



Untersuchungen zum Pyrimidin-Stoffwechsel in *Arabidopsis thaliana*

**Dem Fachbereich Biologie der
Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
eingereichte Dissertation**

**vorgelegt von
Stefanie Hach
Kaiserslautern, im Januar 2011**

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14.04.2011

Berichterstatter:

**Herr Professor Dr. H. Ekkehard Neuhaus
Herr Professor Dr. Matthias Hahn**

D 386

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Funktionen von Nukleotiden und verschiedener Derivate	1
1.2	Der Nukleotid-Stoffwechsel	2
1.2.1	Die <i>de novo</i> -Synthese	4
1.2.2	Der Salvage Pathway	5
1.2.3	Der Katabolismus	6
1.3	Der Transport von Purinen und Pyrimidinen	8
1.3.1	Der Transport von Nukleotiden	8
1.3.2	Der Transport von Nukleosiden	9
1.3.3	Der Transport von Nukleobasen	10
1.4	Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.2	Pflanzen	13
2.2.1	Pflanzenmaterial	13
2.2.2	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.2.3	Anzucht auf Erde	14
2.2.4	Anzucht in steriler Flüssigkultur	15
2.2.5	Anzucht in Sterilkultur	16
2.3	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden	17
2.3.1	Verwendete Stämme	17
2.3.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
2.3.3	Herstellung transgener Organismen	19
2.3.4	Oligonukleotide	20
2.3.5	Verwendete Vektoren und hergestellte Konstrukte	21
2.4	Molekulare Charakterisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	22
2.4.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	22

2.4.2	Northern Blot-Analysen	22
2.4.3	Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR	25
2.4.4	CO ₂ -Abgabe von [¹⁴ C]-Pyrimidinen	26
2.4.5	Bestimmung der Invertase-Aktivität	26
2.4.6	Acetat-abhängige Fettsäuresynthese	27
2.4.7	Bestimmung der DHODH-Aktivität	28
2.5	Reportergen- und Lokalisierungsstudien	29
2.5.1	Lokalisierungsstudien mittels grün fluoreszierendem Protein (GFP)	29
2.5.2	GUS-Färbung	31
2.6	Bestimmung von Metaboliten	32
2.6.1	Chromatographische Quantifizierung von Uracil	32
2.6.2	Chromatographische Quantifizierung der Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose	33
2.6.3	Quantifizierung von Stärke	33
2.6.4	Bestimmung von Blattpigmenten	34
2.6.5	Bestimmung von Kohlenstoff- und Stickstoffgehalten in Samen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2.6.6	Bestimmung der Lipidkonzentration in Samen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2.6.7	Bestimmung der Proteinkonzentration in Samen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Analyse zur entwicklungsspezifischen Expression von <i>Pyd1</i>	36
3.2	Analyse der subzellulären Lokalisierung von <i>Pyd1</i> mittels GFP-Fusion	37
3.3	Molekulare Charakterisierung transgener <i>Pyd1</i> -Pflanzen	39
3.3.1	Nachweis der homozygoten T-DNA-Insertion in das Gen <i>Pyd1</i>	39
3.3.2	Transkriptanalyse der generierten <i>Pyd1</i> -Überexpressionspflanzen	42
3.4	Bestimmung der Dihydrouracil-Dehydrogenase-Aktivität	44
3.4.1	Wachstumsanalyse auf toxischen Nukleosidanaloga	44

3.4.2	Degradierung von radioaktiv markierten Pyrimidinen	48
3.5	Physiologische Untersuchungen transgener <i>Pyd1</i> -Pflanzen während der Keimung	50
3.5.1	Untersuchungen zum Keimungszeitpunkt	50
3.5.2	Untersuchungen zur weiteren pflanzlichen Entwicklung	53
3.5.3	Analyse der Samenzusammensetzung	55
3.5.4	Analyse des Uracilgehalts	56
3.5.5	Quantifizierung von Zuckern	59
3.5.6	Der Einbau von Acetat in Fettsäuren	61
3.5.7	Untersuchungen zum Einfluss des Phytohormons Abscisinsäure	63
3.6	Physiologische Untersuchungen transgener <i>Pyd1</i> -Pflanzen in seneszentem Gewebe	65
3.6.1	Untersuchungen zum <i>Pyd1</i> -Transkriptgehalt in seneszentem Gewebe	65
3.6.2	Analyse des Uracilgehaltes	68
3.7	Physiologische Untersuchungen transgener <i>Pyd1</i> -Pflanzen während Stickstoffmangel	69
3.7.1	Untersuchungen zum <i>Pyd1</i> -Transkriptgehalt während Stickstoffmangel	69
3.7.2	Analyse des Frischgewichts	71
3.7.3	Analyse des Anthocyangehalts	72
3.7.4	Analyse des Uracilgehalts	73
3.7.5	Quantifizierung von Zuckern	73
3.7.6	Degradierung von radioaktiv markierten Pyrimidinen	75
3.8	Aminosäure-Alignment von <i>Pyd1</i> und der nächst verwandten Sequenz in <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
3.9	Analyse zur gewebespezifischen Expression von <i>DHODH</i>	77
3.10	Analyse der subzellulären Lokalisierung von <i>DHODH</i> mittels GFP-Fusion ..	79
3.11	Molekulare Charakterisierung transgener <i>DHODH</i> -Pflanzen	80
3.11.1	Transkriptanalyse der generierten <i>DHODH</i> -RNAi-Pflanzen	80
3.11.2	Transkriptanalyse der generierten <i>DHODH</i> -Überexpressionspflanzen	83
3.12	Bestimmung der Dihydroorotat-Dehydrogenase-Aktivität	84

3.13	Physiologische Untersuchungen transgener <i>DHODH</i> -Pflanzen	85
3.13.1	Untersuchungen zur pflanzlichen Entwicklung	85
3.13.2	Analyse des Frischgewichts	87
3.13.3	Analyse des Chlorophyllgehalts	88
3.13.4	Analyse des RNA-Gehalts	88
3.13.5	Untersuchungen zur Veratmung von Glukose	89
4	Diskussion	91
4.1	Die physiologische Bedeutung von <i>Pyd1</i>	91
4.1.1	<i>Pyd1</i> ist essentiell für die Keimung	95
4.1.2	<i>Pyd1</i> kommt besondere Bedeutung bei Stickstoffmangel zu	101
4.1.3	<i>Pyd1</i> ist an der Stickstoffmobilisierung während der Seneszenz beteiligt	104
4.2	Auf der Suche nach einem <i>Pyd1</i> -Homolog	105
4.3	Die physiologische Bedeutung von <i>DHODH</i>	107
4.4	Ausblick	110
5	Zusammenfassung	112
6	Literaturverzeichnis	114
7	Anhang	

1 Einleitung

Arabidopsis thaliana, die Ackerschmalwand, stellt in der molekularen Pflanzenphysiologie und Pflanzenbiochemie den wichtigsten Modellorganismus dar. *Arabidopsis thaliana* besitzt ein relativ kleines Genom, hat eine kurze Regenerationszeit und produziert eine hohe Samenzahl. Das Genom ist vollständig sequenziert (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000), wodurch die Erzeugung spezifischer Mutanten leicht möglich ist. Aus diesen Gründen bietet sich die Erforschung verschiedenster Stoffwechselfvorgänge mit spezifischen Mutanten an *Arabidopsis thaliana* an.

Nukleinsäuren gehören zu den größten Molekülen, welche von der Zelle synthetisiert werden. Ihre Bausteine sind Purin- und Pyrimidinbasen, die glykosidisch mit Ribose, respektive Desoxyribose verbunden sind, welche man dann als Nukleoside bezeichnet. In der Zelle liegen Nukleoside hauptsächlich in ihrer phosphorylierten Form als Mono-, Di-, oder Triphosphate vor, sogenannte Nukleotide.

Die vorliegende Arbeit wird sich näher mit dem pflanzlichen Pyrimidinstoffwechsel in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. im Allgemeinen und der Funktion des Pyrimidin-Abbaus im Speziellen beschäftigen, unter besonderer Berücksichtigung des Enzyms Dihydrouracil-Dehydrogenase (Pyd1). Der Stoffwechsel von Nukleotiden und speziell Pyrimidinen wird in einem späteren Abschnitt (Kap. 1.2) besprochen. Zunächst soll die Bedeutung von Nukleotiden und ihren Derivaten für den pflanzlichen Metabolismus erläutert werden.

1.1 Funktionen von Nukleotiden und verschiedener Derivate

Man kann Nukleotide als eine der wichtigsten Metabolitklassen im Zellstoffwechsel ansehen, denn sie übernehmen vielfältige Aufgaben. Mit einer Ribose als Pentose bilden sie Ribonukleinsäure (RNA) und dienen somit der Weiterleitung genetischer Informationen. Handelt es sich bei der Pentose um eine Desoxyribose stellen Nukleotide Bausteine der Desoxyribonukleinsäure (DNA) dar und bestimmen mit ihrer Abfolge den genetischen Code zur Informationsspeicherung und -abfrage (WAGNER & BACKER, 1992). In löslicher Form kommt dem Nukleotid Adenosintriphosphat (ATP) besondere Bedeutung zu. Neben seiner Aufgabe als universeller Energieträger und somit Hauptenergielieferant der meisten metabolischen Reaktionen bildet ATP außerdem die Vorstufe essentieller Coenzyme wie Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (NAD(P)⁺), Flavinadenin-

dinukleotid (FAD), Coenzym A (CoA) und S-Adenosylmethionin (SAM) (MOFFAT *et al.*, 2002).

Nukleosiddiphosphat (NDP)-Derivate sind als aktivierte Zwischenprodukte in etliche Biosynthesen involviert (WAGNER & BACKER, 1992). So fungiert ADP-Glukose als Überträger der Glukose auf die wachsende Glukankette bei der Stärkesynthese (TIESSEN *et al.*, 2002) und AMP-aktivierte Aminosäuren dienen der Proteinsynthese. UDP-Glukose ist nicht nur wichtig als Lieferant von Glukose-Einheiten für die Zellulose- und Zellwandsynthese, sie spielt auch eine zentrale Rolle in der Synthese von Saccharose, dem wichtigsten Transportmolekül für Kohlenstoff innerhalb der Pflanze (BOLDT & ZRENNER, 2003; LYTOVCHENKO *et al.*, 2007). Cytidindiphosphat (CDP) dient der Bildung von Phosphoglyzeriden und ist somit an der Membranlipidsynthese beteiligt (KAFFER *et al.*, 2004).

Zudem sind Nukleotide Vorstufen sekundärer Metabolite (z.B. Alkaloide) (SMITH & ATKINS, 2002) und Hormone (z.B. Riboflavin, Folsäure) (HERZ *et al.*, 2000, HANSON *et al.*, 2002).

Die aus einem Adeninderivat bestehenden Cytokinine sind an der Regulation verschiedener Prozesse während des Wachstums und der Entwicklung von Pflanzen beteiligt (KIEBER *et al.*, 2002). So haben diese Substanzen Einfluss auf Zellteilung, Photosynthese, Chloroplasten-Differenzierung, Seneszenz und verschiedene weitere metabolische Vorgänge (MOK & MOK, 1994).

Zyklische Purin-Nukleotide (cAMP, cGMP) dienen bei der Signaltransduktion als „second messenger“ und greifen regulierend in den Stoffwechsel ein (ASSMANN, 1995).

Extrazelluläres ATP (eATP) kann eine G-Protein-vermittelte Signalkaskade auslösen, die an der Regulation verschiedener biologischer Prozesse beteiligt ist (CLARK *et al.*, 2001; DEMIDCHIK *et al.*, 2003). So führen Berührung oder osmotischer Stress in Keimlingen zu einer erhöhten eATP-Konzentration (JETER *et al.*, 2004) und diese zu einer Akkumulation von Superoxiden (SONG *et al.*, 2006).

1.2 Der Nukleotid-Stoffwechsel

Der Nukleotid-Stoffwechsel lässt sich sowohl für Purine als auch für Pyrimidine grundlegend in vier Bereiche aufteilen. So werden Nukleotide per **de novo-Synthese** gebildet (Kap. 1.1.1), die als Nukleoside oder Nukleobasen vorhandenen Grundgerüste können im **Salvage Pathway** recycelt werden (Kap. 1.1.2), mit dem **Katabolismus** steht der Zelle die Möglichkeit eines vollständigen Abbaus der Nukleotide und ihrer Derivate zur Verfügung (Kap. 1.1.3) und **Phosphotransfer-Reaktionen** können Mono- und

Dinukleotide in die Triphosphat-Form konvertieren und so verschiedene Pools von Nukleotiden ins Gleichgewicht setzen (KAPPOCK *et al.*, 2000; ZRENNER *et al.*, 2006). Besonderes Augenmerk soll im Folgenden dem Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsel gelten. Einen Überblick über diesen gibt Abb. 1.1.

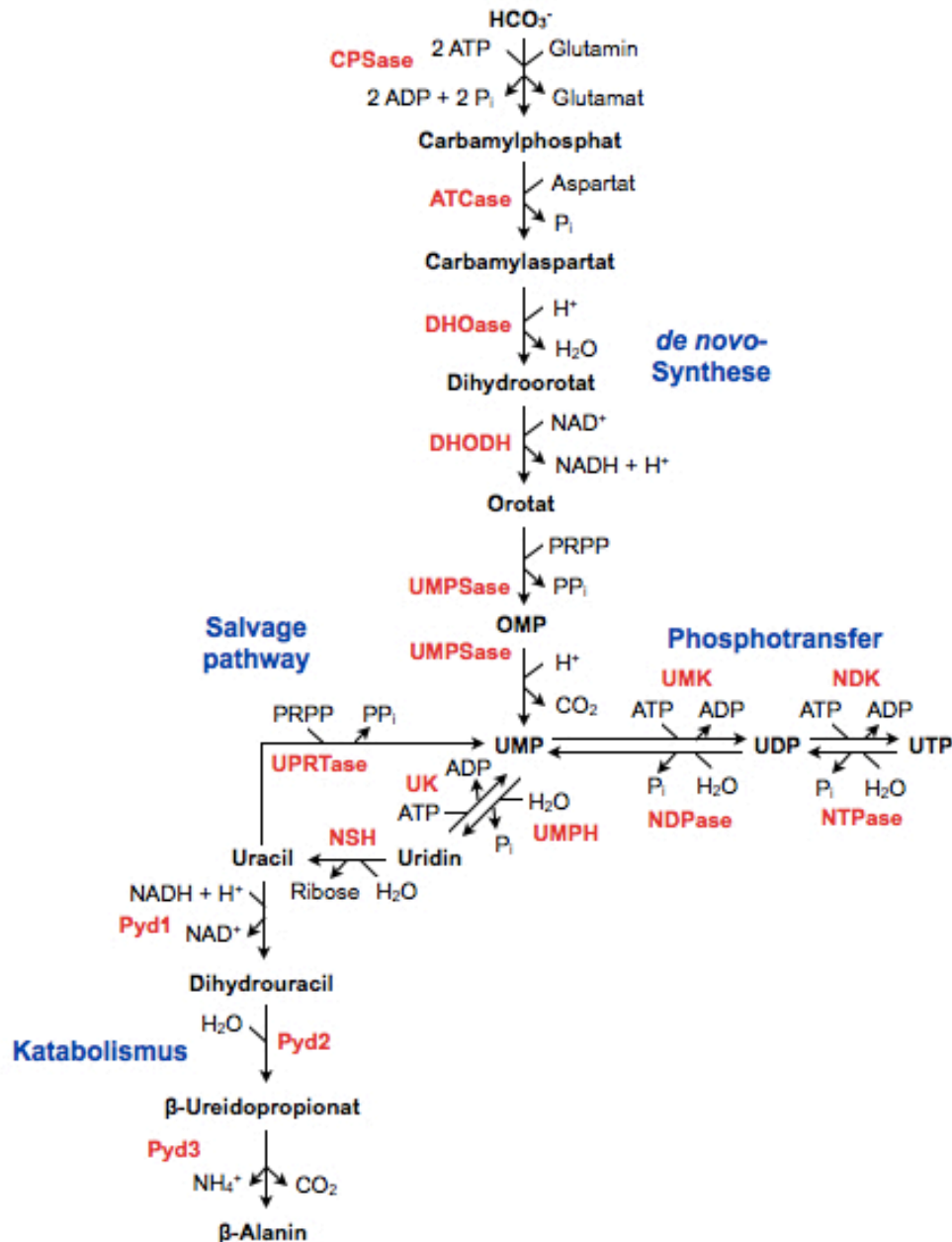


Abb.1.1: Schematischer Überblick des pflanzlichen Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsels

HCO₃⁻, Hydrogencarbonat; ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat; P_i, anorganisches Phosphat; H⁺, Proton; H₂O, Wasser; NAD⁺, NADH, Nicotinamadenindinukleotid; PRPP, 5-Phosphoribosylpyrophosphat; PP_i, Pyrophosphat; OMP, Orotidinmonophosphat; CO₂, Kohlenstoffdioxid; UMP, Uridinmonophosphat; UDP, Uridindiphosphat; UTP, Uridintriphosphat; NH₄⁺, Ammonium. CPSase, Carbamylphosphat-Synthase; ATCase, Aspartat-Transcarbamylase; DHOase, Dihydroorotase; DHODH, Dihydroorotat-Dehydrogenase; UMPsase, UMP-Synthase; UK, Uridin-Kinase; NSH, Nukleosid-Hydrolase; UPRTase, Uracil-Phosphoribosyltransferase; Pyd1, Dihydrouracil-Dehydrogenase; Pyd2, Dihydropyrimidinase; Pyd3, beta-Ureidopropionase; UMPH, Pyrimidin-spezifische 5'-Nukleotidase; UMK, Uridylat-Kinase; NDPase, Nukleodiddiphosphat-Phosphatase; NDK, Nukleodiddiphosphat-Kinase; NTPase, Nukleodidtriphosphat-Phosphatase. Modifiziert nach ZRENNER *et al.*, 2006.

1.2.1 Die *de novo*-Synthese

Die *de novo*-Nukleotid-Biosynthese ist mit vielen Enzym-katalysierten Reaktionen und einem hohen Energieverbrauch verbunden (MOFFAT & ASHIHARA, 2002; ZRENNER *et al.*, 2006). Sie ist konserviert in allen untersuchten Spezies, Unterschiede zeigen sich lediglich in der Organisation der Gene, der Lokalisation der Genprodukte oder deren Fusion zu Multienzymkomplexen (JONES, 1980; DOREMUS & JAGENDORF, 1985; KIM *et al.*, 1992; NASR *et al.*, 1994; SANTOSO & THORNBURG, 1998). In Pflanzen sind alle Enzyme zur Synthese von Pyrimidin- und Purinnukleotiden bis auf die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHDOH) der Pyrimidinsynthese, welche sich im mitochondrialen Intermembranraum befindet, plastidär lokalisiert (MOFFAT & ASHIHARA, 2002; KAUFER *et al.*, 2004; ZRENNER *et al.*, 2006).

Zur Synthese des Pyrimidinrings werden Hydrogenkarbonat (HCO_3^-), Glutamin und Aspartat unter ATP-Hydrolyse zu Orotat verknüpft. Anschließend wird ein Molekül Ribose durch Reaktion mit Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) angehängt und Uridinmonophosphat (UMP) gebildet. Dieses kann über Phosphotransfer-Reaktionen über entsprechende Kinasen zu Uridintriphosphat (UTP) und schließlich zu Cytidintriphosphat (CTP) umgewandelt werden.

Im Gegensatz zur Pyrimidinsynthese geht die Purinsynthese von PRPP aus, an das der Purinring durch Reaktionen mit Glutamin, Glycin und Aspartat unter ATP-Hydrolyse angeknüpft wird. Es entsteht Inosinmonophosphat (IMP), welches zu Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP) umgesetzt werden kann.

Die Synthese der Desoxy-Formen und somit auch die Synthese von dem für die DNA-Synthese notwendigen Desoxythymidintriphosphat (dTTP) erfolgt über Ribonukleotid-Reduktasen und die Thymidylat-Synthase (ROSS, 1981; WAGNER & BACKER, 1992; MOFFAT & ASHIHARA, 2002; BOLDT & ZRENNER, 2003).

Die physiologische Funktion der *de novo*-Nukleotid-Synthese besteht in der Bereitstellung neuer Nukleotid-Grundgerüste. Besonders bei der Zellteilung und bei der Stickstoff-assimilation werden diese in vielfältiger Weise benötigt (SENECOFF *et al.*, 1996; SMITH & ATKINS, 2002). Die essentielle Bedeutung der *de novo*-Synthese für die Pflanze wird dadurch deutlich, dass die meisten Enzyme von „Single Copy“-Genen kodiert werden, deren Verlust nicht durch alternative Stoffwechselwege kompensiert werden kann und häufig zu einem letalen Phänotyp oder stark retardiertem Wachstum führt (SENECOFF *et al.*, 1996; HUNG *et al.*, 2004; ZRENNER *et al.*, 2006).

1.2.2 Der Salvage Pathway

Neben den oben aufgeführten Wegen der energetisch sehr aufwändigen Neusynthese von Nukleotiden besitzen Zellen die Möglichkeit Nukleoside und Nukleobase durch Recycling-Reaktionen wieder in Nukleotide umzuwandeln (MOFFATT & ASHIHARA, 2002; STASOLLA *et al.*, 2003; ZRENNER *et al.*, 2006). Dieser Stoffwechselweg wird als Salvage Pathway bezeichnet.

Nukleoside können über entsprechende Nukleosid-Kinasen unter Verbrauch lediglich eines Moleküls ATP phosphoryliert werden, sodass wieder Nukleosidmonophosphate (NMP) entstehen. Analog dazu besteht auch die Möglichkeit Nukleobasen wieder in den NMP-Pool zu überführen, wobei ein Molekül PRPP benötigt wird (PETERSEN & MOLLER, 2001).

Für Pyrimidine sind lediglich Wege zur Wiederverwertung von Uracil und Uridin beschrieben. So wurde in *Arabidopsis thaliana* auf molekularer Ebene ein Gen identifiziert, welches für ein bifunktionelles Enzym bestehend aus Uridin-Kinase (UK) und Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase) kodiert (ISLAM *et al.*, 2007). Zudem sind allerdings auch Arbeiten zu einer klassischen UPRTase vorhanden, ohne zusätzliche Funktion als UK (MAINGUET *et al.*, 2009). Für dieses in Chloroplasten lokalisierte Enzym ist beschrieben, dass es die Hauptaktivität für das Recycling von Uracil besitzt. Entsprechende „knockout“-Pflanzen bilden in der frühen Entwicklungsphase farblose Keimblätter aus und produzieren weniger lebensfähige Samen als Wildtyp-Pflanzen (MAINGUET *et al.*, 2009).

Für Purine sind entsprechende Wege des Recyclings beschrieben. In *Arabidopsis thaliana* konnten auf molekularer Ebene zwei Gene identifiziert werden, welche für Adenosin-Kinasen (AK) kodieren. Deren Bedeutung zeigt sich in der Betrachtung entsprechender Doppel-“knockout“-Mutanten. Diese weisen eine verminderte Fertilität und gewelltes, stark reduziertes Blattwachstum auf (MOFFATT *et al.*, 2002). Auch *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit einem Defizit der Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRTase), welche Adenin zu AMP recycelt, können keine fertilen Pollen mehr produzieren (MOFFATT & SOMERVILLE, 1988)

Auch der Salvage der Nukleobasen Hypoxanthin und Guanin über eine Hypoxanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRase) konnte in pflanzlichen Rohextrakten nachgewiesen werden (FLOCH *et al.*, 1982) und auch auf molekularer Ebene wurde eine solche HGPRase in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und biochemisch charakterisiert (LIU *et al.*, 2007).

1.2.3 Der Katabolismus

Der Abbau von Pyrimidin- und Purin-Nukleotiden verläuft über unterschiedliche Wege, beginnt jedoch immer mit der Dephosphorylierung des Mononukleotids, katalysiert von 5'-Nukleotidasen bzw. Phosphatasen. Bisher konnten in *Arabidopsis thaliana* allerdings noch keine 5'-Nukleotidasen auf molekularer Ebene charakterisiert werden.

Das Nukleosid Uridin kann weiter unter Abspaltung der Ribose zu Uracil hydrolysiert werden. In *Arabidopsis thaliana* konnte eine solche Nukleosid-Hydrolase 1 (NSH1) (früher bekannt als Uridin-Ribohydrolase URH1) rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert und biochemisch charakterisiert werden (JUNG *et al.*, 2009). In *Arabidopsis thaliana* konnten 4 weitere Gene identifiziert werden, deren vorhergesagte Translationsprodukte aufgrund der Homologie zu einer charakterisierten Nukleosid-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* als NSH2-NSH5 bezeichnet wurden. Während NSH2 als spezifische Inosin-Hydrolase charakterisiert wurde und NSH3 als im Apoplasten lokalisierte Adenosin-Hydrolase eine mögliche Funktion in der Pathogenabwehr zugeordnet werden konnte (JUNG *et al.*, 2011), ist über die beiden verbleibenden Nukleosid-Hydrolasen (NSH4 und 5) noch nichts bekannt.

Der weitere Abbau von Uracil erfolgt in vielen Bakterien, Tieren und Pflanzen über den reduktiven Abbauweg in drei aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritte, katalysiert durch die Enzyme Dihydrouracil-Dehydrogenase (Pyd1), Dihydropyrimidinase (Pyd2) und β -Ureidopropionase (Pyd3). Die Produkte dieses reduktiven Katabolismus sind Ammonium (NH_4^+), Kohlenstoffdioxid (CO_2) und β -Alanin (WASTERACK, 1978; KANEHISA, 2002; RAWLS, 2006; PISKUR *et al.*, 2007; OGAWA & SHIMIZU, 1994, ZRENNER *et al.*, 2009). Uracil wird von der NADPH-abhängigen Pyd1 zu Dihydrouracil reduziert. Daraufhin öffnet Pyd2 hydrolytisch die Ringstruktur, was die irreversible Abspaltung von NH_4^+ und CO_2 durch Pyd3 ermöglicht.

Alternativ zur NADPH-abhängigen Dihydropyrimidin-Dehydrogenase wurde im Organismus *Clostridium uracilicum* die NADH-abhängige Dihydropyrimidin-Dehydrogenase beschrieben (CAMPBELL, 1957). Beide Reaktionen sind reversibel und unterscheiden sich lediglich in ihren Cofaktoren NADH und NADPH. Allerdings wurde diskutiert, dass der Oxidation von Dihydrouracil *in vivo* keine bedeutende metabolische Funktion zukommt. Dies wird gestützt durch den hohen K_m -Wert ($1,5 \cdot 10^{-3}$ M) des Enzyms für Dihydrouracil und die irreversible Pyd3-Reaktion (WASTERACK *et al.*, 1979).

Thymin kann über den entsprechenden Weg katabolisiert werden, Endprodukt ist in diesem Fall neben NH_4^+ und CO_2 3-Amino-Isobutanoat.

Pflanzen besitzen keine Cytosin-Deaminase (STOUGAARD, 1993). Der Abbau des Nucleosids Cytidin verläuft über die Cytidin-Deaminase (CDA) zu Uridin, welches dann über den aufgezeigten Weg abgebaut werden kann.

Obwohl der Pflanze mit dem Salvage Pathway Wege zur Wiederverwertung von Pyrimidinnucleotiden zur Verfügung stehen (Kap. 1.1.2), scheint deren vorwiegende Verwendung im Katabolismus zu liegen (WALSH *et al.*, 2001). So zeigen verschiedenste Untersuchungen, dass ein erheblicher Anteil katabolisiert wird (WASTERNAK *et al.*, 1979; KANAMORI-FUKUDA *et al.*, 1981; FLÖRCHINGER, 2007). In photoorganotrophen Kulturen von *Euglena gracilis* fanden sich 30-40% des aufgenommenen [¹⁴C]-Uracils in CO₂ wieder (WASTERNAK *et al.*, 1979). Unter *in vivo*-Bedingungen wird Uracil im konstanten Verhältnis 1:4 abgebaut (WASTERNAK *et al.*, 1977). Im Gegensatz dazu steht das effektive Recycling des Purins Adenin (ASHIHARA *et al.*, 2000; FLÖRCHINGER *et al.*, 2007).

Neben seiner Funktion im Pyrimidin-Abbau stellt dieser Stoffwechselweg auch eine biosynthetische Quelle für β -Alanin dar. Dieses ist in Pflanzen und Bakterien ein essentieller Bestandteil der Pantothen (Vitamin B₅)- und damit auch der CoA-Synthese (KANEHISA, 2002; COXON *et al.*, 2005). Darüberhinaus kann β -Alanin neben NH₄⁺ auch als Amino-Donor dienen. Das Enzym β -Alanin-Aminotransferase (BAT) bedient Amino-Akzeptoren wie unter anderem 2-Oxoglutarat. In *Arabidopsis thaliana* existieren 8 BAT-Isoformen, von denen 3 biochemisch charakterisiert sind. *In vitro* nutzen die BATs eine Reihe von Amino-Donatoren und -Akzeptoren und erfüllen so vermutlich eine ganze Reihe, bisher allerdings weitestgehend undefinierter Funktionen im pflanzlichen Stoffwechsel (LIEPMAN & OLSEN, 2003). Somit dient der gesamte Pyrimidin-Abbauweg unter anderem dem Recycling des im Pyrimidin-Ring enthaltenen Stickstoffs zum allgemeinen Stickstoff-Metabolismus. Das entstandene NH₄⁺ kann beispielsweise in die Synthese von Aminosäuren eingehen (LAM *et al.*, 1996).

Auch der Purinabbau spielt eine zentrale Rolle im Stickstoff-Stoffwechsel (SMITH & ATKINS, 2002; ZRENNER *et al.*, 2006). Eingeleitet wird er durch die Abspaltung der Amino-Gruppe von AMP durch die AMP-Deaminase, wodurch Inosinmonophosphat (IMP) entsteht (HAN *et al.*, 2006). Der weitere Abbau kann prinzipiell über zwei Wege erfolgen. Über eine 5'-Nucleotidase bzw. eine Phosphatase entsteht das Nucleosid Inosin. Das Enzym IMP-Dehydrogenase führt zur Bildung von Xanthosinmonophosphat (XMP), welches anschließend dephosphoryliert werden kann (COLLART *et al.*, 1996). Wie bei Pyrimidinen kann eine Nucleosid-Hydrolase durch Abspaltung der Ribose die Nucleobase Hypoxanthin bzw. Xanthin erzeugen (JUNG *et al.*, 2011). Beide Nucleobasen werden spezifisch von einer Xanthin-Dehydrogenase (XDH) zu Harnsäure oxidiert (HESBERG

et al., 2004), welche wiederum über eine Uricase in Allantoin (RAYCHAUDHURI & TIPTON, 2002; TAJIMA *et al.*, 2004) und eine Allantoinase schließlich in Allantoinsäure umgewandelt wird (YANG & HAN, 2004). Von Allantoinsäure ausgehend existieren wiederum zwei Wege, welche beide zur Freisetzung von Glyoxylat, NH_4^+ und CO_2 führen (WITTE *et al.*, 2005; ISHIYAMA *et al.*, 2004).

Der Abbau von Adenin-Nukleotiden scheint strikt von der AMP-Deaminase abzuhängen. Zwar wurde das Vorhandensein einer Adenosin/Adenin-Deaminase beschrieben, diese wies allerdings nur eine geringe Aktivität für Adenosin und Adenin auf (POSPISILOVA & FREBORT, 2007). Der Katabolismus von Guaninnukleotiden kann im Gegensatz dazu auch über eine Dephospholierung zu Guanosin und weitere Deaminierung zu Xanthosin geschehen (ASHIHARA *et al.*, 1997).

1.3 Der Transport von Purinen und Pyrimidinen

Sowohl für Nukleotide als auch Nukleoside und Nukleobasen konnten entsprechende Transportproteine identifiziert werden. Diese sollen im Folgenden beschrieben werden.

1.3.1 Der Transport von Nukleotiden

In den integralen Membranen eukaryotischer Zellen konnten verschiedene Gruppen an Nukleotid-Transportproteinen auf molekularer Ebene identifiziert werden. Ob allerdings Nukleotide durch entsprechende Transportproteine über die Plasmamembran transloziert werden können ist bislang noch nicht eindeutig geklärt.

Die mitochondrialen ADP/ATP-Carrier (AAC) gewährleisten durch den Export des in der Atmungskette erzeugten ATP im Austausch gegen ADP die Energieversorgung des Zytosols. In *Arabidopsis thaliana* konnten drei AACs (AAC1-3) biochemisch analysiert werden, die phylogenetisch in die Gruppe der „mitochondrial carrier family“ (MCF) einzugliedern sind (HAFERKAMP *et al.*, 2002; HAFERKAMP *et al.*, 2007).

Innerhalb der MCF-Familie wurden zwei weitere Nukleotid-Transportproteine identifiziert, die allerdings nicht in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Dabei handelt es sich zum Einen um ER-ANT1, einen ATP/ADP-Antiporter im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (LEROCH *et al.*, 2008). Zum Anderen ist dies der AAC5, über dessen Funktion bislang noch nichts bekannt ist.

Eine weitere Gruppe stellen die plastidären ATP/ADP-Transporter dar, die sich sowohl auf Proteinebene als auch in ihrer Struktur grundlegend von den Transportproteinen der MCF

unterscheiden. Deren physiologische Funktion besteht in der Versorgung der Plastiden mit Energie in Form von ATP, die dort für verschiedene Stoffwechselfvorgänge wie z.B. Stärke- oder Fettsäuresynthese benötigt wird. Im Austausch gegen das importierte ATP wird ADP aus dem Stroma ins Zytosol transportiert (REINHOLD *et al.*, 2007; REISER *et al.*, 2004; TJADEN *et al.*, 1998).

Plastiden besitzen einen weiteren Typ von Nukleotid-Transportproteinen. So vermittelt das Bt1-Protein den unidirektionalen Export der *de novo*-Synthese-Produkte AMP, ADP und ATP ins Zytosol (KIRCHBERGER *et al.*, 2008).

1.3.2 Der Transport von Nukleosiden

Auch der Transport von Nukleosiden über die Lipiddoppelschicht erfolgt mit Hilfe spezifischer integraler Transportproteine. Diese werden ihrem Transportmechanismus und molekularen Aufbau entsprechend in zwei große Familien unterteilt.

Proteine aus der Familie der konzentrativen Nukleosidtransporter („concentrative nucleoside transporter“, CNT) sind in verschiedenen Pro- und Eukaryoten vertreten, in Pflanzen wurden sie bislang allerdings nicht nachgewiesen. CNTs vermitteln den Transport der Nukleoside gegen ihren Konzentrationsgradienten. Die in Prokaryoten beschriebenen Proteine besitzen 10 vorhergesagte Transmembrandomänen (TMD) und nutzen die Energie eines bestehenden Protonen (H^+)-Gradienten, um einen gekoppelten Symport der Nukleoside über die Biomembran zu ermöglichen. Die CNTs aus Eukaryoten mit 12-13 putativen TMD transportieren ihre Substrate vorzugsweise durch einen an Natrium (Na^+)-Ionen gekoppelten Mechanismus (CASS *et al.*, 1998; XIAO *et al.*, 2001; CABRITA *et al.*, 2002).

Bei der zweiten Familie der Nukleosidtransporter handelt es sich um equilibrative Nukleosidtransporter („equilibrative nucleoside transporter“, ENT). Vertreter der ENTs wurden in einer Vielzahl von Organismen wie Nematoden, Fischen, Säugern, Pilzen und Protozoen nachgewiesen, darunter auch in Pflanzen (HYDE *et al.*, 2001). In Bakterien wurde bislang kein Homolog zu den ENTs gefunden. So wird bei diesen die Nukleosid-Aufnahme durch Tsx-Kanäle vermittelt, die allerdings homologe Sequenzbereiche mit den ENTs aufzeigen (FSIHI *et al.*, 1993; ACIMOVIC & COE, 2002). ENTs besitzen 11 putative TMD mit einem zytosolischen N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus (SUNDARAM *et al.*, 2001, HYDE *et al.*, 2001).

In *Arabidopsis thaliana* wurden bislang acht putative ENT-Isoformen (AtENT1-8) identifiziert, von denen bisher fünf biochemisch charakterisiert wurden (MÖHLMANN *et al.*,

2001; WORMIT *et al.*, 2004). Nach heterologer Expression der Gene in Hefe und *Xenopus laevis*-Oozyten zeigten die entsprechenden Translationsprodukte ein breites Substratspektrum sowohl für Purin- als auch für Pyrimidin-Nukleoside (LI & WANG, 2000, MÖHLMANN *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2003; WORMIT *et al.*, 2004). Aus Expressionsstudien geht hervor, dass lediglich die Transkripte von *AtENT1* und *AtENT3* in adäquaten Mengen in Keimlingen akkumulieren, wohingegen die Transkripte aller anderen *ENTs* schwer detektierbar waren (FLÖRCHINGER, 2007). Generell kann aus der Anwesenheit von *AtENT1* und *AtENT3* in nahezu allen Geweben auf eine ubiquitäre Funktion dieser Proteine geschlossen werden (LI *et al.*, 2003, WORMIT *et al.*, 2004). *AtENT3* kodiert für einen plasmamembranständigen H⁺-Symporter. *AtENT3* ist der erste pflanzliche Nukleosidtransporter, dem eine definierte physiologische Funktion zugewiesen werden konnte. Entsprechende „knockout“-Mutanten sind durch eine stark verminderte Fähigkeit zur Pyrimidinnukleosid-Aufnahme aus der Rhizosphäre gekennzeichnet (TRAUB *et al.*, 2007). Tiefergehende physiologische Untersuchungen an diesen Mutanten deuten auf eine Bedeutung vor allem unter Stickstoffmangel hin (FLÖRCHINGER, 2007). Aufgrund der Resistenz entsprechender *AtENT3*-„knockout“-Mutanten gegenüber den toxischen Nukleosidanaloga 5-Fluorouracil (FU) und 2-Chloroadenosin (CA) ist *AtENT3* alleine für die Aufnahme von Nukleosiden aus der Rhizosphäre verantwortlich (TRAUB *et al.*, 2007; eigene, unveröffentlichte Ergebnisse). Das Genprodukt des anderen stark exprimierten Nukleosidtransporters in Keimlingen, *AtENT1*, der ebenfalls einen H⁺-gekoppelten Transport vermittelt, ist nach neuesten Erkenntnissen aus Proteom-Studien im Tonoplasten lokalisiert (JAQUINOD *et al.*, 2007; MÖHLMANN *et al.*, 2010). Dort könnte *AtENT1* für den Abtransport der in der Vakuole anfallenden RNA-Degradationsprodukte zuständig sein (LEINHOS *et al.*, 1986; ABEL *et al.*, 1990; ABEL & GLUND, 1986; LÖFFLER *et al.*, 1992; MÖHLMANN *et al.*, 2010).

1.3.3 Der Transport von Nukleobasen

In *Arabidopsis thaliana* gibt es eine Vielzahl von Transportern für Nukleobasen und verwandte Substanzen.

Die Purin-Permeasen („purine permeases“, PUP) stellen mit 15 Mitgliedern die größte Familie dar (GILLISSEN *et al.*, 2000). *AtPUP1* vermittelt einen H⁺-Symport von Purinnukleobasen, Cytokininen und Purinderivaten wie z.B. Koffein (GILLISSEN *et al.*, 2000; BURKLE *et al.*, 2003). *AtPUP2* besitzt ähnliche biochemische Eigenschaften wie *AtPUP1*.

Die Familie der Ureid-Permeasen („ureide permeases“, UPS) stellt in *Arabidopsis thaliana* fünf Mitglieder, von denen drei biochemisch charakterisiert sind (DESIMONE *et al.*, 2002). Nach heterologer Expression in Hefe und *Xenopus laevis*-Oozyten zeigten die Genprodukte von *AtUPS1* und *AtUPS2* ein breites Substratspektrum für Pyrimidin-Nukleobasen (SCHMIDT *et al.*, 2004).

Eine weitere Familie mit 12 Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana* stellen die Nukleobasen-Ascorbat-Transporter („nucleobase ascorbate transporter“, NAT), wobei das Transportsubstrat dieser Transportproteine noch nicht identifiziert ist (MAURINO *et al.*, 2006).

Kürzlich wurden zwei Nukleobasen-Transporter identifiziert, die zu keiner der genannten Familien gehören. *AtAzg1* und *AtAzg2* besitzen eine substantielle Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit zu dem Adenin-Guanin-Hypoxanthin-Transporter *AzgA* aus *Aspergillus nidulans*. Durch heterologe Expression in Hefe konnte eine Purin-Transport-Aktivität gezeigt werden (MANSFIELD *et al.*, 2009).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollte die physiologische Funktion der Dihydrouracil-Dehydrogenase (Pvd1) im Pyrimidin-Abbau von *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Das plastidär lokalisierte Enzym Pvd1 leitet den dreistufigen Abbauprozess der Pyrimidin-Nukleobasen ein (ZRENNER *et al.*, 2009).

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der physiologischen Bedeutung des Pyrimidin-Abbaus im Allgemeinen und dem Enzym Pvd1 im Speziellen im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana*. Hierzu wurden transgene Pflanzen generiert, um die Auswirkungen einer fehlenden oder erhöhten bzw. einer zytosolischen statt plastidären *Pvd1*-Expression auf den pflanzlichen Stoffwechsel untersuchen zu können. Dabei fanden 3 Stadien in der pflanzlichen Entwicklung besondere Bedeutung: Keimung, Stickstoffmangel und Seneszenz.

Da während der durchgeführten Analysen zur Pvd1 nicht ausgeschlossen werden konnte, dass ein weiteres Dihydrouracil-Dehydrogenase-Enzym existiert, sollte zudem das nächste Homolog in *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Dabei handelt es sich um das Pyrimidin-*de novo*-Synthese-Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH). Auch für dieses Gen wurden transgene Pflanzen generiert, um die Auswirkungen einer verminderten oder erhöhten Expression im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* untersuchen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bayer (Leverkusen), Biorad (München), Duchefa (Harlem, Niederlande), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), MPB Biochemicals (Eschwege), MWG Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Schwalbach), Qiagen (Hilden), Riedel-de Haën (Seelze), Roche (Penzberg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) oder Stratagene (Heidelberg) bezogen.

2.2 Pflanzen

In diesem Teil werden alle verwendeten Pflanzenlinien, Anzuchtmethoden und Versuchsbedingungen für *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Diese beinhalten die Anzucht auf Erde oder in Sterilkultur.

2.2.1 Pflanzenmaterial

Alle Untersuchungen an Pflanzen erfolgten an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. der Varietät Columbia. Es wurde sowohl mit Wildtyp-Pflanzen als auch mit *Pyd1*-„knockout“-Mutanten gearbeitet. Es wurden die Linien SAIL_363_E04 (bezeichnet als *Pyd1-1*) und GK-251F09 (*Pyd1-2*) verwendet (ALONSO *et al.*, 2003). Die Linien wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) bzw. aus der GABI-Kat Collection (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) bezogen. In beiden Linien ist das *Pyd1*-Gen durch eine T-DNA-Insertion ausgeschaltet.

Des Weiteren erfolgte die Kultivierung und Untersuchung von Pflanzen bei welchen das Gen *Pyd1* (*At3g17810*) bzw. das Gen *DHODH* (*At5g23300*) unter die Kontrolle des Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV 35S)-Promotors gestellt wurde. Diese Überexpressionspflanzen werden im Folgenden als 35S:*Pyd1* bzw. 35S:*DHODH* bezeichnet. Diese Pflanzen wurden mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation hergestellt (Kap. 2.3.3).

Es wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit einer verringerten *DHODH*-Expression generiert. Die Expression eines *DHODH*-RNAi-Konstruktes führt zur Bildung

doppelsträngiger RNA, welche von der Pflanze als viral erkannt und abgebaut wird. Zudem wird mRNA mit der gleichen Basenabfolge degradiert und so der *DHODH*-mRNA-Pool verringert. Auch dieses Konstrukt steht unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. Diese Dosis-Mutanten wurden ebenfalls mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation hergestellt (Kap. 2.3.3) und werden im Folgenden als 35S_RNAi:*DHODH* bezeichnet.

Zusätzlich wurden Pflanzen generiert, bei denen das N-terminal um 21 Aminosäuren verkürzte Gen *Pyd1* überexprimiert wurde. Mittels *Agrobacterium tumefaciens* wurden *Pyd1-1*-Pflanzen mit diesem Konstrukt transformiert. Diese Pflanzen werden mit 35S:Δ21-*Pyd1* bezeichnet.

2.2.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte sowohl auf Erde, in definierten Flüssigmedien und auf Agarmedien. Um eine synchronisierte Keimung der Samen zu gewährleisten, erfolgte jeweils eine Inkubation bei 4°C (Stratifizierung) für 48 h (WEIGEL & GLAZEBROOK, 2002). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen:

Tab. 2.1: Wachstumsbedingungen in der Klimakammer

Temperatur	22°C
Lichtdauer	10 h (Kurztag) 16 h (Langtag)
Lichtintensität	120 μmol Photonen m ⁻² s ⁻¹

2.2.3 Anzucht auf Erde

Sowohl Wildtyp-Pflanzen als auch Mutanten wurden auf ED73 Einheitserde (DIN 11540-80T) kultiviert.

Für die Versuche mit künstlich senesziertem Blattmaterial wurden, angelehnt an VAN DER GRAAFF *et al.* (2006), entweder einzelne Blätter von den Pflanzen entfernt und in H₂O_{bidest.} inkubiert oder einzelne Blätter mit handelsüblicher Aluminium-Folie direkt an der Pflanze abgedunkelt.

Für die Samenanalysen wurden die Pflanzen für 28 Tage im Kurztag unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Standardbedingungen auf Erde angezogen. Anschließend wurde die Lichtphase zur Blühinduktion auf 16 Stunden Licht verlängert. Nach weiteren 35 Tagen wurden die Pflanzen nicht mehr gewässert, so dass es zur Abreifung und Samenbildung

kam. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Anzahl der Schoten pro Pflanze durch Auszählen bestimmt. Die Samen von Wildtyp, der verschiedenen T-DNA-Insertionsmutanten und der Überexpressionslinien wurden geerntet und standen für die weiteren Analysen zur Verfügung. Es wurde sowohl das Gewicht der gesamten Samenausbeute pro Pflanze als auch das Gewicht von 1000 Samen der jeweiligen Linien gravitrometrisch bestimmt.

Für die Analysen während der Keimung wurden *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge auf handelsüblichen nassen Papierhandtüchern angezogen, um eine Verunreinigung durch Erde zu vermeiden.

2.2.4 Anzucht in steriler Flüssigkultur

Die Anzucht in steriler Flüssigkultur erfolgte in sterilen Erlenmeyerkolben (SCHEIBLE *et al*, 2004). Es wurden je 100 Samen für 10 min mit 15% Natriumhypochlorit sterilisiert und auf runde Netze (handelsübliches Insektenschutzgitter) mit einer Porengröße von 0,8 mm in 30 ml Kontrollmedium gegeben.

Kontrollmedium:

2 mM	KNO ₃
1 mM	NH ₄ NO ₃
1 mM	Gln
3 mM	KH ₂ PO ₄
1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgSO ₄
2 mM	K ₂ SO ₄
0,5% (w/v)	Saccharose
50 µM	KCl
50 µM	H ₃ BO ₃
10 µM	MnSO ₄
2 µM	ZnSO ₄
1,5 µM	CuSO ₄
0,075 µM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄
72 µM	Fe-EDTA
3 mM	MES, pH 5,8 (KOH)

Die Pflanzen wurden für 7 Tage auf einem Schüttler mit 80 rpm angezogen. Danach wurde das Medium durch das jeweilige Testmedium ersetzt.

Medium ohne Stickstoff:

Bei Medium ohne Stickstoff wurden die Substanzen KNO_3 , NH_4NO_3 und Gln durch 3 mM KCl ersetzt.

Um eine Limitierung der Nährstoffverfügbarkeit in den folgenden 3 Tagen der Anzucht zu verhindern wurden die Medien täglich erneuert. Soweit nicht anders angegeben wurden die Analysen mit 10 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen durchgeführt.

2.2.5 Anzucht in Sterilkultur

Zur Durchführung der Keimungstests auf den toxischen Nukleosidderivaten 5-Fluorouracil (FU), 5-Fluorouridin (FD) und 5-Fluoroorotat (FO) wurden oberflächen-sterilisierte *Arabidopsis thaliana*-Samen auf MS-Agarmedium ausgesät (REISER *et al.*, 2004; MURASHIGE & SKOOG, 1962).

MS-Medium:

- 2,203 g l⁻¹ Murashige Skoog Medium mit Vitaminen
- 1% (w/v) Saccharose
- 0,05% (w/v) MES, pH 5,7 (KOH)

Agarplatten dieses Mediums enthielten zusätzlich 0,8% (w/v) Agar.

Für die transiente Expression und die damit verbundenen Lokalisierungsstudien (Kap. 2.5.1) wurden Tabak-Protoplasten verwendet. Hierzu wurden Wildtyp-Tabaksamen (*Nicotiana tabacum* cv W38) unter sterilen Bedingungen in Kunststoffboxen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit MS-2-Medium angezogen. Vor der Aussaat der Samen wurden diese oberflächensterilisiert (Kap. 2.2.4).

MS-2-Medium für *N. tabacum*:

- 4,406 g l⁻¹ Murashige Skoog Medium mit Vitaminen
- 2% (w/v) Saccharose
- 0,05% (w/v) MES, pH 5,7 (KOH)
- 0,8% (w/v) Agar

2.3 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

Im folgenden Teil werden alle verwendeten Bakterien, Konstrukte und Oligonukleotide aufgeführt. Außerdem werden die molekularbiologischen Standardmethoden, die für das Arbeiten mit Plasmid- sowie genomischer DNA (gDNA) und RNA notwendig sind, kurz beschrieben.

2.3.1 Verwendete Stämme

Im Rahmen der molekularbiologischen Methodik wurden die gramnegativen Bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) verwendet. Die Eigenschaften der verwendeten Bakterien sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL 1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>supE44, relA1, lac, [F',</i> <i>proAB+, lacIqΔM15, ::Tn10(tetr)]</i>	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
<i>A. tumefaciens</i> GV3103::pMP90	<i>rifR, genR</i>	KONCZ & SHELL, 1986

2.3.2 Anzucht von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht der *Escherichia coli*-Zellen des Stammes XL1-blue erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in sterilem YT-Medium (SAMBROOK *et al.*, 2001) über Nacht bzw. nach Transformation für 1 h in nicht selektivem ψB-Medium (HANAHAN, 1983).

YT-Medium:

- 0,8% (w/v) Pepton
- 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
- 0,25% (w/v) NaCl, pH 7,0 (NaOH)

Agarplatten dieses Mediums enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar.

ψB-Medium:

- 2% (w/v) Pepton
- 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
- 0,4% (w/v) MgSO₄
- 10 mM KCl, pH 7,6 (KOH)

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 30°C und 180 rpm in YEB-Medium (WALDEN & SCHELL, 1990).

YEB-Medium:

- 0,5% (w/v) Pepton
- 0,5% (w/v) Beef-Extrakt
- 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt
- 0,5% (w/v) Saccharose
- 2 mM MgSO₄

Die Medien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert. Die Selektion der positiven Transformanten erfolgte durch Zugabe entsprechender Antibiotika (Tab. 2.3). Zur Aufbewahrung der rekombinanten Bakterienklone wurden entsprechende Übernacht-Kulturen mit Glycerin (15% (v/v)) versetzt und bei -70°C gelagert.

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampizillin (Amp)	200 µg ml ⁻¹
Tetrazyklin (Tet)	10 µg ml ⁻¹
Rifampicin (Rif)	100 µg ml ⁻¹
Gentamycin (Gen)	25 µg ml ⁻¹
Kanamycin (Kan)	25 µg ml ⁻¹

2.3.3 Herstellung transgener Organismen

In diesem Kapitel sind alle Methoden zur Herstellung transgener Organismen zusammengefasst. Falls nicht gesondert aufgeführt, wurden alle Methoden jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Herstellung von cDNA („complementary“ DNA) wurde Gesamt-RNA mit Hilfe des „RNeasy® Plant Mini Kit“ isoliert, mit RNase-freier DNase verdaut (Qiagen, Hilden) und mit reverser Transkriptase (Verso-Kit, ThermoScientific, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben. Das gewünschte Gen-Fragment wurde unter Verwendung von Oligonukleotiden (Kap. 2.3.4) sowie einer *Taq*- (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. einer *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, Göttingen) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (SAIKI *et al.*, 1988) und mit Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) spezifisch verdaut. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese (SAMBROOK *et al.*, 2001) konnten die gewünschten DNA-Fragmente mit Hilfe der „NucleoSpin® Extract II“-Methode (Machery-Nagel, Düren) extrahiert werden. Diese DNA wurde in die entsprechenden Vektoren (Kap. 2.3.5) ligiert (Invitrogen, Karlsruhe) und stand danach zur Transformation in Mikroorganismen zur Verfügung. Die Kontrolle der generierten Plasmid-Konstrukte erfolgte neben spezifischem Verdau durch Restriktionsenzyme zudem durch Sequenzierungen, welche vom Institut für Immunogenetik des Westpfalz Klinikums Kaiserslautern durchgeführt wurden. Die Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte in Anlehnung an die Rubidiumchlorid- (HANAHAN, 1983) bzw. an die „freeze-thaw“-Methode (HÖFGEN & WILLMITZER, 1988; HÖFGEN & WILLMITZER, 1990). Die Isolierung von Plasmiden aus *Escherichia coli*-Zellen wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979) durchgeführt. Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte mittels der „floral dip“-Methode (CLOUGH & BENT, 1998). Transgene Pflanzen wurden durch Behandlung der

Keimlinge mit 4 µg ml⁻¹ Basta® (Bayer, Leverkusen) bzw. durch Ausbringen der Samen auf Kanamycin (40 µg ml⁻¹)-haltige Agarplatten selektioniert.

2.3.4 Oligonukleotide

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR (Kap. 2.3.3) und für Expressionsstudien mittels qRT-PCR (Kap. 2.4.3) wurden die in Tab. 2.4 aufgeführten Oligonukleotide verwendet, die Synthese erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg).

Tab. 2.4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5' → 3' (bp)	Schnittstelle
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGGA (21)	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG (20)	
pGFP2_fwd	CACAATCCCCTACTCCTTCG (20)	
pGFP2_rev	ATCACCTTCACCCCTCTCCA (19)	
pHan_fwd	ATCCTTCGCAAGACCCTTC (19)	
pHan_rev	TCATGCGATCATAGGCGTC (19)	
35S_fwd	ATCAAGACGATCTACCCGAGTAAC (24)	
35S_rev	CGAAGGATAGTGGGATTGTGCG (21)	
SAIL_LB	TAGCATCTGAATTTCCATAACCAATCTCGATACAC (34)	
GK_LB	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC (25)	
Pyd1-KO_fwd	GCGCAGAATGGGTGCCGCTGTTGG (24)	
Pyd1-KO_rev	CCAATACCCGAAAGCGAGCGATCC (24)	
Pyd1_fwd	TTTCATATGGCTTCCATGATGTTCCGCC (27)	<i>NdeI</i>
Pyd1_rev	TTTCTCGAGGTTAGAAACCATACTCTCAGTCTCC (34)	<i>XhoI</i>
Pyd1ohneTPIlang_OE_fwd	TTTCTCGAGATGGCTGACTTCGATCCATCCTCTCG (35)	<i>XhoI</i>
Pyd1ohneTP_OE_rev	TTTCTAGATTAGTTAGAAACCATACTCTCAGTCTCC (37)	<i>XbaI</i>
Pyd1ohneTPkurz_GFP_fwd	TTTCTAGAAATGTCTTCCGCCCGAATCGG (31)	<i>XbaI</i>
Pyd1ohneTPIlang_GFP_fwd	TTTCTAGAAATGGCTGACTTCGATCCATCCTCTCG (35)	<i>XbaI</i>
DHODH_fwd	TTTCTAGAAATGGCCGGAAGGGCTGCGACG (30)	<i>XbaI</i>
DHODH_rev	TTTCTCGAGTCTGTGATCAGCACCAATTGC (30)	<i>XhoI</i>
DHODH_sense_fwd	TTTCTCGAGATGGCCGGAAGGGCTGCG (27)	<i>XhoI</i>
DHODH_sense_rev	TTTGAATTCAGAATTTCTTCCCCAAAC (28)	<i>EcoRI</i>
DHODH_antisense_fwd	TTTGGATCCAGAATTTCTTCCCCAAAC (28)	<i>BamHI</i>

DHODH_antisense_rev	TTTTCTAGAAATGGCCGGAAGGGCTGCGACG (30)	<i>XbaI</i>
DHODH_GUS_fwd	TTTTCTAGATACTTAGAATATAAAGTACCT (30)	<i>XbaI</i>
DHODH_GUS_rev	TTTCCCGGGAGAAGGTTGCTTCATCTGCAG (30)	<i>SmaI</i>
NSH1-RT_fwd	GGTGGGATCTCAAACGGTG (19)	
NSH1-RT_rev	CTCAGCTGCACTTTTCTCAG (20)	
Pyd1-RT_fwd	ACCGGTGTGATGATGCACG (19)	
Pyd1-RT_rev	TCAAGCCTCTCTTCTCAGC (19)	
Pyd2-RT_fwd	GAGTCTGGCCAACTCTCAGC (20)	
Pyd2-RT_rev	CTTTCCTCTTCTGCCCTCG (19)	
Pyd3-RT_fwd	AGAGCCTGTTGATGGCGAATCG (22)	
Pyd3-RT_rev	CGGCATAGACTTCGTATCTTGC (22)	
DHODH-RT_fwd	TTTCTCGAGATGGCCGGAAGGGCTGCG (27)	<i>XhoI</i>
DHODH-RT_rev	CCCGCGAGCTGCAGCTGAAAC (21)	
Ef1 α -RT_fwd	GAGACCAAGTACTACTGCAC (20)	
Ef1 α -RT_rev	GTTGGTCCCTTGACCAGTCAAG (23)	

2.3.5 Verwendete Vektoren und hergestellte Konstrukte

In Tab. 2.5 sind die Eigenschaften der verwendeten DNA-Vektoren zusammengefasst.

Tab. 2.5: Übersicht der verwendeten Vektoren

Vektor	Genotyp	Referenz
pBSK	β -gal+, ampR, Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pGFP2	ampR, Transformationsvektor, CaMV-35S-Promotor, 2000 OCS-Terminator	WENDT <i>et al.</i> , 2000
pHannibal	ampR, CaMV-35S-Promotor/-Terminator	WESLEY <i>et al.</i> , 2001
pART27	kanR, specR, binärer Pflanzentransformationsvektor	GLEAVE, 1992

In Tab. 2.6 sind die in dieser Arbeit hergestellten DNA-Konstrukte dargestellt.

Tab. 2.6: Übersicht der hergestellten Konstrukte

Konstrukt	Vektor / Insert(s)	Referenz
pBSK::Pyd1	pBSK / <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
pGFP2::Pyd1	pGFP2 / <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
pHannibal::Pyd1	pHannibal / <i>Pyd1</i>	diese Arbeit

pART27::Pyd1	pART27 / <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
pBSK::Δ42-Pyd1(GFP)	pBSK / Δ42- <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
pGFP2::Δ42-Pyd1	pGFP2 / Δ42- <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
pBSK::Δ21-Pyd1(GFP)	pBSK / Δ21- <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
pGFP2::Δ21-Pyd1	pGFP2 / Δ21- <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
pBSK::Δ21-Pyd1(OE)	pBSK / Δ21- <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
pHannibal::Δ21-Pyd1	pHannibal / Δ21- <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
pART27::Δ21-Pyd1	pART27 / Δ21- <i>Pyd1</i>	diese Arbeit
mt-rk CD3-991		NELSON <i>et al.</i> , 2007
px-rk CD3-983		NELSON <i>et al.</i> , 2007
pBSK::DHODH	pBSK / <i>DHODH</i>	diese Arbeit
pGFP2::DHODH	pGFP2 / <i>DHODH</i>	diese Arbeit
pBSK::DHODH-Promotor	pGFP2 / <i>DHODH</i> -Promotor	diese Arbeit
pHannibal::DHODH	pHannibal / <i>DHODH</i>	diese Arbeit
pART27::DHODH	pART27 / <i>DHODH</i>	diese Arbeit
pBSK::DHODH sense	pBSK / <i>DHODH_sense</i>	diese Arbeit
pBSK::DHODH antisense	pBSK / <i>DHODH_antisense</i>	diese Arbeit
pHannibal::DHODH sense	pHannibal / <i>DHODH_sense</i>	diese Arbeit
pHannibal::DHODH_RNAi	pHannibal / <i>DHODH_sense</i> , <i>DHODH_antisense</i>	diese Arbeit
pART27::DHODH_RNAi	pART27 / <i>DHODH_sense</i> , <i>DHODH_antisense</i>	diese Arbeit

2.4 Molekulare Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

Die Überprüfung der Homozygotie der verwendeten T-DNA-Insertionsmutanten erfolgte mittels PCR (Kap. 2.3.3), wobei genomische DNA (gDNA) aus den jeweiligen Pflanzen als Matrize diente. Die Isolierung erfolgte nach der „Simple DNA prep“-Methode des University of Wisconsin Biotechnology Center (UWBC), USA.

2.4.2 Northern Blot-Analysen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Firma Gentra Systems Inc. (Minneapolis, USA; US-Patent

Nr. 5.973.137). Hierzu wurden 100 mg in flüssigem Stickstoff gemörseretes Pflanzenmaterial eingesetzt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Isopropanol. Zur Vermeidung von RNase-Aktivität wurden alle Lösungen mit 0,1% DEPC behandelt und die Glaswaren 6 h bei 180°C gebacken. Die Quantifizierung der RNA erfolgte photometrisch mit Hilfe des Nanodrops (Peqlab, Erlangen).

Die Auftrennung von RNA-Molekülen durch Elektrophorese wurde mittels Formaldehyd-Gelen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (LEHRACH *et al.*, 1977; SAMBROOK *et al.*, 2001).

Die Übertragung der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Machery-Nagel, Düren) erfolgte mittels Kapillartransfer. Als Puffermedium diente zehnfach konzentrierter SSC-Puffer (SAMBROOK *et al.*, 2001). Die Fixierung der RNA auf der Nylonmembran erfolgte durch Ausbildung kovalenter Bindungen unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) in einem UV-Ofen (Amersham Biosciences, Freiburg).

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden diente zur Untersuchung des Transkriptgehaltes von verschiedenen Genen. Die Synthese erfolgte ausgehend von 150-200 ng homologer DNA als Matrize durch eine im Markierungsmix enthaltene Klenow-Polymerase. Durch den Einbau von radioaktiv markiertem [α -³²P]-dCTP (3 Ci μmol^{-1} ; Amersham Biosciences, Freiburg) wurde die DNA während der *in vitro*-Synthese des komplementären Stranges markiert (FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983). Nach Ende der Amplifikation wurde der Reaktionsansatz mit TEN-Puffer abgestoppt und über eine Gelfiltrationssäule (Probe Quant TM G-50 Micro Columns; GE Healthcare, München) gegeben und so nicht eingebautes [α -³²P]-dCTP entfernt.

Vor der Hybridisierung der markierten DNA-Sonden mit der fixierten RNA wurde die Membran 1 h mit Hybridisierungspuffer prähybridisiert, um unbesetzte Membranbindungsstellen abzusättigen (CHURCH & GILBERT, 1984). Die DNA-Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend mit frischem Hybridisierungspuffer zu der vorbereiteten Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen). Unspezifisch gebundene Sondenmoleküle wurden durch zweimaliges Waschen der Membran mit Waschpuffer 1 (jeweils 30 min bei 65°C) und einmaligem Waschen mit Waschpuffer 2 (10 min bei Raumtemperatur) entfernt. Nach dem Trocknen der Membran wurde diese in einer Expositionskassette einem Packard MP Storage Phosphoscreen ausgesetzt und mit einem Cyclone Phospho-Imager (Perkin-Elmer Life Sciences) analysiert.

Transferpuffer:

150 mM Natriumzitat
1,5 M NaCl, pH 7,0

TEN-Puffer:

10 mM Tris, pH 7,5 (HCl)
1 mM EDTA
100 mM NaCl

Hybridisierungspuffer:

250 mM NaHPO₄, pH 7,2
1 mM EDTA
1% (w/v) BSA
7% (w/v) SDS

5-fach Markierungsmix:

250 mM Hepes, pH 7,0 (KOH)
50 mM MgCl₂
0,5 mM DTE
10 mM Spermidin
125 µM dATP
125 µM dGTP
125 µM dTTP
0,5 % Triton X-100
1mg ml⁻¹ BSA
OD 260 ml⁻¹ Randomprimer (dN9) 31
2,5 mU µl⁻¹ anorganische Pyrophosphatase
1 U µl⁻¹ Klenow DNA-Polymerase
45 % Glycerin

Waschpuffer 1:

40 mM NaHPO₄, pH 7,2
1 mM EDTA
0,5% (w/v) BSA
5% (w/v) SDS

Waschpuffer 2:

40 mM NaHPO₄, pH 7,2
1 mM EDTA
1% (w/v) SDS

2.4.3 Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR

Die Analyse der Genexpression mittels quantitativer RT (real time)-PCR erfolgte in Anlehnung an LEROCH *et al.* (2005). Als Template diente Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*, welche mit Hilfe des „RNeasy® Plant Mini Kit“ isoliert und mit RNase freier DNase (Qiagen, Hilden) verdaut wurde. Die reverse Transkription in cDNA erfolgte mittels des „Verso cDNA Kit“ (Thermo Scientific, Karlsruhe). Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung des „IQ SYBR Green Supermix“ (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers im „MyIQ“-Cycler (Bio-Rad). Die cDNA wurde für 10 min bei 95°C denaturiert, danach folgte die Amplifikation der DNA in 50 Zyklen, wobei sich ein Zyklus aus einem Denaturierungsschritt (15 s bei 95°C), dem Primer-Annealing (30 s bei 58°C) und der Elongation (40 s bei 72°C) zusammensetzte. Am Ende jedes Elongationszyklus wurde die Fluoreszenz anhand der Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs „SYBR® Green“ in die doppelsträngige DNA bestimmt. Die Reinheit des Produkts konnte mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kontrolliert werden. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Expression des Gens *At1g07930*, welches für den Elongationsfaktor 1 α (Ef1 α) kodiert, diente als Bezug (CURIE *et al.*, 1991). Alle PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (SAMBROOK *et al.*, 2001) auf ihre korrekte Größe geprüft.

Um die relativen Transkriptmengen der amplifizierten cDNA vergleichen zu können, wurden die relativen Transkriptmengen der verschiedenen iCycler-Läufe nach folgender Formel berechnet:

$$N_0 = \frac{N_n}{E^{C_T}}$$

mit

N_0 : Anzahl der DNA-Kopien vor Beginn der PCR

N_n : Anzahl der DNA-Kopien nach n Zyklen

E : Faktor der PCR-Effizienz

C_T : Anzahl der Zyklen

E ergibt sich nach einem Primertest für jedes Produkt. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zu der Menge an amplifizierter DNA. Setzt man bei gleicher Intensität der Fluoreszenz den Wert für N_n gleich 1 und bestimmt die jeweils nötigen Zyklen (C_T) um diese Intensität zu erlangen, so erhält man mit N_0 eine Aussage über die relative Transkriptmenge.

2.4.4 CO₂-Abgabe von [¹⁴C]-Pyrimidinen

Pyrimidine, die in katabole Reaktionen eingehen, werden zu β -Alanin, Ammonium (NH_4^+) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) abgebaut. Diese Methode wurde modifiziert von STITT & HELDT (1981) bzw. THOM & NEUHAUS (1995) übernommen. Es wurden jeweils 3 Keimlinge aus steriler Flüssigkultur (Kap. 2.2.4) in 800 μl Flüssigkultur-Medium mit bzw. ohne Stickstoff mit zusätzlich 5 μM [¹⁴C]-Substrat für 18 h inkubiert. Die verwendeten Radionuklide tragen die [¹⁴C]-Markierung jeweils spezifisch im Basenanteil, so dass sichergestellt ist, dass im Zuge des Pyrimidin-Abbaus das markierte C-Atom als CO_2 freigesetzt wird. An den oberen Rand der Reaktionsgefäße wurden mit Hilfe von Vakuumfett kleinere Reaktionsgefäße geklebt, die mit 50 μl 3 M KOH befüllt waren, so dass sich freiwerdendes CO_2 lösen konnte. Zum Abstoppen der Reaktion und Verdrängung des restlichen CO_2 aus der Substrat-Lösung wurde mit einer Spritze durch den Deckel des Reaktionsgefäßes in diese 100 μl 2 M HCl gegeben. Anschließend wurde das entstandene Loch mit Vakuumfett abgedichtet. Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte in einem Szintillationszähler (Packard Tri Carb 2500 TR, Canberra Industry, USA).

2.4.5 Bestimmung der Invertase-Aktivität

Die Keimlinge wurden mit Rohextrakt-Puffer gemörsert und nach Zentrifugation (17000g, 5 min, 4°C) konnte der Überstand zur Messung der Invertase-Aktivität eingesetzt werden. Der Nachweis der Invertase-Aktivität erfolgte über einen gekoppelten Enzymtest. 1 Molekül Saccharose wurde mittels Invertasen in 1 Molekül Glukose und 1 Molekül

Fruktose gespalten. Die Glukose wiederum reagierte mit ATP zu Glukose-6-Phosphat, katalysiert durch das Enzym Hexokinase. Die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase wandelte dieses zu 6-Phospho-Gluconolacton um. Die dabei stattfindende Reduktion von NADP⁺ zu NADPH konnte im Photometer (Jasco V-550 Spectrophotometer) bei 334 nm verfolgt werden. Der Testansatz umfasste jeweils 1 ml. Start der Messung erfolgte durch Zugabe von Saccharose.

Rohextrakt-Puffer:

50 mM Hepes-KOH, pH 7,4

5 mM MgCl₂

0,1 mM PMSF

Testansatz: 50 mM Hepes-KOH, pH 7,4

5 mM MgCl₂

1 mM ATP

1 mM NADP⁺

1,5 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

1 U Hexokinase

50 µl Rohextrakt

Start: 1 mM Saccharose

2.4.6 Acetat-abhängige Fettsäuresynthese

Die Analyse des Acetat-Einbaus in Fettsäuren erfolgte modifiziert nach JOURNET & DOUCE (1985) und MUDD & DEZACKS (1981). Die Keimlinge bzw. Blattscheibchen wurden in Flüssigkultur-Kontrollmedium (Kap. 2.2.4) mit zusätzlichen 500 µM [¹⁴C]-Acetat für 3 h in einem Thermomixer (30°C, 500 rpm; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) inkubiert, danach wurde das Inkubationsmedium entfernt und in einem Szintillationszähler (Packard Tri Carb 2500 TR, Canberra Industry, USA) die enthaltene Restaktivität quantifiziert. Eine weitere Reaktion des Pflanzenmaterials mit Mediumrückständen wurde durch Abstoppen der Reaktion mit 900 µl Chloroform/Methanol/Eisessig (50/100/5 (v/v)) verhindert. Nach

Zugabe weiterer 300 µl Chloroform sowie 300 µl H₂O_{bidest.} und intensiver Durchmischung wurde durch Zentrifugation (16.000g, 2 min.) eine Phasentrennung herbeigeführt. In der Chloroform-Phase im unteren Bereich des Reaktionsgefäßes wurden lipophile Substanzen zurückgehalten, während hydrophile Substanzen wie nicht eingebautes Acetat in die obere, wässrige Phase übertraten. Nach Entfernen der wässrigen Phase folgten zwei Waschschrte mit 160 µl Methanol und 500 µl H₂O_{bidest.}. Es erfolgte die Überführung der Chloroformphase in 20 ml-Szintillationsgefäße und das Abdampfen des Chloroforms. Die eingengte Probe wurde zur Quantifizierung der Radioaktivität im Szintillationszähler in 50 µl Chloroform aufgenommen.

2.4.7 Bestimmung der DHODH-Aktivität

Die Bestimmung der DHODH-Aktivität erfolgte angelehnt an ULLRICH *et al.* (2002). Zunächst wurden *Arabidopsis thaliana*-Blätter mit Chloroplasten-Puffer gemörsert und durch Zentrifugation (100g, 5 min, 4°C) die gröbsten Zelltrümmer sedimentiert. Nachdem der Überstand erneut zentrifugiert (100g, 5 min, 4°C) worden war, wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation (11000g, 20 min, 4°C) pelletiert. Nach dem Resuspendieren dieses Pellets dienten diese angereicherte Mitochondrien als Ausgangsmaterial für die photometrische Messung der DHODH-Aktivität. Die bei der Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat freiwerdenden Elektronen dienten der Reduktion von Ubichinon (Q_D), dessen Oxidation wiederum der Reduktion von Dichlorphenolindophenol (DCIP). Dabei wandelt sich das oxidierte, blaue DCIP in die reduzierte, farblose Form um. Dieser Farbumschlag kann im Photometer (Jasco V-550 Spectrophotometer) bei 300 nm verfolgt werden. Der Testansatz umfasste jeweils 1 ml. Start der Messung erfolgte durch Zugabe von Dihydroorotat.

Chloroplasten-Puffer:

- 50 mM Tris, pH 7,5 (HCl)
- 5 mM MgCl₂
- 0,1 mM PMSF

Testansatz:	0,1 mM	Q _D
	0,06 mM	DCIP
	50 mM	Tris, pH 7,5 (HCl)
	150 mM	KCl
	0,08 %	Triton X-100
	50 µl	angereicherte Mitochondrien
Start:	1mM	Dihydroorotat

2.5 Reporterger- und Lokalisierungsstudien

2.5.1 Lokalisierungsstudien mittels grün fluoreszierendem Protein (GFP)

Für subzelluläre Lokalisierungsstudien wurde die Methode der transienten Expression von rekombinanten GFP-Fusionsproteinen in isolierten Tabak-Protoplasten angewendet. Dazu mussten zunächst Tabakprotoplasten isoliert und diese anschließend mit entsprechenden klonierten Plasmid-Konstrukten (Tab. 2.6) transformiert werden.

Die Methode der Protoplastenisolierung aus Tabakblättern (*N. tabacum*, Varietät W38) erfolgte nach einer etablierten Methode (DAMM *et al.*, 1989). Als Pflanzenmaterial wurden in Sterilkultur (Kap. 2.2.5) angezogene, 3-4 Wochen alte Pflanzen verwendet. Nach deren spezifischer Proteolyse mit Enzymlösung über Nacht wurden die Protoplasten durch die Abfolge von mehreren Zentrifugationsschritten in osmotisch hoch wirksamen Lösungen isoliert. Nachfolgend wurden die intakten Protoplasten mittels einer Saccharose-MES-Lösung aufgrund ihrer geringen Dichte durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 60g von den zerstörten Protoplasten getrennt.

Die Transformation der Protoplasten wurde unter Verwendung von PEG durchgeführt (WENDT *et al.*, 2000). Für die Transformation wurden 15-30 µg hochreine Plasmid-DNA verwendet. Die transformierten Protoplasten wurden in B5t-Medium bei 21°C im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 18-36 h mit einem Invers-Mikroskop (Axiovert 200 ApoTome, Zeiss, Jena) bei 450-490 nm ausgestattet mit einem Plan Neofluar 340/1.3 Öl Objektiv unter Verwendung des Zeiss Filter Sets 10. Die gleiche Wellenlänge führt auch zur Anregung des Chlorophylls, wodurch die in den Protoplasten enthaltenen Chloroplasten eine rote Eigenfluoreszenz zeigten. Deren Detektion erfolgte digital mit vorgeschaltetem 560 nm Tiefpassfilter (bzw. Langpassfilter >515 nm). Zur graphischen

Darstellung der Protoplasten wurde eine Serie von Bildern digital aufgezeichnet, die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit den Programmen „LSM Image Browser“ (Zeiss, Jena) bzw. „AxioVision“ V4.4 (Zeiss, Jena).

Enzymlösung:

450 mM Mannitol
10 mM CaCl₂
20 mM MES, pH 5,7
1 % Zellulase Onozuka R-10
0,25 % Macerozyme R-10

Saccharose-MES-Lösung:

500 mM Saccharose
0,1 % MES, pH 5,7

W5-Medium:

145 mM NaCl
125 mM CaCl₂
5 mM KCl
5 mM Glukose

MaMg-Lösung:

500 mM Mannitol
15 mM MgCl₂
0,1 % MES, pH 5,7

PEG-Lösung:

420 mM Mannitol
100 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
0,1 % MES, pH 7,0

B5t-Medium:

3,2 g l⁻¹ Gamborg-Medium
450 mM Glukose
pH 5,7

nach dem Autoklavieren hinzugefügt:

0,1 mg l⁻¹ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (in Ethanol)
1 mg l⁻¹ 1-Naphthyllessigsäure (in DMSO)
0,2 mg l⁻¹ 6-Benzylaminopurin (in Ethanol)

2.5.2 GUS-Färbung

Für Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression von *DHODH* wurden transgene Pflanzen mit einem *DHODH*-Promotor-Reporter-gen-Fusionskonstrukt hergestellt. Bei *uidA* aus *Escherichia coli* handelt es sich um ein solches Reporter-gen, welches für das Enzym β -Glucuronidase (GUS) kodiert. Zum Nachweis des Reporter-gens wird das zu untersuchende Pflanzengewebe mit dem synthetischen Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid (X-Gluc) infiltriert, welches nach oxidativer Kondensation und Spaltung durch GUS einen blauen Farbniederschlag am exakten Syntheseort liefert. Die GUS-Färbung erfolgte in Anlehnung an SESSIONS *et al.*, 1999. Das zu untersuchende Pflanzenmaterial wurde zunächst mit 90%igem (v/v), eiskaltem Aceton für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Daraufhin wurde das Gewebe 20 min mit Färbepuffer infiltriert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Pflanzeneigene Farbreste wurden durch 30-minütige Waschschrirte mit 20%, 35%, 50% und 75% (v/v) Ethanol entfernt.

Färbepuffer:

50 mM	Na ₃ PO ₄ , pH 7,2
10 mM	Kalium-Ferrocyanid
10 mM	Kalium-Ferricyanid
1% (v/v)	Triton X-100
2 mM	X-Gluc

2.6 Bestimmung von Metaboliten

Zur Quantifizierung der Metabolite wurde, falls nicht anders angegeben, Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und bis zur Versuchsdurchführung bei -70°C gelagert.

2.6.1 Chromatographische Quantifizierung von Uracil

Zur Bestimmung der Uracilgehalte wurden 100 mg gemörsertes Pflanzenmaterial verwendet. Die Extraktion erfolgte mit 80%igem Ethanol bei 80°C für 1 h. Nach einer Zentrifugation (20.000g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mittels einer „Speed-Vac“ (RC10.10, Jouan, Saint-Herblain, Frankreich) bei 40°C auf weniger als 100 µl eingedampft und anschließend in einem Endvolumen von 100 µl H₂O resuspendiert. Das resultierende Pellet konnte zur Quantifizierung des Stärkegehaltes herangezogen werden (Kap. 2.6.3). Die Quantifizierung von Uracil erfolgte mittels einer HPLC (high pressure liquid chromatography)-Anlage (Dionex, Idstein, Taunus), bestehend aus P680 HPLC-Pumpe, ASI-100 Automated Sample Injector, RF 2000 Fluoreszenzdetektor, UVD 170U UV-Detektor, UCI-50 Universal Chromatography Interface (Dionex, Sunnyvale, USA) und Nucleodur 100-5 C18 ec-Säule (Machery & Nagel, Düren, Germany). Als Referenz diente ein Uracil-Standard. Zur Analyse der Daten wurde die Software Chromeleon (Version 6.70, Dionex, Sunnyvale, USA) verwendet. Als Laufmittel diente ein Gradient aus Laufmittel A und Laufmittel B. Der verwendete Gradient ist in Tab. 2.7 dargestellt.

Laufmittel A:

50 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 5,4 (KOH)
5,7 mM	TBAS

Laufmittel B:

90 % Acetonitril

Tab. 2.7: Gradient für die HPLC-Analyse zur Bestimmung des Uracil-Gehaltes

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0-5	100,0	0,0
5-14	100,0 - 17,5	0,0 - 82,5
14-15	17,5 - 100,0	82,5 - 0,0
15-20	100,0	0,0

2.6.2 Chromatographische Quantifizierung der Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose

Zur Bestimmung der Zucker-Gehalte wurden 100 mg gemörstertes Pflanzenmaterial verwendet. Die Extraktion erfolgte mit 80%igem Ethanol bei 80°C für 1 h. Nach einer Zentrifugation (20.000g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mittels einer „Speed-Vac“ (RC10.10, Jouan, Saint-Herblain, Frankreich) bei 40°C auf weniger als 100 µl eingedampft und anschließend in einem Endvolumen von 100 µl H₂O resuspendiert. Das resultierende Pellet konnte zur Quantifizierung des Stärkegehaltes herangezogen werden (Kap. 2.6.3). Die Quantifizierung der Zucker erfolgte mittels IC (Ionenchromatographie). IC ist eine Form der HPLC (Kap. 2.6.1), bei der als stationäre Phase ein Ionenaustauscher (meist auf Basis eines Polymermaterials) eingesetzt wird. Das Prinzip hierbei ist eine Wechselwirkung beim Kationen- bzw. Anionenaustausch. Die Quantifizierung der Zucker erfolgte mittels einer 761 IC-Compact-Anlage (Metrohm, Schweiz). Die Auftrennung erfolgte über eine Metrosep A Supp 4-250-Säule (Metrohm, Schweiz). Als Referenz dienten entsprechende Zucker-Standards. Als Laufmittel wurde 100 mM NaOH verwendet.

2.6.3 Quantifizierung von Stärke

Zur Bestimmung des Stärke-Gehalts wurden 100 mg gemörstertes Pflanzenmaterial in 80%igem Ethanol bei 80°C für 1 h inkubiert. Nach einer Zentrifugation (20.000g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand, welcher unter anderem lösliche Zucker (Kap. 2.6.2) und Uracil (Kap. 2.6.1) enthält, vom Pellet getrennt. Zur Entfernung der restlichen löslichen Komponenten wurde das Pellet weitere dreimal für jeweils 10 min mit 80%igem Ethanol gewaschen (80°C). Schließlich wurde das Pellet zur sauren Hydrolyse in 500 µl 50 mM

Natriumacetat (pH 4,7) aufgenommen. Durch 40-minütiges Autoklavieren wurde die Stärke in Lösung gebracht und anschließend enzymatisch durch Zugabe von jeweils 5 U α -Amylase und Amyloglucosidase und Inkubation in einem Thermomixer (37°C, 2 h, 1400 rpm; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) zu Glukose gespalten. Zur Denaturierung der Enzyme erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 95°C. Nach Zentrifugation (20.000g, 5 min) wurde der Überstand abgenommen und das Volumen bestimmt. Zur vollständigen Extraktion der Stärke aus dem Pflanzenmaterial wurde die enzymatische Spaltung der Stärke ein weiteres Mal durchgeführt. Die so erhaltene Glukose, von deren Gehalt auf den Stärkegehalt rückgeschlossen werden kann, wurde wie in Kap. 2.6.2 beschrieben bestimmt.

2.6.4 Bestimmung von Blattpigmenten

Als Ausgangsmaterial zur Determinierung des Gehalts an Chlorophyll dienten 100 mg gemörserte Keimlinge. Die Extraktion erfolgte mit 80%igem Ethanol nach ARNON (1949). Als Pflanzenmaterial zur Bestimmung von Anthocyanen dienten unter Stickstoffmangel angezogene 10 Tage alte Keimlinge (Kap. 2.2.4). Die Extraktion und Quantifizierung erfolgte nach der Methode von LANGE *et al.* (1971).

2.6.5 Bestimmung von Kohlenstoff- und Stickstoffgehalten in Samen von *Arabidopsis thaliana*

Die relativen Gehalte an Kohlenstoff und Stickstoff im Samen wurden in getrockneten Proben mit einem Elementaranalysesystem (Vario EL III, Elementaranalysen-systeme GmbH, Hanau, Germany) bestimmt.

Die Messungen wurden von Dr. Hardy Rolletschek am IPK Gatersleben durchgeführt.

2.6.6 Bestimmung der Lipidkonzentration in Samen von *Arabidopsis thaliana*

Die Bestimmung der Lipidkonzentration erfolgte wie in REISER *et al.*, 2004 beschrieben. Es wurden 100 mg reife und trockene Samen in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff homogenisiert. Nach Zugabe von 1,5 ml Isopropanol wurde die entstandene Samenmasse in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C in einem Über-Kopf-Schüttler über Nacht inkubiert (100 rpm, RT 45°, Fröbel Labortechnik, Lindau). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 12000g; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Der Überstand wurde in vorher gewogene Reaktionsgefäße überführt und für 8 h bei 60°C mit offenem

Deckel inkubiert. Nach vollständigem Abdampfen des Isopropanols wurde der Lipidgehalt gravitrometrisch bestimmt.

2.6.7 Bestimmung der Proteinkonzentration in Samen von *Arabidopsis thaliana*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie in REISER *et al.*, 2004 beschrieben. Es wurden 100 mg reife und trockene Samen in einem Mörser bei Raumtemperatur homogenisiert. Nach Zugabe von 1 ml Protein-Puffer wurde weiter gemörsert und schließlich die entstandene Samenmasse in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 12000g; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) wurde der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung mit Bicinsäure-Reagenz (Pierce Chemical, Rockford, IL) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Protein-Puffer:

- 50 mM HEPES, pH 7,5 (KOH)
- 5 mM MgCl₂
- 1 mM EDTA
- 1 % Triton X-100
- 15 % Glyzerin
- 2 % SDS
- 1 % PMSF

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation sollte die physiologische Funktion der Dihydrouracil-Dehydrogenase (Pyd1) im Pyrimidin-Abbau von *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Das plastidär lokalisierte Enzym Pyd1 leitet den dreistufigen Abbauprozess der Pyrimidin-Nukleobasen ein (ZRENNER *et al.*, 2009).

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der physiologischen Bedeutung des Pyrimidin-Abbaus im Allgemeinen und dem Enzym Pyd1 im Speziellen im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana*. Hierzu wurden transgene Pflanzen generiert, um die Auswirkungen einer fehlenden oder erhöhten bzw. einer zytosolischen statt plastidären *Pyd1*-Expression auf den pflanzlichen Stoffwechsel untersuchen zu können. Dabei fanden 3 Stadien in der pflanzlichen Entwicklung besondere Bedeutung: Keimung, Stickstoffmangel und Seneszenz.

Da während der durchgeführten Analysen zur *Pyd1* nicht ausgeschlossen werden konnte, dass ein weiteres Dihydrouracil-Dehydrogenase-Enzym existiert, sollte zudem das nächste Homolog in *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Dabei handelt es sich um das Pyrimidin-*de novo*-Synthese-Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH). Auch für dieses Gen wurden transgene Pflanzen generiert, um die Auswirkungen einer fehlenden oder erhöhten Expression im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* untersuchen zu können.

3.1 Analyse zur entwicklungsspezifischen Expression von *Pyd1*

Um die Funktion eines Gens im pflanzlichen Stoffwechsel genauer einordnen zu können, kann es entscheidend sein, die gewebe- bzw. entwicklungsspezifische Expression dieses Gens zu kennen. Die Genexpression kann durch GUS-Färbung visualisiert werden, es kann auf die auf Microarray-Daten basierende Referenzdatenbank Genevestigator (ZIMMERMANN *et al.*, 2004) zurückgegriffen werden oder man kann eigene Expressionsstudien mittels qRT (quantitative real time)-PCR durchführen. Zur Untersuchung der entwicklungsspezifischen Expression von *Pyd1* wurden verschiedene Gewebe von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen geerntet, die daraus isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und damit entsprechende qRT-PCR-Analysen durchgeführt (Abb. 3.1).

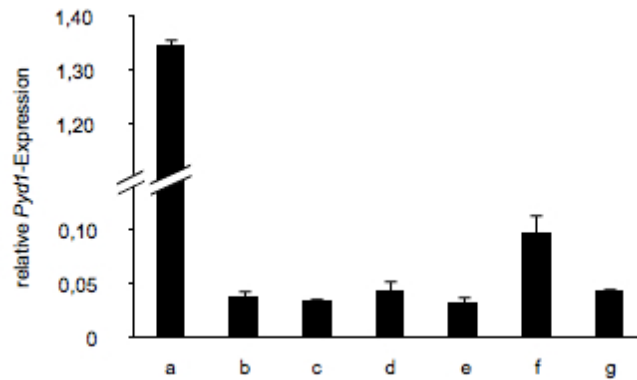


Abb. 3.1: Untersuchung der entwicklungsspezifischen Genexpression von *Pyd1* in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen

Dargestellt ist die qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.4.3) des *Pyd1*-Transkriptgehalts in unterschiedlichen Geweben. (a) trockener Samen; (b) Wurzel; (c) 4 Wochen altes Blatt; (d) 8 Wochen altes Blatt; (e) Stängel; (f) Blüte; (g) Schote. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1 α* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm SE).

Pyd1 zeigte in Wurzeln, Blättern, Stängel und Schoten etwa die gleiche Expression, lediglich in Blüten wurde *Pyd1* etwas stärker exprimiert als in den zuvor genannten Geweben. Im trockenen Samen allerdings war die *Pyd1*-Expression mehr als 15-mal höher im Vergleich zu allen anderen getesteten Geweben (Abb. 3.1).

3.2 Analyse der subzellulären Lokalisierung von *Pyd1* mittels GFP-Fusion

Neben Kenntnissen zur gewebespezifischen Expression eines bestimmten Gens ist auch die subzelluläre Lokalisierung wichtig, um Aussagen über die Funktion des Gens im Stoffwechsel machen zu können. Mittels GFP-Fusionsstudien konnte *Pyd1* als plastidär lokalisiertes Protein identifiziert werden (ZRENNER *et al.*, 2009).

Um nähere Erkenntnisse über die Targetsequenz zu erhalten, wurden zunächst Bioinformatik-Programme wie TargetP 1.1 und SignalP 3.0 genutzt (BENDTSEN *et al.*, 2004; EMANUELSSON *et al.*, 2007). So sagt SignalP für das *Pyd1*-Protein die „cleavage site“ zur Abtrennung des Targetpeptids nach erfolgtem Organell-Import zwischen Aminosäure 21 und 22 voraus. Um zu testen, ob das Fehlen der ersten 21 Aminosäuren tatsächlich zu einer Zurückhaltung des *Pyd1*-Proteins im Zytosol führt wurden isolierte Tabak-Protoplasten neben dem Volllänge-Konstrukt auch mit den zwei verkürzten Versionen Δ 21-*Pyd1* und Δ 42-*Pyd1* transformiert. Die kürzere Proteinversion diente der Überprüfung der

Methode als solche, da hier mit Sicherheit die komplette Zielsteuerungssequenz fehlt. Die transformierten Tabak-Protoplasten sind in Abb. 3.2 dargestellt.

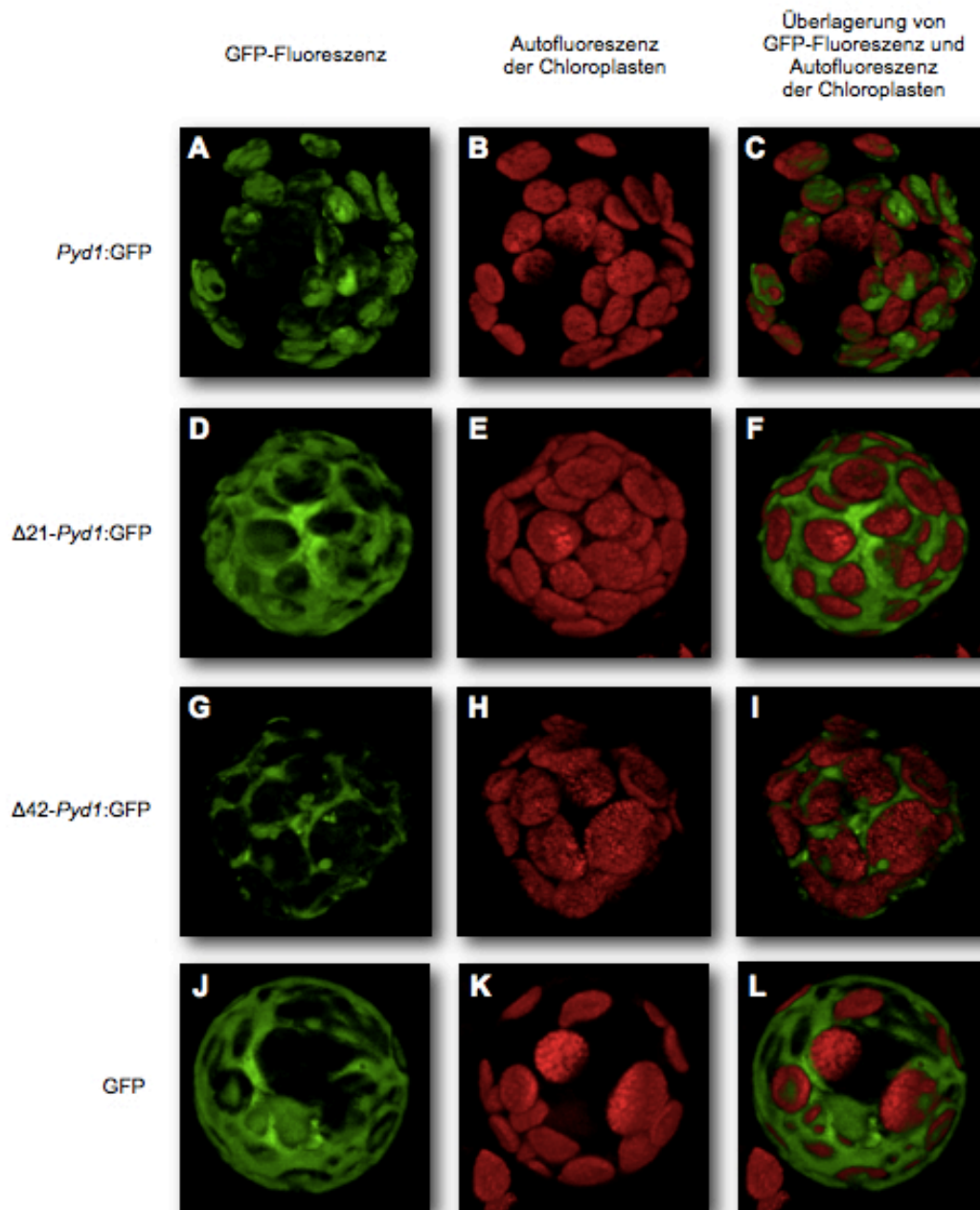


Abb. 3.2: Transiente Expression des *Pyd1*:GFP-Fusionskonstrukts in Tabak-Protoplasten

Dargestellt sind jeweils die GFP-Fluoreszenz, die Eigenfluoreszenz der Chloroplasten sowie die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen.

Die Tabak-Protoplasten wurden transformiert (Kap. 2.5.1) mit

(A)-(C) dem Konstrukt *Pyd1*:GFP,

(D)-(F) dem Verkürzungskonstrukt $\Delta 21$ -*Pyd1*:GFP,

(G)-(I) dem Verkürzungskonstrukt $\Delta 42$ -*Pyd1*:GFP und

(J)-(L) dem leerem GFP-Vektor (Kontrolle für zytosolische Lokalisierung).

Die Untersuchung der transformierten Tabak-Protoplasten erfolgte ca. 24 Stunden nach der Transformation.

Die Aufnahmen wurden mit einem Inversmikroskop bei 40-facher Vergrößerung angefertigt.

In Abb. 3.2 A-C ist ein charakteristischer Tabak-Protoplast nach transienter Expression des *Pyd1*-GFP-Fusionskonstruktes dargestellt. Aus der Überlagerung der Fluoreszenz von *Pyd1*:GFP (Abb. 3.2 A) und der chloroplastidären Eigenfluoreszenz (Abb. 3.2 B) wird ersichtlich, dass diese exakt deckungsgleich sind (Abb. 3.2 C), was auf eine plastidäre Lokalisierung von *Pyd1* hinweist.

Bei den Tabak-Protoplasten, die mit den verkürzten Versionen von *Pyd1* transformiert wurden war dies nicht der Fall (Abb. 3.2 D-F und G-I). Hier entsprach das Muster der Fluoreszenz eindeutig einer zytosolischen Lokalisierung, wie dies auch für den mit GFP transformierten Kontroll-Protoplasten der Fall war (Abb. 3.2 J-L).

3.3 Molekulare Charakterisierung transgener *Pyd1*-Pflanzen

Um die physiologische Funktion von *Pyd1* besser verstehen zu können wurde eine Reihe von korrespondierenden *Pyd1*-Mutanten hergestellt (Kap. 2.2.1).

3.3.1 Nachweis der homozygoten T-DNA-Insertion in das Gen *Pyd1*

Zunächst wurden 2 unabhängige *Pyd1*-T-DNA-Insertionslinien untersucht. Dabei handelt es sich um die Linie SAIL_363_E04, im weiteren Verlauf bezeichnet als *Pyd1*-1, und die Linie GK-251F09 (bezeichnet als *Pyd1*-2). Um eine homozygote T-DNA-Insertionslinie zu identifizieren wurde zunächst gDNA (Kap. 2.4.1) von putativen *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen isoliert und als Template für PCR-Reaktionen mit genspezifischen und T-DNA-spezifischen Primerkombinationen eingesetzt (Abb. 3.3 B und C).

Um auch auf mRNA-Ebene den vollständigen Verlust des *Pyd1*-Transkripts in den beiden T-DNA-Insertionslinien nachzuweisen, wurde Gesamt-RNA revers in cDNA transkribiert (Kap.2.3.3) und ebenfalls einer PCR-Analyse unterzogen (Abb. 3.3 D).

Dem folgenden Schema (Abb. 3.3 A) ist die Lage der T-DNA-Insertionsstellen der Linien SAIL_363_E04 und GK-251F09 zu entnehmen. Weiterhin sind die Bindestellen der verwendeten Primer eingezeichnet.

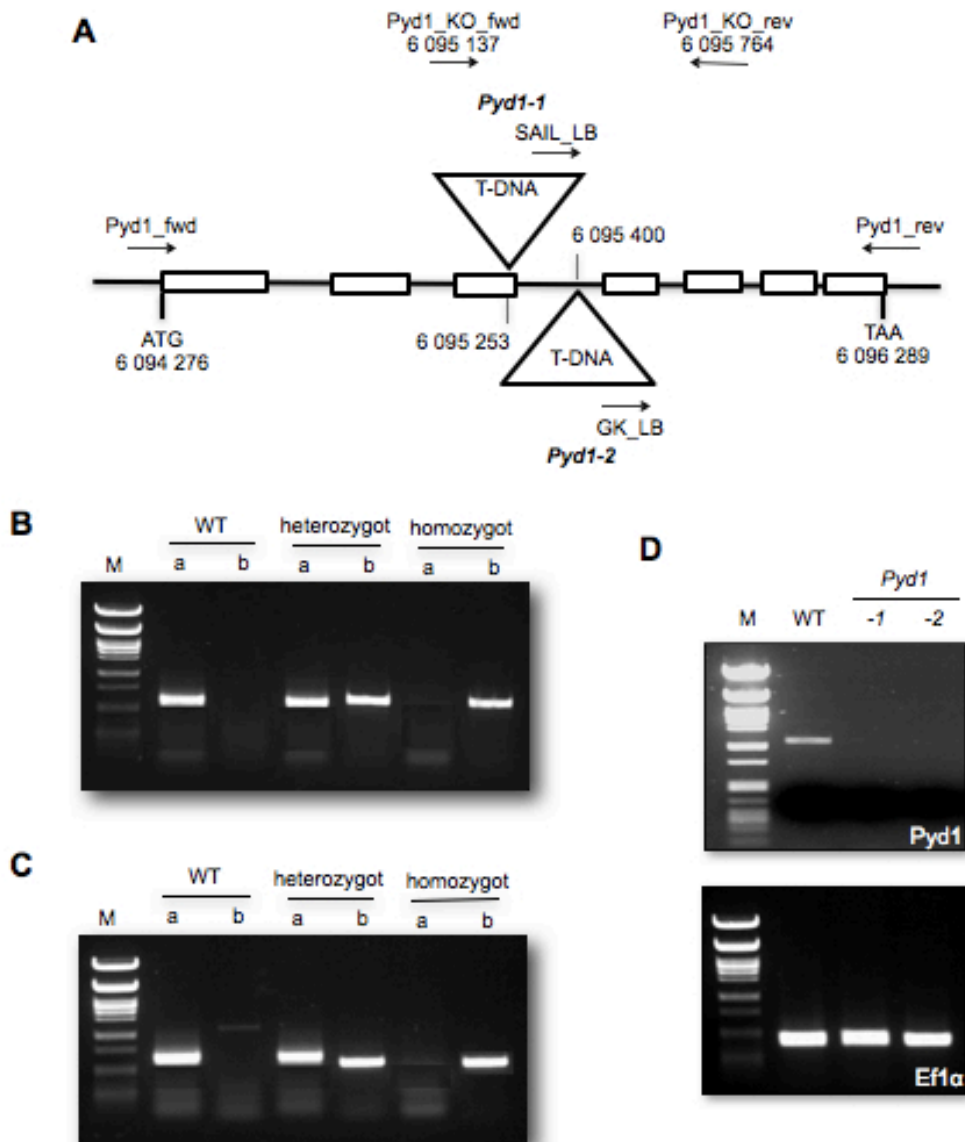


Abb. 3.3: Genetische Charakterisierung der *Pyd1*:T-DNA-Insertionsmutanten

(A) Schema der Exon- und Intron-Struktur des *Pyd1*-Gens sowie die Positionen der T-DNA-Insertionen im 3. Exon (SAIL_363_E04) bzw. im 3. Intron (GK-251F09). Die Bindestellen der eingesetzten Primer sind durch Pfeile dargestellt.

(B) PCR-Analyse auf genomische DNA von Wildtyp (WT)-Pflanzen, heterozygoten und homozygoten *Pyd1*-T-DNA-Insertionsmutanten der Linie SAIL_363_E04 bezeichnet als *Pyd1-1*.
 a: Gen-spezifische Primerkombination *Pyd1_KO_fwd* und *Pyd1_KO_rev*.
 b: T-DNA-spezifische Primerkombination *SAIL_LB* und *Pyd1_KO_rev*.

(C) PCR-Analyse auf genomische DNA von Wildtyp-Pflanzen, heterozygoten und homozygoten *Pyd1*-T-DNA-Insertionsmutanten der Linie GK-251F09 bezeichnet als *Pyd1-2*.
 a: Gen-spezifische Primerkombination *Pyd1_KO_fwd* und *Pyd1_KO_rev*.
 b: T-DNA-spezifische Primerkombination *GK_LB* und *Pyd1_KO_rev*.

(D) PCR zum Nachweis des vollständigen Transkriptverlusts in homozygoten *Pyd1-1*- und *Pyd1-2*-Pflanzen unter Verwendung der Primer *Pyd1_fwd* und *Pyd1_rev*. Kontrolle der PCR-Reaktion in Wildtyp- und *Pyd1*-"knock out"-Pflanzen mit *Ef1α*-spezifischen Primern.
 Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Als Größenstandard (M) diente mit *Pst*I verdaute λ-DNA.

In Abb. 3.3 B ist das Ergebnis der PCR auf gDNA einer Wildtyp-Pflanze, einer heterozygoten und einer homozygoten *Pyd1*:T-DNA-Insertionsmutante der Linie SAIL_363_E04 dargestellt. Verwendet man genspezifische Primer (a) liefert der Wildtyp ein etwa 500 bp großes Produkt, welches der erwarteten Produktgröße entspricht. Während die PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern auf gDNA einer heterozygoten Pflanze ebenfalls dieses Produkt hervorbringt, erhält man mit der entsprechenden Primerkombination auf gDNA der homozygoten T-DNA-Insertionslinie kein Produkt. Allerdings liefert eine PCR mit einer T-DNA-spezifischen Primerkombination (b) sowohl auf gDNA einer homozygoten als auch einer heterozygoten Insertionsmutante ein Produkt von ca. 500 bp, welche ebenfalls der theoretischen Produktgröße entspricht. Da eine PCR mit dieser Primerkombination auf Wildtyp-gDNA kein Produkt liefert kann von einer spezifischen Insertion einer T-DNA in das Gen *Pyd1* bei den *Pyd1*-1-Pflanzen ausgegangen werden. Gleiches gilt für die *Pyd1*-2-Pflanzen (Abb. 3.3 C). Auch hier erhält man durch PCR mit genspezifischen Primern (a) jeweils ein Produkt auf gDNA von Wildtyp und heterozygoter Pflanze, nicht aber auf gDNA der homozygoten Insertionslinie. Umgekehrt amplifiziert eine T-DNA-spezifische Primerkombination (b) nur ein Produkt bei gDNA der homozygoten und heterozygoten Pflanzen, nicht aber bei Wildtyp-gDNA. Weiterhin wurde mit PCR auf cDNA von Wildtyp-, *Pyd1*-1- und *Pyd1*-2-Pflanzen untersucht, ob die Unterbrechung des „open reading frame“ des *Pyd1*-Gens auch zu einem Verlust der entsprechenden mRNA führt (Abb. 3.3 D). Mit den genspezifischen Primern *Pyd1*_fwd und *Pyd1*_rev konnte nur auf cDNA isoliert aus Wildtyp-Pflanzen, nicht aber auf *Pyd1*-1- oder *Pyd1*-2-cDNA, ein Produkt der erwarteten Größe von ca. 1300 bp amplifiziert werden. Zur Kontrolle der aus *Pyd1*-1- und *Pyd1*-2-Pflanzen isolierten cDNA wurde zudem eine PCR mit *Ef1 α* -spezifischen Primern durchgeführt. Diese lieferte bei allen drei Genotypen ein Produkt von ca. 400 bp. Somit kann durch den Verlust der zur cDNA korrespondierenden mRNA in den beiden T-DNA-Insertionslinien auch auf den Verlust des entsprechenden Proteins geschlossen werden.

3.3.2 Transkriptanalyse der generierten *Pyd1*-Überexpressionspflanzen

Es wurden *Pyd1*-Überexpressionspflanzen generiert, bei denen das Gen *Pyd1* unter der Kontrolle des konstitutiven Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotor (CaMV 35S) steht. Zunächst wurden die generierten Pflanzenlinien hinsichtlich ihrer Transkriptgehalte untersucht (Abb. 3.4).

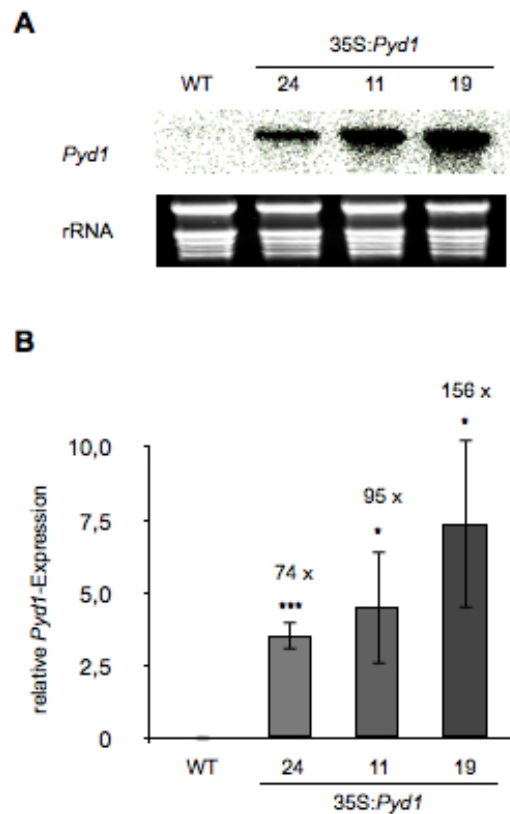


Abb. 3.4: Untersuchung der Genexpression von *Pyd1* in Wildtyp- und 35S:*Pyd1*-Pflanzen

(A) Dargestellt ist das Autoradiogramm eines Northern Blots (Kap. 2.4.2) nach Hybridisierung mit einer *Pyd1*-spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente ein Formaldehydgel, bei dem jede Spur mit 10 µg Gesamt-RNA beladen wurde.

(B) Dargestellt ist eine qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.4.3) des *Pyd1*-Transkriptgehalts. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1α* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

Die Northern-Blot-Analysen lieferten den qualitativen Nachweis, dass der *Pyd1*-Transkriptgehalt in allen drei dargestellten Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen erhöht ist (Abb. 3.4 A). Während in allen drei Überexpressionslinien eine starke Detektion durch die spezifische, radioaktiv markierte Sonde erfolgte, lag der Transkriptgehalt des Wildtyps unterhalb der Nachweisgrenze. Um eine genaue Quantifizierung der *Pyd1*-Transkriptgehalte in den 35S:*Pyd1*-Pflanzen machen zu können wurden zusätzlich

quantitative RT-PCR (qRT-PCR)-Analysen durchgeführt (Abb. 3.4 B). Diese bestätigen die gesteigerten Transkriptgehalte in den Überexpressionspflanzen. So zeigt die Linie 24 eine 74-fache, die Linie 11 eine 95-fache und die Linie 19 sogar eine 156-fache Steigerung des Transkriptgehalts von *Pyd1* im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen.

Pyd1 ist ein plastidär lokalisiertes Protein (ZRENNER *et al.*, 2009; Kap. 3.2). Dagegen handelt es sich bei den anderen Pyrimidinabbau-Enzymen um zytosolisch (*NSH1*, *Pyd3*) (JUNG *et al.*, 2009, ZRENNER *et al.*, 2009) oder im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (*Pyd2*) (ZRENNER *et al.*, 2009) lokalisierte Proteine, weshalb sich die Frage nach dem Grund für eine derart komplexe Lokalisierung stellte. Es wurden Pflanzen generiert, die statt dem plastidären *Pyd1*-Protein zytosolisches *Pyd1*-Protein aufwiesen. Dazu wurde die *Pyd1*-„knockout“-Linie *Pyd1-1* mit der unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor stehenden verkürzten Version $\Delta 21$ -*Pyd1* transformiert. Für dieses verkürzte Protein konnte eine zytosolische Lokalisierung nachgewiesen werden (Kap. 3.2).

Die generierten Pflanzenlinien wurden hinsichtlich ihrer Transkriptgehalte untersucht (Abb. 3.5).

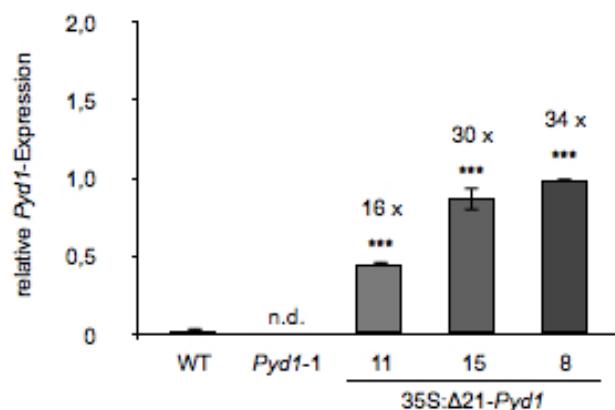


Abb. 3.5: Untersuchung der Genexpression von *Pyd1* in Wildtyp- und 35S: $\Delta 21$ -*Pyd1*-Pflanzen

Dargestellt ist eine qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.4.3) des *Pyd1*-Transkriptgehalts. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1a* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm SE). n.d., nicht detektierbar. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

Die durchgeführten qRT-PCR-Analysen bestätigten, dass es sich bei den untersuchten Pflanzen um Überexprimierer der um 21 Aminosäuren verkürzten *Pyd1*-Version handelt. So war der *Pyd1*-Transkriptgehalt der Linie 11 im Vergleich zum *Pyd1*-Transkript in Wildtyp-Keimlingen 16-fach, der der Linie 15 30-fach und der der Linie 8 34-fach gesteigert.

3.4 Bestimmung der Dihydrouracil-Dehydrogenase-Aktivität

Bisher ist es noch keinem gelungen, Pyc1-Aktivität in pflanzlichen Extrakten (TINTEMANN *et al.*, 1985; ZRENNER *et al.*, 2009) oder mit rekombinant exprimiertem Protein (ZRENNER *et al.*, 2009) direkt zu messen. Auch eigene Versuche sowohl mit pflanzlichen Extrakten oder angereicherten Plastiden, als auch nach heterologer Expression in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* oder am rekombinanten Protein schlugen fehl.

Es wurden andere, indirekte Methoden zum funktionellen Nachweis verwendet.

3.4.1 Wachstumsanalyse auf toxischen Nukleosidanaloga

Toxische Analoga von Pyrimidinen wie 5-Fluorouracil (FU) und 5-Fluorouridin (FD) sind geeignete Hilfsmittel zur Untersuchung verschiedener Stoffwechselfvorgänge. Gelangen diese Substanzen in den pflanzlichen Stoffwechsel, hemmen sie in Form von 5-Fluoro-Desoxy-Uridinmonophosphat (F-dUMP) die Thymidylat-Synthase wodurch die DNA-Synthese inhibiert, somit die Zellteilung blockiert und das Wachstum gestoppt wird (DANENBERG, 1977). Zudem kann eine Metabolisierung zu Fluoro-Uridintriphosphat (F-UTP) zum Einbau in RNA führen, was die Bildung nicht funktioneller Proteine zur Folge hat (HAKALA & RUSTRUM, 1979; DAHER *et al.*, 1990). In der Krebstherapie werden diese Substanzen als Chemotherapeutika eingesetzt.

Die nachfolgenden Abbildungen (Abb. 3.6 bis Abb. 3.8) zeigen die Keimung verschiedener *Pyc1*-Mutanten auf MS-Agar mit und ohne 5-Fluorouracil.

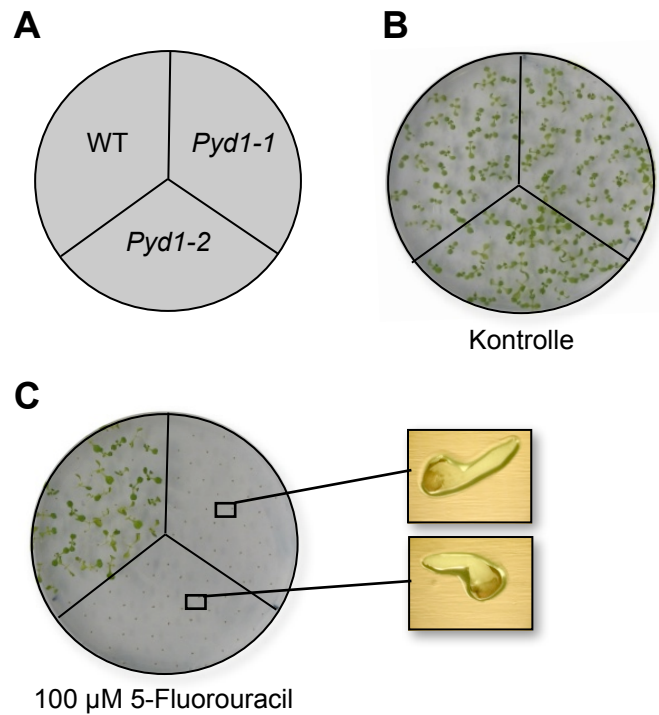


Abb 3.6: Wachstum von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen und *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen auf MS-Agar unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 5-Fluorouracil

Dargestellt sind 10 Tage alte Keimlinge. Die Anzucht erfolgte wie in Kap. 2.2.5 beschrieben.

(A) Schema.

(B) Wachstum auf MS-Agar ohne Zusatz (Kontrollbedingungen).

(C) Wachstum auf MS-Agar mit 100 μM 5-Fluorouracil.

Das Wachstum beider *Pyd1*-„knockout“-Mutanten auf MS-Agar-Platten mit zusätzlich 100 μM 5-Fluorouracil stoppte kurz nach dem Auskeimen (Abb. 3.6 C). Im Gegensatz dazu zeigten die Wildtyp-Keimlinge ein fast normales Wachstum verglichen mit dem Wachstum auf MS-Agar ohne Zusatz (Abb. 3.6 B).

Da Wildtyp-Pflanzen auf MS-Agar-Platten mit 100 μM 5-Fluorouracil noch annähernd wie unter Kontrollbedingungen (MS-Agar ohne Zusatz) wuchsen, wurde das Wachstum der *Pyd1*-Überexpressions-Pflanzen auf MS-Agar-Platten mit höheren 5-Fluorouracil-Konzentrationen getestet (Abb. 3.7).

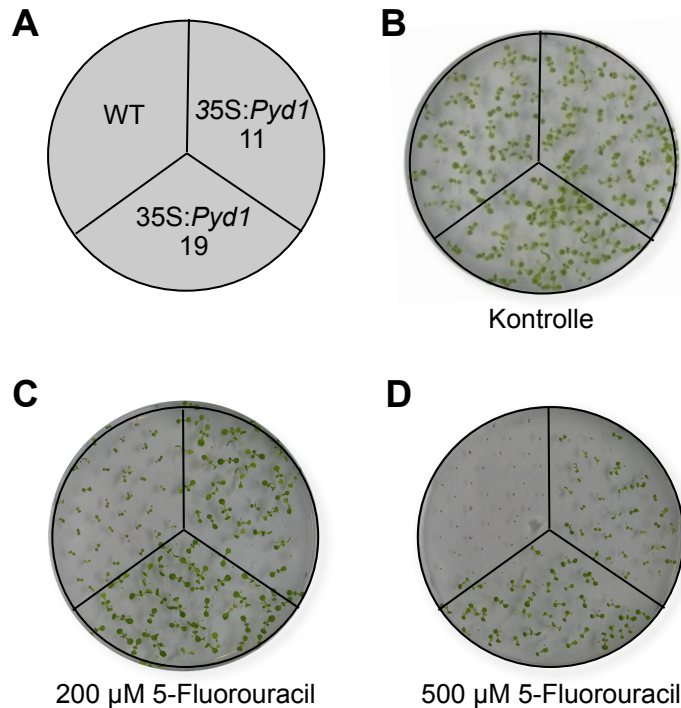


Abb 3.7: Wachstum von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp- und *Pyd1*-Überexpressions-Keimlingen auf MS-Agar unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 5-Fluorouracil

Dargestellt sind 10 Tage alte Keimlinge. Die Anzucht erfolgte wie in Kap. 2.2.5 beschrieben.

(A) Schema.

(B) Wachstum auf MS-Agar ohne Zusatz (Kontrollbedingungen).

(C) Wachstum auf MS-Agar mit 200 µM 5-Fluorouracil.

(D) Wachstum auf MS-Agar mit 500 µM 5-Fluorouracil.

Beim Ausbringen von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen auf MS-Platten mit 5-Fluorouracil-Konzentrationen von 200 µM oder mehr war deren Wachstum im Vergleich zu Kontrollbedingungen sehr stark eingeschränkt (Abb. 3.7 B-D). Im Gegensatz dazu konnten die 35S:*Pyd1*-Keimlinge bei 200 µM 5-Fluorouracil noch ähnlich gut wachsen wie unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.7 C) und auch bei 500 µM 5-Fluorouracil war ihr Wachstum weitaus weniger beeinflusst als bei Wildtyp-Keimlingen. Dabei zeigte die stärkere Überexpressionslinie 19 die höhere Toleranz gegenüber 5-Fluorouracil im Vergleich zur schwächeren Linie 11.

Es wurden zudem Pflanzen generiert, bei denen das in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen plastidäre Enzym *Pyd1* durch Verkürzung des N-Terminus im Zytosol verbleibt. Dies war für ein N-terminal um 21 Aminosäuren verkürztes Protein der Fall, wie entsprechende GFP-Fusions-Studien belegten (Abb. 3.2). Um Pflanzen ohne plastidäre *Pyd1*-Aktivität zu erhalten wurde die *Pyd1*-„knockout“-Linie *Pyd1-1* mit dem

entsprechenden Konstrukt transformiert (Kap. 2.3.3). Mit diesen Pflanzen durchgeführte Wachstumstests auf 5-Fluorouracil sind in Abb. 3.8 dargestellt.

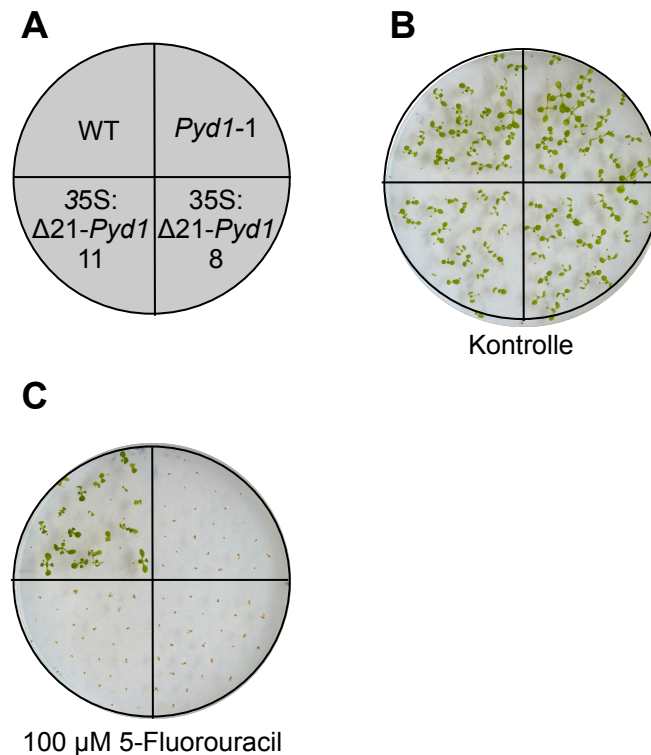


Abb 3.8: Wachstum von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp- und $\Delta 21$ -*Pyd1*-Überexpressions-Keimlingen auf MS-Agar unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 5-Fluorouracil

Dargestellt sind 10 Tage alte Keimlinge. Die Anzucht erfolgte wie in Kap. 2.2.5 beschrieben.

(A) Schema.

(B) Wachstum auf MS-Agar ohne Zusatz (Kontrollbedingungen).

(C) Wachstum auf MS-Agar mit 100 μM 5-Fluorouracil.

Die Keimlinge beider 35S: $\Delta 21$ -*Pyd1*-Linien verhielten sich exakt wie die *Pyd1*-„knockout“-Mutante *Pyd1-1*, dessen Hintergrund sie besitzen. Das verkürzte *Pyd1*-Protein scheint *in vivo* keine Aktivität zu besitzen.

5-Fluorouridin und 5-Fluoroorotat hatten auf alle Mutanten den gleichen, wenn auch etwas schwächer ausgeprägten Effekt (Daten nicht gezeigt).

3.4.2 Degradierung von radioaktiv markierten Pyrimidinen

Zwar konnte die *Pyd1*-Aktivität nicht direkt detektiert werden, es war allerdings möglich mit einem radioaktiven Assay die Aktivität des gesamten Pyrimidin-Degradationsweges zu bestimmen. Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass [¹⁴C]-markiertes Substrat, welches den Pyrimidin-Abbau durchläuft zu [¹⁴C]-CO₂ abgebaut wird. Es wurde die Abbaurate der Pyrimidine Uridin, Uracil und Dihydrouracil zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) bestimmt (Kap. 2.4.3). Hierzu wurden 9 Tage alte, in steriler Flüssigkultur angezogene Keimlinge verwendet.

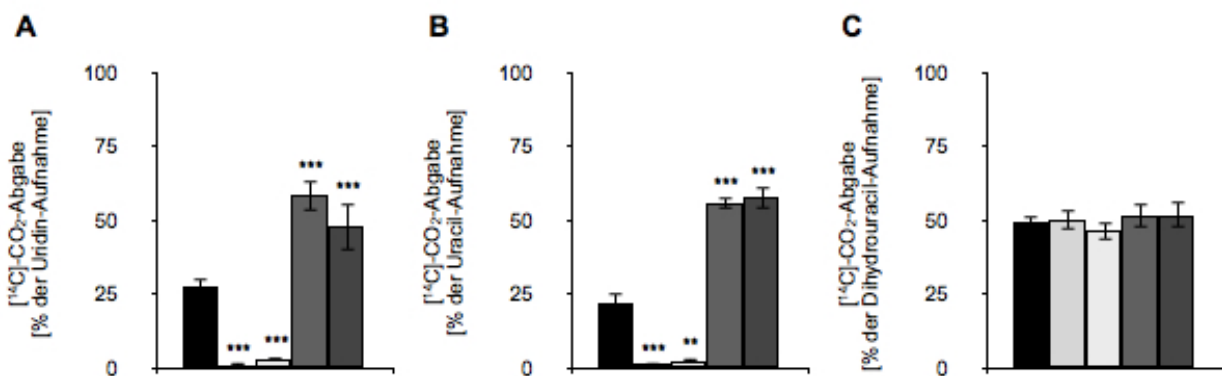


Abb. 3.9: Abbau von [¹⁴C]-Pyrimidinen zu [¹⁴C]-CO₂

Es wurden 10 Tage alte Keimlinge aus steriler Flüssigkultur verwendet (Kap. 2.2.4). Die Inkubation erfolgte in Kontrollmedium (+N) mit 5 μM [¹⁴C]-markiertem

(A) Uridin,

(B) Uracil bzw.

(C) Dihydrouracil (Kap. 2.4.4).

Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SE) aus mehr als 5 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit ** für p<0,01 und *** für p<0,005 jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Beide *Pyd1*-„knockout“-Linien zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Keimlingen eine sehr stark verminderte Abbaurate sowohl von Uridin (Abb. 3.9 A) als auch von Uracil (Abb. 3.9 B), das Produkt der von *Pyd1* katalysierten Reaktion Dihydrouracil wurde aber zu gleichen Anteilen zu [¹⁴C]-CO₂ abgebaut wie in den Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.9 C). So betrug in Wildtyp-Keimlingen unter Kontrollbedingungen die Abbaurate für Uridin 28% (Abb. 3.9 A), für Uracil 22% (Abb. 3.9 B) und für Dihydrouracil 49% (Abb. 3.9 C), jeweils auf die entsprechende Aufnahme bezogen. Die *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen dagegen verstoffwechselten lediglich 1% bzw. 3% Uridin (Abb. 3.9 A) und 1% bzw. 2% Uracil (Abb. 3.9 B), aber 50% bzw. 46% des aufgenommenen Dihydrouracils (Abb. 3.9 C). Die Keimlinge mit gesteigerter *Pyd1*-Expression konnten fast doppelt soviel Uridin (Abb. 3.9. A) und mehr als 2,5-mal soviel des aufgenommenen Uracils (Abb. 3.9 B) zu

[¹⁴C]-CO₂ katabolisieren als die Wildtyp-Keimlinge. Die Dihydrouracil-Abbauraten befand sich auch im Fall der *Pyd1*-Überexpressionspflanzen auf Wildtyp-Niveau (Abb. 3.9 C).

Sowohl die Nucleobase Uracil als auch das Nucleosid Uridin können zum Nucleotid UMP recycelt werden (BOLDT & ZRENNER, 2003; MOFFAT & ASHIHARA, 2002; ZRENNER *et al.*, 2006). Weder für die Reaktion der Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase) noch für die der Uridin-Kinase (UK) konnten Unterschiede in der Aktivität zwischen *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp- und transgenen *Pyd1*-Keimlingen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Neben Uracil existieren noch zwei weitere Pyrimidin-Nucleobasen: Cytosin und Thymin. Da Cytosin in Pflanzen allerdings nicht vorkommt (ZRENNER *et al.*, 2006), wurde nur getestet, ob auch Thymin über den beschriebenen Weg abgebaut wird (Abb. 3.10).

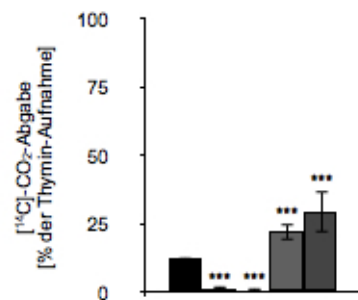


Abb. 3.10: Abbau von [¹⁴C]-Thymin zu [¹⁴C]-CO₂

Es wurden 10 Tage alte Keimlinge aus steriler Flüssigkultur verwendet (Kap. 2.2.4). Die Inkubation erfolgte in Kontrollmedium (+N) mit 5 μM [¹⁴C]-markiertem Thymin (Kap. 2.4.4). Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SE) aus mehr als 5 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für p<0,005 jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Ebenso wie Uracil wird auch das importierte [¹⁴C]-Thymin in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen kaum und in den *Pyd1*-Überexpressionslinien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen stärker zu [¹⁴C]-CO₂ katabolisiert. So betrug der Thymin-Abbau in den Wildtyp-Keimlingen 12%, in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen lag er bei 1% und in den Mutanten mit erhöhter *Pyd1*-Expression bei bis zu 29% in der stärksten Linie (Abb. 3.10).

Die Δ21-*Pyd1*-Mutanten wurden ebenfalls auf ihre Abbau-Aktivität hin untersucht (Abb. 3.11).

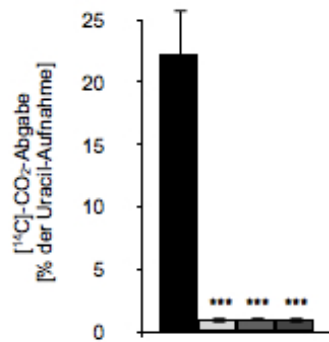


Abb. 3.11: Abbau von [14C]-Uracil zu [14C]-CO₂

Es wurden 10 Tage alte Keimlinge aus steriler Flüssigkultur verwendet (Kap. 2.2.4). Die Inkubation erfolgte in Kontrollmedium (+N) mit 5 μM [14C]-markiertem Uracil (Kap. 2.4.4). Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SE) aus mehr als 5 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für p<0,005 jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* ■ 35S:Δ21-*Pyd1* 11 ■ 35S:Δ21-*Pyd1* 8

Der Uracil-Katabolismus liegt in den Pflanzen der beiden 35S:Δ21-*Pyd1*-Überexpressionslinien mit 1% des aufgenommenen [14C]-Uracils auf demselben Niveau wie in den *Pyd1-1*-Keimlingen (Abb. 3.11). Somit hat das verkürzte *Pyd1*-Protein *in vivo* keine Aktivität.

3.5 Physiologische Untersuchungen transgener *Pyd1*-Pflanzen während der Keimung

Erste Hinweise darauf, dass *Pyd1* in der frühen pflanzlichen Entwicklung besondere Bedeutung zukommt lieferte bereits dessen hohe Expression im trockenen Samen (Abb. 3.1). Aus diesem Grund wurden nähere Analysen die Keimung betreffend durchgeführt.

3.5.1 Untersuchungen zum Keimungszeitpunkt

Zunächst wurden die Keimungszeitpunkte der verschiedenen *Pyd1*-Mutanten bestimmt (Abb. 3.12).

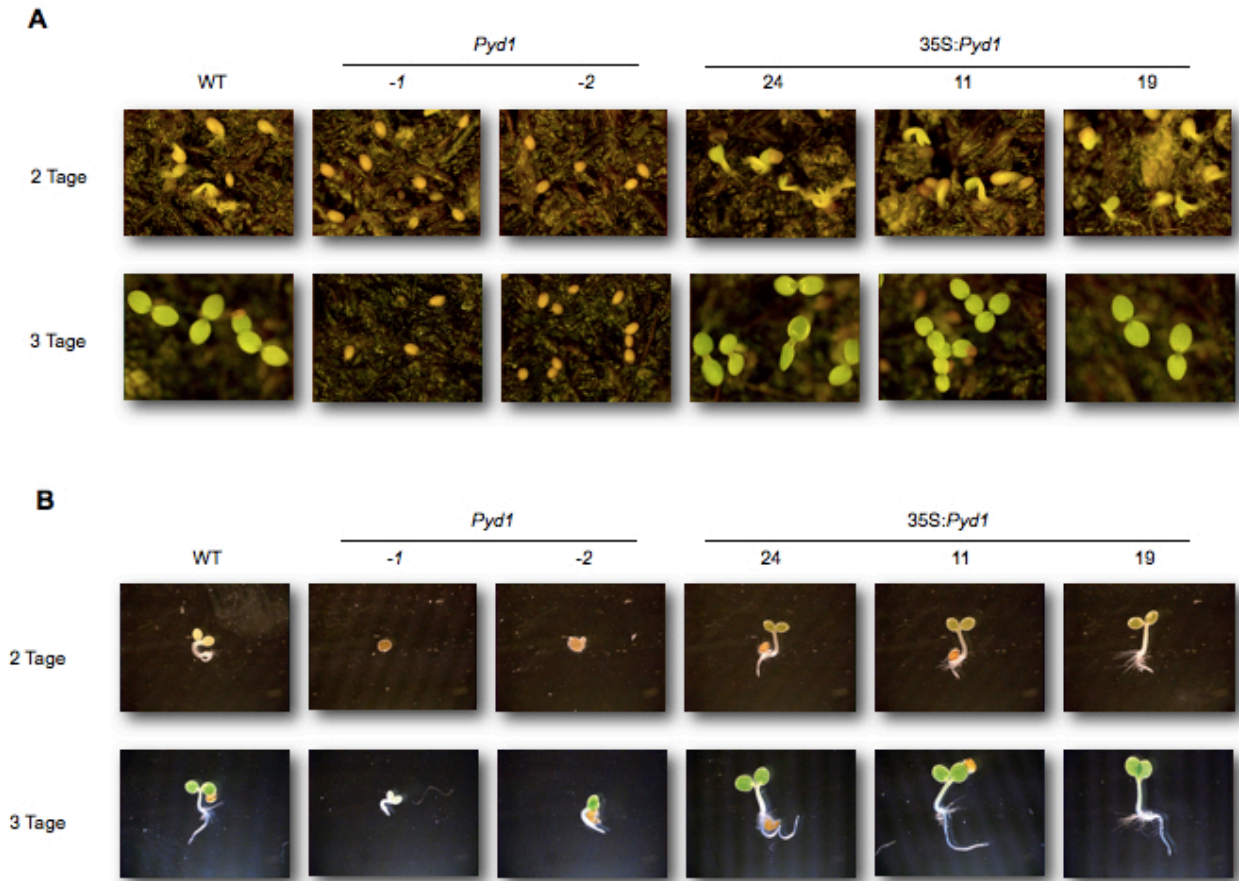


Abb. 3.12: Keimung von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp und verschiedenen *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist die Keimung 2 bzw. 3 Tage nach Beginn des Versuchs (A) auf Erde bzw. (B) auf nassem Papier. Die Samen wurden 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen inkubiert. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt.

Während nach 48 Stunden Keimung auf Erde bei den *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen bereits die Primärwurzel zu erkennen war, konnte bei den beiden *Pyd1*-„knockout“-Mutanten noch keinerlei Keimungsaktivität beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten die Keimlinge der Überexprimierer 11 und 19 neben der Primärwurzel bereits Keimblätter. Die unterschiedliche Keimungsgeschwindigkeit zwischen Wildtyp- und *Pyd1*-„knockout“- Keimlingen wurde nach 72 Stunden noch deutlicher. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Wildtyp- und die 35S:*Pyd1*-Keimlinge grüne Primärblätter entwickelt, während bei den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen noch immer keine Primärwurzel zu detektieren war (Abb. 3.12 A).

Auf feuchtem Papier ausgebracht zeigten die Keimlinge den gleichen Phänotyp. 2 Tage nach der Aussaat hatten sich sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den *Pyd1*-Überexpressions-Keimlingen Primärwurzeln und Kotelydonen entwickelt, bei den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen war im Höchstfall der Ansatz einer Primärwurzel zu erkennen. An Tag

3 war ein deutlicher Größenunterschied zwischen den auf Papier ausgebrachten Samen erkennbar, am kleinsten waren die *Pyd1*-„knockout“-Keimlinge, gefolgt von den Wildtyp-Keimlingen, am größten die *Pyd1*-Überexpressions-Keimlinge (Abb. 3.12 B).

Dieser Keimungsphänotyp war bei allen Anzuchtmethoden zu beobachten, z.B. auch in steriler Flüssigkultur oder auf MS-Agarplatten (Daten nicht gezeigt).

Um die unterschiedliche Keimungsgeschwindigkeit noch deutlicher herauszustellen, wurden zudem die Chlorophyllgehalte in 2 und 3 Tage alten Keimlingen bestimmt (Abb. 3.13).

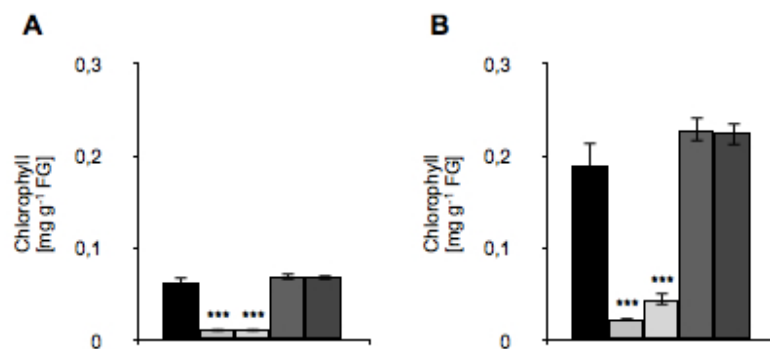


Abb. 3.13: Chlorophyllgehalt von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist der Chlorophyllgehalt

(A) 2 bzw.

(B) 3 Tage nach Beginn des Versuchs.

Die Samen wurden auf nassem Papier ausgesät, 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen inkubiert. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt. Die Keimlinge wurden geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 100 mg zur Chlorophyllextraktion (Kap. 2.6.4) eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SE) aus mehr als 5 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Sowohl 2 Tage alte Wildtyp-Keimlinge als auch 35S:*Pyd1*-Keimlinge zeigten die ersten Ansätze von Keimblättern (Abb. 3.12), weshalb in allen 3 Fällen Chlorophyll detektiert werden konnte. 2 Tage alte Wildtyp-Keimlinge enthielten 0,063 mg g⁻¹FG, die Überexpressionspflanzen 0,069 mg g⁻¹FG bzw. 0,068 mg g⁻¹FG. In den nach 2 Tagen zwar gequollenen, aber noch nicht gekeimten *Pyd1*-„knockout“-Samen war mit jeweils 0,012 mg g⁻¹FG kaum Chlorophyll nachweisbar (Abb. 3.13 A). Erst nach 3 Tagen konnte in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen Chlorophyll nachgewiesen werden, die Gehalte lagen mit 0,023 mg g⁻¹FG bzw. 0,044 mg g⁻¹FG allerdings noch deutlich unter dem Chlorophyllgehalt von 2 Tage alten Wildtyp-Keimlingen. Die Wildtyp-Pflanzen steigerten ihren Chlorophyll-

gehalt nach 3 Tagen Keimung weiter auf 0,190 mg g⁻¹FG, die 35S:*Pyd1*-Keimlinge sogar auf 0,228 mg g⁻¹FG und 0,225 mg g⁻¹FG (Abb. 3.13 B).

3.5.2 Untersuchungen zur weiteren pflanzlichen Entwicklung

Um zu überprüfen, ob die aufgezeigten Effekte bezüglich der Keimungsgeschwindigkeit auch Auswirkungen auf die spätere Entwicklung der Pflanzen hatten, wurden die entsprechenden Genotypen während ihres weiteren Wachstums beobachtet. In Abb. 3.14 sind die Rosetten 4 Wochen alter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gezeigt.

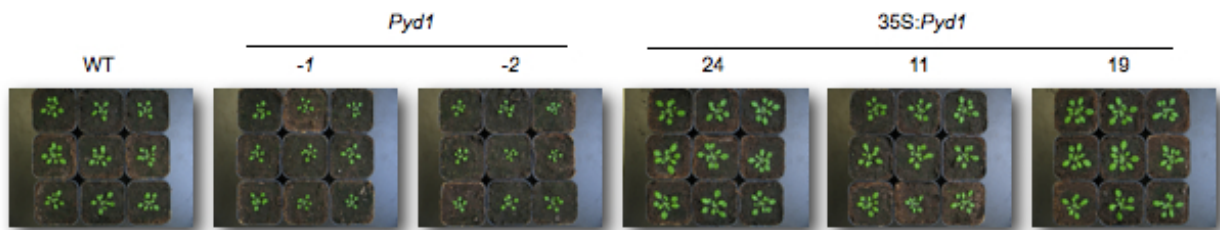


Abb. 3.14: 4 Wochen alte Rosetten von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp und verschiedenen *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt sind die Rosetten 4 Wochen nach Aussaat. Die Samen wurden 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen im Kurztag angezogen. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt.

Bei Betrachtung der Rosetten 4 Wochen alter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen fiel auf, dass die der *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen im Durchmesser deutlich kleiner ausfielen als Wildtyp-Rosetten, die der Überexpressionsmutanten dagegen wiesen die größte Blattoberfläche auf (Abb. 3.14).

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die unterschiedliche Keimungsfähigkeit der verschiedenen *Pyd1*-Mutanten auch Auswirkungen auf die Reproduktion der Pflanzen hat. In diesem Zusammenhang wurden Blühinduktion (Abb. 3.15) und Samenbildung (Abb. 3.16) genauer untersucht.



Abb. 3.15: Blühinduktion in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp und verschiedenen *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt sind Pflanzen 6 Wochen nach Aussaat. Die Samen wurden 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen zunächst 4 Wochen unter Kurztag-Bedingungen, danach weitere 6 Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt.

Die *Pyd1*-Überexpressionspflanzen entwickelten zuerst einen Spross, gefolgt vom *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp, zuletzt bildeten die *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen die Infloreszenz aus (Abb. 3.15).

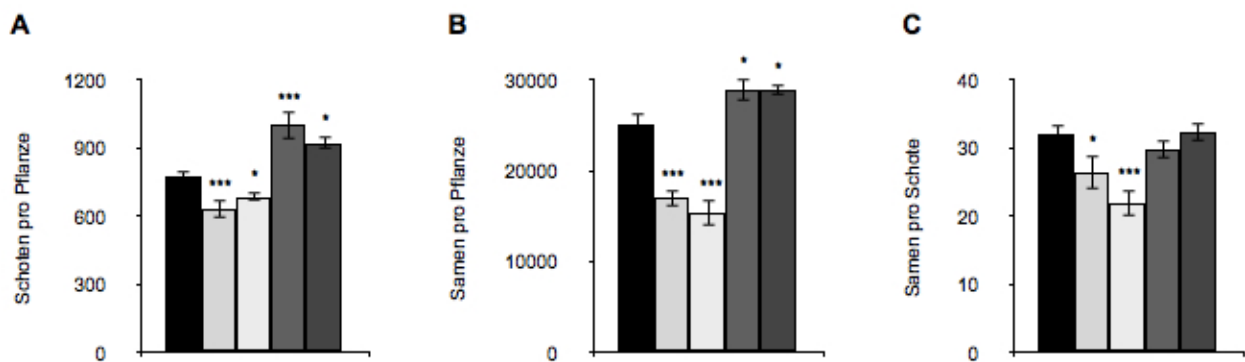


Abb. 3.16: Anzahl von Schoten und Samen in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt sind die Anzahl der
 (A) Schoten pro Pflanze,
 (B) Samen pro Pflanze bzw.
 (C) Samen pro Schote.

Die Samen wurden 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen zunächst 4 Wochen unter Kurztag-Bedingungen, danach weitere 6 Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SE) aus mehr als 10 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für p<0,05 und *** für p<0,005 jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Arabidopsis thaliana-Wildtyp-Pflanzen besaßen ca. 780 Schoten (Abb. 3.16 A) und 25100 Samen (Abb. 3.16 B), somit enthielt jede Schote im Durchschnitt 32 Samen (Abb. 3.16 C). Die beiden *Pyd1*-„knockout“-Pflanzenlinien besaßen nicht nur weniger Schoten und Samen pro Pflanze (Abb. 3.16 A-B), ihre Schoten waren mit 26 bzw. 22 Samen pro Schote durchschnittlich auch deutlich kleiner als die Schoten von Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.16 C). Die beiden Linien der 35S:*Pyd1*-Pflanzen bildeten zwar mehr Schoten und damit auch

mehr Samen aus (Abb. 3.16 A-B), die Größe der Schoten war allerdings mit der Größe der Wildtyp-Schoten vergleichbar (Abb. 3.16 C).

3.5.3 Analyse der Samenzusammensetzung

Eine Möglichkeit die unterschiedlichen Keimungszeitpunkte der verschiedenen *Pyd1*-Mutanten zu erklären könnten unterschiedliche Ausgangsbedingungen innerhalb der Samen sein. Um dies zu testen wurden die Gehalte an Gesamt-Stickstoff und -Kohlenstoff (Tab. 3.1) sowie Protein- und Lipidgehalte (Tab. 3.2) in trockenen Samen bestimmt.

Tab. 3.1: Gesamt-Stickstoff- und -Kohlenstoffgehalte von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Samen und Samen verschiedener *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist der Gesamt-Stickstoff und Gesamt-Kohlenstoffgehalt sowie deren Verhältnis in trockenen Samen. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt. Die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte erfolgte wie in Kap. 2.6.5 beschrieben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SE) aus mehr als 3 biologischen Replikaten.

	Gesamt-Stickstoff (N) [% TG]	Gesamt-Kohlenstoff (C) [% TG]	C/N
WT	4,42 $\pm 0,16$	50,58 $\pm 0,49$	11,80 $\pm 0,59$
<i>Pyd1-1</i>	4,46 $\pm 0,14$	51,35 $\pm 0,53$	11,79 $\pm 0,49$
<i>Pyd1-2</i>	4,69 $\pm 0,13$	49,87 $\pm 0,34$	10,80 $\pm 0,33$
35S: <i>Pyd1 24</i>	4,58 $\pm 0,04$	50,40 $\pm 0,23$	10,67 $\pm 0,13$
35S: <i>Pyd1 11</i>	4,69 $\pm 0,05$	49,97 $\pm 0,11$	10,67 $\pm 0,13$
35S: <i>Pyd1 19</i>	4,74 $\pm 0,08$	50,32 $\pm 0,29$	10,65 $\pm 0,25$

Alle getesteten Samen enthielten rund 4,5% Stickstoff und 50% Kohlenstoff (Tab. 3.1).

Tab. 3.2: Gesamt-Protein- und -Lipidgehalte von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Samen und Samen verschiedener *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist der Gesamt-Protein und Gesamt-Lipidgehalt in trockenen Samen. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt. Die Bestimmung des Lipid- und Proteingehaltes erfolgte wie in Kap. 2.6.6 bzw. Kap. 2.6.7 beschrieben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SE) aus mehr als 3 biologischen Replikaten.

	Lipidgehalt [mg g ⁻¹ FG]	Proteingehalt [mg g ⁻¹ FG]
WT	211,71 \pm 15,71	269,21 \pm 19,93
<i>Pyd1-1</i>	209,29 \pm 12,85	269,21 \pm 11,69
<i>Pyd1-2</i>	216,57 \pm 8,94	287,29 \pm 14,49
35S: <i>Pyd1 11</i>	219,00 \pm 2,49	289,12 \pm 11,75
35S: <i>Pyd1 19</i>	224,33 \pm 16,04	306,65 \pm 11,09

Auch die Protein- und Lipidgehalte der Samen der verschiedenen Genotypen waren vergleichbar. So enthielten alle getesteten Samen 209 bis 224 mg g⁻¹FG Lipid und 269 bis 307 mg g⁻¹FG Protein (Tab. 3.2).

3.5.4 Analyse des Uracilgehalts

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen in ihrer Fähigkeit [¹⁴C]-Uracil abzubauen sehr stark eingeschränkt sind (Kap. 3.4.2). Deshalb stellte sich die Frage, ob Uracil als Edukt der *Pyd1*-Reaktion in diesen Pflanzen vermehrt vorliegt (Abb. 3.17).

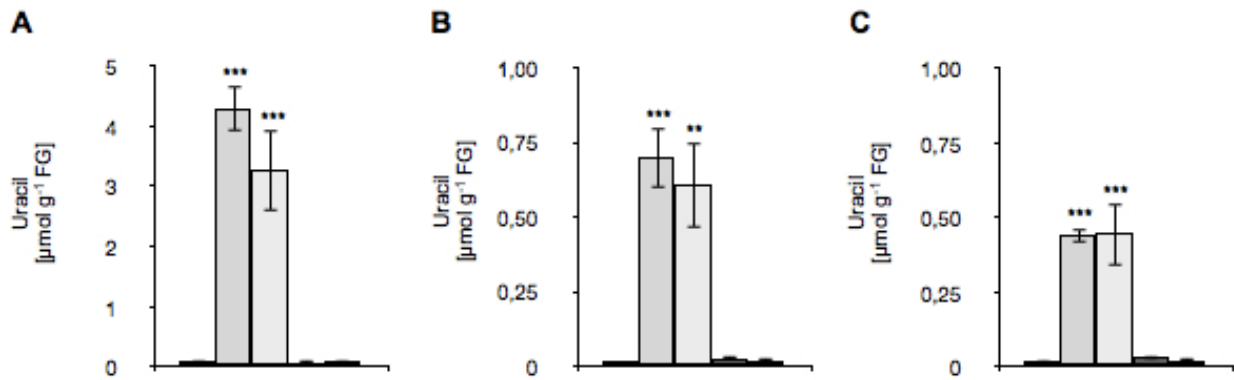


Abb. 3.17: Uracilgehalt von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist der Uracilgehalt (A) im trockenen Samen sowie (B) 2 bzw. (C) 3 Tage nach Beginn des Versuchs.

Die Samen wurden auf nassem Papier ausgesät, 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen inkubiert. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt. Die Keimlinge wurden geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 100 mg zur Quantifizierung von Uracil (Kap. 2.6.1) eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SE) aus mehr als 5 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Tatsächlich kam es zu einem drastischen Anstau von Uracil in den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen. Wildtyp-Samen beinhalteten $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ FG Uracil, die Uracilgehalte der *Pyd1*-Überexpressionslinien 11 und 19 lagen etwa im gleichen Bereich. Dagegen wiesen die Samen beider *Pyd1*-„knockout“-Linien mit $4,30 \mu\text{g g}^{-1}$ FG und $3,26 \mu\text{g g}^{-1}$ FG bis zu 50-fach gesteigerte Uracilgehalte auf (Abb. 3.17 A).

Trockene, reife Samen sind ruhende Organe mit einer sehr geringen metabolischen Aktivität und einem Wassergehalt von lediglich 5-15% (BRADFORD, 1990; GALLARDO *et al.*, 2001). Geht man von einem Wassergehalt von 10% im trockenen Samen aus, so beinhalteten *Pyd1*-„knockout“-Samen fast $400 \mu\text{M}$ Uracil, im Vergleich zu etwa $7 \mu\text{M}$ Uracil in trockenen *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Samen. Quantifiziert man allerdings den Anteil des Stickstoffs, welcher in Uracil gebunden ist im Vergleich zum Gesamtstickstoff (Tab. 3.1), so sind dies in den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen lediglich 0,3%, in Wildtyp-Samen sogar nur 0,0008%.

Auch nachdem die Samen 2 und 3 Tagen quellen und keimen konnten waren die Uracilgehalte der *Pyd1*-„knockout“-Samen noch 25-mal höher als in Wildtyp- und 35S:*Pyd1*-Pflanzen. 2 und 3 Tage gekeimte Wildtyp- und *Pyd1*-Überexpressions-Pflanzen

beinhalteten etwa 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}\text{FG}$ Uracil, die Uracilgehalte in den beiden *Pyd1*-„knockout“-Linien lagen nach 2 Tagen zwischen 0,60 $\mu\text{g g}^{-1}\text{FG}$ und 0,70 $\mu\text{g g}^{-1}\text{FG}$ und nach 3 Tagen noch bei 0,45 $\mu\text{g g}^{-1}\text{FG}$ (Abb. 3.17 B, C).

Um zu überprüfen, ob hohe Uracilgehalte zu einer Verzögerung der Keimung führen, wurden *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen auf Agar mit bis zu 10 mM Uracil kultiviert. In keinem Fall konnten Unterschiede im Vergleich zur Anzucht ohne Uracil festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Da die Uracilgehalte in den *Pyd1*-„knockout“-Samen derart drastisch erhöht waren, wurden zudem die Uracilgehalte in seneszenten Blättern, in Stängeln und Schoten bestimmt (Abb. 3.18). Die aus diesen Geweben mobilisierten Stoffe dienen der Beladung der Samen (HIMELBLAU & AMASINO, 2001).

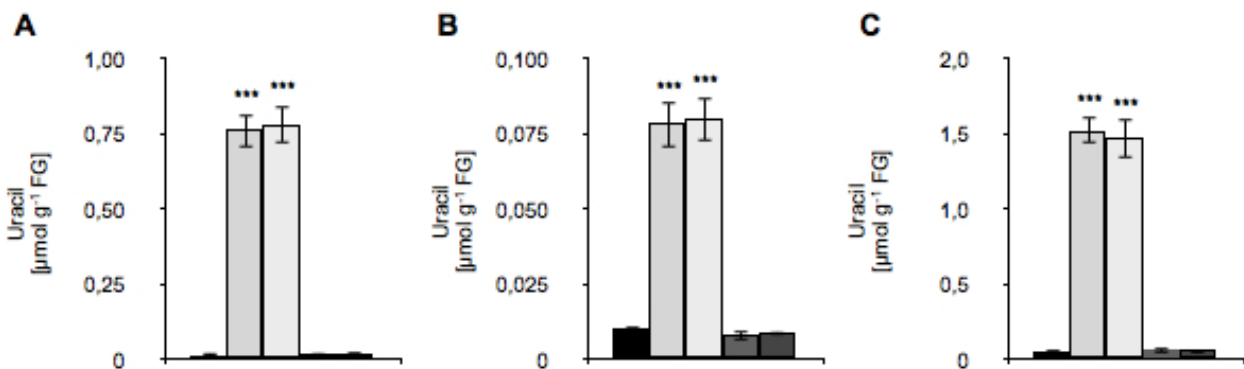


Abb. 3.18: Uracilgehalt von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen verschiedener *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist der Uracilgehalt

(A) in seneszenten Blättern,

(B) im Stängel sowie

(C) in Schoten 10 Wochen alter Pflanzen.

Das Pflanzenmaterial wurde geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 100 mg zur Quantifizierung von Uracil (Kap. 2.6.1) eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ($\pm\text{SE}$) aus mehr als 5 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

In allen untersuchten, an der Samenbeladung beteiligten Geweben konnten erneut drastisch erhöhte Uracilgehalte in den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden (Abb. 3.18).

3.5.5 Quantifizierung von Zuckern

Es existieren eine Vielzahl von Untersuchungen, die belegen, dass erhöhte Monosaccharid-Konzentrationen, insbesondere Glukose, sowohl die Keimung als auch die frühe Keimlingsentwicklung verzögern (DEKKERS *et al.*, 2004; GIBSON, 2005; PRICE *et al.*, 2003; PRICE *et al.*, 2004). Dabei stellt vor allem Glukose ein Zeichen für die Pflanze dar, dass die äußeren Faktoren für eine Keimung nicht optimal sind, wobei dies kein osmotischer Effekt ist.

Um zu prüfen, ob als Ursache für die verzögerte Keimung der *Pyd1*-„knockout“-Samen erhöhte Monosaccharid-Gehalte in Frage kommen, wurden die Zucker-Gehalte der verschiedenen Genotypen im Verlauf der Keimung bestimmt (Abb. 3.19).

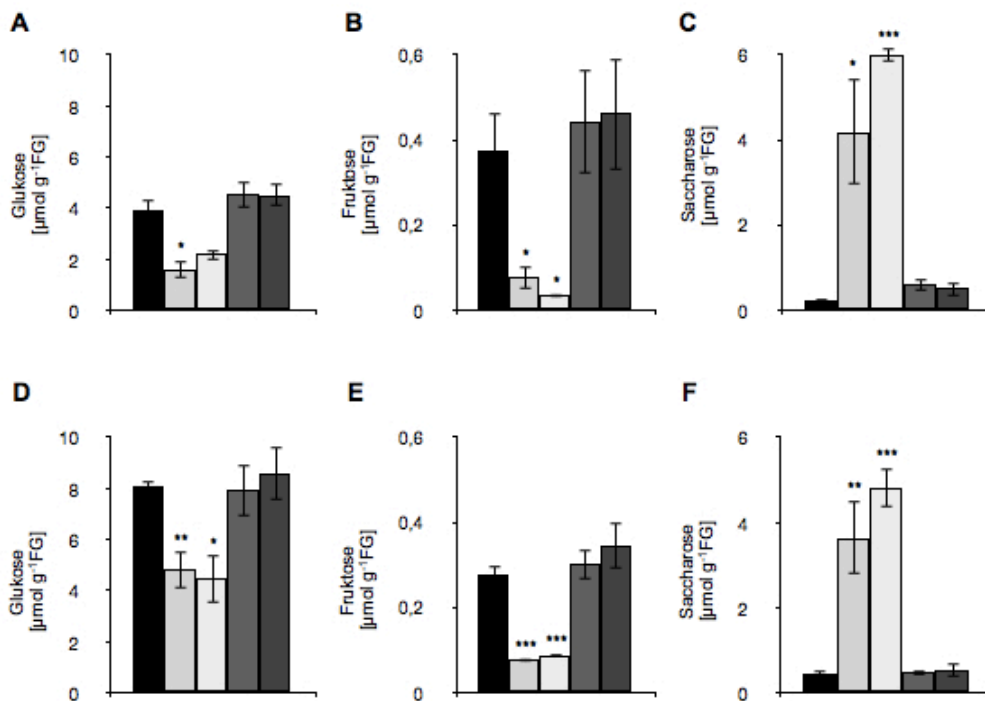


Abb. 3.19: Zucker- und Stärkegehalte von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt sind die Zucker- bzw. der Stärkegehalt in (A)-(D) 2 Tage bzw. (E)-(H) 3 Tage alten Keimlingen.

Die Samen wurden auf nassem Papier ausgesät, 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen inkubiert. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt. Die Keimlinge wurden geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 100 mg zur Extraktion der Zucker (Kap. 2.6.2) und Quantifizierung der Stärke (Kap. 2.6.3) eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SE) aus mehr als 5 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für p<0,05, ** für p<0,01 und *** für p<0,005 jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ *35S:Pyd1 11* ■ *35S:Pyd1 19*

Bei den Zuckergehalten konnten deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen gemessen werden. 2 Tage alte *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlinge besaßen 3,9 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ Glukose (Abb. 3.19 A) und 0,36 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ Fruktose (Abb. 3.19 B). Während sich die Zuckergehalte der *Pyd1*-Überexpressionspflanzen in etwa im gleichen Bereich befanden, waren in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen mit 1,6 bis 2,2 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ Glukose und 0,04 bis 0,08 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ Fruktose deutlich geringere Monosaccharidgehalte detektierbar (Abb. 3.19 A, B). Analysen des Disaccharids Saccharose, welches aus einem Molekül Glukose und einem Molekül Fruktose besteht, zeigten ein entgegengesetztes Bild. Beide *Pyd1*-„knockout“-Linien wiesen mit 4,2 bis 6,0 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ Saccharose im Vergleich zum Wildtyp (0,2 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$) deutlich erhöhte Saccharosegehalte auf (Abb. 3.19 C).

Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei Messung der Zucker in 3 Tage alten Keimlingen, lediglich der Gehalt der Glukose war in allen Genotypen höher als in den 2 Tage alten Keimlingen (Abb. 3.19 E-G).

Aufgrund der in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Saccharosegehalte und verminderten Monosacchidgehalte Glukose und Fruktose, sollte untersucht werden, ob die enzymatische Spaltung von Saccharose in Glukose und Fruktose betroffen ist. Diese irreversible Reaktion wird von Invertasen katalysiert. Isoformen in der Zellwand und der Vakuole (saure Invertasen) unterscheiden sich in ihrer Struktur von denen im Zytosol, in Mitochondrien und Plastiden (neutrale/alkaline Invertasen) (BARRATT *et al.*, 2009; LEE & STURM, 1996). Der Verlust von zwei der 9 zytosolischen Isoformen in *Arabidopsis thaliana* resultiert in drastisch reduzierten Wachstumsraten vor allem während der Keimlingsentwicklung (BARRATT *et al.*, 2009). In Abb. 3.20 ist die Aktivität neutraler Invertasen in Wildtyp-Keimlingen und den Keimlingen der verschiedenen *Pyd1*-Mutanten 2 und 3 Tage nach Aussaat dargestellt.

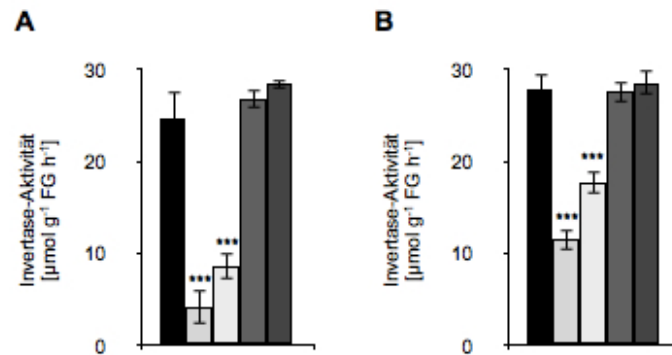


Abb. 3.20: Invertase-Aktivität von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist die Invertase-Aktivität in
 (A) 2 Tage bzw.
 (B) 3 Tage alten Keimlingen.

Die Samen wurden auf nassem Papier ausgesät, 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen inkubiert. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt. Die Messung der Invertase-Aktivität erfolgte wie in Kap. 2.4.5 beschrieben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SE) aus 3 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für p<0,005 jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1 11* ■ 35S:*Pyd1 19*

Wildtyp-Keimlinge setzten nach 2 Tagen 24 µmol Saccharose g⁻¹FG h⁻¹ in Glukose und Fruktose um (Abb. 3.20 A). Diese Umsatzrate war an Tag 3 mit 28 µmol g⁻¹FG h⁻¹ kaum gesteigert (Abb. 3.20 B). Die Invertase-Aktivität der *Pyd1*-Überexpressions-Keimlinge lag sowohl 2 als auch 3 Tage nach der Aussaat in etwa im gleichen Bereich (Abb. 3.20 A-B). Dagegen war in den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen die Invertase-Aktivität an Tag 2 auf etwa ein Viertel und an Tag 3 noch auf etwa die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 3.20 A-B). In 4 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen waren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen *Pyd1*-Mutanten und den Wildtyp-Pflanzen in der Aktivität neutraler Invertasen zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

Die erhöhten Saccharose- bzw. verminderten Monosaccharidgehalte in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.19) ist somit auf eine zu dem jeweiligen Zeitpunkt verminderte Invertase-Aktivität zurückzuführen.

3.5.6 Der Einbau von Acetat in Fettsäuren

In Pflanzen kann β-Alanin, das Endprodukt des Pyrimidin-Abbauweges weiter zu Pantothen (Vitamin B₅) verstoffwechselt werden, einer essentiellen Vorstufe der Coenzym A (CoA)-Synthese (COXON *et al.*, 2005). CoA wiederum ist ein wichtiger Faktor bei der Fettsäure-Synthese. Die Fettsäure-Synthese wurde untersucht, indem der Einbau von extern angebotenenem [¹⁴C]-Acetat in Fettsäuren quantifiziert wurde (Abb. 3.21).

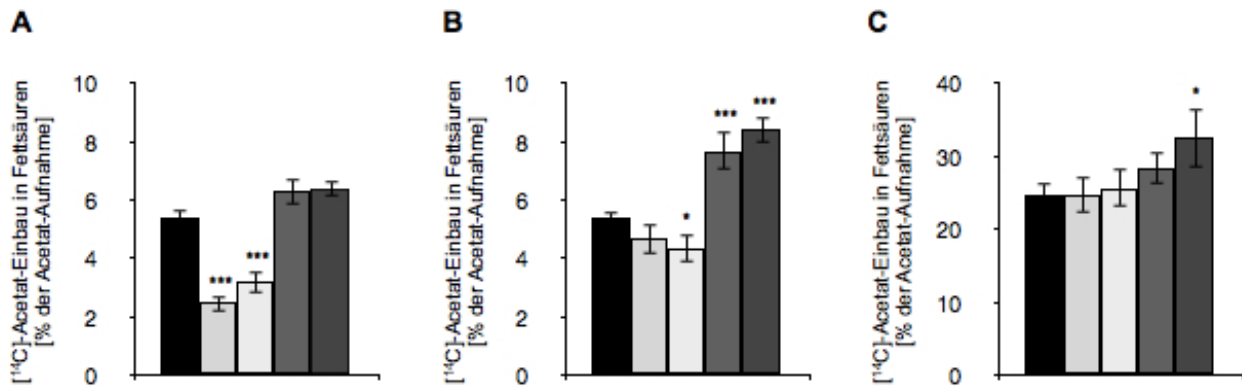


Abb. 3.21: Einbau von $[^{14}\text{C}]$ -Acetat in Fettsäuren in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen verschiedener *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist der Einbau von $[^{14}\text{C}]$ -Acetat in Fettsäuren in

(A) 2 Tage,

(B) 3 Tage bzw.

(C) Blattscheibchen 6 Wochen alter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen.

Die Messung der Acetat-abhängigen Fettsäuresynthese erfolgte wie in Kap. 2.4.6 beschrieben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (\pm SE) aus 3 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Die 2 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlinge bauten 5,4% des aufgenommenen $[^{14}\text{C}]$ -Acetats in Fettsäuren ein. Während die 35S:*Pyd1*-Keimlinge mit 6,4% eine etwas erhöhte Verstoffwechslung von Acetat zu Fettsäuren zeigten, war der Acetat-Einbau in die Fettsäuren in den *Pyd1*-T-DNA-Insertionslinien auf etwa die Hälfte im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen reduziert (Abb. 3.21 A).

Diese Reduktion war in 3 Tage alten Keimlingen weniger deutlich. Während Wildtyp-Keimlinge in diesem Fall immer noch 5,4% des importierten $[^{14}\text{C}]$ -Acetats in Fettsäuren einbauten, zeigten auch beide *Pyd1*-„knockout“-Linien mit 4,7% bzw. 4,3% einen im Vergleich zu den 2 Tage alten Keimlingen einen gesteigerten Acetat-Einbau. Dieser war im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen allerdings noch immer vermindert. In den *Pyd1*-Überexpressionspflanzen dagegen konnte mit 7,7% bzw. 8,4% $[^{14}\text{C}]$ -Acetat-Einbau in Fettsäuren eine deutliche Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abb. 3.21 B).

Betrachtete man den $[^{14}\text{C}]$ -Acetat-Einbau in Fettsäuren in Blattscheibchen von 6 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen so lag der Einbau in Wildtyp- und *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen bei etwa 25%. In den Blattscheibchen der 35S:*Pyd1*-Pflanzen war der Acetat-Einbau in die Fettsäuren mit 29,9% bzw. 32,5% leicht gesteigert (Abb. 3.21 C).

3.5.7 Untersuchungen zum Einfluss des Phytohormons Abscisinsäure

Ein Schlüsselregulator während der Keimung ist das endogene Phytohormon Abscisinsäure (ABA). Daten des eFP-Browsers (WINTER *et al.*, 2007) deuteten auf einen Einfluss von ABA auf die *Pyd1*-Expression hin. Um dies zu überprüfen wurden 9 Tage alte *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlinge mit verschiedenen ABA-Konzentrationen (1-10 μM) behandelt. Anschließend wurde der Transkriptgehalt von *Pyd1* mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 3.22).

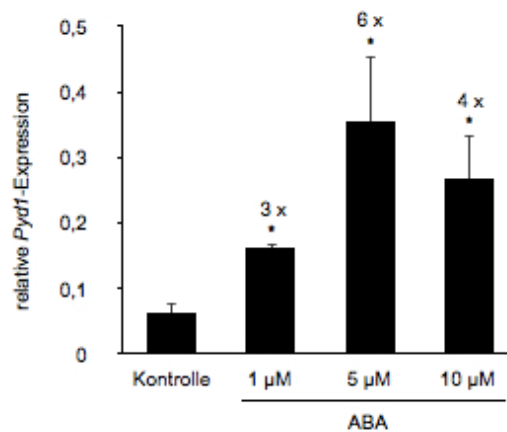


Abb. 3.22: Untersuchung der *Pyd1*-Expression in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen nach ABA-Applikation

Dargestellt ist eine qRT-PCR-Analyse des *Pyd1*-Transkriptgehalts. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1 α* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in steriler Flüssigkultur wie in Kap. 2.2.4 beschrieben. Am Tag 9 erfolgte eine 180-minütige Applikation von ABA. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ($\pm\text{SE}$). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,05$ jeweils im Vergleich zur Kontrolle angegeben.

Bei der in Abb. 3.22 dargestellten qRT-PCR konnte eine Induktion der *Pyd1*-Expression in Abhängigkeit einer ABA-Applikation festgestellt werden. Nach 3-stündiger ABA-Gabe konnte gegenüber der Kontrolle eine Transkriptsteigerung um Faktor 3, 4 bzw. 6, je nach Höhe der ABA-Konzentration festgestellt werden (Abb. 3.22).

In 2 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen der verschiedenen *Pyd1*-Genotypen wurde die Expression verschiedener Gene untersucht, die mit ABA in Zusammenhang stehen (Abb. 3.23).

ABI1 (*ABA insensitive 1*) kodiert für eine Serin/Threonin-Phosphatase und wird als Regulator des ABA-Signalweges während der Keimung beschrieben. Entsprechende *Arabidopsis thaliana*-„knockout“-Mutanten zeigen eine im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen reduzierte ABA-Antwort (GOSTI *et al.*, 1999; MERLOT *et al.*, 2001). In Anwesenheit von

50 μ M ABA ist die *ABI1*-Expression mehr als 15-fach erhöht (HOTH *et al.*, 2002; eigene, unveröffentlichte Ergebnisse).

Ein bedeutender Anteil der physiologischen Antwort auf das Phytohormon ABA wird durch Genexpression vermittelt. So ist eine der ABA-vermittelten Antworten die gesteigerte Expression einer Vielzahl von Genen, den sogenannten ABREs (ABA-responsive elements). Analysen der Chromatin-Struktur dieser Genen deuteten bereits auf die Bedeutung von Koaktivatoren oder Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren hin (BUSK & PAGES, 1998). Eine solche Familie von an ABREs bindende Transkriptionsfaktoren stellen die ABFs (ABRE binding factors) dar. Die *ABF*-Expression wird durch ABA und diverse Stress-Behandlungen induziert (CHOI *et al.*, 2000; eigene, unveröffentlichte Ergebnisse). Ein Mitglied dieser Familie ist das Gen *ABF4*.

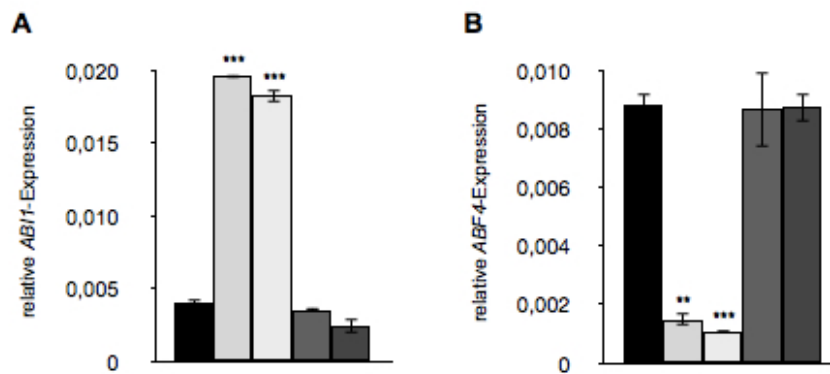


Abb. 3.23: Untersuchung der Expression von ABA-related genes in 2 Tage alten Keimlingen von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp und verschiedenen *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist eine qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.4.3) des
(A) *ABI1*-Transkriptgehalts bzw.
(B) *ABF4*-Transkriptgehaltes.

Die Samen wurden auf nassem Papier ausgesät, 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen inkubiert. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1 α* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Während die *ABI1*-Expression in 2 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen bei 0,004 lag, war diese in den beiden *Pyd1*-„knockout“-Mutanten mit 0,020 bzw. 0,018 auf fast das 5-fache erhöht und mit 0,003 bzw. 0,002 in den 35S:*Pyd1*-Keimlingen geringfügig vermindert (Abb. 3.23 A).

Der *ABF4*-Transkriptgehalt dagegen war in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen auf ca. 15% im Vergleich zu Wildtyp- und 35S:*Pyd1*-Pflanzen, deren Transkriptgehalt etwa im gleichen Bereich lag, reduziert (Abb. 3.23 B).

3.6 Physiologische Untersuchungen transgener *Pyd1*-Pflanzen in seneszentem Gewebe

Pflanzen durchlaufen am Ende ihrer Entwicklung eine programmierte Alterung. Dieser genetisch gesteuerte und energieabhängige Prozess wird als Seneszenz bezeichnet und kann sowohl die gesamte Pflanze betreffen, als auch einzelne Organe oder sogar Zellen. Dabei werden die Nährstoffe aus seneszenten Geweben in nicht-seneszente Gewebe transportiert. In der krautigen Pflanze *Arabidopsis thaliana* werden die Nährstoffe aus den Blättern über die Sprossachse in die reproduktiven Organe wie Blüten und Schoten transportiert, um dort zur Ausstattung der neu gebildeten Samen beitragen zu können (HILL, 1980; MAUK & NOODEN, 1992; HOCKING, 1994; NIEMINEN & HELMISAARI, 1996; HIMELBLAU & AMASINO, 2001). Das von Pflanzen am häufigsten benötigte mineralische Nährelement ist Stickstoff (HIMELBLAU & AMASINO, 2001; MARSCHNER *et al.*, 1995). Eine Pflanze kann sich daher nicht erlauben, Stickstoff in absterbenden Geweben zurückzulassen. Daher war es interessant zu analysieren, ob es während der Blattseneszenz auch zur erhöhten Freisetzung des in Pyrimidinen gebundenen Stickstoffs kommt.

3.6.1 Untersuchungen zum *Pyd1*-Transkriptgehalt in seneszentem Gewebe

Eine Genom-weite Genexpressionsanalyse lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass *Pyd1* in den Prozess der Stickstoff-Mobilisierung eingebunden ist (VAN DER GRAAFF *et al.*, 2006). Mittels qRT-PCR wurde überprüft, ob in seneszenten Blättern *Pyd1*-Transkript akkumuliert (Abb. 3.24).

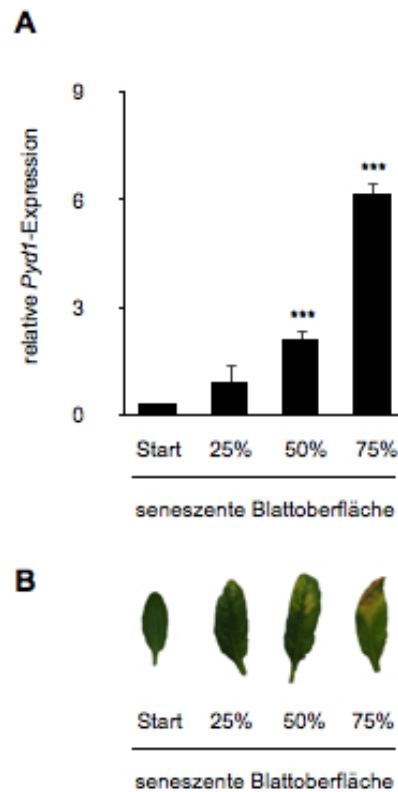


Abb. 3.24: Untersuchung der *Pvd1*-Expression in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen unter natürlichen Seneszenzbedingungen

(A) Dargestellt ist eine qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.4.3) des *Pvd1*-Transkriptgehalts in natürlich seneszierten Blättern. Als Ausgangspunkt dienten Blätter von 6 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1α* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Start-Probe angegeben.

(B) Dargestellt sind Rosetten-Blätter von *Arabidopsis thaliana*, welche die entsprechenden Seneszenzstadien verdeutlichen.

Die Transkriptanalyse zeigte, dass mit zunehmender seneszenten Blattoberfläche *Pvd1* verstärkt exprimiert wird (Abb. 3.24 A). Zur besseren Veranschaulichung der verschiedenen Seneszenz-Stadien sind die verwendeten Blätter von *Arabidopsis thaliana* abgebildet (Abb. 3.24 B). Während bei Blättern mit etwa 25% seneszenten Blattoberfläche *Pvd1* bereits dreimal so stark exprimiert wird als in den 6 Wochen alten Blättern, so war die *Pvd1*-Expression in Blättern mit 50% seneszenten Blattfläche bereits um Faktor 6 erhöht und in Blättern mit 75% seneszenten Fläche sogar um Faktor 18.

Da natürliche Seneszenz schwer reproduzierbar ist und lange Generationszeiten abzuwarten sind, sollte untersucht werden, ob die Expression von *Pvd1* auch durch künstlich induzierte Seneszenz gesteigert werden kann (Abb. 3.25). Dazu wurden einzelne Blätter entweder an der Pflanze abgedunkelt (Abb. 3.25 A-C) oder von der Pflanze entfernt und im Dunkeln in Wasser inkubiert (Abb. 3.25 D-F) (VAN DER GRAAFF *et al.*, 2006; WEAVER & AMASINO, 2001).

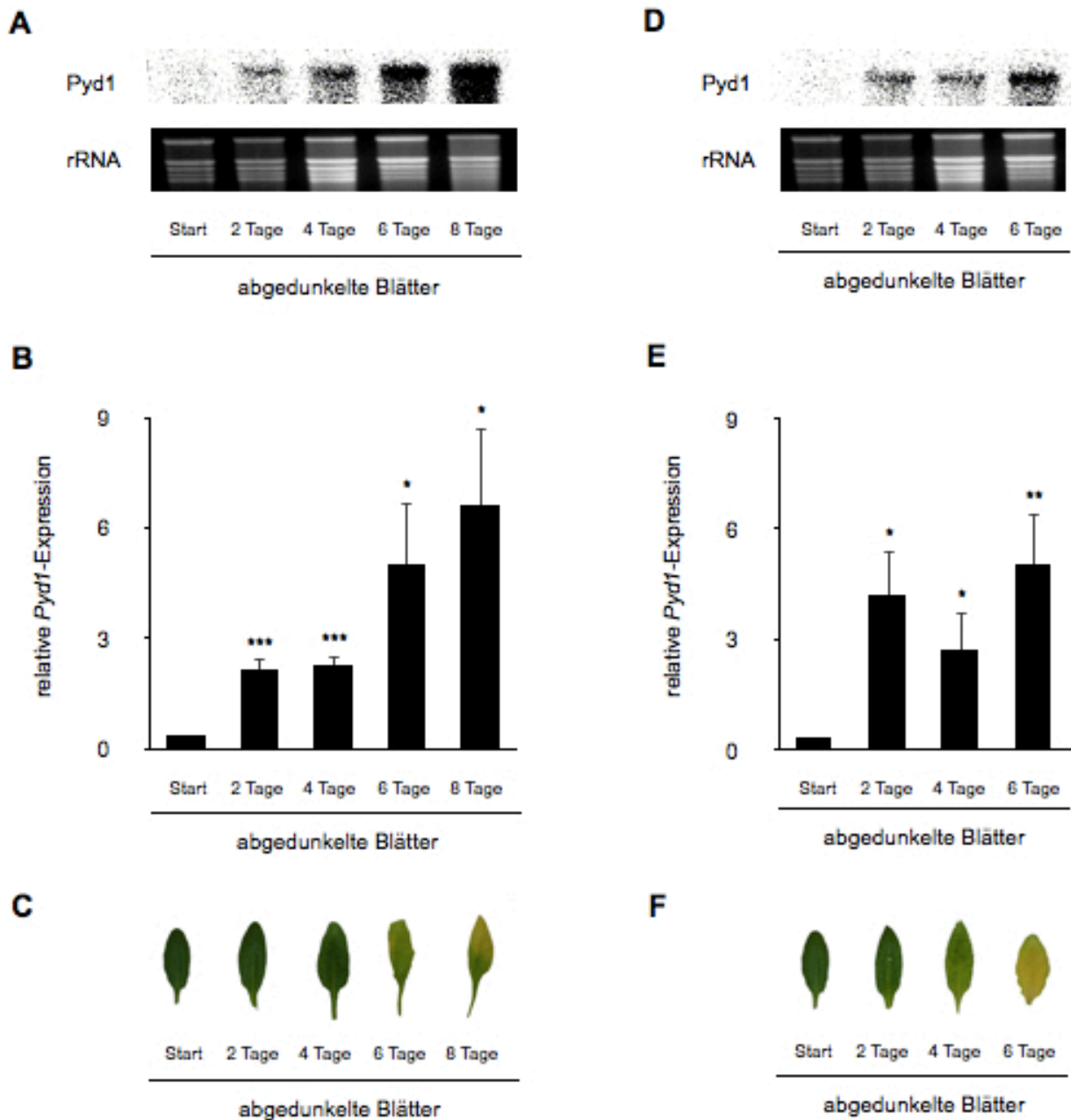


Abb. 3.25: Untersuchung der *Pyd1*-Expression in künstlich seneszierten *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Blättern

(A)-(C) Einzelne Blätter wurden an der Pflanze abgedunkelt.

(D)-(F) Einzelne Blätter wurden von der Pflanze entfernt und im Dunkeln in Wasser inkubiert.

(A) und (D) Dargestellt ist das Autoradiogramm eines Northern Blots (Kap. 2.4.2) nach Hybridisierung mit einer *Pyd1*-spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente ein Formaldehydgel, bei dem jede Spur mit 7 µg Gesamt-RNA beladen wurde.

(B) und (E) Dargestellt ist eine qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.4.3) des *Pyd1*-Transkriptgehalts. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1a* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (±SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Start-Probe angegeben.

(C) und (F) Dargestellt sind Rosetten-Blätter von *Arabidopsis thaliana*, welche die entsprechenden Seneszenzstadien verdeutlichen.

Die weiteren Transkript-Analysen zeigen, dass auch bei künstlich induzierter Seneszenz das Gen *Pyd1* verstärkt exprimiert wird. Wurden einzelne Blätter an der Pflanze

abgedunkelt, so konnte mittels Northern Blot-Analysen über einen Zeitraum von 8 Tagen eine kontinuierliche Steigerung an *Pyd1*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 3.25 A). qRT-PCR-Analysen ermittelten in 2 und 4 Tage abgedunkelten Blättern etwa 6-mal soviel *Pyd1*-Transkript wie in den 6 Wochen alten Kontrollblättern, nach 6 Tagen war der Transkriptgehalt auf das 15-fache gesteigert und nach 8 Tagen auf das 20-fache (Abb. 3.25 B). Zur besseren Veranschaulichung der verschiedenen Seneszenz-Stadien sind die verwendeten Blätter von *Arabidopsis thaliana* abgebildet (Abb. 3.25 C).

In einem weiteren Experiment wurden einzelne Blätter von der Pflanze entfernt und im Dunkeln in Wasser inkubiert. Wieder sind zur besseren Veranschaulichung der verschiedenen Seneszenz-Stadien die verwendeten Blätter abgebildet (Abb. 3.25 F). Auch in diesem Experiment war die *Pyd1*-Expression im Vergleich zur Kontrollbedingung erhöht, allerdings nicht linear zu der Dauer. Nach 2 Tagen im Wasser wiesen die Blätter bereits eine 12-fach höhere *Pyd1*-Expression im Vergleich zur Kontrolle auf, nach 6 Tagen war die Expression von *Pyd1* 15-mal so hoch wie in der Kontrolle aber im Vergleich zum 2 Tage-Wert kaum gesteigert (Abb. 3.25 E).

3.6.2 Analyse des Uracilgehaltes

In Abb. 3.26 sind die Uracilgehalte in 6 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (Abb. 3.26 A) und in 8 Tage abgedunkelten Blättern (Abb. 3.26 B) dargestellt.

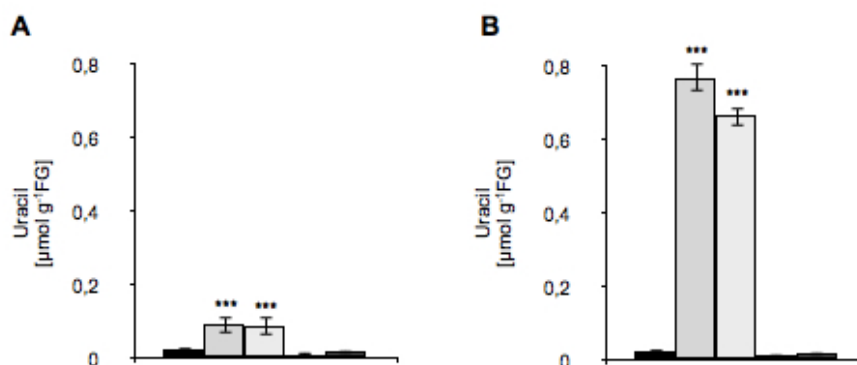


Abb. 3.26: Uracilgehalte in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen verschiedener *Pyd1*-Mutanten vor und nach künstlich induzierter Seneszenz

Dargestellt ist der Uracilgehalt in

(A) 6 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen bzw.

(B) 8 Tage an der Pflanze abgedunkelten Blättern von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehr als 5 biologischen Replikaten ($\pm\text{SE}$). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Sowohl 6 Wochen alte *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Blätter als auch Blätter, in denen durch Abdunklung künstlich Seneszenz induziert wurde wiesen einen Uracilgehalt von 0,022 bzw. 0,024 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ auf (Abb. 3.26 A-B). Die Uracilgehalte der beiden untersuchten 35S:*Pyd1*-Pflanzen lagen mit 0,010 bis 0,019 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ leicht darunter (Abb. 3.26 A-B). Während die Uracilgehalte in den 6 Wochen alten Blättern der *Pyd1*-„knockout“-Linien im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen um das 5-fache gesteigert waren (Abb. 3.26 A), wurde in den seneszenten Blättern mit Uracilgehalten von 0,769 bzw. 0,665 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ eine etwa 30-fache Erhöhung im Vergleich zu seneszenten Wildtyp-Blättern gemessen (Abb. 3.26 B).

3.7 Physiologische Untersuchungen transgener *Pyd1*-Pflanzen während Stickstoffmangel

Bei Stickstoff handelt es sich um das wichtigste mineralische Nährelement für Pflanzen (MARSCHNER, 1995). Ein Mangel an Stickstoff führt schnell zu Wachstumshemmungen. Es kommt zur Ausbildung von Chlorosen, Gelbverfärbungen der Blätter, und zur Bildung von Anthocyanen infolge von Stress (TAIZ & ZEIGER, 2003). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine externe Applikation von Nucleosiden diesen negativen Effekten zum Teil entgegenwirken kann (FLÖRCHINGER, 2007). Ob dies mit einer verstärkten Stickstoff-Freisetzung aus Nucleosiden und Nucleobasen in Zusammenhang steht, wurde im Folgenden untersucht.

3.7.1 Untersuchungen zum *Pyd1*-Transkriptgehalt während Stickstoffmangel

In einer Genexpressionsanalyse Stickstoffmangel betreffend fiel *Pyd1* als ein durch Stickstoffmangel induziertes Gen auf (SCHEIBLE *et al.*, 2004). Die anderen Gene des Pyrimidinabbauweges zeigten diese Induktion nicht. Um dies zu verifizieren wurden sowohl Northern Blot- als auch qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.27 dargestellt.

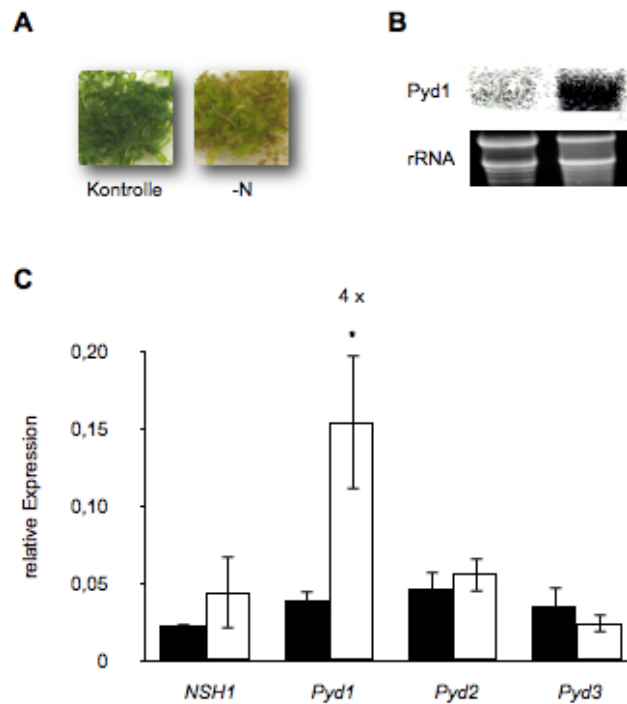


Abb. 3.27: Untersuchung der Expression der Pyrimidinabbau-Gene in Wildtyp-Keimlingen bei Stickstoffmangel

(A) Dargestellt sind die *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge, welche für die Expressionsanalysen verwendet wurden.

(B) Dargestellt ist das Autoradiogramm eines Northern Blots (Kap. 2.4.2) nach Hybridisierung mit einer *Pyd1*-spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente ein Formaldehydgel, bei dem jede Spur mit 10 µg Gesamt-RNA beladen wurde.

(C) Dargestellt ist eine qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.4.3) des Transkriptgehalts der Pyrimidinabbau-Gene *Uridin-Ribohydrolase (NSH1)*, *Dihydrouracil-Dehydrogenase (Pyd1)*, *Dihydropyrimidinase (Pyd2)* und *β-Ureidopropionase (Pyd3)*. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1α* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet.

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in steriler Flüssigkultur wie in Kap. 2.2.4. beschrieben. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (±SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,05$ jeweils im Vergleich zur Kontrolle angegeben.

■ Kontrolle □ -N

In Abb. 3.27 A sind beispielhaft Keimlinge gezeigt, welche für die Expressionsanalysen verwendet wurden. Es sind typische Stickstoffmangel-Erscheinungen wie Chlorosen und die Ausbildung von Anthocyanen (rötliche Verfärbungen an den Blatträndern) zu erkennen. Die Transkript-Analyse mittels Northern Blot zeigte eine deutliche Zunahme des *Pyd1*-Transkriptgehalts unter Stickstoffmangel-Bedingungen (Abb. 3.27 B). Diese Anreicherung von *Pyd1*-Transkript bei Stickstoffmangel konnte ebenfalls mittels qRT-PCR-Analysen detektiert werden. 3 Tage nach Entfernen des gesamten Stickstoffs aus dem Medium betrug die Expressionssteigerung 400%. Die Expression aller anderen Pyrimidinabbau-Gene war dagegen bei Stickstoffmangel nicht verändert (Abb. 3.27 C).

3.7.2 Analyse des Frischgewichts

Die Biomasse stellt einen guten Indikator für die pflanzliche Vitalität dar. Anhand der Bestimmung des Frischgewichts wurden die Auswirkungen eines Stickstoffmangels auf die verschiedenen *Pyd1*-Mutanten getestet (Abb. 3.28).

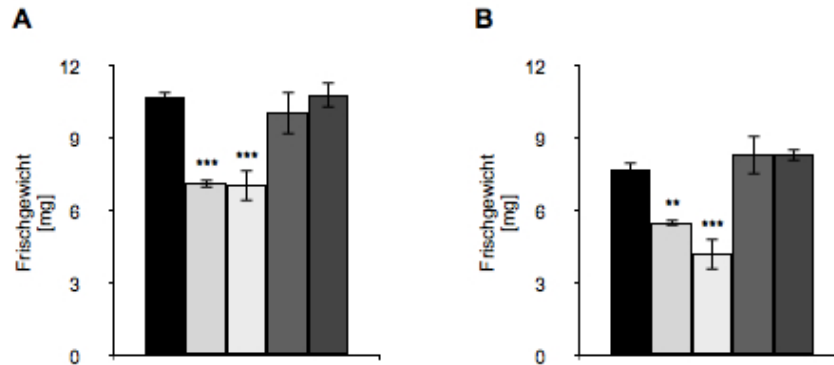


Abb. 3.28: Frischgewicht eines 10 Tage alter *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlings und der Keimlinge der verschiedenen *Pyd1*-Mutanten

Dargestellt ist das Frischgewicht eines Keimlings (A) unter Kontrollbedingungen (+N) bzw. (B) nach 3 Tagen Stickstoffmangel (-N).

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in steriler Flüssigkultur wie in Kap. 2.2.4 beschrieben. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet und gravitrometrisch das Frischgewicht bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehr als 5 biologischen Replikaten (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Ein 10 Tage alter, in steriler Flüssigkultur unter optimaler Nährstoffversorgung angezogener *Arabidopsis thaliana*-Keimling wog 10,7 mg. Im gleichen Bereich befand sich das Gewicht der 35S:*Pyd1*-Keimlinge. Das Keimlingsgewicht der beiden *Pyd1*-T-DNA-Insertionslinien war mit 7,1 mg um ein Drittel im Vergleich zum Wildtyp-Keimlingsgewicht reduziert (Abb. 3.28 A).

Das Gewicht der unter Stickstoffmangel angezogenen Keimlinge war im Fall aller Genotypen im Vergleich zur Anzucht unter Kontrollbedingungen auf 60-80% reduziert (Abb. 3.28 A-B).

Die unter Stickstoffmangel angezogenen *Pyd1*-Überexpressionskeimlinge waren geringfügig schwerer als ein Wildtyp-Keimling. *Pyd1*-„knockout“-Keimlinge dagegen waren deutlich leichter, im Fall von Stickstoffmangel war ihr Gewicht im Vergleich zum Wildtyp bis auf die Hälfte reduziert (Abb. 3.28 B).

3.7.3 Analyse des Anthocyangehalts

Anthocyane sind sekundäre Metabolite, die in unterschiedlichen Stresssituationen der Pflanzen gebildet werden. Die Akkumulation dieses Pigments führt zu einer purpurnen Verfärbung von Blättern, Blattstielen und Stengeln (TAIZ & ZEIGER, 2000). Infolge eines Stickstoffmangels entsteht ein Überschuss an Kohlenhydraten, der aufgrund des fehlenden Stickstoffs nicht der Synthese von Aminosäuren oder anderen stickstoffhaltigen Verbindungen dienen kann. Durch die Bildung von Anthocyanen werden diese überschüssigen Kohlenstoffgerüste verstoffwechselt (TAIZ & ZEIGER, 2000).

Die rötliche Verfärbung der Keimlinge durch Anthocyane schien unterschiedlich die verschiedenen *Pyd1*-Mutanten betreffend. Aus diesem Grund wurden die Anthocyan-gehalte bestimmt (Abb. 3.29).

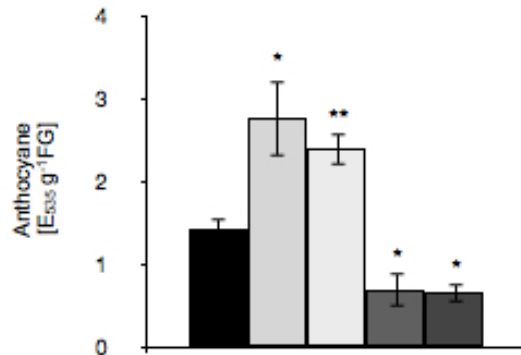


Abb. 3.29: Anthocyan-Gehalt von 10 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *Pyd1*-Mutanten angezogen in steriler Flüssigkultur unter Stickstoffmangel

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in steriler Flüssigkultur wie in Kap. 2.2.4 beschrieben, zunächst 7 Tage in Kontrollmedium und weitere 3 Tage in Stickstoffmangelmedium (-N). Anschließend wurden die Pflanzen geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 100 mg zur Extraktion der Anthocyane eingesetzt (Kap. 2.6.4). Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,05$ und ** für $p < 0,01$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Während Wildtyp-Keimlinge nach 3 Tagen Stickstofflimitierung einen Anthocyangehalt von 1,4 Extinktionseinheiten g^{-1} FG aufweisen, zeigen beide *Pyd1*-„knockout“-Pflanzenlinien mit Anthocyangehalten von 2,8 bzw. 2,4 Extinktionseinheiten g^{-1} FG nahezu eine Verdopplung. Dagegen sind die ermittelten Anthocyangehalte in den *Pyd1*-Überexprimierern mit jeweils 0,7 Extinktionseinheiten g^{-1} FG im Gegensatz zu Wildtyp-Keimlingen um die Hälfte reduziert (Abb. 3.29).

Unter Kontrollbedingungen kam es in keiner der untersuchten Pflanzen zur Akkumulation von Anthocyanen (Daten nicht gezeigt).

3.7.4 Analyse des Uracilgehalts

Auch im Fall von Stickstoffmangel wurden die Uracilgehalte detektiert (Abb. 3.30).

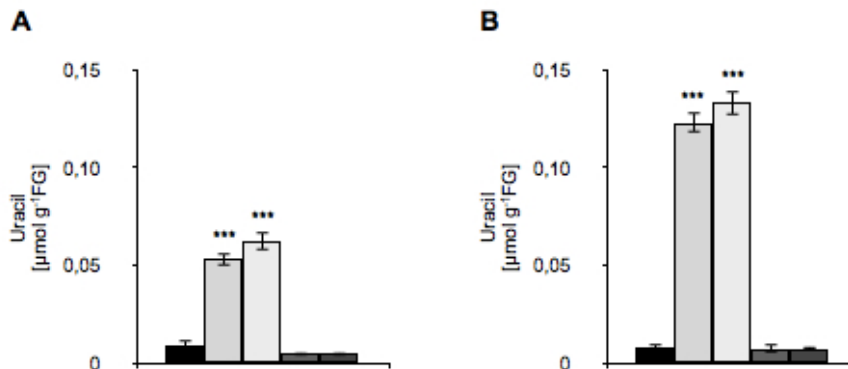


Abb. 3.30: Uracilgehalte von 10 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *Pyd1*-Mutanten angezogen unter Kontroll- und Stickstoffmangelbedingungen

Dargestellt ist der Uracilgehalt in *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen

(A) unter Kontrollbedingungen (+N) bzw.

(B) nach 3 Tagen Stickstoffmangel(-N).

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in steriler Flüssigkultur wie in Kap. 2.2.4 beschrieben. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 100 mg zur Uracil-Extraktion eingesetzt (Kap. 2.6.1). Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehr als 5 biologischen Replikaten ($\pm\text{SE}$). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für $p < 0,001$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

10 Tage alte, unter Kontrollbedingungen angezogene *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlinge wiesen einen Uracilgehalt von $0,009 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ auf. Beide *Pyd1*-„knockout“-Linien wiesen mit $0,053 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ bzw. $0,063 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ um ca. Faktor 6 gesteigerte Uracil-Mengen auf. Die 35S:*Pyd1*-Pflanzen dagegen zeigten mit jeweils $0,005 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ leicht verminderte Uracilgehalte im Vergleich zu den Wildtyp-Keimlingen (Abb. 3.30 A). Während Wildtyp-Keimlinge, die unter Stickstoffmangel angezogen wurden mit $0,008 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ soviel Uracil besaßen wie die unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen, so war der zu beobachtende Uracil-Anstau in den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen hier noch deutlicher ausgeprägt. Mit Uracilgehalten von $0,122 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ und $0,133 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ betrug die Erhöhung hier im Vergleich zu den Wildtyp-Keimlingen sogar Faktor 16. Die Uracilgehalte in den 35S:*Pyd1*-Pflanzen dagegen ähnelten mit jeweils $0,007 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ auch hier dem Uracilgehalt der Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.30 B).

3.7.5 Quantifizierung von Zuckern

Neben Anthocyanen stellt die Bildung von Kohlenhydraten wie löslichen Zuckern und Stärke eine weitere Möglichkeit für die Pflanze dar überschüssige Kohlenwasserstoffe zu verstoffwechseln. In den 10 Tage alten, in steriler Flüssigkultur angezogenen Keimlingen

wurde der Gehalt der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose sowie der Stärkegehalt gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.31 dargestellt.

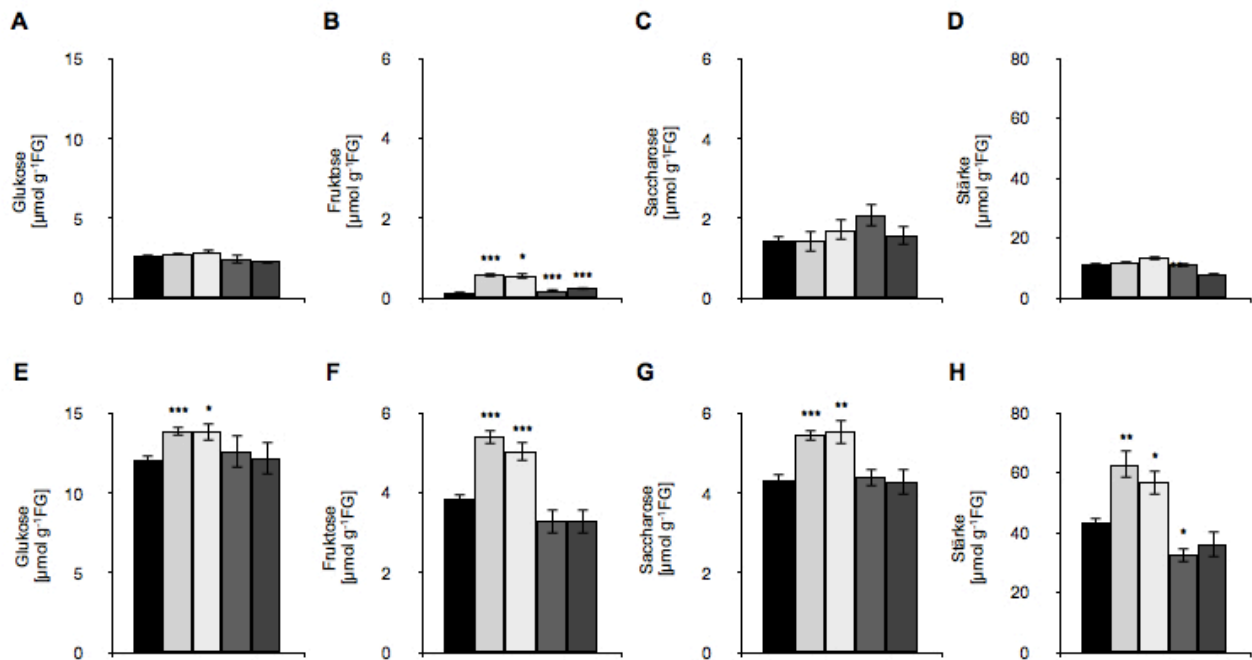


Abb. 3.31: Zucker- und Stärke-Gehalte von 10 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *Pyd1*-Mutanten angezogen unter Kontroll- und Stickstoffmangelbedingungen

Dargestellt sind die Zucker- bzw. der Stärkegehalt (A)-(D): unter Kontrollbedingungen (+N) bzw. (E)-(H): nach 3 Tagen Stickstoffmangel(-N).

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in steriler Flüssigkultur wie in Kap. 2.2.4 beschrieben. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 100 mg zur Extraktion der Zucker (Kap. 2.6.2) und Quantifizierung der Stärke (Kap. 2.6.3) eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehr als 5 biologischen Replikaten (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für $p < 0,001$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1*-1 □ *Pyd1*-2 ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Generell war zu beobachten, dass alle gemessenen Kohlenhydrate unter Stickstoffmangel im Vergleich zur Anzucht unter Kontrollbedingungen deutlich erhöht waren. Darüber hinaus zeigten die beiden *Pyd1*-„knockout“-Linien im Vergleich zu den *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen eine weitere Steigerung der Zucker Glukose, Fruktose, Saccharose und auch von Stärke (Abb. 3.31). Diese war mit einer Steigerung auf bis zu 150% des Wildtyp-Gehaltes bei Fruktose und Stärke am deutlichsten ausgeprägt (Abb. 3.31 F, H). Aber auch die Glukose-Gehalte waren in den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen im Vergleich zu den Wildtyp-Keimlingen um 15% erhöht (Abb. 3.31 E), die Saccharose-Gehalte um 30% (Abb. 3.31 G).

3.7.6 Degradierung von radioaktiv markierten Pyrimidinen

Genexpressionsanalysen zeigten, dass der Transkriptgehalt von *Pyd1* in Abwesenheit des wichtigen Nährelements Stickstoff gesteigert war (Abb. 3.27). Mithilfe des bereits in Kap. 3.4.2 dargestellten radioaktiven Assays des gesamten Pyrimidin-Degradationsweges wurde untersucht, ob dies auch für den Pyrimidin-Abbau *in vivo* der Fall ist (Abb. 3.32).

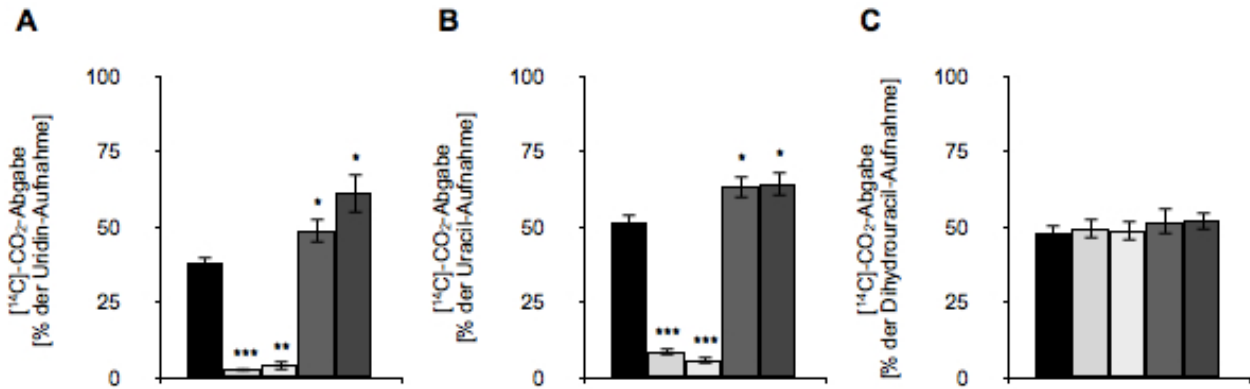


Abb. 3.32: Abbau von [¹⁴C]-Pyrimidinen zu [¹⁴C]-CO₂ bei Stickstoffmangel

Es wurden 10 Tage alte Keimlinge aus steriler Flüssigkultur verwendet (Kap. 2.2.4). Die Inkubation erfolgte in Stickstoffmangelmedium (-N) mit 5 μM [¹⁴C]-markiertem

- (A) Uridin,
- (B) Uracil bzw.
- (C) Dihydrouracil

Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SE) aus mehr als 5 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für p<0,05, ** für p<0,01 und *** für p<0,005 jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ *Pyd1-1* □ *Pyd1-2* ■ 35S:*Pyd1* 11 ■ 35S:*Pyd1* 19

Setzte man die Keimlinge während des Experiments einem Mangel an Stickstoff aus, so zeigten sich die gleichen Tendenzen wie bei Durchführung unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.9): die *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen verstoffwechselten im Falle von Uridin (Abb. 3.32 A) und Uracil (Abb. 3.32 B) nur einen Bruchteil der aufgenommenen Radioaktivität, während der Dihydrouracil-Abbau (Abb. 3.32 C) in ähnlichen Raten wie in den Wildtyp-Keimlingen erfolgte. Die *Pyd1*-Überexpressionspflanzen zeigten auch hier gesteigerte Uridin- und Uracil-Abbauraten, allerdings war die Steigerung im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen nicht so deutlich wie unter Kontrollbedingungen.

Während unter Stickstoffmangel bei den 35S:*Pyd1*-Pflanzen bezüglich keinem der Substrate ein Unterschied im Vergleich zu Kontrollbedingungen festgestellt werden konnte, nahm der Abbau der Pyrimidine Uridin und Uracil im Wildtyp im Vergleich zu Kontrollbedingungen zu (Abb. 3.9 und Abb. 3.32). Wurden bei Verfügbarkeit von Stickstoff im Wildtyp 28% des aufgenommenen Uridins (Abb. 3.9 A) und 22% des aufgenommenen Uracils (Abb. 3.9 B) zu [¹⁴C]-CO₂ abgebaut, so waren es bei geringer Stickstoff-

verfügbarkeit 38% des aufgenommenen Uridins (Abb. 3.32 A) und 52% des Uracils (Abb. 3.32 B), die dem Katabolismus zugeführt wurden. Dies entspricht im Fall des Nukleosids Uridin einer Steigerung der Abbaurrate bei Stickstoffmangel im Vergleich zu Kontrollbedingungen um Faktor 1,4 (Abb. 3.9 A und Abb. 3.32 A), im Fall der Base Uracil sogar um Faktor 2,3 (Abb. 3.9 B und Abb. 3.32 B). Hingegen blieb die Rate des Dihydrouracil-Abbaus unter den gewählten Bedingungen und den Genotypen konstant bei etwa 50% (Abb. 3.9 C und Abb. 3.32 C).

3.8 Aminosäure-Alignment von *Pyd1* und der nächst verwandten Sequenz in *Arabidopsis thaliana*

Der Pyrimidinabbau konnte in den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen nicht auf null reduziert werden, in allen dargestellten Ergebnissen wurde noch eine Abbaurrate von bis zu 9% des aufgenommenen [¹⁴C]-Pyrimidins zu [¹⁴C]-CO₂ detektiert (Abb. 3.9 und Abb. 3.32). Es stellte sich deshalb die Frage, ob in *Arabidopsis thaliana* ein weiteres Protein mit Dehydrouracil-Dehydrogenase-Aktivität existiert. Auch in früheren Arbeiten wurde über das mögliche Vorhandensein eines weiteren Enzyms spekuliert (ZRENNER *et al.*, 2009). Eine BLAST-Suche (ALTSCHUL *et al.*, 1990) lieferte als einzige nah verwandte Sequenz das Protein Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH). DHODH katalysiert den vierten Schritt der Pyrimidin-*de novo*-Synthese, die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat (Abb. 1.1; JONES, 1980; ZRENNER *et al.*, 2006). Das Aminosäure-Alignment der beiden Proteinsequenzen von *DHODH* (*At5g23300*) und *Pyd1* (*At3g17810*) wurde mit den Programmen ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) und GENEDOC (NICHOLAS & NICHOLAS, 1997) erstellt und ist in Abb. 3.33 dargestellt.

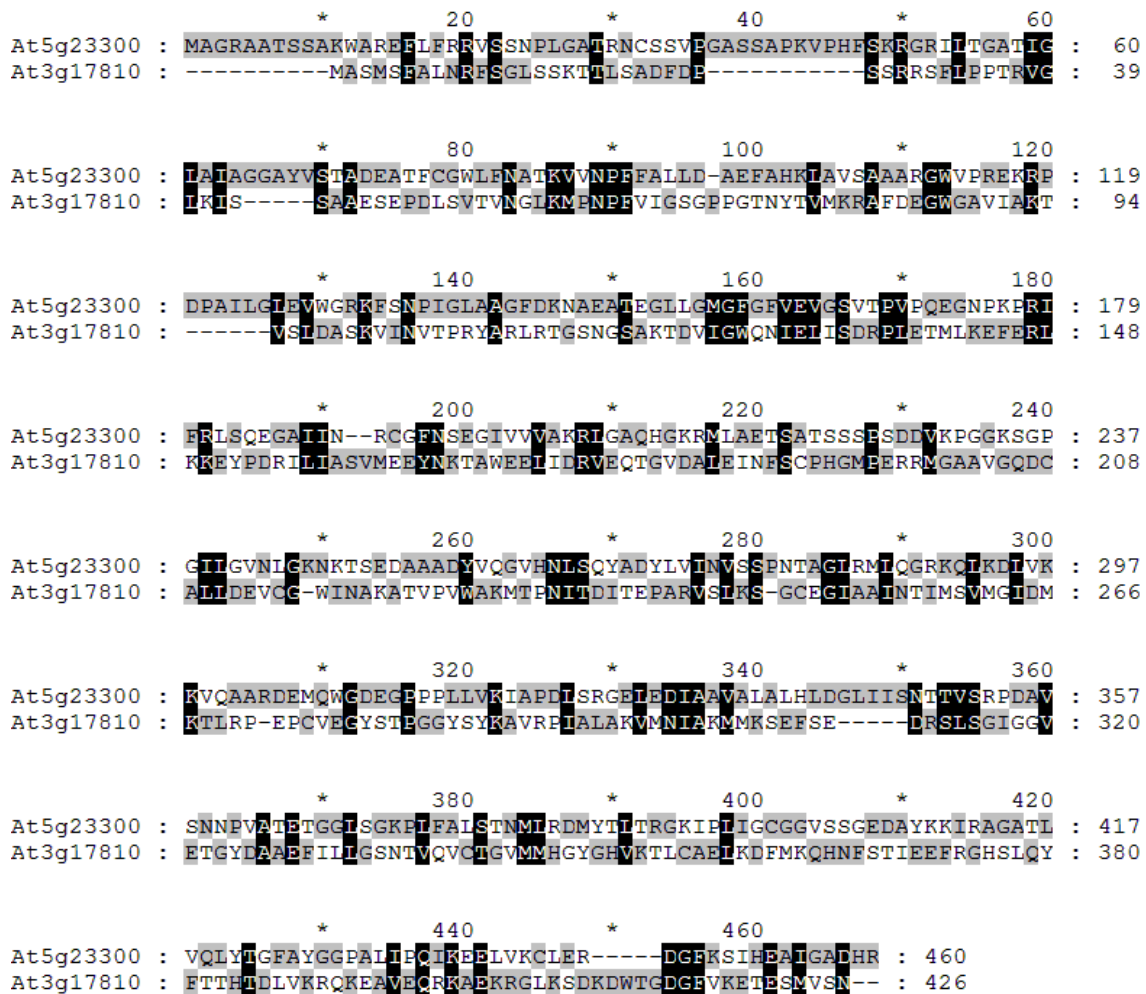


Abb. 3.33: Aminosäure-Alignment von DHODH (At5g23300) und Pvd1 (At3g17810)

Stark konservierte Bereiche innerhalb der Aminosäuresequenz sind schwarz hinterlegt, weniger konservierte Bereiche in abgestuften Grautönen.

Das Protein DHODH besitzt 24% identische und 39% ähnliche Aminosäuren zum Pvd1-Protein.

3.9 Analyse zur gewebespezifischen Expression von *DHODH*

Die *DHODH*-Promotor-Region wird mit nur 290 Nukleotiden relativ kurz vorhergesagt (KAFFER *et al.*, 2004). Nichtsdestotrotz wurde zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von *DHODH* eine ca. 1500 bp große Promotor-Region des 5'-Bereichs mit dem Reporter gen β -Glucuronidase (*GUS*) fusioniert, so dass die *GUS*-Expression unter der Kontrolle des *DHODH*-Promotors stand. Nach der Transformation von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen konnte durch deren histochemische Färbung das Expressionsmuster der *DHODH* determiniert werden.

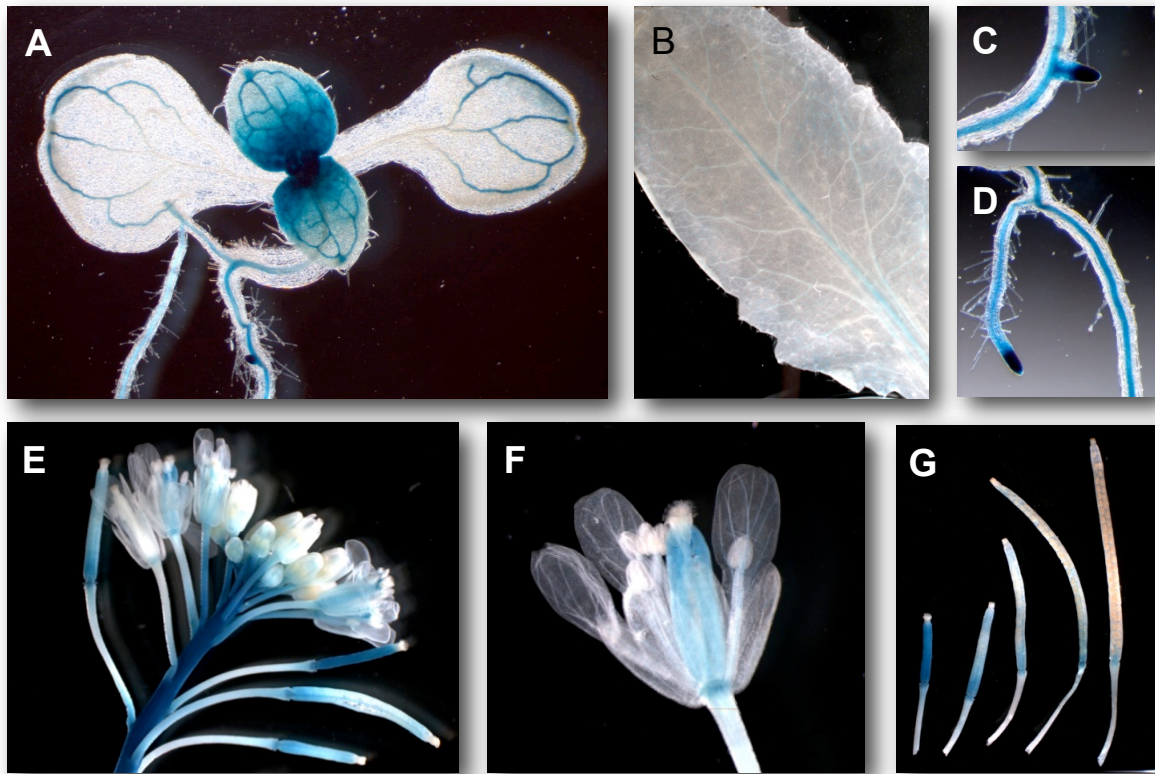


Abb. 3.34: Histochemische Färbung von Promotor:*DHODH-GUS*-Pflanzen

- (A): 7 Tage alter Keimling
- (B): 4 Wochen altes Blatt mit gefärbten Leitgeweben
- (C): Detailaufnahme Wurzel mit Seitenwurz-Bildungszone
- (D): Wurzel mit Seitenwurz
- (E): Blütenstand
- (F): Blüte
- (G): Schoten in verschiedenen Entwicklungsstadien

Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für zehn unabhängige Promotor:*DHODH-GUS*-Pflanzen.

In Abb. 3.34 sind Gewebe repräsentativer Promotor:*DHODH-GUS*-Pflanzen dargestellt. Dazu wurden Pflanzen von zehn unabhängigen Linien untersucht. Deutlich sichtbar ist eine GUS-Färbung in allen Leitgeweben (Abb. 3.34 A-D). Des Weiteren konnte eine Promotoraktivität in Wurzelspitzen (Abb. 3.34 C-D) und generell in den Bildungszentren sich entwickelnder Gewebe (Abb. 3.34 A, C, D, G) festgestellt werden. So war beispielsweise die *DHODH*-Expression in sich entwickelnden Schoten deutlich höher als in bereits ausdifferenzierten Schoten (Abb. 3.34 G).

Daten des eFP Browsers (WINTER *et al.*, 2007) bestätigen das für *DHODH* detektierte Expressionsmuster. So wurde in Wurzelspitzen von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen eine hohe *DHODH*-Expression festgestellt und die Expression in sich entwickelnden Geweben war generell höher als in bereits ausdifferenzierten.

3.10 Analyse der subzellulären Lokalisierung von DHODH mittels GFP-Fusion

DHODH wird als einziges Nukleotid-*de novo*-Synthese-Enzym beschrieben, dessen Lokalisierung nicht plastidär ist. Bioinformatische Analysen identifizierten ein N-terminales Transit-Peptid für Mitochondrien (EMANUELSSON *et al.*, 2007; HEAZLEWOOD *et al.*, 2003). Zudem existieren biochemische (in Erbse, DOREMUS & JAGENDORF, 1985) und immunologische (ULLRICH *et al.*, 2002) Hinweise darauf, dass das Protein an der äußeren Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, wie es bereits in Säugetieren gezeigt werden konnte (CHRISTOPHERSON & SZABADOS, 1997). Dafür spricht auch, dass diverse Programme das Vorhandensein einer Transmembrandomäne am N-terminalen Proteinende vorschlagen (SCHWACKE *et al.*, 2003). Diese bioinformatische Datenbank schließt eine plastidäre Lokalisierung allerdings nicht aus. Eigene GFP-Analysen sollten Klarheit über die Lokalisierung von DHODH schaffen. Deren Ergebnisse sind in Abb. 3.35 dargestellt.

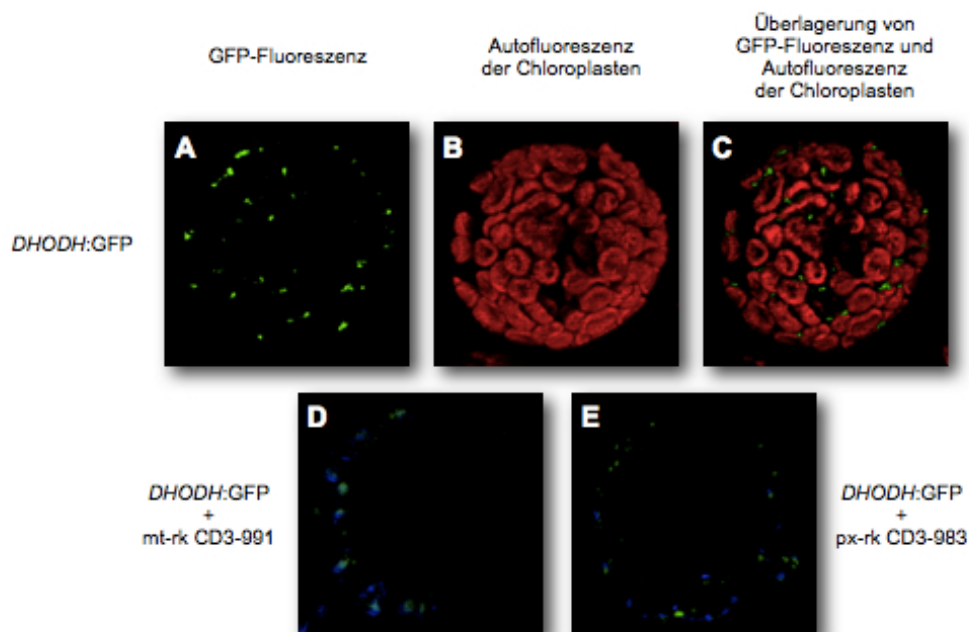


Abb. 3.35: Transiente Expression des *DHODH:GFP*-Fusionskonstrukts in Tabak-Protoplasten

Dargestellt sind jeweils die GFP-Fluoreszenz, die Eigenfluoreszenz der Chloroplasten sowie die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen.

Die Tabak-Protoplasten wurden transformiert mit

(A)-(C) dem Konstrukt *DHODH:GFP*,

(D) dem Konstrukt *DHODH:GFP* und dem mitochondrialen Marker-Konstrukt mt-rk CD3-991 bzw.

(E) dem Konstrukt *DHODH:GFP* und dem peroxisomalen Marker-Konstrukt px-rk CD3-983.

Die Untersuchung der transformierten Tabak-Protoplasten erfolgte ca. 24 Stunden nach der Transformation.

Die Aufnahmen wurden mit einem Inversmikroskop bei 40facher Vergrößerung angefertigt.

In Abb. 3.35 A-C ist ein charakteristischer Tabak-Protoplast nach transienter Expression des *DHODH*-GFP-Fusionskonstruktes dargestellt. Da dieses Fluoreszenzmuster sowohl bei einer mitochondrialen als auch peroxisomalen Lokalisierung in Frage kommt, wurden zudem Tabak-Protoplasten mit dem *DHODH*-GFP-Fusionskonstrukt sowie zusätzlich mit Marker-Konstrukten für die jeweiligen Kompartimente transformiert. Aus der Überlagerung der Fluoreszenz von *DHODH*:GFP und der des mitochondrialen Marker-Konstruktes mt-rk CD3-991 (NELSON *et al.*, 2007) wird die mitochondriale Lokalisierung von *DHODH* ersichtlich (Abb. 3.35 D). Eine peroxisomale Lokalisierung für *DHODH* konnte mittels des Marker-Konstruktes px-rk CD3-983 (NELSON *et al.*, 2007) ausgeschlossen werden (Abb. 3.35 E).

3.11 Molekulare Charakterisierung transgener *DHODH*-Pflanzen

Um die physiologische Funktion von *DHODH* besser verstehen zu können wurde eine Reihe von korrespondierenden *DHODH*-Mutanten hergestellt (Kap. 2.2.1).

3.11.1 Transkriptanalyse der generierten *DHODH*-RNAi-Pflanzen

Für jeden enzymatischen Schritt der Pyrimidin-*de novo*-Synthese gibt es genau ein Gen (GIERMANN *et al.*, 2002; ZRENNER *et al.*, 2006). Bislang sind für keines dieser Gene „knockout“-Mutanten bekannt und das Screening der verfügbaren *Arabidopsis thaliana*-T-DNA-Insertions-Linien resultierte lediglich in heterozygoten Individuen (ZRENNER *et al.*, 2006). So auch das Screening von drei unabhängigen *DHODH*-T-DNA-Insertionslinien (eigene, nicht gezeigte Ergebnisse). Es wurde spekuliert, dass eine homozygote Mutation letal ist (SCHRÖDER *et al.*, 2005; ZRENNER *et al.*, 2006). Um dennoch eine funktionelle Analyse von *DHODH* durchführen zu können, wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) verwendet (Kap. 2.2.1), um *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit einer verringerten *DHODH*-Expression zu generieren (WESLEY *et al.*, 2001). Die Expression des RNAi-Konstruktes führt zur Bildung doppelsträngiger RNA, welche von der Pflanze als viral erkannt und abgebaut wird. Zudem wird mRNA mit der gleichen Basenabfolge degradiert und so der *DHODH*-mRNA-Pool verringert. Die generierten 35S_RNAi:*DHODH*-Linien wurden mittels qRT-PCR hinsichtlich ihres Transkriptgehalts untersucht (Abb. 3.36).

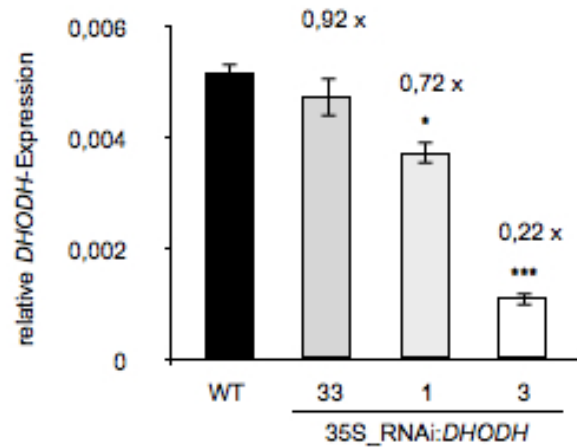


Abb. 3.36: Untersuchung der Genexpression von *DHODH* in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp- und 35S_RNAi:*DHODH*-Pflanzen

Dargestellt ist eine qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.4.3) des *DHODH*-Transkriptgehalts. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1 α* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigen die generierten 35S_RNAi:*DHODH*-Pflanzen eine Reduktion des *DHODH*-Transkripts. Diese ist in Linie 33 und Linie 1 mit Verringerung auf 92% bzw. 72% eher schwach ausgeprägt, während die Reduktion auf 22% in Linie 3 deutlicher ist (Abb. 3.36).

Während homozygote Individuen der Linien 1 und 33 identifiziert werden konnten, waren bei den Pflanzen der Linie 3 nur die heterozygoten Pflanzen in der Lage neue Nachkommen zu produzieren. In Abb. 3.37 A sind beispielhaft sechs Nachkommen einer solchen heterozygoten *DHODH*-RNAi-Pflanze der Linie 3 gezeigt.

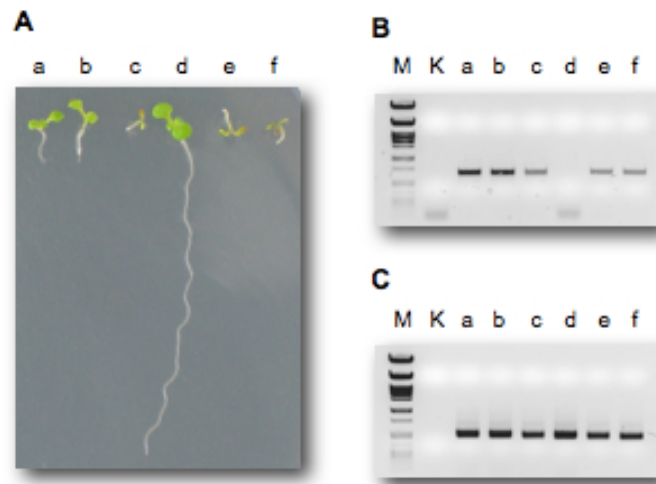


Abb. 3.37: Nachkommen einer heterozygoten 35S_RNAi:DHODH 3-Pflanze

(A) 6 beispielhafte Nachkommen einer heterozygoten 35S_RNAi:DHODH 3-Pflanze, die Keimlinge sind 10 Tage alt. Die Anzucht erfolgte wie in Kap. 2.2.5 beschrieben.
 (B) PCR auf gDNA zum Nachweis des Überexpressionskonstrukts unter Verwendung der Primer 35S_fwd und 35S_rev.
 (C) Kontrolle der PCR-Reaktion mit *Eflα*-spezifischen Primern.
 Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Als Größenstandard (M) diente mit PstI verdaute λ -DNA. K, Kontrolle ohne gDNA.

PCR-Analysen auf den CaMV 35S-Promotor lieferten für die Pflanzen a, b, c, e, und f das erwartete Produkt, weshalb geschlossen werden konnte, dass es sich bei diesen Individuen um transformierte Pflanzen handelte. Bei Pflanze d dagegen konnte das entsprechende Produkt nicht amplifiziert werden, somit war Pflanze d eine *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanze (Abb. 3.37 B).

Eine weitere Kultivierung der in Abb. 3.37 A gezeigten erfolgreich transformierten Pflanzen gelang lediglich mit den Pflanzen a und b. Die Pflanzen c, e und f dagegen zeigten keine Entwicklung über das gezeigte Stadium hinaus, weshalb postuliert wurde, dass es sich bei den Pflanzen a und b um heterozygote Pflanzen und bei den Pflanzen c, e und f um homozygote Pflanzen handelte.

Es wurde untersucht, ob die Zugabe verschiedener Pyrimidine wie Uridin, Uracil und Orotat diesen drastischen, letalen Phänotyp retten kann, so wie Adenosin-Fütterung den Phänotyp von *AtBT1*-RNAi-Mutanten kompensieren konnte (KIRCHBERGER *et al.*, 2008). Das Transportprotein AtBt1 fungiert im Envelope der Plastiden als Exporter der dort *de novo* synthetisierten Adenylate AMP, ADP und ATP (KIRCHBERGER *et al.*, 2008). Im Fall der 35S_RNAi:DHODH-Pflanzen der Linie 3 führte diese Strategie allerdings zu keiner Wachstumsänderung (eigene, nicht gezeigte Ergebnisse).

3.11.2 Transkriptanalyse der generierten *DHODH*-Überexpressionspflanzen

Zudem wurden *DHODH*-Überexpressionspflanzen generiert, bei denen das Gen *DHODH* unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S Promotor steht. Zunächst wurden die generierten Pflanzenlinien hinsichtlich ihrer Transkriptgehalte untersucht (Abb. 3.38).

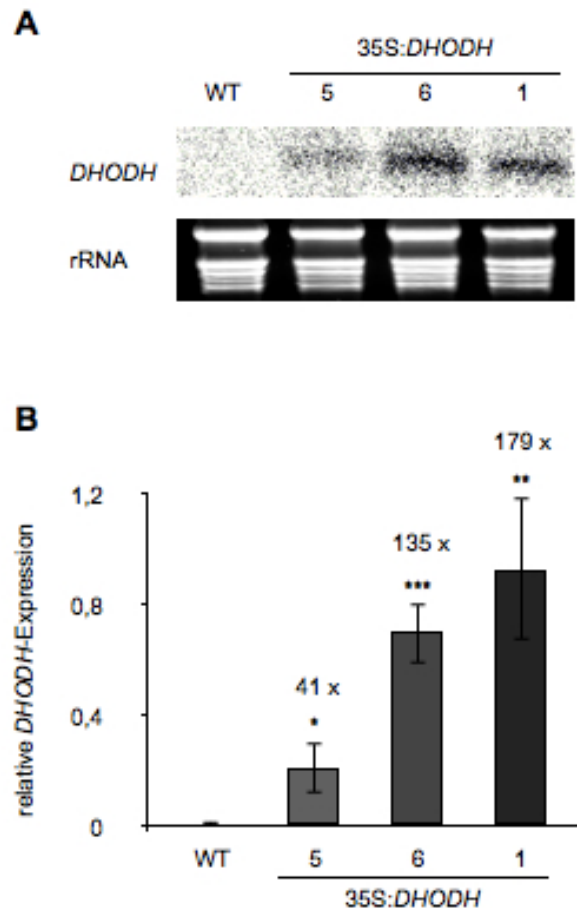


Abb. 3.38: Untersuchung der Genexpression von *DHODH* in Wildtyp- und 35S:*DHODH*-Pflanzen

(A): Dargestellt ist das Autoradiogramm eines Northern Blots (Kap. 2.4.2) nach Hybridisierung mit einer *DHODH*-spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente ein Formaldehydgel, bei dem jede Spur mit 10 µg Gesamt-RNA beladen wurde.

(B): Dargestellt ist eine qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.4.3) des *DHODH*-Transkriptgehalts. Die Daten wurden auf die Expression des housekeeping-Gens *Ef1a* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

Bei den durchgeführten Northern-Blot-Analysen konnte in allen drei *DHODH*-Überexpressionslinien eine Detektion durch die spezifische, radioaktiv markierte Sonde erfolgen, der Transkriptgehalt des Wildtyps dagegen lag unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 3.38 A).

Die zusätzlich durchgeführten qRT-PCR-Analysen bestätigten die gesteigerten Transkriptgehalte in den 35S:*DHODH*-Pflanzen. So zeigte die Linie 5 eine 41-fache, die

Linie 6 eine 135-fache und die Linie 1 sogar eine 179-fache Steigerung des *DHODH*-Transkriptgehalts im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen.

3.12 Bestimmung der Dihydroorotat-Dehydrogenase-Aktivität

Im vorangegangenen Abschnitt konnte bereits gezeigt werden, dass die untersuchten 35S:*DHODH*-Pflanzen im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen erhöhte *DHODH*-Transkriptgehalte aufweisen. Um zu überprüfen, ob diese verstärkte *DHODH*-Expression in den entsprechenden Überexpressionspflanzen auch zu einer gesteigerten *DHODH*-Aktivität führt, wurde diese in pflanzlichen Rohextrakten gemessen. Die ermittelten Daten aus diesen Versuchen sind in Abb. 3.39 dargestellt.

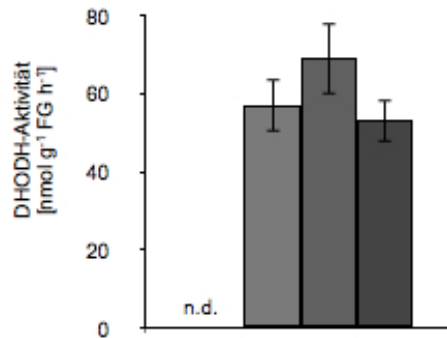


Abb. 3.39: *DHODH*-Aktivität von Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener 35S:*DHODH*-Mutanten

Die *DHODH*-Aktivitätsmessung (Kap. 2.4.7) wurde mit angereicherten Mitochondrien 6 Wochen alter Pflanzen durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm SE). n.d., nicht detektierbar.

■ Wildtyp ■ 35S:*DHODH* 5 ■ 35S:*DHODH* 6 ■ 35S:*DHODH* 1

Die Veränderungen des *DHODH*-Transkriptgehaltes hatten entsprechende Auswirkungen auf die *DHODH*-Aktivität in den untersuchten angereicherten Mitochondrien. Während die *DHODH*-Aktivität in den Mitochondrien der *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnte in den Mitochondrien-Proben aller drei *DHODH*-Überexpressionspflanzen ein Dihydroorotat-Umsatz gemessen werden. Diese lag zwischen 53 und 69 nmol g⁻¹FG h⁻¹ (Abb. 3.39).

Die generierten *DHODH*-Überexpressionspflanzen zeigten weder eine gesteigerte Resistenz gegenüber den toxischen Pyrimidinderivaten 5-Fluorouracil oder 5-Fluorouridin noch einen erhöhten Uracilkatabolismus (Daten nicht gezeigt).

3.13 Physiologische Untersuchungen transgener *DHODH*-Pflanzen

3.13.1 Untersuchungen zur pflanzlichen Entwicklung

Die Pyrimidin-*de novo*-Synthese ist ein lebensnotwendiger Prozess für die Pflanze. Besonders in Zeiten raschen Wachstums und damit verbunden erhöhter Zellteilung ist die Bereitstellung neu synthetisierter Pyrimidin-Grundgerüste von essentieller Bedeutung (ZRENNER *et al.*, 2006). Für jeden enzymatischen Schritt der Pyrimidin-*de novo*-Synthese gibt es genau ein Gen, weshalb spekuliert wurde, dass der Verlust eines dieser Gene für die Pflanze letal ist (GIERMANN *et al.*, 2002; SCHRÖDER *et al.*, 2005; ZRENNER *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden funktionelle Untersuchungen bezüglich des Gens *DHODH* mit Pflanzen durchgeführt, die einen verminderten bzw. erhöhten *DHODH*-Transkriptgehalt aufweisen. In Abb. 3.40 sind die verschiedenen *DHODH*-Genotypen in ihrer frühen pflanzlichen Entwicklung dargestellt.

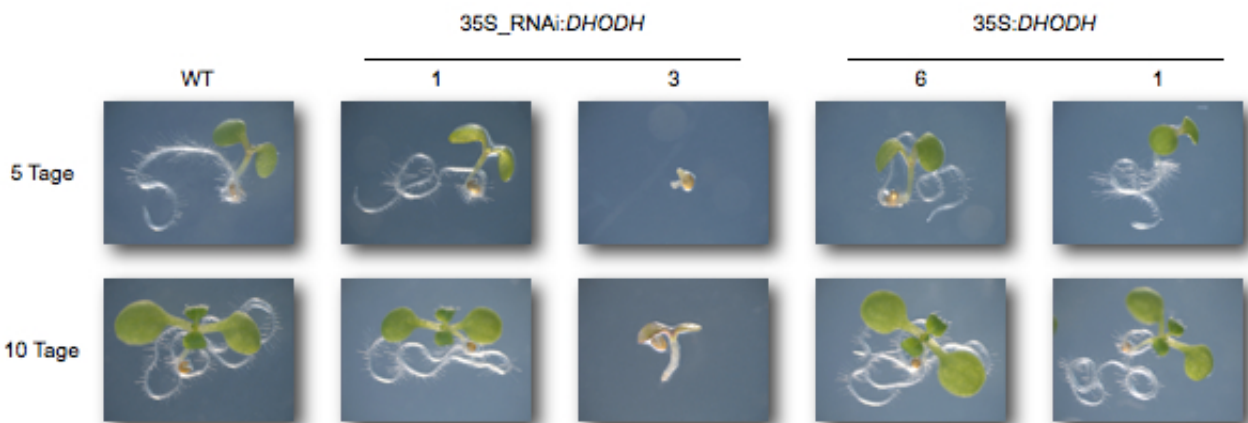


Abb. 3.40: Keimlings-Entwicklung von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp und verschiedenen *DHODH*-Mutanten

Dargestellt sind 5 und 10 Tage alte *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge auf MS-Agar-Platten. Die Samen wurden 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen inkubiert. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt.

5 Tage alte *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlinge zeigten zwei vollständig entwickelte, grüne Keimblätter und eine ausgeprägte, mit Wurzelhaaren bedeckte Wurzel, ebenso die *DHODH*-Überexpressions-Keimlinge sowie die *DHODH*-RNAi-Linie 1. Die Keimlinge der Linie 3 dagegen zeigten zu diesem Zeitpunkt lediglich die ersten Ansätze einer Primärwurzel und von rötlich-braunen Keimblättern (Abb. 3.40). Die stark beeinträchtigte Entwicklung der 35S_RNAi:*DHODH*-Keimlinge der Linie 3 war nach 10 Tagen noch deutlicher zu beobachten. Während die Keimlinge aller anderen Linien, einschließlich der Wildtyp-Keimlinge, zusätzlich zu den Keimblättern auch zwei Primärblätter entwickelt

hatten, bestanden die 35S_RNAi:DHODH-Keimlinge der Linie 3 lediglich aus zwei kleinen, rötlich-braunen Keimblättern und einem Wurzelstumpf ohne Wurzelhaare (Abb. 3.40).

Die Auswirkungen des drastischen Phänotyps der Linie 3 der 35S_RNAi:DHODH-Pflanzen wurde auch später in der Entwicklung untersucht. In Abb. 3.41 sind die Rosetten 6 Wochen alter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gezeigt.

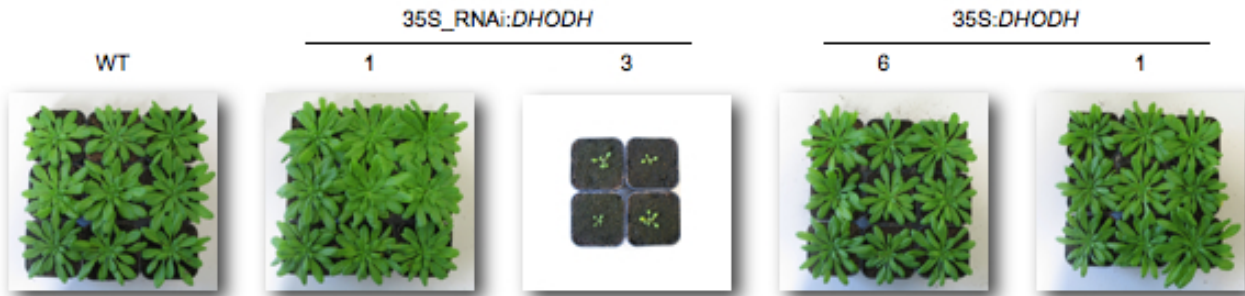


Abb. 3.41: 6 Wochen alte Rosetten von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp und verschiedenen DHODH-Mutanten

Dargestellt sind die Rosetten 6 Wochen nach Aussaat. Die Samen wurden 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen im Kurztag angezogen. Die verwendeten Samen waren alle gleich alt.

Während sowohl 6 Wochen alte *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen als auch die Pflanzen der 35S:DHODH-Linien 6 und 1 und die Pflanzen der 35S_RNAi:DHODH-Linie 1 ähnlich große, voll entwickelte Rosetten aufwiesen, waren die Individuen der DHODH-RNAi-Linie 3 deutlich kleiner und hatten zu diesem Zeitpunkt lediglich einige wenige, kleine Blätter entwickelt (Abb. 3.41). Zudem überlebten nur wenige Individuen dieser RNAi-Linie.

Mit etwa 3 Monaten hatten die Pflanzen der verschiedenen DHODH-Genotypen ihren Lebenszyklus vollendet; sie waren vollständig abgereift und hatten reproduktionsfähige Samen entwickelt. Lediglich Pflanzen der DHODH-RNAi-Linie 3 waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht so weit entwickelt. In Abb. 3.42 ist eine 3 Monate alte heterozygote DHODH-RNAi-Pflanze der Linie 3 gezeigt.



Abb. 3.42: 3 Monate alte heterozygote 35S_RNAi:DHODH 3-Pflanze

Dargestellt ist eine heterozygote 35S_RNAi:DHODH 3-Pflanze 3 Monate nach Aussaat. Die Samen wurden 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend unter den in Tab. 2.1 aufgeführten Bedingungen im Kurztag angezogen.

In Abb. 3.42 ist eine 3 Monate alte heterozygote DHODH-RNAi-Pflanze der Linie 3 dargestellt. Pflanzen dieser Linie zeigten ein stark verlangsamtes Wachstum gegenüber *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen, welche zu diesem Zeitpunkt bereits Samen produziert hatten. Außerdem wiesen die heterozygoten 35S_RNAi:DHODH 3-Pflanzen einen zwergenhaften Phänotyp auf, der sich auch in der Ausbildung eines gedrungenen, buschartigen Sprosses äußerte (Abb. 3.42).

3.13.2 Analyse des Frischgewichts

Die Biomasse stellt einen guten Indikator für die pflanzliche Vitalität dar. In Abb. 3.43 ist das Frischgewichts der verschiedenen DHODH-Mutanten dargestellt.

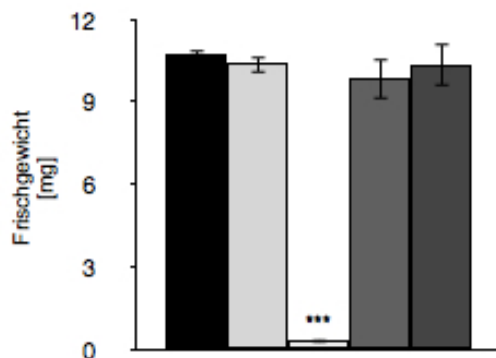


Abb. 3.43: Frischgewicht eines 10 Tage alter Arabidopsis thaliana-Wildtyp-Keimlings und der Keimlinge der verschiedenen DHODH-Mutanten

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in steriler Flüssigkultur wie in Kap. 2.2.4 beschrieben. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet und gravitrometrisch das Frischgewicht bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehr als 5 biologischen Replikaten (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ 35S_RNAi:DHODH 1 □ 35S_RNAi:DHODH 3 ■ 35S:DHODH 6 ■ 35S:DHODH 1

Ein 10 Tage alter, in steriler Flüssigkultur unter optimaler Nährstoffversorgung angezogener *Arabidopsis thaliana*-Keimling wog 10,7 mg. Im gleichen Bereich befand sich das Gewicht der 35S:*DHODH*-Keimlinge (9,9 und 10,4 mg) und das Keimlingsgewicht der im Transkriptgehalt nur leicht reduzierten *DHODH*-RNAi-Linie 1 (10,4 mg). Das Gewicht homozygoter Keimlinge der im *DHODH*-Transkriptgehalt deutlich reduzierten RNAi-Linie 3 dagegen war mit 0,3 mg deutlich auf lediglich 3% des Wildtyp-Frischgewichts reduziert (Abb. 3.43).

3.13.3 Analyse des Chlorophyllgehalts

Der Chlorophyllgehalt der verschiedenen *DHODH*-Mutanten ist in Abb. 3.44 dargestellt.

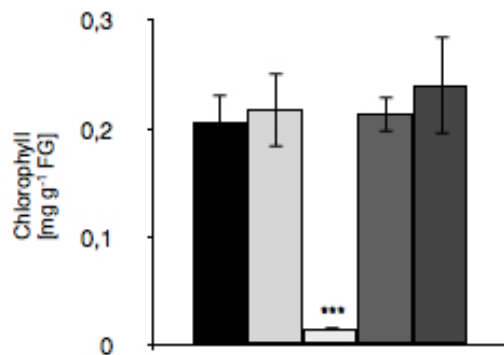


Abb. 3.44: Chlorophyllgehalt von 10 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *DHODH*-Mutanten angezogen in steriler Flüssigkultur

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in steriler Flüssigkultur wie in Kap. 2.2.4 beschrieben. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 100 mg zur Chlorophyll-Extraktion eingesetzt (Kap. 2.6.4). Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ 35S_RNAi:DHODH 1 □ 35S_RNAi:DHODH 3 ■ 35S:DHODH 6 ■ 35S:DHODH 1

Der Chlorophyllgehalt war mit 0,21 bis 0,24 mg g⁻¹FG in Wildtyp-, *DHODH*-Überexpressionspflanzen und in 35S_RNAi:DHODH-Keimlingen der Linie 1 in etwa gleich. Lediglich die Keimlinge der in ihrem *DHODH*-Transkriptgehalt deutlich reduzierten RNAi-Linie 3 wiesen mit 0,02 mg g⁻¹FG einen stark reduzierten Gehalt an Chlorophyll auf (Abb. 3.44).

3.13.4 Analyse des RNA-Gehalts

RNA stellt einen guten Marker für die Pyrimidin-Verfügbarkeit dar. In Abb. 3.45 sind die RNA-Gehalte der verschiedenen *DHODH*-Mutanten dargestellt.

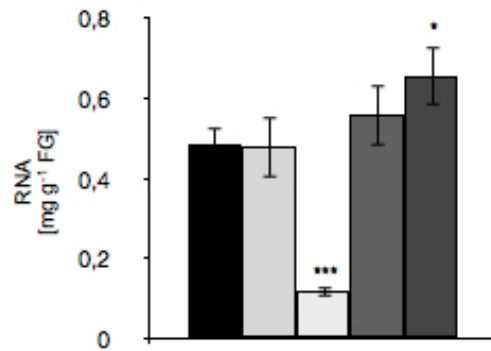


Abb. 3.45: RNA-Gehalt von 10 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener *DHODH*-Mutanten angezogen in steriler Flüssigkultur

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in steriler Flüssigkultur wie in Kap. 2.2.4 beschrieben. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und je 100 mg zur RNA-Extraktion eingesetzt (Kap. 2.4.2). Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten (\pm SE). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,005$ jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ 35S_RNAi:DHODH 1 □ 35S_RNAi:DHODH 3 ■ 35S:DHODH 6 ■ 35S:DHODH 1

Mit 0,56 und 0,65 mg g⁻¹FG wiesen die Keimlinge der beiden *DHODH*-Überexpressionslinien die höchsten RNA-Gehalte auf, gefolgt von den *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen (0,49 mg g⁻¹FG) und den Keimlingen der *DHODH*-RNAi-Linie 1 (0,48 mg g⁻¹FG). Der RNA-Gehalt der 35S_RNAi:DHODH-Keimlinge der Linie 3 war mit 0,12 mg g⁻¹FG auf ein Viertel im Vergleich zu den Wildtyp-Keimlingen reduziert (Abb. 3.45).

3.13.5 Untersuchungen zur Veratmung von Glukose

Es wurde postuliert, dass das Protein DHODH an der äußeren Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (CHRISTOPHERSON & SZABADOS, 1997; DOREMUS & JAGENDORF, 1985; ULLRICH *et al.*, 2002). In Tieren konnte zudem gezeigt werden, dass es dort als Flavoprotein an die Atmungskette gekoppelt ist. So führt die Oxidation von Dihydroorotat zur Reduktion von Flavinmononukleotid (FMN), dessen Oxidation wiederum Ubichinon (Q_D) reduziert (ANGERMÜLLER & LÖFFLER, 1995; CHEN & JONES, 1976; KAUFER *et al.*, 2004; RAWLS *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang war es interessant zu untersuchen, ob eine veränderte *DHODH*-Expression zu einer veränderten Glukose-Veratmung führt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 3.46 A dargestellt.

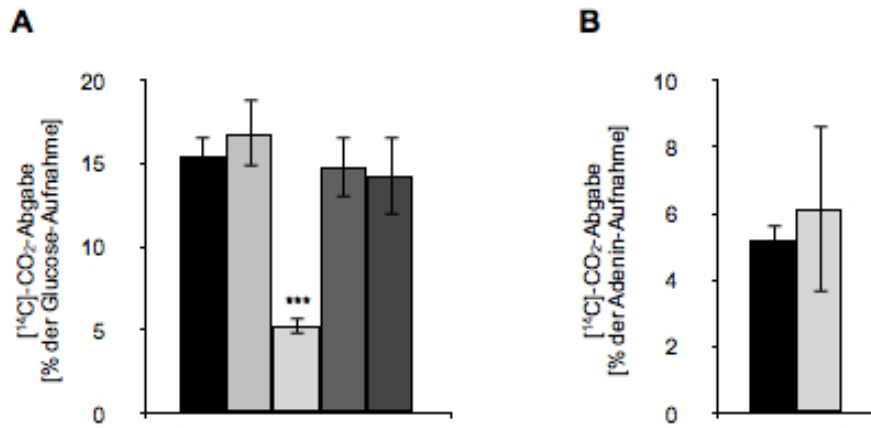


Abb. 3.46: Abbau von [14C]-Glukose zu [14C]-CO₂

Es wurden 10 Tage alte Keimlinge aus steriler Flüssigkultur verwendet (Kap. 2.2.4). Die Inkubation erfolgte in

(A) Wasser mit 100 µM [14C]-markierter Glukose bzw.

(B) Kontrollmedium (+N) mit 5 µM [14C]-markiertem Adenin (Kap. 2.4.4).

Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SE) aus mehr als 5 biologischen Replikaten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt und ist in der Abbildung mit *** für p<0,005 jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Probe angegeben.

■ Wildtyp □ 35S_RNAi:DHODH 1 ▤ 35S_RNAi:DHODH 3 ■ 35S:DHODH 6 ■ 35S:DHODH 1

Die Rate der Glukose-Veratmung war mit etwa 15% in Wildtyp-, *DHODH*-Überexpressionspflanzen und in 35S_RNAi:*DHODH*-Keimlingen der Linie 1 in etwa gleich. Die Keimlinge der in ihrem *DHODH*-Transkriptgehalt deutlich reduzierten RNAi-Linie 3 veratmeten mit 5% der aufgenommenen Glukose im Vergleich zu Wildtyp-Keimlingen nur etwa ein Drittel (Abb. 3.46 A).

Um auszuschließen, dass der gezeigte Effekt nur eine Folge des drastischen Phänotyps der *DHODH*-Überexpressions-Keimlinge der Linie 3 war, wurde der gleiche radioaktive Assay mit [14C]-Adenin durchgeführt (Abb. 3.46 B). In diesem Fall war der Abbau des aufgenommenen Adenins in Wildtyp- und 35S_RNAi:*DHODH*-Keimlingen der Linie 3 in etwa gleich.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die physiologische Funktion der Dihydrouracil-Dehydrogenase (P_{yd}1) im Pyrimidin-Abbau von *Arabidopsis thaliana* zu analysieren. Das plastidär lokalisierte Enzym P_{yd}1 leitet den dreistufigen Abbauprozess der Pyrimidin-Nukleobasen ein (ZRENNER *et al.*, 2009).

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der physiologischen Bedeutung des Pyrimidin-Abbaus im Allgemeinen und dem Enzym P_{yd}1 im Speziellen im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana*. Es wurden transgene Pflanzen generiert, um die Auswirkungen einer fehlenden oder erhöhten bzw. einer zytosolischen statt plastidären P_{yd}1-Expression auf den pflanzlichen Stoffwechsel untersuchen zu können. Dabei fanden 3 Stadien in der pflanzlichen Entwicklung besondere Bedeutung: Keimung, Stickstoffmangel und Seneszenz.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob ein weiteres Dihydrouracil-Dehydrogenase-Enzym existiert. Bei dem nächsten Homolog in *Arabidopsis thaliana* handelt es sich um das Pyrimidin-*de novo*-Synthese-Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH). Durch Herstellung transgener Pflanzen mit sowohl erhöhter als auch reduzierter DHODH-Expression konnten Auswirkungen der DHODH auf den Metabolismus und das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* studiert werden.

4.1 Die physiologische Bedeutung von P_{yd}1

Um die physiologische Funktion von P_{yd}1 im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen wurden eine Reihe korrespondierender Mutanten generiert. Im Einzelnen waren dies die beiden unabhängigen homozygoten T-DNA-Insertionslinien P_{yd}1-1 und P_{yd}1-2; zudem wurden konstitutive Überexpressionspflanzen generiert, bei denen das Gen P_{yd}1 unter die Kontrolle des Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotors (CaMV 35S) gestellt wurde (35S:P_{yd}1). Die molekulare Charakterisierung der verwendeten Pflanzen belegte den totalen Verlust des P_{yd}1-Transkripts in den P_{yd}1-„knockout“-Mutanten (Abb. 3.3 D) bzw. im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen bis zu 156-fach gesteigerte P_{yd}1-Transkriptgehalte in den P_{yd}1-Überexpressionsmutanten (Abb. 3.4).

Diese gesteigerten Transkriptgehalte äußerten sich auch in einer erhöhten Pyrimidinabbau-Kapazität. In 10 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen wurde die Freisetzung von Kohlenstoffdioxid (CO₂) aus exogen applizierten [¹⁴C]-Pyrimidinen

gemessen (Abb. 3.9 und Abb. 3.10), also deren vollständige Degradierung. Es zeigte sich, dass die [^{14}C]- CO_2 -Freisetzung aus dem *Pyd1*-Edukt Uracil in den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen drastisch reduziert war und in den Überexpressionspflanzen mehr als doppelt so effektiv stattfand als in den *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen (Abb. 3.9 B). Die Uracil-Aufnahme dagegen war in allen untersuchten Pflanzenlinien gleich (Daten nicht gezeigt).

Neben Uracil existieren noch zwei weitere Pyrimidin-Nukleobasen: Cytosin und Thymin. Während Cytosin im pflanzlichen Stoffwechsel nicht vorkommt (ZRENNER *et al.*, 2006), wird Thymin über den gleichen Weg wie Uracil abgebaut. Endprodukt ist in diesem Fall neben NH_4^+ und CO_2 nicht β -Alanin, sondern 3-Amino-Isobutanoat. Der Thymin-Katabolismus verhielt sich analog zur Uracil-Degradierung (Abb. 3.10).

Das Nukleosid Uridin kann unter Abspaltung der Ribose zu Uracil hydrolysiert werden (JUNG *et al.*, 2009), welches dann als Edukt der *Pyd1*-Reaktion bereitsteht. Auch der Uridin-Katabolismus war in den *Pyd1*-Überexpressionspflanzen im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen erhöht und in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen drastisch reduziert (Abb. 3.9 A).

Die Effizienz des Pyrimidinabbaus scheint entscheidend mit der Aktivität von *Pyd1* zusammenzuhängen.

Der Katabolismus von Dihydrouracil, dem Produkt der *Pyd1*-Reaktion, lag sowohl in den *Pyd1*-„knockout“- als auch in den *Pyd1*-Überexpressionspflanzen auf Wildtyp-Niveau (Abb. 3.9 C).

Im Einklang mit den erhöhten Uracil-Abbauraten in den *Pyd1*-Überexpressionspflanzen und der drastisch reduzierten [^{14}C]- CO_2 -Freisetzung aus Uracil in den *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen steht das veränderte Wachstum auf dem fluorierten und damit toxischen Pyrimidinderivat 5-Fluorouracil (FU) (Abb. 3.6 und Abb. 3.7).

Gelangen fluorierte Pyrimidinderivate in den pflanzlichen Stoffwechsel, entfalten sie ihre toxische Wirkung vor allem in Form von 5-Fluoro-Desoxy-Uridinmonophosphat (F-dUMP). Diese aktive zytotoxische Form hemmt durch Bildung eines stabilen Komplexes die Thymidylat-Synthase, welche essentiell für die Synthese von Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP) ist. Durch die damit verbundene Inhibierung der DNA-Synthese kommt die Zellteilung zum Erliegen und das Wachstum stoppt (DANENBERG, 1977). Zudem kann eine Metabolisierung zu Fluoro-Uridintriphosphat (F-UTP) zum Einbau in RNA führen, was die Bildung anormaler, nicht funktioneller Proteine zur Folge hat (HAKALA & RUSTRUM, 1979; DAHER *et al.*, 1990).

Diese Eigenschaften machen fluoridierte Pyrimidinanaloga zu geeigneten Chemotherapeutika zum Einsatz in der Krebstherapie. Auch zur Untersuchung verschiedener Stoffwechselforgänge haben sich toxische Analoga von Pyrimidinen wie 5-Fluorouracil (FU) und 5-Fluorouridin (FD) als geeignete Hilfsmittel etabliert. So konnte zum Beispiel durch Wachstumsanalysen von *AtENT3*-„knockout“-Pflanzen auf 5-Fluorouridin gezeigt werden, dass dieses Transportprotein eine essentielle Rolle bei der Aufnahme von Nucleosiden aus der Rhizosphäre spielt (TRAUB *et al.*, 2007) und Wachstumsanalysen diverser *NSH1* (früher *URH1*)-Mutanten auf 5-Fluorouridin unterstrichen die Bedeutung dieser Hydrolase im Pyrimidin-Stoffwechsel (JUNG *et al.*, 2009).

Die stark verminderte Resistenz der *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen gegenüber 5-Fluorouracil (Abb. 3.6) und 5-Fluorouridin (Daten nicht gezeigt) erklärt sich durch den Verlust der Abbaufähigkeit ebendieser Substanzen. Einmal in den pflanzlichen Stoffwechsel importiert, können die toxischen Derivate nicht mehr durch Abbau entgiftet werden, ihnen bleibt nur der Einbau in den Nucleotidpool über Salvage Pathway-Reaktionen. Im Gegensatz dazu sind Pflanzen mit gesteigerter *Pyd1*-Expression und damit erhöhter [¹⁴C]-CO₂-Freisetzung durch den verstärkten Abbau von 5-Fluorouracil (Abb. 3.7) und 5-Fluorouridin (Daten nicht gezeigt) in weniger toxische Metabolite zu einer besseren Entgiftung in der Lage. So kann das entstehende, nicht toxische Endprodukt des Pyrimidinkatabolismus Fluoro- β -Alanin möglicherweise zu β -Aminoacrylat defluoriert werden (PORTER *et al.*, 1995).

Arabidopsis thaliana-Pflanzen mit verstärkt exprimierter *NSH1* zeigten ebenfalls ein leicht verbessertes Wachstum auf 5-Fluorouracil (JUNG *et al.*, 2009). Es wurde postuliert, dass ein Verschieben des Uridin/Uracil-Verhältnisses in Richtung Uracil zu einer erhöhten Abbaurrate, eingeleitet durch die Reaktion der *Pyd1* führt, da die Aktivität des Salvage Pathway-Enzyms Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase) unverändert war (JUNG *et al.*, 2009).

Andererseits stellt sich die Frage, weshalb sich eine veränderte *Pyd1*-Aktivität auf den Katabolismus von Uridin auswirkt. Im Fall einer *Pyd1*-Überexpression verschiebt sich durch den erhöhten Uracil-Abbau das Uridin/Uracil-Verhältnis in Richtung Uridin, wodurch es zur verstärkten Umsetzung ebendieses Substrates kommt.

Generell wäre aus physiologischer Sicht damit zu rechnen, dass bei veränderter *Pyd1*-Aktivität auch andere Gene des Pyrimidin-Stoffwechsels in ihrer Expression und/oder die entsprechenden Translationsprodukte in ihrer Aktivität von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen abweichen. So zeigten Pflanzen mit verminderter Aspartat-Transcarbamylase (ATCase)-Aktivität, einem wichtigen Enzym der Pyrimidin-*de novo*-Synthese neben einem

drastisch retardierten Wachstumsphänotyp eine verminderte *Pyd1*-Expression und eine erhöhte Expression des Salvage Pathway-Enzyms UPRTase (CHEN & SLOCUM, 2008).

In einer von *Pyd1-1* und *Pyd1-2* unabhängigen T-DNA-Insertionsmutante wurde eine im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen erhöhte Expression (2- bis 5-fach) aller *de novo*-Synthesegene detektiert (ZRENNER *et al.*, 2006). Diese Regulation aber scheint kontraproduktiv: möglicherweise erhöhte Neusynthese in Geweben, in denen die Degradation blockiert ist. Eigene Untersuchungen der *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen lieferten keine veränderten Transkriptgehalte der *de novo*-Synthesegene (Daten nicht gezeigt).

Prinzipiell können sowohl die Nukleobase Uracil als auch das Nukleosid Uridin über Reaktionen des Salvage Pathway zum Nukleotid UMP recycelt werden (BOLDT & ZRENNER, 2003; MOFFAT & ASHIHARA, 2002; ZRENNER *et al.*, 2006). Weder für die Reaktion der UPRTase noch für die der Uridin-Kinase (UK) konnten jedoch Unterschiede in der Aktivität zwischen *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp- und transgenen *Pyd1*-Keimlingen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In einer von *Pyd1-1* und *Pyd1-2* unabhängigen *Arabidopsis thaliana*-T-DNA-Insertionsmutante wurde eine im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auf ein Drittel reduzierte Expression der UPRTase detektiert (ZRENNER *et al.*, 2009). Sollte dies tatsächlich der Fall sein (eigene Untersuchungen mit *Pyd1-1* und *Pyd1-2* konnten dies nicht bestätigen), führt diese Änderung im Transkriptgehalt jedoch nicht zu einer veränderten Aktivität des entsprechenden Enzyms. Ein veränderter Pyrimidin-Abbau hat demnach keine Kompensation durch Salvage Pathway-Aktivitäten zur Folge. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Cosubstrat der UPRTase-Reaktion, 5-Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) der Grund für die Limitierung des Uracil-Salvage ist, denn Mutanten der PRPP-Synthese zeigten, dass dieses Metabolit Einfluss auf die Wachstumsraten von *Arabidopsis thaliana* nimmt (KOSLOWSKY *et al.*, 2008).

Ebenso wie bereits für *NSH1*-Überexpressionskeimlinge gezeigt (JUNG *et al.*, 2009), wiesen auch die 35S:*Pyd1*-Keimlinge eine erhöhte Resistenz gegenüber 5-Fluoroorotat (FO) auf (Daten nicht gezeigt). Orotat ist ein Intermediat der Pyrimidin-*de novo*-Synthese. Die erhöhte Resistenz wies auf einen kontinuierlichen Austausch zwischen Nukleotid-, Nukleosid- und Nukleobasen-Pool hin (JUNG *et al.*, 2009). Die Wachstumsanalysen mit den *Pyd1*-Mutanten bestätigen diese Theorie.

Bisher ist es noch niemandem gelungen, *Pyd1*-Aktivität in pflanzlichen Extrakten oder rekombinant in *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* (TINTEMANN *et al.*, 1985; ZRENNER *et al.*, 2009; eigene, nicht gezeigte Daten) direkt zu messen. Möglicherweise kann dies durch das Fehlen einer N-terminalen Domäne mit einem Eisen/Schwefel-Cluster und einer Bindestelle für die Kofaktoren NAD(P)H (Nicotinamidadenindinukleotid

(phosphat)) und FAD (Flavinadenindinukleotid) in der pflanzlichen Pyd1-Proteinsequenz erklärt werden (ZRENNER *et al.*, 2009). Zur Ausübung der Pyd1-Reaktion werden derartige Domänen aber zwingend gebraucht, möglicherweise in Form eines weiteren ebenfalls plastidär lokalisierten Proteins. Dieser erforderliche Interaktionspartner konnte jedoch bislang nicht identifiziert werden.

Möglicherweise stellt ebendieser Interaktionspartner auch den Grund für die plastidäre Lokalisierung des Enzyms Pyd1 dar. Die zusätzlich generierten Pflanzen, bei denen durch Entfernen der Targetsequenz das Enzym Pyd1 zytosolisch lokalisiert war (35S: Δ 21-*Pyd1*), was entsprechende GFP-Analysen verifizierten (Abb. 3.2), hatten im *Pyd1-1*-Hintergrund im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen bis zu 34-fach gesteigerte *Pyd1*-Transkriptgehalte (Abb. 3.5). Dennoch war keine der 35S: Δ 21-*Pyd1*-Mutanten in der Lage [14 C]-Uracil zu [14 C]-CO₂ zu degradieren (Abb. 3.11) oder auf dem toxischen Derivat 5-Fluorouracil im Vergleich zur „knockout“-Mutante *Pyd1-1* verbessertes Wachstum zu zeigen (Abb. 3.8). Dies legt den Schluss nahe, dass Pyd1 im Zytosol nicht aktiv sein kann, weil der entsprechende Interaktionspartner hier nicht vorhanden ist. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein durch das Verkürzen der Sequenz seine Funktionalität verloren hat.

4.1.1 *Pyd1* ist essentiell für die Keimung

Bei der Analyse der generierten *Pyd1*-Mutanten ließen sich dramatische Unterschiede den Keimungszeitpunkt betreffend beobachten. Samen beider *Pyd1*-„knockout“-Mutanten keimten etwa 2 Tage später als entsprechend alte *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Samen (Abb. 3.12). Die 35S:*Pyd1*-Samen betreffend konnte eine geringfügig beschleunigte Keimung gegenüber Wildtyp-Samen beobachtet werden (Abb. 3.12). Die Messung des Blattfarbstoffs Chlorophyll verdeutlichte diese drastisch unterschiedliche Keimlingsentwicklung der verschiedenen *Pyd1*-Mutanten (Abb. 3.13).

Keimung ist ein hochregulierter Prozess, der von Umweltfaktoren beeinflusst wird (BENTSINK & KOORNNEEF, 2002). Während der Keimung werden Speichervorräte wie Proteine und Triacylglycerine abgebaut und erlauben die Synthese neuer, dem jeweiligen Stoffwechselbedarf angepasster Proteine. Um diese Protein-Biosynthese zu ermöglichen besteht ein großer Bedarf an RNA und damit Nukleotiden (BEWLEY, 1997). Sowohl die Nukleotid-*de novo*-Synthese als auch Salvage Pathway-Reaktionen spielen deshalb bei der Keimung und der frühen Keimlingsentwicklung eine bedeutende Rolle.

Es konnte zwar gezeigt werden, dass während den ersten Stunden der Keimung eine hohe Salvage Pathway-Aktivität vorhanden ist, wohingegen die Gene der *de novo*-Synthese noch nicht induziert waren (STASOLLA *et al.*, 2003), allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass die Nukleotid-*de novo*-Synthese durchaus ein wichtiger Prozess während der Keimung ist. So hemmt PALA (*N*-(phosphonacetyl)-L-aspartat), ein spezifischer Inhibitor der Pyrimidin-*de novo*-Synthese die Keimung von *Arabidopsis thaliana*-Samen (BASSETT *et al.*, 2003). Weiterhin zeigen „knockout“-Pflanzen des plastidären Adenylat-Uniporters *AtBt1*, der das Zytosol mit den Endprodukten der Purin-*de novo*-Synthese versorgt, eine drastisch reduzierte Keimungseffizienz (KIRCHBERGER *et al.*, 2008).

Arabidopsis thaliana-„knockout“-Pflanzen des Salvage Pathway-Gens *UPRTase* bildeten in der frühen Entwicklungsphase farblose Keimblätter aus und produzierten weniger lebensfähige Samen als Wildtyp-Pflanzen (MAINGUET *et al.*, 2009). Untersuchungen einer Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) ergaben bei entsprechenden „knockout“-Pflanzen eine verminderte Keimungsrate, während in den Überexpressionspflanzen eine erhöhte Keimungseffizienz beobachtet wurde (LIU *et al.*, 2007). Diverse Mutanten der Uridin-Nukleosidase *NSH1* zeigten eine verlangsamte Keimung (JUNG *et al.*, 2009). Dessen Translationsprodukt wird eher eine Funktion im Nukleotid-Abbau als im Salvage Pathway zugeschrieben (JUNG *et al.*, 2009). Mit den drastischen Keimungsunterschieden der *Pyd1*-Mutanten ist nun zweifelsohne klar, dass auch der Nukleotidkatabolismus ein wichtiger Prozess während der Keimung ist. Dafür spricht auch, dass *Pyd1* während der Mitose verstärkt exprimiert wird (ASCENCIO-IBANEZ *et al.*, 2008). Dies bedeutet, dass *Pyd1* in Zeiten verstärkter Zellteilung und damit während Wachstumsprozessen von Bedeutung ist.

Es konnten Auswirkungen der unterschiedlichen Keimungseffizienz der *Pyd1*-Mutanten auf die weitere pflanzliche Entwicklung beobachtet werden. So hatten 4 Wochen alte *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen deutlich kleinere Rosetten als entsprechende *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen, die Rosettenfläche der 35S:*Pyd1*-Pflanzen war größer (Abb. 3.14). Die Ausbildung einer Infloreszenz fand zunächst in den *Pyd1*-Überexpressionspflanzen statt, gefolgt von Wildtyp-Pflanzen, während die entsprechenden „knockout“-Pflanzen zuletzt eine Sprossachse entwickelten (Abb. 3.15). Auch die Reproduktionsfähigkeit der *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurde durch eine Mutation *Pyd1* betreffend verändert. *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen entwickelten weniger und durchschnittlich kleinere Schoten mit dementsprechend weniger Samen, die 35S:*Pyd1*-Pflanzen besaßen mehr Schoten und Samen (Abb. 3.16).

Diese weitreichenden Konsequenzen der unterschiedlichen Keimungszeitpunkte rechtfertigten eine umfangreiche Analyse der möglichen Ursachen:

Keimung und Keimlingsentwicklung sind kritische Phasen im Leben einer Pflanze, während der die Keimlinge ihren Metabolismus den jeweiligen Umweltbedingungen anpassen müssen (HOLDSWORTH *et al.*, 1999). Dabei dienen die Reserven in den Samen als initiale Kohlenstoff- und Energiequelle für das Keimlingswachstum (BRADBEER, 1988). Somit ist die Ausstattung der Samen ein entscheidender Faktor bei der Keimung.

Eine Nitrat-Akkumulation in der Mutterpflanze und den Samen führt beispielsweise zu einer verkürzten Samenruhe und auch eine exogene Nitrat-Gabe stimuliert die Keimung (BENTSINK & KOORNNEEF, 2002; ALBORESI *et al.*, 2005).

Pflanzen mit einem Defekt in einer Acyl-Acyl Carrier Protein-Thioesterase, ein wichtiges Enzym der Fettsäure-Synthese produzieren Samen mit einer geringen Lebensfähigkeit und einer veränderten Morphologie (BONAVENTURE *et al.*, 2003). *Arabidopsis thaliana*-Samen speichern Lipide in Form von Triacylglycerol (TAG) als Hauptkohlenstoffreserve, die nach der Keimung zum Keimlingswachstum genutzt wird (BEWLEY & BLACK, 1994). Pflanzen mit Mutationen in der TAG-Synthese entwickeln Samen mit deutlich geringeren Lipidkonzentrationen (KATAVIC *et al.*, 1995; LU & HILLS, 2002; ROUTABOUL *et al.*, 1999).

Im Fall der transgenen *Pyd1*-Pflanzen waren weder die Stickstoff- und Kohlenstoff-Gehalte (Tab. 3.1) unterschiedlich zu denen in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen, noch wurden verschiedene Lipid- oder Proteinkonzentrationen (Tab. 3.2) festgestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Edukt der *Pyd1*-Reaktion, Uracil, in den beiden *Pyd1*-„knockout“-Pflanzenlinien stark ansteigt. Die trockenen „knockout“-Samen besaßen bis zu 50-fach erhöhte Uracilgehalte im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Samen (Abb. 3.17 A). Generell war in allen untersuchten *Pyd1*-„knockout“-Gewebe der Uracilgehalt im Vergleich zu den entsprechenden Gewebe der Wildtyp-Pflanzen erhöht (Abb. 3.17, Abb. 3.18, Abb. 3.27, Abb. 3.31).

Im Windenknöterich (*Polygonum convolvulus* L.) werden die Pyrimidinbasen Uracil, Thymin und Cytosin als Keimungsstimulatoren beschrieben (DEYSSON, 1953; TIMSON, 1966). Die optimale Uracil-Konzentration liegt hierbei zwischen 1 mM und 10 mM. In Pflanzen mit intaktem Stoffwechsel können importierte Nukleobasen entweder über die Reaktion der UPRTase recycelt und somit dem Nukleotid-Pool zugänglich gemacht werden oder, eingeleitet über die *Pyd1*-Reaktion, zu β -Alanin, Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Ammonium (NH₄⁺) abgebaut werden (ZRENNER *et al.*, 2006). Die stimulierende Wirkung auf die Keimung könnte zum Einen aus den vermehrt zur Verfügung stehenden Pyrimidin-Grundgerüsten resultieren, aber auch ein positiver Effekt der möglicherweise vermehrt

anfallenden Abbauprodukte ist denkbar, zumal in *Arabidopsis thaliana* 1 mM Uracil zur Expressionssteigerung aller drei Pyrimidin-Abbaugene führt (ZRENNER *et al.*, 2009).

Arabidopsis thaliana-Wildtyp-Pflanzen allerdings verhielten sich auf MS-Agar mit bis zu 10 mM Uracil wie bei Anzucht ohne Uracil (Daten nicht gezeigt). Somit kann sowohl ein stimulierender als auch ein toxischer Effekt von Uracil auf die Keimung von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen unter den getesteten Anzuchtbedingungen ausgeschlossen werden.

Zucker sind nicht nur Substrate des Kohlenstoff- und Energiestoffwechsels, sondern agieren auch als Signalmoleküle in der pflanzlichen Entwicklung (ROLLAND *et al.*, 2002). Sie regulieren Genexpression und entwicklungspezifische Prozesse wie Keimung, Keimlingswachstum, Wurzel- und Blatt-Differenzierung, Blühinduktion, Fruchtreife, Embryogenese und Seneszenz (LEON & SHEEN, 2003).

Erhöhte interne Monosaccharidkonzentrationen, insbesondere Glukose, verzögern sowohl die Keimung als auch die frühe Keimlingsentwicklung (DEKKERS *et al.*, 2004; GIBSON, 2005; PRICE *et al.*, 2003; PRICE *et al.*, 2004).

Die Monosaccharidgehalte in den transgenen *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen waren im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen allerdings deutlich reduziert (Abb. 3.19). Auch die Tatsache, dass die Saccharosegehalte in diesem frühen Entwicklungsstadium erhöht waren deutete eher auf eine verzögerte Saccharose-Nutzung hin.

Unter physiologischen Bedingungen gibt es zwei Enzyme, die einen Saccharose-Abbau katalysieren. Saccharose-Synthasen bauen Saccharose reversibel zu Fruktose und UDP-Glukose ab. Eine *Arabidopsis thaliana*-Mutante, bei der 4 der 6 Isoformen fehlen zeigte jedoch keinen Phänotyp (BARRATT *et al.*, 2009). Invertasen katalysieren die irreversible Hydrolyse von Saccharose in Glukose und Fruktose. Isoformen in der Zellwand und der Vakuole (saure Invertasen) unterscheiden sich in ihrer Struktur von denen im Zytosol, in Mitochondrien und Plastiden (neutrale/alkaline Invertasen) (BARRATT *et al.*, 2009; LEE & STURM, 1996). Invertasen fungieren spezifisch in speziellen Entwicklungsstadien. So sind vakuoläre Invertasen in Saccharose-speichernden Organen in die Mobilisierung der vakuolären Saccharose involviert (HUSAIN *et al.*, 2001; YAU & SIMON, 2003) und werden für normales Wurzelwachstum benötigt (SERGEEVA *et al.*, 2006). Die Aktivität der Zellwand-gebundenen Invertasen ist hoch nach Verwundung und Pathogen-Befall (STURM & CHRISPEELS, 1990; SWARBRICK *et al.*, 2006) und in der frühen Samen-Entwicklung (WEBER *et al.*, 1995). Die genaue Funktion der neutralen Invertasen ist nicht klar, allerdings führte der Verlust von 2 der 9 zytosolischen Isoformen in *Arabidopsis thaliana* zu

drastisch reduzierten Wachstumsraten vor allem während der Keimlingsentwicklung (BARRATT *et al.*, 2009). Gleiche Beobachtungen wurden in Reis (JIA *et al.*, 2008) und Lotus (WELHAM *et al.*, 2009) gemacht.

Die Aktivität neutraler Invertasen in den 2 Tage alten *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen lag deutlich unterhalb der entsprechenden Aktivität in den Wildtyp- und *Pyd1*-Überexpressions-Keimlingen (Abb. 3.20). In 3 Tage alten Keimlingen hatte die Invertase-Aktivität zwar noch kein Wildtyp-Niveau erreicht, war aber im Gegensatz zum Vortag schon deutlich gesteigert. Dagegen war in 4 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen kein Unterschied zwischen den verschiedenen *Pyd1*-Mutanten und den Wildtyp-Pflanzen in der Aktivität neutraler Invertasen zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

Somit kann postuliert werden, dass sowohl die Aktivität neutraler Invertasen als auch das Verhältnis von Monosacchariden zu Disacchariden mit der Keimung und Keimlingsentwicklung korreliert ist. Ob die unterschiedliche Aktivität der neutralen Invertasen in den verschiedenen transgenen *Pyd1*-Keimlingen und das damit veränderte Verhältnis von Monosacchariden zu Disacchariden allerdings Grund oder Folge der verzögerten Keimung sind, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht entscheiden.

Ein Schlüsselregulator während der Keimung ist das endogene Phytohormon Abscisinsäure (ABA). Generell ist ABA als negativer Regulator des Pflanzenwachstums insbesondere unter Umweltstress anzusehen. So steuert ABA unter anderem die Samenruhe und fördert die Blattseneszenz (TAIZ & ZEIGER, 2000). Weiterhin inhibiert ABA die Keimung reifer *Arabidopsis thaliana*-Samen durch Limitierung von Energie und Nährstoffen (GARCIARRUBIO *et al.*, 1997). Auch der Übergang von embryonaler zu Keimungsphase wird durch ABA gehemmt (FINKELSTEIN *et al.*, 2002).

Dass ABA die *Pyd1*-Expression beeinflusst konnte mittels quantitativer RT-PCR-Analysen gezeigt werden. So führte eine 3-stündige Inkubation mit 5 μ M ABA zu einem 6-fach erhöhten *Pyd1*-Transkriptgehalt (Abb. 3.22).

Auch Gene, die durch ABA in ihrem Transkriptgehalt beeinflusst werden, waren in 2 Tage alten *Pyd1*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Keimlingen verändert.

ABI1 (*ABA insensitive 1*) kodiert für eine Serin/Threonin-Phosphatase und wird als Regulator des ABA-Signalweges während der Keimung beschrieben. Entsprechende *Arabidopsis thaliana*-„knockout“-Mutanten zeigten eine im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen reduzierte ABA-Antwort (GOSTI *et al.*, 1999; MERLOT *et al.*, 2001). In Anwesenheit von 50 μ M ABA war die *ABI1*-Expression mehr als 15-fach erhöht (HOTH *et al.*, 2002; eigene, nicht gezeigte Ergebnisse).

Die *ABI1*-Expression war in 2 Tage alten *Pyd1*-„knockout“-Mutanten fast 5-mal so hoch wie in gleich alten *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen, in den 35S:*Pyd1*-Keimlingen leicht vermindert (Abb. 3.23 A). Dies könnte zusammen mit der verzögerten Keimung der *Pyd1*-„knockout“-Samen ein Hinweis darauf sein, dass der ABA-Gehalt in diesen höher ist als im Wildtyp. Eine Messung des Phytohormons ABA *in vivo* bleibt allerdings auf Grund sehr geringer Konzentrationen spezialisierten Labors vorbehalten.

Auch die *ABF4*-Expression wird neben diversen Stressbehandlungen durch ABA induziert (CHOI *et al.*, 2000; eigene, nicht gezeigte Ergebnisse). Der *ABF4*-Transkriptgehalt war in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen aber auf ca. 15% im Vergleich zu Wildtyp- und 35S:*Pyd1*-Pflanzen, deren Transkriptgehalt etwa im gleichen Bereich lag, reduziert (Abb. 3.23 B).

Die gezeigten Ergebnisse deuten auf einen veränderten ABA-Stoffwechsel in den *Pyd1*-Mutanten hin, die genaue Wechselwirkung mit dem Pyrimidinabbau ist aber noch unklar. Ursache dafür ist unter anderem die Komplexität der ABA-Detektions- und -Signalmechanismen in Pflanzen, die noch nicht ausreichend aufgeklärt sind (HIMMELBACH *et al.*, 2003).

Der Pyrimidin-Katabolismus stellt im pflanzlichen Metabolismus keine Sackgasse dar. β -Alanin, das Endprodukt des Pyrimidin-Abbauweges kann weiter zu Pantothen (Vitamin B5) verstoffwechselt werden, einer essentiellen Vorstufe der Coenzym A (CoA)-Synthese (COXON *et al.*, 2005). CoA wiederum ist ein wichtiger Faktor bei der Fettsäure-Synthese. Während der Keimung findet ein umfangreicher Umbau der im Samen als Hauptkohlenstoffquelle gespeicherten Lipide statt. Dabei stellt neben der Glukoneogenese auch die Fettsäure-Synthese zur Generierung neuer Strukturlipide einen wichtigen Prozess dar (HELDT, 1999).

In den diversen *Pyd1*-Mutanten wurde die Fettsäure-Synthese untersucht, indem der Einbau von extern angebotenen $[^{14}\text{C}]$ -Acetat in Fettsäuren quantifiziert wurde (Abb. 3.21). In 2 Tage alten *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen war ein bis auf die Hälfte reduzierter $[^{14}\text{C}]$ -Acetat-Einbau in Fettsäuren im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen zu beobachten (Abb. 3.21 A). Dies hat möglicherweise einen entwicklungsspezifischen Hintergrund, zumal der Unterschied im $[^{14}\text{C}]$ -Acetat-Einbau zwischen Wildtyp-Keimlingen und *Pyd1*-T-DNA-Insertionsmutanten nach 3 Tagen weniger deutlich war als nach 2 Tagen. Dass allerdings die *Pyd1*-Aktivität generell einen Einfluss auf die Fettsäure-Synthese hat, wurde sowohl in 3 Tage alten *Pyd1*-Überexpressions-Keimlingen als auch in Blattscheibchen der entsprechenden 4 Wochen alten Pflanzen offensichtlich. Der Einbau

von [¹⁴C]-Acetat in Fettsäuren war in diesen Fällen um auf bis zu 150% im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen gesteigert.

Trockene Samen befinden sich in einer Art Ruhezustand mit geringem Wassergehalt (5-15%) und fast stillstehender metabolischer Aktivität (GALLARDO *et al.*, 2001). Umso überraschender war die entwicklungsspezifische Expression von *Pyd1*. Der Transkriptgehalt im trockenen Samen war mehr als 15-mal so hoch wie in allen anderen untersuchten Geweben, in denen, abgesehen vom leicht erhöhten Transkriptgehalt in der Blüte, die *Pyd1*-Expression weitestgehend gleichbleibend war (Abb. 3.1). Die *Pyd1*-Aktivität scheint daher als Vorbereitung auf eine bevorstehende Keimung von Bedeutung zu sein.

Obwohl dieses Ergebnis nicht in der Lage ist den Keimungsphänotyp im Detail zu erklären, so liefert es doch, zusammen mit dem drastischen Anstau von Uracil in den beiden *Pyd1*-T-DNA-Insertionslinien, Hinweise darauf, dass entweder die *Pyd1*-Aktivität und/oder der Uracil-Gehalt entscheidend für die optimale Keimung der Samen sind.

Letztendlich kann hier die genaue Ursache für den Keimungsphänotyp nicht vollständig geklärt werden, da bislang nicht eindeutig klar war, welcher Effekt Ursache und welcher Folge ist. Festhalten lässt sich aber, dass die *Pyd1*-Aktivität in der frühen Phase der pflanzlichen Entwicklung, und ganz besonders während des Keimungsprozesses als solchem, von großer Bedeutung ist und ihr Fehlen starken Einfluss auf die gesamte pflanzliche Entwicklung nimmt.

4.1.2 *Pyd1* kommt besondere Bedeutung bei Stickstoffmangel zu

Bei Stickstoff handelt es sich um das wichtigste mineralische Nährelement für Pflanzen (MARSCHNER, 1995; HIMELBLAU & AMASINO, 2001). Ein Mangel an Stickstoff führt daher schnell zu Wachstumshemmungen. Es kommt zur Ausbildung von Chlorosen und zur Bildung von Anthocyanen infolge von Stress (TAIZ & ZEIGER, 2003). Während Stickstoffmangel werden interne Stickstoffquellen wie beispielsweise RNA, Aminosäuren und Chlorophyll mobilisiert (MARTIN *et al.*, 2002; FLÖRCHINGER, 2007).

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine externe Applikation von Nukleosiden diesen negativen Effekten zum Teil entgegenwirken kann. Aufgenommene Nukleoside steigerten die Gehalte an RNA und Chlorophyll und verminderten die Anthocyanbildung (FLÖRCHINGER *et al.*, 2006; FLÖRCHINGER, 2007). Ebenso können Nukleobasen einem Stickstoffmangel zumindest teilweise entgegenwirken. So sind *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen beispielsweise in der Lage mit Uracil als einziger

Stickstoffquelle zu wachsen (ZRENNER *et al.*, 2009). Auch eine Überexpression der *NSH1*, dessen Translationsprodukt den Nukleosidabbau einleitet, hat positive Effekte auf Pflanzen, die Stickstoffmangel ausgesetzt wurden (JUNG *et al.*, 2009).

Pyrimidine enthalten 2 Stickstoffatome. Beim Katabolismus wird dieser gebundene Stickstoff als Ammonium (NH_4^+) frei, welches der Pflanze als Stickstoffquelle dienen kann. Glutamin-Synthasen katalysieren in einer ATP-abhängigen Reaktion die Übertragung von NH_4^+ auf Glutamat, es entsteht Glutamin. Glutamin-Synthasen finden sich sowohl im Zytosol (Klasse GS1, ISHIYAMA *et al.*, 2004) als auch in Plastiden und Mitochondrien (Klasse GS2, TAIRA *et al.*, 2004).

In einer Genexpressionsanalyse Stickstoffmangel betreffend fiel *Pyd1* als ein durch Stickstoffmangel induziertes Gen auf (SCHEIBLE *et al.*, 2004). Durch quantitative RT-PCR-Analysen konnte ermittelt werden, dass der *Pyd1*-Transkriptgehalt um Faktor 4 erhöht war im Vergleich zur Anzucht unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.27 C). Die anderen Gene des Pyrimidinabbauweges zeigten diese Induktion nicht (Abb. 3.27 C).

Als Untersuchungssystem dienten Keimlinge, die in steriler Flüssigkultur (Kap. 2.2.4) angezogen wurden. Diese Anzuchtmethode wurde in der Vergangenheit schon erfolgreich für umfassende Analysen des Stickstoff- und Phosphathaushalts in *Arabidopsis thaliana* eingesetzt (SCHEIBLE *et al.*, 2004, MORCUENDE *et al.*, 2007; FLÖRCHINGER, 2007). Ein großer Vorteil dieser Anzucht ist, dass man die Zusammensetzung des Wachstumsmediums exakt bestimmen kann.

Die Expressionssteigerung während Stickstoffmangel äußerte sich auch in einer im Vergleich zu Kontrollbedingungen erhöhten Pyrimidinabbau-Kapazität (Abb. 3.9 und Abb. 3.32). Der Abbau der Pyrimidine Uridin und Uracil war in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen um 40% (Uridin) bzw. sogar um 140% (Uracil) gesteigert (Abb. 3.9 und Abb. 3.32). Dagegen waren die 35S:*Pyd1*-Pflanzen bezüglich keinem der Substrate zu einer weiteren Steigerung der Abbauaktivität im Vergleich zu Kontrollbedingungen in der Lage (Abb. 3.9 und Abb. 3.32). Anscheinend war das Limit bereits unter Kontrollbedingungen erreicht. Dafür spricht auch, dass Wildtyp-Keimlinge selbst unter Stickstoffmangel-Bedingungen die Abbauraten der *Pyd1*-Überexpressionspflanzen nicht erreichten (Abb. 3.9 und Abb. 3.32).

Da keines der anderen Pyrimidin-Abbaugene durch Stickstoffmangel induziert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die *Pyd1*-Reaktion den Raten-limitierenden Schritt des Uracil-Abbaus darstellt. Ist der Abbau von Uracil einmal durch die Reaktion der *Pyd1* eingeleitet, kommt es zu den Folgereaktionen von *Pyd2* und *Pyd3*.

Im Einklang mit dem unter Stickstoffmangel gesteigerten Pyrimidin-Katabolismus waren auch die detektierten Uracilgehalte. So war zwar ein deutlicher Uracil-Anstau in den *Pyd1*-„knockout“-Keimlingen unter Kontrollbedingungen zu beobachten (Abb. 3.30 A), 3 Tage Stickstoffmangel steigerten diese Uracil-Akkumulation noch einmal um das Doppelte (Abb. 3.30 A), während die Gehalte in Wildtyp- und *Pyd1*-Überexpressionskeimlingen gleich blieben (Abb. 3.30).

Analysen des Frischgewichts 10 Tage alter Keimlinge veranschaulichten zunächst noch einmal den Keimungsphänotyp der *Pyd1*-„knockout“-Keimlinge. So war deren Gewicht im Vergleich zu gleich alten *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen auf etwa zwei Drittel reduziert (Abb. 3.28 A). Setzte man die Keimlinge einem Mangel an Stickstoff aus, war das *Pyd1*-„knockout“-Keimlingsgewicht sogar bis auf die Hälfte reduziert (Abb. 3.28 B). Dies unterstreicht die Vermutung, dass die Reaktion der *Pyd1* während Stickstoffmangel von großer Bedeutung ist.

Zur Bildung von Anthocyanen in der Pflanze kommt es in Folge unterschiedlicher biotischer und abiotischer Stresssituationen (GOULD, 2004; STEYN *et al.*, 2002), unter anderem während einem Mangel an Stickstoff, weshalb sie sich hervorragend als Marker von Stickstoffmangel-Erscheinungen eignen (BONGUE-BARTELSMAN & PHILLIPS, 1995; CHALKER-SCOTT, 1999; DIAZ *et al.*, 2006; LEA *et al.*, 2007). Infolge eines Stickstoffmangels entsteht ein Überschuss an Kohlenhydraten, der aufgrund des fehlenden Stickstoffs nicht der Synthese von Aminosäuren oder anderen stickstoffhaltigen Verbindungen dienen kann. Durch die Bildung von Anthocyanen werden diese überschüssigen Kohlenstoffgerüste verstoffwechselt (TAIZ & ZEIGER, 2000). Da die beiden analysierten *Pyd1*-„knockout“-Mutanten nach 3 Tagen Wachstum ohne Stickstoffquelle einen erhöhten Gehalt an Anthocyanen aufzeigten (Abb. 3.29), könnte dies als weiterer Hinweis gewertet werden, dass diese Pflanzen Stickstoffmangel schlechter tolerieren können als *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen. Umgekehrt bildeten die 35S:*Pyd1*-Pflanzen deutlich weniger von diesem Flavonoid (Abb. 3.29).

Neben Anthocyanen stellt die Bildung von Kohlenhydraten wie löslichen Zuckern und Stärke eine weitere Möglichkeit für die Pflanze dar überschüssige Kohlenwasserstoffe zu verstoffwechseln. In den 10 Tage alten, in steriler Flüssigkultur angezogenen Keimlingen wurde der Gehalt der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose sowie der Stärkegehalt gemessen. Wie erwartet war zu beobachten, dass alle gemessenen Kohlenhydrate unter Stickstoffmangel im Vergleich zur Anzucht unter Kontrollbedingungen deutlich erhöht waren. Darüber hinaus zeigten die beiden *Pyd1*-„knockout“-Linien im Vergleich zu den *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen eine weitere Steigerung der

Zucker Glukose, Fruktose, Saccharose und auch von Stärke (Abb. 3.31). Dies ist ein Indiz dafür, dass umso mehr Kohlenwasserstoffe nicht mehr mit Stickstoff bestückt werden konnten.

Es scheint, dass die Änderungen der *Pyd1*-Expression als Antwort auf Änderungen in der Stickstoffverfügbarkeit eine wichtige Rolle in der Ausbalancierung der Bedürfnisse von Pyrimidin- und Stickstoff-Stoffwechsel spielt. Zu bedenken ist allerdings, dass der Stickstoff, welcher im Uracil gebunden ist nur einen Bruchteil des Gesamtstickstoffs ausmacht. In den *Pyd1*-„knockout“-Samen sind 0,3% des pflanzlichen Stickstoffs im Uracil gebunden, in Wildtyp-Samen sogar nur 0,0008% (Kap. 3.5.4). Aus diesem Grund ist auszuschließen, dass die aufgeführten positiven Effekte alleine auf den aus Uracil freiwerdenden Stickstoff zurückzuführen sind. Vielmehr kommt eine Art Signalwirkung in Frage. Ammonium ist ein zytotoxisches, hochreaktives Metabolit, welches schnell verstoffwechselt werden muss. Möglicherweise geschieht dies durch Erhöhung der NH_4^+ -Reassimilationsfähigkeit und hat die Mobilisierung weiteren Stickstoffs zur Folge.

4.1.3 *Pyd1* ist an der Stickstoffmobilisierung während der Seneszenz beteiligt

Pflanzen durchlaufen am Ende ihrer Entwicklung eine programmierte Alterung. Dieser genetisch gesteuerte und energieabhängige Prozess wird als Seneszenz bezeichnet und kann sowohl die gesamte Pflanze betreffen, als auch einzelne Organe oder sogar Zellen. Dabei werden die Nährstoffe aus seneszenten Geweben in nicht-seneszente Gewebe transportiert. In der krautigen Pflanze *Arabidopsis thaliana* werden die Nährstoffe aus den Blättern über die Sprossachse in die reproduktiven Organe wie Blüten und Schoten transportiert, um dort zur Ausstattung der neu gebildeten Samen beitragen zu können (HILL, 1980; MAUK & NOODEN, 1992; HOCKING, 1994; NIEMINEN & HELMISAARI, 1996; HIMELBLAU & AMASINO, 2001).

Chloroplasten stellen den Ausgangspunkt Seneszenz-vermittelten Katabolismus dar (SMART, 1994; NOODEN *et al.*, 1997). Der größte Anteil des von seneszenten Blättern recycelten Stickstoffs und anderer Nährstoffe stammt aus diesen Organellen (NOODEN & LEOPOLD, 1988; HÖRTENSTEINER, 2007). Die Proteolyse der chloroplastidären Proteine beginnt früh im Prozess der Seneszenz und die freiwerdenden Aminosäuren können in wachsende Teile der Pflanze transportiert werden (HÖRTENSTEINER & FELLER, 2002).

Das von Pflanzen am häufigsten benötigte mineralische Nährelement ist Stickstoff (HIMELBLAU & AMASINO, 2001; MARSCHNER *et al.*, 1995). Eine Pflanze kann sich daher nicht erlauben, Stickstoff in absterbenden Geweben zurückzulassen. In seneszenten

Blättern liegt der Stickstoffgehalt 85% unter dem in nicht seneszenten Blättern (MAUK & NOODEN, 1992; HOCKING, 1994; MARSCHNER, 1995; NIEMINEN & HELMISAARI, 1996).

Eine Genexpressionsanalyse lieferte Hinweise darauf, dass *Pyd1* während der Seneszenz von Bedeutung ist (VAN DER GRAAFF *et al.*, 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen zeigten, dass der *Pyd1*-Transkriptgehalt sowohl in natürlich als auch in künstlich seneszierten *Arabidopsis thaliana*-Blättern um bis auf das 20-fache erhöht war (Abb. 3.24 und Abb. 3.25).

Hinweise darauf, dass diese Expressionssteigerung, wie bereits für Stickstoffmangel gezeigt, mit einer Erhöhung der *Pyd1*-Aktivität einhergeht lieferte die Analyse der Uracilgehalte. Zwar staute sowohl in 6 Wochen alten nicht seneszenten Blättern als auch in den künstlich seneszierten Blättern der *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen Uracil an, allerdings war dieser Anstau in den Pflanzen ohne *Pyd1*-Aktivität um das 5-fache erhöht (Abb. 3.26).

Es scheint wahrscheinlich, dass die Abgabe des in den Pyrimidinen gebundenen Stickstoffs über den durch die *Pyd1*-Reaktion eingeleiteten Pyrimidin-Katabolismus eine signifikante Rolle in der Remobilisierung von Stickstoff aus seneszenten Geweben spielt.

Aus diesem Grund wäre es durchaus vorstellbar, dass in Mutanten ohne *Pyd1*-Aktivität die Stickstoff-Remobilisierung verlangsamt vonstatten geht. So könnte es weiter sein, dass die geringere Samenausbeute (Abb. 3.16) der *Pyd1*-„knockout“-Pflanzen nicht nur auf die generelle Entwicklungsverzögerung dieser Pflanzen zurückzuführen ist, sondern auch auf die schlechtere Mobilisierung des für die Samenbeladung dringend benötigten Stickstoffs. So produzierten die Pflanzen mit gesteigerter *Pyd1*-Expression und damit eventuell verbundener verbesserter Stickstoff-Mobilisierung auch deutlich mehr Samen als *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.16).

4.2 Auf der Suche nach einem *Pyd1*-Homolog

Bei der Untersuchung des Pyrimidinabbaus fiel auf, dass die Degradierung von Uracil in den Pflanzen der beiden *Pyd1*-„knockout“-Linien nicht auf null reduziert war. Bis zu 9% des aufgenommenen [¹⁴C]-Uracils wurde noch als [¹⁴C]-CO₂ frei (Abb. 3.32 B), dies war immerhin noch ein Sechstel der Wildtyp-Abbaurates. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob in *Arabidopsis thaliana* ein weiteres Protein mit Dihydrouracil-Dehydrogenase-Aktivität existiert. Auch in früheren Arbeiten wurde über das mögliche Vorhandensein eines weiteren solchen Enzyms spekuliert (ZRENNER *et al.*, 2009). Eine BLAST-Suche (ALTSCHUL *et al.*, 1990) lieferte als einzige nah verwandte Sequenz das Protein

Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH). Das Protein DHODH besitzt 24% identische und 39% ähnliche Aminosäuren zum Pyd1-Protein (Abb. 3.33). DHODH katalysiert den vierten Schritt der Pyrimidin-*de novo*-Synthese, die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat (Abb. 1.1; JONES, 1980; ZRENNER *et al.*, 2006).

Um eine mögliche Funktion von DHODH als weiteres Dihydrouracil-Dehydrogenase-Enzym im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen wurden konstitutive Überexpressionspflanzen hergestellt, bei denen das Gen *DHODH* unter die Kontrolle des Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotors (CaMV 35S) gestellt wurde (35S:*DHODH*). Die molekulare Charakterisierung der generierten Pflanzen lieferte im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen bis zu 179-fach gesteigerte *DHODH*-Transkriptgehalte (Abb. 3.38).

Die gesteigerten Transkriptgehalte der 35S:*DHODH*-Pflanzen äußerten sich in einer erhöhten DHODH-Aktivität. Während die DHODH-Aktivität in angereicherten Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnte in den Mitochondrien-Proben aller drei *DHODH*-Überexpressionspflanzen ein Dihydroorotat-Umsatz gemessen werden (Abb. 3.39).

Leider ist kein Assay bekannt, mit dem die Pyd1-Aktivität direkt bestimmt werden kann (Kap. 3.4). Um dennoch zu überprüfen, ob das Enzym DHODH neben der Funktion Dihydroorotat zu Orotat zu oxidieren auch die Aktivität aufweist, Uracil zu Dihydrouracil zu reduzieren, wurde die Degradierung von [¹⁴C]-Uracil zu [¹⁴C]-CO₂ untersucht. Die generierten *DHODH*-Überexpressionspflanzen zeigten weder einen erhöhten Uracil-katabolismus noch eine gesteigerte Resistenz gegenüber den toxischen Pyrimidin-derivaten 5-Fluorouracil oder 5-Fluorouridin (Daten nicht gezeigt).

Durch diese Ergebnisse ist zwar nicht vollständig auszuschließen, dass neben Pyd1 ein weiteres Enzym existiert, welches dessen Funktion im Pyrimidinkatabolismus übernehmen kann, dennoch liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei Pyd1 um das einzige Enzym handelt, welches im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* Uracil zu Dihydrouracil reduziert.

Pyd1 ist nicht nur phylogenetisch verwandt zur DHODH (Abb. 3.33; ZRENNER *et al.*, 2006), betrachtet man zudem die von Pyd1 und DHODH katalysierten Reaktionen, so fällt auf, dass diese chemisch auch relativ ähnlich sind. Die Pyd2 von Myxomyceten (Schleimpilzen), Pflanzen und Insekten ist phylogenetisch mit dem *de novo*-Synthese-Gen Dihydroorotase (DHOase) verwandt (GOJKOVIC *et al.*, 2003), was den Schluss nahelegt, dass der Pyrimidinkatabolismus die Umkehrung der Pyrimidin-*de novo*-Synthese ist (KAFFER *et al.*, 2004; ZRENNER *et al.*, 2006). Insofern ist es nicht weiter verwunderlich, dass die DHODH das nächste Homolog zur Pyd1 in *Arabidopsis thaliana* ist.

Die genomische Organisation des Pyrimidinabbaus ist genauso einfach wie die der Pyrimidin-*de novo*-Synthese: einzelne Gene („single copy genes“) kodieren für die jeweiligen enzymatischen Schritte. Wenn man bedenkt, dass die Nukleotid-*de novo*-Synthese sicherlich einer der ursprünglichsten Stoffwechselwege und zudem enzymatisch invariant in allen untersuchten Lebensformen ist (KAFFER *et al.*, 2004), wäre es durchaus vorstellbar, wenn die Gene des Katabolismus aus diesem durch Genduplikation hervorgegangen wären.

4.3 Die physiologische Bedeutung von *DHODH*

Für jeden enzymatischen Schritt der Pyrimidin-*de novo*-Synthese gibt es genau ein Gen (GIERMANN *et al.*, 2002; ZRENNER *et al.*, 2006). Die *DHODH* ist ein wichtiges Glied in dieser Kette. Durch den Salvage Pathway können lediglich die vorhandenen Pyrimidine durch Wiederverwertung neu verteilt werden, die Bereitstellung neuer Pyrimidin-Grundgerüste erfolgt ausschließlich über *de novo*-Synthese und somit auch über die *DHODH*. Ist dieser Prozess vermindert oder fällt gar ganz aus, so ist mit einer Beeinträchtigung aller Prozesse zu rechnen, welche auf Pyrimidin-Nukleotide angewiesen sind.

Um die physiologische Funktion von *DHODH* im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen wurden eine Reihe korrespondierender Mutanten generiert. Dies waren zum Einen die bereits beschriebenen konstitutive Überexpressionspflanzen (35S:*DHODH*).

Zum Anderen wurde versucht, homozygote T-DNA-Insertionspflanzen zu identifizieren. Bislang ist allerdings für keines der Gene der Pyrimidin-*de novo*-Synthese eine „knockout“-Mutanten beschrieben und das Screening der verfügbaren *Arabidopsis thaliana*-T-DNA-Insertions-Linien resultierte lediglich in heterozygoten Individuen (ZRENNER *et al.*, 2006). So auch das Screening von drei unabhängigen *DHODH*-T-DNA-Insertionslinien (eigene, nicht gezeigte Ergebnisse). Es wurde spekuliert, dass eine homozygote Mutation letal ist (SCHRÖDER *et al.*, 2005; ZRENNER *et al.*, 2006). Da die Pyrimidin-*de novo*-Synthese ein für die Pflanze derart essentieller Prozess ist, wäre es nur logisch, wenn der Verlust eines der darin involvierten Gene zum Tod der Pflanze führen würde (GIERMANN *et al.*, 2002; SCHRÖDER *et al.*, 2005).

Um dennoch eine funktionelle Analyse von *DHODH* durchführen zu können, wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) verwendet um *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit einer verringerten *DHODH*-Expression zu generieren. Die molekulare Charakterisierung

der generierten Pflanzen lieferte im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auf bis zu ein Fünftel reduzierte *DHODH*-Transkriptgehalte in den *DHODH*-RNAi-Mutanten (Abb. 3.36). In zwei der drei identifizierten Linien war die Verminderung der Transkriptgehalte auf 92% und 72% eher schwach ausgeprägt, in RNAi-Linie 3 war die Reduktion auf 22% im Vergleich zum Wildtyp-Transkriptgehalt dagegen deutlicher (Abb. 3.36). Während homozygote Individuen der Linien 1 und 33 identifiziert werden konnten, waren bei den Pflanzen der Linie 3 nur die heterozygoten Pflanzen in der Lage neue Nachkommen zu produzieren (Abb. 3.37).

Bei geringfügiger Reduktion der *DHODH*-Expression (35S_RNAi:*DHODH*-Linien 1 und 33) zeigten sich unter normalen Wachstumsbedingungen keine phänotypischen Unterschiede zu *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen. Eine leichte Reduktion der *DHODH*-Expression kann womöglich durch eine Umverteilung der Pyrimidine kompensiert werden oder aber die *DHODH*-Kapazität in *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen ist deutlich höher als der tatsächliche Bedarf neuer Pyrimidin-Nukleotide. Sinkt jedoch die *DHODH*-Expression unter einen bestimmten Schwellenwert (35S_RNAi:*DHODH*-Linie 3), zeigten sich phänotypische Auswirkungen. Konkret äußerten sich die Unterschiede zu den *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen in einer geringeren Biomasse (Abb. 3.41, Abb. 3.42 und Abb. 3.43), der Ausbildung rötlich-brauner Keimblätter (Abb. 3.40 und Abb. 3.44) und vermindertem Wurzelwachstum (Abb. 3.40). Homozygote Pflanzen mit einem derart verminderten *DHODH*-Transkriptgehalt waren nicht in der Lage ihren Lebenszyklus zu vollenden und Samen zu produzieren (Abb. 3.37 und Abb. 3.40). Höchstwahrscheinlich kann der hohe Bedarf an Nukleotiden für die Zellteilung, während der die *DHODH* verstärkt exprimiert wird (MENGES *et al.*, 2002), in den 35S_RNAi:*DHODH*-Pflanzen mit stark reduzierter *DHODH*-Expression nicht mehr ausreichend gedeckt und auch durch Salvage Pathway-Reaktionen nicht mehr kompensiert werden. Dass der *DHODH* während des Wachstums besondere Bedeutung zukommt kann auch den Ergebnissen zur gewebespezifischen Expression mittels Promotor:*DHODH*-*GUS*-Pflanzen entnommen werden. Deutlich sichtbar war eine *GUS*-Färbung neben den Leitgeweben (Abb. 3.34 A-D) auch in Wurzelspitzen (Abb. 3.34 C-D) und generell in den Bildungszentren sich entwickelnder Gewebe (Abb. 3.34 A, C, D, G). So war beispielsweise die *DHODH*-Expression in sich entwickelnden Schoten deutlich höher als in bereits ausdifferenzierten Schoten (Abb. 3.34 G).

Auch die Zugabe verschiedener Pyrimidine wie Uridin, Uracil und Orotat war nicht in der Lage, diesen Phänotyp zu retten (eigene, nicht gezeigte Ergebnisse), so wie Adenosin-Fütterung den Phänotyp von *AtBt1*-RNAi-Mutanten kompensieren konnte (KIRCHBERGER

et al., 2008). Das Transportprotein AtBt1 fungiert im Envelope der Plastiden als Exporter der dort *de novo* synthetisierten Adenylate AMP, ADP und ATP (KIRCHBERGER *et al.*, 2008).

Neben den mehr oder weniger offensichtlichen Auswirkungen auf das Wachstum wurde ein Blick auf metabolische Vorgänge in den transgenen Pflanzen geworfen. RNA stellt einen guten Marker für die Pyrimidin-Verfügbarkeit dar. Die Keimlinge der beiden *DHODH*-Überexpressionslinien wiesen die höchsten RNA-Gehalte auf, gefolgt von den *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen und den Keimlingen der *DHODH*-RNAi-Linie 1, der RNA-Gehalt der 35S_RNAi:*DHODH*-Keimlinge der Linie 3 war auf ein Viertel im Vergleich zu den Wildtyp-Keimlingen reduziert (Abb. 3.45).

Dies steht im Einklang mit Ergebnissen, die im Zusammenhang mit anderen Pyrimidin-*de novo*-Synthese-Genen gemacht wurden. Wurde in *Arabidopsis thaliana* die Aspartat-Transcarbamylase (ATCase), das zweite Enzym der Pyrimidin-*de novo*-Synthese durch PALA (*N*-(phosphonacetyl)-L-aspartat) gehemmt, kam es neben der Inhibierung der Blattentwicklung und des Wurzelwachstum zu einer Reduktion des RNA-Gehalts auf 81% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpflanzen (BASSETT *et al.*, 2003). Ebenso zeigten korrespondierende RNAi-Linien mit 70% bis 95% reduzierten ATCase-Transkriptgehalten verzögertes Wachstum und Entwicklung. Das Wurzel/Spross-Verhältnis war in diesen Pflanzen reduziert, sie entwickelten weniger Blüten und die Schoten produzieren kleinere Samen mit stark reduzierter Lebensfähigkeit (CHEN & SLOCUM, 2007).

Bei der *DHODH* handelt es sich um das einzige Nukleotid-*de novo*-Synthese-Enzym, welches nicht plastidär lokalisiert ist. GFP-Analysen belegten, dass es sich bei der *DHODH* um ein mitochondrial lokalisiertes Protein handelt (Abb. 3.35). Zudem existieren biochemische (in Erbse, DOREMUS & JAGENDORF, 1985) und immunologische (ULLRICH *et al.*, 2002) Hinweise darauf, dass das Protein an der äußeren Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran verankert ist, wie es bereits in Säugetieren gezeigt werden konnte (CHRISTOPHERSON & SZABADOS, 1997). Dort ist die *DHODH* als Flavoprotein an die Atmungskette gekoppelt. Durch Oxidation von Dihydroorotat kommt es zur Reduktion von Flavinmononukleotid (FMN), dessen Oxidation wiederum Ubichinon reduziert (ANGERMÜLLER & LÖFFLER, 1995; CHEN & JONES, 1976; KAUFER *et al.*, 2004; RAWLS *et al.*, 2000). Die durchgeführten Analysen zur Veratmung der Glukose machen es sehr wahrscheinlich, dass dies im pflanzlichen System ebenso der Fall ist. Die Keimlinge der in ihrem *DHODH*-Transkriptgehalt deutlich reduzierten RNAi-Linie 3 veratmeten lediglich ein Drittel im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Keimlingen (Abb. 3.46 A). Um auszuschließen, dass der gezeigte Effekt nur eine Folge des drastischen Phänotyps der

DHODH-Überexpressions-Keimlinge der Linie 3 war, wurde der gleiche radioaktive Assay mit [¹⁴C]-Adenin durchgeführt (Abb. 3.46 B). In diesem Fall war der Abbau des aufgenommenen Adenins in Wildtyp- und 35S_RNAi:*DHODH*-Keimlingen der Linie 3 gleich.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vertiefte Einblicke in die physiologische Funktion von Pyd1 gewonnen werden. Dennoch konnte die Ursache für die verzögerte Keimung der *Pyd1*-„knockout“-Samen nicht vollständig aufgeklärt werden. In diesem Fall wird es eine Herausforderung sein zu klären, welche Effekte ursächlich und welche nur die Folge der verzögerten Keimung sind.

Nicht ganz verstanden sind auch die Gründe für die plastidäre Lokalisierung von Pyd1. Falls der beschriebene Interaktionspartner der Pyd1 tatsächlich existiert, wäre es lohnend, diesen mittels dem „Yeast Two-Hybrid“ System zu identifizieren.

Weiterhin ist nicht vollständig verstanden, wie die geringen Mengen Stickstoff, die bei Stickstoffmangel durch Steigerung der Abbauaktivität aus den Nukleobasen freigesetzt werden zu derart drastischen Verbesserungen der pflanzlichen Entwicklung führen konnten. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob weitere Wege zur Stickstoffmobilisierung wie beispielsweise Nitrat-Transporter in den *Pyd1*-Mutanten reguliert sind.

Ein weiteres Thema betrifft die Kompartimentierung des Pyrimidinabbaus. So handelt es sich bei NSH1 um ein zytosolisch lokalisiertes Enzym (JUNG *et al.*, 2009), Pyd1 befindet sich im Plastiden, Pyd2 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Pyd3 ist wiederum zytosolisch lokalisiert (ZRENNER *et al.*, 2009). Aus diesem Grund muss die Existenz von Transportproteinen postuliert werden, welche die entsprechenden Intermediate an den jeweils nächsten Reaktionsort befördern. Konkret muss im Plastiden ein Uracil-Importsystem und ein Dihydrouracil-Exportsystem vorhanden sein.

Ähnlich verhält es sich im Fall der Pyrimidin-*de novo*-Synthese. *DHODH* wird als einziges Nukleotid-*de novo*-Synthese-Enzym beschrieben, dessen Lokalisierung nicht plastidär ist. Es verdichteten sich die Hinweise darauf, dass das Protein an der äußeren Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Somit müssen Dihydroorotat und Orotat zwar nicht die mitochondriale Membran überqueren, dennoch haben sie mit der plastidären Membran eine Barriere zu überwinden, Dihydroorotat muss exportiert, Orotat

importiert werden. Auch hierfür steht die Identifizierung der entsprechenden Membranproteine noch aus.

Die beschriebenen 35S_RNAi:*DHODH*-Mutanten weisen entweder eine schwache Reduktion der *DHODH*-Expression und damit kaum phänotypische Veränderungen der entsprechenden Pflanzen auf oder aber eine sehr starke Reduktion im Transkriptgehalt, und damit auch sehr drastische Effekte auf die Entwicklung der Pflanzen. Ziel könnte die Identifizierung einer *DHODH*-RNAi-Linie mit mittlerer Reduktion im Transkriptgehalt sein, um an dieser den Zusammenhang zwischen Pyrimidin-Stoffwechsel und Atmungskette detailliert zu analysieren. Weiterhin könnten Gaswechsellmessungen an den verschiedenen *DHODH*-Mutanten aufschlussreich sein.

5 Zusammenfassung

Der Katabolismus von Pyrimidin-Nukleobasen erfolgt in *Arabidopsis thaliana* über einen dreistufigen Stoffwechselweg. In diesem wird Uracil zu β -Alanin, CO_2 und Stickstoff in Form von NH_4^+ abgebaut. Die erste Reaktion, die Reduktion von Uracil zu Dihydrouracil wird von dem plastidären Enzym Dihydrouracil-Dehydrogenase (Pyd1) katalysiert. „Knockout“-Mutanten zeigten verglichen mit Wildtyp-Pflanzen bis zu 50-fach erhöhte Uracilgehalte in allen untersuchten Geweben. Diese Mutanten waren nicht in der Lage, die radioaktiv markierten Pyrimidine Uridin und Uracil zu degradieren und deshalb hochsensitiv gegenüber den toxischen Derivaten 5-Fluorouridin und 5-Fluorouracil. Im Gegensatz dazu wiesen Mutanten, die *Pyd1* überexprimieren eine erhöhte Resistenz gegenüber diesen toxischen Derivaten auf. Expressionsanalysen deckten auf, dass *Pyd1* hauptsächlich im trockenen Samen exprimiert wird. Die transgenen *Pyd1*-Pflanzen wiesen einen drastischen Keimungsphänotyp auf. Während „knockout“-Mutanten 2 Tage später als *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen keimten, waren die *Pyd1*-Überexpressionspflanzen in der Lage etwas früher zu keimen. Dies indiziert, dass die Aktivität der Pyd1 in der frühen pflanzlichen Entwicklung von entscheidender Bedeutung ist. Auch der Abscisinsäure-Stoffwechsel scheint in diesen Keimungsphänotyp involviert zu sein. Weiterhin entwickelten die *Pyd1*-Überexpressionspflanzen mehr Schoten und Samen als Wildtyp-Pflanzen, die „knockout“-Pflanzen weniger.

War während der pflanzlichen Entwicklung Stickstoff limitierend, erhöhten sich *Pyd1*-Expression und Pyd1-Aktivität. *Pyd1* scheint ein Schlüsselregulator des Pyrimidin-Katabolismus zu sein, der zwischen den Bedürfnissen an Stickstoff von Nukleotiden und anderen Metaboliten wie beispielsweise Aminosäuren vermittelt. Weiterhin erwies sich *Pyd1* als wichtige Komponente in der Remobilisierung des Stickstoffs aus seneszenten Geweben.

Es wurde untersucht, ob eventuell ein weiteres Enzym mit Dihydrouracil-Dehydrogenase-Aktivität existiert. Das *Arabidopsis thaliana*-Protein mit der höchsten Homologie zur Aminosäuresequenz von Pyd1 ist das Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH), welches den vierten Schritt der Pyrimidin-*de novo*-Synthese katalysiert, die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat. Der Pyrimidinkatabolismus stellt die Umkehrung der Pyrimidin-*de novo*-Synthese dar und die von Pyd1 und DHODH katalysierten Reaktionen sind chemisch ähnlich. Transgene Pflanzen mit einer gesteigerten *DHODH*-Expression waren

zu einer erhöhten Dihydroorotat-Oxidation in der Lage, zeigten aber keinerlei Pyl1-Aktivität.

Während eine geringfügige Reduktion in der *DHODH*-Expression keinen Einfluss auf die pflanzliche Entwicklung hatte, wiesen Dosismutanten mit einer starken Reduktion des *DHODH*-Transkriptgehaltes einen drastischen Phänotyp auf. Die entsprechenden Pflanzen waren zwergwüchsig, bildeten rötlich-braune Keimblätter aus und ihr Wurzelwachstum war im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen stark vermindert. Zudem hatten diese Pflanzen weniger RNA, was auf eine geringere Pyrimidinverfügbarkeit hindeutet. Gewebespezifische Expressionsanalysen unterstrichen die Bedeutung der *DHODH* und damit der Pyrimidin-*de novo*-Synthese in wachsenden Geweben, in denen die Bereitstellung neuer Pyrimidin-Grundgerüste von essentieller Bedeutung ist. Weiterhin konnten erste Hinweise darauf erbracht werden, dass die pflanzliche *DHODH*, so wie auch das Homolog in Tieren an der äußeren Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran verankert und dort als Flavoprotein an die Atmungskette gekoppelt ist.

6 Literaturverzeichnis

- Abel, S. & Glund, K. (1986)** Localization of RNA-degrading enzyme activity within vacuoles of cultured tomato cells. *Plant Physiol.* 66, 79-86.
- Abel, S.; Blume, B. & Glund, K. (1990)** Evidence for RNA-oligonucleotides in plant vacuoles Isolated from cultured tomato cells. *Plant Physiol.* 94, 1163-1171.
- Acimovic, Y. & Coe, I.R. (2002)** Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in procaryotes and eukaryotes. *Mol.Biol.Evol.* 19, 2199-2210.
- Alboresi, A.; Gestin, C.; Leydecker, M.T.; Bedu, M.; Meyer, C. & Truong, H.N. (2005)** Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 28[4], 500-512.
- Alonso, J.M.; Stepanova, A.N.; Leisse, T.J.; Kim, C.J.; Chen, H., Shinn, P.; Stevenson, D.K.; Zimmerman, J.; Barajas, P.; Cheuk, R.; Gadrinab, C.; Heller, C.; Jeske, A.; Koesema, E.; Meyers, C.C.; 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, D.E.; Marchand, T.; Risseeuw, E.; Brogden, D.; Zeko, A.; Crosby, W.L.; Berry, C.C. & Ecker, J.R. (2003)** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301[5633], 653-657.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Meyers, E.W. & Lipman, D.J. (1990)** Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215, 403-410.
- Angermüller, S. & Löffler, M. (1995)** Localization of dihydroorotate oxidase in myocardium and kidney cortex of the rat. An electron microscopic study using the cerium technique. *Histochemistry* 103, 287-292.
- Arnon, D.I. (1949)** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- Ascencio-Ibáñez JT, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R, Hanley-Bowdoin L. (2008)** Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol.* 148[1], 436-454.
- Ashihara, H.; Stasolla, C.; Loukanina, N. & Thorpe, T.A. (2000)** Purine and pyrimidine metabolism in cultured white spruce (*Picea glauca*) cells: metabolic fate of ¹⁴C-labeled precursors and activity of key enzymes. *Physiol.Plant.* 108 [1], 25-33.
- Ashihara, H.; Takasawa, Y. & Suzuki, T. (1997)** Metabolic fate of guanosine in higher plants. *Physiologia Plantarum* 100[4], 909-916.
- Assmann, S. (1995)** Cyclic AMP as a second messenger in higher plants. *Plant Physiol.* 108[885], 889.
- Barratt, D.H.; Derbyshire, P.; Findlay, K.; Pike, M.; Wellner, N.; Lunn, J.; Feil, R.; Simpson, C.; Maule, A.J. & Smith, A.M. (2009)** Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 106[31], 13124-13129.

- Bassett, E.V.; Bouchet, B.Y.; Carr, J.M.; Williamson, C.L. & Slocum, R.D. (2003)** PALA mediated pyrimidine starvation increases expression of aspartate transcarbamoylase (pyrB) in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol.Biochem.* 41, 695-703.
- Bentsink, L. & Koornneef, M. (2002)** Seed dormancy and germination. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (eds) *The Arabidopsis book*. <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. DOI 10.1199/tab.0050
- Bendtsen, J.D.; Nielsen, H.; von Heijne, G. & Brunak S. (2004)** Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *J.Mil.Biol.* 340[4], 783-795.
- Bewley, J.D. (1997)** Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9[7], 1055-1066.
- Bewley, J.D. & Black, M. (1994)** *Seeds: physiology of development and germination*, 2nd ed. Plenum Press, New York.
- Birnboim, H.C & Doly, R.W. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
- Boldt, R. & Zrenner, R. (2003)** Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Plant Physiol.* 117, 279-304.
- Bonaventure, G.; Salas, J.; Pollard, M.R. & Ohlrogge, J.B. (2003)** Disruption of the *FATB* gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell* 15, 1020-1033.
- Bongue-Bartelsman, M. & Phillips, D.A. (1995)** Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol.Biochem.* 33[5], 539-546.
- Bradbeer, J.W. (1988)** *Seed dormancy and germination*. Blackie, Glasgow.
- Bradford, K.J. (1990)** A water relation analysis of seed germination rates. *Plant Physiol.* 94, 840-849.
- Bullock, W.O.; Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987)** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Bürkle, L.; Cedzich, A.; Döpke, C.; Stransky, H.; Okumoto, S.; Gillissen, B.; Kühn, C. & Frommer, W.B. (2003)** Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. *Plant J.* 34, 13-26.
- Busk, P.K. & Pages, M. (1998)** Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol.Biol.* 37[3], 425-435.
- Cabrera M.A., Baldwin S.A., Young J.D. & Cass C.E. (2002)** Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem.Cell Biol.* 80, 623-638.
- Campbell, L. (1957)** Reductive degradation of pyrimidines. III. purification and properties of dihydrouracil dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* 227, 693-700.

- Cass, C.E.; Young, J.D. & Baldwin, S.A. (1998)** Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. *Biochem.Cell Biol.* 76, 761-770.
- Chalker-Scott, L. (1999)** Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70[1], 1-9.
- Chen, J. & Jones, M. (1976)** The cellular location of dihydroorotate dehydrogenase: relationships to *de novo* biosynthesis of pyrimidines. *Arch.Biochem.Biophys.* 176, 82-90.
- Choi, H.; Hong, J.; Ha, J.; Kang J. & Young, S. (2000)** ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J.Biol.Chem.* 275[3], 1723-1730.
- Christopherson, R.I. & Szabados, E. (1997)** Nucleotide biosynthesis in mammals. In *Channelling in Intermediary Metabolism*, ed. L Agius, HSA Sherratt, pp. 315–35. London: Portland Press
- Church, G.M. & Gilbert, W. (1984)** Genomic sequencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81[7], 1991-1995.
- Clark, G.B.; Thompson jr., G. & Roux, S.J. (2001)** Signal transduction mechanisms in plants: an overview. *Curr.Sci.* 80, 170-177
- Clough, S.J. & Bent, A.F. (1998)** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16[6], 735-743.
- Collart, F.R.; Osipiuk, J.; Trent, J.; Olsen, G.J. & Huberman, E. (1996)** Cloning and characterization of the gene encoding IMP dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 174[2], 217-220.
- Coxon, K.M.; Chakauya, E.; Ottenhof, H.H.; Whitney, H.M.; Blundell, T.L.; Abell, C. & Smith, A.G. (2005)** Pantothenate biosynthesis in higher plants. *Biochemical Society Transactions* 33, 743–746.
- Curie, C.; Bardet, C.; Gander, E.; Madele, C.; Axelos, M. & Lescure, B. (1991)** Cis and trans-acting elements involved in the activation of *Arabidopsis thaliana* A1 gene encoding the translation elongation factor EF-1 alpha. *Nucleic Acids Re.* 19[6], 1305-1310.
- Daher, G.C.; Harris, B.E. & Diasio, R.B. (1990)** Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides. *Pharmac.Ther.* 48, 189-222.
- Damm, B.; Schmidt, R. & Willmitzer, L. (1989)** Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Mol.Gen.Genet.* 217, 6-12.
- Danenberg, P.V. (1977)** Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochem.Biophys.Acta* 473[2], 73-92.
- Dekkers, B.J.W.; Schuurmans, J.A.M.J. & Smeekens, S.C.M. (2004)** Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218, 579-588.
- Demidchik, V.; Nichols, C.; Oliynyk, M.; Dark, A.; Glover, B.J. & Davies, J.M. (2003)** Is ATP a signaling agent in plants? *Plant Physiol.* 133, 456-461.

- Desimone, M.; Catoni, E.; Ludewig, U.; Hilpert, M.; Schneider, A.; Kunze, R.; Tegeder, M.; Frommer, W.B. & Schumacher, K. (2002)** A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14[4], 847-856.
- Deysson, M. (1953)** Effect of uracil on the germination and growth of various angiospermae. *Bull.Soc.bot.Fr.*, 100, 14.
- Diaz, C.; Saliba-Colombani, V.; Loudet, O.; Belluomo, P.; Moreau, L.; Daniel-Vedele, F.; Morot-Gaudry, J.F. & Masclaux-Daubresse, C. (2006)** Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47[1], 74-83.
- Doremus, H.D. & Jagendorf, A.T. (1985)** Subcellular localization of the pathway of *de novo* pyrimidine synthesis in pea leaves. *Plant physiol.* 79, 856-861.
- Emanuelsson, O.; Brunak, S.; von Heijne, G. & Nielsen, H. (2007)** Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* 2, 953-971.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983)** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* 132[1], 6-13.
- Finkelstein, R.R.; Gampala, S.S.L. & Rock, C.D. (2002)** Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell Supplement* 2002, 15-45.
- Floch, F.I.; Lafleurriel, J. & Guillot, A. (1982)** Interconversion of purine nucleotides in Jerusalem artichoke shoots. *Plant Physiol. Biochem.* 27, 309-316.
- Flörchinger, M. (2007)** Nucleosidaufnahme in Pflanzen und Analyse damit verbundener Stoffwechselprozesse. Technische Universität Kaiserslautern. Dissertation.
- Flörchinger, M.; Zimmermann, M.; Traub, M.; Neuhaus, H.E. & Möhlmann, T. (2006)** Adenosine stimulates anabolic metabolism in developing castor bean (*Ricinus communis* L.) cotyledons. *Planta* 223[2], 340-348.
- Fsihi, H.; Kottwitz, B. & Bremer, E. (1993)** Single amino acid substitutions affecting the substrate specificity of the *Escherichia coli* K-12 nucleoside-specific Tsx channel. *J.Biol.Chem.* 268[23], 17495-17503.
- Gallardo, K.; Job, C.; Groot, S.P.C.; Puype, M.; Demol, H.; Vandekerckhove, J. & Job, D. (2001)** Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.* 126, 835-848.
- Garciarrubio, A.; Legaria, J.P. & Covarrubias, A.A. (1997)** Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203[2], 182-187.
- Gibson, S.I. (2005)** Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr.O. Plant Biol.* 8[1], 93-102.
- Giermann, N.; Schröder, M.; Ritter, T. & Zrenner, R. (2002)** Molecular analysis of *de novo* pyrimidine synthesis in *solanaceous* species. *Plant Mol.Biol.* 50, 393-403.
- Gillissen, B.; Bürkle, L.; Andre, B.; Kuhn, C.; Rentsch, D.; Brandl, B., & Frommer, W.B. (2000)** A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12[2], 291-300.

- Gleave, A.P. (1992)** A versatile binary vector system with a t-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol.Biol.* 20[6], 1203-1207.
- Gojkovic, Z.; Rislund, L.; Andersen, B.; Sandrini, M.P.; Cook, P.F.; Schnackerz, K.D. & Piskur, J. (2003)** Dihydropyrimidine amidohydrolases and dihydroorotases share the same origin and several enzymatic properties. *Nucleic Acids Res.* 31, 1683-1692.
- Gosti, F.; Beaudoin, N.; Serizet, C.; Webb, A.A.R.; Vartanian, N. & Giraudat, J. (1999)** ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11, 1897-1910.
- Gould, K.S. (2004)** Nature's Swiss Army Knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J.Biomed.Biotechnol.* 2004[5], 314-320.
- Haferkamp, I. (2007)** The diverse members of the mitochondrial carrier family in plants. *FEBS Letters* 581, 2375-2379.
- Haferkamp, I.; Hackstein, J.H.P.; Voncken, F.; Schmit, G. & Tjaden, J. (2002)** Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. *Eur.J.Biochem.* 269, 3172-3181.
- Hakala, M.T. & Rustum, Y.M. (1979)** The potential of *in vitro* screening. In *Cancer drug development* (De Vita VT, Busch H ,eds) New York, Academic Press, pp. 271- 290.
- Han, B.W.; Bingman, C.A.; Mahnke, D.K.; Bannen, R.M.; Bednarek, S.Y.; Sabina, R.L. & Phillips, G.N. jr. (2006)** Membrane association, mechanism of action, and structure of Arabidopsis embryonic factor 1 (FAC1). *J.Biol.Chem.* 281[21], 14939-14947.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166, 557-580.
- Hanson AD and Gregory JF (2002)** Synthesis and turnover of folates in plants. *Curr.Opin.Plant Biol.* 5, 244-249.
- Heazlewood, J.L.; Tonti-Filippini, J.S.; Gout, A.M.; Day, D.A.; Whelan, J. & Millar, A.H. (2003)** Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16[1], 241-256.
- Heldt, H.W. (1999)** Pflanzenbiochemie. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg.
- Herz, S., Eberhard, S. & Bacher, A. (2000)** Biosynthesis of riboflavin in plants. The *ribA* gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4- dihydroxy-2-butanone 4-phosphat synthase. *Phytochemistry* 53, 723-731.
- Hesberg, C.; Hansch, R.; Mendel, R.R. & Bittner, F. (2004)** Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: differential gene expression and enzyme activities. *J.Biol.Chem.* 279[14], 13547-13554.
- Himmelblau, E. & Amasino, R.M. (2001)** Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Plant Physiol.* 158[10], 1317-1323.

- Hill, J. (1980) The remobilization of nutrients from leaves. *J.Plant Nutr.* 2, 407-444.
- Himelbach, A.; Yang, Y. & Grill, E. (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr.Opin.Plant Biol.* 6[5], 470-479.
- Hocking, P.J. (1994) Dry-matter production, mineral nutrient concentrations, and nutrient distribution and redistribution in irrigated spring wheat, *J.Plant Nutr.* 17, 1289-1308.
- Höfgen, R. & Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16, 9877.
- Höfgen, R. & Willmitzer, L. (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci.* 66, 221-230.
- Hörtensteiner, S. (2006) Chlorophyll degradation during senescence. *Annu.Rev.Plant Biol.* 57, 55-77.
- Hörtensteiner, S. & Feller, U. (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J.Exp.Bot.* 53[370], 927-937.
- Holdsworth, M.; Kurup, S. & McKibbin, R. (1999) Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends Plant Sci.* 4, 275–280.
- Hoth, S.; Morgante, M.; Sanchez, J.P.; Hanafey, M.K.; Tingey, S.V. & Chua, N.H. (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J.Cell Sci.* 15;115(Pt 24), 4891-4900.
- Hung, W.F.; Chen, L.J.; Boldt, R.; Sun, C.W. & Li, H.M. (2004) Characterization of *Arabidopsis* glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase-deficient mutants. *Plant Physiol.* 153, 1314-1323.
- Husain, S.E.; James, C.; Shields, R. & Foyer, C.H. (2001) Manipulation of fruit sugar composition but not content in *Lycopersicon esculentum* fruit by introgression of an acid invertase gene from *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Plant Cell Physiol.* 46, 1366-1376.
- Hyde, R.J.; Cass, C.E.; Young, J.D. & Baldwin, S.A. (2001) The ENT family of eukaryote nucleoside transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol.Membr.Biol.* 18, 53-63.
- Ishiyama, K.; Inoue, E.; Watanabe-Takahashi, A.; Obara, M.; Yamaya, T. & Takahashi, H. (2004) Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *J.Biol.Chem.* 279[16], 16598-16605.
- Islam, M.R.; Kim, H.; Kang, S.W.; Kim, J.S.; Jeong, Y.M.; Hwang, H.J.; Lee, S.Y.; Woo, J.C. & Kim, S.G. (2007) Functional characterization of a gene encoding a dual domain for uridine kinase and uracil phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* 63, 465–477.
- Jaquinod, M.; Villiers, F.; Kieffer-Jaquinod, S.; Hugouvieux, V.; Bruley, C.; Garin, J. & Bourguignon, J. (2007) A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol.Cell.Proteomics* 6, 394-412.

- Jeter, C.R.; Tang, W.Q.; Henaff, E.; Butterfield, T. & Roux, S.J. (2004)** Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2652-2664.
- Jia, L.; Zhang, B.; Mao, C.; Li, J.; Wu, Y.; Wu, P & Wu, Z. (2008)** OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 228[1], 51-59.
- Jones, E.J. (1980)** Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu.Rev.Biochem.* 49, 253–279.
- Journet, E.P. & Douce, R. (1985)** Enzymic capacities of purified cauliflower bud plastids for lipid synthesis and carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* 79[2], 458-467.
- Jung, B.; Flörchinger, M.; Kunz, H.-H.; Traub, M.; Wartenberg, R.; Jeblick, W.; Neuhaus, H.E. & Möhlmann, T. (2009)** Uridine-Ribohydrolase is a key regulator of uridine degradation in the nucleoside degradation and salvage pathways of Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 876–891.
- Jung, B.; Hoffmann, C. & Möhlmann, T. (2011)** Arabidopsis nucleoside hydrolases involed in intracellular and extracellular degradation of purines. *Plant J.*, in press
- Kafer, C.; Zhou, L.; Santoso, D.; Guirgis, A.; Weers, B.; Park, S. & Thornburg, R. (2004)** Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Front.Biosci.* 9, 1611-1625.
- Kanamori-Fukuda, I.; Komamine, A. & Ashihara, H. (1981)** Pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Vinca rosea* cells: changes in the activity of the *de novo* and salvage pathways during growth in a suspension culture. *J.Exp.Bot.* 32 [126], 69-78.
- Kanehisa, M. (2002)** KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Database. www.genome.ad.jp/kegg/.
- Kappock, T.J.; Ealick, S.E. & Stubbe, J.A. (2000)** Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 4, 567-572.
- Katavic, V.; Reed, D.W.; Taylor, D.C.; Giblin, E.M.; Barton, D.L.; Zou, J.; Mackenzie, S.L.; Covello, P.S. & Kunst, L. (1995)** Alteration of seed fatty acid composition by an ethyl methanesulfonate-induced mutation in *Arabidopsis thaliana* affecting diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Physiol* 108, 399-409.
- Kieber, J.J. (2002)** Cytokinins. In *The ArabidopsisBook*, ed. CR Somerville, EM Meyerowitz. Rockville, MD: Am.Soc.Plant Biol. doi:10.1199/tab.0063, www.aspb.org/publications/arabidopsis.
- Kim, H.; Kelly, R.E. & Evans, D.R. (1992)** The structural organization of the hamster multifunctional protein CAD. controlled proteolysis, domains, and linkers. *J.Biol.Chem.* 267 [10], 7177–7184.
- Kirchberger, S.; Tjaden, J. & Neuhaus, H.E. (2008)** Characterization of the Arabidopsis Brittle1 transport q1^protein and impact of reduced activity on plant metabolism. *Plant J.* 56, 51-63.
- Koncz V. & Shell, J. (1986)** The promotor of T1-DNA gene 5 controls the tissuespecific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium vector. *Mol.Gen.Genet.* 204, 383-396.

- Koslowsky, S.; Riegler, H.; Bergmuller, E. & Zrenner, R. (2008)** Higher biomass accumulation by increasing phosphoribosylpyrophosphate synthetase activity in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Biotechnol.J.* 6, 281–294.
- Lam, H.M.; Coschigano, K.T.; Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R. & Coruzzi, G.M. (1996)** The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* 47, 569-593.
- Lange, H.; Shropshire, W. & Mohr, H. (1971)** An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. *Plant Physiol.* 47, 649-655.
- Lea, U.S.; Slimestad, R.; Smedvig, P. & Lillo, C. (2007)** Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* 225[5], 1245-1253.
- Lee, H.S. & Sturm, A. (1996)** Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiol.* 112, 1513-1522.
- Lehrach, H.; Diamond, D.; Wozney, J.M. & Boedtker H. (1977)** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16[21], 4743-4751.
- Leinhos, V.; Krauss, G.J. & Glund, K. (1986)** Evidence that a part of cellular uridine of a tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell suspension culture is located in the vacuoles. *Plant Science* 47[1], 15-20.
- Leon, P. & Sheen, J. (2003)** Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* 8, 110-116.
- Leroch, M.; Kirchberger, S.; Haferkamp, I.; Wahl, M.; Neuhaus, H.E. & Tjaden, J. (2005)** Identification and characterization of a novel plastidic adenine nucleotide uniporter from *Solanum tuberosum*. *J.Biol.Chem.* 280[18], 17992-18000.
- Leroch, M.; Neuhaus, H.E.; Kirchberger, S.; Zimmermann, S.; Melzer, M.; Gerhold, J. & Tjaden, J. (2008)** Identification of a novel adenine nucleotide transporter in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20[2], 438-451.
- Li, G.; Liu, K.; Baldwin, S.A. & Wang, D. (2003)** Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, expression pattern and analysis of transport activities. *J.Biol.Chem.* 278, 35732-35742.
- Li, J. & Wang, D. (2000)** Cloning and in vitro expression of the cDNA encoding a putative nucleoside transporter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 157, 23-32.
- Liepman, A.H. & Olsen, L.J. (2003)** Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131, 215–227.
- Liu, X.; Qian, W.; Liu, X.; Qin, H. & Wang, D. (2007)** Molecular and functional analysis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 175[3], 448-461.

- Löffler, A.; Abel, S.; Jost, W.; Beintema, J.J. & Glund, K. (1992)** Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiol.* 98, 1472-1478.
- Lu, C. & Hills, M.J. (2002)** Arabidopsis mutants deficient in diacylglycerol acyltransferase display increased sensitivity to abscisic acid, sugars, and osmotic stress during germination and seedling development. *Plant Physiol.* 129[3], 1352-1358.
- Lytovchenko, A.; Sonnewald, U. & Fernie, A.R. (2007)** The complex network of non-cellulosic carbohydrate metabolism. *Curr.Op.Plant Biol.* 10[3], 227-235.
- Mansfield, T.A.; Schultes, N.P. & Mourad, G.S. (2009)** AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 583(2), 481-486.
- Manguet, S.E.; Gakière, B.; Majira, A.; Pelletier, S.; Bringel, F.; Guérard, F.; Caboche, M.; Berthomé, R. & Renou, J.P. (2009)** Uracil salvage is necessary for early Arabidopsis development. *The Plant Journal* 60, 280-291.
- Marschner, H. (1995)** Mineral nutrition of higher plants, 2nd Edn. Academic Press, London, 889 p.
- Martin, T.; Oswald, O. & Graham, I.A. (2002)** Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiol.* 128[2], 472-481.
- Mauk, C.S. & Noodén, L.D. (1992)** Regulation of minimal redistribution in pod-bearing soybean explants. *J.Exp.Botany* 43[11], 1429-1440.
- Maurino, V.G.; Grube, E.; Zielinski, J.; Schild, A.; Fischer, K. & Flügge, U.I. (2006)** Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47[10], 1381-1393.
- Menges, M.; Hennig, L.; Grisse, W. & Murray, J.A. (2002)** Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis. *J.Biol.Chem.* 277[44], 41987-42002.
- Merlot, S.; Gosti, F.; Guerrier, D.; Vavasseur, A. & Giraudat, J. (2001)** The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant Journal* 25[3], 295-303.
- Moffat, B. & Asihara, H. (2002)** Purine and Pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis book*, American Society of Plant Biologists.
- Moffat, B. & Somerville, C. (1988)** Positive selection for male-sterile mutants of Arabidopsis lacking adenine phosphoribosyl transferase activity. *Plant Physiol.* 86, 1150-1154.
- Moffatt, B.A.; Stevens, Y.Y.; Allen, M.S.; Snider, J.D.; Pereira, L.A.; Todorova, M.I.; Summers, P.S.; Weretilnyk, E.A.; Martin-McCaffrey, L. & Wagner, C. (2002)** Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol.* 128, 812-821.
- Möhlmann, T.; Bernard, C.; Hach, S. & Neuhaus, H.E. (2010)** Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biology* 12[1], 26-32.

- Möhlmann, T.; Mezher, Z.; Schwerdtfeger, G. & Neuhaus, H.E. (2001)** Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1,At). FEBS Letters 25582, 1-5.
- Mok, D.W.S. & Mok, M.C. (2001)** Cytokinin metabolism and action. Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol. 52, 89-118.
- Morcuende, R.; Bari, R.; Gibon, Y.; Zheng, W.; Pant, B.D.; Blasing, O.; Usadel, B.; Czechowski, T.; Udvardi, M.K.; Stitt, M. & Scheible, W.R. (2007)** Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. Plant Cell Environ. 30[1], 85-112.
- Mudd, J.B. & Dezacks, R. (1981)** Synthesis of phosphatidylglycerol by chloroplasts from leaves of *Spinacia oleracea* L. (spinach). Arch.Biochem.Biophys. 209[2], 584-591.
- Murashige, F. & Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15, 473-496.
- Nasr, F.; Bertauche, N.; Dufour, M.E.; Minet, M. & Lacroute, F. (1994)** Heterospecific cloning of *Arabidopsis thaliana* cDNAs by direct complementation of pyrimidine auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. cloning and sequence analysis of two cDNAs catalysing the second, fifth and sixth steps of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway. Mol.Gen.Genet. 244, 23–32.
- Nelson, B.K.; Cai, X. & Nebenführ, A. (2007)** A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. Plant Journal 51, 1126-1136.
- Nicholas, K.B. & Nicholas, H. (1997)** GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. distributed by the author.
- Nieminen, T. & Helmisaari (1996)** Nutrient retranslocation in the foliage of *Pinus sylvestris* L. growing along a heavy metal pollution gradient. Tree Physiol. 16[10], 825-831.
- Nooden, L. & Leopold, A.C. (1988)** Senescence and aging in plants. Academic Press, San Diego.
- Nooden, L.; Guiamet, J. & John, I. (1997)** Senescence mechanisms. Physiol.Plant 101, 746-753.
- Ogawa, J. & Shimizu, S. (1994)** Beta-ureidopropionase with N-carbamoyl-alpha-L-amino acid amidohydrolase activity from an aerobic bacterium, *Pseudomonas putida* IFO 12996. Eur.J.Biochem. 223, 625-630.
- Petersen, C. & Moller, L.B. (2001)** The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation. J.Biol.Chem. 276[2], 884-894.
- Piskur, J.; Schnackerz, K.D.; Andersen, G. & Björnberg, O. (2007)** Comparative genomics reveals novel biochemical pathways. Trends in Genetics 8, 369–372.
- Porter, D.J.; Harrington, J.A.; Almond, M.R.; Chestnut, W.G.; Tanoury, G. & Spector, T. (1995)** Enzymatic elimination of fluoride from alpha-fluoro-beta-alanine. Biochem.Pharmacol. 50[9], 1475-1484.
- Pospisilova, H. & Frebort, I. (2007)** Aminohydrolases acting on adenine, adenosine and their derivatives. Biomed.Pap.Med.Fac.Univ.Palacky.Olomouc.Czech.Repub. 151[1], 3-10.

- Price, J.; Laxmi, A.; St. Martin, S.K. & Jang, J.-C. (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2128-2150.
- Price, J.; Li, T.-C.; Kang, S.G.; Na, J.K. & Jang, J.-C. (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 132, 1424-1438.
- Rawls, J.M. (2006) Analysis of pyrimidine catabolism in *Drosophila melanogaster* using epistatic interactions with mutations of pyrimidine biosynthesis and beta-alanine metabolism. *Genetics* 172, 1665-1674.
- Rawls, J.; Knecht, W.; Diekert, K.; Lill, R. & Löffler, M. (2000) Requirements for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase. *Eur.J.Biochem.* 267, 2079-2087.
- Raychaudhuri, A. & Tipton, P.A. (2002) Cloning and expression of the gene for soybean hydroxyisourate hydrolase. Localization and implications for function and mechanism. *Plant Physiol.* 130[4], 2061-2068.
- Reinhold, T.; Alawady, A.; Grimm, B.; Beran, K.; Jahns, P.; Conrath, U.; Bauer, J.; Reiser, J.; Melzer, M.; Jeblick, W. & Neuhaus, H.E. (2007) Limitation of nocturnal import of ATP into Arabidopsis chloroplasts leads to photooxidative damage. *Plant Journal* 50, 293-304.
- Reiser, J.; Linka, N.; Lemke, L.; Jeblick, W. & Neuhaus H.E. (2004) Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136[3], 3524-3536.
- Rolland, F.; Moore, B. & Sheen, J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14, 185-205.
- Rolletschek, H.; Hajirezaei, M.R.; Wobus, U. & Weber, H. (2002) Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars and leads to higher water and nitrogen uptake. *Planta* 214[6], 954-964.
- Ross, C.W. (1981) Biosynthesis of nucleotides. In: Stump PK, Conn EE (eds) *The Biochemistry of plants*. Vol 6, Academic Press, New York pp. 169-205.
- Routaboul, J.; Benning, C.; Bechtold, N.; Caboche, M. & Lepiniec, L. (1999) The *TAG1* locus of Arabidopsis encodes for a diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol.Biochem.* 37, 831-840.
- Santoso, D. & Thornburg, R. (1998) Uridine 5'-monophosphate synthase is transcriptionally regulated by pyrimidine levels in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* 116[2], 815- 821.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Scheible, W.R.; Morcuende, R.; Czechowski, T.; Fritz, C.; Osuna, D.; Palacios-Rojas, N.; Schindelasch, D.; Thimm, O.; Udvardi, M.K. & Stitt, M. (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136[1], 2483-2499.
- Schmidt, A.; Su, Y.H.; Kunze, R.; Warner, S.; Hewitt, M.; Slocum, R.D.; Ludewig, U.; Frommer, W.B. & Desimone, M. (2004) UPS1 and UPS2 from Arabidopsis mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *J.Biol.Chem.* 279, 44817-44824.

- Schröder, M.; Giermann, N. & Zrenner, R. (2005)** Functional analysis of the pyrimidine *de novo* synthesis pathway in *solanaceous* species. *Plant Physiol.* 138, 1926-38.
- Schwacke, R.; Schneider, A.; Van der Graaff, E.; Fischer, K.; Catoni, E.; Desimone, M.; Frommer, W.B.; Flügge, U.-I. & Kunze, R. (2003)** ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *Plant Physiol.* 131, 16-26.
- Senecoff, J.F.; McKinney, E.C. & Meagher, R.B. (1996)** *De novo* purine synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 112, 905-991.
- Sergeeva, L.I.; Keurentjes, J.J.B.; Bentsink, L.; Vonk, J.; van der Plas, L.H.W.; Koornneef, M. & Veugdenhil, D. (2006)** Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 103, 2994-2999.
- Sessions, A.; Burke, E.; Presting, G.; Aux, G.; McElver, J.; Patton, D.; Dietrich, B.; Ho, P.; Bacwaden, J.; Ko, C.; Clarke, J.D.; Cotton, D.; Bullis, D.; Snell, J.; Miguel, T.; Hutchinson, D.; Kimmerly, B.; Mitzel, T.; Katagiri, F.; Glazebrook, J.; Law, M. & Goff, S.A. (2002)** A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* 14[12], 2985-2994.
- Sessions, A.; Weigel, D. & Yanofsky, M.F. (1999)** The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promotor specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J.* 20[2], 259-263.
- Smart, C. (1994)** Transley Review No. 64, Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126, 419-448.
- Smith, P.M.C. & Atkins, C.A. (2002)** Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* 128, 793-802.
- Song, C.J.; Steinebrunner, I.; Wang, X.; Stout, S.C. & Roux, S.J. (2006)** Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 140, 1222-1232.
- Stasolla, C.; Katahira, R.; Thorpe, T.A.; & Ashihara, H. (2003)** Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J.Plant Physiol.* 160[11], 1271-1295.
- Steyn, W.J.; Wand, S.J.E.; Holcroft, D.M. & Jacobs, G. (2002)** Anthocyanins in vegetative tissue: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155[3], 349-361.
- Stitt, M. & Heldt, H.W. (1981)** Physiological rates of starch breakdown in isolated intact starch chloroplasts. *Plant Physiol.* 68[3], 755-761.
- Stougaard, J. (1993)** Substrate dependent negative selection in plants using abacterial cytosine deaminase gene. *Plant J.* 3[5], 755-761.
- Sturm, A. & Chrispeels, M.J. (1990)** cDNA cloning of carrot extracellular [beta]-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2, 1107-1119.
- Sundaram, M.; Yao, S.Y.; Ingram, J.C.; Berry, Z.A.; Abidi, F.; Cass, C.E.; Baldwin, S.A. & Young, J.D. (2001)** Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *J.Biol.Chem.* 276[48], 45270-45275.

- Swarbrick, P.A.; Schulze-Lefert, P. & Scholes, J.D. (2006)** Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Env.* 29, 1061-1076.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2000)** *Physiologie der Pflanzen*, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg.
- Tajima, S.; Noruma, M. & Kouchi, H. (2004)** Ureide biosynthesis in legume nodules. *Frontiers in Bioscience* 9, 1374-1381.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Thom, E. & Neuhaus, H.E. (1995)** Oxidation of imported or endogenous carbohydrates by isolated chloroplasts from green pepper fruits. *Plant Physiol.* 109[4], 1421-1426.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22[22], 4673-4680.
- Tiessen, A.; Hendriks, J.H.; Stitt, M.; Branscheid, A.; Gibon, Y.; Farre, E.M. & Geigenberger, P. (2002)** Starch synthesis in potato tubers is regulated by posttranslational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* 14, 2191-2213.
- Timson, J. (1966)** The germination of *Polygonum convolvulus* L. *New Phytol.* 65[4], 423-428.
- Tintemann, H.; Wasternack, C.; Benndorf, R. & Reinbothe, H. (1985)** The rate-limiting step of uracil degradation in tomato cell suspension cultures and *Euglena gracilis in vivo* studies. *Comp.Biochem.Physiol. Part B: Comp.Biochem.* 82[4], 787-792.
- Tjaden, J.; Schwöppe, C.; Möhlmann, T. & Neuhaus, H.E. (1998)** Expression of the plastidic ATP/ADP transporter gene in *Escherichia coli* leads to a functional adenine nucleotide transport system in the bacterial cytoplasmic membrane. *J.Biol.Chem.* 273, 9630-9636.
- Traub, M.; Flörchinger, M.; Piecuch, J.; Kunz, H-H.; Weise-Steinmetz, A.; Deitmer, J.W.; Neuhaus, H.E. & Möhlmann, T. (2007)** The flurouridine insensitive 1 (*fur1*) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 49, 855-864.
- Ullrich, A.; Knecht, W.; Piskur, J. & Löffler, M. (2002)** Plant dihydroorotate dehydrogenase differs significantly in substrate specificity and inhibition from the animal enzyme. *FEBS Letters* 529, 346-350.
- Van der Graaff, E.; Schwacke, R.; Schneider, A.; Desimone, M.; Flügge, U.I. & Kunze, R. (2006)** Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* 141[2], 776-792.
- Wagner, K.G. & Backer, A.I. (1992)** Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. *Int.Rev.Cyt.* 134, 1-14.
- Walden, R. & Schell, J. (1990)** Techniques in a plant molecular biology - progress and problems. *Eur.J.Biochem.* 192, 563-576.

- Walsh, T.A.; Green, S.B.; Larrinua, I.M. & Schmitzer, P.R. (2001)** Characterization of plant beta-ureidopropionase and functional overexpression in *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* 125, 1001–1011.
- Wasternack, C. (1978)** Degradation of pyrimidines-enzymes, localization and role in metabolism. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 173, 467–499.
- Wasternack, C. (1982)** Metabolism of pyrimidines and purines. In Pirson, A., Zimmermann, M.H., eds. *Encyclopedia of plant physiology*. New Ser, Vol. 14B. Berlin, Germany, Springer, 263–301.
- Wasternack, C.; Krauss, G.J. & Reinbothe, H. (1977)** *Plant Sci.Lett.* 10, 121-128.
- Wasternack, C.; Lippmann, G. & Reinbotte, H. (1979)** Pyrimidine-degrading enzymes. Purification and properties of beta-ureidopropionase of *Euglena gracilis*. *Biochim.Biophys.Acta.* 570[2], 341-351.
- Weaver, M. & Amasino, R.M. (2001)** Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiol.* 127, 876-886.
- Weber, H.; Borisjuk, L.; Heim, U.; Buchner, P. & Wobus, U. (1995)** Seed Coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* 7, 1835-1846.
- Weigel, D. & Glazebrook, J. (2002)** *Arabidopsis. A Laboratory Manual.*
- Welham, T.; Pike, J.; Horst, I.; Flemetakis, E.; Katinakis, P.; Kaneko, T.; Sato, S.; Tabata, S.; Perry, J.; Parniske, M. & Wang, T.L. (2009)** A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. *J.Exp.Bot.* 60[12], 3353-3365.
- Wendt, U.K.; Wenderoth, I.; Tegeler, A. & Von Schaewen, A. (2000)** Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 23[6], 723-733
- Wesley, S.V.; Helliwell, C.A.; Smith, N.A.; Wang, M.B.; Rouse, D.T.; Liu, Q.; Gooding, P.S.; Singh, S.P.; Abbott, D.; Stoutjesdijk, P.A.; Robinson, S.P.; Gleave, A.P.; Green, A.G. & Waterhouse, P.M. (2001)** Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27[6], 581-590.
- Winter, D.; Vinegar, B.; Nahal, H.; Ammar, R.; Wilson, G.V. & Provart, N.J. (2007)** An „electronic fluorescence pictograph“ browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS.One* 2[1], e718.
- Witte, C.P.; Rosso, M.G. & Romeis, T. (2005)** Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139[3], 1155-1162.
- Wormit, A.; Traub, M.; Flörchinger, M.; Neuhaus, H.E. & Möhlmann, T. (2004)** Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochem.J.* 383, 19-26.
- Xiao, G.; Wang, J.; Tangen, T. & Giacomini, K.M. (2001)** A novel proton-dependent nucleoside transporter, CeCNT3, from *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Pharmacol.* 59, 339-348.

- Yang, J. & Han, K.H. (2004)** Functional characterization of allantoinase genes from Arabidopsis and a nonureide-type legume black locust. *Plant Physiol.* 134[3], 1039-1049.
- Yao, Y.Y & Simon, P.W. (2003)** A 2.5-kb insert eliminates acid soluble invertase isozyme II transcript in carrot (*Daucus carota* L.) roots, causing high sucrose accumulation. *Plant Mol.Biol.* 53, 151- 162.
- Zimmermann, P.; Hirsch-Hoffmann, M.; Hennig, L. & Gruissem, W. (2004)** Genevestigator. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* 136, 2621-2632.
- Zrenner, R.; Riegler, H.; Marquard, C.R.; Lange, P.R.; Geserick, C.; Bartosz, C.E.; Chen, C.T. & Slocum, R.D. (2009)** A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in Arabidopsis. *New Phytol.* 183[1], 117-123.
- Zrenner, R.; Stitt, M.; Sonnewald, U. & Boldt, R. (2006)** Pyrimidine und purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu.Rev.Plant Biol.* 57, 805-836.
- Zybailov, B.; Rutschow, H.; Friso, G.; Rudella, A.; Emanuelsson, O.; Sun, Q. & van Wijk, K.J. (2008)** Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS.One* 3[4], e1994.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% (v/w)	Volumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent
μ	mikro
+N	Anzuchtsbedingung mit Stickstoff
-N	Anzuchtsbedingung ohne Stickstoff
AAC	ADP/ATP-Carrier
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABI	Abscisinsäure „insensitive“
ABF	Abscisinsäure „responsive element“ „binding factor“
ABRE	Abscisinsäure „responsive element“
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Adenosin-Kinase
AMP	Adenosinmonophosphat
APRTase	Adenin-Phosphoribosyltransferase
ATCase	Aspartat-Transcarbamylase
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAT	β-Alanin-Aminotransferase
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
¹⁴ C	radioaktiv markiertes Kohlenstoffatom
CA	2-Chloroadenosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat

ANHANG

CaMV 35S	Cauliflower Mosaic Virus 35S-Promotor
Ca(NO ₃) ₂	Calciumnitrat
CDA	Cytidin-Deaminase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDP	Cytidindiphosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CNT	„concentrative nucleoside transporter“
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CPSase	Carbamyolphosphat-Synthase
C _T	Anzahl der Zyklen
CTP	Cytidintriphosphat
CuSO ₄	Kupfersulfat
DCIP	Dichlorphenolindo-phenol
DEPC	Diethyldicarbonat
DHOase	Dihydroorotase
DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
E	Faktor der PCR-Effizienz
eATP	extrazelluläres Adenosintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ef1 α	Elongationsfaktor 1 α
ENT	„equilibrative nucleoside transporter“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Flavinadenindinukleotid
F-dUMP	5-Fluoro-Desoxy-Uridinmonophosphat
FG	Frischgewicht
FD	5-Fluorouridin
FMN	Flavinmononukleotid

ANHANG

FO	5-Fluoroorotat
FU	5-Fluorouracil
F-UTP	5-Fluoro-Uridintriphosphat
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	„green fluorescent protein“
Gln	Glutamin
GMP	Guanosinmonophosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
H ⁺	Proton
H ₃ BO ₃	Borsäure
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure
HGPRTase	Hypoxanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase
H ₂ O	Wasser
HPLC	<u>„high pressure liquid chromatography“</u>
IC	Ionenchromatographie
IMP	Inosinmonophosphat
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KNO ₃	Kaliumnitrat
KOH	Kaliumhydroxid
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
l	Liter
M	Molar
m	Meter
m	milli

ANHANG

MCF	„mitochondrial carrier family“
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MnSO ₄	Mangansulfat
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MS	Murashige Skoog
n	nano
N ₀	Anzahl der DNA-Kopien vor Beginn der PCR
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P) ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (oxidierte Form)
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ PO ₄	Natriumphosphat
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Center
NAT	Nukleobasen-Ascorbat-Transporter
NDK	Nukleodiddiphosphat-Kinase
NDP	Nukleosiddiphosphat
NDPase	Nukleodiddiphosphat-Phosphatase
NH ₄ ⁺	Ammonium
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	Ammoniumheptamolybdat
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrat
NMP	Nukleosidmonophosphat
N _n	Anzahl der DNA-Kopien nach n Zyklen
NSH	Nukleosid-Hydrolase
NTPase	Nukleodidtriphosphat-Phosphatase
OD	Optische Dichte
OMP	Orotidinmonophosphat
p	piko
³² P	radioaktiv markiertes Phosphoratom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol

ANHANG

P _i	anorganisches Phosphat
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PMSF	Phenylmethylysulphonylfluoride
PP _i	Pyrophosphat
PRPP	5-Phosphoribosylpyrophosphat
PUP	Purin-Permease
Pyd1	Dihydrouracil-Dehydrogenase
<i>Pyd1-1</i> und <i>-2</i>	homozygote <i>Pyd1</i> -„knockout“-Pflanzen
Pyd2	Dihydropyrimidinase
Pyd3	β-Ureidopropionase
Q _b	Ubichinon
qRT-PCR	quantitative „real time“ Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	Ribonukleinsäure Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	„real time“-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
<i>35S:DHODH</i>	<i>DHODH</i> -Überexpressionspflanzen
<i>35S_RNAi:DHODH</i>	<i>DHODH</i> -RNAi-Pflanzen
SDS	Natriumlaurylsulfat
<i>35S:Pyd1</i>	<i>Pyd1</i> -Überexpressionspflanzen
<i>35S:Δ21-Pyd1</i>	<i>Δ21-Pyd1</i> -Überexpressionspflanzen
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerol
T-DNA	Transfer-Desoxyribonukleinsäure
TMD	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
UK	Uridin-Kinase

ANHANG

UMK	Uridylat-Kinase
UMP	Uridinmonophosphat
UMPH	Pyrimidin-spezifische 5`-Nukleotidase
UMPSase	UMP-Synthase
UPS	Ureid-Permease
UPRTase	Uracil-Phosphoribosyltransferase
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettstrahlung
WT	Wildtyp
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid
XMP	Xanthosinmonophosphat
ZnSO ₄	Zinksulfat

7.2 Klonierungsstrategien

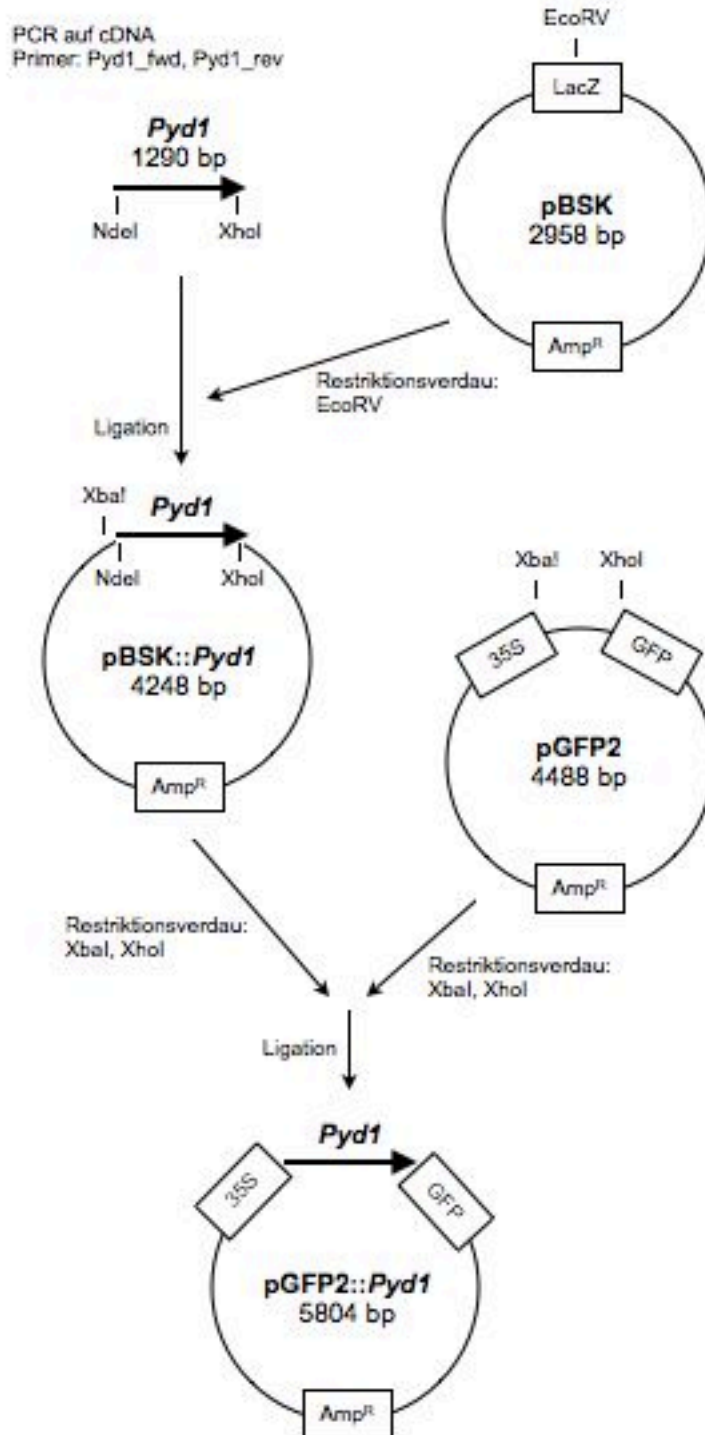


Abb. 7.1: Klonierungsstrategie für das pGFP2::Pyd1-Konstrukt

Die codierende Sequenz von *Pyd1* wurde mittels Pfu-Polymerase und den Primern DHODH_fwd und DHODH_rev von cDNA amplifiziert. LacZ, β -Galaktosidase; Amp^R, Ampicillin-Resistenz; 35S, CaMV 35S-Promotor; GFP, green fluorescent protein

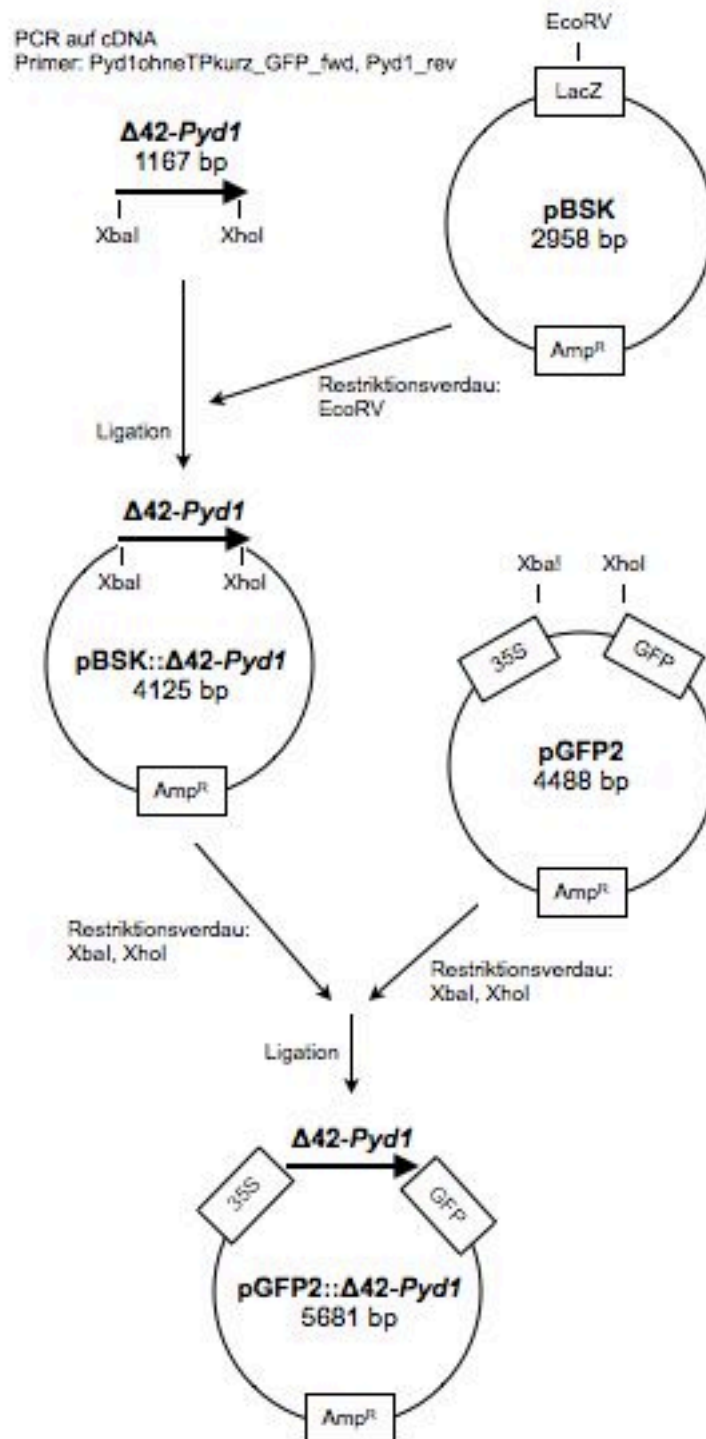


Abb. 7.2: Klonierungsstrategie für das pGFP2:: $\Delta 42$ -*Pyd1*-Konstrukt

Die um 126 Nukleotide verkürzte codierende Sequenz von *Pyd1* wurde mittels Pfu-Polymerase und den Primern DHODHohneTPkurz_GFP_fwd und DHODH_rev von cDNA amplifiziert. Mit Hilfe des Primers DHODHohneTPkurz_GFP_fwd wurde an den Beginn der verkürzten Sequenz ein Start-ATG eingefügt. LacZ, β -Galaktosidase; Amp^r, Ampicillin-Resistenz; 35S, CaMV 35S-Promotor; GFP, green fluorescent protein

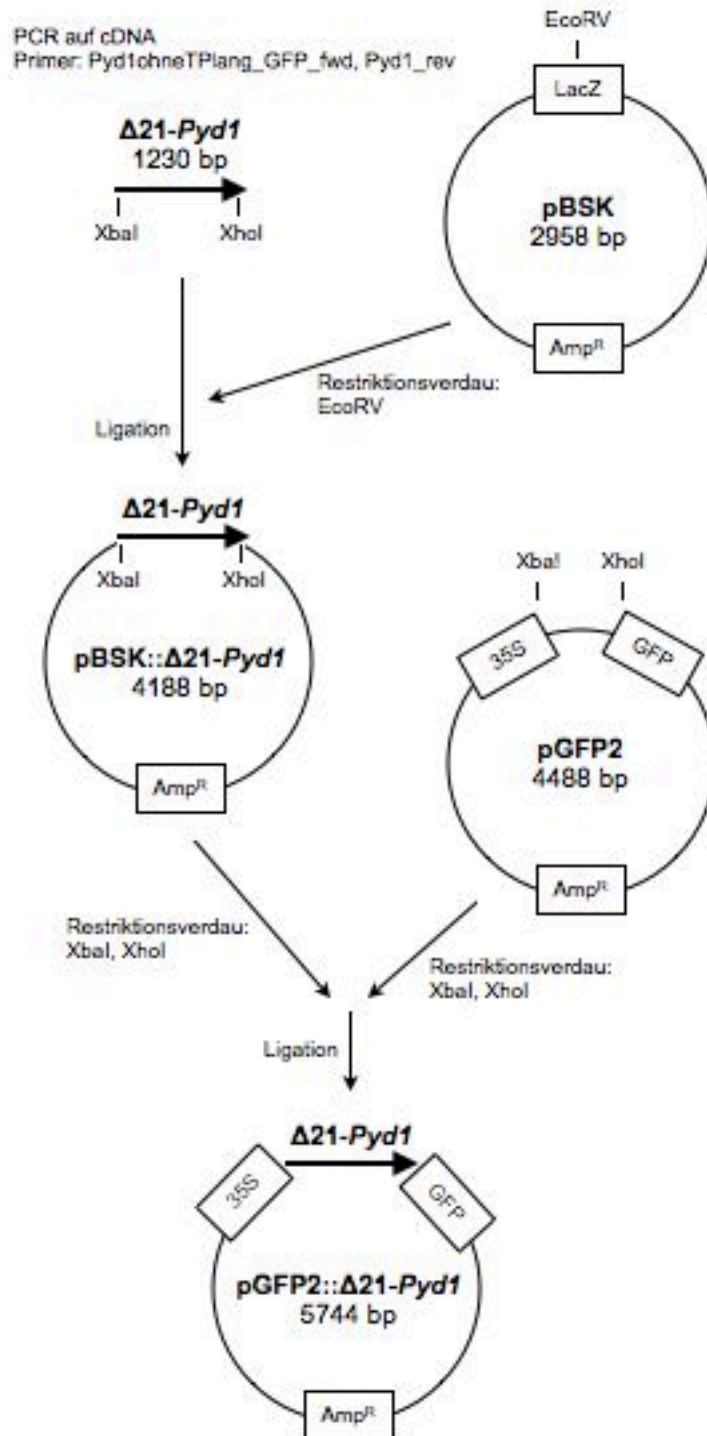


Abb. 7.3: Klonierungsstrategie für das pGFP2:: $\Delta 21$ -*Pyd1*-Konstrukt

Die um 63 Nukleotide verkürzte codierende Sequenz von *Pyd1* wurde mittels Pfu-Polymerase und den Primern DHODHohneTPlang_GFP_fwd und DHODH_rev von cDNA amplifiziert. Mit Hilfe des Primers DHODHohneTPlang_GFP_fwd wurde an den Beginn der verkürzten Sequenz ein Start-ATG eingefügt. LacZ, β -Galaktosidase; Amp^R, Ampicillin-Resistenz; 35S, CaMV 35S-Promotor; GFP, green fluorescent protein

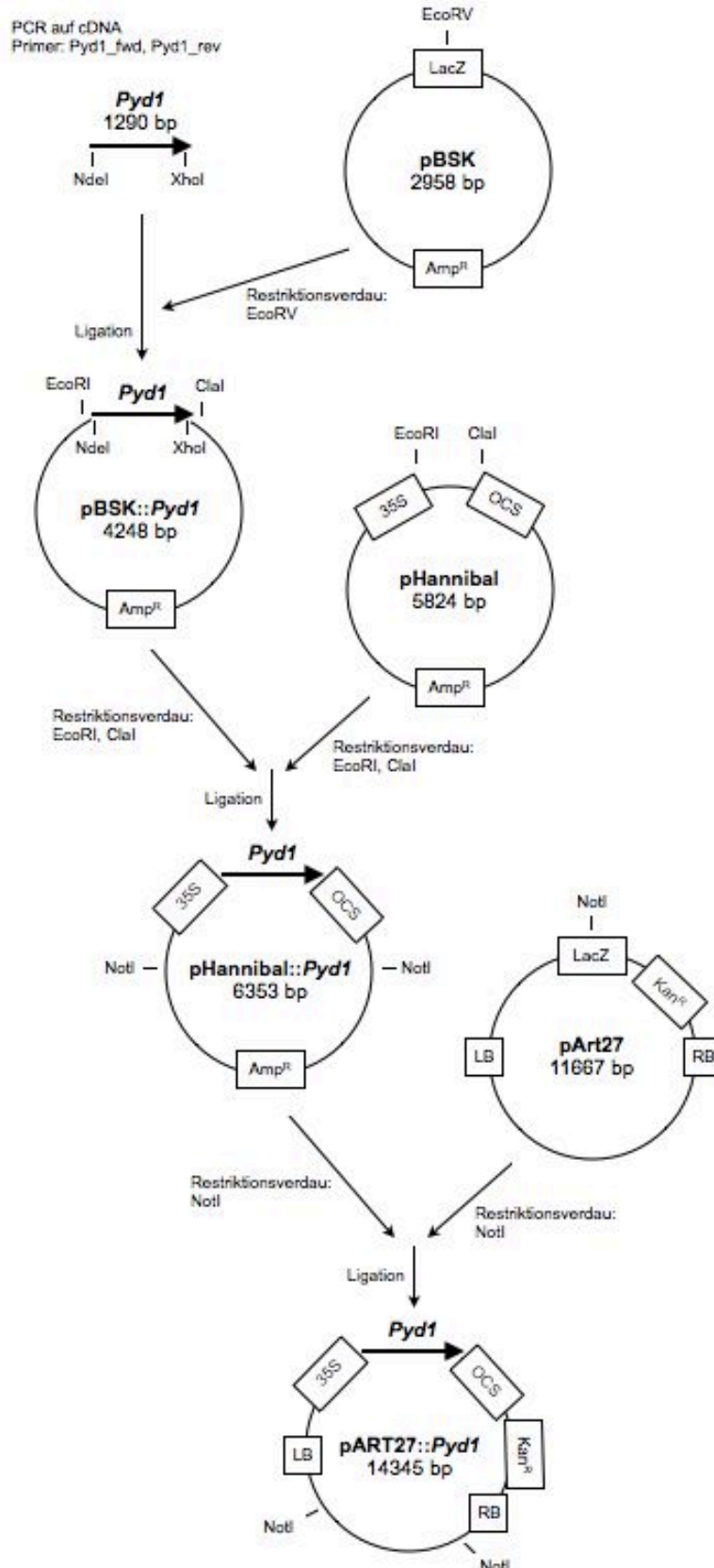


Abb. 7.4: Klonierungsstrategie für das pART27::Pyd1-Konstrukt

Die codierende Sequenz von *Pyd1* wurde mittels Pfu-Polymerase und den Primern Pyd1_fwd und Pyd1_rev von cDNA amplifiziert. LacZ, β-Galaktosidase; Amp^R, Ampicillin-Resistenz; 35S, CaMV 35S-Promotor; OCS, OCS-Terminator; Kan^R, Kanamycin-Resistenz; LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border

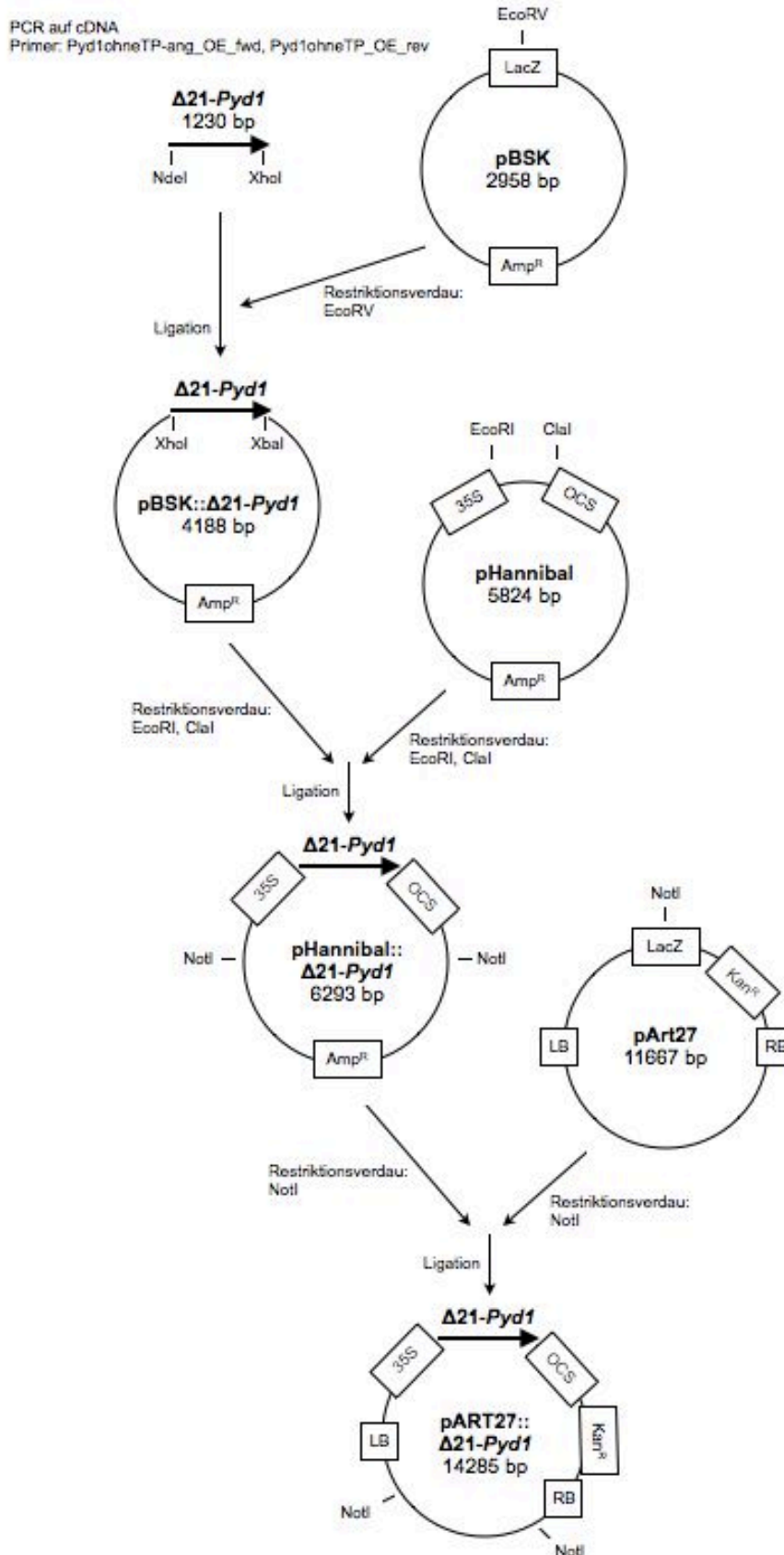


Abb. 7.5: Klonierungsstrategie für das pART27::Pyd1-Konstrukt

Die um 63 Nukleotide verkürzte codierende Sequenz von *Pyd1* wurde mittels Pfu-Polymerase und den Primern DHODHohneTPlang_OE_fwd und DHODHohneTP_OE_rev von cDNA amplifiziert. Mit Hilfe des Primers DHODHohneTPlang_OE_fwd wurde an den Beginn der verkürzten Sequenz ein Start-ATG eingefügt. LacZ, β-Galaktosidase; Amp^R, Ampicillin-Resistenz; 35S, CaMV 35S-Promotor; OCS, OCS-Terminator; Kan^R, Kanamycin-Resistenz; LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border

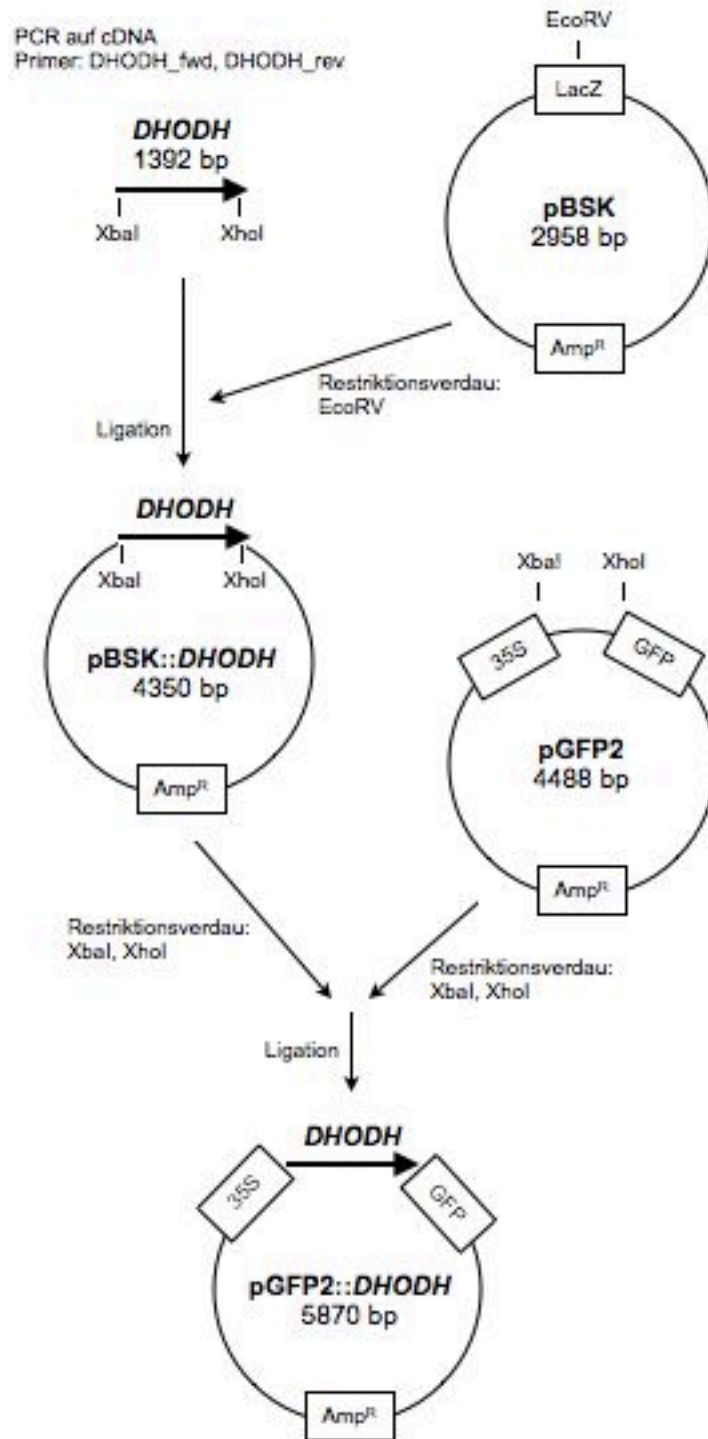


Abb. 7.6: Klonierungsstrategie für das pGFP2::DHODH-Konstrukt

Die codierende Sequenz von *DHODH* wurde mittels Pfu-Polymerase und den Primern DHODH_fwd und DHODH_rev von cDNA amplifiziert. LacZ, β -Galaktosidase; Amp^R, Ampicillin-Resistenz; 35S, CaMV 35S-Promotor; GFP, green fluorescent protein

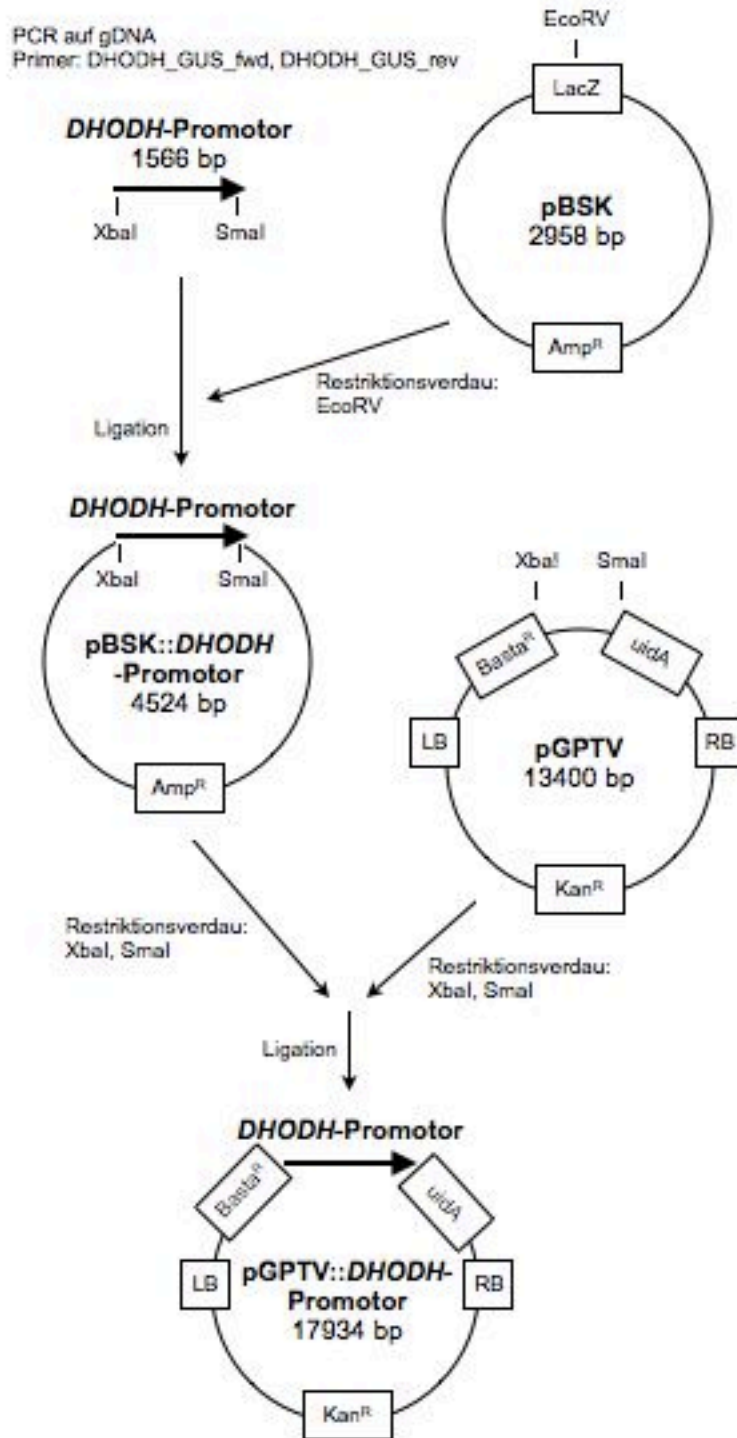


Abb. 7.7: Klonierungsstrategie für das pGPTV::DHODH-Promotor-Konstrukt

Der *DHODH*-Promotor im 5'-Bereich der codierenden Sequenz von *DHODH* wurde mittels Pfu-Polymerase und den Primern DHODH_GUS_fwd und DHODH_GUS_rev von gDNA amplifiziert. LacZ, β -Galaktosidase; Amp^R, Ampicillin-Resistenz; Kan^R, Kanamycin-Resistenz; Basta^R, Basta-Resistenz; uidA, β -Glucuronidase; LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border

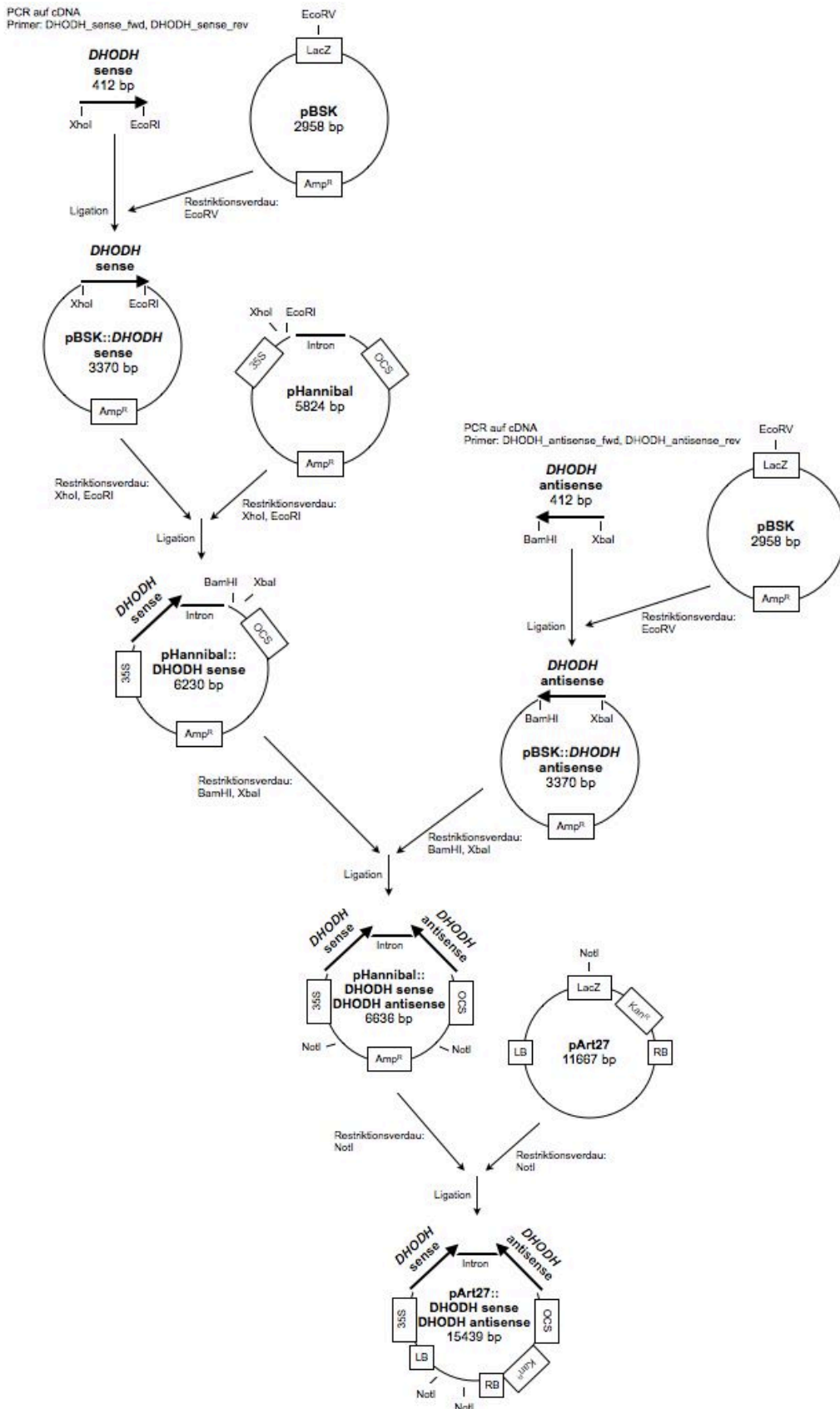


Abb. 7.8: Klonierungsstrategie für das pART27_RNAi::DHODH-Konstrukt

Es wurde ein Teil der codierende Sequenz von *DHODH* mittels Pfu-Polymerase und den Primern *DHODH_sense_fwd* und *DHODH_sense_rev* bzw. *DHODH_antisense_fwd* und *DHODH_antisense_rev* einmal in sense- und einmal in antisense-Orientierung von cDNA amplifiziert. LacZ, β -Galaktosidase; Amp^R, Ampicillin-Resistenz; 35S, CaMV 35S-Promotor; OCS, OCS-Terminator; Kan^R, Kanamycin-Resistenz; LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border

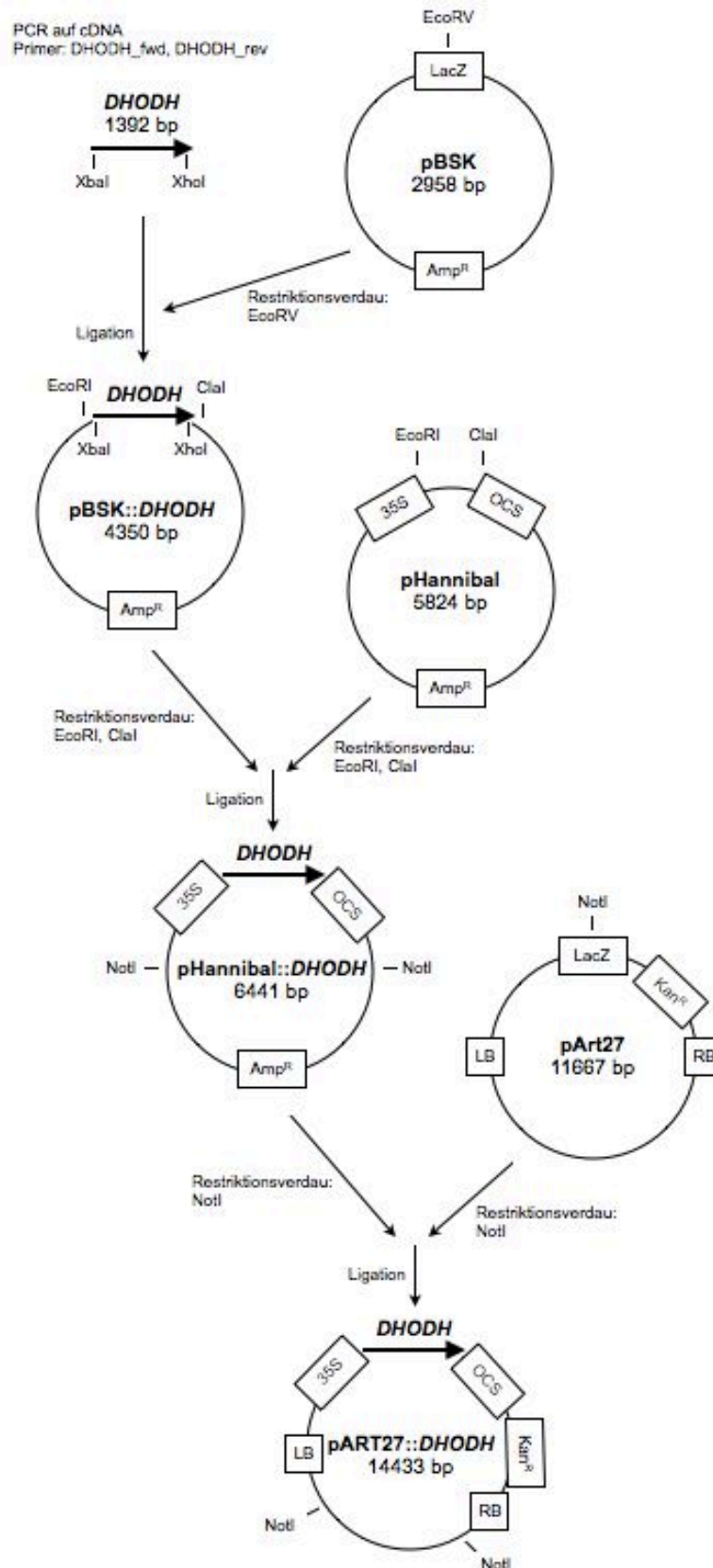


Abb. 7.9: Klonierungsstrategie für das pART27::DHODH-Konstrukt

Die codierende Sequenz von *DHODH* wurde mittels Pfu-Polymerase und den Primern DHODH_fwd und DHODH_rev von cDNA amplifiziert. LacZ, β-Galaktosidase; Amp^R, Ampicillin-Resistenz; 35S, CaMV 35S-Promotor; OCS, OCS-Terminator; Kan^R, Kanamycin-Resistenz; LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schematischer Überblick des pflanzlichen Pyrimidinnukleotid-Stoffwechsels	3
Abb. 3.1:	Untersuchung der entwicklungsspezifischen Genexpression von <i>Pyd1</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Pflanzen	37
Abb. 3.2:	Transiente Expression des <i>Pyd1</i> :GFP-Fusionskonstrukts in Tabak-Protoplasten	38
Abb. 3.3:	Genetische Charakterisierung der <i>Pyd1</i> :T-DNA-Insertionsmutanten	40
Abb. 3.4:	Untersuchung der Genexpression von <i>Pyd1</i> in Wildtyp- und 35S: <i>Pyd1</i> -Pflanzen	42
Abb. 3.5:	Untersuchung der Genexpression von <i>Pyd1</i> in Wildtyp- und 35S: Δ 21- <i>Pyd1</i> -Pflanzen	43
Abb. 3.6:	Wachstum von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlingen und <i>Pyd1</i> -„knockout“-Keimlingen auf MS-Agar unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 5-Fluorouracil	45
Abb. 3.7:	Wachstum von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp- und <i>Pyd1</i> -Überexpressions-Keimlingen auf MS-Agar unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 5-Fluorouracil	46
Abb. 3.8:	Wachstum von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp- und Δ 21- <i>Pyd1</i> -Überexpressions-Keimlingen auf MS-Agar unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 5-Fluorouracil	47
Abb. 3.9:	Abbau von [¹⁴ C]-Pyrimidinen zu [¹⁴ C]-CO ₂	48
Abb. 3.10:	Abbau von [¹⁴ C]-Thymin zu [¹⁴ C]-CO ₂	49
Abb. 3.11:	Abbau von [¹⁴ C]-Uracil zu [¹⁴ C]-CO ₂	50
Abb. 3.12:	Keimung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp und verschiedenen <i>Pyd1</i> -Mutanten	51
Abb. 3.13:	Chlorophyllgehalt von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten	52
Abb. 3.14:	4 Wochen alte Rosetten von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp und verschiedenen <i>Pyd1</i> -Mutanten	53
Abb. 3.15:	Blühinduktion in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp und verschiedenen <i>Pyd1</i> -Mutanten	54
Abb. 3.16:	Anzahl von Schoten und Samen in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten	54
Abb. 3.17:	Uracilgehalt von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten	57
Abb. 3.18:	Uracilgehalt von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten	58
Abb. 3.19:	Zucker- und Stärkegehalte von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten	59
Abb. 3.20:	Invertase-Aktivität von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten	61
Abb. 3.21:	Einbau von [¹⁴ C]-Acetat in Fettsäuren in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten	62
Abb. 3.22:	Untersuchung der <i>Pyd1</i> -Expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlingen nach ABA-Applikation	63

Abb. 3.23: Untersuchung der Expression von ABA-related genes in 2 Tage alten Keimlingen von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp und verschiedenen <i>Pyd1</i> -Mutanten	64
Abb. 3.24: Untersuchung der <i>Pyd1</i> -Expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Pflanzen unter natürlichen Seneszenzbedingungen	66
Abb. 3.25: Untersuchung der <i>Pyd1</i> -Expression in künstlich seneszierten <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Blättern	67
Abb. 3.26: Uracilgehalte in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten vor und nach künstlich induzierter Seneszenz	68
Abb. 3.27: Untersuchung der Expression der Pyrimidinabbau-Gene in Wildtyp-Keimlingen bei Stickstoffmangel	70
Abb. 3.28: Frischgewicht eines 10 Tage alter <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlings und der Keimlinge der verschiedenen <i>Pyd1</i> -Mutanten	71
Abb. 3.29: Anthocyan-Gehalt von 10 Tage alten <i>Arabidopsis thaliana</i> -Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten angezogen in steriler Flüssigkultur unter Stickstoffmangel	72
Abb. 3.30: Uracilgehalte von 10 Tage alten <i>Arabidopsis thaliana</i> -Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten angezogen unter Kontroll- und Stickstoffmangelbedingungen	73
Abb. 3.31: Zucker- und Stärke-Gehalte von 10 Tage alten <i>Arabidopsis thaliana</i> -Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>Pyd1</i> -Mutanten angezogen unter Kontroll- und Stickstoffmangelbedingungen	74
Abb. 3.32: Abbau von [¹⁴ C]-Pyrimidinen zu [¹⁴ C]-CO ₂ bei Stickstoffmangel	75
Abb. 3.33: Aminosäure-Alignment von DHODH (At5g23300) und <i>Pyd1</i> (At3g17810)	77
Abb. 3.34: Histochemische Färbung von Promotor: <i>DHODH-GUS</i> -Pflanzen	78
Abb. 3.35: Transiente Expression des <i>DHODH:GFP</i> -Fusionskonstrukts in Tabak-Protoplasten	79
Abb. 3.36: Untersuchung der Genexpression von <i>DHODH</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp- und 35S_RNAi: <i>DHODH</i> -Pflanzen	81
Abb. 3.37: Nachkommen einer heterozygoten 35S_RNAi: <i>DHODH</i> 3-Pflanze	82
Abb. 3.38: Untersuchung der Genexpression von <i>DHODH</i> in Wildtyp- und 35S: <i>DHODH</i> -Pflanzen	83
Abb. 3.39: <i>DHODH</i> -Aktivität von Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener 35S: <i>DHODH</i> -Mutanten	84
Abb. 3.40: Keimlings-Entwicklung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp und verschiedenen <i>DHODH</i> -Mutanten	85
Abb. 3.41: 6 Wochen alte Rosetten von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp und verschiedenen <i>DHODH</i> -Mutanten	86
Abb. 3.42: 3 Monate alte heterozygote 35S_RNAi: <i>DHODH</i> 3-Pflanze	87
Abb. 3.43: Frischgewicht eines 10 Tage alter <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlings und der Keimlinge der verschiedenen <i>DHODH</i> -Mutanten	87
Abb. 3.44: Chlorophyllgehalt von 10 Tage alten <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>DHODH</i> -Mutanten angezogen in steriler Flüssigkultur	88
Abb. 3.45: RNA-Gehalt von 10 Tage alten <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen verschiedener <i>DHODH</i> -Mutanten angezogen in steriler Flüssigkultur	89
Abb. 3.46: Abbau von [¹⁴ C]-Glukose zu [¹⁴ C]-CO ₂	90

7.4 Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen

„Analysis of Pyrimidine degradation“, Fachbereichs-Seminar, 10. Dezember 2009, Altleiningen.

„Pyrimidine degradation in *Arabidopsis thaliana*“, 7. Wallenfels Rundgespräch zur Pflanzenbiochemie, 7. Mai 2010, Wallenfels.

„Pyrimidine degradation in *Arabidopsis thaliana*“, TNAM 2010, 18. September 2010, Salzburg.

„Pyrimidine degradation in *Arabidopsis thaliana*“, Network Meeting "Extracellular Nucleotides", 23. Oktober 2010, Dresden.

„Pyrimidine degradation in *Arabidopsis thaliana*“, RIMB, 18. September 2010, Kaiserslautern.

7.5 Publikationsliste

Möhlmann, T.; Bernard, C.; Hach, S. & Neuhaus, H.E. (2010) Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biology* 12[1], 26-32.

Bernard, C.; Hach, S.; Traub M., Kunz H.H., Trentmann O. & Möhlmann T. Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) balances adenylate levels in plants. Submitted to *New Phytologist*.

Hach, S.; Bernard, C. & Möhlmann, T. Pyrimidine degradation influences germination of *Arabidopsis* seeds. in preparation.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus** für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken.

Bei Herrn **Prof. Dr. Matthias Hahn** möchte ich mich an dieser Stelle für die Bewertung meiner Arbeit herzlich bedanken.

Ein weiteres Dankeschön geht an Herrn **Prof. Dr. Johannes Herrmann** für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Dr. Torsten Möhlmann** bedanken, für die hervorragende Betreuung, seine Fachkompetenz, seine stetige Hilfsbereitschaft, seine ruhige Art... Danke Torsten, niemand hätte mich besser betreuen können!

Weiterhin gilt besonderer Dank dem gesamten **ENT-Team** seit ich dort vor 5 Jahren aufgenommen wurde für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke **Dr. Martin Traub** und **Dr. Michaela Traub**, von denen ich viel gelernt habe.

Dr. Benjamin Jung und **Dr. Carsten Bernard** möchte ich für die gute Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft danken.

Dankeschön auch an die Diplomandinnen **Marietta Hiery** und **Sandra Witz** und die Praktikanten **Dana Dech** und **Christopher Girke** die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem ergeht Dank an meine liebe Büro-Gefährtin **Christiane Hoffmann** und den „Feind an meiner Laborbank“ ;-)
Benjamin Rieder.

Sandra Klaumann danke ich für die gemeinsamen Mittagspausen mit unzähligen Latte Macchiati (!!!) und die diversen außer-universitären Aktivitäten. Auf dass noch viele folgen mögen...

Dank auch an alle anderen Helfer im Labor: der Labor-Mama und Nachschub-Lieferantin **Ruth Wartenberg**, dem Meister der Chromatographie **Wolfgang Jeblick** für unzählige HPLC- und IC-Läufe, **Christa Jung** für die Bewältigung aller bürokratischen Aufgaben und unserem fleißigen Spül-Bienchen **Ute Walther**.

Danke natürlich auch allen anderen Mitgliedern der **AG Pflanzenphysiologie** für das angenehme Arbeitsklima, die Unterstützung jeglicher Art und den 3-Uhr-Kaffee.

Dr. Hardy Rolletschek danke ich für die Analysen der Gesamt-Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte.

Last but not least... danke ich noch allen Menschen, die mich außerhalb der AG Pflanzenphysiologie während der vergangenen Jahre unterstützt haben.

Dies ist allen voran mein **Papa**, der mir all das ermöglicht hat. Ich weiß, dass du immer für mich da bist. Danke!

Meine **Oma** danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützt hat.

Ich danke meinem Zukünftigen :-)) **Benni**, der oft meine Launen und geistige Abwesenheit ertragen musste, aber sich wirklich nie beschwert hat. Und überhaupt...

Außerdem seiner Familie, die zwar schon Teil meiner Familie ist, dies aber nun auch offiziell wird.

Und **Christin** und **Martin**, die mir mehr sind als Freunde.

Lebenslauf

Name Stefanie Hach

Geburtsdatum 04.09.1983

Geburtsort Kaiserslautern

Schullaufbahn

08/1990 - 06/1994 Wilenstein-Grundschule in Trippstadt

08/1994 - 03/2003 Hohenstaufen-Gymnasium in Kaiserslautern,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2003 - 03/2008 Lehramt-Studium in Biologie und Mathematik
an der Technischen Universität Kaiserslautern

08/2007 - 04/2007 Staatsexamensarbeit in der Abteilung Pflanzenphysiologie
unter der Leitung von Prof. Dr. Neuhaus
Titel: Untersuchungen zum Nukleosid-„salvage“ mit Hilfe
biochemischer Methoden und Genexpressionsanalysen

Promotion

05/2007 - heute Promotion an der Technischen Universität Kaiserslautern
unter der Leitung von Prof. Dr. Neuhaus
Thema: Untersuchungen zum Pyrimidin-Stoffwechsel in
Arabidopsis thaliana

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Ich versichere, dass ich weder an der Technischen Universität Kaiserslautern noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, im Januar 2011

Stefanie Hach