

# **Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie**

## **Golm bei Potsdam**

**Geschäftsführender Direktor, Wissenschaftliches Mitglied**

Prof. Dr. Lothar Willmitzer

Am Mühlenberg 1  
14476 Golm  
Postanschrift:  
Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie  
14424 Potsdam  
Telefon 03 31/56 78-2 02  
Telefax 03 31/56 78-2 01  
E-Mail: [Willmitzer@mpimp-golm.mpg.de](mailto:Willmitzer@mpimp-golm.mpg.de)  
Internet: <http://www.mpimp-golm.mpg.de>

### **Selbständige Nachwuchsgruppen**

Leiter: Priv.-Doz. Dr. Bernd Müller-Röber (bis 30.4.2000) · Dr. Michael Udvardi

### **Mitarbeiter**

Ende 1999 waren insgesamt 147 Mitarbeiter (einschließlich der Drittmittelbeschäftigten) am Institut tätig, darunter 38 Wissenschaftler; dazu kamen im Berichtsjahr 37 Nachwuchs- und Gastwissenschaftler.

### **Forschungsthemen im Überblick**

Analyse der Synthese- und Speichervorgänge von Kohlenhydraten in höheren Pflanzen („sink-source“-Interaktion); Untersuchungen zur Zellwandbiosynthese, zur Ionenaufnahme über Wurzelhaare, zur Schließzellenentwicklung und -verteilung und zur Rolle der als Pflanzenhormone wirksamen Brassinosteroide; Etablierung und Optimierung nichtinvasiver Messmethoden und Entwicklung von Methoden zur automatisierten Einzelzellanalytik, Genomanalyse (Willmitzer)

Untersuchungen zur Molekularphysiologie pflanzlicher Schließzellen; Analyse des Metabolismus osmotisch aktiver Substanzen in den Schließzellen; Charakterisierung von Ionenkanälen in Schließzellen; Identifikation von Signaltransduktionskomponenten innerhalb des Spaltöffnungsapparates (Müller-Röber)  
Untersuchungen zur molekularen Physiologie der Stickstoffakquisition in Pflanzen, insbesondere zur Struktur, Funktion und Regulation von Nitrat- und Ammoniumtransportern; Analyse spezifischer Mechanismen während der symbiotischen Stickstofffixierung (Udvardi)

*Fachbeirat:*

Prof. Dr. Maarten Koorneef,  
Wageningen/NL  
Prof. Dr. Chris Lamb, Norfolk/GB  
Prof. Dr. Dierk Scheel, Halle  
Prof. Dr. Thomas D. Sharkey,  
Madison/USA  
Prof. Dr. Christopher R. Somerville,  
Stanford/USA  
Prof. Dr. Ulrich Wobus, Gatersleben

**Institutsgeschichte**

Das Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie wurde am 1. Januar 1994 gegründet. Erster Direktor ist Prof. Dr. Lothar Willmitzer. Das Institut nahm am 1. Februar 1995 seine experimentelle Arbeit in einem Verfügungsgebäude auf dem Gelände der Universität Potsdam in Golm auf. 1999 wurde der Institutsneubau auf dem Gelände des Max-Planck-Campus Golm bezogen. Das Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie wird im Endausbau in drei Abteilungen sowie zwei Selbständige Nachwuchsgruppen gegliedert sein. Das Institut untersucht die Prozesse der Biosynthese, der Verteilung und des Transports sowie der Speicherung niedermolekularer Substanzen und hochmolekularer Inhaltsstoffe mit Speicher-, Signal- oder Strukturfunktion. In einem integrativen Ansatz werden pflanzenphysiologische und molekulargenetische Arbeitstechniken eingesetzt. Ziel ist der Aufbau einer systemorientierten Biochemie und Physiologie der Pflanzen unter Anwendung und Fortentwicklung moderner, an der lebenden Pflanze anzuwendenden physikalisch- und biochemisch-analytischer Methoden zur Beantwortung pflanzenpezifischer Fragestellungen. Eine Abteilung und zwei Selbständige Nachwuchsgruppen sind etabliert.

**Abteilung Molekulare Physiologie Höherer Pflanzen**

*Direktor: Prof. Dr. Lothar Willmitzer*

**Arbeitsgebiete**

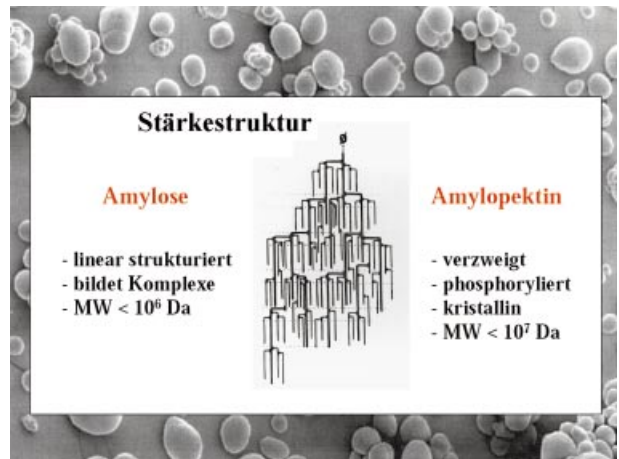
Analyse der Synthese- und Speichervorgänge von Kohlenhydraten in höheren Pflanzen („sink-source“-Interaktion); Untersuchungen zur Zellwandbiosynthese, zur Ionenaufnahme über Wurzelhaare, zur Schließzellenentwicklung und -verteilung und zur Rolle der als Pflanzenhormone wirksamen Brassinosteroide; Etablierung und Optimierung nichtinvasiver Messmethoden und Entwicklung von Methoden zur automatisierten Einzelzellanalytik; Genomanalyse; molekulare Entwicklungs- und Stoffwechselgenetik (Arabidopsis); nichtinvasive Methoden; Einzelzellanalytik; Blühinduktion, Biopolymere (Fruktane); Wurzelphysiologie, Biopolymere (Glukane).

**Aktueller Forschungsschwerpunkt***Molekulargenetische Untersuchung des Stärkehaushalts Höherer Pflanzen*

Stärke konstituiert den Großteil der Trockenmasse in den erntebaren Speicherorganen von Kulturpflanzen. Sie ist nicht nur die primäre Energiequelle in der menschlichen Nahrung, sondern auch ein nachwachsender Rohstoff, der Eingang in eine Vielzahl von industriellen Anwendungen findet. Die Menge Stärke, die jährlich in Weizen, Reis, Mais und Kartoffeln geerntet wird, überschreitet weltweit  $10^{12}$  Tonnen. Davon werden ungefähr  $2 \times 10^7$  Tonnen als industrieller Rohstoff genutzt. Diese industriell genutzte Stärke wird vornehmlich aus Mais gewonnen, in Mitteleuropa wird Stärke aber auch in erheblichen Mengen aus Kartoffeln isoliert. Für die Pflanze stellt Stärke eine Substanz dar, die für viele biochemische, zellu-

läre und physiologische Prozesse von entscheidender Bedeutung ist. Beispielhaft seien hier die transitorische Stärkebiosynthese, die während der Photosynthese im Tagesgang auftreten kann, sowie die Akkumulation von Stärke in Überdauerungsorganen, wo sie als essenzieller Speicher von Kohlenhydraten und Energie dient, genannt. Die meisten Stärken setzen sich aus zwei verschiedenen Makromolekülen zusammen, der Amylose (20–30%) und dem Amylopektin. Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften  $\beta$ -D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Präsenz von ca. 0,1%  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ist Amylopektin stärker verzweigt und weist ca. 4% Verzweigungspunkte auf. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen beiden Molekülen liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von  $5 \times 10^5$ – $10^6$  Da hat, liegt dasjenige von Amylopektin zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Da (Abb. 1).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt in den relativen Mengen an Spurenstoffen, die mit diesen Makromolekülen assoziiert vorliegen können. Amylose kann mit kleinen hydrophoben Molekülen komplexiert vorliegen. Insbesondere in Getreiden kann die Amylose mit relativ hohen Mengen an Lipiden komplexiert sein. Amylopektin kann andererseits kovalent gebundenes anorganisches Phosphat enthalten, was für die Amylose bisher nicht beschrieben wurde. Hohe Phosphatgehalte werden speziell in Stärken gefunden, die aus Knollenfrüchten gewonnen sind. Unter den kommerziell erhältlichen Stärken hat die Kartoffelstärke den höchsten Phosphatgehalt, der zwischen 10–30



nmol  $\text{mg}^{-1}$  Stärke liegen kann. In Curcuma-Arten kann der Phosphatgehalt sogar 2–4fach höher liegen, während er in Getreiden ca. 100fach geringer ist. Der hohe Phosphatgehalt verleiht der Kartoffelstärke Eigenschaften, die sie von anderen Stärken unterscheidet. Ungeachtet der Bedeutung, die das kovalent gebundene Phosphat für die physikochemischen Eigenschaften der Stärke hat, ist die Biochemie, die der Inkorporation von Phosphat in die Stärke zugrunde liegt, bisher weitestgehend unerforscht. Trotz einer Vielzahl von Studien, die die Biosynthese der Stärke aufklären oder Beziehungen zwischen der Struktur der Stärke und ihren funktionalen Eigenschaften etablieren sollten, bleibt Stärke eine weitgehend unverstandene Substanz. Obwohl Stärke sich aus Makromolekülen zusammensetzt, die fast ausschließlich aus Glucosemolekülen aufgebaut sind, hat sich in der Evolution eine Vielfalt entwickelt, die es ermöglicht, Pflanzenspezies aufgrund ihrer Stärkestruktur zu unterscheiden. Diese Vielfalt erstreckt sich nicht nur zwischen einzelnen Arten, sondern ist auch innerhalb einer Pflanze zu beobachten, da in verschiedenen Organen unterschiedliche Stärkestrukturen ausgebildet werden.

**Abb. 1:** Stärke setzt sich aus den Makromolekülen Amylose und Amylopektin zusammen. Abhängig vom Gehalt dieser Komponenten, aber auch von der Kettenlänge und vom Grad der Verzweigungen und Phosphorylierungen resultieren unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften von Stärken (MW = Molekulargewicht). Im Hintergrund: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Stärkekörnern.

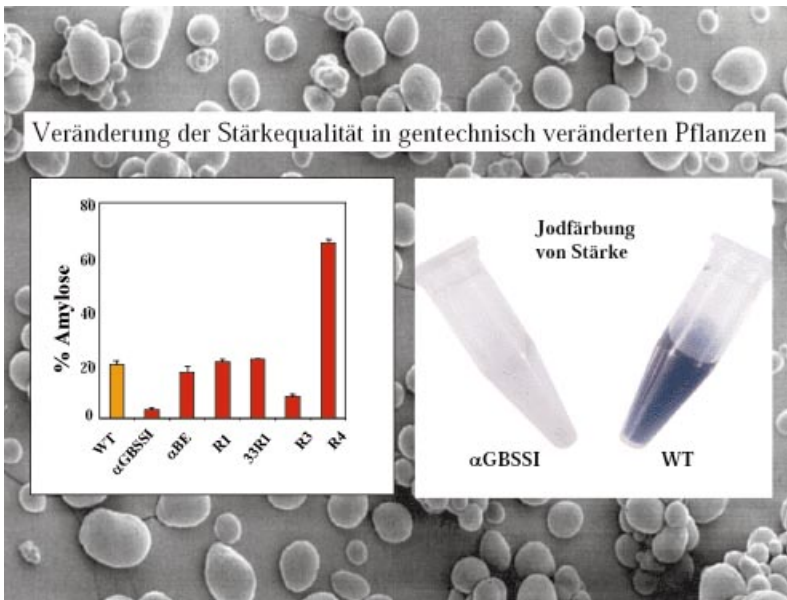


**Abb. 2:** An der Biosynthese von Stärke, einem Polymer von Glucose-Einheiten, sind verschiedene Enzyme beteiligt. Die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) stellt den aktivierten Zucker ADP-Glucose her. SS I-III sind Stärkesynthasen, die zusammen mit den Verzweigungsenzymen (BE I-II) das verzweigte Amylopektin synthetisieren. GBSS sind stärkekorngelundene Stärke-Synthasen, die maßgeblich an der Herstellung des linearen Stärkeanteils Amylose beteiligt sind.

Weiterhin ist die Stärkestruktur stark von Umwelteinflüssen wie z. B. der Temperatur und dem Wasser- oder Nährstoffangebot abhängig. Diese Variabilität ist überraschend, weil die Enzyme, die zur Stärkebiosynthese beitragen, sich in allen Pflanzenarten weitestgehend ähneln. Unterschiede sind meistens dadurch bedingt, dass die Ausstattung von verschiedenen Pflanzenorganen mit den jeweiligen Isozymen variiert. So kann das dominierende Isozym, das gegebenenfalls mehr als 90 % der Gesamtaktivität eines spezifischen Enzyms ausmachen kann, von Organ zu Organ verschieden sein. Bis heute ist es jedoch nicht möglich, eine Reihe von Eigenschaften der in einem gegebenen Pflanzenorgan synthetisierten Stärke mit der An- oder Abwesenheit bestimmter Isoformen zu korrelieren. Genetische Ansätze ermöglichten es, die Frage der spezifischen Funktion eines Enzyms in einem Stoffwechselweg zu untersuchen. Insbesondere zu Enzymen der Stärkebiosynthese sind eine Reihe von Mutanten bekannt, die schon vor vielen Jahren charakterisiert worden sind. Mit Hilfe der klassisch eingesetzten Selektionsmethoden für Mutanten im Stärkestoffwechsel, wie zum Beispiel auf eine

veränderte Jodfärbung pflanzlicher Gewebe, lassen sich jedoch nur solche Genotypen selektieren, die relativ drastische Änderungen in der Stärkestruktur aufweisen. Mit Hilfe moderner molekulargenetischer Methoden ist es möglich, Pflanzen zu erzeugen, die für jedes beliebige Enzym, das potenziell in der Stärkebiosynthese involviert ist, eine verminderte Aktivität aufweisen. Anhand solcher selektierten Pflanzen lassen sich auch subtile Änderungen in der Stärkefeinstruktur mit Hilfe aufwendigerer Analysemethoden detektieren.

Die Biosynthese der Stärke lässt sich in drei Teilschritte unterteilen (Abb. 2). Das Enzym ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) synthetisiert zunächst ADP-Glucose, das das Substrat für die Stärke-Synthasen (SS), die lineare Glucane synthetisieren, ist. Die linearen Glucane werden dann durch Verzweigungsenzyme (Branching Enzymes, daher BE) verzweigt. Durch diese Reaktionssequenz würden aber nur zufällig verzweigte Glucane (Phytoglycogen) synthetisiert. Durch das Enzym Isoamylase werden überschüssige Seitenketten wieder entfernt, was die regelmäßige Anordnung der Seitenketten erlaubt. Es ist nicht auszuschließen, dass andere Enzyme, die traditionell dem Stärkeabbau zugeordnet werden, auch an der Ausbildung der Feinstruktur des Amylopektins beteiligt sind. Aus diesem Grunde wurden in unserer Arbeitsgruppe eine Vielzahl von Genen isoliert, die für Enzyme des Stärkemetabolismus kodieren und eine funktionelle Analyse dieser Gene in transgenen Kartoffelpflanzen durchgeführt. Dafür wird die Expression dieser Gene *in planta* inhibiert, um anschließend die Auswirkung dieser Manipulation auf den Stärkestoffwechsel zu analysieren. Die Analyse erlaubt Rückschlüsse auf die spezifische Funktion des jeweiligen Enzyms. Diese Vorgehensweise wird

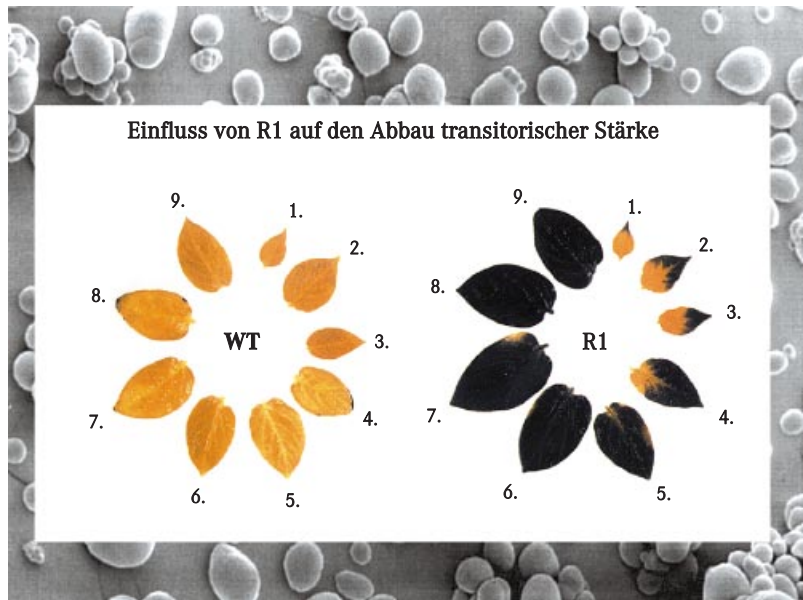


**Abb. 3:** Linke Bildseite: Verschiedene transgene Kartoffelpflanzen zeigen einen veränderten Amylosegehalt. Die Stärken haben dadurch unterschiedliche physikalische Qualitäten. WT = nichttransformierte Kontrollpflanzen,  $\alpha$ GBSSI = Pflanzen mit reduzierter Aktivität der stärkekorngelassenen Stärke-Synthese,  $\alpha$ BE = Pflanzen mit reduzierter Aktivität des Verzweigungsenzyms, R1 und 33R1 = Pflanzen mit reduzierter Aktivität des R1-Enzyms (höchstwahrscheinlich an der Phosphorylierung von Stärke beteiligt), R3 = Pflanzen mit reduzierten Aktivitäten der stärkekorngelassenen Stärke-Synthese und des R1-Enzyms, R4 = Pflanzen mit reduzierten Aktivitäten des Verzweigungsenzyms und des R1-Enzyms. Rechte Bildseite: Stärke mit geringem Amylose-Anteil wie von  $\alpha$ GBSSI-Pflanzen zeigt nur einen Bruchteil der Blaufärbung mit Jod, wie sie für WT-Stärke typisch ist.

u. a. dadurch bedingt, dass es bis heute nicht gelungen ist, durch das Zusammenführen verschiedenster isolierter Enzyme Stärkegranula *in vitro* zu erzeugen. Stärke-Synthasen (SS) katalysieren den Transfer des Glucosyl-Rests von ADP-Glucose zum nichtreduzierenden Ende eines  $\alpha$ -1,4-Glucans. Alle Stärke-Synthasen können beide Komponenten der Stärke, Amylose und Amylopektin, *in vitro* verlängern. Basierend auf Sequenzvergleichen lassen sich bisher mindestens vier verschiedene Isozyme in Pflanzen unterscheiden. Diese werden GBSS (stärkekorngelassene Stärke-Synthase; *granule-bound starch synthase*), SSI, SSII und SSIII genannt. Möglicherweise werden in Zukunft weitere Isozyme in Pflanzen charakterisiert werden. Es gelang für alle bekannten Stärke-Synthasen cDNA-Klone aus Kartoffel zu isolieren. Die Rolle dieser Stärke-Synthase-Isozyme wurde anhand transgener Kartoffelpflanzen analysiert (Abb. 3). GBSS ist dabei allein für die Amylose-Synthese verantwortlich, da transgene Pflanzen mit verminderter Ex-

pression von *GBSS* eine Amylose-freie Stärke synthetisieren. *GBSS* scheint aber auch an der Amylopektin-Synthese beteiligt zu sein. Die Untersuchungen legen nahe, dass sie zur Herstellung längerer Seitenketten in Amylopektinmolekülen beiträgt. Das dominierende Isozym in der Amylopektinsynthese ist SSIII, das zu 80 % der Gesamt-Stärke-Synthase-Aktivität in Kartoffelknollen beiträgt. Wird die Expression dieses Isozyms vermindert, so werden Stärkekörner mit einer stark veränderten Morphologie synthetisiert, in denen die Amylopektin-Komponente vermehrt kürzere Seitenketten enthält. Die Rolle der anderen Stärke-Synthase-Isozyme ist nicht so deutlich ausgeprägt. Wird die Expression von *SSII* inhibiert, so ist lediglich eine leichte Verschiebung im Kettenlängenverteilungsmuster hin zu kürzeren Ketten festzustellen, während die Inhibierung der Expression von *SSI* nicht zu feststellbaren Veränderungen im Stärkestoffwechsel führt. Werden *SSII* und *SSIII* gleichzeitig in ihrer Expression gehemmt, so kommt es zu ähnlichen

**Abb. 4:** Blattstärke (transitorische Stärke) wird in dunkel gehaltenen Pflanzen abgebaut. Blätter nicht-transformierter Kontrollpflanzen (WT), die mehrere Stunden im Dunkeln gehalten wurden, weisen daher keine typische blaue Jodfärbung der Stärke mehr auf. In gentechnisch veränderten Pflanzen, die in der Aktivität des R1-Enzyms reduziert sind, ist dieser Mechanismus offenbar gestört, denn obwohl die Blätter stundenlang dunkel gehalten wurden, zeigen sie eine intensive blaue Jodfärbung. Die Blattstärke ist nicht abgebaut worden, was vermutlich mit dem stark verminderten Phosphatgehalt zusammenhängt.



Effekten, wie sie in anderen Pflanzenarten auftreten, wenn Gene für Stärke-Synthasen mutiert sind. Die Stärkekornmorphologie ist entstellt, und zusätzlich zu den kürzeren Seitenketten treten auch verstärkt extrem lange Ketten im Amylopektin auf. Interessanterweise sind die Effekte, die man erhält, wenn beide Stärke-Synthasen gleichzeitig inhibiert werden, nicht additiv, sondern intermediär zwischen den Auswirkungen in Bezug auf den Anteil kürzerer Seitenketten, wenn man sie einzeln hemmt. Dies deutet darauf hin, dass die Isozyme der Stärke-Synthasen während der Amylopektinsynthese miteinander interagieren.

Darüberhinaus haben wir die Rolle eines Verzweigungsenzym-Isozyms ( $BE_B$ ) in der Amylopektin-Synthese genauer bestimmt. Pflanzen mit verminderter Aktivität von  $BE_B$  synthetisieren ein Amylopektin mit einem höheren Anteil längerer Ketten, sowie einem nahezu verdoppelten Phosphatgehalt. Es ist jedoch kein Einfluss auf den Amylose-Gehalt der

Stärke festzustellen. Dieser wird erst ersichtlich, wenn zusätzlich zu  $BE_B$  die Expression von  $R1$  vermindert wird. In diesen transgenen Pflanzen ist eine Steigerung des Amylosegehalts der Stärke auf über 60% festzustellen. Die Klonierung einer cDNA für  $R1$  gelang mit Hilfe von Antisera, die gegen Proteine gerichtet waren, die assoziiert mit Stärkegranula vorliegen. Dieses Protein ist bisher nicht beschrieben worden und katalysiert wahrscheinlich die Phosphorylierung der Stärke. Pflanzen mit verminderter Expression von  $R1$  synthetisieren eine Stärke mit stark vermindertem Phosphatgehalt (Abb. 4), während eine Expression des Proteins in *Escherichia coli* zu einer Erhöhung des Phosphat-Anteils im Glycogen führt. Der biochemische Reaktionsmechanismus, der zur Phosphorylierung der Stärke führt, ist jedoch bisher nicht verstanden, ebensowenig wie die Erhöhung des Amylose-Anteils in Pflanzen mit gleichzeitig verminderter Expression von  $BE_B$  und  $R1$ . Es ist möglich, dass das zweite

Verzweigungsenzym durch den verminderten Phosphatgehalt in seiner Aktivität beeinträchtigt wird. Außerdem gelang es, die Rolle der verschiedenen Stärke-Phosphorylasen weiter zu charakterisieren. Interessanterweise ist das dominante Isozym in Kartoffelknollen (Pho1a) an der Amylopektinsynthese beteiligt, da in transgenen Pflanzen mit verminderter Expression von Pho1a eine Verschiebung des Kettenlängenverteilungsmusters hin zu kürzeren Ketten auftritt. Dies widerspricht der gegenwärtig vertretenen Lehrbuchmeinung, dass die Stärke-Phosphorylase primär den Abbau der Stärke katalysiert. Dieser ist in den transgenen Pflanzen unverändert. Wir konnten den Prozess der Stärkeverzuckerung bei Kaltlagerung von Kartoffelknollen unterdrücken. Pflanzen mit verminderter Expression von *R1* zeigen diesen Phänotyp, der unter Umständen darauf zurückzuführen ist, dass die in diesen Pflanzen synthetisierte Stärke von den vorhandenen Enzymen nicht abgebaut werden kann. Dies lässt sich gegenwärtig aber nicht überprüfen, da, im Gegensatz zu der in Lehrbüchern vertretenen Meinung, der Stärkeabbau in vegetativen Pflanzenorganen bisher nicht verstanden ist. Daher werden wir in Zukunft verstärkt die Stärkemobilisierung untersuchen. Weiterhin versuchen wir den Reaktionsmechanismus des R1-Proteins aufzuklären (*Kossmann, Lloyd, Scheidig; M. Steup, R. Lorberth, Universität Potsdam*).

### **Selbständige Nachwuchsgruppe Molekularphysiologie pflanzlicher Schließzellen**

*Leiter: Dr. Bernd Müller-Röber  
(bis 30. 4. 2000)*

#### **Arbeitsgebiete**

Untersuchungen zur Molekularphysiologie pflanzlicher Schließzellen; Analyse des Metabolismus osmotisch aktiver Substanzen in den Schließzellen; Charakterisierung von Ionenkanälen in Schließzellen; Identifizierung von Signaltransduktionskomponenten innerhalb des Spaltöffnungsapparates.

### **Selbständige Nachwuchsgruppe Physiologie der Stickstoffakquisition**

*Leiter: Dr. Michael Udvardi*

#### **Arbeitsgebiete**

Untersuchungen zur molekularen Physiologie der Stickstoffakquisition in Pflanzen, insbesondere zur Struktur, Funktion und Regulation von Nitrat- und Ammoniumtransportern; Analyse spezifischer Mechanismen während der symbiotischen Stickstofffixierung.