

Funktionelle Charakterisierung der drei DAHP-Synthase Isoformen aus *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anja Pietzke-Calcagnile
aus Solingen

Düsseldorf, Mai 2013

aus dem Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-2)
des Forschungszentrums Jülich

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ingar Janzik
Korreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2014

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Der Shikimatweg	1
1.1.1 Der Shikimatweg ist Lieferant für diverse Stoffwechselwege.....	3
1.1.2 Die Lokalisation des Shikimatweges	5
1.1.3 Regulierung der Enzyme des Shikimatweges.....	7
1.2 Die DAHP-Synthase	9
1.2.1 Regulation der DAHP-Synthase	9
1.2.2 Substrate der DAHP-Synthase.....	11
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Enzyme	14
2.1.3 Antikörper	15
2.1.4 Oligonukleotide.....	15
2.1.5 Vektoren.....	17
2.1.6 Antibiotika	17
2.1.7 Bakterienstämme.....	17
2.1.8 Affinitätssäulen	18
2.1.9 Geräte	18
2.1.10 Pflanzen.....	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1.1 RNA-Isolierung.....	20
2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA	20
2.2.1.3 cDNA Herstellung	21
2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	21
2.2.1.5 Gelelektrophoretische Analyse der DNA	22

2.2.1.6	Elution der PCR-Produkte aus dem Gel	23
2.2.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	23
2.2.1.8	Restriktion von DNA	23
2.2.1.9	T4-DNA-Polymerase-Behandlung.....	23
2.2.1.10	Einbringen in den Zielvektor.....	24
2.2.1.11	Bakterienanzucht von <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.1.12	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	25
2.2.1.13	Plasmidpräparation	25
2.2.1.14	Kolonie-PCR.....	25
2.2.1.15	Realtime-PCR	26
2.2.1.16	Southern Blot	27
2.2.2	Expression und Isolierung von Proteinen.....	29
2.2.2.1	Induktion der Proteinexpression	29
2.2.2.2	Aufschluss der induzierten Bakterienzellen.....	29
2.2.2.3	Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Säulen	30
2.2.2.4	Proteinaufreinigung mittels Profinity eXact-Säulen.....	30
2.2.2.5	Gelelektrophorese von Proteinen: SDS Page nach Laemmli	31
2.2.2.6	Proteinfärbung mit Coomassie.....	32
2.2.2.7	Western Blot	32
2.2.2.8	Enterokinasebehandlung	33
2.2.3	Proteincharakterisierung	34
2.2.3.1	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten für PEP	34
2.2.3.2	Umpuffern des Enzyms mittels Micro Bio-Spin-Säulen.....	34
2.2.3.3	DAHP-Synthase Aktivitätstest.....	34
2.2.3.4	Proteinbestimmung nach Bradford.....	36
2.2.4	Metabolitenbestimmung.....	36
2.2.4.1	HPLC.....	36
2.2.4.2	Phenolbestimmung	37
2.2.4.3	Ammoniumbestimmung.....	38
2.2.5	Pflanzenanzucht	38
2.2.5.1	Anzucht auf Erde.....	38
2.2.5.2	Anzucht auf Sand	39
2.2.5.3	Anzucht auf Hoagland-Agarplatten.....	39
2.2.6	GROWSCREEN	40

3	Ergebnisse	41
3.1	Klonierung und Überexpression.....	41
3.1.1	Klonierung	41
3.1.2	Optimierung der Überexpression	43
3.2	Proteinaufreinigung	45
3.2.1	Vektor pET-51 (Strep Tag).....	45
3.2.2	Entfernen des Strep Tags mit einer Enterokinase	46
3.2.3	Vektor pPAL-7 (High Profinity eXact Tag)	47
3.2.4	Größenabschätzung der drei Isoformen im SDS-Gel	49
3.3	Biochemische Charakterisierung	50
3.3.1	pH-Optimum	50
3.3.2	Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen.....	51
3.3.2.1	Mangan.....	52
3.3.2.2	Magnesium.....	52
3.3.2.3	Cobalt.....	54
3.3.3	K_m -Werte und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten.....	54
3.3.3.1	pH-Wert 7,0	54
3.3.3.2	pH-Wert 6,0	56
3.3.4	Reduzierende Agenzien	57
3.3.5	Substratspezifität.....	59
3.3.6	Temperaturabhängigkeit	60
3.3.7	Einfluss der aromatischen Aminosäuren auf die Aktivität	61
3.3.8	Charakterisierung des Enzyms ohne Tag.....	62
3.4	Charakterisierung der Knockout-Linien.....	64
3.4.1	Wachstum unter Standardbedingungen	65
3.4.2	Das basale Expressionsmuster der drei DAHP-Synthasen	67
3.4.2.1	Auswahl eines geeigneten Referenzgens	68
3.4.2.2	Expression der drei DAHP-Synthasen in Wurzel und Spross	69
3.4.3	Knockout-Linien unter diversen Stressbehandlungen.....	71
3.4.3.1	Knockout-Linien in 24-Stunden Licht	73
3.4.3.1.1	Frischgewichte	73
3.4.3.1.2	Genexpression	74
3.4.3.1.3	Aminosäuregehalt.....	75
3.4.3.1.4	Ammonium- und Phenolgehalt.....	78
3.4.3.2	Knockout-Linien unter Kältestress.....	80

3.4.3.2.1	Frischgewichte	80
3.4.3.2.2	Phenolgehalt	81
3.4.3.2.3	Aminosäuregehalt.....	82
4	Diskussion	85
4.1	Co-Expressionsmuster der drei DAHP-Synthasen	85
4.2	Biochemische Charakterisierung der DAHP-Synthasen	90
4.2.1	Proteinaufreinigung.....	90
4.2.2	pH-Optimum	91
4.2.3	Aktivierung durch zweiwertige Kationen	94
4.2.4	Enzymkinetik	97
4.2.5	Einfluss von reduzierenden Agenzien.....	103
4.2.6	Substratspezifität.....	104
4.2.7	Temperaturabhängigkeit	105
4.2.8	Einfluss der aromatischen Aminosäuren	105
4.2.9	Zusammenfassung der Charakterisierungsdaten.....	106
4.3	Knockout-Mutanten	108
4.3.1	Mutanten und Wildtyp unter Standardbedingungen	108
4.3.2	Expressionsmuster der DAHP-Synthasen.....	109
4.3.3	Mutanten und Wildtyp unter Stressbedingungen.....	111
4.3.3.1	Dauerlicht.....	111
4.3.3.2	Kältebehandlung	116
5	Literaturverzeichnis	119
6	Anhang	135
	Danksagung.....	138
	Erklärung.....	139

Zusammenfassung

In *Arabidopsis* wurden aufgrund von Sequenzhomologien drei Gene identifiziert, die putativ für Isoformen des Eingangsenzyms des Shikimatwegs, die 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat 7-phosphat-Synthase (DAHPS) kodieren. In einer Reihe von Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass diese Gene transkribiert und sehr unterschiedlich reguliert werden. In dieser Arbeit wurde nun erstmals durch heterologe Expression nachgewiesen, dass alle drei für funktionelle DAHPS kodieren. Die Expressionsdaten weisen darauf hin, dass die drei DAHPS unterschiedliche Funktionen erfüllen. So werden die DAHP-Synthasen 1 und 3 durch Stressfaktoren wie Pathogenbefall, UV-Licht, Ozon oder Verwundung in ihrer Expression induziert, die Expression der DAHP-Synthase 2 hingegen bleibt meist fast unverändert. Ob diese Regulation der drei Gene jedoch nur zu unterschiedlichen Mengen an DAHPS-Enzym führt, oder ob sich die drei Enzyme auch biochemisch unterscheiden, war bisher unbekannt.

Bei der Analyse der biochemischen Eigenschaften der heterolog in *E. coli* exprimierten Enzyme weisen die drei Isoenzyme sehr viele Ähnlichkeiten auf. Alle drei Isoformen werden durch reduziertes Thioredoxin aktiviert, so dass ihre Aktivität vermutlich auch *in vivo* einer Redoxregulation unterliegt. Sie werden alle deutlich durch Manganionen aktiviert und durch höhere Konzentrationen von Magnesiumionen in schwächerem Maße. Alle drei Enzyme finden in einem Temperaturbereich zwischen 40 und 45°C sowie bei pH 7,0 optimale Bedingungen und sie verwenden alle ausschließlich E4P neben PEP als Substrat. Trotz dieser Gemeinsamkeiten deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass der DAHP-Synthase 3 eine zentrale Rolle unter den drei Isoformen zukommt. Ihr pH-Optimum ist breiter als das der anderen beiden Isoformen und sie zeigt auch noch bei pH 6,0 optimale Aktivität während die anderen beiden Enzyme bei diesem pH-Wert in ihrer Aktivität schon stark abfallen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der DHS3 liegt signifikant höher als die der DAHP-Synthasen 1 und 2. Während die Isoformen 1 und 2 in ihrer Aktivität durch Phenylalanin oder Tryptophan aktiviert werden, zeigt sich die Isoform 3 unbeeinflusst durch die aromatischen Aminosäuren. Darüber hinaus zeigen die Expressionsstudien in Blatt- und Wurzelmaterial, dass die DAHP-Synthase 3 in beiden Geweben deutlich stärker exprimiert ist als die anderen beiden Isoenzyme. Diese Ergebnisse unterstreichen die Befunde der Transkriptionsanalysen, in denen sich dieses Enzym als stressinduziert erwies. Als Reaktion auf Stress werden diverse Sekundärmetabolite synthetisiert für die unter Stresseinwirkung innerhalb kurzer Zeit große Mengen an Chorismat bereitgestellt werden müssen. Diese Aufgabe kann die DAHP-Synthase

3 mit ihrer hohen maximalen Aktivität und ihrer erhöhten Unabhängigkeit gegenüber den umgebenden pH-Bedingungen, sowie ihrer hohen Expression in Wurzel und Spross gut erfüllen. Eine Co-Expressionsanalyse zeigt ebenfalls die starke Verknüpfung der Expression dieser Isoform mit Enzymen des Phenylpropanoidweges, in dem eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten synthetisiert wird. Die Co-Expressionsanalyse für die DAHP-Synthase 1 weist eher auf eine Verbindung zur Tryptophan- und Auxin-Biosynthese hin, so dass diese Isoform möglicherweise über den Tryptophan- und Auxinbedarf reguliert wird.

Eine vergleichende Analyse von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und Knockout-Mutanten zur weiterführenden Klärung der unterschiedlichen Funktionen für die verschiedenen DAHP-Synthasen ergab bei der Anzucht unter Standardbedingungen phänotypisch keine Unterschiede. Nur die Knockout-Mutante für die DAHP-Synthase 2 weist auf Metabolitenebene einen signifikant deutlich erhöhten Gehalt an Phenylalanin und einen leicht erhöhten Gehalt an Tryptophan im Vergleich zum Wildtyp und den anderen Knockout-Mutanten auf. Unter veränderten Anzuchtbedingungen werden jedoch phänotypische Unterschiede zwischen dem Wildtyp und einigen Knockout-Pflanzen sichtbar. Sowohl bei einem Wechsel der Tag/Nacht-Rhythmik zu einer Dauerbelichtung sowie beim Transfer in eine kalte Umgebungstemperatur von 10°C wiesen Knockout- und Wildtyp-Pflanzen deutliche Unterschiede auf. Unter Dauerbelichtung zeigen die Wildtyp-Pflanzen im Gegensatz zu den Mutanten eine signifikant höhere Zunahme des Frischgewichts. Bei Kälte zeigt die Doppelmutante die höchste Zunahme an Frischgewicht im Vergleich zu den Wildtyp- und anderen Knockout-Pflanzen. Die in dieser Arbeit ermittelten Parameter, wie Ammonium- und Phenolgehalte sowie Aminosäurekonzentrationen erklären die deutlich veränderten Wachstumsreaktionen auf die veränderten Umweltbedingungen nicht und verweisen auf eine komplexere Funktion der DAHPS Isoformen als bisher angenommen.

Summary

Based on sequence homology one identified in Arabidopsis three genes that code for putative isoforms of the entry enzyme of the shikimate pathway 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (DAHPS). In several investigations one already showed that these enzymes are transcribed and very differently regulated. In this work it is demonstrated for the first time that all three genes actually code for functional DAHPS. The expression data indicate that the three DAHPS fulfil different functions. While the expression of DAHP-synthases 1 and 3 is induced by stress factors like pathogens, UV-light, ozon and wounding, the expression of DAHP-synthase 2 is nearly unaffected. If this regulation of the three genes only leads to a different amount of enzyme or if there are also differences in their biochemical characteristics was so far unknown.

The analysis of the biochemical characteristics of the three enzymes, that were heterologously expressed in *E. coli*, reveals a lot of similarities. All three isoforms are activated by reduced thioredoxin, what suggests a redox regulation of their activity also *in vivo*. They are all clearly activated by manganese ions and weaker activated by higher concentrations of magnesium ions. The three enzymes find optimal conditions in a temperature range of 40- 45°C as well as in a pH of 7,0 and they bind specifically to the substrates E4P and PEP.

But in spite of these similarities, the results of this work indicate that DAHP-synthase 3 may play a central role under these three isoenzymes. The pH-optimum of DAHP-synthase 3 is broader than that of the other two enzymes. It still shows optimal activity in a pH of 6,0, while the activity of the other two enzymes already clearly decreases under these conditions. The maximum rate of reaction of DAHP-synthase 3 is significantly higher than the maximum rates of DAHP-synthases 1 and 2. While the isoforms 1 and 2 are influenced by the addition of phenylalanine or tryptophan to the reaction buffer, the activity of DAHP-synthase 3 is unaffected by the aromatic amino acids. In addition the analysis of gene expression in roots and shoots reveals that DAHP-synthase 3 clearly shows the highest expression of the three enzymes in both tissues. These results underline the findings of transcription studies, which showed the stress inducibility of this isoform. As a reaction to different stress factors diverse secondary metabolites are synthesized for which chorismate has to be provided in great quantities within a short time. The enzyme DAHP-synthase 3 is able to fulfil this function with its high maximum rate of reaction and its elevated independence of the pH-conditions and its strong expression in root and shoot. A co-expression analysis also shows a strong link

of the expression of this isoform to the expression of several enzymes of the phenylpropanoid pathway, in which a lot of secondary metabolites are synthesized.

The co-expression analysis for DAHP-synthase 1 shows a link to the biosynthesis of tryptophan and auxin, so that this isoform is possibly regulated by the demand for tryptophan or auxin.

A comparative analysis of wildtype plants (Col-0) and knockout mutants for a further investigation of the different functions of the three DAHPS exhibited no phenotypic differences under standard growth conditions. Only the knockout mutant for DAHP-synthase 2 shows on metabolic level significantly higher concentrations of phenylalanine and slightly elevated concentrations of tryptophan in comparison to the other plants.

Altered growth conditions uncover some differences between the wildtype plants and some knockout mutants. The change of day/night rhythm to continuous light as well as the transfer into a cold environment of 10°C reveals clear differences between the wildtype and knockout plants. In continuous light the wildtype plants have a higher fresh weight than the knockout mutants. Under cold conditions the double mutant for DAHP-synthases 2 and 3 shows a higher increase of fresh weight than the other plants. The parameters like the amount of ammonium and phenols or the concentration of amino acids, determined in this work, do not explain this clearly changed growth behaviour in answer to the modified environmental conditions. This indicates a more complex function of the DAHPS as previously assumed.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Col-0	Columbia-0
CM	Chorismat-Mutase
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DAHPS	3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase
DAPase	Dipeptidyl Aminopeptidase I
DHQ-SDH	3-Dehydroquinat-Dehydratase-Shikimat-Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E4P	Erythrose-4-Phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPPS	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
HXK	Hexokinase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IES	Indolessigsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OPA	Orthophthalaldehyd
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
q-RT -PCR	quantitative Realtime PCR
rcf	relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAL	Tyrosinammoniumlyase
TED	Tris-carboxymethylethylendiamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TK	Transketolase
TRX	Thioredoxin
Tween-20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
UV	Ultra Violett
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Der Shikimatweg

Der Shikimatweg ist der Biosyntheseweg über den in Pflanzen die drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gebildet werden. Neben den Pflanzen benutzen ausschließlich Pilze, Bakterien und einige Sporozoa diesen Syntheseweg (Herrmann und Weaver, 1999; Roberts *et al.*, 1998). Er wird unterteilt in den Pre- und den Postchorismatweg, da nur die Syntheseschritte bis zum Chorismat allen Aminosäuren gemeinsam sind. Der Prechorismatweg gliedert sich in insgesamt sieben enzymatische Schritte. Ausgehend von der Kondensation von Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) liefert er zunächst das namensgebende Zwischenprodukt Shikimat und endet schließlich mit der Synthese von Chorismat als letzter gemeinsamer Vorstufe zur Synthese der aromatischen Aminosäuren. Die Reaktionsschritte, die sich nun auf dem Weg zu den aromatischen Aminosäuren anschließen gehören dem Postchorismatweg an, welcher sich in zwei Richtungen verzweigt. Phenylalanin und Tyrosin werden über die Intermediate Prephenat und Arogenat gebildet, während Tryptophan über Anthranilat synthetisiert wird (Tzin und Galili, 2010, vgl. Abb.1). In Mikroorganismen dient der Shikimatweg beinahe ausschließlich der Synthese dieser Aminosäuren für die Proteinbiosynthese. In Pflanzen und Pilzen dagegen zweigen von Intermediaten des Prechorismatwegs und dem Chorismat selbst noch viele Stoffwechselwege ab, die der Biosynthese zahlreicher aromatischer Sekundärstoffe dienen. Der Shikimatweg setzt in Pflanzen also Kohlenhydratvorstufen aus dem Primärmetabolismus um, welche zu einem wesentlichen Teil in den Sekundärmetabolismus fließen (Abb.1). Die geschätzte Umsatzleistung von ca. 20 % des fixierten Kohlenstoffs bei Pflanzen durch den Shikimatweg (Haslam, 1993) macht die zentrale Rolle dieses Stoffwechselweges deutlich. Er kann als zentraler Vermittlungspunkt zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus angesehen werden, in dem Chorismat den zentralen Verzweigungspunkt zu unterschiedlichen aromatischen Stoffwechselprodukten darstellt.

Entdeckt wurde der Shikimatweg zunächst in Bakterien. Bei der Arbeit mit auxotrophen Mutanten von *Escherichia coli* fand man heraus, dass Shikimat eine zentrale Rolle in der Synthese von aromatischen Substanzen spielen muss. Die verwendeten Mutanten waren auf die exogene Zufuhr von aromatischen Aminosäuren und anderer aromatischer Substanzen

angewiesen. Die Gabe von Shikimat machte die Substitution dieser Substanzen jedoch überflüssig (Davis, 1951). In den folgenden Jahren wurden weitere Intermediate des Shikimatweges identifiziert (Gibson und Gibson 1964; Pittard und Wallace, 1966; Weiss und Mingioli, 1956; Weissbach und Hurwitz, 1959). Es folgten die Isolierung und Analyse der einzelnen beteiligten Enzyme. (Fewster, 1962; Levin und Sprinson, 1964; Mitsuhashi und Davis, 1954; Morell *et al.*, 1967; Srinivasan und Sprinson, 1959; Srinivasan *et al.*, 1963; Yaniv und Gilvarg, 1954). Die Untersuchungen zur Rolle und Funktion des Shikimatweges in Pflanzen erfolgte dann erst deutlich später.

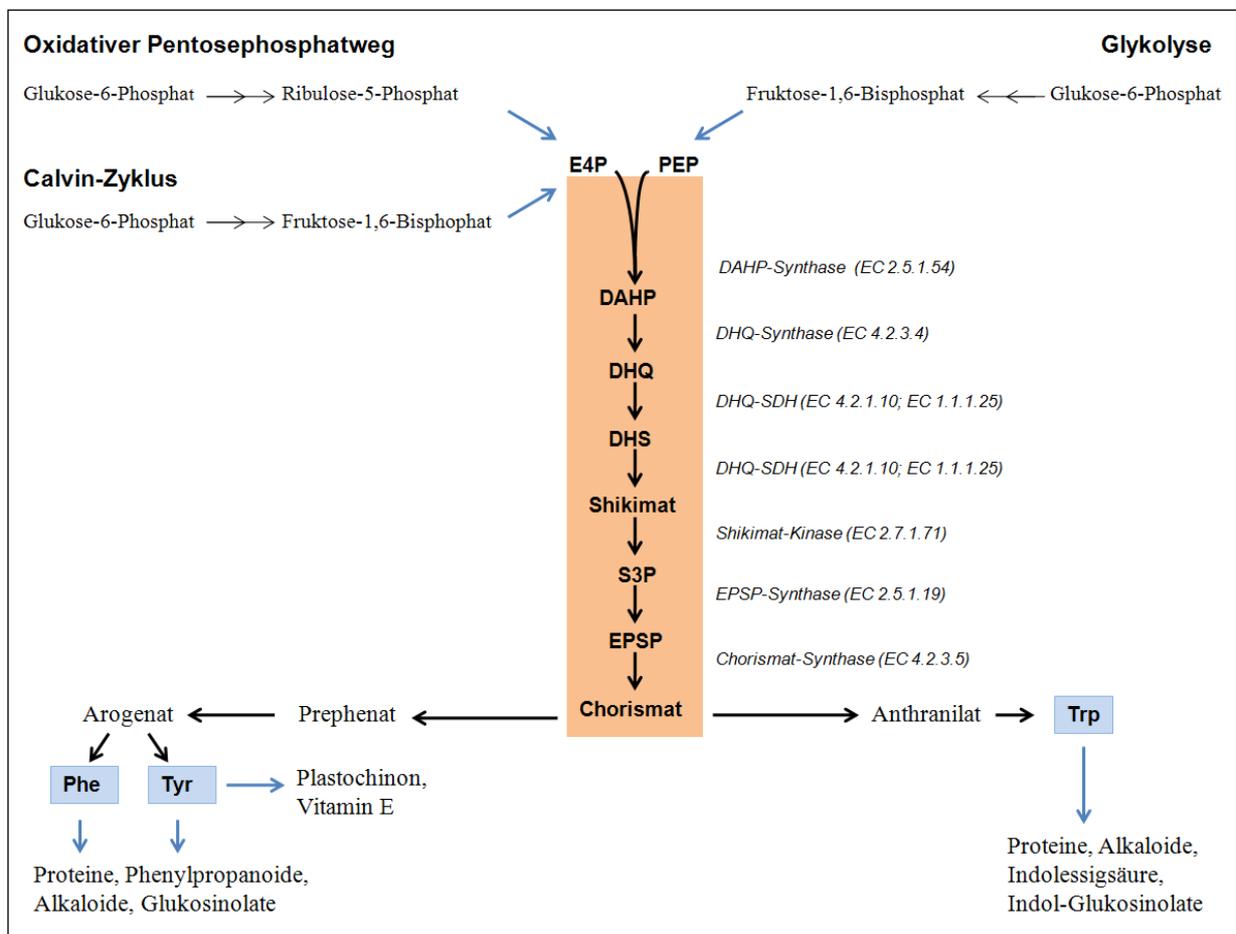


Abb.1 Der Shikimatweg und seine Einbindung in den Stoffwechsel der Pflanze: Die Substrate für die Eingangsreaktion stammen aus dem Pentosephosphatweg und der Glykolyse. Der Prechorismatweg endet mit dem Chorismat, welches die letzte gemeinsame Vorstufe für die Synthese der aromatischen Aminosäuren und einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten darstellt. Abkürzungen: DAHP: 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-Phosphat; DHQ: 3-Dehydroquinat; DHS: 3-Dehydroshikimat; DHQ-SDH: 3-Dehydroquinat-Dehydratase-Shikimat-Dehydrogenase; S3P: Shikimat-3-Phosphat; EPSP: 5-Enolpyrovylshikimat-3-Phosphat.

1.1.1 Der Shikimatweg ist Lieferant für diverse Stoffwechselwege

Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über die pflanzlichen Biosynthesewege, die sich an den Shikimatweg anschließen und die von ihm bereitgestellten Metaboliten verwenden. Dabei liegt der Fokus auf den aromatischen Aminosäuren und auf den Sekundärstoffen, die sich aus Chorismat ableiten.

Ausgehend von Chorismat werden Phenylalanin und Tyrosin über die Zwischenprodukte Prephenat und Arogenat gebildet (Abb.1). Danach verzweigt sich der weitere Syntheseweg der beiden Aminosäuren. Man vermutet, dass Phenylalanin zu einem geringen Teil, ähnlich wie in Mikroorganismen, auch über Phenylpyruvat synthetisiert werden kann. Aktuelle Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die Synthese von Phenylalanin in Pflanzen vorwiegend über Arogenat erfolgt (Cho *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2010; Tzin und Galili, 2010). **Phenylalanin** ist Ausgangsstoff für eine Vielzahl von Sekundärstoffen, wobei die Phenylpropanoide den größten Teil darstellen. Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) ist das Eingangsenzym des Phenylpropanoidweges und katalysiert die Umwandlung von Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure, welche im folgenden katalytischen Schritt zu p-Cumarsäure umgewandelt wird. Auch **Tyrosin** kann in den Phenylpropanoidweg einfließen. Hier katalysiert vermutlich die Tyrosin-Ammonium-Lyase (TAL) die Desaminierung von Tyrosin, wobei direkt die p-Cumarsäure entsteht. Es ist bisher allerdings noch nicht aufgeklärt ob die TAL-Aktivität tatsächlich auf der Aktivität eines spezifischen Enzyms beruht oder vielmehr auf der Fähigkeit der PAL auch Tyrosin als Substrat anzunehmen (Beaudoin-Eagan und Thorpe, 1985; Khan *et al.*, 2003; Neish, 1961; Rösler *et al.*, 1997). Im weiteren Verlauf des Phenylpropanoidweges entstehen Substanzen wie Lignin, Flavonoide, Cumarine und Stilbene. Lignin beispielsweise ist eines der am häufigsten vorkommenden Biopolymere und dient den Pflanzen sowohl als mechanisches Stabilitätselement als auch als Abwehrmittel gegen Eindringen und Wachstum von Pathogenen (Boudet, 2000; Vance *et al.*, 1980).

Die Gruppe der Flavonoide umfasst mehr als 4500 Substanzen, welche sich u.a. in die Substanzklassen der Flavone, Flavonole, Anthocyane und Chalkone einordnen lassen. So vielfältig wie ihre Vertreter sind auch die Funktionen der Flavonoide in der Pflanze: Sie dienen z.B. der visuellen Anlockung von bestäubenden Insekten und bieten Schutz vor schädlicher UV-B-Strahlung. Sie wehren durch ihren bitteren Geschmack Fraßfeinde ab oder wirken antimikrobiell (Übersicht in Harborne und Williams, 2000; Treutter, 2006).

Eine weitere Substanzklasse, die sich aus den Phenylpropanoiden ableitet, sind die Cumarine.

Sie wirken ebenfalls antibakteriell. Darüber hinaus entdeckte man die gerinnungshemmende Wirkung des Bishydroxycumarins, als Rinder nach dem Verzehr von Steinklee massive Blutungen aufwiesen. Cumarinderivate finden in der Medizin heute verbreitete Anwendung als Antikoagulantien (Dixon und Paiva, 1995; Harder und Breddin, 2004).

Die zweite große Klasse der Sekundärstoffe in die Phenylalanin und Tyrosin Eingang finden sind die Alkaloide. Sie sind stickstoffhaltige Verbindungen von denen die meisten einen Stickstoff-Heterozyklus als Grundkörper besitzen. Die Alkaloide sind für ihre toxischen und pharmakologischen Wirkungen bekannt. Als Beispiele für Alkaloide die aus Phenylalanin und Tyrosin hervorgehen seien hier das Morphin oder der Neurotransmitter Dopamin genannt. Die pflanzlichen Alkaloide umfassen mehr als 12000 Substanzen und nur für einen kleinen Teil dieser Stoffe liegt ein Nachweis ihrer Funktion und Wirkung vor. Die Rolle der Alkaloide als chemische Abwehr gegen Tiere und als Phytoalexine ist hingegen unumstritten. So wird die Nikotinbiosynthese in Tabakpflanzen beispielsweise bei Verletzung durch Fraßfeinde angeregt und in Tee- und Kaffeepflanzen dient Koffein als Abwehrsubstanz gegen Fressfeinde (Ashihara und Crozier, 2001; Baldwin, 1988; Robinson, 1974). Ein charakteristisches Phytoalexin in Arabidopsis ist das Indol-Alkaloid Camalexin welches u.a. durch *Pseudomonas syringae* induziert werden kann (Tsuji *et al.*, 1992).

Desweiteren dienen Tyrosin und Phenylalanin auch der Synthese der aromatischen Glukosinolate. Glukosinolate dienen der Pflanze ebenfalls zur Abwehr von Pathogenen und Fraßfeinden (Übersicht in Halkier und Gershenzon, 2006). Tyrosin hat darüber hinaus Bedeutung für die Lichtreaktion der Photosynthese, da es in die Synthese des mobilen Elektronenträgers Plastchinon eingeht. Außerdem wird es für die Biosynthese von dem Antioxidans Vitamin E benötigt, welches in Form von α -Tocopherol an den Thylakoiden angereichert ist um dort die Thylakoidmembranen vor photooxidativer Schädigung zu schützen (Havaux *et al.*, 2003).

Bei der **Tryptophan**-Biosynthese entsteht zunächst aus Chorismat und Glutamin die Vorstufe Anthranilat, welche in fünf weiteren enzymatischen Reaktionen schließlich in Tryptophan überführt wird (Tzin und Galili, 2010). Aus der Aminosäure Tryptophan gehen dann viele indolhaltige Metaboliten hervor, wie die Indolessigsäure (IES), die Indol-Alkaloide, Phytoalexine und Indol-Glukosinolate. IES ist ein zentrales Phytohormon in Pflanzen und reguliert u.a. das Streckungswachstum im Spross und das Wurzelwachstum. Zur Gruppe der aus Tryptophan hervorgehenden Indol-Alkaloide gehören Chinin und Lysergsäure. Chinin findet Anwendung bei der Malariatherapie- und Prophylaxe. Die Lysergsäure ist Basis des

halluzinogenen Lysergsäurediethylamids (LSD). Phytoalexine und Indol-Glukosinolate dienen der Abwehr von Bakterien und Fraßfeinden (Übersicht in Bennett und Wallsgroove, 1994; Hartmann, 2007).

1.1.2 Die Lokalisation des Shikimatweges

Der Shikimatweg zieht seine Substrate aus zentralen Stoffwechselwegen ab und stellt seine Produkte wiederum abzweigenden Stoffwechselwegen zur Verfügung. Dies bedarf einer starken Regulation damit keine Stoffwechselenergie und Ressourcen verschwendet werden. Die Energie, die beispielsweise in die Synthese der aromatischen Aminosäuren einfließt, ist relativ hoch. Schätzungen sagen, dass die Energiekosten für die Synthese der einzelnen aromatischen Aminosäuren deutlich höher liegen (in den meisten Fällen ≥ 2 fach) als für die restlichen Aminosäuren (Akashi und Gojobori, 2002; Craig und Weber, 1998). Daher erscheint eine Lokalisation des Shikimatweges im Chloroplasten, also an der Quelle der benötigten Energieäquivalente, als naheliegend. Viele Untersuchungen und Enzym-Isolationen unterstreichen die Lokalisation des Shikimatweges im Chloroplasten. Die zusätzliche Existenz dieses Stoffwechselweges oder einiger seiner Abschnitte im Cytosol werden jedoch bis heute diskutiert.

Schon früh fand man Hinweise, dass der Shikimatweg in den Chloroplasten lokalisiert ist: Experimente mit isolierten, intakten Chloroplasten aus Spinat zeigten den Einbau von ^{14}C -markiertem CO_2 und Shikimat oder ^{14}C -markiertem Phosphoenolpyruvat in die aromatischen Aminosäuren (Bickel *et al.*, 1978; Schulze-Siebert *et al.*, 1984).

In isolierten Chloroplasten aus der Erbse (*Pisum sativum* L.) konnten alle sechs Prechorismatwegenzyme nachgewiesen werden (Mousdale und Coggins, 1984; Mousdale und Coggins, 1985).

Darüber hinaus wurde für alle Enzyme des Shikimatweges in höheren Pflanzen eine N-Terminale Sequenz identifiziert, welche wahrscheinlich für den Import in den Chloroplasten verantwortlich ist (Herrmann und Weaver, 1999). Enzyme, die im Kern kodiert werden und für den Chloroplastenimport bestimmt sind, werden mit einer Transitsequenz als Vorstufen im Cytosol synthetisiert und dann in den Chloroplasten importiert. Charakteristisch für die N-Terminale Transitsequenzen ist, dass sie kaum saure Aminosäurereste aufweisen, aber reich an basischen und hydroxylierten Aminosäureresten sind. Nach erfolgtem Import wird die

Signalsequenz von einer Peptidase entfernt und das Protein faltet sich entweder in seine aktive Form oder wird weiter in die Thylakoidmembran oder in das Thylakoidlumen transportiert (Richter und Lamppa, 1998; Hörmann *et al.*, 2007).

Für eine DAHP-Synthase der Kartoffel, eine 5-Enolpyruvyl-shikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSP-Synthase) der Petunie und eine Shikimat-Kinase der Tomate konnte der *in vitro* Transport in den Chloroplasten nachgewiesen werden. Die EPSP-Synthase und die Shikimat-Kinase waren allerdings sowohl mit Transitsequenz als auch ohne Sequenz katalytisch aktiv (Della-Cioppa *et al.*, 1986; Schmid *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2002). Somit ist eine zusätzliche katalytische Aktivität dieser Enzyme im Cytosol nicht ausgeschlossen, obgleich die Importstudien mit der EPSP-Synthase darauf hinweisen, dass der Import der Enzym-Vorstufen in den Chloroplasten sehr schnell erfolgt (Della-Cioppa *et al.*, 1986).

Die Chorismat-Synthase hingegen weist nur in ihrer prozessierten Form, also ohne Transitsequenz, katalytische Aktivität auf (Henstrand *et al.*, 1995). Dies schließt einen vollständigen cytosolischen Shikimatweg, der allein auf der cytosolischen Aktivität der unprozessierten Shikimatweg-Enzyme beruht, aus.

Die Theorie, dass ein weiterer cytosolischer Shikimatweg neben dem plastidären Stoffwechselweg existiert, beruht vor allem auf der Entdeckung von cytosolischen Isoformen der DAHP-Synthase, Chorismat-Mutase und der DHQ-SDH (d'Amato *et al.*, 1984; Ding *et al.*, 2007; Eberhard *et al.*, 1996a und 1996b; Ganson *et al.*, 1986; Morris *et al.*, 1989). Die Chorismat-Mutase katalysiert die Umlagerung von Chorismat zu Prephenat, der ersten gemeinsamen Vorstufe der Aminosäuren Phenylalanin oder Tyrosin. Es sind zwei Isoformen der Chorismat-Mutase bekannt (CM-1 und CM-2), die aus verschiedenen höheren Pflanzen isoliert wurden. CM-1 ist im Chloroplasten lokalisiert und gilt als die regulierte Isoform.

CM-1 wird bei Verwundung oder Pathogenbefall induziert und unterliegt einer Regulation durch die aromatischen Aminosäuren. Das cytosolische Enzym CM-2 hingegen, unterliegt keiner Regulation durch die aromatischen Aminosäuren und zeigt keine Expressionsänderung nach Verwundung oder Pathogeneinwirkung, wird aber durch Kaffeesäure kompetitiv gehemmt. Die Existenz einer Chorismat-Mutase im Cytosol kann ein Hinweis darauf sein, dass die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ebenfalls im Cytosol synthetisiert werden können. Die Lokalisation und die unterschiedlichen regulierenden Faktoren der beiden Isoenzyme lassen unterschiedliche Funktionen vermuten. So stellt die CM-1 das Prephenat möglicherweise vor allem für die Proteinbiosynthese bereit, während die CM-2, welche keiner Regulierung durch die aromatischen Aminosäuren unterliegt, das Prephenat in die Synthese

von Sekundäremetaboliten einfließen lässt (Eberhard *et al.*, 1996b; Goers und Jensen, 1984; Kuroki und Conn, 1989; Singh *et al.*, 1985).

Die plastidäre Form der DAHP-Synthase ist ebenfalls reguliert, während die DAHP-Synthase im Cytosol als unreguliert gilt. Beide Enzyme zeichnen sich durch unterschiedliche biochemische Eigenschaften aus. Ein entscheidender Unterschied ist die Substratspezifität. Während die plastidäre Form hochspezifisch Erythrose-4-Phosphat bindet, zeigt das Enzym im Cytosol auch eine hohe Affinität gegenüber anderen Aldehyden und eine besonders hohe spezifische Aktivität mit Glykolaldehyd als Substrat. Daher ist zu vermuten, dass die Funktionen der beiden Enzyme sehr unterschiedlich sind, so dass wahrscheinlich nur das plastidäre Enzym physiologische Bedeutung für die DAHP-Synthese hat (Doong *et al.*, 1992b; Ganson *et al.*, 1986; McCue und Conn, 1989; Morris *et al.*, 1989; Muday und Herrmann, 1992; Rubin und Jensen, 1985).

1.1.3 Regulierung der Enzyme des Shikimatweges

Man weiß, dass der Kohlenstofffluss in den Shikimatweg in Bakterien im Wesentlichen über das Eingangsenzym DAHP-Synthase reguliert wird. Bakterien besitzen drei DAHP-Synthasen, die jeweils der negativen Rückkopplung durch die aromatischen Aminosäuren unterliegen: es gibt eine Tyrosin-sensitive, eine Phenylalanin-sensitive und eine Tryptophan-sensitive Isoform (Ogino *et al.*, 1982).

Auf die bisher isolierten pflanzlichen DAHP-Synthasen hingegen, zeigen die aromatischen Aminosäuren keine inhibierende Wirkung. In Kartoffel und Karotte wird die DAHP-Synthase sogar durch Tryptophan aktiviert (Suzich *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 1986). Arogenat zeigt eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität der DAHP-Synthase, allerdings nur in unphysiologischen Konzentrationen (Razal *et al.*, 1994; Rubin und Jensen, 1985). So konnte man bisher keine Substanz finden, die in physiologischen Konzentrationen negativ rückkoppelnd auf die Aktivität der DAHP-Synthase wirkt. Dass das bakterielle Enzym anders reguliert ist als die pflanzliche DAHP-Synthase überrascht nicht, wenn man die Aminosäuresequenzen vergleicht, die nur zu etwa 20 % identisch sind (Herrmann und Weaver, 1999).

Einige Enzyme des Postchorismatweges in Pflanzen unterliegen allerdings der allosterischen Kontrolle durch ihre Produkte (Abb.2). So wird eine Chorismat-Mutase sowohl durch Phenylalanin als auch Tyrosin inhibiert und durch Tryptophan aktiviert (Gilchrist *et al.*, 1972;

Goers und Jensen, 1984). Die Arogenat-Dehydratase wird durch Phenylalanin inhibiert und durch Tyrosin stimuliert (Siehl und Conn, 1988). Die Arogenat-Dehydrogenase wird inhibiert durch Tyrosin, und die Anthranilat-Synthase durch Tryptophan (Brotherton *et al.*, 1986; Connelly und Conn, 1986).

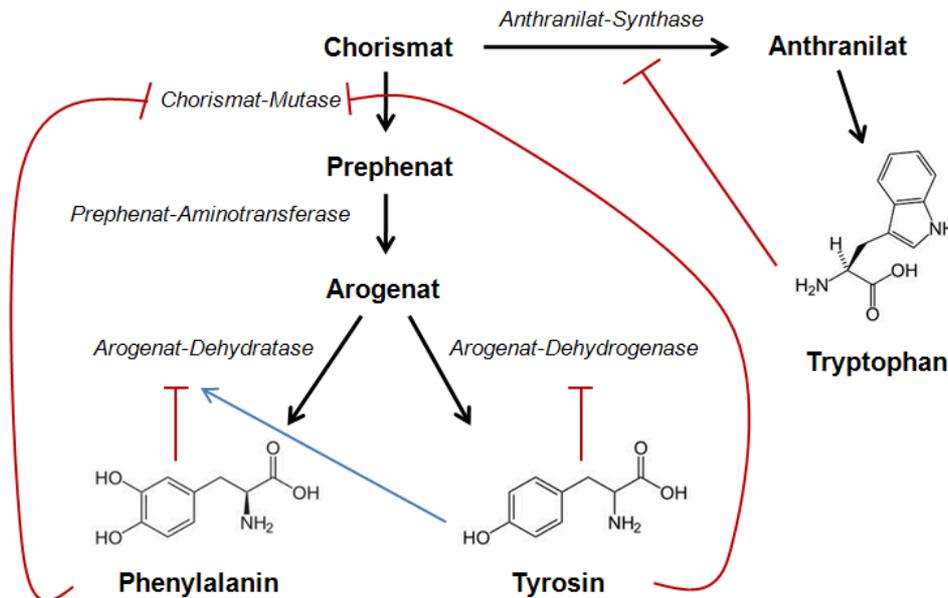


Abb.2 Die Feedback-Inhibition der Enzyme des Postchorismatweges: Die inhibierende Wirkung einer Substanz auf das Enzym ist in rot dargestellt, die induzierende Wirkung in blau.

Für den pflanzlichen Prechorismatweg ist eine Regulierung vor allem auf der Transkriptionsebene bekannt. Verschiedene abiotische und biotische Faktoren beeinflussen die Expression der beteiligten Gene. Für alle Prechorismatweg-Gene konnte eine erhöhte Expression nach Einwirken von pilzlichen Elicitoren gezeigt werden. In der Tomate hat man den zeitlichen Verlauf dieser Expression genauer studiert. Interessanterweise werden die Shikimat-Kinase und auch die PAL vor anderen Shikimatweg-Genen induziert. Dies weist darauf hin, dass die Genprodukte von Shikimat-Kinase und PAL oder auch durch sie gesteigerte Intermediate die anderen Gene regulieren könnten (Bischoff *et al.*, 1996 und 2001; Forlani, 2002; Görlach *et al.*, 1995; Henstrand *et al.*, 1992; McCue und Conn, 1989).

Unter Ozoneinwirkung werden ebenfalls alle Prechorismatweg-Gene induziert. Hierbei ist allerdings auch die Expressionssteigerung des Eingangsenzyms DAHP-Synthase sehr früh zu beobachten (Betz *et al.*, 2009; Janzik *et al.*, 2005).

Weitere Faktoren die die Expression von Prechorismatweg-Enzymen induzieren sind Verwundung, Pathogene, Licht und Hitze (Diaz und Merino, 1998; Dyer *et al.*, 1989; Fucile *et al.*, 2008; Henstrand *et al.*, 1992; Keith *et al.*, 1991; McCue und Conn, 1990; Mori *et al.*, 2000). Dabei zeigen verschiedene Isoenzyme oft eine unterschiedliche Antwort auf den jeweiligen Faktor.

Neben der oben bereits beschriebenen allosterischen Kontrolle weisen auch die Enzyme des Postchorismatweges eine Regulation auf Transkriptionsebene auf. Die Expression einer Chorismat-Mutase und einer Anthranilat-Synthase wird durch Verwundung induziert. Die Expression der Anthranilat-Synthase wird ebenfalls durch Pathogene erhöht (Kuroki und Conn, 1988; Niyogi und Fink, 1992).

Doch auch die Verfügbarkeit von Substraten, Nährstoffen oder Stoffwechselprodukten übt einen Einfluss auf die Expression der Shikimatweg-Gene aus. Stickstoffmangel induziert die DAHP-Synthase, während der Mangel an Schwefel die EPSP-Synthase induziert (Herrmann und Weaver, 1997; Nikiforova *et al.*, 2003). Das Herunterfahren der Histidin-Biosynthese führt zu einer erhöhten Expression von DAHP-Synthase und EPSP-Synthase (Guyer *et al.*, 1995). Ein verringertes Angebot an den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan führt zu einer erhöhten Aktivität der DAHP-Synthase (Guillet *et al.*, 2000). Wird die Verfügbarkeit von Erythrose-4-Phosphat eingeschränkt, so bringt dies einen veränderten Fluss durch Shikimat- und Phenylpropanoidweg mit sich (Henkes *et al.*, 2001).

Somit unterliegen die Gene der Shikimatweg-Enzyme einer Vielzahl von regulierenden Faktoren.

1.2 Die DAHP-Synthase

1.2.1 Regulation der DAHP-Synthase

Die bisher untersuchten DAHP-Synthasen sind alle Metalloproteine und benötigen ein Metallion für ihre Aktivität. In *E. coli* wirken Fe^{2+} oder Zn^{2+} aktivierend auf das Enzym (Stephens und Bauerle, 1991). In Pflanzen kennt man DAHP-Synthasen, die entweder durch Mn^{2+} oder durch Co^{2+} aktiviert werden. Das Mangan-aktivierte Enzym, welches in den Chloroplasten zu finden ist, hat eine absolute Spezifität für das Substrat Erythrose-4-

Phosphat. Das Cobalt-aktivierte Enzym hingegen, das im Cytosol lokalisiert ist, zeigt eine höhere Affinität gegenüber Glykoaldehyden (Vergleiche Abschnitt 1.1.2). Für die DAHP-Synthase 1 in *Arabidopsis thaliana* konnte bereits gezeigt werden, dass Mn^{2+} -Ionen die effektivsten Kationen für die Aktivierung des Enzyms sind. Magnesiumionen können Manganionen in höheren Konzentrationen ersetzen. Co^{2+} und Fe^{2+} , sowie Ca^{2+} vermögen dies hingegen nicht (Entus *et al.*, 2002).

Desweiteren wurde festgestellt, dass die DAHP-Synthase 1 aus *Arabidopsis* reduziertes Thioredoxin (TRX) für ihre Aktivität benötigt, also möglicherweise einer Redox-Regulierung unterliegt (Entus *et al.*, 2002).

In den meisten Pflanzen sind bis zu drei verschiedene Isoformen der DAHP-Synthase bekannt, in der Pappel sind es sogar vier (Hamberger *et al.*, 2006; Herrmann und Weaver, 1999). Man konnte mehrfach feststellen, dass die jeweiligen Isoformen einer unterschiedlichen Regulation in der Transkription unterliegen. Stressfaktoren wie Pathogenbefall, UV-B-Strahlung, pilzliche Elicitoren, Trockenheit, Ozon oder Verwundung steigern die Aktivität und Transkription verschiedener Isoformen der DAHP-Synthase (Betz *et al.*, 2009; Catala *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006; Ditt *et al.*, 2006; Keith *et al.*, 1991; McCue *et al.*, 1989; Henstrand *et al.*, 1992; Janzik *et al.*, 2005; Ramani *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 1999; Thilmony *et al.*, 2006). Die Transkriptionssteigerung der DAHP-Synthase wird dabei häufig von der Induktion der PAL begleitet (Henstrand *et al.*, 1992; Janzik *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2006).

Desweiteren führt das exogene Angebot von Kohlenhydraten in Form von Saccharose oder Glukose zu einer Induktion der DAHP-Synthasen 1 und 3. (Solfanelli *et al.*, 2006, Martin, 2006).

Zwei Phytohormone haben auf die Expression der DAHP-Synthase 1 aus *Arabidopsis* Einfluss: Methyljasmonat wirkt induzierend, während die Abscisinsäure in Schließzellen die Expression verringert (Devoto *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2007; Leonhardt *et al.*, 2004; Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2005).

Ein möglicher Transkriptionsfaktor, der in *Arabidopsis thaliana* regulierend auf den Shikimatweg einwirkt, ist AtMYB15. Eine Überexpression des Gens für AtMYB15 führt zu einer gesteigerten Expression fast aller Gene des Prechorismatweges, darunter auch zwei Isoformen der DAHP-Synthase (Chen *et al.*, 2006).

Darüber hinaus unterliegen die Transkripte der DAHP-Synthase und einiger anderer Enzyme des Prechorismatweges einer diurnalen Rhythmik (Janzik *et al.*, 2005, Mockler *et al.*, 2007).

1.2.2 Substrate der DAHP-Synthase

Die Substrate der DAHP-Synthase sind das Phosphoenolpyruvat (PEP) und das Erythrose-4-Phosphat (E4P) (Herrmann und Weaver, 1999). Das PEP stammt aus der Glykolyse und kann im Chloroplasten und den meisten anderen Plastiden nicht synthetisiert werden, da hier Enzyme der Glykolyse fehlen: die Phosphoglycerat-Mutase und die Enolase (Bagge und Larsson, 1986; Stitt und Rees, 1979; van der Straeten *et al.*, 1991). Daher muss das PEP zunächst aus dem Cytosol in den Chloroplasten transportiert werden. Der Transport erfolgt über den Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator. Dieser ist in der inneren Chloroplastenmembran lokalisiert und hier erfolgt der Transport des Phosphoenolpyruvats in das Stroma im Austausch gegen anorganisches Phosphat (Fischer *et al.*, 1997).

Das Substrat E4P stammt aus dem oxidativen Pentosephosphatweg oder dem Calvinzyklus. Beide Stoffwechselwege finden im Chloroplasten statt. Im Licht wird das E4P während der Photosynthese im Calvinzyklus bereitgestellt, während im Dunkeln der oxidative Pentosephosphatweg das E4P liefert (Hrazdina und Jensen, 1992). Gebildet wird das E4P mit Hilfe des Enzyms Transketolase (Henkes *et al.*, 2001), welches die Reaktion von Glyceraldehyd-3-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat zu Xylulose-5-Phosphat und E4P katalysiert.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In einer Reihe von Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene pflanzliche Isoformen der DAHP-Synthase auf transkriptioneller Ebene unterschiedlich reguliert sind. So wird die Expression von einigen Isoenzymen durch das Einwirken verschiedener Stressfaktoren wie Pathogenbefall, UV-Licht, Ozon oder Verwundung induziert, während die Expression anderer unverändert bleibt. (Betz *et al.*, 2009; Ditt *et al.*, 2006; Görlach *et al.*, 1995; Janzik *et al.*, 2005; Keith *et al.*, 1991). Dies deutet darauf hin, dass den Isoenzymen unterschiedliche Funktionen zufallen.

In dieser Arbeit wird eine vergleichende Studie der drei Isoenzyme aus Arabidopsis auf biochemischer Ebene durchgeführt um mögliche Unterschiede auch auf der Proteinebene zu finden. Dabei wurde mit in *E. coli* heterolog exprimierten Proteinen gearbeitet, die anschließend mit einem photometrischen Enzymassay charakterisiert wurden. Die Arbeit mit

heterolog exprimierten Protein macht es möglich jedes Enzym einem konkreten Gen zuzuordnen und große Mengen für eine umfassende biochemische Charakterisierung zu gewinnen.

Zusätzlich zu der biochemischen Charakterisierung der Proteine wurden in dieser Arbeit Knockout-Mutanten für die verschiedenen DAHP-Synthasen analysiert. Dabei standen sowohl Knockout-Mutanten für jede einzelne Isoform, als auch eine Doppelmutante für die DAHP-Synthasen 2 und 3 zur Verfügung. Die Pflanzen weisen unter Standardbedingungen äußerlich keine Unterschiede auf. Daher wurden die Genexpression und der Gehalt an verschiedenen Metaboliten unter verschiedenen Anzuchtbedingungen untersucht, um so Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten sichtbar zu machen und Hinweise auf mögliche Funktionen der einzelnen Isoenzyme zu finden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Stoff	Firma
Agarose	Bio-Rad, München
Aminosäurestandards	Agilent Technologies, Waldbronn
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant	Blue G-250 Bio-Rad, München
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Buchs (Schweiz)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Erythrose-4-Phosphat (E4P)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 99,8 % (EtOH)	KMF Laborchemie Handels GmbH
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gallussäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gene Ruler™ 1kb Ladder (DNA-Standard)	Fermentas, St. Leon-Roth
Glycin	Merck, Darmstadt
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Fermentas, St. Leon-Roth
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, München
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
Kaliumchlorid (KCl)	KMF, Lehmar
LB-Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid x 4H ₂ O (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 6H ₂ O (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt

Stoff	Firma
Mangan(II)chlorid x 2H ₂ O (MnCl ₂)	Merck, Darmstadt
Mass Ruler™ DNA Ladder, Low Range (DNA-Standard)	Fermentas, St. Leon-Roth
Monomeregemisch	Bio-Rad, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Serva, Heidelberg
Nähragar	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinder-Serum-Albumin	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Bio-Rad, München
Thioredoxin (<i>Spirulina</i> sp.)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris (ultrapure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris HCl	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Bio-Rad, München

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle übrigen Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) im analytischen Reinheitsgrad bezogen.

2.1.2 Enzyme

Enzym	Firma
Rekombinante Enterokinase (rEK)	Merck, Darmstadt
HotStar HiFidelity DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
iScript™ Reverse Transcriptase	Biorad, München
Lysozym (Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pfu Polymerase	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Taq</i> DNA Polymerase LC (native, without BSA)	Fermentas, St. Leon-Roth

Enzym	Firma
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth
T4-DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.3 Antikörper

Für die Immunodetektion der DAHP-Synthasen im Westernblot diente polyklonales Meerschweinchenantiserum gegen eine DAHP-Synthase aus Arabidopsis von der Firma Eurogentec. Als Antigen bei der Immunisierung der Meerschweinchen diente die heterolog exprimierte DAHP-Synthase 1 aus Arabidopsis. Dieser Antikörper detektierte im Western Blot nachweislich alle drei DAHP-Synthasen aus Arabidopsis.

Antikörper	Firma
Anti-Meerschweinchen IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-DAHPS	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden in HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Sie wurden in dem vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von 100 μ M vorlagen.

Name	Sequenz	
for_5g20280	AGCTCAAACCAAGACATCC	**
rev_5g20280	TGACCTCTCCAGTGATCC	**
for_1g06530	GCGAGAGATTGACAAGTCC	**
rev_1g06530	TCACCTCAAAGCACCAAG	**
026_RT_3 (DAHPS3)	AAC CCA AGT CGT CGA ATG TGA C	**
033_RT_5 (DAHPS2)	CAT GGG TGC AGC TGG ACT TA	**
033_RT_3 (DAHPS2)	AG CCA TGA TTG TGT TTC CGT	**

Name	Sequenz	
5AtActAll (Aktin)	GAGAAGATTTGGCATCACAC	**
3AtActAll (Aktin)	CACACCATCTCCAGAGTC	**
AtDHS1pETex5 (DAHPS1)	GAC GAC GAC AAG ATT GCT GTA CAC GCG GCT GA	*
AtDHS1pETex3 (DAHPS1)	GAG GAG AAG CCC GGT TCA AGA CAC ACG CTG	*
AtDHS2pETex5 (DAHPS2)	GAC GAC GAC AAG ATC GCT TCG GTT AAA TGG AG	*
AtDHS2pETex3 (DAHPS2)	GAG GAG AAG CCC GGT CTA GAC TCC AAT AGA TG	*
AtDHS3pETex5 (DAHPS3)	GAC GAC GAC AAG ATT GCG TCG GCG GCG	*
AtDHS3pETex3 (DAHPS3)	GAG GAG AAG CCC GGT TTA GAG GGC AAA AGC C	*
AtDHS1_PAL7ex5 (DAHPS1)	P-AAG CTT TGG CTG TAC ACG CG	*
AtDHS1_PAL7ex3 (DAHPS1)	P-AAT TCT TAA GAC ACA CGC TGG C	*
AtDHS2_PAL7ex5 (DAHPS2)	P-AAG CTT TGG CTT CGG TTA AAT GG	*
AtDHS2_PAL7ex3 (DAHPS2)	P-AAT TCT TAG ACT CCA ATA GAT GAC G	*
AtDHS3_PAL7ex5 (DAHPS3)	P-AAG CTT TGG CGT CGG C	*
AtDHS3_PAL7ex3 (DAHPS3)	P-AAT TCT TAG AGG GCA AAA GCC	*
064_RT_5 (DAHPS1)	GTC AGA GAA AAT CTG TGA TG	**
3ATDP (DAHPS1)	GGA ATC CTC GAT TTC TCA TC	**
NPTII5 (Kanamycin-Resistenzgen)	CAC GAC GGG CGT TCC TTG C	***
NPTII3 (Kanamycin-Resistenzgen)	GGT GGT CGA ATG GGC AGG TAG C	***
5AtPAL1 (PAL1)	GTG TCG CAC TTC AGA AG	**
3AtPAL1 (PAL1)	GGC TTG TTT CTT TCG TGC	**
SALK_026183_LP (DAHPS3)	TGC TAC TGG TGG TTA TGC TGC	**

Einsatz für:

* die Amplifizierung der cDNA für die Expressionsklonierung und die Kolonie-PCR

** die realtime-PCR

*** die Sondenherstellung für den Southern Blot

2.1.5 Vektoren

Vektor	Firma
pPAL7 Vektor	Bio-Rad, München
pET-51 EK/LIC Vektor	Merck, Darmstadt
pQE-2 Vektor	Qiagen, Hilden

2.1.6 Antibiotika

Bei der Anzucht der Bakterien fand Ampicillin der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) Anwendung.

2.1.7 Bakterienstämme

Die verwendeten *Escherichia coli*- Bakterienstämme wurden alle von Merck (Darmstadt) bezogen. Es handelt sich um Bakterienstämme der Marke Novagen®.

Stamm	Genotyp
BI21(DE3) (Expression)	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (DE3)
BL21(DE3)pLysS (Expression)	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR)
NovaBlue GigaSingles™ Competent Cells (Klonierung)	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF'[proA⁺B⁺ lacI^q ZDM15::Tn10]</i> (Tc ^R)

2.1.8 Affinitätssäulen

Säule	Firma
Strep-Tactin „Superflow“ cartridge H-PR	IBA GmbH, Göttingen
Bio-Scale Mini Profinity eXact Cartridge	Bio-Rad, München

2.1.9 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Brutschrank	Modell 300	Memmert (Schwabach)
Brutschüttler	TH 15	Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Elektrophoreseapparaturen	OWL SeparationSystem	VWR (Darmstadt)
Feinwaagen	PB3002-5	Mettler Toledo (Giessen)
	Explorer	OHAUS (Giessen)
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Mikroplatten-Lesegerät	Synergy 2	BioTek, Bad Friedrichshall
MilliQ - Anlage	MilliQ – Gradient	Millipore (Schwalbach)
PCR-Gerät	RoboCycler Gradient 96	Stratagene (Heidelberg)
pH-Meter	Accumet model 15	Fischer Scientific (Schwerte)
Photometer	UVIKON XL	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Protein-Elektrophorese-System	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad (München)
qRT-PCR-Gerät	iCycler MyIQ	Bio-Rad (München)
Schüttler	Model 260300	Boekel Industries Inc. (Feasterville, USA)
Schüttler	BioDancer	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Schüttler	Certomat® U	VITARIS AG (Baar)
Spannungsgeräte	Power Pac 300	Bio-Rad (München)
Spektralphotometer	DR 5000 UV/VIS	HACH LANGE (Düsseldorf)
Thermoblock	Thermoblock comfort	Eppendorf (Hamburg)

Gerät	Modell	Firma
Ultraschallgerät	Vibracell 75186	Sonics & Materials, USA (Danbury, Connecticut)
UV stratalinker	UV stratalinker 1800	Stratagene (Heidelberg)
Vakuum-Zentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Videodokumentationsanlage	UVT-28MP	Herolab (Wiesloh)
Western-Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot cell	Bio-Rad (München)
Zentrifugen	Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
	Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

Sonstige Laborgeräte entsprachen dem üblichen Laborstandard.

2.1.10 Pflanzen

Alle Experimente wurden mit Pflanzenmaterial von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Das Saatgut wurde von der Firma NASC (Loughborough, UK) bezogen. Es handelt sich bei allen Pflanzenlinien um SALK-Linien mit Columbia-Hintergrund. Die Linien N526, N533 und N5088 sind Knockout-Mutanten für jeweils verschiedene Isoformen der DAHP-Synthase. Die Mutationen wurden durch eine T-DNA-Insertion erzeugt. Alle Mutanten waren in der F5-Generation homozygot. Es wurde ebenfalls mit einer Doppelmutante für die DAHP-Synthasen 2 und 3 gearbeitet. Diese wurde durch Kreuzung der Linien N533 und N526 erzeugt, und die Homozygotie wurde nachgewiesen.

Pflanzenlinie	Salk-Linie	Insertion in Gen	Insertion in Exon/Intron
Columbia-0	-	-	-
N526	SALK_026183	At1g 22410 (DHS3)	Intron
N533	SALK_033389	At4g 33510 (DHS2)	Intron
N5088	SALK_008842	At4g 39980 (DHS1)	Exon

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Dafür wurde jeweils 50 – 100 mg in flüssigem Stickstoff gemörserteres Blattmaterial verwendet. Für die Isolierung von reiner RNA wurde eine kurze DNase-Behandlung nach Herstellerangaben ergänzt.

2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA

1 g in flüssigem Stickstoff aufgeschlossenen Pflanzenmaterials wurde in 4 ml 2x CTAB-Puffer gelöst und unter gelegentlichem Invertieren für 1 Stunde bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und gut gemischt. Zur Phasentrennung wurde für 10 Minuten bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde dann mit 1/10 Volumen 10% CTAB-Lösung gut gemischt und erneut mit 1 Volumen des Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die wässrige Phase mit 1 Volumen CTAB-Präzipitationspuffer vermischt und über Nacht bei 65°C inkubiert. Der dabei entstandene CTAB-Nukleinsäure-Komplex wurde dann bei 2000 rpm und 4°C für 5 Minuten sedimentiert und nach Entfernen des Überstandes mit 500 µl Hochsalz-TE-Puffer resuspendiert. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 6/10 Volumen eiskaltem Isopropanol und der Inkubation bei -20°C für 15 Minuten. Anschließend folgte die Sedimentation mittels Zentrifugation für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4°C. Nach Waschen der DNA mit 80% Ethanol wurde das Pelett in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Lösen der Nukleinsäuren erfolgte über Nacht bei 4°C in 30-50 µl H₂O.

2x CTAB Puffer:	1 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCL, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% (w/v) PVP, 2% (v/v) β-ME, 65°C warm
10% CTAB-Lösung:	0,7 M NaCl, 10% (w/v) CTAB, 65°C warm

CTAB Präzipitationspuffer: 1% (w/v) CTAB, 50 mM Tris, 10 mM EDTA
 Hochsalz -TE - Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1M NaCl

2.2.1.3 cDNA-Herstellung

Die cDNA wurde mithilfe der M-MLV reversen Transkriptase (Promega) oder mit iScript reverser Transkriptase (BioRad) und einem Gemisch aus Oligo(dT)Primern nach Angaben des Herstellers gewonnen.

2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR):

Die PCR-Reaktionen für die Klonierung in den pET-51-Vektor wurden mit dem Enzym HotStar HiFidelity (Qiagen) und für die Klonierung in den pPAL7-Vektor mit der Pfu-Polymerase durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen erfolgten in einem Ansatzvolumen von 50 µl und im RoboCycler Gradient 96 (Stratagene). Die entsprechenden Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden mit MiliQ-Wasser auf eine Konzentration von 100 µM gebracht.

PCR-Ansatz Pfu: 1x Pfu-Puffer mit Magnesium (Fermentas); 0,2 mM dNTP;
 1 µM jeder Primer; 8 ng template (Plasmid-DNA (pET-51));
 1 U Pfu Polymerase (Fermentas); H₂O dd

PCR-Ansatz HotStar
 HiFidelity: 1x HotStar HiFidelity PCR-Puffer mit Magnesium und dNTP
 (Qiagen); 1 µM jeder Primer; 3 µl cDNA; 2,5 U HotStar -
 HiFidelity DNA Polymerase; H₂O dd

PCR-Programm:

Aktivierungsschritt:	5 Minuten	95 °C	} 35 Zyklen
Denaturierung:	0,5 Minuten	95 °C	
Hybridisierung:	1 Minute	T _m - 5 °C	
Amplifizierung:	1,5 Minuten*	72 °C	
Finale Amplifizierung:	10 Minuten	72 °C	

* Für die PCR-Reaktion mit der Pfu-Polymerase wurde die Zeit der Amplifizierung bis zu 3 Minuten erhöht

2.2.1.5 Gelelektrophoretische Analyse der DNA

Es wurden 0,8 %ige Agarosegele der Größe 7 cm x 8 cm verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und als Elektrophoresepuffer diente ebenfalls der 1x TAE-Puffer. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel, wurden diese mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt. Für eine Größen- und Mengenabschätzung der DNA-Banden wurden Molekulargewichtsstandards (siehe 2.1.1) geladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei 85 Volt für 45 Minuten in Horizontalgelkammern. Danach wurden die Gele für 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und in MiliQ Wasser entfärbt. Die Detektion der DNA erfolgte unter UV Licht und wurde mittels einer Dokumentationsanlage (UVT-28MP ICU-1, Herolab (Wiesloch) und Video Graphic Printer UP-890CE Sony, Köln) fotografiert.

50x TAE-Puffer: 2 M Tris; 0,9 M Essigsäure; 0,05 M EDTA; pH= 7,3

10x Ladepuffer: 30 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol

2.2.1.6 Elution der PCR-Produkte aus dem Gel

Zur Elution der PCR-Produkte aus dem Agarosegel wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) dem Protokoll des Herstellers entsprechend verwendet und die DNA wurde mit Wasser eluiert.

2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Eine OD von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/μl und einer RNA-Konzentration von 40 ng/μl.

Desweiteren wurde die OD bei 280 nm erfasst. Bei dieser Wellenlänge absorbieren Proteine maximal. So lässt sich die Reinheit der DNA bzw. RNA überprüfen, indem man den Quotienten OD_{260} / OD_{280} bildet. Der Quotient sollte bei sauberer DNA bzw. RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.8 Restriktion von DNA

Das Schneiden von DNA erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen HindIII, EcoRI und BamHI (Fermentas, St. Leon-Roth). Dies erfolgte in dem vom Hersteller jeweils empfohlenen Puffer und Reaktionsvolumen bei 37°C für 2 Stunden. Nach der Restriktion wurden die entsprechenden Enzyme hitzeinaktiviert (20 Minuten bei 75°C).

2.2.1.9 T4-DNA-Polymerase-Behandlung

Für das Einbringen der amplifizierten DNA in den entsprechenden Zielvektor wurde diese nach der Gelelution mit T4-DNA-Polymerase (Fermentas) in Anwesenheit der passenden Desoxyribonukleotide behandelt, um komplementäre Überhänge zu den Überhängen des linearisierten Vektors zu generieren. Bei dem pPAL-7-Vektor handelt es sich um einen RIC-Vektor (restriction-independent-cloning) und bei dem pET-51-Vektor um einen LIC-Vektor (ligation-independent-cloning). Für die Klonierung in den pPAL-7-Vektor wurde dem Ansatz

dGTP, und für die Klonierung in den pET-51-Vektor wurde dATP hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei 12°C inkubiert und anschließend wurde die DNA-Polymerase für 20 Minuten bei 72°C inaktiviert.

T4-DNA-Polymerase-Ansatz: 0,2 - 0,3 pmol DNA; 1x Puffer (Fermentas);
2,5 mM entsprechendes dNTP; 1,5 U T4 DNA-
Polymerase (Fermentas); H₂O dd ad 20 µl

2.2.1.10 Einbringen in den Zielvektor

Für das Einfügen des nach der T4-DNA-Polymerase-Behandlung passenden Inserts in den Vektor pET-51 wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Für die Ligation der mit T4-DNA-Polymerase behandelten Inserts in den pPAL7-Vektor wurde eine T4-DNA-Ligase verwendet. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend für die Transformation in kompetente Zellen verwendet.

pPAL7 Vektor: 1x Ligationspuffer (Fermentas); 20 ng Vektor (Bio-Rad),
2,5 U T4 DNA-Ligase (Fermentas); T4-DNA-Polymerase-
Ansatz (15 - 25 ng DNA); H₂O dd ad 20 µl

2.2.1.11 Bakterienanzucht von *Escherichia coli*

Als Festmedium diente Standard-Nähragar (Merck, Darmstadt) und als Flüssigmedium LB-Medium (Sigma-Aldrich, Steinheim), die nach Herstellerangaben angesetzt wurden. Die Flüssigkulturen mit einem Volumen zwischen 3 und 4 ml wurden auf einem Brutschüttler bei 180 rpm und 37°C mindestens 16 Stunden inkubiert. Bei der Anzucht auf Festmedien wurde entsprechend ebenfalls bei 37°C und in der Regel über Nacht inkubiert. Steril filtriertes Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) wurde den Medien nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

2.2.1.12 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Die verwendeten Vektoren mit dem Insert wurden in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen NovaBlue GigaSingles™ zur Klonierung oder BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS (Novagen®) zur Expression transformiert. Zu 20 µl kompetenten Zellen wurden 2 µl Ligationsansatz gegeben. Der Ansatz wurde für 20 Minuten auf Eis gestellt für die Aufnahme der DNA in die kompetenten Zellen. Anschließend erfolgte für 50 Sekunden bei 42 °C ein Hitzeschock, damit sich die Zellen schlossen. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurde er in 950 µl SOC-Medium gegeben und für 60 Minuten bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

SOC-Medium: 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl (autoklaviert); 10 mM MgCl₂ (steril filtriert); 20 mM MgSO₄ (steril filtriert); 20 mM Glukose (steril filtriert)

Nach der Inkubation des Transformationsansatzes bei 37 °C wurde der Ansatz bei 3000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und 800 µl des Überstandes abgenommen und verworfen. Das Zellsediment wurde in dem restlichen SOC-Medium resuspendiert und vollständig auf einer Selektionsagarplatte ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C für mindestens 12 Stunden inkubiert.

2.2.1.13 Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation wurde das Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben verwendet und die DNA mit Wasser eluiert.

2.2.1.14 Kolonie-PCR

Zur Klonierungskontrolle wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurde zur PCR direkt Zellmaterial von einer Plattenkolonie eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde direkt in die PCR-Eppendorfgefäße gegeben, die jeweils das Zellmaterial aus den einzelnen Kolonien enthielten. Es wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl verwendet. Puffer, MgCl₂,

dNTPs und die Taq-Polymerase sind alle von demselben Hersteller (Fermentas, St. Leon-Roth). Das PCR-Programm entsprach dem für die PCR-Reaktionen, die der Klonierung dienen (Vergleiche 2.2.1.4).

PCR-Ansatz: 1x Taq-Puffer; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 1 µM jeder Primer;
 1,3 U Taq-Polymerase

2.2.1.15 Realtime-PCR

Für die Quantifizierung der Genexpression mittels RT-PCR wurde der iCycler MyIQ (Bio-Rad) verwendet. Als Fluoreszenzfarbstoff diente SYBR® Green (Bio-Rad). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Das Gesamtvolumen einer PCR-Reaktion betrug jeweils 50 µl. Die Konzentration der Primer im Reaktionsansatz betrug 300 mM. Für jede PCR-Reaktion wurden jeweils 8 µl cDNA, die aus 1 µg RNA gewonnen wurde (siehe Abschnitt 2.2.1.1), eingesetzt. Pro Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden mit dem mitgelieferten Programm "IQ™ Optical System Software" aufgenommen und teilausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der REST 2009 Software (Pfaffl *et al.*, 2002; Pfaffl, 2004). Diese statistische Methode bezieht die Normierung des Expressionsunterschiedes des Zielgens auf die Expressionsunterschiede des Referenzgens sowie die Amplifikationseffizienzen mit ein.

Als Referenzgen für den Versuch unter 24 Stunden Licht (Vgl. Abschnitt 3.4.3.1) diente Aktin. Das entsprechende Oligonukleotidpaar war dabei so gestaltet, dass es sich nicht nur spezifisch an eine Isoform des Aktins in Arabidopsis anlagert, sondern als Startpunkt für die Amplifizierung der Aktin-Isoformen 1, 4, 8, 11 und 12 dient. Für die Expressionsanalyse der DAHP-Synthasen in Wurzel und Spross (Vgl. Abschnitt 3.4.2) wurden die Gene At1g06530 und At5g20280 als Referenzgene getestet, da die Expressionswerte von Aktin in Wurzel und Spross nicht vergleichbar waren. Das Gen At5g20180 kodiert für eine putative Saccharosphosphat-Synthase und das Gen At1g06530 kodiert für ein Protein, das vermutlich mit Ubiquitin interagiert.

PCR-Programm:

Denaturierung:	5 Minuten 95 °C	
Denaturierung:	0,5 Minuten 95 °C	} 40 Zyklen
Hybridisierung:	0,5 Minuten $T_m - 5^\circ\text{C}$	
Amplifizierung:	0,5 Minuten 72 °C	
Terminale Amplifizierung:	5 Minuten 72 °C	

2.2.1.16 Southern Blot

Zunächst wurde mit der genomischen DNA aus 1 g gemörserten Pflanzenmaterial (Vgl. Abschnitt 2.2.1.2) ein Restriktionsverdau durchgeführt (Vgl. Abschnitt 2.2.1.8). Die Restriktionsansätze wurden auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 50 Volt für etwa 5 Stunden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in folgenden Schritten gewaschen:

- 1) 20 Minuten in 0,25 M HCl-Lösung
- 2) 2 x kurz in H₂O
- 3) 2 x 15 Minuten in Denaturierungslösung
- 4) 2 x 15 Minuten in Neutralisationslösung
- 5) 2 x kurz in H₂O
- 6) 10 Minuten in 10x SSC-Puffer

Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisationslösung:	1 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,4
10x SSC-Puffer:	1,5 M NaCl, 0,15 M Natriumcitrat, pH 7,0

Der Blot-Aufbau erfolgte nach Vorschrift mit dem Turboblotter (Schleicher & Schuell BioScience, Dassel) über Nacht in 10x SSC-Puffer. Es wurde eine Nylonmembran (Roche, Mannheim) verwendet. Danach wurde die DNA durch UV-Behandlung auf der Membran fixiert und die Membran in H₂O gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Hybridisierung erfolgte mit DIG-markierten Sonden (siehe unten). Vor der Prehybridisierung wurde die

Membran mit Methylblau angefärbt und mit 2x SSC-Puffer und H₂O entfärbt und der Größenmarker mit Bleistift markiert. Die Hybridisierung erfolgte in DIG Easy Hyb-Puffer (Roche) bei 50°C in einem Hybridisierungssofen. Nach einer Stunde Prehybridisierung wurde die denaturierte Digoxigenin-markierte Sonde direkt in die Hybridisierungslösung gegeben (40 ng/ml). So hybridisierte die Membran über Nacht bei 50°C. Am nächsten Morgen erfolgten die Post-Hybridisierungswaschschritte:

- 1) 2 x 5 Minuten in 2x SSC-Puffer und 0,1% (w/v) SDS bei 50°C
- 2) 2 x 15 Minuten in 0,5x SSC-Puffer und 0,1% (w/v) SDS bei 50°C

Die immunologische Detektion erfolgte mit dem DIG Wasch- und Blockierlösungs-Kit und einem alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin (Roche) nach Angaben des Herstellers. Die Inkubation mit dem Substrat CDP-Star (Roche) führt dabei zur Chemilumineszenz, welche mit dem System LAS-300 (Raytest, Straubenhardt) sichtbar gemacht wurde.

Methylblau: 0,02% (w/v) Methylblau, 0,3M Natriumacetat, pH 5,5

Zur Herstellung der Sonden zum Nachweis des Kanamycin-Resistenzgens wurde als Matrize der Expressionsvektor pKGWFS7 (Karimi *et al.*, 2002) verwendet. Die Herstellung erfolgte mittels PCR (Vgl. Abschnitt 2.2.1.4) mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche) nach den Angaben des Herstellers. Die Sondenaufreinigung erfolgte dann mit Amicon® Microcon® PCR Filter units (Milipore) ebenfalls nach den Angaben des Herstellers in ein Elutionsvolumen von 25 µl H₂O.

Reaktionsansatz: 15 ng DNA, 5,0 µl Dig-Puffer (Roche), 5,0 µl Dig-Mix (Roche)
0,5 µl jeder Primer (Vgl. Abschnitt 2.1.4), 0,7µl Enzym-Mix (Roche), ad 50 µl H₂O.

2.2.2 Expression und Isolierung von Proteinen

2.2.2.1 Induktion der Proteinexpression

Die Expression der Zielproteine wurde mit dem künstlichen Induktor Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die transformierten *E. coli*-Zellen BL21(DE3)pLysS (pET-51-Vektor) bzw. BL21(DE3) (pPAL-7-Vektor) wurden von einer Selektionsagarplatte in sechs Vorkulturen à 4 ml mit 100 μ g/ml Ampicilin überimpft.

Diese Kulturen wurden bei 150 rpm und 37°C für mindestens 12 Stunden inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden dann in 300 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und im Schikanekolben bei 37 °C und 150 rpm weiter inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,7 (Kontrolle im Photometer bei 600 nm) wurde die Überexpression mit IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5 mM (pET-51-Vektor) bzw. 1 mM (pPAL-7-Vektor) gestartet. Anschließend erfolgte die weitere Inkubation bei 37°C und 150 rpm für 3 Stunden. Danach wurde die Kultur in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 15000 *rev* zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Aufschluss der induzierten Bakterienzellen

Zum Aufschluss der Bakterienzellen mit dem enthaltenen pET-51-Vektor wurde das Pellet von 300 ml induzierter Bakterienkultur (Vgl. Abschnitt 2.2.2.1) auf Eis aufgetaut und in 6 ml Waschpuffer der Strep-Tactin-Säulen (IBA) mit 0,2 mM DTT resuspendiert. Dazu wurden 300 μ g Lysozym hinzugegeben und die Kultur für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall-Spitze (Vibracell 75186) in sechs Intervallen à 10 Sekunden mit einer Amplitude von 50%. Zwischen den Ultraschall-Intervallen wurde die Kultur für jeweils 10 Sekunden auf Eis gekühlt.

Für den Aufschluss der Bakterienzellen mit dem Vektor pPAL-7 wurde genauso verfahren. Nur wurde hier das Pellet von 150 ml induzierter Bakterienkultur mit 6 ml Waschpuffer resuspendiert (Waschpuffer des Kits „Profinity eXact“).

Waschpuffer „Strep-Tactin“: 1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0,
0,2 mM DTT

Waschpuffer „Profinity eXact“: 50 mM EPPS, 300 mM Natriumacetat, pH 7,0,
1 mM DTT

2.2.2.3 Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Säulen

Es wurden „1 ml Strep-Tactin Superflow H-PR cartridges“ (IBA) zur Aufreinigung des Proteins mit Strep-Tag verwendet. Die Puffer und das Bakterienlysate wurden unter gleichmäßigem Druck mit einer Spritze auf die Säule aufgetragen. Die Puffer hatten alle Raumtemperatur und es wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Die Eluate und das Bakterienlysate vor Säulenauftrag wurden stets auf Eis gelagert. Zunächst wurde die Säule mit 2 ml Waschpuffer (Strep-Tactin) equilibriert und anschließend das Bakterienlysate langsam über die Säule gegeben. Es folgten 5 Waschschrte mit jeweils 1 ml Waschpuffer. Danach folgte die Elution mit 3 ml des Elutionspuffers (Strep Tactin) und die Eluate wurden in 0,5 ml-Portionen aufgefangen und sofort aliquotiert bei -80°C eingefroren. Zur Regeneration der Säule wurden dann 15 ml Regenerationspuffer (Strep-Tactin) über die Säule gegeben und die Säule bis zur nächsten Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Waschpuffer „Strep-Tactin“: 1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,2 mM DTT,
pH 8,0

Elutionspuffer „Strep-Tactin“: 1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA,
25 mM Desthiobiotin, pH 8,0

Regenerationspuffer „Strep-Tactin“: 1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA,
10 mM HABA, pH 8,0

2.2.2.4 Proteinaufreinigung mittels Profinity eXact-Säulen

Es wurden „1 ml Bio-Scale Mini Profinity eXact Cartridges“ (Bio-Rad) zur Aufreinigung des Proteins mit Profinity eXact-Tag verwendet. Die Puffer und das Bakterienlysate wurden mit einer Spritze unter gleichmäßigem Druck auf die Säule aufgetragen. Die Puffer wurden vorher auf 4°C gekühlt und es wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Die Eluate und das

Bakterienlysat vor Säulenauftrag wurden stets auf Eis gelagert. Zunächst wurde die Säule mit 10 ml Waschpuffer (Profinity eXact) equilibriert und das Lysat langsam über die Säule gegeben. Dann wurden 1,5 ml Elutionspuffer (Profinity eXact) auf die Säule gegeben, die Eluate in 0,5 ml-Portionen aufgefangen, und die Säule für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden weitere 4,5 ml Elutionspuffer über die Säule gegeben und die Eluate erneut in 0,5 ml-Portionen aufgefangen. Die Eluate wurden sofort bei -80°C eingefroren. Nach der Elution wurde die Säule mit 5 ml Waschpuffer gespült und dann im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Mit dem vom Hersteller empfohlenen Elutionspuffer mit 100 mM Natriumfluorid konnte in den Enzymassays keine Aktivität der DAHP-Synthasen detektiert werden, so dass der Elutionspuffer wie angegeben modifiziert wurde.

Waschpuffer „Profinity eXact“: 50 mM EPPS, 300 mM Natriumacetat, pH 7,0,
1 mM DTT

Elutionspuffer „Profinity eXact“: 50 mM EPPS, 1 M Natriumformiat, pH 7,2,
150 mM KCl, 1 mM DTT

2.2.2.5 Gelelektrophorese von Proteinen: SDS Page nach Laemmli

Die Gelelektrophorese der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in der Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli. Es wurden ein 4,5%iges Sammelgel und 10%iges Trenngel verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel 1:2 mit Laufpuffer verdünnt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. In jede Geltasche wurden insgesamt 40 μl gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V.

Laufpuffer: 0,25 M Tris; 2 M Glycin; 2,5 % SDS; 1 % (w/v) SDS; pH 8,3

Sammelgel: 4,5%: 1,25 ml Monomerenmischung; 5 ml H_2O ; 2,1 ml Sammelgelpuffer;
50 μl 10%iges APS; 30 μl TEMED

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris HCl; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8

Trenngel: 10% : 6 ml Monomerenmischung; 7,5 ml H_2O ; 4,5 ml Trenngelpuffer;
120 μl 10%iges APS; 27 μl TEMED

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris HCl; 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8

2.2.2.6 Proteinfärbung mit Coomassie

Die Proteinfärbung mit Coomassie erfolgte für 20 Minuten unter Schwenken. Dann wurden die Gele in Entfärbelösung gegeben und unter Schwenken entfärbt bis die Hintergrundfärbung so stark reduziert war, dass die Proteinbanden scharf sichtbar wurden.

Färbelösung: 0,025 % Coomassie Brilliant Blue G-250; 45 % (v/v) Methanol;
10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

2.2.2.7 Western Blot

Der Blot wurde in der Blotapparatur Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Blot-Sandwich wurde luftblasenfrei zusammengesetzt und so in die Apparatur gegeben, dass die Nitrocellulosemembran zur Anode und das Gel zur Kathode ausgerichtet waren. Der Transfer fand für 1 Stunde bei 200 mA und 100 V in eisgekühltem Blottingpuffer statt. Um die transferierten Proteine anschließend sichtbar zu machen wurde eine Behandlung mit Antikörpern durchgeführt. Zunächst wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde in Blockierlösung inkubiert, um durch diese Absättigung eine spätere unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Der Primärantikörper (Anti-DAHPS, Vgl. Abschnitt 2.1.3) wurde 1:20000 in Blockierlösung eingesetzt und ist spezifisch gegen das Protein „DAHPS“ gerichtet. Nach viermaligem Waschen der Membran für jeweils 5 Minuten mit 1x TBS-Puffer (s.u.), erfolgte für eine Stunde die Inkubation mit einem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Guinea Pig) ebenfalls 1:20000 in Blockierlösung verdünnt. Danach folgten erneut vier Waschschrte wie nach der ersten Antikörperbehandlung und dann ein kurzes Schwenken in dem Alkalische-Phosphatase-Puffer zum Equilibrieren. Anschließend wurden die Antikörper mit Hilfe der Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (NBT/BCIP)- Färbung sichtbar gemacht.

Waschschritte:

- 1) 5 Minuten 1x TBS-Puffer
- 2) 5 Minuten TBS-Tween-Puffer
- 3) 5 Minuten TBS-Tween-Puffer
- 4) 5 Minuten 1x TBS-Puffer

Alkalische-Phosphatase-Puffer:	100 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; pH 9,5
BCIP:	50 mg/ml in 100% Dimethylformamid
Blockierlösung:	8 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBS-Puffer
Blottingpuffer:	25 mM Tris; 190 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol
NBT:	50 mg/ml in 70% (v/v) Dimethylformamid
10x TBS-Puffer:	200 mM Tris; 1,4 M NaCl; pH 7,6
TBS-Tween-Puffer:	0,05 % (v/v) Tween-20 in 1x TBS-Puffer

2.2.2.8 Enterokinasebehandlung

Die Entfernung des Strep-Tags am N-Terminus des aufgereinigten Enzyms (pET-51-Vektor) erfolgte nach Herstellerangaben mit einer rekombinanten Enterokinase (Novage®). Dabei wurden verschiedenen Konzentrationen Enzym und Enterokinase verwendet. Auch die Inkubationstemperatur und -zeit wurden variiert (Raumtemperatur und 4°C; 2-20 Stunden).

Reaktionsansatz: 1x rEK Cleavage-Puffer (Novagen)
 20 -50 µg aufgereinigtes Enzym (mit Strep-Tag)
 0,001 U – 1 U Enterokinase (in 1x rEK Dilution-Puffer; Novagen)
 ad 50 µl Aqua dest.

2.2.3 Proteincharakterisierung

2.2.3.1 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten für PEP

Da der Extinktionskoeffizient von Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängig ist von pH-Wert und zweiwertigen Kationen (Schofield *et al.*, 2003), wurde der Extinktionskoeffizient entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz für jeden verwendeten Puffer photometrisch bestimmt. Die Messungen erfolgten im Synergy2 in UV-transparenten 96 well-Platten. Es wurde für jeden Puffer eine Eichkurve mit unterschiedlichen Konzentrationen PEP (2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM und 0,125 mM) bei einer Wellenlänge von 232 nm erstellt. Nach Abzug des Nullwertes (jeweiliger Puffer ohne PEP) wurde die Extinktion gegen die PEP-Konzentration graphisch aufgetragen und aus der Steigung der erhaltenen Geraden wurde der jeweilige Extinktionskoeffizient ermittelt. Es wurde stets eine Dreifachmessung durchgeführt und der Mittelwert für die späteren Messungen verwendet.

2.2.3.2 Umpuffern des Enzyms mittels Micro Bio-Spin-Säulen®

Für das Umpuffern des in Elutionspuffer (Strep-Tag) vorliegenden Zielproteins in einen Puffer ohne DTT wurden Bio-Gel P-6 Säulen in Tris-Puffer (Bio-Rad) verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Das Protein wurde in Standardreaktionspuffer (Vgl. Abschnitt 2.2.3.3) ohne DTT und E4P umpuffert. Es wurde dabei zu Beginn jeweils 50 µl Enzymlösung auf die Säule aufgetragen.

2.2.3.3 DAHP-Synthase Aktivitätstest

Bei diesem Test wird die Abnahme des Substrates PEP ermittelt. Da PEP jedoch bei vielen enzymatischen Reaktionen in der Pflanze verbraucht wird, kann dieser Assay nur für gereinigtes Protein verwendet werden. Die Messung der PEP-Abnahme erfolgte photometrisch bei 232 nm im Synergy2. Der Extinktionskoeffizient von PEP wurde für die verwendeten Puffer jeweils neu bestimmt (Vgl. Abschnitt 2.2.3.1). 1 U der DAHPS-Aktivität ist über die Abnahme von 1 µmol PEP pro Minute definiert. Die Messung erfolgte kontinuierlich in UV-

transparenten 96 well plates und das Probenvolumen betrug für jeden Assay jeweils 100 µl. Die Reaktion wurde mit der Zugabe des Substrates Erythrose-4-Phosphat gestartet und die Messung erfolgte standardmäßig bei Raumtemperatur. Es wurden für jeden Assay 1,08 µg Enzym eingesetzt. Die Abnahme der Extinktion wurde sofort nach Start der Reaktion für 2 Minuten aufgezeichnet und für die Berechnung der Enzymaktivität wurde die Extinktionsänderung in der ersten Minute herangezogen.

Für die Messung der Aktivität bei verschiedenen pH-Werten wurde in dem pH-Bereich von 5,5 bis 7,0 der MES-Puffer mit dem jeweiligen pH-Wert eingesetzt. Im pH-Bereich von 7,0 bis 8,5 wurde im Standardreaktionspuffer gemessen.

Bei der Bestimmung des Einflusses der verschiedenen zweiwertigen Kationen auf die Aktivität des Enzyms wurde als Kontrollpuffer der Standardpuffer ohne MnCl₂ verwendet.

Bei der Variation der Konzentrationen eines der Substrate wurde das andere Substrat jeweils konstant auf seiner Standardkonzentration (E4P 3mM, PEP 1mM) gehalten.

Für die Messung der Aktivität bei verschiedenen Temperaturen wurde der Standardreaktionspuffer verwendet und der pH-Wert von 7,0 bei der jeweiligen Temperatur eingestellt.

Für die Messung der Aktivität des Enzyms unter verschiedenen DTT-Konzentrationen wurde das aufgereinigte Enzym zunächst umgepuffert (vergleiche 2.2.3.2), um das DTT aus dem Elutionspuffer zu entfernen.

Für die Messung der Enzymaktivität unter dem Einfluss von Thioredoxin aus *Spirulina* sp. (Sigma-Aldrich) wurde das Thioredoxin in Waschpuffer (Strep-Tactin) mit einer DTT-Konzentration von 10 mM gelöst. Das Thioredoxin wurde dann dem Enzym-Reaktionsansatz in der jeweiligen Konzentration hinzugefügt und das Enzym und das Thioredoxin für 5 Minuten zusammen inkubiert bevor die Reaktion gestartet wurde.

Standardreaktionspuffer: 50 mM EPPS; 0,2 mM DTT; 0,5 mM MnCl₂; 1 mM PEP;
3 mM E4P; pH 7,0

MES-Puffer: 50 mM MES; 0,2 mM DTT; 0,5 mM MnCl₂; 1 mM PEP;
3 mM E4P; pH 7,0

2.2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinmessung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Als Proteinstandard für die Eichung wurde Rinder-Serum-Albumin verwendet. Nach Zugabe des Bradford-Reagenz, das zuvor 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt und durch einen Faltenfilter gefiltert wurde, wurden die Proben für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm im Photometer. Es wurden jeweils Dreifachproben angefertigt.

Proteinprobe: 1250 µl Bradford-Reagenz + 25 µl Proteinprobe

Nullprobe: 1250 µl Bradford-Reagenz + 25 µl Elutionspuffer (vgl. 2.2.2.3 und 2.2.2.4)

2.2.4 Metabolitenanalyse

2.2.4.1 HPLC

Für die Analyse des Aminosäuregehalts wurde eine wässrige Extraktion aus gemörserten Sprossmaterial vorgenommen. Es wurden etwa 200 mg Pflanzenmaterial in einen Mörser gegeben und mit 200 µl Aqua dest. für 1,5 Minuten gemörsert. Anschließend wurde das Pistill mit 100 µl Aqua dest. gespült und die Lösung und der Inhalt des Mörsers in ein Eppendorfgesäß überführt. Es folgte die Inkubation für 10 Minuten bei 95°C und das anschließende Abkühlen auf Eis. Dann wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Acrodisc® GHP Spritzenvorsatzfiltern (VWR, Darmstadt) filtriert und mittels HPLC analysiert.

Die Aminosäuregehalte wurden über die Derivatisierung mit Orthophthalaldehyd (OPA) bestimmt. Es wurde mit einem diskontinuierlichen binären Gradienten (s.u.) bei 40°C auf einem HPLC-System (VWR, Darmstadt) aufgetrennt. Die Derivate wurden bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm mit einem

Hitachi L-2485 Fluoreszenzdetektor (VWR, Darmstadt) detektiert und mit dem Programm EZ Chrom Elite™ Chromatography Data System quantifiziert.

Säule:	Lichrospher 100 RP 18-5 EC 125 mm x 4 mm (CS-Chromatografie,Langerwehe)
Vorsäule:	Lichrospher 100 RP 18-5 EC 40 mm x 4 mm (CS-Chromatografie,Langerwehe)
Laufmittel A:	50mM Natriumacetatpuffer/ pH 6,8 mit 50 mM Phosphorsäure, 1,5% Tetrahydrofuran
Laufmittel B:	97 % Methanol, 3 % Tetrahydrofuran
Flussrate:	1 ml/min
Pumpe:	L-2130 (VWR, Darmstadt)
Gradient:	0 Min. 100% A; 12,5 Min. 85% A und 15% B; 65 Min. 50% A und 50% B; 75 Min. 30% A und 70% B; 80 Min. 100% B; 82 Min. 90% A und 10% B; 85 Min. 100% A
Injektion:	10 µl
Sandwich:	4,5 µl OPA + 1 µl Probe + 4,5 µl OPA
Säulenofen:	Hitachi Column Oven L-2300 (VWR, Darmstadt)
Probengeber:	Autosampler Multipurpose Sampler (Gerstel, Mülheim)
Software Autosampler:	Maestro

2.2.4.2 Phenolbestimmung

Die Phenolbestimmung erfolgte modifiziert nach einer Methode von Singleton (Singleton *et al.*, 1999). Für die Bestimmung des Phenolgehalts wurden jeweils 50 mg gemörsertes Pflanzenmaterial in einen gekühlten Mörser mit ca. 70 mg Seesand (Merck) gegeben. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 500 µl gekühltem Methanol (95%) und der Inhalt wurde für 1 Minute mit mäßigem Druck gemörsert. Danach wurde das Pistill mit 3 x 500 µl gekühltem Methanol abgespült und die Lösung und der Inhalt der Mörsers in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Dann erfolgte für 5 Minuten die Zentrifugation bei 13000 rpm.

100 μl des Überstands wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 200 μl Folin-Ciocalteu-Reagenz (1:10 verdünnt) hinzugegeben. Nach gutem Mischen folgte die Inkubation für 2 Stunden in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Danach wurde die Probe für 7 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert, um das Präzipitat am Boden des Reaktionsgefäßes zu fixieren. Die photometrische Messung erfolgte bei 765 nm in 1 cm Polystyrol-Küvetten. Die Lichtabsorption bei dieser Wellenlänge ist proportional zu der Konzentration der Phenole. Als Blank diente 95% Methanol. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als Eichlösung diente Gallussäure in 95% Methanol und der lineare Bereich lag zwischen 100 und 1000 μM .

2.2.4.3 Ammoniumbestimmung

Der Gehalt an Ammoniumionen wurde mittels Ammonium Küvetten-Test „LCK 304“ der Firma HACH LANGE (Düsseldorf) bestimmt. Es wurden jeweils 100 mg gemörsertes Blattmaterial mit 1 ml H_2O für 3 Minuten gemörsert und dann für 15 Minuten bei 14000 rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde in dem Küvetten-Test eingesetzt der Ammoniumgehalt mit dem DR 5000 UV/VIS Spektralphotometer (HACH LANGE) bestimmt. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.2.5. Pflanzenanzucht

2.2.5.1 Anzucht auf Erde

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in Einheitserde des Typs ED73 (Einheitserde Werkverband e.V.) unter Standardbedingungen bei 8 Stunden Licht und 16 Stunden Dunkelheit. Die Temperatur betrug während der Belichtung 22°C und in Dunkelheit 18°C . Die relative Luftfeuchte lag im Licht bei 50% und in Dunkelheit bei 60%. Die Aussaat erfolgte in Aussaatschalen und nach 7 Tagen wurden die Keimlinge in Töpfe der Größe 8 cm x 8 cm pikiert und 5-6 Wochen unter ausreichender Wasserversorgung weiter kultiviert. Die Lichtintensität betrug 100 bis 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Zur Ernte wurde der Spross mit

einem Skalpell von der Wurzel getrennt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Pflanzenmaterial wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Für die verschiedenen Stressbehandlungen (kontinuierlich 5°C Kälte, kontinuierlich 10°C Kälte, Dauerlicht, Hochlicht mit 600-700 μE) wurden nur die Temperatur- bzw. Lichtparameter entsprechend verändert. Die Pflanzen unter Salzstress wurden statt mit Leitungswasser mit einer 300 mM NaCl-Lösung gegossen. Die Anzucht der Pflanzen auf Nullerde erfolgte wie oben beschrieben. Nur wurde hier statt der Erde des Typs ED73 Nullerde (Einheitserde Werkverband e.V.) verwendet.

2.2.5.2 Anzucht auf Sand

Die Pflanzen für die Expressionsanalyse der DAHP-Synthasen in Wurzel und Spross wurden auf Sand angezogen. Die Anzucht erfolgte in gewaschenem Quarzsand bei 8 Stunden Licht und 16 Stunden Dunkelheit. Die Temperatur betrug während der Belichtung 22°C und in Dunkelheit 18°C. Die relative Luftfeuchte lag im Licht bei 50% und in Dunkelheit bei 60%. Die Aussaat erfolgte in Aussaatschalen und nach etwa 7 Tagen wurden die Keimlinge in Töpfe der Größe 8 cm x 8 cm pikiert und 4 Wochen weiter kultiviert. Die Lichtintensität betrug 100 bis 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Pflanzen wurden mit 0,1%iger Nährlösung Hakaphos® blau 15+10+15+(2) (Compo) versorgt. Zur Ernte wurden die Pflanzen mit den Wurzeln mit Wasser vorsichtig aus dem Sand gelöst und der Sand abgewaschen. Dann wurden Spross und Wurzel mit einem Skalpell getrennt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Pflanzenmaterial wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.5.3 Anzucht auf Hoagland-Agarplatten

Die Platten wurden mit einer 1/3 Hoagland-Lösung (Hoagland und Arnon, 1950) und 1% (w/w) Agar hergestellt. Die Bestandteile der Hoagland-Lösung sind unten dargestellt. Diese Lösung wurde 1:3 verdünnt eingesetzt. Agar und Hoagland-Lösung wurden zusammen für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert und die Platten nach Abkühlen auf etwa 50°C gegossen.

1/1 Hoagland-Lösung:

Makroelemente:

KNO ₃	5 mM
Ca(NO) ₂	5 mM
MgSO ₄	2 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM

Mikroelemente:

MnCl ₂	0,010 mM
CuSO ₄	0,001 mM
ZnSO ₄	0,001 mM
ZnSO ₄	0,050 mM
Fe-EDTA-Komplex	0,175 mM FeSO ₄ 0,090 mM EDTA

Vor dem Auslegen auf den sterilen Agarplatten erfolgte eine Oberflächensterilisation der Arabidopsis-Samen. Die Samen wurden für 3 Minuten in 70% Ethanol und 10 Minuten in Natriumhypochlorit-Lösung (0,5% NaOCl, 0,2% Tween 20) gespült. Anschließend wurden die Samen mehrfach mit sterilisiertem Wasser gewaschen und mit einer Pipette einzeln in den Agar gesetzt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte dann unter denselben Temperatur- und Lichtbedingungen wie unter 2.2.5.1 und 2.2.5.2 beschrieben.

2.2.6 GROWSCREEN

Zur Bestimmung der relativen Wachstumsrate wurde der GROWSCREEN (Walter et al., 2007) eingesetzt. Dieses nicht-invasive Verfahren dient der Bestimmung der projizierten Pflanzenfläche von Rosettenpflanzen. Dabei fährt eine in x- und y-Richtung bewegliche Kamera automatisch über eine Pflanzenpopulation in diesem Fall in jeweils 8 cm x 8 cm großen Töpfen und macht von jeder einzelnen Pflanze eine Farbaufnahme. Mittels einer Farbsegmentierung wird der Bildanteil extrahiert, der die Pflanze darstellt, und man erhält eine Binärmaske der Pflanze. Durch Zählen der Pixel wird dann die projizierte Pflanzenfläche bestimmt. Am 19. Tag nach Aussaat der Pflanzen wurden die ersten Aufnahmen der Pflanzen gemacht. Dann folgten ab Tag 25 alle 1-3 Tage erneute Aufnahmen der Pflanzen um den Wachstumsverlauf zu analysieren. Dies geschah bis zum 40. Tag nach Aussaat.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Überexpression

Durch das Arabidopsis Genom Projekt und entsprechende Homologievergleiche sind Sequenzen für drei putative DAHP-Synthasen in Arabidopsis identifiziert worden (Herrmann und Weaver, 1999). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die drei identifizierten Leseraster heterolog in *E. coli* zu exprimieren und die Enzyme biochemisch zu charakterisieren. Dazu war es zunächst nötig, das offene Leseraster für die jeweils reife Form des Enzyms ohne die putative Chloroplasten-Importsequenz in den Zielvektor zu klonieren. Alle drei Enzyme weisen am N-terminalen Ende eine solche Importsequenz auf. Die anzunehmenden Schnittstellen des Importsignals konnten mit Hilfe des Programms ChloroP 1.1 ermittelt werden (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>; Emanuelsson *et al.*, 1999).

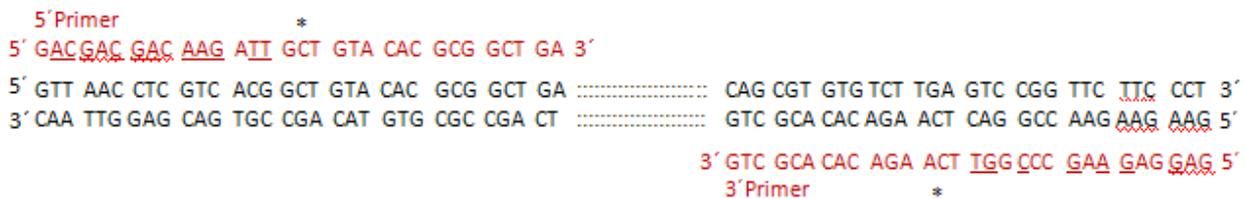
Als Expressionsvektor dienten der pET-51-Vektor (Novagen®) und der pPAL7-Vektor (Bio-Rad). Der pET-51-Vektor trägt N-terminal eine kodierende Sequenz für den Strep Tag II und darauf folgend eine Erkennungsstelle für eine Enterokinase. Diese soll ein späteres Entfernen des Tags möglich machen. Der pPAL7-Vektor kodiert N-terminal für den 75 Aminosäure langen Profinity eXact™ Tag, der die Möglichkeit bietet den Tag bereits auf der Affinitäts-säule während des Prozesses der Proteinaufreinigung vom Zielprotein zu entfernen. Eine auf der Affinitätssäule immobilisierte Subtilisin-Protease erkennt und bindet den Tag. Dann spaltet sie nach Veränderung der Pufferbedingungen das Zielprotein an der Spalterkennungssequenz ab, welches daraufhin eluiert wird. Einen Überblick über die Elemente und Schnittstellen in den Vektoren geben die Abbildungen 49 und 50 im Anhang. Mit Hilfe entsprechend abgeleiteter Oligonukleotide konnten alle drei cDNAs amplifiziert werden. Die fehlerfreie Amplifikation der Sequenzen wurde durch die Sequenzierung beider Stränge (MWG Biotech, Martinsried) verifiziert.

3.1.1 Klonierung

Bei beiden verwendeten Vektorsystemen handelt es sich um LIC (ligation independent cloning) Vektoren. Hier soll ein detaillierter Überblick über die Klonierung in den pET-51 Vektor gegeben werden. Die Klonierung in das andere System funktionierte nach demselben

Prinzip und wird daher nur kurz behandelt. Für die Klonierung in den pET-51 Vektor wurde mittels PCR und geeigneten Oligonukleotiden (Vgl. Abb.3 und Abschnitte 2.1.4 und 2.2.1) die Zielsequenz an beiden Enden jeweils mit 15 zusätzlichen spezifischen Basenpaaren versehen. Nach der PCR wurden dann die DNA-Doppelstränge mit einer T4-DNA-Polymerase unter Zusatz von Desoxyadenosintriphosphat (dATP) behandelt, so dass beide ohne weiteren Ligationsschritt komplementär binden können (Abb.3).

A



B



C

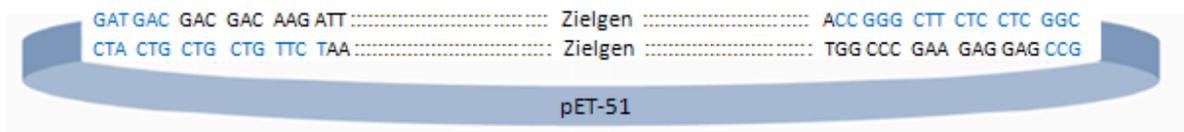


Abb.3 Klonierung der Zielsequenz in den pET-51 EK-LIC Vektor am Beispiel der DAHP-Synthase 1

A: Primerhybridisierung mit der Zielsequenz. Der Ausschnitt aus der DAHPS1-Sequenz ist in schwarz dargestellt. * markiert hier das erste und letzte zu exprimierende Codon. Die in diesem Beispiel eingesetzten Primer sind in rot dargestellt. Unterstrichene Basen zeigen eine Fehlerpaarung zur Zielsequenz. **B: T4-DNA-Polymerase-Behandlung.** PCR-Produkt der in A dargestellten Primer und Templates. Die Erkennungsstelle für die Enterokinase ist blau markiert. Die grau unterlegten Basen werden von der T4-DNA-Polymerase aufgrund ihrer Exonukleaseaktivität entfernt. **C: Einfügen des Inserts in den Zielvektor.** Die Vektorsequenz ist in blau, und die Zielsequenz in schwarz dargestellt.

Somit erhält man nach der Überexpression die reife Form der jeweiligen DAHP-Synthase mit drei zusätzlichen Elementen am N-Terminus: dem aus 8 Aminosäuren bestehenden Strep-Tag II, der daran anschließenden Erkennungssequenz für die Enterokinase und einer zusätzlichen Aminosäure, die für die Klonierung eingefügt werden muss. Im Falle der DAHP-Synthase 1

handelt es sich bei der letzteren um Isoleucin. Eine Proteinaufreinigung mit diesem System liefert also zunächst das Zielprotein mit einer N-terminalen Verlängerung von 14 Aminosäuren. Schneidet man anschließend das Produkt dieser Aufreinigung mit der Enterokinase, so erhält man das Zielprotein mit nur einer zusätzlichen Aminosäure am N-Terminus.

Die Klonierung in den pPAL7 Vektor erfolgte nach einem ähnlichen Prinzip. Um eine komplementäre Sequenz zur Vektorsequenz zu erhalten generierte man auch hier definierte 5'-Einzelstrangüberhänge am PCR-Produkt mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase. Der Profinity eXact™ Tag umfasst insgesamt 228 Basen, wovon die letzten 27 Basen für die Erkennungsequenz der Schnittstelle der Subtilisin-Protease kodieren. Da in diesem Aufreinigungssystem bereits während der Aufreinigung Tag-freies Protein gewonnen wird und die Sequenz des Zielproteins direkt auf die Schnittstelle der Protease folgt, erhält man hier als Produkt das Zielprotein ohne zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus.

3.1.2 Optimierung der Überexpression

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3)pLysS wurde mit den pET-51-Expressionskonstrukten transformiert. Um die optimale Kultivierungsdauer nach Induktion mit IPTG zu ermitteln, wurde der Gehalt der Bakterienkultur an Zielprotein zu verschiedenen Zeitpunkten getestet. In der Zelle kann das Zielprotein als lösliches Protein oder eingeschlossen in „inclusion bodies“ vorliegen. Daher wurde bei der Analyse der Proben zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen dem löslichen und dem unlöslichen Anteil unterschieden.

In Abbildung 4 ist diese Analyse am Beispiel der DAHP-Synthase 3 im Western Blot dargestellt. Man sieht deutlich eine Induktion der Expression. Nach drei Stunden ist bereits eine erhebliche Menge der DAHP-Synthase in der löslichen Fraktion zu finden. Der Anteil der DAHP-Synthase in der unlöslichen Fraktion ist zu allen Zeitpunkten nach Induktion recht hoch und gleichbleibend. Doch da die Konzentration des Zielproteins bereits nach drei Stunden ausreichend hoch war und sich auch nach weiteren 1,5 Stunden nicht mehr steigern ließ, wurde diese Inkubationsdauer auch für die folgenden Inkubationen gewählt. Bei den anderen zwei Isoformen wurden auf dieselbe Weise verfahren, da auch sie nach drei Stunden bereits eine ausreichende Menge Zielprotein in der löslichen Zellfraktion aufwiesen.

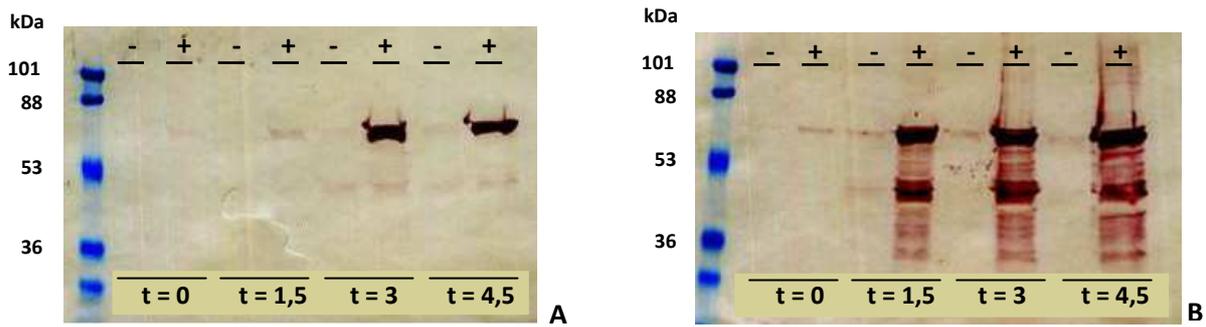


Abb.4 Die Induktion der DAHP-Synthase 3 in *E. coli* im pET-51 System. Es wurden Proben vor der Induktion ($t = 0$) und 1,5 Stunden, 3 Stunden und 4,5 Stunden nach Induktion entnommen. Nach der Zentrifugation wurden sowohl der Überstand (lösliche Fraktion) als auch das Pellet (unlösliche Fraktion) aufgeschlossen und im Western Blot dargestellt. Die Induktion erfolgte mit 0,5 mM IPTG (+). Eine Bakterienkultur ohne Induktion durch IPTG diente als Kontrolle (-). A: lösliche Fraktion. B: unlösliche Fraktion. Die Detektion der DAHP-Synthase erfolgte mit Antikörpern gegen die DAHP-Synthase (Vgl. Abschnitt 2.1.3).

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) wurde mit den pPAL7-Expressionskonstrukten transformiert. Auch hier ergab sich eine optimale Kultivierungsdauer von drei Stunden nach der Induktion mit IPTG (Abb.5). In der löslichen Fraktion ist die Menge an Zielprotein nach 4,5 Stunden etwa dieselbe wie nach drei Stunden. Die Menge an Zielprotein in der unlöslichen Fraktion hingegen steigt nach 4,5 Stunden nochmals an, so dass die zusätzlich exprimierte Menge an Zielprotein bei einer längeren Inkubationszeit als drei Stunden vermutlich in „inclusion bodies“ vorliegt und für eine Proteinaufreinigung nicht nutzbar ist.

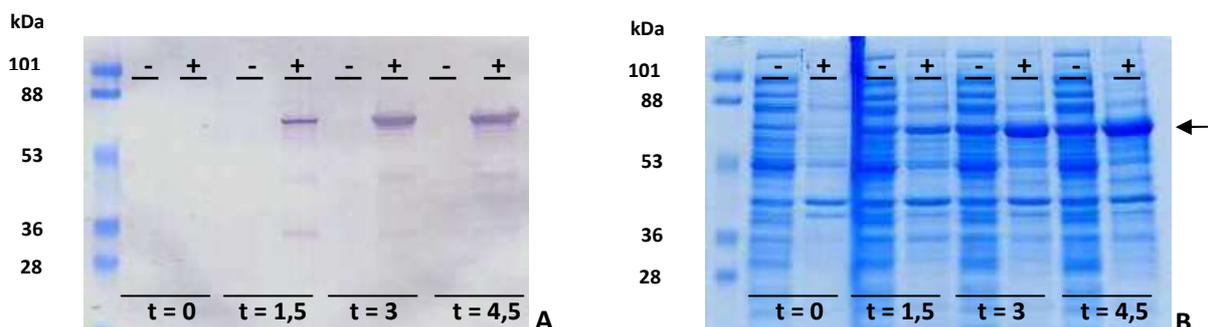


Abb.5 Die Induktion der DAHP-Synthase 2 in *E. coli* im pPAL7 System. Es wurden Proben vor der Induktion ($t = 0$) und 1,5 Stunden, 3 Stunden und 4,5 Stunden nach Induktion entnommen. Nach der Zentrifugation wurden der Überstand (lösliche Fraktion) als auch das Pellet (unlösliche Fraktion) aufgeschlossen. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG (+). Eine Bakterienkultur ohne Induktion durch IPTG diente als Kontrolle (-). A: lösliche Fraktion im Western Blot. B: unlösliche Fraktion im SDS-Gel; Der Pfeil markiert die Laufhöhe der DAHP-Synthase. Die Detektion der DAHP-Synthase im Western Blot erfolgte mit Antikörpern gegen die DAHP-Synthase (Vgl. Abschnitt 2.1.3).

3.2 Proteinaufreinigung

3.2.1 Vektor pET-51 (Strep Tag)

Die Proteinaufreinigung der Proteine mit Strep Tag erfolgte über StrepTactin-Säulen. Der Erfolg der Aufreinigung und die Reinheit des Proteins wurden sowohl mittels SDS-Gelelektrophorese als auch mittels Western Blot überprüft. Alle Isoformen ließen sich nahezu bis zur Homogenität aufreinigen (Abb.6).

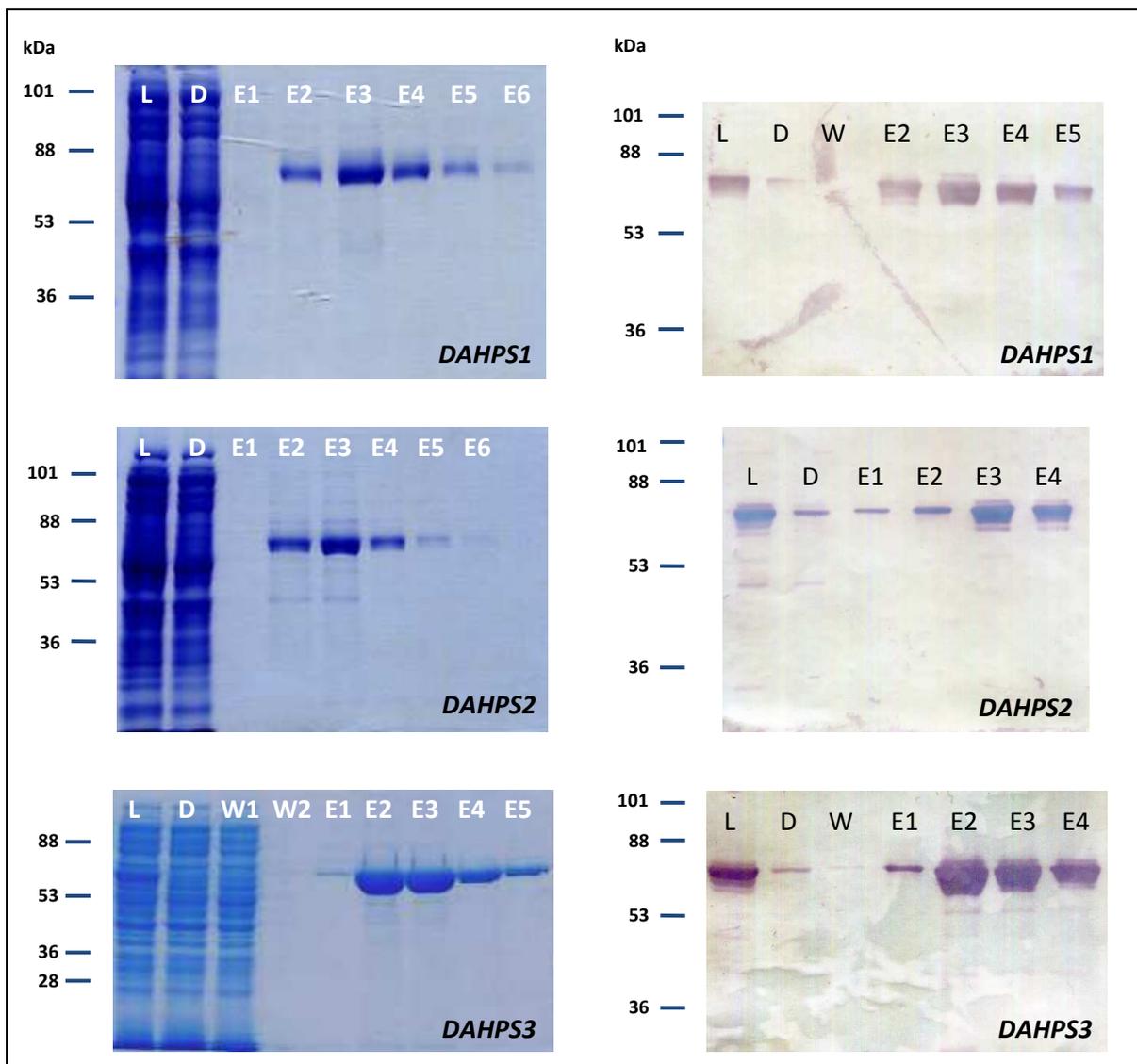


Abb.6 Die drei DAHP-Synthasen nach der Aufreinigung über StrepTactin-Säulen. Dargestellt sind die einzelnen Aufreinigungsschritte im SDS-Gel (links) und im Western Blot (rechts). Die SDS-Gele wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. SDS-Gele und Western Blots zeigen jeweils die Ergebnisse unterschiedlicher Aufreinigungen. Die Detektion der DAHP-Synthasen im Western Blot erfolgte mit Antikörpern gegen die DAHP-Synthase (Vgl. Abschnitt 2.1.3). L: Lysat D: Durchfluss W: Waschfraktion E: Eluate

Die Ausbeute an löslichem Zielprotein aus dem Gesamtprotein im aufgeschlossenen Bakterienlysat bewegte sich zwischen 3 und 5 %. In Tabelle 1 ist exemplarisch eine detaillierte Aufstellung der Proteingehalte in Lysat und in den einzelnen Eluaten am Beispiel der DAHP-Synthase 3 aus drei verschiedenen Aufreinigungen dargestellt. Für alle drei DAHP-Synthasen lag die Gesamtausbeute an Zielprotein in einer einzelnen Proteinaufreinigung jeweils bei 1 - 2 mg Zielprotein.

Tab.1 Proteingehalte in den einzelnen Fraktionen nach Aufreinigung der DAHP-Synthase 3. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford. Hier sind exemplarisch die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Aufreinigungen gezeigt. Lysat: 6 ml Bakterienextrakt nach Ultraschall- und Lysozymbehandlung; Eluate: jeweils 0,5 ml von der Affinitätssäule eluiertes Zielprotein.

DAHPS 3	Proteinkonzentration (mg/ml)						Ausbeute Gesamt
	Lysat	Eluat 1	Eluat 2	Eluat	Eluat 4	Eluat 5	[mg]
1	4,86	-	1,51	1,28	0,38	0,15	1,66
2	6,80	0,05	1,14	1,24	0,43	0,20	1,53
3	6,41	-	0,97	1,05	0,3	0,12	1,22

3.2.2 Entfernen des Strep Tags mit einer Enterokinase

Der pET-51-Vektor ist so konzipiert, dass eine Erkennungsstelle für eine rekombinante Enterokinase zwischen der Sequenz für den Strep Tag und der Zielsequenz eingebaut wird (Vgl. Abschnitt 3.1.1). Diese Erkennungsstelle soll ein Entfernen des Tags mit Hilfe der entsprechenden Serinprotease nach der Aufreinigung ermöglichen. Das Entfernen des Tags war jedoch nur mit dem Verlust von Enzymaktivität möglich. Eine spätere Analyse mittels Western Blot zeigte, dass die Serinprotease durch unspezifisches Schneiden das Zielprotein in mehrere Einzelfragmente teilte und somit zum Aktivitätsverlust der DAHP-Synthase führte.

Trotz Variation der Konzentrationen von Enterokinase und Zielenzym, sowie der Inkubationstemperaturen und -zeiten arbeitete die Enterokinase stets unspezifisch und das Ergebnis war ein deletiertes, nicht funktionsfähiges Enzym. In Abbildung 7A ist dargestellt, dass die Enterokinase den Strep Tag entfernt, jedoch auch die DAHP-Synthase unspezifisch an einigen Stellen schneidet, so dass viele Fragmente der DAHP-Synthase entstehen. Daraufhin wurde die Menge der eingesetzten Enterokinase nochmal heruntersetzt um dieses

unspezifische Schneiden zu vermeiden oder zu reduzieren (Abb.7B). Doch bei sehr niedrigen Konzentrationen der Serinprotease zeigte sich gar keine Proteaseaktivität mehr.

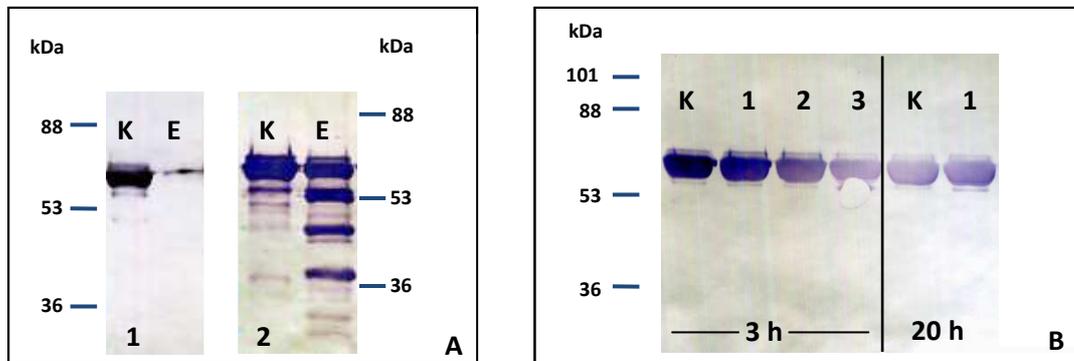


Abb.7 Behandlung der gereinigten DAHP-Synthasen mit Enterokinase um den StrepTag II zu entfernen. **A:** Behandlung von 20 μ g DAHP-Synthase-2 mit 0,5 U Enterokinase für 2 Stunden bei Raumtemperatur. **A1:** Westernblot mit Antikörpern gegen Strep Tag II; **A2:** Westernblot mit Antikörpern gegen die DAHP-Synthase. **B:** Behandlung von 30 μ g DAHP-Synthase-3 mit 0,001U (1), 0,01U (2) und 0,1U (3) Enterokinase. Die Proben wurden 3 bzw. 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen den Strep Tag II durchgeführt. Alle Kontrollen (**A** und **B**) wurden ohne Enterokinase, aber ansonsten unter denselben Bedingungen wie die anderen Proben behandelt. K: Kontrolle; E: mit Enterokinase behandelte Probe.

3.2.3 Vektor pPAL-7 (High Profinity eXact Tag)

Da sich das Entfernen des Strep Tags II in dem pET-51-Vektor-System als problematisch erwies, wurde ein weiterer Vektor eingesetzt: der pPAL-7 Vektor. In diesem System wird der Tag direkt auf der Affinitätssäule durch Veränderung der Pufferbedingungen vom Zielprotein entfernt. Fluorid-Ionen im Elutionspuffer wirken am effektivsten beim Anregen der Aktivität der Subtilisin-Protease. Mit dem vom Hersteller empfohlenen Elutionspuffer mit Natriumfluorid konnte zwar reines und geschnittenes Protein gewonnen werden, dieses zeigte jedoch nur wenig oder gar keine Aktivität mehr nach der Aufreinigung. Da neben Fluorid-Ionen auch Chlorid-Ionen die Aktivität der Protease anregen, wurde ein Elutionspuffer mit Kaliumchlorid entwickelt (Vgl. Abschnitt 2.2.2.4). Abbildung 8 zeigt das Ergebnis einer Aufreinigung mit diesem Puffer am Beispiel der DAHP-Synthase 1. Im Western Blot (B) ist

sehr deutlich der Größenunterschied zwischen dem Enzym mit Tag in Lysat und Durchfluss und dem Enzym ohne Tag in den Elutionsfraktionen zu erkennen. Man sieht hier eine nahezu homogene Aufreinigung. Im Western Blot ist in den Elutionsfraktionen nur eine kleine zusätzliche Bande kurz unterhalb der Laufhöhe der DAHP-Synthase zu erkennen. Da sie von dem Antikörper gegen die DAHP-Synthase erkannt wird, scheint es sich um ein etwas kleineres Fragment des Enzyms zu handeln.

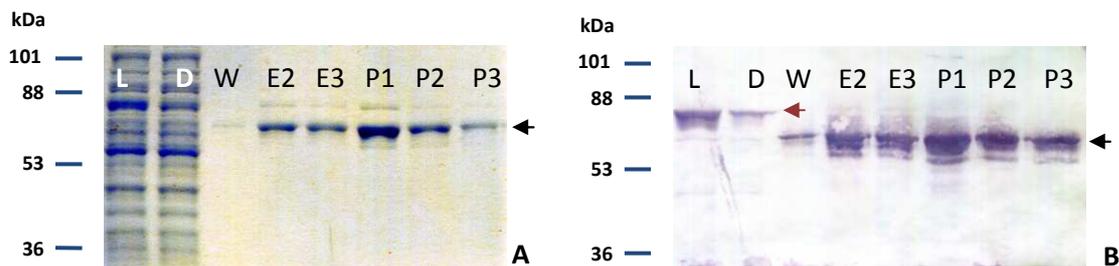


Abb.8 Die DAHP-Synthase 1 nach Aufreinigung über die Profinity eXact Säule (Bio-Rad). Dargestellt sind die einzelnen Aufreinigungsschritte im SDS-Gel (A) und im Western Blot (B). Die SDS-Gele wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Detektion der DAHP-Synthasen im Western Blot erfolgte mit Antikörpern gegen die DAHP-Synthase in Arabidopsis. L: Lysat; D: Durchfluss; W: Waschfraktion; E und P: Eluate vor (E) und nach (P) Inkubation im Elutionspuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die schwarzen Pfeile markieren die Laufhöhe des geschnittenen Zielproteins und die roten Pfeile die Laufhöhe des Enzyms mit Profinity eXact Tag.

Die maximal erzielte Proteinkonzentration bei der Aufreinigung über die Profinity eXact Säulen betrug in einem Einzeleluat nur 0,34 mg/ml (DAHP-Synthase 1). Die maximale Ausbeute in allen Eluaten insgesamt betrug lediglich 0,842 mg (DAHP-Synthase 1). Die hier erzielten Konzentrationen und Proteinmengen sind also wesentlich kleiner als die mit den StrepTactin-Säulen erreichten (Vgl. Tab.1 und Abschnitt 3.2.1). In den meisten Aufreinigungen fiel ein großer Anteil von Zielprotein in der Durchfluss-Fraktion auf. Dies ist die Fraktion, die nach dem Hinzufügen von Waschpuffer zur Säule nach Auftrag des Bakterienlysats aufgefangen wird. Sie sollte bei optimaler Bindung des Zielproteins an die Affinitätssäule also kaum Zielprotein aufweisen. In diesem System scheint also die Bindung des Zielproteins an die Säule nicht optimal zu sein, was die geringe Ausbeute an Zielprotein erklären könnte.

3.2.4 Größenabschätzung der drei Isoformen im SDS-Gel

Um die Molekulargewichte der drei Isoformen zu ermitteln, wurden die über die Profinity eXact Säulen™ aufgereinigten Enzyme ohne Tag im SDS-Gel mit einem entsprechendem Größenstandard aufgetragen (Abb.9). Die aufgrund der Aminosäuresequenz ermittelten und mittels SDS-Gel ermittelten Molekulargewichte sind in Tabelle 2 dargestellt. Die im Gel ermittelten Molekulargewichte liegen etwas höher. Die DAHP-Synthase 3 ist hier etwa 1 kDa größer als die anderen zwei Isoformen.

Tab.2 Bestimmung des Molekulargewichts der drei DAHP-Synthasen. Die Molekulargewichte wurden anhand der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programmes DNAMAN und mittels SDS-Gel-Auftragung abgeschätzt.

	DNAMAN	SDS-Gel
DAHPS 1	52,9 kDa	54,6 kDa
DAHPS 2	51,0 kDa	54,8 kDa
DAHPS 3	52,8 kDa	55,6 kDa

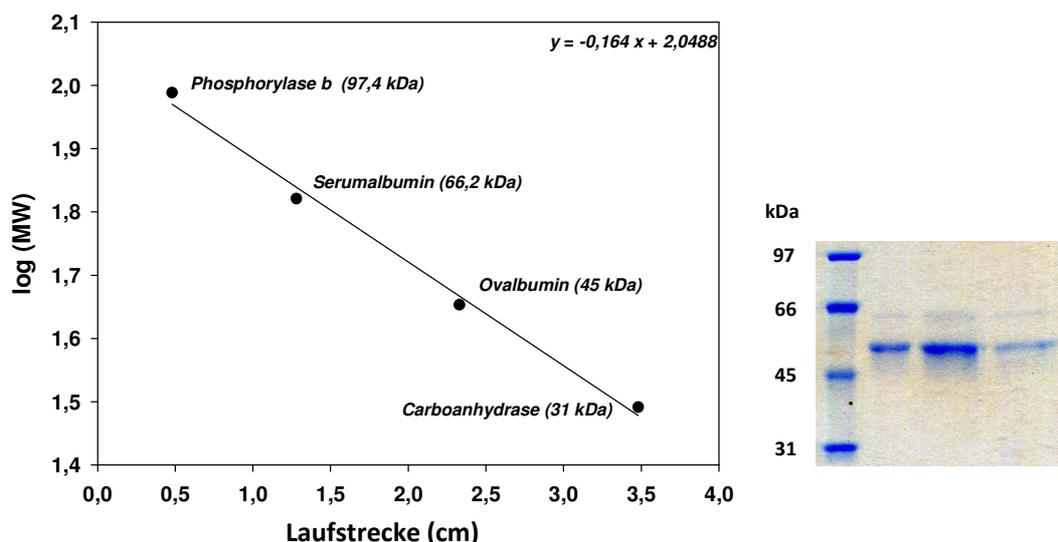


Abb.9 Bestimmung des Molekulargewichts der drei DAHP-Synthasen im SDS-Gel.

links: Auftragung des Logarithmus der Masse der Standardproteine gegen die Laufstrecke der jeweiligen Proteine zur Ermittlung der Eichgeraden; rechts: die drei Isoenzyme ohne Tag im SDS-Gel mit dem Größenstandard.

3.3 Biochemische Charakterisierung

In höheren Pflanzen konnten aufgrund von Sequenzhomologien meist zwei oder drei Gene, die für putative Isoenzyme der DAHP-Synthase kodieren, identifiziert werden (Betz *et al.*, 2009; Görlach *et al.*, 1993; Janzik *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Untersuchungen dieser Gene zeigten vor allem auf Transkriptionsebene eine unterschiedliche Regulation (Vgl. Abschnitt 1.2.1). Dies weist darauf hin dass die verschiedenen kodierten Isoenzyme möglicherweise in der Pflanze unterschiedliche Funktionen erfüllen. So könnte jedes Enzym unter anderen physiologischen Bedarfszuständen und Stoffwechsellagen aromatische Aminosäuren bzw. ihre Vorstufe Chorismat bereitstellen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, eine mögliche Manifestation dieser unterschiedlichen Regulation und Aufgabenteilung auch in den biochemischen Eigenschaften der Isoenzyme zu überprüfen. Bei der vergleichenden biochemischen Charakterisierung der drei DAHP-Synthasen aus *Arabidopsis thaliana* wurde mit heterolog exprimierten Proteinen gearbeitet, da dies den Gewinn großer Proteinmengen und die Zuordnung der einzelnen Enzyme zu einem konkreten Gen möglich macht. Da sich die Proteinausbeute nur im pET-51-Vektor-System als hinreichend groß für eine Charakterisierung erwies (Vgl. Abschnitt 3.2), wurden die folgenden Messungen, falls nicht anders angegeben, mit Protein mit N-terminalen Strep Tag durchgeführt. Die Aktivität der DAHP-Synthase wurde durch die Abnahme des Substrates Phosphoenolpyruvat photometrisch ermittelt.

3.3.1 pH-Optimum

Da der Extinktionskoeffizient von Phosphoenolpyruvat pH-Wert abhängig ist (Schofield *et al.*, 2003), wurde der Extinktionskoeffizient entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz für jeden verwendeten Puffer jeweils photometrisch bestimmt. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 232 nm (Abb.10A). Die Enzymtests wurden im Bereich von pH 5,5 bis 7,0 in 50 mM MES- Puffer und in dem pH-Bereich zwischen pH 7,0 und 8,5 in 50 mM EPPS-Puffer durchgeführt.

Für die DAHP-Synthase 1 ergab sich ein pH-Optimum zwischen 6,5 und 7,0. Die DAHP-Synthase 2 zeigte bei einem pH-Wert von 7,0 maximale Aktivität und die DAHP-Synthase 3 wies sich durch ein etwas breiteres pH-Optimum aus, das zwischen 6,0 und 7,5 lag (Abb.10B-D).

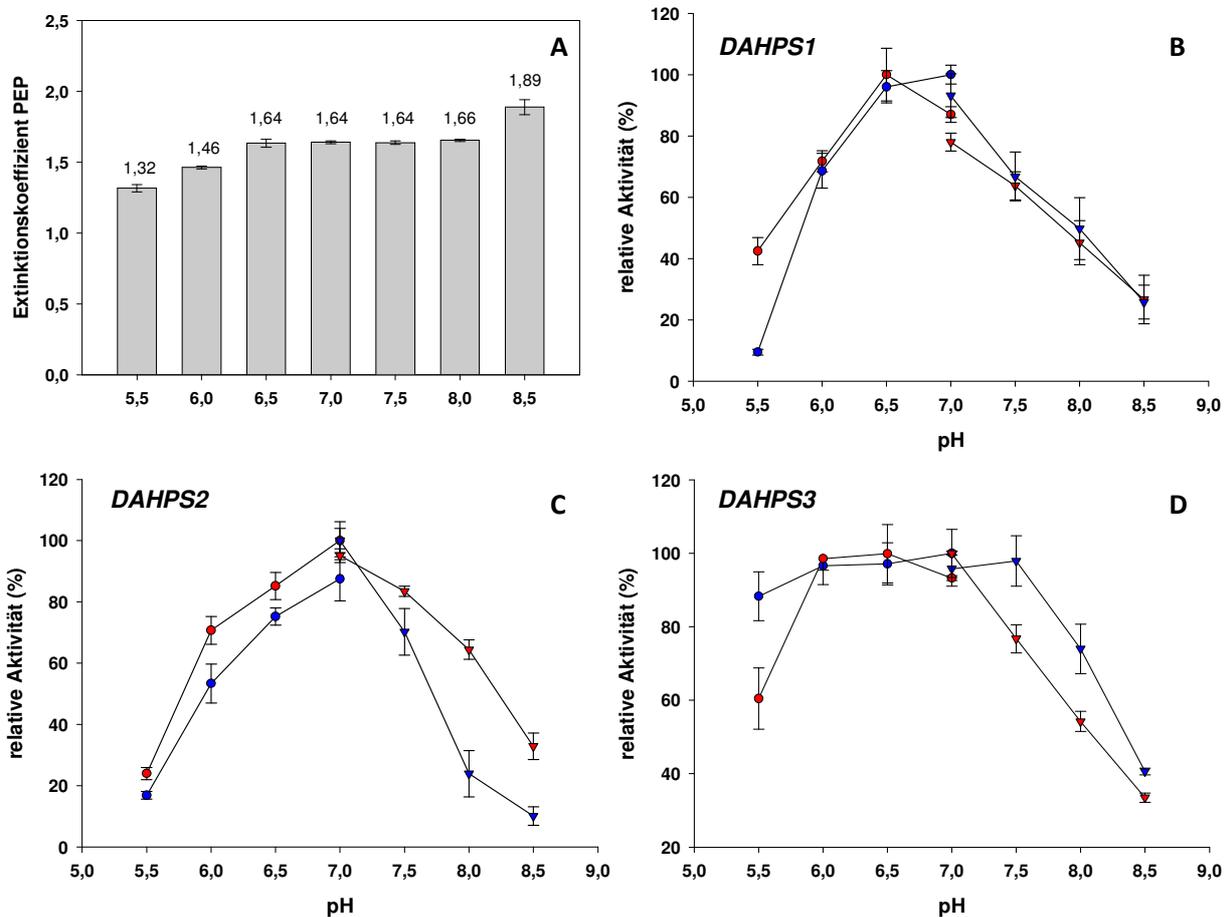


Abb.10: pH-Wert-Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten für Phosphoenolpyruvat (A) und der Aktivität der DAHP-Synthasen (B-D). A: Der Extinktionskoeffizient wurde in denselben Puffern bestimmt, die in den weiteren Aktivitätstests Verwendung fanden und enthalten somit auch MnCl_2 , MgCl_2 und DTT. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für $n = 3$. B-D: Die Ergebnisse aus 2 Messungen mit jeweils unabhängig voneinander aufgereinigtem Enzym sind in unterschiedlichen Farben dargestellt (blau und rot). Jeder Aktivitätswert zeigt den Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für die Dreifachbestimmung. ● 50 mM MES-Puffer ; ▼ 50 mM EPPS-Puffer.

3.3.2 Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen

Die DAHP-Synthasen sind Metalloproteine, d.h. sie tragen ein Metallion als prosthetische Gruppe. Aus Pflanzen hat man bisher DAHP-Synthasen isoliert, die durch Cobalt-, Mangan- und Magnesiumionen aktiviert werden (Herrmann und Weaver, 1999; Rubin und Jensen, 1985; Suzich *et al.*, 1985).

3.3.2.1 Mangan

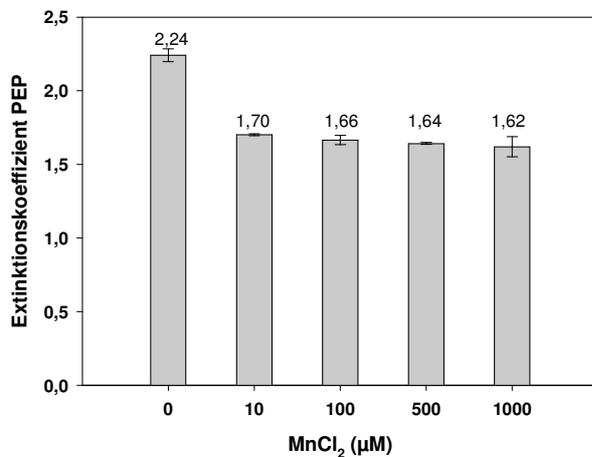


Abb.11: Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten für Phosphoenolpyruvat von Mangan.

Der Extinktionskoeffizient wurde in denselben Puffern bestimmt, die in den weiteren Aktivitätstests Verwendung fanden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für $n = 3$.

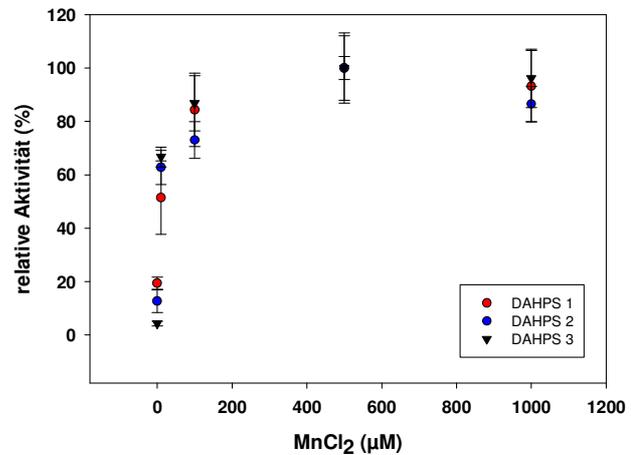


Abb.12: Abhängigkeit der Aktivität der drei DAHP-Synthasen von Mangan.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für $n = 3$. Der hier verwendete Grundpuffer (EPPS 50 mM pH 7,0) enthielt keinerlei Zusatz von zweiwertigen Kationen.

Der Extinktionskoeffizient für Phosphoenolpyruvat ist nicht nur pH-Wert abhängig, sondern wird auch von zweiwertigen Kationen beeinflusst (Schofield *et al.*, 2003). Daher wurde auch für die Messungen mit Manganzusatz zunächst der Extinktionskoeffizient in dem jeweiligen mit MnCl₂ versetzten Puffer bestimmt. Der Extinktionskoeffizient im Kontrollpuffer ohne Zusatz von zweiwertigen Kationen unterscheidet sich deutlich von den Extinktionswerten mit Mangan. Die Extinktionswerte der Puffer mit verschiedenen Mangankonzentrationen untereinander sind hingegen sehr ähnlich (Abb.11). Die Abhängigkeit der Aktivität von der Anwesenheit von Mangan ist für alle Isoenzyme deutlich zu sehen (Abb.12). Die Steigerung der Mangankonzentration von 10 µM auf 1000 µM bringt für alle drei Enzyme eine Aktivitätssteigerung von etwa 80 % mit sich. Die hier dargestellten Aktivitäten wurden mit dem für den jeweiligen Puffer spezifischen Extinktionskoeffizienten berechnet.

3.3.2.2 Magnesium

Auch durch den Zusatz von Magnesium lassen sich die DAHP-Synthasen aktivieren. Dafür sind allerdings Konzentrationen im millimolaren Bereich notwendig (Abb.13).

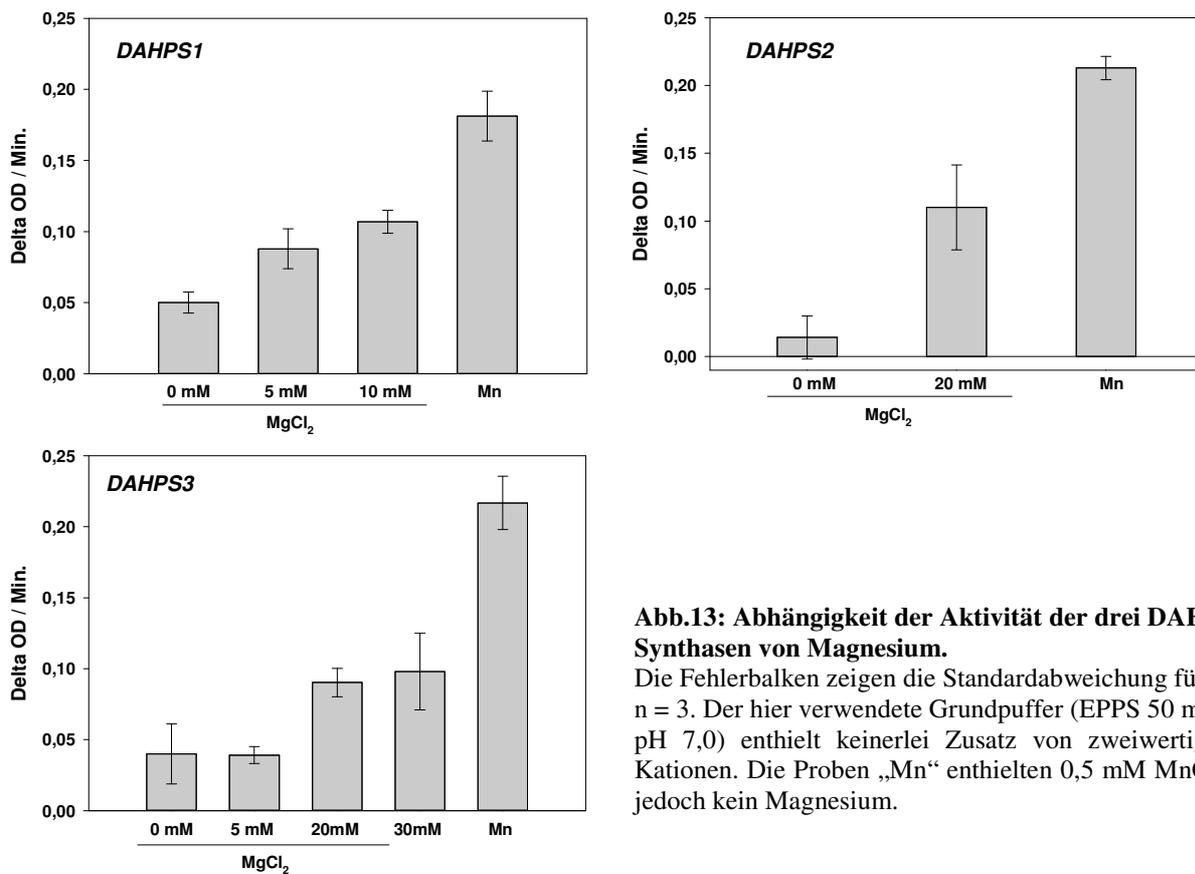


Abb.13: Abhängigkeit der Aktivität der drei DAHP-Synthasen von Magnesium.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für $n = 3$. Der hier verwendete Grundpuffer (EPPS 50 mM; pH 7,0) enthielt keinerlei Zusatz von zweiwertigen Kationen. Die Proben „Mn“ enthielten 0,5 mM $MnCl_2$, jedoch kein Magnesium.

Für diese Tests wurden die Extinktionskoeffizienten von Phosphoenolpyruvat in den einzelnen mit $MgCl_2$ versetzten Puffern nicht bestimmt. Daher wurde hier nicht die spezifische Aktivität als Maß für die Enzymaktivität gewählt, sondern die Änderung der optischen Dichte pro Minute. Es zeigte sich deutlich, dass die Aktivierung durch Magnesiumzusatz stattfindet und dass die Aktivierung durch das Mangan höher ausfällt als die Aktivierung durch das Magnesium. Die DAHP-Synthase 1 zeigt im Gegensatz zur DAHP-Synthase 3 bereits bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 5 mM eine Aktivitätssteigerung.

3.3.2.3 Cobalt

Unter Zusatz von Cobalt zeigten die DAHP-Synthasen 2 und 3 keinerlei Aktivität. Dabei wurden Konzentrationen von 10 und 500 μM CoCl_2 eingesetzt. Die ausbleibende Aktivierung der DAHP-Synthase 1 durch Cobalt wurde bereits in der Arbeit von Entus *et al.* (2002) gezeigt.

3.3.3 K_m -Werte und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten

Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration ergab für alle Isoformen der DAHP-Synthase sowohl für das Substrat Phosphoenolpyruvat (PEP) als auch für das Substrat Erythrose-4-Phosphat (E4P) eine typische Michaelis-Menten-Kurve in Form einer Hyperbel (Abb.14 und 15). Die Bestimmung der K_m -Werte und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten erfolgte mittels nichtlinearer Regression mit der Excel-Vorlage ANEMONA (Hernández und Ruiz, 1998). Dabei wurde der für die jeweiligen Dreifachproben ermittelte Standardfehler in jeder Berechnung berücksichtigt.

3.3.3.1 pH-Wert 7,0

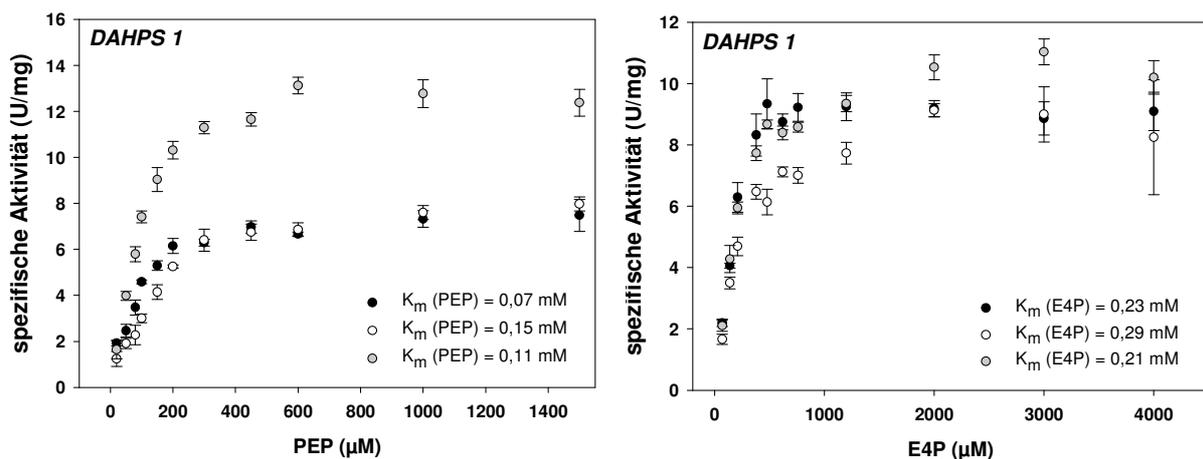


Abb.14: Michaelis-Menten-Diagramme für die Substrate PEP (links) und E-4-P (rechts) für die DAHP-Synthase 1. Dargestellt sind in jeweils unterschiedlichen Farben die Ergebnisse aus drei Messungen mit unabhängig voneinander aufgereinigtem Protein. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für $n = 3$. Die Aktivitätstests wurden in 50 mM EPPS-Puffer pH 7,0 durchgeführt.

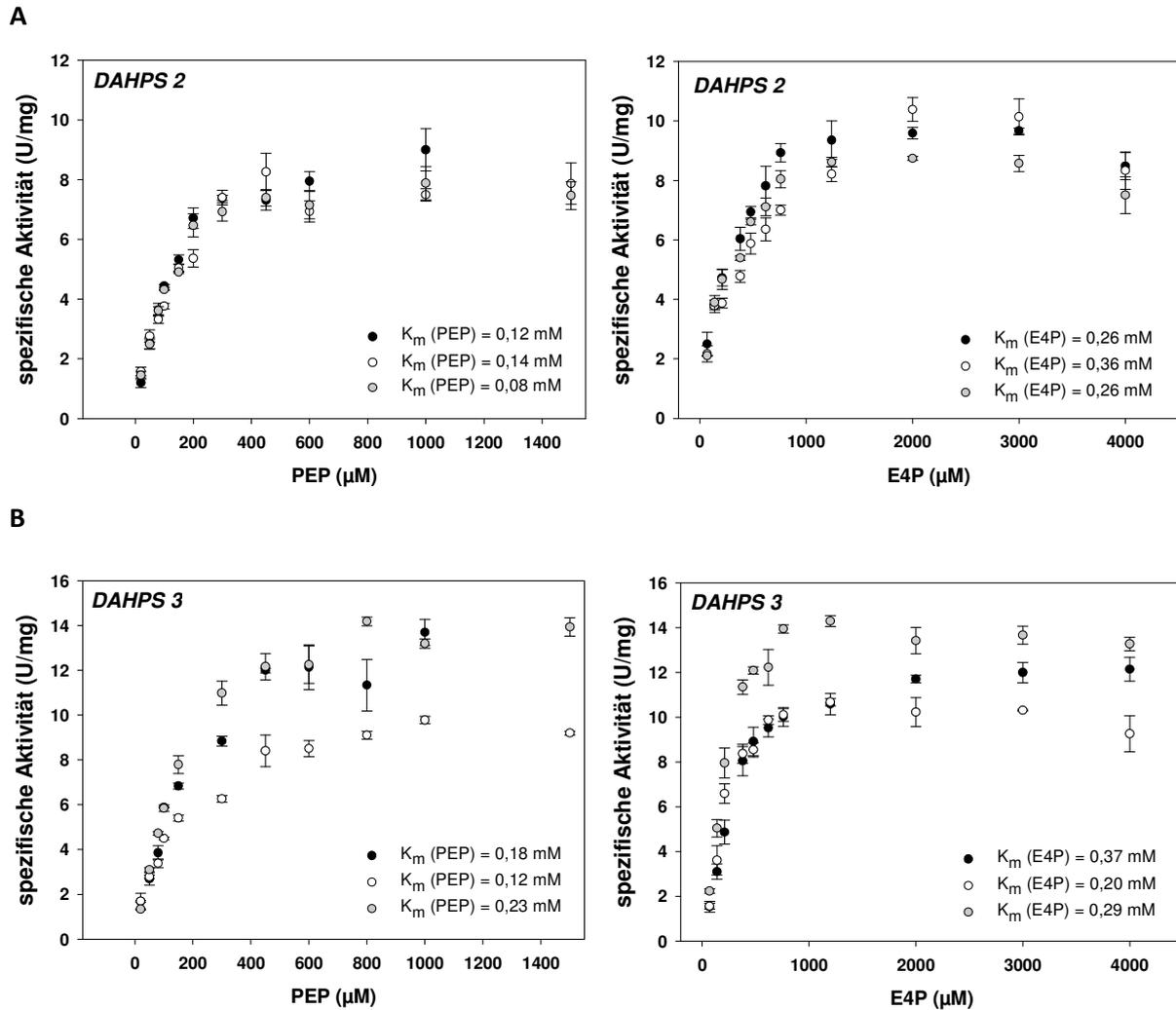


Abb.15: Michaelis-Menten-Diagramme für die Substrate PEP (links) und E-4-P (rechts) für die DAHP-Synthasen 2 (A) und 3 (B). Dargestellt sind in jeweils unterschiedlichen Farben die Ergebnisse aus drei Messungen mit unabhängig voneinander aufgereinigtem Protein. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für $n = 3$. Die Aktivitätstests wurden in 50 mM EPPS-Puffer pH 7,0 durchgeführt.

Die Enzymtests wurden im Standardpuffer EPPS mit pH 7,0 durchgeführt. Im Vergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der K_m -Werte (PEP) und K_m -Werte (E4P) zwischen den verschiedenen Isoenzymen. Die K_m -Werte (PEP) lagen mit 0,24 – 0,29 mM etwas mehr als doppelt so hoch wie die für Erythrose-4-Phosphat, die sich zwischen 0,11 und 0,17 mM bewegen. Der Vergleich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) offenbart allerdings eine signifikant höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit der DAHP-Synthase 3 gegenüber den anderen zwei Isoenzymen (Abb.16).

	K_m (E4P) [mM]	K_m (PEP) [mM]	V_{max} [U/mg]
DHS1	0,24 ± 0,04	0,11 ± 0,04	10,56 ± 2,28
DHS2	0,29 ± 0,06	0,11 ± 0,03	9,65 ± 1,19
DHS3	0,29 ± 0,09	0,17 ± 0,05	14,33 ± 3,21

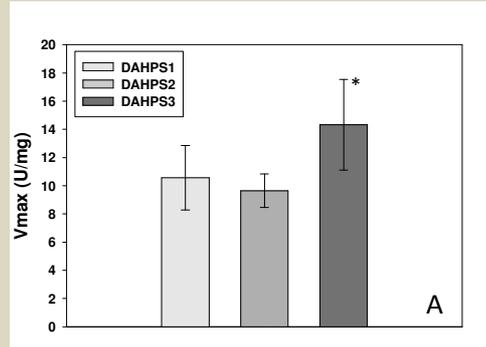


Abb.16: K_m -Werte und maximale Aktivitäten (V_{max}) für die drei Isoformen der DAHP-Synthase.

Die Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen mit unabhängig voneinander aufgereinigtem Protein. Die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte erfolgte mit der Excel-Vorlage ANEMONA. A zeigt die maximalen Aktivitäten nochmals graphisch aufgetragen. Die maximale Aktivität der DAHP-Synthase 3 ist signifikant höher als die der DAHP-Synthase 1 ($p \leq 0,05$) und signifikant höher als die der DAHP-Synthase 2 ($p \leq 0,001$). Zur Ermittlung der Signifikanz wurde eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Post-Hoc LSD-Test durchgeführt

3.3.3.2 pH-Wert 6,0

Wurden die Enzymtests bei einem pH-Wert von 6,0 durchgeführt, so zeigten die DAHP-Synthasen 1 und 3 für das Substrat Erythrose-4-Phosphat dasselbe Verhalten wie bei einem pH-Wert von 7,0. Für die DAHP-Synthase 2 hingegen verdoppelte sich der K_m -Wert für das Substrat Erythrose-4-Phosphat im Vergleich zu den saureren pH-Bedingungen (Tab.3). Für diese pH-Wert Bedingung liegt für jedes Isoenzym jeweils nur eine Analyse vor. Die K_m -Werte der einzelnen Enzyme für das Substrat Phosphoenolpyruvat unter pH-Wert 6,0 konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden.

Tab.3: Vergleich der K_m -Werte (E4P) der DAHP-Synthasen bei pH 6,0 und pH 7,0. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Analysen bei pH-Wert 7,0 und einer Analyse bei pH-Wert 6,0. Bei jeder Analyse wurde für jede Substratkonzentration eine Dreifachbestimmung der Enzymaktivität durchgeführt.

	DAHPS1	DAHPS2	DAHPS3
	K_m (E4P) [mM]		
pH 7 (1)	0,23	0,26	0,37
pH 7 (2)	0,29	0,36	0,20
pH 7 (3)	0,21	0,26	0,29
pH 6 (1)	0,20	0,79	0,21

3.3.4 Reduzierende Agenzien

Viele Enzyme im Chloroplasten sind lichtreguliert. Die Lichtregulation erfolgt über veränderte Redoxzustände von Enzymen, welche durch den photosynthetischen Elektronentransport ausgelöst werden. Die Reduktion der entsprechenden Enzyme führt zu einer veränderten katalytischen Aktivität und somit zu einer Aktivierung oder Inaktivierung. Die drei DAHP-Synthasen in *Arabidopsis* sind aufgrund der identifizierten Importsequenzen vermutlich ebenfalls im Chloroplasten lokalisiert und möglicherweise lichtreguliert. Die Aktivierung der DAHP-Synthase 1 durch DTT und reduziertes Thioredoxin ist bereits durch eine Arbeit von Entus *et al.* (2002) bekannt. Zur Überprüfung einer Redoxregulation wurde die Aktivität der anderen beiden DAHP-Synthasen unter Einfluss des chemischen Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) und von Thioredoxin (TRX) aus *Spirulina* sp. getestet. Alle drei Enzyme wurden sowohl durch DTT als auch durch reduziertes Thioredoxin aktiviert (Abb.17). Für die Messungen mit DTT wurden die Enzyme zunächst umgepuffert, da die Puffer für die Proteinaufreinigung DTT zur Enzymstabilisierung enthalten. Die Umpufferung erfolgte mittels Molekularsieb-Chromatographie (Bio-Spin[®]6, Biorad). Das verwendete TRX wurde vor der Reaktion zunächst mit 10 mM DTT reduziert. Die Aktivität der Enzyme ließ sich mit DTT um etwa 60 % (DAHP-Synthasen 1 und 3) bzw. um etwa 40 % (DAHP-Synthase 2) steigern. Dafür reichten bei Isoenzym 1 200 μ M DTT, bei der dritten Isoform 160 μ M und bei der DAHP-Synthase 2 wurde bereits bei einer Konzentration von 80 μ M DTT die maximale Aktivität erreicht. Die Aktivität aller drei Enzyme wurde etwa um weitere 30 % gesteigert durch die Zugabe von reduziertem Thioredoxin. Da in jeder Messung ein konstantes Volumen einer entsprechenden Thioredoxinmenge in 10 mM DTT eingesetzt wurde, wies jeder Puffer in der Messung eine DTT-Konzentration von 300 μ M auf. Auch der Kontrollpuffer wurde mit einer DTT-Konzentration von 300 μ M versetzt. Bei dieser DTT-Konzentration sind alle drei Enzyme bereits maximal durch DTT aktiviert, so dass die weitere Aktivierung tatsächlich durch das reduzierte Thioredoxin hervorgerufen sein muss. Um einen bloßen Stabilisierungseffekt durch das Thioredoxin als Protein als Ursache für die Aktivitätssteigerung auszuschließen, wurden ebenfalls Aktivitätstests mit Zusatz von Rinderserumalbumin (BSA) durchgeführt.

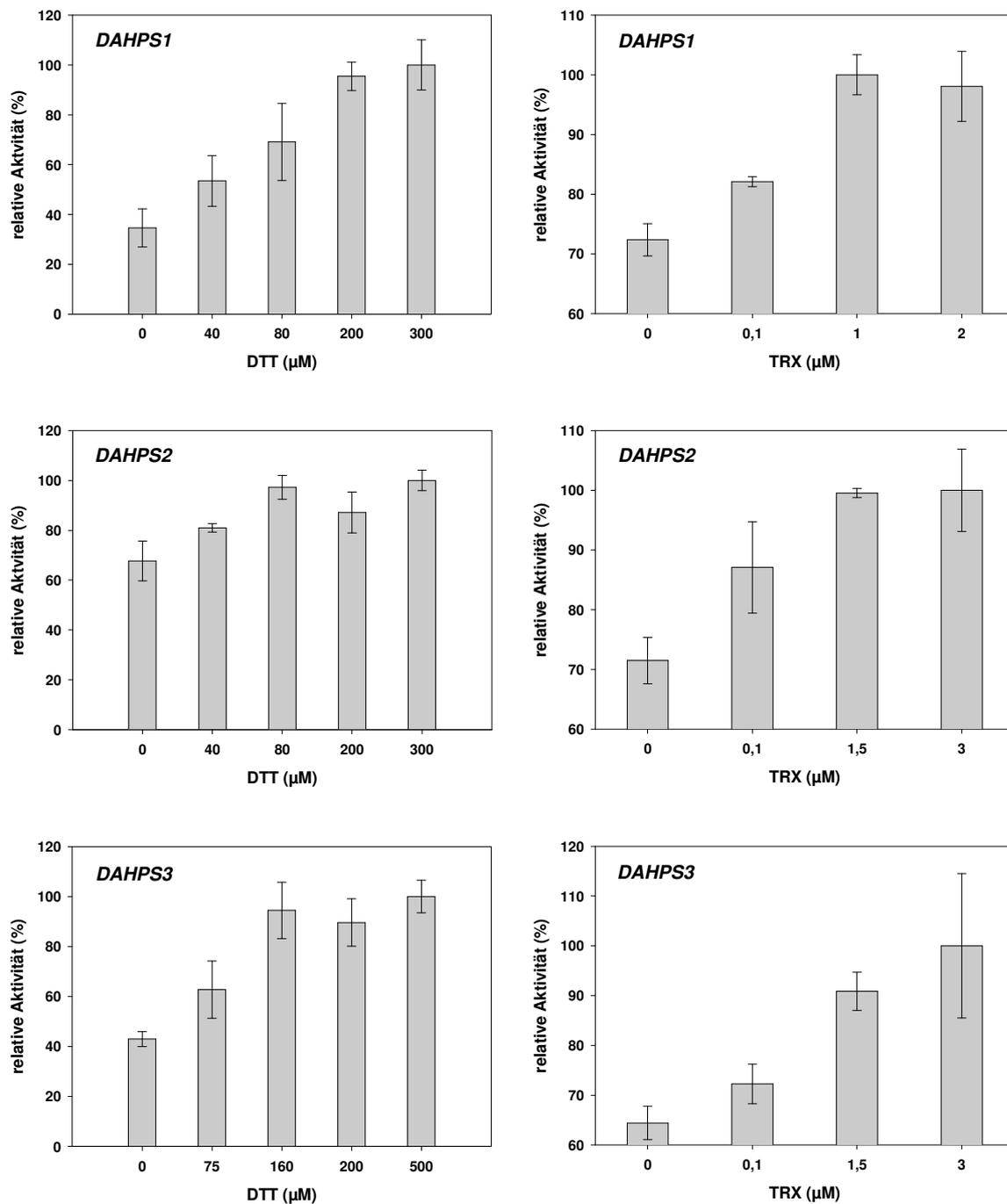


Abb.17: Aktivität der DAHP-Synthasen mit Dithiothreitol und reduziertem Thioredoxin. Die einzelnen Aktivitätswerte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für $n = 3$ an. 100 % entsprechen der höchsten mittleren Aktivität in der jeweiligen Testreihe. Die Aktivitätstests wurden in 50 mM EPPS-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Für die Ermittlung der DTT-Abhängigkeit wurde das Enzym zunächst in den späteren Reaktionspuffer umgepuffert ohne Zugabe von reduzierenden Agenzien. Die Vorinkubation des Enzyms mit DTT erfolgte für 2 Minuten. Das Thioredoxin aus *Spirulina* sp. (Sigma) wurde für 10 Minuten in 10 mM DTT vorinkubiert. Dann erfolgte eine Inkubation mit dem Enzym vor der Aktivitätsmessung für 5 Minuten.

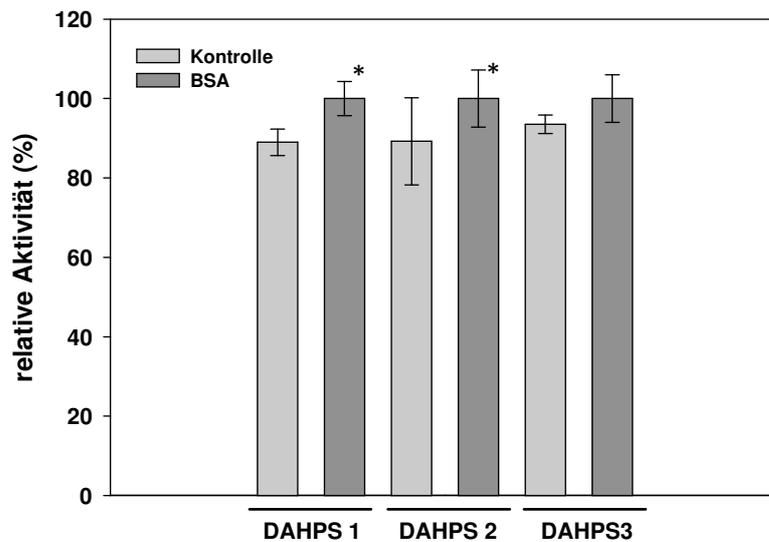


Abb.18: Aktivität der DAHP-Synthasen mit BSA. Die einzelnen Aktivitätswerte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für $n = 3$ an. 100 % entsprechen der Aktivität der entsprechenden Probe mit Zusatz von BSA. Die Aktivitätstests wurden in 50 mM EPPS-Puffer pH 7,0 mit 0,1 mg/ml BSA durchgeführt. * zeigt Signifikanz gegenüber der Kontrolle. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein t-Test ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

Durch die Zugabe von BSA mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ im Puffer konnte die Aktivität der Enzyme lediglich um etwa 10 % gesteigert werden (Abb.18). Im Vergleich dazu wurden in den Messreihen mit Thioredoxin Konzentrationen zwischen 1,2 $\mu\text{g/ml}$ und 36 $\mu\text{g/ml}$ Thioredoxin eingesetzt. Also ist die Aktivitätssteigerung durch reduziertes Thioredoxin eindeutig kein bloßer Stabilisierungseffekt durch eine erhöhte Proteinkonzentration im Reaktionspuffer, sondern wird durch das Thioredoxin selbst hervorgerufen.

3.3.5 Substratspezifität

Man kennt Cobalt-aktivierte DAHP-Synthasen, die eine breite Substratspezifität aufweisen (Doong *et al.*, 1992b). Zu den wirksamsten Substraten gehören dabei Glykoaldehyd, DL-Glyceraldehyd und D (-) Erythrose. Diese Alternativsubstrate zu Erythrose-4-Phosphat wurden daher auch an den heterolog exprimierten DAHP-Synthasen aus Arabidopsis getestet. Doch für keines der drei Isoenzyme konnte unter Verwendung der drei Alternativsubstrate

eine Aktivität detektiert werden. Dabei wurden die Konzentrationen des jeweiligen Substrates von 1 mM bis 10 mM variiert.

3.3.6 Temperaturabhängigkeit

Zu der Abhängigkeit der DAHP-Synthasen von der Temperatur liegen für die Isoformen 1 und 3 jeweils die Ergebnisse aus einem Test vor. Für die Isoform 2 liegen die Ergebnisse aus zwei Analysen mit Material aus jeweils unabhängigen Proteinaufreinigungen vor.

Die Isoformen 1 und 3 zeigten maximale Aktivität bei einer Temperatur von 40 °C. Die Isoform 2 hatte ein Temperaturoptimum zwischen 40 °C und 45 °C (Abb.19).

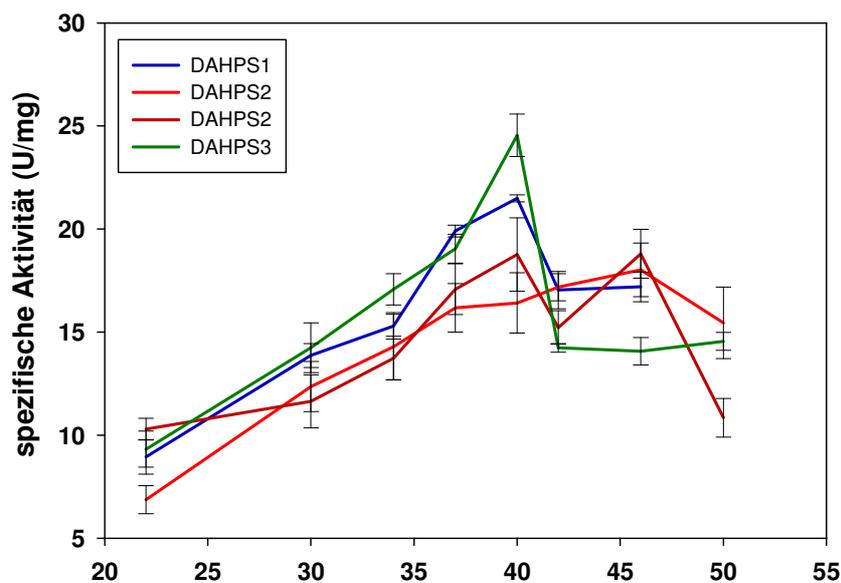


Abb.19: Aktivität der DAHP-Synthasen bei verschiedenen Temperaturen. Die einzelnen Aktivitätswerte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für $n = 3$ an. Die Aktivitätstests wurden in 50 mM EPPS-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Der pH-Wert wurde bei den entsprechenden Temperaturen eingestellt. Für die DAHP-Synthase 2 liegen die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Messungen vor (rot).

3.3.7 Einfluss der aromatischen Aminosäuren auf die Aktivität

In einigen Untersuchungen mit aus Pflanzen gewonnenen DAHP-Synthasen konnte man eine Aktivierung durch die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan zeigen (Suzich *et al.*, 1985, Pinto *et al.*, 1986). In dieser Arbeit konnte eine Aktivitätssteigerung der DAHP-Synthasen 1 und 2 unter Zugabe von Phenylalanin zum Reaktionspuffer beobachtet werden. Die Aktivität der DAHP-Synthase 1 konnte darüber hinaus auch durch die Aminosäure Tryptophan gesteigert werden. Die Zugabe von Tyrosin hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme. Die DAHP-Synthase 3 zeigte keinerlei Aktivitätsänderung durch die Zugabe von aromatischen Aminosäuren (Abb.20).

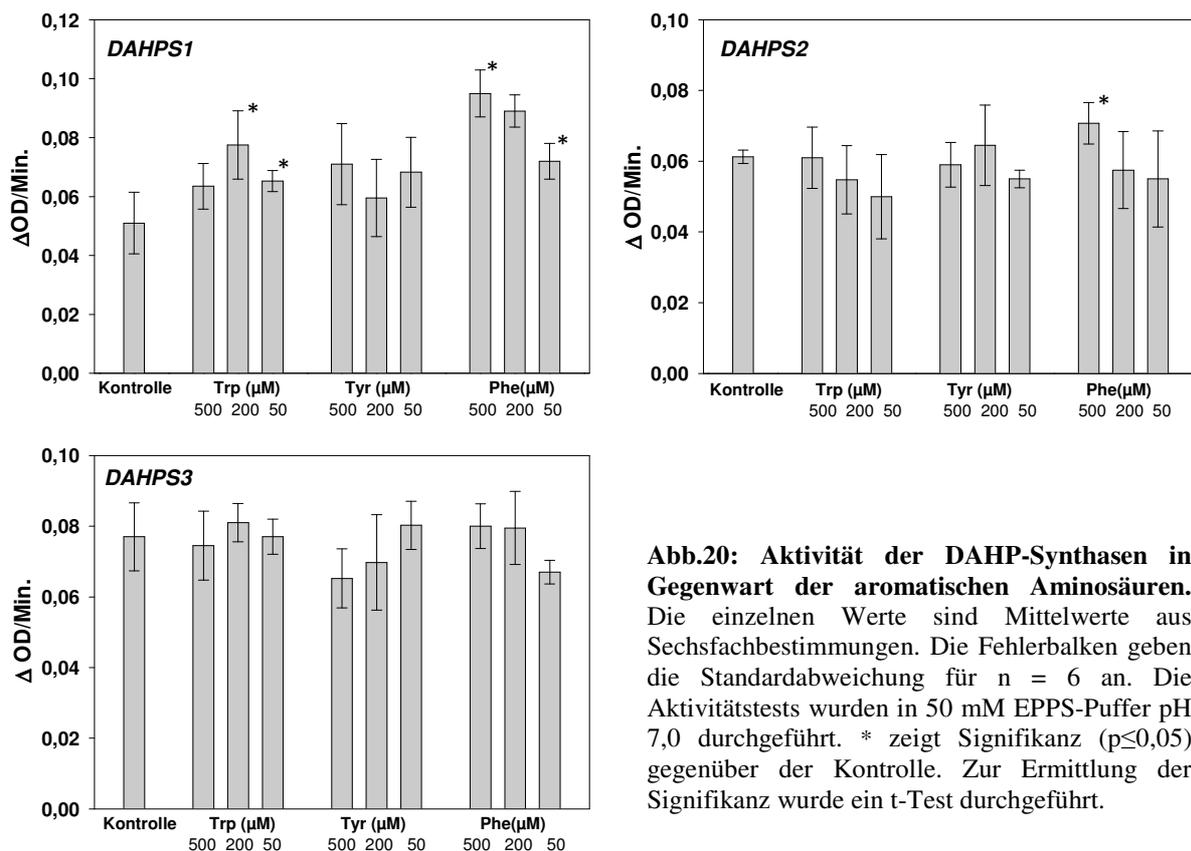


Abb.20: Aktivität der DAHP-Synthasen in Gegenwart der aromatischen Aminosäuren. Die einzelnen Werte sind Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für $n = 6$ an. Die Aktivitätstests wurden in 50 mM EPPS-Puffer pH 7,0 durchgeführt. * zeigt Signifikanz ($p \leq 0,05$) gegenüber der Kontrolle. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt.

3.3.8 Charakterisierung des Enzyms ohne Tag

Für die Charakterisierung der DAHP-Synthasen ohne Tag wurde bei der Klonierung der pPAL-7-Vektor eingesetzt. Der pPAL7-Vektor kodiert N-terminal für den 75 Aminosäure langen Profinity eXact™ Tag, der die Möglichkeit bietet den Tag bereits auf der Affinitäts-säule während dem Prozess der Proteinaufreinigung vom Zielprotein zu entfernen. Das in diesem System gewonnene Enzym zeigte nach der Aufreinigung zunächst nur wenig Aktivität und auch nach Optimierung der Pufferbedingungen konnten nur geringe Mengen aktives Protein gewonnen werden, die nicht ausreichend für eine umfassende Charakterisierung waren. Die maximal erzielten Proteinkonzentrationen in den Eluaten lagen bei der Aufreinigung im pPAL-7 System bei nur etwa 1/3 der Konzentration der im pET-51-System erzielten Konzentrationen (Vgl. Abschnitt 3.2.3). Daher wurde die umfassende Proteincharakterisierung an Protein mit N-terminalen Strep-Tag durchgeführt, das im pET-51-System gewonnen wurde (siehe Abschnitte 3.3.1 bis 3.3.7). Um dennoch zu zeigen, dass der N-terminale Strep-Tag keine Auswirkung auf die Aktivität und das Verhalten der hier exprimierten DAHP-Synthasen hatte, sollte auch das Enzym ohne Tag in kleineren Mengen getestet werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies für das pH-Wert-Optimum und den K_m (PEP)-Wert für die DAHP-Synthase 1 durchgeführt werden (Abb. 21 und 22).

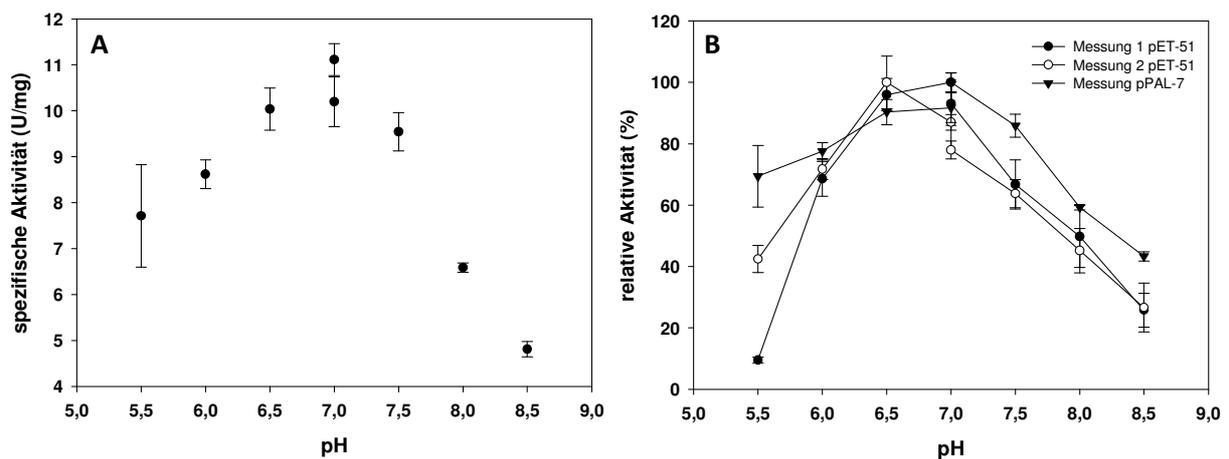


Abb.21: pH-Wert Abhängigkeit der Aktivität der DAHP-Synthase 1 ohne Tag (pPAL-7; A,B) und mit Strep Tag (pET-51; B). Die einzelnen Aktivitätswerte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für $n = 3$ an. 100% entsprechen in B der maximalen Aktivität des jeweiligen Enzyms in der einzelnen Messreihe.

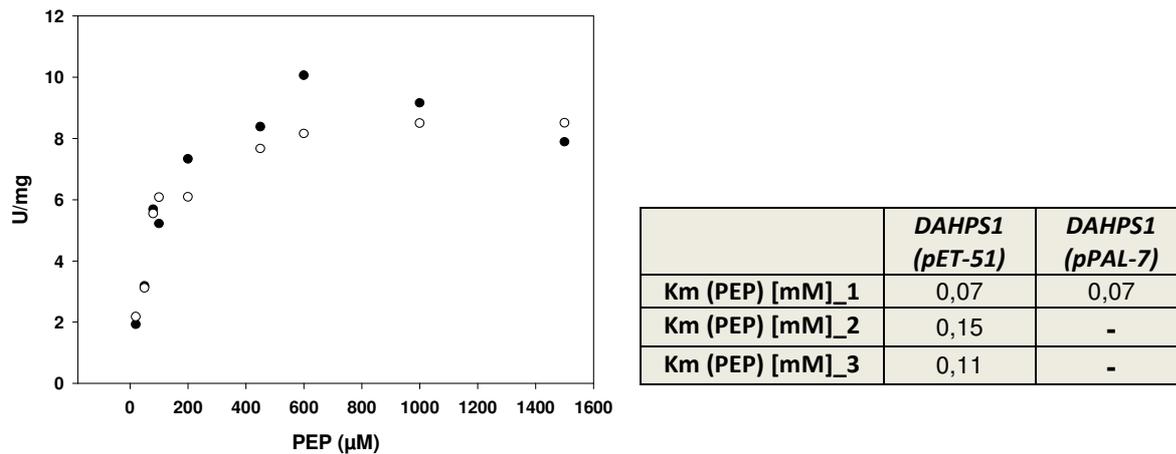


Abb.22: Michaelis-Menten-Diagramm für das Substrat PEP für die DAHP-Synthase 1 ohne Tag (links). Die Aktivitätswerte sind Einzelwerte aus zwei unabhängigen Messreihen. Die ermittelten K_m (PEP)-Werte für die DAHP-Synthase 1 mit Strep-Tag (pET-51) und ohne Tag (pPAL-7) sind der Tabelle rechts zu entnehmen. Die Bestimmung der K_m -Werte erfolgte mit der Excel-Vorlage ANEMONA. Dabei wurde nur für das Enzym mit Strep-Tag der für die jeweiligen Dreifachproben ermittelte Standardfehler in der Berechnung berücksichtigt. Für das Enzym ohne Tag war dies nicht möglich, da hier nur Doppelproben vorlagen.

Für die DAHP-Synthase 1 ohne Tag ergab sich ein pH-Optimum von 7,0 (Abb.21). Dies liegt ganz im Bereich des ermittelten pH-Optimums der DAHP-Synthase 1 mit Strep-Tag. Dieses lag zwischen pH 6,5 und pH 7,0 (Vgl. Abschnitt 3.3.1). Auch die Werte der spezifischen Aktivität sind hier sehr ähnlich. Die spezifische Aktivität im pH-Optimum des Enzyms mit Strep-Tag bewegte sich zwischen 10 und 12 U/mg Protein. Die DAHP-Synthase 1 ohne Tag zeigte hier ebenfalls eine spezifische Aktivität von etwa 11 U/mg Protein.

Vergleicht man den für die geschnittene DAHP-Synthase ermittelten K_m (PEP)-Wert mit dem Mittelwert aus drei Messungen des Enzyms mit Strep-Tag ($0,11 \pm 0,04$ mM), so liegt er mit 0,07 mM etwas niedriger. Schaut man sich jedoch die einzelnen K_m (PEP)-Werte des Enzyms mit Tag an, so liegt er durchaus in demselben Bereich (Abb.22).

Im Rahmen der K_m -Wert-Bestimmung wurde ebenfalls die maximale Aktivität bestimmt. Diese lag in der Messung mit dem geschnittenen Enzym bei 9,32 U/mg Protein für die DAHP-Synthase 1. Der Mittelwert aus drei Messungen an dem Enzym mit Strep-Tag ergab eine maximale Aktivität von 10,56 U/mg Protein.

3.4 Charakterisierung der Knockout-Linien

Für jede Isoform der DAHP-Synthase standen homozygote T-DNA Insertions-Mutanten für die entsprechenden Gene zur Verfügung (Abb.23). Das Saatgut wurde von NASC (Loughborough, UK) bezogen. Es handelt sich bei allen drei Pflanzenlinien um SALK-Linien mit Columbia-Hintergrund (Alonso *et al.*, 2003; Vgl. Abschnitt 2.1.10). Die Pflanzen wurden zunächst mit sich selbst gekreuzt um homogenes Saatgut zu erhalten. Die Knockout-Mutanten waren in der F5-Generation homozygot. Dass es sich um Einzel-Insertionslinien handelt wurde mittels Restriktionsenzymen und Southern Blots nachgewiesen (Abb.24). Es wurden noch weitere SALK-Linien getestet, doch es konnten keine weiteren Einzel-Insertionslinien mit eindeutigem Knockout identifiziert werden. Aus den identifizierten Einzelinsertionslinien wurde eine Doppelmutante für die Isoformen 2 und 3 gekreuzt. Die Gene für die DAHP-Synthasen 2 und 3 liegen auf zwei verschiedenen Chromosomen, was die Erzeugung der Doppelmutante erheblich vereinfachte. Auch hier wurde die Homozygotie nachgewiesen. Mittels PCR und Isoform-spezifischen Oligonukleotiden wurde nachgewiesen, dass die Transkripte der DAHP-Synthasen in den entsprechenden Knockout-Pflanzen im Vergleich zu den Transkripten in den Wildtyp-Pflanzen um das mindestens 500-fache reduziert oder überhaupt nicht nachweisbar waren (Daten nicht dargestellt).

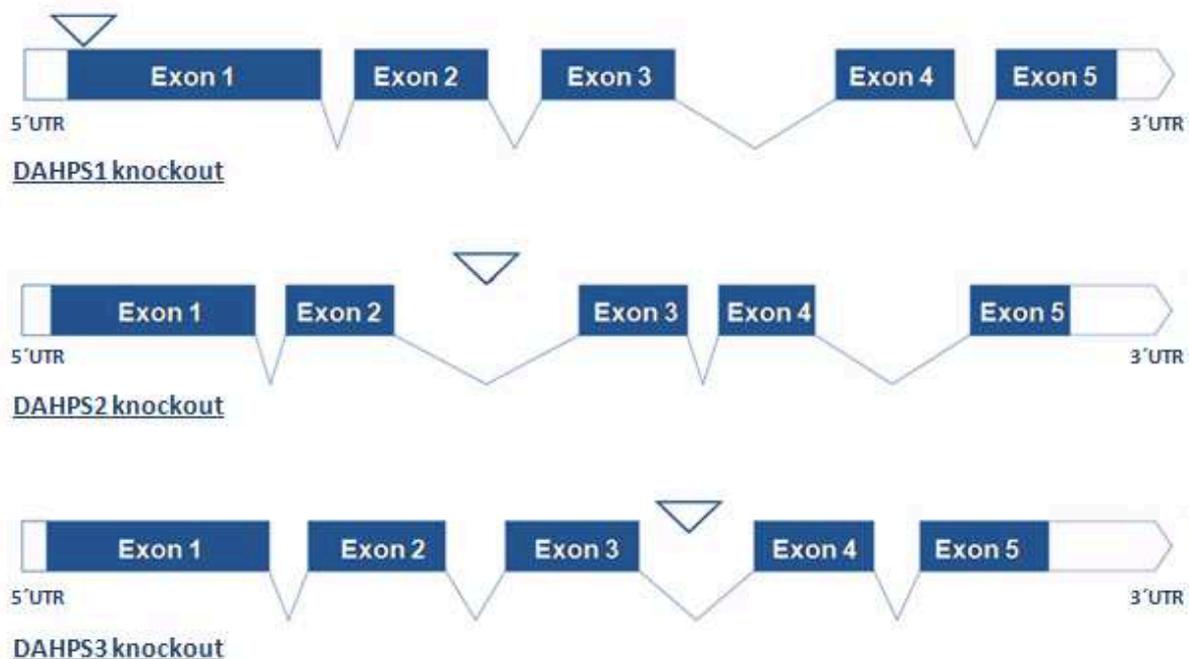


Abb.23: Überblick über die verwendeten Knockout-Linien für die verschiedenen DAHP-Synthasen. Es wurde in der Arbeit mit Wildtyp-Pflanzen des Ökotyps Columbia-0 verwendet und die Knockout-Linien haben denselben genetischen Hintergrund. ▽ kennzeichnet den Ort der T-DNA-Insertion.

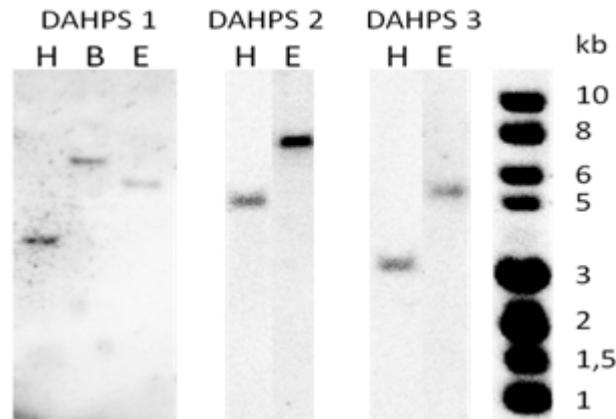


Abb.24: Test auf Einzelinsertion der KO-Linien für die drei DAHP-Synthasen mittels Southern Blot. DAHPS1: KO-Linie N5088 für DAHP-Synthase 1; DAHPS2: KO-Linie N533 für DAHP-Synthase 2; DAHPS3: KO-Linie N526 für DAHP-Synthase 3. Verwendete Restriktionsenzyme: *Hind*III (H), *Bam*HI (B), *Eco*RI (E). Bei allen drei KO-Linien handelt es sich um Einzelinsertionslinien, da nach Behandlung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in allen Fällen jeweils nur eine Bande zu detektieren war.

Zunächst wurden die Knockout-Mutanten unter Standardbedingungen im Gewächshaus angezogen und verglichen. Hier wurden sowohl rein äußerliche sowie metabolische und transkriptionelle Analysen durchgeführt. Dann wurden die KO-Mutanten unter diversen Stressbedingungen analysiert, da vergangene Transkriptanalysen zeigten, dass einige Isoformen besonders unter Stress induziert werden und ihnen eine wichtige Rolle bei der entsprechenden Stressreaktion zugesprochen wird (Betz *et al.*, 2009; Ditt *et al.*, 2006; Görlach *et al.*, 1995; Janzik *et al.*, 2005; Keith *et al.*, 1991). In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse im Detail dargestellt.

3.4.1 Wachstum unter Standardbedingungen

Unter Standardbedingungen im Gewächshaus (Vgl. Abschnitt 2.2.5.1) zeigten die Knockout-Mutanten dieselben äußerlichen und biochemischen Merkmale wie der Wildtyp (Abb.25). Nur für die Knockout-Mutante für die DAHP-Synthase 2 konnte ein biochemischer Phänotyp nachgewiesen werden: Diese Pflanzen zeigten unter Standardbedingung einen etwa 30% höheren Phenylalanin-Gehalt im Spross als die anderen Pflanzen (Abb.26).

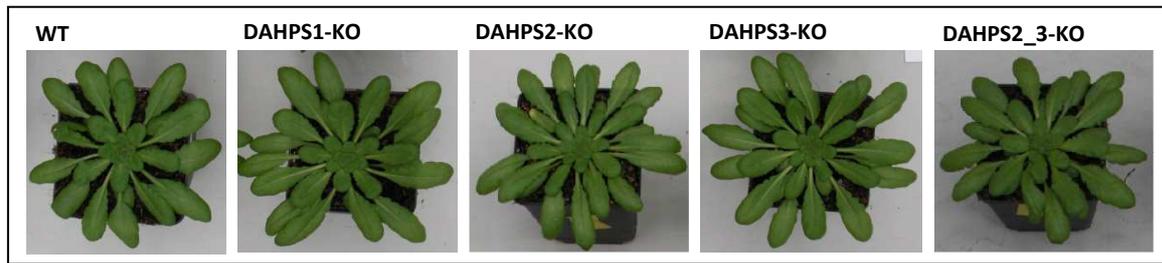


Abb.25: Phänotyp des Wildtyps und der Knockout-Mutanten für die verschiedenen Isoformen der DAHP-Synthase im Vergleich. Die Pflanzen sind 5 Wochen alt und unter Kurztagbedingungen angezogen (8 Stunden Licht). Die Temperaturen betragen 22°C am Tag und 18 °C in der Nacht. Es ist kein Unterschied in den Phänotypen auszumachen.

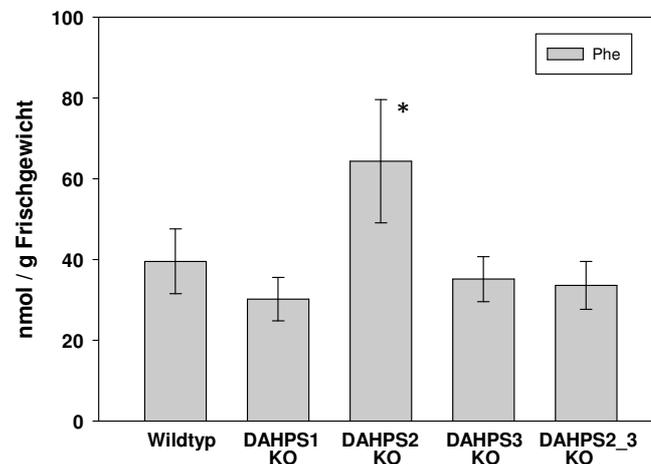


Abb.26: Gehalt an Phenylalanin im Spross von Wildtyp und Knockout-Mutanten. Die Pflanzen unterlagen einem Tag-Nacht-Rhythmus mit 8 Stunden Belichtung. Die Analysen wurden mittels HPLC durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen, in denen jeweils 2 Pflanzenpools à 3 Pflanzen geerntet und analysiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen also die Standardabweichung für n=4. Der Phenylalanin-Gehalt in den DAHP-Synthase 2-KO-Pflanzen ist signifikant höher als in den anderen Pflanzen; $p \leq 0,05$. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt.

Um zu verifizieren, dass keine Unterschiede im Wachstumsverhalten der Mutanten und der Wildtyp-Pflanzen existieren, wurden die Pflanzen mittels GROWSCREEN-Verfahren (Walter *et al.*, 2007) analysiert. Dabei handelt es sich um ein nicht-invasives bildverarbeitendes Verfahren um die relative Wachstumsrate zu bestimmen (Vgl. Abschnitt 2.2.6). Die Analyse

mittels GROWSCREEN zeigte keinen signifikanten Unterschied im Wachstumsverhalten des Wildtyps und der Knockout-Mutanten (Abb.27).

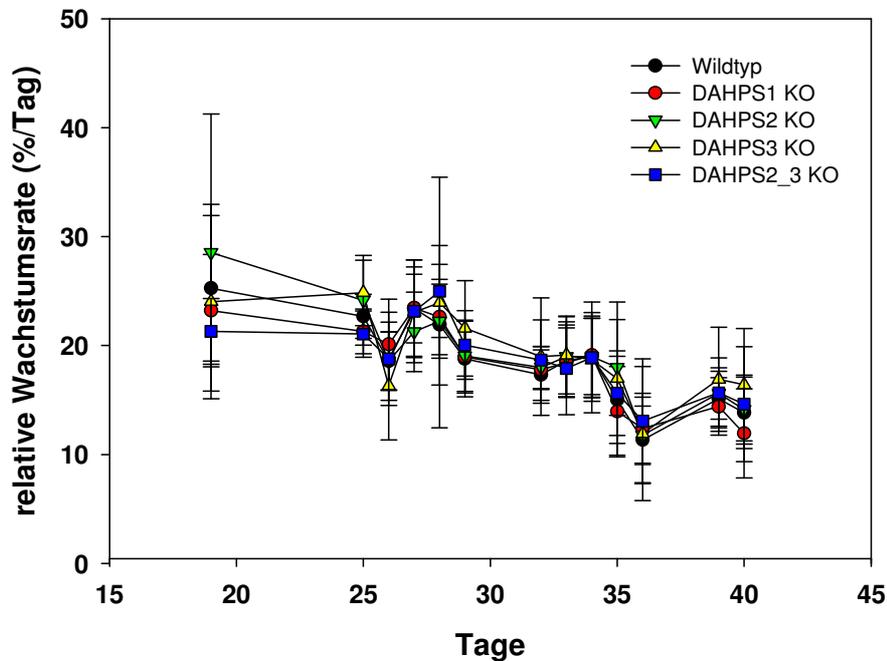


Abb.27: Relative Wachstumsrate von Wildtyp und Knockout-Mutanten für die DAHP-Synthasen. Die Pflanzen wurden von Tag 19 bis Tag 40 nach Aussaat mit dem GROWSCREEN-Verfahren aufgenommen. Ab Tag 25 erfolgte die Aufnahme alle 1 bis 3 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 47-50 Pflanzen. Nur für die Knockout-Mutanten für die DAHP-Synthasen 2 und 3 sind die Mittelwerte aus jeweils 23-25 Pflanzen dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.4.2 Das basales Expressionsmuster der drei DAHP-Synthasen

Um die Expression der drei Isoformen der DAHP-Synthase in Wurzel und Spross zu vergleichen, wurden sowohl Wildtyp-Pflanzen als auch alle Knockout-Pflanzen auf Sand angezogen (Vgl. Abschnitt 2.2.5.2). Nach 4 Wochen (ab Keimung) wurden die Wurzeln und Sprosse getrennt geerntet und mittels realtime-PCR die Expression der einzelnen Isoformen in den zwei verschiedenen Geweben analysiert.

3.4.2.1 Auswahl eines geeigneten Referenzgens

Als mögliches Referenzgen wurde zunächst Aktin getestet, welches ein weit verbreitetes und gängiges Referenzgen darstellt, da es als wenig reguliert gilt. Das Gen war zwar innerhalb der Wurzel und innerhalb des Sprosses jeweils sehr konstant exprimiert, doch ein Vergleich der Expression in Wurzel- und Sprossproben untereinander ergab einen nahezu 8-fachen Expressionsunterschied (Δ CT von fast 3) (Abb.28).

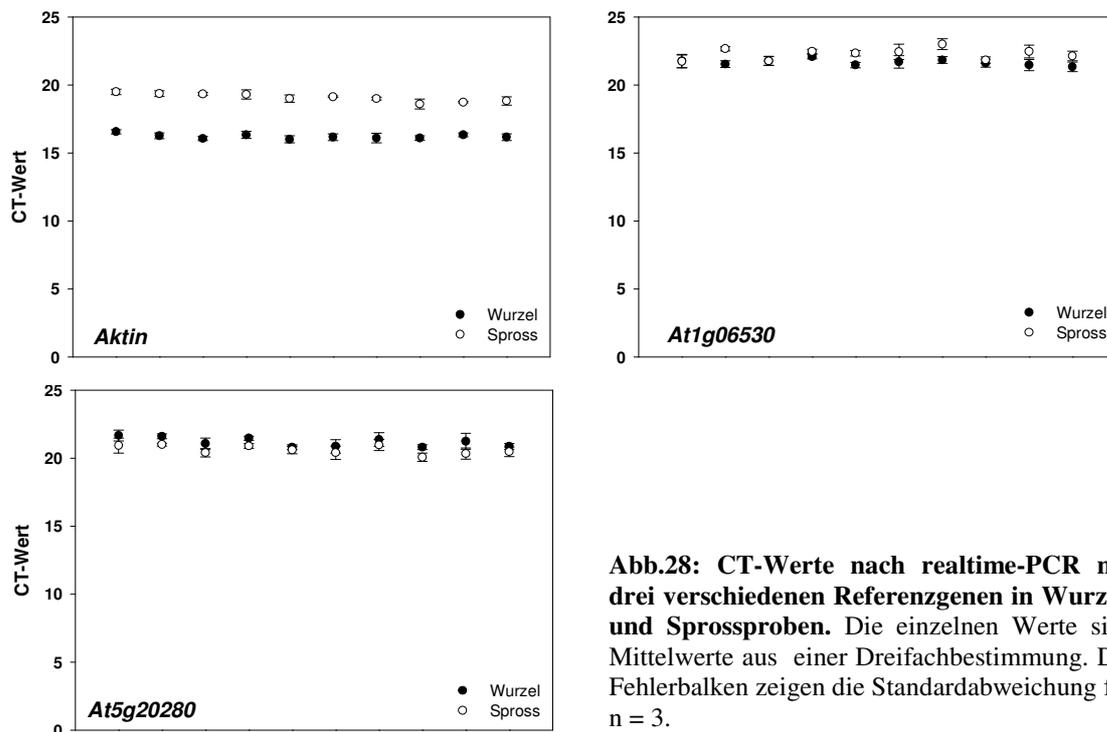


Abb.28: CT-Werte nach realtime-PCR mit drei verschiedenen Referenzgenen in Wurzel- und Sprossproben. Die einzelnen Werte sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für $n = 3$.

Um jedoch die Expression der DAHP-Synthasen in der Wurzel und im Spross untereinander vergleichen zu können, musste ein Referenzgen gefunden werden, das sowohl in der Wurzel als auch im Spross ähnliche CT-Werte ergibt. Daher wurden zwei weitere potentielle Referenzgene getestet. Das Gen At5g20180 kodiert für eine putative Saccharosphat-Synthase und das Gen At1g06530 kodiert für ein Protein, das vermutlich mit Ubiquitin interagiert. Beide Gene waren sowohl in den Wurzel- als auch in den Sprossproben nahezu identisch und konstant exprimiert (Abb.28). Die Differenz zwischen den CT-Werten in Spross und in Wurzel innerhalb der einzelnen Pflanzenpools lag für das Referenzgen AT5g20280 niedriger, so dass dieses als Referenzgen für die folgenden Analysen verwendet wurde.

3.4.2.2 Expression der drei DAHP-Synthasen in Wurzel und Spross

Sowohl in den Wildtyp-Pflanzen als auch in den Knockout-Pflanzen stellte die DAHP-Synthase 3 die am höchsten, und die DAHP-Synthase 2 die am niedrigsten exprimierte Isoform dar. Dies gilt für das Spross- und das Wurzelgewebe gleichermaßen. In Abbildung 29 ist die Expression der drei Isoformen exemplarisch nur im Wildtyp dargestellt, da sich in den Knockout-Mutanten keine Unterschiede zeigten. Die Darstellung der Expressionswerte aller Gene im Spross und in der Wurzel der verschiedenen Pflanzen findet sich im Anhang (Abb.51, Tab.9 und Tab.10).

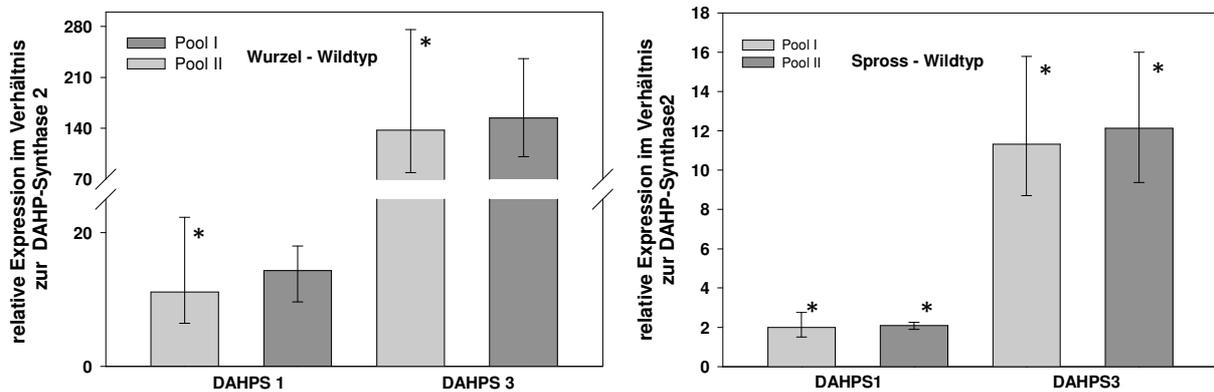


Abb.29: Die relative Expression der DAHP-Synthasen in der Wurzel (links) und im Spross (rechts) von Wildtyp-Pflanzen. Die Ergebnisse der Analyse von zwei Pflanzenpools sind in jeweils unterschiedlichen Farben dargestellt. Für jeden Pool wurden fünf Pflanzen geerntet. Die Expressionswerte wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Die CT-Werte der DAHP-Synthase 2 dienten dabei als Kontrollgruppe, so dass die Expression der jeweiligen Isoformen in Relation zur Expression der DAHP-Synthase 2 dargestellt ist. Die Standardfehler (Fehlerbalken) und die Signifikanz der Ergebnisse wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. * = signifikanter Unterschied im Vergleich zur Expression der DAHP-Synthase 2; $p \leq 0,05$.

Ein Vergleich der Expressionswerte in der Wurzel und im Spross ergab für die Wildtyp-Pflanzen und für die Knockout-Pflanzen dasselbe Bild. Die Expression der DAHP-Synthasen 1 und 3 lag in der Wurzel deutlich höher als im Spross. Die Expression der DAHP-Synthase 2 in der Wurzel hingegen war der im Spross ähnlich oder lag sogar niedriger (Tab.4). In Abb.30 ist dieser Vergleich der Expression der DAHP-Synthasen in Wurzel und in Spross exemplarisch für den Wildtyp graphisch dargestellt.

Tab.4: Die Expression der DAHP-Synthasen in der Wurzel im Vergleich zur Expression im Spross. Die Ergebnisse der Analyse von zwei Pflanzenpools werden jeweils als Expression I und Expression II bezeichnet. Für jeden Pool wurden fünf Pflanzen geerntet. Die Expressionswerte wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Die CT-Werte der Sprossproben dienten dabei als Kontrollgruppe, so dass die Expression der Isoformen in Relation zur Expression der jeweiligen Isoform im Spross dargestellt ist. Die Standardfehler und die Signifikanz der Ergebnisse wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Ein signifikanter Unterschied zur Expression im Spross besteht wenn $p \leq 0,05$.

Pflanzenlinie	Isoform	x-fache Expression I	Standardfehler I	$p \leq 0,05$	x-fache Expression II	Standardfehler II	$p \leq 0,05$
Wildtyp	1	3,4	2,1 – 6,8	-	4,5	4,0 – 4,9	ja
	2	0,6	0,4 – 1,0	-	0,7	0,5 – 0,9	-
	3	7,3	4,5 – 13,7	-	8,2	5,6 – 12,0	ja
DAHPS1 KO	2	0,5	0,2 – 1,0	-	1,2	1,0 – 1,4	-
	3	7,6	4,0 – 14,8	ja	20,2	14,5 – 29,9	ja
DAHPS2 KO	1	9,2	6,6 – 11,3	ja	6,1	4,9 – 8,1	ja
	3	9,4	6,0 – 13,9	ja	11,3	8,7 – 14,9	ja
DAHPS 3 KO	1	4,6	3,5 – 6,2	ja	4,8	3,1 – 6,7	-
	2	0,6	0,5 – 0,7	-	0,4	0,3 – 0,6	-
DAHPS 2_3 KO	1	3,8	2,5 – 5,5	ja	4,9	4,1 – 5,7	-

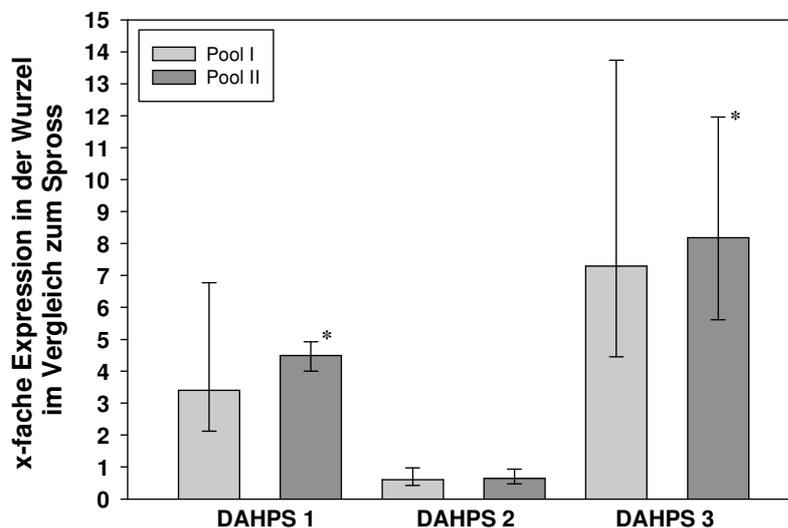


Abb.30 Die Expression der DAHP-Synthasen in der Wurzel im Vergleich zur Expression im Spross von Wildtyp-Pflanzen. Die Ergebnisse der Analyse von zwei Pflanzenpools sind in jeweils unterschiedlichen Farben dargestellt. Für jeden Pool wurden fünf Pflanzen geerntet. Die Expressionswerte wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Die CT-Werte der Sprossproben dienten dabei als Kontrollgruppe, so dass die Expression der Isoformen in Relation zur Expression der jeweiligen Isoform im Spross dargestellt ist. Die Standardfehler (Fehlerbalken) und die Signifikanz der Ergebnisse wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den von REST 2009© ermittelten Standardfehler. * = signifikanter Unterschied im Vergleich zur Expression im Spross. $p \leq 0,05$.

3.4.3 Knockout-Linien unter diversen Stressbehandlungen

Wie bereits erwähnt zeigten die Wildtyp-Pflanzen und die Knockout-Mutanten unter Standardbedingungen denselben Phänotyp. Die Modifizierung von Wasserverfügbarkeit und Nährstoffen wirkten sich zwar auf den Phänotyp aller Linien aus, brachten jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten zum Vorschein. Tabelle 5 und Abbildung 31 geben einen Überblick über die Auswirkungen von veränderten Anzuchtbedingungen.

Die Anzucht in sehr kalter Umgebung bei Temperaturen von 5°C führte zu einem Stillstand des Wachstums ab Beginn der Stressbehandlung bei allen Pflanzen. In Nullerde, die etwa fünfmal weniger Calciumchlorid und Kalium und viermal weniger Phosphor als Normalerde enthält, zeigten alle Pflanzen einen Zwergenwuchs.

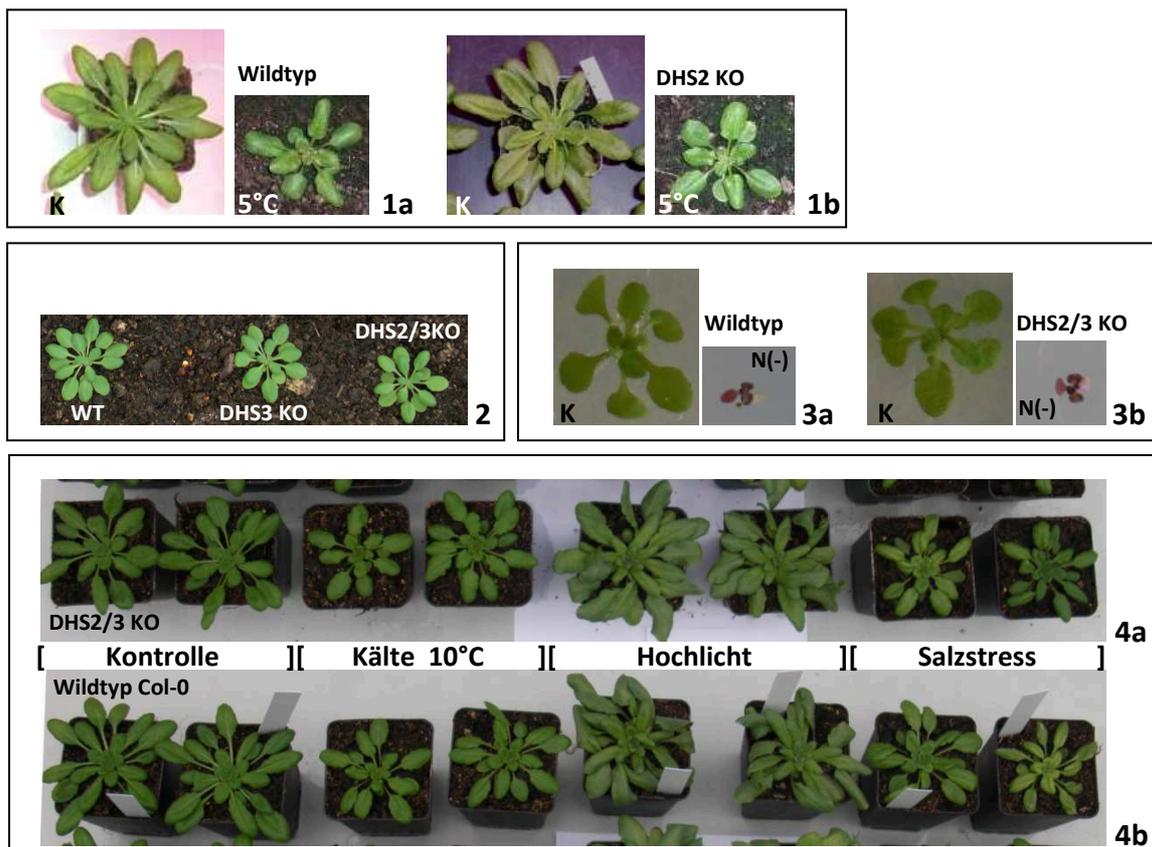


Abb.31: Überblick über die Auswirkung verschiedener Stressbehandlungen auf Wildtyp-Pflanzen und Mutanten. Details zu den Stress-Behandlungen sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Es sind stets exemplarisch Pflanzen des Wildtyps und mindestens eine der KO-Pflanzen dargestellt, wie in den Abbildungen jeweils gekennzeichnet.

Tab.5: Überblick über die Auswirkung verschiedener Stressbehandlungen auf Wildtyp-Pflanzen und Mutanten. Wenn nicht anders angegeben waren die Pflanzen während der Belichtungszeit einem Licht von 100 bis 150 μE Licht ausgesetzt. Temperatur und Luftfeuchte (LF) sind stets sowohl für die Belichtungszeit als auch für die Dunkelphase angegeben (Licht/Dunkelheit).

Behandlung	Dauer der Behandlung	Alter der Pflanzen bei Ernte	Kontrolle	Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten	Effekt der Behandlung	Bilder
5°C; 12 h Licht; 80%/80% LF	15 Tage	5 Wochen	22°C; 14 h Licht; 60%/60% LF	nein	Einstellung des Wachstums	Abb.31: 1a,1b
Nullerde; 8 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60% LF	6 Wochen	6 Wochen	Normalerde 8 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60% LF	nein	geringeres Wachstum	Abb.31: 2
Hoaglandplatten ohne Stickstoff	3 Wochen	3 Wochen	Hoaglandplatten mit Stickstoff; 10 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60% LF	nein	kaum Wachstum, Rotfärbung	Abb.31: 3a,3b
Hoaglandplatten mit 1/50 Stickstoff	3 Wochen	3 Wochen	Hoaglandplatten mit Stickstoff; 10 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60% LF	nein	Geringes Wachstum und Chlorose der Blätter	-
Hochlicht 600-700 μE ; 8 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60%LF	7 Tage	5 Wochen	8 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60%LF	nein	Starkes Wachstum	Abb.31: 4a,4b
Salzstress 300 mM NaCl; 8 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60%LF	7 Tage	5 Wochen	8 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60%LF	nein	Geringeres Wachstum	Abb.31: 4a,4b
10°C; 8 h Licht; 50%/60%LF	7 Tage	5 Wochen	8 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60%LF	ja	Doppelmutante zeigt höchste Zunahme an Frischgewicht	Abb.31: 4a,4b
24 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60%LF	7 Tage	5 Wochen	8 h Licht; 22°C/18°C; 50%/60%LF	ja	Wildtyp zeigt höchste Zunahme an Frischgewicht	Abschnitt 3.4.3.1

Bei der Anzucht auf Agarplatten ohne Stickstoffzusatz hörten alle Pflanzen kurz nach der Keimung auf zu wachsen und zeigten eine starke Rotfärbung. Eine verringerte Stickstoffverfügbarkeit führte bei allen Pflanzen zu sehr geringen Wachstum und einer Chlorose der Blätter. Die Anzucht unter starkem Lichteinfluss von 600-700 μE führte zu einem starken Wachstum aller Pflanzen. Unterschiede im Frischgewicht ließen sich nicht feststellen. Unter Salzstress, der durch das Bewässern mit 300 mM NaCl-Lösung gegeben wurde, zeigten alle Pflanzen ein etwas geringeres Wachstum als die Pflanzen unter Kontrollbedingungen (Abb.31). Erst die Anzucht unter kontinuierlicher Belichtung und die

Anzucht in einer Umgebungstemperatur von 10°C wirkten sich auf die Wildtyp-Pflanzen und die Knockout-Mutanten unterschiedlich aus. Unter Dauerlicht zeigte der Wildtyp eine stärkere Zunahme des Frischgewichts im Vergleich zur Kontrolle als die Mutanten. In einer Umgebungstemperatur von 10 °C hatte die Doppel-Knockout-Mutante für die Isoformen 2 und 3 die höchste Zunahme an Frischgewicht im Vergleich zum Wildtyp und den anderen Mutanten. Eine detaillierte Darstellung der Pflanzen unter 24 Stunden Dauerbelichtung und in 10°C Umgebungstemperatur wird in den folgenden Abschnitten gegeben.

3.4.3.1 Knockout-Linien in 24 Stunden Licht

3.4.3.1.1 Frischgewichte

Unter kontinuierlicher Belichtung zeigten sowohl die Knockout-Mutanten als auch der Wildtyp eine leichte Akkumulation von Anthocyanen an der Blattunterseite und die Blätter waren nicht flach wie in der Kontrollgruppe, sondern vor allem die älteren Blätter waren nach unten gerollt. Stellenweise zeigten sich kleine punktförmige helle Flecken an der Blattoberseite (Abb.32). Der Vergleich der Frischgewichte von Kontrollpflanzen und der Pflanzen in 24 Stunden Dauerlicht ergab einen deutlichen Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Knockout-Mutanten.



Abb.32: Phänotyp des Wildtyps Col-0 nach Dauerlichtbehandlung. Die Pflanzen wurden für 7 Tage einem kontinuierlichen Dauerlicht von 100-150 μE ausgesetzt. Es zeigte sich eine leichte Rotfärbung an der Blattunterseite und vereinzelt helle Flecken an der Blattoberseite. Die Knockout-Mutanten zeigten denselben Phänotyp.

Die Wildtyp-Pflanzen zeigten im Dauerlicht im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant erhöhtes Frischgewicht. Bei den Knockout-Mutanten hingegen unterschieden sich die Frischgewichte unter den beiden Anzuchtbedingungen kaum oder nicht signifikant (Abb.33).

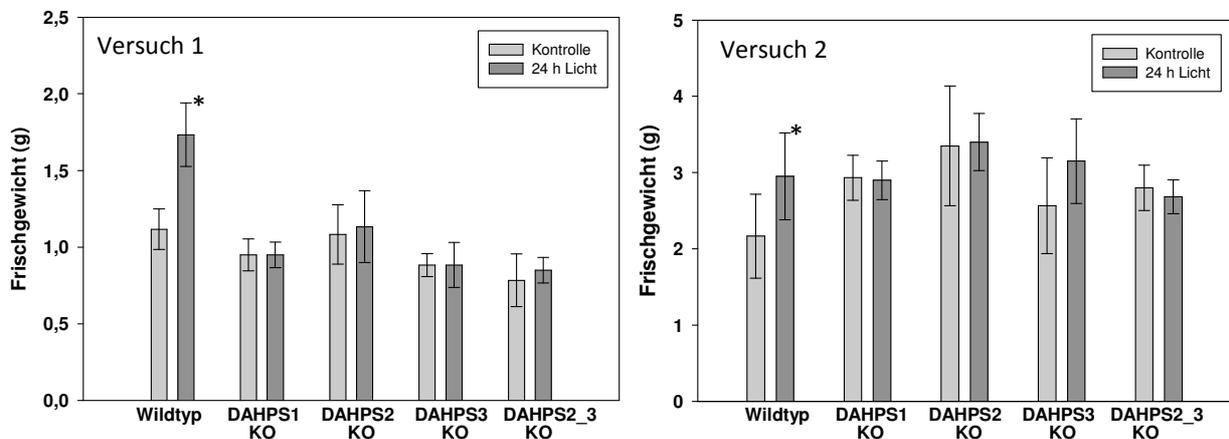


Abb.33: Frischgewichte von Wildtyp- und Knockout-Pflanzen in zwei Versuchen mit 24 Stunden Dauerlicht. Die Pflanzen wurden für 7 Tage einem kontinuierlichen Dauerlicht von 100-150 μE ausgesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass die Kontrollpflanzen und die jeweiligen Pflanzen unter Dauerlicht zu Versuchsbeginn die gleiche Größe aufwiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Frischgewichte pro Pflanze direkt nach Ernte. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für $n=6$. „*“ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Frischgewichten der behandelten Pflanzen und den jeweiligen Kontrollpflanzen, $p < 0,001$ in Versuch 1 und $p < 0,05$ in Versuch 2. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt.

3.4.3.1.2 Genexpression

Die Expression der verschiedenen Isoformen der DAHP-Synthase und einer Isoform der PAL (PAL1) in den Kontroll-Pflanzen und in den Pflanzen unter Dauerlicht wurde mittels realtime-PCR analysiert. Dabei wurde das Blattmaterial als RNA-Quelle genutzt. Vergleicht man die Genexpression der vier Enzyme in den Wildtyp-Pflanzen und den Mutanten, so zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb.34).

Vergleicht man die Genexpression aller Pflanzen unter Dauerlicht mit den entsprechenden Kontrollpflanzen, so war sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten im Mittel die DAHP-Synthase 1 herunterreguliert (x-fache Induktion 0,6-0,8) und die DAHP-Synthase 3 leicht hochreguliert (x-fache Induktion etwa 1,3). Die PAL-Expression war sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten im Dauerlicht im Mittel dreifach höher als in den Kontrollpflanzen. Ein

Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Abb.34).

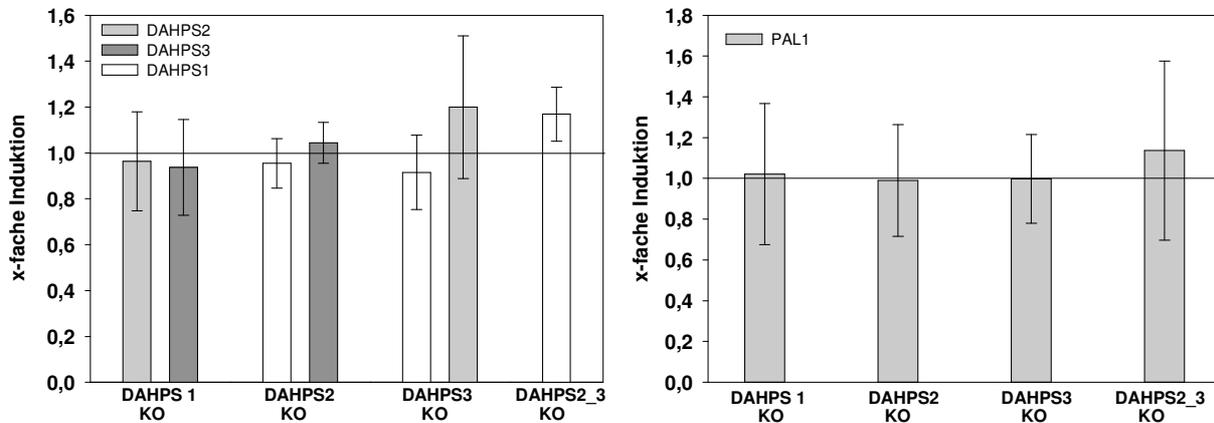


Abb.34: x-fache Expression der DAHP-Synthasen (links) und der PAL1 (rechts) in den Knockout-Pflanzen in Dauerlicht im Vergleich zum Wildtyp in Dauerlicht. Die Pflanzen wurden für 7 Tage einem kontinuierlichen Dauerlicht von 100-150 μ E ausgesetzt. Jeder Expressionswert zeigt den Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 Pflanzenpools à 3Pflanzen. Die Expressionswerte wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Die CT-Werte der Wildtyp-Analysen wurden als Kontrollgruppe verwendet, so dass die Expression der Isoformen in Relation zur Expression der jeweiligen Isoform im Wildtyp unter Dauerlicht dargestellt ist. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für n = 4. Es zeigte sich laut dem Programm REST 2009© insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression im Wildtyp und in den Knockout-Mutanten.

3.4.3.1.3 Aminosäuregehalt

Neben der Genexpression und dem Frischgewicht wurden ebenfalls die Aminosäuren in den Versuchspflanzen analysiert. Ein Vergleich der aromatischen Aminosäuren in den Sprossen der Kontrollpflanzen ergab in den KO-Pflanzen für die DAHP-Synthase 2 eine signifikant höhere Konzentration an Phenylalanin als im Wildtyp oder in den anderen Knockout-Pflanzen. Auch die Konzentration von Tryptophan ist leicht, aber signifikant gegenüber den KO-Pflanzen für die DAHP-Synthasen 1 und 3 und die Doppelmutante erhöht. Die Analyse des Gehalts an Tyrosin hingegen ergab für alle Pflanzen ein ähnliches Ergebnis. Die Konzentration aller drei aromatischen Aminosäuren war sowohl im Wildtyp als auch in den Knockout-Mutanten unter Dauerlicht erhöht gegenüber den Pflanzen unter Kontrollbedingungen (Abb.35).

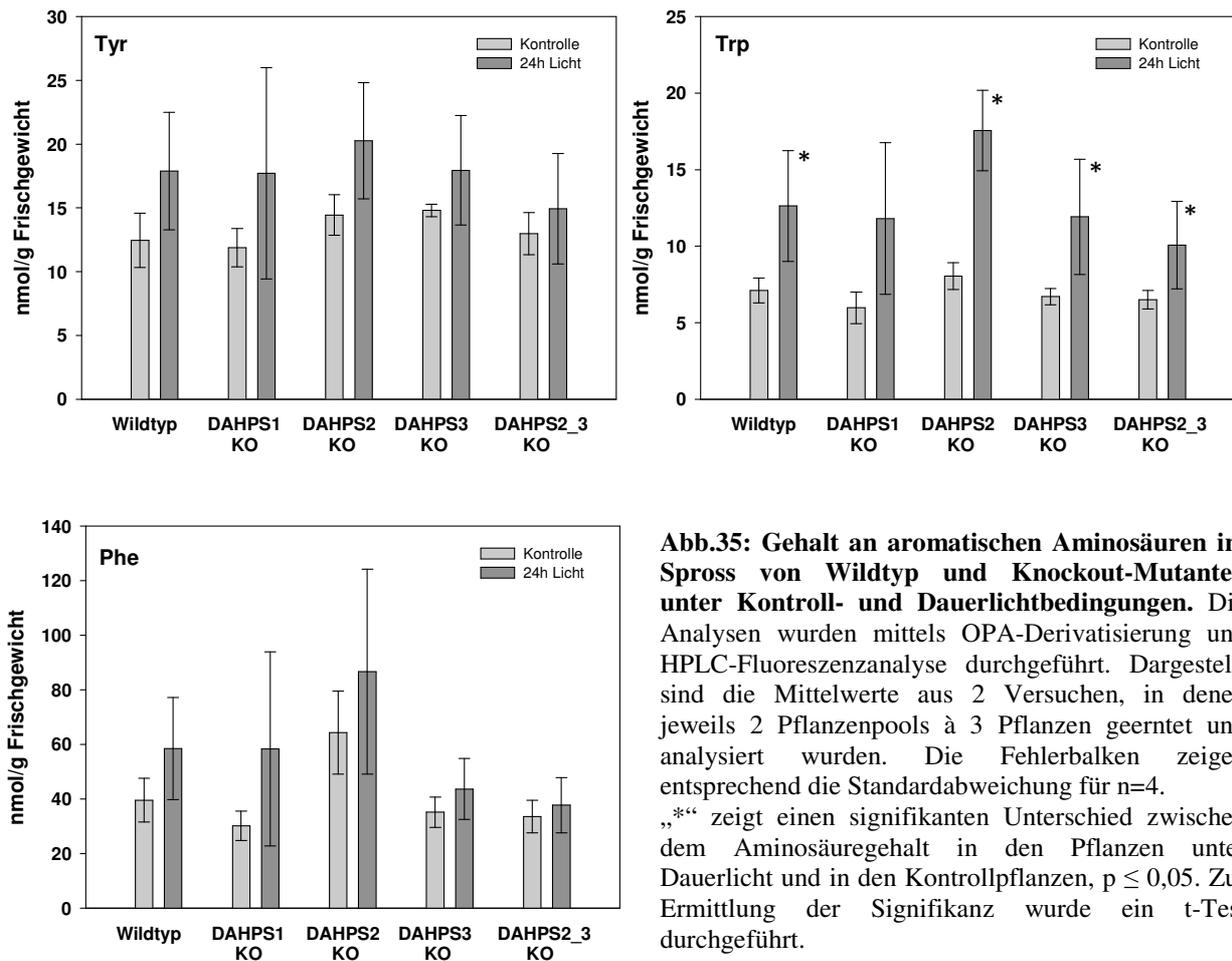


Abb.35: Gehalt an aromatischen Aminosäuren im Spross von Wildtyp und Knockout-Mutanten unter Kontroll- und Dauerlichtbedingungen. Die Analysen wurden mittels OPA-Derivatisierung und HPLC-Fluoreszenzanalyse durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen, in denen jeweils 2 Pflanzenpools à 3 Pflanzen geerntet und analysiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen entsprechend die Standardabweichung für n=4. „*“ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Aminosäuregehalt in den Pflanzen unter Dauerlicht und in den Kontrollpflanzen, $p \leq 0,05$. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse einiger ausgewählter Aminosäuren dargestellt, die eine wesentliche Rolle im Stickstoffhaushalt der Pflanze spielen. Sie dienen als Stickstofftransportform, sind Bausteine für andere Aminosäuren oder für Purin- und Pyrimidinnukleotide oder sie entstehen bei der Photorespiration.

Die Konzentrationen von Asparagin (Asn), Serin (Ser) und Glutamin (Gln) waren in den Pflanzen unter Dauerlicht erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dagegen waren die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu) und Glycin (Gly) unter Dauerlichtbedingungen niedriger konzentriert als unter Kontrollbedingungen (Abb.36).

Die Abnahme der Konzentration von Asparaginsäure war für die DAHP-Synthase-3-Knockout-Pflanzen unter kontinuierlichem Licht nicht so stark ausgeprägt wie für die anderen Pflanzen. Schaut man sich die Ergebnisse der beiden Einzelversuche getrennt an (Ergebnisse nicht dargestellt), so war im ersten Versuch die Konzentration der Asparaginsäure sogar leicht erhöht (1,1fach im Vergleich zur Kontrolle) und im zweiten Versuch nur leicht erniedrigt

(0,9fach im Vergleich zur Kontrolle). Für die anderen Pflanzenlinien waren die Asp-Konzentrationen im ersten Versuch 0,7fach bis 0,9fach verglichen mit der Kontrollgruppe, und im zweiten Versuch 0,6fach bis 0,8fach.

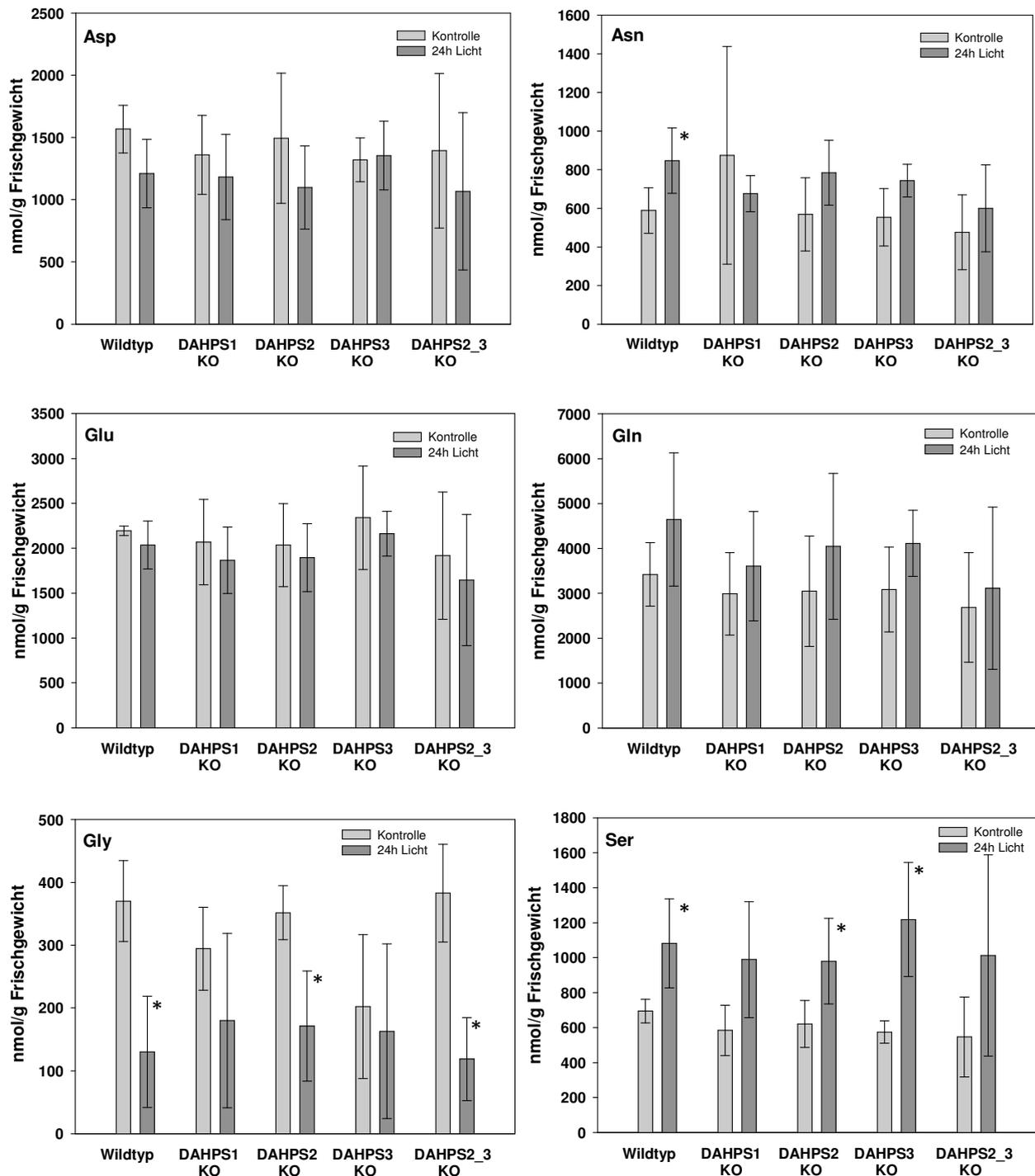


Abb.36: Gehalt an ausgewählten Aminosäuren im Spross von Wildtyp- und Knockout-Pflanzen unter Kontroll- und Dauerlichtbedingungen. Die Analysen wurden mittels HPLC durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen, in denen jeweils 2 Pflanzenpools à 3 Pflanzen geerntet und analysiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen also die Standardabweichung für n = 4. „*“ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Aminosäuregehalt in den Pflanzen unter Dauerlicht und in den Kontrollpflanzen, $p \leq 0,05$. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt.

Für die Aminosäure Glycin zeigte die Knockout-Mutante für die DAHP-Synthase 3 erneut dieses Bild. Auch hier war die Abnahme der Gly-Konzentration geringer unter Dauerlicht als bei den anderen Pflanzenlinien. Im ersten Versuch war die Konzentration noch etwa 0,5fach gegenüber den Kontrollpflanzen und im zweiten Versuch sogar leicht erhöht mit einer 1,1fachen Konzentration. Die anderen Pflanzenlinien zeigten hier im ersten Versuch eine 0,2 bis 0,4fache und im zweiten Versuch eine 0,4 bis 0,7fache Konzentration der Aminosäure Glycin gegenüber der Kontrolle.

Betrachtet man die Konzentrationen der Aminosäure Asparagin, so fällt für die Knockout-Mutante für die DAHP-Synthase 1 im Mittel eine Ab- statt einer Zunahme an Asparagin im kontinuierlichen Licht auf. Doch in der Einzelauswertung der beiden Versuche mit Dauerlicht (Ergebnisse nicht dargestellt) zeigte diese Knockout-Mutante im ersten Versuch dasselbe Verhalten wie die anderen Pflanzenlinien und nur im zweiten Versuch wich sie von diesem Verhalten ab. Unter Kontrollbedingungen wies sie hier eine 2,3 bis 3,6fach höhere Asn-Konzentration auf als die anderen Pflanzen, während die entsprechende Asn-Konzentration unter Dauerlicht im selben Bereich lag wie die der anderen Pflanzenlinien. Somit ist dieses widersprüchliche Ergebnis und dieser extrem hohe Wert in der Kontrolle des zweiten Versuches nur schwer zu beurteilen.

3.4.3.1.4 Ammonium- und Phenolgehalt

Ammonium (NH_4^+) ist ein zentrales Intermediat im Stickstoffhaushalt der Pflanze und der Ammoniumgehalt kann Hinweise auf die Stickstoffverfügbarkeit der Pflanze geben. Der Ammoniumgehalt der Knockout-Mutanten und des Wildtyps aus einem der 24-h-Licht-Versuche wurde mittels des Küvettentests der Firma HACH LANGE analysiert.

Ein Vergleich der Ammoniumgehalte in den Sprossen von Kontrollpflanzen und der Pflanzen unter Dauerlicht erbrachte weder einen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten, noch zwischen den verschiedenen Behandlungen (Tab.6).

Pflanzliche Phenole stellen eine große heterogene Gruppe von Sekundärstoffen dar. Die meisten dieser Stoffe werden im Phenylpropanoidweg über die Aminosäure Phenylalanin synthetisiert.

Tab.6: Ammoniumgehalt im Spross von Wildtyp und Knockout-Mutanten. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem 24 h-Licht-Versuch. Dabei wurden 2 Pflanzenpool der Kontrollgruppe und 2 Pflanzenpools der Gruppe unter Dauerlicht mit jeweils 3 Pflanzen analysiert. Die Analysen wurden mit einem Küvetten-Test der Firma HACH LANGE durchgeführt.

Pflanzenlinie	Ammoniumgehalt (ng/mg FG)		Ammoniumgehalt (ng/mg FG)	
	Kontrolle Pool I	24 h Licht Pool I	Kontrolle Pool II	24 h Licht Pool II
Wildtyp	42,86	51,98	49,73	50,50
DAHPS1 KO	57,48	63,56	41,78	40,73
DAHPS2 KO	51,98	45,73	48,50	51,88
DAHPS3 KO	48,99	44,46	46,39	48,88
DAHPS2_3 KO	52,76	48,81	42,16	47,64

Somit gibt der Phenolgehalt Auskunft über die Aktivität des Shikimatweges, der das Eingangssubstrat Phenylalanin bereitstellt, und über die Aktivität des Phenylpropanoidweges, der dieses Substrat zu diversen phenolischen Substanzen weiterverarbeitet. Der mittlere Phenolgehalt in den Sprossen der Kontrollpflanzen lag zwischen 4,2 und 5,3 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht in allen Linien. Nach 7 Tagen Dauerlichtbehandlung waren in allen Pflanzenlinien die Phenolgehalte etwa 1,2fach erhöht im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen (Abb. 37).

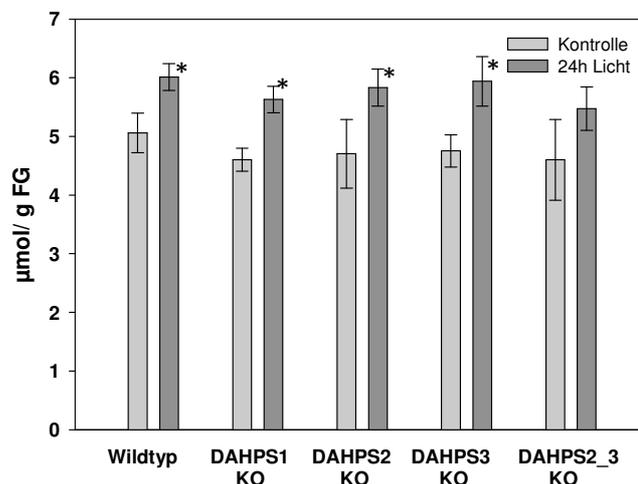


Abb.37: Phenolgehalt im Spross von Wildtyp und Knockout-Mutanten nach 7 Tagen Dauerlichtbehandlung und unter Kontrollbedingungen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus beiden 24h-Licht-Versuchen. Dabei wurden in jedem Versuch jeweils 2 Pflanzenpool der Kontrollgruppe und 2 Pflanzenpools der Gruppe unter Dauerlicht mit jeweils 3 Pflanzen analysiert. Dargestellt sind hier die Mittelwerte aus beiden Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für $n = 4$. In allen Pflanzenlinien war der Phenolgehalt unter 24-h-Licht-Bedingungen um etwa 20% erhöht. „*“ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Phenolgehalt in den Pflanzen unter Dauerlicht und in den Kontrollpflanzen, $p \leq 0,05$. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt.

3.4.3.2 Knockout-Linien unter Kältestress

3.4.3.2.1 Frischgewichte

Es wurden zwei Versuche durchgeführt, in denen die Pflanzen für 7 Tage bei einer Temperatur von 10°C aufgezogen wurden. In beiden Versuchen zeigten der Wildtyp und die Einzel-Knockout-Mutanten für die DAHP-Synthasen 1, 2 und 3 ein vermindertes Frischgewicht im Vergleich zu der Kontrollgruppe in einer Umgebungstemperatur von 22°C während der Belichtung und 18°C während der Dunkelphase. Die Doppel-Knockout-Mutante für die DAHP-Synthasen 2 und 3 hingegen wies im ersten Versuch kein reduziertes Frischgewicht auf, und im zweiten Versuch war es weniger verringert als das der anderen Pflanzenlinien (Abb.38 und 39).

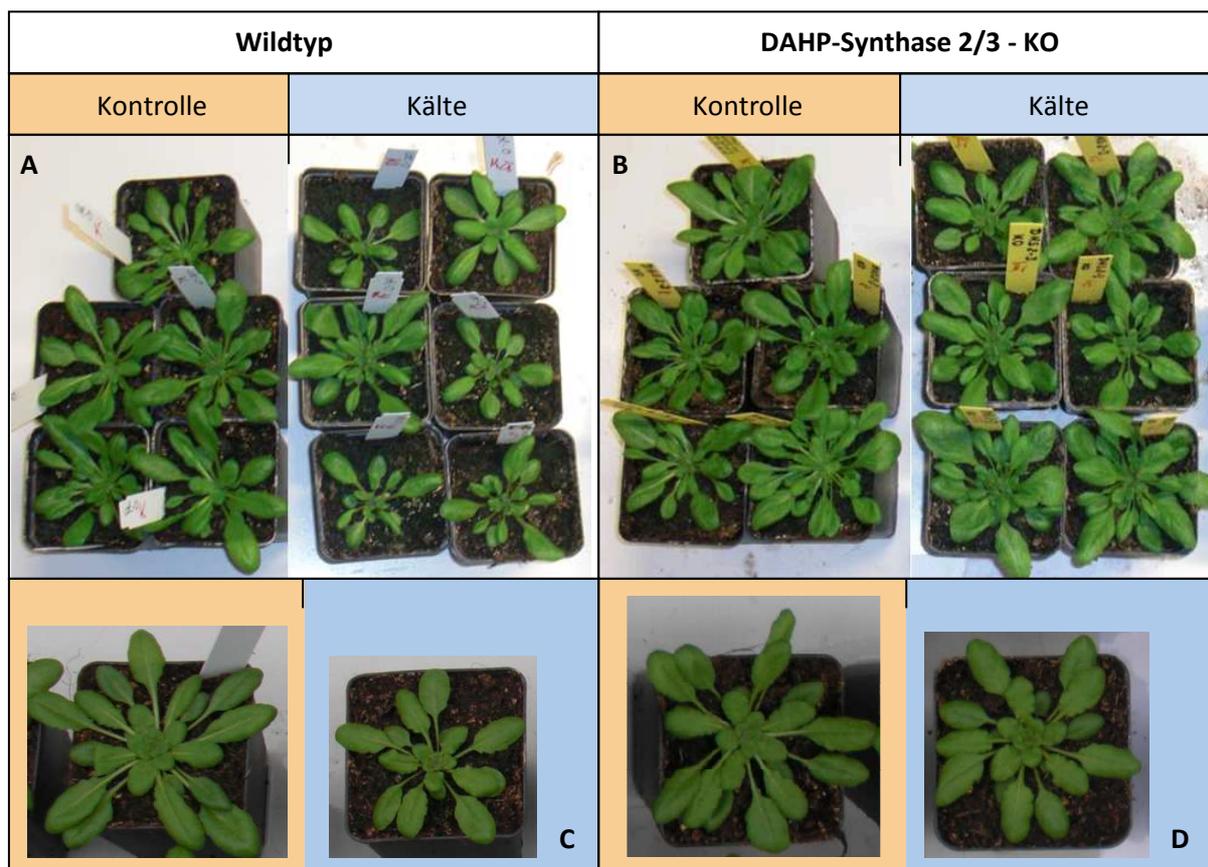


Abb.38: Wildtyp und Doppelmutante (Knockout für DAHPS 2 und 3) unter Kontrollbedingungen und in 10°C Kälte in zwei unabhängigen Versuchen. A: Versuch I Wildtyp; B: Versuch I DAHP-Synthase 2/3 Knockout-Mutante; C: Versuch II Wildtyp; D: Versuch II DAHP-Synthase 2/3 Knockout-Mutante. Die Kontrollpflanzen sind jeweils links und die Pflanzen in Kälte jeweils rechts dargestellt.

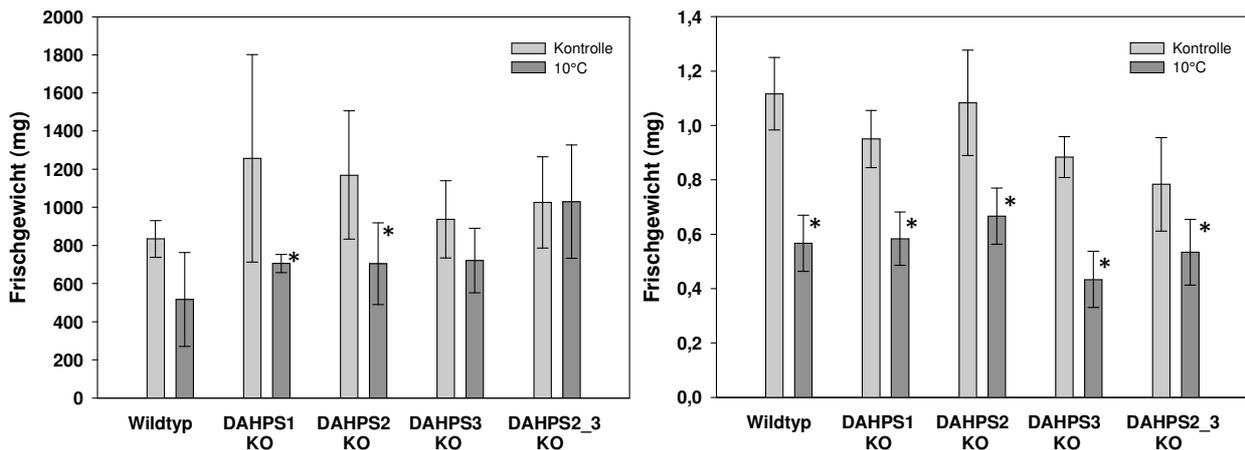


Abb.39: Frischgewichte des Wildtyps und der Knockout-Mutanten unter Kontrollbedingungen und in 10°C Kälte in Versuch I (A) und Versuch II (B). Dabei wurden in jedem Versuch jeweils 2 Pflanzenpool der Kontrollgruppe und 2 Pflanzenpools der Gruppe unter 10°C mit jeweils 3 Pflanzen analysiert. Dabei wurde das Einzelgewicht jeder Pflanze bestimmt. Dargestellt sind daher die Mittelwerte und die Standardabweichung für $n=6$. „*“ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Frischgewicht in den Pflanzen unter Kältebehandlung und in den Kontrollpflanzen, $p \leq 0,05$. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt.

So zeigte die Doppelmutante unter Kältebedingungen im ersten Versuch noch 100% des Frischgewichtes unter Kontrollbedingungen, während die anderen Pflanzenlinien unter Kälte nur noch 56 bis 77% des Frischgewichtes der Kontrolle erreichten. Im zweiten Versuch kam dieser Unterschied nicht so stark heraus, konnte jedoch tendenziell reproduziert werden. Hier wies die Doppelmutante in Kälte noch 68% des Kontrollfrischgewichtes auf, während die Frischgewichte der anderen Knockout-Mutanten und des Wildtyps zwischen 50 und 61% lagen.

3.4.3.2.2 Phenolgehalt

Unter Kältebehandlung wurde bereits in anderen Experimenten ein Anstieg des Phenolgehalts beobachtet (Kirakosyan *et al.*, 2003; Rivero *et al.*, 2001). Hier war nach 7 Tagen Anzucht in einer Umgebungstemperatur von 10°C in allen Pflanzenlinien der Phenolgehalt im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen in einer Umgebungstemperatur von 18 bis 22°C im Mittel um 30% erhöht (Abb.40).

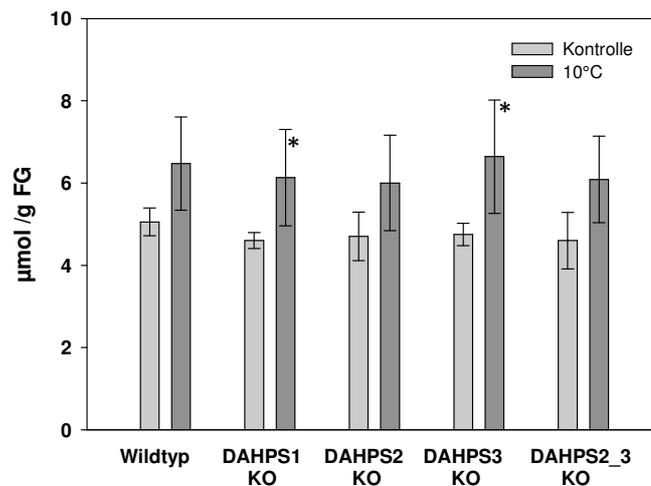


Abb.40: Phenolgehalt im Spross von Wildtyp und Knockout-Mutanten nach 7 Tagen Kältebehandlung bei 10°C und unter Kontrollbedingungen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus beiden Kälte-Versuchen. Dabei wurden in jedem Versuch jeweils 2 Pflanzenpool der Kontrollgruppe und 2 Pflanzenpools der Gruppe in 10°C Kälte mit jeweils 3 Pflanzen analysiert. Dargestellt sind hier die Mittelwerte aus beiden Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für $n = 4$. In allen Pflanzenlinien war der Phenolgehalt unter 24-h-Licht-Bedingungen etwa 1,3fach erhöht. „*“ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Frischgewicht in den Pflanzen unter Kältebehandlung und in den Kontrollpflanzen, $p \leq 0,05$. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt.

3.4.3.2.3 Aminosäuregehalt

Daten zur Aminosäureanalyse liegen nur für einen der Kälteversuche vor. Auch hier wurden pro Linie jeweils zwei Pflanzenpools geerntet und der Aminosäuregehalt in beiden Pools bestimmt. Für die Knockout-Linien der DAHP-Synthasen 2 und 3 liegen allerdings nur die Daten für einen Pool vor.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren unter Kälteeinfluss die Aminosäuren Asparagin, Serin, Threonin und Glycin erhöht. Ebenfalls erhöht waren in den Knockout-Mutanten die Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure. Auffallend dabei ist, dass der Wildtyp dabei das gegenteilige Verhalten zeigte und diese Aminosäuren im Wildtyp in der Kälte stattdessen erniedrigt waren (Abb.41).

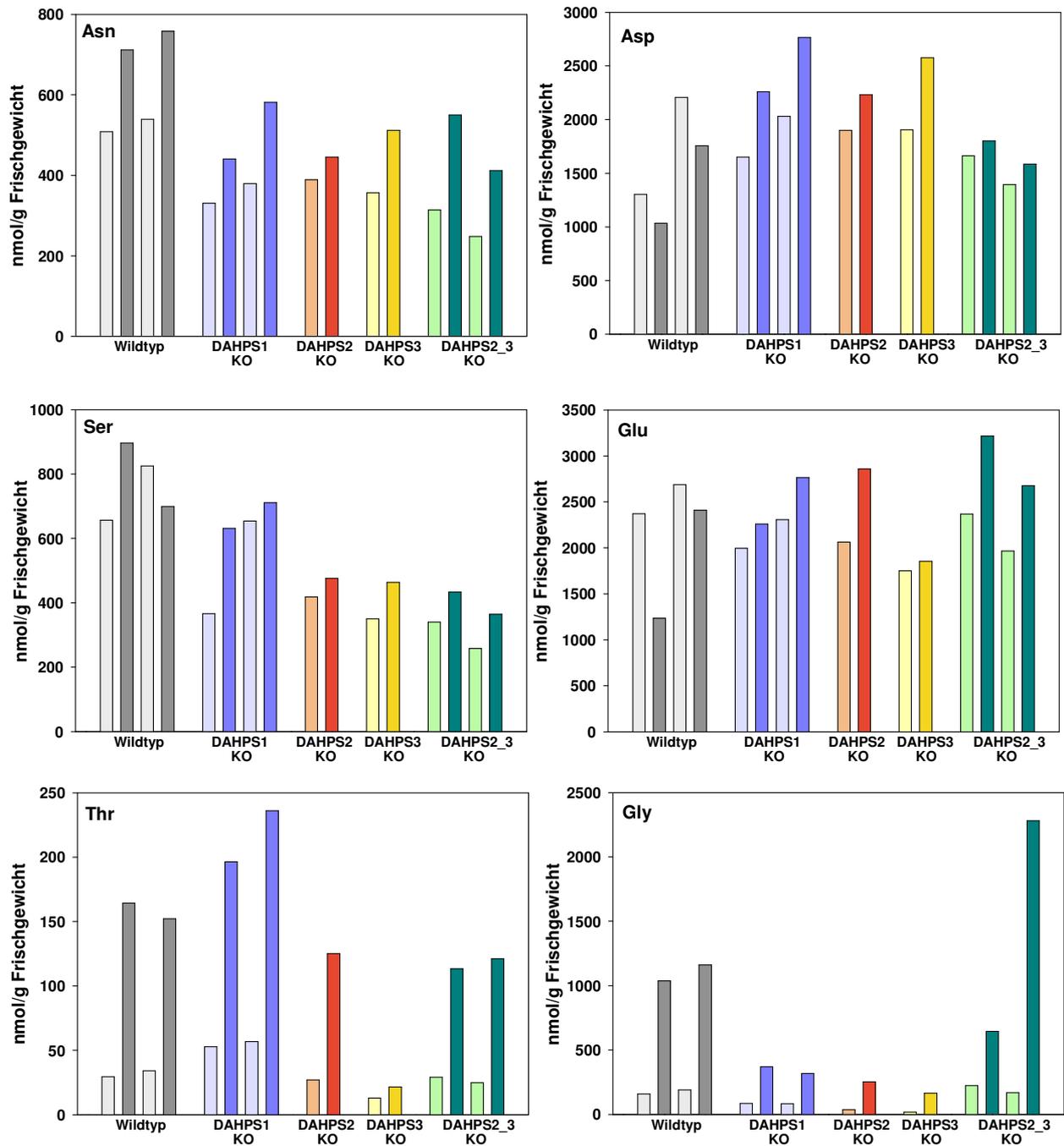


Abb.41: Gehalt an ausgewählten Aminosäuren im Spross von Wildtyp- und Knockout-Pflanzen unter Kontroll- und Kältebedingungen. Die Analysen wurden mittels HPLC durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Versuch, in dem jeweils 2 Pflanzenpools à 3 Pflanzen für jede Pflanzenlinie geerntet und analysiert wurden. Die Ergebnisse der Pools sind einzeln dargestellt. Für einige Pflanzenlinien liegen nur die Analyseergebnisse für einen Pool vor. Die hellen Farben stellen jeweils die Kontrollgruppe und die dunklen Farben die Kältegruppe dar. Wildtyp; DAHPS KO; DAHPS2 KO; DAHPS3 KO; DAHPS2_3 KO.

Für die aromatischen Aminosäuren liegen nur die Daten für Tyrosin und Phenylalanin vor. Die Konzentration von Tyrosin war in allen Pflanzenlinien unter Kälteeinfluss niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Aminosäure Phenylalanin war in der Kältegruppe im Wildtyp und in der Knockout-Mutante für die DAHP-Synthase 1 erhöht und hingegen in den Knockout-Linien für die DAHP-Synthasen 2 und 3 reduziert. Die Doppelmutante zeigte in einem Pool einen leicht erhöhten und in dem anderen Pool einen leicht reduzierten Phenylalanin-Gehalt (Abb.42).

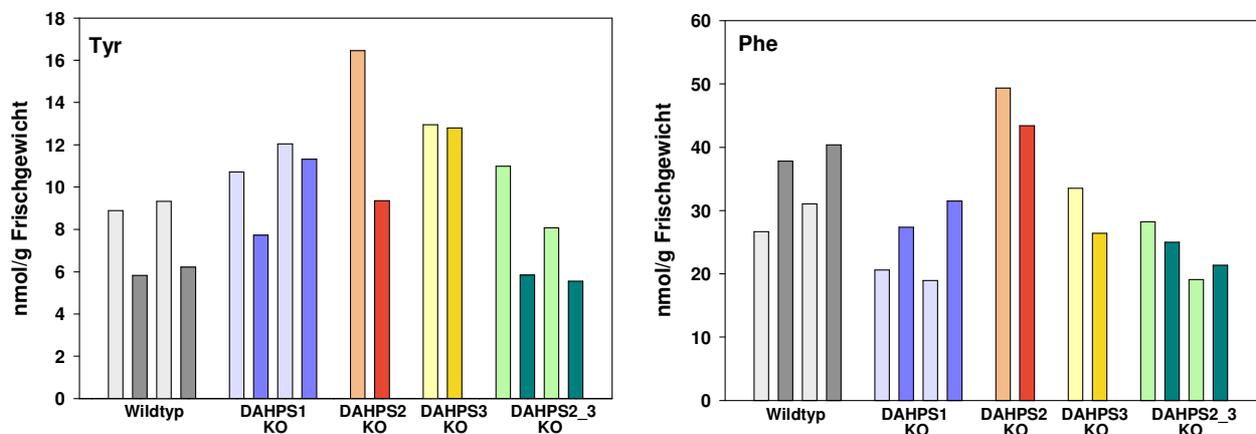


Abb.42: Gehalt an aromatischen Aminosäuren im Spross von Wildtyp- und Knockout-Pflanzen unter Kontroll- und Kältebedingungen. Die Analysen wurden mittels HPLC durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Versuch, in dem jeweils 2 Pflanzenpools à 3 Pflanzen für jede Pflanzenlinie geerntet und analysiert wurden. Die Ergebnisse der Pools sind einzeln dargestellt. Für einige Pflanzenlinien liegen nur die Analyseergebnisse für einen Pool vor. Die hellen Farben stellen jeweils die Kontrollgruppe und die dunklen Farben die Kältegruppe dar.
 ■ Wildtyp; ■ DAHPS KO; ■ DAHPS2 KO; ■ DAHPS3 KO; ■ DAHPS2_3 KO.

4 Diskussion

Der Shikimatweg spielt als Lieferant der aromatischen Aminosäuren und ihrer Vorstufen eine sehr zentrale Rolle im Stoffwechsel der Pflanze (Herrmann und Weaver, 1999; Tzin und Galili, 2010). Er liefert wesentliche Bausteine für die Proteinbiosynthese und auch für eine Vielzahl elementarer Sekundärmetabolite. Die Abwesenheit des Shikimatweges bei Säugetieren macht ihn darüber hinaus zu einem geeigneten Ziel bei der Entwicklung von Herbiziden, die bei Tier und Mensch keine toxische Wirkung aufweisen. So sind der Shikimatweg und seine Enzyme Thema und Objekt zahlreicher Untersuchungen (Übersicht in Maeda und Dudareva, 2012; Tzin und Galili, 2010). Meist wird in diesen zwischen dem Prechorismatweg und Postchorismatweg unterschieden, da bis zum Chorismat die Synthese der aromatischen Aminosäuren über einen gemeinsamen Weg erfolgt, sich jedoch ab dem Chorismat die Synthese in Richtung Phenylalanin und Tyrosin von der in Richtung Tryptophan trennt. Über die genaue Regulation des Prechorismatweges in Pflanzen ist dennoch nur wenig bekannt und die DAHP-Synthase als Eingangsenzym dieses zentralen Stoffwechselweges ist bei der Erforschung der Regulation von besonderem Interesse. In dieser Arbeit sollte zunächst nachgewiesen werden, dass die drei in Arabidopsis aufgrund von Sequenzhomologien identifizierten Gene funktionelle DAHP Synthasen kodieren. Mit Hilfe von heterolog exprimierten Enzymen sollte nach Hinweisen auf mögliche biochemische Unterschiede dieser drei DAHP-Synthasen gesucht werden. In einem weiteren Ansatz sollten entsprechende Knockout-Mutanten für die einzelnen DAHP-Synthasen unter unterschiedlichen Anzuchtbedingungen Hinweise auf mögliche funktionelle Unterschiede der verschiedenen Isoenzyme liefern.

4.1 Co-Expressionsmuster der drei DAHP-Synthasen: eine Datenbankanalyse

In verschiedenen Arbeiten konnte die differentielle Expression der drei putativen DAHP-Synthase Gene nachgewiesen werden, die bereits auf unterschiedliche Funktionen hindeuten (Betz *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2006; Ditt *et al.*, 2006; Görlach *et al.*, 1995; Keith *et al.*, 1991; Thilmony *et al.*, 2006; Vanderauwera *et al.*, 2005). Inzwischen erlauben die vorhandenen Datenbanken darüber hinaus eine genaue Co-Expressionsanalyse mit anderen Genen, welche über diese Kontext-Regulations-Analyse weitere Hinweise auf die Funktion der einzelnen

Isoformen liefern kann. Eine solche Analyse wurde mit der Datenbank ATTED-II (<http://atted.jp>; Obayashi *et al.*, 2009 und 2011) durchgeführt.

Nach dieser Co-Expressionsanalyse ist die **DAHP-Synthase 1** in ihrem Netzwerk direkt verbunden mit einem Gen der Tryptophan-Biosynthese (At2g04400) und einem Gen der Serin-Biosynthese (At4g35630). Im weiteren Netzwerk schließen sich noch vier weitere Gene an, die in die Tryptophan-Biosynthese involviert sind (At5g38530, At5g17990, At5g05730 und At3g54640) (Abb.43). Somit könnte diese Isoform der DAHP-Synthase besonders wichtig sein für die Bereitstellung der Bausteine für die Synthese der Aminosäure Tryptophan und weiterer Stoffe, die sich von Tryptophan ableiten. Eine wesentliche Verbindung, die sich von Tryptophan ableitet ist das Auxin. So kodiert tatsächlich eines mit der DAHP-Synthase 1 co-regulierten Gene für das Enzym Anthranilatsynthase-1 (ASA-1; At5g05730), welches für die Jasmonat-induzierte Auxin-Biosynthese wesentlich ist (Sun *et al.*, 2009).

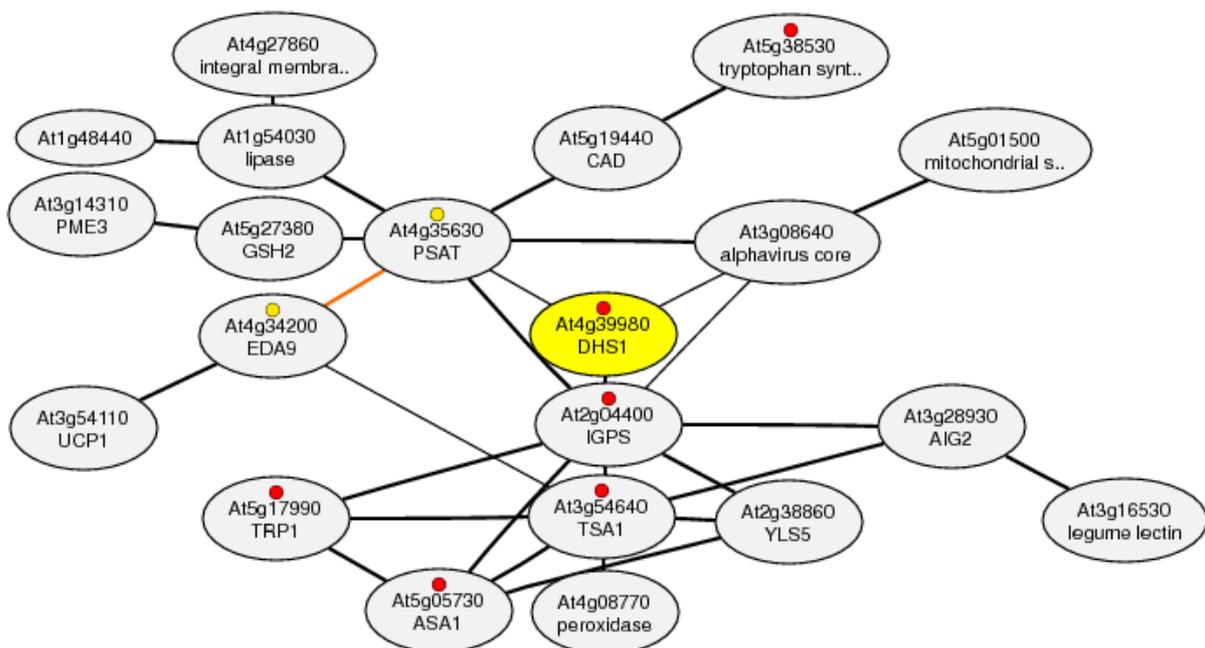


Abb.43: Co-Expressionsnetzwerk der DAHP-Synthase 1 aus Arabidopsis (At4g39980). Erstellt mit ATTED-II (<http://atted.jp>). rot: Biosynthese der aromatischen Aminosäuren; gelb: Glyn-, Serin- und Threonin Metabolismus

Für die Synthese von Auxin gibt es einen Tryptophanabhängigen und einen Tryptophanunabhängigen Weg. Der Tryptophanunabhängige Weg führt vermutlich über das

Indol-3-Glycerol-Phosphat, in dessen Synthese das ebenfalls co-regulierte Enzym IGPS involviert ist (Ouyang *et al.*, 2000). Aufgrund dieser möglichen Einbindung in die Tryptophan-Biosynthese ist es denkbar, dass die DAHP-Synthase 1 über den Tryptophan/Auxingehalt und -bedarf reguliert wird. Dies schlägt sich dann allerdings nicht in den Tryptophan-Konzentrationen der Knockout-Mutanten für die DAHP-Synthase 1 nieder, welche unverändert im Vergleich zum Wildtyp waren (Abb.35). Vermutlich wird von den anderen beiden Isoformen der DAHP-Synthase noch ausreichend Chorismat bereitgestellt, so dass der Tryptophangehalt nicht beeinflusst wird. Ein weiterer Stoff, dessen Biosynthese Tryptophan erfordert, ist das Phytoalexin Camalexin in Arabidopsis, welches bei der Abwehr von Pathogenen eine wesentliche Rolle spielt (Glawischnig *et al.*, 2004). Dies passt zu der Tatsache, dass die DAHP-Synthase 1 durch Verwundung und Pathogene induziert wird (Keith *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1999; Thilmony *et al.*, 2006). Die co-regulierte Anthranilat-Synthase ASA-1 katalysiert die erste Reaktion der Tryptophanbiosynthese und wird ebenfalls durch Verwundung und Pathogene induziert (Niyogi und Fink, 1992). Jasmonat und Methyljasmonat sind wichtige Signalsubstanzen in der Stressantwort von Pflanzen. Gene der Tryptophan-Biosynthese und der DAHP-Synthase 1 werden durch Jasmonat und Methyljasmonat hochreguliert (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2005). Auch dies unterstreicht die Bedeutung der DAHP-Synthase 1 bei der Antwort auf Stress durch Verwundung, Ozon und Pathogene (Ditt *et al.*, 2006; Keith *et al.*, 1991; Janzik *et al.*, 2005; Thilmony *et al.*, 2006).

Die **DAHP-Synthase 3** ist direkt co-reguliert mit drei Genen des Phenylpropanoidweges. Dabei handelt es sich um das Eingangsenzym des Phenylpropanoidweges, der Phenylalanin-Ammonium-Lyase PAL1 (At2g37040), um die 4-Coumarat-CoA Ligase 4CL1 (At1g51680) und die Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (At4g34050). Im weiteren Netzwerk schließen sich noch 8 weitere Gene des Phenylpropanoidweges, darunter 2 Gene der Flavonoid-Biosynthese an. Desweiteren findet man 2 Gene des Pentosephosphatweges, darunter die Transketolase (At2g45290), die den Shikimatweg mit dem Substrat E4P versorgt. Eine Untersuchung in Tabakpflanzen zeigt, dass eine verringerte Transketolase-Aktivität zu deutlich reduzierten Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren und einiger Phenylpropanoide führt. Dies wird mit einem verminderten Fluss durch den Shikimat- und Phenylpropanoidweg erklärt aufgrund des reduzierten Angebots von E4P (Henkes *et al.*, 2001). Somit deutet die Co-Expression der DAHP-Synthase 3 mit diesem Substratlieferanten für den Shikimatweg erneut auf eine zentrale Rolle dieser Isoform unter den drei DAHP-

Synthesen hin. Mit der Chorismatmutase CM1 (At3g29200) ist auch ein Gen des Shikimatweges co-reguliert mit der DAHP-Synthase 3 (Abb.44). Die Chorismatmutase ist wesentlich für die Synthese von Phenylalanin und Tyrosin, also die Substrate für den Phenylpropanoidweg. Der Phenylpropanoidweg ist ein zentraler Stoffwechselweg bei der Biosynthese der verschiedensten Sekundärstoffe, die die Pflanze zum größten Teil bei der Auseinandersetzung mit ihrer Umwelt und mit möglichen biotischen und abiotischen Stressfaktoren benötigt.

Die Expression der DAHP-Synthase 3 scheint nach diesem Co-Expressionsnetzwerk besonders mit diesem Stoffwechselweg verknüpft zu sein. Auch die Expression von dieser Isoform der DAHP-Synthase wird durch Verwundung, Ozon, Pathogene und Methyljasmonat induziert (Chen *et al.*, 2006; Ditt *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2008; Pauwels *et al.*, 2008).

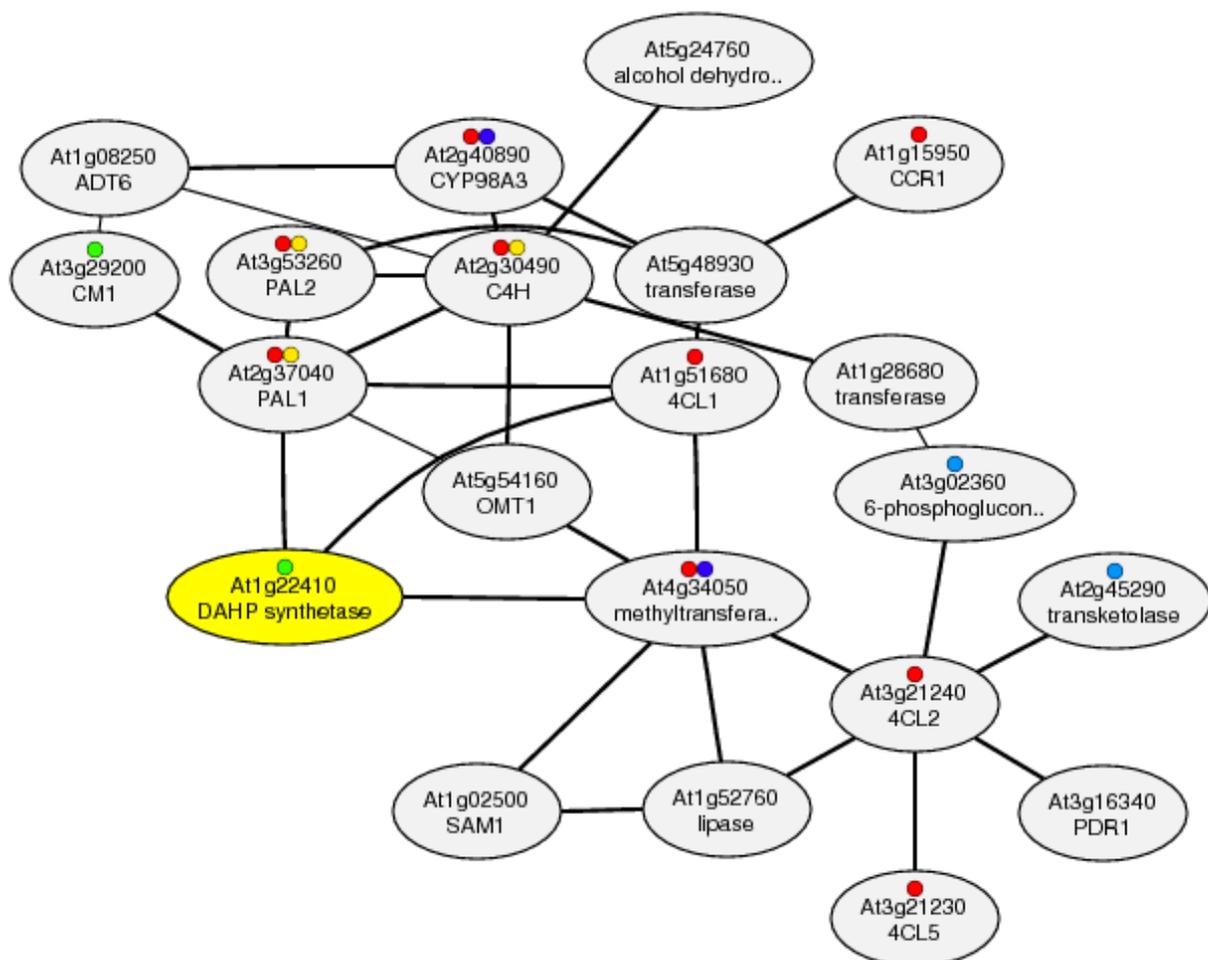


Abb.44: Co-Expressionsnetzwerk der DAHP-Synthase 3 aus Arabidopsis (At1g22410). Erstellt mit ATTED-II (<http://atted.jp>). rot: Biosynthese von Phenylpropanoiden; gelb: Phenylalanin- Metabolismus; grün: Biosynthese der aromatischen Aminosäuren; hellblau: Pentosephosphatweg; dunkelblau: Flavonoid-Biosynthese

Schaut man sich die Übersicht für die **DAHP-Synthase 2** an, so fällt auf, dass anders als bei den Isoformen 1 und 3 keine Gene des Pheylpropanoidweges oder der Aminosäure-Biosynthese direkt mit dieser Isoform co-exprimiert sind (Abb.45). Die DAHP-Synthase 2 ist direkt co-reguliert mit dem Gen für das Enzym PPH1 (At4g27800). Diese Proteinphosphatase wird für die lichtabhängige Umverteilung (state transition) von Antennenpigmentkomplexen zwischen den Photosystemen I und II benötigt (Pribil *et al.*, 2010). Zwei weitere direkt co-exprimierte Gene kodieren für Proteine mit unbekannter Funktion.

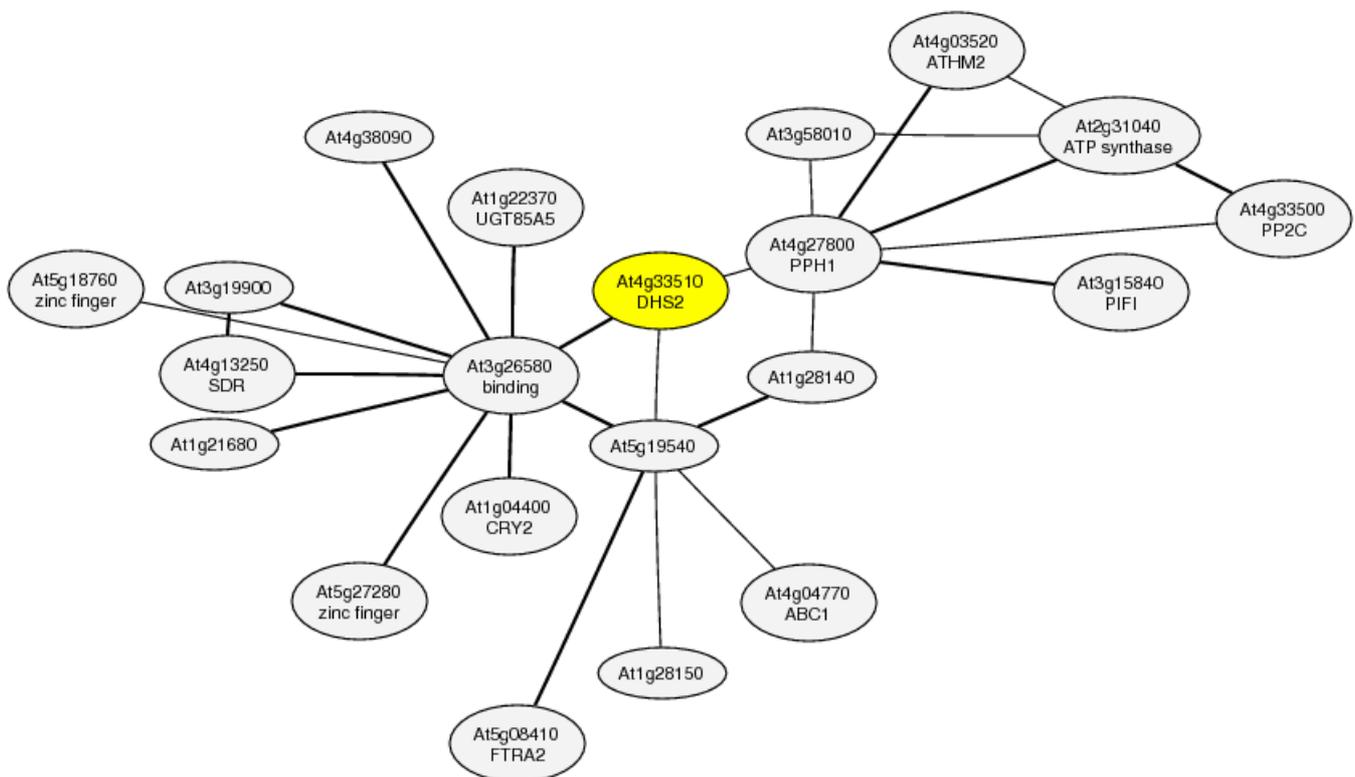


Abb.45: Co-Expressionsnetzwerk der DAHP-Synthase 2 aus Arabidopsis (At4g33510). Erstellt mit ATTED-II (<http://atted.jp>).

Die DAHP-Synthase 2, die als kaum reguliert gilt und von den drei DAHP-Synthasen sowohl in der Wurzel als auch im Spross am niedrigsten exprimiert wird, zeigt keine Co-Expression mit anderen Genen, die in zentralen Stoffwechselwegen involviert sind oder einen Hinweis auf eine spezielle Funktion dieser Isoform der DAHP-Synthase liefern. Dies unterstützt die Vermutung der konstitutiven Expression dieses Isoenzym.

4.2 Biochemische Charakterisierung der DAHP-Synthasen

In einem zweiten Schritt sollten die heterologe Expression und biochemische Charakterisierung weitere Hinweise auf unterschiedliche Funktionen der drei putativen DAHPS Gene und der entsprechend kodierten Proteine liefern.

4.2.1 Proteinaufreinigung

Durch das Anfügen eines N-terminalen Strep-Tags mit Hilfe des pET 51-Vektors konnten die drei Enzyme der DAHP-Synthase über StrepTactin-Säulen nahezu zur Homogenität und in ausreichender Menge für umfangreiche Aktivitätstest aufgereinigt werden. Dieses für die Charakterisierung eingesetzte Protein trug am N-Terminus insgesamt 14 zusätzliche Aminosäuren (Strep-Tag II, Enterokinase-Erkennungssequenz und eine zusätzliche Aminosäure für die Klonierung) im Vergleich zum vermutlich reifen Protein in der Pflanze (ermittelt mit ChloroP 1.1; Emanuelsen *et al.*, 1999). Der Strep-Tag wurde am N-terminalen Ende angefügt, da Modelle der drei DAHP-Synthasen aus Arabidopsis für 2 Isoformen eine C-terminale Helix vorhersagen. Die dritte Isoform, die DAHP-Synthase 2, trägt diese Helix nicht (Shahinas, 2009).

Das im pPAL-Vektor exprimierte Enzym völlig ohne Tag konnte erst nach einigen Optimierungen in aktiver Form gewonnen werden und nur in geringen Konzentrationen, so dass ausführliche Aktivitätstests mit diesem Material nicht möglich waren. Doch die gewonnenen Mengen waren für die DAHP-Synthase 1 ausreichend um zu zeigen, dass das Aktivitätsniveau dieses Enzyms ohne Tag dasselbe war wie das des Enzyms mit den 14 zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus. So lag die maximale spezifische Aktivität der DAHP-Synthase 1 bei der Bestimmung des pH-Optimums bei 10,2-11,8 U/mg mit Tag, und bei 11,1 U/mg ohne Tag. Darüber hinaus lagen das pH-Optimum und der K_m -Wert für Phosphoenolpyruvat (PEP) für die DAHP-Synthase 1 ohne Tag in demselben Bereich wie für die DAHP-Synthase 1 mit Tag (Details siehe Abschnitte 4.2.2 und 4.2.4). Mit dem Enzym ohne Tag konnte mittels Auftragung im SDS-Gel und geeigneter Größenstandards die Größe der drei Isoformen abgeschätzt werden. In der Literatur findet man Angaben zu aufgereinigten DAHP-Synthasen aus der Karotte und der Kartoffel. Diese wurden aus den Pflanzen mittels

nicht denaturierender Phosphocellulose-Chromatographie isoliert. Man identifizierte dabei jeweils Homodimere mit einer Masse von 103 bzw. 110 kDa (Suzich *et al.*, 1985 und Pinto *et al.*, 1986). Für die heterolog exprimierten Tag-freien DAHP-Synthasen in dieser Arbeit ergab sich eine Größe der Monomere von etwa 55 kDa für alle drei Isoenzyme (Tab.2 und Abb.9). Dies entspricht also der Größe der DAHP-Synthasen aus Karotte und Kartoffel wenn man davon ausgeht, dass auch die DAHP-Synthase aus Arabidopsis als Homodimer vorliegt. Die so ermittelten Größen liegen ebenfalls nur knapp über den aufgrund der Aminosäuresequenz abgeschätzten Größen von 51 kDa (DAHPS 2) und 53 kDa (DAHPS 1 und 3).

Die folgenden Betrachtungen zu der Charakterisierung der heterolog exprimierten DAHP-Synthasen befassen sich, falls nicht anders angegeben, mit den Ergebnissen der Proteinanalysen mit N-terminalem Strep-Tag.

4.2.2 pH-Optimum

Die Abhängigkeit der Aktivität der DAHP-Synthasen vom pH-Wert wurde in dem Bereich von pH 5,5 bis 8,5 untersucht. Die drei DAHP-Synthasen arbeiteten alle in einem ähnlichen pH-Wert-Bereich optimal. Für die DAHP-Synthase 1 ergab sich ein pH-Optimum zwischen 6,5 und 7,0. Die DAHP-Synthase 2 zeigte bei einem pH-Wert von 7,0 maximale Aktivität. Die DAHP-Synthase 3 hatte ihr pH-Optimum zwischen 6,0 und 7,5. Ein Unterschied ergibt sich hier also für die DAHP-Synthase 3, deren pH-Optimum breiter ist als das der anderen beiden Isoenzyme.

Da alle drei Isoformen eine N-terminale Chloroplastenimportsequenz besitzen (ChloroP 1.1; Emanuelsson *et al.*, 1999) ist die Lokalisation im Chloroplasten sehr wahrscheinlich. In der Kartoffel wurde bereits der Import einer DAHP-Synthase in den Chloroplasten demonstriert und die DAHP-Synthase 3 aus Arabidopsis konnte mit Hilfe einer Coexpression mit dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) im Chloroplasten nachgewiesen werden (Bayer *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte massenspektrometrisch die DAHP-Synthase 2 im Chloroplasten von Arabidopsis erfasst werden (Zybailov *et al.*, 2008, Ferro *et al.*, 2010). Die DAHP-Synthase 1 aus Arabidopsis wurde bisher nicht direkt im Chloroplasten nachgewiesen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Enzym SPP (*stromal processing peptidase*), das zuständig ist für die Prozessierung von Enzymen die aus dem Cytoplasma in den Chloroplasten transportiert werden, auch die DAHP-Synthase 1 prozessiert und die

Chloroplasten-Importsequenz entfernt (Richter *et al.*, 2005). Also befinden sich wahrscheinlich alle drei Enzyme in einem Umfeld, dessen pH-Wert zumindest im Spross stark lichtabhängig ist. Im Dunkeln liegt der pH-Wert in Stroma und Lumen etwa bei pH 7,0. Während der Lichtreaktion der Photosynthese werden Protonen über die Thylakoidmembran in das Lumen gepumpt, so dass der pH-Wert dort bis zu pH 5,0 absinken, und der pH-Wert im Stroma bis auf pH 8,0 ansteigen kann (Crofts und Horton, 1991; Werdan *et al.*, 1975). Aufgrund der unterschiedlichen pH-Wert-Bedingung innerhalb der verschiedenen Zellkompartimente ist die genaue subzelluläre Lokalisation der drei DAHP-Synthasen bei der Beurteilung ihrer pH-Optima von Bedeutung. Leider ist bisher nur wenig darüber bekannt. Proteine, die ihren Bestimmungsort im Thylakoidlumen haben, besitzen neben der Transitsequenz häufig noch eine zusätzliche Thylakoid-Transfer-Domäne. Nach erfolgreichem Transfer wird auch hier wieder die Domäne durch eine Peptidase abgetrennt und das reife Enzym entlassen (Emanuelsson *et al.*, 2000). Eine Analyse der Aminosäuresequenzen der drei DAHP-Synthasen mit dem Programm SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011; Emanuelsson *et al.*, 2007) ergab keinen Hinweis auf eine Signalsequenz für den Import ins Thylakoidlumen. In der Datenbank AT_CHLORO (Ferro *et al.*, 2010), die auf LC-MS/MS-Daten von Stroma, Thylakoiden und Chloroplastenhülle beruht, findet man allerdings Angaben zur Isoform 2 in Arabidopsis: Von der DAHP-Synthase 2 wurden 96,1% im Thylakoidlumen und nur 3,9 % im Stroma identifiziert, was auf eine Lokalisation dieser Isoform im Lumen hindeutet.

Die DAHP-Synthase 3 wurde während einer Plasmamembranisolierung in Arabidopsis mittels LC-MS/MS nachgewiesen (Mitra *et al.*, 2009). Hier wurde allerdings ausschließlich die Plasmamembran untersucht und es gibt keine Angabe zur Menge des identifizierten Proteins, so dass es sich möglicherweise auch um kleine Mengen von Verunreinigung oder gerade über die Membran transportiertes Protein handeln könnte. Führt man ein semiglobales Alignment der Aminosäuresequenzen der DAHP-Synthasen aus Arabidopsis und der zwei bekannten putativen DAHP-Synthasen aus der Kartoffel durch, so ist die DAHP-Synthase 3 aus Arabidopsis einer DAHP-Synthase aus der Kartoffel am ähnlichsten, die im Stroma lokalisiert ist (Abb.46). Bei Importversuchen mit dieser Isoform der Kartoffel-DAHP-Synthase in Spinatchloroplasten wurde nach Isolierung von Thylakoiden und Stroma das prozessierte Enzym nur im Stroma gefunden (Zhao *et al.*, 2002). Die Ähnlichkeit der DAHP-Synthase 3 mit diesem Enzym kann auf die gleiche Lokalisation der DAHP-Synthase 3 im Stroma hindeuten.

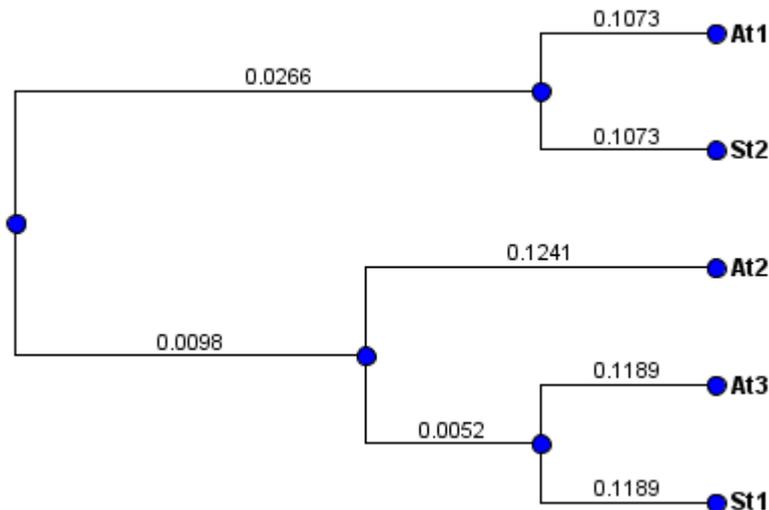


Abb.46: phylogenetischer Stammbaum der drei DAHP-Synthasen aus *Arabidopsis thaliana* und von zwei DAHP-Synthasen aus *Solanum tuberosum* nach semiglobalem Alignment der Aminosäuresequenzen: ermittelt mit dem Programm Geneious Pro 5.5.6 (Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A (2011) Geneious v5.4; <http://www.geneious.com>) mit der Methode UPGMA und dem Distanzmodell Juke-Cantor. Die Aminosäuresequenzen stammen für die Kartoffel vom „National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov). At1-3: DAHP-Synthasen 1-3 aus *Arabidopsis thaliana* (diese Arbeit); St1: Isoform aus *Solanum tuberosum* (Zhao et al., 2002) und St2: eine weitere Isoform aus *Solanum tuberosum* (Dyer et al., 1990).

Die Analyse des pH-Optimums der DAHP-Synthase 3 würde allerdings eher für eine Lokalisation im Thylakoidlumen sprechen: An einen pH-Wert im sauren Bereich zwischen pH 5,5 und pH 6,0, der während der Lichtreaktion herrscht, wäre sie nach den Charakterisierungsdaten im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen am besten angepasst. Sie zeigte bei pH 6,0 noch etwa 91 % ihrer maximalen Aktivität im Optimum, während die DAHP-Synthase 1 bei pH 6,0 nur noch 67% und die DAHP-Synthase 2 nur noch 52% bzw. 67% der maximalen Aktivität erreichten (Abb.10). Ihr breites pH-Optimum macht sie unabhängiger von den umgebenden pH-Wert und so wird sie eventuell weniger von dem Belichtungsstatus der Pflanze beeinflusst. Darüber hinaus ist die DAHP-Synthase 3 die Isoform, die in der Wurzel am stärksten exprimiert wird. Ihre Expression in der Wurzel liegt 7 bis 20fach höher als im Spross und etwa 140 mal höher als die der DAHP-Synthase 2 bzw. 11 mal höher als die der DAHP-Synthase 1 in der Wurzel (Vgl. Abschnitt 3.4.2.2). Somit könnte diese Isoform eine besondere Rolle in der Wurzel erfüllen.

Die DAHP-Synthase 2, die laut LC-MS/MS-Daten (Ferro et al., 2010) im Thylakoidlumen lokalisiert ist, würde bei Belichtung bei einem pH-Wert zwischen 5,0 und 6,0 suboptimale

Bedingungen vorfinden. Dies wiederum könnte ein Hinweis darauf sein, dass der DAHP-Synthase 2 weniger Bedeutung bei starker Lichteinwirkung zukommt.

Bei Dunkelheit oder schwacher Lichteinwirkung, wenn der pH-Wert im Stroma und im Lumen eher bei pH 7,0 liegt, herrscht für alle Isoenzyme ein optimaler pH-Wert ganz unabhängig von ihrer subzellulären Lokalisation. Bei einem pH-Wert von 8,0 liegen die Ergebnisse der zwei unabhängigen Messungen des pH-Optimums teilweise weiter auseinander. Alle Isoformen zeigen jedoch unter diesen pH-Bedingungen eine deutlich niedrigere Aktivität als in ihrem Optimum (Abb.10) und somit wären alle an die pH-Wert-Bedingungen im Stroma während der Lichtreaktion suboptimal angepasst.

Die Bestimmung des pH-Optimums der DAHP-Synthase 1 ohne Tag (Expression im pPAL7 Vektor) ergab ein Optimum bei pH 7,0. Somit liegt das Optimum des Enzyms mit Tag (6,5 - 7,0) in demselben Bereich wie das des Enzyms ohne Tag. Auch die Aktivitätsniveaus beider Enzyme sind ähnlich. Beide Enzyme zeigten eine spezifische Aktivität von 10-11 U/mg unter optimalen pH-Bedingungen. Somit beeinflussen die N-terminalen Anhänge des Enzyms mit Strep-Tag weder das Aktivitätsniveau noch das Verhalten des Enzyms in unterschiedlichen pH-Niveaus wesentlich.

4.2.3 Aktivierung durch zweiwertige Kationen

Die DAHP-Synthasen sind Metalloproteine, d.h. sie tragen ein Metallion als prosthetische Gruppe. Aus Pflanzen hat man bisher DAHP-Synthasen isoliert, die durch Cobalt-, Mangan- und Magnesiumionen aktiviert werden (Herrmann und Weaver, 1999; Rubin und Jensen, 1985; Suzich *et al.*, 1985). An der heterolog exprimierten DAHP-Synthase 1 aus Arabidopsis wurde bereits gezeigt, dass sie durch Manganionen im mikromolaren Bereich und durch Magnesiumionen im millimolaren Bereich aktiviert wird. Cobaltionen, Eisen- und Calciumionen vermochten das Enzym jedoch nicht zu aktivieren (Entus *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde die Aktivität der drei heterolog exprimierten DAHP-Synthasen in Anwesenheit von Mangan-, Magnesium- und Cobaltionen getestet.

Alle drei Enzyme wurden gleichermaßen durch den Zusatz von Manganionen aktiviert (Abb.12). Ohne Zusatz von Metallionen war kaum Aktivität detektierbar und bei einer MnCl_2 -Konzentration von 500 μM war bereits die maximale Aktivitätssteigerung um etwa

80% durch den Manganzusatz festzustellen. Zu den konkreten physiologischen Konzentrationen von freiem Mn^{2+} in Chloroplasten finden sich wenige und recht unterschiedliche Angaben in der Literatur. Williams und Fraústo da Silva (2000) schätzen im Zytoplasma Konzentrationen unter $1 \mu M$ und auch im Chloroplasten nehmen sie Konzentrationen im mikromolaren Bereich an. In einem vergleichbaren Bereich wiesen die Chloroplasten aus Tomaten einen Mangangehalt von etwa $1,9 \mu g Mn/mg$ Chlorophyll auf (Possingham und Spencer, 1962). In den Blättern von zwei Traubensorten konnte man deutlich höhere Mangankonzentrationen von $0,09$ bzw. $0,37 mg/g$ Trockengewicht messen (dies entspricht bei einem angenommenen Wassergehalt von 80% etwa einer Mangankonzentration von $0,33 mM$ bzw. $1,35 mM$) (Yao *et al.*, 2012). Im Spitzahorn wurde in Sonnenblättern ein Mangangehalt von umgerechnet $1,36 mM$ und in Schattenblättern von $0,55 mM$ mittels NMR bestimmt (McCain und Markley, 1989). Diesen Werten nach würde man tatsächlich Mangankonzentrationen im Blatt vorfinden, die im millimolaren Bereich liegen und in denen die drei DAHP-Synthasen eine starke Aktivierung durch die Manganionen erfahren. Allerdings ist bei diesen Konzentrationen im Blatt nicht bekannt wie viele der Manganionen tatsächlich im Chloroplasten vorzufinden sind, da hier die Mangankonzentrationen im gesamten Blattmaterial ohne Unterscheidung zwischen verschiedenen Kompartimenten bestimmt wurden. Da Mangan in höheren Konzentrationen giftig für die Pflanzenzelle ist, ist der größte Teil der Manganionen nicht im Chloroplasten, sondern in der Vakuole oder in der Zellwand lokalisiert (McCain und Markley, 1989; Yao *et al.*, 2012). Somit liegen die in Chloroplasten geschätzten Konzentrationen von Mangan vermutlich niedriger und möglicherweise unter den hier *in vitro* ermittelten optimalen Konzentrationen der drei DAHP-Synthasen aus Arabidopsis.

Durch den Zusatz von Magnesiumionen war ebenfalls für alle drei Enzyme eine Aktivierung um etwa 50% zu beobachten. Hierfür sind allerdings millimolare Konzentrationen des $MgCl_2$ zwischen 5 und $20 mM$ notwendig. Die Aktivierung des Enzyms durch Magnesiumionen fällt nur etwa halb so hoch aus wie die Aktivierung durch Manganionen (Abb.13). Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Änderung der Extinktion pro Minute kann hier nicht wie die spezifische Aktivität als ein Absolutwert beurteilt werden. Aktivitätsunterschiede zwischen den Proben mit verschiedenen Magnesium- und mit Manganzusätzen würden sich noch leicht verändern wenn man den spezifischen Extinktionskoeffizienten von Phosphoenolpyruvat zur Berechnung heranziehen und die spezifische Aktivität der Enzyme betrachten würde.

Dennoch stellen diese Daten die Aktivierung durch Magnesiumzusatz eindeutig dar. Während der Belichtung wird das Stroma als Folge des Protonentransports in das Thylakoidlumen alkalisch und daraufhin findet ein Gegentransport von Mg^{2+} statt, der die Magnesiumkonzentration im Stroma ansteigen lässt. Da freies Magnesium auf viele Enzyme des Calvin-Zyklus aktivierend wirkt, nimmt man an, dass diese lichtinduzierte erhöhte Magnesiumkonzentration ein positiver Regulationsmechanismus für die CO_2 -Fixierung ist (Hind *et al.*, 1974; Krause, 1977; Ishijima *et al.*, 2003 und 2004). So könnten die erhöhten Magnesiumwerte im Stroma ebenfalls aktivierend auf im Stroma lokalisierte DAHP-Synthasen wirken. Mittels fluoreszierendem Magnesium-Indikator wurde im Stroma eine Konzentration von freien Magnesiumionen von 0,5 mM in Dunkelheit und 2 mM in Belichtung festgestellt (Ishijima *et al.*, 2003). Andere Untersuchungen an isolierten Chloroplasten aus Spinat stellten eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration um 1-3 mM bzw. 2-5 mM im Stroma unter Lichteinwirkung gegenüber den Werten in Dunkelheit fest (Krause, 1977; Portis und Heldt, 1976). Die heterolog exprimierte DAHP-Synthase 1 wurde bei einem pH-Wert von 7,0 durch eine $MgCl_2$ -Konzentration von 5 mM um etwa 34% in ihrer Aktivität gesteigert (Änderung der optischen Dichte/Min.). Die DAHP-Synthase 3 zeigte bei 10 mM $MgCl_2$ noch keine Aktivitätssteigerung (Daten nicht dargestellt), bei 20 mM $MgCl_2$ jedoch stellte sich eine Aktivitätssteigerung von etwa 50 % ein. Für die DAHP-Synthase 2 liegen nur Daten bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 20 mM vor, die ebenfalls zu einer Aktivierung der DAHP-Synthase führte (Abb.13). Diese Daten beruhen auf einer Messreihe mit jeweils Dreifachproben für jede Magnesiumkonzentration. Um die Aussagekraft dieser Daten zu erhöhen müssten diese Messungen noch weitere Male und in kleineren Konzentrationsstufen wiederholt werden. Nach der bisherigen Datenlage reagiert die DAHP-Synthase 1 am empfindlichsten auf erhöhte Magnesiumkonzentrationen. Die Aktivitätssteigerung findet hier in einem Konzentrationsbereich statt, der einer physiologischen Konzentration im Chloroplasten während der Belichtung entspricht. Für die anderen zwei Isoformen wurde erst in höheren Konzentrationen eine Aktivierung festgestellt (DAHP-Synthase 3) oder getestet (DAHP-Synthase 2). Es ist also auch möglich, dass *in vivo* eine synergistische Wirkung von Magnesium- und Manganionen vorliegt, so dass auch eine relativ niedrige Magnesiumkonzentration in einem Bereich von 1 bis 5 mM im Zusammenspiel mit vorhandenen Mangankonzentrationen einen viel stärkeren Aktivierungseffekt hätte. Eine Aktivierung durch Magnesiumionen, welche im Stroma bei

Belichtung in erhöhter Konzentration vorliegen, passt zu der erhöhten Expression der DAHP-Synthasen bei Belichtung (Vgl. Abb.47).

In dieser Arbeit wurde außerdem die Aktivität der DAHP-Synthasen 2 und 3 unter Zusatz von 10 μM und 500 μM CoCl_2 getestet. Mit diesen Konzentrationen konnte keine Aktivität der Enzyme detektiert werden. Die ausbleibende Aktivierung der DAHP-Synthase 1 durch Cobalt wurde bereits in der Arbeit von Entus et al. (2002) gezeigt. Cobalt-aktivierbare DAHP-Synthasen verschiedener Pflanzen sind dagegen durch 500 μM Cobaltionen klar aktivierbar (Doong et al., 1992b; Ganson et al., 1986; Ganson und Jensen, 1988).

4.2.4 Enzymkinetik

Eine zentrale Einflussgröße auf die katalytische Aktivität eines Enzyms ist auch die Menge an verfügbaren Substraten. Mit der Michaelis-Menten-Theorie lässt sich die Affinität des Enzyms zu seinen Substraten quantitativ erfassen. Die Michaelis-Menten-Konstanten wurden für das Substrat Phosphoenolpyruvat (PEP) und für das Substrat Erythrose-4-Phosphat (E4P) bestimmt. Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen ergab für alle Isoformen der DAHP-Synthase und für beide Substrate eine typische Michaelis-Menten-Kurve in Form einer Hyperbel (Abb.14 und 15). Zur Bestimmung der K_m -Werte und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten wurde die Excel-Vorlage ANEMONA (Hernández und Ruiz, 1998) verwendet. Dabei wurden die kinetischen Daten mittels nichtlinearer Regression und unter Berücksichtigung der für die jeweiligen Dreifachproben ermittelten Standardfehler berechnet. Der pH-Wert 7,0 für die Ermittlung der K_m -Werte wurde zunächst gewählt, da hier alle drei Enzyme optimale Aktivität zeigten. Ein Vergleich der K_m -Werte der drei Enzyme ergab keine signifikanten Unterschiede. Die K_m -Werte für PEP lagen für alle drei DAHP-Synthasen zwischen 0,24 und 0,29 mM PEP und die K_m -Werte für E4P zwischen 0,11 und 0,17 mM E4P. Die mittlere maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) der DAHP-Synthase 3 war jedoch signifikant höher als die der anderen beiden Enzyme. So lag die mittlere maximale Reaktionsgeschwindigkeit der DAHP-Synthase 3 um 26% höher als die der DAHP-Synthase 1 und 32% höher als die der DAHP-Synthase 2 (Abb.16). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird jedoch nur bei Substratsättigung erreicht, welche unter natürlichen Bedingungen nicht anzunehmen ist.

Die katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_m) für das Substrat PEP sind bei allen drei Isoenzymen höher als die für das Substrat E4P, so dass die Effizienz der drei DAHP-Synthasen von der Bindung des Substrates E4P bestimmt wird. Die DAHP-Synthase 2 weist hier tendenziell die geringste katalytischen Effizienz mit $33,5 \pm 5,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf und die DAHP-Synthase 3 erwartungsgemäß die höchste mit $47,3 \pm 11,3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Allerdings sind die Standardabweichungen hier recht hoch und die Unterschiede nicht signifikant (Tab.7).

Tab.7: Die katalytische Effizienzen der drei Isoenzyme der DAHP-Synthase für die beiden Substrate Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P). Es wurden jeweils drei Bestimmungen durchgeführt. Dargestellt sind daher die Mittelwerte und die Standardabweichungen für $n=3$.

	$K_{\text{cat}}/K_m [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	
	E4P	PEP
DAHPS 1	$42,6 \pm 9,10$	$92,1 \pm 25,7$
DAHPS 2	$33,5 \pm 5,70$	$74,8 \pm 10,5$
DAHPS 3	$47,3 \pm 11,3$	$78,7 \pm 4,70$

Dennoch spricht diese tendenziell höhere katalytische Effizienz der DAHP-Synthase 3 zusammen mit der Tatsache, dass sie sowohl in Wurzel als auch im Spross die am höchsten exprimierte Isoform ist (Vgl. Abschnitt 3.4.2.2) für eine zentrale Rolle dieses Isoenzym. Da sie zu den unter Stress induzierten Enzymen zählt, ist sie unter Stressbedingungen in der Lage durch ihre Effizienz und große Anzahl in kurzer Zeit große Mengen Chorismat für nachfolgende Stoffwechselwege bereitzustellen.

Die für die drei DAHP-Synthasen ermittelten Effizienz-Werte liegen im selben Bereich wie die katalytische Effizienz eines Enzyms, das in einem dem Shikimatweg nachgeschalteten Stoffwechselweg eine zentrale Rolle spielt und häufig ähnlich reguliert ist wie die DAHP-Synthase: die PAL. Die katalytischen Effizienzen der 4 rekombinanten PAL-Enzyme aus Arabidopsis lagen zwischen 25 und $51 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Cochrane *et al.*, 2004).

Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht über K_m -Werte anderer DAHP-Synthasen und weiterer Enzyme, die ebenfalls PEP als Substrat verwenden. In der Pflanze gibt es einige Enzyme, die ebenfalls Phosphoenolpyruvat nutzen: die EPSP-Synthase, Pyruvatkinase, Enolase und PEP-Carboxylase. Die ersten drei Enzyme sind ausschließlich oder auch im Chloroplasten lokalisiert. Die PEP-Carboxylase galt bisher als ausschließlich cytosolisches Enzym, es wurde

mittlerweile jedoch in Reis auch eine Isoform im Chloroplasten identifiziert (Masumoto *et al.*, 2010; Plaxton, 1996). Die EPSP-Synthase katalysiert den sechsten Schritt des Prechorismatweges. Dabei reagiert Shikimat-3-Phosphat mit PEP unter Abspaltung von Orthophosphat zu 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat. Die Pyruvatkinase ist ein wesentliches Enzym in der Glykolyse und katalysiert die Umsetzung von PEP zu Pyruvat. Das Enzym PEP-Carboxylase carboxyliert PEP zu Oxalacetat. In CAM- und C4-Pflanzen stellt dies die primäre CO₂-Fixierung dar, während es sich in C3-Pflanzen um eine anaplerotische Reaktion handelt. Die Enolase (2-Phosphoglycerat-Dehydratase) dehydratisiert 2-Phosphoglycerat zu PEP in der Glykolyse oder katalysiert die reverse Reaktion in der Glukoneogenese.

Tab.8: Michaelis-Menten Konstanten für verschiedene Enzyme. Quellen: **1:** Graziana und Boudet, 1980; **2:** Suzich *et al.*, 1985); **3:** diese Arbeit; **4:** Doong *et al.*, 1992; **5:** Mousdale und Coggins, 1984; **6:** Zhou *et al.*, 2006; **7:** Forlani *et al.*, 1994; **8:** Baysdorfer und Bassham, 1984; **9:** Plaxton *et al.*, 2002; **10:** Knowles *et al.*, 1998; **11:** Prabhaker, 2010; **12:** Ting und Osmond, 1973. Dargestellt sind die gerundeten Werte. * kennzeichnet die Enzyme, die nicht aus Pflanzenmaterial gewonnen, sondern heterolog exprimiert wurden.

Enzym	Pflanze	K _m (PEP)	K _m (E4P)	Quelle
DAHP-Synthase (Mn-aktiviert)	<i>Zea mays</i>	310 µM	240 µM	1
	<i>Daucus carota</i>	30 µM	71 µM	2
	<i>Arabidopsis thaliana</i> *	110-170 µM	240-290 µM	3
DAHP-Synthase (Co-aktiviert)	<i>Spinacea oleracea</i>	/	1950 µM	4
EPSP-Synthase	<i>Pisum sativum L.</i>	5 µM	/	5
	<i>Oryza sativa</i> *	20 µM	/	6
	<i>Zea mays</i>	28 – 33 µM	/	7
Pyruvatkinase	<i>Spinacea oleracea L.</i>	38 – 45 µM	/	8
	<i>Brassica napus</i>	52 µM	/	9
	<i>Nicotiana tabacum L.</i>	71 µM	/	10
Enolase	<i>Arabidopsis thaliana</i> *	534 µM	/	11
PEP-Carboxylase	<i>Zea mays</i>	340 µM	/	12

Für das Substrat Erythrose-4-Phosphat gibt es nur zwei Konkurrenzenzyme: die Aldolase und die Transketolase. Für diese Enzyme liegen in der Literatur keine K_m -Werte für E4P vor. Die Aldolase (Sedoheptulose-1,7 Biphosphat Aldolase) ist ein Enzym des Calvin Zyklus und katalysiert die Reaktion von E4P und Dihydroxyaceton-3-Phosphat zu Sedoheptulose-1,7-bisphosphat. Die Transketolase ist sowohl ein Enzym des Calvin-Zyklus als auch des oxidativen Pentosephosphatwegs. In beiden Stoffwechselwegen stellt sie ein Substrat für den Shikimatweg bereit: das Erythrose-4-Phosphat. Doch neben dieser Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat zu Xylulose-5-Phosphat und E4P, katalysiert die Transketolase im oxidativen Pentosephosphatweg u.a. auch die reverse Reaktion von Xylulose-5-Phosphat und E4P zu Fruktose-6-Phosphat zu Xylulose-5-Phosphat.

Sowohl in *Daucus carota* als auch in *Arabidopsis thaliana* liegt der K_m -Wert der manganaktivierten DAHP-Synthase für das Substrat E4P etwa doppelt so hoch wie der K_m -Wert für PEP. Dies überrascht nicht, da im Chloroplasten drei oder vier weitere Enzyme mit der DAHP-Synthase um das Substrat PEP konkurrieren, während für das E4P in diesem Kompartiment nur zwei Konkurrenzenzyme vorliegen. Somit ist eine erhöhte Affinität gegenüber PEP von Vorteil für das Enzym.

Die DAHP-Synthase in Mais zeigt einen ähnlichen K_m -Wert für E4P wie das Enzym in *Arabidopsis* (240 μ M E4P). Der K_m -Wert für PEP liegt in Mais etwas höher als der für E4P. Allerdings ist Mais eine Pflanze, die C4-Photosynthese betreibt. Während in C3-Pflanzen das Enzym RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase) die primäre CO_2 -Fixierung katalysiert und Ribulose-1,5-bisphosphat dabei als Akzeptormolekül dient, ist in C4-Pflanzen die PEP-Carboxylase unter Nutzung des Substrates Phosphoenolpyruvat für die CO_2 -Fixierung zuständig. Da dann die Regeneration des primären CO_2 -Akzeptors PEP in den Chloroplasten der Mesophyllzellen stattfindet, finden sich hier hohe PEP-Transportraten von den Mesophyllzellen ins Cytosol wo die CO_2 -Fixierung stattfindet (Knappe *et al.*, 2003). Somit sollte PEP in C4-Pflanzen im Chloroplasten höher konzentriert vorliegen und für die dort lokalisierte DAHP-Synthase leichter verfügbar sein als in C3-Pflanzen, und somit eine geringere Affinität gegenüber PEP tolerierbar sein. Die Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PPDK), die die Regeneration von PEP aus Pyruvat katalysiert, wird durch Licht aktiviert (Fukayama *et al.*, 2001). Wenn die DAHP-Synthase tatsächlich auch durch Lichteinwirkung aktiviert wird (Vgl. Abschnitt 4.2.5), so wären die beiden Enzyme auch zeitgleich besonders aktiv.

Die Cobalt-aktivierte DAHP-Synthase aus Spinat zeigt einen vergleichsweise hohen K_m -Wert für das Substrat E4P (1950 μM E4P). Für dieses Enzym konnte bereits gezeigt werden, dass es eine breite Substratspezifität aufweist und ebenfalls Diosen, Triosen und weitere Tetrosen als Substrat verwenden kann (Vgl. Abschnitt 4.2.6). Daher ist es fraglich ob es tatsächlich von physiologischer Bedeutung für die Synthese von DAHP ist oder die Bereitstellung anderer Substanzen katalysiert (Doong *et al.*, 199b). Diese im Vergleich zu den Mangan-aktivierten DAHP-Synthasen geringe Affinität gegenüber E4P unterstützt diese Vermutung.

Der Vergleich der K_m -Werte für die Mangan-aktivierten DAHP-Synthasen in unterschiedlichen Pflanzenspezies (Tab.8) zeigt, dass diese von Art zu Art stark variieren können. Daher kann man für einen direkten Vergleich der $K_m(\text{PEP})$ -Werte der EPSP-Synthasen und DAHP-Synthasen nur das Enzym aus Mais heranziehen, da nur in diesem Fall für beide Enzyme entsprechende Daten vorliegen. So liegt der K_m -Wert für das Substrat PEP für die EPSP-Synthase etwa zehnmal niedriger als für die DAHP-Synthase. Dies ist durchaus sinnvoll, da die EPSP-Synthase im Shikimatweg der DAHP-Synthase nachgeschaltet ist und auf einen noch geringeren PEP-Pool zugreifen kann.

Die Pyruvatkinase, die ein sehr zentrales Enzym des katabolen Stoffwechsels darstellt, zeigt im Vergleich zur DAHP-Synthase tendenziell eine höhere Affinität gegenüber dem Substrat Phosphoenolpyruvat, wengleich hier nur die Enzyme unterschiedlicher Spezies verglichen werden können (Tab.8).

Schaut man sich die Konzentrationen der beiden Substrate der DAHP-Synthase im Chloroplasten an, so scheinen die Enzyme keine optimalen Substratkonzentrationen für ihre Aktivität vorzufinden. Allerdings liegen für Erythrose-4-Phosphat nur Schätzungen vor und keine konkreten Messdaten. Im Stroma von Arabidopsis schätzt man die Konzentration von E4P auf nur 2,3 μM bzw. 2,8 μM und in Spinatchloroplasten auf 17 μM E4P. In Blättern von Sonnenblumen schätzt man die Konzentration immerhin auf 50 μM E4P (Backhausen *et al.*, 1997; Vosloh, 2011; Woodrow und Mott, 1993). Für Phosphoenolpyruvat wurden in Arabidopsis Konzentrationen von 52 μM PEP im Chloroplasten und 2215 μM PEP im Cytosol bestimmt (Vosloh, 2011). In Tabak wurden 75 nmol PEP/g Frischgewicht gemessen (Scheible *et al.*, 1997; Vosloh, 2011). Diese Substratkonzentrationen in der Pflanze liegen sehr viel niedriger als die in dieser Arbeit ermittelten optimalen Konzentrationen von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat für die heterolog exprimierten Enzyme. Dies lässt vermuten, dass in der Pflanze die Einflüsse anderer Faktoren, wie beispielsweise die

Konzentration von reduzierenden Agenzien und Metallionen oder die Temperatur sehr wesentlich für die Aktivität der Enzyme sind und einen hohen Stellenwert besitzen.

Die sehr viel höhere Aktivität der DAHP-Synthase 3 bei pH 6,0 führte zu der Vermutung, dass sich unter diesen pH-Wert-Bedingungen auch Unterschiede in den K_m -Werten zwischen den drei Isoenzymen zeigen würden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die K_m -Werte für das Substrat E4P bei diesem pH-Wert ermittelt. Überraschenderweise zeigte dabei nicht die DAHP-Synthase 3 ein abweichendes Verhalten, sondern die DAHP-Synthase 2. Sie zeigte in dem sauren pH-Milieu eine deutlich geringere Affinität zu dem Substrat Erythrose-4-Phosphat als bei pH 7,0. Der K_m -Wert (E4P) lag mit 0,79 mM E4P bei pH 6,0 etwa 63% höher als bei pH 7,0 (0,29 mM E4P). Die katalytische Effizienz der DAHP-Synthase 2 lag bei pH 6,0 nur noch bei $11,05 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, also etwa dreimal niedriger als bei pH 7,0. Im Gegensatz dazu lagen die K_m -Werte (E4P) der anderen beiden Enzyme bei pH 6,0 in demselben Bereich wie bei pH 7,0 (Tab.3). Die Werte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten lagen bei allen drei Enzymen bei pH 6,0 etwas niedriger als im neutralen pH-Milieu. Auch hier zeigte die DAHP-Synthase 3 mit 13,08 U/mg die höchste maximale Reaktionsgeschwindigkeit (Ergebnisse nicht dargestellt). Die DAHP-Synthase 2 arbeitet also in einem pH-Wert von 7,0 sehr viel effektiver als bei einem pH-Wert von 6,0. Dieses Verhalten ist erstaunlich, da für die DAHP-Synthase 2 die Lokalisation im Thylakoidlumen festgestellt wurde, wo während der Belichtung durchaus pH-Werte zwischen 5,0 und 6,0 herrschen können (Ferro *et al.*, 2010). Die anderen beiden Enzyme hingegen zeigen unter beiden pH-Wert-Bedingungen dieselbe Affinität zum Substrat E4P. Allerdings müssen zukünftige Enzymtests dieses Ergebnis nochmals bestätigen und auch das Verhalten der K_m -Werte (PEP) bei pH 6,0 untersuchen.

Für die DAHP-Synthase 1 liegt ein K_m -Wert (PEP) für das Enzym ohne Tag vor, das im PAL-7-Vektor exprimiert wurde. Vergleicht man den für die geschnittene DAHP-Synthase ermittelten K_m (PEP)-Wert mit dem Mittelwert aus drei Messungen des Enzyms mit Strep-Tag ($0,11 \pm 0,04 \text{ mM}$), so liegt er mit 0,07 mM etwas niedriger. Schaut man sich jedoch die einzelnen K_m (PEP)-Werte des Enzyms mit Tag aus der Dreifachbestimmung an, so wurde in einer Messung auch hier ein Wert von 0,07 mM bestimmt (Abb.22). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) lag in der Messung mit dem geschnittenen Enzym bei 9,32 U/mg Protein für die DAHP-Synthase 1. Der Mittelwert aus drei Messungen an dem Enzym mit Strep-Tag ergab ein V_{\max} von $10,56 \text{ U/mg Protein} \pm 2,28$. Somit scheint die N-terminale

Verlängerung der DAHP-Synthase 1 durch den Strep-Tag keinen großen Einfluss auf den K_m -Wert (PEP) auszuüben. Dies deutet daraufhin, dass der Tag möglicherweise auch generell das Verhalten des Enzyms nicht verändert.

4.2.5 Einfluss von reduzierenden Agenzien

Redoxreaktionen sind ein wesentlicher Bestandteil des pflanzlichen Stoffwechsels. Über Redoxzustände werden Enzymreaktionen gesteuert und so verschiedene Stoffwechselwege und die Expression verschiedener Gene beeinflusst. Eine wesentliche Komponente in der Redoxregulierung in Chloroplasten stellen die Thioredoxine dar. Thioredoxine sind ubiquitäre etwa 12 kDa große Proteine, die in reduzierter Form als Oxireduktasen wirken. Höhere Pflanzen besitzen eine Vielzahl von Isoformen des Thioredoxins, die in verschiedenen subzellulären Kompartimenten angesiedelt sind. In Arabidopsis sind mindestens 20 Isoformen bekannt. (Collin *et al.*, 2003; Gelhaye *et al.*, 2005). Die Regulierung von Enzymen in Chloroplasten durch Thioredoxin galt lange als Ferredoxin- und damit als lichtabhängig, bis man eine NADPH-abhängige Thioredoxin-Reduktase im Chloroplasten fand. Die NADPH-abhängigen Thioredoxin-Reduktasen galten bis dahin als ausschließlich im Cytoplasma oder in den Mitochondrien lokalisiert. Somit ist auch eine lichtunabhängige Redoxregulierung über Thioredoxin im Chloroplasten denkbar (Cejudo *et al.*, 2012; Lepistö *et al.*, 2009).

Bei der lichtgekoppelten Reduktion von Thioredoxin führt der photosynthetische Elektronentransport in Photosystem I zu einer Reduktion von Ferredoxin. Dies wiederum reduziert die Ferredoxin/Thioredoxin-Reduktase (FTR), welche Thioredoxin reduzieren kann. NADPH hingegen kann sowohl im Licht über den photosynthetischen Elektronentransfer bereitgestellt werden als auch bei Dunkelheit über die NADP-Dehydrogenase-Aktivität. Die NADPH-abhängige Thioredoxin-Reduktase, die im Chloroplasten lokalisiert ist (NTRC), verfügt über zwei Domänen: über eine NADPH-Thioredoxin-Reduktase-Domäne am N-Terminus und eine Thioredoxin-Domäne am C-Terminus (Cejudo *et al.*, 2012).

Reduziertes Thioredoxin vermag Enzyme des Calvin-Zyklus zu aktivieren, wie die Fruktose-1,6-bisphosphatase, Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase oder Transketolase. Es inaktiviert wiederum beispielsweise ein Enzym des oxidativen Pentosephosphatweges, die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Marchand *et al.*, 2004; Scheibe, 1991).

Für die DAHP-Synthase 1 aus Arabidopsis konnte bereits gezeigt werden, dass sie sowohl durch DTT als auch durch reduziertes Thioredoxin aus Cyanobakterien und aus Spinat aktiviert wird. Entzog man dem Enzym alle reduzierenden Agenzien, so zeigte es keine Aktivität mehr (Entus *et al.*, 2002). Reduzierende Agenzien verändern nicht nur die Aktivität von Enzymen, sondern sie können darüber hinaus auch den Import von Enzymen in den Chloroplasten positiv regulieren. So wird beispielsweise der Toc-Komplex, einer der am Import der Proteine in den Chloroplasten beteiligten Translokons, durch reduzierende Agenzien beeinflusst (Stengel *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurde erstmals die Wirkung von reduzierenden Agenzien auf alle drei DAHP-Synthasen aus Arabidopsis untersucht. Alle DAHP-Synthasen ließen sich durch DTT um 40-60% in ihrer Aktivität steigern. Reduziertes Thioredoxin aus Cyanobakterien konnte diese Aktivität nochmals um weitere 30% steigern. Durch Aktivitätstest mit Rinderserumalbumin konnte ein bloßer Stabilisierungseffekt durch das Thioredoxin als Protein für die Aktivitätssteigerung ausgeschlossen werden (Vgl. Abschnitt 3.3.4). Im Chloroplasten liegt Thioredoxin in reduzierter Form unter Belichtungsbedingungen bei laufender Lichtreaktion der Photosynthese vor. So kann die Redoxregulation der Enzyme ein Hinweis auf eine Verbindung zwischen Lichteinwirkung und Aktivität der DAHP-Synthasen sein. Für eine Mangan-aktivierte DAHP-Synthase aus der Erdbeere wurde bereits eine vermehrte Aktivität des Enzyms mit steigender Lichtintensität gezeigt (Mori *et al.*, 2000) und alle drei DAHP-Synthasen werden bei Belichtung stärker exprimiert als in Dunkelheit (Vgl. Abb.47). Ob lichtunabhängig durch die Aktivität der NTRC reduziertes Thioredoxin etwa bei der Regulation der DAHP-Synthasen in den Wurzeln ebenfalls eine wichtige Rolle spielt, muss in zukünftigen Analysen genauer untersucht werden.

4.2.6 Substratspezifität

Cobalt-aktivierte DAHP-Synthasen aus Spinat und Kartoffel zeigen eine breite Substratspezifität (Vgl. Abschnitt 1.2.1). Diese Enzyme vermögen in Kombination mit PEP nicht nur mit dem Substrat E4P sondern auch mit diversen anderen Zuckern zu arbeiten. Die Enzyme zeigen zwar die höchste Affinität für das Substrat E4P, jedoch erreichen sie vor allem mit diversen Diosen und Triosen höhere spezifische Aktivitäten und mit einigen Tetrosen

ähnliche spezifische Aktivitäten wie mit dem Substrat E4P (Doong *et al.*, 1992b). Die höchste Aktivität erreichen sie mit dem Substrat Glykolaldehyd (2,45 mal höher als mit E4P). Ersetzt man im Fall der drei heterolog exprimierten DAHP-Synthasen aus Arabidopsis das E4P durch einige dieser Substrate (Glykolaldehyd, DL-Glyceraldehyd-3-Phosphat oder D(-) Erythrose), so zeigen die Enzyme keinerlei Aktivität. Sie scheinen spezifisch E4P als Substrat zu verwenden.

4.2.7 Temperaturabhängigkeit

Der optimale Temperaturbereich der Enzyme wurde bei pH 7,0 ermittelt, da hier alle Enzyme optimale pH-Wert-Bedingungen vorfinden. Für die DAHP-Synthase 2 liegen zwei, und für die anderen beiden Enzyme jeweils eine Bestimmung des Temperaturoptimums vor. Die DAHP-Synthase 2 zeigte bei Temperaturen zwischen 40°C und 45°C die höchste Aktivität. Die DAHP-Synthasen 1 und 3 hatten ihr Optimum bei 40°C. Diese relativ hohen Temperaturoptima decken sich mit dem optimalen Temperaturbereichen anderer DAHP-Synthasen aus Spinat und Tabak zwischen 45°C und 50°C (Doong *et al.*, 1993). Auch ein anderes Enzym des Prechorismatweges, die EPSP-Synthase, weist ein recht hohes Optimum zwischen 50°C und 55 °C auf (Forlani *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1985).

4.2.8 Einfluss der aromatischen Aminosäuren

In Bakterien werden die DAHP-Synthasen durch eine starke negative Rückkopplung durch die aromatischen Aminosäuren reguliert. Sie besitzen drei verschiedene DAHP-Synthasen: eine Tyrosin-, eine Phenylalanin- und eine Tryptophan-sensitive Isoform (Ogino *et al.*, 1982). Doch die drei hier heterolog exprimierten DAHP-Synthasen zeigten kein vergleichbares Regulationsmuster. In anderen Untersuchungen konnte in der Kartoffel und in der Karotte sogar eine leichte Aktivierung der DAHP-Synthase durch Tryptophan (Trp) beobachtet werden. So stieg die Aktivität der DAHP-Synthase in der Kartoffel bei einer Tryptophan-Konzentration von 300 µM um 52% und in der Karotte um 25% bei einer Konzentration von 20 µM (Suzich *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 1986). Eine Aktivitätssteigerung durch Tryptophan konnte in dieser Arbeit nur für die DAHP-Synthase 1 gezeigt werden. Hier wurde die Aktivität mit einer Konzentration von 200 µM Tryptophan im Vergleich zur Kontrolle ohne

Zusatz von Aminosäuren signifikant um 52% gesteigert. Diese Aktivierung ist also sehr ähnlich zu der in der Kartoffel. Eine Verbindung von Tryptophansynthese und der DAHP-Synthase 1 zeigt sich auch in einer Co-Expressionsanalyse (Vgl. Abschnitt 4.1). Demnach wird das Gen für die DAHP-Synthase 1 mit einigen Genen der Tryptophan-Biosynthese co-exprimiert.

Erhöhte Tryptophankonzentrationen wirken stimulierend auf die Aktivität einiger Chorismatmutasen und somit auf die Synthese der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Hingegen wirken sie negativ regulierend auf die Aktivität einiger Anthranilat-Synthasen und somit auf die Biosynthese von Tryptophan selbst (Eberhard *et al.*, 1996b; Poulsen *et al.*, 1993). Verfügt die Pflanze also über ausreichend Tryptophan, so wird der Baustein Chorismat in die Richtung der Synthese von Phenylalanin und Tyrosin, und somit in Richtung Phenylpropanoidstoffwechsel und Alkaloid-Synthese geleitet.

Die Zugabe der Aminosäure Tyrosin hatte keinerlei Einfluss auf die Aktivität der Enzyme.

Allerdings wurde eine signifikante Aktivitätssteigerung der DAHP-Synthasen 1 und 2 unter Zugabe von Phenylalanin zum Reaktionspuffer beobachtet. Bei einer Phe-Konzentration von 500 μM stieg die Aktivität der DAHP-Synthase 1 um 86% und die Aktivität der DAHP-Synthase 2 um 39% (Abb.20).

Somit wird die Isoform 1 am stärksten durch die aromatischen Aminosäuren beeinflusst, während die DAHP-Synthase 3 keinerlei Aktivitätsänderung durch die Zugabe von aromatischen Aminosäuren zeigte. Die DAHP-Synthase 1 wird also deutlich stärker durch den metabolischen Status in der Pflanzenzelle beeinflusst als die DAHP-Synthase 3, was im Einklang mit der deutlich geringeren pH-Empfindlichkeit der DAHP-Synthase 3 zu stehen scheint.

4.2.9 Zusammenfassung der Charakterisierungsdaten

Die drei DAHP-Synthasen zeigen viele Ähnlichkeiten. So werden sie alle durch DTT, reduziertes Thioredoxin und Mangan- und Magnesiumionen aktiviert. Das Temperatur-optimum aller drei Enzyme liegt zwischen 40°C und 45 °C. Doch es zeigen sich auch Unterschiede. Dabei fällt auf, dass v.a. die DAHP-Synthase 3 sich in einigen Eigenschaften von den anderen zwei Enzymen unterscheidet.

Die Daten zum pH-Optimum zeigen, dass Die DAHP-Synthase 3 aufgrund des breiten pH-Optimums unabhängiger von dem pH-Wert der Umgebung und somit auch unabhängiger von der Lichtreaktion und dem Belichtungsstatus der Pflanze ist. Hinsichtlich einer möglichen subzellulären Lokalisation der drei DAHP-Synthasen im Chloroplasten lassen die Daten zum pH-Optimum nur für die DAHP-Synthase 3 eine Vermutung zu. Ihre recht hohe Aktivität auch unter sauren pH-Wert-Bedingungen spricht für eine Lokalisation im Thylakoidlumen. Für die anderen Isoformen ergaben die Daten keine eindeutigen Hinweise. Die Datenlage zur tatsächlichen subzellulären Lokalisation ist sehr gering. Nur für die DAHP-Synthase 2 aus Arabidopsis ist die Lokalisation im Thylakoidlumen zuverlässig nachgewiesen (Ferro *et al.*, 2010). Dies unterstreicht die ermittelte Aktivität der DAHP-Synthase 2 im sauren pH-Milieu allerdings nicht: Diese hat ihr Optimum bei einem pH-Wert von 7,0. Die DAHP-Synthase 2, die trotz Lokalisation im Thylakoidlumen bei pH-Werten zwischen 5 und 6 suboptimal arbeitet, ist möglicherweise eher bei geringer Belichtung wichtig und aktiv.

Auch die Daten zur Enzymkinetik weisen für die DAHP-Synthase 3 eine Besonderheit auf: Das Enzym zeigt eine signifikant höhere maximale Aktivität als die DAHP-Synthasen 1 und 2. Während sich die DAHP-Synthasen 1 und 2 durch die aromatische Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin in ihrer Aktivität beeinflussen lassen, erwies sich die Isoform 3 als unempfindlich gegenüber allen drei aromatischen Aminosäuren. Zieht man noch in Betracht, dass die DAHP-Synthase 3 in Arabidopsis die am höchsten exprimierte Isoform darstellt (Vgl. Abschnitt 3.4.2.2), so scheint diesem Isoenzym eine zentrale Rolle zuzukommen.

Bei der DAHP-Synthase 2 fällt auf, dass sie bei einem pH-Wert von 6,0 etwa dreimal weniger effektiv arbeitet als bei einem pH-Wert von 7,0 (Vgl. Abschnitt 3.3.3.2). Dies ist sehr erstaunlich, da sie laut einer Studie als im Lumen lokalisiert gilt (Ferro *et al.*, 2010) und sie somit bei Belichtung schlechtere pH-Bedingungen vorfindet als bei Dunkelheit. Da das Enzym durch reduziertes Thioredoxin eine etwa 70% höhere Aktivität zeigt vermag diese Aktivierung bei Belichtung den Aktivitätsverlust durch die pH-Wert-Änderung nicht auszugleichen. So lässt sich vermuten, dass der DAHP-Synthase 2 bei Belichtung weniger Bedeutung zukommt.

4.3 Knockout-Mutanten

4.3.1 Mutanten und Wildtyp unter Standardbedingungen

Unter Standardbedingungen im Gewächshaus (Vgl. Abschnitt 2.2.5.1) zeigten beinahe alle Knockout-Mutanten und die Wildtyp-Pflanzen dieselben äußerlichen und biochemischen Merkmale. Nur die Knockout-Mutante für die DAHP-Synthase 2 zeigte einen abweichenden biochemischen Phänotyp. Diese Pflanzen wiesen im Spross einen um 30% deutlich erhöhten Phenylalanin-Gehalt auf als die anderen Pflanzen (Vgl. Abschnitt 3.4.3.1.3). Außerdem zeigten sie im Mittel einen leichten aber signifikant erhöhten Tryptophan-Gehalt im Vergleich zu den anderen drei Knockout-Mutanten (17-26%) und einen nicht signifikant erhöhten Gehalt um 11% im Vergleich zum Wildtyp.

Da alle drei Isoenzyme dieselbe Reaktion katalysieren zeigt die Tatsache, dass das Fehlen der Isoform 2 einen Effekt hat, dass es Unterschiede in der Regulierung oder Expression der drei Isoenzyme geben muss. Entweder ist die DAHP-Synthase 2 zu anderen Tageszeiten oder unter bestimmten Bedingungen besonders aktiv wenn die anderen zwei Isoformen gerade keine große Aktivität zeigen, oder die Expression der Gene unterscheidet sich zeitlich oder räumlich von den anderen zwei Isoformen.

Der Anstieg von Phenylalanin und Tryptophan kann bedingt sein durch eine gesteigerte Synthese dieser aromatischen Aminosäuren, aber auch durch ein Herunterfahren von Stoffwechselwegen, die diese verbrauchen. Um dies zu differenzieren sollten in Folgeversuchen die Aktivität von Enzymen und die Expression von Genen der Phenylalanin- bzw. Tryptophan-Biosynthese (z.B. Prephenatdehydratase bzw. Tryptophan-Synthase) und des Phenylpropanoidweges bzw. der Auxin-Biosynthese (z.B. PAL bzw. Tryptophan-Aminotransferase) in der Knockout-Mutante der DAHP-Synthase 2 im Vergleich zum Wildtyp oder den anderen Knockout-Mutanten getestet werden. Allerdings ergab die in dieser Arbeit bereits durchgeführte Analyse der Expression der PAL in den Knockout-Mutanten und in den Wildtyp-Pflanzen unter Standardbedingungen keinen Unterschied (Daten nicht dargestellt).

Die Charakterisierungsdaten der heterolog exprimierten DAHP-Synthase 2 zeigen bereits einen Zusammenhang zwischen der Aktivität des Enzyms und der aromatischen Aminosäure Phenylalanin. So wird die DAHP-Synthase 2 durch Phenylalanin aktiviert (Vgl. Abschnitt 4.2.8). Erstaunlich ist, dass der erhöhte Phenylalanin- bzw. Tryptophangehalt in der

Doppelmutante für die DAHP-Synthasen 2 und 3 nicht mehr zu beobachten ist. Dies deutet darauf hin, dass diese zwei Isoformen in einer Beziehung zueinander stehen und sich auf eine bisher nicht identifizierte Art und Weise beeinflussen. Allerdings scheint dies nicht auf Expressionsebene zu geschehen, denn der Ausfall der DAHP-Synthase 2 führt nicht zu einer kompensatorisch höheren Expression der DAHP-Synthase 3 oder umgekehrt (Vgl. Abschnitt 4.3.2).

4.3.2 Expressionsmuster der DAHP-Synthasen

Die drei DAHP-Synthasen zeigten im Wildtyp und in den verschiedenen Knockout-Mutanten ein ähnliches basales Expressionsmuster. In allen Pflanzen wurde sowohl im Spross als auch in der Wurzel die DAHP-Synthase 3 am stärksten, und die DAHP-Synthase 2 am schwächsten exprimiert (Abb.29). Dieses Verhältnis konnte auch schon in vorangegangenen Experimenten mit den Wildtyp-Pflanzen bestätigt werden (Daten nicht dargestellt).

In 9 Tage alten Keimlingen von *Arabidopsis* fand man ein anderes Expressionsverhältnis der drei Isoenzyme. Hier waren die DAHP-Synthasen 2 und 3 genauso hoch oder höher als die DAHP-Synthase 1 exprimiert (Lillo *et al.*, 2008). Dieses andere Verhältnis kann durch die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen bedingt sein. So könnte die DAHP-Synthase 1 im Keimlingstadium größere Bedeutung haben als im späteren Stadium der Pflanze.

Der Vergleich der Expressionswerte in der Wurzel und im Spross ergab für die Wildtyp- und die Knockout-Pflanzen dasselbe Bild. Die Expressionwerte der DAHP-Synthasen 1 und 3 lagen in der Wurzel deutlich höher als im Spross (3-9fach erhöht für Isoform 1 und 7-20fach erhöht für Isoform 3). Die Expression der DAHP-Synthase 2 hingegen war in der Wurzel überwiegend niedriger (Tab.4). Somit scheinen die Isoformen 1 und 3 auch in der Wurzel eine große Rolle zu spielen, während die Isoform 2 hier vermutlich nicht so wichtig ist. Die deutlich stärkere Expression in der Wurzel der Isoformen 1 und 3 kann auf eine andere oder zusätzliche Funktion der beiden Enzyme in der Wurzel hindeuten, die sich von der im Spross unterscheidet. Ist die DAHP-Synthase in der Wurzel ebenfalls in den Plastiden lokalisiert, so findet sich dort auch ein Ferredoxin-Thioredoxin-System zur Redoxregulation. Die Reduktion der Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase erfolgt dann über metabolisch generiertes NADPH mittels der Ferredoxin-NADP-Reduktase (Balmer *et al.*, 2006). Schon in der Tomate konnte

man eine unterschiedliche Expression verschiedener Isoformen der DAHP-Synthase in Wurzel und Blättern feststellen. So ist die Isoform 1 in der Wurzel nur sehr niedrig und im Blatt recht hoch exprimiert, während die Isoform 2 in der Wurzel stärker exprimiert ist (Görlach *et al.*, 1993).

Auch bei der PAL, die unter ähnlichen Bedingungen hochreguliert wird wie die DAHP-Synthase und einen großen Anteil der Produkte des Shikimateweges verwendet, stellt man eine unterschiedlich starke Expression der verschiedenen Isoformen in verschiedenen Geweben der Pflanze fest. Von der PAL existieren in Arabidopsis vier verschiedene Isoenzyme. So ist die Expression der Isoformen 1 und 2 sowohl in Wurzel und auch im Blatt relativ stark. Die Isoform 1 ist dabei etwas stärker exprimiert als Isoform 2. Das dritte Isoenzym ist in der Wurzel nur recht schwach exprimiert, hingegen im Blatt sehr stark. Die vierte Isoform ist in beiden Geweben nur sehr schwach exprimiert (Raes *et al.*, 2003; Wanner *et al.*, 1995).

In einer Reihe von Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Transkription der drei DAHP-Synthasen durch Umweltfaktoren sehr unterschiedlich beeinflusst wird. So wird die Expression von Isoformen 1 und 3 durch das Einwirken von verschiedenen Einflussfaktoren wie Pathogenbefall, UV-Licht, Ozon oder Verwundung induziert (Betz *et al.*, 2009; Ditt *et al.*, 2006; Görlach *et al.*, 1995; Janzik *et al.*, 2005; Keith *et al.*, 1991). Die zwei Phytohormone Methyljasmonat und Abscisinsäure beeinflussen die Expression der DAHP-Synthase 1 (Devoto *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2007; Leonhardt *et al.*, 2004; Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2005) und durch die exogene Verabreichung von Saccharose werden die DAHP-Synthase 1 und 3 induziert (Solfanelli *et al.*, 2006). Die Expression der DAHP-Synthase 2 hingegen bleibt unter diesen Bedingungen fast unverändert. Nur in einem Experiment mit Hochlicht wird die DAHP-Synthase 2 leicht induziert während die anderen zwei Isoformen eher reprimiert werden (Vanderauwera *et al.*, 2005). Diese weitestgehend fehlende Regulation und die niedrige in Wurzel und Spross konstante Expression der DAHP-Synthase 2 unterstreichen die Vermutung, dass diese Isoform konstitutiv exprimiert ist.

4.3.3 Mutanten und Wildtyp unter Stressbedingungen

4.3.3.1 Dauerlicht

Bei einem Wechsel von Tag/Nacht-Rhythmik zu Dauerbelichtung, wiesen die Wildtyp-Pflanzen nach 7 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant erhöhtes Frischgewicht auf, während sich bei den Knockout-Mutanten Frischgewichte unter den beiden Anzuchtbedingungen kaum und nicht signifikant unterschieden (Abb.33). Arabidopsis gehört zu den fakultativen Langtagpflanzen. Das Blühen von Arabidopsis-Pflanzen wird durch eine Photoperiode, die länger als 12 Stunden dauert, forciert und unter Kurztagbedingungen wird die vegetative Phase der Pflanzen verlängert (Lepistö und Rintamäki, 2012). In Arabidopsis-Pflanzen, die 24 Stunden belichtet wurden, waren die Blattfläche, der Chlorophyllgehalt und die Biomasse gegenüber Pflanzen in 20 Stunden Belichtung eindeutig erhöht (Dodd *et al.*, 2005). Auch bei der Tomate stellte man eine Zunahme von Frischgewicht, Trockengewicht und der Blattfläche unter Dauerbelichtung fest (Ohyama *et al.*, 2005). Für die Zunahme von Frischgewicht muss Energie bereitgestellt werden, die über die Photosynthese oder den Stärkeabbau geliefert werden kann, und es sind verschiedene Bausteine wie Proteine und Kohlenhydrate notwendig. An der Regulation dieser Wachstums- und Entwicklungsprozesse sind verschiedene Hormone wie z.B. Auxin, Gibbereline und Cytokinin beteiligt. In den Knockout-Mutanten ist also vermutlich die Bereitstellung von einem oder mehreren dieser Bausteine oder Faktoren unter Dauerlicht nicht in demselben Maße möglich wie in den Wildtyp-Pflanzen.

Betrachtet man den Gehalt an Aminosäuren in den Pflanzen, der einen Eindruck von der Verfügbarkeit der Proteinbausteine gewährt, so gibt es Unterschiede zwischen den Pflanzen unter Dauerlicht und unter Kontrollbedingungen, aber kaum zwischen Wildtyp- und Knockout-Pflanzen. Die Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren waren in allen Pflanzen unter Dauerlicht gegenüber den Pflanzen unter Kontrollbedingungen erhöht (Abb.35). Dies deutet darauf hin, dass für die verstärkten Wachstumsprozesse im Licht auch mehr aromatische Aminosäuren benötigt werden. So leiten sich aus diesen wichtige Elemente für das Wachstum ab, wie der Zellwandbestandteil Lignin (Li *et al.* 2010) oder das Phytohormon Auxin. Die Konzentrationen von Asparagin (Asn), Serin (Ser) und Glutamin (Gln) waren in den Pflanzen unter Dauerlicht im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abb.36). Die

Aminosäure Glutamin entsteht bei der Nitrat- und Ammoniumassimilation der Pflanze. Bei der Nitratassimilation wird anorganisches Nitrat über Nitrit zu Ammonium und schließlich zu Glutamin oder Glutaminsäure (Glu) umgewandelt. Beide Aminosäuren sind eine wichtige Stickstoffquelle für viele zelluläre Prozesse, wie z.B. auch für die Biosynthese von Asparagin. Glu und Asp gelten als Stickstoffspeicher in der Pflanze und erfüllen eine wichtige Funktion im Stickstoff-Transportsystem (Lam *et al.*, 1996). Die Ammoniumkonzentrationen im Spross unterschieden sich in den Kontrollpflanzen und den Pflanzen unter Dauerlicht weder zwischen Wildtyp und Mutanten, noch zwischen den verschiedenen Behandlungen (Tab.6). Ammonium entsteht nicht nur in der primären Stickstoffassimilation oder wird aus der Umgebung aufgenommen, sondern sehr viel mehr Ammonium entsteht bei der Photorespiration. Aber auch in anderen Prozessen wie dem Phenylpropanoidweg oder im Proteinkatabolismus entsteht Ammonium. Da hohe Ammoniumkonzentrationen toxisch für die Pflanze sind muss das Ammonium reassimiliert werden in Glutamin oder Glutamat. Daher sind die Ammoniumkonzentration im Blattgewebe normalerweise relativ niedrig (Husted *et al.*, 2000). Dies spiegelt sich auch in den in dieser Arbeit ermittelten gleichbleibenden Ammoniumkonzentrationen und den erhöhten Glutamin-Konzentrationen wider.

So können die erhöhten Konzentrationen von Asparagin und Glutamin im Dauerlicht auf eine erhöhte Stickstoffaufnahme der Pflanzen durch eine vermehrte Aktivität der an der Nitrat- und Ammoniumassimilation beteiligten Enzyme hindeuten. Eine andere Quelle für erhöhte Ammoniummengen ist die Photorespiration. Es ist davon auszugehen, dass die Menge an fixierten Sauerstoff durch die RuBisCO unter Dauerlicht insgesamt deutlich höher liegt, als bei den Kontrollpflanzen. Im Verlauf der Umwandlung von 2 Molekülen Glykolat zu einem Glycerat wird kontinuierlich Ammonium freigesetzt, welches wiederum assimiliert werden muss (Maurino und Peterhansel, 2010). Neben Ammonium entsteht auch Serin während der Photorespiration, dessen Konzentration ebenfalls erhöht ist in den Pflanzen unter Dauerbelichtung. Da dies sowohl in den Mutanten als auch den Wildtyp-Pflanzen gleichermaßen zu beobachten ist, ist ein veränderter Stickstoff- oder Ammoniumgehalt in den Mutanten als Ursache für das niedrigere Frischgewicht eher auszuschließen.

Die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu) und Glycin (Gly) waren unter Dauerlichtbedingungen niedriger konzentriert als unter Kontrollbedingungen (Abb.36).

Die Abnahme der Konzentration von Asparaginsäure und Glycin war für die DAHP-Synthase-3-Knockout-Pflanzen unter kontinuierlichem Licht nicht so stark ausgeprägt wie für die anderen Pflanzen. Glutaminsäure dient nicht nur als Substrat für die Glutaminsynthese,

sondern spielt u.a. auch eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Chlorophyll (Forde und Lea, 2007). So kann ein geringerer Gehalt an Glutaminsäure in den Pflanzen unter Dauerbelichtung auf eine erhöhte Glutaminsynthese zur Speicherung und zum Transport von Stickstoff und eine erhöhte Biosynthese von Chlorophyll hindeuten. Glycin und Asparaginsäure dienen als Bausteine bei der *de novo* Synthese der Purinnukleotide (Gly und Asp) und der Pyrimidinnukleotide (Asp) (Zrenner *et al.*, 2006). Bei einem erhöhtem Wachstum und einer hohen Stoffwechselrate in kontinuierlichem Licht müssen für die damit verbundene DNA-Replikation und Translation ausreichend DNA- und RNA-Moleküle hergestellt werden. Das kann einen erhöhten Glycin- und Asparaginsäureverbrauch erklären. Der Grund für die geringere Abnahme von Asp und Gly in den Knockout-Mutanten für die DAHP-Synthase 3 lässt sich ohne Ermittlung weiterer Parameter und Faktoren an dieser Stelle nicht erklären.

Der Phenolgehalt war in allen Pflanzenlinien unter Dauerlicht um 20% erhöht. Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten gab es keine (Abb.37). Der erhöhte Phenolgehalt deutet darauf hin, dass sowohl Shikimat- als auch Phenylpropanoidweg bei Dauerbelichtung verstärkt arbeiten. Denn der Shikimatweg liefert Eingangssubstrate für den Phenylpropanoidweg, der wiederum die meisten der phenolischen Substanzen bereitstellt. Dennoch spiegelt sich das Fehlen einzelner oder mehrere Isoformen der DAHP-Synthase nicht im Gesamtphenolgehalt wider. Allerdings können diese Konzentrationsbestimmungen keinen Aufschluss darüber liefern ob und wie stark die Umsatzraten im Shikimatweg beeinflusst sind. Hier könnten geeignete Flux-Analysen weitere Hinweise liefern.

Vergleicht man die Expression der DAHP-Synthasen und der PAL1 in allen Pflanzen unter Dauerlicht mit den entsprechenden Kontrollpflanzen, so findet man keinen Unterschied zwischen Wildtyp und den Mutanten. Man stellt zwar einen leichten Rückgang der Expression der DAHP-Synthase 1 und eine leichte Induktion der DAHP-Synthase 3 unter Dauerlicht fest, doch die verschobene diurnale Rhythmik der Expression der drei DAHP-Synthasen und der PAL unter Kurztagbedingungen und unter Dauerlicht macht es unmöglich die Expression in den zwei verschiedenen Anzuchtbedingungen tatsächlich vergleichend zu beurteilen (Abb.47 und 48).

Mit Hilfe eines web-basierten Programms (<http://diurnal.mocklerlab.org>), das den Zugriff auf diurnale Expressionsdaten aus verschiedenen Array-Experimenten an einigen Modellpflanzen ermöglicht, konnte die Expression der DAHP-Synthasen und der PAL im Tagesgang unter

Kurztag-Bedingungen und unter Dauerlicht in *Arabidopsis* nachvollzogen werden (Mockler *et al.*, 2007). Diese Daten zeigen diurnale Schwankungen in der Genexpression für alle drei DAHP-Synthasen und die PAL1. Bei Belichtung wird die Expression der Gene hochgefahren und fällt mit Einbruch der Dunkelheit langsam wieder ab. Bei den drei DAHP-Synthasen steigt die Expression der DAHP-Synthase 3 schneller an und erreicht ihr Maximum bereits nach 4 Stunden Belichtung, während die der anderen beiden Isoformen erst nach 8 Stunden Belichtung das Maximum erreichen (Abb.47). Auffallend ist die starke Synchronität der Expression der DAHP-Synthase 3 mit der Expression der PAL1 sowohl unter Kurztagbedingungen als auch unter Dauerbelichtung (Abb.47 und 48). Dies passt zu den Ergebnissen einer Co-Expressionsanalyse, die zeigt, dass die DAHP-Synthase 3 mit der PAL1 und einigen weiteren Genen des Phenylpropanoidweges co-exprimiert wird. Auch die Synthese der aromatischen Aminosäuren, v.a. von Phenylalanin und Tyrosin, unterliegt einer diurnalen Rhythmik. Ebenso findet man bei Shikimat ein solches Muster. Diese Substanzen werden bei einem Rhythmus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit gegen Ende der Lichtperiode (10-12 Stunden) vermehrt gebildet (Gibon *et al.*, 2006).

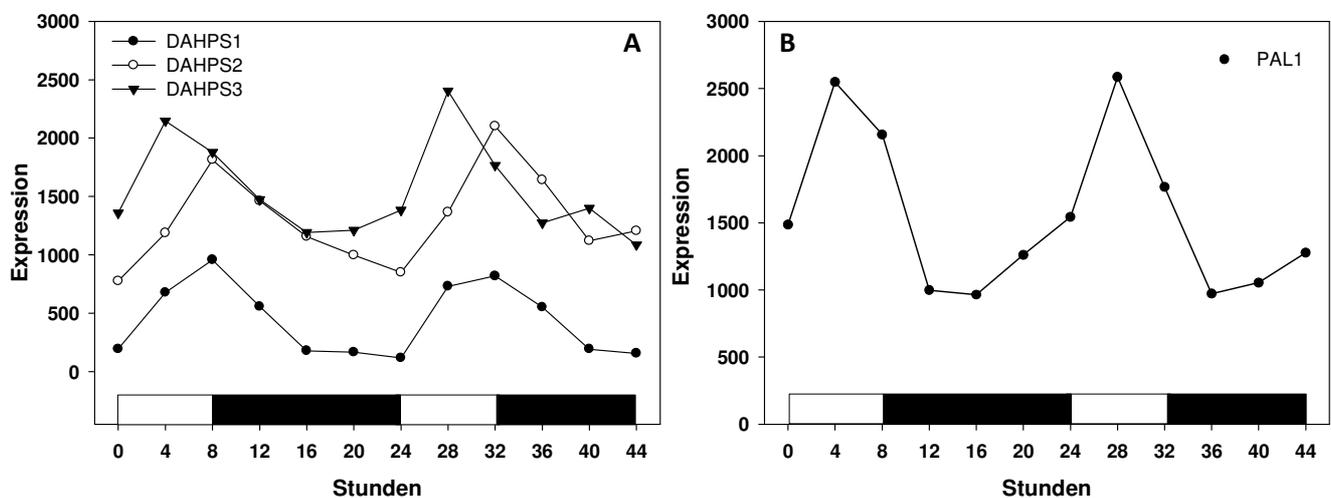


Abb.47: Expression der drei DAHP-Synthasen (A) und der PAL1 (B) aus *Arabidopsis thaliana* unter Kurztag-Bedingungen: Daten bezogen von <http://diurnal.mocklerlab.org> (Mockler *et al.*, 2007). Die weißen Balken markieren die Belichtungszeiten (8 Stunden) und die schwarzen Balken markieren die Dunkelzeiten (16 Stunden).

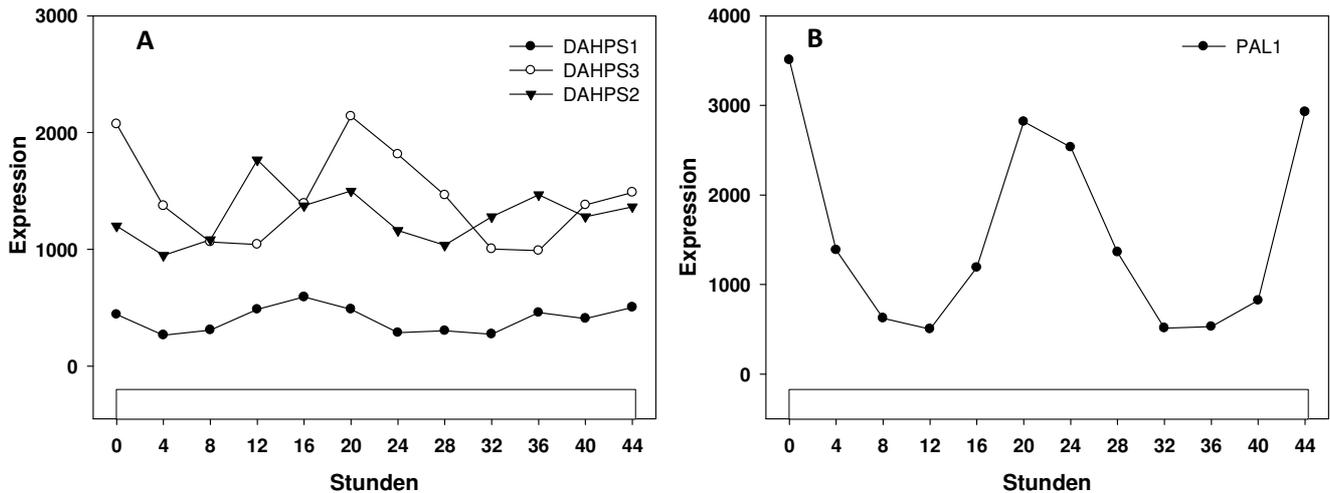


Abb.48: Expression der drei DAHP-Synthasen (A) und der PAL1 (B) aus *Arabidopsis thaliana* unter Dauerbelichtung: Daten bezogen von <http://diurnal.mocklerlab.org> (Mockler *et al.*, 2007). Die weißen Balken markieren die Belichtungszeiten (24 Stunden).

Unter Dauerbelichtung zeigen die drei DAHP-Synthasen weiterhin eine tageszeitliche Schwankung in ihrer Expression. Allerdings kommt es zu einer deutlichen Phasenverschiebung und Verlängerung der Phasen mit erhöhter Expression. Bei kontinuierlichem Licht sind die Expression der DAHP-Synthase 3 und der PAL1 sehr synchron, während die Schwankungen in der Expression der DAHP-Synthasen 1 und 2 wesentlich geringer ausgeprägt sind und einem anderen Rhythmus folgen (Abb.48). Diese zwei Isoformen unterscheiden sich also in ihrem zeitlichen Expressionsmuster von der Isoform 3 und auch von der Expression der PAL1, sowohl in Kurztag-Bedingungen als auch unter Dauerbelichtung. Dies deutet darauf hin, dass die DAHP-Synthasen 1 und 2 andere Funktionen erfüllen als die DAHP-Synthase 3, die stark mit dem Phenylpropanoidweg verknüpft zu sein scheint.

In Folgeversuchen sollte also zur vergleichenden Analyse der Genexpression unter Kälte- und Kontrollbedingungen die Expression im Tagesgang verfolgt werden um eine bessere Vergleichbarkeit der Expressionsdaten zu ermöglichen. Darüber hinaus sollte neben ihrer Expression auch die Aktivität der Enzyme ermittelt werden.

Somit lässt sich aus den hier ermittelten Daten und Parametern keine Erklärung für die unterschiedliche Entwicklung der Frischgewichte von Wildtyp- und den Knockout-Pflanzen

ableiten. Mit dem Stickstoffhaushalt und Shikimat- und Phenylpropanoidweg sind allerdings noch viele andere Stoffwechsel- und Synthesewege verknüpft, so dass Ungleichgewichte in der Homöostase anderer Metaboliten, verursacht durch das Wegfallen einzelner DAHP-Synthasen, zu einem verminderten Frischgewicht in den Mutanten geführt haben könnten. Interessanterweise ist durch das Wegfallen von gleich zwei Isoformen in der Knockout-Mutante für die DAHP-Synthasen 2 und 3 keine Steigerung dieses Effektes zu beobachten.

4.3.3.2 Kältebehandlung

Bei der Anzucht der Pflanzen in einer Umgebungstemperatur von 10°C zeigte die Doppelmutante für die DAHP-Synthasen 2 und 3 eine von den Wildtyp-Pflanzen und den anderen Knockout-Mutanten abweichende Entwicklung des Frischgewichtes. Während die Wildtyp- und die Einzel-Knockout-Pflanzen für die Isoformen 1, 2 und 3 in der Kälte nur 50-61% des Frischgewichtes unter Kontrollbedingungen (8 Stunden 22°C/ 16 Stunden 18°C) erreichten, wies die Doppelmutante im ersten Versuch ein unverändertes Frischgewicht und im zweiten Versuch ein um nur 32% verringertes Frischgewicht im Vergleich zu den Kontrollbedingungen auf (Abb.38 und 39). *Arabidopsis thaliana* gehört zu den kältetoleranten Pflanzen und kann auch noch bei Temperaturen von 4°C wachsen und in die generative Phase übergehen. Dafür ist eine gute Kälteakklimatisierung notwendig. Diese umfasst u.a. eine erhöhte Saccharose-Synthese und eine Anreicherung der Aminosäure Prolin (Kaplan *et al.*, 2004; Stitt und Hurry, 2002).

Ein Unterschreiten der optimalen Wachstumstemperaturen hat Einfluss auf viele Prozesse in der Pflanze: Die Kinetik von Enzymen, die Photosynthese, den Transport und die Respiration verändern sich durch die niedrigen Temperaturen (Christie *et al.*, 1994). So erstaunt es nicht, dass das Frischgewicht der Versuchspflanzen in Kälte im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt war. Auch in Tabak war das Frischgewicht bei Anzucht in 15°C im Vergleich zur Anzucht in 25°C reduziert (Hara *et al.*, 2003).

Bei der Anzucht in 10°C war in allen Pflanzenlinien der Phenolgehalt im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen im Mittel um 30% erhöht. Unter Kältebehandlung wurde bereits im Weißdorn und in Wassermelonen ein Anstieg des Phenolgehalts beobachtet (Kirakosyan *et al.*, 2003; Rivero *et al.*, 2001). Kälte bedeutet für die Pflanze auch oxidativen Stress. Durch die ungünstigen Temperaturen werden Elektronen- und Energietransportketten gestört, so

dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) höher konzentriert vorliegen können. Viele phenolische Substanzen in der Pflanze besitzen antioxidative Aktivität und wirken so dem durch die ROS verursachten Schaden entgegen (Kirakosyan *et al.*, 2003; Prasad *et al.*, 1994). Die Phenole werden im Phenylpropanoidweg synthetisiert. So erstaunt es nicht, dass die Expression der PAL und weiterer Enzyme dieses Stoffwechselweges in Pflanzen, die in einer kalten Umgebungstemperatur aufwachsen, erhöht ist (Christie *et al.*, 1994; Rivero *et al.*, 2001). Auch für die Expression eines Shikimatweg-Enzyms, der 3-Dehydroquinat-Dehydratase-Shikimat-Dehydrogenase (DHQ-SDH), konnte die Induktion durch Kälte gezeigt werden (Han *et al.*, 2009).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren in allen Pflanzen unter Kälteeinfluss die Aminosäuren Asparagin, Serin, Threonin und Glycin erhöht. Dies deckt sich mit den Aminosäuredaten aus Studien an Arabidopsis während der Kälteakklimatisation und an Weizenpflanzen in Kältestress (Naidu *et al.*, 1991; Kaplan *et al.*, 2007).

Ein Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout-Mutanten zeigte sich in dieser Arbeit in dem Gehalt an Asparagin- und Glutaminsäure. Diese Aminosäuren waren bei der Anzucht in Kälte im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Mutanten erhöht, während sie im Wildtyp niedriger waren (Abb.41). Die Anpassung an die Kälte umfasst u.a. eine erhöhte Prolinsynthese. So könnte der Wildtyp möglicherweise mehr Prolin synthetisieren als die anderen Pflanzen, was die Glutaminsäure-Konzentration beeinträchtigt, da Prolin aus Glutaminsäure gebildet wird. Daten zu den Konzentrationen von Prolin in den Versuchspflanzen liegen allerdings nicht vor.

Abweichungen in den Aminosäurekonzentrationen unter Kälteeinwirkung (4°C) in anderen Untersuchungen an Arabidopsis und Weizen zu den in dieser Arbeit ermittelten Werten ergeben sich teilweise bei den aromatischen Aminosäuren. In den o.g. Untersuchungen stiegen die Konzentrationen von Trp und Phe in Kälte stark, und die Tyrosinkonzentrationen leicht an. Interessanterweise stieg die Konzentration von Shikimat im Gegensatz zu der der aromatischen Aminosäuren dabei nicht an (Naidu *et al.*, 1991; Kaplan *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit war die Konzentration von Tyrosin in allen Pflanzenlinien außer in der Knockout-Mutante für die Isoform 3 unter Kälteeinfluss niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Knockout-Mutante für die DAHP-Synthase 3 zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontroll- und Kältebehandlung. Auch für die Aminosäure Phenylalanin ergab der Vergleich der verschiedenen Pflanzenlinien ein heterogenes Bild: Phenylalanin war

in der Kältegruppe im Wildtyp und in der Knockout-Mutante für die DAHP-Synthase 1 erhöht. In den Einzel-Knockout-Linien für die DAHP-Synthasen 2 und 3 hingegen war Phenylalanin reduziert. Die Doppelmutante zeigte für die zwei Pflanzenpools kein einheitliches Bild zum Phenylalanin-Gehalt (Abb.42). Daten zur Aminosäure Tryptophan liegen in dieser Arbeit nicht vor.

Das höhere Frischgewicht der Doppelmutante für die DAHP-Synthasen 2 und 3 deutet darauf hin, dass diese Pflanzen sich an die kalte Umgebungstemperatur schneller oder besser adaptiert haben als die anderen Pflanzen. Die hier ermittelten Parameter vermögen allerdings diesen Unterschied nicht zu erklären. Interessant ist ein Unterschied, der sich unter den kalten Anzuchtbedingungen zwischen dem Wildtyp und allen Knockout-Mutanten in der Konzentration von Asparagin- und Glutaminsäure zeigt. Hier weist der Wildtyp niedrigere Konzentrationen in Kälte im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, während die Knockout-Mutanten erhöhte Konzentrationen aufweisen. Dies kann auf einen bisher noch nicht bekannten Zusammenhang zwischen den DAHP-Synthasen und dem Stickstoffhaushalt unter Stressbedingungen hinweisen. Denn neben dem Einsatz in der Proteinbiosynthese wird Glutaminsäure auch als Stickstoffspeicher und Vorstufe für die Aminosäure Prolin verwendet. Daher wäre die Analyse der Prolin- und Stickstoffgehalte in den Wildtyp- und den Knockout-Pflanzen in Folgeversuchen von Interesse.

5 Literaturverzeichnis

Akashi H, Gojobori T. 2002. Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (6) 3695-3700.

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadriab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby W, Berry CC, Ecker JR. 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.

Ashihara H, Crozier A. 2001. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Sci.* 9: 407-413.

Backhausen JE, Jöstingmeyer P, Scheibe R. 1997. Competitive inhibition of spinach leaf phosphoglucose isomerase isoenzymes by erythrose 4-phosphate. *Plant Sci.* 130: 121-131.

Bagge P, Larsson C. 1986. Biosynthesis of aromatic amino acids by highly purified spinach chloroplasts - Compartmentation and regulation of the reactions. *Physiol. Plant.* 68: 641-647.

Baldwin IT. 1988. Short-term damage-induced increases in tobacco alkaloids protect plants. *Oecologia* 75:367-370.

Balmer Y, Vensel WH, Cai N, Manieri W, Schürmann P, Hurkman WJ, Buchanan BB. 2006. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (8): 2988-2993.

Bayer GR, Stael S, Csaszar E, Teige M. 2011. Mining the soluble chloroplast proteome by affinity chromatography. *Proteomics* 11: 1287-1299.

Baysdorfer C und Bassham JA. 1984. Spinach Pyruvate Kinase Isoforms. *Plant Physiol.* 74: 374-379.

Beaudoin-Eagan LD, Thorpe TA. 1985. Tyrosine and Phenylalanine Ammonia Lyase Activities during Shoot Initiation in Tobacco Callus Cultures. *Plant Physiol.* 78: 438-441.

Bennett RN, Wallsgrove RM. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633.

Betz GA, Gerstner E, Stich S, Winkler B, Welzl G, Kremmer E, Langebartels C, Heller W, Sandermann H, Ernst D. 2009. Ozone affects shikimate pathway genes and secondary metabolites in saplings of European beech (*Fagus sylvatica* L.) grown under greenhouse conditions. *Trees* 23:539-553.

- Bickel H, Palme L, Schultz G. 1978. Incorporation of shikimate and other precursors into aromatic amino acids and prenylquinones of isolated spinach chloroplasts. *Phytochemistry* 17: 119-124.
- Bischoff M, Rösler J, Raesecke HR, Görlach J, Amrhein N, Schmid J. 1996. Cloning of a cDNA encoding a 3-dehydroquinate synthase from a higher plant, and analysis of the organ-specific and elicitor-induced expression of the corresponding gene. *Plant Mol. Biol.* 31: 69-76.
- Bischoff M, Schaller A, Bieri F, Kessler F, Amrhein N, Schmid J. 2001. Molecular Characterization of Tomato 3-Dehydroquinate Dehydratase-Shikimate: NADP Oxidoreductase. *Plant Physiol.* 125: 1891–1900.
- Boudet AM. 2000. Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiol. Biochem.* 38 (1/2): 81–96.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Braun M, Henstrand JM, Görlach J, Amrhein N, Schmid J. 1996. Enzymatic properties of chorismate synthase isozymes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta* 200: 64-70.
- Brotherton JE, Hauptmann RM, Widholm JM. 1986. Anthranilate synthase forms in plants and cultured cells of *Nicotiana tabacum* L.. *Planta* 168:214-221.
- Catala R, Ouyang J, Abreu A, Hu Y, Seo J, Zhang X, Chua NH. 2007. The Arabidopsis E3 SUMO Ligase SIZ1 Regulates Plant Growth and Drought Responses. *Plant Cell* 19: 2952-2966.
- Cejudo FJ, Ferrández J, Cano B, Puerto-Galán L, Guinea M. 2012. The function of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system in plastid redox regulation and signalling. *FEBS Lett.* 586: 2974-2980.
- Chen Y, Zhang X, Wu W, Chen Z, Gu H, Qu LJ. 2006. Overexpression of the Wounding-Responsive Gene *AtMYB15* Activates the Shikimate Pathway in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* 48 (9): 1084–1095.
- Chen Z, Walker RP, Acheson RM, Leegood C. 2002. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Assayed at Physiological Concentrations of Metal Ions Has a High Affinity for CO₂. *Plant Physiol.* 128: 160-164.
- Cho M, Corea ORA, Yang H, Bedgar DL, Laskar DD, Anterola AM, Moog-Anterola FA, Hood RL, Kohalmi SE, Bernards MA, Kang C, Davin LB, Lewis NG. 2007. Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Identification and characterization of arogenate dehydratases. *J. Biol. Chem* 282 (42): 30827-30835.
- Christie PJ, Alfenito Walbot V. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194:541.

- Cochrane FC, Davin LB, Lewis NG. 2004. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65: 1557-1564.
- Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M. 2003. The *Arabidopsis* Plastidial Thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 278 (26): 23747-23752.
- Connelly JA, Conn EE. 1986. Tyrosine Biosynthesis in *Sorghum bicolor*: Isolation and Regulatory Properties of Arogenate Dehydrogenase. *Z. Naturforsch.* 41c: 69-78.
- Craig CL, Weber RS. 1998. Selection Costs of Amino Acid Substitutions in ColE1 and ColIa Gene Clusters Harbored by *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 15 (6): 774-776.
- Crofts J, Horton P. 1991. Dissipation of excitation energy by Photosystem II particles at low pH. *Biochim. Biophys. Acta* 1058: 187-193.
- d'Amato TA, Ganson RJ, Gaines CG, Jensen RA. 1984. Subcellular localization of chorismate-mutase isoenzymes in protoplasts from mesophyll and suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Planta* 162:104-108.
- Davis DB. 1951. Aromatic biosynthesis. I. The role of shikimic acid. *J. Biol. Chem.* 191: 315-25.
- Deikman J, Hammer PE. 1995. Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 108, 47-57.
- Della-Cioppa G, Bauer SC, Klein BK, Shah DM, Fraley RT, Kishore GM. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 6873-6877.
- Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang HS, Chilcott C, Zhu T, Turner JG. 2005. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol. Biol.* 58:497-513.
- Diaz J, Merino F. 1998. Wound-induced Shikimate Dehydrogenase and Peroxidase Related to Lignification in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Leaves. *J. Plant Physiol.* 152: 51-57.
- Ding L, Hofius D, Hajirezaei MR, Fernie AR, Börnke F, Sonnewald U. 2007. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 58(8): 2053-2067.
- Ditt RF, Kerr KF, de Figueiredo P, Delrow J, Comai L, Nester EW. 2006. The *Arabidopsis thaliana* Transcriptome in Response to *Agrobacterium*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19 (6): 665-681.
- Dixon R, Paiva NL. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.

- Dodd AN, Salatia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AAR. 2005. Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. *Science* 309: 630-633.
- Doong RL, Jensen RA. 1992a. Synonymy of the three apparent isoenzymes of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in *Pisum sativum* L. with 3-deoxy-d-manno-octulosonate 8-phosphate synthase and the DS-Co/DS-Mn isoenzyme pair. *New Phytol.* 121: 165-171.
- Doong RL, Gander JE, Ganson RJ, Jensen RA. 1992b. The cytosolic isoenzyme of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in *Spinacia oleracea* and other higher plants: extreme substrate ambiguity and other properties. *Physiol. Plant.* 84: 351-360.
- Doong RL, Ganson RJ, Jensen RA. 1993. Plastid-localized 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (DS-Mn): the early-pathway target of sequential feedback inhibition in higher plants. *Plant Cell Environ.* 16: 393-402.
- Dyer WE, Henstrand JM, Handa AK, Herrmann KM. 1989. Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7370-7373.
- Dyer WE, Weaver LM, Zhao JM, Kuhn DN, Weller SC, Herrmann KM. 1990. A cDNA encoding 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Solanum tuberosum* L. *J. Biol. Chem.* 265: 1608-1614.
- Eberhard J, Bischoff M, Raesecke HR, Amrhein N, Schmid J. 1996a. Isolation of a cDNA from tomato coding for an unregulated, cytosolic chorismate mutase. *Plant Mol. Biol.* 31: 917-922.
- Eberhard J, Ehrler TT, Epple P, Felix G, Raesecke HR, Amrhein N, Schmid J. 1996b. Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties. *Plant J.* 10: 815-821.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Prot. Sci.* 8: 978-984.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. 2000. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2: 953-971.
- Entus R, Poling M, Herrmann KM. 2002. Redox Regulation of Arabidopsis 3-Deoxy-d-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase. *Plant Physiol.* 129(4): 1866-1871.
- Ferro M, Brugière S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Court M, Moyet L, Ramus C, Miras S, Mellal M, Le Gall S, Kieffer-Jaquinod S, Bruley C, Garin J, Joyard J, Masselon C, Rolland N. 2010. AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 6: 1063-84.

- Fewster JA. 1962. Phosphorylation of Shikimic Acid by Ultrasonic Extracts of Micro-Organisms. *Biochem. J.* 85: 388-393.
- Fischer K, Kammerer B, Gutensohn M, Arbinger B, Weber A, Häusler RE, Flügge UI. 1997. A New Class of Plastidic Phosphate Translocators: A Putative Link between Primary and Secondary Metabolism by the Phosphoenolpyruvate/Phosphate Antiporter. *Plant Cell* 9: 453-462.
- Forde BG, Lea PJ. 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J. Exp. Bot.* 58 (9): 2339–2358.
- Forlani G, Parisi B, Nielsen E. 1994. 5-enol-Pyruvyl-Shikimate-3-Phosphate Synthase from *Zea mays* Cultured Cells. *Plant Physiol.* 105: 1107-1114.
- Forlani G. 2002. Differential expression of 5-enol-Pyruvyl-Shikimate-3-Phosphate Synthase isoforms in elicitor-treated, cultured maize cells. *Funct. Plant Biol.* 29: 1483-1490.
- Fucile G, Falconer S, Christendat D. 2008. Evolutionary Diversification of Plant Shikimate Kinase Gene Duplicates. *PLoS Genet.* 4(12): e1000292.
- Fukayama H, Tsuchida H, Agarie S, Nomura M, Onodera H, Ono K, Lee BH, Hirose S, Toki S, K MSB, Makino A, Matsuoka M, Miyao M. 2001. Significant Accumulation of C4-Specific Pyruvate, Orthophosphate Dikinase in a C3 Plant, Rice. *Plant Physiol.* 127: 1136-1146.
- Ganson RJ, D'Amato TA, Jensen RA. 1986. The Two-Isozyme System of 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase in *Nicotiana glauca* and Other Higher Plants. *Plant Physiol.* 82: 203-210.
- Ganson RJ, Jensen RA. 1988. The Essential Role of Cobalt in the Inhibition of the Cytosolic Isozyme of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate Synthase from *Nicotiana glauca* by Glycophosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 85-93.
- Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP. 2005. The plant thioredoxin system. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 24-35.
- Gibon Y, Usadel B, Blaessing Oe, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M. 2006. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. *Genome Biol.* 7(8): R76.
- Gibson M, Gibson F. 1964. Preliminary Studies on the Isolation and Metabolism of an Intermediate in Aromatic Biosynthesis: Chorismic Acid. *Biochem. J.* 90 (2): 248-256.
- Gilchrist DG, Woodin TS, Johnson ML, Kosuge T. 1972. Regulation of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Higher Plants. *Plant Physiol.* 49: 52-57.
- Glawischnig E, Hansen BG, Olsen CE, Halkier BA. 2004. Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8245–8250.

- Görlach J, Beck A, Henstrand JM, Handa AK, Herrmann KM, Schmid J, Amrhein N. 1993. Differential expression of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genes encoding shikimate pathway isoenzymes. I. 3-Deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase. *Plant Mol. Biol.* 23: 697-706.
- Görlach J, Raesecke HR, 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.
- Goers SK, Jensen RA. 1984. The differential allosteric regulation of two chorismate-mutase isoenzymes of *Nicotiana glauca*. *Planta* 162: 117-124.
- Gordon WR, Koukarri WL. 1978. Circadian Rhythmicity in the Activities of Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Lemna perpusilla* and *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Physiol.* 62: 612-615.
- Graziana A, Boudet AM. 1980. 3-Deoxy-D arabino- heptulosonate 7-phosphate synthase from *Zea mays*: general properties and regulation by tryptophan. *Plant Cell Physiol.* 21: 739-802.
- Guillet G, Poupart J, Basurco J, De Luca V. 2000. Expression of Tryptophan Decarboxylase and Tyrosine Decarboxylase Genes in Tobacco Results in Altered Biochemical and Physiological Phenotypes. *Plant Physiol.* 122: 933-943.
- Guyer D, Patton D, Ward E. 1995. Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4997-5000.
- Halkier BA, Gershenzon J. 2006. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 303-333.
- Hamberger B, Ehling J, Barbazuk B, Douglas CJ. 2006. Comparative genomics of the shikimate pathway in Arabidopsis, *Populus trichocarpa* and *Oryza sativa*: shikimate pathway gene family structure and identification of candidates for missing links in phenylalanine biosynthesis. In: Recent Advances in Phytochemistry. Volume 40. Integrative Plant Biochemistry (J.T. Romeo, ed), Elsevier Ltd, Amsterdam, pp. 85-113.
- Han JW, Lee KP, Yoon M, Kang SH, Kim GH. 2009. Cold stress regulation of a bi-functional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase (DHQ/SDH)-like gene in the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *Bot. Mar.* 52: 178-185.
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T. 2003. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* 217: 290-298.
- Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Harder S, Breddin HK. 2004. Antikoagulanzen im Überblick: Gestern, heute und morgen. *Pharm. Unserer Zeit* 33: 172-18.
- Hartmann T. 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831-2846.

- Haslam E. 1993. *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- Havaux M, Lütz C, Grimm B. 2003. Chloroplast Membrane Photostability in *chlP* Transgenic Tobacco Plants Deficient in Tocopherols. *Plant Physiol.* 132: 300-310.
- Henkes S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R, Stitt M. 2001. A Small Decrease of Plastid Transketolase Activity in Antisense Tobacco Transformants Has Dramatic Effects on Photosynthesis and Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 13: 535–551.
- Henstrand JM, McCue KF, Brink K, Handa AK, Herrmann KM, Conn EE. 1992. Light and Fungal Elicitor Induce 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase mRNA in Suspension Cultured Cells of Parsley (*Petroselinum crispum* L.). *Plant Physiol.* 98: 761-763.
- Henstrand JM, Schmid J, Amrhein N. 1995. Only the Mature Form of the Plastidic Chorismate Synthase is Enzymatically Active. *Plant Physiol.* 108: 1127-1132.
- Herrmann KM, Weaver LM. 1997. Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 346–351.
- Herrmann KM, Weaver LM. 1999. The Shikimate Pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 473-503.
- Hernández und M. T. Ruiz. 1998. An EXCEL template for calculation of enzyme kinetic parameters by non-linear regression. *Bioinformatics* 14(2): 227-228.
- Hind G, Nakatani HY, Izawa S. 1974. Light-Dependent Redistribution of Ions in Suspensions of Chloroplast Thylakoid Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1484–1488.
- Ho LHM, Giraud E, Uggalla V, Lister R, Clifton R, Glen A, Thirkettle-Watts D, Van Aken O, Whelan J. 2008. Identification of Regulatory Pathways Controlling Gene Expression of Stress-Responsive Mitochondrial Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 147: 1858–1873.
- Hoagland, DR, Arnon, DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Expt. Sta. Circ.* 347: 1- 32.
- Hörmann F, Soll J, Bölter B. 2007. The Chloroplast Protein Import Machinery: A Review. *Meth. Mol. Biol.* 390: 179-193.
- Hrazdina G, Jensen RA. 1992. Spatial organisation of enzymes in plant metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 241-267.
- Husted S, Hebborn CA, Mattsson M, Schjoerring JK. 2000. A critical experimental evaluation of methods for determination of NH_4^+ in plant tissue, xylem sap and apoplastic fluid. *Physiol. Plant.* 109: 167–179.
- Ishijima S, Uchibori A, Takagi H, Maki R, Ohnishi M. 2003. Light-induced increase in free Mg^{2+} concentration in spinach chloroplasts: Measurement of free Mg^{2+} by using a fluorescent probe and necessity of stromal alkalization. *Arch. Biochem. Biophys.* 412: 126–132.

- Ishijima S, Ito H, Yoshimura H, Uchibori A, Ohnishi M. 2004. Effects of Alkalinization and ATPase Inhibition on Stromal Free Mg²⁺ Concentration in Spinach Chloroplasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 2411-2414.
- Janzik I, Preiskowski S, Kneifel H. 2005. Ozone has dramatic effects on the regulation of the prechorismate pathway in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. Cv. Bel W3). *Planta* 223: 20-27.
- Jung C, Lyou SH, Yeu SY, Kim Ma, Rhee S, Kim M, Lee JS, Chou YD, Cheong J. 2007. Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 26: 1053–1063.
- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL. 2004. Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136: 4159-4168.
- Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL. 2007. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant J.* 50: 967-981.
- Karimi M, Inze D, Depicker A. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7: 193–195.
- Keith B, Dong X, Ausubel FM, Fink GR. 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.
- Khan W, Prithiviraj B, Smith DL. 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *J. Plant Physiol.* 160: 859–863.
- Kirakosyan A, Seymour E, Kaufman PB, Warber S, Bolling S, Chang SC. 2003. Antioxidant Capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3973-3976.
- Knappe S, Löttgert T, Schneider A, Voll L, Flüge UI, Fischer K. 2003. Characterization of two functional *phosphoenolpyruvate/ phosphate translocator* (PPT) genes in *Arabidopsis* - AtPPT1 may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *Plant J.* 36: 411-420.
- Knowles VL, McHugh SG, Hu Z, Dennis DT, Miki BL, Plaxton WC. 1998. Altered Growth of Transgenic Tobacco Lacking Leaf Cytosolic Pyruvate Kinase. *Plant Physiol.* 116: 45-51.
- Krause GH. 1977. Light-Induced Movement of Magnesium Ions in Intact Chloroplasts Spectroscopic Determination with Eriochrome Blue SE. *Biochim. Biophys. Acta* 460: 500-510.
- Kuroki GW, Conn EE. 1989. Differential Activities of Chorismate Mutase Isozymes in Tubers and Leaves of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol.* 89, 472-476.

- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. 1996. The Molecular-Genetics of Nitrogen Assimilation into Amino Acids in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569–93.
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner N, Leonhardt G, Schroeder JI. 2004. Microarray Expression Analyses of Arabidopsis Guard Cells and Isolation of a Recessive Abscisic Acid Hypersensitive Protein Phosphatase 2C Mutant. *Plant Cell* 16: 596–615.
- Lepistö A, Kangasjärvi S, Luomala EM, Brader G, Sipari N, Keränen M, Keinänen M, Rintamäki E. 2009. Chloroplast NADPH-Thioredoxin Reductase Interacts with Photoperiodic Development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 149: 1261-1276.
- Lepistö A, Rintamäki E. 2012. Coordination of Plastid and Light Signaling Pathways upon Development of Arabidopsis Leaves under Various Photoperiods. *Mol. Plant* 5(4): 799-816.
- Levin JG, Sprinson DB. 1964. The Enzymatic Formation and Isolation of 3-Enolpyruvylshikimate 5-Phosphate. *J. Biol. Chem.* 239: 1142-1150.
- Li X, Nicholas DB, Weng JK, Chapple C. 2010. The Growth Reduction Associated with Repressed Lignin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is Independent of Flavonoids. *Plant Cell* 22: 1620–1632.
- Lillo C, Lea US, Ruoff P. 2008. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ.* 31: 587–601.
- Maeda H, Yoo H, Dudareva N. 2010. Prephenate aminotransferase directs plant phenylalanine biosynthesis via arogenate. *Nat. Chem. Biol.* 7: 19-21.
- Maeda H, Yoo H, Dudareva N. 2012. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 73-105.
- Marchand C, Le Maréchal P, Meyer Y, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Decottignies P. 2004. New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 4: 2696-2706.
- Martin S. 2006. *Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen dem Kohlenstoffstatus und der Induktion der DAHP-Synthasen in Tabak und Arabidopsis*. Unveröffentlichte Diplomarbeit, Universität Düsseldorf.
- Masumotoa C, Miyazawaa SI, Ohkawaa H, Fukudaa T, Taniguchia Y, Murayamaa S, Kusanob M, Saitob K, Fukayamaa H, Miyao M. 2010. Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 5226-5231.
- Maurino VG, Peterhansel C. 2010. Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 249-256.
- McCain DC, Markley JL. 1989. More Manganese Accumulates in Maple Sun Leaves than in Shade Leaves. *Plant Physiol.* 90: 1417-1421.

- McCue KF, Conn EE. 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.
- McCue KF, Conn EE. 1990. Induction of Shikimic Acid Pathway Enzymes by Light in Suspension Cultured Cells of Parsley (*Petroselinum crispum*). *Plant Physiol.* 94: 507-510.
- Mitra SK, Walters BT, Clouse SD, Goshe MB. 2009. An Efficient Organic Solvent Based Extraction Method for the Proteomic Analysis of Arabidopsis Plasma Membranes. *J. Proteome Res.* 8: 2752–2767.
- Mitsuhashi S, Davis BD. 1954. Aromatic Biosynthesis XII. Conversion of 5-Dehydroquinic acid to 5-Dehydroshikimic acid by 5-Dehydroquinase. *Biochim. Biophys. Acta* 15: 54-61.
- Mockler TC, Michael TP, Priest HD, Shen R, Sullivan CM, Givan SA, McEntee C, Kay S, Chory J. 2007. THE DIURNAL PROJECT: Diurnal and circadian expression profiling, model-based pattern matching and promoter analysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72: 353-63.
- Morell H, Clark MJ, Knowles PF, Sprinson DB. 1967. The Enzymic Synthesis of Chorismic and Prephenic Acids from 3-Enolpyruvylshikimic Acid 5-Phosphate. *J. Biol. Chem.* 242: 82-90.
- Mori T, Sakurai M, Sakuta M. 2000. Changes in PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and Ds-Mn) activity during anthocyanin synthesis in suspension culture of *Fragaria ananassa*. *Plant Cell Tiss. Org.* 62: 135–139.
- Morris PF, Doong R, Jensen RA. 1989. Evidence from *Solanum tuberosum* in Support of the Dual-Pathway Hypothesis of Aromatic Biosynthesis. *Plant Physiol.* 89: 10-14.
- Mousdale DM, Campbell MS, Coggins JR. 1987. Purification and characterization of bifunctional dehydroquinase-shikimate: NADP oxidoreductase from pea seedlings. *Phytochemistry* 26 (10): 2665-2670.
- Mousdale DM, Coggins JR. 1984. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from seedlings of *Pisum sativum* L.. *Planta* 160: 78-83.
- Mousdale DM, Coggins JR. 1985. Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L.. *Planta* 163:241-249.
- Muday GK, Herrmann KM. 1992. Wounding Induces One of Two Isoenzymes of 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase in *Solanum tuberosum* L.V. *Plant Physiol.* 98: 496-500.
- Naidu BP, Paleg LG, Aspinall D, Jennings AC, Jones GP. 1991. Amino acid and Glycine Betaine Accumulation in Cold-Stressed Wheat Seedlings. *Phytochemistry* 30 (2): 407-409.
- Neish AC. 1961. Formation of m- and p-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochemistry* 1: 1-24.

- Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Heofgen R. 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J.* 33: 633–650.
- Niyogi KK, Fink GR. 1992. Two Anthranilate Synthase Genes in *Arabidopsis*: Defense-Related Regulation of the Tryptophan Pathway. *Plant Cell* 4 (6): 721-733.
- Obayashi T, Nishida K, Kasahara K, Kinoshita K. 2011. ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants. *Plant Cell Physiol.* 52: 213-9.
- Obayashi T, Hayashi S, Saeki M, Ohta H, Kinoshita K. 2009. ATTED-II provides coexpressed gene networks for *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 37: D987-91.
- Ogino T, Garner C, Markley JL, Herrmann KM. 1982. Biosynthesis of aromatic compounds: ¹³C NMR spectroscopy of whole *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79: 5828-5832.
- Ohyama K, Manabe K, Omua Y, Kozai T. 2005. Potential Use of a 24-Hour Photoperiod (Continuous Light) with Alternating Air Temperature for Production of Tomato Plug Transplants in a Closed System. *HortScience* 40(2): 374-377.
- Ouyang, J., Shao, X., and Li, J. 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 24: 327–333.
- Pauwels L, Moorrel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inzé D, Goossens A. 2008. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:105(4): 1380-1385.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8:785-786.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: e36.
- Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 1/2004: 92-95.
- Pinto JEBP, Suzich JA, Herrmann KM. 1986. 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase from Potato Tuber (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol.* 82: 1040-1044.
- Pittard J, Wallace BJ. 1966. Distribution and Function of Genes Concerned with Aromatic Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 91: 1494-1508.
- Plaxton WC, The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. 1996. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 185–214.

- Plaxton WC, Smith CR, Knowles VL. 2002. Molecular and Regulatory Properties of Leucoplast Pyruvate Kinase from *Brassica napus* (Rapeseed) Suspension Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 400 (1): 54-62.
- Portis AR, Heldt HW. 1976. Light-Dependent Changes of the Mg²⁺ Concentration in the Stroma in Relation to the Mg²⁺ Dependency of CO₂ Fixation. *Biochim. Biophys. Acta* 449: 434-446.
- Possingham JV, Spencer D. 1962. Manganese as A Functional Component of Chloroplasts. *Aust. J. Biol. Sci.* 15: 58-68.
- Poulsen C, Bongaerts RJM, Verpoorte R. 1993. Purification and characterization of anthranilate synthase from *Catharanthus roseus*. *Eur. J. Biochem.* 212: 431-440.
- Prabhakar V. 2010. *Plastidic Phosphoenolpyruvate: Investigations on its role in plant growth and development*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR. 1994. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74.
- Pribil M, Pesaresi P, Hertle A, Barbato R, Leister D. 2010. Role of Plastid Protein Phosphatase TAP38 in LHCII Dephosphorylation and Thylakoid Electron Flow. *PLoS Biol.* 8(1): e1000288.
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W. 2003. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 133: 1051-1071.
- Ramani S, Patil N, Jayabaskaran C. 2010. UV-B induced transcript accumulation of DAHP synthase in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *J. Mol. Signal.* 5: 13 doi:10.1186/1750-2187-5-13
- Razal RA, Lewis NG, Towers GHN. 1994. Pico-tag analysis of arogenic acid and related free amino acids from plant and fungal extracts. *Phytochem. Anal.* 5: 98-104.
- Richter S, Lamppa GK. 1998. A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7463-7468.
- Richter S, Zhong R, Lamppa G. 2005. Function of the stromal processing peptidase in the chloroplast import pathway. *Physiol. Plant.* 123: 362-368.
- Rivero RM, Ruiz JM, Garcia PC, López-Lefebvre LR, Sánchez E, Romero L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* 160: 315-321.
- Roberts F, Roberts CW, Johnson JJ, Kylek DE, Milhousk WK, Tzipori S, Fergusonl DJP, Chakrabarti D. 1998. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* 393: 801-805.
- Robinson T. 1974. Metabolism and Function of Alkaloids in Plants. *Science* 184 (4135): 430-435.

- Rösler J, Krekel F, Amrhein N, Schmid J. 1997. Maize Phenylalanine Ammonia-Lyase has Tyrosine Ammonia- Lyase Activity. *Plant Physiol.* 113: 175-179.
- Rubin JL, Jensen RA. 1985. Differentially Regulated Isozymes of 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate-7-Phosphate Synthase from Seedlings of *Vigna radiata* [L.] Wilczek. *Plant Physiol.* 79: 711-718.
- Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Hirai MY, Noji M, Saito K, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Ohta H. 2005. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in Arabidopsis. *Plant J.* 44: 653-668.
- Sato K, Mase K, Nakano Y, Nishikubo N, Sugita R, Tsuboi Y, Kajita S, Zhou J, Kitano H, Katayama Y. 2006. 3-Deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase is regulated for the accumulation of polysaccharide-linked hydroxycinnamoyl esters in rice (*Oryza sativa* L.) internode cell walls. *Plant Cell Rep.* 25: 676-688.
- Scheibe R. 1991. Redox-Modulation of Chloroplast Enzymes. *Plant Physiol.* 96: 1-3.
- Scheible WR, Gonzáles-Fontes A, Lauerer M, Müller-Röber B, Caboche M, Stitt M. 1997. Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. *Plant Cell* 9: 783-798.
- Schmid J, Schaller A, Leibinger U, Boll W, Amrhein N. 1992. The *in-vitro* synthesized tomato shikimate kinase precursor is enzymatically active and is imported and processed to the mature enzyme by chloroplasts. *Plant J.* 2(3): 375-383.
- Schofield LR, Patchett ML, Parker EJ. 2004. Expression, purification, and characterization of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Expres. Pur.* 34: 17-27.
- Schulze-Siebert D, Heineke D, Scharf H, Schultz G. 1984. Pyruvate-Derived Amino Acids in Spinach Chloroplasts. *Plant Physiol.* 76: 465-471.
- Schwacke R, Schneider A, Van Der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flugge UI, Kunze R. 2003. ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *Plant Physiol.* 131: 16-26.
- Shahinas D. 2009. *Structural and Functional Insights on Regulation by Phenolic Compounds*. Masterarbeit. University of Toronto.
- Sharma R, Jain M, Bhatnagar RK, Bhalla-Sarin N. 1999. Differential expression of DAHP synthase and chorismate mutase in various organs of *Brassica juncea* and the effect of external factors on enzyme activity. *Physiol. Plant.* 105: 739-745.
- Siehl DL, Conn EE. 1988. Kinetic and Regulatory Properties of Arogenate Dehydratase in Seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Arch. Biochem. Biophys.* 260 (2): 822-829.
- Singh BK, Connelly JA, Conn EE. 1985. Chorismate Mutase Isoenzymes from *Sorghum bicolor*: Purification and Properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 243(2): 374-384.

- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Smart CC, Johanning D, Müller G, Amrhein M. 1985. Selective Overproduction of 5-enol-Pyruvylshikimic Acid 3-Phosphate Synthase in a Plant Cell Culture Which Tolerates High Doses of the Herbicide Glyphosat. *J. Biol. Chem.* 260 (30): 16338-16346.
- Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P. 2006. Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis^[W]. *Plant Physiol.* 140: 637-646.
- Srinivasan PR, Sprinson DB. 1959. J 2-Keto-3-deoxy-d-arabo-heptonic Acid 7-Phosphate Synthetase. *J. Biol. Chem.* 234: 716-722.
- Srinivasan PR, Rothschild J, Sprinson DB. 1963. The Enzymic Conversion of 3-Deox-D-arabino-heptulosonic Acid 7-Phosphate to 5-Dehydroquinone. *J. Biol. Chem.* 238: 3176-3182.
- Stengel A, Benz JP, Buchanan BB, Soll J, Bölder B. 2009. Preprotein Import into Chloroplasts via the Toc and Tic Complexes Is Regulated by Redox Signals in *Pisum sativum*. *Mol. Plant* 2 (6): 1181-1197.
- Stephens CM, Bauerle R. 1991. Analysis of the Metal Requirement of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266 (31): 20810-20817.
- Stitt M, Rees T. 1979. Capacities of pea chloroplasts to catalyse the oxidative pentose phosphate pathway and glycolysis. *Phytochemistry* 18: 1905-1911.
- Stitt M, Hurry V. 2002. A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 199-206.
- Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, Chen Q, Liu F, Zhou W, Chen R, Li X, Tietz O, Wu X, Cohen JD, Palme K, Li C. 2009. Arabidopsis ASA1 Is Important for Jasmonate-Mediated Regulation of Auxin Biosynthesis and Transport during Lateral Root Formation. *Plant Cell* 21: 1495-1511.
- Suzich JA, Dean JFD, Herrmann KM. 1985. 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase from Carrot Root (*Daucus carota*) Is a Hysteretic Enzyme. *Plant Physiol.* 79: 765-770.
- Sysoeva MI, Markovskaya EF, Shibaeva TG. Plants under continuous light: a review. 2010. *Plant Stress* 4(1): 5-17.
- Thilmony R, Underwood W, He SY. 2006. Genome-wide transcriptional analysis of the Arabidopsis thaliana interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J.* 46: 34-53.
- Ting IP, Osmond CB. 1973. Multiple Forms of Plant Phosphoenolpyruvate Carboxylase Associated with Different Metabolic Pathways. *Plant Physiol.* 51: 448-453.

- Treutter D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4:147–157.
- Tsuji J, Jackson EP, Gage DA, Hammerschmidt R, Somerville SC. 1992. Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 98: 1304-1309.
- Tzin V, Galili G. 2010. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Mol. Plant* 3(6): 956–972.
- Van der Straeten D, Rodrigues-Pousada RA, Goodman HM, Van Montagua M. 1991. Plant Enolase: Gene Structure, Expression, and Evolution. *Plant Cell* 3: 719-735.
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT. 1980. Lignification as A Mechanism of Disease Resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 259-88.
- Vanderauwera S, Zimmermann P, Rombauts S, Vandenabeele S, Langebartels C, Grisse W, Inze D, Van Breusegem F. 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *PlantPhysiol.* 139: 806-821.
- Voll L, Häusler RE, Hecker R, Weber A, Weissenböck G, Fiene G, Waffenschmidt S, Flügge U. 2003. The phenotype of the *Arabidopsis cue1* mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *Plant J.* 36: 301-317.
- Vosloh D. 2011. *Subcellular compartmentation of primary carbon metabolism in mesophyll cells of Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Universität Potsdam.
- Walter A, Scharr H, Gilmer F, Zierer R, Nagel KA, Ernst M, Wiese A, Virnich O, Christ MM, Uhlig B, Jünger S, Schurr U. 2007. Dynamics of seedling growth acclimation towards altered light conditions can be quantified via GROWSCREEN: a setup and procedure designed for rapid optical phenotyping of different plant species. *New Phytol.* 174(2): 447-455.
- Wanner LA, Li G, Ware D, Somssich IE, Davis KR. 1995. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 27: 327-338.
- Weiss U, Mingioli ES. 1956. Aromatic Biosynthesis. XV. The Isolation and Identification of Shikimic Acid 5-Phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 2894–2898.
- Weissbach A, Hurwitz J. 1959. The Formation of 2-Keto-3-deoxyheptonic Acid in Extracts of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 234: 705-709.
- Werdan K, Heldt HW, Milovancev M. 1975. The Role of pH in the Regulation of Carbon Fixation in the Chloroplast Stroma. Studies on CO₂ Fixation in the Light and Dark. *Biochim. Biophys. Acta* 396: 276-292.
- Williams RJP, Fraústo da Silva JJR. 2000. The distribution of elements in cells. *Coord. Chem. Rev.* 200–202: 247-348.

- Woodrow IE, Mott KA. 1993. Modelling C 3 photosynthesis: A sensitivity analysis of the photosynthetic carbon-reduction cycle. *Planta* 91: 421-432.
- Yaniv H, Gilvarg C. 1954. Aromatic Biosynthesis XIV. 5-Dehydroshikimic reductase. *J. Biol. Chem.* 13: 787-795.
- Yao Y, Xu G, Mou D, Wang J, Ma J. 2012. Subcellular Mn compartation, anatomic and biochemical changes of two grape varieties in response to excess manganese. *Chemosphere* 89: 150-157.
- Zhang ZZ, Li XX, Zhu BQ, Wen YQ, Duan CQ, Pan QH. 2011. Molecular characterization and expression analysis on two isogenes encoding 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in grapes. *Mol. Biol. Rep.* 38 (7): 4739-4747.
- Zhao J, Weaver LM, Herrmann KM. 2002. Translocation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase precursor into isolated chloroplasts. *Planta* 216: 180-186.
- Zhou M, Xu H, Wei X, Ye Z, Wei L, Gong W, Wang Y, Zhu Z. 2006. Identification of a Glyphosate-Resistant Mutant of Rice 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase Using a Directed Evolution Strategy. *Plant Physiol.* 140: 184-195.
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R. 2006. Pyrimidine and Purine Biosynthesis and Degradation in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 805-36.
- Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, van Wijk KJ. 2008. Sorting Signals, N-Terminal Modifications and Abundance of the Chloroplast Proteome. *PLoS ONE* 3(4): e1994. doi:10.1371/journal.pone.0001994.

6 Anhang

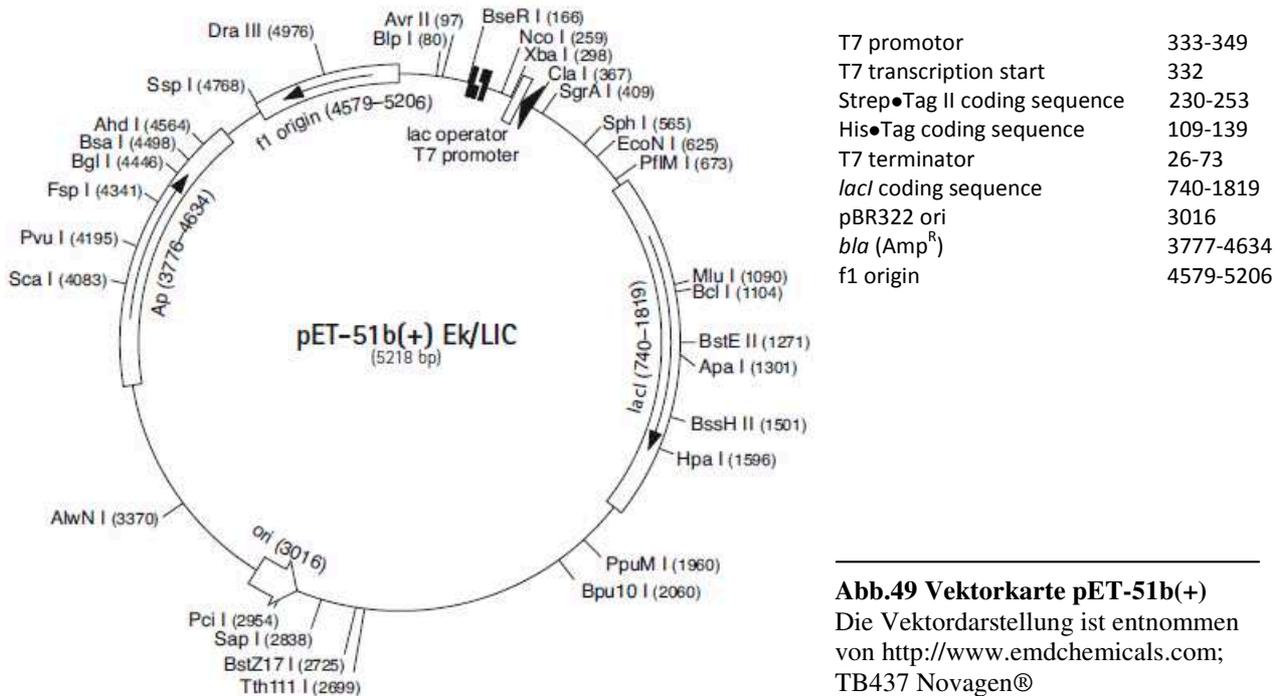


Abb.49 Vektorkarte pET-51b(+)
Die Vektordarstellung ist entnommen von <http://www.emdchemicals.com>; TB437 Novagen®

T7 promoter	1-17
T7 terminator	413-460
<i>lacI</i>	4634-5713
<i>bla</i> (Amp ^R)	1079-1936
Origin of replication (ori)	2499
MCS	
SapI	309
HindIII	310
SpeI	318
NcoI	325
BamHI	333
EcoRI	345
XhoI	351
NotI	358
Profinity eXact tag	92-316
Cleavage recognition sequence of Profinity eXact tag	EEDKLFKAL (precedes SapI site)

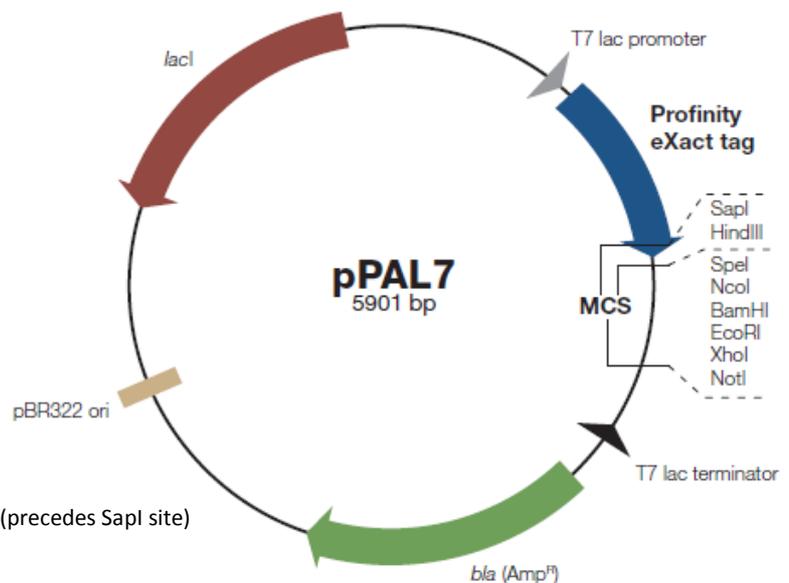


Abb.50 Vektorkarte pPAL7

Die Vektordarstellung ist entnommen von <http://www.bio-rad.com>; Bulletin 5646; ©2007 Bio-Rad Laboratories, Inc.

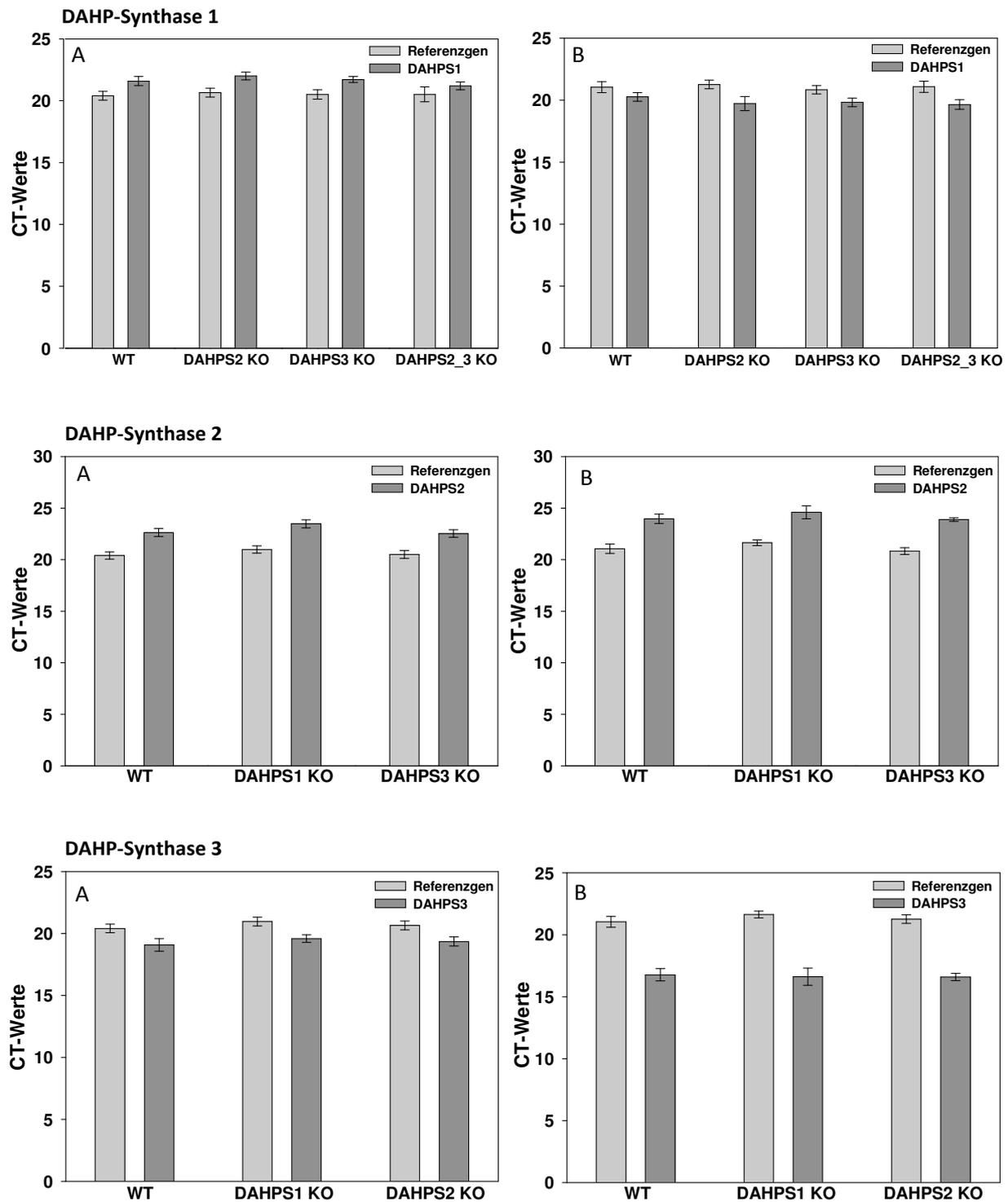


Abb.51: Expression der drei DAHP-Synthasen in Spross (A) und Wurzel (B). Dargestellt sind die CT-Werte, die in der realtime-PCR ermittelt wurden. Es wurde jeweils Blattmaterial aus zwei Pflanzenpools à 5 Pflanzen analysiert und für jede Analyse eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Somit zeigen die Ergebnisse die Mittelwerte aus jeweils 6 Bestimmungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für n = 6.

Tab.9: Die Expression der DAHP-Synthasen im Spross. Die Ergebnisse der Analyse von zwei Pflanzenpools werden jeweils als Expression I und Expression II bezeichnet. Für jeden Pool wurden fünf Pflanzen geerntet. Die Expressionswerte wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Die CT-Werte der DAHP-Synthase 2 dienten dabei als Kontrollgruppe, so dass die Expression der Isoformen in Relation zur Expression der DAHP-Synthase 2 im Spross dargestellt ist. Die Standardfehler und die Signifikanz der Ergebnisse wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Ein signifikanter Unterschied zur Expression im Spross besteht wenn $p \leq 0,05$.

Pflanzenlinie	Isoform	Expression I	Standardfehler I	P ≤ 0,05	Expression II	Standardfehler II	P ≤ 0,05
Wildtyp	1	2,00	1,51 – 2,75	ja	2,10	1,90 – 2,26	ja
	2	1	-	-	1	-	-
	3	11,31	8,70 – 15,78	ja	12,13	9,37 – 16,0	ja
DAHPS1 KO	2	1	-	-	1	-	-
	3	14,59	7,63 – 32,74	ja	14,93	12,36 – 18,04	ja
DAHPS 3 KO	1	2,19	1,78 – 2,64	ja	1,38	1,01 – 2,03	-
	2	1	-	-	1	-	-

Tab.10: Die Expression der DAHP-Synthasen in der Wurzel. Die Ergebnisse der Analyse von zwei Pflanzenpools werden jeweils als Expression I und Expression II bezeichnet. Für jeden Pool wurden fünf Pflanzen geerntet. Die Expressionswerte wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Die CT-Werte der DAHP-Synthase 2 dienten dabei als Kontrollgruppe, so dass die Expression der Isoformen in Relation zur Expression der DAHP-Synthase 2 in der Wurzel dargestellt ist. Die Standardfehler und die Signifikanz der Ergebnisse wurden mit dem Programm REST 2009© ermittelt. Ein signifikanter Unterschied zur Expression im Spross besteht wenn $p \leq 0,05$.

Pflanzenlinie	Isoform	Expression I	Standardfehler I	P ≤ 0,05	Expression II	Standardfehler II	P ≤ 0,05
Wildtyp	1	11,31	6,52 – 22,71	ja	14,59	9,77 – 18,38	-
	2	1	-	-	1	-	-
	3	137,19	79,08 – 275,39	ja	153,99	100,71 – 235,61	-
DAHPS1 KO	2	1	-	-	1	-	-
	3	250,15	137,68 – 452,72	ja	250,15	184,55 – 394,64	ja
DAHPS 3 KO	1	16,76	13,00 – 23,01	ja	16,76	11,22 – 22,63	ja
	2	1	-	-	1	-	-

Danksagung

Frau Prof. Dr. Ingar Janzik danke ich für das Überlassen des Themas dieser Dissertation und das entgegengebrachte Vertrauen. Danke für die Diskussionen und Anregungen und auch die Motivation die Dissertation nach so langer Zeit nun endlich fertigzustellen.

Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger gilt mein Dank für die Übernahme des Co-Referats dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an Sabine Preiskowski und Andrea Neuwohner. Danke für die schöne Zeit im Labor und im Büro und die tolle Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank für Eure tatkräftige Unterstützung bei realtime-PCR und HPLC und bei kleinen und großen Fragen im Laboralltag.

Ein Danke auch an alle anderen Mitarbeiter des IBG-2 für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die angenehme Zeit. Ein besonderer Dank geht an Shizue Matsubara und Anika Wiese-Klinkenberg für alle Ratschläge und Diskussionen und an Beate Uhlig und Marcel Schneider für die Unterstützung bei der Pflanzenanzucht. Danke an Vicky Temperton für die angenehme Pendelei zwischen Aachen und Jülich.

Mein persönlicher Dank geht an meine Familie, besonders an Aless, die mich immer unterstützt, motiviert und an mich geglaubt hat.

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die hier vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 16.05.2013

(Anja Pietzke-Calcagnile)