

# Regulation von Wachstum und Kohlenhydratspeicherung durch Umweltfaktoren und physiologische Signale

Geigenberger, Peter

Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie

Abteilung - Metabolische Netzwerke  
Forschungsgebiet: Pflanzenforschung

Korrespondierender Autor: Geigenberger, Peter  
E-Mail: geigenberger@mpimp-golm.mpg.de

---

## Zusammenfassung

Abstrakt Pflanzen besitzen die Fähigkeit mit Hilfe der Lichtenergie aus anorganischer Materie reduzierte Kohlenstoffverbindungen herzustellen und für Wachstums- und Speicherprozesse zu nutzen. Unsere Arbeiten beschäftigen sich mit der Regulation dieser Speicherprozesse. Wir stellen die Frage, wie Speicherung und Verbrauch der Kohlenhydrate in Pflanzen koordinieren werden und welches dabei die entscheidenden Faktoren und Kontrollmechanismen sind. Dabei konnten Regulationssysteme identifiziert werden, die biosynthetische Prozesse innerhalb der Pflanze steuern und auf Änderungen in der Umwelt und in physiologischen Faktoren einstellen. Stärke ist das am weitesten verbreitete Speicherkohlenhydrat in Pflanzen. Durch systematische Bestimmung der subzellulären Konzentration aller Metabolite des Stärkesynthesewegs und Berechnung der Massenwirkungsquotienten der beteiligten Enzyme konnte ADP-Glukose-Pyrophosphorylase als entscheidende Regulationsstelle der Stärkesynthese bestimmt werden. Die Aktivität dieses Enzyms wird über das plastidäre Redoxpotential durch posttranslationale Thiol-Modulation reguliert, wodurch die Stärkesynthese an Änderungen in Licht und Zuckerverfügbarkeit angepasst wird. Die Redox-Regulation steuert neben der Stärkesynthese auch andere wichtige biosynthetische Prozesse, wie die Lipid- oder Aminosäuresynthese. Die Signalwege, welche die Redoxregulation biosynthetischer Prozesse mit Licht und Zuckerverfügbarkeit verbinden werden derzeit aufgeklärt. Weitere Arbeiten zeigen, dass auch die Verfügbarkeit von Pyrimidin- und Purinnukleotiden als Kofaktoren wichtiger Stoffwechselreaktionen die biosynthetische Aktivität wachsender Speichergewebe begrenzt. Die Stärkegehalte transgener Kartoffelknollen konnten durch gezielte Manipulation der plastidären Nukleotidspiegel verändert werden. Verringerte Nukleotidkonzentrationen sind Teil einer generellen Anpassung von Wachstum und Stoffwechsel an niedrige Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe. Fallende Sauerstoffkonzentrationen führen zu einer Hemmung der Atmung, zu sinkenden Adenylatspiegel und zu einer allgemeinen Drosselung verschiedener biosynthetischer Prozesse. Zusätzlich erfolgt ein Umschalten auf Stoffwechselwege die weniger Energie verbrauchen und Sauerstoff sparen. Die für die Stoffwechselanpassungen relevanten Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe sind jedoch weit höher als der  $K_m$  (Sauerstoff) der Cytochromoxidase der Atmungskette und induzieren noch keine Gärungsprozesse. Wir denken daher, dass ein bislang unbekannter Sauerstoffsensor an der Regulation beteiligt ist. In den weiteren Arbeiten sollen die Komponenten dieses putativen Signalsystems identifiziert werden. Unsere ersten Ergebnisse weisen auf eine Rolle pflanzlicher Hemoglobine bei der Wahrnehmung und Regulation interner Sauerstoffkonzentrationen hin.

Pflanzen besitzen die Fähigkeit mithilfe der Lichtenergie aus anorganischer Materie Kohlenhydrate herzustellen und für Wachstums- und Speicherprozesse zu nutzen. Kohlendioxid wird in den

Chloroplasten der Blätter im Calvin-Zyklus fixiert, wobei Triosephosphate aufgebaut werden. Während ein Teil des fixierten Kohlenstoffs vorübergehend in Form von Stärke gespeichert wird und im Chloroplasten verbleibt, wird der andere Teil exportiert und in Form von Saccharose an die nicht-photoautotrophen Gewebe der Pflanze verteilt. Diese verwenden die ankommende Saccharose für Wachstum und Speicherung.

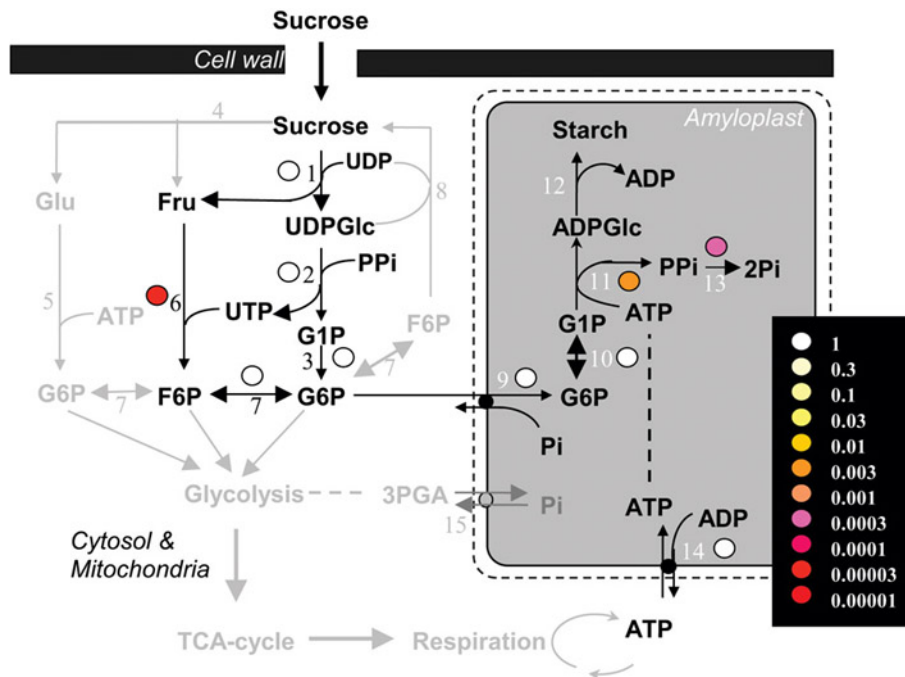
Stärke ist das am weitesten verbreitete Speicherkohlenhydrat in Pflanzen und gleichzeitig der wichtigste Kohlenhydratlieferant in Nahrungsmitteln aus Nutzpflanzen wie Reis, Mais und Kartoffeln. In zunehmendem Maße wird Stärke auch industriell zur Herstellung von Papier, als Lebensmittelzusatzstoff oder Verpackungsmaterial benutzt. Es besteht daher ein großes Interesse daran, den Stärkegehalt in Pflanzen durch klassische Pflanzenzüchtung oder biotechnologische Ansätze zu erhöhen. Unser Wissen über die Faktoren und Mechanismen, welche die pflanzliche Stärkesynthese steuern, ist jedoch noch sehr lückenhaft. Wir benutzen wachsende Kartoffelknollen als einfaches Modellsystem, um die Stärkebiosynthese in Pflanzen besser zu verstehen [1]. Kartoffelknollen stellen ein relativ homogenes Gewebe dar, speichern den größten Teil des angelieferten Kohlenstoffs als Stärke, und der Eintritt der Saccharose in den Stoffwechsel ist relativ einfach, da die Leitbahnen symplastisch entladen werden. Saccharose wird unter Verwendung von UDP über das Enzym Saccharosesynthase in UDP-Glukose und Fruktose umgewandelt, die im nächsten Zug über UDP-Glukose-Pyrophosphorylase und Hexokinase jeweils zu Hexosephosphaten metabolisiert werden (**Abb. 1**). Letztere werden über ein Transportprotein in den Amyloplasten eingeschleust, und über ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) unter Verwendung von ATP in ADP-Glukose umgewandelt. ADP-Glukose ist die ultimative Vorstufe für die Stärkebiosynthese, wobei dessen Glukoserest unter Abspaltung von ADP durch Stärkesynthasen auf die Glukanketten des Stärkekorns übertragen wird. ATP muss im Gegentausch mit ADP über den Adenylatranslokator in den Plastiden transportiert werden.

#### ADP-Glukose-Pyrophosphorylase ist eine wichtige Regulationsstelle der Stärkesynthese

Wir fragten zunächst, welche Schritte dieses Stoffwechselwegs als Regulationsstellen in Frage kommen. Enzyme, die irreversible Schritte katalysieren, werden allgemein als gute Kandidaten für Regulationsstellen angesehen. Um herauszufinden, welche enzymatischen Schritte nahe am Gleichgewicht sind und welche stark aus dem Gleichgewicht verschoben sind, wurden die subzellulären Konzentrationen aller Intermediate zwischen Saccharose und Stärke in Kartoffelknollen bestimmt und die molaren Massenwirkungsquotienten berechnet [2]. Ein Vergleich der Massenwirkungsquotienten mit ihren jeweiligen theoretischen Gleichgewichtskonstanten zeigte, dass drei Enzyme weit aus dem Gleichgewicht verschoben sind (siehe Abb. 1): Hexokinase, AGPase und die plastidäre Pyrophosphatase. Für zwei dieser Enzyme, Hexokinase und AGPase, sind bereits seit längerem regulatorische Eigenschaften bekannt. So wird die Hexokinase durch ihre Reaktionsprodukte ADP und Hexosephosphate inhibiert. Glykolytische Intermediate spielen auch bei der allosterischen Regulation von AGPase eine wichtige Rolle. Das Enzym wird durch Pi gehemmt und durch Glyzerat-3-P (3PGA) aktiviert.

Die Hemmung der Stärkesynthese durch agronomisch wichtige Umweltfaktoren wie Hitze und Trockenstress wird über Änderungen in den Konzentrationen dieser Effektoren und Regulation von AGPase bewirkt. Werden Atmung und Glykolyse in Folge erhöhter Temperaturen aktiviert, so sinkt das Metabolitenverhältnis 3PGA zu Pi ab. Ein Absinken von 3PGA ist auch bei Trockenstress zu verzeichnen, als Folge einer Hemmung des Saccharoseabbaus und einer Stimulierung der Saccharosesynthese. In beiden Fällen führen die Änderungen in den Effetorkonzentrationen zu einer Hemmung von AGPase und einer verlangsamten Stärkesyntheserate. Die Bedeutung dieses Regulationsmechanismus liegt somit

darin, die Geschwindigkeit der Stärkesynthese an kurzfristige Änderungen in der Balance zwischen Saccharoseabbau und Atmung anzupassen.



**Abb. 1:** Stoffwechselweg von der Saccharose zur Stärke und seine subzelluläre Kompartimentierung in wachsenden Kartoffelknollen. 1 Saccharosesynthase, 2 UDP-Glucose Pyrophosphorylase, 3 zytosolische Phosphoglukomutase, 4 Invertase 5 & 6 Hexokinasen, 7 Phosphoglukoisomerase, 8 Saccharosephosphatsynthase und Saccharosephosphatase, 9 Hexosephosphat-Translokator, 10 plastidäre Phosphoglukomutase, 11 ADP-Glucose Pyrophosphorylase (AGPase), 12 Stärkesynthase, 13 plastidäre Pyrophosphatase, 14 Adenylat-Translokator, 15 Triosephosphat-Translokator. Die für wachsende Kartoffelknollen spezifischen Reaktionen des Saccharoseabbaus und der Stärkesynthese sind hervorgehoben. Der Farb-Code spiegelt das Verhältnis  $T/K_{eq}$  wieder und gibt an, wie weit die einzelnen Reaktionen aus ihrer Gleichgewichtslage verschoben sind. Der jeweilige Massenwirkungsquotient ( $T = [Produkte]/[Substrate]$ ) wurde experimentell durch Messung der subzellulären Metabolitkonzentrationen im Gewebe bestimmt [2]. Die Auftrennung des Gewebes in subzelluläre Kompartimente erfolgte dabei über nicht-wässrige Fraktionierung. Die zugehörige Gleichgewichtskonstante ( $K_{eq}$ ) wurde aus der Literatur entnommen. Eine Reaktion ist nahe am Gleichgewicht, wenn  $T/K_{eq} = 0.1-1$ .

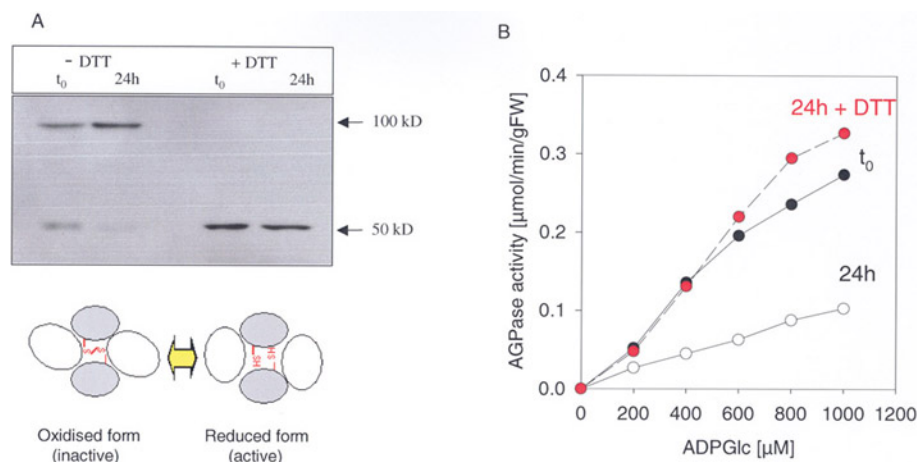
#### Posttranslationale Redoxregulation von ADP-Glucose-Pyrophosphorylase bestimmt, welcher Anteil des angelieferten Kohlenstoffs in Stärke fließt

Weitere Untersuchungen zeigen, dass auch Änderungen in der Verfügbarkeit der Saccharose die Stärkesyntheserate in Kartoffelknollen beeinflussen [1]. So bewirkt eine tageszeitlich bedingte Erhöhung der Saccharosekonzentration in wachsenden Knollen eine Beschleunigung der Stärkesyntheserate. Umgekehrt bewirkt das Abtrennen der Knolle von der Assimilatversorgung durch die Pflanze innerhalb weniger Stunden eine Hemmung der Stärkesynthese. Die Stoffwechselflüsse wurden dabei mithilfe radioaktiver Indikatoren bestimmt, die in die Knolle injiziert wurden. Die beteiligte Regulationsstelle wurde durch systematische Analyse der subzellulären Konzentrationen jedes Metaboliten zwischen Saccharose und Stärke vor und nach dem Abtrennen der Knolle ermittelt. Bei einer Hemmung des

Stoffwechselflusses ist ein Regulationsschritt dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentrationen seiner Substrate steigen und seiner Produkte sinken. ADP-Glukose Pyrophosphorylase war der einzige Schritt im gesamten Stoffwechselweg, dessen Substrate (Glukose-1-P und ATP) stiegen und dessen Produkte (ADP-Glukose und Pyrophosphat) fielen, nachdem die Knolle von der Pflanze getrennt wurde [2]. Dies wies auf AGPase als einzige Regulationsstelle hin.

Interessanterweise konnten alle bislang bekannten Regulationsmechanismen die Hemmung der AGPase durch eine verringerte Assimilatversorgung nicht erklären. So stiegen die plastidären Konzentrationen des allosterischen Aktivators 3PGA an, während die Konzentrationen des Inhibitors Pi fielen. Zwar wurde die Expression von AGPase auf mRNA-Ebene reprimiert, dies hatte aber keine Auswirkung auf die AGPase-Proteinmenge oder deren maximale Aktivität während des fraglichen Zeitraums. Proteinmenge und Aktivität des Enzyms wurden dabei über Standardmethoden bestimmt, welche die Zugabe von Reduktionsmitteln wie Dithiotreitol oder Mercaptoethanol in den Testlösungen vorschreiben. Wurde AGPase allerdings unter nicht-reduzierenden Bedingungen extrahiert und über SDS-Gelelektrophorese getrennt, so lagen die kleinen Untereinheiten des heterotetrameren Enzyms in Knollen vor der Abtrennung als eine Mischung aus Dimeren und Monomeren vor, während sie in abgetrennten Knollen komplett dimerisiert waren (**Abb. 2A**). Die Dimerisierung der kleinen Untereinheiten führt zu einer Hemmung der Enzymaktivität aufgrund dramatischer Änderungen in den kinetischen Eigenschaften des Enzyms, die sowohl die Substrataffinitäten (**Abb. 2B**) als auch die Empfindlichkeit gegenüber allosterischen Effektoren betreffen. Dazu musste man die Enzymaktivität sofort nach der Extraktion und ohne Zugabe von Dithiotreitol messen. Wird Dithiotreitol *in-vitro* zu Proteinextrakten oder *in-vivo* zu Kartoffelgewebe zugegeben, so kann die Dimerisierung innerhalb kürzester Zeit revertiert und AGPase reaktiviert werden. Die Arbeitsgruppe *Preiss* in Michigan entdeckte eine ähnliche *in-vitro* Aktivierung durch Dithiotreitol und Thioredoxine an heterolog überexprimierter AGPase und konnte zeigen, dass dies mit Reduktion und Öffnung einer intermolekularen Disulfidbrücke einhergeht, die zwischen den Cysteinen-12 der zwei kleinen Untereinheiten gebildet wird.

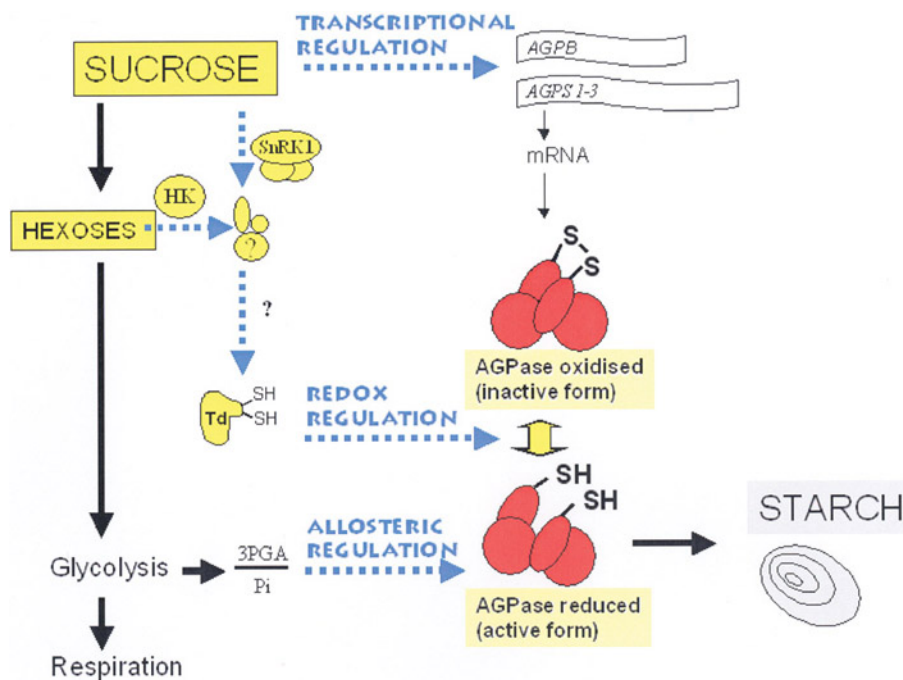
Unsere Arbeiten weisen auf eine zentrale Bedeutung der posttranslationalen Redoxregulation für die Stärkesynthese in wachsenden Kartoffelknollen hin [2]. Die Redoxaktivierung von AGPase erfolgt innerhalb von 30-60 min als Antwort auf steigende Saccharoseverfügbarkeit und führt zu einer Stimulierung der Stärkesynthese und einem Absinken der glykolytischen Intermediatspiegel. Dadurch wird der Fluss des eintretenden Kohlenstoffs an der Atmung vorbei in Richtung Stärkesynthese umgelenkt. Die gute Korrelation zwischen Saccharosekonzentration und Redoxaktivierung in zahlreichen Situationen, die den Saccharosegehalt der Knolle beeinflussen, weist auf ein zelluläres Signalsystem hin, das Änderungen im Saccharosegehalt wahrnimmt und die Redoxmodulation des Enzyms vermittelt (**Abb. 3**). Die Komponenten dieses Signalsystems müssen nun identifiziert und verifiziert werden. Erste Studien weisen auf zwei unterschiedliche Signalwege hin, die von Saccharose und Glukose ausgehen [3]. Untersuchungen an transgenen Kartoffelpflanzen zeigen, dass eine „sucrose-non-fermenting (SNF)“-Proteinkinase an der durch Saccharose induzierten Redoxaktivierung beteiligt ist. Demgegenüber ist die durch Glukose induzierte Redoxaktivierung unabhängig von SNF-Kinasen und wird auch nach Zugabe anderer Hexosen ausgelöst, die durch Hexokinase phosphoryliert werden können. Nicht-phosphorylierbare Glukoseanaloge wie 3-O-Methyl-Glukose bewirken keine Redoxregulierung. Dies weist auf eine duale Funktion der Hexokinase als Stoffwechselkatalysator und Signalkomponente hin. Interessanterweise führte die Überexpression einer bakteriellen Glukokinase in transgenen Kartoffelknollen zu einer verminderten Redoxaktivierung von AGPase, obwohl die Glukosephosphorylierungsraten erhöht waren. Dies zeigt, dass nur bestimmte *endogene* Hexokinasen als Zuckersensoren wirken.



**Abb. 2:** Unterbindung der Assimilatversorgung führt innerhalb von 24h in wachsenden Kartoffelknollen zur Dimerisierung der kleinen Untereinheiten von AGPase und zur Inaktivierung des Enzyms [2]. (A) Auftrennung der Proteinextrakte über SDS-Gelelektrophorese und anschließender Immunoblot mit Antikörper gegen die kleine Untereinheit von AGPase. Die Proben waren mit oder ohne Dithiotreitol (DTT) behandelt. Durch Zugabe von DTT konnte die Dimerisierung rückgängig gemacht werden. (B) Enzymkinetik von AGPase in Extrakten von Kartoffelknollen vor ( $t_0$ ) oder 24h nach Unterbrechung der Assimilatversorgung. Extraktion und Aktivitätsmessung erfolgten schnell (innerhalb 2 min) und ohne Zugabe von DTT, um den in-vivo Redoxstatus des Enzyms zu erhalten. Post-extracto-Zugabe von DTT führt zu Reaktivierung von AGPase (rote Symbole).

#### Posttranslationale Redoxregulation bestimmt, welcher Anteil des fixierten Kohlenstoffs im Chloroplasten verbleibt und dort in biosynthetische Wege fließt

Die Ergebnisse mit Kartoffelknollen werfen die Frage auf, inwieweit die Redoxregulation von AGPase auch in anderen Pflanzenorganen an der Regulation der Stärkesynthese beteiligt ist. In photoautotrophen Blättern ist die Redoxregulation ein seit langem bekannter Mechanismus zur Regulation der photosynthetischen Aktivität durch Licht (Abb. 4). Der photosynthetische Elektronentransport führt zur Reduktion von Ferredoxin und der nachfolgenden Übertragung reduzierender Gruppen auf die Thioredoxine f und m durch Ferredoxin:Thioredoxin-Reduktase. Die Thioredoxine reagieren dann mit Zielenzymen des CO<sub>2</sub>-Fixierungszyklus, der ATP-Synthese und des NADPH-Exports und aktivieren diese durch Redoxmodulation intramolekularer Disulfidbrücken. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Licht auch zur Redox-Aktivierung von AGPase und zu erhöhten Stärkesyntheseraten führt [4]. Dadurch kann in Abhängigkeit vom chloroplastidären Redoxstatus bestimmt werden, wie viel neu-fixierter Kohlenstoff im Chloroplasten verbleibt und dort in Biosynthesen fließt (Abb. 4). Auch in Blättern führt eine erhöhte Zuckerverfügbarkeit unabhängig vom Licht zu Redoxaktivierung von AGPase. Dies könnte Teil eines regulatorischen Netzwerks sein, das den Kohlenstoff in biosynthetische Wege lenkt, wenn Saccharose nicht mehr rechtzeitig abtransportiert werden kann und akkumuliert. Dabei werden neben der Stärkesynthese auch andere plastidäre Biosynthesewege wie die Lipid- und Aminosäuresynthese aktiviert. Eine gleichzeitige Aktivierung der Stärke-, Lipid- und Aminosäurebiosynthese auf Kosten der Saccharosesynthese erfolgte auch nach Redoxmanipulation von Blattscheiben durch Zugabe von Dithiotreitol in vivo. Dies ging mit einem Anstieg der Redoxaktivierung der AGPase einher. Derzeit wird untersucht, an welchen Stellen im Lipid- und Aminosäurestoffwechsel die Redoxregulation erfolgt. Die Arbeiten sollen ein umfassendes Bild der Anpassung des Stoffwechsels an Änderungen im Redoxstatus ergeben.



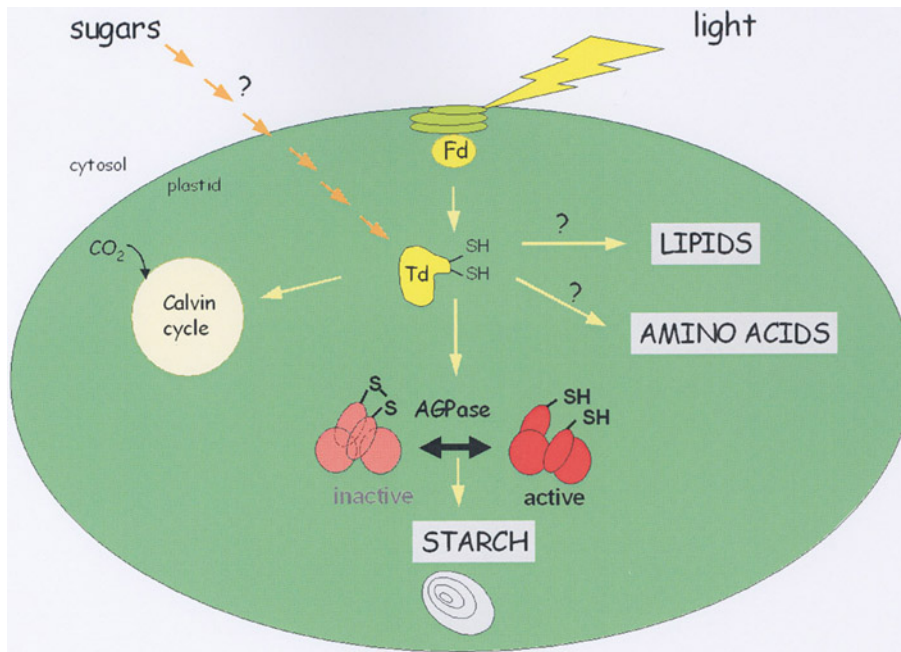
**Abb. 3:** Modell zur Regulation der Stärkesynthese in Kartoffelknollen. Die Redoxmodulation der AGPase stellt einen neuen Mechanismus dar, der die Stärkesynthese wachsender Kartoffelknollen auf Änderungen in der Saccharoseversorgung einstellt. Das Signalsystem, das Änderungen in der Saccharoseverfügbarkeit wahrnimmt und die Redoxregulation vermittelt ist weitgehend unerforscht. Erste Ergebnisse weisen auf zwei verschiedene Signalwege hin [3]. Während der eine von Saccharose ausgeht und über SNF-Proteinkinasen (SnRK1) vermittelt wird, geht der andere von Hexosen aus, ist unabhängig von SnRK1 und wird über Hexokinase (HK) vermittelt. Dies weist auf eine duale Rolle von Hexokinase als Stoffwechselkatalysator und Zuckersensor hin. Innerhalb des Amyloplasten könnten Thioredoxine (Td) die Redoxmodulation der AGPase bewirken.

Die weitere Aufklärung des Signalsystems, das die Redoxregulation biosynthetischer Prozesse in Abhängigkeit von Licht und Zucker vermittelt, soll mithilfe der Modellpflanze *Arabidopsis* erfolgen. *Arabidopsis* hat den Vorteil, dass ihr Genom bereits entschlüsselt ist und eine Vielzahl von Mutanten mit Defekten in möglicherweise relevanten (Kandidaten-) Genen bereits zur Verfügung stehen und analysiert werden können. Es ist auch geplant, gezielt nach Mutanten zu suchen, die in der Vermittlung der Redoxregulation gestört sind. Dabei sollen neue Gene identifiziert werden, die für Komponenten der Signalübermittlung kodieren.

### Die Verfügbarkeit von Nukleotidkofaktoren begrenzt die biosynthetische Aktivität wachsender Speichergewebe

Bislang wurde kaum beachtet, dass Stoffwechsel Flüsse durch die zellulären Konzentrationen wichtiger Nukleotidkofaktoren begrenzt sein könnten [1]. So benötigt der Abbau der Saccharose über die reversible Saccharosesynthase-Reaktion Uridinnukleotide als Kofaktoren (siehe Abb. 1). Die Konzentration von UDP im Zytosol von Kartoffelknollen (52-58  $\mu\text{M}$ ) ist weit niedriger als der  $K_m$  der Saccharosesynthase für dieses Kosubstrat (100-700  $\mu\text{M}$ ) [2]. Dies könnte bedeuten, dass der Saccharoseabbau durch die vorherrschenden UDP-Konzentrationen limitiert wird. Experimente mit Kartoffelknollenscheiben zeigten, dass Saccharoseabbau und Stärkesynthese tatsächlich stimuliert werden können, wenn die Uridinnukleotidspiegel durch Fütterung von Orotat, einem Intermediat der *de-novo*-Purinsynthese,

erhöht werden. Die Faktoren, welche die Höhe der Uridinnukleotidspiegel in Speichergeweben determinieren, müssen noch identifiziert werden, sie könnten aber mit der Saccharoseverfügbarkeit in Verbindung stehen.

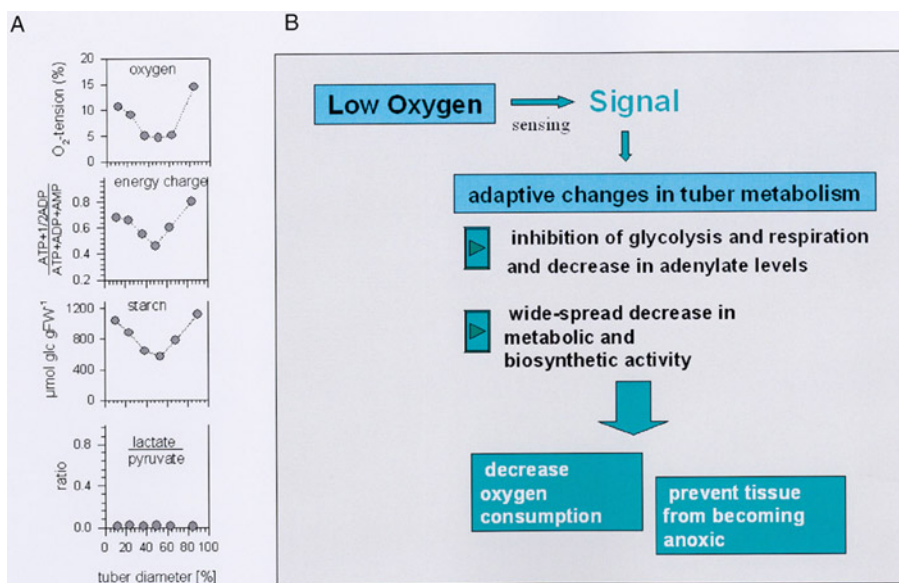


**Abb. 4:** Modell der Redoxregulation biosynthetischer Prozesse in Chloroplasten. Licht führt über den photosynthetischen Elektronentransport zur Reduktion von Ferredoxin (Fd) und anschließender Übertragung der Redoxgruppen auf Thioredoxine (Td). Diese aktivieren Enzyme des Calvin-Zyklus über Redox-Modulation intramolekularer Disulfidbrücken (Thiolmodulation). Wir vermuten, dass die Redox-Aktivierung der AGPase durch Licht über einen ähnlichen Signalweg läuft. Häuft sich Saccharose außerhalb des Chloroplasten an, so führt dies auch ohne Belichtung zur Redoxaktivierung der AGPase. Wir haben zudem Hinweise, dass auch andere biosynthetische Prozesse, wie die Lipid- und Aminosäuresynthese redoxreguliert sind. Durch Untersuchungen an der Modellpflanze *Arabidopsis* sollen die beteiligten Signalkomponenten identifiziert werden.

Die plastidäre Stärkesynthese über AGPase benötigt ATP. Während letzteres in Blättern über Photophosphorylierung direkt im Chloroplasten gebildet werden kann, muss ATP in nicht-photoautotrophen Geweben über die mitochondriale Atmungskette gebildet und in den Amyloplasten transportiert werden. Die im Amyloplasten von Kartoffelknollen vorherrschenden ATP-Konzentrationen sind relativ niedrig (80-180  $\mu\text{M}$ ) und in einem Bereich, wo sie die Aktivität der AGPase limitieren könnten ( $K_m$  für ATP = 120-190  $\mu\text{M}$ ) [2]. Werden Vorstufen der Synthese von Pyrimidinnukleotiden an Kartoffelknollenscheiben gefüttert, so erhöht sich die Konzentration von ATP und die Stärkesyntheserate wird stimuliert [5]. Auch mithilfe molekularer Ansätze konnten die Adeninnukleotidspiegel in transgenen Kartoffelknollen manipuliert und deren Stärkegehalte dadurch verändert werden. So führte die antisense-Hemmung der plastidären Adenylatkinase zu erhöhten ATP-Konzentrationen und verbesserten Stärkegehalten [6], während die plastidäre Überexpression einer ATP-Diphosphohydrolase (Apyrase) zu verringerten ATP-Konzentrationen und stark verminderten Stärkegehalten führte. Neben der Stärke wurden auch die Gehalte jener Aminosäuren beeinflusst, die im Plastiden synthetisiert werden.

### Niedrige Nukleotidkonzentrationen sind Teil einer Anpassung des Stoffwechsels und des Wachstums an die Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe

Um die Gründe für die niedrigen ATP-Konzentrationen in Kartoffelknollen zu klären, wurden die Sauerstoffgehalte wachsender Knollen mithilfe einer O<sub>2</sub>-Mikroelektrode analysiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Sauerstoffkonzentrationen innerhalb wachsender Knollen mit zunehmender Knollengröße bis auf 2% (gegenüber 21% in der äußeren Atmosphäre) sinken können [7]. Das Absinken der Sauerstoffkonzentration von der Peripherie (8-10%) zum Zentrum der Knolle (2-4%) wird von einem Rückgang der ATP-Konzentration und der zellulären Energieladung begleitet, was auf eine Hemmung der Atmung hinweist. Auch die Stärkegehalte werden beeinflusst, sie nehmen von der Peripherie zur Knollenmitte hin ab (**Abb. 5A**). Weitere Untersuchungen bestätigten, dass fallende interne Sauerstoffkonzentrationen zu einer Hemmung von Glykolyse und Atmung, zu sinkenden Adenylatspiegeln und zu einer allgemeinen Drosselung verschiedener biosynthetischer Prozesse führen [7]. Die Verminderung der Stoffwechselaktivität erfolgt bei Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe, die weit höher liegen als der K<sub>m</sub> (O<sub>2</sub>) von Zytochromoxidase – der Endoxidase in der Atmungskette – und die auch noch keine Gärungsprozesse induzieren. Die Hemmung des Stoffwechsels ist adaptiv, da sie den Sauerstoffverbrauch im Gewebe senkt und so verhindert, dass Anaerobiose eintritt. Wir denken, dass ein noch unbekanntes Signalsystem Änderungen interner Sauerstoffkonzentrationen wahrnimmt und die Stoffwechselanpassungen vermittelt (**Abb. 5B**).



**Abb. 5:** Sauerstoffgradienten in wachsenden Kartoffelknollen führen zu Anpassungen im Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel. (A) Sauerstoff- und Metabolitgradienten in einer wachsenden Kartoffelknolle [7-8]. Der Sauerstoffgehalt geht zur Knollenmitte hin bis auf 4% zurück (im Vergleich zur äußeren Atmosphäre die 21% Sauerstoff enthält). Dies ist mit einem Rückgang der Adenylatkonzentrationen und der zellulären Energieladung (adenylate energy charge) verbunden. Auch Stärkegehalte nehmen zur Knollenmitte hin stark ab. Die relevanten Sauerstoffkonzentrationen bewirken noch keine Gärungsprozesse. (B) Entwurf einer Hypothese zur Anpassung des pflanzlichen Stoffwechsels an sinkende Sauerstoffkonzentrationen. Änderungen interner Sauerstoffkonzentrationen werden durch einen bislang unbekanntes Mechanismus wahrgenommen und führen zu einer Verlangsamung des Stoffwechsels. Dadurch wird weniger Sauerstoff verbraucht und der Rückgang der Sauerstoffkonzentration im Gewebe wird gebremst. Das Auftreten von Anaerobiose (Gärung) im Gewebe und die damit verbundenen lebensbedrohenden Nachteile für die Pflanze können so vermieden werden.



Eine weitere Strategie um Sauerstoff zu sparen ist das Umschalten auf energiesparsamere Stoffwechselwege [8]. So gibt es zwei verschiedene Stoffwechselwege des Saccharoseabbaus in Pflanzen, die sich in Ihrem Energiebedarf unterscheiden (siehe Abb.1). Während der Saccharoseabbau über Invertase und Hexokinasen 2 ATP pro 1 Molekül metabolisierte Saccharose benötigt, braucht der Abbau über Saccharosesynthase und UDP-Glukose-Pyrophosphorylase nur 1 PPi. Letzteres entsteht in vielen biosynthetischen Reaktionen als Abfallprodukt, und liegt im Zytosol in relativ hohen Konzentrationen vor. Dort kann es als alternativer Energiedonor zu ATP verwendet werden. Interessanterweise führen niedrige Sauerstoffkonzentrationen zu einer verringerten Expression von Invertase und einer erhöhten Expression von Saccharosesynthase [8]. Dies erklärt, warum der Saccharoseabbauweg mit einsetzendem Dickenwachstum der Kartoffelknolle von Invertase zu Saccharosesynthase wechselt. Wird eine Invertase in transgenen Kartoffelknollen überexprimiert, um den endogenen Saccharosesynthaseweg zu umgehen, so wird die Atmung stimuliert, die internen Sauerstoffkonzentrationen nahezu auf Null gesenkt, und der zelluläre Energiegehalt weiter reduziert. Damit verbunden ist ein Rückgang der Stärkegehalte, besonders in der Mitte der transgenen Knollen, wo auch die Sauerstoffkonzentrationen besonders niedrig sind [8]. Das Umschalten von Invertase auf Saccharosesynthase stellt somit einen wichtigen Mechanismus dar, um ein stärkeres Absinken interner Sauerstoffgehalte während des Knollenwachstums zu verhindern und ATP für biosynthetische Prozesse zu konservieren. Interessanterweise geht der entwicklungsbedingte Wechsel von Invertase zu Saccharosesynthase mit einem Umschalten von Zellteilung auf Speicherung einher.

Auch wachsende Samen sind durch niedrige interne Sauerstoffgehalte und niedrige Nukleotidspiegel gekennzeichnet [7]. Die Sauerstoffkonzentration in Rapssamen wurde mithilfe optischer O<sub>2</sub>-Mikrosensoren (Durchmesser der Optode 30 µm) analysiert, die in die Schote eingeführt wurden. Dabei konnten dramatische Sauerstoffgradienten zwischen der Oberfläche der Schote (21%) dem Schoteninnenraum (10-12%) und dem Inneren der Samen (ca. 1%) gemessen werden. Durch die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen wird eine ganze Reihe biosynthetischer Prozessen in wachsenden Samen gehemmt, die den Kohlenstoff in Zellwände, Stärke, Proteine und Lipide (Öl) einbauen [7]. Eine experimentelle Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der Umgebung der Schote führte zu erhöhten ATP-Spiegeln und einer Beschleunigung der Ölsyntheserate in den Samen. Untersuchungen mit Weizen, Reis und Rizinus zeigen, dass sowohl der energieabhängige Transport der Saccharose in den Leitbahnen als auch deren Entladung in den wachsenden Samen durch die – innerhalb dieser Gewebe vorherrschenden – niedrigen Sauerstoffkonzentrationen limitiert ist [9].

Offensichtlich haben Pflanzen im Gegensatz zu Tieren keine spezialisierten Zirkulationssysteme entwickelt, um eine effiziente Sauerstoffversorgung interner stoffwechselaktiver Gewebe zu gewährleisten. Pflanzen verfügen jedoch über Anpassungsmechanismen, die ein totales Absinken interner Sauerstoffkonzentrationen (Anaerobiose) verhindern. Die damit verbundenen Stoffwechseländerungen und morphologischen Anpassungen (Lentizellen, Aerenchyme) werden über ein Signalsystem vermittelt, das noch aufgeklärt werden muss [7]. Mithilfe genetischer Ansätze in der Modellpflanze *Arabidopsis* sollen die Komponenten dieses Signalwegs identifiziert werden. Molekulare Ansätze um die Sauerstoffverfügbarkeit in Speicherorganen gezielt zu verändern wurden zunächst in Kartoffel entwickelt. Dazu wurden transgene Pflanzen hergestellt, die Hämoglobine unterschiedlicher Herkunft mithilfe eines für Knollen spezifischen Promoters überexprimieren. Hämoglobine wurde für diesen Ansatz gewählt, da sie zu den wenigen sauerstoffbindenden Proteinen in Pflanzen zählen. Die Überexpression von Leghämoglobin aus *Lotus japonica* führte zu vergrößerten Korkporen (Lentizellen) im Abschlussgewebe wachsender Knollen, sowie zu erhöhten internen Sauerstoffkonzentrationen und erhöhten Stärkegehalten. Die Ergebnisse weisen auf eine Rolle pflanzlicher Hämoglobine bei der Wahrnehmung und Regulation interner Sauerstoffkonzentrationen hin.

## Literaturhinweise

- [1] Geigenberger P (2003) Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany* 54, 457-465
- [2] Tiessen A, Hendriks JHM, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farré EM and Geigenberger P (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox-modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *The Plant Cell* 14, 2191-2213
- [3] Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG and Geigenberger P (2003) Evidence that SNF1 related kinase and hexokinase are involved in separate sugar signalling pathways modulating posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in growing potato tubers. *The Plant Journal* (in press)
- [4] Hendriks JHM, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M and Geigenberger P (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by post-translational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology* (in press)
- [5] Loeff I, Stitt M and Geigenberger P (2001) Increased adenine nucleotide levels modify the interaction between respiration and starch synthesis when adenine is fed to discs of growing potato tubers. *Planta* 212, 782-791
- [6] Regierer B, Fernie AR, Springer F, Perez-Melis A, Leisse A, Koehl K, Willmitzer L, Geigenberger P and Kossmann J (2002) Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants. *Nature Biotechnology* 20, 1256-1260
- [7] Geigenberger P (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 247-256
- [8] Bologna KL, Fernie AR, Leisse A, Ehlers Loureiro M and Geigenberger P (2003) A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiology* (in press)
- [9] van Dongen JT, Schurr U, Pfister M and Geigenberger P (2003) Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiology* 131, 1529-1543