

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

**Golm bei Potsdam**

## **Geschäftsführender Direktor**

Prof. Dr. Lothar Willmitzer

Am Mühlenberg 1

14476 Golm

Postanschrift:

Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie

14424 Potsdam

Telefon 03 31/5 67-82 02

Telefax 03 31/5 67-82 01

E-Mail: [willmitzer@mpimp-golm.mpg.de](mailto:willmitzer@mpimp-golm.mpg.de)

Internet: <http://www.mpimp-golm.mpg.de>

## **Wissenschaftliche Mitglieder, Direktoren**

Prof. Dr. Mark Stitt (seit Dezember 2000) · Prof. Dr. Lothar Willmitzer

## **Selbständige Nachwuchsgruppen**

Dr. Michael Udvardi · Dr. Markus Pauly (seit Mai 2001)

## **Mitarbeiter**

Ende 2000 waren insgesamt 98 Mitarbeiter (einschließlich der Drittmittelbeschäftigten) am Institut tätig, darunter 35 Wissenschaftler; dazu kamen im Berichtsjahr 39 Nachwuchs- und 16 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 Brassinosteroiden; Etablierung und Optimierung nichtinvasiver Messmethoden und Entwicklung von Methoden zur automatisierten Einzelzellanalytik, Genomanalyse (Willmitzer)

Kohlenhydrate in Speicherorganen, Metabolische Netzwerke, Nukleotidstoffwechsel (Stitt)

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)

Untersuchungen zur Synthese von Zellwandpolysacchariden, inklusive des Stoffwechsels der Nukleotid-Zucker und dessen Regulation; Funktionelle Analyse von Zellwandpolymeren und deren Substrukturen durch Modifikation dieser Bestandteile *in planta* (Pauly)

*Fachbeirat:*

Prof. Dr. Maarten Koornneef,  
Wageningen/NL  
Prof. Dr. Chris Lamb, Norfolk/GB  
Prof. Dr. Barry Osmond,  
Weston Creek/Australien  
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. Gründungsdirektor 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 und zum Ziel haben, die Prozesse der Biosynthese, der Verteilung und des Transports sowie der Speicherung niedermolekularer Substanzen und hochmolekularer Inhaltsstoffe mit Speicher-, Signal- oder Strukturfunktion zu untersuchen. Dies wird im Rahmen eines integrativen Ansatzes unter Einbeziehung pflanzenphysiologischer und molekulargenetischer Arbeitstechniken geschehen. Ziel ist der Aufbau einer systemorientierten Biochemie und Physiologie der Pflanzen unter Anwendung und Fortentwicklung moderner, an der lebenden Pflanze anzu-

wendender physikalisch- und biochemisch-analytischer Methoden zur Beantwortung pflanzenspezifischer Fragestellungen. Eine Abteilung und eine Selbständige Nachwuchsgruppe sind vollständig etabliert. Die zweite Abteilung, unter der Leitung von Prof. Mark Stitt, ist seit Dezember 2000 im Aufbau begriffen. Dr. Markus Pauly leitet ab Mai 2001 eine zweite Selbständige Nachwuchsgruppe.

**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; Funktionelle und Vergleichende Genomforschung; molekulare Entwicklungs- und Stoffwechselgenetik (Arabidopsis); nichtinvasive Methoden; Einzelzellanalytik, Phloempoteine; Biopolymere (Fruktane).

**Abteilung Metabolische Netzwerke**

*Direktor: Prof. Dr. Mark Stitt*

**Arbeitsgebiete**

Kohlenhydrate in Speicherorganen, Molekulare Nährstoffphysiologie, Me-

tabolische Netzwerke, Nukleotidstoffwechsel, Proteomics, Bioinformatik.

### **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 symbiontischen Stickstofffixierung.

### **Selbständige Nachwuchsgruppe Aufbau, Struktur und Funktion von pflanzlichen Zellwänden**

*Leiter: Dr. Markus Pauly*

Untersuchungen zur Synthese von Zellwandpolysacchariden, inklusive des Stoffwechsels der Nukleotid-Zucker und dessen Regulation; Funktionelle Analyse von Zellwandpolymeren und deren Substrukturen durch Modifikation dieser Bestandteile *in planta*.

#### **Aktueller Forschungsschwerpunkt**

*Molekulargenetische Untersuchungen zur Regulation der Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren*

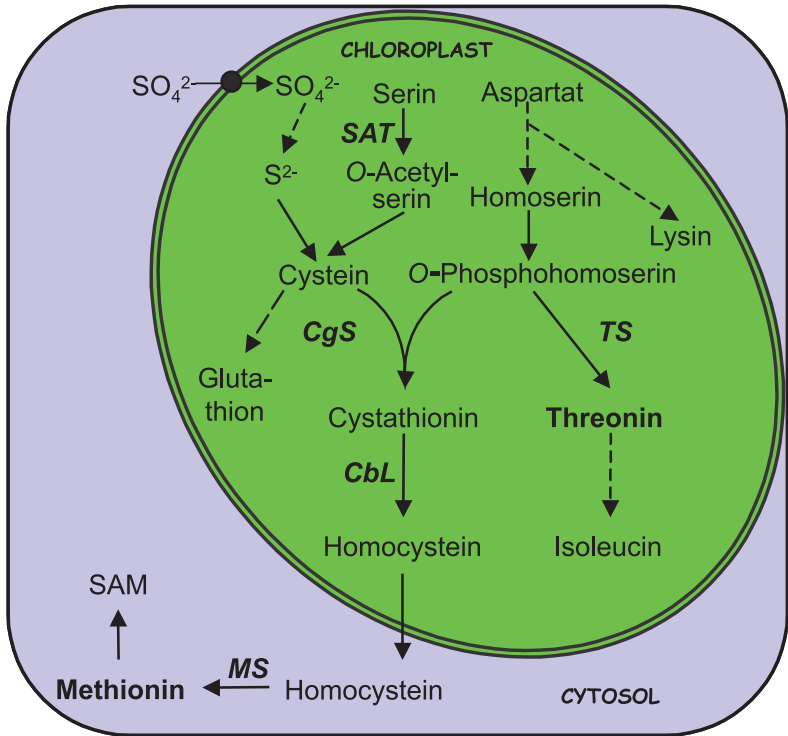
Schwefelhaltige Verbindungen spielen eine zentrale Rolle im pflanzlichen Stoffwechsel. Höhere Pflanzen verwenden anorganisches Sulfat als Hauptquelle zur Synthese stoffwechselrelevanter Verbindungen, darunter die Aminosäuren Cystein und Methionin, sowie eine Vielzahl anderer Metabolite wie Vitamine, Sulfolipide, Glutathion, Phytochelatine und se-

kundäre Metaboliten. Diese Verbindungen sind an einer Vielzahl verschiedener physiologischer Reaktionen, wie etwa der Stressantwort, der Wirkung von Hormonen und der Proteinbiosynthese beteiligt. Sie spielen ebenfalls eine Rolle bei Entwicklungsvorgängen und sind Kofaktoren bei enzymatischen Reaktionen.

Trotz der offensichtlichen Bedeutung dieser Aminosäuren wissen wir weniger über ihren Metabolismus als über andere primäre Stoffwechselwege. Daher werden am Institut zwei Schwerpunkte in diesem Bereich bearbeitet: 1) Aufklärung der Biosynthesevorgänge und der Regulation schwefelhaltiger Aminosäuren in Pflanzen und 2) Erhöhung des Gehalts dieser für die menschliche und tierische Ernährung essentiellen Aminosäuren in Nutzpflanzen. Hierzu werden gezielt im Stoffwechsel veränderte Pflanzen (Mutanten, transgene Pflanzen) mit veränderter Ausprägung dieser Merkmale hergestellt. Die molekulare und biochemische Analyse dieser Pflanzen hat dazu beigetragen, unser Wissen um diese Synthesewege zu erweitern.

*Cysteinbiosynthese.* – Cystein ist die erste organische Verbindung im pflanzlichen Stoffwechsel, die reduzierten Schwefel enthält. Es ist Vorläufer einer Vielzahl weiterer Verbindungen. Der Gehalt an freiem Cystein ist üblicherweise in Pflanzen sehr niedrig. Die Schwefelassimilation erfolgt in vier Schritten: die Aufnahme von Sulfat in den Wurzeln, der Aktivierung des inerten Sulfats durch Bindung an ATP, die stufenweise Reduktion und die Inkorporation von Sulfid in Cystein (Abb. 1). Das Kohlenstoffgrundgerüst des Cysteins wird von der Aminosäure Serin abgeleitet. Serin wird mittels Acetylierung durch das Enzym Serinacetyltransferase (SAT) aktiviert. Durch das Enzym O-Acetylserin(thiol)lyase (Cysteinsynthase, OAS-TL) wird ab-

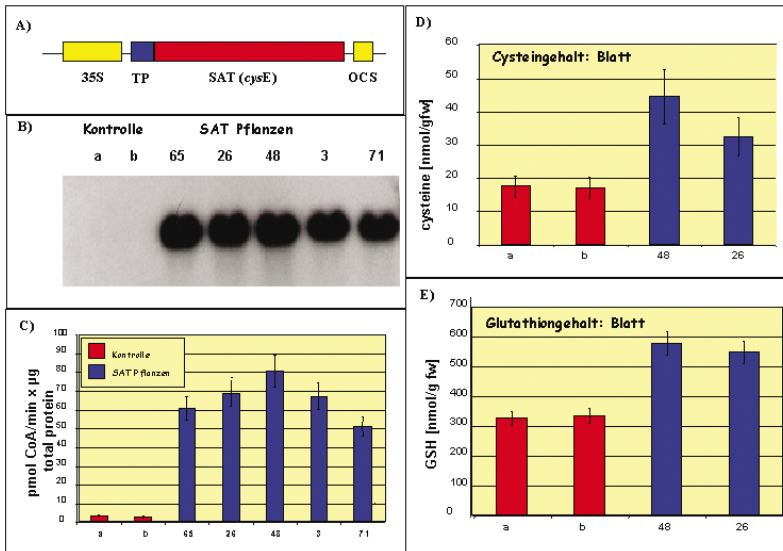
**Abb. 1:** Biosyntheseweg der schwefelhaltigen Aminosäuren in Pflanzen. Die Biosynthese findet weitgehend im Chloroplasten der Blätter statt. Zur Cysteinbiosynthese wird Sulfat zu Sulfid reduziert und substituiert die durch Acetylierung aktivierte Hydroxylgruppe des Serins unter Bildung des Thiols Cystein. Cystein dient entweder als Vorläufer der Glutathionbiosynthese, eines weiteren wichtigen Thiols der Pflanze oder als Vorläufer und Sulfhydrylgruppendonator der Methioninbiosynthese. Methionin selbst gehört zur Familie der vom Aspartat abgeleiteten, sämtlich essenziellen Aminosäuren (Lysin, Threonin, Isoleucin, Methionin). Das Intermediat O-Phosphohomoserin wird in drei Reaktionsschritten, von denen der letzte interessanterweise im Cytosol lokalisiert ist, zu Methionin umgewandelt. Die Lokalisation der im Text erwähnten Enzyme ist im Stoffwechselschema angedeutet. SAT: Serinacetyltransferase; CgS: Cystathionin-gamma-Synthase; CbL: Cystathionin-beta-Lyase; MS: Methioninsynthase; TS: Threoninsynthase. Gestrichelte Linien bedeuten, dass dort mehrere enzymatische Reaktionen aufeinanderfolgen, die hier nur angedeutet sind.



schließlich Cystein unter Inkorporation des Sulfids synthetisiert. Verschiedene Isoformen der Cysteinsynthase und der SAT konnten in pflanzlichen Kompartimenten wie dem Cytosol, den Chloroplasten und Mitochondrien nachgewiesen werden, aber lediglich die Funktion der plastidär lokalisierten Formen der OAS-TL und SAT ist im Hinblick auf die *De-novo*-Synthese von Cystein hinreichend geklärt. Die Sulfatassimilation ist ein energieverbrauchender Prozess und benötigt etwa  $732 \text{ kJ mol}^{-1}$  für die Reduktion bis zum Cystein. In Pflanzen wird die Energie direkt aus der Photosynthese in Form von ATP und Reduktionsäquivalenten bereitgestellt. Die Sulfatassimilation findet daher primär im grünen Blattgewebe statt, die meisten beteiligten Enzyme sind in den Chloroplasten lokalisiert.

Die Funktionsaufklärung mithilfe molekulargenetischer Ansätze soll im Folgenden für die Enzyme Serinacetyltransferase (SAT), die Cystathionin beta-Lyase (CbL) und die Threoninsynthase (TS) exemplarisch beschrieben werden. Die jeweilige Position im Stoffwechselweg zeigt Abbildung 1.

**Serinacetyltransferase.** – Die Serinacetyltransferase (SAT) stellt das aktivierte Kohlenstoffgrundgerüst für die Cysteinbiosynthese bereit. Die durch SAT katalysierte Reaktion wird als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angesehen. Zur Verifizierung dieser Annahme und mit dem Ziel den Cysteingehalt zu erhöhen, haben wir transgene Kartoffelpflanzen erzeugt, die das bakterielle *E. coli* SAT-Gen (*cysE*) konstitutiv in Pflanzen exprimierten. Die daraus resultierende Erhöhung der plastidären SAT-Aktivi-



**Abb. 2:** Überexpression der Serinacetyltransferase (SAT) in Kartoffelpflanzen. **A)** Konstrukt zur Transformation von Pflanzen. Das *Escherichia coli*-*cysE*-Gen (SAT) wurde mit einem Transitpeptid versehen, dass das Protein in den Chloroplasten dirigiert. Die Expression erfolgt konstitutiv unter Kontrolle des viralen 35S Promoters; OCS bezeichnet die Terminierungssequenz des künstlichen Gens. **B)** Die RNA-Blot-Analyse der transgenen Pflanzen zeigt eine starke Expression des eingebrachten SAT-Gens (Schwärzung) in allen transgenen Linien (SAT-Pflanzen), wohingegen in den nichttransformierten Kontrollen (a, b) kein Signal zu erkennen ist. **C)** In Blattextrakten der transgenen Pflanzen (65, 26, 48, 3, 71) konnte eine 10- bis 20fache Erhöhung der SAT-Aktivität gemessen werden gegenüber Kontrollpflanzen, die eine niedrige endogene Aktivität aufweisen (a, b). **D)** Der Cysteingehalt in Blättern zweier ausgewählter transgener Pflanzen (48, 26) ist aufgrund der eingebrachten neuen SAT-Aktivität gegenüber untransformierten Kontrollen (a, b) etwa verdoppelt. **E)** Der Glutathiongehalt – ein Tripeptid, das ein Molekül Cystein enthält – in Blättern zweier ausgewählter transgener Pflanzen (48, 26) ist aufgrund der eingebrachten neuen SAT-Aktivität gegenüber untransformierten Kontrollen (a, b) etwa verdoppelt. Der Gehalt an Glutathion liegt etwa 10fach höher als der des freien Cysteins, so dass insgesamt eine deutliche Akkumulation reduzierten Schwefels in Form von Cystein erzielt werden konnte. Glutathion dient dabei einerseits als Cysteinreservoir, andererseits wird so das toxische Cystein „entgiftet“.

tät bewirkte eine Verdopplung der Cysteingehalte in Blättern transgener Linien sowie eine Verdopplung der Glutathiongehalte (Abb. 2). Daraus lässt sich ableiten, dass unter normalen Wachstumsbedingungen nicht die Schwefelassimilation, sondern die SAT-Aktivität die Cysteinsyntheserate begrenzt. Das Ansteigen des Glutathiongehalts deutet darauf hin, dass die vorhandene Cysteinmenge wiederum limitierend für die Glutathionsynthese ist. Des Weiteren sind hohe Cysteinmengen toxisch für die Pflanze und werden im Glutathionpool gleichsam entgiftet und bioverfügbar gespeichert. Trotz der Bereitstellung erhöhter Cysteinmengen kommt es nicht zu einer Akkumulation freien Methionins in diesen transgenen Pflanzen und die transgenen Pflanzen weisen keinen von Kontrollpflanzen abweichenden Phänotyp auf.

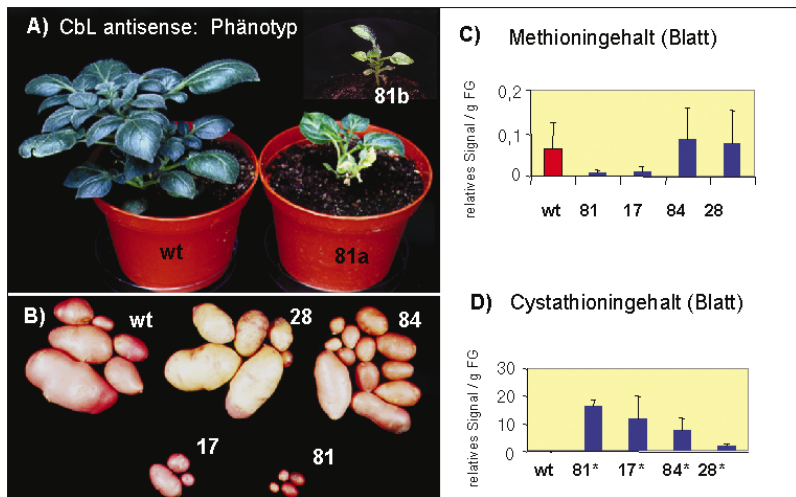
Glutathion dient dazu, reduzierten Schwefel innerhalb der Pflanze zu transportieren. Weiterhin spielt es als Antioxidans eine entscheidende Rolle bei der Abwehr diverser Formen von Stress, wie beispielsweise oxidativem-, Trocken- und Hitze-

Stress, sowie bei der Entgiftung zellschädlicher Fremdstoffen (Xenobiotics) und von Schwermetallen. Untersuchungen SAT-überexprimierender transgener Pflanzen haben gezeigt, dass eine Erhöhung des Glutathiongehalts zu einer erhöhten Toleranz gegenüber oxidativem Stress führte, indem die Pflanzen gegenüber Wasserstoffperoxid widerstandsfähiger wurden. Zu prüfen ist auch die Frage, inwiefern die erzeugten transgenen Pflanzen toleranter gegenüber Schwermetallen sind. Ergebnisse, die auf einer Erhöhung des Thiolgehalts aufgrund der Expression der *E. coli*-Gene der gamma-Glutamylcystein-synthetase und der Glutathionsynthetase beruhen, sind vielversprechend in Bezug auf eine Schwermetalltoleranz und der Entwicklung von Pflanzen im Hinblick auf den Einsatz zur Bodensanierung („Phytoremediation“).

**Methionin- und Threoninbiosynthese.** – Cystein stellt als Substrat der Methioninbiosynthese reduzierten, organisch gebundenen Schwefel bereit. Das Kohlenstoffgrundgerüst des Methionins entstammt dagegen der so genannten Aspartatfamilie. Aspa-



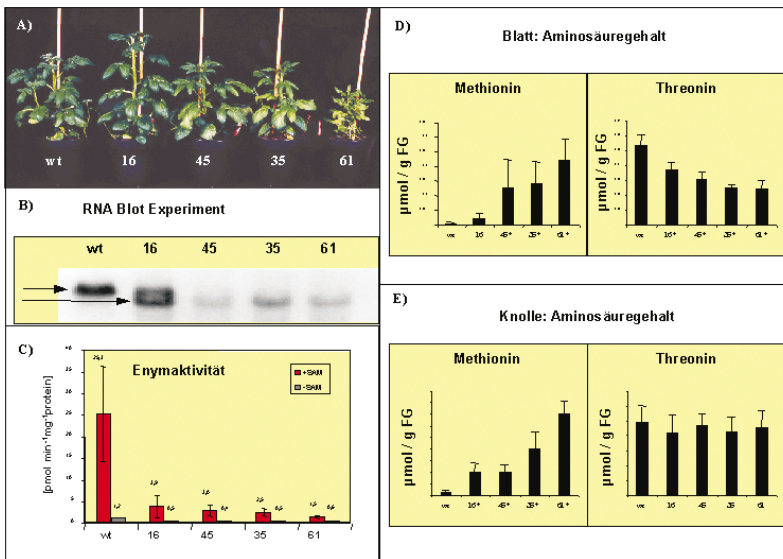
**Abb. 3:** Funktionelle Analyse der Cystathionin-beta-Lyase (CbL) der Kartoffel. Transgene Kartoffelpflanzen, die ein CbL-Antisense-Konstrukt tragen, zeigen im **A)** oberirdischen Bereich einen drastischen Phänotyp mit Wuchsretardation, Chlorosis und Veränderungen der Blattmorphologie (beispielsweise zwei Exemplare der Linie 81; 81 a, 81 b) sowie mit zunehmender Inhibierung (28, 84, 17, 81) eine **B)** Reduktion der Knollenzahl und -größe. Die Zahlen bezeichnen verschiedene transgene Linien, wt bedeutet untransformierte Kontrolle (Wildtyp). **C)** Der Methionin-gehalt ist mit zunehmender Inhibierung im Blatt signifikant erniedrigt, da der Biosyntheseweg durch die antisense-Inhibierung der CbL-Expression blockiert wird. **D)** Dahingegen akkumuliert das Substratmolekül der CbL, Cystathionin, aufgrund des Blocks in den gleichen Geweben mit zunehmender Inhibierung der CbL-Aktivität. Cystathionin ist in Kontrollen (wt) nicht nachweisbar. Hiermit wird deutlich, dass es sich bei der CbL um ein essenzielles Gen des Methioninstoffwechsels handelt.



ragin und Aspartat leiten sich vom gemeinsamen Kohlenstoffgerüst des Oxalacetats ab; Lysin, Threonin, Methionin und Isoleucin wiederum haben Aspartat als gemeinsamen Vorläufer. Die Synthese erfolgt über einen verzweigten Biosyntheseweg, wobei die Regulation der Metabolitflüsse auf biochemischer Ebene für die Biosynthese des Threonins und Lysins über „feedback“-Inhibitionsmechanismen kontrolliert wird. Das Intermediat O-Phosphohomoserin (OPHS) fließt sowohl in die Threonin- als auch in die Methioninsynthese ein, d. h. die Enzyme am Verzweigungspunkt – die Threoninsynthese (TS) und die Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (CgS) konkurrieren um das gemeinsame Substrat. Threonin wird lediglich durch Abspaltung der Phosphatgruppe gebildet. Diese Reaktion wird von der TS katalysiert. Das CgS katalysiert den ersten Schritt der Methioninsynthese. In einer pyridoxalphosphat-abhängigen  $\gamma$ -Substitutionsreaktion wird aus den Substraten Cystein und OPHS der Thioether Cystathionin gebildet. Pflanzen sind einzigartig in der Verwendung von OPHS als Substrat, wohingegen Bakterien Succin-

nylhomoserin und Hefen Acetylhomoserin als aktivierte Kohlenstoffdonatoren verwenden. Cystathionin wird nachfolgend durch das Enzym Cystathionin- $\beta$ -Lyase (CbL) in einer ebenfalls pyridoxalphosphatabhängigen Reaktion gespalten und das entstehende Homocystein wird durch das Enzym Methioninsynthase unter Bildung von Methionin S-methyliert. Die ersten beiden Schritte sind im Chloroplasten lokalisiert, während der letzte Schritt im Cytosol stattfindet.

**Cystathionin- $\beta$ -Lyase.** – Zur Bestimmung der Rolle der Cystathionin- $\beta$ -Lyase (CbL) in der Methioninbiosynthese wurde ein reverser genetischer Ansatz („antisense-approach“) verwendet, der zu einer graduellen Repression der Transkription und zunehmenden Reduktion der Enzymaktivität führte. Mit zunehmender Inhibierung entwickeln die einzelnen transgenen Linien Zwergenwuchs, der mit verringertem Ertrag einherging. Unter Gewächshausbedingungen starben diese Linien letztlich ab (Abb. 3). Die weitere Untersuchung von stoffwechselwegerelevanten Metaboliten ergab, dass in den am stärksten inhibierten Pflanzen der Methio-



ningehalt reduziert war. Fütterungsexperimente mit Methionin revertierten den Phänotyp zu einem Wildtyp-ähnlichen und legen eine kausale Verknüpfung zwischen Wachstumsveränderung und Methioningehalt nahe. Bedeutend in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass parallel dazu die Gehalte der Metabolite wie Cystein, Homoserin und besonders Cystathionin stiegen, wie mittels GC/MS-Analytik ermittelt wurde. Die Reduktion der enzymatischen Aktivität der CbL führt zu einer Akkumulation der Vorläuferverbindungen, gleichsam einem Metabolitenstau. Auf der anderen Seite führte die Überexpression der Kartoffel-CbL zu 2,5fach erhöhten und der *E. coli*-CbL (*metC*) zu 500fach erhöhten Enzymaktivitäten, die ohne Einfluss auf den Metabolitengehalt blieben; es konnte keine Steigerung des Endproduktes Methionin nachgewiesen werden. So konnten wir nachweisen, dass es sich bei der CbL zwar um ein essenzielles Gen für den Stoffwechsel handelt, dass seine Aktivität aber nicht umsatzbestimmend für den Metabolitenfluss ist.

**Abb. 4:** Die Auswirkung partieller Threoninsynthese-(TS)-Inhibierung auf den Methioninstoffwechsel der Kartoffel. Ein Kartoffel-TS-antisense-Konstrukt wurde in Kartoffelpflanzen eingeführt. Die Analysen zu den TS-antisense-Pflanzen (16, 45, 35, 61 - sortiert nach der Stärke der Inhibition) werden dargestellt. **A)** Die TS-antisense-Pflanzen zeigen in Abhängigkeit von der Stärke der Inhibition zunehmend phänotypische Veränderungen, ähnlich wie die in Abb. 3 beschriebenen CbL-antisense-Pflanzen. Bei sehr starker Inhibition ist der Phänotyp ohne Supplementation letal. **B)** Im RNA-Blot ist nachweisbar, dass die endogene (obere) Bande in Linie 16 reduziert und in den weiteren antisense-Linien nicht mehr nachweisbar ist. In allen transgenen Linien tritt eine neue, der ver-

kürzten antisense-RNA entsprechende Bande auf. **C)** In guter Korrelation mit der Abnahme der RNA kann im Enzymassay gezeigt werden, dass die Enzymaktivität der transgenen Linien (im Blatt) drastisch reduziert ist. TS ist in Anwesenheit von SAM induziert, aber auch unter diesen Bedingungen ist die Enzymaktivität aufgrund verringerter Proteingehalte wegen reduzierter mRNA-Abundanz sehr stark herabgesetzt. **D)** Aufgrund dieser verringerten Enzymaktivität ist der Threoningehalt in Blattgewebe um ca. 50% verringert, gleichzeitig aber steigt der Gehalt des Methionins im konkurrierenden Stoffwechselweg um ein Vielfaches an, d. h. der vorhandene ‚Substratstrom‘ wird aufgrund des Blocks zum Methionin umgelenkt. **E)** Anders als im Blatt können wir in der

Knolle zwar auch einen Anstieg des Methioningehaltes detektieren, aber die Konzentrationen der essenziellen Aminosäure Threonin sind nicht reduziert. Es ist für die Knolle noch ungeklärt inwieweit eine *In-situ*-Biosynthese oder ein Import von im Blatt hergestellten Aminosäuren die Balance in diesem Organ bestimmt. Für die züchterische Anwendung hat dieses Ergebnis eine hohe Bedeutung im Hinblick auf die ernährungsphysiologische Verbesserung pflanzlicher Nahrungsmittel, in denen häufig essenzielle Aminosäuren (Lysin, Methionin und Tryptophan) unterrepräsentiert sind.

**Threoninsynthase.** – Zur Charakterisierung der Rolle der TS für die Synthese von Threonin und Methionin wurden transgene Kartoffelpflanzen, die eine Antisense-RNA der Kartoffel TS exprimieren, hergestellt und untersucht. Aufgrund der graduellen Inhibition der Expression und damit der Enzymaktivität über die Herabsetzung der Menge des vorhandenen Proteins entwickeln die transgenen Linien einen Phänotyp, der in Abhängigkeit vom Grad der Inhibition von unauffällig bis hin zu einer starken Wachstumsretardierung, phänotypischen Abnormalitäten und einer massiven Chlorosis (Vergilbung) variiert (Abb. 4). Zum Verständnis der pflanzlichen Funktion der TS ist letztlich die Auswirkung auf die Metabolitenzusammensetzung von entscheidender Bedeutung. Der Threoningehalt in Blättern der transgenen Linien ist, erwartungsgemäß, auf bis zu 10% des Wildtyps reduziert. Die Aminosäuren Lysin und Isoleucin sind unbeeinflusst in ihrem Gehalt. Der Methioningehalt in Blättern der transgenen Linien ist dagegen bis zu 240fach erhöht.

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Menge an bereitgestelltem Kohlenstoff entscheidend ist für die Methioninbiosynthese und nicht die Menge reduzierten Schwefels in Form von Cystein (siehe SAT oben).

Im Regulationsmodell, das für eine andere Pflanze, *Arabidopsis thaliana*, entwickelt wurde, spielt die CgS neben der TS eine entscheidende Rolle. Unsere Analysen zeigen, dass dieses Modell sich auf die Kartoffel nicht übertragen lässt: der Kohlenstofffluss wird ausschließlich durch die TS reguliert, beziehungsweise durch das CgS/TS-Verhältnis.

Dies wird bestärkt durch Untersuchungen, die zeigen, dass eine Erhöhung des Methioningehalts mit einer Erhöhung des SAM-Gehalts ein-

hergeht. Unter diesen Bedingungen erhöht sich die Affinität der TS zum Substrat OPHS um den Faktor 250–500 und verschiebt damit den Kohlenstofffluss in Richtung Threoninsynthese. Dieser Regulations-schritt wurde in unseren transgenen Pflanzen durch die Reduktion des vorhandenen Proteins zugunsten der Methioninbiosynthese verschoben.

Einerseits ist die Bedeutung der Threoninsynthase für die Regulation der Biosynthese von Threonin und Methionin für die Grundlagenforschung interessant, andererseits eröffnet sich mit den hier vorgestellten Arbeiten die Möglichkeit zur Verbesserung der ernährungsphysiologischen Qualität bezüglich des Gehalts essenzieller Aminosäuren in Kulturpflanzen.

In diesem Zusammenhang ist es von besonderer Bedeutung, dass die transgenen TS-antisense Pflanzen in den Knollen im Gegensatz zum Blattgewebe keine Reduktion des Threoningehalts zeigen. Zugleich ist jedoch der Methioningehalt bis zu 50fach erhöht.

Kulturpflanzen wie Getreide, Hülsenfrüchte, Kartoffeln und Süßkartoffeln enthalten üblicherweise nur geringe Mengen der essentiellen Aminosäuren Methionin und Lysin.

Der vorgestellte Ansatz zur Beeinflussung der Primärstoffwechselflüsse muss sinnvollerweise nun in einem nächsten Schritt mit der gleichzeitigen Expression von ernährungsphysiologisch wertvollen Speicherproteinen kombiniert werden, um die erhöhte Syntheserate in eine ernährungsphysiologisch verwertbare Form zu überführen und stabil zu fixieren. Die hier ermittelten Prinzipien stehen zur Verbesserung der Qualität von Nutzpflanzen zur Verfügung (*Höfgen, Basner, Harms, Casazza, Kreft, Maimann, Zeh*; in Zusammenarbeit mit H. Hesse, Freie Universität Berlin).