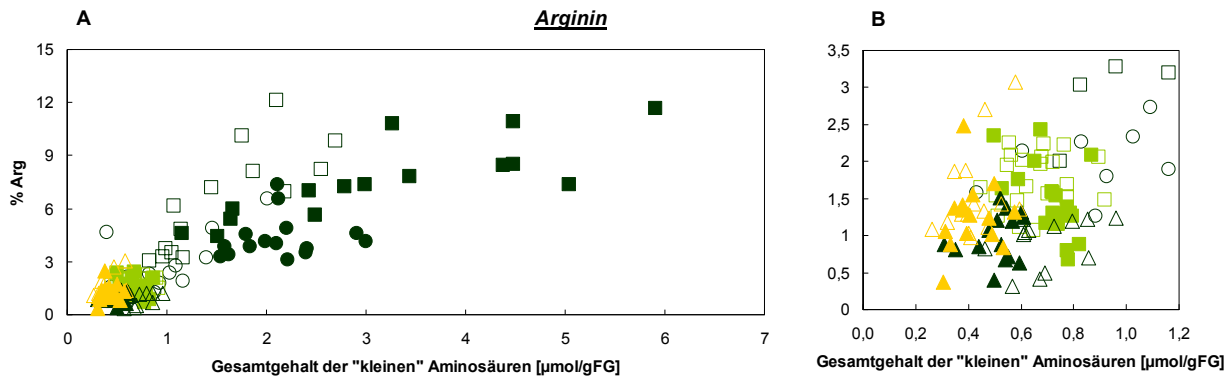


Abb. 5.29: Prozentualer Anteil an Arginin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO₃ (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO₃ (■), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO₃ (▲) und mit 0.2 mM KNO₃ (▲). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (▲).

Alle Genotypen zeigen jedoch eine große Streuung entlang der y-Achse, die nicht auf diurnale Effekte zurückzuführen ist und die absoluten Arginingehalte sind niedrig in diesen Proben. Auch hier kann dies einerseits als Hinweis interpretiert werden, dass die biologische Varianz aller Proben hoch ist und somit Einflüsse physiologischer oder externer Natur einen Effekt auf die Biosynthese von Arginin haben, oder dass dies andererseits auf technische Varianz zurückzuführen ist.

Der Anteil an **Citrullin** relativ zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren sinkt nicht generell in allen Genotypen mit reduziertem Stickstoffstatus (Abb. 5.30A). Der nitratverhungerte Wildtyp zeigt vergleichbare Citrullinanteile zu Genotypen mit ausreichender Stickstoffversorgung (Wildtyp und F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃). Die Anteile der Transformante Nia30(145) beider Ernährungszustände sinken und führen zur Annahme, dass sich die Citrullinanteile relativ zu den anderen Aminosäuren in einigen Pflanzen mit niedrigem Stickstoffstatus verändern (Abb. 5.30B). Alle Genotypen mit unzureichender Stickstoffversorgung zeigen eine große Streuung entlang der y-Achse, die nicht auf diurnale Veränderungen zurückzuführen ist. Entweder ist diese Streuung ein Ausdruck biologischer Varianz dieser Proben oder wiederum ein Hinweis darauf, dass die technische Analyse mit abnehmendem Aminosäuregehalt in den Blättern erschwert wird.

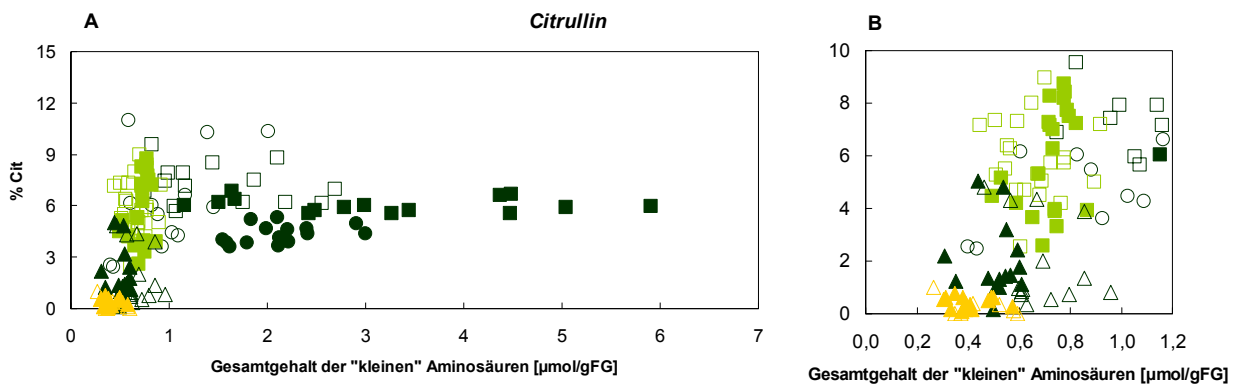


Abb. 5.30: Prozentualer Anteil an Citrullin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).

Der Anteil von **Histidin** relativ zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren sinkt tendenziell in Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus (Abb. 5.31A). Die Nitrat akkumulierende Transformante Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 zeigt dies – mit kaum messbaren Werten – am deutlichsten im Vergleich zum nitratverhungerten Wildtyp. Teilweise ist dieser Effekt in der nitratdefizienten Transformante (Nia30(145) gewachsen mit 0.2 mM KNO_3) rückläufig. Dies könnte ein Hinweis darauf liefern, dass Nitrat einen inhibierenden Effekt auf die Histidinbiosynthese hat oder den Verbrauch von Histidin für andere Stoffwechselprozesse stimuliert.

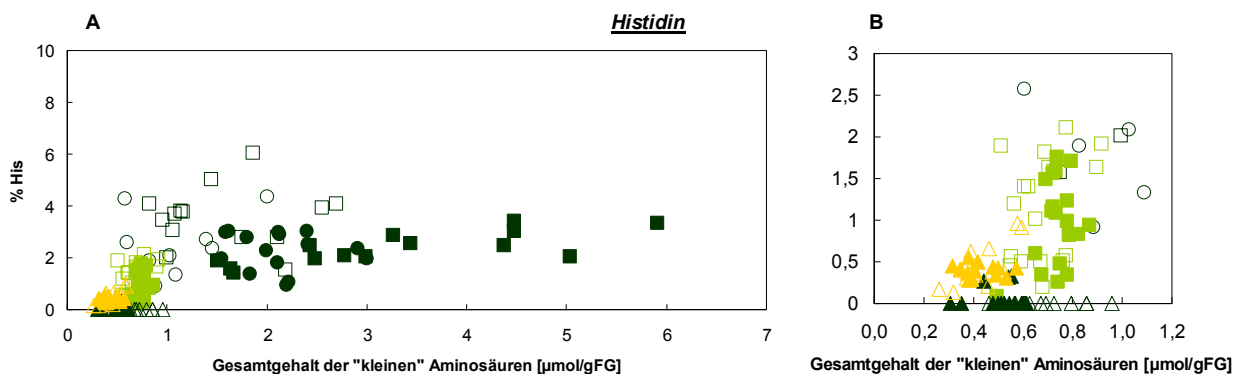


Abb. 5.31: Prozentualer Anteil an Histidin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).

Der Anteil an **Threonin** am Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren steigt im Wildtyp mit unzureichender Nitratapplikation auf durchschnittlich 35% an im Vergleich zu den anderen Genotypen mit ausreichender Nitratversorgung (Wildtyp und F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃) an (Abb. 5.32A). Die Threoninanteile in der Nitrat akkumulierenden Transformante Nia30(145) dagegen sinken (Abb. 5.32B). Dieser Effekt ist in der nitratverhungerten Variante dieser Transformante (Nia30(145) gewachsen mit 0.2 mM KNO₃) nur schwach rückläufig (Abb. 5.32B). Tendenziell kann daraus geschlossen werden, dass hohe Nitratgehalte einen inhibierenden Effekt auf die Threoninbiosynthese haben oder den Verbrauch an Threonin stimulieren.

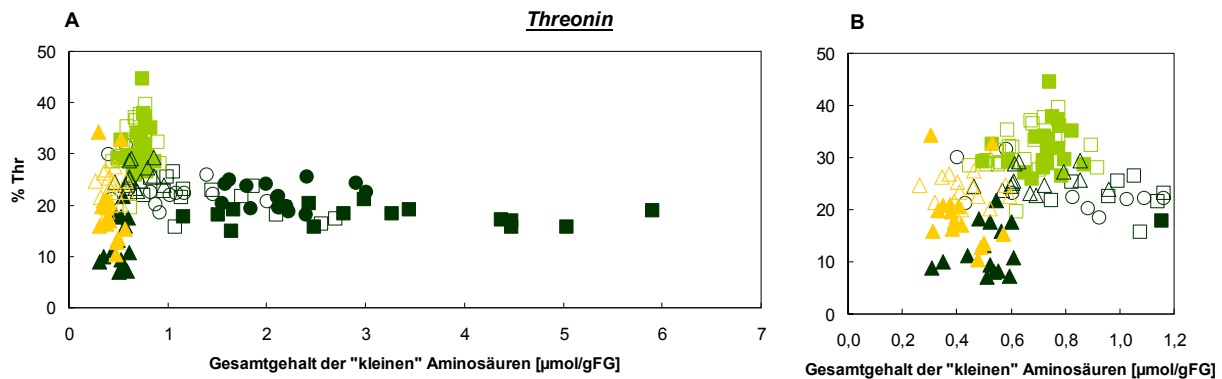


Abb. 5.32: Prozentualer Anteil an Threonin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitrat-spezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO₃ (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO₃ (■), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO₃ (▲) und mit 0.2 mM KNO₃ (▲). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (▲).

Die Anteile an **Leucin** relativ zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren sind im nitratverhungerten Wildtyp leicht erhöht im Vergleich zu den Genotypen mit ausreichender Stickstoffversorgung (Wildtyp und F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃) (Abb. 5.33A). Die Nitrat akkumulierende Transformante Nia30(145) zeigt im Vergleich zum Nitrat defizienten Wildtyp leicht erniedrigte Anteile. Dieser Effekt ist teilweise rückläufig in der nitratverhungerten Variante dieser Transformante (Abb. 5.33B). Auch hier kann auf Grund der schwachen Antworten nur tendenziell davon ausgegangen werden, dass hohe Nitratgehalte in den Blättern inhibierend auf die Leucinbiosynthese wirken oder den Verbrauch an Leucin in anderen Stoffwechselprozessen stimulieren.

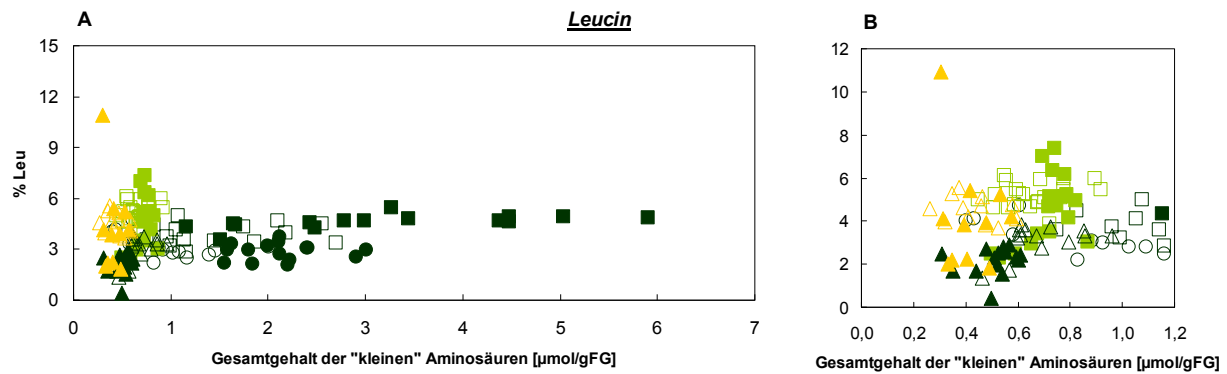


Abb. 5.33: Prozentualer Anteil an Leucin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (□), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).

Der Anteil an **Isoleucin** relativ zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren ist in den Nia30(145) mit unzureichender Nitratapplikation durchschnittlich 22.5% (Abb. 5.34A). Kontrollwildtyp und F23xNia30(145) zeigen beide mit einem Isoleucinanteil von durchschnittlich 3% signifikant niedrige Gehalte im Vergleich zur nitratverhungerten Nia30(145) (Abb. 5.34A). Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 und nitratverhungertes Wildtyp haben durchschnittlich 8% Isoleucinanteil (Abb. 5.34B). Es besteht die Möglichkeit, dass die erhöhten Isoleucinanteile in Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus im Vergleich zum Normalzustand dadurch zustande kommen, dass in diesen Pflanzen vermehrt Protein degradiert wird. Zu einem erhöhten Anteil an Isoleucin kann es auch kommen, wenn es in diesen Pflanzen bei gleichbleibender Isoleucinbiosynthese zu einer verringerten Proteinbiosynthese bzw. Biosynthese der anderen Aminosäuren kommt (siehe absolute Konzentrationen in Kapitel 5.2.1.2 Abb. 5.11) Der auffällig erhöhte Anteil dieser Aminosäure in den nitratverhungerten Transformanten könnte aus einem kombinatorischen Effekt beider genannten Möglichkeiten entstehen. Nitratspezifische Effekte können hier nicht von denen des allgemein reduzierten Stickstoffstatus unterschieden werden. Interessanterweise hat die PCA-Analyse Isoleucin als Aminosäure identifiziert, die Genotypen mit reduziertem Stickstoffstatus von Genotypen mit ausreichendem Stickstoffstatus trennt.

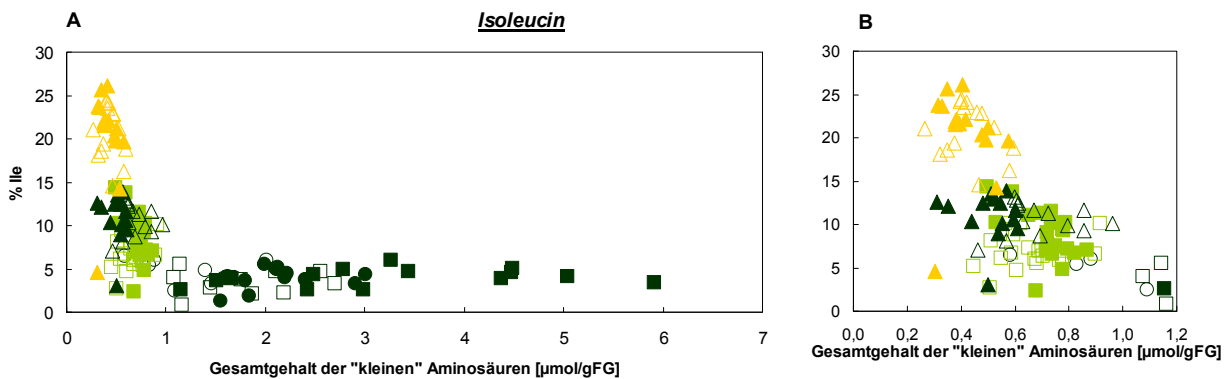


Abb. 5.34: Prozentualer Anteil an Isoleucin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (□), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).

5.2.2.5.3 Individuelle Antworten der Aminosäuren auf einen reduzierten Kohlenstoffstatus

Vorangegangene Arbeiten mit Tabakpflanzen (Matt et al. 2002 und Dissertation 2001) zeigten, dass eine Verminderung der Kohlenhydrate zu einer Verringerung der individuellen Aminosäuregehalte führte. Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt: Die Verringerung der Kohlenhydratmenge zum einen durch reduzierte Lichtverhältnisse und zum anderen durch verringerte Rubisco Aktivität. Beide Versuchsansätze führen zu verringerten Aminosäuregehalten aus den gleichen Gründen, einerseits die verringerte Kohlenhydratassimilation und andererseits und ergänzend dazu eine verringerte Nitratassimilation durch reduzierte NR-Aktivität und eine reduzierte Menge an Vorläuferaminoaciden. Beide Kohlenstofflimitierungen haben, wie in Matt et al. (2002) gezeigt, jedoch unterschiedliche physiologische Auswirkungen. Während eine Verringerung der Rubisco-Aktivität in *rbcS*-antisense Pflanzen eine Überreduzierung der Elektronentransportkette hervorruft und gleichermaßen zu einer Verringerung der Kohlenhydratgehalte, der Aminosäuren, von α -Ketoglutarat und der GOGAT-Aktivität führt, hat eine Verringerung der Lichtstärke reduzierte Gehalte an Reduktionsäquivalenten ATP und NADPH, Kohlenhydraten und Aminosäuren zur Folge. Im Zusammenhang mit der Verhältnisanalyse ist es interessant, spezifische Effekte dieser beiden verschiedenen Kohlenstofflimitierungen zu unterscheiden und Tendenzen in Bezug auf die übergeordnete Fragestellung nach einer koordinierten Biosynthese der Aminosäuren herauszuarbeiten. Unterschiedliche Antworten in der Verhältnisanalyse können demnach z.B. Hinweise über eine regulatorische Rolle von α -Ketoglutarat geben.

Allgemein ist in diesem Kapitel zu beachten, dass weniger Datenpunkte vorhanden sind im Vergleich zum stickstoffbasierten Datensatz und die Ergebnisse daher zum Teil nur Trends andeuten. Der Verwendung zweier Kontrollwildtypen (SR1 und SNN) ist als unkritisch zu betrachten, da die Ergebnisse der absoluten Aminosäurekonzentrationen in den Blättern dieser beiden Wildtypen sich gleichen (*siehe Anhang*) und in der PCA-Analyse nicht getrennt wer-

den (siehe Kapitel 5.2.2.1). Wie im vorangegangenen Kapitel werden zuerst die Hauptaminosäuren dargestellt und danach die „kleinen“. Zur Vereinfachung für den Betrachter wird in Tabelle 5.8 eine kurze Zusammenstellung der in diesem Kapitel verwendeten Symbole dargestellt.

Genotyp	Rubisco- Aktivität	Symbol	Genotyp	Lichtstärke	Symbol
Wildtyp (SR1)	826 μ mol/gFG/h	●	Wildtyp SNN	400 μ E	■
3104 (ant3)	818 μ mol/gFG/h	●	Wildtyp SNN	150 μ E	■
3203 (ant3)	334 μ mol/gFG/h	●	Wildtyp SNN	80 μ E	■
3206m (ant3)	298 μ mol/gFG/h	●			
3206k (ant3)	251 μ mol/gFG/h	●			
ant5	98 μ mol/gFG/h	●			

Tabelle 5.8: Zusammenstellung der in Kapitel 5.2.2.5.3 verwendeten Symbole

Die Hauptaminosäuren

Der Anteil an **Glutamat** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt ändert sich in unterschiedlicher Weise, je nachdem wie die Kohlenstofflimitierung herbeigeführt wird. Eine Kohlenstofflimitierung hervorgerufen durch verringerte Rubisco-Aktivität bewirkt eine Reduzierung des Anteils dieser Aminosäure im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Wildtyppflanzen und Transformante mit moderater Rubisco Verringerung haben durchschnittlich 8% Glutamat, während der prozentuale Anteil in den stark betroffenen Transformanten auf durchschnittlich 3% herabsinkt (Abb. 5.35).

Der Anteil an Glutamat im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt in Pflanzen angezogen unter verschiedenen Lichtqualitäten zeigt dagegen eine Erhöhung um den Faktor 2 in Pflanzen gewachsen in niedrigen Lichtverhältnissen. Der prozentuale Anteil an Glutamat steigt sukzessive mit fallender Lichtqualität (Abb. 5.35)

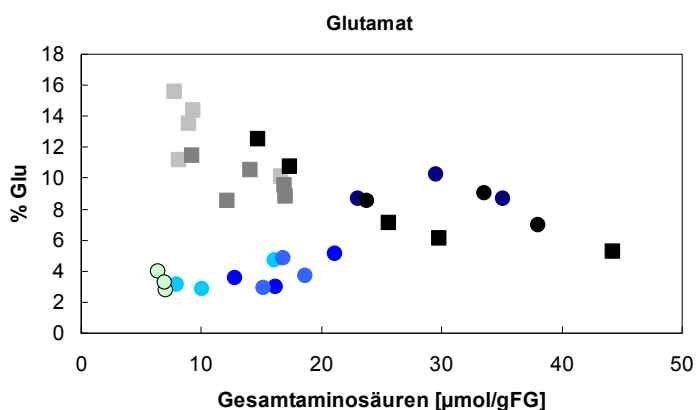


Abb. 5.35: Prozentualer Anteil an Glutamat im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400 μ E (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150 μ E (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80 μ E (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR 1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Dieses unterschiedliche Ergebnis in Bezug auf Kohlenstoff limitierende Bedingungen gibt einen Hinweis darauf, dass die Biosynthese von Glutamat anscheinend eng an die Gehalte von α -Ketoglutarat gekoppelt ist (siehe Diskussion Kapitel 6.1.2.3). Die Gehalte dieser organischen Säure sind in den *rbcS*-antisense Pflanzen signifikant erniedrigt im Vergleich zum Kontrollwildtyp, in den Pflanzen gewachsen unter suboptimalen Lichtbedingungen jedoch nicht (Matt et al., 2002)

Der Anteil an **Glutamin** relativ zum Gesamtaminosäuregehalt steigt um den Faktor 2 in allen Genotypen mit stark verringerter Rubisco-Aktivität (Abb. 5.36). Dagegen zeigen sich keine signifikanten Änderungen des Glutaminanteils im Versuch mit verringerter Lichtstärke. Interessanterweise steigen die Glutaminanteile, während die Glutamatanteile der anti-*rbcS* Pflanze fallen und die GOGAT-Aktivität in diesen Pflanzen ebenfalls erniedrigt ist (Matt et al. 2002). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es bei sinkenden Glutamatanteilen gekoppelt mit reduzierter α -Ketoglutaratkonzentration und GOGAT-Aktivität zur Erhöhung der Glutaminanteile kommt.

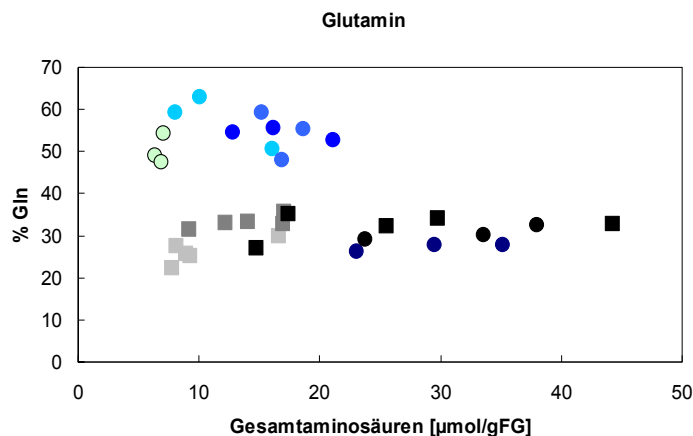


Abb. 5.36: Prozentualer Anteil an Glutamin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400 μ E (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150 μ E (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80 μ E (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR 1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Der Anteil an **Asparagin** relativ zum Gesamtaminosäuregehalt steigt tendenziell in Pflanzen mit reduziertem Kohlenhydratstatus durch verringerte Rubisco-Aktivität an. Eine deutliche Zunahme ist nur in den Genotypen mit der geringsten Rubisco-Aktivität (ant5) zu sehen (Abb. 5.37). Die Asparaginanteile zeigen in Pflanzen gewachsen mit suboptimaler Lichtstärke ebenfalls nur einen leichten Anstieg (Abb. 5.37). Die Datenpunkte der beiden Versuche liegen jedoch übereinander. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Asparaginbiosynthese direkt oder indirekt durch den Kohlenhydratstatus der Pflanzen beeinflusst werden kann, zumal bereits im vorangegangenen Kapitel eine Zunahme der Asparaginanteile am Ende der Nacht, wenn Kohlenhydrate niedrig sind, beobachtet wurde.

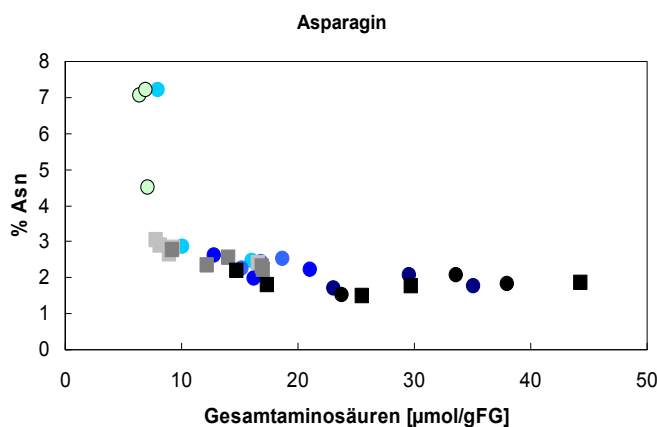


Abb. 5.37: Prozentualer Anteil an Asparagin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400 μ E (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150 μ E (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80 μ E (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR 1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Der Anteil an **Aspartat** am Gesamtaminosäuregehalt steigt sukzessive mit Verringerung der Lichtstärke. In Pflanzen gewachsen mit ausreichender Lichtstärke hat Aspartat durchschnittlich einen prozentualen Anteil von 7%. Pflanzen gewachsen mit 150 μE zeigen durchschnittlich einen prozentualen Anteil von 17% und Tabakpflanzen gewachsen mit sehr stark reduzierter Lichtstärke zeigen einen prozentualen Anteil von durchschnittlich 27% (Abb. 5.38). In Pflanzen mit reduzierter Rubisco-Aktivität ändern sich die Aspartatanteile relativ zu den anderen Aminosäuren nicht (Abb. 5.38). Interessanterweise zeigen die Aspartatanteile des kohlenstoff- und stickstoffbasierten Datensatzes ähnliche Ergebnisse. Aspartatanteile des stickstoffbasierten Datensatzes zeigen einen deutlichen Anstieg während der Nacht (*siehe Abb. 5.17 Kapitel 5.2.2.5.1*) und die PCA-Analyse konnte Aspartat als Aminosäure identifizieren, die trennende Eigenschaften in Bezug auf die Proben hat, die während des Tages oder während der Nacht geerntet wurden. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass die Biosynthese von Aspartat direkt oder indirekt durch Licht beeinflusst werden könnte.

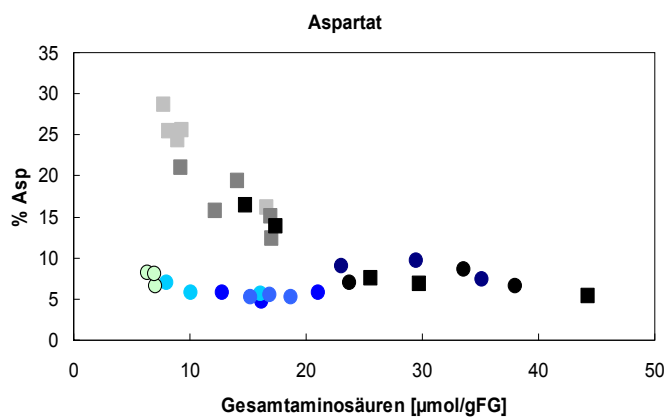


Abb. 5.38: Prozentualer Anteil an Aspartat im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400 μE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150 μE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80 μE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR 1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Der Anteil an **Glycin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt sinkt sukzessive mit steigender Kohlenstofflimitierung in beiden Versuchsansätzen. Der Anteil des Wildtyps und der Transformante 3107 mit ähnlicher Rubisco-Aktivität liegt bei ca. 17%, in der Transformante ant5 mit sehr geringer Rubisco-Aktivität bei 3% (Abb. 5.39). Pflanzen mit ausreichender Lichtstärke zeigen ca. 20% Glycin relativ zu den anderen Aminosäuren und Pflanzen gewachsen bei 80 μE verfügen nur noch über ca. 4% Glycin am Gesamtaminosäuregehalt (Abb. 5.39). Eine Reduktion des Kohlenstoffstatus der Pflanzen scheint demnach eine Auswirkung auf die Glycinbiosynthese zu haben. Unterstützend dazu konnte in *Kapitel 5.2.2.3.1* gezeigt werden, dass die Glycinanteile während der Nacht, also in einem Kohlenstoff limitierenden Zustand, sinken.

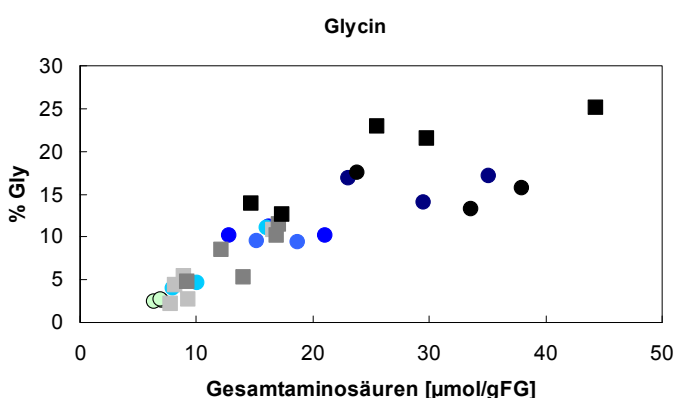


Abb. 5.39: Prozentualer Anteil an Glycin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400 μE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150 μE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80 μE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR 1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Der Anteil an **Serin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt fällt um durchschnittlich den Faktor 3 in Pflanzen mit stark reduzierter Rubisco-Aktivität (*ant5*) und zeigt keine signifikanten Änderungen im Versuch mit reduzierter Lichtstärke (Abb. 5.40).

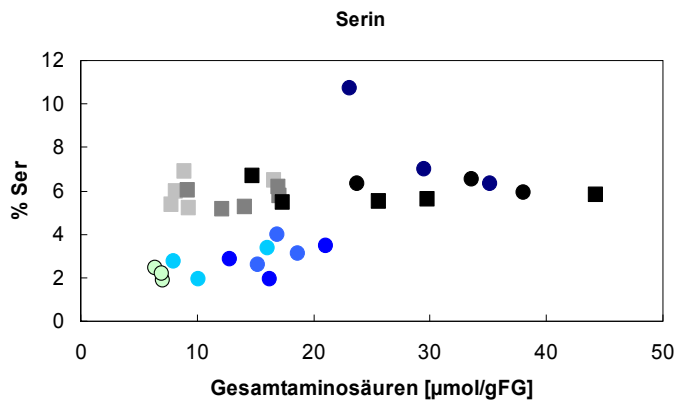


Abb. 5.40: Prozentualer Anteil an Serin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400µE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150µE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80µE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR 1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und *ant5* (●).

Der Anteil an **Alanin** im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt zeigt einen sukzessiven Abfall mit zunehmender Verringerung der Rubisco-Aktivität. Während die Wildtypen und die Pflanzen mit kaum reduzierter Rubisco-Aktivität einen prozentualen Alaninanteil von 14% haben, sinkt dieser in Pflanzen mit stärkerer Reduzierung der Rubisco-Aktivität (*ant3*) auf 8%. Pflanzen mit sehr starker Reduzierung der Rubisco-Aktivität (*ant5*) haben nur noch einen prozentualen Anteil von 4% (Abb. 5.41). Suboptimale Lichtbedingungen führen ebenfalls zu einer Abnahme der Alaninanteile im Verhältnis zu den anderen Aminosäuren (Abb. 5.41).

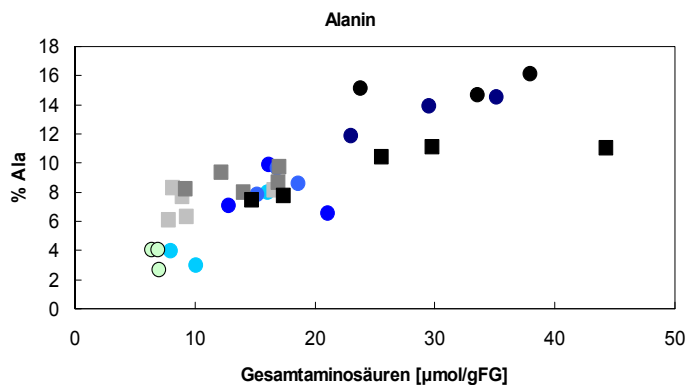


Abb. 5.41: Prozentualer Anteil an Alanin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400µE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150µE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80µE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR 1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und *ant5* (●).

Die „kleinen“ Aminosäuren

Die Anteile der **aromatischen Aminosäuren** relativ zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren zeigen bei der gesamten Gruppe einen gleichen Trend. Mit zunehmender Kohlenstofflimitierung aufgrund verringerter Rubisco-Aktivität (Abb. 5.42 bis 5.44) sinken die Anteile der aromatischen Aminosäuren. Ebenfalls sinken die Anteile bei Kohlenstofflimitierung durch reduzierte Lichtstärke (Abb. 5.42 bis 5.44).

Phenylalanin zeigt dieses Verhalten am deutlichsten. Genotypen mit signifikant niedriger Rubisco-Aktivität haben um den Faktor 5 niedrigere Anteile (Abb. 5.42). Bei verringerter Lichtqualität sinkt der Phenylalaninanteil sukzessive bis maximal um den Faktor 2 (Abb. 5.42).

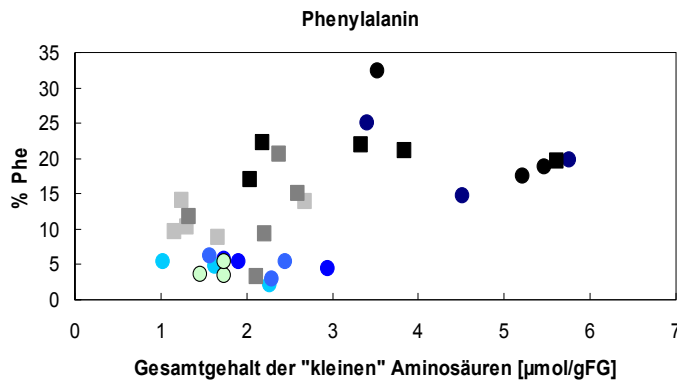


Abb. 5.42: Prozentualer Anteil an Phenylalanin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400µE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150µE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80µE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Tyrosinanteile verringern sich um den Faktor 2.7 in den Genotypen mit geringer Rubisco-Aktivität (3203, 3206 mittel und klein, ant5) (Abb. 5.43) und sinken um den Faktor 3 in Pflanzen gewachsen mit verringerter Lichtstärke im Vergleich zu Pflanzen gewachsen mit hoher Lichtstärke (Abb. 5.43).

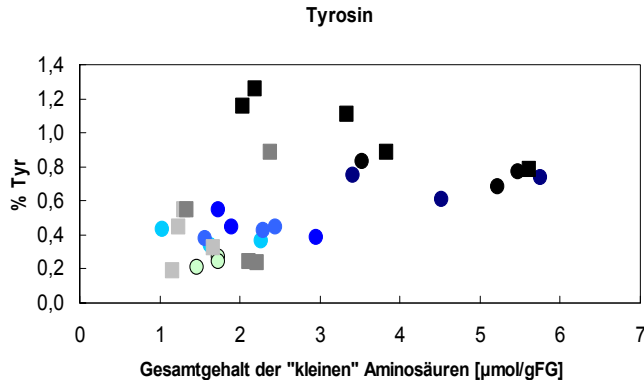


Abb. 5.43: Prozentualer Anteil an Tyrosin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400µE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150µE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80µE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Tryptophananteile verringern sich in Genotypen mit signifikant reduzierter Rubisco-Aktivität (3203; 3206 mittel, 3206 klein und ant5) durchschnittlich um den Faktor 4 im Vergleich zu Genotypen mit ausreichender Rubisco-Aktivität (Wildtyp und 3104) (Abb. 5.44). Der Tryptophananteil sinkt sukzessive mit verringerter Lichtstärke. Während Pflanzen gewachsen mit 400 µE durchschnittlich einen Anteil von 1.5% haben, ist der der Pflanzen gewachsen mit 150 µE nur noch durchschnittlich bei 0.8% und der der Pflanzen gewachsen mit 80 µE bei einem Minimum von 0.4% (Abb. 5.44).

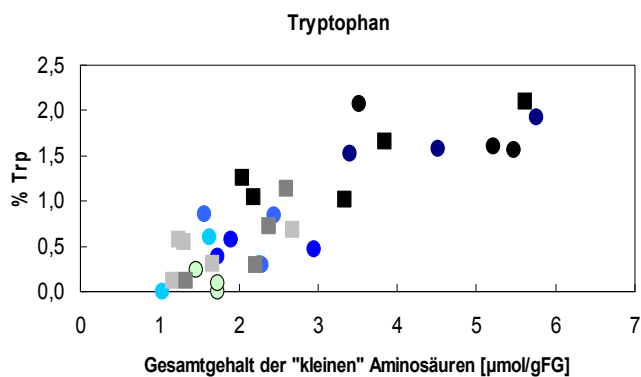


Abb. 5.44: Prozentualer Anteil an Tryptophan im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400µE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150µE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80µE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcs*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Zusammenfassend kann man für die Gruppe der aromatischen Aminosäuren sagen, dass eine Kohlenstofflimitierung im Allgemeinen auf die Biosynthese aller Mitglieder dieser Familie den gleichen Effekt hat. Interessanterweise zeigen sich die Phenylalaninanteile im Verhältnis zu den anderen „kleinen“ Aminosäuren in den anti-*rbcs* Pflanzen stärker reduziert als durch eine Kohlenstofflimitierung hervorgerufen durch Wachstum unter suboptimalen Lichtbedingungen.

Von den „kleinen“ Aminosäuren zeigen drei Mitglieder der **Aspartatfamilie**, Threonin, Methionin und Lysin, eine spezifische Änderung auf Kohlenstofflimitierung.

Der Anteil an **Threonin** im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren zeigt einen leichten Anstieg mit zunehmender Reduzierung der Rubisco-Aktivität. ant5 Genotypen zeigen mit dem Faktor 2.3 den höchsten Anstieg des prozentualen Anteils an Threonin im Vergleich zum Normalzustand (Abb. 5.45). Ein geringer Anstieg der Threoninanteile ist auch bei Kohlenstofflimitierung durch reduzierte Lichtstärke zu beobachten.

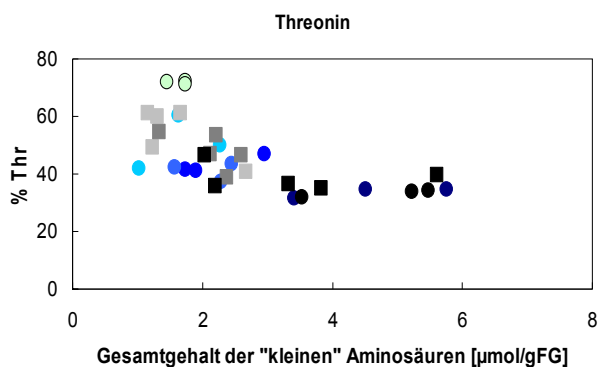


Abb. 5.45: Prozentualer Anteil an Threonin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400µE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150µE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80µE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcs*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Der Anteil an **Methionin** im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren dagegen zeigt ein leichtes Absinken der Anteile um den Faktor 3.5 in den Genotypen 3206 klein und ant5 (Abb. 5.46).

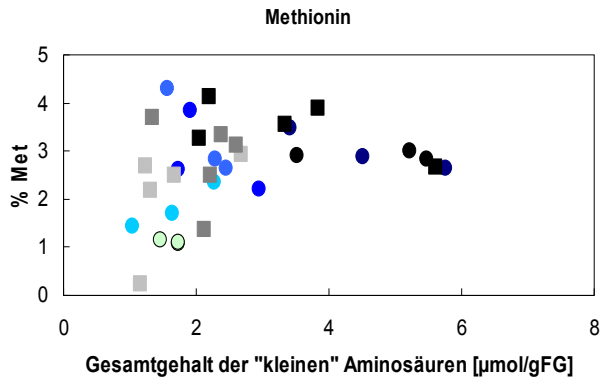


Abb. 5.46: Prozentualer Anteil an Methionin im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400µE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150µE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80µE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Der Anteil an **Lysin** im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren zeigt wie im Falle von Methionin einen leichten Aufwärtstrend in Pflanzen mit reduzierter Rubisco-Aktivität (Abb. 5.47).

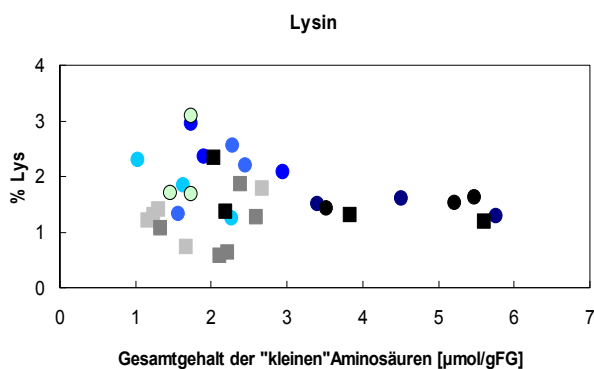


Abb. 5.47: Prozentualer Anteil an Lysin im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt der „kleinen“ Aminosäuren. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400µE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150µE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80µE (■). (●) symbolisieren die Daten aus der Charakterisierung der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

Es kann jedoch bei keinem der Mitglieder der Aspartatfamilie zwischen einer spezifischen Antwort auf eine der beiden Kohlenstofflimitierungen unterschieden werden, da in allen Fällen nur schwache Antworten zu beobachten sind. Interessanterweise zeigt Isoleucin verhältnismäßig stabile Anteile in allen Pflanzen mit reduziertem Kohlenstoffstatus (*siehe Anhang*).

5.2.2.5.4 Zusammenstellung der Ergebnisse aus Kapitel 5.2.2.5.2 und 5.2.2.5.3

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der beiden vorangegangenen Kapitel noch einmal zusammenfassend dargestellt werden. Es erfolgt eine tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse der Verhältnisanalyse aller Aminosäuren. Die Aminosäuren, die nicht in den beiden vorangegangenen Kapiteln dargestellt wurden, können im Anhang eingesehen werden. In der Regel zeigen sie keine bzw. keine eindeutige Reaktion auf reduzierten Kohlenstoff- und Stickstoffstatus der Pflanzen. Die Veränderungen der Anteile der individuellen Aminosäure werden in der Tabelle über Pfeile dargestellt. Sinkende Anteile werden symbolisiert über einen nach unten gerichteten Pfeil, steigende Anteile über einen aufwärts zeigenden Pfeil. Gestrichelte Pfeile deuten Trends und keine deutlichen Antworten an. Für diese Aminosäuren konnten keine eindeutigen Aussagen aufgrund zu geringer Anzahl an Datenpunkten oder hoher Variabilität getroffen werden (*siehe Anhang*).

	<i>Effekt hervorgerufen durch reduzierten Stickstoffstatus</i>	<i>Effekt hervorgerufen durch Nitrat</i>	<i>Effekt hervorgerufen durch Niedrig-Licht</i>	<i>Effekt hervorgerufen durch reduzierte Rubisco-Aktivität</i>	<i>Diurnaler Effekt (Nacht)</i>	<i>Andere Beobachtung</i>
Gln	↓	↓	-	↑	-	-
Glu	↑	-	-	↓	-	-
Asn	-	↓	↑	↑	↑ (nur WT 12 mM KNO ₃)	↑(ant5)
Asp	-	-	↑	-	↑	-
Gly	↓	↓	↓	↓	↓	-
Ser	-	-	-	↓	-	-
Ala	↓	↑	↓	↓	↓	-
Thr	↑	↓	↑	↑ (ant5)	-	-
Met	-	-	↓	↓ (ant5)	-	-
Ile	↑	-	-	-	-	↑ in NIA 0.2mM KNO ₃
Lys	↑	-	-	↑	-	-
Arg	↓	↓	-	↓ (ant5)	-	-
Cit	↓ (Nia)	-	-	↓ (ant5)	-	-
His	↓	↓	-	↑ (ant3)	-	-
Val	-	-	-	↑ (ant3)	-	-
Leu	↑	↓	-	↑ (ant3)	-	-
Phe	↓	↑	↓	↓	↓	-
Tyr	-	-	↓	↓	-	-
Trp	-	-	↓	↓	-	-

Tabelle 5.8: Zusammenstellung der individuellen Antworten aller Aminosäuren auf einen reduzierten Kohlenstoff- und Stickstoffstatus. Dargestellt werden die Antworten durch Pfeile. Ein aufwärts zeigender Pfeil (↑) symbolisiert steigende Anteil im Verhältnis zu den anderen Aminosäuren bzw. den anderen „kleinen“ Aminosäuren und ein nach unten gerichteter Pfeil (↓) sinkende Anteile der entsprechenden Aminosäure. Ein gestrichelter aufwärts zeigender Pfeil (↑) deutet einen Trend steigender Anteile der entsprechenden Aminosäure an, ein fallender gestrichelter Pfeil (↓) den Trend fallender Anteile der entsprechenden Aminosäure.

Glutamat zeigt generell steigende Anteile bei reduziertem Kohlenstoff- und Stickstoffstatus. Dies resultiert wahrscheinlich aus den relativ stabilen absoluten Konzentrationen in allen Genotypen, während die Gesamtaminosäuren in Genotypen mit reduziertem Kohlenstoff- bzw. Stickstoffstatus fallen. Lediglich in den anti-*rbcS* Pflanzen sinkt der Glutamatanteil.

Glutamin zeigt generell sinkende Anteile bei reduziertem Stickstoffstatus. In den anti-*rbcS* Genotypen steigen die Glutaminanteile.

Aspartat zeigt relativ stabile Anteile bei reduziertem Stickstoffstatus. Die Anteile steigen aber bei Kohlenstoffmangel hervorgerufen durch niedrige Lichtstärke und während der Nacht.

Asparagin deutet sinkende Anteile hervorgerufen durch einen nitratspezifischen Effekt an. Tendenziell steigen die Asparaginanteile bei reduziertem Kohlenstoffstatus, deutlich jedoch nur in extremen Bedingungen. In Pflanzen gewachsen unter ausreichender Stickstoffversorgung zeigen die Asparaginanteile diurnale Schwankungen.

Glycin zeigt generell fallende Anteile in Pflanzen mit reduziertem Kohlenstoff- und Stickstoffstatus. Dabei deutet sich eine nitratspezifische Abnahme an und eine eindeutige Antwort auf diurnale Rhythmen. Serinanteile zeigen sich in fast allen Bedingungen im Vergleich zu den Glycinanteilen erstaunlich stabil.

Alanin zeigt tendenziell fallende Anteile in Pflanzen mit reduziertem Kohlenstoff- und Stickstoffstatus. Es deutet sich ein nitratspezifischer Effekt an. Die diurnale Antwort der Alaninanteile ist nur in Genotypen mit ausreichendem Stickstoffstatus konsistent.

Die **aromatischen Aminosäuren** zeigen fallende Anteile bei reduziertem Kohlenstoffstatus. **Phenylalanin** zeigt als einzige Aminosäure dieser Familie reduzierte Anteile als Antwort auf einen reduzierten Stickstoffstatus und deutet einen nitratspezifischen Effekt auf die Biosynthese an. Phenylalaninanteile zeigen auch eine klare individuelle Antwort auf den diurnalen Rhythmus mit einer Abnahme während der Nacht.

Jede einzelne Aminosäure der **Aspartatfamilie** zeigt ihre individuelle Reaktion auf reduzierten Kohlenstoff- oder Stickstoffstatus der Pflanzen. **Threoninanteile** steigen tendenziell relativ zu den anderen „kleinen“ Aminosäuren, wenn diese durch reduzierten Kohlenstoff- und Stickstoffstatus fallen und deuten einen nitratspezifischen Effekt auf die Biosynthese an. **Methionin** hat stabile Anteile in Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus und tendenziell sinkende Anteile bei Kohlenstoffmangel. **Isoleucin** zeigt steigende Anteile bei niedrigem Stickstoffstatus, besonders in den nitratverhungerten Nia30(145). Dies ist wahrscheinlich eine Folge der nicht signifikant erniedrigten absoluten Konzentrationen dieser Aminosäuren in den Genotypen, deren Gesamtaminosäuregehalt aufgrund eines reduzierten Stickstoffstatus fällt. **Lysinanteile** steigen bei reduziertem Stickstoffstatus und zeigen diesen Trend auch tendenziell in Pflanzen mit reduziertem Kohlenstoffstatus.

Arginin, Citrullin und Histidin weisen generell sinkende Anteile in Genotypen mit reduziertem Stickstoffstatus auf. Die sinkenden Anteile von Histidin deuten einen nitratspezifischen Effekt an.

Leucinanteile sinken bei hohen Nitratgehalten und deutet eine nitratspezifische Antwort an.

FAZIT

- Die Verhältnisanalyse dieses sehr komplexen Datensatzes bietet im Falle der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit, individuelles Verhalten einer speziellen Aminosäure in verschiedenen Bedingungen zu beschreiben. Das Abweichen von einem Normzustand kann Auskunft darüber geben, welche Einflüsse für diese Abweichung verantwortlich sind.
- Es hat sich gezeigt, dass einige Aminosäuren sehr individuell auf einen Abfall des Gesamtaminosäuregehaltes reagieren, der entweder durch Reduzierung des Stickstoff- oder Kohlenstoffstatus hervorgerufen wurde.
- Innerhalb dieser unterschiedlichen Antworten auf reduzierten Stickstoff- bzw. Kohlenstoffstatus können individuelle Reaktionen nitratspezifischen und lichtspezifischen Effekten und dem Energiestatus der Thylakoidmembran zugeordnet werden.
- Aminosäuren, die aufgrund ihres gemeinsamen Vorläufermoleküls oder ähnlicher Biosynthesewege zu einer Aminosäurefamilie zusammengefasst werden, zeigen generell keine ähnliche Antwort auf Stickstoff- oder Kohlenstoffmangel. Besonders deutlich konnte das in der Aspartatfamilie und den aromatischen Aminosäuren gezeigt werden.
- Die stickstoffreichen Aminosäuren Arginin, Histidin, Tryptophan, Glutamin und Asparagin zeigen fallende Anteile in Genotypen mit reduziertem Stickstoffstatus. Lysin zeigt in diesen Genotypen steigende Anteile. Das führt zu der Annahme, dass deren Biosynthese oder deren Verbrauch bei Stickstoffmangel individuell reguliert wird.
- Aspartat-, Asparagin-, Glycin-, Alanin- und Phenylalaninanteile zeigen deutliche diurnale Effekte. Die Unterscheidung der Daten in Tages- und Nachtproben lieferte keinen Aufschluss darüber, ob die Antworten der genannten Aminosäuren direkt oder indirekt durch Licht beeinflusst werden. Es deutet sich jedoch an, dass die steigenden Asparaginanteile während der Nacht auf die tageszeitliche Abnahme der Kohlenhydrate zurückzuführen ist.
- In Bezug auf die übergeordnete Fragestellung nach einer generell koordinierten Biosynthese der Aminosäuren zeigen die Ergebnisse der Verhältnisanalyse, dass einige Aminosäuren unter Mangelbedingungen ein verändertes Verhalten zum Normalzustand zeigen. Dies konnte für viele Hauptaminosäuren und für einige „kleine“ Aminosäuren gezeigt werden und lässt die Schlussfolgerung zu, dass deren Biosynthese unabhängig zu der der anderen Aminosäuren abläuft. Eine koordinierte Biosynthese trifft vielleicht für die Aminosäuren zu, die unter Mangelbedingungen keine Abweichung vom Normalzustand zeigen. Die Verhältnisanalyse bestätigt die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (PCA). Alle Aminosäuren, die in der PCA-Analyse einen hohen Eigenwert haben, zeigen in der Verhältnisanalyse in Mangelzuständen Abweichungen vom Normalzustand.
- Die Korrelationsanalyse gibt Hinweise darauf, dass sehr gute Korrelationen innerhalb aller kleinen Aminosäuren unter Normalbedingungen sich in Mangelzuständen signifikant verschlechtern. Die daraus gezogene Vermutung, dass sich in Mangelzuständen mögliche assoziierte Biosynthesewege innerhalb kleinen Aminosäuren unabhängig voneinander verhalten, konnte mit der Verhältnisanalyse bestärkt werden.

5.3 Identifizierung regulatorischer Interaktionen zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel

Ein maßgebliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, regulatorische Interaktionen zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanzen zu identifizieren. Viele Stoffwechselwege pflanzlicher Sekundärstoffe sind gut untersucht in Hinblick auf Funktion, Biosynthese und Regulation. Da lange angenommen wurde, dass sich eine Pflanze bei Bedarf aus dem Vorrat der Primärmetabolite bedient, um Sekundärstoffe zu synthetisieren, wurde wenig über eine mögliche Funktion der Primärmetabolite für die Regulation des Sekundärstoffwechsels nachgedacht. Die „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese von Coley et al. (1985) setzte sich als erste Hypothese mit dem Zusammenspiel zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel auseinander und besagt, dass bei Kohlenstoffverarmung vorzugsweise stickstoffreiche Sekundärmetabolite synthetisiert werden und umgekehrt. Die zahlreichen Untersuchungen zur Überprüfung dieser Hypothese liefern sowohl bestätigende als auch widerlegende Ergebnisse (*siehe Einleitung*). Wie einleitend beschrieben, resultiert die kontroverse Diskussion um die „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese wahrscheinlich aus der ungenügenden Dokumentation des Primärstoffwechsels sowohl in Kontroll-, als auch in Mangelbedingungen. Matt et al. (2002) beschrieb bereits die Änderungen des Alkaloids Nikotin und des Phenylpropanoids Chlorogensäure in kohlenstofflimitierten Tabakpflanzen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollen dazu dienen, einen Einfluss des Stickstoffstoffwechsels auf den Sekundärstoffwechsel nachzuweisen. Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv Gatersleben) mit unterschiedlicher Nitratversorgung wurden mit Nitratreduktase reduzierten Transformanten verglichen. Die genaue Dokumentation des Primärstoffwechsels fand bereit in *Kapitel 5.1 und 5.2* statt. Die in den folgenden Kapiteln vorgestellten Analysen wurden in den gleichen Pflanzen durchgeführt, die in *Kapitel 5.1 und 5.2* charakterisiert wurden. Das experimentelle System bietet die Möglichkeit Prozesse zu identifizieren, die entweder vom Stickstoffstatus der Pflanze abhängen oder von Nitrat an sich reguliert werden, da Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ große Mengen an Nitrat akkumuliert (*siehe Abb. 5.3*).

Die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit durchgeführte Weiterentwicklung einer HPLC-Methode ermöglichte eine Analyse von Phenylpropanoidintermediaten, der Endprodukte des Phenylpropanoidstoffwechsels Chlorogensäure und Rutin, sowie des Alkaloids Nikotin. Mikroarray Technik und quantitative RT-PCR ermöglichten Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene.

5.3.1 Nikotin

Im folgenden Kapitel werden die Konsequenzen einer veränderten Stickstoffversorgung für das Alkaloid Nikotin untersucht. Nikotin gilt als konstitutiv vorhandener Abwehrstoff in Tabakpflanzen, dessen Synthese bei Verwundung jedoch auf ein Vielfaches ansteigt (*siehe Einleitung Kapitel 3.4.1*). Diskutiert werden Nikotindaten aus den jüngsten vollexpandierten Blättern, da diese einem natürlichen Wirkungsort des Nikotins entsprechen.

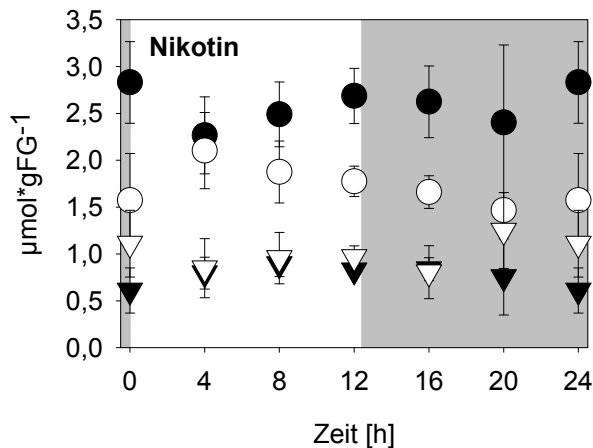


Abb. 5.48: Tagesgang von Nikotin im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen mit 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) gewachsen mit 0,2 mM KNO₃. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5. Die Analyse von Nikotin und der Primärmetabolite vorgestellt in Kapitel 5.1 und 5.2 fand in den gleichen Proben statt.

Die Nikotingehalte aller dargestellten Genotypen sind über den gesamten Tag relativ konstant. Man sieht jedoch einen Zusammenhang zwischen Nitratversorgung und Nikotingehalten in den Blättern. Während der gut nitratversorgte Wildtyp einen durchschnittlichen Nikotingehalt von $2,75 \mu\text{mol} \cdot \text{gFG}^{-1}$ zeigt, sind die der moderat NR reduzierten Transformante F23xNia30(145) leicht, aber signifikant reduziert. Genotypen mit einem drastisch reduzierten Stickstoffstatus (nitratverhungertes Wildtyp und Nia30(145)), zeigen beide gegenüber dem Kontrollwildtyp eine 3,6-fache Reduktion der Nikotingehalte (Abb. 5.48). Der Vergleich des nitratverhungerten Wildtyps und der Transformante Nia30(145) zeigt keinen Unterschied der Nikotingehalte im Blatt.

Die Nikotinbiosynthese findet in der Wurzel statt und wird über den Xylemstrom in die Blätter transportiert (*siehe Einleitung*). Abbildung 5.49 zeigt die Gehalte der beiden Vorläufermetabolite von Nikotin Arginin und Ornithin in der Wurzel. Keine der beiden Aminosäuren gemessen in der Wurzel zeigt einen ausgeprägten Tagesgang (*Daten nicht gezeigt*, siehe ebenfalls Scheible et al., 1997), aus diesem Grund werden die Gehalte als Mittel über den gesamten Tag dargestellt. Der Arginingehalt des Kontrollwildtyps ist im Vergleich zum verhungerten Wildtyp und der Transformante Nia30(145), gewachsen mit 12 mM KNO₃, höher (Abb. 5.49). Im Vergleich zur moderat betroffenen Transformante F23xNia30(145), ebenfalls gewachsen mit 12 mM KNO₃, zeigen sich die Arginingehalte des Kontrollwildtyps sogar erniedrigt (Abb. 5.49).

Die Ornithingehalte des Kontrollwildtyps, der moderat betroffenen Transformante F23xNia30(145) und der stark NR-defizienten Transformante Nia30(145), alle gewachsen mit 12 mM KNO₃, zeigen ähnliche Werte (Abb. 5.49). Lediglich die Gehalte des nitratverhungerten Wildtyps sind signifikant niedriger im Vergleich zum Kontrollwildtyp und der anderen Genotypen (Abb. 5.49).

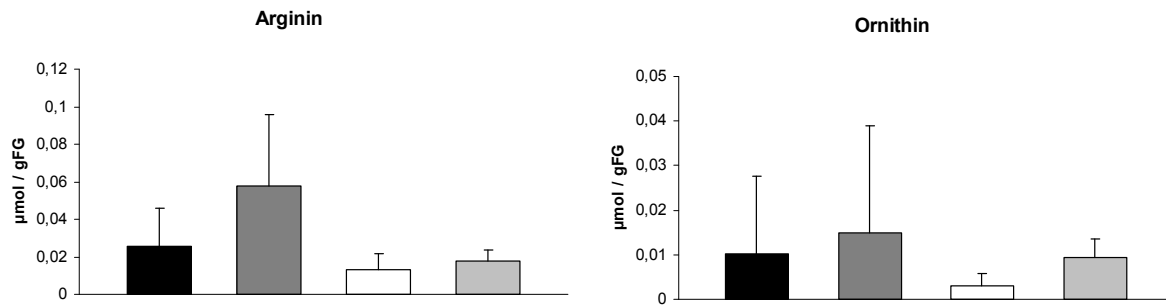


Abb. 5.49: Tagesgänge der Arginin- und Ornithingehalte in der Wurzel des Wildtyps (schwarz), F23xNia30(145) (dunkelgrau), Nia30(145) (hellgrau) gewachsen mit 12 mM KNO₃ und Wildtyp (weiss) gewachsen mit 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. (n = 30 – 42).

Die Reduktion der Nikotingehalte in den Blättern ist in den Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus wesentlich größer als die Reduktion der Vorläufermetabolite Arginin und Ornithin in der Wurzel. Dies gilt besonders für die Transformante Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃. Die Transformante F23xNia30(145) zeigt sogar tendenziell erhöhte Gehalte dieser beiden Aminosäuren. Das Ergebnis zeigt, dass die Abnahme von Nikotin nicht nur auf eine verringerte Konzentration der unmittelbaren Vorläufer zurückzuführen ist und deutet an, dass Pflanzen im Falle eines Stickstoffmangels Arginin und Ornithin bevorzugt in andere Stoffwechselprozesse neben der Nikotinbiosynthese einbindet.

5.3.2 Die Phenylpropanoide

Die zweite große Gruppe der Sekundärstoffe, die im Verlauf dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Gruppe der Phenylpropanoide. Ein großer Teil des fixierten Kohlenstoffs fließt in diese heterogene Sekundärstofffamilie. Ein direkter Zusammenhang dieser Gruppe mit der Stickstoffassimilation besteht in der Tatsache, dass der Vorläufer die proteinogene, aromatische Aminosäure Phenylalanin ist, deren Biosynthese im vorangegangenen Kapitel eine Abhängigkeit vom Stickstoff- und Kohlenstoffstatus der Pflanze zeigte. Manche Spezies verwenden alternativ Tyrosin. Phenylalanin wird durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) desaminiert und in Zimtsäure überführt. Das dadurch freigesetzte Ammonium geht umgehend durch den GOGAT/GS-Zyklus wieder in die Assimilation des Stickstoffs ein.

Durch die vorgenommenen Manipulationen des Stickstoffstoffwechsels sollten Metabolite und Prozesse identifiziert werden, die einen direkten Einfluss auf den Stoffwechselweg der Phenylpropanoide haben.

5.3.2.1 Bestimmung ausgewählter Phenylpropanoidmetabolite im Blatt

Gemessen wurden Intermediate des Phenylpropanoidstoffwechsels und die Endprodukte Chlorogensäure und Rutin. Lignifizierung wurde durch histologische Färbung der Stammquerschnitte untersucht.

Die Intermediate

Kaffeensäure entsteht durch die Hydroxylierung von p-Coumarsäure am Benzolring und stellt einen Vorläufer von Chlorogensäure (CGA) und der Monolignole dar. Die Analyse der Kaffeensäuregehalte im Blatt ergibt durchschnittlich einen 5-fachen Anstieg dieses Phenylpropan-Intermediats im verhungerten Wildtyp und der moderat betroffenen Transformante F23xNia30(145) im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Gut ernährter Wildtyp und Nia30(145) zeigen vergleichbare Gehalte (Abb. 5.50). Ein diurnaler Rhythmus der Kaffeensäuregehalte ist bei keinem der untersuchten Genotypen zu beobachten.

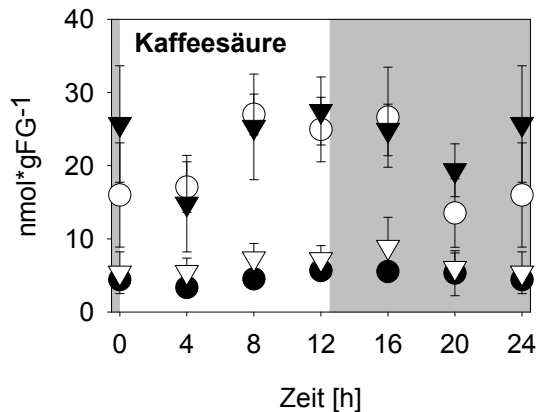


Abb. 5.50: Tagesgang der Kaffeensäuregehalte im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5. Die Analyse von Kaffeensäure und der in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Primärmetabolite fand in den gleichen Proben statt.

p-Coumarsäure entsteht durch die Hydroxylierung der Zimtsäure oder direkt durch die Desaminierung der proteinogenen Aminosäure Tyrosin durch das Enzym Tyrosin-Ammonium-Lyase (TAL). Bei p-Coumarsäure verzweigt sich der Phenylpropanstoffwechsel. Zum einen ist p-Coumarsäure Vorläufer der Kaffeensäure und der Monolignole und zum anderen steht es nach seiner Aktivierung dem Flavonoidstoffwechsel zur Verfügung. Es ist ebenso Vorläufermolekül der Coumarine, Stilbene und der Styrylpyrone. Frei vorliegende p-Coumarsäure ist im Blattgewebe in unseren Analysen nicht nachweisbar. Hauptsächlich ist p-Coumarsäure in der Zellwand und in lignifizierten Geweben gebunden (Jung und Ralph, 1990; Jung und Deetz, 1993). Dementsprechend konnte in der Analyse der Blattgewebe p-Coumarsäure nur in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden.

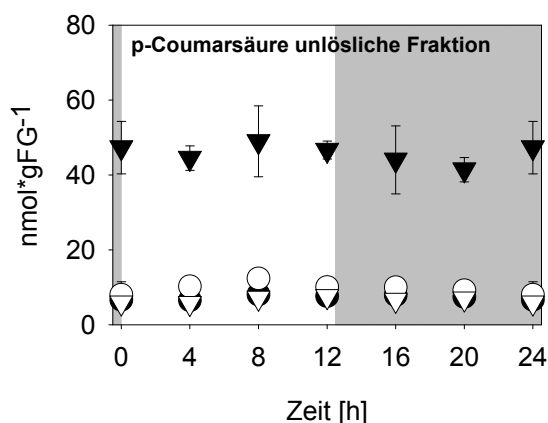


Abb. 5.51A: Tagesgang der p-Coumarsäuregehalte im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5. Die Analyse von p-Coumarsäure und der in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Primärmetabolite fand in den gleichen Proben statt.

Hier zeichnet sich ebenfalls ein eindeutiges Bild ab. p-Coumarsäuregehalte im verhungerten Wildtyp zeigen einen 5-fachen Anstieg im Vergleich zum Kontrollwildtyp und der anderen Genotypen (Abb. 5.51A). Wildtyp und Nia30(145), beide mit ausreichender Nitratversorgung, zeigen wieder ähnliche Gehalte (Abb. 5.51B). Die moderat betroffene NR-Transformante F23xNia30(145) zeigt tendenziell höhere Gehalte. Aufgrund der Standardabweichung kann hier jedoch nicht von einem signifikanten Anstieg gesprochen werden (Abb. 5.51B).

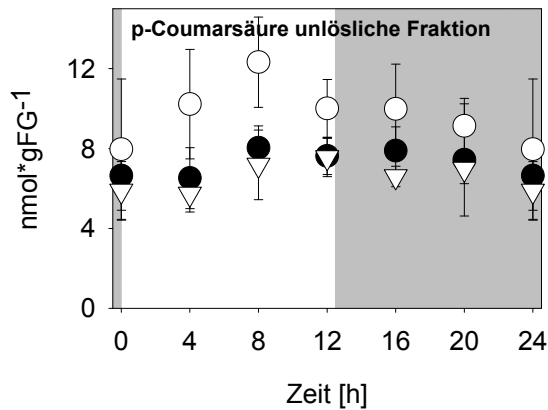


Abb. 5.51B: Tagesgang der p-Coumarsäuregehalte im jüngsten vollexpandierten Blatt. Vergrößerung der **Abb. 5.51A** im Bereich von 0 bis 12 nmol*gFG⁻¹. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5. Die Analyse von p-Coumarsäure und der in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Primärmetabolite fand in den gleichen Proben statt.

p-Coumarsäure zeigt bei keinem der vorgestellten Genotypen einen ausgeprägten Tagesgang. Man sieht beim Kontrollwildtyp, F23xNia30(145) und der Nia30(145) einen leichten Anstieg in der ersten Hälfte des Tages und einen darauf folgenden Abstieg in der zweiten Hälfte des Tages, welcher über die Dunkelperioden hin anhält. Der verhungerte Wildtyp hingegen zeigt diesen tendenziellen diurnalen Rhythmus nicht (Abb. 5.51A und B).

Ferulasäure entsteht durch die Hydroxylierung der Kaffeesäure und ist ebenfalls ein Vorläufer der Monolignole. In Tabakpflanzen stellt sie den Hauptteil der zellwandgebundenen Phenole dar (Baucher et al., 1998). Die vorliegende Analyse konnte Ferulasäure sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion nachweisen, wobei nur die Ferulasäuregehalte der unlöslichen Fraktion der zellwandgebundenen Ferulasäure zugeordnet werden kann.

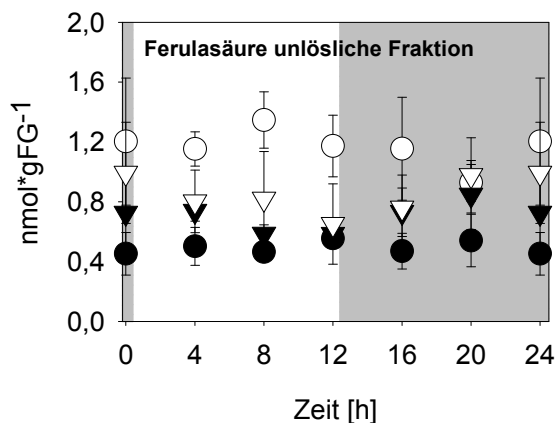


Abb. 5.52A: Tagesgang der Ferulasäuregehalte in der unlöslichen Fraktion im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) gewachsen in 0,2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5. Die Analyse von Ferulasäure und der in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Primärmetabolite fand in den gleichen Proben statt.

Die Wildtyppflanzen mit unterschiedlicher Nitratversorgung zeigen in der unlöslichen Fraktion ähnliche Ferulasäuregehalte. Die NR-defiziente Transformante Nia30(145) mit genügender Nitratversorgung zeigt zu diesen keinen nennenswerten Unterschied. Die moderat betroffene Transformante F23xNia30(145) zeigt tendenziell erhöhte Ferulasäuregehalte (Abb. 5.52A).

Die lösliche Fraktion der Ferulasäure zeichnet ein umgekehrtes Bild zu den bisherigen Ergebnissen. Der verhungerte Wildtyp hat 10-fach niedrigere Ferulasäuregehalte im Vergleich zum Kontrollwildtyp und den anderen beiden Genotypen (Abb. 5.52B). Erniedrigte frei vorliegende Ferulasäure im verhungerten Wildtyp könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei diesen Pflanzen die Ferulasäure vermehrt in Monolignole umgewandelt wird und somit verstärkt an der Lignifizierung der sekundären Zellwand im Stammleitgewebe beteiligt ist. Dies setzt allerdings einen Transport frei vorliegender Ferulasäure oder den Transport bereits synthetisierter Monolignole voraus.

Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 hat tendenziell niedrigere Ferulasäuregehalte im Vergleich zum Kontrollwildtyp (Abb. 5.52B). Diese Tendenz konnte in einem unabhängigen Gewächshausexperiment bestätigt werden (siehe Tabelle 5.9 am Ende diese Kapitels). Die moderat betroffene Transformante F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 zeigt keinerlei Unterschied im Vergleich zum Kontrollwildtyp (Abb. 5.52B). Dies konnte ebenfalls in einem unabhängigen Gewächshausexperiment bestätigt werden (siehe Tabelle 5.9 am Ende diese Kapitels). Weder frei vorliegende, noch zellwandgebundene Ferulasäure zeigen einen ausgeprägten Tagesgang (Abb. 5.52A und B).

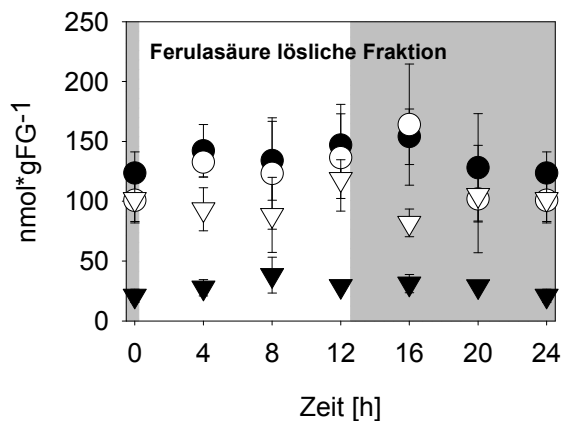


Abb. 5.52B: Tagesgang der Ferulasäuregehalte in der löslichen Fraktion im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO_3 und Wildtyp (▼) gewachsen in 0.2 mM KNO_3 . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. $n = 5$. Die Analyse von Ferulasäure und der in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Primärmetabolite fand in den gleichen Proben statt.

Benzoessäure entsteht durch Decarboxylierung der Zimtsäure. In Tabakpflanzen ist es der Vorläufer von Salicylsäure (Yalpani, 1993). Ebenso wie Salicylsäure wird es aufgrund seiner mikrobiellen Eigenschaften als Abwehrstoff der Pflanze diskutiert (Raskin, 1992; Klessig und Malamy, 1994; Hommond-Kosack und Jones, 1995). Benzoessäure und auch Salicylsäure sind keine Phenylpropanoide. Benzoessäure wird dennoch in diesem Kapitel vorgestellt, da es ein Intermediat der Salicylsäuresynthese ist und aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel hervorgeht. Es ist interessant zu erfahren, ob sich Metabolite, die direkt aus den Phenylpropanoidstoffwechsel hervorgehen und deren Biosynthese abhängig von diesem ist, ein ähnliches Verhalten in den vorgestellten Genotypen zeigen, wie die Intermediate bzw. auch die Endprodukte der Phenylpropanoide.

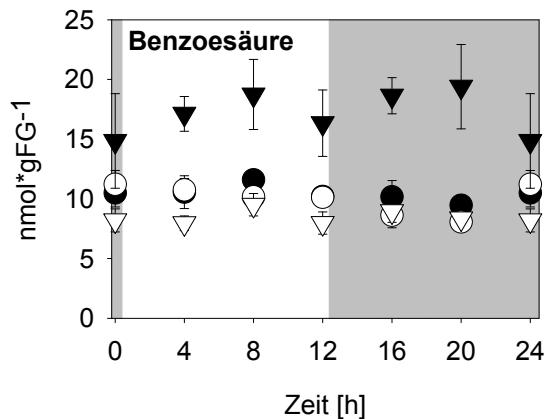


Abb. 5.53: Tagesgang der Benzooesäuregehalte im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5. Die Analyse von Benzooesäure und der in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Primärmetabolite fand in den gleichen Proben statt.

Wildtyp, F23xNia30(145) und Nia30(145) versorgt mit 12 mM KNO₃ zeigen alle vergleichbare Benzooesäuregehalte im Blatt. Der verhungerte Wildtyp zeigt im Vergleich zu den anderen Genotypen einen 1.8-fachen Anstieg der Gehalte an Benzooesäure im Blatt (Abb. 5.53). Dieser tendenzielle Anstieg von Benzooesäure deutet an, dass sich der bei den Phenylpropanoidintermediaten gefundene Trend auch in Metaboliten zeigt, die von diesem Stoffwechselweg abzweigen. Es ist kein deutlich ausgeprägter Tagesgang ersichtlich (Abb. 5.53). Salicylsäure lieferte mit der verwendeten Analyseverfahren keine zuverlässigen Ergebnisse (*Daten nicht gezeigt*).

Die Endprodukte

Chlorogensäure (CGA) entsteht durch den Zusammenschluss von Kaffeesäure und Chinasäure durch das Enzym Hydroxycinnamoyl-CoA Quinat:Hydroxycinnamoyl Transferase (HQT). In Solanaceae ist CGA mengenmäßig das häufigste auftretende lösliche Phenylpropanoid. Chlorogensäure agiert in Pflanzenzellen als Antioxidans (Rice-Evans, 1997; Daniels, 1967) und schützt sie unter anderem gegen Lipidperoxidation (Tamagnone et al., 1998). Beispielsweise neigen Pflanzen mit reduzierter CGA-Akkumulation zu beschleunigtem Zelltod in ausgewachsenen Blättern und zu signifikant erhöhten Gehalten an oxidierten Lipidmalondialdehyden (Tamagnone et al., 1998), einem Indikator für Membranschäden.

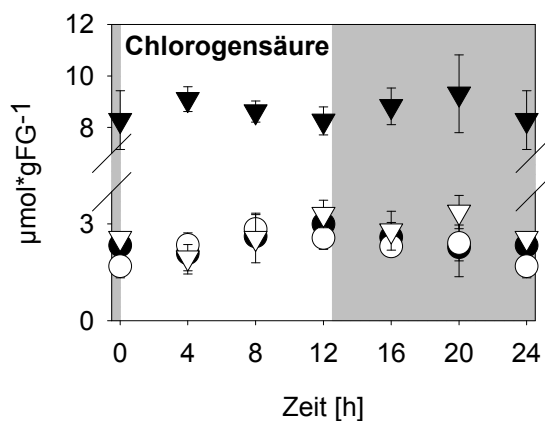


Abb. 5.54: Tagesgang der Chlorogensäuregehalte im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) gewachsen in 0.2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5. Die Analyse von Chlorogensäure und der in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Primärmetabolite fand in den gleichen Proben statt.

Die gezeigten CGA-Gehalte spiegeln das Bild der Phenylpropanoidintermediate wieder. Der nitratmangelernährte Wildtyp zeigt im Vergleich zum Kontrollwildtyp und der beiden anderen Genotypen mit herabgesetztem Stickstoffstatus 3-fach erhöhte CGA-Gehalte (Abb. 5.54). Ein ausgeprägter Tagesgang der CGA-Gehalte im Blatt kann nicht festgestellt werden. Tendenziell erhöhen sich die CGA-Werte zum Ende des Tages hin und fallen während der Dunkelperiode wieder ab. Dies kann man beim Wildtyp, F23xNia30(145) und der Nia30(145), alle gewachsen mit 12 mM KNO_3 , beobachten. Der verhungerte Wildtyp dagegen zeigt eine entgegengesetzte Tendenz. CGA steigt in der ersten Hälfte des Tages an, fällt in der zweiten Hälfte ab, um dann während der Dunkelperiode wieder leicht anzusteigen und dann am Ende der Nacht auf ein Minimum abzusinken (Abb. 5.54).

Rutin ist biochemisch gesehen ein glykolisiertes Quercetin, also ein Flavonoid und wurde in mehreren Pflanzenspezies nachgewiesen. Es agiert ebenfalls wie Chlorogensäure als Antioxidans und schützt die Pflanzenzelle vor allem vor Lipidperoxidation.

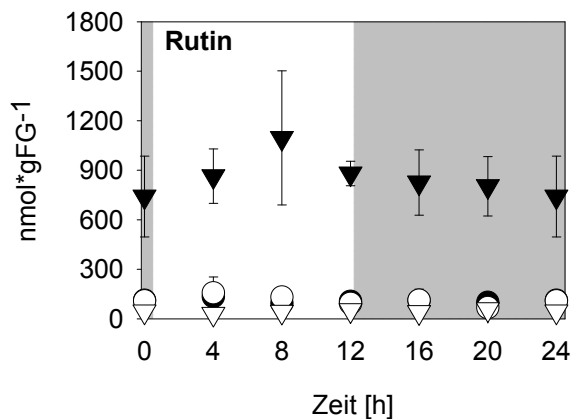


Abb. 5.55A: Tagesgang der Rutingehalte im jüngsten vollexpandierten Blatt. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO_3 und Wildtyp (▼) gewachsen in 0,2 mM KNO_3 . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. $n = 5$. Die Analyse von Rutin und der in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Primärmetabolite fand in den gleichen Proben statt.

Rutingehalte der Blätter im verhungerten Wildtyp zeigen im Vergleich zum Kontrollwildtyp und der F23xNia30(145), beide gewachsen mit 12 mM KNO_3 , einen Anstieg um den Faktor 7 (Abb. 5.55A und B). Wesentlich drastischer ist der Unterschied zwischen dem verhungerten Wildtyp und der nahezu NR-defizienten Transformante Nia30(145). In diesem Fall hat der verhungerte Wildtyp um den Faktor 17 erhöhte Rutingehalte (Abb. 5.55A und B).

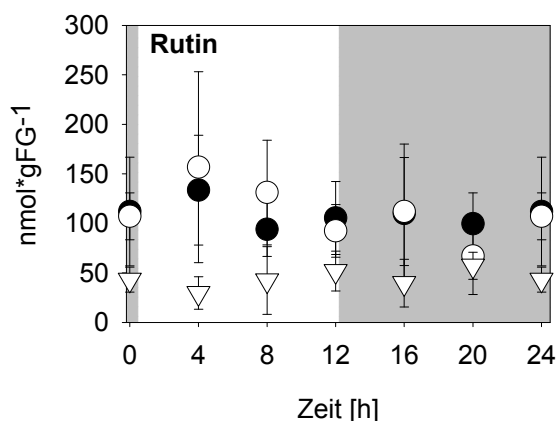


Abb. 5.55B: Tagesgangs der Rutingehalte im jüngsten vollexpandierten Blatt. Vergrößerung der Abb. 5.55A im Bereich von 0 bis 300 $\text{nmol} \cdot \text{gFG}^{-1}$. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO_3 . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. $n = 5$. Die Analyse von Rutin und der in Kapitel 5.1 und 5.2 vorgestellten Primärmetabolite fand in den gleichen Proben statt.

Abb. 5.55B zeigt deutlich, dass auch hier alle Genotypen nur einen tendenziellen und keinen speziell ausgeprägten diurnalen Rhythmus haben. Rutin steigt beim Wildtyp und der F23xNia30(145) nach 4 Stunden Licht an und sinkt während der zweiten Hälfte des Tages ab und ändert sich nicht mehr während der Dunkelperiode (Abb. 5.55B). Nia30(145) zeigt keinerlei tendenzielle Änderungen der Rutingehalte während des gesamten Tages. Der Wildtyp, gewachsen mit 0.2 mM KNO₃, hat im Vergleich zum oben beschriebenen, tendenziellen Tagesgang ein verschobenes Tagesmaximum, welches nach 8 Stunden Licht beobachtet werden kann. Danach sinkt der Rutingehalt und verbleibt dort auch während der Dunkelperiode (Abb. 5.55A).

Zur Bestätigung aller Ergebnisse wurde ein Folgeexperiment im Gewächshaus durchgeführt, in welchem die Pflanzen auf Erde wuchsen. Nitratmangel wurde durch wachsen der Pflanze auf Erde gewährleistet, die keine Stickstoffquelle enthielt. Die Pflanzen wurden alle 3 Tage mit einer Nährlösung gegossen, die Nitrat als einzige Stickstoffquelle enthielt (*siehe Kapitel 4.2.3 in Material und Methoden*). Aufgrund der Tatsache, dass in den gemessenen Phenylpropanoiden kein auffälliger Tagesgang zu beobachten war, fand die Ernte dieses Experimentes nur zu einem Zeitpunkt in der zweiten Hälfte des Tages statt. Die Ergebnisse in Tabelle 5.9 zeigen, dass fast alle bisher beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden konnten, obwohl die Gehalte allgemein betrachtet zwischen diese beiden Experimenten variieren. Chlorogensäure zeigt nur noch eine 2-fache Erhöhung. Der nitratverhungerte Wildtyp zeigt keine erhöhten Benzoessäuregehalte verglichen mit der Kontrolle und den anderen Genotypen. Rutin dagegen ist leicht erhöht in Pflanzen, die im Gewächshaus gewachsen sind. Die erhöhten Kaffeesäuregehalte im Blatt der moderat betroffenen Transformante F23xNia30(145) konnten ebenfalls bestätigt werden, jedoch lediglich um den Faktor 2. Diese Varianzen sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen beider Experimente zurückzuführen, z.B. sind die Lichtverhältnissen und die Intensität des UV-Lichts im Gewächshaus niedriger.

Genotyp	N	Nikotin	CGA	Kaffeesre.	Rutin	p-Coumarsre. (unlsl.)	Ferulasre. (lsl.)	Ferulasre. (unlsl.)	Benzoesre.
WT (Gat.)	12mM	1.0±0.2	0.7±0.1	3.2±0.6	32.6±3.5	5.5±1	83±10	0.5±0.08	12±1.5
WT (Gat.)	0.2mM	0.6±0.1	1.6±0.2	37.1±4	982±257	32±3.6	38±5	0.7±0.1	13±1
F23xNia30(145)	12mM	0.8±0.1	0.7±0.1	6.2±1.5	53±13	5±1.6	81±13	0.5±0.2	13±0.7
Nia30(145)	12mM	0.2±0.1	0.3±0.02	2.8±0.3	16±7	4.7±1	41±19	0.4±0.04	12±1.4

Tabelle 5.9: Zusammenstellung aller Werte des Nachfolgeexperimentes im Gewächshaus. Die Pflanzen wuchsen auf Erde. Genotypen mit Nitratmangel wuchsen auf Nullerde, die keinerlei Stickstoffquelle enthielt. Die Pflanze wurden alle 3 Tage mit entsprechender Nährlösung, die lediglich Kaliumnitrat enthielt, gegossen. Die Angabe für Nikotin und Chlorogensäure sind in $\mu\text{mol}\cdot\text{gFG}^{-1}$, die Angabe der restlichen Phenylpropanoidintermediate oder Endprodukte sind in $\text{nmol}\cdot\text{gFG}^{-1}$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von biologischen Replikaten ($n = 5$). Abkürzungen: WT = Wildtyp; Gat. = Gatersleben; N = Stickstoff; CGA = Chlorogensäure; unlsl. = unlöslich; lsl = löslich; Kaffeesre. = Kaffeesäure; p-Coumarsre. = p-Coumarsäure; Ferulasre. = Ferulasäure; Benzoesre. = Benzoessäure

Der Einfluss von Nitrat auf die Lignifizierung des Stammgewebes

Ligninvorstufen, die so genannten Monolignole, gehen aus der Reduktion der Intermediate des Phenylpropanstoffwechsels p-Coumar-, Ferula-, und Sinapinsäure hervor (Whetten und Sederoff, 1995; Boudet, 1998). Um die Auswirkungen dieser unter Nitratmangelernährung veränderten Intermediate auf die Lignifizierung des Stammgewebes zu untersuchen, wurden histologische Färbungen durchgeführt. Um ein physiologisch ähnliches Alter der sehr unterschiedlich wachsenden Pflanzen zu gewährleisten, wurden die Querschnitte an Pflanzen durchgeführt, die sich kurz vor der Blüte befanden. Um eine Variabilität der Lignifizierung aufgrund unterschiedlichen physiologischen Alters noch weiter einzugrenzen, wurden nur Schnitte des jüngsten Stammabschnittes verglichen.

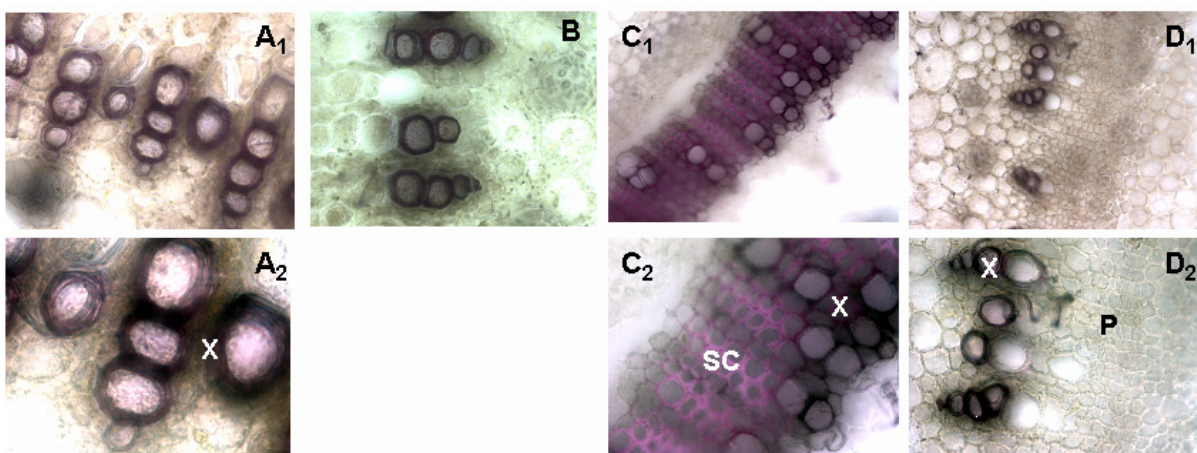


Abb. 5.56: Spezifische Färbung des Lignins im Stammgewebe mit Phloroglucinol/HCl. Aus den jüngsten Stammabschnitten wurden von Hand mit einer Rasierklinge dünne Schnitte angefertigt. Nach Behandlung mit Phloroglucinol/HCl-Lösung (5 Minuten Inkubationszeit), wurden die angefärbten Schnitte unter einem Lichtmikroskop untersucht. **(A)** Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 . A_1 = 20- fache Vergrößerung, A_2 = 40- fache Vergrößerung. **(B)** F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 ; 20-fache Vergrößerung. **(C)** Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 . C_1 = 20- fache Vergrößerung, C_2 = 40- fache Vergrößerung. **(D)** Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 . D_1 = 20- fache Vergrößerung, D_2 = 40- fache Vergrößerung. Abkürzungen: P = Parenchymzellen; SC = Sklerenchym; X = Xylemgefäß. Von jedem Genotyp wurden 5 – 7 Replikate angefertigt mit jeweils dem gleichen Ergebnis (*Daten nicht gezeigt*).

Die Lignifizierung des Leitgewebes des Wildtyps, der F23xNia30(145) und der Nia30(145), alle gewachsen mit 12 mM KNO_3 , zeigen ein ähnliches sekundäres Dickenwachstum bzw. Lignifizierung der Xylemelemente, spezieller der Tracheen. Der verhungerte Wildtyp dagegen zeigt sehr starke Lignifizierung des Xylemgewebes und des Phloemsklerenchyms in vergleichbaren Abschnitten des Stammes (Abb. 5.56).

Fazit

- Fast alle Intermediate des Phenylpropanoidstoffwechsels zeigen erhöhte Gehalte in den Blattzellen des nitratmangelernährten Wildtyps im Vergleich zu allen anderen Genotypen mit ausreichender Nitratapplikation. Ausnahme ist Ferulasäure der löslichen Fraktion. Diese zeigt wesentlich niedrigere Gehalte in den Blattzellen des nitratverhungerten Wildtyps im Vergleich zu den anderen Genotypen mit ausreichender Nitratapplikation. Eine weitere Ausnahme bildet die in der Zellwand gebundene Ferulasäure. Diese zeigt keinerlei Unterschied im Vergleich der untersuchten Genotypen und der verschiedenen Nitratbedingungen. Auch Benzoessäure, ein Intermediat der Salicylsäurebiosynthese, zeigt nur tendenziell erhöhte Gehalte in den Blattzellen des nitratverhungerten Wildtyps im Vergleich zu den anderen Genotypen mit ausreichender Nitratapplikation.
- Wichtige und mengenmäßig häufig vorkommende Endprodukte des Phenylpropanoidstoffwechsels in Tabakpflanzen, wie die vorgestellte Chlorogensäure und das Flavonoid Rutin, zeigen signifikant erhöhte Gehalte in nitratmangelernährten Wildtypen im Vergleich zu den anderen Genotypen mit ausreichender Nitratapplikation.
- Ausgeprägte diurnale Rhythmen sind bei keinem der untersuchten Metabolite zu erkennen.
- Die Lignifizierung des Leitgewebes ist in vergleichbaren Stammabschnitten in nitratmangelernährten Wildtypen wesentlich höher im Vergleich zu den Genotypen mit ausreichender Nitratapplikation.
- Die moderat NR-reduzierte Transformante F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ hat signifikant erhöhte Kaffeesäuregehalte im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Ansonsten zeigt dieser Genotyp ein dem Kontrollwildtyp vergleichbares Verhalten.
- Der Vergleich der Phenylpropanoidmetabolite des nitratverhungerten Wildtyps und der Nitrat akkumulierenden Transformante Nia30(145) geben einen starken Hinweis darauf, dass Nitrat einen regulatorischen Einfluss auf die Phenylpropanoidbiosynthese hat. Alle Effekte bezüglich der vorgestellten Metabolite des Phenylpropanoidstoffwechsel, die im nitratverhungerten Wildtyp beobachtet werden konnten, sind in den Genotypen Nia30(145) mit stark reduzierter NR-Aktivität unterdrückt. Diese Genotypen zeigen ein dem Kontrollwildtyp ähnliches Verhalten. Da der organische Kohlenstoff- und Stickstoffstatus des nitratverhungerten Wildtyps und der *NIA*-Transformante vergleichbar ist und es in den Nia30(145) zu einer Nitratakkumulation kommt, kann der oben genannte Schluss gezogen werden.

5.3.3 Identifizierung der regulatorischen Ebene des Nitrats auf den Phenylpropanoidstoffwechsel

Die im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Metabolite des Phenylpropanoidstoffwechsels zeigen deutlich, dass ein hoher Nitratspiegel in der Zelle eine Abnahme der Phenylpropanoidintermediate, dessen Endprodukte und der Lignifizierung des Stammleitgewebes zur Folge hat. Nitrat spielt demnach eine regulatorische Rolle im Phenylpropanoidstoffwechsel.

In diesem Kapitel wird die Identifizierung möglicher regulatorischer Ebenen des Nitrats untersucht. Nitrat kann auf unterschiedliche Weise einen Einfluss ausüben.

Denkbar ist

- ein direkter Einfluss auf die Verfügbarkeit der Vorläufermoleküle Phenylalanin und Tyrosin, aus deren Desaminierung durch die PAL bzw. TAL Zimtsäure bzw. p-Coumarsäure entsteht. Es ist allgemein akzeptiert, dass diese Desaminierung der Vorläufermoleküle der geschwindigkeitsbestimmende und regulatorische Schritt in der Phenylpropanoidbiosynthese ist (*siehe Einleitung*).
- der Einfluss von Nitrat auf die Transkription der für den Phenylpropanoidstoffwechsel verantwortlichen Gene direkt oder auf die entsprechenden Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren könnte Nitrat eine Rolle bei einer möglichen posttranslationalen Regulation der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme PAL und TAL innehaben.

5.3.3.1 Bestimmung von Phenylalanin

Phenylalanin ist von beiden möglichen Synthesewegen im Phenylpropanoidstoffwechsel in den meisten Spezies der bevorzugte Vorläufer. Dies gilt auch für Tabak.

Die Phenylalaninergehalte im Blatt aller Genotypen zeigen folgendes Bild, welches in *Kapitel 5.2* Abbildung 5.57A bereits genau beschrieben wurde:

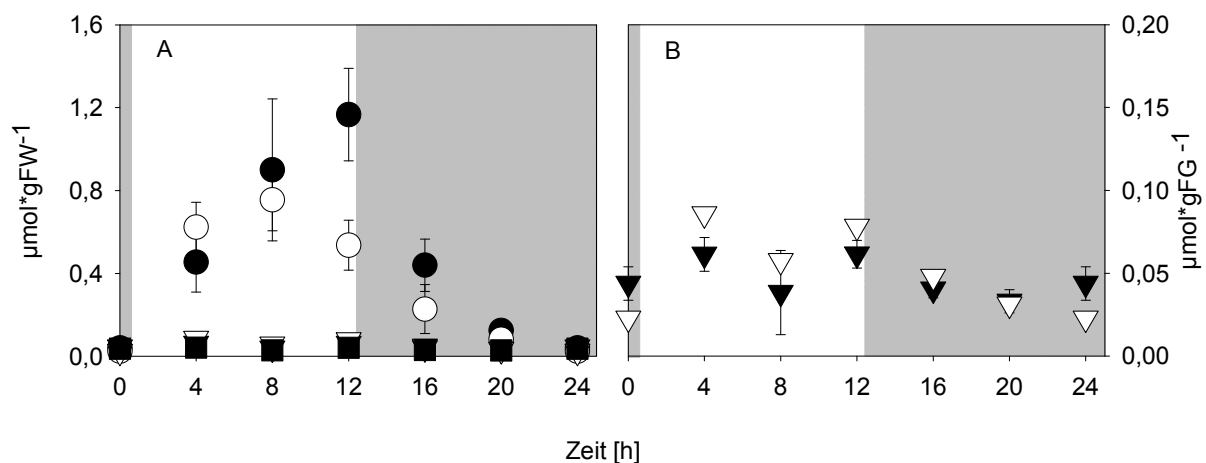


Abb. 5.57A und B: (A) Tagesgang von Phenylalanin im jüngsten vollexpandierten Blatt. (B) Vergrößerung von (A) im Bereich von 0 bis 0,2 µmol*gFG⁻¹. Die grauen Bereiche symbolisieren die Nacht. Dargestellt sind Wildtyp (●), F23xNia30(145) (○), Nia30(145) (▽) gewachsen in 12 mM KNO₃ und Wildtyp (▼) gewachsen in 0,2 mM KNO₃. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 5.

Im Zusammenhang mit der oben genannten Fragestellung, ob Nitrat einen Einfluss auf die Biosynthese des Vorläufermoleküls Phenylalanin und damit indirekt Einfluss auf die Phenylpropanoidbiosynthese hat, zeigt Abbildung 5.57A deutlich, dass die Phenylalaninergehalte der Blätter des Wildtyps, gewachsen mit 12 mM KNO₃, höher sind als die des nitratverhungerten Wildtyps zu fast allen Tageszeitpunkten. Die Phenylpropanoidgehalte im nitratverhungerten Wildtyp sind jedoch höher verglichen mit dem Wildtyp gewachsen mit hoher Nitratapplikation.

Abbildung 5.57B zeigt, dass die Phenylalaningehalte der stark NR-defizienten Transformante Nia30(145) im Vergleich zum nitratverhungerten Wildtyp nicht erniedrigt sind. Die Phenylpropanoide der Nia30(145) sind es jedoch. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass eine Veränderung in der Verfügbarkeit von Phenylalanin nicht für die Verringerung der Phenylpropanoide verantwortlich ist.

5.3.3.2 Transkriptmessung durch Oligomikroarrays

Zur Überprüfung der oben genannten Annahme, ob Nitrat einen Einfluss auf die Expression von Genen des Phenylpropanoidstoffwechsels hat, wurde zunächst eine Mikroarray-Analyse durchgeführt, um eine Übersicht über die Expression von 400 Genen hauptsächlich aus dem Sekundärstoffwechsel zu erhalten. In einer Hybridisierung wurde Wildtyp ernährt mit 12 mM KNO_3 verglichen mit Wildtyp ernährt mit 0.2 mM KNO_3 . In einer weiteren Hybridisierung wurde Wildtyp ernährt mit 12 mM KNO_3 verglichen mit der Nitrat akkumulierenden Transformante Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO_3 . Die Blattproben wurden aus jeweils 5 verschiedenen Pflanzen zusammengestellt. Um einen möglichen repressiven Effekt von Nitrat soweit wie möglich auszuschließen, wurde Blattmaterial kurz nach der täglichen Nitratapplikation, also nach 4 Stunden Licht geerntet. Die nach der Hybridisierung erhaltenen Expressionssignale wurden einer Quantil-Normalisierung unterzogen. Änderungen der Genexpressionen wurden relativ zur Kontrollpflanze (Wildtyp ernährt mit 12 mM KNO_3) dargestellt. Die Ergebnisse technischer Replikate wurden gemittelt und in eine \log_2 Skala überführt. Die Expressionsdaten auf Basis der \log_2 Skala wurden durch die MapMan Software (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2005; <http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan>) dargestellt. Jedes farbcodierte Rechteck in Abbildung 5.58A und Abbildung 5.58B symbolisiert ein Oligonukleotid codierend für ein Gen auf dem Array. Die Rechtecke bzw. Transkriptsignale sind, entsprechend ihrer Funktion, in einer Stoffwechselkarte angeordnet. Weiß bedeutet, dass die Expression sich nicht ändert, rot stellt eine verringerte Expression dar und blau einen Anstieg der Expression im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Zur farbcodierten Darstellung in der MapMan-Software wurde eine Skala von 1.5 gewählt. Signale um 1.5 auf der logarithmischen Skala (entspricht einer mehr als 3-fachen Änderung im Vergleich zur Kontrolle) sind gesättigt und Signale mit einem Wert von 0.3 sind optisch nicht mehr von denen zu unterscheiden, die keine Änderung aufweisen (also einen Wert von 0 auf der Skala haben und als weiß dargestellt werden).

Änderungen der Transkripte des Phenylpropanoidstoffwechsels spezifisch hervorgerufen durch Nitrat

Der verhungerte Wildtyp zeigt gegenüber dem Kontrollwildtyp bei einigen Transkripten des Phenylpropanoidstoffwechsels eindeutige Erhöhungen. Bei den mit blau gekennzeichneten Transkripten handelt es sich um Signale der Transkripte von *PAL* (AW219744, BE462826, TC84666, TC84677), *C4H* (TC93956) und *4Cl* (AW031547) (Abb. 5.58A). Ein genauer Homologieabgleich in der Arabidopsisdatenbank ergab, dass es sich bei den Signalen für *PAL* wahrscheinlich um die beiden in Tabak bekannten Isoformen *PAL-1* und *PAL-2* (Nagai et al., 1994; Pellegrini et al., 1994) handelt. Bei dem Signal für *4CL* ergaben die Homologiestudien, dass es sich wahrscheinlich um die Isoform 2 aus Tabak handelt. Eine Erniedrigung gegenüber dem Wildtyp zeigt ein Transkript aus dem Flavonoidstoffwechsels, das Homologien zu

einer putativen Anthocyanidin-3-glucoside Rhamnosyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* (BE462756) hat.

Des Weiteren können leichte Erhöhungen zweier Transkripte des Isoprenoidstoffwechsels beobachtet werden. Es handelt sich hierbei um eine Karotinoid-Dioxygenase (TC86454) und ein Transkript mit Homologien zu einer Phytoen-Dehydrogenase (TC90536). Eine putative Terpensynthase (AW617523) und eine β -Karotenhydroxylase (TC85496) zeigen leicht erniedrigte Expression im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Transketolase (BE096424) aus dem oxidativen Pentosephosphatweg bzw. aus dem Calvinzyklus hat ebenfalls im Vergleich zum gut ernährten Wildtyp eine reduzierte Expression. Die Glycin-Dehydrogenase (TC85196) aus dem Aminosäurekatabolismus dagegen zeigt eine induzierte Expression im nitratverhungerten Wildtyp. Die Hybridisierung des Mikorarrays ergab keine Änderungen der Transkripte, deren Gene dem Shikimatweg bzw. der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren zugeordnet sind.

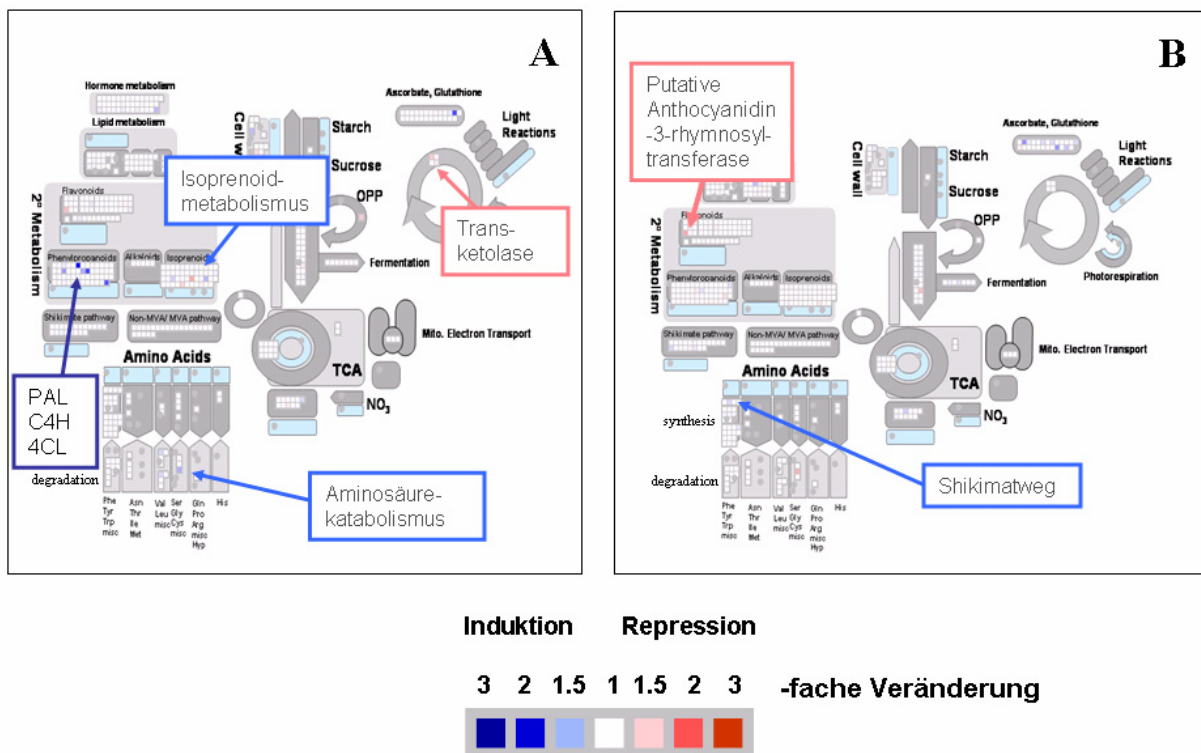


Abb. 5.58: Transkriptprofile der Versuchspflanzen hergestellt mit einem Oligomikroarray mit 1154 Gensequenzen, die speziell dem Phenylpropanoidstoffwechsel und verwandten Prozessen zugeordnet sind. Ausgewählt wurden die Gensequenzen durch eine spezifische „BLAST“-Suche in den momentan zur Verfügung stehenden Gendatenbanken (NCBI, TIGR, TAIR, Arabidopsisdatenbank). **(A)** Dargestellt sind die Änderungen der Transkription des nitratverhungerten Wildtyps im Vergleich zum Kontrollwildtyp auf einer Stoffwechselkarte. **(B)** Dargestellt sind die Änderungen der Transkription der nahezu NRA-defizienten Transformante Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 im Vergleich zum Kontrollwildtyp auf einer Stoffwechselkarte. Jedes Gen stellt ein Rechteck dar, welches bezüglich seiner Funktion in der Stoffwechselkarte angeordnet ist. Weiss bedeutet keinerlei veränderte Expression, Rot eine verringerte Expression und Blau eine induzierte Expression. Die Originaldaten wurden auf einer \log_2 Skala mit Hilfe der MapMan-Software dargestellt. Es wurde innerhalb der MapMan-Software eine Skala mit dem Wert 1.5 gewählt. Daraus ergibt sich oben dargestellte Farbcodierung.

Die stark NR-reduzierte Transformante Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ zeigt keinerlei signifikante Änderungen der Transkripte bezüglich des Phenylpropanoidstoffwechsels im Vergleich zum Kontrollwildtyp (Abb. 5.58B). Lediglich das Transkript mit Homologien zu einer putativen Anthocyanidin-3-glycosid Rhamnosyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* (BE462756)(Abb. 5.58B) zeigt eine Erniedrigung. Eine verringerte Expression wurde auch im nitratverhungerten Wildtyp beobachtet.

Änderungen der Transkriptmengen von Transkriptionsfaktoren

Die sekundären Biosynthesewege der Pflanze werden stark durch Transkriptionsfaktoren reguliert (Grotewold, 2005; Martin, 1997). Es stellt sich die Frage, ob der regulatorische Einfluss von Nitrat auf den Phenylpropanoidstoffwechsel eventuell über Transkriptionsfaktoren geleitet wird. Ein besonderer Fokus bezüglich dieser Frage wird auf die Myb Proteine gelegt. Es ist bekannt, dass Myb Proteine einen wichtigen regulatorischen Einfluss auf den Phenylpropanoidstoffwechsel haben (Urao et al., 1993; Sablowski et al., 1994; Solano et al., 1995; Campell et al., 1995; Martin, 1997; Tamagnone et al., 1998). Der in dieser Arbeit verwendete Mikroarray enthält eine Anzahl verschiedener Sequenzen für Transkriptionsfaktorgene, die möglicherweise einen regulatorischen Einfluss auf die Phenylpropanoidbiosynthese haben.

Die Veränderungen der Signale bezüglich der Transkriptionsfaktoren sind sehr schwach, so dass keine aussagekräftige Schlussfolgerung gezogen werden kann. Nichtsdestotrotz deuten die Ergebnisse an, dass einige Myb-Gene und Transkriptionsfaktorgene, die stressinduziert sind, in den nitratverhungerten Wildtypen leicht erhöhte Expression im Vergleich zum Kontrollwildtyp (Wildtyp ernährt mit 12 mM KNO₃) haben. Darunter befindet sich auch die Sequenz eines MYB-Transkriptionsfaktors, der Homologien zum Transkriptionsfaktor MYB4 in *Arabidopsis thaliana* und *Pinus taeda* hat und dort die Expression einiger Gene hochreguliert, die für die Lignifizierung der Gewebe verantwortlich sind (Patzlaff et al., 2003).

Obwohl auch die Nitrat akkumulierenden NIA-Transformante tendenziell leicht induzierte und reprimierte Signale bezüglich der Sequenzen für MYB-Transkriptionsfaktorgene zeigt, unterscheiden sich diese von denen, die im nitratverhungerten Wildtyp gefunden werden. Nur ein Signal, welches hohe Homologie zu Cpm7 oder CpMyb10 aus *Caterostigma plantagineum* hat, einem Transkriptionsfaktor, der bei Dehydration induziert wird (Bartels, 1996), ist in der NIA-Transformante tendenziell erniedrigt während es im nitratverhungerten Wildtyp tendenziell erhöht ist. Tabelle 8.1 im Anhang zeigt eine kurze Zusammenstellung der Expressionsdaten beider Genotypen.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse in diesem Abschnitt keine Aussage darüber zulassen, ob Nitrat entweder einen induzierenden oder reprimierenden Effekt auf Transkriptionsfaktoren hat, die relevant für die Regulation des Phenylpropanoidstoffwechsels sind. Zum einen zeigen die erhaltenen schwachen Signale meist Homologien zu Transkriptionsfaktoren, deren Funktion bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt ist, zum anderen sind die erhaltenen Signale nicht aussagekräftig. Möglicherweise ist in diesem Fall die Genexpressionsanalyse über Mikroarray-Technik nicht sensitiv genug, da Transkriptionsfaktoren in der Regel sehr schwach exprimiert sind, oder der verwendete Mikroarray enthält nicht die relevanten Sequenzen. Die Frage, ob Nitrat selbst auf die Expression der relevanten Ge-

ne für den Phenylpropanoidstoffwechsel wirkt oder indirekt über Transkriptionsfaktoren agiert, bleibt offen.

5.3.3.3 Transkriptmessung durch quantitative RT-PCR

Die Expressionsdaten aus *Kapitel 5.3.3.2* lassen den Schluss zu, dass Nitrat möglicherweise eine Auswirkung auf Transkripte des Phenylpropanoidstoffwechsels hat. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse erfolgten Genexpressionsanalysen über quantitative RT-PCR. Es standen Primer für Isoform *PAL-1* (Phenylalanin-Ammonium-Lyase), für die Isoform *4Cl-2* (4-Coumerat-CoA-Ligase) und *HQT* (Hydroxycinnamoyl-CoA Quinat:Hydroxycinnamoyl Transferase) zur Verfügung. Stellvertretend für den primären Stoffwechsel wurden Transkripte des Shikimatstoffwechsels gemessen. Hier standen Primer für Shikimatdehydrogenase (*ShDH-2*) und die 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat Synthase (*DAHPS*) zur Verfügung. Die Analyse über quantitative RT-PCR ermöglichte eine technische Bestätigung der Mikroarray-Analyse, da für beide Methoden die gleichen Blattproben benutzt wurden. Des Weiteren sollten auf diesem Weg die Ergebnisse aus *Kapitel 5.3.3.2* in biologischen Replikaten bestätigt werden. Die Genexpressionsanalyse über quantitative RT-PCR fand zu 6 verschiedenen Zeitpunkten des Tages statt. Zu jedem Tageszeitpunkt wurden zwei verschiedene Individuen analysiert ($n = 2$), deren Ergebnis wiederum aus zwei technischen Replikaten zustande gekommen ist. Ausnahme ist die Genexpressionsanalyse von *HQT*, dieses Transkript wurde zu jedem Zeitpunkt nur in einem Individuum gemessen, dessen Ergebnis sich wiederum aus zwei technischen Replikaten zusammensetzt.

Diurnale und genotypisch bedingte Änderungen der Transkripte des Shikimatbiosyntheseweges im Blatt

Zur Genexpressionsanalyse des Shikimatweges standen die Primer für Transkripte der *DAHPS* und *ShDH-2* zur Verfügung. Das Produkt von *DAHPS* ist das erste Enzym im Shikimatweg und katalysiert die Kondensation von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat zu 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat. Das Produkt von *ShDH-2* katalysiert im Shikimatbiosyntheseweg den Schritt von 3-Dehydroshikimat zu Shikimat unter NADPH Verbrauch.

Eine tageszeitlich bedingte Schwankung der Transkripte von *DAHPS* kann man nur tendenziell feststellen. Betrachtet man nur den Wildtyp ernährt mit 12 mM KNO_3 , ist eine Zunahme der Transkripte nach 4 Stunden Licht zu beobachten. Danach sinkt der Transkriptspiegel bis auf ein Minimum am Ende des Tages. Während der Nacht wiederum steigt der Transkriptspiegel und sinkt in der zweiten Hälfte der Nacht wieder auf ein Minimum zurück. Diese tageszeitliche Schwankung spiegelt sich in den anderen Genotypen wieder (Abb. 5.59).

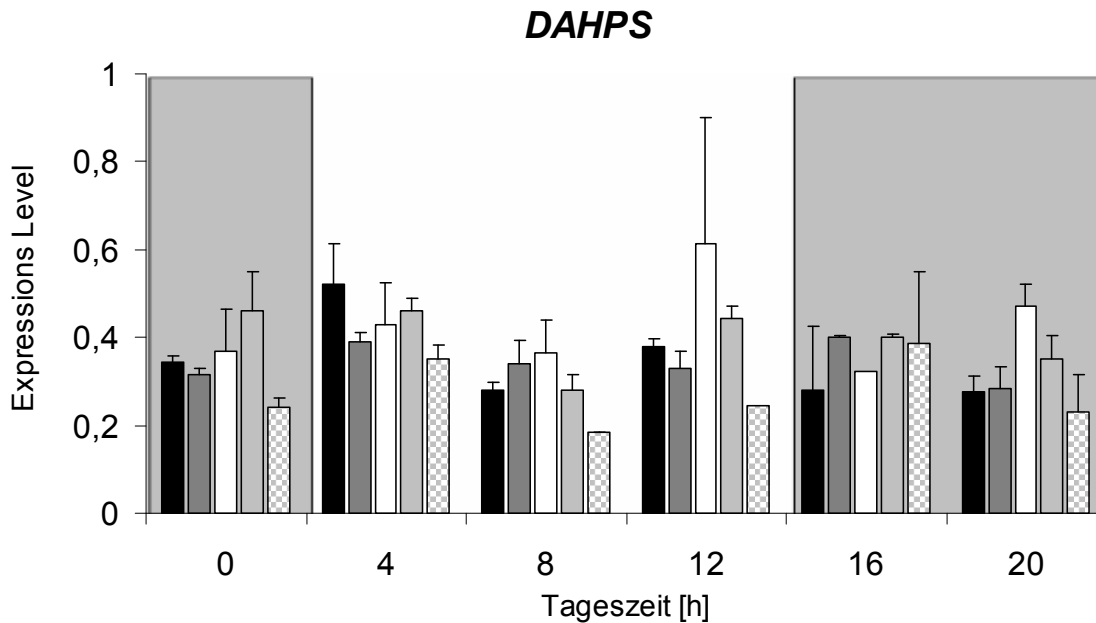


Abb. 5.59: Tagesgang der Transkripte von *DAHPS*. Die dunkelgrau unterlegten Bereiche symbolisieren die Nacht, der hell unterlegte Bereich symbolisiert den Tag. Dargestellt sind die Transkripte des Wildtyps ernährt mit 12 mM KNO₃ (■), F23xNia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (■), des Wildtyps ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (□), Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (■) und Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (□). Angegeben sind Mittelwerte ± SD biologischer Replikate (n = 2).

Die Transkripte der *DAHPS* zeigen im Vergleich der einzelnen Genotypen untereinander keine signifikanten Unterschiede, weder als Antwort auf Nitratmangelernährung noch als Antwort auf stark reduzierte NR-Aktivität (Abb. 5.59). Lediglich die Transkripte der *DAHPS* im Genotyp Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO₃ zeigen während der Lichtperiode tendenziell niedrigere Expressionswerte im Vergleich zu allen anderen Genotypen.

Tageszeitliche Schwankungen der Transkripte für *ShDH-2* sind ebenfalls nur tendenziell zu beobachten. Wildtyp, F23xNia30(145) und Nia30(145), alle ernährt mit 12 mM KNO₃, zeigen tendenziell höhere Expressionslevel während der Nacht. Transkripte des Wildtyps und der Nia30(145), beide ernährt mit 0.2 mM KNO₃, haben dagegen nach 4 Stunden Licht ein Maximum. Die Transkriptspiegel dieser beiden Genotypen sinken in der zweiten Hälfte des Tages wieder ab und steigen – wie die der anderen Genotypen – während der Dunkelperiode wieder an (Abb. 5.60).

ShDH-2

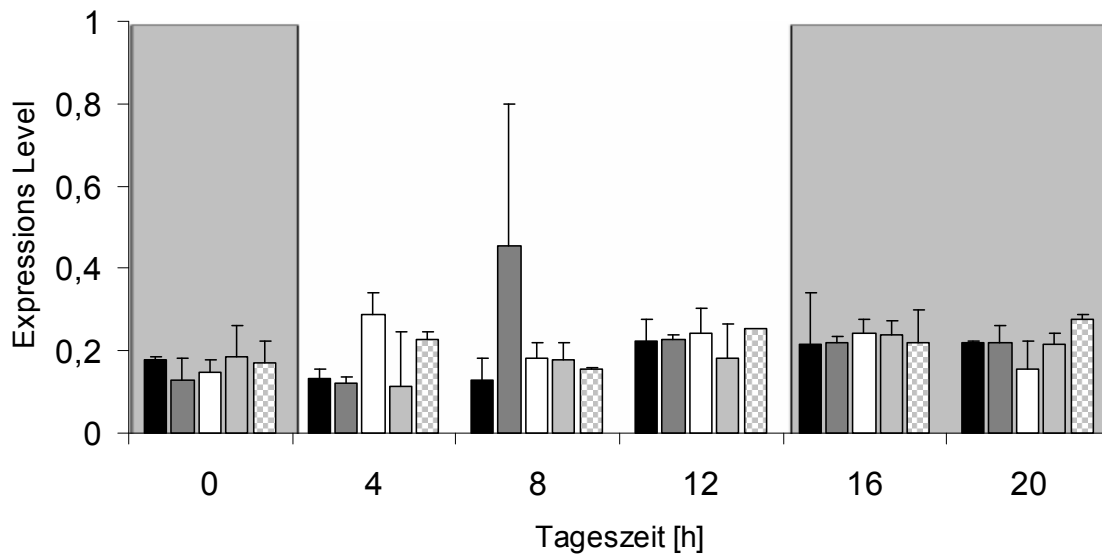


Abb. 5.60: Tagesgang der Transkripte von *ShDH-2*. Die dunkelgrau unterlegten Bereiche symbolisieren die Nacht, der hell unterlegte Bereich symbolisiert den Tag. Dargestellt sind die Transkripte des Wildtyps ernährt mit 12 mM KNO₃ (■), F23xNia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (■), des Wildtyps ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (□), Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (■) und Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (▨). Angegeben sind Mittelwerte ± SD biologischer Replikate (n = 2).

In Tabak sind derzeit zwei Isoformen für *ShDH* beschrieben (Ding und Sonnewald, 2004, 2005; „primary accession number“ für *ShDH-1*: Q6PUF9 und *ShDH 2*: Q6PUG0). In der vorliegenden Arbeit standen Primer für die Isoform 2 zur Verfügung. Die Transkripte der *ShDH-2* zeigen im Vergleich der Genotypen untereinander keinen signifikanten Unterschied, weder als Antwort auf Nitratmangelernährung noch als Antwort auf stark reduzierte NR-Aktivität (Abb. 5.60). Der verhungerte Wildtyp zeigt nach 4 Stunden Licht tendenziell erhöhte Transkriptwerte im Vergleich zum Kontrollwildtyp und die moderat betroffene Transformante F23xNia30(145) zeigt nach 8 Stunden Licht erhöhte Transkriptgehalte. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist diese Erhöhung nicht signifikant.

Diurnal und genotypisch bedingte Änderungen der Transkripte des Phenylpropanoidstoffwechsels im Blatt

Zurzeit sind zwei Isoformen für *PAL* in Tabak beschrieben (Nagai et al., 1994; Pellegrini et al., 1994). Für die folgende Genexpressionsanalyse standen Primer für die *PAL-1* zur Verfügung. Die *PAL-1* Transkripte des Kontrollwildtyps sinken im Laufe des Tages und während der ersten Hälfte der Nacht. Am Ende der Nacht steigen die Transkripte wieder an (Abb. 5.61). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Genexpressionsanalysen aus diurnalen Experimenten von *Arabidopsis thaliana* (O.E. Bläsing, persönliche Mitteilung). Die anderen Genotypen zeigen vergleichbare diurnale Schwankungen, wenn sie mit 12 mM KNO₃ gewachsen sind.

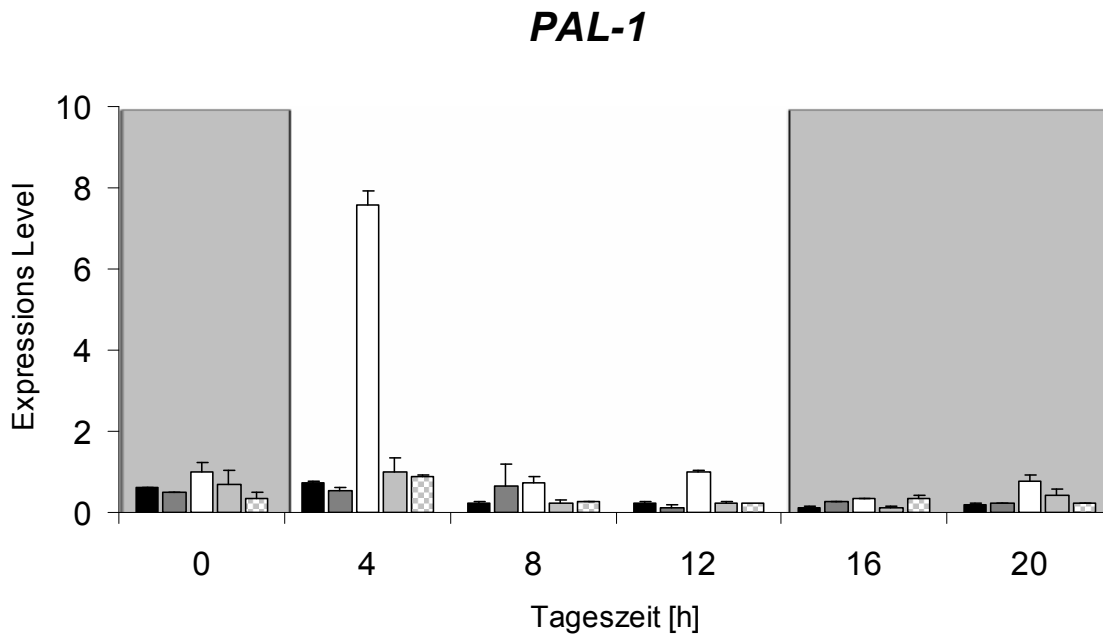


Abb. 5.61: Tagesgang der Transkripte von *PAL-1*. Die dunkelgrau unterlegten Bereiche symbolisieren die Nacht, der hell unterlegte Bereich symbolisiert den Tag. Dargestellt sind die Transkripte des Wildtyps ernährt mit 12 mM KNO₃ (■), F23xNia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (▣), des Wildtyps ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (□), Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (▤) und Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (▥). Angegeben sind Mittelwerte ± SD biologischer Replikate (n = 2).

Der nitratverhungerte Wildtyp zeigt zu fast allen Tageszeitpunkten signifikant höhere Transkriptspiegel von *PAL-1* im Vergleich zum Kontrollwildtyp und der Transformante Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (Abb. 5.61). Besonders drastisch ist die 8-fache Erhöhung der *PAL-1* Transkripte nach 4 Stunden Licht, gefolgt von einem ebenso drastischen Absinken nach 8 Stunden Licht. Nichtsdestotrotz bleiben die *PAL-1* Transkripte des nitratverhungerten Wildtyps zu allen Tageszeitpunkten höher. Eine mögliche Erklärung für diesen immensen Abfall könnte das Gießereignis nach ca. 3 bis 3.5 Stunden Licht sein. Zu diesem Zeitpunkt nehmen die Pflanzen Nitrat auf. Wang et al. (2004) und Scheible et al. (2004) konnten zeigen, dass nitratsensitive Transkripte mit einiger Zeitverzögerung auf Nitratzugabe reagieren. In Nitratfütterungsversuchen mit nitratverhungerten Arabidopsis Keimlingen erfolgte erst drei Stunden nach Nitratzugabe eine Erniedrigung des *PAL-1* Transkriptes (At2g37040) und eines weiteren Gens, welches als PAL Isoform (At3g10340) annotiert ist (Scheible et al., 2004).

Der drastische Anstieg der *PAL-1* Transkripte des nitratverhungerten Wildtyps zu Beginn der Lichtperiode könnte ein lichtabhängiger Effekt sein. Es ist bekannt, dass *PAL*-Transkripte nach UV-Licht Behandlung der Pflanzen steigen (Lois et al., 1989). In Kapitel 5.1.6 Abbildung 5.6 konnte gezeigt werden, dass der verhungerte Wildtyp reduzierte Chlorophyllgehalte gegenüber dem Kontrollwildtyp hat. Der Beginn der Lichtperiode könnte demnach zu oxidativem Stress in den nitratverhungerten Pflanzen führen und eine Induktion des *PAL* Transkriptes bewirken. Der repressive Effekt von Nitrat auf *PAL-1*, ausgelöst durch die Nitratapplikation nach 3 – 3.5 Stunden Licht führt dann zu der drastischen Reduktion des Transkripte nach 8 Stunden.

Bisher wurden zwei Isoformen der *4Cl* in Tabak beschrieben (Lee und Douglas, 1996). Für Untersuchungen in dieser Arbeit lagen Primer der Isoform 2 vor.

Ein ausgeprägter diurnaler Rhythmus der Transkripte kann in keinem der Genotypen beobachtet werden (Abb. 5.62). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Genexpressionsanalysen aus diurnalen Experimenten von *Arabidopsis thaliana*. Transkripte der Gene aller 4 Isoformen in *Arabidopsis* zeigen lediglich sehr leichte Oszillationen (O.E. Bläsing, persönliche Mitteilung).

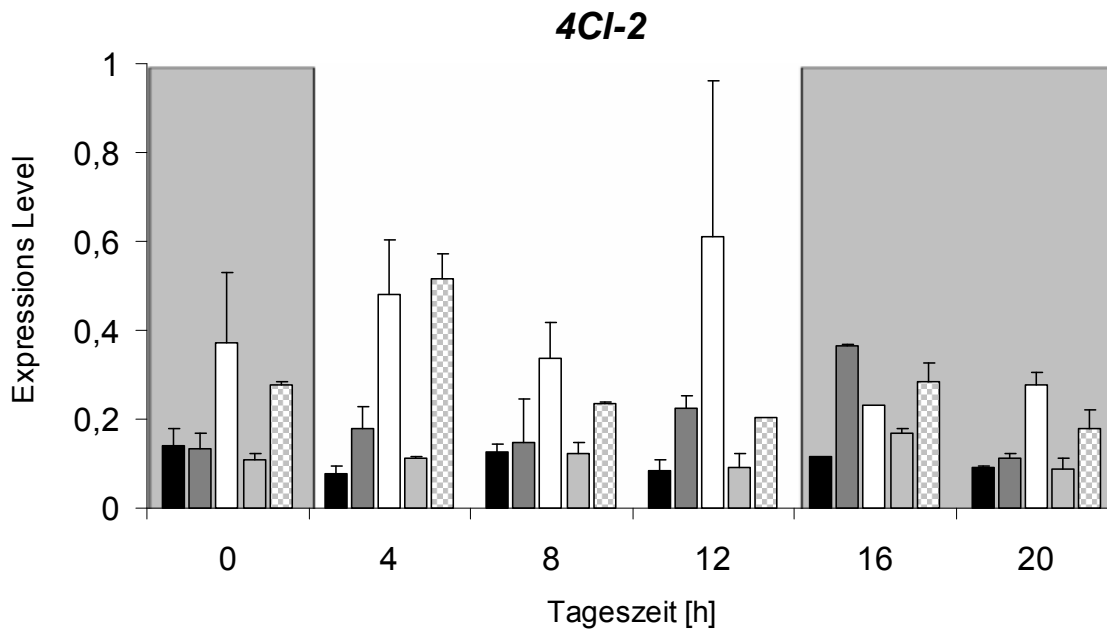


Abb. 5.62: Tagesgang der Transkripte von *4Cl-2*. Die dunkelgrau unterlegten Bereiche symbolisieren die Nacht, der hell unterlegte Bereich symbolisiert den Tag. Dargestellt sind die Transkripte des Wildtyps ernährt mit 12 mM KNO₃ (■), F23xNia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (■), des Wildtyps ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (□), Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (▨) und Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (▩). Angegeben sind Mittelwerte ± SD biologischer Replikate (n = 2).

Transkripte der *4Cl-2* zeigen signifikant erhöhte Transkriptspiegel in den Blättern des nitratverhungerten Wildtyps im Vergleich zum Kontrollwildtyp und der Nitrat akkumulierenden Transformante Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ (Abb.5.62).

Wie im Fall von *PAL-1* zeigen auch die Transkripte von *4Cl-2* in den nitratverhungerten Wildtypen eine Reaktion auf das Gießereignis mit 0.2 mM KNO₃ nach ca. 3 – 3.5 Stunden Licht, die jedoch geringer ausfällt. Der Transkriptspiegel nach 8 Stunden Licht ist im Vergleich zum Zeitpunkt nach 4 Stunden Licht leicht erniedrigt. In den Nitratfütterungsversuchen nitratverhungerner *Arabidopsis* Keimlinge von Scheible et al. (2004) sanken die Transkripte aller 4 Isoformen von *4Cl* drei Stunden nach Nitratzugabe.

Die moderat betroffene NR-defiziente Transformante F23xNia30(145) zeigt zu einigen Zeitpunkten gegenüber dem Kontrollwildtyp leicht erhöhte Transkripte für *4Cl-2*. In diesen Pflanzen konnten im Vergleich zum Kontrollwildtyp in Kapitel 5.3.2.1 leicht erhöhte Kaffeesäuregehalte in den Blättern nachgewiesen werden. Kaffeesäure ist ein Vorläufer der Ligninvorstufen und die 4-Coumerat:CoA Ligase (*4Cl*) katalysiert im Biosyntheseweg der Ligninvorstufen den Zusammenschluss der Hydroxyzimtaldehyde mit dem Coenzym A. Eine erhöhte Lignifi-

zierung dieser Genotypen konnte in jungen Stammabschnitten im Vergleich zum Kontrollwildtyp nicht festgestellt werden (*siehe Abbildung 5.56*). Stammabschnitte an der Basis dieser Genotypen zeigten jedoch tendenziell stärker lignifizierte Bereiche im Vergleich zum Kontrollwildtyp (*Daten nicht gezeigt*).

Die Transformante Nia30(145) im nitratverhungerten Zustand zeigt ebenfalls, verglichen mit dem Kontrollwildtyp und der Nitrat akkumulierenden Transformante (Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃) signifikant höhere Transkriptspiegel. Die Transkripte für *4Cl-2* sinken auch in diesen Pflanzen ca. 5 – 4.5 Stunden nach Nitratzugabe.

Die Transkripte von *HQT* des Kontrollwildtyps sinken während der Nacht. Dies zeigt sich ebenfalls in allen anderen Genotypen und in der nitratverhungerten NIA-Transformante nur tendenziell (Abb. 5.63).

In den Blättern der nitratverhungerten Wildtypen sind die Transkripte von *HQT* zu allen Zeitpunkten signifikant höher als in den Kontrollwildtypen, den Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ und den anderen Genotypen (Abb. 5.63). In diesen Pflanzen scheint die Nitratzugabe nach ca. 3 – 3.5 Stunden Licht keinen reduzierenden Einfluss 4.5 – 5 Stunden später zu haben. Sie sinken aber ca. 8.5 – 9 Stunden nach Nitratzugabe (Abb. 5.63).

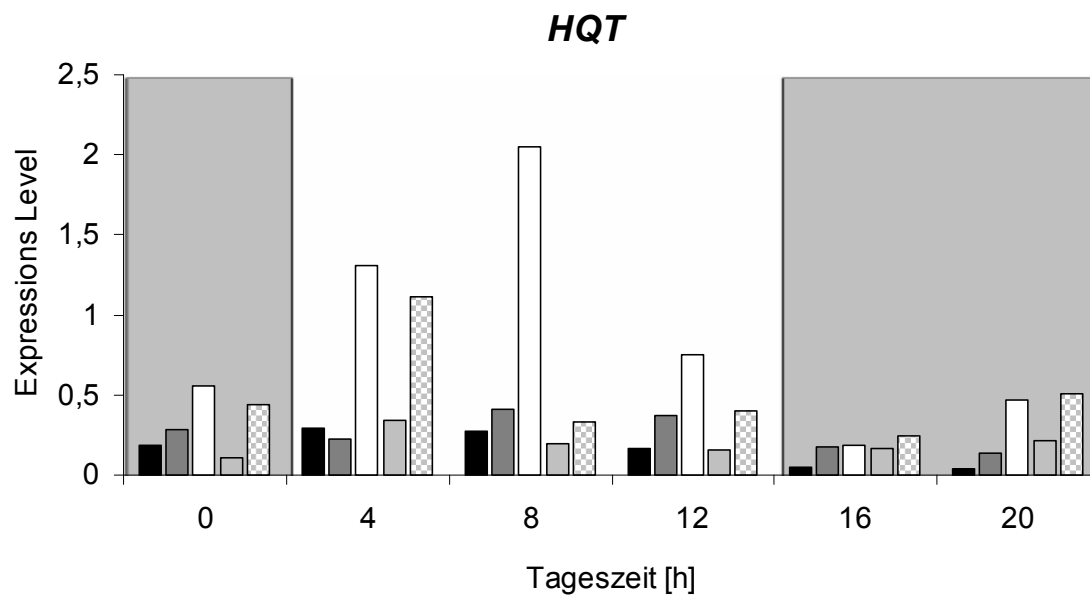


Abb. 5.63: Tagesgang der Transkripte von *HQT*. Die dunkelgrau unterlegten Bereiche symbolisieren die Nacht, der hell unterlegte Bereich symbolisiert den Tag. Dargestellt sind die Transkripte des Wildtyps ernährt mit 12 mM KNO₃ (■), F23xNia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (▣), des Wildtyps ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (□), Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃ (▤) und Nia30(145) ernährt mit 0.2 mM KNO₃ (▥). Angegeben sind Mittelwerte ± SD biologischer Replikate (n = 2).

Die Transkripte der verhungerten Transformante Nia30(145) sind ebenfalls zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollen (Wildtyp und Nia30(145) ernährt mit 12 mM KNO₃) erhöht (Abb. 5.63). Im Gegensatz zu den Transkripten des verhungerten Wildtyps sinken sie bereits 4.5 – 5 Stunden nach Nitratzugabe.

Erstaunlicherweise sind die Transkripte der moderat betroffenen NR-defizienten Transformante F23xNia30(145) zu einigen Zeitpunkten, bevorzugt gegen Ende des Tages und wäh-

rend der Nacht, im Vergleich zum Kontrollwildtyp leicht erhöht (Abb. 5.63), obwohl die CGA-Gehalte der Blätter keinerlei Unterschied zu den Kontrollwildtypen zeigen (siehe Abbildung 5.54).

FAZIT

- Der nitratverhungerte Wildtyp zeigt im Vergleich zum Kontrollwildtyp signifikant erhöhte Transkripte für *PAL*, *4Cl* und *HQT*. Dies konnte sowohl durch Mikroarray-Hybridisierung als auch über quantitative RT-PCR gezeigt werden.
- Diese Zunahme bleibt in der Nitrat akkumulierenden Transformante Nia30(145), gewachsen mit 12 mM KNO₃, aus. Eine Zunahme konnte beobachtet werden, wenn die Transformante unter Stickstoffmangelbedingungen angezogen wird.
- Die Transkripte für *PAL*, *4Cl* und *HQT* zeigen in der Nitrat akkumulierenden NIA-Transformante dem Kontrollwildtyp vergleichbare Expressionen.
- Tageszeitliche Schwankungen der Transkripte des Phenylpropanoidstoffwechsels des Kontrollwildtyps sind im Einklang mit Ergebnissen aus diurnalen Genexpressionsanalysen in *Arabidopsis thaliana*.
- Die zwei Gene des Shikimatbiosyntheseweges *DAHPS* und *ShDH* sind weder vom Nitratgehalt der Blätter noch vom Stickstoffstatus der Pflanzen betroffen. Sie scheinen relativ unempfindlich auf Stickstoffverarmung zu reagieren. In Nitratverhungeringsexperimenten mit *Arabidopsis thaliana* zeigten Transkripte der *ShDH* ebenfalls keine Änderung (O.E. Bläsing persönliche Mitteilung).
- Aus all diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass niedrige Nitratgehalte in den Blättern einen induzierenden Effekt auf die Expression von Genen haben, die spezifisch für den Phenylpropanoidstoffwechsel sind.
- Es bleibt allerdings die Frage offen, ob die korrespondierenden Enzyme der in diesem Kapitel vorgestellten Transkripte *in vivo* auch tatsächlich erhöhte Aktivitäten haben.
- Die Frage, ob Nitrat seinen regulatorischen Effekt über Transkriptionsfaktoren ausübt, bleibt durch diesen Versuchsansatz offen.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Auswirkungen eines verringerten Stickstoffstoffwechsels auf den Aminosäurestoffwechsel und den Sekundärstoffwechsel von Tabak. Zwei unterschiedliche Ansätze wurden gewählt, um den Stickstoffstoffwechsel zu beeinflussen. Auf physiologischer Ebene wurden Wildtyppflanzen unter Nitratmangelbedingungen angezogen, und auf genetischer Ebene wurden Nitratreduktase defiziente Transformanten mit unterschiedlich starker Reduktion der NR-Aktivität, sowohl unter ausreichender Stickstoffernährung als auch unter Stickstoffmangel angezogen. Dieses experimentelle System bot zum einen die Möglichkeit, die Auswirkung des Stickstoffstatus auf primäre und sekundäre Stoffwechselwege zu untersuchen. Zum anderen konnte durch den Vergleich von Pflanzen mit internem Nitratmangel (Wildtyp ernährt mit 0.2 mM Kaliumnitrat) und Nitrat akkumulierenden Transformanten (Nia30(145) ernährt mit 12 mM Kaliumnitrat) Prozesse identifiziert werden, die direkt durch Nitrat beeinflusst werden. Aus zweierlei Gründen wurde eine vollständige Dokumentation durch diurnale Analyse der wichtigsten Primärmetabolite vorgenommen: Sowohl der Kohlenstoff-, als auch der Stickstoffmetabolismus unterliegen tageszeitlichen Schwankungen. Unter Mangelzuständen ändern sich kohlenstoff- und stickstoffhaltige Primärmetabolite parallel statt wechselseitig (*siehe Einleitung*).

Von zentraler Bedeutung den Aminosäurestoffwechsel betreffend war eine erweiterte und umfangreichere Betrachtung der Hypothese nach einer koordinierten Kontrolle der Aminosäurebiosynthese in Pflanzen. Zu diesem Zweck wurde der erstellte Datensatz mit einem bereits bestehenden Aminosäuredatensatz (Matt et al., 2002), analysiert unter Kohlenstoffmangelbedingungen, kombiniert.

Des Weiteren war es Ziel dieser Arbeit, die Interaktion des primären Stickstoffstoffwechsels und des Sekundärstoffwechsels zu untersuchen und regulatorische Elemente zu identifizieren. Matt et al. (2002) konnte zeigen, dass eine Reduktion des Kohlenstoffstoffwechsels nicht zu der erwarteten Verlagerung von kohlenstoffreichen zu stickstoffreichen Sekundärmetaboliten führte (*siehe „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese nach Coley et al., 1986*). Grund für diese, auch schon öfter in der Literatur beschriebene Unstimmigkeit ist die vereinfachte Beschreibung des physiologischen Zustandes der Pflanze im Allgemeinen (*siehe Einleitung*). Stickstoffmangel führt bei vielen Pflanzenspezies zu erhöhtem Phenylpropanoidgehalt. Das in der vorliegenden Arbeit benutzte experimentelle System erlaubte die Identifizierung von Nitrat als wahrscheinlichen Inhibitor des Phenylpropanoidstoffwechsels.

6.1 Die Auswirkungen von Kohlenstoff- und Stickstoffstatus auf das Verhalten der Aminosäuren in Tabakblättern

6.1.1 Die absoluten Konzentrationen der meisten Aminosäuren zeigen die gleichen diurnalen Muster in Kontrollbedingungen, aber bei der Analyse unter Kohlenstoff- bzw. Stickstoffmangelbedingungen zeigen einige Aminosäuren individuelle Antworten

Die diurnalen Rhythmen der Aminosäuren in Kontrollbedingungen zeigen, dass die absoluten Konzentrationen der meisten Aminosäuren großen Änderungen in einem immer wiederkehrenden Muster unterliegen, das koordiniert erscheint. Es erfolgt meist eine Zunahme der

absoluten Konzentration über die Lichtperiode hinweg und ein Absinken während der Nacht. Dieses Ergebnis unterstützt die Daten von Noctor et al. (2002), in deren Studien sich die Gehalte der meisten „kleinen“ Aminosäuren von Kartoffel-, Gerste- und Weizenpflanzen mit unterschiedlicher Photosyntheseaktivität linear zum Gesamtaminosäuregehalt der „kleinen“ Aminosäuren ändern. Daraus wurde schlussfolgernd von einer koordinierten Biosynthese aller „kleinen“ Aminosäuren ausgegangen. Eine Reduktion des Kohlenstoffstoffwechsels, entweder durch verringerte Lichtqualität oder Reduzierung der Rubisco-Aktivität, und eine Reduktion des Stickstoffstoffwechsels, entweder durch Nitratmangel oder reduzierte Nitratreduktase-Aktivität, führen zur Abnahme der absoluten Konzentrationen der Aminosäuren und zum Erliegen der diurnalen Rhythmen. Dies kann zweierlei Gründe haben: Zum einen kann Aminosäurekatabolismus zu einer Reduktion der Gehalte führen. Dies ist nach dem bisherigen Wissensstand über Aminosäurekatabolismus in Pflanzen unwahrscheinlich. Der Abbau von Aminosäuren wurde bisher nur in seneszenten Blättern und bei der Samenkeimung beschreiben, nicht jedoch in jungen „source“ Blättern (Van Etten et al., 1967; Beevers 1976). Es ist wesentlich wahrscheinlicher, dass eine generelle Verringerung der Aminosäurebiosynthese in den kohlenstoff- und stickstoffreduzierten Pflanzen der Grund für diese Verschiebungen sein könnte. Eine generell koordinierte Aminosäurebiosynthese sollte dann auch in Mangelsituationen auftreten, so wie Noctor et al. (2002) das für Pflanzen mit unterschiedlichen Photosynthesekapazitäten beschrieben haben. Die genaue Analyse der in dieser Arbeit vorliegenden Aminosäuredaten mittels Hauptkomponentenanalyse, Korrelationsanalyse und Verhältnisanalyse zeigen aber deutlich, dass eine generelle Koordination der Aminosäurebiosynthese nicht als allgemeingültig angenommen werden kann.

Auf sehr allgemeine Weise konnte mittels der Hauptkomponentenanalyse gezeigt werden, dass nicht nur Genotypen, sondern auch die Qualität der Kohlenstoff- bzw. Stickstoffreduzierung voneinander unterschieden werden. Weiterhin konnte sogar unterschieden werden, ob Proben während des Tages oder der Nacht geerntet wurden. Diese Trennung setzt voraus, dass Aminosäuren existieren die den Datensätzen Variabilität verleihen und als solche konnten Glutamin, Glutamat, Aspartat, Glycin, Alanin und auch die „kleinen“ Aminosäuren Threonin, Isoleucin und Phenylalanin identifiziert werden.

Eine Korrelationsanalyse zwischen jeder individuellen Aminosäure zeigte, dass die meisten „kleinen“ Aminosäuren unter Normal- bzw. Kontrollbedingungen sehr gute Korrelationen zueinander haben. Dies spiegelt das gleiche Verhaltensmuster der diurnalen Rhythmen in einer statistischen Größe wider und kann als Bestätigung der These von Noctor et al. (2002) angesehen werden. Jedoch verschlechtern sich die Korrelationskoeffizienten sobald eine Reduktion innerhalb des Primärstoffwechsels vorgenommen wurde. Dieses Ergebnis unterstützte die These von Noctor et al. (2002) nicht mehr, in deren Untersuchungen ebenfalls Pflanzen mit unterschiedlichem Kohlenstoffstatus eingeschlossen wurden (*siehe oben*). Das vorliegende Ergebnis, zusammen betrachtet mit dem Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse, zeigt deutlich, dass die Diskrepanz beider Untersuchungen zum einen wahrscheinlich durch die Tatsache erklärt werden kann, dass einzelne Aminosäuren sehr individuelle Verhaltensmuster in bestimmten Situationen haben, und dass der Datensatz von Noctor et al. (2002) möglicherweise zu wenig Stoffwechsel verändernde Faktoren beinhaltet.

Um detailliertere Aussagen zu ermöglichen, wurde eine Verhältnisanalyse durchgeführt. Hierbei wurde der Anteil jeder Aminosäure am Gesamtaminosäuregehalt bzw. am Gesamtaminosäuregehalt der „kleinen“ Aminosäuren kalkuliert und in Abhängigkeit zu diesem dargestellt. Auf diese Weise konnte nicht nur festgestellt werden, ob sich eine Aminosäure indi-

viduell im Vergleich zu den anderen verhält, sondern auch ob sie auf reduzierte Stickstoffbedingungen, reduzierte Kohlenstoffbedingungen, spezifisch auf Nitrat, eine überreduzierte Elektronentransportkette oder auf Tag/Nacht-Unterschiede reagiert. Diese sehr detaillierte Betrachtung ausgewählter Aminosäuren in der Verhältnisanalyse unterstützt die Vermutung, dass eine koordinierte Aminosäurebiosynthese aller Aminosäuren in Pflanzen nicht generell angenommen werden kann. Glutamat beispielsweise ist auffallend stabil unter beinahe allen Konditionen. Phenylalanin zeigt in jeder Situation eine individuelle Antwort. Isoleucin- und Lysinanteile steigen unter reduzierten Stickstoffbedingungen, während Glutamin-, Glycin-, Alanin-, Arginin- und Histidinanteile fallen. Unter reduzierten Kohlenstoffbedingungen fallen die Anteile aller aromatischen Aminosäuren und die von Alanin und Glycin, während Glutamin- und Aspartatanteile steigen. Interessanterweise haben einige der genannten Aminosäuren, wie z.B. Glutamat, Glutamin, Aspartat, Glycin, Phenylalanin und Isoleucin einen hohen trennenden Charakter in der Hauptkomponentenanalyse. Im folgenden Kapitel werden die individuellen Antworten einiger Aminosäuren in Bezug auf die jeweiligen Stoffwechsel verändernden Parameter diskutiert.

6.1.2 Die individuellen Antworten einiger Aminosäuren auf den Kohlenstoff- und Stickstoffstatus der Pflanze, auf überreduzierte Elektronentransportkette, Nitrat und Licht

6.1.2.1 Individuelle Reaktionen auf Licht

Individuelle Reaktionen der Aminosäuren auf Licht oder Dunkelheit können zwei verschiedene Ursachen haben: Entweder spielt Licht direkt eine regulatorische Rolle oder die Aminosäurekonzentrationen reagieren auf steigende bzw. fallende Konzentrationen der Zucker. Die Verhältnisanalyse hat gezeigt, dass Aspartat-, Glycin-, und Phenylalaninanteile individuell in allen Genotypen auf Licht reagieren. Alanin- und Asparaginanteile zeigen diese individuelle Änderung nur in den Pflanzen mit ausreichendem Stickstoffstatus. Da in allen Fällen ein relativ weites Zeitfenster zur Probennahme gewählt wurde (alle 4 Stunden), lässt sich der kurzfristige regulatorische Effekt von Licht nicht von dem langfristigen der reduzierenden Kohlenhydrate eindeutig unterscheiden.

Aufschluss darüber gaben Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana*, deren Blätter zuerst 2 Stunden belichtet, danach wieder verdunkelt wurden. Proben wurden alle 15 Minuten genommen, um so ein enges Zeitfenster zu gewährleisten (*Janneke Hendriks, persönliche Kommunikation*). Es zeigte sich, dass die Phenylalaninergehalte nach 15 Minuten Licht um den Faktor 2 stiegen. In dieser Zeit sind noch keine ausgeprägten Konzentrationsänderungen der reduzierenden Zucker zu beobachten. Fütterungsversuche mit Redoxäquivalenten führten ebenfalls zu einem zweifachen Anstieg der Phenylalaninergehalte (*Janneke Hendriks, persönliche Kommunikation*). Henstrand et al. (1992) konnte eine Lichtregulation der DAHP Synthese in vitro nachweisen. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass eine regulatorische Rolle der reduzierenden Zucker auf die Phenylalaninbiosynthese unwahrscheinlich ist, und dass dieser Biosyntheseweg vielmehr redox vermittelt beeinflusst wird.

Aspartat zeigte in diesen Experimenten keine schnellen Änderungen auf Illumination bzw. Verdunkelung. Dies führt zu der Annahme, dass die reduzierenden Zucker möglicherweise auf die Aspartatsynthese Einfluss haben können. Diese Aminosäure wird aus einem Molekül

Glutamat und einem Molekül Oxalacetat über das Enzym Aspartat-Aminotransferase (AspAT) synthetisiert. Über eine licht- bzw. zuckerabhängige Regulation dieses Enzyms ist kaum etwas bekannt. Wadsworth et al. (1993) konnte 5 Isoformen von AspAT aus Sojabohne isolieren. Einige dieser Isoformen waren lichtunabhängig vorhanden, andere konnten nur im Dunkeln identifiziert werden. Aus Arabidopsis ist bekannt, dass der diurnale Rhythmus keinerlei Effekt auf die AspAT-Aktivität hat (Gibon et al., 2004). Die Frage, ob die Synthese auf transkriptioneller oder posttranslationaler Ebene reguliert wird bleibt offen.

In der Literatur wird auch die Regulation von Asparagin in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert. Asparagin wird durch Asparaginsynthetase (AS) aus Aspartat und Glutamin synthetisiert. Frühe Arbeiten von Urquhart und Joy (1981) konnten hohe Asparagingehalte in Erbsenblättern während der Nacht nachweisen. Tsai und Coruzzi (1990) identifizierten ergänzend dazu in Erbse zwei AS kodierende Gene. Eines davon wird konstitutiv exprimiert, während die Expression des anderen Gens durch Licht gehemmt wird. Dies konnte auch für verschiedene Tabakspezies gezeigt werden (Tsai und Coruzzi, 1991). Es wird auch die Beteiligung eines Phytochroms (Tsai und Coruzzi, 1991; Lam et al., 1994) diskutiert. Drei Gene konnten bisher in Arabidopsis identifiziert werden (Lam et al., 1994). Eines davon, *ASN1*, wird durch Licht und exogene Saccharoseapplikation gehemmt. Die exogene Applikation von Glutamin, Asparagin und Glutamat konnte diesen Effekt rückgängig machen. Die Autoren schlossen daraus, dass die Expression von *ASN1* einerseits durch Licht und das organischen Stickstoff/Kohlenstoffverhältnis reguliert wird. Ein hohes Stickstoff/Kohlenstoffverhältnis hat eine Induktion der *ASN1* Expression zur Folge, wohingegen ein niedriges Verhältnis bzw. Photosyntheseaktivität oder Stickstoffmangel eine Hemmung der *ASN1* Expression zur Folge hätte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen unter Kontrollbedingungen alle aufgeführten Thesen. Während der Nacht, wenn die Pflanze Kohlenstoffmangel erfährt, steigen die Asparaginanteile relativ zu den anderen Aminosäuren. Dies ist auch in den absoluten Konzentrationen zu sehen. Die Asparaginanteile steigen besonders deutlich in den ant5 Genotypen, also Pflanzen mit extrem reduzierter CO₂-Fixierung. Da diese Pflanzen unter ausreichender Stickstoffversorgung wuchsen, ist ein hohes Stickstoff/Kohlenstoffverhältnis anzunehmen. Es kann abschließend keine endgültige Aussage über die diurnalen Regulationsmechanismen getroffen werden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die diurnalen Veränderungen von Asparagin eher auf tageszeitliche Änderungen von Zuckern als auf eine direkte Wirkung von Licht zurückzuführen ist.

6.1.2.2 Individuelle Reaktionen auf reduzierten Stickstoffstatus

Die Verhältnisanalyse hat gezeigt, dass einige Aminosäuren ein individuelles Verhalten auf einen reduzierten Stickstoffstatus der Pflanzen zeigen und somit die Schlussfolgerung nahe legen, dass Stickstoffmangel generell einen Einfluss auf die Biosynthese der reagierenden Aminosäuren hat. Man kann aufgrund des experimentellen Systems die unterschiedlichen Reaktionen verschiedenen Ereignissen zuordnen.

Erstens, die Anteile einer Aminosäure verändern sich relativ zu den anderen Aminosäuren generell als Antwort auf reduzierten organischen Stickstoff. Glutamat zeigt deutlich erhöhte Anteile in allen stickstoffreduzierten Genotypen, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass Glutamatgehalte eher konstant sind während die der anderen Aminosäuren sinken. Weitere Gründe für dieses Ergebnis werden ausführlich in *Kapitel 6.1.3* dargelegt.

Zweitens, Unterschiede zwischen Nitrat akkumulierenden NIA-Transformanten und nitratmangelernährten Wildtypen erlauben nitratspezifische Effekte zu identifizieren, wobei die Anteile der entsprechenden Aminosäure in den NIA-Transformanten im Vergleich zum nitratdefizienten Wildtyp entweder fallen oder steigen. Glutamin, Threonin, Leucin und Arginin zeigen tendenziell verringerte Anteile in den NIA-Transformanten im Vergleich zum nitratmangelernährten Wildtyp. Asparagin, Glycin und Histidin zeigen dies deutlich. Der Grund dieses Verhaltens konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eine mögliche Erklärung wäre die Tatsache, dass Nitrat normalerweise die Synthese und den Gebrauch von Glutamin und anderen Aminosäuren für die Proteinbiosynthese begünstigt, das dies jedoch in den NIA-Transformanten auf Grund der reduzierten Nitratassimilation blockiert ist und generell zu einem Ungleichgewicht im Aminosäureprofil führt.

Phenylalanin- und Alaninanteile zeigen spezifische Reaktionen auf niedrige Nitratgehalte in den Blättern. In beiden Fällen steigen die Anteile in der Nitrat akkumulierenden NIA-Transformante im Vergleich zum nitratmangelernährten Wildtyp. Dieser Effekt war in den nitratverhungerten NIA-Transformanten nicht zu beobachten und deutet darauf hin, dass Nitrat die Synthese dieser beiden Aminosäuren stimuliert. Das Ergebnis für Phenylalanin deckt sich mit dem Ergebnis bezüglich der inhibierenden Wirkung von akkumulierendem Nitrat auf den Phenylpropanoidstoffwechsel bzw. den wahrscheinlich verringerten Verbrauch Phenylalanins in den NIA-Transformanten für diesen und scheint zumindest an Hand der beschränkten Expressionsanalyse nicht auf transkriptionelle Regulation der Gene des Shikimatweges zurückzuführen sein. (siehe unten Kapitel 6.2.6)

Nicht ausreichend geklärt werden konnten die deutlich erhöhten Isoleucinanteile und nicht signifikant erniedrigten Isoleucingehalte in den nitratverhungerten NIA-Transformanten. Lea et al. (2006) konnte eine Zunahme der Isoleucingehalte in Blätter von Mutanten mit deregulierter Nitratreduktase auf transkriptioneller und post-translationaler Ebene von *Nicotiana glauca* beobachten. Der Aktivitätsgrad der NR in diesen Mutanten betrug 80% während des gesamten Tag/Nacht-Zyklus und die Nitratgehalte waren ebenfalls im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit. Diaz et al. (2005) konnte im metabolischen Profil seneszenten Arabidopsisblätter Isoleucin als Seneszenzmarker identifizieren. In allen untersuchten Fällen ging Seneszenz auch mit Erhöhung von Arginin, Leucin und Gaba im Besonderen einher. Diese Aminosäureerhöhungen konnten im vorliegenden Datensatz nicht festgestellt werden, so dass die Tatsache, dass Isoleucin in den nitratverhungerten NIA-Transformanten als Seneszenzmarker agiert, unwahrscheinlich ist. Gegen beginnende Seneszenz in diesen Pflanzen spricht auch die Tatsache, dass bei der Wahl des Erntezeitpunktes bei allen Genotypen darauf geachtet wurde, ein vergleichbares physiologisches Alter der Blätter zu gewährleisten. Eine weitere mögliche Erklärung für diese erhöhten Anteile könnte die Tatsache sein, dass Isoleucin eine stark hydrophobe Aminosäure ist und das höchste C/N-Verhältnis (7:1) hat. Möglicherweise werden in Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus bevorzugt Proteine abgebaut, die hydrophobe Bereiche haben um Isoleucin zu Kohlenstoffgerüsten und Ammonium, welches durch GS/GOGAT-Zyklus wieder in die Stickstoffassimilation zurückgeführt wird, zu degradieren. Dies könnte in der nitratverhungerten NIA-Transformante verstärkt stattfinden oder der mögliche Degradierungsprozess von Isoleucin ist in diesen Genotypen weniger stark ausgeprägt. Um dieses Phänomen zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Ein unerwartetes Ergebnis stellen die unterschiedlichen Reaktionen stickstoffreicher Aminosäuren dar. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Anteile dieser Aminosäuren relativ zu

den anderen in Stickstoffmangelbedingungen sinken. Die Anteile von Arginin, Histidin und Glutamin tun dies auch. Asparagin dagegen zeigt in den nitratverhungerten Wildtypen vergleichbare Anteile zu Pflanzen mit ausreichendem Stickstoffstatus. Die Anteile dieser Aminosäure sinken lediglich in NIA-Transformanten und Lysinanteile steigen in allen Genotypen mit reduziertem Stickstoffstatus relativ zu den anderen Aminosäuren. Lysingehalte in pflanzlichen Samen werden durch Lysinsynthese (DHPS) und Lysinkatabolismus (LKR/SDH) reguliert (*siehe Einleitung*). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es in jungen Arabidopsis *LKR/SDH* „knockout“ Mutanten mit konstitutiv exprimierter bakterieller DHPS zu erhöhten Lysingehalten auch in vegetativen Geweben kommt (Zuh und Galili, 2004). Die Autoren schlossen daraus, dass Lysinkatabolismus in wachsenden Geweben vorhanden sein kann und auch dort an der Regulation der Lysingehalte beteiligt ist. Expressionsstudien für *LKR/SDH* in jungen Arabidopsispflanzen ergaben eine reduzierte Expression dieser Gene und reduzierte Proteingehalte unter Stickstoffmangel (Stepansky und Galili, 2003; Stepansky, 2004). Die steigenden Lysinanteile relativ zu anderen Aminosäuren in Genotypen mit reduziertem Stickstoffstatus können also eine Folge von reduziertem Lysinkatabolismus sein. Obwohl bereits erwähnt wurde, dass Aminosäurekatabolismus für die sich verändernden Anteile einiger Aminosäuren unter Mangelbedingungen nicht in Frage kommt, scheint Lysinkatabolismus diesbezüglich eine Ausnahme zu sein. Stepansky et al. (2006) konnte in bioinformatischen Studien zeigen, dass die Expression von *LKR/SDH* in *Arabidopsis thaliana* nicht mit der Expression anderer katabolischer Gene korreliert und somit auch unter anderen Konditionen agiert. Obwohl es für Pflanzen nicht bewiesen ist, konnte in Prokaryoten gezeigt werden, dass Lysin die Produkte der Gene seiner eigenen Biosynthese durch RNA-Bindung selbst reguliert (Rodionov et al. 2003; Sudarsan et al., 2003). Solch eine Regulation in Pflanzen würde diesen ungewöhnlichen Kontrollmechanismus von Synthese gekoppelt mit Katabolismus von Lysin teilweise erklären.

6.1.2.3 Individuelle Reaktionen auf verringerten Kohlenstoffstatus

Einige Aminosäuren zeigen individuelle Reaktionen auf Kohlenhydratmangelzustände, wobei die Reaktionen durchaus von der Qualität des Kohlenhydratmangelzustandes abhängig sind. Am auffälligsten ist die unterschiedliche Reaktion der Anteile an Glutamat auf Kohlenstoffmangel im Verhältnis zum Gesamtaminosäureanteil. Während der Glutamatanteil unter Niedriglichtbedingungen tendenziell leicht ansteigt, fällt er in den Pflanzen mit reduzierter Rubisco-Aktivität ab. Im Ergebnisteil *Kapitel 5.2.2.5.3* wurde bereits beschrieben, dass antisense *rbcS* Pflanzen im Vergleich zu den unter suboptimalen Lichtverhältnissen gewachsenen Pflanzen erniedrigte α -Ketoglutaratgehalte haben. Matt et al. (2002) stellte eine Verbindung zwischen erniedrigten Glutamatgehalten und ebenfalls erniedrigten α -Ketoglutaratgehalten her. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass dieser Effekt rückgängig gemacht werden kann durch eine kurze Wachstumsperiode (4 Stunden) der anti-*rbcS* Genotypen unter Niedriglichtbedingungen (*Mark Stitt und Regina Feil, persönliche Kommunikation*). Dutilleul et al (2003, 2005) liefern ergänzende Hinweise darauf, dass die Gehalte von α -Ketoglutaratgehalte und Glutamat mit veränderten Redoxzuständen vernetzt sind. In *cms* Mutanten von *Nicotiana glauca* wurde der Elektronenfluss durch Manipulation am mitochondrialen Komplex I unterbrochen. Diese veränderten Redoxzustände führen ebenfalls zu einer Reduktion von α -Ketoglutarat und Glutamat, während Glutamin ansteigt. Die Ergebnisse der Analysen dieser Arbeit unterstützen die Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Redoxstatus, dem Gehalt an α -Ketoglutarat und dessen Konsequenzen auf den Anteil

an Glutamat und Glutamin, zumal die Glutaminanteile in den Rubisco-antisense Pflanzen ansteigen.

Auch die aromatischen Aminosäuren zeigen alle die gleiche auffällige Reaktion: Sie fallen bei verringertem Kohlenstoffstatus ab, ohne dabei einen Unterschied zu zeigen, ob der verringerte Kohlenstoffstatus durch suboptimale Lichtqualität oder reduzierte Rubisco-Aktivität verursacht wurde. Diese Tatsache spricht für einen reduzierten Kohlenstofffluss durch den Shikimatweg bei verringertem Kohlenhydratstatus, zumal Matt et al. (2002) in beiden Kohlenhydratmangelzuständen verringerte absolute Gehalte aller aromatischen Aminosäuren beobachten konnte (*siehe Anhang*) und zusätzlich dazu verringerte Gehalte des Phenylpropans Chlorogensäure in den Blättern. Einen weiteren Hinweis darauf, dass Pflanzen unter Kohlenstoff limitierenden Bedingungen möglicherweise den Kohlenstofffluss in Richtung Shikimatweg verringern, liefern tageszeitabhängige Untersuchungen in Arabidopsisblättern. Es konnte gezeigt werden, dass das Intermediat Shikimat zu Beginn des Tages ansteigt und im Laufe der Nacht, in welcher die Pflanze Kohlenhydratmangel durchläuft, abfällt (*Janneke Hendriks, persönliche Kommunikation*). Ergänzend dazu stellte Gibon et al. (2004) abnehmende Shikimatdehydrogenase-Aktivität durch verlängerte Nacht in Arabidopsisblättern fest.

Die abnehmenden Anteile von Glycin und Serin in beiden Kohlenhydratmangelzuständen sind wahrscheinlich auf verringerte Flüsse in die Photorespiration zurückzuführen. Die Zunahme der Aspartatanteile bei verringerter Lichtqualität deckt sich mit der Zunahme dieser Aminosäure während der Nacht sowohl in absoluter Konzentration als auch als Anteil am Gesamtaminosäuregehalt. In allen Fällen sind jedoch klärende Untersuchungen notwendig, um Gründe für das individuelle Verhalten der vorgestellten Aminosäuren näher zu analysieren.

6.1.3 Glutamat zeigt in fast allen Situationen stabile Konzentrationen und Anteile am Gesamtaminosäuregehalt

Eines der erstaunlichsten Ergebnisse der Aminosäureanalyse der vorliegenden Arbeit ist, dass Glutamatgehalte und -anteile keine diurnalen Schwankungen aufzeigen und relativ stabil auf Nitratmangelzustände und auf Niedriglichtbedingungen reagieren. Glutamat schwankt auch in den Untersuchungen von Noctor et al. (2002) weit weniger als alle anderen Aminosäuren. Glutamat ist eines der zentralen Metabolite in der Nitrat- und Ammoniumassimilation und dient in vielen Aminosäurebiosynthesen als Aminogruppendonor. Es gibt ebenso Hinweise darauf, dass Glutamat am Recycling von Ammonium beteiligt ist, welches während der Photorespiration entsteht (Coshigano et al., 1998; Stitt and Krapp, 1999; Novitskaya et al., 2002). Dies setzt einen hohen Fluss durch diesen Stoffwechselweg voraus. Unser Ergebnis führt zu der Annahme, dass Änderungen im Glutamatpool strikt reguliert sein müssen, wie bereits Hsieh et al. (1998) annimmt. Unterstützt wird diese Vermutung durch Aminosäurefütterungsversuche an Tabakblättern (Müller, Dissertation 2001): Während die Fütterungen aller anderen Aminosäuren zu drastischen Anstiegen derselben führen, ändern sich die internen Glutamatgehalte bei Glutamatfütterung nur leicht.

In tierischen Organismen dient die Konzentration an frei vorliegendem Glutamat als Signal für Überschuss an freien Aminosäuren entweder aus Proteinabbau oder Nahrungsaufnahme, und als Folge wird Aminosäurekatabolismus eingeleitet. Initiationschritt ist die Aktivität von Carbamyl-Phosphat Synthase und der Synthese ihres allosterischen Aktivators N-

Acetylglutamat durch N-Acetylglutamat Synthase. Letzteres Enzym wird durch den Gehalt an freiem Glutamat aktiviert. Regulation und Mechanismen des pflanzlichen Aminosäurekatabolismus sind weitgehend unbekannt. PII ein Einheit, die in Mikroorganismen den Stickstoffstatus abschätzt (Forchhammer et al., 1994), konnte auch in Pflanzen identifiziert werden (Hsieh et al., 1998; Ferrario-Mery et al., 2005), ebenso die Protein-Protein Interaktion von PII mit N-Acetylglutamat Kinase, einem Enzym, welches in der Arginin- und Ornithinbiosynthese eine einleitende Rolle spielt (Sugiyama et al., 2004; Chen, 2006). Eine mögliche Beteiligung von frei vorliegendem Glutamat an der Initiation von Aminosäurekatabolismus in Pflanzen könnte ein weiterer Grund für die stabil gehaltenen Konzentrationen dieser Aminosäure sein. Um diese Behauptung zu verifizieren, bedarf es jedoch klärender Experimente.

6.1.4 Die Biosynthese der Aminosäuren muss flexibel auf externe Einflüsse reagieren können, wie das Beispiel von Phenylalanin zeigt

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Hypothese einer koordinierten Aminosäurebiosynthese – nach dem Modell von *E. coli* oder Hefe – von Noctor et al. (2002) in einigen Fällen zutrifft. Die absoluten Konzentrationen der „kleinen“ zeigen während diurnaler Rhythmen unter Kontrollbedingungen auffallend stabile Muster. Die Hauptkomponentenanalyse identifiziert Aminosäuren, die kaum trennende Eigenschaften besitzen. Die Korrelationsanalyse zeigt unter Kontrollbedingungen extrem stabile Korrelationen der meisten „kleinen“ Aminosäuren, selbst über tageszeitliche Schwankungen hinweg. Und die Verhältnisanalyse zeigt für Serin, Methionin, Leucin, Valin, Tryptophan, Tyrosin und Asparagin tendenziell stabile Anteile in allen Stickstoffmangelbedingungen und Leucin und Valin zeigen dies ebenfalls in allen Kohlenstoffmangelbedingungen.

Obwohl die Analyse beider Aminosäure Datensätze Aminosäuren identifiziert hat, deren Gehalte eventuell einer koordinierten Biosynthese unterliegen, konnte auch gezeigt werden, dass die These von Noctor et al (2002) nicht generell angenommen werden kann. Da die Aussagen dieser früheren Veröffentlichung lediglich auf Korrelationsanalysen basieren, ist es wichtig festzuhalten, dass Korrelationsanalysen immer nur Beziehungen beschreiben, aber keine Aussagen über die biologische Relevanz treffen. Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Ergebnisse und deren Diskussion zeigen deutlich, dass diese These erweitert werden muss. Pflanzen sind komplexe biologische Systeme, die flexibel auf sich verändernde Umweltparameter reagieren müssen. Zhao et al. (1998) argumentierte bereits in diese Richtung. Aminosäuren sind nicht nur an der Proteinbiosynthese beteiligt, sondern einige dienen in Pflanzen auch zur Synthese von sekundären Pflanzenstoffen, Hormonen, Nukleinsäuren und sind zentrale Einheit in der primären Stickstoffassimilation.

Das Beispiel Phenylalanin zeigt sehr deutlich, dass Pflanzen sehr individuell diesbezüglich auf gegebene Umweltparameter reagieren. Diese aromatische Aminosäure zeigt in fast allen Manipulationen eine individuelle Antwort. Die Analyse der Phenylalaninanteile zeigt eine Abhängigkeit zu Licht, Nitratgehalt und zum organischen Kohlenstoffstatus. Dieser wahrscheinlich sehr komplexe Regulationsmechanismus dieser Aminosäure ist möglicherweise Folge der Tatsache, dass Phenylalanin Vorläufermetabolit der Phenylpropanoide ist. Aus dieser Gruppe der Sekundärstoffe gehen nicht nur Flavonoide, Isoflavone und Anthocyane hervor, sondern auch Lignin, welches neben Zellulose das häufigste Biopolymer ist (*siehe Einleitung*). Die in dieser Arbeit vorliegende Analyse der Phenylpropanoide in Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus unterstützt die Annahme nach einer individuellen Regulation der

Phenylalaninbiosynthese und zeigt, dass diese wesentlich sinnvoller ist, als die Gehalte in Abhängigkeit der anderen Aminosäuren anzupassen.

6.1.5 Schlussbemerkung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die Gehalte der Aminosäuren klare generelle Tendenzen zeigen, wenn der Kohlenstoff- oder Stickstoffstatus reduziert wird. Die meisten fallen entweder als Antwort auf verringerten Kohlenstoff oder Stickstoff. Die Analysen haben jedoch gezeigt, dass die Synthese einiger individueller Aminosäuren unabhängig von der Synthese anderer Aminosäuren reguliert wird. Zwei Beispiele sind Glutamat, welches erstaunlich stabil in allen physiologischen Zuständen der Pflanze ist, und Phenylalanin, welches sowohl lichtabhängige Reaktionen zeigt als auch individuelle Antworten auf reduzierten Kohlenstoffstatus, Stickstoffstatus und Nitrat gibt. Gerade im Falle von Phenylalanin wäre es interessant mehr über den regulatorischen Einfluss von Nitrat zu erfahren. Denkbar wäre die Verwendung des vorliegenden experimentellen Systems mit gezielter Genexpressionsanalyse von Genen, die für die Phenylalaninbiosynthese relevant sind, gekoppelt mit Enzymaktivitätsmessungen, der dazu korrespondierenden Proteine. Ähnliche Versuche sind prinzipiell für alle Aminosäuren vorstellbar, die in dieser Arbeit in Zusammenhang mit einer nitratspezifischen Antwort gebracht wurden.

6.2 Einfluss von Nitrat auf Nikotin und den Phenylpropanoidstoffwechsel

6.2.1 Nitrat hat keinen regulatorischen Einfluss auf die Nikotinbiosynthese

Die in dieser Arbeit untersuchten Genotypen bzw. Nährstoffbedingungen verhalten sich in Bezug auf die Nikotingehalte gemäß der „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese. Eine sukzessive Erniedrigung des Stickstoffstatus der Pflanzen hatte ebenfalls ein sukzessives Absinken der Nikotingehalte in den Blättern zur Folge. Während die moderat betroffene NR – reduzierte Transformante F23xNia30(145) mit ausreichender Nitratversorgung leicht erniedrigte Nikotingehalte aufweist, sind die Gehalte des Alkaloids in den Pflanzen mit einem drastischen Stickstoffproblem signifikant erniedrigt. Bereits in vorangegangenen Arbeiten konnte auch der allgemeine Kohlenstoff- und Stickstoffstatus der Tabakpflanzen als Ursache für erniedrigte Nikotingehalte der Blätter erkannt werden (Matt, 2001).

Eine ausführliche Analyse des primären Kohlenstoff- und Stickstoffstatus der Pflanze konnte jedoch nicht zur Identifizierung regulatorischer Elemente führen. Durch die Analyse der Vorläufermetabolite Arginin und Ornithin in den Wurzeln wird deutlich, dass die Abnahme von Nikotin in Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus nicht ausschließlich an die Abnahme seiner unmittelbaren Vorläufermoleküle gebunden ist. Die Gehalte dieser beiden Aminosäuren sind in der Transformante F23xNia30(145) im Vergleich zum Kontrollwildtyp sogar tendenziell erhöht und die Transformante Nia30(145) weist bei signifikant niedrigeren Nikotingehalten in den Blättern ähnliche Ornithingehalte in den Wurzeln im Vergleich zum Kontrollwildtyp

auf und nur tendenziell niedrigere Argininkonzentrationen. Es ist anzunehmen, dass die verringerte Nikotinakkumulation durch einen gehemmten Stickstoffmetabolismus bedingt ist. Nitrat selbst übernimmt keine regulatorische Rolle, da der nitratverhungerte Wildtyp und die Nitrat akkumulierende NIA-Transformante in den Blättern vergleichbar niedrige Nikotingehalte haben. Sollten Primärmetabolite an der Regulation der Nikotinbiosynthese beteiligt sein, so sind diese jenseits der Nitratreduktion zu suchen.

6.2.2 Stickstoffmangel führt zu einer Stimulation des Phenylpropanoidstoffwechsels

Es ist weitgehend bekannt, dass Pflanzen, die in stickstoffarmer Umgebung wachsen einen erhöhten Phenylpropanoidstoffwechsel haben. Fajer et al. (1992) konnten dieses Phänomen in *Plantago lanceolata* nachweisen, Hakulinen et al. (1998) in *Salix myrsinifolia* und Gebauer et al. (1998) in *Pinus taeda*. Ähnliche Ergebnisse wurden in den vorliegenden Versuchen gefunden. Die Lignifizierung zeigt sich in den unter Nitratmangel angezogenen Wildtyppflanzen wesentlich weiter fortgeschritten als im Vergleich zum Kontrollwildtyp. Chlorogensäure, die auch von Aerts und Baumann (1994) als alternative Speichersubstanz für Ligninvorstufen diskutiert wird, zeigt ebenfalls in den unter Nitratmangel angezogenen Wildtyppflanzen 4-fach höhere Werte im Vergleich zum Kontrollwildtyp (siehe Kapitel 5.3.2.1). Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die Rutingehalte.

In den Versuchen von Gebauer et al. (1998) konnten Korrelationen zwischen erhöhten Phenylpropanoiden und nicht strukturellen Kohlenhydraten festgestellt werden, wobei diese Versuche mit unterschiedlicher Nitratverfügbarkeit immer an erhöhten CO₂-Gehalt gekoppelt waren. Im Gegensatz dazu schlägt Lambers et al. (1993) eine Regulation des Phenylpropanoidstoffwechsels ausgehend von der Verfügbarkeit des Vorläufermetabolits Phenylalanin vor und dessen Bedarf innerhalb der Proteinbiosynthese. Diese Schlussfolgerung spiegelt sich in der Hypothese von Margna et al. 1977 wider. Es wird hier postuliert, dass Pflanzen mit ausreichender Nitratverfügbarkeit schnell wachsen und Phenylalanin hauptsächlich zur Proteinbiosynthese benötigt wird. Befinden sich Pflanzen in Umständen, in welchen Wachstum und Proteinbiosynthese limitiert sind, steht Phenylalanin für die Phenylpropanoidbiosynthese zur Verfügung.

Diese Veröffentlichungen stehen in Einklang mit der „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese von Coley et al. (1985). Limitierte Stickstoffverfügbarkeit führt bei Pflanzen zu verlangsamtem Wachstum und zu Blättern mit einer verlängerten Lebensdauer. In einer solchen Situation tendieren Pflanzen dazu, mehr Energie in Verteidigungsstrategien zu investieren, bevorzugt in die Sekundärstoffe mit einem niedrigen Stickstoffgehalt und einem niedrigem „turn-over“. Sekundärstoffe, die diese Voraussetzungen erfüllen sind meist struktureller Natur oder erfüllen neben ihrer Verteidigungsfunktion auch eine Speicherfunktion.

Es liegen Hinweise vor, dass die Verfügbarkeit des Vorläufermetabolits einen direkten Einfluss auf die Biosynthese der Phenylpropanoide hat. Henkes et al. (2000) fand in *Nicotiana tabacum* antisense-Pflanzen mit verringerter Transketolase Aktivität sowohl reduzierte Gehalte aller aromatischen Aminosäuren als auch reduzierte Phenylpropanoidgehalte. Matt et al. (2002) fand ebenfalls in Tabakpflanzen mit verringerter Rubisco-Aktivität oder gewachsen unter suboptimalen Lichtbedingungen, sowohl reduzierte Gehalte aller aromatischen Aminosäuren, als auch reduzierte Gehalte von Chlorogensäure.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass die Vorläufermetabolite Phenylalanin und Tyrosin keinen direkten regulatorischen Einfluss auf den Phenylpropanoidstoffwechsel haben. Beide aromatischen Aminosäuren sind in den nitratverhungerten Wildtypen und den Nitrat akkumulierenden Transformanten Nia30(145) zu allen Tageszeiten im Vergleich zum Kontrollwildtyp signifikant erniedrigt (*siehe Kapitel 5.3.3.1*). Doch die Phenylpropanoidgehalte der nitratverhungerten Wildtypen sind im Vergleich dieser beiden Genotypen und im Vergleich zum Kontrollwildtyp signifikant erhöht.

Eine Unterstützung der These, dass der Fluss von Phenylalanin in Richtung Proteinbiosynthese oder Phenylpropanoidsynthese vom Nitratstatus der Pflanze diktiert wird, kann auch mit unserem experimentellen Ansatz nicht gegeben werden, obwohl die Proteingehalte in den nitratverhungerten Wildtypen signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolle sind (*siehe Kapitel 5.1.4*). Zur abschließenden Klärung wären dazu Fluss-Studien mit radioaktiv markiertem Phenylalanin notwendig.

Ein stimulierender Einfluss akkumulierender Kohlenhydrate auf die Phenylpropanoidbiosynthese kann auch ausgeschlossen werden. Nitratdefiziente Wildtypen akkumulieren überschüssige Kohlenhydrate als Stärke. Die löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose sind im Vergleich zum Kontrollwildtyp zu allen Tageszeiten signifikant erniedrigt (*siehe Kapitel 5.1.5*).

6.2.3 Nitratreduktase reduzierte Transformanten weisen keinen erhöhten Phenylpropanoidstoffwechsel auf. Dadurch kann Nitrat als regulatorisches Element identifiziert werden

Nitrat akkumulierende NR-defiziente Transformanten weisen im Gegensatz zu nitratmangelernährten Wildtypen keine erhöhten Phenylpropanoidkonzentrationen in den Blättern auf. Trotz vergleichbarem Kohlenstoff- und Stickstoffstatus zu den nitratverhungerten Wildtypen haben die nahezu NR-defizienten Transformanten Nia30(145) gewachsen mit 12 mM Kaliumnitrat keine erhöhten Phenylpropanoidgehalte in den Blättern. Da das experimentelle System der vorliegenden Arbeit bei beiden Nitratverarmungen eine physiologische Steuerung des allgemeinen Stickstoffstatus der Pflanze von einer Steuerung des Nitrats *per se* unterscheidet, identifiziert dieses Ergebnis Nitrat als mögliches regulatorisches Element in der Phenylpropanoidbiosynthese. Ein niedriger Nitratgehalt innerhalb der Blätter hat einen hohen Gehalt an Phenylpropanoidintermediaten und den Endprodukten Chlorogensäure und Rutin zur Folge.

Ausnahme hierbei bilden die Kaffeesäuregehalte der F23xNia30(145) ernährt mit 12 mM Kaliumnitrat. Dieses Ergebnis konnte nicht ausreichend erklärt werden. Kaffeesäure ist ein wichtiges Intermediat in der Synthese der Ligninvorstufen Coniferyl- und Sinapoylalkohol und des Intermediats Ferulasäure. Zellwandgebundene Ferulasäure ist in diesen Pflanzen im Vergleich zu den anderen Genotypen erhöht. Es könnte über eine leicht erhöhte phenolische Vernetzung der (sekundären) Zellwand in diesen Transformanten spekuliert werden.

6.2.4 Die Lignifizierung der nitratverhungerten Wildtypen ist im Stammgewebe erheblich erhöht

Der colorimetrische Test zum Nachweis der Lignifizierung des Stammgewebes ergab bei den nitratverhungerten Wildtypen eine erhöhte Lignifizierung vergleichbarer Stammabschnitte. Ein quantitativer Ligninnachweis wurde nicht erbracht. In Henkes et al. (2000) lieferte die quantitative und colorimetrische Nachweismethode vergleichbare Ergebnisse. Das Resultat zeigt deutlich, dass ein erhöhter Phenylpropanoidstoffwechsel zum Teil zur erhöhten Lignifizierung des Stammgewebes beiträgt. Lignin ist als eines der hauptsächlichsten Endprodukte in diesen Pflanzen zu betrachten. In seiner Funktion als strukturelles Element ist dieses Ergebnis ebenfalls eine Bestätigung der „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese, in welcher ausgearbeitet wird, dass Pflanzen unter einem Nährstoffmangel dazu neigen, Sekundärstoffe mit einem niedrigen „turn-over“ zu synthetisieren, wobei diese meist struktureller Natur sind. Transgene Tabakpflanzen mit einer erhöhten PAL-Aktivität wiesen ebenfalls erhöhte Lignifizierung des Stammgewebes auf. Die Komposition des Lignins bzw. die Anteile an G- und S-Einheiten allerdings änderte sich nicht (Howels et al., 1996; Sewalt et al., 1997). Die signifikant niedrigeren Gehalte frei gelöster Ferulasäure in den Pflanzen der vorliegenden Arbeit sind demnach eher eine Folge des Nitratmangelstatus, als der erhöhten Transkription von *PAL*. Es muss jedoch an dieser Stelle festgehalten werden, dass eine erhöhte Transkription eines Gens nichts über die tatsächliche Aktivität des korrespondierenden Enzyms aussagt. Lignifizierung des Gewebes stellt einen Schutz der Pflanzen gegen Phytopathogene und Fraßfeinde dar und gewährleistet ebenfalls mehr Stabilität des Stammes. Nitratmangelernährte Wildtypen haben eine wesentlich längere Wachstumsperiode, um letztendlich die Reproduktionsphase zu erreichen. Eine erhöhte Lignifizierung gewährleistet demnach diesen Pflanzen eine angemessene Verteidigung unter Mangelbedingungen und bestätigt in diesem Sinne die „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese.

6.2.5 Zellwandgebundene Ferulasäure zeigt in nitratmangelernährten Wildtypen keine Änderung, zellwandgebundene p-Coumarsäure dagegen ist signifikant erhöht

Primäre und sekundäre Zellwand sind über Ether- und Esterbindungen stark mit den phenolischen Substanzen Ferulasäure und p-Coumarsäure vernetzt. Ferulasäure bildet Diether- oder Diesterbrücken zwischen Polysacchariden untereinander oder zwischen Polysacchariden und Lignin. Ferulasäureverknüpfungen innerhalb der Zellwand stabilisieren diese, setzen damit aber gleichzeitig ihre Kapazität zur Streckung herunter (Baucher et al., 1998 und Zitate darin). Man findet sie aus diesem Grund hauptsächlich in sekundärer Zellwand und Geweben, die sich nicht mehr in der Phase des exponentiellen Zellwachstums befinden. Die zellwandgebundenen Ferulasäuregehalte der Blätter aller Genotypen unterscheiden sich im Vergleich nicht signifikant voneinander. Nitratmangel scheint keine Auswirkung auf die Einlagerung der Ferulasäure in die Zellwand zu haben. Zellwachstum unter Nitratmangel wird intensiv untersucht. Es gibt demnach mehrere Hinweise, die die geringe Zellgröße im Zusammenhang mit Nitratmangel erklärt. Radin & Boyer (1982) machen einen geringeren Turgor innerhalb der Zellen nitratmangelernährter Pflanzen für die verringerte Zellgröße verantwortlich. MacAdam, Nelson & Sharp (1992) stellten eine Verbindung zwischen der Herabsetzung des Zellwachstums und einem Anstieg von Zellwandkomponenten verknüpfender Peroxidasen her, die signifikant zur Inflexibilität der Zellwand beitragen. Die in dieser Arbeit ermittel-

ten Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass Ferulasäureverbindungen innerhalb der Zellwand unter Nitratmangel keine Rolle in der Verkürzung der Blatt- und Zellentwicklung spielen.

Die Funktion zellwandgebundener p-Coumarsäure ist bisher nicht besonders gut verstanden. Kleine Anteile findet man im frühen Stadium der primären Zellwand mit Arabinoglucanen verestert. In der sekundären Zellwand bildet p-Coumarsäure zusammen mit Ferulasäure die Verbindung zwischen Strukturproteinen der Zellwand und den Polysacchariden. p-Coumarsäure wird während der Entwicklung der sekundären Zellwand zu geringen Teilen an Polysaccharide verestert und zu wesentlich größeren Teilen an Lignin (Jung und Ralph, 1990; Jung und Deetz, 1993), scheint aber im Vergleich zu Ferulasäure an keinen Verknüpfungen innerhalb der Zellwand beteiligt zu sein (Lam et al., 1992). Mehrere Autoren konnten einen Zusammenhang zwischen steigender Anzahl an Esterbindungen mit p-Coumarsäure innerhalb der Zellwand und der Herabsetzung ihrer Verdaubarkeit feststellen (Hartley et al., 1972; Akin, 1982; Burritt et al., 1984). Del Rio et al. (2004) wies eine hemmende Wirkung der p-Coumarsäure auf Enzyme nach, die nach einer Pilzpenetration der Pflanzengewebe vom Phytopathogen zum Zellwand- und Ligninverdau freigesetzt werden. Kontrovers dazu zeigte Scobbie et al. (1993), dass die mit Lignin veresterte p-Coumarsäure der sekundären Zellwand eher ein Indikator für deren Lignifizierung ist, als dass sie Einfluss auf die Verdaubarkeit bzw. Abbau der Zellwand durch fremde Organismen hat. Die signifikant erhöhten zellwandgebundenen p-Coumarsäuregehalte in nitratmangelernährten Tabakpflanzen in den vorliegenden Versuchen unterstützen beide oben beschriebenen Schlussfolgerungen. Agiert p-Coumarsäure als Abwehrsubstanz gegen Phytopathogenen oder Fraßfeinde, würde dieses Ergebnis ebenfalls die „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese unterstützen. Ist zellwandgebundene p-Coumarsäure als Indikator für die Lignifizierung der sekundären Zellwand zu verstehen, steht dieses Ergebnis in Einklang mit der erhöhten Lignifizierung der nitratmangelernährten Wildtypen.

6.2.6 Transkripte des Shikimatstoffwechsels zeigen keine signifikanten Veränderungen innerhalb der Genotypen

Weder die Transkripte für *DAHPS* noch für *ShDH-2* zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich aller Genotypen. Die Expression dieser Transkripte scheint völlig unabhängig vom Stickstoff- bzw. Nitratstatus der Pflanze zu reagieren. Bisher bekannte transkriptionelle Regulatoren sind stressbezogen. Elicitor, Licht und Verwundung haben eine generell erhöhte Transkription aller der bis dato isolierten cDNAs des Shikimatweges zur Folge (Schmid und Amrhein 1995 und Zitate daraus). Die Tatsache, dass 20% des fixierten Kohlenstoffs in den Shikimatbiosyntheseweg fließen und dass die Vorläufermetabolite Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP) aus dem Pentosephosphatweg bzw. aus der Glykolyse stammen, lässt eine starke Verknüpfung des Shikimatweges mit dem Kohlenstoffmetabolismus annehmen.

In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass ein Ausschalten des *Csr* (Carbon storage regulator) eine Erhöhung des Ausgangsproduktes PEP zur Folge hat und in einer erhöhten DAHP- und Phenylalaninengehalt resultiert, ebenso wie in einer signifikant höheren DAHPS-Aktivität (Tataroko et al., 2001). Den gleichen Effekt hat die Überexpression von Transketolase in *E. coli* (Tataroko et al., 2001). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass Hefe *DHAPS* und Chorisman-Synthase codierende Gene GCN4-kontrollierte Elemente in ihren Promotorregionen

haben. Bei niedrigen Gehalten einer einzelnen Aminosäure kommt es bei Genen mit GCN4-Bindungsstellen zu einer Repression ihrer Expression (*siehe Einleitung*).

Über transkriptionelle Regulatoren im Dialog des Kohlenstoffmetabolismus mit dem Shikimatweg ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nichts bekannt. Eine Reduzierung der Transketolase in *Nicotiana tabacum* dagegen hat signifikant niedrigere Gehalte an aromatischen Aminosäuren zur Folge (Henkes et al., 2000). Gibon et al. (2004) konnte bei Arabidopsispflanzen unter kohlenstofflimitierten Bedingungen, hervorgerufen durch verlängerte Nacht, eine Erniedrigung der ShDH-Aktivität nachweisen, aber keine konstante Erniedrigung des *ShDH*-Transkripts At3g06350. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen zum einen, dass zumindest manche Gene des Shikimatweges nicht vom Stickstoffstatus der Tabakpflanzen beeinflusst werden, und dass eine Aminosäureverarmung im Einzelnen und im Gesamten ebenfalls keine Auswirkung auf die analysierten Transkripte des Shikimatweges hat.

6.2.7 Transkripte des Phenylpropanoidstoffwechsels sind in nitratverhungerten Wildtypen signifikant erhöht

Die Erstellung von Transkriptionsprofilen einiger Transkripte der Genfamilien *PAL*, *4Cl* und *HQT* durch quantitative RT-PCR zeigen eine signifikant erhöhte Expression in den nitratverhungerten Wildtypen. Dieser Anstieg ist weder in den Nia30(145) noch in den F23xNia30(145), beide ernährt mit 12 mM Kaliumnitrat, zu finden. Die Hybridisierung eines Tomaten-Oligomikroarrays, der speziell Gene des Sekundärstoffwechsels und einige ausgewählte des Primärstoffwechsels enthält, bestätigt die Induktion spezifischer Gene des Phenylpropanoidstoffwechsels in nitratverhungerten Wildtypen und das Ausbleiben dieser Induktion in der NIA-reduzierten Transformante Nia30(145) gewachsen mit 12 mM Kaliumnitrat. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Transkripte des Phenylpropanoidstoffwechsels spezifisch durch niedrigen Nitratgehalt induziert werden können. Interessanterweise sind die *PAL* Transkripte der nitratmangelernährten Nia30(145) über den gesamten Tagesgang hinweg nicht signifikant erhöht. *4Cl-2* und *HQT* dagegen sind eindeutig induziert in diesen Pflanzen. Obwohl die nitratverhungerten Transformanten niedrige Nitratgehalte haben, sind diese immer noch signifikant höher im Vergleich zu den gleich ernährten Wildtypen. Es besteht die Möglichkeit, dass *PAL* als Schlüsselenzym des Phenylpropanoidstoffwechsels wesentlich sensitiver auf Nitratgehalte reagiert als die Gene der nach geordneten Enzyme.

Arabidopsiskeimlinge unter Stickstoffmangel zeigen ebenfalls Induktion vieler Gene des Phenylpropanoid- und Flavonoidstoffwechsels (Scheible et al., 2004). Die Zugabe von Kaliumnitrat zu den nitratverhungerten Keimlingen hatte eine signifikante Reduktion dieser Transkripte erst nach 3 Stunden zur Folge (Scheible et al., 2004). Wang et al. (2004) identifizierten Gene, die direkt auf Nitrat reagieren, indem Unterschiede der Genexpression von nitratverhungerten Arabidopsis Wildtyppflanzen und NIA Doppelmutanten zwei Stunden nach Nitratzugabe verglichen wurden. Es wurden jedoch keine signifikanten Änderungen in der Expression von *PAL* und *4CL* festgestellt. Bestätigend dazu konnte Scheible et al. (2004) zeigen, dass viele der von Wang et al. (2004) nitratgesteuerten Gene schon bereits nach 30 Minuten Nitratzugabe eine signifikante Expressionsänderung aufwiesen. Gene, die dem Phenylpropanoidstoffwechsel zugeordnet sind, zeigen diese Änderungen jedoch erst nach 3 Stunden (Scheible et al., 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass diese Gengruppe des Sekundärstoffwechsels verzögert antwortet, um adäquat auf Änderungen des Primärstoffwech-

sels zu reagieren. Des Weiteren könnten Gene des Phenylpropanoidstoffwechsels eine höhere Transkriptstabilität aufweisen, so dass es zu diesen verzögerten Reaktionen kommt. Auch pflanzenspezifische Unterschiede können hier eine Rolle spielen. Arabidopsis und Tabak haben sehr verschiedene Spektren den Sekundärstoffwechsel betreffend. Unterschiedlich ausgeprägte Regulationsmöglichkeiten diesbezüglich können in Betracht gezogen werden. Zellwandgebundene Ferulasäure z.B. bleibt bei nitratverhungerten Tabakwildtyp-Pflanzen unverändert, wohingegen sie unter Nitratmangelbedingungen in Arabidopsiskeimlingen steigt (Scheible et al., 2004).

6.2.8 Schlussbemerkung und Ausblick

Änderungen des Stickstoffstatus führen zu der erwarteten Verlagerung von stickstoffreichen zu kohlenstoffreichen Sekundärmetaboliten, ganz wie es die „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese voraussagt. Das Ergebnis bestätigt die Schlussfolgerungen, die Matt et al. (2002) aus vorangegangenen Studien gemacht hat, in denen der Kohlenstoffstatus reduziert wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Verlagerungen nicht aufgrund der Änderungen der Vorläufermetabolite stattfindet. Im Falle der Phenylpropanoide wurde deutlich, dass Änderungen der Nitratgehalte einen direkten Einfluss auf deren Biosynthese haben. Durch noch ungeklärte Mechanismen wirkt Nitrat auf die Genexpression relevanter Gene des Phenylpropanoidstoffwechsels. Zur Klärung dieser Mechanismen wäre eine gezielte Genexpressionsanalyse einiger Transkriptionsfaktorgene, die in Solanaceae wahrscheinlich eine regulatorische Rolle bezüglich des Phenylpropanoidstoffwechsels spielen, denkbar. Enzymaktivitätsmessungen einiger Schlüsselenzyme des Phenylpropanstoffwechsels würden zeigen, ob der erhöhten Expression einiger Gene auch erhöhte Enzymaktivitäten folgen.

7 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Änderungen im Kohlenstoff- bzw. Stickstoffstaus der Pflanzen zu einer parallelen statt reziproken Änderung der kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Primärmetabolite führen. Unter diesem Gesichtspunkt wurden in der vorliegenden Arbeit der Aminosäurestoffwechsel und der Sekundärstoffwechsel unter reduzierten Stickstoffbedingungen untersucht. Zur Beeinflussung des Stickstoffstoffwechsels wurden nitratmangelernährte Tabakwildtyppflanzen und Genotypen mit unterschiedlich stark reduzierter Nitratreduktase-Aktivität verwendet. Dieses experimentelle System erlaubt zusätzlich durch den Vergleich Nitrat defizienter Wildtyppflanzen mit Nitrat akkumulierenden NIA-Transformanten Prozesse zu identifizieren, die durch Nitrat gesteuert werden. Die Analysen der Primär- und Sekundärmetabolite wurde in allen Genotypen diurnal durchgeführt, um auch tageszeitlich abhängige Prozesse zu identifizieren.

Die Analyse der absoluten Gehalte aller individuellen Aminosäuren enthüllte bei den meisten erstaunlich stabile diurnale Muster mit einem Anstieg während des Tages und einem Abfall in der Nacht in Wildtyppflanzen gewachsen mit ausreichend Nitrat. Dieses Ergebnis legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Biosynthese der Aminosäuren koordiniert abläuft. In Pflanzen mit reduziertem Stickstoffstatus haben diese diurnalen Muster jedoch keinen Bestand. Die Kombination des erzeugten stickstoffbasierten Aminosäuredatensatz in Kombination mit einem bereits erzeugten Aminosäuredatensatz unter kohlenstofflimitierten Bedingungen von Matt et al. (2002) führte durch Hauptkomponentenanalyse (PCA) und Korrelationsanalyse zu dem Ergebnis, dass die Hypothese nach einer koordinierten Aminosäurebiosynthese nicht allgemeine Gültigkeit hat. Die PCA identifizierte Glutamin, Glutamat, Aspartat, Glycin, Phenylalanin und Threonin als Faktoren, die den Datensätzen ihre charakteristische Eigenschaft und deren Varianz verleihen. Die Korrelationsanalyse zeigte, dass die sehr guten Korrelationen der individuellen Aminosäuren untereinander in reduzierten Stickstoff- und Kohlenstoffbedingungen sich verschlechtern. Das Verhältnis einer einzelnen Aminosäure relativ zu den anderen führte zur Identifizierung einiger Aminosäuren, die individuelle Antworten auf Stickstoff- und/oder Kohlenstoffstatus zeigen, und/oder speziell auf Nitrat, Licht und/oder den Energiestatus der Thylakoidmembran. Glutamat beispielsweise verhält sich in den meisten Situationen stabil, Phenylalanin dagegen zeigt in jeder physiologischen Situation eine individuelle Antwort. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu einer Erweiterung der Hypothese einer koordinierten Synthese der Aminosäuren dahingehend, dass diese nicht generell für alle Aminosäuren angenommen werden kann. Es gibt einige Aminosäuren deren, Anteile sich situationsbedingt anpassen.

Die Reduktion des Stickstoffstatus in nitratmangelernährten Tabakwildtyppflanzen führte zu der, nach der „Carbon-Nutrient-Balance“ Hypothese erwarteten Verlagerung der kohlenstoffreichen Phenylpropanoide und des stickstoffreichen Nikotins. Die Erhöhung der Phenylpropanoidgehalte war nicht in der Nitrat akkumulierenden NIA-Transformante zu beobachten und somit konnte Nitrat als regulatorisches Element identifiziert werden. Ein Einfluss der Vorläufermetabolite konnte ausgeschlossen werden, da sowohl nitratmangelernährter Wildtyp als auch die Nitrat akkumulierende NIA-Transformante ähnliche Gehalte dieser aufwiesen. Genexpressionsanalysen über Mikroarray-Hybridisierung und quantitative RT-PCR zeigten, dass Nitrat durch noch nicht geklärte Mechanismen Einfluss auf die Expression einiger Gene nimmt, die dem Phenylpropanoidstoffwechsels zugeordnet sind.

Summary

It is known that changes in carbon and nitrogen status of a plant lead to parallel rather than reciprocal changes of carbon and nitrogen containing primary metabolites. Based on this finding the influence of carbon and nitrogen status on the amino acid profile as well as on secondary metabolism was investigated in tobacco. Manipulations of the nitrogen status were carried out in two ways: Tobacco wild type plants were cultivated in nitrogen-replete and nitrogen starved conditions; in addition nitrate accumulating transformants with reduced nitrate reductase (NIA) activity were used. The comparison of the nitrate starved wild type and the nitrate accumulating NIA-transformant allows to distinguish processes which were driven by the nitrogen status of a plant or by nitrate itself. Due to the fact that most primary metabolites have diurnal changes the analysis of primary and secondary metabolites were done at six different time points per day in order to identify diurnal processes.

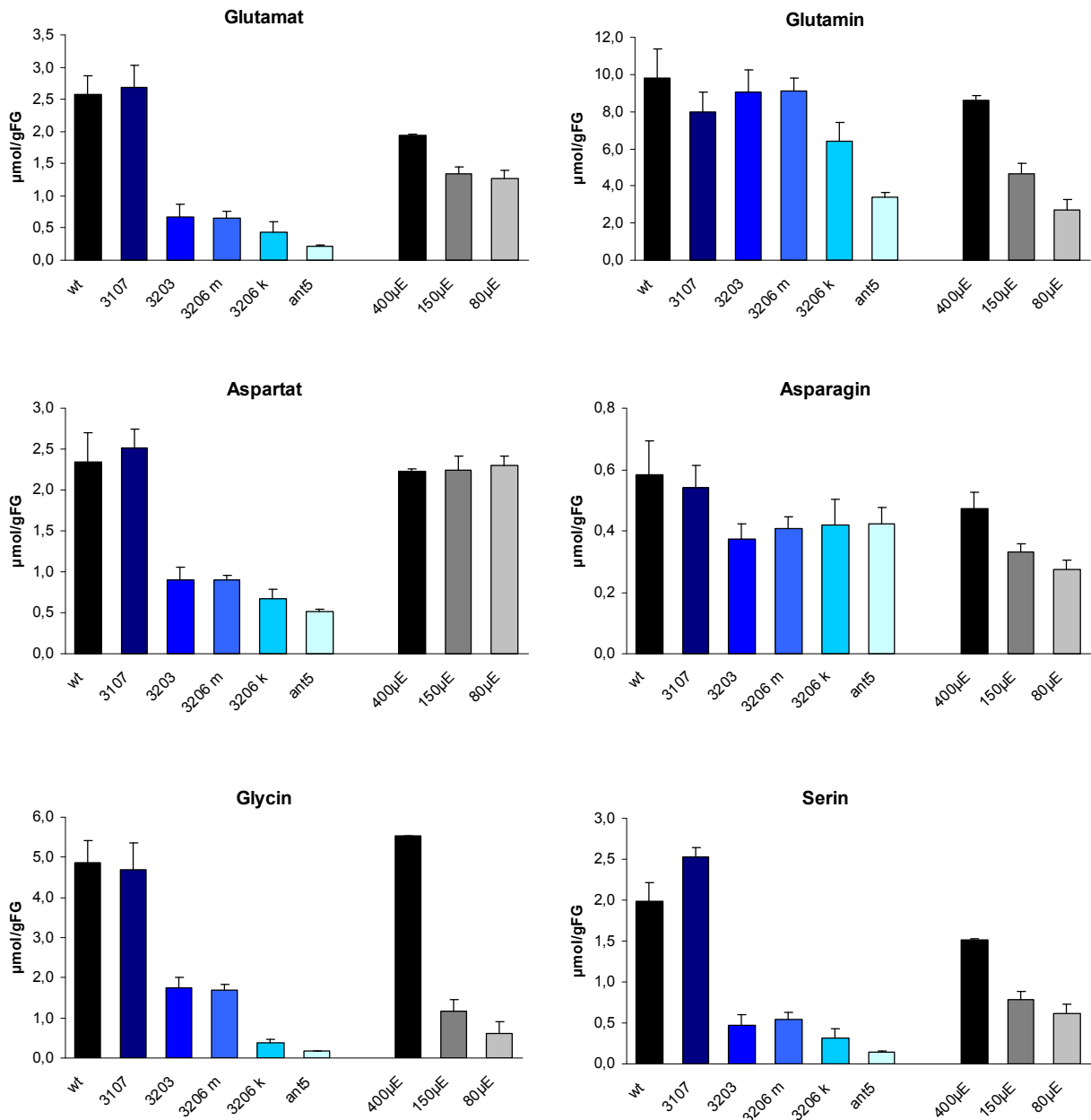
Analysis of the absolute levels of individual amino acids under normal nitrogen supply conditions reveals characteristic diurnal patterns for the majority of amino acids with an increase during the day and a decrease during the night. This result indicates that amino acid biosynthesis might be coordinated. However these diurnal patterns are no longer stable in plants with reduced nitrogen status; furthermore absolute levels of individual amino acids differed over a wide range of concentrations. The hypothesis of a coordinated regulation of amino acid metabolism was further tested by combining this dataset with an amino acid dataset produced under carbon limited conditions (Matt et al., 2002) and applying Principal Component Analysis (PCA) and correlation analysis. Glutamine, glutamate, aspartate, glycine, phenylalanine and threonine were responsible for the clear separation of the different genotypes and experimental conditions in the PCA plot. The data from the correlation analysis show that most of the minor amino acids have very good correlations under carbon and nitrogen sufficient conditions. These correlations became weaker with decreasing carbon and nitrogen status of the plants. These results clearly indicate that a coordinated biosynthesis of amino acids is not a general phenomenon. Comparing the levels of each individual amino acid to the total amino acid pool revealed specific answers of a particular amino acid to carbon and/or nitrogen status, to nitrate and/or light and to energy status of the thylakoid membrane. Glutamate for instance is remarkably stable in most of the conditions and phenylalanine shows an individual response in every situation. From these results it was concluded that the hypothesis of a coordinated biosynthesis of amino acids might be true for some amino acids, but clearly needs to be extended because some amino acids adjust their levels in an individual fashion depending on the external conditions.

The reduction of nitrogen status of nitrate starved wild type plants leads to a shift from carbon-rich phenylpropanoids to nitrogen-rich nicotine as predicted by the "carbon-nutrient-balance hypothesis". Increased phenylpropanoids were not observed in nitrate accumulating NIA-transformants. Therefore nitrate could be identified as a regulatory element in phenylpropanoid metabolism. A regulatory influence of precursors could be excluded since nitrate starved wild type and NIA-transformant had similar levels. Genexpression analysis via microarray hybridisation and quantitative RT-PCR shows that nitrate acts a transcriptional regulator of genes involved in phenylpropanoid metabolism. The elucidation of this regulatory role of nitrate requires further investigation.

8 Anhang

8.1 Absolute Aminosäuregehalte in Pflanzen mit reduzierter Rubisco-Aktivität und Pflanzen gewachsen unter suboptimalen Lichtbedingungen (Matt et al., 2002)

8.1.1 Die Hauptaminosäuren



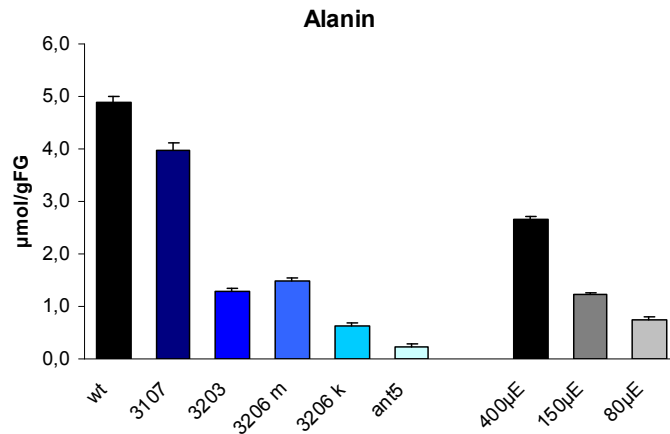
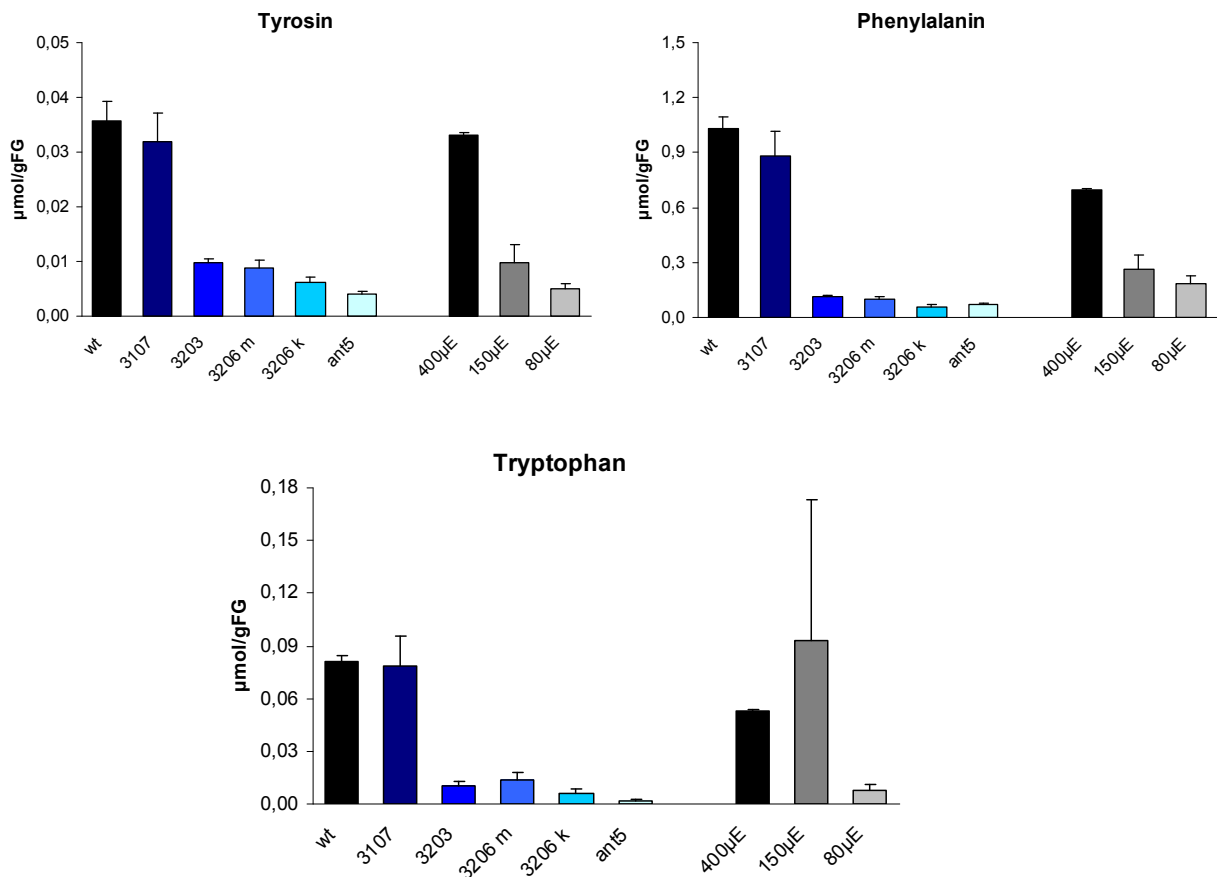
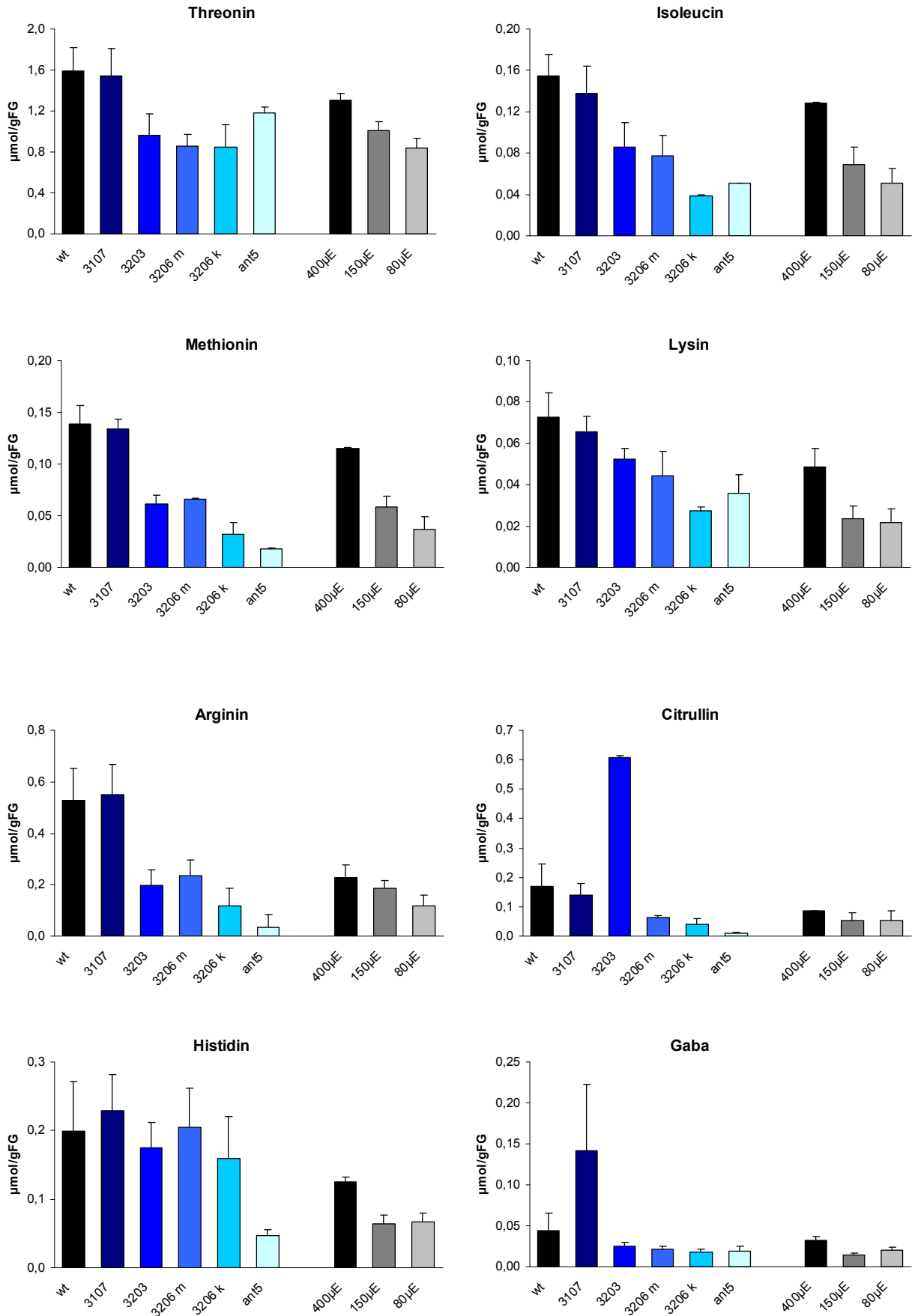


Abb. 8.1: Absolute Gehalte der Hauptaminosäuren in Blättern der Tabakpflanzen mit reduziertem Kohlenhydratstatus. Links sind dargestellt die Aminosäuregehalte der Untersuchung von Pflanzen mit unterschiedlich reduzierter Rubisco-Aktivität: Wildtyp (SR1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●). Rechts sind dargestellt die Aminosäuregehalte der Untersuchung von Wildtypen (SNN) gewachsen mit unterschiedlicher Lichtqualität: Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400μE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150μE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80μE (■).

8.1.2 Die „kleinen“ Aminosäuren





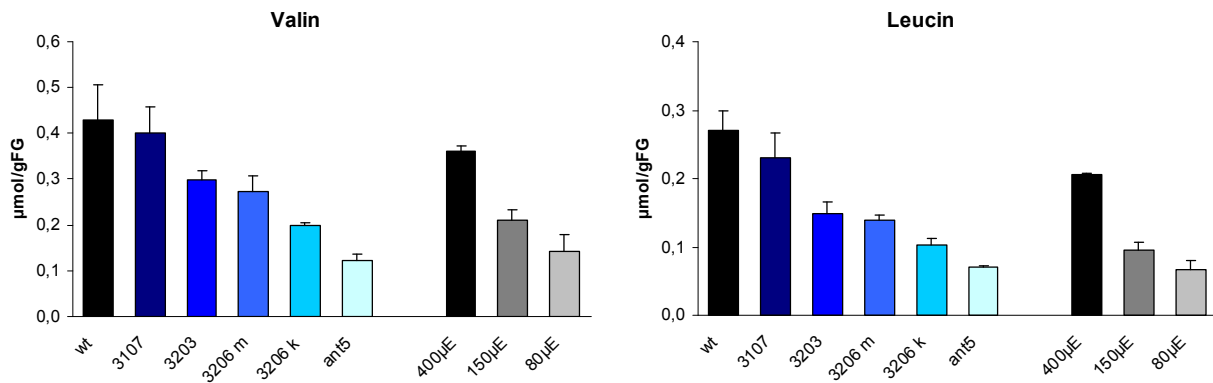
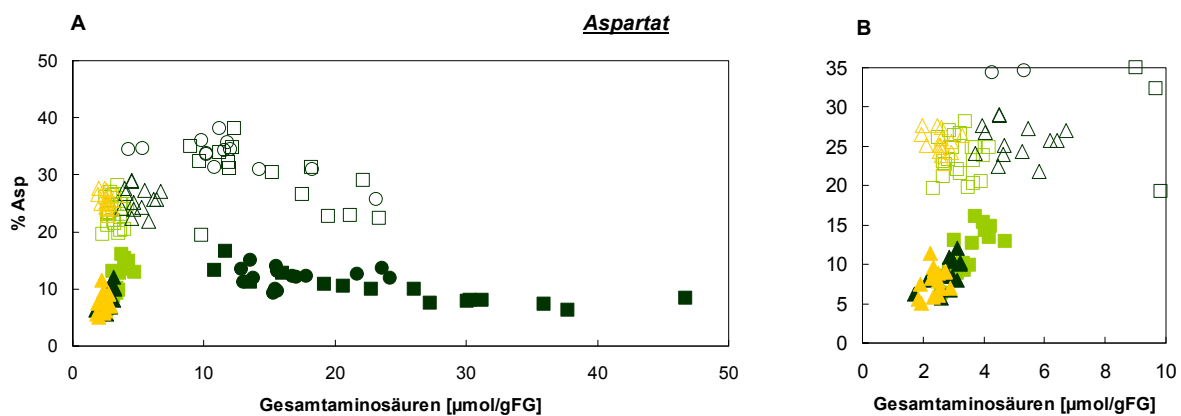


Abb. 8.2: Absolute Gehalte der kleinen Aminosäuren in Blättern der Tabakpflanzen mit reduziertem Kohlenhydratstatus. Links sind dargestellt die Aminosäuregehalte der Untersuchung von Pflanzen mit unterschiedlich reduzierter Rubisco-Aktivität: Wildtyp (SR1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●). Rechts sind dargestellt die Aminosäuregehalte der Untersuchung von Wildtypen (SNN) gewachsen mit unterschiedlicher Lichtqualität: Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400µE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150µE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80µE (■).

8.2 Verhältnisanalyse der unter Kapitel 5.2.2.5.2 und 5.2.2.5.3 nicht aufgeführten Aminosäuren

8.2.1 Aminosäuren mit reduziertem Stickstoffstatus



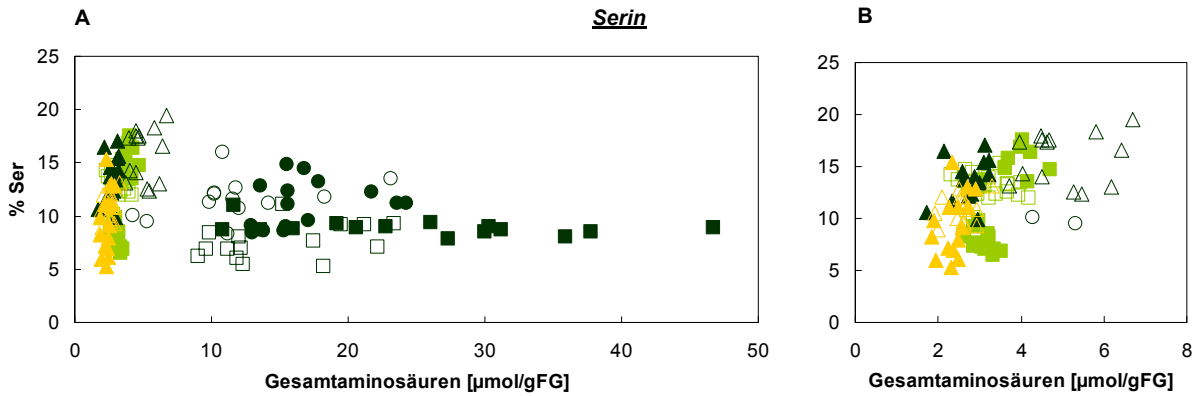
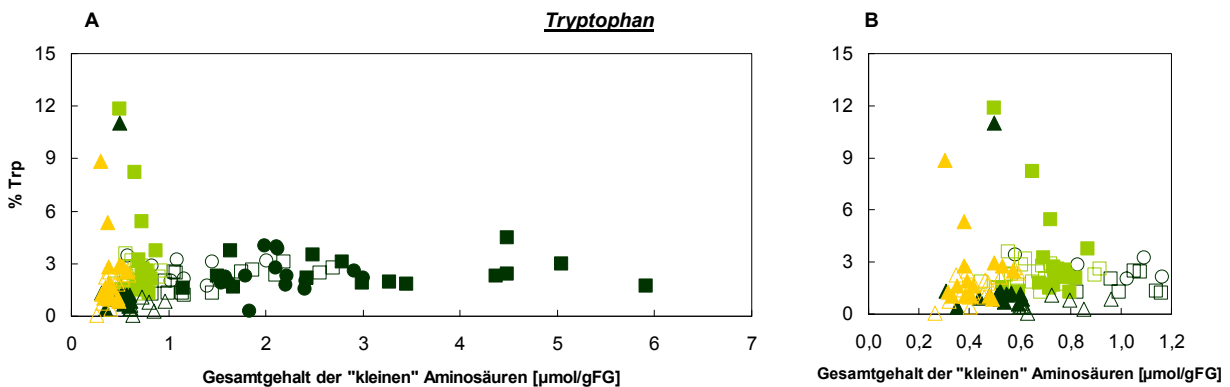
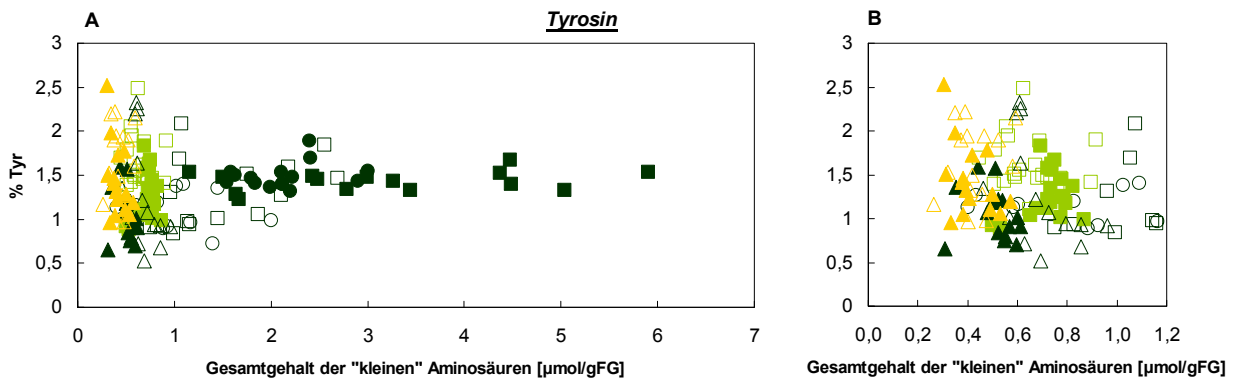


Abb. 8.3: Prozentualer Anteil aller nicht in *Kapitel 5.2.2.5.2* aufgeführten Aminosäuren im Verhältnis zum Gesamtaminosäuregehalt. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (□), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).



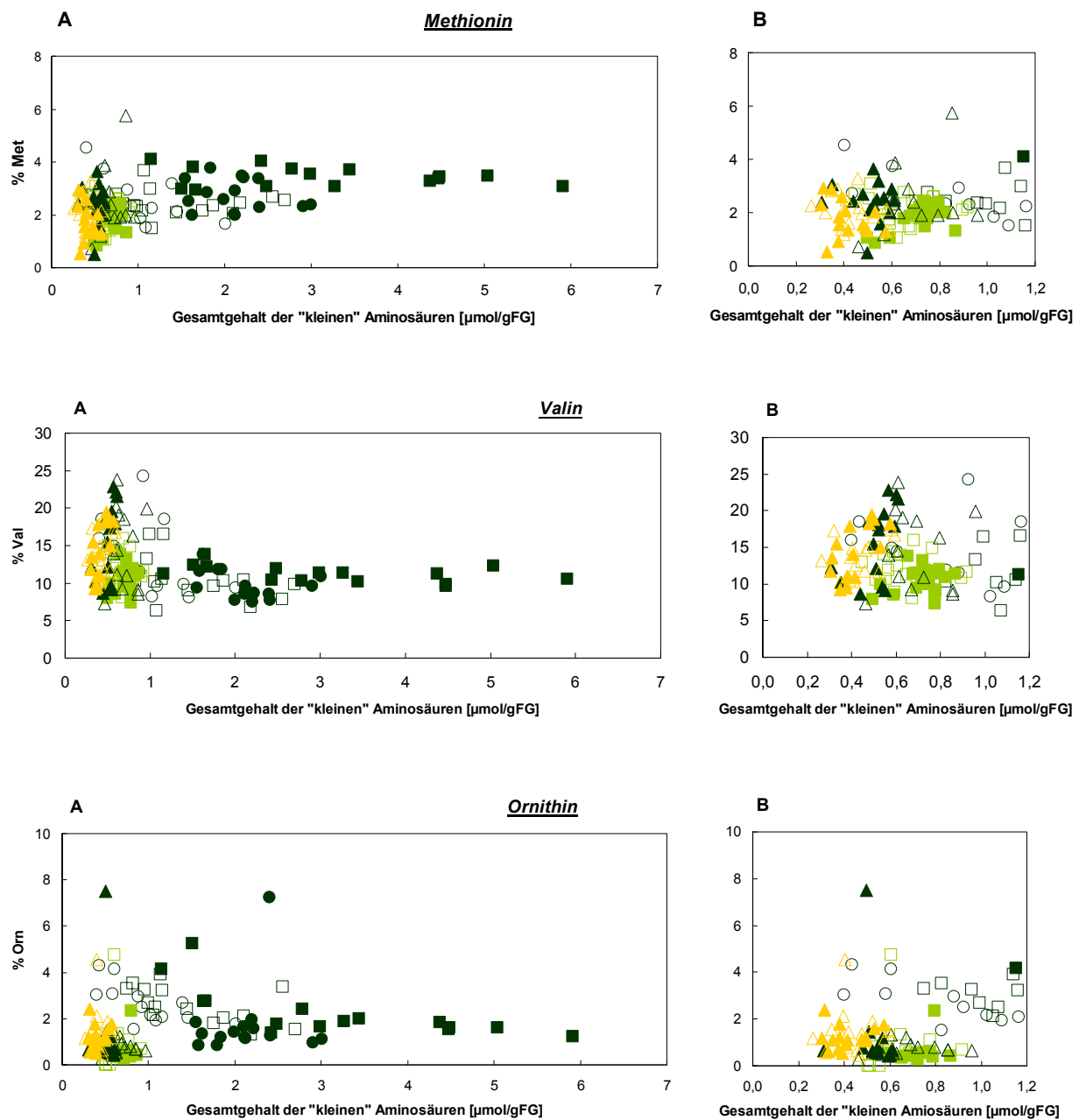


Abb. 8.4: Prozentualer Anteil aller nicht in *Kapitel 5.3.2.5.2* aufgeführten Aminosäuren im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. Wildtyppflanzen werden symbolisiert durch (■/□), die Pflanzen der Transformante F23xNia30(145) durch (●/○) und die der Transformante Nia30(145) durch (▲/△). Geschlossene Symbole stellen Werte während des Tages dar, offene Symbole Werte während der Nacht. **(A)** Aufgetragen sind alle Genotypen in den verschiedenen nitratspezifischen Behandlungen. Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO_3 (■), F23xNia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO_3 (●), Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM KNO_3 (□), Nia30(145) gewachsen in 12 mM KNO_3 (▲) und mit 0.2 mM KNO_3 (△). Dargestellt sind alle einzelnen Messwerte. **(B)** zeigt eine Vergrößerung der Abbildung (A) im Bereich der Genotypen gewachsen unter Stickstoffmangelbedingungen. Wildtyp gewachsen mit 0.2 mM Kaliumnitrat (■), Nia30(145) gewachsen mit 12 mM (▲) und 0.2 mM Kaliumnitrat (△).

8.2.2 Aminosäuren mit reduziertem Kohlenstoffstatus

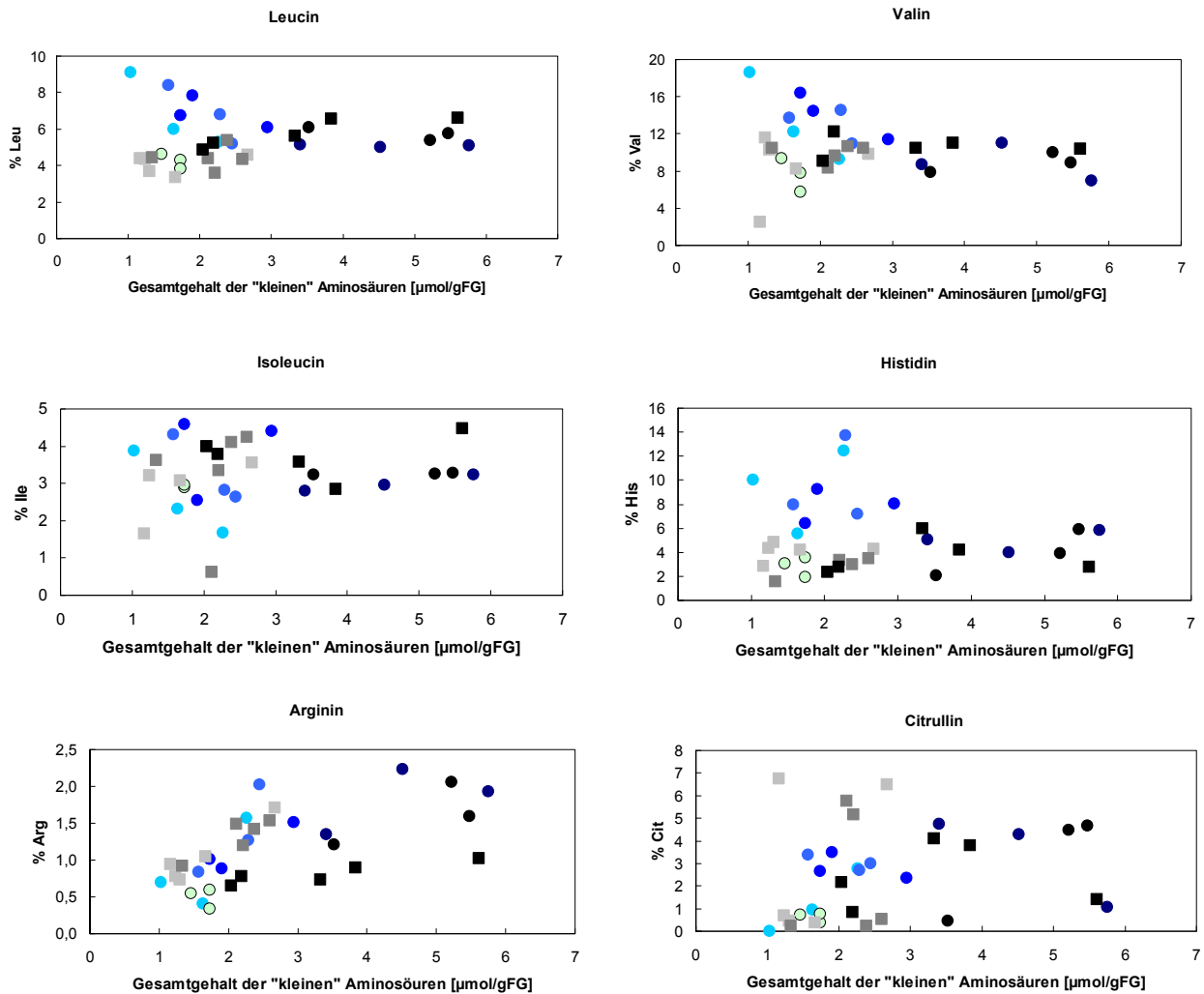


Abb. 8.5: Prozentualer Anteil aller nicht in Kapitel 5.2.2.5.3 aufgeführten Aminosäuren im Verhältnis zum Gesamtgehalt der „kleinen“ Aminosäuren. (■) symbolisieren Daten des Versuches unterschiedlicher Wildtypen gewachsen unter unterschiedlichen Lichtqualitäten. Dargestellt sind Wildtyp (SNN) gewachsen mit 400 μE (■), Wildtyp (SNN) gewachsen mit 150 μE (■) und Wildtyp (SNN) gewachsen mit 80 μE (■). (●) symbolisieren die Daten aus dem Versuche der *rbcS*-antisense Pflanzen. Dargestellt sind Wildtyp (SR1) (●), 3104 (●), 3203 (●), 3206m (●), 3206k (●) und ant5 (●).

8.3 Tabelle der Expressionsdaten für verschiedene Transkriptionsfaktoren

Gencode	Beschreibung und Bemerkung	Wildtyp 0.2mM KNO ₃	Nia30(145) 12mM KNO ₃
AI489878	Myb-verwandtes Protein Ph2: Homologien zu LBM2 bzw. Myb15 aus <i>Nicotiana tabacum</i> und Myb14 von <i>Arabidopsis thaliana</i> (Stracke et al., 2001; Teoh et al., 2003).	1.39	-
BG129925	MYB Homolog: Homologien zu Myb17 aus <i>Arabidopsis</i> ; Funktion unbekannt	1.33	-
BE459188	Dehydration induziertes myb-verwandtes Protein Cpm7: (Bartels, 1996; Villalobos et al., 2004); Homologien zu Myb78 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1.31	0.82
AI487919	MYB ähnliches Protein: Homologien zu AtMYB74 und AtMYB102 in <i>Arabidopsis thaliana</i> induziert bei Trockenstress (Kranz et al., 1998)	1.26	-
TC93497	MYB: Homologien zu MYB4 in <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Pinus taeda</i> Lignifizierung der Gewebe (Patzlaff et al., 2003)	1.25	-
AW624217	MYB ähnlicher Transkriptionsfaktor	0.84	-
NP000313_X98308	Myb-verwandter Transkriptionsfaktor THM18	0.83	-
TC86215	MYB	0.80	-
NP000001_X99134	MYB Transkriptionsfaktor	0.80	-
TC85536	Unbekanntes Protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	-	1.60
BE441064	MYB27 Protein ähnlich	-	1.59
AW224733	Vorläufer der Polyphenoloxidase	-	1.42
AW442364	MYB	-	1.38
AI773565	MYB-Familien Transkriptionsfaktor	-	1.29
TC92861	Putativer myb-verwandter Transkriptionsfaktor	-	0.82
AW651186	AtMYB84; MYB	-	0.81
TC86181	bHLH Transkriptionsfaktor JAF13 [<i>Petunia</i>]	-	0.80
BG125481	Putativer Transkriptionsfaktor MYB124	-	0.79
AW033578	MYC Transkriptionsfaktor MYC7E	-	0.77

Tabelle 8.1: Zusammenfassung aller Oligonukleotide, die Gene eines Transkriptionsfaktors präsentieren. Die Tabelle gibt Auskunft über den Gencode, die Beschreibung des Gens und die x-fache Veränderung des nitratverhungerten Wildtyps und der Transformante Nia30(145) gewachsen mit 12 mM KNO₃ im Vergleich zur Kontrolle (Wildtyp gewachsen mit 12 mM KNO₃).

9 Literaturverzeichnis

Aerts B.J. and Baumann T.W. (1994) Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. *Journal of Experimental Botany* **45**: 497 – 503

Akin D.E. (1982) Forage cell wall degradation and p-coumaric, ferulic and sinapinic acids. *Agron. J.* **74**: 424 ff

Arcondeguy T., Jack R. and Merrick M. (2001) PII signal transduction proteins: pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 80 – 105

Arcondeguy T., Lawson D. and Merrick M. (2000) Two residues in the T-loop of GlnK determine NifL-dependent nitrogen control of nif-gene expression. *J. Biol. Chem.* **275**: 38452 – 38456

Arruda P., Kemper E.L., Papes F., Leite A. (2000) Regulation of lysine catabolism in higher plants. *Trends Plant Sci.* **5**: 324 – 330

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 Physiology* **92**: 1124 – 1133

Ausubel F.M. (1987) Current protocols in molecular biology 1987. Ausubel et al (Hrsg.) J. Wiley and Sons, New York

Azevedo R.A., Arana J.L., 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., Lea P.J. (1997) The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* **46**: 395 – 419

Azevedo R.A., Lea P.J. (2001) Lysine metabolism in higher plants. *Amino Acids* **20**: 261 – 279

Azevedo R.A., Smith R.J., Lea P.J. (1992) Aspartate Kinase regulation in maize: Evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. *Phytochemistry* **31**: 3731 – 3734

Azevedo, R.A. (2002) Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. *Amino Acids* **22**: 217 – 230

Bachmann M., Huber J. L., Liao P.-C., Gage D.A. & 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

- Bachmann M., McMichael Jr. R. W., Huber J. L., Kaiser W. M. & Huber S. C. (1995) Partial purification and characterization of a calcium-dependent protein kinase and an inhibitor protein required for inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Plant Physiology* **108**: 1083 – 1091
- Baldwin I.T. (1988c) Short-term damage-induced increases in tobacco alkaloids protect plants. *Oecologia* **75**: 367 – 370
- Baldwin I.T. (1989) Mechanism of damage induced alkaloids in wild type tobacco. *J. Chem. Ecology* **15**: 1661 – 1680
- Baldwin I.T. (1991) Damage – induced alkaloids in wild type tobacco. In M.J. Raupp and D.W. Tallamy (eds.). *Phytochemical induction by herbivores*. John Wiley & Sons, New York, pp. 47 – 49
- Baldwin I.T. (1993) Chemical changes rapidly induced by folivory, pp. 1-23, in E. A. Bernay (ed.). *Insect-Plant Interactions*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Baldwin I.T. (1997) Allometric limits to the induced accumulation of nicotine in native tobacco. *Plant Species Biol.* **11**: 107 – 114
- Baldwin I.T. (1999) The jasmonate cascade and the complexity of induced defense against herbivore attack, in M. Wink (ed.). *The Role of Plant Secondary Metabolites and Their Utilization in Biotechnology*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK.
- Baldwin I.T. and Ohnmeiss T.E. (1993) Alkaloidal responses to damage in *Nicotiana* native to North America. *J. Chem. Ecol.* **19**: 1143 – 1153
- Baldwin I.T. and Ohnmeiss T.E. (1994) Swords into plowshares? *Nicotiana sylvestris* does not use nicotine as a nitrogen source under nitrogen-limited growth. *Oecologia* **98**: 385 – 392
- Baldwin I.T., Karb M.J. (1995) Plasticity in allocation of nicotine to reproductive parts in *Nicotiana attenuata*. *J. Chem. Ecol.* **21**: 897 – 909
- Baldwin I.T., Oesch R., Merhige P. and Hayes K. (1993) Damage-induced root nitrogen metabolism in *Nicotiana sylvestris*: testing C/N predictions for alkaloid production. *Journal of Chemical Ecology* **19**: 3029 – 3043
- Baldwin I.T., Zhang Z.P., Diab N., Ohnmeiss T.E., McCloud E.S., Lynds G.Y., Schmelz E.A. (1997) Quantification, correlations and manipulations in wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **201**: 397 – 404
- Barnes S. and Prasain J. (2005) Current progress in the use of traditional medicines and nutraceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 324 – 328

- Bartels D. (1996) A family of novel myb-related genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* are specifically expressed in callus and roots in response to ABA or desiccation. *Plant Mol. Biol.* **32**: 707 – 716
- Bate N.J., Orr J., Ni W., Meromi A., Nadler-Hassar T., Doerner P.W., Dixon R.A. (1994) Quantitative relationship between phenylalanine-ammonia lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-limiting step in natural product synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**: 7608 – 7612
- Baucher M., Monties B., Van Montagu M. and Boerjan W. (1998) Biosynthesis and genetic engineering of Lignin. *Critical Reviews in Plant Science* **17**: 125 – 197
- Beevers S.L. (1976) Senescence. Bonner, James and Joseph E. Varner (ED.). *Plant Biochemistry*. 3rd ED. Illus Academic Press: New York, N.Y., USA; London, England, pp 771 – 794
- Benesova M. and Bode R. (1992) Chorismate mutase isoforms from seeds and seedlings of *Papver somniferum*. *Phytochemistry* **31**: 2983 – 2987
- Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L. (2002) *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman and Co.
- Bläsing O.E, Gibon Y., Günther M., Höhne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheible W-R. and Stitt M. (2005) Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 3257 – 3281
- Bolstad B.M., Irizarry R.A., Astrand M. and Speed T.P. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. **19**: 185 – 193
- Boswell H.D., Watson A.B., Walton N.J., Robins D.J. (1993) Formation of N'-ethyl-s-nornicotine by transformed root cultures of *Nicotiana rustica*. *Phytochemistry* **34**: 153 – 155
- Boudet A.-M. (1998) A new view of lignification. *Trend in Plant Sciences* **3**: 67 – 71
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248 – 254
- Brennecke K., Souza-Neto A.J., Lugli J., Lea P.J., Azevedo R.A. (1996) Aspartate kinase in the maize mutants *Ask1-LT19* and *opaque-2*. *Phytochemistry* **41**: 707 – 712
- Bryant J.P., Chapin F.S. III, Klein D.R. (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* **40**: 357 – 368
- Bryant J.P., Reichardt P.B., Clausem T.P. and Werner R.A. (1993) Effects of mineral nutrition on delayed inducible resistance in Alaska paper birch. *Ecology* **74**: 2072 – 2084

Buchanan B., Gruissem W., Jones R.L. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Merican Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.

Burillo S., Luque I., Fuentes I., Contreras A. (2004) Interactions between the nitrogen signal transduction protein PII and N-acetyl glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. *J. Bacteriol.* **186**: 3346 – 3354

Burritt E.A., Bittner A.S., Street J.C. and Anderson M.J. (1984) Correlations of phenolic acids and xylose content of cell wall with in vitro dry matter digestibility of three maturing grasses. *J. Dairy Sci.* **67**: 1209 ff

Campbell M.M. and Sederoff R.R. (1996). Variation in lignin content and composition. *Plant Physiology* **110**: 3 – 13

Campell W.H. & Kinghorn J.R. (1990) Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 315 – 319

Cane D.E., ed. (1999) *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Vol. 2, Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids. Pergamon/Elsevier, Amsterdam.

Cathrin Müller (2002) Molekulargenetische und physiologische Studien zur Regulation des Stickstoff-Stoffwechsels in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*. Inaugural-Dissertation, Universität Heidelberg

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. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 5726 – 5733

Chou K.H. and Splittoesser W.E. (1972) Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons. *Physiol. Plant* **49**: 550 – 554

Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A., Steele J.L. (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 217 –246

Cipollini M.L., Paulk E., Cipollini D.F. (2002) Effect of nitrogen and water treatment on leaf chemistry in horsenettle (*Solanum carolinense*), and relationship to herbivory by flea beetles (*Epitrix* spp.) and tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *Journal of Chemical Ecology* **28**: 2377 – 2398

Close D., McArthur C., Paterson, S., Fitzgerald H., Walsh A., Kincade T. (2003) Photoinhibition: A link between effects of the environment on Eucalypt leaf chemistry and herbivory. *Ecology* **84**: 2952 – 2966

Coley P. D, Massa M., Lovelock C. E., Winter K. (2002) Effects of elevated CO₂ on foliar chemistry of saplings of nine species of tropical tree. *Oecologia* **133**: 62 – 69

- Coley P.D., Bryant J.P. and Chapin R.S. (1985) Resource availability and plant anti-herbivore defense. *Science* **230**: 895 – 899
- Connelly J.A. (1984) Enzymological studies of tyrosine biosynthesis in *Sorghum bicolor*. Ph.D. Dissertation, University of California, Davis
- Connelly J.A.; Conn E.E. (1986) Tyrosine biosynthesis in *Sorghum bicolor*: Isolation and regulatory properties of arogenate dehydrogenase. *Z. Naturforsch.* **41**: 69 – 78
- Cord Neto G., Yunes J. A., Vettore A. L., Da Silva M. J., Arruda P. and Leite A. (1995) *Plant Molecular Biology* **27**: 1015 ff
- Coschigano K.T., Melo-Olivieria R., Lim K. & Coruzzi G.M. (1998) Arabidopsis *gls* mutants and distinct Ferredoxin-GOGAT genes; implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *Plant Cell* **10**: 741 – 752
- Cronin G., Hay M. E. (1996) Effects of light and nutrient availability on the growth, secondary chemistry, and resistance to herbivory of two brown seaweeds *Oikos*. **77**: 93 – 106
- Czechowski T., Bari R.P., Stitt M., Scheible W-R., Udvardi M. (2004) Real-time PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant Journal* **38**: 366 – 379
- Damerval C., Le Guilloux M. (1998) Characterization of novel proteins affected by the *o2* mutation and expressed during maize endosperm development. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 354 – 361
- Daniel D.G.H and Martin H.F. (1967) Antioxidant in oats: Mono-ester of caffeic and ferulic acids. *J. Sci. Food Agric.* **18**: 589 – 595
- Dawson R.F. (1942) Accumulation of nicotine in reciprocal grafts of tomato and tobacco. *Am. J. Bot.* **29**: 66 – 71
- Degenkolbe T., Hannah M., Freund S., Hinch D.K., Heyer A.G., Köhl K.I. (2005) A quality-controlled microarray method for gene expression profiling. *Analytical Biochemistry* **346**: 217 – 224
- Del Rio J.A., Gomez P., Baidez A., Fuster M.D., Ortuno A., Frias V. (2004) Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea*. **43**: 87 – 94
- Delforge J., Messenguy F., Wiame J.M. (1975) Regulation of arginine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the specificity of *argR*-mutations and general control of amino acid biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **57**: 231 – 239

- Dever T.E., Feng L., Wek R.C., Cigan A.M., Donahue T.F., Hinnebusch A.G. (1992). Phosphorylation of initiation factor 2- α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translation control of GCN4 in yeast. *Cell* **68**: 585 – 596
- Diaz C., Purdy S., Christ A., Morot-Gaudry J.F., Wingler A. and Masclaux-Daubresse C. (2005) Characterization of Markers to Determine the Extent and Variability of Leaf Senescence in Arabidopsis. A Metabolic Profiling Approach. *Plant Physiology* **138**: 898 – 908
- Ding L. and Sonnewald U. (2004) Tobacco 3-dehydratase/shikimate dehydrogenase isoform 1. Submitted to EMBL/GeneBank/DDBJ database
- Ding L. and Sonnewald U. (2005) Tobacco 3-dehydratase/shikimate dehydrogenase isoform 2. Submitted to EMBL/GeneBank/DDBJ database
- Dixon R.A. and Harrison M.J. (1990) Early events in the activation of plant defence responses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32**: 476 – 501
- Dixon R.A. and Paiva N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085 – 1097
- Dixon R.A., Choudhary A.D., Dalkin D., Edwards R., Fahrendorf T., Gowri G., Harrison M.J., Lamb C.J., Loake G.J., Maxwell C.A., Orr J., and Paiva N.L. (1992) Molecular biology of stress induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. In *Phenolic Metabolism in Plants*, H.A. Stafford and R.K. Ibrahim, eds (New York: Plenum Press), pp. 91 – 138
- Dougall D.K. (1970) Threonine deaminase from Paul's scarlet rose tissue cultures. *Phytochemistry* **9**: 959 – 964
- Dutilleul C., Driscoll S., Cornic G., De Paepe R., Foyer C.H. & Noctor G. (2003) Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiology* **131**: 264 – 275
- Dutilleul C., Lelarge C., Prioul J.L., De Paepe R., Foyer C.H. & Noctor G. (2005) Mitochondria-driven changes in leaf NAD status exert a crucial influence on the control of nitrate assimilation and the integration of carbon and nitrogen metabolism. *Plant Physiology* **139**: 64 – 78
- Dyer W.E., Henstrand J.M., Handa A.K., Herrmann K.M. (1989) Wounding induces the first enzyme of shikimate pathway in solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7370 – 7373
- Eisenstein E. (1995) Allosteric regulation of biosynthetic threonine deaminase from *Escherichia coli*: effect of isoleucine and valine on active-side ligand binding and catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**: 311 – 318
- Euler M. and Baldwin, I.T. (1996) The chemistry of defense and apparency in the corollas of *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* **107**: 102 – 112

- Fadi Aldehni M., Sauer J., Spielhauer C., Schmid R., and Forchhammer K. (2003) Signal transduction protein P_{II} is required for NtcA regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **185**: 2582 – 2591
- Fajer E.D., Bowers M.D. and Bazzaz F.A. (1992) The effect of nutrients and enriched CO₂ on production of carbon-based allelochemicals in *Plantago*: a test of the carbon nutrient balance hypothesis. *Am. Nat.* **140**: 707 – 723
- Feeny P. (1977) Defensive ecology of the cruciferae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **64**: 221 –234
- Ferrario-Mery S., Bouvet M., Leleu O., Savino G. Hodges M. & Meyer C. (2005) Physiological characterization of Arabidopsis mutants affected in expression of the putative regulatory protein PII. *Planta* **223**: 28 – 39
- Flachmann R. (1997) Composition of photosystem II antenna in light-harvesting complex II antisense tobacco plants at varying irradiances. *Plant Physiology* **113**: 787 – 794
- Forchhammer K. (2004) Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: 319 – 313
- Forchhammer K. and Tandeau de Marsac N. (1994) The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N status. *J. Bacteriol.* **176**: 84 – 91
- Gallii G. (1995) Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell* **7**: 899 – 906
- Gallii G., Shaul O., Perl A. and Karchi H. (1994). Synthesis and accumulation of the essential amino acids lysine and threonine in seeds. *In Seed Development and Germination*, H. Kigel and G. Gallii, eds (New York: Marcel Dekker), pp. 811 – 831
- Gebauer G., Melzer A. and Rehder H. (1984) Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolia* L. I. Differences in organs and diurnal changes. *Oecologia* **92**: 236 – 241.
- Gebauer R., Strain B.R. and Reynolds J.R. (1998) The effect of elevated CO₂ and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Oecologia* **113**: 29 – 36
- Geiger M., Haake V., Ludewig F., Sonnewald U. and Stitt M. (1999) The nitrate and ammonium supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ.* **22**: 1177 – 1199
- Geiger M., Walch-Liu P., Engels C., Harnecker J., Schulze E.-D., Ludewig F., Sonnewald U., Scheible W.-R. & 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 and Environment* **21**: 253 – 268

Gershenzon J. (1994) Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chem. Ecology* **20**: 1281 – 1328

Gershenzon J., Croteau R. (1993) Terpenoid biosynthesis: basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. In *Lipid Metabolism in Plants*, T.S. Moore, Jr., ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 339 – 388

Gibon Y., Bläsing O.E., Palacios N., Pankovic D., Hendriks J.H.M., Fisahn J., Höhne M., Günter M. and Stitt M. (2004a) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: Depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant Journal* **39**: 847 – 862

Giovanelli J., Mudd S. and Datko A. (1988) In vivo regulation of threonine and isoleucine biosynthesis in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6746. *Plant Physiology* **86**: 369 – 374

Goers S.K. and Jensen R.A. (1984b) The differential allosteric regulation of two chorismate-mutase isoenzymes from *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **162**: 117 – 124

Görlach J., Raesecke H., Rentsch D., Regenass M., Roy P., Zala M., Keel C., Boller T., Amrhein N., Schmid J. (1995) Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor treated, cultured tomato cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3166 – 3170

Grotewold E. (2005) Plant metabolic diversity: a regulatory perspective. *Trend in Plant Science* **10**: 1360 – 1385

Guerzoni M.E. (1972) Physiological and enzymatic aspects of histidine-mediated control of the tryptophane pathway. *Arch. Mikrobiol.* **86**: 57 – 68

Guyer D., Patton D. and Ward E. (1995) Evidence for cross pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4997 – 5000

Hahlbrock K. (1981). Flavonoids. In *Biochemistry of Plants*, Vol. 7, P.K. Stumpf and E.E. Conn, eds (New York: Academic Press), pp. 425 – 456

Hahlbrock K. and Scheel D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 347 – 369

Hakulinen J. (1998) Nitrogen-induced reduction in leaf phenolic level is not accompanied by increased rust frequency in a compatible willow (*Salix myrsinifolia*) – *Melampsora* rust interaction. *Physiologia Plantarum* **102**: 101 – 110

- Hammond-Kosack K.E. and Jones J. (1995) Resistance gene-dependent plant defence responses. *Plant Cell* **8**: 1773 – 179
- Harborne J.B., ed (1988). *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. (New York: Chapman and Hall).
- Hartings H., Maddaloni M., Lazzaroni N., di Fonzo N., Motto M., Salamini F., Thompson R. (1989) The *o2* gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *EMBO J* **8**: 2795 – 2801
- Hartley R.D. (1972) p-Coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility. *J. Sci. Food Agric.* **23**: 1347 ff
- Hartmann T. (1991). Alkaloids. In *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, 2nd ed., Vol. I: The Chemical Participants, G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum, eds (San Diego: Academic Press), pp. 79 – 121
- Haslam E. (1993) *Shikimic acid metabolism and metabolites*. Wiley, Chichester, UK; 387 ff
- Hauffe K.D., Lee S.P., Subramaniam R., Douglas C.J. (1993) Combinatorial interactions between positive and negative cis-acting elements control spatial patterns of *4 Cl-1* expression in transgenic tobacco. *Plant Journal* **4**: 235 – 253
- Heinrich A, Maheswaran M, Ruppert U, Forchhammer K. (2004) The *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase. *Mol. Microbiol.* **52**:1303 – 1314
- Henkes S., Flachmann R., Sonnewald U., and Stitt M. (2001) A small decrease of plastid transketolase expression in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **13**: 535 – 551
- Henstrand J.M., McCue K.F., Bink K., Handa A.K., Herrmann K.M., Conn E.E. (1992) Light and fungal elicitor induce 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate Synthase mRNA in suspension cultured cells of parsley (*Petronselinum crispum* L.). *Plant Physiology* **98**: 761 – 764
- Herrmann K.M (1995) The shikimate pathway as an entry point to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology* **107**: 7 – 12
- Herrmann K.M. (1995) The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* **7**: 907 – 919
- Herrmann K.M. and Weaver L.M. (1999) The shikimate pathway [Book]. Book Chapter] Jones, R. L. [Editor]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999. 473-503. *Series Information: Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 50

- Hertel S.C., Hieke M. and Groder D. (1991b) Purification and characterisation of chorismate mutase isoenzymes from *Ruta graveolens* L. *Acta Biotechnol.* **11**: 39 – 48
- Hesse H., Kreft O., Maimann S., Zeh M., Willmitzer L., Hoefgen R. (2001) Approaches towards understanding methionine biosynthesis in higher plants. *Amino Acids* **20**: 281 – 289
- Hoefft M., Verpoorte R. and Beck E. (1996) Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Oecologia* **107**: 160 – 169
- Howels P.A., Sewalt V.J.H., Paiva N.L., Elkind Y., Bate N.J., Lamb C. and Dixon R.A. (1996) Overexpression of L-phenylalanine ammonia lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology* **112**: 1617 – 1624
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **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
- Huber J.L., Huber S.C., Campbell W.H. and Redinbaugh M.G. (1992) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**: 58 – 65
- Huber S.C., MacKintosh C., Kaiser W.M. (2002) Metabolic enzymes as targets for 14-3-3 proteins. *Plant Mol. Biol.* **50**: 1053 – 1063
- Hunag H., Villanueva V.R. (1992) Inhibition of polyamine biosynthesis and seed germination in *Picea abies*. *Phytochemistry* **31**: 3353 – 3356
- Huppe H.C. & 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
- Iason G.R. and Hester A.J. (1993) The response of heather to shade and nutrients: predictions of the carbon-nutrient hypothesis. *J. Ecol.* **81**: 75 – 80
- Jensen R. (1985) The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate and secondary metabolism. *Physiologia Plantarum* **66**: 164 – 168
- Jensen R.A. (1985) The shikimate/arogenate pathway: Link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiol. Plant.* **66**: 164 – 168
- Jung H.G. and Allen M.S. (1995) Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* **73**: 2774 – 2790

- Jung H.G. and Deetz D.A. (1993) Cell wall lignification and degradability. In: H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (Ed.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Madison, WI., pp. 315 ff
- Jung H.G. and Ralph J. (1990) Phenolic-carbohydrate complexes in plant cell walls and their effect on lignocellulose utilization. In: D. E. Akin, L. G. Ljungdahl, J. R. Wilson, and P.J. Harris (Ed.) *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants*. Elsevier, New York, pp. 173
- Kaiser W.M. and Huber S.C. (1994a) Post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiology* **106**: 817 – 821
- Keinanen M., Oldham N.J., Baldwin I.T. (2002) Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata* *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **49**: 3553 – 3558
- Keith B., Dong X., Ausubel F.M., Fink G.R. (1991) Differential induction of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8821 – 8825
- Kemper E.L., Cord Neto G., Papes F., Martinez Moraes K.C., Leite A. (1999) The role of Opaque 2 in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell* **11**: 1981 – 1993
- Kim J., Leustek T. (2000) Repression of cystathionine γ -synthase in *Arabidopsis thaliana* produces partial methionine auxotrophy and developmental abnormalities. *Plant Sci.* **151**: 9 – 18
- Kinney K.K., Lindroth R.L., Jung S.M. and Nordheim E.V. (1997) Effects of carbon dioxide and nitrate availability on deciduous trees: phytochemistry and insect performance. *Ecology* **78**: 215 – 230
- Klein D., Morcuende R., Stitt M. & 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 and Environment* **23**: 863 – 871
- Klessig D.F. and Malamy J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1439 – 1458
- Kranz H.D., Denekamp M., Greco R., Jin H., Leyva A., Meissner R.C., Petroni K., Urzainqui A., Bevan M., Martin C., Smeekens S., Tonelli C., Paz-Ares J. and Weisshaar B. (1998) Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 263 – 276
- Kuroski G.W. and Conn E.E. (1988b) Purification and characterisation of an inducible aromatic amino acid from chorismate mutase from *Solanum tuberosum* tubers. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 616 – 621

- Kutchan T.M. (1995) Alkaloid biosynthesis -The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* **7**: 1059 –1070
- Lam H-M., Peng S.S.-Y. and Coruzzi G.M. (1994) Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **106**: 1347 – 1357
- Lam T.B.T., Iiyama K. and Stone B.A. (1992) Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes. *Phytochemistry* **31**: 1179 ff
- Lamontagne M., Margolis H. A., Bauce E. (2000) Testing the ecophysiological basis for the control of monoterpene concentrations along canopy profiles in thinned and unthinned balsam fir stand. *Oecologia* **124**: 318 – 331
- Lauter R.R. (1996) Preferential expression of ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 8139 – 8144
- Lea P. & Forde B. (1994) Studies of amino acid biosynthesis in transgenic plants. *Plant Cell and Environment* **17**: 541 – 556
- Lea P.J., Blackwell R. D., Murray A.J.S. (1988) Photorespiratory mutants of barley an update. *Plant Physiology* **86**: 124
- Lea U.S., Leydecker M.T. Quilleré I., Meyer C. and Lillo C. (2006) Post-translational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant Physiology, in review*
- Lee D. and Douglas C.J. (1996) Two distinct members of a tobacco 4-coumarate:coenzyme A ligase (4Cl) gene family. cDNA structure, gene inheritance and expression and properties of recombinant proteins. *Plant Physiology* **112**: 193 – 205
- Lefèvre A., Consoli L. Gaziola S.A., Pellegrino A.P., Azevedo R.A., Damerval C. (2002) Dissection of opaque-2 regulatory network using transcriptome and proteome approaches along with enzyme activity measurements. *Scientia Agricola*
- Leser C., Treutter D. (2005). Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiologia Plantarum* **123**: 49 – 56
- Lewis N.G., Yamamoto E. (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 205 – 210
- Lillo C., Meyer C., Lea U.S., Provan F., Olteidal S. (2004) Mechanism and importance of posttranslational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1275 – 1282
- Lohmeier-Vogel E.M., Loukanina N., Ferrar T.S., Moorhead G.B.G., Thorpe T.A. (2005) N-acetyl glutamate kinase from *Daucus carota* suspension cultures: embryogenic expression profile, purification and characterization. *Plant Physiology & Biochemistry* **43**: 854 – 861

- Lois R., Dietrich A., Hahlbrock K., Schulz W. (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO Journal* **8**: 1641 – 1648
- Lou Y. and Baldwin I.T. (2004) Nitrogen supply influences herbivore-induced direct and indirect defense and transcriptional response in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **135**: 496 – 506
- Lou Y. and Baldwin I.T. (2004) Nitrogen supply influences herbivore-induced direct and indirect defense and transcriptional response in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **135**: 496 – 506
- Lynds G.Y. and Baldwin I.T. (1998) Fire, nitrogen, and defensive plasticity in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* **115**: 531 – 540
- MacAdam J.W., Nelson C.J., Sharp R.E. (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiology* **99**: 872 – 878
- MacAdam J.W., Sharp R.E., Nelson C.J. (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue II. Spatial distribution of apoplastic peroxidase activity in genotypes differing in length of elongation zone. *Plant Physiology* **99**: 879 – 885
- MacKintosh C. (1992) Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochem. Biophys. Acta* **1137**: 121 – 126
- MacKintosh C., Douglas P. & Lillo C. (1995) Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Physiology* **107**: 451 – 457
- Magasanik B. (2000) Global regulation of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**: 14044 – 14045
- Margna U.V. (1977) Regulation of phenyl propanoid poly phenol accumulation in plant cells. *Zhurnal Obshchei Biologii*. **38**: 754 – 767
- Marschner M. (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd edition, Academic Press Limited, London, UK
- Martin C. and Paz-Ares J. (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.* **13**: 67 – 73
- Matt P., Geiger M., Walch-Liu P., Engels C., Krapp A. & 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 increases 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 Journal* **30**: 663 – 677
- Matt P., Schurr U., Krapp A. & 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
- Mavandad M., Edwards R., Liang X., Lamb C.J., Dixon R.A. (1990) Effects of trans-cinnamic acid on expression of the bean phenylalanine-ammonium-lyase gene family. *Plant Physiology* **94**: 671 – 680
- McCloud E.S. and Baldwin I.T. (1997) Herbivory and caterpillar regurgitants amplify the wound induced increases in jasmonic acid but not nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **203**: 430 – 435
- McCue K.F., Conn E.E. (1989) Induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase activity by fungal elicitor in cultures of *Petroselinum crispum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7374 – 7377
- McGravey D., Croteau R. (1995) Terpenoid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1015 – 1026
- McKey D. (1974) Adaptive patterns in alkaloid physiology. *Am. Nat.* **108**: 305 – 320
- Mol J.M.N., Jenins G.I., Schäfer E., Weiss D. (1996) Signal perception, transduction and gene expression involved in anthocyanine biosynthesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**: 525 – 557
- Moore S., Payton P., Wright M., Tanksley S. and Giovannoni J. (2005) Utilisation of tomato microarrays for comparative expression analysis in Solanaceae. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2885 – 2895
- Molina S.M.G., Gaziola S.A., Lea P.J., Azevedo R.A. (2001) Manipulating cereal crops for high lysine. *Scientia Agricola* **58**: 205 – 211
- Morot-Gaudry J.-F. (2001) Synthesis of amino acids [Book. Book Chapter] Morot-Gaudry, Jean-Francois [Editor]. *Nitrogen assimilation by plants: Physiological, biochemical and molecular aspects*. 231 – 251
- Müller A. (1983) Genetic analysis of nitrate reductase-deficient tobacco plants regenerated from regenerated from mutants cells: evidence for duplicate structural genes. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 275 – 281

- Müller A., Grafe R. (1978) Isolation and characterisation of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* **161**: 67 – 76
- Müller A.J. & Mendel R. (1989) Biochemical and somatic cell genetics of nitrate reduction in *Nicotiana* in: *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation* Wray & Kinghorn (eds.) Kap.11: 166-185
- Nagai N., Kitauchi F., Shimosaka M. and Okazaki M. (1994) Cloning and sequencing of a full-length cDNA coding for phenylalanine ammonia-lyase from tobacco cell culture. *Plant Physiology* **104**: 1091 – 1092
- Nester E.W., Lorence J.H., Nasser D.S. (1967) An enzyme aggregate involved in the biosynthesis of aromatic amino acids of *Bacillus subtilis*. The possible function in feedback regulation. *Biochemistry* **6**: 1553 – 1563
- Niggeweg R., Michael A., Martin C. (2004) Engineering Plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* **22**: 746 – 754
- Ninfa A.J. & Jiang P. (2005) PII signal transduction proteins: sensors α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Current Opinion in Microbiology* **8**: 168 – 173
- Noctor G., Novitskaya L., Lea P.J. & Foyer C.H. (2002) Co-ordination of leaf minor amino acid contents in crop species: significance and interpretation. *Journal of Experimental Botany* **53**: 939 – 945
- Novitskaya L., Trevanion S.J., Driscoll S., Foyer C.H. & Noctor G. (2002) How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis. *Plant, Cell & Environment* **25**: 821 – 835
- Nowacki E., Jurzysta M., Gorski P., Nowacka D. and Waller G.R. (1976) Effect of nitrogen nutrition on alkaloid metabolism in plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **169**: 231 – 240
- Ohnmeiss T., McCloud E.S., Lynds G.Y. and Baldwin, I.T. (1997) Within-plant relationships among wounding, jasmonic acid, and nicotine: Implications for defense in *Nicotiana sylvestris*. *New Phytol.* **137**: 441 – 452
- Pain V.M. (1994) Translational control during amino acid starvation. *Biochemie* **76**: 718 – 728
- Patzlaff A., MacInnis S., Courtenay A., Surman C., Newman L.J., Smith C., Bevan M.W., Mansfield S., Whetten R.W., Sederoff R.R., Campbell M.M. (2003) Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant Journal* **36**: 743 – 754
- Paz-Yepes J., Flores E. and Herrero A. (2003) Transcriptional effects of the signal transduction protein PII (glnB gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS Lett.* **543**: 42 – 46

- Pellegrini L., Rohfritsch O., Fritig B. and Legrand M. (1994). Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiology* **106**: 877 – 886
- Petra Matt (2001) Auswirkung veränderter Kohlehydratversorgung auf Primär- und Sekundärstoffwechsel von Tabak. Inaugural-Dissertation, Universität Heidelberg
- Poa S.S., Paulsen I.T. and Saier M.H., Jr. (1998) Major facility superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 1 – 34
- Poulsen C. and Verpoorte R. (1991) Roles of chorismate mutase, isochorismate synthase and anthranilate synthase in plants. *Phytochemistry* **30**: 377 – 386
- Radin J.W., Boyer J.S. (1982) Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower *Helianthus annuus* cultivar Russian-mammoth plants role of hydraulic conductivity and turgor. *Plant Physiology* **69**: 771 – 775
- Radwanski E.R. and Last R.L. (1995) Tryptophane biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* **7**: 921 – 934
- Raskin I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **43**: 439 – 463
- Rhoades D.H. and Cates R.G. (1976) A general theory of plant antiherbivore chemistry, pp. 168–213, in J. W. Wallace and R.L. Manselle (eds.). *Biochemical Interaction between Plants and Insects*. Plenum Press, New York.
- Rice-Evans C.A., Miller J. and Pagana G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend in Plant Sci.* **2**:152 – 159
- Rodermel S.R., Abbott M.S. and Bogorad L. (1988) Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense gene inhibits ribulose biphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell* **55**: 673 – 681
- Rodionov D.A., Vitreschak A.G., Mironov A.A., Gelfand M.S. (2003) Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nucleic Acids Res.* **31**: 6748 – 6757
- Rolland F., Moore B., Sheen J. (2002) Sugar sensing and signalling in plants. *Plant Cell Supplement* **2002**: S185 – S205
- Sablowski R.W.M., Moyano E., Cullianez-Macia F.A., Schuch W., Martin C. and Bevan M. (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.* **13**: 128 – 137
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA

Scheible W.-R. (1996) Zur Bedeutung der Nitratreduktase und Nitrat per se für das Wachstum, den Kohlenstoffmetabolismus von Tabak. Dissertation, Universität Heidelberg

Scheible W.-R., Gonzales-Fontes A., Lauerer M., Müller-Röber B., Caboche M. and Stitt M. (1997c) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* **9**: 783 – 798

Scheible W.-R., Krapp A. and Stitt M. (2000) Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant Cell Environ.* **23**: 1155 – 1167

Scheible W.-R., Lauerer M., Schulze E.-D., Caboche M. and Stitt M. (1997a) Accumulation of nitrate in the shoot acts as signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal* **11**: 671 – 691

Scheible W.-R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelasch D., Thimm O., Udvardi M.K., Stitt M. (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiology* **136**: 2483 – 2499

Scheible W.-R., Gonzalez-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, post-translational modification and turnover of nitrate reductase. *Planta* **203**: 304 – 319

Schmid J., Amreihn N. (1995) Molecular organisation of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* **39**: 737 – 749

Schmidt R.J., Ketudat M., Aukerman M.J., Hoschek G. (1992) Opaque-2 is a transcription activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell* **4**: 689 – 700

Schürch A., Miozzari J., Hüttner R. (1974) Regulation of tryptophane biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mode of action of 5-methyl-tryptophane and 5-methyl-tryptophane-sensitive mutants. *J. of Bacteriol.* **117**: 1131 – 1140

Scinto L.F.M., Daffner K.R., Dressler D., Ransil B.I., Rentz D., Weintraub S., Mesulam M. and Potter H. (1994). A potential noninvasive neurobiological test for Alzheimer's disease. *Science* **266**: 1051 – 1054

Scobbie L., Russell W., Provan G.J. and Chesson A. (1993) The newly extended maize internode: A model for the study of secondary cell wall formation and consequences for digestibility. *Journal of the Science of Food & Agriculture.* **61**: 217 – 225

Sehgal P. and Naylor A.W. (1966) Ontogenetic study of urease in jack beans, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Bot. Gaz.* **27**: 27 – 34

- Sewalt V.J.H., Ni W., Blount J.W., Jung H.G., Masoud S.A., Lamb C. and Dixon R.A. (1997) Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down – regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology* **115**: 41 – 50
- Sharma R. and Mazumder R. (1970) Purification, properties and feedback control of threonine dehydratase from spinach. *J. Biol. Chem.* **245**: 3008 – 3014
- Sharma R. and Mazumder R. (1970) Purification, properties and feedback control of threonine dehydratase from spinach. *J. Biol. Chem.* **245**: 3008 – 3014
- Shaul O., Galili G. (1992a) Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant Journal* **2**: 203 – 209
- Shaul O., Galili G. (1992b) Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. *Plant Physiology* **100**: 1157 – 1163
- Shaul O., Galili G. (1993) Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol. Biol.* **23**: 759 – 768
- Siehl D.L. (1999) The Biosynthesis of tryptophane, tyrosine and phenylalanine from chorismate. In *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*, B.K. Singh, ed. Marcel Dekker, New York, pp. 171 – 204
- Siehl D.L. and Conn E.E. (1988) Kinetic and regulatory properties of arogenate dehydratase in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 822 – 829
- Singh B.K. and Shaner D.L. (1995) Biosynthesis of branched chain amino acids: From test tube to field. *Plant Cell* **7**: 935 – 944
- Singh B.K., Szamosi I.T. and Shaner D.L. (1995) Regulation of carbon flow through the branched chain amino acid biosynthetic pathway. In *Amino Acids and Their Derivatives in Higher Plants*, R.M. Wallsgrove, ed (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 59 – 75
- Smith C.S., Morrice N. & Moorhead G.B.G. (2004) Lack of evidence for phosphorylation of *Arabidopsis thaliana* PII: implications for plastid carbon and nitrogen signalling. *Biochimica et Biophysica Acta* **1699**: 145 – 154
- Smith C.S., Zaplachinski S.T., Muench D., Moorhead G.B.G. (2002) Expression and purification of the chloroplast putative nitrogen sensor PII of *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expr. Purif.* **25**: 2 – 7
- Solano R., Nieto C., Avila J., Cañas L., Diaz I. and Paz-Ares J. (1995) Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J.* **14**: 1773 – 1784

- Solomonson L.P. & Barber M. J. (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 225 – 253
- Solomonson L.P. & Barber M. J. (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 225 – 253
- Southon I.W. and Buckingham J., eds (1989) Dictionary of Alkaloids. (London: Chapman and Hall Ltd).
- Spill D. & Kaiser W.M. (1994) Partial purification of two proteins (100 kDa and 67 kDa) cooperating in the ATP-dependent inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Planta* **192**: 183 – 188
- Splittoesser W.E. (1969) The appearance of arginine and arginase in pumpkin cotyledones. Characterisation of arginase. *Phytochemistry* **8**: 753 – 758
- Stebbins N.E., Polacco J.C. (1995) Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiology* **109**: 169 – 175
- Stepansky A., Galili G. (2003) Synthesis of the Arabidopsis bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is concertedly regulated by metabolic and stress associated signals. *Plant Physiol* **133**: 1407 – 1415
- Stepansky A., Less H., Angelovici R., Aharon R., Zhu X. and Galili G. (2006) Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. *Amino Acids* **30**: 121 – 125
- Stepansky A., Yao Y., Guiliang T., Galili G. (2004) Regulation of lysine catabolism in Arabidopsis through concertedly-regulated synthesis of the two distinct gene products of the composite AtLKR-SDH locus. *Journal of Experimental Botany* **56**: 525 – 536
- Stitt M., Krapp A. (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background. *Plant Cell & Environment*. **22**: 583 – 621
- Stracke R., Werber M. and Weisshaar B. (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 447 – 456
- Sudarsan N., Wickiser J.K., Nakamura S., Ebert M.S., Breaker R.R. (2003) An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev.* **17**: 2688 – 2697
- Sugiyama K., Hayakawa T., Kudo T., Ito T., Yamaya T. (2004) Interaction of N-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice. *Plant Cell Physiol.* **45**:1768 –1778
- Szamosi I.T., Shaner D.L. and Singh B.K. (1994) Inhibition of three nine dehydratase is herbicidal. *Plant Physiology* **106**: 1257-1260

- Szamosi I.T., Shaner D.L., and Singh B.K. (1993) Identification and characterization of a biodegradative form of threonine dehydratase in senescing tomato leaf. *Plant Physiology* **10**: 999 – 1004
- Taiz L. und Zeiger E. (2000) *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Tamagnone L., Merida A., Parr A., Mackey S., Culianez–Macia F., Roberts K., Martin C. (1998a) The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* **10**: 135 – 154
- Tamagnone L., Merida A., Stacey N., Plaskitt K., Chang C–F., Lynn D., Dow M., Roberts K., Martin C. (1998b) Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **10**: 1801 – 1816
- Tatarko M., Romeo T. (2001) Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* **43**: 26 – 32
- Teoh W.-C., Cheah S.-C., Harikrishna K., Tan S.-H. (2003) Isolation and characterization of Myb-related genes from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Plant Biology* **46**: 95 – 104
- Thimm O., Bläsing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Kruger P., Selbig J., Müller L.A., Rhee S.Y., Stitt M. (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal* **37**: 914 – 939
- Tosserams M., Smet J., Magendans E., Rozema J. (2001) Nutrient availability influences uv-B sensitivity of *Plantago lanceolata*. *Plant Ecology* **154**: 159 – 168
- Touraine B. and Glass A.D.M. (1997). NO₃⁻ and ClO₃⁻ fluxes in the *chl1 5* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Does the CHL1-5 gene encode a low affinity NO₃⁻ transporter? *Plant Physiology* **114**: 137 – 144
- Trueman L.J., Richardson A. and Forde B.G. (1996b) Molecular cloning of higher plant homologues of the high affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene* **175**: 223 – 231
- Tsai F.Y., Coruzzi G.M. (1990) Dark-induced and organ-specific expression of two asparagine synthetase genes in *Pisum sativum*. *EMBO Journal* **9**: 323 – 332
- Tsai F.Y., Coruzzi G.M. (1991) Light represses transcription of asparagine synthetase genes in photosynthetic and non-photosynthetic organs of plants. *Molecular & Cellular Biology* **11**: 4966 – 4972
- Tsay Y.F., Schroeder J.I., Feldman K.A., Crawford N.M. (1993) The herbicide sensitive gene *chl1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible transporter. *Cell* **72**: 705 – 713

- Tyler V.E. (1994). *Herbs of Choice*. (New York: Haworth Press, Inc.)
- Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao S., Shinozaki K. (1993) An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**: 1529 – 1539
- Urquhart A.A., Joy K.W. (1981) Use of phloem exudate technique in the study of amino acid transport in Pea *Pisum sativum* cultivar little-marvel plants. *Plant Physiology* **68**: 750 – 754
- Usadel B., Nagel A., Thimm O., Redestig H., Bläsing O., Palacios N., Selbig J., Hanneman J., Piques M., Steinhauser D., Scheible W-R., Gibon Y., Morcuende R., Weicht D., Meyer S. and Stitt M. (2005) Extension of the visualisation tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of co-responding genes and comparison with known responses. *Plant Physiology* **138**: 1194 – 1204
- Van Dam N.M., De-Jong T.J., Iwasa Y. and Kubo T. (1996) Optimal distribution of defenses: are plants smart investors? *Functional Ecology* **10**: 128 – 136
- Van De Vijver C.A.D.M., Boot R.G.A., Poorter H., Lambers H. (1993) Phenotypic plasticity in response to nitrate supply of an inherently fast-growing species from a fertile habitat and an inherently slow-growing species from an infertile habitat. *Oecologia* **96**: 548 – 554
- Van Der Werf A., Van Nuenen M., Visser A.J., Lambers H. (1993) Effects of N-supply on the rates of photosynthesis and shoot and root respiration of inherently fast- and slow-growing monocotyledonous species. *Physiologia Plantarum*. **89**: 563 – 569
- Van Etten C.H., Kwolek W.F., Peter J.E. and Barclay A.S. (1967) Plant seed as a Protein source for food and feed. Evaluation based on amino acid composition of 379 species. *J. Agric. Food Chem.* **15**: 1077 – 1089
- Vance C.P., Kirk T.K. and Sherwood R.T. (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**: 259 – 288
- Vaucheret H., Chabaud M., Kronenberger J. and Caboche M. (1990) Functional complementation of tobacco and *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase deficient mutants by transformation with the wild type alleles of the tobacco structural genes. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 468 – 474
- Vaucheret H., Kronenberger J., Rouzé P. & Caboche M. (1989a) Complete nucleotide sequence of the two homologous tobacco nitrate reductase genes. *Plant Molecular Biology* **12**: 597 – 600
- Vaucheret H., Vincentz M., Kronenberger J., Caboche M. & Rouzé P. (1989b) Molecular cloning and characterisation of the two homologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 10 – 15

- Vega-Palas M.A., Flores E. and Herrero A. (1992) NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.* **6**: 1853 – 1859
- Venekamp J.H., DeVries F.W.T., Mensink H., van Mourik F. and Koot J.T.M. (1987) the effect of alternations in nitrogen supply on nitrogen metabolism of hydroponically grown maize plants, *Zea mays* L. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **182**: 349 – 358
- Villalobos M.A., Bartels D. and Iturriaga G. (2004) Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* overexpressing the CpMYB10 transcription factor gene. *Plant Physiology* **135**: 309 – 324
- Villanueva V.R. and Huang H. (1993) Effect of polyamine inhibition on pea seed germination. *J. Plant Physiol.* **141**: 336 – 340
- Wadsworth G.J., Marmaras S.M., Matthews B.F. (1993) Isolation and characterization of a soybean cDNA clone encoding the plastid form of aspartate aminotransferase. *Plant Molecular Biology* **21**: 993 – 1009
- Waller G.R. und Nowacki E. (1978) Alkaloid biology and metabolism in plants. Plenum Press, New York, London
- Wang R., Tischner R., Gutierrez R.A., Hoffman M., Xing X., Chen M., Coruzzi G., Crawford N.M. (2004) Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**: 2512 – 2522
- Wang X., Larkins B.A. (2001) Genetic analysis of amino acid accumulation in *opaque-2* maize endosperm. *Plant Physiology* **125**: 1766 – 1777
- Wang X., Stumpf D.K., Larkins B.A. (2001) Aspartate kinase 2. A candidate gene of a quantitative trait locus influencing free amino acid content in maize endosperm. *Plant Physiology* **125**: 1778 – 1787
- Weisshaar B., Jenkins G.I. (1998) Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 251 – 257
- Whetten C.M. and Sederoff R. (1995) Lignin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1001 – 1013
- Wilkens R.T., Shea G.O., Halbreich S. and Stamp N.E. (1996) Resource availability and the trichome defenses of tomato plants. *Oecologia* **106**: 181 – 191
- Wilson B.J., Gray A.C., Matthews B.F. (1991) Bifunctional protein in carrot contains both Aspartatkinase and Homoserine Dehydrogenase activities. *Plant Physiology* **97**: 1323 – 1328
- Wink, M. (1999) Biochemistry of plant secondary metabolism. ed. by Michael Wink. -Boca Raton, Fla. [u.a.], CRC Press

- Wolfner M., Yep D., Messenguy F. Fink G.R. (1975) Integration of amino acid biosynthesis into cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **96**: 273 – 290
- Yalpani N., Enyedi A.J., Leon J., and Raskin I. (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**: 372 – 376
- Zhang Z.-P. and Baldwin I.T. (1997) Transport of 2-[¹⁴C]jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **203**: 436 – 441
- Zhao J., Williams C.C., Last R.L. (1998) Induction of arabidopsis tryptophane pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. *Plant Cell* **10**: 359 – 370
- Zhu X., Galili G. (2004) Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. *Plant Physiology* **135**: 129 – 136
- Zonia L.E., Stebbins N.E. and Polacco J.C. (1995) Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seed. *Plant Physiology* **107**: 1097 – 1103

Danke

Prof. Dr. Mark Stitt für seine wissenschaftliche Betreuung, seine ansteckende Begeisterung, die Freiheit bei der Bearbeitung dieses Themas und vor allem für seine Unterstützung und Geduld, in den Zeiten, in denen in meinem speziellen Fall alles etwas länger als gewöhnlich gedauert hat. Sein unkonventioneller Umgang mit Doktorandinnen + kleinem Anhang soll an dieser Stelle als positives Beispiel für die Vereinbarkeit von Wissenschaft und Familie nicht unerwähnt bleiben

Der **DFG** für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit

Dr. Natalia Palacios-Rojas for teaching me molecular biology, for providing the primers, her invaluable help in microarray hybridisation and real-time PCR and for her company in the world of secondary metabolism and beyond

Regina Feil für ihre unschätzbare Hilfe bei der Weiterentwicklung der HPLC-Methode für Sekundärmetabolite. Ohne sie würde ich wahrscheinlich jetzt noch daran „rumfummeln“

Dr. Joachim Kopka für seine geduldige Einweisung in das mir unbekannte Universum der multivariaten Datenanalyse und seine Evaluierung dieser Arbeit

Dr. Dirk Hinch, Susanne Freund und **Thomas Degenkolbe** für die Hilfe bei der Mikroarray Hybridisierung

Dr. Arno Bovy and **Dr. Elio Schlijen** for providing the microarray and the rapid “online service hotline”

Britta Hausmann und dem **Greenteam** für die Tabakanzuchten und deren Pflege

Dr. Yves Gibon für seinen Rat bei enzymtechnischen und nicht enzymtechnischen Fragen und den einen oder anderen wertvollen Input.

Dr. Wolfgang Lein, der mir nicht nur als „Mr. PrimerDesign“ in guter Erinnerung bleiben wird. Mit wem werde ich denn jetzt gepflegt zu Mittag essen????

Inmaculada Castro-Marin for saving my life and sitting in the same boat. It's always good to have a friend beside you

Dem Rest der **AG Stitt** für so manche Unterstützung und die nette Atmosphäre, und diesbezüglich ganz besonders **Linda**

Dem **IT-Team** für die schnelle Hilfe und der Geduld bei der „never-ending-story“ mit meinem Account

Und ganz besonders **Dr. Stefan Henkes** für das Korrekturlesen (inhaltlich sowie orthographisch), seine Unterstützung (wissenschaftlich sowie persönlich) und die kleinen Anschubser zur rechten Zeit in die richtige Richtung. DANKE!!!!