

**Lehrstuhl für Genetik der  
Technischen Universität München**

**Stabilisotopenmarkierung und quantitative  
NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung des zentralen  
Kohlenhydratmetabolismus in *Zea mays*.**

**Gertraud Spielbauer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des Akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Gerhard Wenzel  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl  
2. Univ.-Prof. Dr. Gert Forkmann  
3. Univ.-Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 21.04.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 22.06.2005 angenommen.



Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Adalbert Bacher, Dr. Wolfgang Eisenreich, Dr. Lilla Margl und Dr. Christian Ettenhuber, Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie, TU München, und mit Prof. Dr. L. Curtis Hannah, University of Florida, durchgeführt.

Durch die Kooperationspartner vom Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie wurden die NMR-Spektren aufgenommen und quantitativ ausgewertet. Außerdem wurde dort, in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Genetik, die Flusssimulation entwickelt. Die Beiträge der Kooperationspartner werden in der vorliegenden Arbeit nur in Grundzügen beschrieben.

Die Anzucht vieler Maislinien erfolgte durch Prof. L. Curtis Hannah und seine Mitarbeiter in Gainesville, Florida. Prof. Hannah stellte auch seine Einrichtungen für die Durchführung der Markierungsexperimente zur Verfügung und leistete durch fachliche Diskussionen einen wichtigen Beitrag zur Interpretation der Daten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>12</b>
2.1	Stärke: Bedeutung, Zusammensetzung und Struktur .....	12
2.2	Biosynthese von Stärke im Maisendosperm .....	13
2.3	Stärkemutanten von Mais.....	18
2.4	Entwicklung von Körnern in Sterilkultur.....	23
2.5	Markierungsexperimente und Flussanalyse in der Pflanzenforschung.....	25
2.6	Ziele der Arbeit .....	29
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1	Sterilkultur von Maiskörnern .....	31
3.2	Markierung mit [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]Glucose bzw. [U- <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]Saccharose .....	31
3.3	Isolierung von Glucose aus Stärke .....	32
3.4	Isolierung von Glucose aus Stärke und Phytoglykogen von <i>sugary1</i> Mutanten.....	33
3.5	Partieller Verdau von Stärke .....	33
3.6	Bestimmung der Trockenmasse .....	33
3.7	Bestimmung des Stärkegehaltes.....	34
3.8	Bestimmung des Gehaltes an Glucose und Saccharose .....	34
3.9	NMR Spektroskopie.....	34
3.10	Bestimmung der Gesamtanreicherung .....	37
3.11	Statistischer Vergleich von Spektren .....	37
3.12	Pflanzenmaterial.....	38
3.13	Chemikalien und Reagenzien.....	39
3.14	Genotypisierung von <i>Sh2-Rev3</i> und <i>sh2</i> Endosperm .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
4.1	Experimenteller Ablauf.....	41
4.1.1	Von der Markierung zum Isotopologenumuster .....	41
4.1.2	Fehlerbetrachtung.....	45
4.1.3	Auswertung der Isotopologenumuster .....	47
4.1.3.1	Wie entstehen Isotopologe? .....	47

4.1.3.2	Qualitative Auswertung der Isotopologenmuster.....	56
4.1.3.3	Quantitative Auswertung der Isotopologenmuster.....	59
4.2	Steady State Annahme .....	62
4.3	Entwicklung von Maiskörnern in Sterilkultur.....	63
4.3.1	Akkumulierung von Speicherstoffen .....	63
4.3.2	Maiskörner entwickeln sich auf Saccharose und Glucose ähnlich .....	65
4.4	Einfluss des genetischen Hintergrunds auf das Isotopologenmuster .....	70
4.5	Einfluss von Anzuchtbedingungen auf das Muster.....	71
4.6	Betrachtung der metabolischen Flüsse zu unterschiedlichen Entwicklungsstufen .....	75
4.7	Kohlenhydratmetabolismus in Mutanten .....	80
4.7.1	Mutanten, die die Bereitstellung von Hexosen beeinträchtigen.....	81
4.7.2	Mutanten, die die Synthese und den Transport von ADP-Glucose beeinträchtigen....	83
4.7.3	Mutanten, die die Synthese von Amylopektin und Amylose beeinträchtigen .....	89
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>93</b>
5.1	Leistungsfähigkeit der Methode.....	93
5.2	Quantitative Auswertung der Ergebnisse: „Flussanalyse“.....	94
5.3	Flexibilität des Stoffwechsels: Flussänderungen mit der Entwicklung des Kornes .....	95
5.4	Stabilität des Stoffwechsels.....	98
5.5	Metabolismus in <i>amylose extender</i> , <i>waxy</i> und <i>sugary1</i> Mutanten.....	100
5.6	Produktion von Stärke und Phytoglykogen in <i>sugary1</i> Mutanten .....	101
5.7	Metabolismus in <i>shrunk2</i> , <i>brittle2</i> und <i>brittle1</i> Mutanten.....	104
5.8	Metabolismus in <i>shrunk1</i> , <i>shrunk1 sucrose synthase1</i> und <i>miniature1</i> Endosperm .....	109
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>113</b>

## Abkürzungen und Nomenklatur

Neben SI-Einheiten, Elementsymbolen, chemischen Formeln und dem Einbuchstabencode für Nucleotide werden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
<i>ae</i>	<i>amylose extender</i>
AGPase	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase
AGPPase	ADP-Glucose-Phosphorylase
ALD	Aldolase
BETC	basale Endospermtransferzellen
<i>bt</i>	<i>brittle</i>
cDNA	komplementäre DNA
DAP	Tage nach Pollinierung ( <i>days after pollination</i> )
DBE	Entzweigungsenzym ( <i>debranching enzyme</i> )
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMP	Emden-Meyerhoff-Parnas
E4P	Erythrose-4-Phosphat
f	Feld
FBPase	Fructose-1,6-Bisphosphatase
F6P	Fructose-6-P
Frc	Fructose
g	Gewächshaus
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GBSS	Stärkekorngelbundene Stärke-Synthase ( <i>granule bound starch synthase</i> )
Glc	Glucose
G6P	Glucose-6-P
H6P	Hexose-6-P
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )

INCW	Zellwand gebundene Invertase ( <i>cell wall invertase</i> )
IRMS	Isotopenverhältnisanalyse ( <i>isotope ratio mass spectrometry</i> )
K	Kolben
LSU	große Untereinheit der AGPase ( <i>large subunit</i> )
MFA	Metabolische Flussanalyse
<i>mn</i>	<i>miniature</i>
MS	Murashige Skoog
NADP, NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
OAA	Oxalacetat ( <i>oxal acetic acid</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFP	Pyrophosphat abhängige Phosphofruktokinase
PFK	Phosphofruktokinase
PGI	Phosphoglucoisomerase
PGM	Phosphoglucomutase
P5P	Pentose-5-P
PPi	Pyrophosphat
PPP	Pentosephosphatweg ( <i>pentose phosphate pathway</i> )
rev	reversibel
Rev	Revertante
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
SBE	Stärke-Verzweigungsenzym ( <i>starch branching enzyme</i> )
S7P	Seduheptulose-7-P
<i>sh</i>	<i>shrunk</i>
SS	Stärke-Synthase
SSU	kleine Untereinheit der AGPase ( <i>small subunit</i> )
<i>su</i>	<i>sugary</i>
Suc	Saccharose
SuSy, Sus	Saccharose-Synthase ( <i>sucrose synthase</i> )
TA	Transaldolase
THC	Triose-Hexose-Cycling

TK	Transketolase
Tab.	Tabelle
TCA	Citratzyklus, Tricarbonsäurezyklus ( <i>tricarboxylic acid cycle</i> )
TIM	Triosephosphat-Isomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP, UTP	Uridindiphosphat, Uridintriphosphat
UGPase	UDP-Glucose-Pyrophosphorylase
U	Unit (Enzyme) oder <i>Uniformly</i> (Isotopologe)
WSP	wasserlösliches Polysaccharid ( <i>water soluble polysaccharide</i> )
WT	Wildtyp
wx	waxy

Es wird die Standardnomenklatur für Mais verwendet (Beavis et al. 1995). Die mutante (nichtfunktionale) Form eines Gens wird kursiv und mit Kleinbuchstaben (z.B. *sh1*), die nichtmutante (wildtypische) Form des Gens kursiv und mit großem Anfangsbuchstaben (z.B. *Sh1*), das Genprodukt nichtkursiv und mit Großbuchstaben (z.B. SH1) und Transkripte und cDNAs nichtkursiv und mit großem Anfangsbuchstaben (z.B. Sh1) geschrieben.

Die Nomenklatur von spezifisch isotoopenmarkierten Verbindungen erfolgt nach IUPAC. Das Nucleotidsymbol wird in eckigen Klammern vor dem Namen der Verbindung gesetzt. Die Zahlen vor dem Nucleotid geben die Positionen der Markierung an und die tiefgestellte Zahl bezeichnet die Anzahl der markierten Atome. Beispielsweise bezeichnet  $[2,3,4-^{13}\text{C}_3]$ Glucose ein Glucosemolekül, dass an den Positionen C2, C3 und C4 mit  $^{13}\text{C}$  markiert ist.

Die Isotopologe von organischen Verbindungen werden als binärer Code dargestellt; die „Nummerierung“ beginnt mit dem C1-Atom von links nach rechts. Eine „1“ symbolisiert ein  $^{13}\text{C}$ -Atom, eine „0“ symbolisiert ein  $^{12}\text{C}$ -Atom und ein „X“ symbolisiert ein  $^{13}\text{C}$ - oder ein  $^{12}\text{C}$ -Atom. Beispielsweise bezeichnet Glucose {110000} das Isotopolog  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glucose (Eisenreich et al. 2004).

## 1 Zusammenfassung

Die Kombination von Stabilisotopenmarkierung mit  $^{13}\text{C}$  und NMR-Spektroskopie findet in der Pflanzenforschung u. a. in der Aufklärung von Biosynthesewegen und in der metabolischen Flussanalyse Anwendung. In dieser Arbeit wurden Maiskörner während der Entwicklung in Sterilkultur in *steady state* Experimenten mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$  bzw.  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{12}]\text{Saccharose}$  markiert. Durch hochauflösende  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektroskopie und komplexe Datenanalyse wurden aus Stärke- und Phytoglykogenhydrolysaten die Konzentrationen von 14 biochemisch relevanten Glucoseisotopologen bestimmt. Die resultierenden Isotopologemuster von Inzuchtlinien und Mutanten erlauben Rückschlüsse auf zentrale Stoffwechselprozesse und wurden zur qualitativen und quantitativen Analyse des Kohlenhydratmetabolismus von Maiskörnern genutzt.

Unterschiedliche Anzuchtbedingungen wirken sich nicht wesentlich auf das Muster aus und zeigen die gute Reproduzierbarkeit der Methode. Im Gegensatz dazu beeinflusst der genetische Hintergrund das Isotopologemuster. Drei Markierungsexperimente zur frühen (11-18 DAP), mittleren (18-25 DAP) und späten Phase (25-32 DAP) der linearen Stärkeakkumulation konnten zeigen, dass der Zentralmetabolismus des Maiskorns flexibel ist und sich die Isotopologemuster und metabolischen Flüsse mit der Entwicklung des Korns ändern. Durch eine *in silico* Simulation wurden die Anteile von fünf definierten Stoffwechselprozessen an der Formierung der Glucoseisotopologe quantifiziert. In allen Experimenten konnten die Glykolyse und der Pentosephosphatweg als die dominierenden Prozesse identifiziert werden, wobei der glykolytische Fluss überwiegt. Das metabolische Cycling durchläuft in der mittleren Phase ein Minimum, kenntlich an den hohen Anteilen am Direkteinbau und der Glykolyse und den niedrigen Anteilen am Pentosephosphatweg und Citratzyklus in der Simulation. Die frühe und späte Phase zeichnen sich hingegen durch wenig Direkteinbau und eine hohe Beteiligung des Pentosephosphatweges und des Citratzyklus am Cycling aus. Die Unterschiede könnten dadurch erklärt werden, dass der zentrale Metabolismus durch die relativen Syntheseraten der Speicherstoffe beeinflusst wird. Stärke und Lipide werden während der gesamten Kornfüllungsphase in linearer Weise akkumuliert, während die Anreicherung von Proteinen in der frühen und späten Phase hoch und in der mittleren Phase niedrig ist. Es wird vermutet, dass in der frühen und späten Phase der Bedarf an Vorstufen für die Proteinbiosynthese erhöht ist und daher die Flüsse durch den Citratzyklus und den Pentosephosphatweg intensiviert werden.

Durch Markierungsexperimente mit Mutanten wurden die Auswirkungen einzelner Enzyme auf den Kohlenhydratmetabolismus untersucht. Es wurden die Isotopologemuster von zehn gut charakterisierten Mutanten bestimmt. Deren Läsionen decken von der Bereitstellung der Hexosen (*mn1*, *sh1*, *sh1 sus1*), der Produktion und den Transfer von ADP-Glucose (*bt2*, *sh2*, *bt1*, *Sh2-Rev6*) bis zur Synthese von Amylose und Amylopektin (*ae*, *wx*, *su1*) alle wichtigen Stufen der Stärkesynthese ab. Lediglich die Isotopologemuster der *bt2*-Stärke, der *mn1*-Stärke und des *su1*-Phytoglykogens zeigten mit einer intensiver metabolisierten Glucose signifikante Unterschiede zur Wildtypstärke. Der primäre Kohlenhydratmetabolismus von Mais ist demnach generell sehr stabil und wird von den meisten Mutationen nicht signifikant verändert. Es existiert daher kein einfacher Zusammenhang zwischen der Menge und der Zusammensetzung des Endproduktes Stärke (*sink strength*) und den metabolischen Flüssen. Überraschend ist, dass sich ein Fehlen der kleinen Untereinheit der AGPase (*bt2*) auf das Muster der Stärkeglucose signifikant auswirkt, während ein Fehlen der großen Untereinheit (*sh2*) oder des ADP-Glucose Transporters (*bt1*) kaum Auswirkungen hat.

Zur Erklärung der Isotopologemuster der meisten Mutanten wurde ein Modell der Kompartimentierung von Kohlenhydratflüssen im Maiskorn vorgeschlagen. Es basiert darauf, dass die Hexose-P-Pools des Cytosols und der Plastiden isotopologisch nicht im Gleichgewicht sind und sich die Muster der beiden Pools durch die Mehrheit der Mutationen nicht verändern. Dabei unterliegt der plastidäre Pool einem intensiveren metabolischen Cycling als der cytosolische Pool. In Wildtypen und den meisten Mutanten wird ADP-Glucose im Cytosol produziert, in den Amyloplasten transportiert und dort ohne weiteres Cycling in Stärke eingebaut. Im Falle von *su1*-Phytoglykogen und *bt2*-Stärke importieren dagegen die Plastiden Hexose-P und synthetisieren daraus ADP-Glucose durch plastidäre AGPase. Die Glucose der Wildtypstärke repräsentiert daher den cytosolischen und die der *bt2*-Stärke und des *su1*-Phytoglykogens den höher gecyclten plastidären Hexose-P-Pool. Dies würde bedeuten, dass in *sh2* neben der Aktivität der cytosolischen auch die der plastidäre AGPase beeinträchtigt wird, während in *bt2* die plastidäre Form intakt bleibt.

Die Rolle der Debranching-Enzyme (DBE) bei der Biosynthese von Amylopektin ist noch ungeklärt. Es haben sich hierzu in der Literatur zwei verschiedene Modelle herauskristallisiert, die eine unterschiedliche Beteiligung des Enzyms vorsehen. Im Zentrum der Debatte steht die *su1* Mutante, der mit Isoamylase ein spezielles DBE fehlt und die neben Stärke das wasserlösliche, stark verzweigte Polysaccharid Phytoglykogen akkumuliert. Das „Glucan-Trimming“-Modell sieht eine direkte Beteiligung der Isoamylase an der Stärkesynthese vor. Demnach hydrolysieren sie störende Verzweigungen des

Präamylopektins und bilden daraus kristallisationsfähiges Amylopektin. In der *su1* Mutante reichert sich die Stärkevorstufe Präamylopektin als Phytoglykogen an. Im Gegensatz dazu geht das „WSP-Clearing“-Modell von einer indirekten Rolle der Isoamylase aus. Sie hydrolysiert im Stroma vorkommende wasserlösliche Polysaccharide (WSPs), die mit der Stärke um ADP-Glucose konkurrieren und sich in *su1* Endosperm als Phytoglykogen anreichern.

Unterschiedliche Isotopologienmuster von *su1*-Stärke und *su1*-Phytoglykogen aus demselben Endosperm legen nahe, dass zwei verschiedene Synthesewege zu den Polymeren führen. Die in Phytoglykogen abgelagerte Glucose unterliegt einem stärkeren metabolischen Cycling und scheidet daher als direkte Vorstufe von Stärke aus. Eine Amylopektinsynthese nach dem „Glucan-Trimming“-Modell mit einer direkten Beteiligung der Isoamylase erscheint daher unwahrscheinlich. Die Ergebnisse wären aber prinzipiell mit dem „WSP-Clearing“-Modell vereinbar.

Die Kohlenstoffgerüste beider Polysaccharide werden in Plastiden aus ADP-Glucose aufgebaut. Die unterschiedlich gecyclten Polymere können mit dem Modell der Kompartimentierung erklärt werden, wenn man annimmt, dass die Stärke- und Phytoglykogensynthese örtlich getrennt in zwei verschiedenen Plastidtypen stattfindet. Stärke akkumulierende Plastiden importieren cytosolische ADP-Glucose für den Aufbau von Stärke. WSP akkumulierende Plastiden besitzen keinen Brittle1 Translokator, sondern importieren Hexose-P und synthetisieren daraus ADP-Glucose durch plastidäre AGPase. Die Glucose der Stärke repräsentiert daher den cytosolischen, die des Phytoglykogens den stärker gecyclten plastidären Hexose-P-Pool.

Nicht erklärbar mit dem Modell der Kompartimentierung ist das höhere Cycling der *mnl*-Stärke, die aus cytosolischer ADP-Glucose aufgebaut ist. Gemäß dem vorgeschlagenen Modell wäre dies die einzige Mutante, die eine direkte Änderung der Flüsse des Zentralmetabolismus hervorruft.

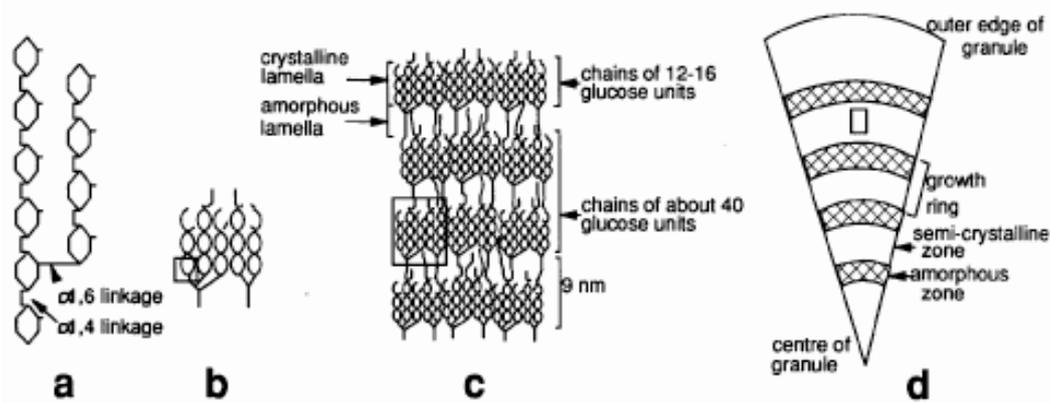
## 2 Einleitung

### 2.1 Stärke: Bedeutung, Zusammensetzung und Struktur

Stärke ist für viele Pflanzen das wichtigste Reservekohlenhydrat. Mensch und Tier nutzen die stärkehaltigen Speicherorgane von Hülsenfrüchten, Getreiden und Hackfrüchten als Grundnahrungsmittel. Außerdem wird Stärke in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie vielfältig genutzt und stellt einen wichtigen Rohstoff für die Papier- und Textilindustrie dar (Slattery et al. 2000, Jobling 2004). Nicht zuletzt aus diesem Grund ist die Biosynthese von Stärke seit langem ein Forschungsschwerpunkt der Pflanzenbiologie. Überraschenderweise ist das Wissen in diesem Bereich trotzdem nach wie vor unvollständig.

Auf den ersten Blick ist Stärke eine sehr einfache Substanz, die sich lediglich aus Glucosemolekülen zusammensetzt. Wildtyp Stärke fast aller Pflanzen ist eine Mischung aus etwa 20-30 % Amylose und 70-80 % Amylopektin (Belitz und Grosch 1992). Beides sind Polysaccharide mit ähnlicher chemischer Struktur, die sich im Wesentlichen in der Kettenlänge und dem Verzweigungsgrad unterscheiden (Nelson and Pan 1995, Kossmann and Lloyd 2000). Amylose besteht nahezu ausschließlich aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, hat nur sehr wenige Verzweigungen und ist daher ein lineares Molekül. Amylopektin ist durch zusätzliche  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen (ca. 4-5 %) stark verzweigt. Amylosemoleküle bestehen aus ca. 930-990 Glucosemonomeren, während bei dem viel größeren Amylopektin ca. 4800-12000 Glucosemoleküle aneinander gereiht sind (Nelson and Pan 1995). Damit ist Amylopektin eines der größten natürlichen Polymere.

In Pflanzen liegt Stärke in Form von wasserunlöslichen Körnern vor, die je nach Spezies in Form und Größe variieren und einen Durchmesser zwischen 1 und 100  $\mu\text{m}$  erreichen können (Smith 2001). Stärkekörner sind von semikristalliner Natur mit alternierenden semikristallinen und amorphen Zonen (Abb. 2.1, aus Smith et al. 1997). Für die Struktur der semikristallinen Bereiche ist dabei allein Amylopektin verantwortlich. In dem Molekül wechseln sich Regionen mit vielen Verzweigungen mit linearen Bereichen ab. Benachbarte, kurze lineare Ketten (12-16 Glucoseeinheiten) eines Moleküls können sich zu Doppelhelices aneinanderlagern und bilden einen Cluster. Die Cluster werden so arrangiert, dass semikristalline Zonen mit amorphen Zonen im Wechsel sind. In den kristallinen Bereichen sind die linearen Ketten organisiert, in den amorphen Zonen sind die Verzweigungen angehäuft. Zonen mit alternierenden amorphen und kristallinen Bereichen wechseln sich wiederum mit völlig amorphen Zonen ab und sind für die typischen Wachstumsringe der



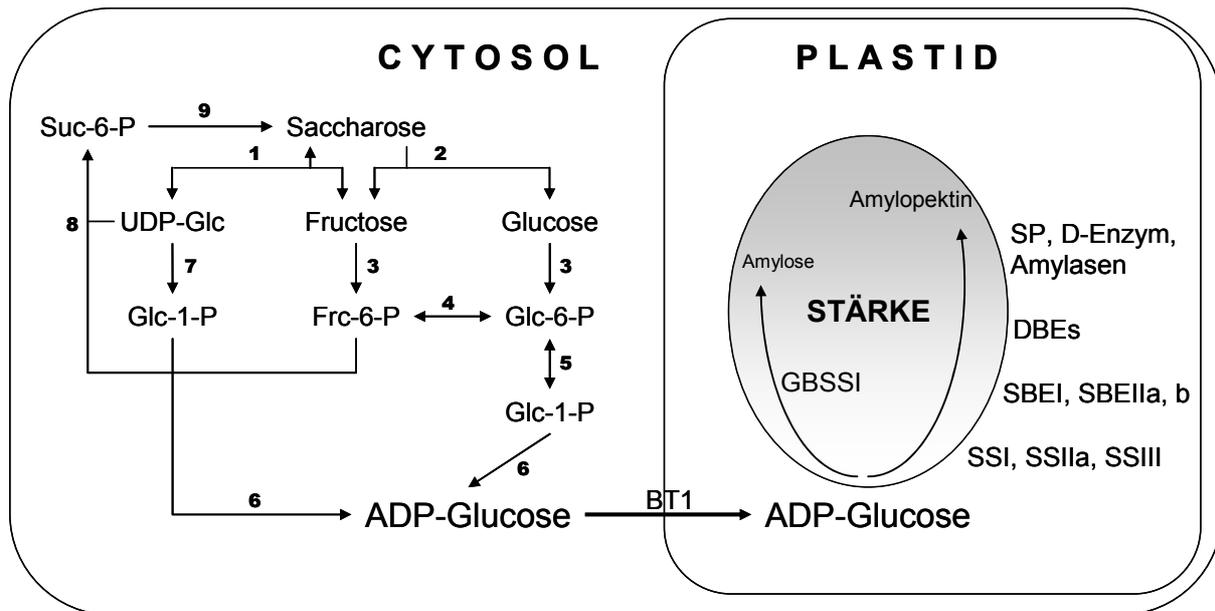
**Abb. 2.1:** Organisation eines Stärkekorns. (a) Teil eines Amylopektinmoleküls. Zwei  $\alpha$ -1,4-Glucoseketten sind durch eine  $\alpha$ -1,6-Verzweigung verknüpft. (b) Benachbarte Ketten eines Amylopektinmoleküls lagern sich in Doppelhelices aneinander und bilden ein Cluster. (c) Die Cluster werden so arrangiert, dass sich kristalline Bereiche mit amorphen Bereichen abwechseln. (d) Alternierende semikristalline und amorphe Zonen sind konzentrisch angeordnet. (aus Smith et al. 1997).

Stärkekörner verantwortlich. In den völlig amorphen Zonen befinden sich vermutlich Amylose und ungeordnetes Amylopektin (Smith 2001, Kossmann and Lloyd 2000).

In Pflanzen wird Stärke sowohl in photosynthetischen als auch in nichtphotosynthetischen Geweben gebildet. In den photosynthetisch aktiven Geweben werden überschüssige Kohlenhydrate tagsüber in Form von transitorischer Stärke gespeichert, die während der Nacht wieder abgebaut wird. Im Gegensatz dazu findet in Speicherorganen eine kontinuierliche Produktion und Akkumulierung von Stärke in eigens dafür „eingerrichteten“ Plastiden, den Amyloplasten, statt. Maiskörner beginnen ca. 10-12 Tage nach Pollinierung (*days after pollination* = DAP) mit der Stärkeproduktion (Tsai et al. 1970). Es folgt eine lineare Phase der Stärkeakkumulation, die in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen bei ca. 20 DAP ihre aktivste Phase erreicht und nach etwa 40-45 Tagen endet (Cully et al. 1984, Ingle et al. 1965).

## 2.2 Biosynthese von Stärke im Maisendosperm

In vielen Publikationen wird der Aufbau von Stärke in Speicherorganen als der Syntheseweg von Saccharose zu Amylose und Amylopektin betrachtet (Kossmann and Lloyd 2000, Smith 2001, Nelson and Pan 1995, Pozueta-Romero et al. 1999, Fernie et al. 2002). Saccharose, deren Kohlenstoffgerüst letztendlich für den Aufbau von Stärke verwendet wird, wird in den



**Abb. 2.2:** Übersicht über die Biosynthese von Stärke in Maisendosperm. Saccharose wird im Cytosol durch Invertase oder Saccharose-Synthase zu Hexosen abgebaut und in ADP-Glucose umgewandelt. Durch eine Vielzahl von Enzymen ist im Cytosol eine Spaltung und Resynthese von Saccharose möglich. BT1 transportiert ADP-Glucose in den Amyloplasten, woraus durch die konzertierte Aktion von u. a. Stärke-Synthasen, Stärke-Banching-Enzymen und Stärke-Debranching-Enzymen Amylose und Amylopektin aufgebaut werden. Für die Synthese von Amylose ist nur GBSSI nötig; die Synthese von Amylopektin erfordert eine Vielzahl von Enzymen. 1, SuSy; 2, Invertase; 3, Hexokinase; 4, PGM; 5, PGI; 6, AGPase; 7, UGPase; 8, Saccharose-P-Synthase; 9, Saccharose-P-Phosphatase.

Blättern gebildet und dann ins Endosperm transportiert. Für die Umwandlung von Saccharose in Speicherstärke im Endosperm benötigt die Pflanze dann mehr als 20 Enzyme (Abb. 2.2).

Der Abbau von importierter Saccharose in Hexosen kann durch zwei Enzymklassen, den Invertasen und den Saccharose-Synthasen (SuSy), katalysiert werden. Invertasen bewirken eine irreversible Hydrolyse in Glucose und Fructose, Saccharose-Synthasen katalysieren eine reversible Spaltung in UDP-Glucose und Fructose (Winter and Huber 2000). In den meisten Pflanzen wie Arabidopsis, Tomate, Kartoffel, Weizen und Gerste existieren zwei *SuSy* Gene. Mais und Reis stellen mit drei *SuSy* Genen eine Ausnahme dar (Carlson et al. 2002). Die Isozyme SH1 (= SUS2) und SUS1 sind dabei biochemisch sehr ähnlich, während SUS3 eher den SuSys von Dikotyledonen ähnelt (Carlson et al. 2002). In Maisendosperm trägt SH1 während der linearen Phase der Stärkeakkumulation zu über 90 % der gesamten SuSy Aktivität bei (Chourey 1981). Den geringsten Anteil an der gesamten SuSy Aktivität nimmt SUS3 mit weniger als 1 % ein (Carlson et al. 2002). SuSys katalysieren zwar *in vitro* eine reversible Umwandlung von Saccharose in Hexosen (Geigenberger und Stitt 1993), es wird aber angenommen, dass die Reaktion *in vivo* durch einen schnellen Abtransport der Spaltungsprodukte via Hexokinasen und Stärkesynthese nur in eine Richtung verläuft (Weber

et al. 1997). Die Hauptaufgabe von SuSys besteht in der Bereitstellung von UDP-Glucose für die Stärke- und Cellulosesynthese (Chourey et al. 1998).

Zellwandgebundene Invertase (INCW-2) ist örtlich und zeitlich das erste Enzym, auf das importierte Zucker treffen (Miller und Chourey 1992). Sie befindet sich ausschließlich in den basalen Endospermtransferzellen (BETC) und nimmt mit ca. 90 % den Hauptteil der gesamten Invertaseaktivität eines Maiskorns ein (Cheng et al. 1996). Die restlichen 10 % entfallen auf im Cytosol und in der Vakuole lokalisierte lösliche Invertase. Während SuSys in heterotrophen Geweben mit der Produktion von Speicherstoffen assoziiert werden, spielen Invertasen vor allem bei der Zellexpansion und Zellteilung eine wichtige Rolle (Vilhar et al. 2002).

Saccharose-Synthasen und Invertasen produzieren die Hexosen UDP-Glucose, Fructose und Glucose, die durch die Aktion von Hexokinasen, Phosphoglucomutase (PGM), Phosphoglucoisomerase (PGI) und UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase) in Glucose-1-P überführt werden (Plaxton 1996).

Die eigentliche Stärkesynthese beginnt dann mit dem Aufbau von ADP-Glucose aus Glucose-1-Phosphat und ATP. Katalysiert wird diese Reaktion durch ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase), dem Schlüsselenzym der Stärkesynthese. Alle pflanzlichen AGPasen setzen sich aus zwei ähnlichen, aber dennoch unterschiedlichen Untereinheiten zusammen und sind in Form eines  $\alpha_2\beta_2$  Heterotetramers aktiv (Smith-White und Preiss 1992). In Maisendosperm kodieren zwei strukturelle Gene, *Shrunken2* und *Brittle2*, die große und kleine Untereinheit der AGPase (Bhave et al. 1990, Bae et al 1990).

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Synthese von ADP-Glucose im Maisendosperm ähnlich wie in Blättern und den meisten anderen höheren Pflanzen im Amyloplasten lokalisiert ist. Erst in den neunziger Jahren konnte durch das Fehlen von Transitpeptiden in SH2 und BT2 Proteinen (Giroux und Hannah 1994) und Experimenten an isolierten Amyloplasten (Denyer et al. 1996, Möhlmann et al. 1997) begründet werden, dass ein Großteil der ADP-Glucose im Cytosol produziert wird. Eine ähnliche Situation herrscht in Gerste (Johnson et al. 2003), Weizen (Burton et al. 2002) und Reis (Sikka et al. 2001) vor. Auch in diesen Pflanzen wird, wie vermutlich in sämtlichen Gräsern (Beckles et al. 2001), ADP-Glucose überwiegend im Cytosol gebildet.

Cytosolische ADP-Glucose wird durch den Translokator *Brittle1* in den Amyloplasten transportiert (Shannon 1998), wo es durch die gemeinsame Aktion von Stärke-Synthasen (SSs), Stärke-Debranching-Enzymen (DBEs) und Stärke-Banching-Enzymen (SBEs) in Amylopektin und Amylose umgewandelt wird.

Stärke-Synthasen (SS) katalysieren den Transfer von Glycosyleinheiten von ADP-Glucose an das nichtreduzierende Ende bereits existierender  $\alpha$ -1,4-Glucane, d.h. sie verlängern sowohl Amylose- als auch Amylopektinketten (Smith 2001). Sie werden traditionell in zwei Gruppen eingeteilt, den granular gebundenen Stärke-Synthasen (GBSS, granule bound starch synthase) und den „löslichen“ Stärke-Synthasen. Die erste Gruppe befindet sich ausschließlich in der Stärkekornmatrix und ist dort für die Synthese von Amylose verantwortlich (Denyer et al. 2001). Die zweite Gruppe ist für die Synthese von Amylopektin zuständig. Obwohl diese ursprünglich als lösliche Stärke-Synthase bezeichnet wurden, ist mittlerweile bekannt, dass sie in Abhängigkeit von der Spezies, dem Gewebe und dem Entwicklungsstand sowohl im Stroma als auch granular vorkommen.

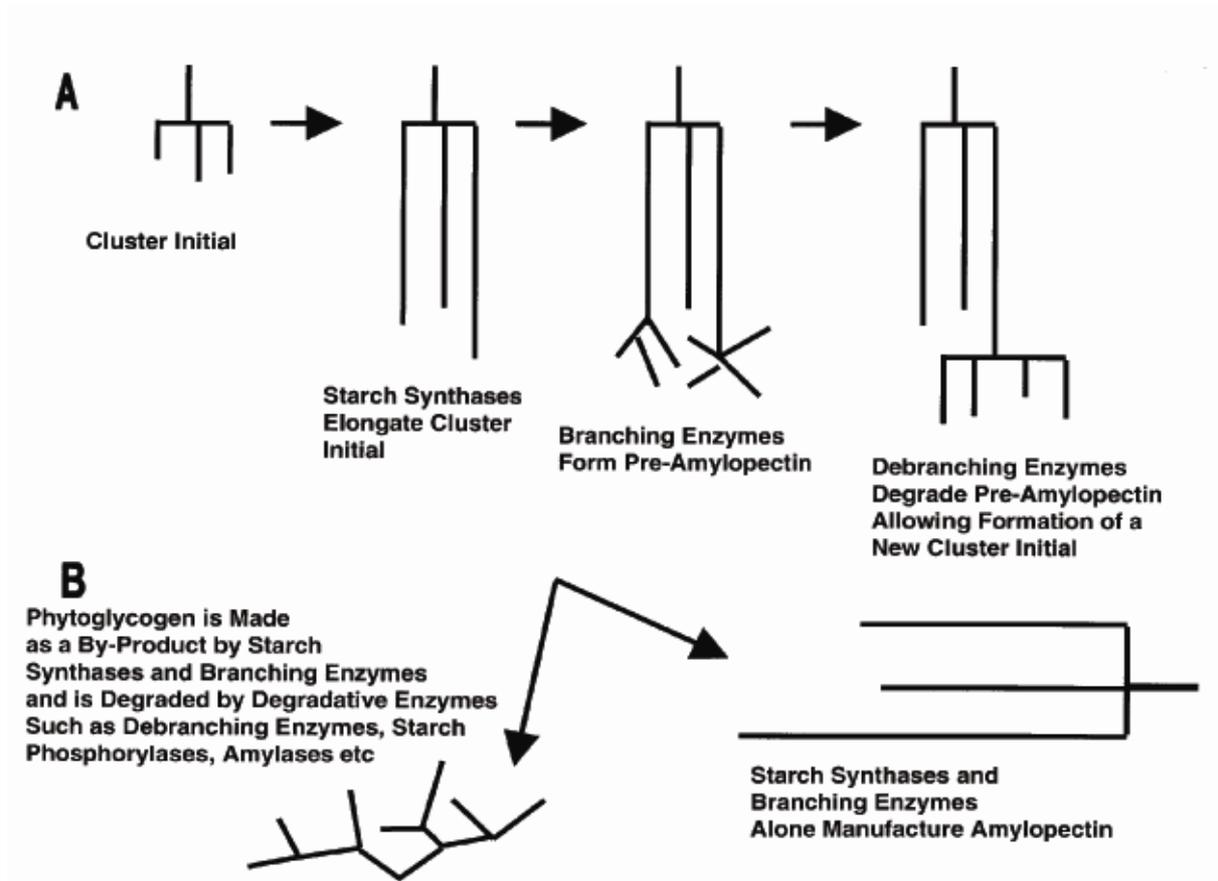
Auf Basis der Aminosäuresequenzen werden die Stärke-Synthasen in fünf Hauptklassen eingeteilt, den GBSS, SSI, SSII, SSIII und SSIV (Ball und Morell 2003). In Maisendosperm konnten cDNA Klone von GBSSI, SSI, SSIIa, SSIIb und SSIII nachgewiesen werden (Cao et al. 2000). Von den „löslichen“ Stärke-Synthasen konnten bisher lediglich die Proteine von SSI und SSIII isoliert, gereinigt und charakterisiert werden, von SSIIa und SSIIb gelang dies noch nicht (Cao et al. 2000). Die genaue Funktion der einzelnen SSs an der Amylopektinsynthese ist noch unbekannt. Es wird angenommen, dass SSI die Synthese kurzer Ketten bis zu 10 Glucoseeinheiten katalysiert, während SSII und SSIII die längeren Ketten bilden (James et al. 2003). An der gesamten SS-Aktivität in Maisendosperm nehmen SSI und SSIII den größten Teil ein. SSIIb und SSIIa zeigen zwar nur eine geringe Aktivität, scheinen aber trotzdem eine entscheidende Rolle in der Amylopektinsynthese zu spielen (Tetlow et al. 2004). Die Funktion der einzelnen Isoformen in Mais zu erforschen ist dadurch erschwert, dass kaum Informationen aus Mutanten gezogen werden können. Von SSI und SSIIb konnten bisher noch keine Mutationen, die zu einer Reduktion der Enzyme geführt hätten, identifiziert werden. Eine Läsion von SSIIa bewirkt den *sugary-2* Phänotyp (Zhang et al. 2004). Eine Eliminierung von SSIII (*dull1*) resultiert in einem milden Phänotyp, der nur in einem *Waxy* Hintergrund auffällig ist (Gao et al. 1998).

Für den Aufbau von Amylose ist alleine GBSS verantwortlich. Im Gegensatz zur Amylopektinsynthese, die an der Oberfläche des Stärkekorns stattfindet, wird Amylose im Inneren des Stärkekorns synthetisiert. Vorläufer sind vermutlich kurzkettige Maltooligosaccharide (MOS) mit 2-7 Glucoseeinheiten, die ins Innere des Stärkekorns diffundieren und dort durch GBSS zu Amylose verlängert werden. (Denyer et al. 2001).

Stärke-Branching-Enzyme (SBEs) führen  $\alpha$ -1,6-Verzweigungen ein, indem sie eine  $\alpha$ -1,4-Verbindung hydrolysieren und das dabei freigesetzte reduzierende Ende an die

Hydroxylgruppe des C<sub>6</sub>-Atoms der Glucose anfügen (Smith 2001). Ähnlich den Stärke-Synthasen existieren verschiedenste Isoformen, die nach der primären Aminosäuresequenz in zwei Klassen, den SBEI und SBEII eingeteilt werden. In Monokotyledonen wird die SBEII Klasse durch die zwei verschiedenen Genprodukte SBEIIa und SBEIIb repräsentiert (Ball und Morell 2003). Die beiden Klassen unterscheiden sich in der Länge der transferierten Ketten: SBEII bevorzugen kürzere und SBEI längere Ketten (Tetlow et al 2004). Durch heterologe Expression der drei SBEs aus Mais in Hefen konnte gezeigt werden, dass SBEI nicht ohne die Aktion von SBEII wirksam ist (Seo et al. 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass SBEIIa und SBEIIb die Substrate von SBEI produzieren. Gestärkt wird dies durch die unterschiedliche Expression der Branching-Enzyme. SBEIIa und SBEIIb werden während der gesamten Entwicklungszeit exprimiert, BEI aber hauptsächlich während der zweiten Hälfte (Ball und Morell 2003). Eine verminderte Aktivität oder ein komplettes Ausschalten eines Enzyms führte nur bei SBEIIb zu einem klaren Körnerphänotyp mit amylopektinfreier Stärke (*amylose extender*). Ein Ausschalten von SBEIIa in Mais zeigt nur im Blatt Veränderungen, nicht aber im Endosperm. SBEIIa ist daher vermutlich für die Stärkesynthese in Blatt ein wichtiger, im Endosperm aber ein unwichtiger Faktor. Ein komplettes Ausschalten von SBEI zeigt keinen Phänotyp. Die genauen Funktionen der Branching-Enzyme, speziell die von SBEI, bleiben daher nach wie vor ungeklärt (Tetlow et al. 2004).

Neben Stärke-Synthasen und Branching-Enzymen sind auch Debranching-Enzyme (DBE) für die Stärkebiosynthese nötig. In Pflanzen existieren zwei Isoformen, die Pullulanasen (ZPU in Mais) und die Isoamylasen (SU1 in Mais). Beide Enzyme können  $\alpha$ -1,6-Verbindungen hydrolysieren, unterscheiden sich aber in der Substratspezifität (James et al. 2003). Isoamylasen spalten die Verzweigungen von Amylopektin und Glykogen, hydrolysieren aber nicht die chemisch identischen Verzweigungen von Pullulan. Pullulanasen hydrolysieren hingegen die  $\alpha$ -1,6-Verküpfungen von Pullulan und zu einem geringeren Grad die von Amylopektin. Die Verzweigungen von Glykogen können sie nicht hydrolysieren (Doehlert und Knutson 1991). Mutanten mit einem stark reduzierten Gehalt an Isoamylase (*sugary 1* in Mais) akkumulieren auf Kosten von Amylopektin das wasserlösliche Polysaccharid Phytoglykogen und zeigen einen reduzierten Gehalt an Stärke. Die genaue Rolle der DBEs in der Stärkebiosynthese ist noch nicht bekannt, es existieren aber zwei Modelle, die ihre Funktion erklären können (Abb. 1.3, aus Kossmann und Lloyd 2000). Das „Glucan-Trimming“-Modell sieht eine direkte Beteiligung der DBEs an der Amylopektinsynthese vor. Dabei hydrolysieren die DBEs störende Verzweigungen von an der Oberfläche der



**Abb. 2.3:** Zwei Modelle zur Biosynthese von Amylopektin. Im „Glucan-Trimming“-Modell (A) wird Präamylopektin durch DBEs zu Amylopektin „getrimmt“. Im „WSP-Clearing“-Modell (B) wird Phytoglykogen in Konkurrenz zu Stärke synthetisiert und durch DBEs degradiert. (aus Kossmann und Lloyd 2000)

Stärkekörner gebildetem Präamylopektin. Das somit „getrimmte“ Amylopektin ist dann in der Lage, sich in Doppelhelices aneinander zu lagern (Ball et al. 1996). Im Gegensatz dazu geht das „WSP-Clearing“-Modell von einer indirekten Rolle der DBEs aus. Demnach hydrolysieren die DBEs lösliche, im Stroma vorkommende Glucane und entfernen somit ein Substrat, das um die Bindung an SSs und BEs konkurriert (Zeeman et al. 1998).

Des Weiteren spielen bei der Stärkesynthese Disproportionierungsenzyme (D-Enzyme), Amylasen, Stärkephosphorylasen (SP) und Glucosidasen eine Rolle.

### 2.3 Stärkemutanten von Mais

Vieles von unserem Wissen über Stärkesynthese basiert auf der Analyse von Mutanten. Sämtliche Mutationen, die eine Änderung der Stärkestruktur oder -menge bewirken, wurden zuerst in Mais identifiziert (Nelson und Pan 1995). In der klassischen „biochemischen

Genetik“ werden die Intermediate des Stärkesyntheseweges von Mutanten mit den zugehörigen Wildtypen verglichen und verschiedene Enzymkandidaten gemessen. Ein deutlich reduzierter Enzymgehalt lässt darauf schließen, dass das jeweilige Enzym wichtig für den Syntheseweg ist.

Mit der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe von Markierungsexperimenten ein Beitrag zum Verständnis des Kohlenhydratstoffwechsels im Maiskorn geleistet werden. Im Zentrum des Interesses steht dabei der Stärkesyntheseweg. Es wurde daher ein Großteil der bekannten Stärkemutanten von Mais für Markierungsexperimente ausgewählt, deren Mutationen Schritte auf dem Weg von Saccharose zu Stärke betreffen. Einen Überblick über die gewählten Mutanten, deren Läsionen und Phänotypen gibt Tab. 2.1. Die Mutationen betreffen mit *miniature1* (*mn1*), *shrunken1* (*sh1*), *shrunken1 sucrose synthase1* (*sh1 sus1*) die Bereitstellung von Hexosen, mit *brittle1* (*bt1*), *brittle2* (*bt2*), *shrunken2* (*sh2*), *shrunken2-Rev6* (*Sh2-Rev6*) den Transport und die Synthese von ADP-Glucose und mit *sugary1* (*su1*), *amylose extender* (*ae*) und *waxy* (*wx*) den Aufbau von Amylopektin und Amylose aus ADP-Glucose. Auf Basis ihrer Phänotypen werden die Mutanten in zwei Klassen eingeteilt. Die Klasse 1 umfasst die Körnermutanten *shrunken*, *brittle* und *miniature*. Sie zeigen extreme Phänotypen mit stark reduzierten Stärkegehalten. In die Klasse 2 werden die übrigen Körnermutanten zusammengefasst. Hierzu zählen zum Beispiel *ae* und *wx*. Sie haben in der Regel einen milderen Körnerphänotyp mit einem geringeren Einfluss auf den Stärkegehalt (Boyer und Hannah 2001).

*Mn1* (*miniature1*) kodiert die zellwandgebundene Invertase INCW-2 (Cheng et al. 1996), die die irreversible Spaltung von Saccharose in Glucose und Fructose katalysiert ( $\text{Suc} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glc} + \text{Frc}$ ). Die Mutanten *mn1* wurde das erste Mal 1946 beschrieben (Lowe und Nelson 1946). Die Körner entwickeln sich bis ca. 9 DAP normal, dann degenerieren die Zellen der plazento-chalazalen Schicht durch programmierten Zelltod (Kladnik et al. 2004.). Zwischen Mutter- und Tochtergewebe bildet sich eine Lücke, wodurch das Endosperm von der Nährstoffversorgung abgeschnitten wird. Die Entwicklung des Endosperms und des Embryos erreicht bei ca. 14 DAP einen Stillstand. Die Körner bleiben dadurch sehr klein und erreichen nur 20 % des Korngewichtes eines Wildtypkorns (Lowe und Nelson 1946, Cheng et al. 1996). Das reduzierte Korngewicht geht dabei mit einer verminderten mitotischen Aktivität und Zellteilung einher (Vilhar et al. 2002). Neben der zellwandgebundenen Invertase ist auch die lösliche Invertase im Endosperm stark reduziert bzw. nicht detektierbar (Miller und Chourey 1992, Cheng et al. 1996). Das Endosperm von *mn1* Körnern enthält um ca. 60 % weniger

**Tab. 2.1:** Ausgewählte Stärkemutanten von Mais, deren Läsionen und Samenphänotypen.

<b>Locus</b>	<b>Allel</b>	<b>Läsion</b>	<b>Samenphänotyp</b>	<b>Literatur</b>
<b>Bereitstellung von Hexosen</b>				
<i>Mn1</i>	<i>mn1</i>	zellwandgebundene Invertase	Korngewicht um ca. 80 % reduziert; Gehalt an löslichen Zuckern reduziert, relativer Gehalt an Saccharose erhöht; Gehalt an löslicher Invertase reduziert; Zelldegeneration in der P-C-Schicht; verminderte Zellteilung und -expansion	Cheng et al. 1996, Kladnik et al. 2004
<i>Sh1</i>	<i>sh1</i>	Saccharose-Synthase 2	Stärkegehalt um 25-40 % reduziert; Gehalt an reduzierenden Zuckern und Saccharose erhöht; Zelldegenerationen der Stärkespeicherzellen	Chourey et al. 1998
<i>Sh1, Sus1</i>	<i>sh1 sus1</i>	Saccharose-Synthase 1 und 2	wie <i>sh1</i> ; Stärkegehalt zusätzlich um 25 % reduziert	Chourey et al. 1998
<b>Synthese und Transport von ADP-Glucose</b>				
<i>Bt2</i>	<i>bt2</i>	AGPase (kleine UE)	Stärkegehalt um ca. 70-80 % reduziert; Gehalt an reduzierenden Zuckern und Saccharose erhöht; Korngewicht reduziert; Trockenmasse reduziert	Hannah und Nelson 1976
<i>Sh2</i>	<i>sh2</i>	AGPase (große UE)	wie <i>bt2</i>	Hannah und Nelson 1976
<i>Sh2</i>	<i>Sh2-Rev6</i>		Korngewicht um 11-18 % vergrößert	Giroux et al. 1996
<i>BT1</i>	<i>bt1</i>	ADP-Glucose Translokator	Gehalt an ADP-Glucose erhöht; Gehalt an Saccharose und reduzierenden Zuckern erhöht; Gehalt an Stärke um ca. 80-85% reduziert	Shannon et al. 1998

<b>Synthese von Amylose und Amylopektin</b>				
<i>Wx</i>	<i>wx-C</i>	GBSSI (Stärkekorngewundene Stärke-Synthase)	amylosefreie Stärke; Gesamtstärkegehalt kaum reduziert (5 %)	Nelson und Rines 1962
<i>Ael</i>	<i>ael</i>	BEIIb (Stärke-Branching-Enzym IIb)	Gehalt an Stärke um ca. 30 % reduziert; Gehalt an Amylose in der Stärke erhöht (von normal 25 % auf bis zu 70 %); anomales Amylopektin mit weniger Verzweigungen	Boyer und Preiss 1987
<i>Sul</i>	<i>sul-Ref</i>	DBE (Isoamylase) (Debranching-Enzym)	Gehalt an reduzierenden Zuckern und Saccharose erhöht; Gehalt an Stärke um ca. 50 % reduziert; Phytoglykogen wird auf Kosten von Amylopektin akkumuliert	Rahman et al. 1998

lösliche Zucker als Wildtyp Endosperm, der Anteil an Saccharose an den löslichen Zuckern ist dabei erhöht (Shannon et al. 1993).

Saccharose-Synthase katalysiert die reversible Umwandlung von Saccharose in UDP-Glucose und Fructose ( $\text{Suc} + \text{UDP} \leftrightarrow \text{UDP-Glc} + \text{Frc}$ ). In Maisendosperm werden die beiden Isoenzyme SuSy1 und SuSy2 durch *Saccharose Synthase 1 (Sus1)* und *Shrunken1 (Sh1)* kodiert (Chourey 1981, Echt und Chourey 1985). Ein Verlust von SH1 bedingt den *sh1* Körner Phänotyp, der sich durch Degeneration von zentral lokalisierten Stärkespeicherzellen auszeichnet. Dadurch ist der Stärkegehalt um ca. 25-40 % reduziert (Singletary et al. 1997, Chourey et al. 1998). Gleichzeitig ist der Gehalt an löslichen Zuckern erhöht (Tobias et al. 1992). Während zahlreiche *sh1* Mutanten in den unterschiedlichsten Spezies bekannt sind, konnte bisher erst eine einzige *sus1* Mutante isoliert werden, die aber keinen spezifischen Phänotyp aufweist (Chourey et al. 1998). Die Doppelmutante *sh1 sus1* enthält ca. 25 % weniger Stärke als *sh1* Mutanten. Ansonsten ist der Phänotyp gleich. Eine zusätzliche Zelldegeneration durch *sus1* konnte nicht festgestellt werden. (Chourey et al. 1998).

*Bt2 (Brittle2)* und *Sh2 (Shrunken2)* kodieren die kleine und große Untereinheit der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, dem Enzym des Stärkeweges, dem bisher die meiste Aufmerksamkeit geschenkt wurde (Hannah und Nelson 1976). Es katalysiert die Umwandlung von Glucose-1-P in ADP-Glucose ( $\text{Glc-1-P} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{ADP-Glc} + \text{PPi}$ ). Mutationen, die zu einer starken Reduktion der AGPase Aktivität führen (ca. 5-7 %

Restaktivität) zeigen gemeinsam mit *bt1* Körnern von allen Maismutanten den stärksten Phänotyp. Der Gehalt an Stärke ist im Vergleich zum Wildtyp um 70-80 % reduziert und die löslichen Zucker sind stark erhöht (Nelson und Pan 1995). Lösliche Zucker nehmen in diesen Mutanten selbst bei 28 DAP ca. 26 % der Trockenmasse ein, während zu diesem Zeitpunkt Wildtypen 3 % und selbst *su1* Körner nur 8 % lösliche Zucker aufweisen (Creech 1968).

In der aus *sh2* hervorgegangenen Revertante *Sh2-Rev6* ist die AGPase Aktivität wieder hergestellt, aber nicht mehr durch Phosphat hemmbar. Das Allel *Sh2-Rev6* verursacht ein um ca. 11-18 % vergrößertes Korngewicht bei einem gleich bleibenden, relativen Anteil an Stärke (Giroux et al. 1996).

Brittle1 ist ein Adenylat-Translokator, der den Transfer von cytosolischer ADP-Glucose in den Amyloplasten bewirkt (Shannon et al. 1998). Die Mutante *bt1* besitzt mit einem um ca. 80 % reduzierten Gehalt an Stärke und einem stark erhöhten Gehalt an löslichen Zuckern (Tobias et al. 1992) einen ähnlichen Phänotyp wie *bt2* und *sh2* Körner. Die Körner der Mutante *bt1* akkumulieren aber zusätzlich hohe Mengen an ADP-Glucose (Shannon et al. 1996).

Von Mutanten, die die Amylose- oder Amylopektinsynthese betreffen, wurden *ae*, *wx* und *su1* ausgewählt. Eines der ersten jemals charakterisierten Gene ist der *waxy* Locus von Mais (Nelson und Rines 1962). Ein Verlust von *Wx* resultiert in einem mit bloßem Auge erkennbaren opaken Endosperm. Durch das Fehlen von Stärkekorng gebundener Stärke-Synthase (GBSSI) enthält *wx* Stärke keine Amylose. Der Gesamtstärkegehalt ist gegenüber dem Wildtyp nur geringfügig um ca. 5 % reduziert (Creech 1968).

*Amylose extender (ae)* Mutanten fehlt BEIIb bei gleichzeitigen normalen Aktivitäten an BEI und BEIIa (Boyer und Preiss 1978). Der Anteil an Amylose erhöht sich im *ae* Endosperm von normalerweise 25 % auf bis zu 70 %, und das verbleibende Amylopektin zeigt eine abnormale Struktur mit weniger Verzweigungen als üblich (Stinard et al. 1993). Der Gesamtstärkegehalt ist verringert und erreicht nur ca. 67 % im Vergleich zum Wildtyp (Creech 1968).

Der *Sugary1* Locus kodiert Isoamylase (Rahman et al. 1998), ein Debranching-Enzym, das  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen von Amylopektin hydrolysiert. Mutanten, denen SU1 fehlt, akkumulieren auf Kosten von Amylopektin Phytoglykogen, ein hochverzweigtes, wasserlösliches Polyglucan. Entsprechend ist der Stärkegehalt um ca. 50 % reduziert (Creech 1968). Wie der Name ausdrückt, akkumulieren die Mutanten Saccharose und andere Einfachzucker (James et al. 1995). In *su1-Ref* Endosperm ist gleichzeitig die Aktivität an dem Debranching-Enzym Pullulanase stark reduziert (Dinges et al. 2001).

## 2.4 Entwicklung von Körnern in Sterilkultur

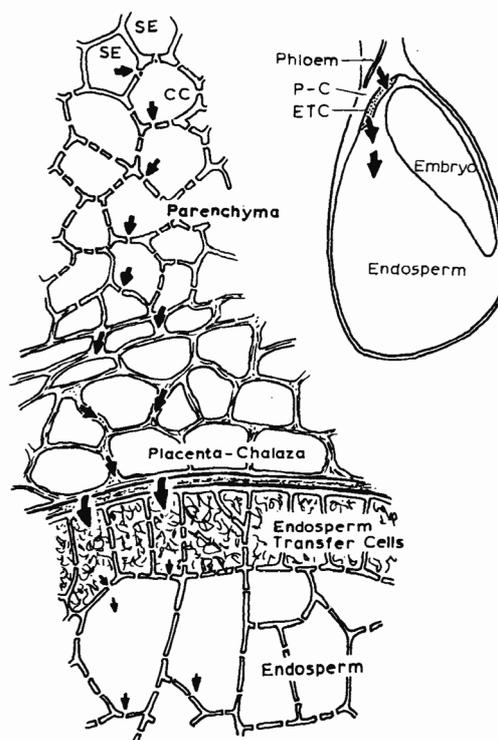
Die *in vitro* Kultur von Maiskörnern wurde als erstes von Gengenbach (1977) beschrieben und stellt mittlerweile eine Standardmethode in der Pflanzenforschung dar. Sie ermöglicht unter definierten Bedingungen bereits ab wenigen Tagen nach Pollinierung (DAP) die Entwicklung von Maiskörnern in Kultur. Die Körner entwickeln sich dabei physiologisch und anatomisch ähnlich wie *in vivo* bis zur Reife. Die Methode wird daher seit den 70er Jahren zur Erforschung unterschiedlichster Fragestellungen genutzt. Es wurden unter anderem die Effekte der Temperatur (Jones et al. 1981), der Genotypen (Cobb und Hannah 1983) und der Kohlenhydratquellen und -mengen (Cobb und Hannah 1986, Cheng und Chourey 1999, Felker 1992, Cobb et al. 1988) auf die Kornentwicklung untersucht. Das System wurde auch zur Durchführung von Markierungsexperimenten genutzt (Glawischnig et al. 2000, 2001, 2002).

Bei der Sterilkultur werden Körnerblöcke inklusive Kolbengewebe auf ein Agarmedium platziert. Die Maiskörner nehmen Nährstoffe aus dem Medium auf, metabolisieren sie und entwickeln sich zur Reife. In der Literatur ist immer noch strittig, auf welche Art und Weise die Aufnahme und der Transfer der Saccharide vom Medium ins Korn erfolgt.

Der natürliche Vorläufer von Stärke ist Saccharose. Dieses wird während der Photosynthese in den Blättern gebildet und von dort über das Phloem ins Korn transportiert. Die Biosynthese von Speicherstärke findet dann in den Amyloplasten des Endosperms statt. Die Leitbündel des Kolbengewebes reichen jedoch nicht bis ins Endosperm, sondern enden in dessen Nähe im Pedicel (Felker und Shannon 1980). Entsprechend findet die Phloementladung bereits im Pedicel statt. Wie der Transport von aus dem Phloem entladener Saccharose ins Endosperm erfolgt ist bis dato ungeklärt.

Abb. 2.3 (aus Thorne 1985) zeigt schematisch den anatomischen Aufbau eines Maiskorns. Das diploide Muttergewebe an der Basis des Korns besteht aus dem Pedicel und dem plazento-chalazalen Gewebe (P-C-Schicht). Die Verbindungsstelle der beiden Gewebe wird als „closing layer“ bezeichnet. Sie besteht aus komprimierten Zellen des oberen Pedicels und des unteren plazento-chalazalen Gewebes und wird vermutlich im reifen Korn zu einer schwarzen Schicht. Die Zellen des Pedicels sind durch eine Vielzahl von Plasmodesmen miteinander verbunden. An die plazento-chalazale Region schließen sich die basalen Endospermzellen an. Im unteren Bereich zeigen sie typische Merkmale von Transferzellen: sie besitzen zahlreiche Mitochondrien und die Innenflächen der Zellwände sind durch Einwachsungen stark vergrößert (Griffith et al. 1987). Die darüber liegenden „normalen“

Endospermzellen sind der Ort der Stärkesynthese und sind genauso wie die Transferzellen durch Plasmodesmen miteinander verbunden. Die Zellen der P-C-Schicht hingegen haben keine Plasmodesmen, es besteht also keine symplastische Verbindung zwischen dem Endosperm und dem Muttergewebe (Felker und Shannon 1980, Kladnik et al. 2004). Dies legt die Vermutung nahe, dass Assimilate im Pedicel symplastisch, in der P-C-Schicht apoplastisch und im Endosperm wiederum symplastisch transportiert werden (Thorne 1985). Eine entscheidende Rolle im Transport von Wasser, Zuckern und anderen Nährstoffen wird dabei der P-C-Schicht zugeschrieben (Kladnik et al. 2004). Ungeklärt ist bis jetzt, auf welche Art und Weise der Transport von Assimilaten erfolgt. Man geht meist davon aus, dass ein passiver Transport vorliegt (Griffith et al. 1987, Porter et al. 1985). Ein aktiver Transport kann aber nicht ausgeschlossen werden (Felker 1982), obwohl bisher im Maisendosperm noch kein Hexose- oder Saccharosetransporter nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 2.3:** Anatomie eines Maiskorns mit schematischer Darstellung des vermuteten Transportweges von Assimilaten. SE, Siebelemente; CC, Begleitzellen; P-C, Placenta-Chalazal; ETC, Endospermtransferzellen (aus Thorne 1985).

Anhand von *pulse chase* Experimenten mit  $^{14}\text{CO}_2$  behandelten Maispflanzen konnte gezeigt werden, dass Saccharose auf dem Weg von den Leitbündeln ins Endosperm zunächst durch Invertase zu Glucose und Fructose hydrolysiert wird (Shannon 1968, Shannon 1972, Shannon und Dougherty 1972). Die für diesen Prozess verantwortliche zellwandgebundene Invertase

ist dabei ausschließlich in den basalen Endospermtransferzellen (Cheng et al. 1996) lokalisiert. Die Hydrolyseprodukte Glucose und Fructose werden ins Endosperm aufgenommen und später wieder durch Saccharose-P-Synthase und Saccharose-P-Phosphatase in Saccharose umgewandelt (Abb. 1.2). Ein Kreislauf von Saccharosehydrolyse und –resynthese wurde unter anderem auch in *Ricinus communis* beobachtet. Es wird angenommen, dass der auf den ersten Blick sinnlose Zyklus (*futile cycle*) den Fluss von Kohlehydraten ins Speichergewebe reguliert (Geigenberger und Stitt 1991).

*In vitro* spielt neben dem Korn selbst zusätzlich das Kolbengewebe bei der Aufnahme von Nährstoffen eine Rolle. Körner sind nicht in der Lage sich ohne anhaftendes Kolbengewebe zu entwickeln und entwickeln sich umso besser, je mehr Kolbengewebe vorhanden ist. Untersuchungen von Felker (1992) weisen daraufhin, dass das Kolbengewebe nicht nur eine physikalische Absorptionsfläche ist, durch die die Nährstoffe passiv hindurch diffundieren. Vielmehr werden Nährstoffe erst ins Kolbengewebe aufgenommen und dann ähnlich *in vivo* ins Endosperm abgegeben.

## 2.5 Markierungsexperimente und Flussanalyse in der Pflanzenforschung

Markierungsexperimente mit Radioisotopen (z.B.  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ) und Stabilisotopen (z.B.  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) haben eine lange Tradition und werden bis heute unter anderem zur Aufklärung von Synthesewegen und zur metabolischen Flussanalyse (MFA) eingesetzt (Szyperski 1998). Die MFA nimmt dabei einen immer größeren Stellenwert ein.

In einem Experiment werden den Pflanzen bzw. den Pflanzenteilen markierte Verbindungen angeboten, die Pflanzen nehmen dieses „Störsignal“ auf, verstoffwechseln es und verteilen es im metabolen Netzwerk. Die Metabolite von Interesse werden meist extrahiert und ihre Markierung wird durch Radiotracing, MS oder NMR nachgewiesen. Aus den so gewonnenen Daten können dann unter anderem Stoffwechselflüsse berechnet werden. Als Methode der Wahl hat sich mittlerweile die Stabilisotopenmarkierung mit  $^{13}\text{C}$  herauskristallisiert.

Roscher et al. (2000) teilt Markierungsexperimente generell in dynamische und *steady state* ein. Bei den mittlerweile fast ausschließlich durchgeführten *steady state* Experimenten muss sich das biologische System in einem stationären Zustand befinden, d.h. die Größen der intrazellulären Pools dürfen sich nicht ändern, so dass der Fluss zu einem Metaboliten hin genauso groß ist wie der Fluss von ihm weg (Wiechert 2001).

Den Pflanzen bzw. Teilen davon können markierte Verbindung auf verschiedene Weise verfüttert werden. Die einfachste Methode ist, Pflanzenteile abzutrennen und sie in ein

flüssiges Medium zu geben, das die markierten Substanzen enthält. Auf diese Weise wurden zum Beispiel Kartoffelscheiben (Viola et al. 1991), Weizenendosperm (Keeling et al. 1988), Bananen (Hill und ap Rees, 1994) und exzidierte Wurzelspitzen von Mais (Dieuaide-Noubhani et al. 1995) behandelt. Die Aufnahme von Markierung über Flüssigmedien kann ebenso in Zellkulturen (Hatzfeld und Stitt 1990, Fernie et al. 2001, Rontein et al. 2002) erfolgen. Bewährt haben sich auch Sterilkulturen, in denen sich Pflanzenteile ähnlich wie *in planta* weiterentwickeln können und die daher sehr lange Markierungszeiten bis hin zu mehreren Wochen erlauben. Beispiele hierfür sind Versuche an Embryonen von *Brassica napus* (Schwender et al. 2002), Maiskörnern (Glawischnig et al. 2000, 2002) und Sojabohnen Kotyledonen (Sriram et al. 2004). Die Markierung kann ebenso *in vivo* durchgeführt werden, z. B. durch Begasung mit  $^{13}\text{CO}_2$  (eigene unveröffentlichte Versuche, Schäfer et al. 1980) oder durch Injektion von markierten Vorstufen in die Pflanze (Keeling et al. 1988).

Bei den Experimenten müssen markierte Komponenten gleichzeitig mit unmarkierten Komponenten angeboten werden. Würde zum Beispiel ausschließlich vollmarkierte Glucose benutzt, so wären sämtliche daraus abgeleiteten Metabolite auch vollmarkiert und lieferten daher keine Information. Eine Verdünnung kann auf drei Arten erfolgen (Roscher et al. 2000). Erstens, das Substrat ist nur an bestimmten Positionen markiert (Positionslabeling). Zweitens, von zwei chemisch verschiedenen Substraten ist nur eines markiert. Drittens, ein vollmarkiertes Substrat wird mit einem Überschuss des gleichen Substrates angeboten (Bondlabeling). Studien auf Basis von Positionslabeling haben eine längere Tradition und waren und sind vor allem bei der Aufklärung des Triose-Hexose-Cyclings (Ratcliffe und Shachar-Hill 2001) von Bedeutung. Bondlabeling mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Vorstufen ist die am häufigsten angewandte Methode und hat sich vor allem in Kombination mit NMR-Analyse als geeignet erwiesen (Roscher et al. 2000, Szyperski 1998).

Die Verteilung einer  $^{13}\text{C}$ -Markierung im Metabolismus lässt sich durch NMR oder MS verfolgen. Makrokomponenten wie Proteine, Stärke, Saccharose, Cellulose, Fettsäuren etc. bzw. dessen Bildungsblöcke werden direkt betrachtet. Wichtige Zwischenprodukte des zentralen Stoffwechsels wie Oxalacetat, Pyruvat oder Phosphoenolpyruvat kommen hingegen in nur sehr geringen Mengen vor und können daher nicht direkt gemessen werden. Deren Muster kann durch Retrobiosynthese anhand der Muster metabolisch direkt verwandter Aminosäuren, Nucleosiden oder sekundären Metaboliten rekonstruiert werden. Am aussagekräftigsten sind die proteinogenen Aminosäuren, aus denen sich die Muster von acht Intermediaten ableiten lassen (Szyperski 1995, 1998). Hierzu wird das Protein hydrolysiert, und die Aminosäuren werden getrennt, aufgereinigt und einzeln vermessen (Eisenreich und

Bacher 2000, Dieuaide-Noubhani et al. 1995). Alternativ dazu kann das Rohhydrolysat direkt per MS (Dauner und Sauer 2000) oder 2D-NMR (Szyperski 1995, Sriram, 2004) in einem einzigen Lauf vermessen werden.

Im  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum liefert jedes C-Atom ein eigenes Signal, es gibt also direkt die positionsspezifische  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung wieder. Bei benachbarten  $^{13}\text{C}$ -Atomen sind die Signale durch skalare  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen zusätzlich aufgespalten. Es können also  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  Bindungsbrüche und -knüpfungen gut verfolgt werden. Anhand dieser Informationen können für kleinere Moleküle wie z. B. Aminosäuren und Glucose (Szyperski 1995, Glawischnig et al. 2001, Eisenreich et al. 2004) die relativen Konzentrationen aller relevanten Isotopologe berechnet werden. Nachteile der NMR-Spektroskopie sind dessen geringe Empfindlichkeit und die aufwendige Probenvorbereitung, da in der Regel sehr reine Verbindungen in hohen Mengen erforderlich sind.

Im Gegensatz dazu zeichnet sich die Massenspektroskopie als schnelle, sehr empfindliche Methode mit vergleichsweise einfacher Probenaufarbeitung aus. Gemessen wird die Masse der Moleküle, eine direkte Aussage über die Position der Markierung kann jedoch nicht getroffen werden. Durch geeignete Derivatisierungen und anschließende Fragmentierung lassen sich aber zusätzliche Informationen gewinnen. Dauner und Sauer (2000) zeigten, dass eine einzige Derivatisierung der Aminosäuren eines sauren Proteinhydrolysates ausreicht, um genügend Informationen für eine Flussanalyse zu erhalten.

Metabolische Flussanalysen (MFA) müssen nicht zwangsläufig den gesamten zentralen Metabolismus abdecken, sondern können sich auf Ausschnitte des Stoffwechsels konzentrieren. In den letzten Jahren wurden zum Beispiel Flussanalysen veröffentlicht, die sich auf den Citratzyklus (TCA) (Edwards et al. 1998), den oxidativen Pentosephosphatweg (PPP) (Garlick et al. 2002) und das Triose-Hexose-Cycling (Fernie et al. 2001) beschränken. Eine vollständige MFA hat zum Ziel, alle metabolischen Flüsse des zentralen Stoffwechsels eines Organismus zu quantifizieren. Neben den relativen Anteilen von PPP, TCA, Glykolyse, etc. am Gesamtfluss müssen dabei auch so genannte *futile cycles* beachtet werden. Darunter versteht man scheinbar unnütze Kreisläufe, bei denen unter Verbrauch von Energie zwei Verbindungen ohne Nettofluss ineinander umgewandelt werden (Portais und Dolert 2002). Letztendlich soll eine komplette Flusskarte eines Organismus erstellt werden können.

Der erste Schritt einer MFA ist das Aufstellen eines Stoffwechselnetzes anhand Literaturdaten. Eine richtige Auswertung setzt also voraus, dass die Biosynthesewege des Organismus bekannt sind. Weiterhin muss bekannt sein, welche Position die C-Atome in den C-Ketten der einzelnen Zwischenstufen einnehmen. Flussanalysen konzentrieren sich fast

immer auf den zentralen Kohlenstoffmetabolismus. Von Interesse sind also der Pentosephosphatweg, der Citratzyklus und die Glykolyse. Obwohl man annehmen möchte, dass diese Wege bereits gut erforscht sind, ist dies nicht immer der Fall, und die Annahme vermeintlich bekannter Tatsachen ist eine typische Fehlerquelle (van Winden et al. 2001). Hier sind die Transaldolase und Transketolase, zwei Enzyme des PPP die maßgeblich am Entstehen von Mustern beteiligt sind, als Beispiele zu nennen. Sie besitzen vermutlich eine breitere Substratspezifität als angenommen wird, mit der Folge, dass Transketolase statt zwei mindestens sechs verschiedene Reaktionen katalysieren kann und somit die Muster falsch interpretiert werden können (van Winden et al. 2001).

Vernachlässigt wird meist auch eine mögliche Kanalisierung von Reaktionen. Gemeint ist damit, dass ein direkter Enzym-zu-Enzym Transfer von Substraten erfolgt. Es wird zum Beispiel eine Kanalisierung im TCA zwischen Succinat-CoA-Synthetase, Succinat-Dehydrogenase und Fumarase vermutet, mit der Folge, dass auf Stufe der eigentlich symmetrischen Moleküle Succinat und Fumarat keine Randomisierung erfolgt (van Winden et al. 2001).

MFA ist in Pflanzen im Vergleich zu anderen Organismen durch die ausgeprägte Kompartimentierung der Stoffwechselwege erschwert. Sowohl im Cytosol als auch in Plastiden finden sich fast alle Enzyme des PPP und der Glykolyse. Es kann also angenommen werden, dass die beiden Stoffwechselwege zumindest teilweise parallel in beiden Kompartimenten ablaufen können. Die Wege können zwar in heterotrophen Geweben auf den Stufen der Hexose-Phosphate und Triose-Phosphate kommunizieren, es kann daraus aber nicht unbedingt auf einen einzigen Triose-P- und Hexose-P-Pool geschlossen werden. Neben den Triose-P und Hexose-P existieren auch für Malat, Oxalacetat, Pyruvat und Acetyl-CoA verschiedene Pools mit unterschiedlicher Biogenese und somit unterschiedlichen Mustern.

Obwohl vielfach gezeigt werden konnte, dass *steady state labeling* in Pflanzen möglich ist und mathematische Tools wie z.B.  $^{13}\text{C}$ -FLUX (Wiechert et al. 2001) oder NMR2Flux (Sriram et al. 2004) zur Berechnung der Flüsse vorhanden sind, existieren bisher nur wenige Flusskarten von Pflanzen. Die bisherigen Auswertungen beschränkten sich meist auf qualitative und semiquantitative Aussagen (Schwender et al. 2004). Die erste umfassende Flusskarte wurde von Dieuaide-Noubhani et al. im Jahre 1995 an exzidierten Maiswurzelspitzen aufgestellt. Es folgten Flusskarten von Tomatenzellen (Rontein et al. 2002) und Sojabohnen Kotyledonen (Sriram et al. 2004). In den letztgenannten Versuchen wurde dabei zum ersten Mal die Kompartimentierung der Pflanzenzelle richtig berücksichtigt.

Zu erwähnen ist auch eine auf den PPP und die Glykolyse begrenzte Flussanalyse auf Basis von MS Daten an *Brassica napus* Embryonen (Schwender et al. 2003).

Von Maisendosperm existieren Markierungsexperimente mit vollmarkierter Glucose, Saccharose und Acetat und anschließender NMR-Spektroskopie (Glawischnig et al. 2001, Glawischnig et al. 2002). Die gemessenen Isotopologe der Aminosäuren und der hydrolysierten Stärke decken sich qualitativ gut mit den zu erwartenden Flüssen durch die bekannten Wege des zentralen Kohlenhydratmetabolismus. Die Daten wurden aber nicht zu einer Quantifizierung der Flüsse genutzt.

Im Gegensatz zu Pflanzen existieren von Mikroorganismen bereits zahlreiche Flusskarten, die meist durch MS- und/oder NMR-Messungen der proteinogenen Aminosäuren erstellt wurden. Aufgrund der Sensibilität, der Schnelligkeit, der geringen Kosten und des begrenzten Materials hat sich die Massenspektroskopie hierbei als bevorzugte Technik durchgesetzt (Sauer 2004).

Eine umfassende Flussanalyse in Pflanzen erforderte in den genannten Beispielen einen umfangreichen experimentellen Aufwand. Es wurden viele Metabolite wie Aminosäuren und Zucker analysiert und daraus die Flüsse berechnet. Es konnte aber am Lehrstuhl auch gezeigt werden, dass sich aus einer umfangreichen NMR-Analyse einer einzigen Verbindung – Glucose aus hydrolysierte Stärke - relevante Aussagen treffen lassen (Glawischnig et al. 2002). Die NMR-Analyse konnte in den letzten Jahren erheblich verbessert werden, so dass mittlerweile die Konzentration aller biologisch relevanten Glucoseisotopologe bestimmt werden kann (Eisenreich et al. 2004). Am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie wurde die 4F-Software entwickelt (Ettenhuber und Eisenreich 2004). Sie ermöglicht es, die relativen Anteile von Direkteinbau, Glykolyse/Gluconeogenese, Pentosephosphatweg und Citratzyklus/Gluconeogenese am Cycling der in Maisstärke eingebauten Glucose zu bestimmen. Die Software liefert zwar keine klassische Flusskarte, ist aber gut geeignet, unterschiedliche Entwicklungsstadien, Wildtypen und Mutanten zu vergleichen

## 2.6 Ziele der Arbeit

Mit der Arbeit soll ein Beitrag zum generellen Verständnis des Kohlenhydratstoffwechsels im Mais Korn geleistet werden. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei der Biosyntheseweg von Saccharose zu Stärke.

Als Methode wurde eine Kombination aus Stabilisotopenmarkierung mit  $^{13}\text{C}$  und NMR-Spektroskopie ausgewählt. Es werden dabei Maiskörner mit anhaftendem Kolbengewebe in

Sterilkultur mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose bzw. [U-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]Saccharose markiert und aus den gereinigten Stärkeglucosen die Konzentrationen sämtlicher biochemisch relevanter Glucoseisotope bestimmt. Aus den Isotopologengruppen lassen sich Rückschlüsse auf den zentralen Kohlenhydratmetabolismus ziehen.

Auf diese Weise sollten verschiedene Inzuchtlinien und die Stärkemutanten *wx*, *ae*, *sul*, *bt1*, *bt2*, *sh2*, *Sh2-Rev6*, *mn1*, *sh1* und *sh1 sus1* auf einer neuen Ebene charakterisiert werden. Es sollte dabei ermittelt werden, ob und welchen Einfluss einzelne Mutationen auf den zentralen Kohlenhydratmetabolismus ausüben. Dabei sollte unter anderem überprüft werden, inwieweit sich die Zusammensetzung und die Menge der produzierten Stärke und unterschiedliche C-Quellen im Kulturmedium auswirken. Da die Biosynthese von Phytoglykogen in der Literatur noch strittig ist, sollte aus *sul* Endosperm zusätzlich zum Muster der Stärkeglucose das Isotopologengruppenmuster von Phytoglykogen ermittelt werden.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, musste zunächst bestimmt werden, inwiefern sich der genetische Hintergrund und die Anzuchtbedingungen auf das Muster auswirken.

Ungeklärt ist auch, inwieweit der zentrale Metabolismus während der linearen Phase der Stärkeakkumulation konstant bzw. Änderungen unterworfen ist. Daher sollten Körner einer Inzuchtlinie zu drei verschiedenen Entwicklungsphasen markiert und die gemessenen Isotopologengruppenmuster verglichen werden.

Am Lehrstuhl für Genetik wurden bereits Markierungsexperimente mit Maiskörnern durchgeführt und die Isotopologengruppenverteilung durch NMR bestimmt (Glawischnig et al. 2002). Die Auswertung der Muster beschränkte sich dabei auf das qualitative Zuordnen der Isotope zu den einzelnen Stoffwechselprozessen. Es sollte nun anhand der Isotopologengruppenmuster die Stoffwechselwege auch quantitativ erfasst werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Sterilkultur von Maiskörnern

Die Sterilkultur von Maiskörnern wurde nach dem Standardprotokoll von Gengenbach (1977) mit den von Cobb und Hannah (1983) vorgenommenen Modifikationen durchgeführt. Maiskörner wurden 8-9 Tage nach Pollinierung in Kultur genommen. Das obere Fünftel des Kolbens und die äußersten ein bis zwei Hüllschichten wurden noch auf dem Feld bzw. im Gewächshaus entfernt. Alle folgenden Schritte wurden dann unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Der komplette Kolben wurde mit 70 % Ethanol eingesprüht und abgeflammt. Mit einem Skalpell wurden durch zwei Schnitte in der Längsachse und einen Schnitt in der Querachse des Kolbens die Hüllblätter und Silks durchtrennt und diese anschließend entfernt. Der dadurch halbseitig offen gelegte Kolben wurde in ca. 10 Körner breite Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden der Länge nach in drei keilförmige Stücke zerteilt, und bis auf zwei parallele Körnerreihen mit 4-10 Körnern wurden sämtliche Körner mit einem Skalpell beseitigt. Die Blöcke wurden in 25 x 100 mm Petrischalen mit 50 ml Nährmedium gesetzt und bei 26°C im Dunklen inkubiert. Das Medium (pH 5,8) enthielt pro Liter 4,33 g MS Salze, MS Vitamine, 1 g Caseinhydrolysat, 80 g Glucose bzw. Saccharose, 20 mg Gentamycin und 3,5 g Agar. In den Kulturen von W22 Maiskörnern zur Untersuchung der linearen Wachstumsphase und zur Erstellung der Wachstumskurve wurden noch zusätzlich 0,5 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) zugesetzt.

#### 3.2 Markierung mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose bzw. [U-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]Saccharose

Nach einigen Tagen in Vorkultur auf einem unmarkierten Medium wurden die Körnerblöcke zur Markierung in ein Medium umgesetzt, das neben 77,33 g/l unmarkierter Glucose bzw. Saccharose 2,67 g/l [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose bzw. [U-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]Saccharose enthielt. Das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Zuckern war in allen Experimenten 30:1. Für Markierungsexperimente mit Glucose wurde sowohl die Vorkultur als auch die Markierung auf einem glucosehaltigen Medium durchgeführt. Umgekehrt wurde für Markierungen mit Saccharose ausschließlich Saccharose als Kohlenstoffquelle benutzt.

Sämtliche Kulturen von Mutanten und den zugehörigen Wildtypen wurden von 15-22 DAP markiert.

W22 Maiskörner zur Untersuchung der linearen Phase der Stärkeakkumulation wurden zu drei verschiedenen Zeiträumen von 11-18 DAP, 18-25 DAP und 25-32 DAP markiert.

Nach 7 Tagen ( $168 \pm 1$ h) Inkubation wurden die Körner geerntet, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3 Isolierung von Glucose aus Stärke

Von den gefrorenen Maiskörnern wurden das Pericarp und der Embryo entfernt. Das verbleibende Endosperm wurde in der Lyophille für 5-6 Tage getrocknet und in flüssigem Stickstoff in einem Mörser homogenisiert. W22 Körner zur Untersuchung der linearen Phase der Stärkeakkumulation wurden mit Pericarp und Embryo getrocknet und das gesamte Korn wurde homogenisiert.

Die Isolierung von Glucose aus Stärke aus dem Endosperm basiert auf einer modifizierten Methode von Glawischnig et al. (2002). Zur Entfernung von Lipoiden wurden 200 mg Endosperm mehrmals mit Hexan extrahiert. Der Rückstand wurde getrocknet und mehrmals mit 80 % Ethanol und Wasser bei ca.  $60^{\circ}\text{C}$  zur Isolierung von löslichen Zuckern extrahiert. Das verbleibende Stärkepellet wurde mit 3-4 ml 0,5 N Natronlauge versetzt und bei  $60^{\circ}\text{C}$  für 1 h gelatinisiert. Das Gel wurde in 10 ml Wasser aufgenommen und mit 1 M Essigsäure auf pH 4,5 eingestellt. Die Stärke wurde anschließend mit Amyloglucosidase (ca. 20 Units, lyophilisiertes Pulver von Sigma-Aldrich) über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  verdaut. Die Lösung wurde zentrifugiert (30 min, 4800 rpm) und der Überstand am Rotationsverdampfer auf wenige Milliliter eingengt. Die Glucose wurde mittels Affinitätschromatographie an einer 2-ml Affigel 601 Säule aufgereinigt. Hierzu wurde die Lösung auf pH  $> 9$  eingestellt und auf die mit 0,2 M Ammoniumacetat (pH 8,8) equilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 40 ml 0,2 M Ammoniumacetat (pH 8,8) gewaschen und Glucose anschließend mit 0,2 M Ammoniumacetat (pH 6,0) eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden per Dünnschichtchromatographie (SilicaGel 60, Chloroform/Essigsäure/Wasser 6:7:1 (v/v/v) auf Glucose getestet. Glucose wurde dabei durch Besprühen mit Aminohippursäure detektiert. Positiv getestete Fraktionen wurden vereinigt und an einer Lyophille getrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und die enthaltene Glucose wurde per HPLC weiter aufgereinigt. Für W22 Maiskörner zur Untersuchung der linearen Wachstumsphase erfolgte die Reinigung an einer Rezex RPM-Monosaccharide Säule (Phenomenex, 300 x 7,8mm). Glucose wurde mit 0,4 ml/min Wasser bei  $75^{\circ}\text{C}$  nach 22,5 min eluiert und durch ein Differentialrefraktometer detektiert. Für sämtliche anderen Experimente wurde Glucose an

einer Luna NH<sub>2</sub> HPLC Säule mit 40 ml/min 80/20 (v/v) Acetonitril/Wasser bei 40°C und refraktometrischer Detektion aufgereinigt. Glucose eluierte nach 8 min.

Glucosehaltige Fraktionen wurden gesammelt, an der Lyophille getrocknet und zur NMR Analyse in 0,6 ml D<sub>2</sub>O gelöst.

### **3.4 Isolierung von Glucose aus Stärke und Phytoglykogen von *sugary1* Mutanten**

Die Isolierung von Metaboliten aus *sugary1* Körnern erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Inouchi et al. (1983). Aus 500 mg getrocknetem Endosperm wurden Phytoglykogen und lösliche Zucker durch mehrmaliges Extrahieren mit Wasser bei Raumtemperatur isoliert. Phytoglykogen wurde aus der wässrigen Lösung durch Zugabe von 3 Volumen Methanol gefällt. Das Gemisch wurde zentrifugiert (10 min, 4800 rpm) und der Rückstand mehrmals mit Methanol gewaschen. Phytoglykogen wurde in 0,4 M Citratpuffer pH 4,5 gelöst und mit Amyloglucosidase (ca. 20 U) über Nacht bei 55°C verdaut. Die entstandene Glucose wurde wie oben beschrieben (siehe 3.3) mittels Affinitätschromatographie und HPLC aufgereinigt.

Das nach der wässrigen Extraktion verbleibende Stärkepellet wurde wie oben beschrieben zu Glucose verdaut und gereinigt.

### **3.5 Partieller Verdau von Stärke**

Die partielle Hydrolyse von Stärke erfolgt nach Keeling et al. (1988). Getrocknetes Endosperm wurde von löslichen Zuckern und Phytoglykogen befreit (siehe 3.4) und das stärkehaltige Pellet (120 mg) mit 20 ml 0,1 M Natriumacetat (pH 4,5) aufgeschlämmt. Die Stärke wurde mit Amyloglucosidase (ca. 20 U) für 60 min bei 55°C verdaut und die freigesetzte Glucose durch Affinitätschromatographie und HPLC aufgereinigt (siehe 3.3).

### **3.6 Bestimmung der Trockenmasse**

Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden Maiskörner in einer Lyophille für 7 Tage getrocknet und deren Gewicht vor und nach Trocknung bestimmt.

### 3.7 Bestimmung des Stärkegehaltes

Der Gehalt an Stärke wurde aus getrocknetem Endosperm mit einem Testkit von Boehringer Ingelheim bestimmt. Nach Anleitung des Herstellers wurden 10 – 50 mg getrocknetes Endosperm zum Lösen der Stärke mit 20 ml DMSO und 5 ml 8 N HCl versetzt und für 30 min bei 60°C inkubiert. Die Lösung wurde schnell in Eis abgekühlt, mit 5 ml 8 N NaOH versetzt und mit 0,112 N Citratpuffer (pH 4,5) auf 100 ml aufgefüllt. Von der Lösung wurden 50 – 200 µl zum Test eingesetzt. In der Lösung wurde der Gehalt an Glucose vor und nach enzymatischer Stärkehydrolyse bestimmt und aus der Differenz der beiden Werte der Stärkegehalt berechnet. Hierzu wurde Glucose durch Hexokinase in Glucose-6-P überführt, welches durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in einer NADP<sup>+</sup> abhängigen Reaktion zu Gluconat-6-P umgesetzt wurde. Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der Menge an D-Glucose proportional und wurde anhand seiner Absorption bei 340 nm bestimmt.

### 3.8 Bestimmung des Gehaltes an Glucose und Saccharose

10 – 20 mg getrocknetes Maisendosperm wurden mit 1 ml Wasser für 30 Minuten bei 70°C inkubiert, zentrifugiert und aus dem Überstand Saccharose und Glucose mit einem Testkit nach Boehringer Ingelheim bestimmt. Von der Lösung wurden 50 - 100 µl zum Test eingesetzt. In der Lösung wurde der Gehalt an Glucose vor und nach enzymatischer Spaltung von Saccharose durch Invertase bestimmt (siehe 3.7).

### 3.9 NMR Spektroskopie

Glucose (jeweils ca. 10 mg) wurde in 0,6 ml D<sub>2</sub>O aufgenommen. <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR Spektren wurden wie beschrieben (Eisenreich et al. 2004) mit einem Bruker DRX500 Spektrometer bei 27°C bei 500,13 MHz bzw. 125,76 MHz aufgenommen. Die Daten wurden mit der Standardsoftware von Bruker (XWINNMR 3.0) ausgewertet. Die Zuordnung der Signale von α- und β- Glucose erfolgte nach Glawischnig et al. (2002) und Eisenreich et al. (2004). Die chemischen Verschiebungen, Kopplungskonstanten und Isotopenshifts wurden anhand Spektren von kommerziell erworbenen <sup>13</sup>C markierten Glucosen bestimmt (Tab. 3.1)

**Tab. 3.1:** NMR Daten von Glucose (aus Eisenreich et al. 2004).

Position	Chemische Verschiebung [ppm]	<sup>13</sup> C- <sup>13</sup> C Kopplungskonstanten [Hz]	<sup>13</sup> C Isotopenshift [ppb]
1α	93,28	46,3 (2α), 3,0 (6α), 2,0 (5α)	8 (2α)
2α	72,79	45,6 (1α), 38,2 (3α), 2,7 (4α)	11 (1α), 29 (3α), 40 (1α, 3α)
3α	74,05	38,2 (2α), 38,7 (4α), 3,5 (6α), 1,4 (5α)	-7 (2α), -3 (2α, 4α)
4α	70,90	40,9 (5α), 39,2 (3α), 3,0 (2α)	22 (5α), 42 (3α, 5α)
5α	72,55	43,4 (6α), 40,3 (4α), 2,0 (1α), 1,7 (3α)	6 (6α)
6α	61,85	43,4 (5α), 3,5 (1α), 3,6 (3α)	11 (6α)
1β	97,20	46,1 (2β), 4,2 (3β), 4,1 (6β)	8 (2β)
2β	75,41	45,8 (1β), 38,9 (3β), 2,3 (4β)	12 (1β), 22 (3β), 34 (1β, 3β)
3β	77,10	39,4 (4β), 38,9 (2β), 2,3 (5β), 4,0 (6β), 4,2 (1β)	-8 (2β)
4β	70,83	40,5 (5β), 38,7 (3β), 3,5 (2β)	13 (5β), 30 (3β, 5β)
5β	77,19	43,2 (6β), 40,8 (4β), 2,3 (3β)	6 (6β), 5 (4β)
6β	61,97	43,2 (5β), 4,1 (1β), 4,2 (3β)	12 (5β)

Die Gesamtanreicherung an <sup>13</sup>C von Glucose wurde anhand der <sup>13</sup>C-Satelliten des H-1α Signals (5,26 ppm) im <sup>1</sup>H NMR Spektrum nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ } ^{13}\text{C} = \frac{\text{IS}}{\text{IS} + \text{IH}} \quad \text{IS} = \text{Integral der } ^{13}\text{C}\text{-Satelliten, IH} = \text{Integral des Hauptsignals}$$

Dieser Wert diente als Referenz für die <sup>13</sup>C Anreicherung aller anderen Atome. Für die meisten Versuche wurde die Gesamtanreicherung zusätzlich experimentell durch IRMS bestimmt. In diesen Fällen wurde der zuverlässigere Wert aus der IRMS-Messung als Referenzwert verwendet.

Im <sup>1</sup>H entkoppeltem <sup>13</sup>C NMR Spektrum (Abb. 4.1) wurde jedes einzelne Signal separat integriert, die Integrale der zusammengehörenden Satelliten addiert und somit der Anteil der einzelnen Satelliten am Gesamtsignal bestimmt. Die direkt aus den Spektren berechneten Werte repräsentieren die Gesamtmenge mehrere Isotopologe und werden als X-Gruppen bezeichnet. Aus den X-Gruppen wurde die Menge der einzelnen Isotopologe wie in Eisenreich et al. (2004) beschrieben berechnet.

Eine Zusammenstellung aller möglichen X-Gruppen mit den zugehörigen chemischen Verschiebungen findet sich in Tabelle 3.2. Die Glucoseisotopologe werden dabei als binärer Code dargestellt; die „Nummerierung“ beginnt mit dem C1-Atom von links nach rechts. Eine „1“ symbolisiert ein <sup>13</sup>C-Atom, eine „0“ symbolisiert ein <sup>12</sup>C-Atom und ein „X“ symbolisiert ein <sup>13</sup>C- oder ein <sup>12</sup>C-Atom.

**Tab. 3.2:** Auflistung aller möglichen X-Gruppen von Glucose (aus Ettenhuber et al.2005, eingereicht)

Signal	$\alpha$ -isomer		$\beta$ -isomer	
	Position (ppm)	X group	Position (ppm)	X group
1	93.28	<b>10XXXX</b>	97.20	<b>10XXXX</b>
	93.458, 93.094	<b>11XXXX</b>	97.376, 97.012	<b>11XXXX</b>
	93.473, 93.458, 93.447, 93.429, 93.109, 93.092, 93.067	11XX11	97.376, 97.012	110XX0
	93.458, 93.092	11XX00	97.409, 97.376, 97.337, 97.045, 97.010, 96.975	111XX1
			97.395, 97.356, 97.031, 96.992	111XX0, 110XX1
2	72.79	<b>010XXX</b>	75.410	<b>010XXX</b>
	72.966, 72.598	<b>110XXX</b>	75.582, 75.217	<b>110XXX</b>
	72.914, 72.610	<b>011XXX</b>		1101XX
	73.087, 72.790, 72.725, 72.417	<b>111XXX</b>	75.582, 75.217	1100XX
		1110XX	75.540, 75.234	<b>011XXX</b>
	73.097, 73.068, 72.791, 72.766, 72.734, 72.700, 72.431, 72.401	1111XX		0111XX
			75.540, 75.234	0110XX
			75.712, 75.410, 75.348, 75.041	<b>111XXX</b>
3	74.05	<b>X010XX</b>	77.100	<b>X010XX</b>
	74.210, 73.908	<b>X110XX</b>	77.250, 76.950	<b>X110XX</b>
	74.209, 73.906	<b>X011XX</b>	77.261, 76.950	0110XX
	74.359, 74.050, 73.755	<b>X111XX</b>	77.279, 77.243, 76.970, 76.933	1110XX
	74.382, 74.363, 74.353, 74.336, 74.079, 74.064, 74.050, 74.033, 73.779, 73.762, 73.749, 73.733	X11111	77.250, 76.950	<b>X011XX</b>
	74.359, 74.05, 73.755	X11100	77.411, 77.100, 76.790	<b>X111XX</b>
			77.455, 77.441, 77.420, 77.401, 77.383, 77.369	111111
			77.147, 77.100, 77.077, 77.056, 76.836, 76.819,	
			77.420, 77.399, 77.10, 76.803, 76.782	011110
			77.411, 77.10, 76.790	011100
4	70.870	<b>XX010X</b>	70.830	<b>XX010X</b>
	71.037, 70.717	<b>XX110X</b>	70.978, 70.654	<b>XX110X</b>
	71.037, 70.717	<b>XX011X</b>	70.978, 70.654	<b>XX011X</b>
	71.165, 70.852, 70.548	<b>XX111X</b>	71.117, 70.788, 70.480	<b>XX111X</b>
	71.183, 71.153, 70.852, 70.561, 70.532	X1111X	71.131, 71.104, 70.788, 70.496, 70.469	X1111X
	71.165, 70.852, 70.548	X0111X	71.118, 70.788, 70.484	X0111X
5	72.55	<b>XXX010</b>	77.190	<b>XXX010</b>
	72.719, 72.393	<b>XXX110</b>	77.350, 77.023	<b>XXX110</b>
	72.719, 72.372	<b>XXX011</b>	77.352, 77.012	<b>XXX011</b>
	72.877, 72.55, 72.218	<b>XXX111</b>	77.517, 77.190, 76.847	<b>XXX111</b>
			77.519, 77.501, 77.19, 76.847, 76.835	XX1111
6	61.850	<b>XXXX01</b>	61.970	<b>XXXX01</b>
	62.008, 61.667	<b>XXXX11</b>	62.132, 61.787	<b>XXXX11</b>
	62.036, 62.008, 61.982, 61.695, 61.667, 61.637	1X1X11	62.165, 62.132, 62.098, 61.815, 61.789, 61.756	1X1X11
	62.008, 61.667	0X0X11	62.132, 61.787	0X0X11
			62.146, 62.112, 61.803, 61.769	1X0X11
				0X1X11

### 3.10 Bestimmung der Gesamtanreicherung

Zusätzlich zu den ermittelten Werten aus dem  $^1\text{H}$  NMR Spektrum wurde die Gesamtanreicherung von Glucose aus Phytoglykogen und Stärke mittels IRMS (*isotope ratio mass spectrometry*) durch Isolab GmbH, Schweitenkirchen, bestimmt (Kornexl et al. 1997). Die als  $\delta$ -Werte angegebenen  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Isotopenverhältnisse wurden wie folgt umgerechnet:

$$\% \text{ } ^{13}\text{C} = \frac{\delta \cdot I(\text{S})}{10} + 100 \cdot I(\text{S})$$

mit  $\delta = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der Probe in ‰

$$I(\text{P}) = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}\text{-Verhältnis des Standards PDB (0,0112372)}$$

Von *mn1*-Glc, *mn1*-Suc, *bt2*-Suc, *shlsus1*-Glc, *shlsus1*-Suc, *sh2-g1*-Glc, *sh2-g1*-Suc und *Sh2-Rev6-g1*-Suc wurde der getrocknete Rückstand von mit Hexan und 80% Ethanol extrahiertem Maisendosperm zur Messung verwendet. Von W22 Körnern zur Untersuchung von verschiedenen Phasen der linearen Stärkeakkumulation wurde getrocknetes, homogenisiertes Kornmaterial vermessen. Von den übrigen Experimenten wurden die Glucoselösungen für die NMR Spektroskopie an der Lyophille getrocknet und der Rückstand zur IRMS Messung verwendet.

Der wässrig-methanolische Rückstand der Phytoglykogenfällung von *su1*-Endosperm wurde einrotiert, an der Lyophille getrocknet und zur IRMS-Messung verwendet. Dieser Wert gibt überwiegend die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung der löslichen Zucker wieder.

### 3.11 Statistischer Vergleich von Spektren

Der paarweise statistische Vergleich der Isotopologenverteilung zweier Proben erfolgte durch Bestimmung der RMSD (root mean square deviation) –Werte, die sich wie folgt berechnen:

$$\text{RMSD}(n; x, y) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}$$

Mit  $n = \text{Anzahl der Isotopologe}$

$x = \text{Konzentration des Isotopologs } i \text{ aus Spektrum } x$

$y = \text{Konzentration des Isotopologs } i \text{ aus Spektrum } y$

### 3.12 Pflanzenmaterial

Die für die Experimente verwendeten Maispflanzen wurden im Sommer 2002 und Frühling 2003 unter Feldbedingungen in Gainesville, Florida, und im Sommer 2003, Herbst 2003 und Sommer 2004 in einem Gewächshaus in Freising angezogen (Tab. 3.3). Die Linien *Sh2-Rev3* und *Sh2-Rev6* wurden sowohl im Gewächshaus als auch auf dem Feld angezogen.

**Tab. 3.3:** Verwendetes Pflanzenmaterial.

Genetischer Hintergrund	Mutation	Anzucht	Zeit	Bezugsquelle
W64A	--	Feld	Sommer 2003	Oregon State University Purdue University
W64A	<i>amylose extender (ae)</i>	Feld	Sommer 2003	Oregon State University Purdue University
W64A	<i>waxy (wx)</i>	Feld	Sommer 2003	Oregon State University Purdue University
W64A	<i>sugary1 (su1)</i>	Feld	Sommer 2003	Oregon State University Purdue University
W64A	<i>shrunkn1 (sh1)</i>	Feld	Sommer 2003	Oregon State University Purdue University
W64A	<i>brittle1 (bt1)</i>	Feld	Sommer 2003	Oregon State University Purdue University
W64A	<i>brittle2 (bt2)</i>	Feld	Sommer 2003	Oregon State University Purdue University
Fa56	<i>Sh2-Rev3</i>	Feld Gewächshaus	Sommer 2003 Sommer 2004	Prof. L. C. Hannah (University of Florida)
Fa56	<i>Sh2-Rev6</i>	Feld Gewächshaus Gewächshaus	Sommer 2003 Sommer 2004 Herbst 2003	Prof. L. C. Hannah (University of Florida)
Fa56	<i>sh2</i>	Gewächshaus Gewächshaus	Herbst 2003 Sommer 2004	Prof. L. C. Hannah (University of Florida)
W22	<i>mn1</i>	Gewächshaus	Herbst 2003	Prof. P. Chourey (University of Florida)
W22	<i>sh1sus1</i>	Gewächshaus	Herbst 2003	Prof. P. Chourey (University of Florida)
W22	--	Feld Gewächshaus	Sommer 2002 Sommer 2004	Prof. L. C. Hannah Prof. P. Chourey (University of Florida)

Saatgut der Linien W22 (für Untersuchungen von verschiedenen Phasen der linearen der Stärkeakkumulation), *Sh2-Rev3*, *Sh2-Rev6* und *sh2* stammen von Prof. L. Curtis Hannah, University of Florida. Saatgut des Wildtyps Fa56 stand nicht zur Verfügung. Es wurde statt dessen die Revertante *Sh2-Rev3*, in der die Wildtypfrequenz wiederhergestellt ist, verwendet (Giroux et al. 1996). Zur Vereinfachung wird *Sh2-Rev3* in der vorliegenden Arbeit als Fa56 Wildtyp bezeichnet. Saatgut der Linien W22 (für Vergleiche von Mutanten und für die

Erstellung der Wachstumskurve), *mn1* und *sh1 sus1* wurden von Prof. Prem Chourey, University of Florida, zur Verfügung gestellt. Saatgut der Linien W64A, *sh1*, *ae*, *wx*, *su1*, *bt1* stammen aus Beständen der Oregon State University und Purdue University.

### 3.13 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen BioRad (USA), Fluka (Schweiz), Duchefa (Niederlande), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (USA) bezogen. [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose und [U-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]Saccharose wurden von Omicron (South Bend, IN) erworben.

### 3.14 Genotypisierung von *Sh2-Rev3* und *sh2* Endosperm

Die Genotypisierung des Endosperms der beiden Revertanten *Sh2-Rev3* (hier bezeichnet als Fa56 Wildtyp) und *Sh2-Rev6* beruht darauf, dass *Sh2-Rev6* eine Insertion von 6 Basenpaaren in *Sh2* besitzt, während in *Sh2-Rev3* die Wildtyp Sequenz wiederhergestellt ist (Giroux et al. 1996).

Die Isolierung von DNA aus getrocknetem Endosperm erfolgte nach einem Protokoll von Joao Leiva (<http://ag.arizona.edu/research/larkinslab/>). Hierzu wurde die DNA aus 50-200 mg getrocknetem Endosperm mit 600 µl Extraktionspuffer (100 mM TRIS, pH 8,5, 100 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 8,0, 1 % Sarcosyl) extrahiert und mit Phenol-Chloroform (1-1) und Chloroform gereinigt. Störende RNA wurde mit 3µl RNase (10 mg/ml) bei 37°C verdaut. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und mit 70 % Ethanol gereinigt.

Flankierende Sequenzen der Insertionsstelle von *Sh2-Rev3* wurden mit Hilfe der PCR-Primer LH71 (5'-GGGAAGAAGCTTCAAAGCTAC-3') und LH72

(5'-GGATCCAAAGCAGGGTAATGG-3') (Giroux et al. 1996) amplifiziert. Die PCR-Reaktionen wurden als 50 µl Ansätze im Thermoblock UNO (Biometra) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt Standard-Puffer KCl V (50 mM Tris, pH 8,3, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,3 µM eines jeden Primers, je 0,2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP und 1 Unit Taq Polymerase (Roche). Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: 94°C 3 min, gefolgt von 37 Zyklen 94°C 1 min, 50 °C 1 min Annealing, 72°C 50 sec Extensionszeit und 72°C 10 min finale Extension.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den pGEM<sup>®</sup>-T Vektor (Promega) nach Angaben des Herstellers kloniert. Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse (Birboim und Doly 1979). Die Plasmid-DNA wurde zusätzlich einer PEG-Fällung (Sambrook und Russel 2001) unterzogen. Sequenzierungen wurden mit einem Kapillarsequenzierer ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) nach der Didesoxy-Methode nach Sanger et al. (1977) durchgeführt. Sequenzreaktionen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem BigDye<sup>®</sup> v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde der Primer T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') von Promega verwendet. Die Sequenzen wurden mit der Software Lasergene von DNASTAR Inc. (USA) ausgewertet.

Die Genotypisierung von *sh2* Endosperm erfolgte durch eine PCR mit den Primern LH273 (5'-GTGGGAGTTCTATACTTCTGTTGGACTGG-3') und LH274 (5'-CAGATCCATCAGCAAAGTTGATCCCGCC-3'). Die Primerpaare umgeben die Insertionsstelle von *sh2-R* und liefern für Wildtypen ein 960 bp großes PCR-Produkt, nicht aber für *sh2-R* (L.C. Hannah, persönliche Kommunikation). Die PCR wurde wie oben beschrieben mit folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 94°C 3 min, gefolgt von 37 Zyklen 94°C 1 min, 60 °C 1 min Annealing, 72°C 1 min Extensionszeit und 72°C 10 min finale Extension.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Experimenteller Ablauf

#### 4.1.1 Von der Markierung zum Isotopologemuster

Maiskörner mit anhaftendem Gewebe wurden zwischen 8 und 10 DAP in Kultur gegeben und vor der eigentlichen Markierung zunächst für einige Tage auf einem unmarkierten Medium vorkultiviert. Dieser Zeitraum diente dazu, die Entwicklung der Körner und etwaige mikrobielle Kontaminationen zu verfolgen. Zur Markierung mit  $^{13}\text{C}$  wurden die Kolbenblöcke unter sterilen Bedingungen auf ein frisches Medium gleicher Zusammensetzung gegeben, das neben unmarkierten Zuckern einen geringen Anteil an vollmarkierten Zuckern enthielt. Das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Zuckern betrug jeweils 1:30. Ein sehr hoher Überschuss an unmarkierten Verbindungen ist notwendig, um so genannte statistische Kopplungen zu minieren. Gemeint ist damit, dass sich im Falle eines Bindungsbruchs im Molekül und anschließender Resynthese ein markiertes Bruchstück mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit mit einem unmarkierten Fragment verbindet.

In allen Experimenten wurden die Körner für 7 Tage mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$  oder  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{12}]\text{Saccharose}$  markiert. In diesem Zeitraum nehmen die Körner die angebotene Glucose oder Saccharose auf, metabolisieren sie und bauen daraus unter anderem Speicherstärke auf. Die Verteilung der  $^{13}\text{C}$ -Markierung in der Stärke wurde mittels NMR Spektroskopie verfolgt. Hierzu wurde Stärke aus dem Endosperm isoliert, enzymatisch in ihre Monomere zerlegt und die entstandene Glucose durch Affinitätschromatographie und HPLC aufgereinigt. Von der gereinigten Glucose wurden  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren aufgenommen, daraus so genannte X-Gruppen berechnet und aus ihnen die Anteile der einzelnen Glucoseisotopologe bestimmt. Als Isotopologe bezeichnet man gemäß der IUPAC-Definition (International Union of Pure and Applied Chemistry) von 1997 Verbindungen mit gleicher chemischer Struktur, die sich nur in ihrer Isotopenzusammensetzung (z.B.  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{Glc}$  und  $[1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3]\text{Glc}$ ) unterscheiden. Der Begriff Isotopomer setzt sich aus „isotopic isomer“ zusammen und bezeichnet Isotopologe mit gleicher Masse wie z.B.  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{Glc}$  und  $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{Glc}$  ([www.iupac.org](http://www.iupac.org)). Fälschlicherweise werden die beiden Begriffe häufig synonym verwendet.

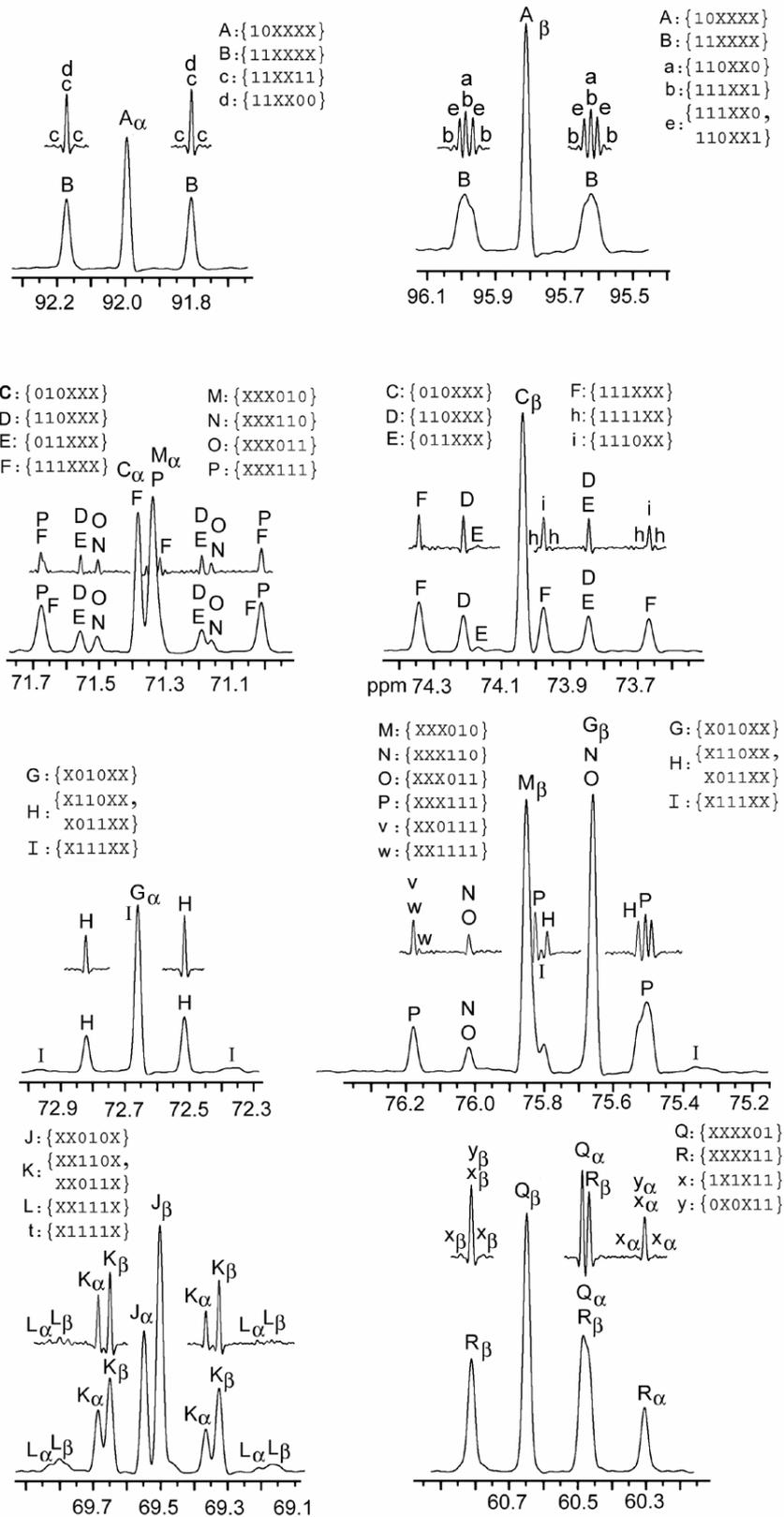
Kohlenstoff ist eine Mischung aus 98,9 %  $^{12}\text{C}$ , 1,1 %  $^{13}\text{C}$  und Spuren an  $^{14}\text{C}$ , mit der Konsequenz, dass sämtliche organische Verbindungen als komplexe Isotopologengemische vorliegen. Statistisch kommen nur einfachmarkierte Isotopomere mit 1,1 % in größeren

Mengen vor. Die Konzentration an zweifachmarkierten Isotopomeren liegt bei nur 0,011 % und die von drei- bis sechsfach markierten Isotopomeren ist um ein Vielfaches geringer (Tab. 4.1).

**Tab 4.1:** Natürliches Vorkommen ausgewählter Glucoseisotologe.

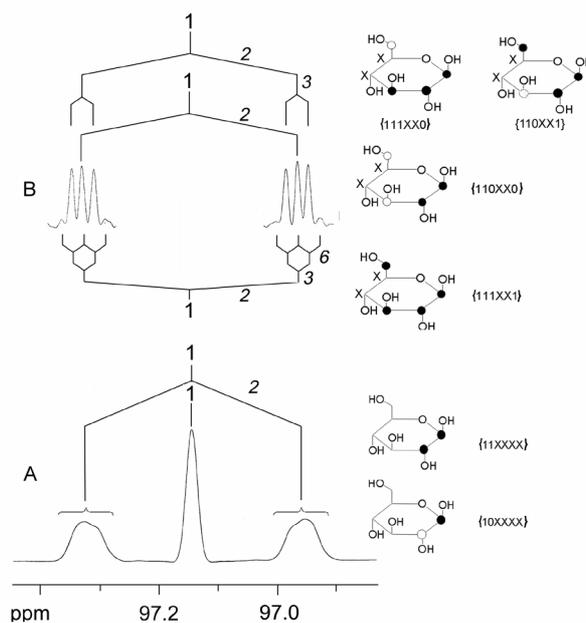
Isotopolog	Konzentration in mol %
[1- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ]	1,1
[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]	1,2 x 10 <sup>-2</sup>
[1,2,3- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]	1,3 x 10 <sup>-4</sup>
[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]	1,5 x 10 <sup>-6</sup>
[1,2,3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]	1,7 x 10 <sup>-8</sup>
[U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]	1,8 x 10 <sup>-10</sup>

In einem <sup>13</sup>C NMR Spektrum von natürlich angereicherten Verbindungen erscheinen die C-Atome daher als Singulets. Erst wenn durch Stabilisotopenmarkierung der <sup>13</sup>C-Gehalt erhöht wird und eine genügende Anzahl von mehrfachmarkierten Verbindungen vorliegt, werden Signalaufspaltungen durch Kopplungen benachbarter <sup>13</sup>C-Atome sichtbar. In den Experimenten wurde, je nach Syntheserate und Anteil von präformierter unmarkierter Stärke, durch eine siebentägige Markierung mit vollmarkierten Zuckern die Gesamtanreicherung an <sup>13</sup>C in der Speicherstärke von 1,1 % auf 1,55 – 2,81 % (Tab. 4.6) angehoben. In den <sup>13</sup>C NMR Spektren der Glucosen erscheinen daher 12 komplexe Signalgruppen, 6 für das α-Anomer und 6 für das β-Anomer (Abb. 4.1). In Lösung liegen die beiden Anomere in einem konstanten Konzentrationsverhältnis von 0,7:1 (α:β) vor.



**Abb. 4.1:**  $^{13}\text{C}$  NMR Signale von Glucose aus hydrolysierter Stärke. W22 Körner wurden von 11-18 DAP mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glc}$  markiert. Die groß abgebildeten Spektrenausschnitte wurden mit einer schwachen, die kleineren Ausschnitte mit einer starken Gaußfunktion berechnet. Den Signalen sind X-Gruppen zugeordnet und von A-Y durchnummeriert (Abbildung zur Verfügung gestellt von Wolfgang Eisenreich, LS Organische Chemie und Biochemie, TU München).

Die Signalzuordnung und Berechnung von X-Gruppen wird beispielhaft am  $1\beta$ -Signal gezeigt (Abb. 4.2). Vom  $1\beta$ -Atom sind  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen zu den Atomen  $2\beta$  ( $J = 46,1$  Hz),  $3\beta$  ( $J = 4,2$  Hz) und  $6\beta$  ( $J = 4,1$  Hz) möglich (Tab. 3.1). Damit wird das Signal in ein d (Dublett), ein dd (Doppeldublett) und ein ddd (Dublett eines Doppeldubletts) aufgespalten. Anhand der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten aus Tab. 3.1 können die Satelliten den X-Gruppen  $\{110\text{XX}0\}$ ,  $\{111\text{XX}0\}/\{110\text{XX}1\}$  und  $\{111\text{XX}1\}$  zugeordnet werden. Moleküle mit einer Einfachmarkierung am  $1\beta$ -Atom werden durch das Zentralsignal repräsentiert. Die X-Gruppen  $\{10\text{XXXX}\}$  und  $\{11\text{XXXX}\}$  werden aus einem Spektrum bestimmt, dass mit einer milden Gaußfunktion berechnet wurde (Abb. 4.2 A). Wird das Spektrum mit einer starken Gaußfunktion berechnet, sind die Satelliten besser aufgelöst und es werden die Fernkopplungen sichtbar. Daraus werden die übrigen X-Gruppen berechnet. Kopplungen zu den Atomen  $4\beta$  und  $5\beta$  sind nicht sichtbar. Zu deren Signatur kann keine Aussage getroffen werden, und sie werden daher als X dargestellt.



**Abb. 4.2:**  $^{13}\text{C}$  NMR Signal von C- $1\beta$  von Glucose. Die Kopplungspartner werden durch Zahlen angegeben. In den Strukturformeln werden  $^{13}\text{C}$ -Atome durch gefüllte Kreise,  $^{12}\text{C}$ -Atome durch offene Kreise und nicht bestimmbare C-Atome durch X dargestellt. Neben den Strukturformeln sind die X-Gruppen aufgeführt. A. Spektrum berechnet mit einer milden Gaußfunktion. B. Spektrum berechnet mit einer starken Gaußfunktion. (Abbildung von Christian Ettenhuber, LS für Organische Chemie und Biochemie, TU München)

Werden alle Signale nach diesem Beispiel ausgewertet, so ergeben sich je nach Qualität des Spektrums etwa 30 X-Gruppen.

Werden nur die Stabilisotopen  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$  betrachtet, beträgt die Anzahl der möglichen Isotopologen einer organischen Verbindung  $2^n$ , wobei  $n$  die Anzahl der C-Atome ist. Es gibt also theoretisch 64 verschiedene Glucoseisotopologe.

Aus einem  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Glucose lassen sich je nach Qualität des Spektrums lediglich maximal etwa 30 X-Gruppen ableiten, aus denen die Konzentrationen der Isotopologe berechnet werden. Das System erscheint daher auf den ersten Blick als unterbestimmt. Der Versuchsaufbau erlaubt es aber, dass die Analyse auf 21 Isotopologe beschränkt werden kann. Durch einen 30:1 Überschuss an unmarkierter Glucose bzw. Saccharose können Bindungen zwischen zwei markierten Bruchstücken nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit gebildet werden. Sämtliche Isotopologe, die nur durch Verknüpfung von zwei markierten Fragmenten erklärt werden können, dürfen daher vernachlässigt werden. Die Anzahl der möglichen Isotopologe reduziert sich damit auf mehrfachmarkierte Isotopologe mit Markierungen an benachbarten C-Atomen und einfachmarkierte. Glucosen wie {100100} oder {011011} werden zum Beispiel ausgeschlossen. Von den verbleibenden 21 möglichen Isotopologen kann die Bildung von 14 Isotopologen biochemisch erklärt werden, die von 7 nicht (Eisenreich et al. 2004). Entsprechend konnte in keinem Experiment eines oder mehrere der 7 biochemisch unwahrscheinlichen Glucosen detektiert werden.

#### 4.1.2 Fehlerbetrachtung

Die Aufnahme und Auswertung von NMR-Spektren ist natürlich mit Fehlern behaftet. Fehler können zum Beispiel durch die spektroskopische Messung, das manuelle Setzen der Integrale und den Dekonvolutionsprozess (Berechnung der Konzentrationen der Isotopologe aus den X-Gruppen) erzeugt werden. Der Gesamtfehler ist im Wesentlichen abhängig von der Qualität des Spektrums. Generell liefern sehr reine Substanzen mit hoher Gesamtanreicherung besser aufgelöste Spektren. Da die Glucosen trotz gleicher Aufarbeitung in unterschiedlicher Reinheit vorliegen und die Gesamtanreicherungen an  $^{13}\text{C}$  der Proben zwischen 1,55 und 2,81 % (Tab. 4.6) schwanken, sind je nach Spektrum unterschiedliche Fehler anzunehmen. Die Fehler unterscheiden sich zudem von Isotopolog zu Isotopolog. Große, isolierte Signale sind besser zu integrieren als kleine, überlappende Signale. Für die einzelnen Isotopologe sind daher Abweichungen zwischen ca. 4 und 75 % realistisch.

Es wurde darauf verzichtet, für jedes Isotopolog eines jeden Spektrums den jeweiligen Fehler zu bestimmen. In den Darstellungen sind daher keine Fehlerindikatoren abgebildet. Es ist

daher nicht immer einfach, aus den Balkendiagrammen auf den ersten Blick zu erkennen, ob verschiedene Isotopologensätze ähnlich oder signifikant unterschiedlich sind.

**Tab. 4.2:** Vergleich der Isotopologienmuster von Glucose aus hydrolysiertes Stärke aus W22 und W22-*mn1* Endosperm. Körner von W22-*mn1* und von drei verschiedenen W22 Pflanzen wurden zwischen 15 und 22 DAP mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose markiert. Die angegebenen Konzentrationen der Isotopologe, Standardabweichungen und RMSD-Werte beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 %.

Isotopolog	mol %			STDW <sup>a</sup> K1/K2/K3	mol %		STDW <i>mn1</i> /K1
	W22-K1	W22-K2	W22-K3		<i>mn1</i>	W22-K1	
100000	1,24	1,23	1,23	0,007	1,49	1,24	0,176
010000	1,24	1,24	1,22	0,011	1,47	1,24	0,162
001000	1,66	1,66	1,62	0,024	1,79	1,66	0,088
000100	1,37	1,40	1,37	0,016	1,59	1,37	0,154
000010	1,34	1,37	1,40	0,027	1,60	1,34	0,182
000001	1,27	1,28	1,27	0,007	1,52	1,27	0,174
110000	0,41	0,41	0,41	0,004	0,37	0,41	0,027
011000	0,05	0,02	0,09	0,015	0,02	0,05	0,019
000110	0,05	0,03	0,03	0,012	0,04	0,05	0,009
000011	0,33	0,33	0,33	0,001	0,23	0,33	0,069
111000	0,69	0,73	0,71	0,016	0,57	0,69	0,084
000111	0,77	0,77	0,77	0,000	0,63	0,77	0,099
001111	0,00	0,00	0,00	0,000	0,01	0,00	0,009
111111	0,10	0,09	0,09	0,003	0,08	0,10	0,011
RMSD <sup>b</sup> x 10 <sup>-2</sup>	W22-K1 : W22-K2: 1,8 W22-K1 : W22-K3: 2,1 W22-K2 : W22-K3: 1,7			<i>mn1</i> : W22-K1: 15,8			

<sup>a</sup> STDW = Standardabweichung

<sup>b</sup> RMSD = *root mean square deviation*

Für die Generierung von Isotopologen sind Reaktionen des zentralen Kohlenhydratmetabolismus verantwortlich. Da diese in jedem Korn gleich sind, sind auch sämtliche Spektren prinzipiell ähnlich. Es hat sich gezeigt, dass die Ergebnisse sehr gut reproduzierbar sind und verschiedene Versuchsansätze sehr ähnliche Isotopologenmuster liefern (siehe 4.3). In Tabelle 4.2. sind beispielsweise die Konzentrationen der 14 detektierten Glucoseisotopologen aus den hydrolysierten Stärken von drei verschiedenen W22 Pflanzen angegeben. Deren Muster sind einander sehr ähnlich und ergeben für die einzelnen Isotopologen niedrige Standardabweichungen zwischen 0,000 und 0,027. Vom Wildtyp unterscheidet sich das Spektrum der Stärkeglucose der Mutante W22-*mn1* deutlich. Dies

drückt sich in höheren Standardabweichungen zwischen 0,009 und 0,176 aus (siehe 4.3.4 und 4.3.6).

Als Kennzahl für die Ähnlichkeit von Mustern wurde der RMSD-Wert bestimmt. Der RMSD-Wert zweier Datensätze ist die Wurzel der gemittelten quadratischen Abweichungen der 14 gemessenen Isotopologe. Um vergleichbare Isotopologkonzentrationen zu erhalten, wurden sämtliche Spektren auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % normiert. Niedrige RMSD-Werte ( $1-4 \times 10^{-2}$ ) geben eine hohe Ähnlichkeit der Muster wieder, hohe Werte ( $> 10 \times 10^{-2}$ ) zeigen an, dass die Muster unterschiedlich sind. Im obigen Beispiel ergibt der statistische Vergleich der drei W22 Pflanzen RMSD-Werte zwischen 1,8 und 2,1. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Spektren von W22-K1 und *mn1* äußern sich in einem hohen RMSD-Wert von 15,8. Die berechneten Werte decken sich gut mit der qualitativen Aussage, die alleine durch das Betrachten und den Vergleich von skalierten NMR-Spektren getroffen werden kann. Spektren mit niedriger RMSD erscheinen optisch als gleich. Bei Spektren mit hoher RMSD sind hingegen Unterschiede zu erkennen.

### 4.1.3 Auswertung der Isotopologenmuster

#### 4.1.3.1 Wie entstehen Isotopologe?

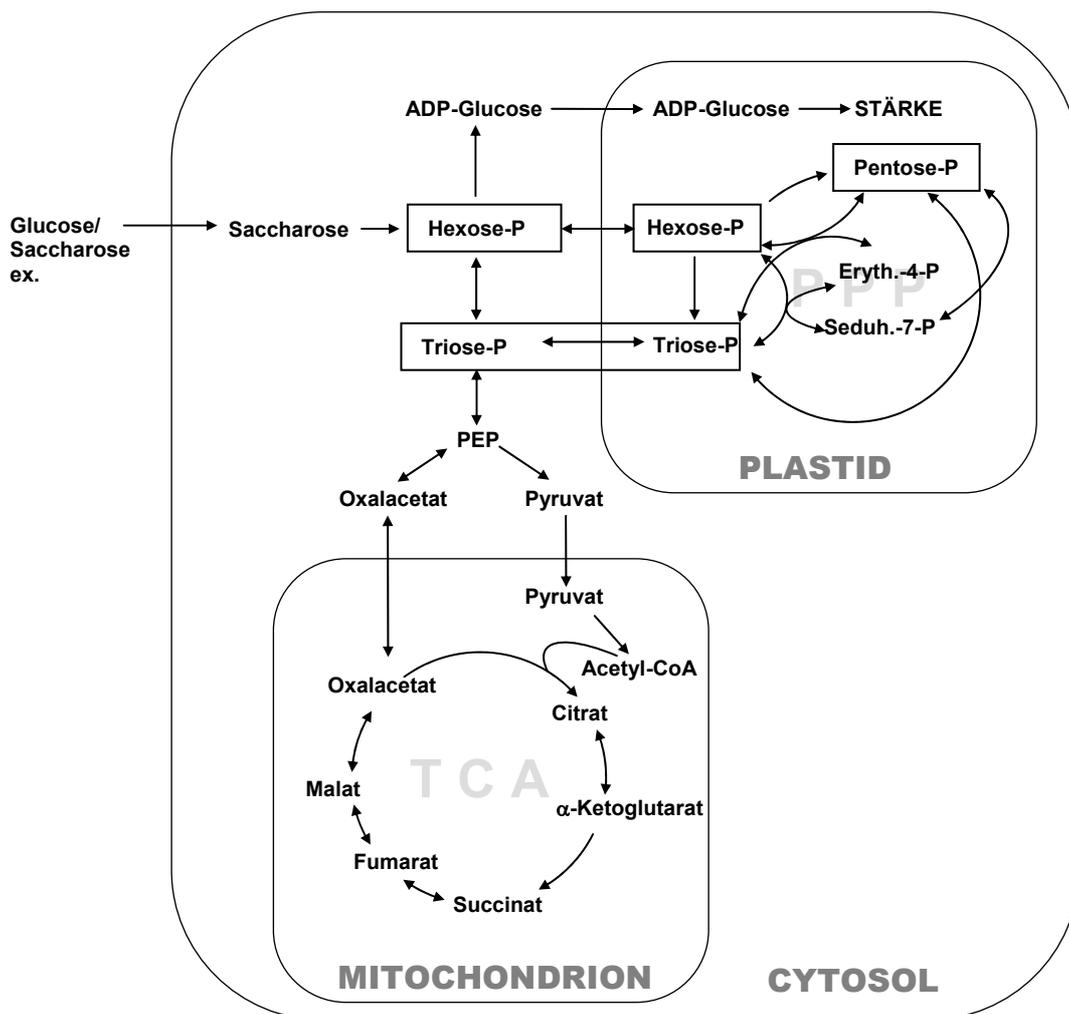
Isotopologe bilden sich, wenn das C-Gerüst eines markierten Glucosemoleküls gespalten wird und sich ein dabei entstandenes markiertes Fragment mit einem unmarkierten Fragment wieder zu Glucose vereint. Hauptverantwortlich für diesen Prozess ist der zentrale Kohlenhydratmetabolismus, genauer gesagt die Reaktionen folgender Biosynthesewege:

- (1) Glykolyse/Gluconeogenese
- (2) Pentosephosphatweg (PPP)
- (3) Tricarbonsäurezyklus/Gluconeogenese

Bei der Interpretation der Daten wird angenommen, dass Markierungen in den Zentralmetabolismus nur durch die zugeführten Hexosen eingetragen werden. Es ist aber generell möglich, dass weitere Prozesse an der Formierung von Glucoseisotopologen beteiligt sind. Es könnten beispielsweise durch die Synthese und den Katabolismus von Aminosäuren und Fettsäuren zusätzliche markierte Intermediate in den PPP, den Citratzyklus und die

Glykolyse einfließen und zur Resynthese von Glucose genutzt werden. Diese Prozesse sind vermutlich gering und werden daher vernachlässigt.

Die Erklärung der beobachteten Muster und die Zuordnung von Isotopologen zu den einzelnen Prozessen erfolgt anhand bekannter Biosynthesewege. Für Maisendosperm wird ein zentraler Kohlenhydratmetabolismus gemäß Abb. 4.3 zugrunde gelegt, dessen Reaktionsfolgen sich aus Informationen aus der Literatur (Stryer 1999, Buchanan et al. 2000, Kruger und von Schaewen 2003, Plaxton 1996, KEGG 2005) ergeben.



**Abb. 4.3:** Zentraler Kohlenhydratmetabolismus in *Zea Mays* Endosperm. Die Hexose-P (Fructose-6-P, Glucose-6-P), Pentose-P (Ribose-5-P, Ribulose-5-P, Xylulose-5-P) und Triose-P (DHAP, GAP) stehen durch schnelle Epimerase- und Isomerisierungsreaktionen jeweils im Gleichgewicht und werden als Pools betrachtet.

Ein typisches Abgrenzungsmerkmal von Pflanzen gegenüber anderen Organismen ist ein hohes Maß an Redundanz und Kompartimentierung (Roscher et al. 2000). Nahezu alle Enzyme der Glykolyse (Plaxton 1996) und des oxidativen PPP (Kruger und von Schaewen

2003) kommen sowohl in Plastiden als auch im Cytosol vor, was die Vermutung nahe legt, dass die Synthesewege auch in beiden Kompartimenten voll funktionsfähig sind. Die Lokalisation des nichtoxidativen PPP ist noch unklar. Es wird vermutet, dass sich dieser in den meisten pflanzlichen Organismen auf den Plastiden beschränkt (Kruger und von Schaewen 2003, Sriram et al. 2004).

In Abb. 4.3 sind zur besseren Übersicht die Zellkompartimente eingezeichnet. Bei den durchgeführten Experimenten kann aber zwischen Reaktionen in den einzelnen Kompartimenten nicht unterschieden werden. Der Blick richtet sich hier nur auf Glucose aus hydrolysierte Stärke. In dieser spiegeln sich – unabhängig vom genauen Ort in der Zelle – sämtliche Metabolisierungen, die vor dem Einbau in Stärke stattfinden.

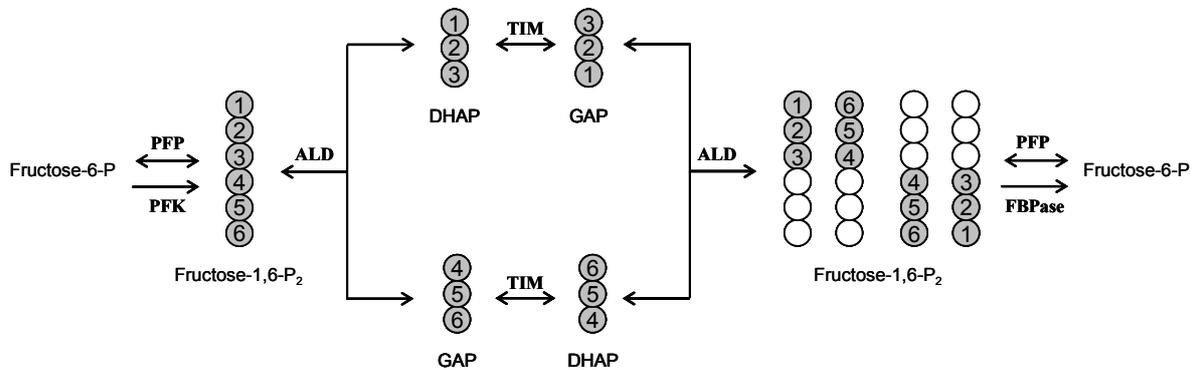
Bei der Auswertung der Muster werden analog zu vielen anderen Markierungsexperimenten (Follstad und Stephanopoulos 1998, Schwender et al. 2003, Wiechert 2001) die Pentose-, Hexose- und die Triose-Phosphate jeweils als Pools betrachtet, da die einzelnen Verbindungen vermutlich durch schnelle Isomerase- und Epimerasereaktionen im Gleichgewicht stehen.

#### (1) Glykolyse/Gluconeogenese

„Die Glykolyse ist eine Folge von Reaktionen, in denen Glucose zu Pyruvat umgebaut wird [...]“ (Stryer 1999). Reversible Schritte der Glykolyse können die Triosen wieder in Hexosen zurückführen. Die Folge von glykolytischem Abbau der Hexose-P in Triose-P, die Isomerisierung der Triose-P und die folgende Resynthese zu Hexose-P ist ein wesentlicher Teil des Triose-Hexose-Cyclings (Kruger et al. 2003) und wird hier als EMP (in Anlehnung an Embden-Meyerhoff-Parnas) bezeichnet.

Für die Bildung von Isotopologen sind dabei die Enzyme Aldolase und Triosephosphat-Isomerase (TIM) verantwortlich. Die Aldolase katalysiert die reversible Spaltung von Fructose-1,6-P<sub>2</sub> in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP). Die beiden Triosen werden durch die Aktion von TIM isomerisiert. Für das Muster ist entscheidend, dass sich durch die Isomerisierung durch TIM die Triosen und somit auch die daraus entstehenden Hexosen spiegeln, d.h. das C<sub>1</sub> von DHAP wird zum C<sub>3</sub> des GAP und umgekehrt (Abb. 4.4). An der gegenseitigen Umwandlung von Fructose-6-P in Fructose-1,6-P<sub>2</sub> sind in Pflanzen die Enzyme PFK, PFP und FBPase beteiligt. PFP ist ein pflanzeigenes Enzym, das im Cytosol die reversible Umwandlung katalysiert. PFK und FBPase katalysieren

irreversible Reaktionen. PFK bildet in Plastiden und im Cytosol Fructose-1,6-P<sub>2</sub>, FBPase katalysiert die Rückreaktion zu Fructose-6-P. Da FBPase in Plastiden von Maisendosperm fehlt (Entwistle und ap Rees 1990, Neuhaus et al. 1993), kann die Rückreaktion nur im Cytosol stattfinden.



**Abb. 4.4:** Entstehung von Isotopologen durch Triose-Hexose-Cycling über EMP. Die C-Gerüste der Moleküle werden als Kreise dargestellt, graue Kreise symbolisieren ein markiertes, weiße Kreise ein unmarkiertes Molekül. Aus vollmarkierten Hexosen entstehen durch EMP 1,2,3- bzw. 4,5,6-markierte Hexosen. TIM führt zur Inversion der Triosen. PFP, Pyrophosphat abhängige Phosphofruktokinase; PFK, Phosphofruktokinase; ALD, Aldolase; TIM, Triosephosphat-Isomerase; FBPase, Fructose-1,6-Bisphosphatase.

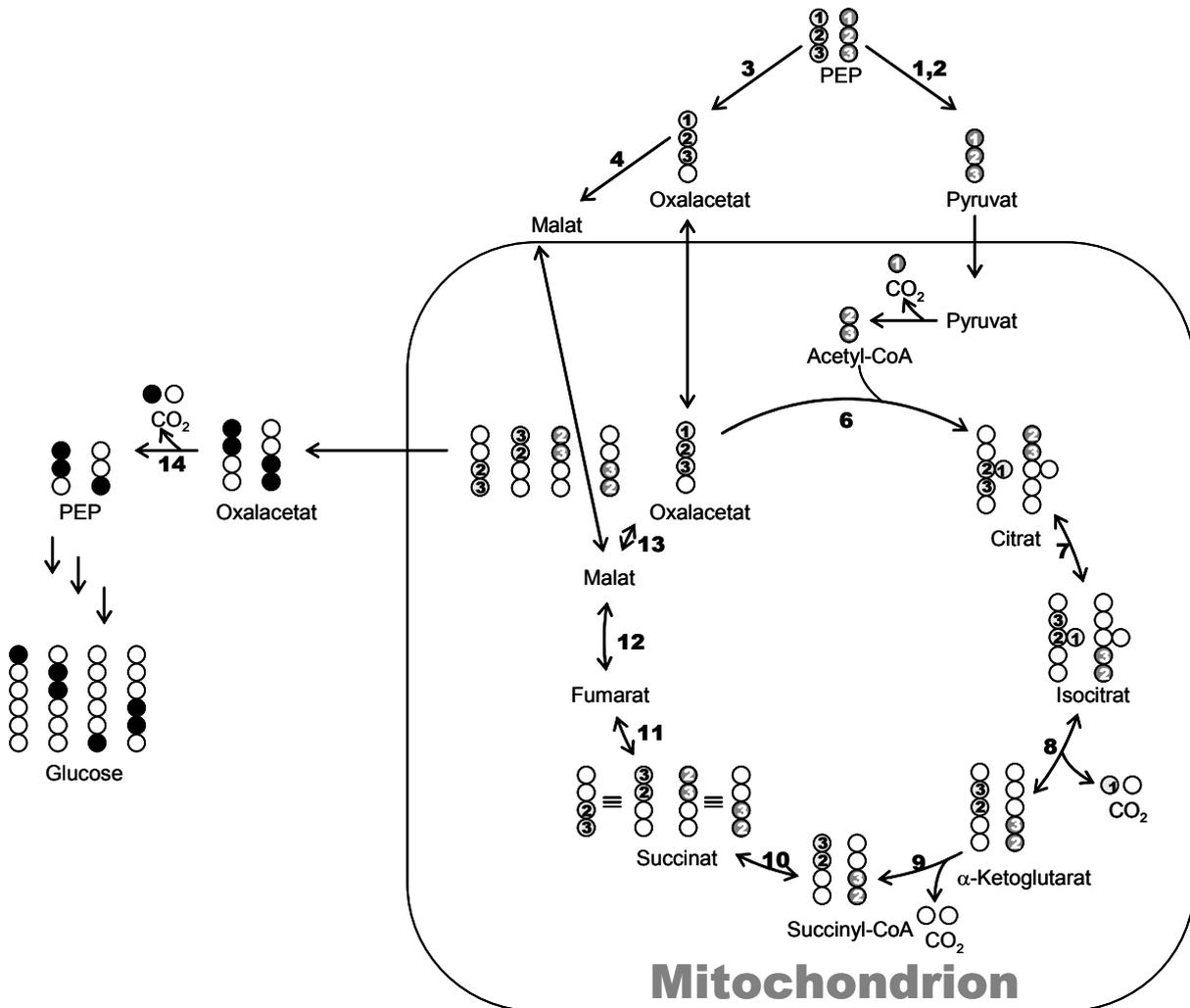
## (2) Citratzyklus/Gluconeogenese

Die Glykolyse baut Hexosen zu Phosphoenolpyruvat ab. Dieses kann auf zwei Wege in den Tricarbonsäurezyklus (*tricarboxylic acid cycle*, TCA) eingeschleust werden. Auf dem „klassischen“ Weg wird es zunächst durch Pyruvat-Kinase oder PEP-Phosphatase in Pyruvat und anschließend durch Pyruvat-Dehydrogenase in Acetyl-CoA umgewandelt, welches dann durch die Aktion von Citrat-Synthase in den Zyklus eintritt.

Alternativ wird Phosphoenolpyruvat (PEP) durch PEP-Carboxylase zu Oxalacetat (*oxal acetic acid*, OAA) carboxyliert und dieses entweder direkt oder nach vorheriger Umwandlung in Malat in den TCA eingeschleust. Diese alternativen Wege werden als anaplerotische Reaktionen bezeichnet.

Vorangegangene Markierungsexperimente am Lehrstuhl (Glawischnig et al. 2001) zeigen, dass anaplerotische Reaktionen in Maiskörnern stattfinden. Dabei wurden Maiskörner in Sterilkultur zwischen 11 und 30 DAP mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose markiert und die Verteilung der Markierung in den Aminosäuren verfolgt. Aus den Mustern der Aminosäuren wurden u. a. die

Isotopologengmuster der TCA-Intermediate OAA,  $\alpha$ -Ketoglutarat, PEP, Pyruvat und Acetyl-CoA retrobiosynthetisch erschlossen. In der Veröffentlichung erfolgte keine Interpretation der Daten im Hinblick auf den TCA, es lassen sich aber aus den Rohdaten wichtige Schlüsse ziehen. Die Autoren folgerten lediglich aus dem Muster von OAA, dass etwa 25 % des



**Abb. 4.5:** Entstehung von Isotopologen via Citratzyklus/Gluconeogenese. Die Isotopologe {100000}, {011000}, {000110} und {000001} entstehen ausgehend von vollmarkiertem PEP sowohl durch klassisches Durchlaufen des Citratzyklus via Einschleusen als Acetyl-CoA (schwarze Kreise) als auch durch anaplerotische Reaktionen via Einschleusen als Oxalacetat oder Malat (graue Kreise). Die C-Gerüste der Moleküle werden als Kreise dargestellt: graue und schwarze Kreise stellen ein <sup>13</sup>C markiertes, farblose Kreise ein unmarkiertes Molekül dar. 1, Pyruvat-Kinase; 2, PEP-Phosphatase; 3, PEP-Carboxylase; 4, Malat-Dehydrogenase; 5, Pyruvat-Dehydrogenase; 6, Citrat-Synthase; 7, Aconitase; 8, Isocitrat-Dehydrogenase; 9,  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase; 10, Succinyl-CoA-Synthetase; 11, Succinat-Dehydrogenase; 12, Fumarase; 13, Malat-Dehydrogenase; 14, PEP-Carboxykinase.

C-Flusses durch den TCA über anaplerotische Reaktionen (Carboxylierung von PEP) erfolgt. Aus dem Muster von  $\alpha$ -Ketoglutarat kann mit 42 % die Obergrenze des anaplerotischen Flusses bestimmt werden.

Wird vollmarkiertes Pyruvat  $\{1_11_21_3\}$  decarboxyliert und über Acetyl-CoA  $\{1_21_3\}$  in den Zyklus eingeschleust, so entsteht Citrat  $\{1_21_30000\}$  durch Kondensation mit unmarkiertem OAA. Obwohl Citrat ein symmetrisches Molekül ist, erfolgt die anschließende Isomerisierung durch Aconitase zu Isocitrat gerichtet. Es entsteht ausschließlich Isocitrat  $\{00001_31_2\}$ , dessen C-Atome der Positionen 1 bis 4 von OAA und die der Positionen 5 und 6 von Acetyl-CoA stammen. Die folgenden zwei oxidativen Decarboxylierungen durch Isocitrat-Dehydrogenase und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase spalten zwei C-Atome ab, die ursprünglich aus OAA stammten. Es entsteht Succinyl-CoA  $\{001_31_2\}$ , das durch Succinyl-CoA-Synthetase in Succinat umgewandelt wird. Die Moleküle Succinat und Fumarat sind symmetrisch, so dass von der Stufe des Succinats an eine Randomisierung der Markierung erfolgt und letztendlich OAA mit dem Muster  $\{001_31_2/1_21_300\}$  entsteht (Abb. 4.5). In der Literatur (van Winden et al. 2001) gibt es Hinweise darauf, dass die Reaktionen von Succinyl-CoA über Succinat zu Malat kanalisiert ablaufen und ein gerichteter Transfer der Substrate zu den Enzymen erfolgt. Dies hätte zur Folge, dass keine Randomisierung der Markierung erfolgen würde. Die Rohdaten von Glawischnig et al. (2001) zeigen aber, dass OAA sehr symmetrisch markiert ist. Eine mögliche Kanalisierung kann daher ausgeschlossen werden. Aus OAA  $\{001_31_2/1_21_300\}$  entsteht durch PEP-Carboxykinase mittels Abspaltung des C4-Atoms Phosphoenolpyruvat  $\{001_3/1_21_30\}$ , welches durch Gluconeogenese die Hexosen  $\{01_31_2000\}$ ,  $\{0001_21_30\}$ ,  $\{1_300000\}$  und  $\{000001_3\}$  liefert.

Tritt PEP  $\{1_11_21_3\}$  über anaplerotische Reaktionen in den Citratzyklus ein, so entsteht OAA  $\{1_11_21_30\}$ . Durchläuft dieses einmal den Citratzyklus wird daraus unter Berücksichtigung des Verbleibs der einzelnen C-Atome OAA mit dem Muster  $\{1_31_200\}$  und  $\{001_21_3\}$  gebildet, welches die Hexosen  $\{01_31_2000\}$ ,  $\{0001_31_20\}$ ,  $\{1_200000\}$  und  $\{000001_2\}$  liefert.

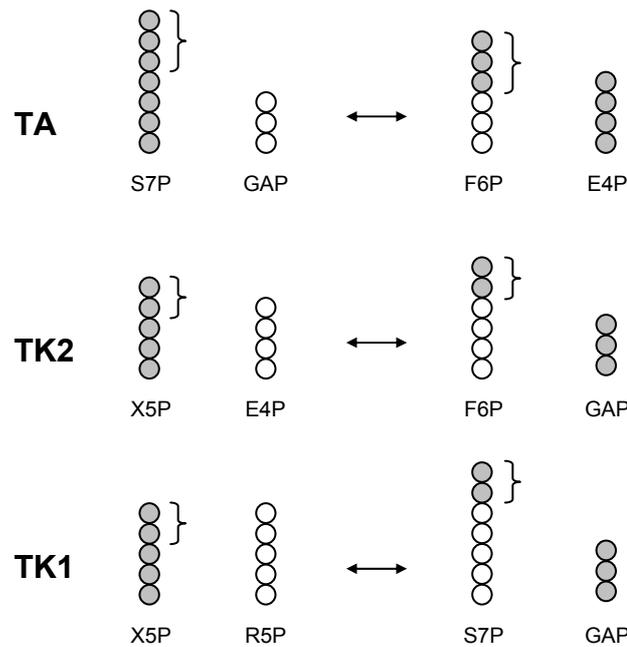
Ausgehend von vollmarkierten Triosen wird durch den Citratzyklus sowohl über den klassischen Weg als auch über den anaplerotischen Wegen der gleiche Satz an Glucoseisotopologe gebildet, allerdings mit einer unterschiedlichen Positionsverteilung der einzelnen C-Atome (Abb. 4.5). Die beiden Reaktionswege haben nur dann eine unterschiedliche Auswirkung auf die Isotopologenverteilung, wenn Triosen (PEP) mit dem Muster  $\{001\}$ ,  $\{010\}$  oder  $\{110\}$  in den Zyklus eintreten. Diese werden durch die Glykolyse oder den PPP aus den Hexosen  $\{000001\}$ ,  $\{100000\}$ ,  $\{000010\}$ ,  $\{010000\}$ ,  $\{000110\}$  und  $\{011000\}$  gebildet.

Die Reaktionen des Citratzyklus laufen nicht strikt in einer Richtung ab. Es werden zum Beispiel Malat und OAA sehr schnell ineinander umgewandelt; sie werden daher in der Regel als ein Pool betrachtet (Salon et al. 1988). Aus den Rohdaten von Glawischnig et al. (2001) ist zu schließen, dass auch ein schneller Austausch des Malat-OAA-Pools mit Fumarat durch die Fumarasereaktion erfolgt. Die Oxalacetatisotopomere {1110} und {0111} kommen in mit [ $^{13}\text{C}_6$ ]Glucose markiertem Maisendosperm in gleichen Mengen vor. OAA {1110} entsteht durch Carboxylierung von PEP durch PEP-Carboxylase, dessen Spiegelbild OAA {0111} kann nur durch eine Austauschreaktion über Fumarase gebildet werden. Werden aus OAA {1110} und {0111} über Decarboxylierung durch PEP-Carboxykinase und anschließender Gluconeogenese Hexosen regeneriert, so entstehen die Isotopologe {111000}, {000111}, {110000} und {000011}. In den früheren Markierungsexperimenten (Glawischnig et al. 2001) machen {1110} und {0111} nur etwa 14 % des Oxalacetatpools aus. Diese Werte können zwar nicht direkt auf die jetzigen Versuche übertragen werden, es ist aber anzunehmen, dass auch hier der Fluss von PEP nach Fumarat und zurück gering ist. Er wird daher in der Auswertung und Simulation vernachlässigt. Die Entstehung der Isotopologe {111000}, {000111}, {110000} und {000011} wird hier daher nur dem Triose-Hexose-Cycling über EMP und dem PPP zugeschrieben.

Weitere Isotopologe könnten aus dem Citratzyklus durch die Aktion von Malatenzym entstehen. Das Enzym katalysiert die Umwandlung von Malat in Pyruvat. Ausgehend von OAA {0011} würde eine Reaktion über Pyruvat mit einem anschließenden Durchlaufen des Citratzyklus und der Gluconeogenese zusätzlich die Isotopomere {010000} und {000010} liefern. Anhand des in Glawischnig et al. (2001) gemessenen Musters von Alanin, aus dem sich retrobiosynthetisch das Markierungsmuster von Pyruvat ableiten lässt, kann jedoch geschlossen werden, dass der Fluss über Malatenzym minimal ist. Er wurde daher in der Auswertung vernachlässigt.

### (3) Pentosephosphatweg

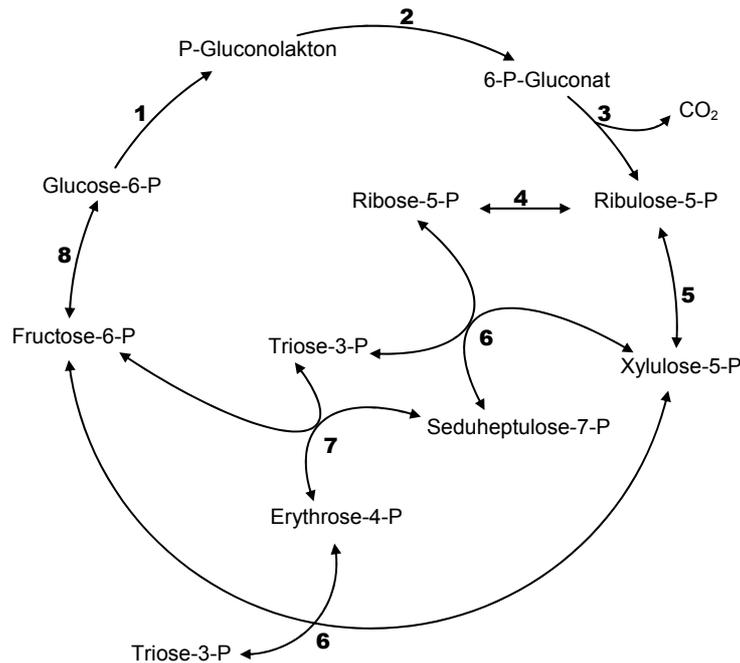
Von den Reaktionen des Pentosephosphatweges (PPP) sind diejenigen, die durch Transaldolase und Transketolase katalysiert werden, für die Bildung von Isotopologen verantwortlich. Transaldolase und Transketolase bewirken die gerichtete Übertragung von  $\text{C}_3$ - bzw.  $\text{C}_2$ -Einheiten von einer Ketose auf eine Aldose (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6:** Transfer von C<sub>3</sub>-bzw. C<sub>2</sub>-Einheiten durch Transaldolase (TA) und Transketolase (TK) im Pentosephosphatweg. S7P, Seduheptulose-7-P; GAP, Glycerinaldehyd-3-P; F6P, Fructose-6-P; E4P, Erythrose-4-P; X5P, Xylulose-5-P; R5P, Ribose-5-P.

Der PPP wird in der Regel nach dem Schema in Abb. 4.7 (nach Kruger und von Schaewen 2003) dargestellt. Dieses Schema soll nicht vermitteln, dass der PPP ein fixer Ablauf von Reaktionsfolgen sei. Vielmehr ist zu beachten, dass sämtliche Reaktionen des nichtoxidativen Teils reversibel sind, was letztendlich einen bedeutenden Einfluss auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Isotopologe hat (Follstad und Stephanopoulos 1998). Obwohl der PPP bei sämtlichen Organismen biochemisch eine zentrale Position einnimmt, ist dessen genauer Ablauf immer noch nicht gesichert. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass sowohl Transketolase als auch Transaldolase eine breitere Substratspezifität haben, als in dem gängigen Schema angenommen wird (van Winden et al. 2001). Dies führte zur Annahme, dass weitere Intermediate, wie z.B. Oktulose-8-P auftreten könnten. Zudem gibt es bisher keinen experimentellen Beweis dafür, dass die Enzyme des PPP so organisiert sind, dass eine freie Diffusion der Intermediate verhindert wird. Darauf basierend wurde ein alternativer Ablauf für den PPP vorgeschlagen (Kruger und von Schaewen 2003). Da bisher trotz vieler Lücken im Wissen über den PPP noch kein endgültiger Beweis für zusätzliche Intermediate oder eine andere Reaktionsfolge erbracht werden konnte, wird die Auswertung hier auf den Biosyntheseweg nach Abb. 4.7 beschränkt.

Der PPP wird klassischerweise so beschrieben, dass Hexosen unter Produktion von Reduktionsäquivalenten im oxidativen Teil zu Pentosen decarboxyliert werden. Der nichtoxidative Teil dient der Regeneration von Hexosen aus Pentosen durch die

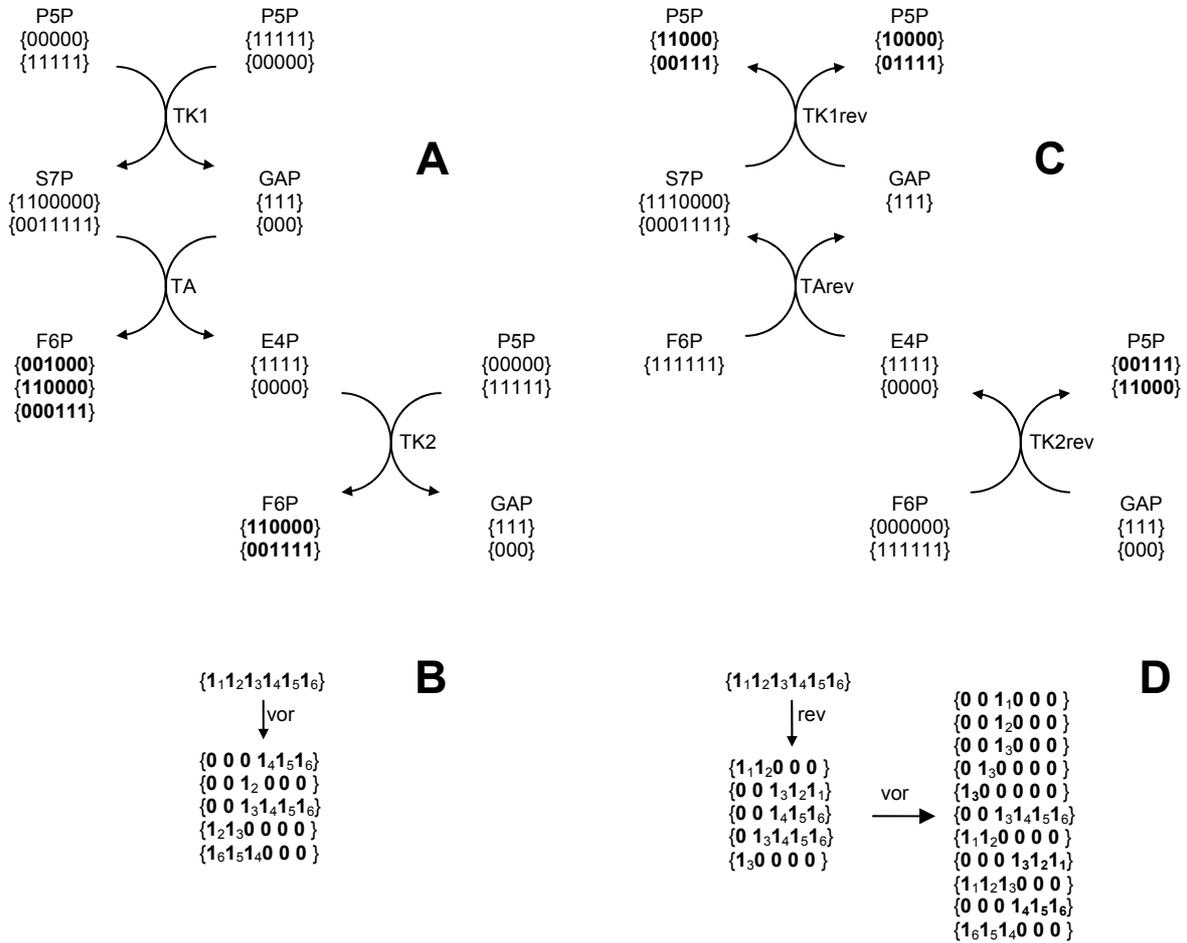


**Abb. 4.7:** Der Pentosephosphatweg nach Textbuchbiochemie. 1, Glucose-6-P-Dehydrogenase; 2, 6-Phosphoglucono-Lactonase; 3, Gluconat-6-P-Dehydrogenase; 4, Ribose-5-P-Isomerase; 5, Ribulose-5-P-Epimerase; 6, Transketolase; 7, Transaldolase; 8, Glucose-6-Phosphat-Isomerase (nach Kruger und von Schaewen 2003).

Reaktionsfolge TK1, TA und TK2. Lässt man den PPP in genannter Weise ausgehend von vollmarkiertem Hexose-P {111111} durchlaufen, so verteilt sich die Markierung und es entstehen die Isotopologe {110000}, {001000}, {000111}, {001111} und {111} (Abb. 4.8 A). Sämtliche Reaktionen des nichtoxidativen Teils des PPP können auch reversibel ablaufen. Werden vollmarkierte Hexosen und vollmarkierte Triosen in den Zyklus eingeschleust und durch reversible Transketolase- und Transaldolaseaktivitäten vollständig in Pentosen überführt, so entstehen Pentosen mit den Mustern {11000}, {10000}, {01111} und {00111} (Abb. 4.8 B). Werden aus diesen Pentosen durch den Vorwärtsweg des PPP wieder Hexosen hergestellt, so entstehen zusätzlich zu den Isotopologen {001111}, {000111}, {110000} und {001000} die einfachmarkierten Hexosen {010000} und {001000}.

Der PPP ist der Prozess, der zu der intensivsten Umverteilung der Markierung führt. Verdeutlicht wird dies in Abb. 4.8, in der im unteren Teil der Verbleib der einzelnen C-Atome beim Durchlauf des PPP verfolgt wird. Findet zum Beispiel ein Pentose-Hexose-Cycling im nichtoxidativen PPP statt (Abb. 4.8 B), so entsteht dabei das Isotopolog {001000}, dessen Markierung vom C1-, C2- oder C3-Atom der ursprünglich zugeführten vollmarkierten Glucose stammt.

Die Reaktionen des PPP bewirken nur in der oberen Hälfte des Glucosemoleküls eine Verteilung der Markierung, die untere Hälfte bleibt dabei immer intakt.



**Abb. 4.8:** Entstehung von Isotopologen durch den Pentosephosphatweg. **A** Bildung von Hexoseisotopologen aus vollmarkierten Pentosen (Reaktionsfolge von oben nach unten). **B** Verteilung der C-Atome durch den Vorwärtsweg durch den PPP („vor“). Im oxidativen PPP wird das C1-Atom decarboxyliert und im nichtoxidativen PPP werden aus den Pentosen nach der Reaktionsfolge in A Hexosen regeneriert. Die dabei entstehenden Triosen werden durch Aldolase in Hexosen umgewandelt. **C** Regeneration von Pentosen aus Hexosen im nichtoxidativen Teil des PPP (Reaktionsfolge von unten nach oben). **D** Verteilung der C-Atome durch den Hexose-Pentose-Austausch im nichtoxidativen PPP. Triosen und Hexosen werden zu Pentosen („rev“), die wiederum zu Hexosen regeneriert werden („vor“). Die dabei entstehenden Triosen werden durch Aldolase in Hexosen umgewandelt.

#### 4.1.3.2 Qualitative Auswertung der Isotopologemuster

Es wurden insgesamt etwa 50 verschiedene Spektren von Stärkeglucosen aus Maisendosperm von verschiedenen Wildtypen und Mutanten aufgenommen und daraus das Isotopologemuster bestimmt. Da der zentrale Kohlenhydratmetabolismus, der letztendlich

**Tab 4.2:** Entstehung von Isotopologen. Die Tabelle ist von links nach rechts und von oben nach unten zu lesen. Zum Beispiel entsteht die Glucose {001111} durch TK2 aus E4P {1111}, welches durch TA aus S7P {XXX1111} oder TK2rev aus {XX1111} gebildet wurde. H6P, Hexose-6-P; S7P, Seduheptulose-7-P; T3P, Triose-3-P; P5P, Pentose-5-P.

Isotopolog	Reaktion	Vorläufer	Reaktion	Vorläufer
{111111}	--	--		
{111000}	EMP TA	H6P {111111} S7P {1110000}	TArev	H6P {111XXX}
{000111}	EMP  TA	H6P {111111} T3P {111}	TK1 oder TK2 TArev	P5P {XX111} H6P {XXX111}
{110000}	TK2  TA	P5P {11XXX}  S7P {1100000}	oxPPP TK2rev TK1rev TArev TK1	H6P {X11XXX} H6P {11XXXX} S7P {11XXXXX} H6P {11XXXX} P5P {11XXX}
{000011}	EMP	H6P {110000}		
{001111}	TK2	E4P {1111}	TA TK2rev	S7P {XXX1111} H6P {XX1111}
{011000}	TCA	T3P {X11}	ALD TK1 oder TK2 TArev	H6P {11XXXX/XXXX11} P5P {XXX11} H6P {XXXX11}
{000110}	TCA	T3P {X11}	wie oben	wie oben
{100000}	TCA TA	T3P {X11} S7P {1000000}	wie oben TK1	wie oben P5P {10000}
{000001}	TCA EMP	T3P {X11} H6P {100000}	wie oben	wie oben
{010000}	TK2	P5P {01XXX}	TK1rev	7P {0001XXX}
{000010}	EMP	H6P {010000}		
{001000}	TA  TK2	S7P {001XXXX}  E4P {1000}	TK1 TArev TA	P5P {1XXXX} H6P {00XXXX} S7P {XXX1000}
{000100}	EMP	H6P {001000}		

für die Bildung der Muster verantwortlich ist, vom Prinzip her gleich ist – in jedem Korn werden die Glykolyse, der Pentosephosphatweg und der Citratzyklus durchlaufen – sind auch die Muster der Proben sehr ähnlich.

In sämtlichen Experimenten konnten 14 Isotopologe in signifikanten Mengen (> 0,01 mol %) gemessen werden. Deren hauptsächliche Entstehungsweise wird ansatzweise in Tabelle 4.1 beschrieben und bis zu zwei Reaktionsschritte zurückverfolgt. Die für die Ausbildung von Isotopologen verantwortlichen Reaktionen bzw. Reaktionsfolgen werden als TA (Transaldolase), TK1 (Transketolase1), TK2 (Transketolase2), ALD (Aldolase), EMP (Triose-Hexose-Cycling über Glykolyse/Gluconeogenese) und TCA

(Citratzyklus/Gluconeogenese) bezeichnet. Generell kann jedes Isotopolog durch EMP seines Spiegelbildes entstehen (siehe 4.1.3.1, Abb. 4.4). In der Tabelle wurde EMP aber nur dann als Syntheseweg aufgeführt, wenn es ein wesentlicher oder ausschließlicher Entstehungsweg eines Isotopologs ist.

Die Tabelle soll keine umfassende Beschreibung des Stoffwechsels liefern. Sie soll vielmehr verdeutlichen, dass die Verteilung der Markierung komplex ist und zu einem Isotopolog in der Regel unterschiedliche Wege führen. Daher ist es nicht möglich anhand einer einzelnen Isotopologenverteilung viele Aussagen über den Metabolismus des untersuchten Organismus zu treffen.

Der Metabolismus des Maiskorns wird durch den glykolytischen Abbau von Hexosen und durch den PPP dominiert, kenntlich an den hohen Anteilen der Isotopologe {111000}, {000111}, {110000}, {000011} und {001000} in allen Versuchen. Der Pentosphosphatweg liefert auch das Isotopolog {001111}. Da dieses durch Folgereaktionen weiter aufgespalten wird, kommt es aber immer nur in sehr geringen Mengen vor.

Es kann anhand des Verhältnisses von {111000} zu {000111} die Aktivität von Transaldolase abgeschätzt werden. Die Isotopomere {111000} und {000111} entstehen hauptsächlich durch EMP aus vollmarkierten Hexosen. Es können aber auch vollmarkierte Triosen aus dem PPP durch Aldolase in die beiden Isotopomere umgewandelt werden. Im PPP werden die Triosen {111} durch TK1 oder TK2 aus Pentosen mit dem Muster {XX111} gebildet. Das Isotopolog {000111}, nicht aber {111000} kann zusätzlich durch Transaldolase aus einer Triose {111} entstehen.

Die Anteile des Citratzyklus und des Direkteinbaus am Hexose-Cycling sind in allen Versuchen gering. Dies ist abzulesen an den Konzentrationen der Isotopologe {111111}, {011000} und {000110}, die ausschließlich aus dem direkten Transfer bzw. dem Citratzyklus stammen.

Die qualitative Aussagekraft eines einzelnen NMR-Spektrums ist sehr gering. Dies zeigen auch erste Veröffentlichungen, in denen die Methodenbeschreibung im Vordergrund steht und daher nur die Isotopologenverteilung von Glucose eines einzelnen Versuches bestimmt wurde (Eisenreich et al. 2004, Glawischnig et al. 2002). Hier konnte lediglich ausgesagt werden, dass das Hexose-Cycling sehr hoch ist und dass verschiedene Stoffwechselwege stattfinden. Dabei wurden einige Isotopologe den einzelnen Biosynthesewegen qualitativ zugeordnet werden.

Biologische Aussagen aus einer Isotopologenverteilung lassen sich erst dann treffen, wenn die Muster zu einer Quantifizierung von Stoffwechselflüssen genutzt werden oder wenn unterschiedliche Wildtypen, Mutanten etc. miteinander verglichen werden.

#### 4.1.3.3 Quantitative Auswertung der Isotopologemuster

Für die quantitative Auswertung der Isotopologemuster wurde der „4F-Algorithmus“ entwickelt (Ettenhuber und Eisenreich 2004). Es wurde ein Ansatz gewählt, der in der Literatur bisher noch nicht zu finden ist. Hierzu wird der zentrale Kohlenhydratmetabolismus in fünf Kreisprozesse („dtr“, „emp“, „ppp1“, „ppp2“ und „tca“) eingeteilt, die von exogen zugeführter Glucose ausgehen und bei in Stärke eingebauter Glucose enden. Den Kreisprozessen wird anhand bekannter Biosynthesewege nach Abb. 4.3 die Bildung von bestimmten Isotopologen in bestimmten Verhältnissen zugewiesen. Das Programm simuliert durch Anwendung der Regeln aus einem Pool von  $[U-^{13}C_6]$ Glucose und Glucose natürlicher Anreicherung den molaren Überschuss von 14 Glucoseisotopologen. Dadurch können die prozentualen Anteile der am Cycling beteiligten Kreisprozesse (Tab. 4.3) angegeben werden. Die Programmierung und die Auswahl eines regelbasierten Systems als Grundprinzip der Simulation erfolgte durch die Kooperationspartner am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie in Garching (TU München). Die Transformationsregeln wurden hauptsächlich am Lehrstuhl für Genetik festgelegt.

Der Prozess „dtr“ beschreibt den direkten Transfer von exogener Glucose in Stärke ohne vorherige metabolische Umwege. Die Regel ist nur für vollmarkierte Glucosen gültig.

Der Prozess „emp“ bezeichnet den Abbau von Hexose-P durch Aldolase in Triose-P, die Isomerisierung der Triose-P durch TIM und die Rekombination der Hexose-P aus Triose-P.

Die vielfältigen Reaktionen des Pentosephosphatweges werden durch die Prozesse „ppp1“ und „ppp2“ beschrieben. Die Regel „ppp1“ definiert den Vorwärtsweg nach Lehrbuchbiochemie (Stryer 1999). Sechs Moleküle Hexose-P werden im oxidativen Teil decarboxyliert und liefern sechs Moleküle Pentose-P, die durch die drei aufeinander folgenden Reaktionen TK1, TA und TK2 zu fünf Molekülen Hexose-P regeneriert werden. Dabei entstehen  $4 \times \{110000\}$ ,  $2 \times \{001111\}$ ,  $2 \times \{001000\}$ ,  $3 \times \{000111\}$  und  $1 \times \{111000\}$ . In der Regel wird analog zum Stoffwechselmodus 3 in Stryer (1999) angenommen, dass zwischenzeitlich entstandene Triosen  $\{111\}$  durch Aldolase in die Hexosen  $\{111000\}$  und  $\{000111\}$  umgebaut werden. Die Regel „ppp2“ gibt das Cycling durch den nichtoxidativen Teil des PPP wieder. Vier Moleküle Hexose-P und zwei Moleküle Triose-P werden durch

**Tab. 4.3:** Transferregeln der 4F Software. Die Regeln basieren auf den zentralen Kohlenhydratmetabolismus nach Abb. 4.3. Es wird angenommen, dass die Hexose-P, Pentose-P und Triose-P im Gleichgewicht stehen und dass durch den hohen Überschuss an unmarkierten Verbindungen im Kulturmedium markierte Moleküle nur mit unmarkierten Molekülen reagieren.

Regel	Kreisprozesse und die zugehörigen Transformationen
<p>“dtr”</p>	<p>Direkter Transfer von exogener Glucose {111111} in Stärke ohne vorheriges Cycling. Die Regel wird nur für das Isotopolog {111111} angewandt.</p> <p>Kreisprozess: G6P → Stärke</p> <p>Transformation: {XXXXXXX} → {XXXXXXX}</p>
<p>“emp“</p>	<p>Triose-Hexose-Cycling (THC) durch Glykolyse/Gluconeogenese.</p> <p>Kreisprozess: G6P → GAP + DHAP → G6P → Stärke</p> <p>Transformation: {XXXXXXX} → {XXX000} + {000XXX}</p>
<p>“ppp1”</p>	<p>Pentosephosphatweg ‚vorwärts‘.</p> <p>Kreisprozess: 6 G6P → 6 Ru5P + 6 CO<sub>2</sub> → 4 F6P + 2 GAP → 5 G6P → Stärke</p> <p>Transformation: 6{XXXXXXX} → 4{XX0000} + 2{00XXXX} + 2{00X000} + 3{000XXX} + {XXX000}</p>
<p>“ppp2”</p>	<p>Hexose-Pentose-Cycling durch den nichtoxidativen Teil des Pentosephosphatweges.</p> <p>Kreisprozess: 15 G6P → 18 Ru5P → 15 G6P → Stärke</p> <p>Transformation: 15{XXXXXXX} → 2{00XXXX} + 13{000XXX} + 3{XXX000} + 8{XX0000} + 4{X00000} + 4{0X0000} + 10{00X000}</p>
<p>“tca”</p>	<p>Transfer von Hexosen über Glykolyse zu Triose, einmaliges Durchlaufen des TCA, Gluconeogenese.</p> <p>Kreisprozess: G6P → 2 AcCoA + 2 CO<sub>2</sub> → 2 OAA → 2 PEP + 2 CO<sub>2</sub> → G6P → Stärke  G6P + 2 CO<sub>2</sub> → 2 OAA → 2 PEP + CO<sub>2</sub> → G6P → Stärke</p> <p>Transformation: 2{XXXXXXX} → {X00000} + {0XX000} + {000XX0} + {00000X}</p>

TK1rev, TArev und TK2rev zu fünf Pentose-P umgewandelt und anschließend durch einen Vorwärtsdurchlauf des nichtoxidativen PPP wieder in Hexose-P und Triose-P zurückgeführt. Dabei entstehen aus 15 vollmarkierten Hexosen 2 x {001111}, 13 x {000111}, 3 x {111000}, 8 x {110000}, 4 x {100000}, 4 x {010000} und 10 x {001000}. Die Regel kombiniert Teile der Stoffwechselmodi 1 und 3 von Stryer (1999) bzw. 5 und 6 von Schuster et al. (2000) und wird in Kruger et al. (2003) als Austausch-Fluss durch den nichtoxidativen PPP bezeichnet. Sie setzt ein starres Verhältnis von in den nichtoxidativen PPP eintretenden Hexose-P zu eintretenden Triose-P von 2 zu 1 voraus.

Der Prozess „tca“ umfasst den glykolytischen Abbau von Hexosen in PEP, das über Acetyl-CoA oder über anaplerotische Reaktionen über OAA bzw. Malat in den TCA eintritt. Der TCA wird einmal vorwärts durchlaufen, das entstandene Oxalacetat abgeführt und über Gluconeogenese in Hexose-P umgewandelt. Dabei entstehen aus vollmarkierten Triosen {111} die Hexosen {100000}, {000001}, {011000} und {000110} (Abb. 4.5).

Die Regeln werden nach bestimmten Prioritäten ausgeführt. Die Priorität ist umso höher, je mehr Isotopologe gebildet werden und Prozesse, die unsymmetrische Isotopologe liefern, haben eine höhere Priorität als solche, die symmetrische liefern. Weitere Informationen zum Programm sind Ettenhuber et al. (2005, Manuskript eingereicht) zu entnehmen.

Bei den Regeln wird die positionsspezifische Verteilung der C-Atome nicht berücksichtigt. Werden die Regeln mit vollmarkierten Hexosen ausgeführt, dann wirkt sich diese Vereinfachung nicht auf das Ergebnis aus. Unterschiede können aber auftreten, wenn die Regeln auf nicht vollmarkierte Hexosen angewandt werden. Eine Anwendung von „ppp1“ auf die Hexosen 6 x {111000} würde beispielsweise gemäß der Transformation in Tab. 4.3 die Isotopologe 4 x {001000}, 4 x {110000} und 1 x {111000} liefern. Unter Berücksichtigung des tatsächlichen Verbleibs der C-Atome ergäben sich aber aus 6 x {111000} die Isotopologe 4 x {001000} und 4 x {110000} (Abb. 4.8 B). Ein extremeres Beispiel ist die Anwendung der Regel „ppp1“ auf die Hexosen 6 x {100000}. Nach der Transferregel in 4.3 entstehen daraus 5 x {100000}; unter Berücksichtigung der tatsächlichen positionellen Verteilung der C-Atome werden aber alle markierten C1-Atome als CO<sub>2</sub> abgespalten und es entstehen 5 x {000000} (Abb. 4.8 B).

Das Ignorieren der positionsspezifischen Verteilung der C-Atome erlaubt es auch, den TCA als eine einzige Regel zu formulieren. Wie beschrieben (siehe 4.1.3.1) führt aber ein Einschleusen von PEP in den TCA über den klassischen Weg oder die anaplerotischen Wege eigentlich zu einer unterschiedlichen Verteilung der C-Atome.

Wie die Abbildungen 4.4, 4.5 und insbesondere 3.8 zeigen, müssten eigentlich bei jeder Transferregel die Positionen der C-Atome im Molekül berücksichtigt werden. Wie stark sich diese Vereinfachung auf das Endergebnis der Simulation auswirkt, kann hier nicht abgeschätzt werden.

## 4.2 *Steady State* Annahme

Die Isotopologienmuster können nur dann für eine metabolischen Flussanalyse genutzt werden, wenn sich das System in einem isotopologisch und metabolisch stabilen Zustand, dem so genannten *steady state*, befindet. Dies ist dann gegeben, wenn die  $^{13}\text{C}$  Verteilungen und Konzentrationen von Intermediaten konstant sind (Wiechert 2001). Dieser Idealzustand ist in Pflanzenzellkulturen oder Batchkulturen von Mikroorganismen leicht zu erreichen, bei sich entwickelndem Pflanzengewebe aber kaum möglich (Kruger et al. 2003; siehe 2.5).

Die Turnoverrate von Polymeren wie Speicherstärke ist generell sehr gering. Die Glucose aus total hydrolysierten Stärke repräsentiert daher einen Integralwert über die gesamte Inkubationsperiode, also inklusive der Zeit, die für das Einstellen des isotopischen *steady state* nötig war. Die daraus resultierende Verfälschung des Isotopologienmusters kann durch lange Inkubationsperioden minimiert werden (Kruger et al. 2003).

In dem hier gewählten Versuchsansatz ist die Zeit, die das System braucht, um ein isotopisches *steady state* zu erlangen, im Vergleich zur gesamten Markierungsdauer kurz. Getestet wurde dies an *sul* Endosperm. Die Stärke wurde zunächst von Phytoglykogen und anderen löslichen Zuckern befreit und dann nach dem Protokoll von Keeling et al. (1988) partiell hydrolysiert. Dadurch werden die Stärkekörner langsam von außen nach innen verdaut und man gewinnt neu synthetisierte Stärke. Das Isotopologienmuster dieser „jungen Stärke“ unterscheidet sich nicht wesentlich von dem Muster der gesamt hydrolysierten Stärke (Abb. 4.25). Wäre die Zeit zur Einstellung des *steady states* im Vergleich zur gesamten Markierungsdauer lang, so würden sich die Muster der Glucose aus dem partiellen und dem totalen Verdau unterscheiden.

Lange Markierungszeiten bringen den Nachteil mit sich, dass sich das Gewebe in dieser Zeit weiterentwickelt, sich die Flüsse dabei ändern und daher kein metabolisch stabiler Zustand mehr herrscht. Trotzdem kann man von einem quasi *steady state* ausgehen, wenn die Turnoverraten der Intermediate (hier Hexosen) hoch genug sind, um mit den metabolischen Änderungen Schritt zu halten (Roscher et al. 2000).

Die Zeit, die ein System braucht, um isotopisches *steady state* zu erlangen wird in den meisten Markierungsexperimenten mit Pflanzen – wenn überhaupt - durch Kontrolle des Markierungsstatus von Intermediaten bestimmt. Als geeignet hat sich zum Beispiel das Verfolgen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung und das Bestimmen der Markierung in löslichen Zuckern, Stärke und Aminosäuren erwiesen. In keimenden *Lactuca sativa* Embryonen ist die Markierung von  $^{14}\text{CO}_2$  je nach der verwendeten markierten Vorstufe bereits nach wenigen Minuten bis maximal 30 Minuten konstant (Salon et al. 1998). In Maiswurzelspitzen ist die  $^{14}\text{CO}_2$  Produktion nach etwa 10 h konstant, in Saccharose und Glucose ist bereits nach 2 h ein stabiler Zustand erreicht (Dieuaide-Noubhani 1995). Ein schnelles Einstellen des *steady state* in Maiswurzelspitzen konnte auch in Aminosäuren nachgewiesen werden (Edwards et al. 1998). Von dem allgemeinen Bild, dass *steady state* in Bakterien in wenigen Minuten, in tierischen und pflanzlichen Geweben für gewöhnlich in wenigen Stunden erreicht wird, weichen bisher nur die Ergebnisse aus Zellkulturen von Tomaten ab. Hier benötigen lösliche Zucker und Aminosäuren 3 bzw. 4 Tage, um einen stabilen Isotopenzustand zu erreichen (Rontein et al. 2002).

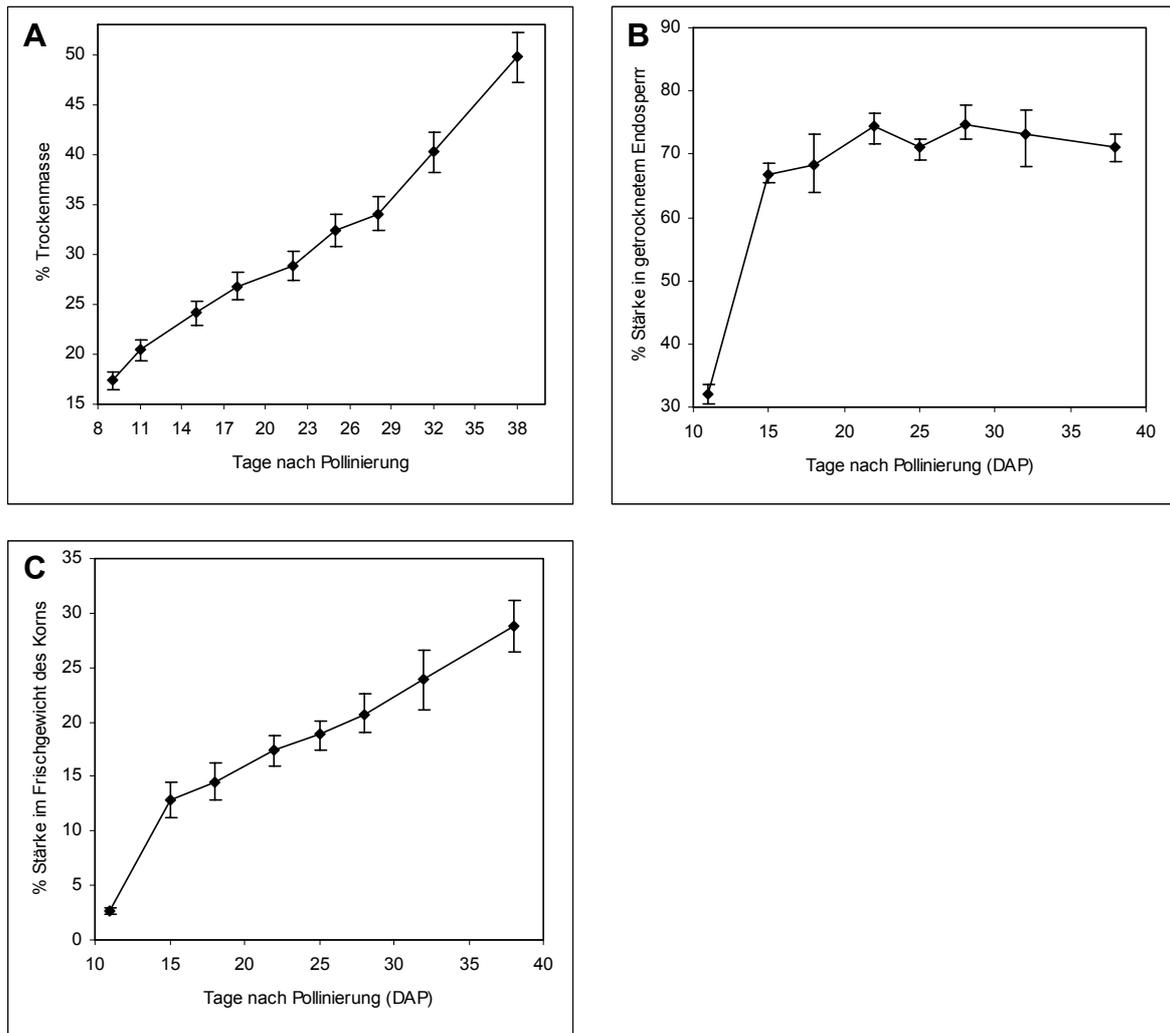
Die Daten aus der Literatur und die eigenen Ergebnisse an *su1* Körnern legen nahe, dass sich auch im Maisendosperm das isotopologische Gleichgewicht in den löslichen Hexosen schnell einstellt und diese zu jedem Zeitpunkt der Markierung die aktuellen metabolen Flüsse repräsentieren. Damit lässt sich die Annahme eines quasi *steady states* rechtfertigen.

### **4.3 Entwicklung von Maiskörnern in Sterilkultur**

#### **4.3.1 Akkumulierung von Speicherstoffen**

Etwa 5-10 Tage nach Pollinierung beginnen Maiskörner Stärke, Lipide und Proteine zu synthetisieren. Es folgt eine mehrwöchige, aktive Phase der Produktion von Speicherstoffen. In dieser Zeit steigt deren Anteil und somit auch die Trockenmasse linear an (Ingle et al. 1965). Im reifen Korn macht Stärke mit 70-75 % der Trockenmasse den Hauptbestandteil der Speicherstoffe aus. Lipide und Proteine kommen zu 4-5 % und 8-10 % vor (Boyer und Hannah 2001).

Im Vergleich zur Entwicklung an der Pflanze akkumulieren Körner in Kultur Trockenmasse und Stärke schneller, dafür aber für einen um 10-15 Tage kürzeren Zeitraum. Für die Dauer der Stärkeakkumulation ist dabei in erster Linie die Temperatur verantwortlich (Cully et al 1984, Jones et al. 1981). Im Gegensatz zu Cully et al. (1984) und Jones et al. (1981), die ein



**Abb. 4.9:** Entwicklung von Maiskörnern (W22) in Kultur. Änderung der Trockenmasse (A), des Stärkegehalts im getrockneten Endosperm (B) und des Stärkegehalts im Frischgewicht des Korns (C) mit dem Kornalter.

Ansteigen der Trockenmasse von W64A bzw. A19 x W64A Körnern in Kultur bis lediglich 30 bzw. 35 DAP beobachteten, akkumulierten die Körner in den eigenen Versuchen Trockenmasse bis mindestens 38 DAP (Abb. 4.9, A).

Entsprechend der kürzeren Wachstumsphase reichern Körner in Kultur um ca. 10% weniger Stärke an und haben ein um 25 % geringeres Korngewicht im Vergleich zu *in vivo* Körnern (Jones et al. 1981). In den eigenen Kulturen beträgt der Stärkeanteil in der Trockenmasse nach 18 DAP 68 % und erreicht nach bereits 22 DAP mit 74 % sein Maximum. Umgerechnet auf den Stärkegehalt pro Frischgewicht bedeutet dies, dass der Anteil an Stärke zwischen 11 DAP und 38 DAP linear ansteigt (Abb. 4.9 C). Eine ähnliche Wachstumskurve findet sich in Jones et al. (1981).

#### 4.3.2 Maiskörner entwickeln sich auf Saccharose und Glucose ähnlich

Das Originalprotokoll von Gengenbach (1977) sieht für die Sterilkultur von Maiskörnern als C-Quelle 150 g/l Saccharose vor. Maiskörner sind aber durchaus in der Lage, auf anderen C-Quellen wie Glucose oder Fructose (Glawischnig et al. 2002, Cobb und Hannah 1986, Cheng und Chourey 1999) zu wachsen. Körner können sich auf Glucose bis zur Reife entwickeln, akkumulieren allerdings um ca. 15-20 % weniger Stärke als auf Saccharose (Cobb und Hannah 1986).

Sämtliche Mutanten und ein Großteil der Wildtypen wurden sowohl auf Glucose als auch auf Saccharose kultiviert. In der Entwicklung der Körner sind dabei kaum Unterschiede zu erkennen. Auf Saccharose entwickeln sich die Körner etwas schneller als auf Glucose. Es wurde nach der Ernte stichprobenartig das Korngewicht bestimmt. Analog zu Cobb und Hannah (1986) ist das Korngewicht von Glucosekulturen im Vergleich zu Saccharosekulturen um ca. 5-10 % reduziert. Lediglich bei *su1* Körnern führt ein Wachsen auf Saccharose zur vereinzelt Ausbildung von abnormal großen Körnern, die mit 450 mg ein um etwa 80 % erhöhtes Korngewicht haben.



**Abb. 4.10:** Aufgeplatzte *ae* Körner (22 DAP) nach 7 Tagen in Sterilkultur. Die Körner wurden auf 80 g/l Saccharose angezogen.

Die Körner hatten in Kultur sowohl auf Saccharose als auch auf Glucose einen für den jeweiligen Wildtypen bzw. die Mutation typischen Körnerphänotyp. Ein ungewöhnliches Verhalten in Sterilkultur ist lediglich bei *ae* und *bt2* Körnern zu beobachten. Nach ca. 18 DAP beginnen einige Körner aus ungeklärter Ursache zu platzen. Dieses Phänomen ist bei *ae*

Körnern stärker (Abb. 4.10) als bei *bt2* Körnern ausgeprägt. Vor allem Körner, die auf Saccharose gezogen wurden, neigten in den Versuchen dazu zum Bersten. Für sämtliche weitere Untersuchungen wurden von allen Markierungen nur die intakten Körner verwendet. Die Konzentration an Glucose und Saccharose im getrockneten Endosperm wurde durch enzymatische Analyse des wässrigen Extrakts bestimmt. Viele Mutanten mit stark verringertem Stärkegehalt besitzen laut Literatur gleichzeitig einen erhöhten Gehalt an löslichen Zuckern. Dies wurde für die Mutanten *sh1*, *bt1*, *bt2*, *sh2* und *sul* dokumentiert (Tab. 4.4) und wäre auch von *sh1 sus1* zu erwarten. Von den hier *in vitro* gezogenen Maiskörnern akkumulierten nur *bt2*, *sh2* und *sul* mehr Glucose und Saccharose als der Wildtyp; *sh1*, *sh1 sus1* und *bt1* zeigten im Vergleich zum Wildtyp unveränderte Gehalte. Im Gegensatz dazu konnten Cobb und Hannah (1983) auch in *sh1* Körnern, die *in vitro* gezogenen wurden, einen erhöhten Gehalt an Zuckern messen.

**Tab. 4.4:** Konzentrationen von Glucose und Saccharose im getrockneten Endosperm bei 22 DAP. In Klammern sind die Werte in % vom WT angegeben. Die Zuckergehalte wurden aus einem wässrigen Extrakt mit einem Enzymtest von Boehringer Ingelheim bestimmt. Vergleichend sind Werte aus der Literatur in % vom WT angegeben.

	Markierung mit Glucose		Markierung mit Saccharose		Werte aus der Literatur	
	% Glucose (% von WT)	% Saccharose (% von WT)	% Glucose (% von WT)	% Saccharose (% von WT)	% Glucose von WT	% Saccharose von WT
W22 <i>mn1</i> <i>sh sus1</i>	2,1 (--) 2,2 (105) 3,3 (157)	5,2 (--) 7,1 (137) 13,5 (260)	1,7 (--) 2,0 (118) 3,2 (188)	6,0 (--) 7,2 (120) 12,8 (213)	-- 58 <sup>d</sup> k. A.	-- 17 <sup>d</sup> k. A.
W64A <i>sh1</i> <i>bt1</i> <i>bt2</i> <i>ae</i> <i>wx</i> <i>sul</i>	0,7 (--) 0,8 (114) 0,7 (100) 1,9 (271) 0,7 (100) 0,5 (71) 1,5 (214)	5,8 (--) 8,6 (148) 7,7 (133) 25,2 (434) 4,7 (81) 4,0 (69) 5,8 (100)	0,8 (--) 1,0 (125) 0,7 (88) 1,6 (200) 1,9 (238) 0,4 (50) 1,4 (175)	5,4 (--) 8,2 (152) 6,7 (124) 27,8 (515) 4,4 (81) 3,2 (59) 10,4 (193)	-- 166 <sup>a</sup> , 200 <sup>b</sup> 230 <sup>b</sup> k.A. 89 <sup>c</sup> 67 <sup>c</sup> 302 <sup>e</sup>	-- 320 <sup>a</sup> , 260 <sup>b</sup> 530 <sup>b</sup> k.A. 167 <sup>c</sup> 103 <sup>c</sup> 333 <sup>e</sup>
Fa56 <i>sh2</i> <i>Sh2-Rev6</i>	1,8 (--) 2,0 (111) 0,7 (39)	2,7 (--) 8,8 (326) 1,7 (63)	-- 3,3 (--) 0,9 (--)	-- 9,6 (--) 0,6 (--)	-- 190 <sup>a</sup> , 250 <sup>b</sup> k. A.	-- 350 <sup>a</sup> , 450 <sup>b</sup> k. A.

<sup>a</sup> aus Cobb und Hannah (1983); 20 DAP, Endosperm

<sup>b</sup> aus Tobias et al. (1992), 21 DAP, Endosperm

<sup>c</sup> aus Holder et al. (1974), 21 DAP, Korn

<sup>d</sup> aus Shannon et al. (1993), Endosperm

<sup>e</sup> aus Doehlert et al. (1993), 20 DAP, Endosperm

Die Konzentrationen an Saccharose und Glucose im getrockneten Endosperm sind in den meisten Linien unabhängig von der Art der C-Quelle im Kulturmedium (Tab. 4.4). Körner, die auf Saccharose wachsen, reichern in der Regel genauso viel Saccharose und Glucose an wie Körner, die auf Glucose wachsen, und umgekehrt. Dies trifft auf Mutanten genauso zu wie auf drei verschiedene Wildtypen. Selbst in *mn1*, *sh1* und *sh1 sus1* in denen die Umwandlungen von Saccharose in Glucose durch die Mutationen betroffen sind, lassen sich keine Unterschiede erkennen. Abweichungen finden sich lediglich in *ae*, *su1*, *sh2* und *Sh2-Rev6* Endosperm. Dabei ist in *ae* der Glucosegehalt in der Suc-Markierung ca. 2,5 fach so hoch wie in der Glc-Markierung und in *su1* Endosperm ist der hohe Anteil an Saccharose in der Suc-Markierung im Vergleich zur Glc-Markierung auffällig.

Die ähnlichen Phänotypen und die meist ähnlichen Anteile an löslichen Zuckern lassen vermuten, dass zwischen einer Kultivierung auf Glucose und Saccharose generell kein Unterschied besteht. Bestätigt wird dies durch die durchgängig sehr ähnlichen Isotopologemuster der Stärkeglucosen aus den Glc- und Suc-Markierungen (Abb. 4.18-4.26).

Die Körner der Mutanten und Wildtypen wurden jeweils zwischen 15 und 22 DAP einmal mit Glucose und einmal mit Saccharose markiert. Von sämtlichen Mutanten und Wildtypen wurde die Stärke aus dem getrockneten Endosperm isoliert, vollständig enzymatisch hydrolysiert und die entstandene Glucose durch Affinitätschromatographie und präparative HPLC aufgereinigt. Von den Glucosen wurden  $^{13}\text{C}$ - NMR Spektren aufgenommen und die Konzentrationen von 14 Glucoseisotopologen berechnet. Die Gesamtanreicherungen an  $^{13}\text{C}$  wurden durch IRMS bestimmt und betragen in den Versuchen zwischen 1,55 und 2,81 % (Tab. 4.6). Die Anteile (mol %, entspricht mol pro 100 mol) der einzelnen Isotopologe hängen von der Gesamtanreicherung an  $^{13}\text{C}$  des jeweiligen Versuchs ab. Ist die Gesamtanreicherung niedrig, so ist eine große Anzahl von Molekülen mit natürlicher Anreicherung vorhanden und die prozentualen Anteile der Isotopologe fallen gering aus. Umgekehrtes gilt für eine hohe Gesamtanreicherung. Die Absolutwerte von Isotopologen aus Spektren, die auf die tatsächliche, durch IRMS bestimmte, Gesamtanreicherung berechnet wurden sind daher nicht entscheidend. Vielmehr sind deren relativen Anteile zueinander in einem Isotopologensatz wichtig. Verschiedene Spektren sind nur dann vergleichbar, wenn sie einheitlich normiert werden. Es wurden daher für sämtliche Abbildungen die NMR-Spektren auf eine einheitliche Gesamtanreicherung von 2,50 % normiert. Somit sind auch die Diagramme untereinander vergleichbar.

Die RMSD-Werte wurden ebenso für alle Versuche auf Basis einer Gesamtanreicherung von 2,50 % berechnet. Ein statistischer Vergleich der Spektren aus den Glc- und Suc-Markierungen (Tab. 4.5) ergibt für sämtliche Wildtypen und Mutanten eine niedrige RMSD. Einzige Ausnahmen stellen Fa56 und *Sh2-Rev6* mit RMSD-Werten von 21,7 und 21,2 dar. Dies wird gesondert in 4.7.2. behandelt.

**Tab. 4.5:** Statistischer Vergleich der Isotopologemuster zwischen Glucose- und Saccharosemarkierungen. Die Bezeichnungen f und g geben die Anzuchtbedingungen wieder und sind in Tab. 3.11. genauer definiert. f, Feld; g, Gewächshaus.

	RMSD [ $\times 10^{-2}$ ] [U- $^{13}\text{C}_6$ ]Glucose : [U- $^{13}\text{C}_{12}$ ]Saccharose
Mo17	2,1
B73	2,1
B73/Mo17	2,0
W64A	1,8
<i>sh1</i>	1,6
<i>bt1</i>	1,8
<i>bt2</i>	3,2
<i>ae</i>	3,4
<i>wx</i>	2,3
<i>sul</i> -Stärke	3,0
<i>sul</i> -Phytoglykogen	1,7
W22	1,4
<i>mn1</i>	1,4
<i>sh1 sus1</i>	2,7
Fa56-f	21,7
<i>Sh2-Rev6</i> -f	21,2
<i>sh2-g1</i>	1,8

Die Glc- und Suc-Markierungen unterscheiden sich auch nicht wesentlich in den Gesamtanreicherungen der Stärkeglucosen (Tab. 4.6). Für die meisten Linien wurden durch IRMS in den beiden Versuchen sehr ähnliche Anreicherungen ermittelt, die lediglich um maximal 0,10 %  $^{13}\text{C}$  voneinander abweichen. Ausnahmen sind in *sul*-Stärke und *sul*-Phytoglykogen sowie in den Linien im Hintergrund Fa56 zu finden. In diesen Fällen sind die Gesamtanreicherungen der Glc-Markierungen um 0,16-0,42 %  $^{13}\text{C}$  höher als die der Suc-Markierungen. Dies könnte eventuell dadurch bedingt sein, dass sich besonders in diesen Linien die Körner auf Saccharose schneller entwickeln als auf Glucose.

IRMS bietet eine Möglichkeit, die Gesamtanreicherung der Proben mit einer hohen Genauigkeit und einer sehr guten Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Die

Gesamtanreicherungen weichen in Dreifachbestimmungen um höchstens 0,02 %  $^{13}\text{C}$  voneinander ab (Tab. 4.6).

**Tab. 4.6:**  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse ( $\delta$ -Werte) und Gesamtanreicherungen an  $^{13}\text{C}$  der Proben; bestimmt durch IRMS. Die Umrechnung des  $\delta$ -Wertes in die Gesamtanreicherung ist im Abschnitt Material und Methoden (siehe 3.10) angegeben. Die Werte sind in der Regel Mittelwerte aus drei Messungen. In Ausnahmefällen wurde die Messung nur einmal (<sup>1</sup>) oder zweimal (<sup>2</sup>) durchgeführt. Zur IRMS-Messung wurde entweder hydrolysierte, gereinigte Stärkeglucose, die nach der NMR-Messung einrotiert wurde oder mit Hexan und Ethanol/Wasser extrahiertes, getrocknetes Endosperm (gekennzeichnet mit <sup>a</sup>) verwendet. Die Bezeichnungen f, g1 und g2 geben die Anzuchtbedingungen wieder und sind in Tab. 3.11 genauer definiert. g, Gewächshaus; f, Feld.

	Markierung mit Glucose		Markierung mit Saccharose	
	$\delta$ -Wert	% $^{13}\text{C}$	$\delta$ -Wert	% $^{13}\text{C}$
<b>Linien in W64A</b>				
Wildtyp	894,6 <sup>1</sup>	2,13 <sup>1</sup>	910,2 ± 0,9 <sup>2</sup>	2,15 <sup>2</sup>
<i>ae</i>	829,8 ± 3,87	2,06 ± 0,01	881,5 ± 1,75	2,11 ± 0,01
<i>wx</i>	945,4 ± 4,23 <sup>2</sup>	2,19 ± 0,01 <sup>2</sup>	970,8 ± 2,23	2,21 ± 0,01
<i>sul</i> -Stärke	952,3 <sup>1</sup>	2,19 <sup>1</sup>	779,8 <sup>1</sup>	2,00 <sup>1</sup>
<i>sul</i> -Phytoglykogen	753,3 <sup>1</sup>	1,97 <sup>1</sup>	564,0 <sup>1</sup>	1,76 <sup>1</sup>
<i>sh1</i>	722,6 ± 5,30 <sup>2</sup>	1,94 ± 0,01 <sup>2</sup>	812,1 ± 0,85	2,04 ± 0,00
<i>bt1</i>	822,8 ± 5,30	2,05 ± 0,01	819,4 ± 0,36	2,04 ± 0,00
<i>bt2</i>	375,0 ± 2,04	1,55 ± 0,01	489,6 ± 6,2	1,67 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Linien in W22</b>				
Wildtyp			1353,9 <sup>1</sup>	2,65 <sup>1</sup>
K1	1076,0 ± 7,60	2,33 ± 0,01	--	--
K2	1500,0 <sup>1</sup>	2,81 <sup>1</sup>	--	--
K3	1435,8 ± 3,39 <sup>2</sup>	2,74 ± 0,01 <sup>2</sup>	--	--
<i>mn1</i>	702,4 ± 6,76	1,91 ± 0,01 <sup>a</sup>	726,6 ± 16,61	1,94 ± 0,02 <sup>a</sup>
<i>sh1 sus1</i>	1210,9 ± 5,42	2,48 ± 0,01 <sup>a</sup>	1123,3 ± 2,64	2,39 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Linien in Fa56</b>				
Wildtyp-f	768,0 ± 1,12	1,99 ± 0,00	623,0 ± 0,93	1,82 ± 0,01
Wildtyp-g2	715,2 ± 0,90	1,93 ± 0,00	--	--
<i>sh2</i> -g1	1067,7 ± 12,4	2,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	919,6 ± 4,52	2,16 ± 0,01 <sup>a</sup>
<i>sh2</i> -g2	621,5 ± 10,94 <sup>2</sup>	1,82 ± 0,01 <sup>2</sup>	--	--
<i>Sh2-Rev6</i> -f	861,8 ± 2,98	2,09 ± 0,01	483,9 ± 0,55	1,67 ± 0,00
<i>Sh2-Rev6</i> -g1	--	--	1126,6 ± 15,30	2,39 ± 0,02 <sup>a</sup>
<i>Sh2-Rev6</i> -g2	913,00 ± 2,66	2,15 ± 0,00	--	--

<sup>1</sup> Einfachbestimmung

<sup>2</sup> Zweifachbestimmung

<sup>a</sup> mit Hexan und Ethanol/Wasser extrahiertes getrocknetes Endosperm wurde zur Messung verwendet

Neben der Art der Kohlenstoffquelle ist auch deren Menge entscheidend. Cobb et al. (1988) testeten den Effekt von unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen. Ohne negative Effekte konnte diese von 150 g/l auf bis zu 80 g/l reduziert werden. Erst unter 80 g/l Saccharose im Medium zeigten sich erhebliche Rückstände in der Entwicklung, eine reduzierte Keimungsrate, ein reduzierter Stärkegehalt und ein vermindertes Korngewicht.

Auf Basis dieser Daten und aufgrund der hohen Kosten von markierten Verbindungen wurden für alle Kulturen einheitlich 80 g/l Saccharose bzw. Glucose verwendet.

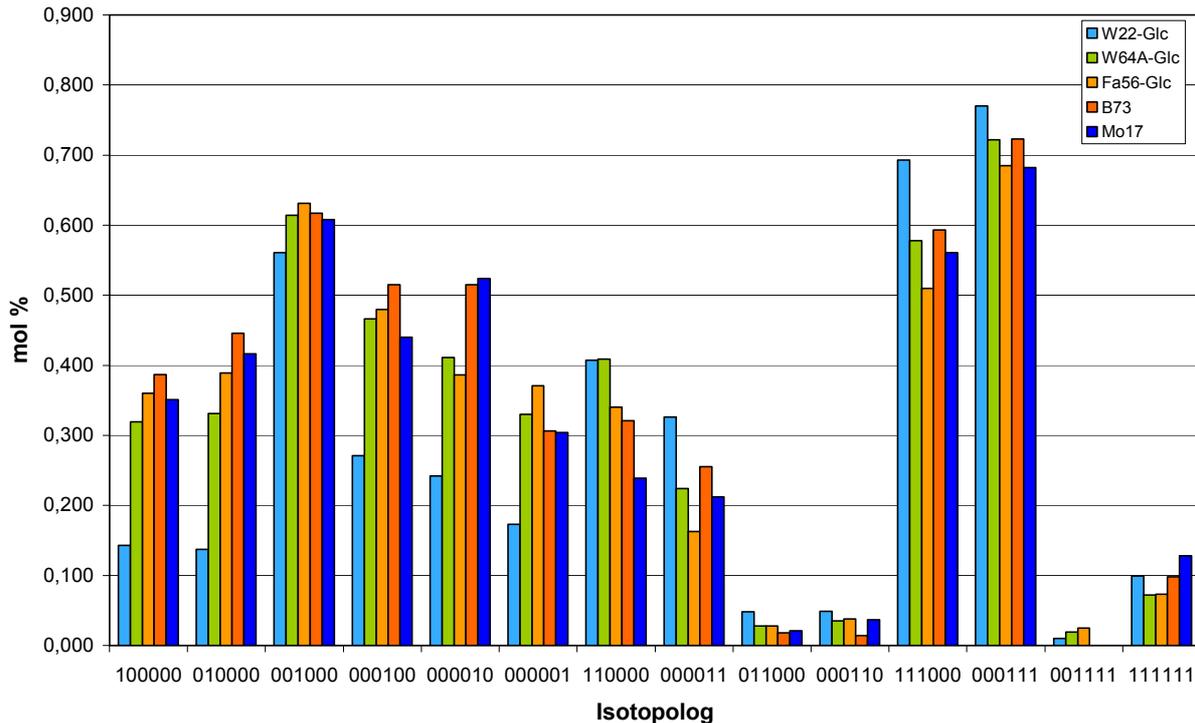
#### 4.4 Einfluss des genetischen Hintergrunds auf das Isotopologemuster

Der Vergleich der Isotopologemuster der Inzuchtlinien W22, W64A, Fa56, B73 und Mo17 (Abb. 4.11) zeigt, dass sich der Genotyp auf den zentralen Kohlenhydratmetabolismus auswirkt. Bei dem Vergleich ist zu beachten, dass nicht alle Linien zum selben Zeitpunkt markiert wurden. Die Körner der Linie W22, W64A und Fa56 wurden von 15-22 DAP und die Körner der Linien B73 und Mo17 von 18-25 DAP markiert. Ein direkter Vergleich von allen Linien ist also nicht möglich, eine Tendenz kann aber durchaus gezeigt werden. Die Muster der Linien W64A, Fa56, B73 und Mo17 sind einander relativ ähnlich, wenn gleich ihre RMSD-Werte mit 3,8 – 6,4 (Tab. 4.7) etwas höher liegen als zum Beispiel der Vergleich einiger Mutanten untereinander oder mit den zugehörigen Wildtypen. Ein deutlich abweichendes Muster ist in W22 Körnern zu erkennen. Deren RMSD-Werte zu den anderen Wildtypen liegen zwischen 11,7 und 16,1.

Ein Einfluss des genetischen Hintergrunds auf das Muster muss also berücksichtigt werden. Dies betrifft vor allem die Auswertung von Mutanten, die in insgesamt drei verschiedenen Hintergründen vorliegen.

**Tab. 4.7:** Statistischer Vergleich (RMSD x 10<sup>-2</sup>) der Isotopologemuster von Stärkeglucose verschiedener Wildtypen nach Markierung mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glc.

	<b>W22</b>	<b>W64A</b>	<b>Fa56</b>	<b>B73</b>	<b>Mo17</b>
<b>W22</b>	-	11,7	16,1	15,5	15,0
<b>W64A</b>	11,7	-	5,3	5,5	6,4
<b>Fa56</b>	16,1	5,3	-	5,1	5,3
<b>B73</b>	15,5	5,5	5,1	-	3,8
<b>Mo17</b>	15,0	6,4	5,3	3,8	-



**Abb. 4.11:** Vergleich des Isotopologenmusters von Glucose aus hydrolysierte Stärke unterschiedlicher Wildtypen. Körner der Linien W22, W64A und Fa56 wurden von 15-22 DAP, Körner der Linie B73 und Mo17 von 18-25 DAP mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben.

#### 4.5 Einfluss von Anzuchtbedingungen auf das Muster

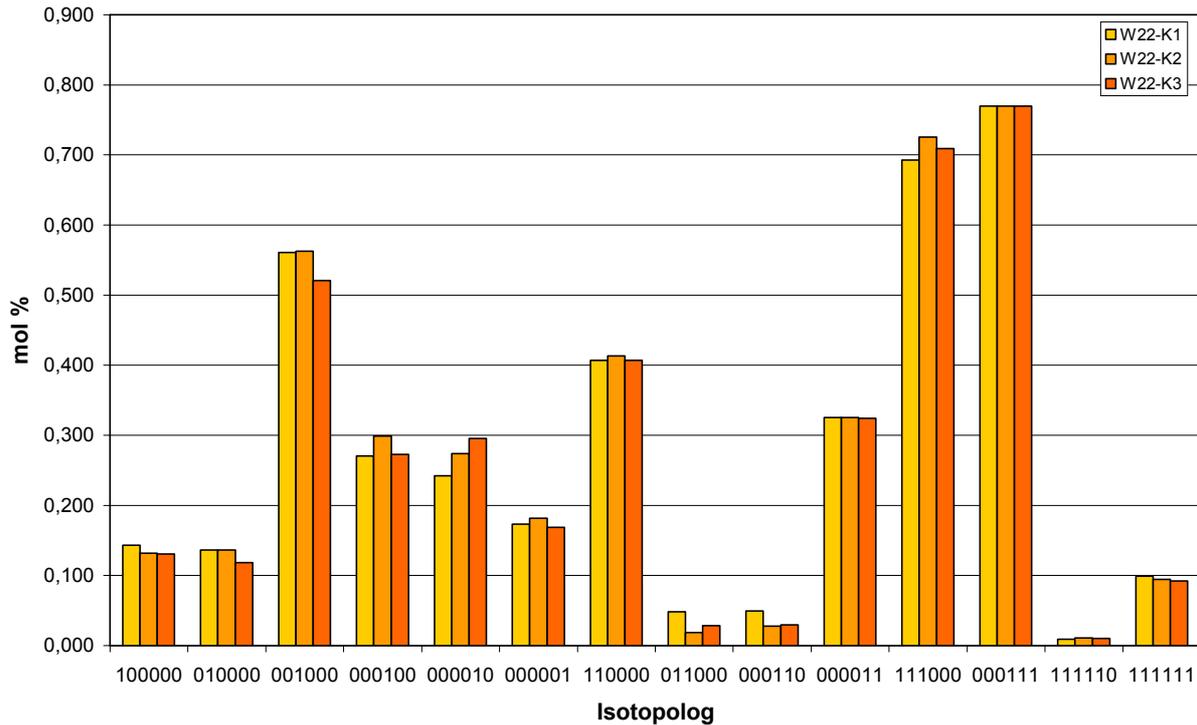
Die Entwicklung einer Pflanze und demzufolge auch die Entwicklung eines Maiskorns sind im Wesentlichen von den Wachstumsbedingungen abhängig. Faktoren wie die Lichtintensität, die Lichtdauer, die Temperatur, die Nährstoffversorgung und die Niederschlagsmenge nehmen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung (Thompson 1975). Dies hat zur Folge, dass Pflanzen mit gleichem Genotyp, die unter verschiedenen Umweltbedingungen aufgewachsen sind, sich in Ihrem Äußeren erheblich unterscheiden können. Denkbar wäre, dass sich mit einer Änderung des äußerlich sichtbaren Phänotyps auch der Kohlenstoffmetabolismus eines Maiskorns ändert. Hierzu wurden Pflanzen der gleichen Linie unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen angezogen, markiert und die Isotopologenverteilung der hydrolysierten Stärken verglichen.

Selbst wenn Pflanzen zur gleichen Zeit in einem Gewächshaus oder einem Feld angezogen werden, können keine homogenen Bedingungen für alle Pflanzen angenommen werden. Je nach Standort können diese leicht variieren. Im Gewächshaus sind zum Beispiel Pflanzen, die sich am Fenster oder direkt unter einer Lichtquelle befinden, größer und kräftiger als Pflanzen

an einem schattigeren Standort. Drei verschiedene W22 Pflanzen wurden zur gleichen Zeit (Oktober – Dezember 2003) im Gewächshaus angezogen und in getrennten Experimenten in Kultur genommen und mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose markiert. Die Isotopologenmuster der Stärkeglucosen aus den drei Pflanzen unterscheiden sich kaum voneinander (Abb. 4.12, Tab. 4.8).

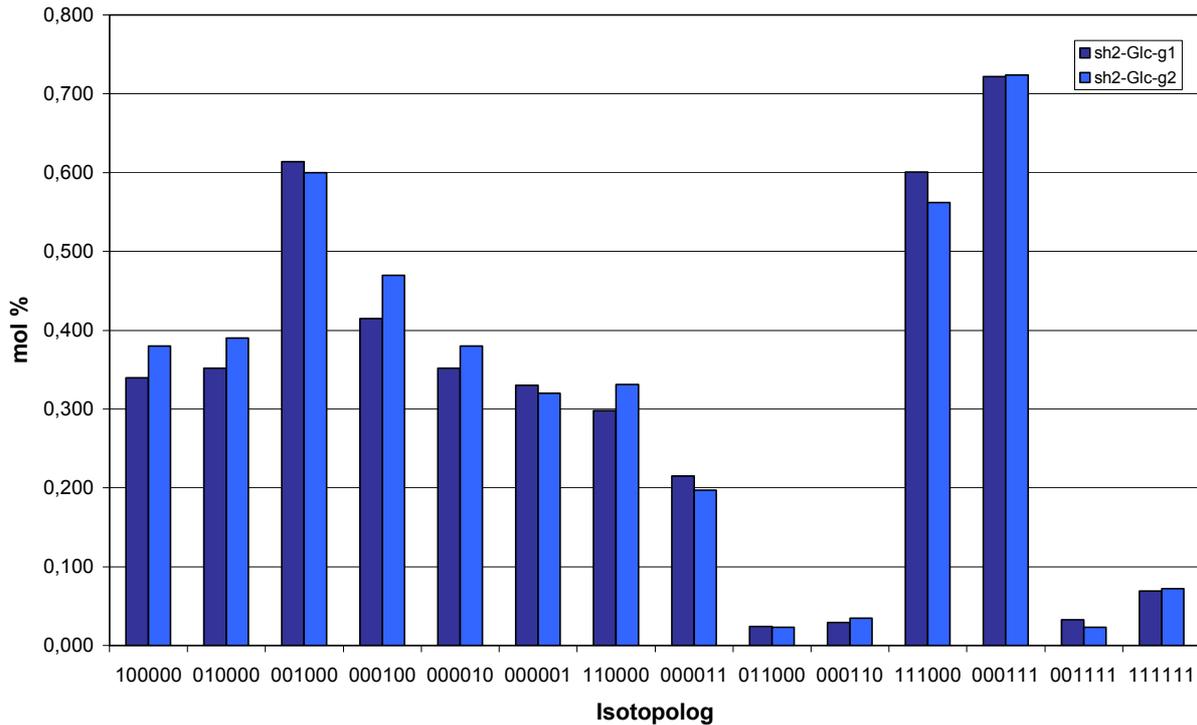
**Tab. 4.8:** Statistischer Vergleich der Isotopologenmuster von Stärkeglucose von Pflanzen unterschiedlicher Anbaubedingungen nach Markierung mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose. Die Bezeichnungen f, g1 und g2 geben die Anzuchtbedingungen wieder und sind in Tab. 3.11 genauer definiert. f, Feld; g, Gewächshaus.

	<b>RMSD [x 10<sup>-2</sup>]</b>
<b>Vergleich von verschiedenen Standorten im Gewächshaus</b>	
W22-K1 : W22-K2	1,8
W22-K1 : W22-K3	2,1
W22-K2 : W22-K3	1,7
<b>Vergleich von verschiedenen Anbauperioden im Gewächshaus</b>	
<i>sh2-g1</i> : <i>sh2-g2</i>	2,7
<b>Vergleich zwischen der Anzucht im Gewächshaus und auf dem Feld</b>	
Fa56-f : Fa56-g2	4,2
<i>Sh2-Rev6-f</i> : <i>Sh2-Rev6-g2</i>	2,2



**Abb. 4.12:** Vergleich von unterschiedlichen Anzuchtbedingungen. Drei W22 Pflanzen wurden an unterschiedlichen Standorten im Gewächshaus gepflanzt und von 15-22 DAP mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologen beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben.

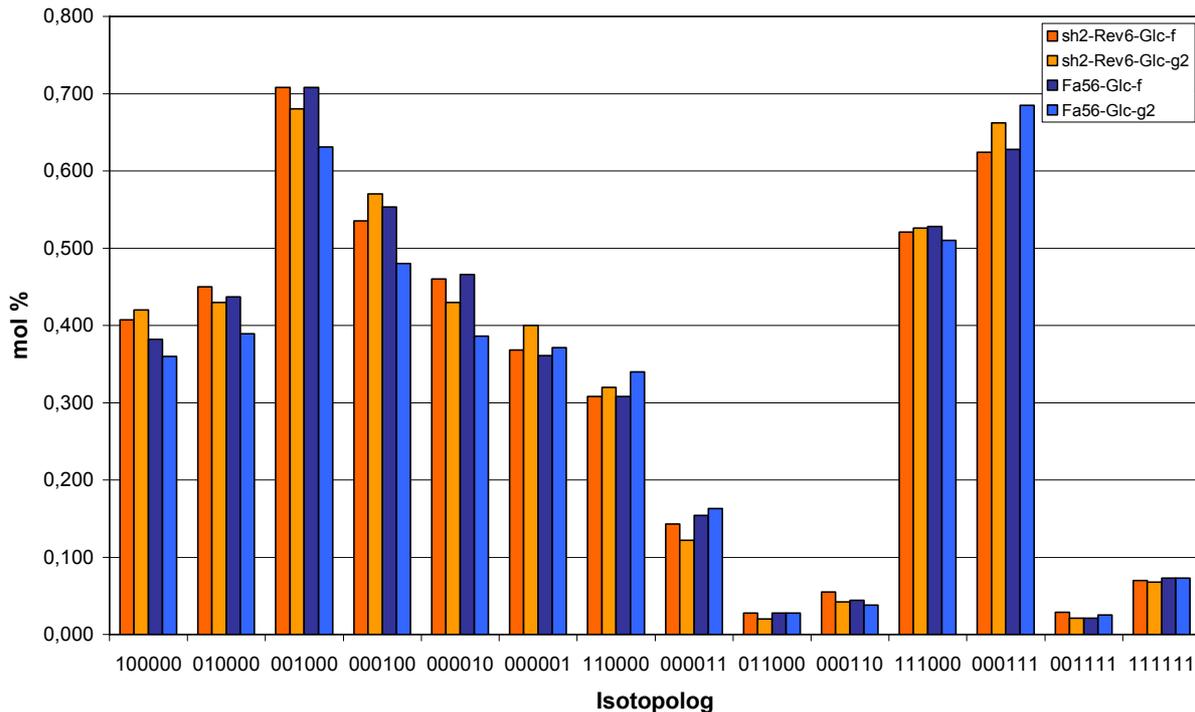
Die Wachstumsbedingungen in einem Gewächshaus können je nach Wetterlage stark variieren. Pflanzen der Linie *sh2* wurden einmal von August bis Oktober 2003 und einmal von Juli bis September 2004 im Gewächshaus in Freising angezogen und mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose markiert. Die Anbauperioden unterscheiden sich durch zufällige wetterbedingte Schwankungen vor allem in der Lichtintensität, Sonnendauer, Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Die Nährstoff- und Wasserversorgung ist annähernd gleich. Das Muster der Stärkeglucose aus den beiden Markierungen ist kaum zu unterscheiden (Abb. 4.13, Tab. 4.8). Wetterbedingte Schwankungen scheinen also keinen sehr großen Einfluss auf die metabolischen Flüsse zu haben.



**Abb. 4.13:** Vergleich von unterschiedlichen Anzuchtbedingungen. *Sh2* Pflanzen wurden von August bis Oktober 2003 (*sh2*-Glc-g1) und von Juli bis September 2004 (*sh2*-Glc-g2) im Gewächshaus in Freising angezogen und von 15-22 DAP mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben.

Die stärksten Auswirkungen von unterschiedlichen Umweltbedingungen sind zu erwarten, wenn die Anzucht von Mais auf einem Feld mit einer Anzucht im Gewächshaus verglichen wird.

Ein Großteil der für die Markierungen verwendeten Mutanten wurde im Sommer 2003 auf einem Feld in Gainesville, Florida, angebaut. Dabei herrschten im Vergleich zum Gewächshaus in Freising höhere Temperaturen, eine höhere Luftfeuchtigkeit, mehr Niederschläge und eine intensivere Sonnenbestrahlung vor. Hinzu kommen noch unterschiedliche Böden, Schädlingsbekämpfungsmaßnahmen und Düngemittel. Körner der Linien Fa56 und *Sh2-Rev6* wurden sowohl in Florida auf dem Feld als auch in Freising im Gewächshaus angezogen. Ein Vergleich der Isotopologenmuster der Stärkeglucosen zeigt, dass sich selbst extrem unterschiedliche Umwelteinflüsse nicht stark auf das Muster auswirken (Abb. 4.14, Tab. 4.6).



**Abb. 4.14:** Vergleich von unterschiedlichen Anzuchtbedingungen. *Fa56* und *Sh2-Rev6* Pflanzen wurden im Gewächshaus und auf dem Feld angezogen und von 15-22 DAP mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben. f, Feld; g, Gewächshaus.

Der zentrale Kohlenhydratmetabolismus des Maiskorns erwies sich in den Experimenten als sehr stabil. Durch unterschiedliche Umweltbedingungen verursachte Modifikationen der Pflanzen während der frühen Phase der Kornentwicklung (bis 8 DAP) haben vermutlich keinen wesentlichen Einfluss auf das Muster der Stärkeglucose, d.h. die Flüsse durch die zentralen Stoffwechselwege werden dadurch nicht stark verändert.

#### 4.6 Betrachtung der metabolischen Flüsse zu unterschiedlichen Entwicklungsstufen

Glawischnig et al. (2002) untersuchten mit Hilfe von  $^{13}C$ -Markierung und anschließender NMR-Analyse der hydrolysierten Stärke den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel von Maiskörnern. Die Körner wurden dabei in Sterilkultur über einen Zeitraum von 19 Tagen zwischen 11 und 30 DAP markiert.

Aufbauend auf diesem Versuch wurde ein ähnliches, weiterentwickeltes Experiment durchgeführt. Die lineare Phase der Stärkeakkumulation wurde in drei Abschnitte geteilt und diese gesondert betrachtet. Körner der Linie W22 wurden hierzu auf unmarkiertem Medium ab 8 DAP vorkultiviert, nach 3, 10 bzw. 17 Tagen auf markiertes Medium umgesetzt und

jeweils 7 Tage lang von 11-18 DAP (früher Zeitraum), 18-25 DAP (mittlerer Zeitraum) und 25-32 DAP (später Zeitraum) mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose markiert.

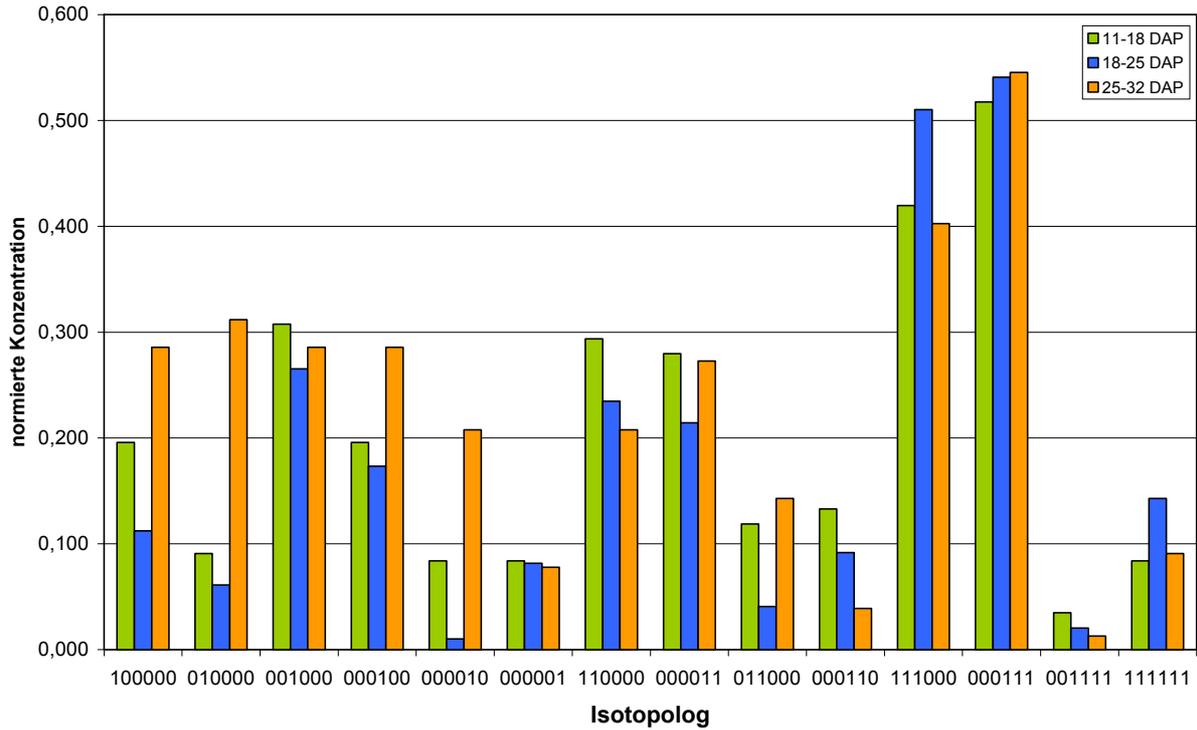
Die <sup>13</sup>C-Gesamtanreicherung der getrockneten Körner wurde per IRMS bestimmt und beträgt 2,53 %, 2,08 % und 1,87 % für die Proben 11-18 DAP, 18-25 DAP und 25-32 DAP. Diese Werte decken sich mit den Erwartungen insofern als mit dem Alter des Korns der Anteil an präformierter Stärke mit natürlicher Anreicherung steigt. Dadurch sinkt der prozentuale Anteil von während der Markierungsphase eingebautem <sup>13</sup>C an der Gesamtstärke. Um einen direkten Vergleich der Isotopologemuster der drei Zeiträume zu ermöglichen, wurden in Abb. 4.15 die Konzentrationen einheitlich normiert. Dabei wurde die im Vergleich zur natürlichen Anreicherung überschüssige Konzentration eines Isotopologs zum Verhältnis der überschüssigen Gesamtanreicherung (IRMS-Wert minus 1,1 %) gesetzt. Durch diese Art der Normierung können Gemische von Isotopologen, die sich nur im Anteil an Glucose mit natürlicher <sup>13</sup>C Anreicherung unterscheiden, ineinander überführt werden.

Die Isotopologemuster von Glucose aus den hydrolysierten Stärken der drei Zeiträume sind unterschiedlich (Abb. 4.15) und ergeben im statistischen Vergleich hohe RMSD-Werte (Tab. 4.9).

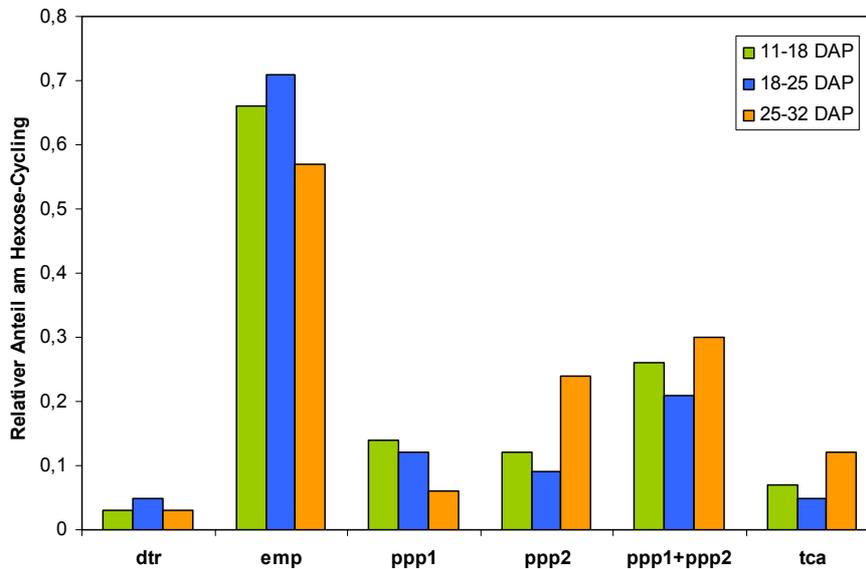
**Tab. 4.9:** Statistischer Vergleich der Isotopologenzusammensetzung von Stärkeglucose aus den drei Markierungszeiträumen.

RMSD [x 10 <sup>-2</sup> ]		
früh : mittel	früh : spät	mittel : spät
9,6	20,6	15,7

## Ergebnisse



**Abb. 4.15:** Vergleich unterschiedlicher Entwicklungsstufen. W22 Körner wurden von 11-18, 18-25 und 25-32 DAP mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose markiert. Die normierten Konzentrationen der Isotopologe berechnen sich nach  $(\text{Anreicherung des Isotopologs} - \text{natürliche Anreicherung des Isotopologs}) / (\text{Gesamtanreicherung der Probe} - \text{natürliche Gesamtanreicherung der Probe})$ .



**Abb. 4.16:** Relativer Anteil von Kreisprozessen am Cycling von Hexosen vor deren Einbau in Stärke.

Die aus den Spektren qualitativ ersichtlichen Unterschiede werden durch eine *in silico* Simulation quantitativ bestätigt. Mit der 4F Software (siehe 4.1.3.3) wurden die relativen Anteile der am Hexose-Cycling beteiligten Prozesse („dtr“, „emp“, „ppp1“, „ppp2“ und „tca“) bestimmt (Abb. 4.16). In der Simulation wurden die Isotopologenkonzentrationen eingesetzt, die sich durch eine Normierung auf die tatsächliche, durch IRMS bestimmte, Gesamtanreicherung ergeben (Tab. 4.10).

In allen drei Zeiträumen ist „emp“, also ein Triose-Hexose-Cycling durch glykolytische Spaltung und Resynthese, die am häufigsten stattfindende Transformation. Es folgen die Umwandlungen durch den PPP („ppp1“ + „ppp2“) und den Citratzyklus („tca“). Glucosemoleküle, die direkt ohne vorherige Metabolisierung in Stärke eingebaut werden, („dtr“) nehmen jeweils nur einen sehr geringen Anteil ein.

Der mittlere Zeitraum (18-25 DAP) weicht in der Isotopologenverteilung und demzufolge in der Simulation deutlich von den anderen beiden ab. In der normierten Darstellung (Abb. 4.15) sind in diesem Zeitraum der Anteil der vollmarkierten Glucosen und die Summe der dreifach markierten Glucosen {111000} und {000111} am höchsten. Gleichzeitig ist die Summe der Isotopologe {011000} und {000110} – zwei Indikatoren des Citratzyklus – minimal. Ebenso sind mit Ausnahme des Isotopologs {000001} die Anteile der einfachmarkierten Isotopologe am niedrigsten. Entsprechend sind für diesen Zeitraum in der Simulation die Werte für „dtr“ und „emp“ maximal, während „ppp1“ + „ppp2“ und „tca“ ein Minimum durchlaufen.

Im späten Zeitraum (25-32 DAP) sind die hohen Konzentrationen an einfachmarkierten Glucoseisotopologen auffallend. Diese entstehen vor allem durch Reaktionen des Citratzyklus und des nichtoxidativen PPP. In der Simulation ergeben sich in diesem Zeitraum für „tca“ und „ppp2“ sehr hohe Werte. Der Anteil an „ppp2“ ist dabei etwa viermal so hoch wie der Anteil an „ppp1“. Im frühen und mittleren Zeitraum sind hingegen „ppp1“ und „ppp2“ annähernd gleich, mit einem leichten Überschuss an „ppp1“.

Der Vergleich von experimentell ermittelten mit simulierten Isotopologkonzentrationen ergibt Gesamtabweichungen zwischen 11,0 und 13,8 % (Tab. 4.10). Dies deutet generell auf eine gute Simulierbarkeit des Stoffwechsels anhand der gewählten Transferregeln hin. Die niedrigen Gesamtwerte können aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass bei einzelnen Isotopologen Abweichungen zwischen den simulierten und experimentell bestimmten Werten von über 40 % beobachtet werden.

**Tab. 4.10:** Vergleich von experimentell bestimmten mit simulierten Konzentrationen der Glucoseisotopologe.

Isotopolog	11-18 DAP			18-25 DAP			25-32 DAP		
	Exp. <sup>c</sup>	Sim. <sup>c</sup>	Abw. <sup>b</sup>	Exp. <sup>c</sup>	Sim. <sup>c</sup>	Abw. <sup>b</sup>	Exp. <sup>c</sup>	Sim. <sup>c</sup>	Abw. <sup>b</sup>
{100000}	0,28	0,30	7,1	0,11	0,11	0,0	0,22	0,22	0,0
{010000}	0,13	0,11	-15,4	0,06	0,06	0,0	0,24	0,20	-16,7
{001000}	0,44	0,40	-9,1	0,26	0,20	-23,1	0,22	0,21	-4,6
{000100}	0,28	0,23	-17,9	0,17	0,14	-17,7	0,22	0,18	-18,2
{000010}	0,12	0,12	0,0	0,01	0,01	0,0	0,16	0,16	0,0
{000001}	0,12	0,17	41,7	0,08	0,07	-12,5	0,06	0,05	-16,7
{110000}	0,42	0,35	-16,7	0,23	0,19	-17,4	0,16	0,15	-6,3
{000011}	0,40	0,47	17,5	0,21	0,29	38,1	0,21	0,18	-14,3
{011000}	0,17	0,17	0,0	0,04	0,04	0,0	0,11	0,09	-18,2
{000110}	0,19	0,17	-10,5	0,09	0,08	-11,1	0,03	0,03	0,0
{111000}	0,60	0,66	10,0	0,50	0,53	6,0	0,31	0,34	9,7
{000111}	0,74	0,88	18,9	0,53	0,61	15,1	0,42	0,50	19,1
{001111}	0,05	0,05	0,0	0,02	0,02	0,0	0,01	0,01	0,0
{111111}	0,12	0,12	0,0	0,14	0,14	0,0	0,07	0,07	0,0
Abweichung <sup>a</sup>	13,3 %			13,8 %			11,0 %		

<sup>a</sup> Summe der Differenzen zwischen gemessenen und simulierten Isotopologkonzentrationen im Verhältnis zur Summe der gemessenen Isotopologkonzentrationen

<sup>b</sup> prozentuale Abweichung zwischen gemessenen und simulierten Isotopologkonzentrationen

<sup>c</sup> Isotopologenüberschuss (<sup>13</sup>C Anreicherung minus natürliche <sup>13</sup>C Anreicherung); normiert auf die jeweilige, durch IRMS bestimmte, Gesamtanreicherung

Die Ergebnisse in dieser Arbeit sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Glawischnig et al. (2002). Auch in diesem Experiment stellen die vollmarkierten Glucosen nur einen geringen Anteil der Isotopologe. Die Isotopologe {000111}, {111000}, {110000} und {000011} kommen in hohen Mengen vor, während nur wenig {001111} nachgewiesen werden konnte. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar sind, da sich die Auswertung in der Zwischenzeit erheblich verbessert hat. So konnten in den alten Versuchen die Isotopomere {011000} und {000110} nicht bestimmt werden und auf eine Quantifizierung der meisten einfachmarkierten Glucosen wurde verzichtet.

#### 4.7 Kohlenhydratmetabolismus in Mutanten

Der zentrale Kohlenhydratmetabolismus wurde in zehn für die Pflanzenforschung bedeutenden Maismutanten untersucht. Die Mutationen betreffen die gegenseitige Umwandlung von Saccharose in Hexosen (*sh1*, *mn1*, *sh1 sus1*), die Produktion und den Transport von ADP-Glucose (*sh2*, *bt2*, *Sh2-Rev6*, *bt1*) und die Synthese von Amylose und Amylopektin (*ae*, *wx*, *su1*).

Die Mutanten lagen in drei verschiedenen genetischen Hintergründen vor und wurden teils im Sommer 2003 in Gainesville, Florida, auf dem Feld und teils im Herbst 2003 und Herbst 2004 in Freising im Gewächshaus angezogen. Die Linien im genetischen Hintergrund Fa56 wurden mehrmals gepflanzt. Bei diesen Linien werden zur genauen Identifizierung der Proben der Ort und die Zeit der Anzucht durch die Zusätze -f, -g1 und -g2 zum Namen der Linie angegeben (Tab. 4.11).

**Tab. 4.11:** Für Markierungsexperimente eingesetzte Maismutanten, ihre genetischen Hintergründe und der Ort und die Zeit der Anzucht.

Linie	Ort	Zeit
<b>Linien in W64A</b>		
Wildtyp	Florida – Feld	Sommer 2003
<i>ae</i>	Florida – Feld	Sommer 2003
<i>wx</i>	Florida – Feld	Sommer 2003
<i>su1</i>	Florida – Feld	Sommer 2003
<i>sh1</i>	Florida – Feld	Sommer 2003
<i>bt1</i>	Florida – Feld	Sommer 2003
<i>bt2</i>	Florida – Feld	Sommer 2003
<b>Linien in W22</b>		
Wildtyp	Freising – Gewächshaus	Herbst 2003
<i>mn1</i>	Freising – Gewächshaus	Herbst 2003
<i>sh1 sus1</i>	Freising – Gewächshaus	Herbst 2003
<b>Linien in Fa56</b>		
Wildtyp	Florida – Feld	Sommer 2003
	Freising – Gewächshaus	Herbst 2004 (g2)
<i>sh2</i>	Freising – Gewächshaus	Herbst 2003 (g1)
	Freising – Gewächshaus	Herbst 2004 (g2)
<i>Sh2-Rev6</i>	Florida - Feld	Sommer 2003
	Freising – Gewächshaus	Herbst 2003 (g1)
	Freising – Gewächshaus	Herbst 2004 (g2)

Die Wachstumsbedingungen und die Zeit der Anzucht nehmen vermutlich keinen wesentlichen Einfluss auf das Muster (siehe 4.4), es müssen aber die verschiedenen genetischen Hintergründe beachtet werden (siehe 4.3). Das Isotopologenmuster einzelner Mutanten kann nicht isoliert betrachtet werden, vielmehr sind bei der Interpretation der Daten Änderungen des Musters im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp aussagekräftig. Im statistischen Vergleich der Mutanten mit den zugehörigen Wildtypen sind von allen Mutanten lediglich bei Glucosestärke aus *bt2* und *mn1* Endosperm mit RMSD-Werten zwischen 13,5 und 16,8 Unterschiede zu erkennen. Zusätzlich weicht das Muster von Glucose aus hydrolysiertem Phytoglykogen von *sul* Endosperm signifikant von Wildtypstärke ab (Tab. 4.12).

**Tab. 4.12:** Statistischer Vergleich der Isotopologenmuster von Glucose aus hydrolysierter Stärke und hydrolysiertem Phytoglykogen der Mutanten mit den jeweiligen Wildtypen.

	RMSD [ $\times 10^{-2}$ ]	
	Markierung mit Glucose	Markierung mit Saccharose
<b>Mutanten in W64A</b>		
<i>ae</i>	3,7	4,2
<i>wx</i>	2,7	3,0
<i>sul</i>	5,5	5,0
<i>sul</i> -Phytoglykogen	14,1	13,5
<i>sh1</i>	5,0	6,6
<i>bt1</i>	4,1	5,0
<i>bt2</i>	23,8	22,5
<b>Mutanten in W22</b>		
<i>mn1</i>	15,8	16,8
<i>sh1 sus1</i>	3,3	4,7
<b>Mutanten in Fa56</b>		
<i>sh2-g2</i>	2,6	--
<i>Sh2-Rev6-g2</i>	3,9	--

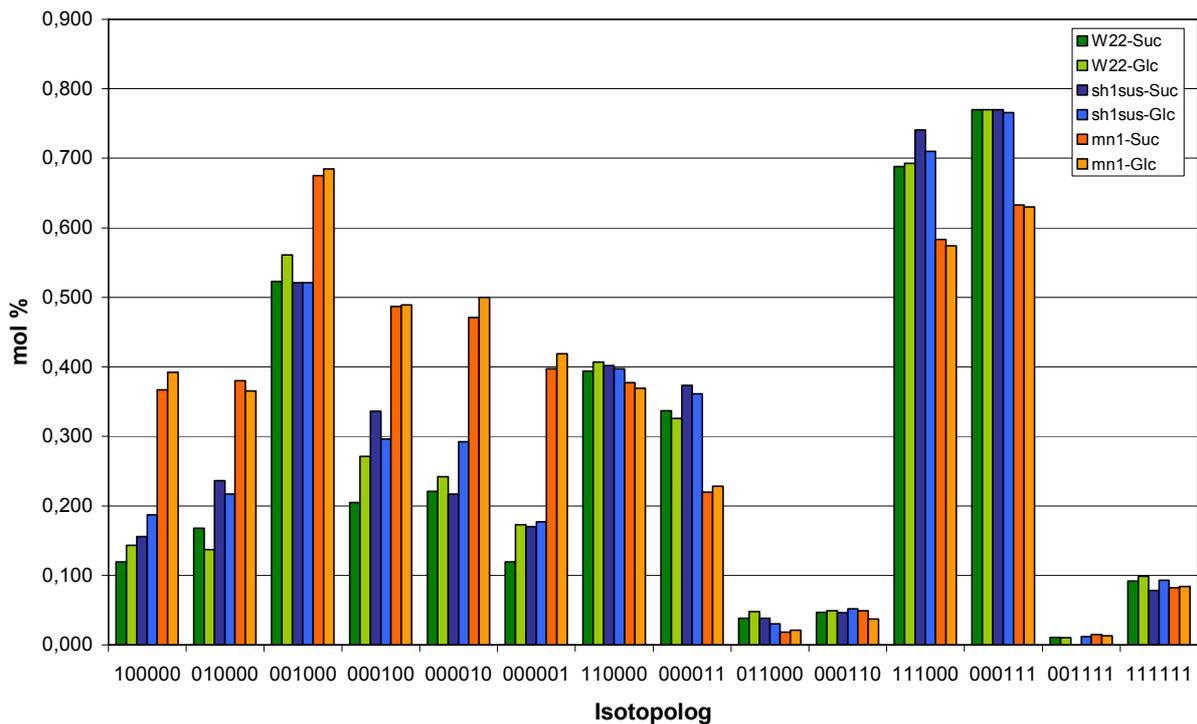
#### 4.7.1 Mutanten, die die Bereitstellung von Hexosen beeinträchtigen

Die Maiskörner in Kultur nehmen exogen zugeführte Saccharose und Glucose auf. Hexosen und Saccharose werden im Korn durch die drei Enzymgruppen Invertasen ( $\text{Suc} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glc} + \text{Suc}$ ), Saccharose-Synthasen ( $\text{Suc} + \text{UDP} \leftrightarrow \text{Frc} + \text{UDP-Glc}$ ) und Saccharose-P-Synthasen

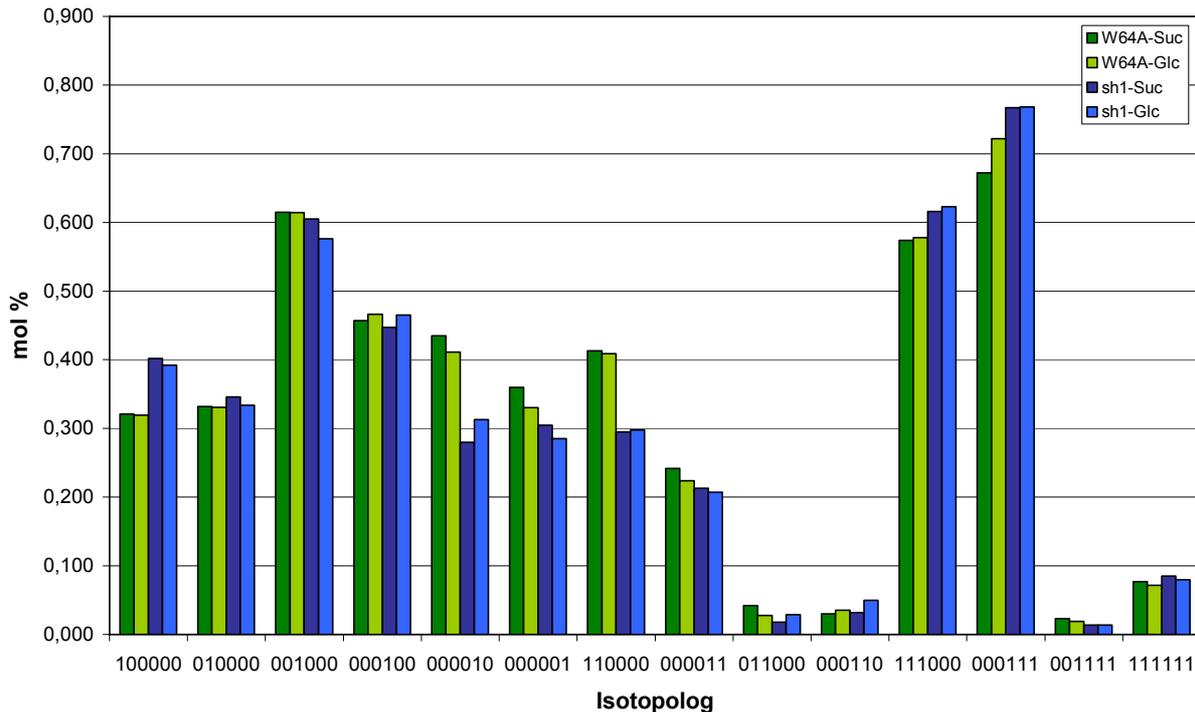
(UDP-Glc + Frc-6-P  $\leftrightarrow$  Suc-6-P + UDP) ineinander umgewandelt (Winter und Huber 2000).

Die gewählten Mutanten, die die Bereitstellung von Hexosen betreffen, liegen in verschiedenen genetischen Hintergründen vor. *Mn1* und *sh1 sus1* sind beide in einem W22 Hintergrund und wurden im Gewächshaus in Freising gepflanzt. *Sh1* liegt in W64A vor und wurde auf einem Feld in Florida angezogen. Die beiden Mutanten *sh1* und *sh1 sus1* betreffen Saccharose-Synthase und zeigen gegenüber den zugehörigen Wildtypen kaum Veränderungen (Abb. 4.17 und 4.18). Dabei ist die Doppelmutante (RMSD 4,7 und 3,3) dem Wildtyp sogar ähnlicher als die Einfachmutante (RMSD 6,6 und 5,0).

Ein deutlicher Effekt ist in *mn1* Körnern zu erkennen (Abb. 4.17). Ein Fehlen der Invertase bewirkt eine Änderung des zentralen Kohlenhydratmetabolismus. Die Einfachmarkierungen sind im Vergleich zum Wildtypen erhöht. Gleichzeitig ist der Anteil an mehrfachmarkierten Isotopologen geringer. Der Anteil an direkt eingebauten Glucosen ohne vorherige metabolische Umwege bleibt gleich. Die Mutation bewirkt also ein höheres Hexose-Cycling.



**Abb. 4.17:** Isotopologenmuster von Glucose aus hydrolysiertes Stärke aus WT (W22), *mn1* und *sh1 sus1* Endosperm. Die Körner wurden von 15-22 DAP einmal mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose und einmal mit  $[U-^{13}C_{12}]$ Saccharose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben.



**Abb. 4.18:** Isotopologemuster von Glucose aus hydrolysiertes Stärke aus WT (W64A) und *sh1* Endosperm. Die Körner wurden von 15-22 DAP einmal mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose und einmal mit  $[U-^{13}C_{12}]$ Saccharose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben.

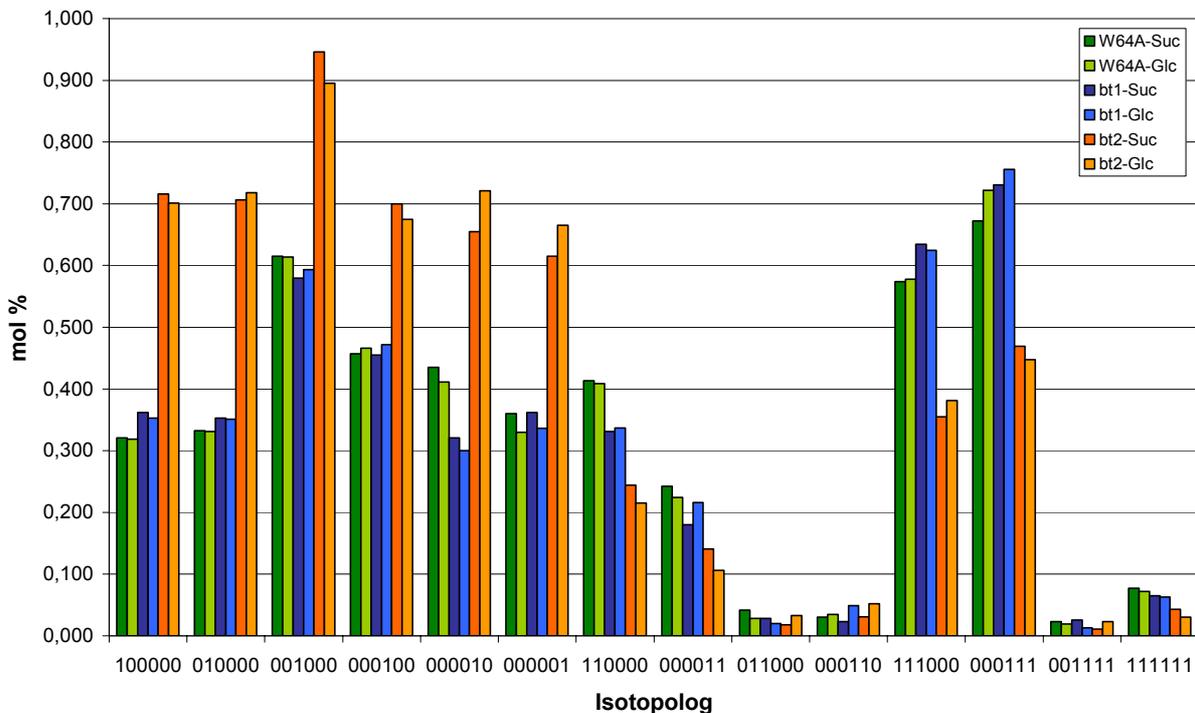
#### 4.7.2 Mutanten, die die Synthese und den Transport von ADP-Glucose beeinträchtigen

Die Bedeutung des wichtigsten Enzyms der Stärkebiosynthese, der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase), für den zentralen Kohlenhydratmetabolismus eines Maiskorns wurde anhand der Mutanten *bt2*, *sh2* und *Sh2-Rev6* untersucht. *Sh2* und *Bt2* codieren die große und kleine Untereinheit der AGPase, welche die Umwandlung von Glucose-1-P in ADP-Glucose bewirkt. *BT1* transportiert die im Cytosol generierte ADP-Glucose in den Amyloplasten. Die Mutante *bt1* verursacht ebenso wie *bt2* und *sh2* einen drastischen Körnerphänotyp mit stark reduzierten Stärkegehalten. In *Sh2-Rev6* ist die AGPase nicht mehr durch Phosphat hemmbar, so dass Körner mit größerem Gewicht und entsprechend mehr Stärke entstehen.

Die Mutanten liegen in unterschiedlichen genetischen Hintergründen vor und wurden unter unterschiedlichen Bedingungen angezogen. Die Mutanten *bt1* und *bt2* sind in W64A und wurden im Sommer auf dem Feld in Florida gepflanzt. Die Mutanten *sh2* und *Sh2-Rev6* liegen in Fa56 vor und wurden teils auf dem Feld in Florida und teils im Gewächshaus in Freising gepflanzt.

Das Fehlen des Transporters BT1 übt keinen erkennbaren Einfluss auf die Flüsse des zentralen Kohlenhydratmetabolismus aus. Das Isotopologenmuster von Glucose aus hydrolysiertes *bt1*-Stärke unterscheidet sich kaum von dem des Wildtyps (Abb. 4.19). Im statistischen Vergleich der Spektren wurden RMSD-Werte von 5,0 und 4,1 für die Markierungen mit Saccharose und Glucose errechnet (Tab. 4.12).

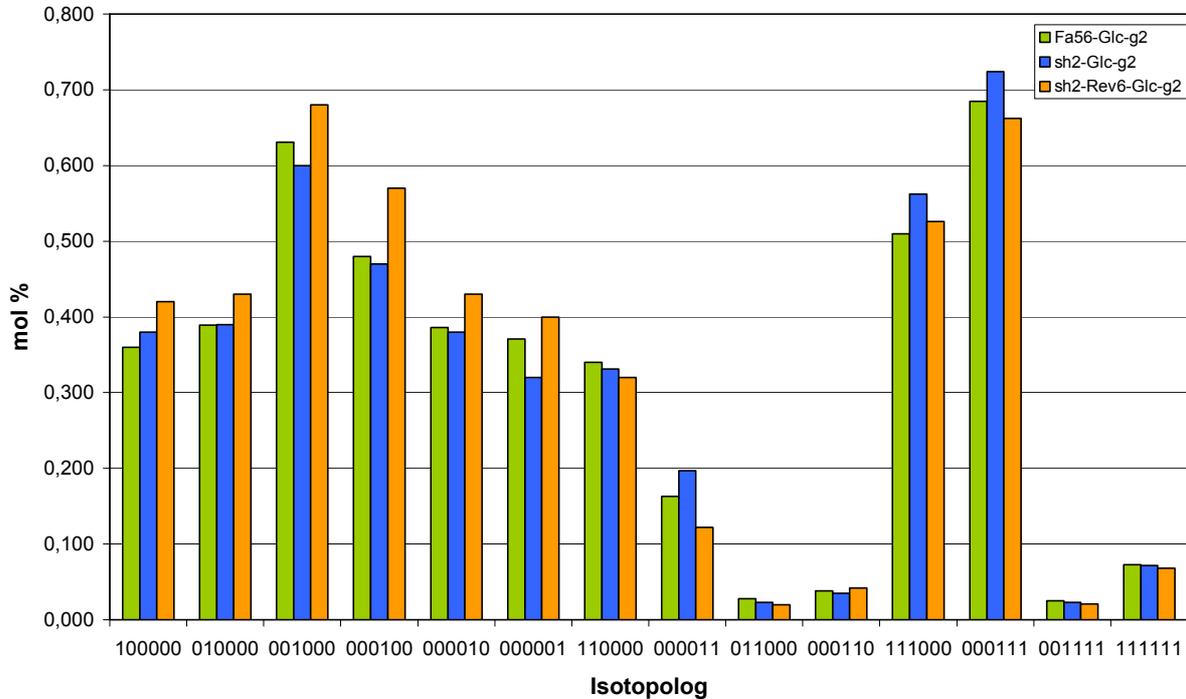
Glucose aus *bt2*-Stärke zeigt hingegen ein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Muster. Die relativen Anteile der mehrfachmarkierten und vollmarkierten Isotopologe sind reduziert, die der einfachmarkierten Isotopomere entsprechend erhöht. Das Fehlen der kleinen Untereinheit der AGPase führt also zu einem höheren Cycling der Hexosen vor ihrem Einbau in Stärke. Die unterschiedlichen Muster resultieren in hohen RMSD-Werten von 22,5 für das Experiment mit Saccharose und 23,8 für das Experiment mit Glucose.



**Abb. 4.19:** Isotopologenmuster von Glucose aus hydrolysiertes Stärke aus WT (W64A), *bt1* und *bt2* Endosperm. Die Körner wurden von 15-22 DAP einmal mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose und einmal mit [U-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]Saccharose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben.

Im Gegensatz zur kleinen Untereinheit wirkt sich ein Fehlen der großen Untereinheit der AGPase nicht auf die Flüsse des zentralen Metabolismus des Kornes aus. Glucose aus hydrolysiertes *sh2*-Stärke hat ein ähnliches Isotopologenmuster wie Glucose aus Wildtypstärke. Ebenso kann kein signifikanter Unterschied zwischen der Glucose aus

Wildtyp- und *Sh2-Rev6*-Stärke erkannt werden (Abb. 4.20). Im statistischen Vergleich der drei Spektren ergeben sich RMSD-Werte von 2,6 und 3,9 (Tab. 4.12).



**Abb. 4.20:** Isotopologenmuster von Glucose aus hydrolysiertes Stärke aus WT (Fa56), *sh2* und *Sh2-Rev6* Endosperm. Die Körner wurden von 15-22 DAP mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose markiert. Die Konzentrationen der Isotopolog beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben. g, Gewächshaus.

Generell besteht zwischen den Isotopologenmustern der Stärkeglucose aus der Suc-Markierung und der Glc-Markierung kein Unterschied. Dies trifft selbst auf die Mutanten *mn1*, *sh1* und *sh1 sus1* zu, in denen die gegenseitige Umwandlung von Saccharose in Hexosen beeinträchtigt ist (siehe 4.7.1). Eine Ausnahme von der Regel ist in den Linien Fa56 und *Sh2-Rev6* (ebenso im Hintergrund Fa56) zu finden. In ihnen liefern die Markierungen mit Saccharose und Glucose unterschiedliche Muster (Abb. 4.21). In der Gegenüberstellung der Saccharose- und Glucosespektren der beiden Linien zeigen die RMSD-Werte von 21,7 und 21,2 deutliche Unterschiede an (Tab. 4.13).

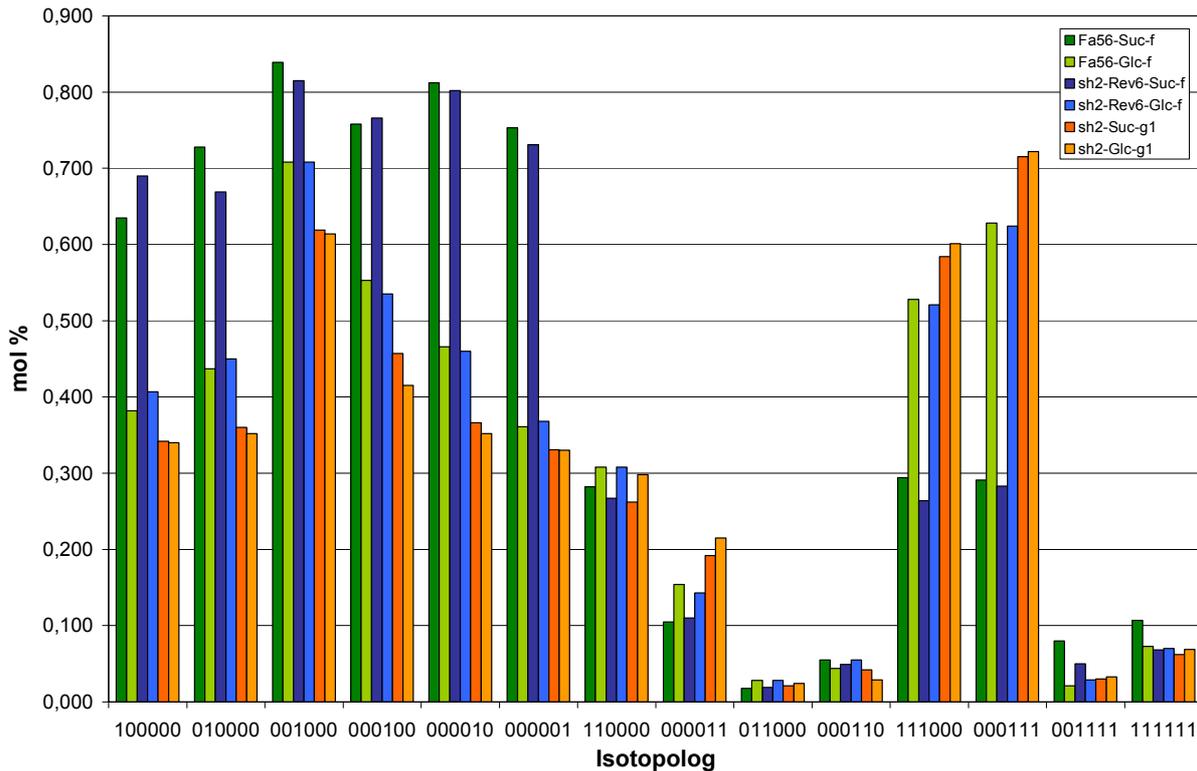
Auffallend ist, dass die Muster aus den Glc-Markierungen und den Suc-Markierungen der beiden Linien jeweils sehr ähnlich sind und im statistischen Vergleich mit 1,1 (Glc) und 2,9 (Suc) entsprechend niedrige RMSD-Werte liefern (Tab. 4.13).

**Tab. 4.13:** Statistischer Vergleich der Isotopologenmuster von Stärkeglucose aus Fa56-, *sh2*- und *Sh2-Rev6* Endosperm. f, Feld; g, Gewächshaus.

<b>RMSD [x 10<sup>-2</sup>]</b>	
<b>Vergleich von Glc- mit Suc-Markierungen</b>	
Fa56	21,7
<i>Sh2-Rev6</i>	21,2
<i>sh2</i>	1,8
<b>Vergleich von WT (Fa56) mit <i>Sh2-Rev6</i></b>	
Glc – Markierung	1,1
Suc – Markierung	2,9
<b>Vergleich von verschiedenen <i>Sh2-Rev6</i>-Spektren</b>	
Suc-f : Suc-g1	31,7
Glc-f : Glc-g2	2,2
Suc-g1 : Glc-g2	11,0

Eine eventuelle Verwechslung von Material kann ausgeschlossen werden. Aus den getrockneten Endospermen der vier Proben (Fa56-Glc-f, *Sh2-Rev6*-Glc-f, Fa56-Suc-f, *Sh2-Rev6*-Suc-f) wurden in getrennten Ansätzen jeweils zweimal Glucose aus Stärke isoliert, aufgereinigt und am NMR vermessen. Die Spektrensätze waren nahezu identisch (Ergebnisse nicht abgebildet). Die Endosperme der Proben Fa56-Glc-f und Fa56-Suc-f wurden zudem genotypisiert und richtig positiv als Fa56 identifiziert. Die Unterscheidung der Linien Fa56 und *Sh2-Rev6* beruht darauf, dass *Sh2-Rev6* eine Insertion von 6 Basenpaaren in *Sh2* besitzt, während in *Sh2-Rev3* (hier bezeichnet als Fa56, siehe 3.11) die Wildtyp Sequenz wiederhergestellt ist (Giroux et al. 1996).

Eine eindeutige Identifizierung von *sh2* Endosperm war nicht möglich. Die in dieser Arbeit verwendete Mutante *sh2-R* enthält in *Sh2* eine über 9,5 kb große Insertion zwischen dem Intron 2 und dem Exon 4 mit unbekannter Sequenz. Eine PCR um diese Region liefert für Wildtypen ein 960 bp großes PCR-Produkt, nicht aber für *sh2-R* (L.C. Hannah, persönliche Kommunikation). Das Fehlen dieser PCR-Bande in allen *sh2* Proben und der Phänotyp der Körner (verschrumpelt, kleines stärkehaltiges Pellet nach Extraktion des Endosperms mit Hexan und Ethanol/Wasser) lassen darauf schließen, dass es sich bei den untersuchten Körnern tatsächlich um *sh2* handelt.

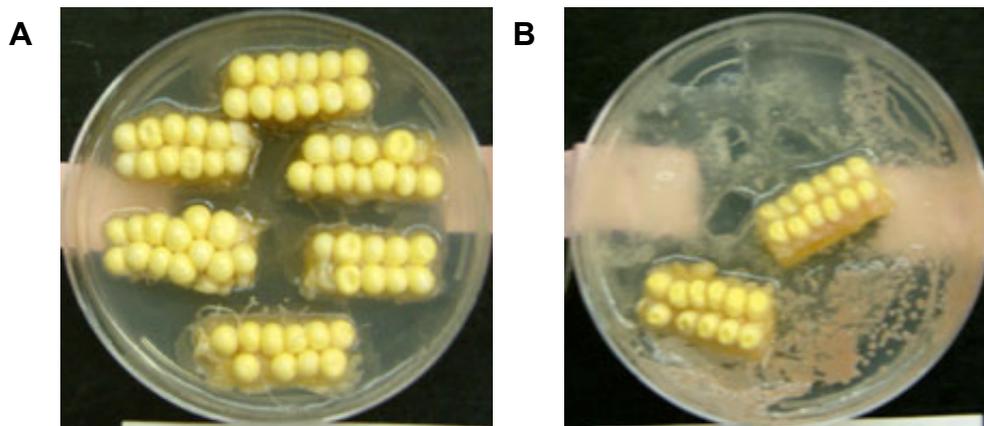


**Abb. 4.21:** Isotopologemuster von Glucose aus hydrolysierte Stärke aus WT (Fa56), *Sh2-Rev6* und *sh2* Körnern. Die Körner wurden von 15-22 DAP einmal mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose und einmal mit  $[U-^{13}C_{12}]$ Saccharose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben. f, Feld; g, Gewächshaus.

Die Isotopologemuster aus den Glc-Markierungen von Fa56 und *Sh2-Rev6* sind sowohl mit dem Muster aus Stärkeglucose von *sh2-Suc* als auch mit dem Muster von *sh2-Glc* nahezu identisch (Abb. 4.21, Tab. 4.13). Von dem einheitlichen Bild, das die Linien im Fa56 Hintergrund liefern, weichen die beiden Suc-Markierungen deutlich ab. Die Anteile an einfachmarkierten Glucoseisotopologen sind stark erhöht; gleichzeitig sind die Anteile an mehrfachmarkierten Isotopologen verringert.

Eine denkbare Erklärung für die abweichenden Muster aus Fa56-Suc und *Sh2-Rev6-Suc* könnte sein, dass in den beiden Experimenten das Kulturmedium kontaminiert war (Abb. 4.22). Sämtliche anderen Experimente waren frei von mikrobiellen Kontaminationen. Eine Verkeimung wirkt sich vermutlich nur dann auf das Muster aus, wenn die Mikroorganismen markierte Saccharose aufnehmen, sie verstoffwechseln und in veränderter Form wieder ins Medium abgeben. Dies hätte zur Folge, dass den Maiskörnern neben vollmarkierter Saccharose auch andere Isotopologe bzw. voll- oder teilmarkierte Abbauprodukte der Saccharose zum Einbau zur Verfügung stünden. In der Glucose der hydrolysierten Stärke wäre dann mit einem stärkeren Cycling und einem hohen Anteil an Einfachmarkierungen zu rechnen. Die gemessenen Muster decken sich zwar mit dieser Erwartung, allerdings war die

Verkeimung in den Proben unterschiedlich stark ausgeprägt. Im Medium von *Sh2-Rev6*-Suc war deutlicher bakterieller Befall zu erkennen, im Medium von Fa56-Suc fiel die Verkeimung gering aus (Abb. 4.22). Es ist unwahrscheinlich, dass ein unterschiedlicher Befall zu einer ähnlichen Verteilung der Markierung führt, aber dennoch nicht völlig auszuschließen. Zur vollständigen Klärung müssten die Kohlenhydrate der Medien isoliert werden und zum Beispiel durch MS oder NMR bestimmt werden, ob neben vollmarkierten Zuckern noch weitere Isotopologe vorliegen. Dabei sollte beachtet werden, dass Mikroorganismen neben Saccharose und Glucose auch andere Verbindungen ausscheiden können.



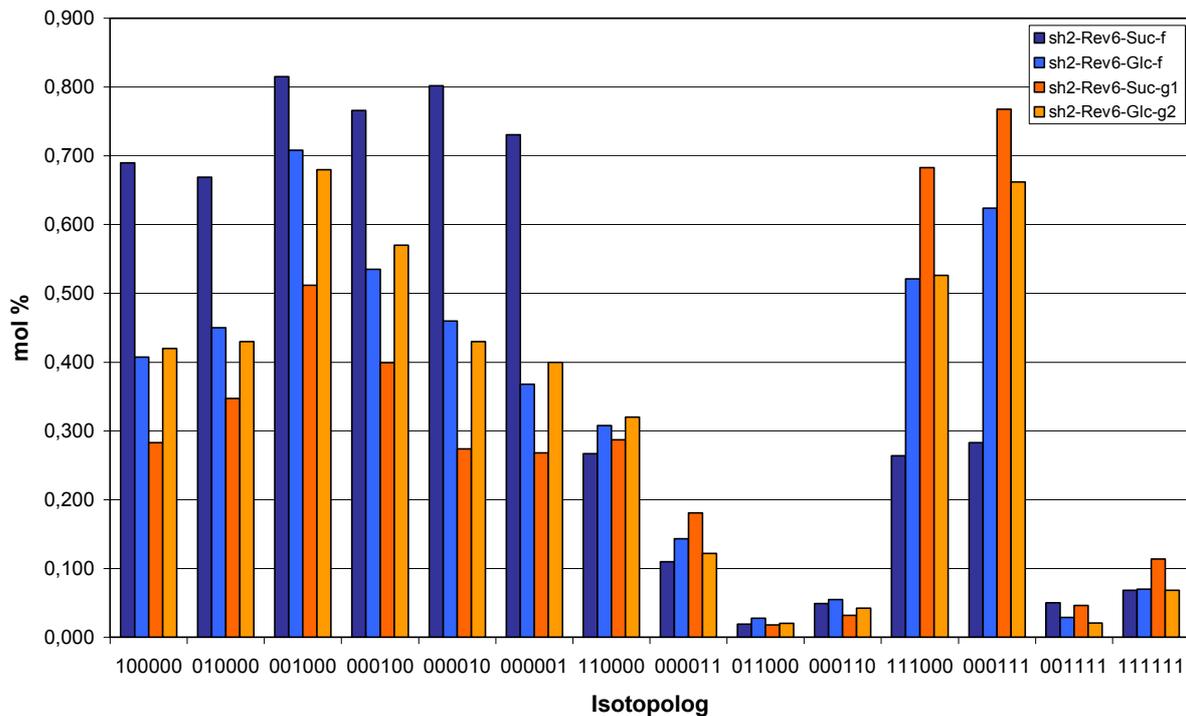
**Abb. 4.22:** Verkeimtes Medium von Fa56-Suc (A) und *Sh2-Rev6*-Suc (B) Kulturen. Die Bilder wurden kurz vor der Ernte nach einer siebentägigen Markierung mit Saccharose aufgenommen. In der *Sh2-Rev6*-Suc (B) Kultur ist das Medium stark, in der Fa56-Suc Kultur (A) nur schwach verkeimt.

Eine unterschiedliche Verstoffwechslung von Glucose und Saccharose könnte auch eine allgemeine Eigenheit des Genotypen sein. Dafür spricht, dass in allen Linien in Fa56 die Gesamtanreicherungen der Stärkeglucosen in der Glc-Markierung höher sind als in der Suc-Markierung (Tab. 4.6). Dagegen spricht aber, dass die Mutante *sh2* ebenfalls in einem Fa56 Hintergrund vorliegt, aber für Markierungen mit Glucose und Saccharose keine signifikant unterschiedlichen Spektren liefert.

Eine Markierung von *Sh2-Rev6* Körnern mit Saccharose wurde wiederholt. Die Pflanzen für die Versuche wurden im Gewächshaus in Freising angezogen. Das zuerst gemessene Ergebnis von auf dem Feld gewachsenen Pflanzen konnte nicht reproduziert werden, obwohl in etlichen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Anzuchtbedingungen das Muster nicht beeinflussen. Anstelle von hohen Anteilen an einzelmarkierten Glucosen zeigt das neue Spektrum im Vergleich zum Wildtypen geringere Anteile an einfachmarkierten Glucosen. Mehrfachmarkierte und vollmarkierte Glucoseisotopologe kommen hingegen in höheren Mengen vor (Abb. 4.23). Das in der Wiederholung ermittelte Isotopologemuster von *Sh2-*

*Rev6-Suc-g1* kann auch mit keinem der sonst sehr gut reproduzierbaren Muster der anderen Linien im Fa56 Hintergrund in Einklang gebracht werden. Vergleicht man das Muster zum Beispiel mit *Sh2-Rev6-Glc-g2*, so beträgt die RMSD 11,0 (Tab. 4.12).

Eine endgültige Interpretation ist auf Basis dieser Daten noch nicht möglich. Eine nochmalige Wiederholung des Versuches wäre hierzu nötig.



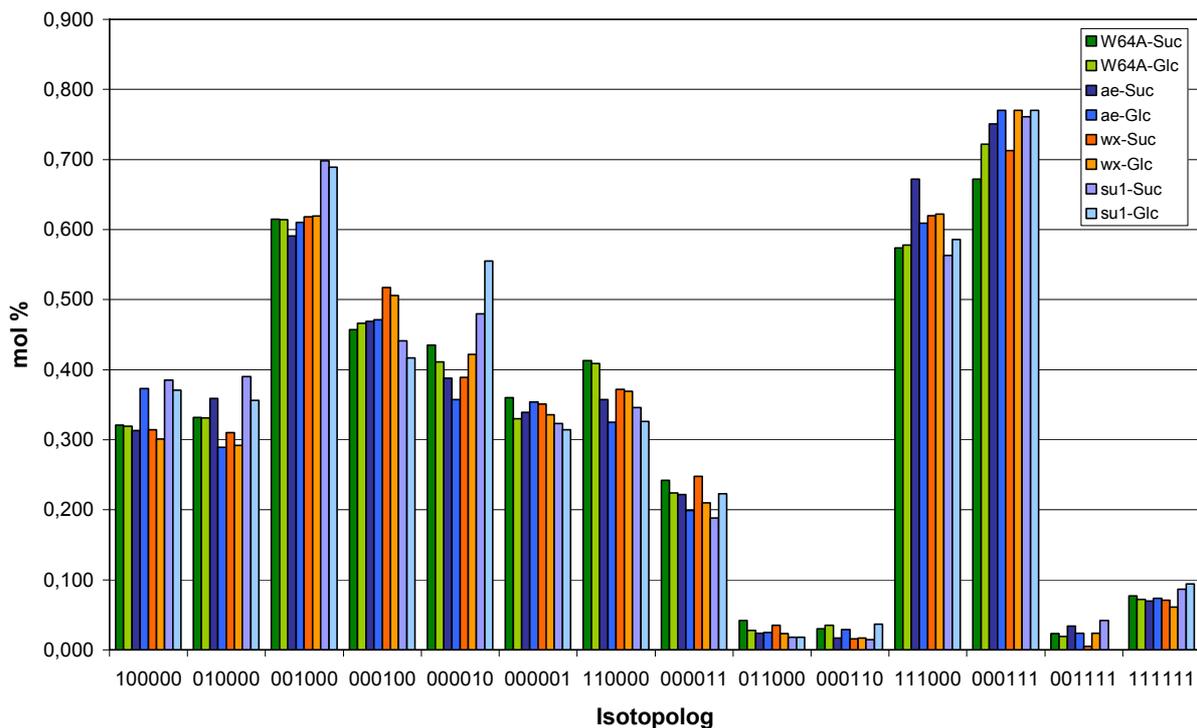
**Abb. 4.23:** Isotopologuenmuster von Glucose aus hydrolysiertes Stärke aus *Sh2-Rev6-Glc* und *Sh2-Rev6-Suc* Endosperm. Die Körner wurden von 15-22 DAP einmal mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose und einmal mit  $[U-^{13}C_{12}]$ Saccharose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben. Die Isotopologuenmuster der Suc-Markierungen sind nicht reproduzierbar. f, Feld; g, Gewächshaus.

### 4.7.3 Mutanten, die die Synthese von Amylopektin und Amylose beeinträchtigen

Mit *amylose extender (ae)*, *waxy (wx)* und *sugary1 (su1)* wurden Mutanten ausgewählt, die erst sehr spät in den Stärkesyntheseweg eingreifen. Sie betreffen drei von mindestens 10 Enzymen, die an der Bildung von Amylopektin und Amylose aus ADP-Glucose beteiligt sind. In *wx* Endosperm fehlt die für die Amylosesynthese benötigte Stärkekorngelbende-Stärke-Synthase (GBSSI). In *ae1* und *su1* Endosperm sind die Aktivitäten von SBEIIb bzw. Isoamylase stark reduziert. Alle drei Mutationen führen zu veränderten Stärkezusammensetzungen und -strukturen. Die Stärke von *wx* enthält gar keine Amylose, in

*ael*-Stärke ist der Anteil an Amylose stark erhöht und in Endosperm von *su1* Körnern wird durch das Fehlen des Debranching-Enzyms SU1 das wasserlösliche Polymer Phytoglykogen auf Kosten von Amylopektin angereichert.

Die Isotopologemuster von Glucose aus totalhydrolysiertes Stärke sind für die drei Mutanten und den Wildtyp nahezu identisch; es können keine signifikanten Änderungen gemessen werden (Abb. 4.24). Dementsprechend liegen die RMSD-Werte zwischen 2,7 und 6,2. Sie fallen für *wx*-Stärke am niedrigsten und für *su1*-Stärke am höchsten aus (Tab. 4.12).

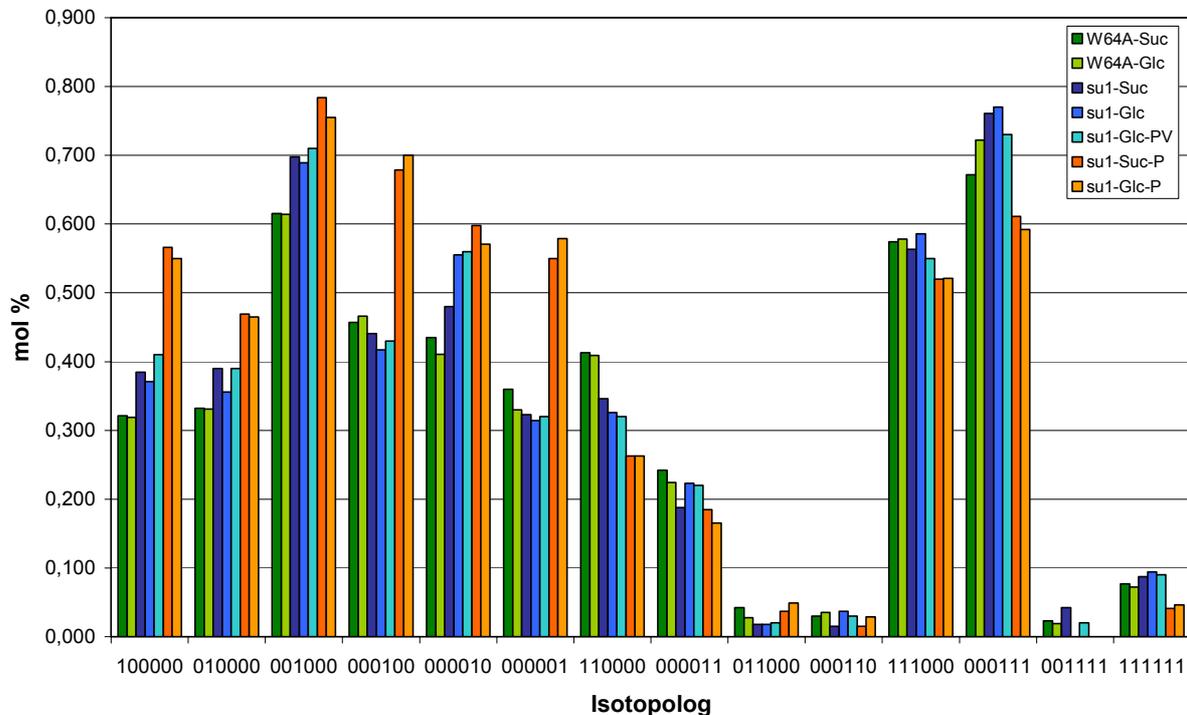


**Abb. 4.24:** Isotopologemuster von Glucose aus hydrolysiertes Stärke aus WT (W64A), *ae*, *wx* und *su1* Endosperm. Die Körner wurden von 15-22 DAP einmal mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose und einmal mit  $[U-^{13}C_{12}]$ Saccharose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben.

Da die Biosynthese von Phytoglykogen in *su1* Endosperm und generell die Bedeutung von Debranching-Enzymen für die Stärkebiosynthese noch strittig ist, wurde aus markiertem *su1* Endosperm neben Stärke auch Phytoglykogen isoliert, enzymatisch hydrolysiert, die entstandene Glucose gereinigt und am NMR vermessen.

Wie in der Stärke besteht im Isotopologemuster von Phytoglykogen kein Unterschied zwischen der Glucose- und der Saccharose-Markierung. Es konnten jedoch signifikante Unterschiede zwischen *su1*-Phytoglykogen und *su1*-Stärke festgestellt werden (Abb. 4.25). Während das Muster der *su1*-Stärke keine signifikanten Unterschiede zu Wildtypstärke

aufweist, wurde die in *su1* Phytoglykogen eingebaute Glucose intensiver gecycelt. Die einfachmarkierten Isotopologe kommen in höheren, die mehrfachmarkierten in niedrigeren Mengen vor. Der statistische Vergleich von *su1*-Stärke mit *su1*-Phytoglykogen bestätigt mit RMSD-Werten von 13,2 und 12,1 (Tab. 4.14) die Unterschiede.



**Abb. 4.25:** Isotopologemuster von Glucose aus total hydrolysierter Stärke (St) aus WT (W64A) Endosperm und aus total hydrolysierter Stärke (St), partiell hydrolysierter Stärke (St-PV) und hydrolysiertem Phytoglykogen (P) aus *su1* Endosperm. Die Körner wurden von 15-22 DAP einmal mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose und einmal mit [U-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]Saccharose markiert. Die Konzentrationen der Isotopologe beziehen sich auf eine Gesamtanreicherung von 2,50 % und sind als Überschuss gegenüber der natürlichen Anreicherung angegeben.

Phytoglykogen ist ein wasserlösliches Polysaccharid, welches nicht in das Stärkekorn integriert wird und daher möglicherweise einem enzymatischen Angriff ausgesetzt ist. Um zu testen, ob ein kontinuierlicher Auf- und Abbau von Phytoglykogen für die unterschiedlichen Muster verantwortlich ist, wurden die Gesamtanreicherungen von isolierten Metaboliten per IRMS bestimmt. Eine hohe Turnoverrate von Phytoglykogen würde sich in einer hohen Gesamtanreicherung äußern. Anhand der Ergebnisse in Tab. 4.15 kann dies verneint werden. Sowohl im Suc- als auch im Glc-Experiment ist die <sup>13</sup>C Anreicherung von Phytoglykogen sogar niedriger als die von Stärke. Es kann damit aber nicht ausgeschlossen werden, dass ein Turnover in den äußeren Verzweigungen des Phytoglykogens wie in Blattgewebe der Phytoglykogen akkumulierenden *A. thaliana* Mutanten *atisa-1* und *atisa-2* stattfindet (Delatte et al. 2005).

**Tab. 4.14:** Statistischer Vergleich der Isotopologenmuster von Glucose aus hydrolysierte Stärke und hydrolysiertem Phytoglykogen aus *sul* Endosperm.

	RMSD [ $\times 10^{-2}$ ]	
	Markierung mit Glucose	Markierung mit Saccharose
W64A-Stärke : <i>sul</i> -Stärke	5,5	5,0
<i>sul</i> -Stärke : <i>sul</i> -Stärke-PV	2,2	--
<i>sul</i> -Stärke : <i>sul</i> -Phyto	13,2	12,1

**Tab. 4.15:** Gesamtanreicherungen von Glucose aus Stärke und Phytoglykogen von *sul* Endosperm; bestimmt durch IRMS.

	Gesamtanreicherung an $^{13}\text{C}$ in %	
	Markierung mit Glucose	Markierung mit Saccharose
W64A-Stärke	2,13	2,15
<i>sul</i> -Stärke	2,19	2,00
<i>sul</i> -Stärke-partieller Verdau	2,50	--
<i>sul</i> -Phytoglykogen	1,97	1,76
<i>sul</i> -lösl. Zucker	2,56	--

Eine hohe Turnoverrate von Phytoglykogen als Ursache für die unterschiedlichen Muster von Phytoglykogen und Stärke kann weiterhin durch den Vergleich von total verdauter mit partiell verdauter *sul*-Stärke ausgeschlossen werden. Bei dem partiellen Verdau wurde entsprechend dem Protokoll von Keeling et al. (1988) Stärke direkt, also ohne vorheriges Gelatinisieren mit NaOH, mit Amyloglucosidase für 60 min hydrolysiert. Durch diese Prozedur werden die Stärkekörner langsam von außen nach innen verdaut und man erhält neu synthetisierte Stärke mit einer höheren Anreicherung (2,50 %) als vom Kompletterverdau (2,19 %). Wäre lediglich ein hoher Turnover von Phytoglykogen für das abweichende Muster verantwortlich, müssten die Stärkeglucosen aus den zwei Versuchen ein unterschiedliches Muster liefern und das Isotopologenmuster des Phytoglykogens müsste dem von neu synthetisierter Stärke ähneln. Die Glucosen aus dem partiellen und dem kompletten Stärkeverdau zeigen aber im direkten Vergleich ein ähnliches Isotopologenmuster (Abb. 4.25) mit niedriger RMSD (2,2; Tab. 4.12), das von dem des Phytoglykogens deutlich abweicht.

## 5 Diskussion

### 5.1 Leistungsfähigkeit der Methode

Die Sterilkultur von Maiskörnern nach dem Protokoll von Gengenbach ist eine einfache und doch effektive Möglichkeit, Maiskörner unter definierten Bedingungen ähnlich *in planta* anzuziehen (Gengenbach 1977, siehe 2.4). Die Methode wurde hier dazu genutzt, markierte Verbindungen in Form von  $[U-^{13}C_6]$ Glucose oder  $[U-^{13}C_{12}]$ Saccharose in das Korn einzubringen. Während einer siebentägigen Inkubationsperiode hatten die Körner Zeit, die Markierung aufzunehmen, sie zu verstoffwechseln und unter anderem in Form von Stärke abzulagern. In den meisten Markierungsexperimenten, vor allem dann, wenn sie mit einer Metaboliten Flussanalyse (MFA) kombiniert werden, wird eine Vielzahl von unterschiedlichen Metaboliten untersucht (Sriram et al. 2004, Dieuaide-Noubhani et al. 1995). Hier wurde die Untersuchung auf eine einzige Verbindung – Glucose aus hydrolysiertes Stärke bzw. Phytoglykogen – beschränkt.

Dabei ist zu beachten, dass die Maiskörner mit anhaftendem Kolbengewebe, welches eine aktive Rolle in der Aufnahme und Metabolisierung von Nährstoffen spielt, kultiviert werden. Es ist daher denkbar, dass bereits im Kolbengewebe ein Hexose-Cycling stattfindet und das Muster der Stärkeglucose die Summe der Reaktionen des Kolbens und des Korns repräsentiert. Werden beispielsweise Maiskörner in Sterilkultur mit  $[U-^{13}C_6]$ Glucose markiert, dann zeigen die aus dem Kolbengewebe isolierten Aminosäuren aus dem Proteinhydrolysat eine intensive Verteilung der Markierung (Glawischnig et al. 2001).

Nur 13 % der Glucoseeinheiten aus Maisstärke stammen aus direkt eingebauten Hexosen. Die übrigen 87 % landen über metabolische Umwege in Stärke (Glawischnig et al. 2002). Im zentralen Kohlenhydratmetabolismus werden Hexosen durch die Reaktionen der Glykolyse, des Pentosephosphatweges, des Citratzyklus und der Gluconeogenese fragmentiert und resynthetisiert. Wird Maisendosperm mit vollmarkierten Zuckern versorgt, so äußert sich dieses Hexose-Cycling in der Bildung von für die jeweiligen Stoffwechselwege typischen Glucoseisotopologen. Anhand des Isotopologenmusters der Glucose aus Stärke können daher qualitative und quantitative Aussagen über die Beteiligung der Stoffwechselwege getroffen werden.

Die Verwendung eines Überschusses an unmarkierten Verbindungen (hier 30:1) rechtfertigt es, die Analyse von 64 theoretisch möglichen Glucoseisotopologen auf 21 zu beschränken. (Eisenreich et al. 2004). Die NMR-Analyse von löslichen Zuckern wird trotzdem in der

Literatur als schwierig eingestuft (Roscher 2001), und in vielen Arbeiten werden die Ergebnisse lediglich als Rohdaten dargestellt (Sriram et al. 2004, Schwender et al. 2003). Arbeiten am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der TU München ist es zu verdanken, dass die Konzentrationen aller 21 möglichen Isotopologe ermittelt werden können. Dies basiert im Wesentlichen auf der Bestimmung der NMR-Daten von Glucose (Glawischnig et al. 2002) und der Entwicklung eines Algorithmus zur Dekonvolution der aus dem Spektrum abgeleiteten X-Gruppen (Eisenreich et al 2004).

Die Kombination aus Markierung mit  $^{13}\text{C}$  und NMR-Spektroskopie ist eine leistungsfähige Methode mit unterschiedlichsten Anwendungsbereichen in der Pflanzenforschung (Ratcliffe und Sachar-Hill 2001). Bereits durch die ausgefeilte Analyse eines einzigen Metaboliten (Glucose) konnten in der Arbeit verschiedenste biochemische und pflanzenphysiologische Fragestellungen behandelt und diskutiert werden.

Die Daten wurden quantitativ mit dem 4F Programm ausgewertet (Ettenhuber und Eisenreich 2004). Dabei werden aus dem Glucosemuster die Anteile der vorher definierten Prozesse „emp“, „ppp1“, „ppp2“, „tca“ und „dtr“ an der Bildung der Isotopologe berechnet.

Wichtige Einblicke ergaben sich auch durch eine rein qualitative Auswertung. Durch einen Vergleich des Musters von verschiedenen Wildtyplinien und Stärkemutanten konnten die Einflüsse von Anzuchtbedingungen, Kohlenstoffquellen, des genetischen Hintergrundes und einer Reihe von Mutationen auf den zentralen Kohlenhydratmetabolismus erfasst werden. Die überraschenden Ergebnisse aus den Stärkemutanten erlaubten zusätzlich Aussagen über die Biosynthese von Phytoglykogen. Neue Erkenntnisse konnten auch über den Metabolismus in *sh2* und *bt2* Mutanten gewonnen werden.

## 5.2 Quantitative Auswertung der Ergebnisse: „Flussanalyse“

Die Isotopologenverteilung der Glucose wurde dazu genutzt, die Anteile von verschiedenen Stoffwechselwegen zu quantifizieren. Die hier entwickelte und angewandte Methode muss deutlich von einer herkömmlichen MFA abgegrenzt werden, die sich idealerweise zum Ziel setzt, eine komplette Flusskarte eines Metabolismus zu erstellen und die relativen Flüsse zueinander zu quantifizieren (Sauer 2003). Die in den eigenen Versuchen berechneten Daten aus dem 4F Programm hingegen geben die Anteile zuvor definierter Stoffwechselprozesse an der Formierung der gemessenen Glucoseisotopologe wieder.

Mit dem gewählten Ansatz muss mit wenigen Regeln ein komplexes Stoffwechselsystem beschrieben werden. Es gelang hier durch die Definition von fünf Transferregeln, die

Reaktionen aller wichtigen zentralen Biosynthesewege zu erfassen und die Entstehung sämtlicher detektierbarer Isotopologen zu erklären. Es wird ein Hexose-Cycling über die Glykolyse/Gluconeogenese („emp“), über den Citratzyklus mit anschließender Gluconeogenese („tca“) und über die Reaktionen des Pentosephosphatweges („ppp1“, „ppp2“) berücksichtigt. Im Falle des PPP werden sowohl Vorwärtsreaktionen durch den oxidativen und nichtoxidativen Teil („ppp1“) als auch Austauschreaktionen von Hexosen und Triosen mit Pentosen durch den nichtoxidativen Teil („ppp2“) abgedeckt.

Die Daten lassen sich anhand der definierten Regeln mit einer Gesamtabweichung von 11,0-13,8 % fitten, wenngleich einzelne Isotopologe um über 40 % voneinander abweichen. Es bleibt daher fraglich, wie gut die Regeln das System beschreiben können und wie nahe oder fern die Ergebnisse an der Realität sind. Dabei gilt es zu bedenken, dass durch die Regeln Extremsituationen definiert werden und bei deren Definition Vereinfachungen vorgenommen werden müssen. Zum Beispiel wird in sämtlichen Regeln die tatsächliche, positionsspezifische Verteilung der C-Atome ignoriert.

Zur Festigung der Ergebnisse wäre ein Kontrollexperiment anzuraten. Zum Beispiel könnte eine Markierung mit [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Glucose (Roscher 2001) als zweiter Datensatz wichtige Zusatzinformationen liefern.

### **5.3 Flexibilität des Stoffwechsels: Flussänderungen mit der Entwicklung des Korns**

Viele Biosynthesewege konnten in den letzten Jahren und Jahrzehnten auf biochemischer und molekularer Ebene aufgeschlüsselt werden. Mit dem Einzug von „high-throughput“ Methoden entwickelten sich die Begriffe Genomics, Transkriptomics, Proteomics und Metabolomics und erlaubten eine umfassende Beschreibung von Zellen auf mehreren Ebenen. Um den Stoffwechsel eines Metabolismus wirklich zu verstehen, ist zusätzlich die Bestimmung von metabolen Flüssen unerlässlich. Trotz der Bedeutung der Flussanalyse wird dieser in der Pflanzenforschung bisher nur eine geringe Aufmerksamkeit entgegengebracht. Entsprechend existieren hierzu nur wenige Veröffentlichungen (Schwender et al. 2004). Ein Vergleich der bisher durchgeführten Flussanalysen von Pflanzen zeigt viele Ähnlichkeiten und deutet auf einen über verschiedene Spezies hinweg konservierten, stabilen Zentralmetabolismus in Pflanzenzellen hin (Rontein et al. 2002).

Es findet zum Beispiel das Triose-Hexose-Cycling (THC) in verschiedenen Pflanzen und Pflanzenteilen in einem ähnlichen Ausmaß statt. Triose-Hexose-Cycling (THC) ist ein so

genannter „futile cycle“, also ein scheinbar unnützer Kreislauf, bei dem unter Verbrauch von Energie (meist Hydrolyse von ATP) zwei Verbindungen ohne Nettofluss ineinander umgewandelt werden (Portais und Delort 2002). Dies kann am einfachsten durch Markierungsexperimente mit  $[1-^{13}\text{C}_1]$ - oder  $[6-^{13}\text{C}_1]$ Glucose nachgewiesen werden. THC bewirkt dabei durch Glykolyse/Gluconeogenese und Reaktionen des Pentosephosphatweges eine Verteilung der Markierung auf die C6- bzw. C1-Position. Beobachtet wurde dieser Effekt schon in den 50er Jahren, aber erst durch Keeling et al. (1988) an Weizenkörnern einem Triose-Hexose-Austausch zugeschrieben. Die Umverteilung der Markierung in der Glucose von der C1- auf die C6-Position wurde in vielen Pflanzen gemessen und schwankt in einem relativ kleinen Rahmen. Sie beträgt zum Beispiel in Maisendosperm 12-15 %, in Kartoffeln 13 % (Hatzfeld und Stitt, 1990), in Weizenkörnern 12-29 % (Keeling et al. 1988), in Kartoffelscheiben 19 %, in Kotyledonen von *Vicia faba* 14 % (Viola et al. 1991), in Wildtyp und transgenem Tabak 14-25 % (Fernie et al. 2001), in Maiswurzelspitzen 18 % (Dieuaide-Noubhani et al. 1995) und in *Brassica napus* Embryonen 27 % (Schwender et al. 2003).

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit kann die Umverteilung der Markierung von der C1- auf die C6-Position nicht direkt entnommen werden. Da aber die Isotopologe  $\{000010\}$ ,  $\{000100\}$  und  $\{000011\}$  ausschließlich durch THC aus den jeweiligen spiegelbildlichen Isotopologen gebildet werden (siehe 4.1.3.2), lässt sich anhand der Verhältnisse  $\{010000\}/\{000010\}$ ,  $\{001000\}/\{000100\}$  und  $\{110000\}/\{000011\}$  das THC abschätzen. Für sämtliche Markierungsexperimente ergeben sich daraus Umverteilungen von etwa 40 %. Dieser Wert liegt deutlich über den bisher in der Literatur ermittelten Werten.

Es wurden Körner der Linie W22 zu drei verschiedenen Entwicklungszeiträumen (11-18 DAP, 18-25 DAP und 25-32 DAP) mit  $[U-^{13}\text{C}_6]$ Glucose markiert. Die Glucoseisotopologe der Stärken wurden in den Versuchen je nach Entwicklungsstatus des Maisendosperms zu 57-71 % durch Glykolyse/Gluconeogenese, zu 19-30 % durch den Pentosephosphatweg und zu 5-12 % durch TCA/Gluconeogenese gebildet. Dies bestätigt das generelle Bild in Pflanzen, dass die metabolen Flüsse durch die Glykolyse und den PPP hoch sind und dabei der glykolytische Fluss überwiegt. In *Brassica napus* Embryonen fließen beispielsweise 35 % der Glucose in den oxidativen PPP und 56 % in die Glykolyse (Schwender et al. 2004). In Tomatenzellen und Maiswurzelspitzen landen jeweils etwa 28 % der in die Zelle eintretenden Glucose im PPP (Rontein et al. 2002, Dieuaide-Noubhani et al. 1995).

Neben den Ähnlichkeiten sind auch Unterschiede in den Metabolismen der verschiedenen Pflanzen zu erkennen. Trotz ausreichender Zufuhr von Glucose durch das Kulturmedium findet in Maisendosperm in allen hier durchgeführten Experimenten Gluconeogenese, d.h. der

Aufbau von Hexosen aus Oxalacetat, statt. Gluconeogenese konnte auch in Salat Embryonen (Salon et al. 1988), nicht aber in Sojabohnen Embryonen (Sriram et al. 2004), Maiswurzelspitzen (Dieuaide-Noubhani et al. 1995) und Tomaten (Rontein et al. 2002) detektiert werden.

Vermutlich aufgrund der kostspieligen markierten Verbindungen und der aufwendigen Analyse betrachten die meisten bisher veröffentlichten Flussanalysen in Pflanzen lediglich einen einzigen Markierungszeitraum und liefern damit eine „Momentaufnahme“ des Metabolismus. Lediglich an Zellkulturen von Tomaten (Rontein et al. 2002) und Karotten (Krook et al. 1998) wurden unterschiedliche Entwicklungsstufen gesondert betrachtet. Tomatenzellen besitzen an drei verschiedenen Wachstumsphasen im Zentralmetabolismus hohe und stabile Flüsse, während die Flüsse durch anabole Pfade flexibel und vergleichsweise niedrig sind (Rontein et al. 2002).

In Abhängigkeit vom Entwicklungsstand des Korns zeigen sich die Flüsse des zentralen Metabolismus in Maisendosperm flexibel. Die Anteile der Glykolyse, des PPP und des Citratzyklus an der Bildung von Glucoseisotopologen ändern sich mit dem Alter des Korns. Im mittleren Zeitraum (18-25 DAP) sind die Anteile des Pentosephosphatweges („ppp1“ + „ppp2“) und des Citratzyklus („tca“) niedrig und gleichzeitig der direkte Transfer von Glucose in Stärke („dtr“) und die Glykolyse („emp“) hoch. In der frühen (11-18 DAP) und späten (25-32 DAP) Entwicklungsphase herrscht ein umgekehrtes Bild; die Anteile des PPP und des Citratzyklus sind hoch und der direkte Transfer und die Glykolyse niedrig. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass in Maisendosperm mit Stärke, Lipiden und Proteinen drei verschiedene Speicherstoffe akkumuliert werden, die einen unterschiedlichen Bedarf an Vorläufern haben. Stärke und Lipide werden ab ca. 10 DAP linear angereichert (Abb. 4.9, Ingle et al. 1965). Der Proteinanteil steigt hingegen in der frühen Phase zunächst stark an, erreicht in der mittleren Phase ein Plateau und steigt in der späten Phase nochmals stark an (Ingle et al. 1965). Die meisten Aminosäuren für die Proteinbiosynthese werden aus Intermediaten des PPP und Citratzyklus gebildet. Die hohen Anteile von „ppp1“, „ppp2“ und „tca“ am Cycling in der frühen und späten Markierungsperiode könnten also dadurch bedingt sein, dass in diesen Intervallen vermehrt Prekursoren für Proteinbiosynthese zur Verfügung gestellt werden müssen. In der mittleren Markierungsperiode wird hingegen hauptsächlich Stärke akkumuliert.

Diese Theorie ließe sich durch Verwendung von Linien mit veränderten Öl- und Proteingehalten (Moose et al. 2004) untermauern. Dabei sollten beispielsweise Maislinien mit hohen Proteingehalten ein erhöhtes Cycling zeigen.

#### 5.4 Stabilität des Stoffwechsels

Von *Zea mays* existieren eine Reihe von Mutanten, die den Stärkegehalt und die Stärkezusammensetzung im Endosperm verändern (Boyer und Hannah 2001). Die genetische und biochemische Charakterisierung dieser Mutanten hat Mais als Modellsystem für die Synthese von Reservestärke in Getreide etabliert (Nelson und Pan 1995). Es wurden zehn Mutanten zur Charakterisierung des zentralen Kohlenhydratmetabolismus mittels  $^{13}\text{C}$ -Markierung und NMR-Analyse gewählt. Die Mutationen decken ausgehend von Saccharose alle wichtigen Schritte der Stärkebiosynthese ab und betreffen die Prozessierung von Saccharose (*mn1*, *sh1*, *sh1 sus1*), die Synthese und den Transport von ADP-Glucose (*bt2*, *sh2*, *Sh2-Rev6*, *bt1*) und die Biosynthese von Amylose (*wx*) und Amylopektin (*ae*, *su1*).

Es ist bekannt, dass sich einzelne Mutationen nicht nur auf die eigentliche genetische Läsion beschränken, sondern pleiotrope Effekte auf den gesamten Metabolismus ausüben. Mit Ausnahme von *wx* resultieren sämtliche Mutationen in einem reduzierten Trockengewicht des Korns und in kleineren Stärkekörnern (Boyer und Hannah 2001). Mutationen äußern sich auch in veränderten Metabolitkonzentrationen. Neben Stärke, wasserlöslichen Polysacchariden (WSP) und löslichen Zuckern (Creech 1968) werden auch die Konzentrationen von Intermediaten der Glykolyse wie Hexose-P und Triose-P (Tobias et al. 1992) und Nucleotiden und Nucleotidzuckern (Shannon et al. 1996) im Vergleich zu Wildtypen verändert. Dabei geht ein verminderter Stärkegehalt meist mit einem erhöhten Gehalt an Saccharose (Shannon et al. 1996) und Triosen einher (Tobias et al. 1992).

Der Kohlenhydratmetabolismus von verschiedenen Mutanten wurde auch auf Ebene von Enzymaktivitäten untersucht. Hier konnten sowohl Änderungen in den Aktivitäten der eigentlichen Stärkeenzyme wie AGPase, UGPase, SSs, SBE und Susy (Shannon et al. 1996, Singletary et al. 1997) als auch Aktivitätsänderungen von Enzymen der Glykolyse wie Hexokinasen, PGM, PGI und PFP (Doehlert und Kuo 1990, Singletary et al. 1997) detektiert werden. Beispielsweise bewirken die Mutanten *sh1*, *bt2* und *ae1* eine um etwa zwei- bis fünffache Steigerung der Aktivität einer Vielzahl von Enzymen der Stärkesyntheseweges außerhalb des strukturellen Gens (Singletary et al. 1997).

Untersuchungen an Mutanten weisen auch darauf hin, dass Stärke, Proteine und Lipide nicht unabhängig voneinander synthetisiert werden. Die an Stärke stark reduzierten Mutanten *bt2*, *bt1* und *sh2* haben gleichzeitig einen verminderten Anteil an Zein, einem Speicherprotein (Lee und Tsai 1985). In *sh2*, *bt2*, *sh1* und *bt1* Körner sind nicht nur die Transkriptmengen von

Enzymen der Stärkesynthese, sondern auch die der Proteinsynthese (S Zein, L Zein) erhöht (Giroux et al. 1994).

Obwohl in der Literatur gezeigt werden konnte, dass in Stärkemutanten der gesamte Kohlenhydratmetabolismus im Vergleich zum Wildtyp verändert wird, konnten kaum Unterschiede in den Isotopologenmustern festgestellt werden. Von den zehn untersuchten Mutanten zeigten nur *mn1* und *bt2* ein unterschiedliches Muster der Glucose aus hydrolysierten Stärke. Zusätzlich weicht das Muster der Glucose aus hydrolysiertem Phytoglykogen der *su1* Mutante ab. Der zentrale Kohlenhydratmetabolismus von Maisendosperm ist offensichtlich enorm stabil. Einzelne Mutationen bewirken zwar vielfältige Änderungen, die relativen Flüsse durch die Glykolyse, durch den Pentosphosphatweg und den Citratzyklus werden dadurch aber nicht erkennbar geändert.

Die in Mutanten beobachteten pleiotropen Effekte werden häufig den erhöhten Konzentrationen an löslichen Zuckern zugeschrieben (Giroux et al. 1994, Singletary et al. 1997). Die Expression vieler Gene wird durch Kohlenhydrate moduliert (*sugar sensing*). Vor allem Gene, die Enzyme kodieren, die an der Synthese von Speicherstoffen beteiligt sind, werden durch hohe Zuckergehalte positiv reguliert (Koch 1996). In Maisendosperm wird zum Beispiel die Transkription und Aktivität von AGPase (Giroux et al. 1994, Doehlert und Kuo 1990) und die Expression von SBEI (Kim und Gultinan 1999) mit steigender Saccharosekonzentration erhöht. Weitere Beispiele für eine durch Saccharose induzierte Expression von Genen des Stärkesyntheseweges sind u. a. in Isoamylase in Gerste (Sun et al. 1999) und in AGPase (Müller-Röber et al. 1990), SuSy (Salanobat und Belliard 1989), SS (Visser et al. 1991) und SBE (Kossmann et al. 1991) in Kartoffel zu finden. Eine erhöhte Konzentration an Saccharose und Glucose im Vergleich zum Wildtyp konnte hier im Endosperm der Mutanten *sh1 sus1*, *bt2*, *sh2* und *su1* gemessen werden. Von diesen Mutanten weicht lediglich das Isotopologenmuster der Stärkeglucose von *bt2* nennenswert vom Muster des Wildtyps ab. Die Isotopologenmuster von *sh1 sus1*, *sh2* und *su1* sind gegenüber dem Muster der Wildtypen kaum verändert. Es besteht also kein einfacher Zusammenhang zwischen der Konzentration der löslichen Zucker und den metabolischen Flüssen des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels.

In allen untersuchten Mutanten ist laut Literatur die Konzentration an Stärke im Vergleich zum WT verändert. Die Unterschiede reichen von einer Erhöhung des Stärkegehalts um 15 % (*Sh2-Rev6*), über eine leichte Reduktion um 5 % (*wx*) bis hin zu einer extremen Reduktion um 80 % (*bt1*, *bt2*, *sh2*). Die ähnlichen Isotopologenmuster der meisten Mutanten zeigen, dass die metabolischen Flüsse nicht mit der Menge der produzierten Stärke (*sink strength*) korrelieren.

Die Markierungsexperimente mit Mutanten zeigen, dass der zentrale Kohlenhydratmetabolismus in Maiskörnern sehr stabil und unabhängig von den Konzentrationen an Stärke, löslichen Zuckern und anderen Metaboliten ist. Dieses Ergebnis ist überraschend, weil beispielsweise in Kartoffeln beobachtet wurde, dass eine niedrige Konzentration an Saccharose mit einer erhöhten glykolytischen Aktivität korreliert (Trethewey et al. 1999) und in Tabak ein hoher Gehalt an Fructose-1,6-P<sub>2</sub> das Cycling zwischen Triose-P und Hexose-P stimuliert (Ferne et al. 2001).

### **5.5 Metabolismus in *amylose extender*, *waxy* und *sugary1* Mutanten**

Stärke setzt sich aus zwei verschiedenen Makromolekülen zusammen, dem Amylopektin und der Amylose. Amylose ist ein überwiegend lineares Polymer bestehend aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpfter Glucose mit wenigen Verzweigungen. Amylopektin besteht ebenso hauptsächlich aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpfter Glucose, enthält aber zusätzlich ca. 4-5 %  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen und ist daher stark verzweigt. Im reifen Korn besteht Wildtyp Stärke aus 20-30 % Amylose und 70-80 % Amylopektin (Kossmann und Lloyd 2000). Ob sich eine Änderung der relativen Anteile der beiden Polysaccharide an der Gesamtstärke auf den zentralen Kohlenhydratmetabolismus auswirkt, wurde anhand der Mutanten *wx*, *ae* und *sul* getestet. Die Stärke von *wx* Endosperm besteht durch das Fehlen von GBSSI ausschließlich aus Amylopektin (Nelson und Rines 1962), in der Stärke von *ae* Endosperm ist durch das Fehlen von SBEIIb der Anteil an Amylose stark erhöht (Stinard et al. 1993) und *sul* Endosperm besitzt eine Stärke mit weniger, aber stärker verzweigtem Amylopektin (Wang et al. 1993). Zwischen den Isotopologengmustern von Glucose aus *wx*-, *ae*-, *sul*- und WT-Stärke gibt es keine signifikanten Unterschiede. Die Zusammensetzung der Reservestärke wirkt sich also nicht auf die Flüsse des zentralen Kohlenhydratmetabolismus aus.

Es ist bekannt, dass sich trotz der strukturellen Ähnlichkeit die beiden Polymere in Pflanzen nicht direkt voneinander ableiten lassen, d.h. weder ist Amylose eine Vorstufe von Amylopektin, noch ist Amylopektin eine Vorstufe von Amylose (Denyer et al. 1999). Es existieren vielmehr zwei parallele Synthesewege. Im Maisendosperm führt der eine Weg durch die Aktion von Stärkekorngewebener-Stärke-Synthase I (GBSSI) zu Amylose. Der andere Weg führt unter Beteiligung von Stärke-Synthasen (SSI, SSIIa, SSIIb, SSIII), Stärke-Branching-Enzymen (SBEI, SBEIIa, SBEIIb) und Stärke-Debranching-Enzymen (Isoamylase, Pullulanase) zu Amylopektin (Tetlow et al. 2004). Seit den 60er Jahren ist durch

die Arbeiten von Leloir bekannt, dass die Glucosemonomere beider Stärkemoleküle von ADP-Glucose abgeleitet werden (Recondo und Leloir 1961). Die ähnlichen Muster der Stärkeglucosen der drei Mutanten bedeuten, dass sich sowohl Amylose als auch Amylopektin aus einem einzigen ADP-Glucose-Pool ableiten. Im Cytoplasma synthetisierte ADP-Glucose wird in den Plastiden transportiert und dort ohne zusätzliches plastidäres Cycling (siehe 5.7) in parallelen Wegen in Amylopektin und Amylose abgelagert.

Die große Ähnlichkeit der beobachteten Isotopologemuster weist auch darauf hin, dass der Turnover, d.h. die gleichzeitige Synthese und Degradation, von Amylopektin und Amylose ähnlich ist. Eine alternative Erklärung für die ähnlichen Isotopologemuster von *ae-*, *wx-*, *sul-* und WT-Stärke ist, dass der Turnover aller Stärkekomponenten generell so gering ist, dass er sich nicht signifikant auf das Markierungsmuster auswirkt. Ein aktiver Stärketurnover in nichtphotosynthetischen Geweben von Pflanzen konnte bisher nur vereinzelt nachgewiesen werden (Pozueta-Romero und Akazawa 1993, Neuhaus et al. 1995, Sweetlove et al. 1996). Dabei sind transgene Kartoffeln mit einer um das sechsfache erhöhten Aktivität an AGPase das bisher einzige Speicherorgan, in dem ein Stärketurnover dokumentiert wurde (Sweetlove et al. 1996). In diesem Fall wurde aber in Wildtyp Kartoffeln kein bzw. nur ein sehr geringer Turnover beobachtet.

## 5.6 Produktion von Stärke und Phytoglykogen in *sugary1* Mutanten

Durch Untersuchungen von Mutanten kam man zu der überraschenden Erkenntnis, dass neben Stärke-Synthasen und Stärke-Banching-Enzymen auch Debranching-Enzyme eine entscheidende Rolle in der Stärkesynthese spielen. Ein Verlust von Isoamylase führt zur Anreicherung des hochverzweigten, wasserlöslichen Glucosepolymers Phytoglykogen auf Kosten von Amylopektin. Entsprechende Mutanten konnten in Mais (James et al. 1995), Reis (Nakamura et al. 1997), Arabidopsis (Zeeman et al. 1998) und Chlamydomonas (Mouille et al. 1996) identifiziert werden.

Der genaue Beitrag, den die DBEs zur Stärkebiosynthese leisten, ist bislang ungeklärt. In der Literatur haben sich dazu zwei verschiedene Modelle herauskristallisiert. Das „Glucan-Trimming“-Modell (Myers et al. 2000) geht von einer direkten Beteiligung der DBEs an der Stärkesynthese aus. Stärke-Synthasen und Branching-Enzyme synthetisieren an der Oberfläche des Stärkekorns Präamylopektin, eine Substanz, die aufgrund ihrer starken Verzweigung nicht kristallisieren kann. Debranching-Enzyme „trimmen“ das Präamylopektin, d.h. überflüssige Verzweigungen werden entfernt und es entsteht kristallisationsfähiges

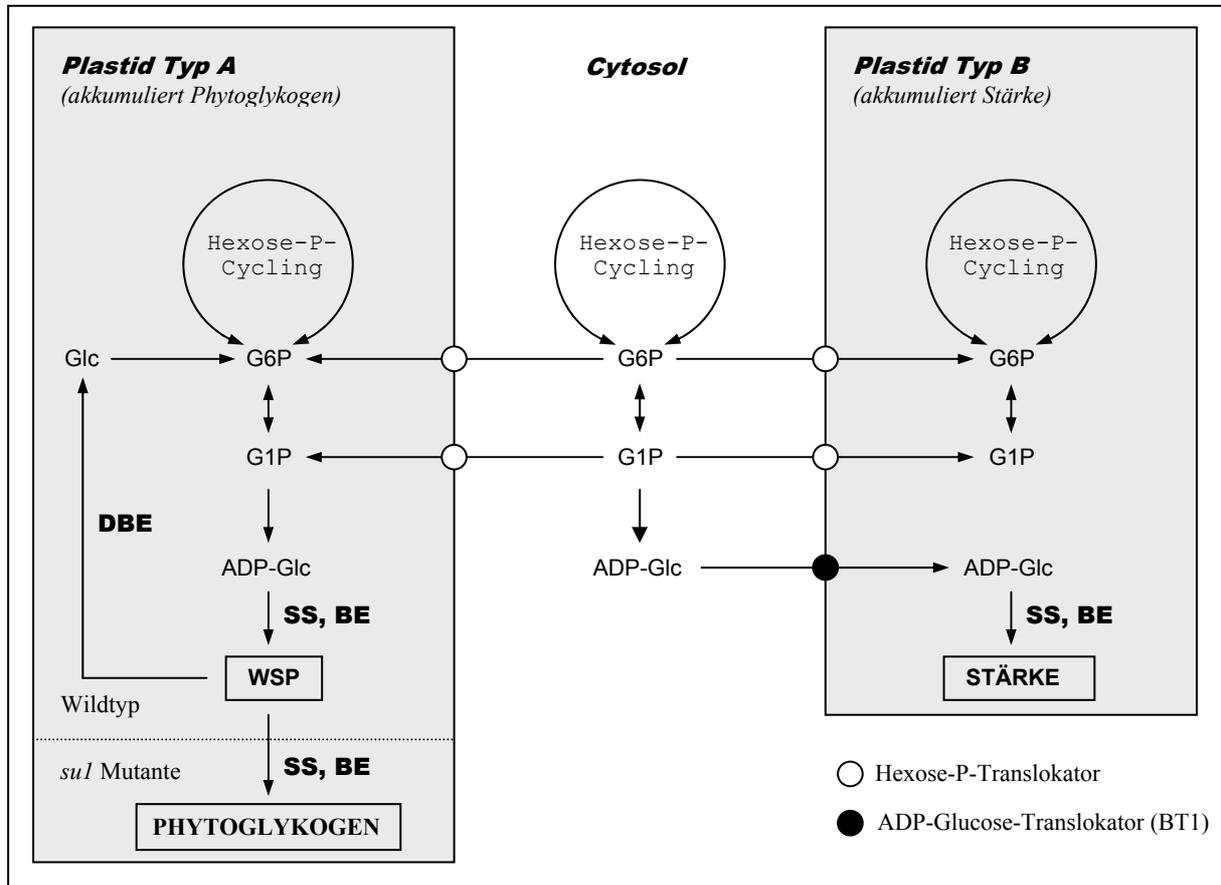
Amylopektin. In *sul* Mutanten wird Präamylopektin nicht getrimmt, d.h. es wird nur zu einem kleinen Teil in das Stärkekorn integriert. Durch die weitere Aktion von SS und SBEs entsteht daraus Phytoglykogen, welches sich anreichert.

Im „WSP- (water soluble polysaccharide) Clearing“-Modell (Zeeman et al. 1998) sind DBEs nur indirekt an der Amylopektinsynthese beteiligt. SSs und SBEs verlängern und verzweigen nicht nur Amylopektin, sondern reagieren auch mit Maltooligosacchariden, die in der löslichen Fraktion des Amyloplasten vorkommen. Diese Beiprodukte werden durch DBEs wieder abgebaut. In *sul* Mutanten findet kein Abbau dieser Konkurrenzprodukte statt. Stattdessen werden sie durch SSs und DBEs vergrößert und reichern sich in Form von Phytoglykogen an.

In *sul* Endosperm findet parallel eine lineare Akkumulation von Stärke und Phytoglykogen statt (Singletary et al. 1997). Phytoglykogen ist ein wasserlösliches Produkt mit großer Oberfläche. Es ist daher denkbar, dass es einem enzymatischen Angriff stärker ausgesetzt ist als die Polymere eines organisierten Stärkekornes. Trotzdem erscheint anhand der <sup>13</sup>C-Gesamtanreicherung von Phytoglykogen (1,97 % im Glucoseexperiment) und Stärke (2,19 % im Glucoseexperiment) eine hohe Turnoverrate von Phytoglykogen unwahrscheinlich. Diese sollte sich in einer im Vergleich zu Stärke höheren Gesamtanreicherung äußern. Ein niedriger Turnover (Zeeman et al. 2002) bzw. ein Turnover, der sich nur auf die äußeren Schichten des Phytoglykogens beschränkt (Delatte et al. 2005), konnte auch in Phytoglykogen (und Stärke) aus Blattgewebe der *A. thaliana* Mutanten *atisa-1* und *atisa-2* festgestellt werden. Die Isotopologienmuster von Glucose aus *sul*-Phytoglykogen und *sul*-Stärke zeigen signifikante Unterschiede (Abb. 4.25). Während das Muster der Glucose aus *sul*-Stärke ähnlich dem von WT-Stärke ist, ist die Glucose aus Phytoglykogen stärker gecycelt. Dies bedeutet, dass unterschiedliche Wege zu den beiden Polymeren führen müssen. Präamylopektin ist daher als direkte Vorstufe von Phytoglykogen, wie es das „Glucan-Trimming“-Modell vorsieht, unwahrscheinlich.

Sowohl Stärke als auch Phytoglykogen werden aus ADP-Glucose gebildet (Holder et al. 1974). Die unterschiedlichen Muster lassen sich nur durch zwei verschiedene ADP-Glucose-Pools erklären. Darauf basierend wurde ein Modell entwickelt (Abb. 5.1), welches vorsieht, dass die beiden Polymere in unterschiedlichen Plastiden synthetisiert werden. Plastiden des Typs B sind für die Biosynthese von Stärke, Plastiden des Typs A sind für die Biosynthese von Phytoglykogen verantwortlich. Typ A Plastiden besitzen keinen Adenylat-Translokator (BT1) und importieren anstelle von ADP-Glucose Glucose-1-P, welches durch plastidäre AGPase in ADP-Glucose umgewandelt wird und als Substrat für SSs und SBEs zur

Verfügung steht. Es wird vermutet, dass im Wildtyp, in Einklang mit dem „WSP-Clearing“ Modell, ein konstanter Auf- und Abbau von WSPs erfolgt.



**Abb. 5.1:** Modell zur Biosynthese von Stärke und Phytyglykogen in *Zea mays* Endosperm. Die Synthese der beiden Polysaccharide findet örtlich getrennt in verschiedenen Plastidtypen statt. Im Stärke-Plastiden (Typ B) wird cytosolische ADP-Glucose in Stärke eingebaut. In WSP-Plastiden (Typ A) findet die Produktion von ADP-Glucose unabhängig von BT1, SH2 und BT2 durch plastidäre AGPase im Plastiden statt. Die Hexose-P-Pools des Cytosols und des Plastiden sind isotopologisch nicht im Gleichgewicht.

In *sul* Endosperm ist durch das Fehlen von Debranching-Enzymen kein Abbau der WSPs möglich, so dass Phytyglykogen akkumuliert wird. Das höhere Cycling von Glucose aus Phytyglykogen ist durch zusätzliche Prozesse im Plastiden zu erklären. Glucose-1-Phosphat kann vor der Umwandlung in ADP-Glucose durch plastidäre Glykolyse und Reaktionen des PPP metabolisiert werden.

Die örtliche Trennung der Phytyglykogen- und Stärkesynthese wird durch lichtmikroskopische Untersuchungen von *sul* Endosperm bestätigt (Lampe 1931, Boyer et al. 1977). In *sul* Endosperm konnten abnormale Plastiden, die nur Phytyglykogen enthalten, beobachtet werden. Phytyglykogen haltige Plastiden befinden sich vor allem im Zentrum des

Endosperms, während die äußeren Schichten stärkehaltig sind. Eine ähnliche Verteilung findet sich in *su1* Mutanten von Reis. Auch hier konnten Zellen, die ausschließlich Phytoglykogen enthalten, detektiert werden. Diese befinden sich in der Mitte des Endosperms (Nakamura et al. 1997).

Das Modell deckt sich gut mit dem Phänotyp einer *bt1 su1* Doppelmutante. In *bt1 su1* Endosperm werden beträchtliche Anteile an Phytoglykogen gebildet (Tsai und Glover 1974), d.h. wie in dem Modell vorgeschlagen ist die Biosynthese von Phytoglykogen unabhängig von BT1.

Es ist anzunehmen, dass das Endosperm auch im WT Plastiden des Typs A enthält. Phytoglykogen aus WT sollte daher ein ähnliches Isotopologemuster wie Phytoglykogen aus *su1* haben. Aus dem begrenzt zur Verfügung stehenden Material konnten jedoch keine ausreichenden Mengen an Phytoglykogen aus Wildtyp isoliert werden.

### **5.7 Metabolismus in *shrunken2*, *brittle2* und *brittle1* Mutanten**

Die Mutanten *sh2*, *bt2* und *bt1* betreffen die Synthese bzw. den Transport von ADP-Glucose, dem Substrat für stärkeaufbauende Enzyme. Die Mutationen führen zu Körnerphänotypen, die mit dem bloßen Auge nicht zu unterscheiden sind (Hannah et al. 1993). In allen drei Mutanten ist der Stärkegehalt im reifen Korn um bis zu 80 % reduziert und gleichzeitig der Anteil an löslichen Zuckern im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. In *bt1* Endosperm wird zusätzlich ADP-Glucose angereichert (Shannon et al. 1996).

*Bt2* und *Sh2* kodieren die kleine (SSU) und große (LSU) Untereinheit der cytosolischen ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) in Maisendosperm (Bhave et al. 1990, Bae et al. 1990). Die beiden Untereinheiten bilden ein enzymatisch aktives  $\alpha_2\beta_2$  Heterotetramer (Smith-White und Preiss 1992). Die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine sind ähnlich und es wirken beide in Maisendosperm sowohl katalytisch als auch regulatorisch (Cross et al. 2004). Trotzdem sind sie nicht austauschbar und einzeln in Abwesenheit der anderen Untereinheit enzymatisch inaktiv (Greene und Hannah 1998).

In sämtlichen *sh2* und *bt2* Mutanten sowie in *sh2 bt2* Doppelmutanten kann eine Restaktivität an AGPase detektiert werden und es findet Stärkesynthese statt (Hannah et al. 1980). Versuche an Nullmutanten legten die Vermutung nahe, dass in Maisendosperm eine cytosolische und eine plastidäre Form des Enzyms vorhanden ist und von vier verschiedenen Genen repräsentiert wird (Giroux und Hannah 1994). Die cytosolische Form macht 95 % der Gesamtaktivität aus (Denyer et al. 1996) und wird von *Sh2* und *Bt2* kodiert. Die plastidären

Untereinheiten werden vermutlich von *Agp2* (SSU, entspricht Agpsemzm in Hannah et al. 2001) und *Agp1* (LSU) oder dazu nahe verwandten Genen kodiert (Giroux und Hannah 1994). In *bt2* Endosperm ist die Restaktivität an AGPase vollständig im Plastiden lokalisiert und die plastidäre Form wird hier durch die Mutation nicht beeinflusst (Denyer et al. 1996). Ein analoger Versuch von *sh2* Endosperm existiert bisher noch nicht. Basierend auf den Ergebnissen von *bt2* wird aber meist angenommen, dass auch in *sh2* die Biosynthese von Stärke durch plastidäre AGPasen bewerkstelligt wird.

Demnach sollte Glucose aus Stärke von *sh2* und *bt2* Endosperm ein ähnliches Isotopologenmuster geben. In den Versuchen unterscheiden sich jedoch die Muster der beiden Mutanten erheblich. Während das von Glucose aus *sh2*-Stärke nicht vom Wildtyp zu unterscheiden ist, wurde die Glucose der *bt2*-Stärke intensiver gecycelt, d.h. einfachmarkierte Isotopologe kommen in höheren, mehrfachmarkierte und vollmarkierte Isotopologe in geringeren Anteilen vor.

Eine mögliche Erklärung für die überraschenden Isotopologenmuster der Mutanten *bt2*, *sh2* und *bt1* könnte das ursprünglich für *sul* entwickelte Modell der Kompartimentierung der Kohlenhydratflüsse liefern. Es basiert darauf, dass die ADP-Glucose- bzw. generell die Hexose-Pools zwischen Plastiden und Cytosol nicht im Gleichgewicht sind. Dabei hat der plastidäre Pool eine komplexere *metabolic history*, d.h. die Hexosen dieses Pools unterliegen einem stärkeren Cycling. Zwar können die beiden Kompartimente auf Stufe der Hexose-Phosphate über Hexose-P-Translokatoren miteinander kommunizieren (Fischer und Weber 2002), der Austausch ist aber offensichtlich nicht schnell genug um ein isotopologisches Gleichgewicht herzustellen. Hexose-Pools, die zwischen den Kompartimenten nicht im Gleichgewicht sind, sind im Pflanzenreich nicht unbekannt und wurden zum Beispiel in Sojabohnen Embryonen (Sriram et al. 2004) und Karotten (Krook et al. 1998) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu sind die Hexose-Pools der Plastiden und des Cytosols von Zellkulturen von Tomaten (Rontein et al. 2002) und in *Brassica napus* Embryonen (Schwender et al. 2003) isotopologisch im Gleichgewicht. Das Modell setzt weiterhin voraus, dass auf Stufe der ADP-Glucose kein Cycling erfolgt, d.h. der Schritt von Glucose-1-P zu ADP-Glucose ist irreversibel und ADP-Glucose wird ohne weitere Metabolisierung zum Aufbau der Stärkemoleküle genutzt. Dafür spricht, dass es allgemein sehr wenige Enzyme gibt, die in der Lage sind, Nucleotidzucker zu hydrolysieren. Hierzu zählen unter anderem AGPase und ADP-Glucose-Phosphorylase (AGPPase). AGPase katalysiert zwar *in vitro* eine reversible Reaktion, *in vivo* läuft die Reaktion aber nur in Richtung der ADP-Glucose-Synthese ab (Ballicora et al. 2004). Eine Aktivität an AGPPase konnte zwar u. a. in Endosperm von Gerste

und Weizen nachgewiesen werden, die Aktivität sinkt aber mit Einsetzen der Stärkeproduktion ab etwa 10 DAP auf ein Minimum ab (Rodriiguez-Lopez et al. 2000). Ebenso deutet die Akkumulierung von ADP-Glucose in *bt1* Körnern darauf hin, dass kein Abbau von ADP-Glucose erfolgt und dessen vermutlich einzige Metabolisierung ein Einbau in Stärke ist.

In Wildtypen findet die Synthese von ADP-Glucose fast ausschließlich im Cytosol statt. Die in den Plastiden transportierte ADP-Glucose wird dort direkt ohne weitere Metabolisierung in Stärke eingebaut. Aus Stärke hydrolysierte Glucose repräsentiert daher das Isotopologienmuster des Hexose-Pools des Cytosols (Abb. 5.2). Gemäß dem Modell würde *bt2*-Stärke den Hexose-Pool des Plastiden repräsentieren. Wie aus den Daten der Literatur zu erwarten, werden Hexosen demnach in Form von Glucose-1-Phosphat und/oder Glucose-6-Phosphat in den Amyloplasten transportiert (Möhlmann et al. 1997, Shannon et al. 1996) und vor ihrer Umwandlung in ADP-Glucose durch plastidäre AGPase und anschließendem Einbau in Stärke durch Reaktionen des PPP und der Glykolyse im Plastiden zusätzlich verstoffwechselt und ergeben somit eine höhere Cyclingrate (Abb. 5.2).

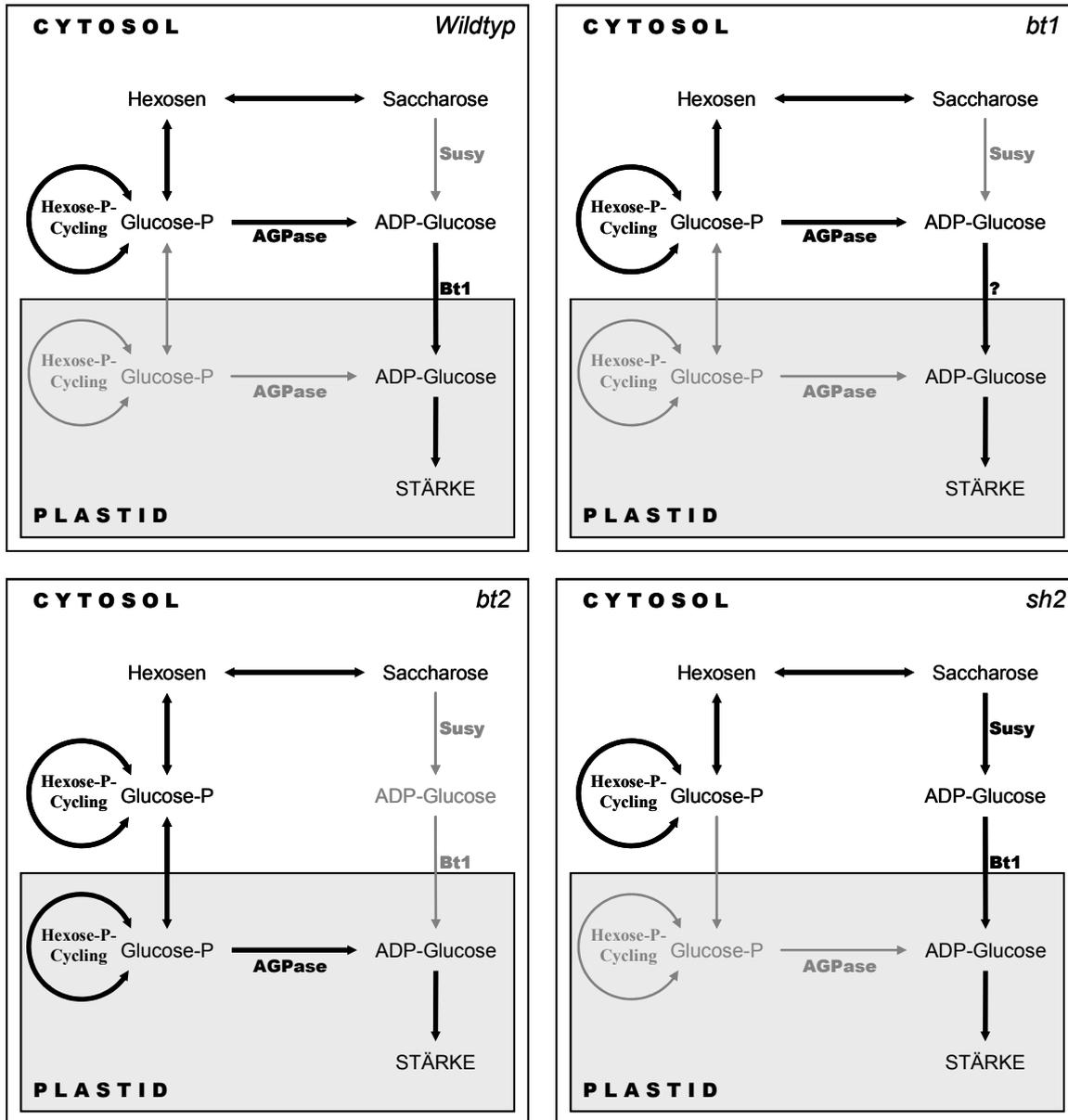
Nach dem Modell leitet sich in *sh2* Endosperm die Stärke entgegen den Erwartungen aus cytosolisch gebildeter ADP-Glucose ab. Dies lässt vermuten, dass in *sh2* weder eine funktionelle plastidäre noch eine funktionelle cytosolische AGPase vorhanden ist. Die Bildung von ADP-Glucose im Cytosol ohne die Aktion von AGPase könnte zum Beispiel durch Saccharose-Synthase erklärt werden (Pozueta-Romero et al. 1999). Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu der in der Literatur weit verbreiteten Annahme, dass sich *sh2* und *bt2* ähnlich verhalten und in beiden Mutanten die Stärkeproduktion durch plastidäre AGPase übernommen wird.

Mit diesem Modell (Abb. 5.1, 5.2) sind Ergebnisse von *su1 bt1* (Tsai und Glover 1974) und *su1 sh2* (Creech 1968, Holder et al. 1974) Doppelmutanten in Einklang. Das Modell sagt eine plastidäre Synthese von ADP-Glucose für den Aufbau von Phytoglykogen in *su1* Endosperm voraus. Im Vergleich zu *su1* besitzt die Doppelmutante *su1 bt1* einen stark reduzierten Gehalt an Stärke, akkumuliert aber - vermutlich aufgrund einer intakten plastidären AGPase - nennenswerte Mengen an Phytoglykogen. In der Doppelmutante *su1 sh2* ist im Vergleich zu *su1* sowohl der Phytoglykogen- als auch der Stärkegehalt deutlich reduziert. Dieser Befund ließe sich durch das Fehlen einer plastidären AGPase neben der cytosolischen AGPase erklären. Da die Phytoglykogenproduktion gemäß dem Modell unabhängig von cytosolischer AGPase ist, sollte eine Doppelmutante *su1 bt2* wie *su1 bt1* Phytoglykogen anreichern, gleichzeitig aber der Gehalt an Stärke deutlich reduziert sein.

Weshalb in *sh2* Endosperm eventuell keine funktionsfähige plastidäre AGPase vorhanden ist bleibt offen. Denkbar wäre, dass mit einem Fehlen der cytosolischen LSU gleichzeitig die plastidäre LSU ausgeschaltet wird. Dies könnte ein pleiotroper Effekt oder auch dadurch bedingt sein, dass in Maisendosperm ein einziges Gen die cytosolische und plastidäre Untereinheit kodiert. Es ist bekannt, dass in Mais drei verschiedene Gene die kleine Untereinheit der AGPase kodieren (Hannah et al. 2001), analoge Daten zur großen Untereinheit fehlen aber bisher. Ähnlich verhält es sich in anderen Gräsern. Im Gerstekorn werden die cytosolische und plastidäre SSUs von verschiedenen Genen kodiert und in einer Mutante mit fehlender cytosolischer SSU wird die plastidäre Form nicht beeinträchtigt (Johnson et al. 2003). Analoge Versuche zur großen Untereinheit existieren auch hier nicht. In Weizen werden sowohl cytosolische LSU als auch cytosolische SSU von verschiedenen Genen kodiert. Gereinigte und sequenzierte plastidäre AGPase lässt vermuten, dass die plastidäre SSU durch ein noch zu bestimmendes Gen kodiert wird. Ein für die plastidäre LSU kodierendes Gen konnte aber nicht identifiziert werden (Burton et al. 2002).

Die Bildung eines enzymatisch aktiven Homotetramers aus der im *sh2* Endosperm intakten BT2 Untereinheit analog zu in *E. coli* exprimierten SSU von Kartoffel (Ballicora et al. 2004) findet in Mais nicht statt (Greene und Hannah 1998).

Die Glucose aus hydrolysierte Stärke des *bt1* Endosperms ist im Muster kaum vom Wildtyp zu unterscheiden. Die Stärke stammt also gemäß dem Modell aus dem cytosolischen ADP-Glucose-Pool. Isolierte Amyloplasten aus *bt1* Endosperm haben bezüglich der Aufnahme von ADP-Glucose nur 26 % der Aktivität von Amyloplasten aus anderen Genotypen (Shannon et al. 1996). Auf welche Weise in *bt1* der Transfer von ADP-Glucose vom Cytosol in den Amyloplasten erfolgt ist unklar. Wird das Isotopologemuster von *bt1*-Stärke im Sinne des Modells (Abb. 5.2) interpretiert, dann scheint aber der Transfer von cytosolischer ADP-Glucose für die Produktion der Stärke in der Mutante verantwortlich zu sein. Plastidär produzierte ADP-Glucose leistet in der Mutante scheinbar keinen wesentlichen Beitrag zur Stärkesynthese (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2:** Stärkebiosynthese in Wildtyp, *bt1*, *bt2* und *sh2* Endosperm. Die Hauptwege der Stärkesynthese sind dick eingezeichnet. ADP-Glucose kann durch cytosolische und plastidäre AGPase und durch SuSy synthetisiert werden. Hexose-P-Cycling findet im Cytosol und im Plastiden statt; dabei sind die beiden Glucose-P-Pools nicht im Gleichgewicht. In Wildtyp, *bt1* und *sh2* repräsentiert das Muster der Stärkeglucose den cytosolischen ADP-Glc-Pool, in *bt2* den plastidären ADP-Glc-Pool.

Um die Theorie zu stützen, müsste belegt werden, dass tatsächlich zwei isotopologisch nicht identische Hexose-Pools vorhanden sind. Hierzu wäre zum Beispiel die Isolierung von Saccharose als typische cytosolische Substanz (Liu und Shannon 1981) denkbar. Vorausgesetzt die löslichen Zucker des Cytosols stehen untereinander im Gleichgewicht, sollten in den Wildtypen, *bt1* und *sh2* das Muster zwischen Stärke und Saccharose identisch sein, nicht aber in *bt2*.

Es ist bekannt, dass sich Mutationen in verschiedenen genetischen Hintergründen unterschiedlich auswirken können (Boyer und Hannah 2001). Die AGPase Mutanten dieser Arbeit lagen aber in zwei verschiedenen genetischen Hintergründen vor (Fa56-*sh2*, W64A-*bt2* und W64A-*bt1*). Um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Muster in den Mutanten *sh2* und *bt2* lediglich durch verschiedene genetische Hintergründe verursacht wurden, sollten die Markierungen in einem einheitlichen Hintergrund wiederholt werden. In diesem Zusammenhang sollten zur Überprüfung des Modells der Kompartimentierung auch Markierungsexperimente mit den Doppelmutanten *su1 bt1*, *su1 sh2* und *su1 bt2* durchgeführt werden. Dabei sollten neben den Isotopologemustern der Glucosen aus Stärke und aus Phytoglykogen auch die Konzentrationen der beiden Polymere bestimmt werden. Die Doppelmutanten *su1 bt1* und *su1 bt2* sollten sowohl Stärke als auch Phytoglykogen akkumulieren, während die Doppelmutante *su1 sh2* nur Stärke anreichern sollte. Gemäß dem Modell sollten die Glucosen aus Phytoglykogen jeweils den höher gecyclten plastidären Hexose-Pool repräsentieren. Die Stärken aus *su1 bt1* und *su1 sh2* sollten den cytosolischen, und die Stärke aus *su1 bt2* sollte den plastidären ADP-Glucose-Pool repräsentieren. Dies bedeutet, dass in *su1 bt2* die Isotopologemuster von Stärke und Phytoglykogen gleich, in *su1 bt1* aber unterschiedlich sein sollten.

### **5.8 Metabolismus in *shrunken1*, *shrunken1 sucrose synthase1* und *miniature1* Endosperm**

Saccharose ist die gängige Transportform von Kohlenhydraten in Pflanzen und liefert die Hexoseeinheiten zum Aufbau der Speicherstärke. Der Abbau von Saccharose in Hexosen wird durch Invertasen und Saccharose-Synthasen katalysiert. Die beiden Enzymgruppen liefern unterschiedliche Reaktionsprodukte, besitzen verschiedene zeitliche und räumliche Verteilungen und werden mit unterschiedlichen Synthesewegen assoziiert. Ein Fehlen dieser Enzyme wirkt sich auch auf die Flüsse des zentralen Kohlenhydratmetabolismus unterschiedlich aus. Das Isotopologemuster von hydrolysierter Stärke aus W64A-*sh1* und W22-*sh1 sus1* Endosperm, dem 90 bzw. 99,5 % der Aktivität an Saccharose-Synthase fehlt (Carlson et al. 2002), unterscheidet sich nicht vom Wildtyp. Ein Fehlen von Invertase in W22-*mn1* Endosperm bewirkt hingegen Veränderungen: Die in Stärke abgelagerte Glucose wurde intensiver gecycelt.

Saccharose-Synthasen katalysieren die Umwandlung von Saccharose in UDP-Glucose und Fructose. Die Reaktion ist generell reversibel (Geigenberger und Stitt, 1993), läuft aber unter

physiologischen Bedingungen hauptsächlich in Richtung der Saccharosespaltung ab (Weber et al. 1997). In Maisendosperm werden die drei verschiedenen Saccharose-Synthase Gene *Sh1* (= *Sus2*), *Sus1* und *Sus3* exprimiert (Carlson et al. 2002). SH1 ist für etwa 90 %, SUS1 für etwa 8-10 % (Chourey 1981) und SUS3 für lediglich 0,5 % (Carlson et al. 2002) der Gesamtaktivität verantwortlich. *Sh1* Mutanten zeigen einen relativ milden Körnerphänotyp mit einem um ca. 20 % reduzierten Stärkegehalt. Die Doppelmutante *sh1 sus1* ist von der Einfachmutante kaum zu unterscheiden und hat einen um ca. 45 % reduzierten Stärkegehalt (Chourey et al. 1998). Saccharose-Synthasen werden häufig mit der Bereitstellung von Glucosemonomeren für die Biosynthese von Cellulose und Stärke assoziiert (Chourey et al. 1990). Immunocytochemische Untersuchungen zeigen, dass SH1 ausschließlich im Endosperm und SUS1 überwiegend in den basalen Endospermtransferzellen und in der Aleuronschicht lokalisiert ist (Heinlein und Starlinger 1988, Chen und Chourey 1989). Die Verteilung und Aktivität von SH1 im Endosperm zeigt einen Zusammenhang zwischen dem Enzym und der Stärkesynthese. Mit dem Einsetzen der Stärkeproduktion bei 10 – 12 DAP steigt die Enzymaktivität stark an (Tsai et al. 1970). Die Aktivität ist in der frühen Phase im apikalen Teil des Endosperms hoch und wandert dann analog zur Stärkesynthese zum basalen Teil des Endosperms (Wittich und Vreugdenhil 1998).

Die unterschiedlichen Verteilungen der beiden SuSy Isozyme und die unterschiedlichen Stärkegehalte ihrer Mutanten deuten zwar auf unterschiedliche - bis heute noch nicht geklärte - Aufgaben hin, ein Fehlen eines oder beider Enzyme hat aber auf den zentralen Stoffwechsel keine Auswirkung. Die gleichen Isotopologemuster der Stärken aus *sh1* und *sh1 sus1* sind ein weiteres Beispiel dafür, dass die Menge des Endproduktes Stärke (*sink strength*) nicht mit einem veränderten Kohlenhydratmetabolismus korreliert.

Invertasen bewirken die irreversible Hydrolyse von Saccharose in Glucose und Fructose. Die ionisch an die Zellwand gebundene Form INCW-2 macht etwa 90 % der Gesamtaktivität der Invertasen aus und befindet sich ausschließlich in den basalen Endospermtransferzellen (Cheng et al. 1996). Die restlichen 10 % der Invertaseaktivität entfallen auf lösliche Invertase, die im Cytosol und in der Vakuole lokalisiert ist und sich ausschließlich im basalen Drittel des Kornes befindet (Miller und Chourey 1992). Zellwandgebundene Invertase ist also räumlich und zeitlich das erste Enzym, auf das in das Korn eintretende Zucker treffen. Der Invertase wird daher eine wichtige Rolle in der Phloementladung und der Aufnahme von Kohlenhydraten ins Endosperm zugeschrieben (Koch 2004, Huber et al. 1997). Das Enzym wird zwar über die gesamte Kornentwicklung exprimiert, seine Hauptaktivität erreicht es aber, anders als die Saccharose-Synthasen, bereits nach 12 DAP und fällt dann wieder ab

(Cheng et al. 1996, Tsai et al. 1970). Invertasen werden daher mit der Zellteilung und –expansion assoziiert und weniger mit der Lieferung von Vorstufen für die Stärkesynthese (Vilhar et al. 2002).

*Mnl* kodiert zwar nur für INCW-2, in *mn1* Mutanten ist aber ebenso die Aktivität an löslicher Invertase stark vermindert, so dass in der Mutante eine gesamte Restaktivität von 1,5 % verbleibt (Cheng et al. 1996). In *mn1* Körnern löst sich ab etwa 9 DAP das Tochtergewebe vom Muttergewebe ab (Kladnik et al 2004), das reife Korn hat ein um etwa 80 % reduziertes Korngewicht (Lowe und Nelson 1946) und die Zellteilung und –expansion sind eingeschränkt (Vilhar et al. 2002). Die relative Stärkemenge und die Stärkeverteilung ist im *mn1* Korn gegenüber dem Wildtyp nicht verändert (Cheng und Chourey 1999), so dass der verminderte Stärkegehalt vermutlich ein sekundärer Effekt ist und kein direkter Einfluss auf den Stärkesyntheseweg ausgeübt wird. Entsprechend finden sich in *mn1* Endosperm normale bzw. nur leicht reduzierte Mengen an AGPase, SUS1 und SH1 (Cheng und Chourey 1999). Es ist daher anzunehmen, dass die Produktion von Stärke in *mn1* Endosperm wie in Wildtypen erfolgt und die Stärkeglucose den cytosolischen Hexose-P-Pool repräsentiert. Das erhöhte Hexose-P-Cycling lässt sich also nicht mit dem Kompartimentierungsmodell (Abb. 4.1, 4.2) erklären.

Über die Ursachen, die ein verändertes Cycling in *mn1* Endosperm im Vergleich zum Wildtyp und vielen anderen Mutanten hervorrufen, kann hier nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung könnte in einem veränderten energetischen Zustand liegen. Aus energetischer Sicht ist es ein großer Unterschied, ob Saccharose durch Invertase oder Saccharose-Synthase gespalten wird. Die Hydrolyse durch Invertase liefert Glucose und Fructose, die unter Verbrauch von ATP durch Hexokinasen in Glucose-6-P und Fructose-6-P überführt werden. Energiesparender ist die Spaltung durch Saccharose-Synthase in UDP-Glucose und Fructose unter Verbrauch von Pyrophosphat, welches durch die anschließende Weiterverarbeitung von UDP-Glucose durch UGPase geliefert wird. Im zentralen Maisendosperm ist die Sauerstoffkonzentration sehr gering (Rolletschek et al. 2005), d.h. der Stoffwechsel ist gezwungen, so energiesparend wie möglich zu arbeiten. Die Bereitstellung von Vorläufern für die Stärkesynthese durch Saccharose-Synthasen erscheint insofern plausibel. Entsprechend werden durch niedrige Sauerstoffgehalte Saccharose-Synthase Gene hochreguliert (Zeng et al. 1998) und Invertase Gene gehemmt (Zeng et al. 1999). Höhere Sauerstoffkonzentrationen finden sich im Embryo und in dessen Nähe und in den äußeren Schichten des Korns (Rolletschek et al. 2005). In diesen Bereichen steht mehr Sauerstoff für die Produktion von ATP zur Verfügung und es finden die energieaufwendigen Biosynthesen von Proteinen und

Lipiden statt. Invertase ist im basalen Bereich des Korns lokalisiert und wird mit der Biosynthese von Lipiden im Embryo assoziiert (Doehlert 1990). Wird der Sauerstoffgehalt im Endosperm künstlich erhöht, so erhöhen sich die Intermediate der Glykolyse, des Citratzyklus und freie Aminosäuren, was vermuten lässt, dass die Lipid- und Proteinbiosynthese forciert wurde (Rolletschek et al. 2005). In *mn1* Mutanten muss die Spaltung von Saccharose durch Restaktivitäten von Invertase und zum überwiegenden Teil durch Saccharose-Synthase erfolgen. Es ist daher denkbar, dass die energiesparende Form der Saccharosehydrolyse mehr Energie für die Produktion von Proteinen und Lipiden zulässt und damit verbundene erhöhten Flüsse durch den PPP und den Citratzyklus für das veränderte Hexose-P-Cycling verantwortlich sind.

In *sh1*, *sh1 sus1* und *mn1*, sowie in sämtlichen anderen Mutanten und Wildtypen besteht im Isotopologenmuster der hydrolysierten Stärken kein Unterschied zwischen der Markierung mit Glucose und Saccharose. Dieses auf den ersten Blick überraschende Ergebnis findet in der Literatur Bestätigung. Wider Erwarten konnte durch eine Kultivierung von *mn1* Körnern auf glucose- bzw. fructosehaltigem Medium kein normaler Kornphänotyp hergestellt werden (Cheng und Chourey 1999). Die Autoren folgerten daraus, dass offensichtlich nicht der Gehalt an einzelnen Zuckern an sich entscheidend ist, sondern die physiologische Spaltung und Freisetzung von Zuckern für eine normale Entwicklung des Korns wichtig sind. Anatomische, biochemische und immunohistologische Untersuchungen zeigten kaum Unterschiede zwischen einer Kultivierung auf Glucose, Fructose oder Saccharose. Lediglich die Proteinmengen an SUS1 und SH1 sind in der Saccharose-Kultur höher als in der Glucose-Kultur (Cheng und Chourey 1999). Trotz dieser kleinen Unterschiede wurde im vorliegenden Experiment keine Änderung der Flüsse des zentralen Kohlenhydratmetabolismus beobachtet. Die Markierungsexperimente an Mutanten zeigten, dass der zentrale Kohlenhydratmetabolismus im Mais sehr stabil ist. Lediglich die hydrolysierten Glucosen aus *bt2*-Stärke, *mn1*-Stärke und *sul*-Phytoglykogen besitzen ein im Vergleich zum WT verändertes Isotopologenmuster. Legt man das Kompartimentierungsmodell (Abb. 5.1, 5.2) zugrunde, dann wäre *mn1* die einzige Mutante, die eine Änderung der metabolischen Flüsse bewirkt. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als andererseits gezeigt werden konnte, dass der zentrale Kohlenhydratmetabolismus des Maiskorns flexibel ist und sich die metabolischen Flüsse mit der Entwicklung des Korns ändern (siehe 4.6 und 5.3).

## 6 Literatur

- Bae, L.M., Giroux, M., Hannah, L.C. (1990) Cloning and characterization of the brittle-2 gene of maize. *Maydica* **35**: 317-322.
- Ball S., Guan H.P., James M., Myers A., Keeling P., Mouille G., Buleon A., Colonna P., Preiss J. (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**: 349-352.
- Ball, S.G., Morell, M.K. (2003) From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 207-233.
- Ballicora, M.A., Iglesias, A.A., Preiss, J. (2004) ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosyn. Res.* **79**: 1-24.
- Beavis, W., Berlyn, M., Burr, B., Chandler, V., Coe, E., Fauron, C., Nelson, O., Polacco, M., Rodermel, S., Sachs, M., and others (1995) A standard for maize genetics nomenclature. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **69**: 182-184.
- Beckles D.M., Smith A.M., ap Rees T. (2001) A cytosolic ADP-glucose pyrophosphorylase is a feature of graminaceous endosperms, but not of other starch-storing organs. *Plant Physiol.* **125**: 818-827.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Auflage, Springer-Verlag. S. 284.
- Bhave M.R., Lawrence S., Barton C., Hannah L.C. (1990) Identification and molecular characterization of shrunken-2 cDNA clones of maize. *Plant Cell.* **2**: 581-588.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Boyer, C.D., Hannah, L.C. (2001) Kernel mutants of corn. Specialty Corn. CRC Press. 1-31.
- Boyer, C.D., Daniels, R.R., Shannon, J.C. (1977) Starch granule (amyloplast) development in endosperm of several *Zea mays* L. genotypes affecting kernel polysaccharides. *Amer. J. Bot.* **64**: 50-56.
- Boyer, C.D., Preiss, J. (1978) Multiple forms of starch branching enzyme of maize: evidence for independent genetic control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**: 169-175.
- Buchanan, B.B., Grissem, W., Jones, R.L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists.
- Burton R.A., Johnson P.E., Beckles D.M., Fincher G.B., Jenner H.L., Naldrett M.J., Denyer K. (2002) Characterization of the genes encoding the cytosolic and plastidial forms of ADP-glucose pyrophosphorylase in wheat endosperm. *Plant Physiol.* **130**: 1464-1475.
- Cao, H., James, M.G., Myers, S.M. (2000) Purification and characterization of soluble starch synthases from maize endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**: 135-146.

- Carlson S.J., Chourey P.S., Helentjaris T., Datta R. (2002) Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene. *Plant Mol Biol.* **49**:15-29.
- Chen, Y.-C., Chourey, P.S. (1989) Spatial and temporal expression of the two sucrose synthase genes in maize: immunohistological evidence. *Theor. Appl. Gen.* **78**: 553-559.
- Cheng, W.-H., Chourey, P.S. (1999) Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 485-495.
- Cheng, W.-H., Taliercio, E.T., Chourey, P.S. (1996) The *miniature1* seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell.* **8**: 971-983.
- Chourey, P.S. (1981) Genetic control of sucrose synthetase in maize endosperm. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 372-376.
- Chourey P.S., Taliercio E.W., Carlson S.J., Ruan Y.L. (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 88-96.
- Cobb, B.G., Hannah, L.C. (1983) Development of wild type, shrunken-1 and shrunken-2 maize seeds grown *in vitro*. *Theoretical and Applied Genetics* **65**: 47-51.
- Cobb, B.G., Hannah, L.C. (1986) Sugar utilization by developing wild type and shrunken-2 maize kernels. *Plant Physiol.* **80**: 609-611.
- Cobb, B.G., Hole, J.D., Smith, J.D., Kent, M.W. (1988) The Effects of Modifying Sucrose Concentration on the Development of Maize Kernels Grown *in vitro*. *Annals of Botany* **62**: 265-270.
- Creech, R.G. (1968) Carbohydrate Synthesis in maize. *Adv. Agron.* **20**: 275-321.
- Cross J.M., Clancy M., Shaw J.R., Greene T.W., Schmidt R.R., Okita T.W., Hannah L.C. (2004) Both subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase are regulatory. *Plant Physiol.* **135**: 137-144.
- Cully, D.E., Gengenbach, B.G., Smith, J.A., Rubenstein, I., Connelly, J.A., Park, W.D. (1984) Endosperm protein synthesis and L-[<sup>35</sup>S]Methionine incorporation in maize kernels cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* **74**: 389-394.
- Dauner, M., Sauer, U. (2000) GC-MS Analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol. Prog.* **16**: 642-649.
- Delatte, T., Trevisan, M., Parker, M.L., Zeeman, S.C. (2005) Arabidopsis mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J.* **41**: 815-830.

- Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjornsen, T., Keeling, P., Smith A.M. (1996) The major form of ADP-Glucose Pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial *Plant Physiol.* **112**: 779-785.
- Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S., Smith, A.M. (2001) The control of amylose synthesis. *J. Plant. Physiol.* **158**: 479-487.
- Denyer, K., Waite, D., Motawia, S., Moller, B.L., Smith, A.M. (1999) Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochem. J.* **340**: 183-191.
- Dieuaide-Noubhani, M., Raffard, G., Canioni, P., Pradet, A., Raymond, P. (1995) Quantification of compartmented metabolic fluxes in maize root tips using isotope distribution from  $^{13}\text{C}$ - or  $^{14}\text{C}$ -labeled glucose. *J. Biol Chem.* **270**: 13147-13159.
- Dinges, J.R., Colleoni, C., Myers, A.M., James, M.G. (2001) Molecular structure of three mutations at the maize *sugary1* locus and their allele-specific phenotypic effects. *Plant Physiol.* **125**: 1406-1418.
- Doehlert, D.C. (1990) Distribution of enzyme activities within the developing maize (*Zea mays*) kernel in relation to starch, oil and protein accumulation. *Physiol. Planta.* **78**: 560-567.
- Doehlert, D.C., Knutson, C.A. (1991) Two classes of starch debranching enzymes from developing maize kernels. *J Plant Physiol.* **138**: 566-572.
- Doehlert, D.C., Kuo, T.M. (1990) Sugar metabolism in developing kernels of starch-deficient endosperm mutants of maize. *Plant Physiol.* **92**: 990-994.
- Doehlert, D.C., Kuo, T.M., Juvik, J.A., Beers, E.P., Duke, S.H. (1993) Characteristics of carbohydrate metabolism in sweet corn (*sugary-1*) endosperm. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **118**: 661-666.
- Echt, C.S., Chourey, P.S. (1985) A comparison of two sucrose synthetase isozymes from normal and *shrunk-1* maize. *Plant Physiol.* **79**: 530-536.
- Edwards S., Nguyen B.T., Do B., Roberts J.K.M. (1998) Contribution of malic enzyme, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and the krebs cycle to respiration and biosynthesis and to intracellular pH regulation during hypoxia in maize root tips observed by nuclear magnetic resonance imaging and gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.* **116**: 1073-1081.
- Eisenreich, W., Bacher, A (2000) Elucidation of biosynthetic pathways by retrodictive/predictive comparison of isotopomer patterns determined by NMR spectroscopy. *Genet Eng (N Y)* **22**:121-53.
- Eisenreich, W., Ettenhuber, C., Laupitz, R., Theus, C., Bacher, A. (2004) Isotopolog perturbation techniques for metabolic networks: Metabolic recycling of nutritional glucose in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* **101**: 6764-6769.
- Entwistle, G., ap Rees, T.A. (1990) Lack of Fructose-1,6-bisphosphatase in a range of higher plants that store starch. *Biochem. J.* **271**: 467-472.

Ettenhuber, C., Eisenreich, W. (2004), 4F service 1.1, type 2 network, <http://xsystem.org.chemie.tu-muenchen.de>.

Ettenhuber, C., Spielbauer, G., Margl, L., Hannah, L.C., Gierl, A., Bacher, A., Genschel, U., Eisenreich, W. (2005) Changes in flux pattern of the central carbohydrate metabolism. eingereicht.

Felker, F.C. (1992) Participation of cob tissue in the uptake of medium components by maize kernels cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* **139**: 647-652.

Felker, F.C., Shannon, J.C. (1980) Movement of <sup>14</sup>C-labeled Assimilates into Kernels of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **65**: 864-870.

Fernie, A.R., Roscher A., Ratcliffe, RG (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250-263.

Fernie, A.R., Willmitzer, L., Trethewey, R.N. (2002) Sucrose to Starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends in Plant Sci.* **7**: 35-41.

Fischer, K., Weber, A. (2002) Transport of carbon in non-green plastids. *Trends Plant Sci.* **7**: 345-351.

Follstad, B.D., Stephanopoulos, G. (1998) Effect of reversible reactions on isotope label redistribution. Analysis of the pentose phosphate pathway. *Eur. J. Biochem.* **252**: 360-371.

Gao M., Wanat J., Stinard P.S., James M.G., Myers A.M. (1998) Characterization of dull1, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell* **10**: 311-314.

Garlick, A.P., Moore, C., Kruger, N.J. (2002) Monitoring flux through the oxidative pentose phosphate pathway using [1-<sup>14</sup>C]gluconate. *Planta* **216**: 265-272.

Geigenberger, P., Stitt, M. (1991) A futile cycle of sucrose synthesis and degradation is involved in regulating partitioning between sucrose, starch and respiration in cotyledons of germinating *Ricinus communis* L. seedlings when phloem transport is inhibited. *Planta* **185**: 182-190.

Geigenberger, P., Stitt, M. (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* **189**: 329-339.

Gengenbach, B.G. (1977) Development of maize caryopses from in-vitro pollination. *Planta* **134**: 91-93.

Giroux, M.J., Hannah, L.C. (1994) ADP-glucose pyrophosphorylase in *shrunk-2* and *brittle-2* mutants of maize. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 400-408.

Giroux M.J., Boyer C., Feix G., Hannah L.C. (1994) Coordinated transcriptional regulation of storage product genes in the maize endosperm. *Plant Physiol.* **106**: 713-722.

- Giroux M.J., Shaw J., Barry G., Cobb B.G., Greene T., Okita T., Hannah L.C. (1996) A single mutation that increases maize seed weight. *PNAS* **93**: 5824-5829.
- Glawischnig, E., Gierl, A., Tomas, A., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002) Starch biosynthesis and intermediary metabolism in maize kernels. Quantitative analysis of metabolite flux by nuclear magnetic resonance. *Plant Physiol.* **130**: 1717-1727.
- Glawischnig, E., Gierl, A., Tomas, A., Bacher, A., Eisenreich, W. (2001) Retrobiosynthetic nuclear magnetic resonance analysis of amino acid biosynthesis and intermediary metabolism. Metabolic flux in developing maize kernels. *Plant Physiol.* **125**: 1178-1186.
- Glawischnig, E., Tomas, A., Eisenreich, W., Spiteller, P., Bacher, A., Gierl, A. (2000) Auxin biosynthesis in maize kernels. *Plant Physiol.* **123**: 1109-1119.
- Greene T.W., Hannah L.C. (1998) Maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase SHRUNKEN2 and BRITTLE2 subunit interactions. *Plant Cell* **10**: 1295-1306.
- Griffith, S.M., Jones, R.J., Brenner, M.L. (1987) *In Vitro* sugar transport in *Zea mays* L. kernels. *Plant Physiol.* **84**: 467-471.
- Hannah, L.C., Giroux, M., Boyer, C. (1993) Biotechnological modification of carbohydrates for sweet corn an maize improvement. *Sci. Hort.* **55**: 177-197.
- Hannah, L.C., Nelson, O.E. (1976) Characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase from shrunken-2 and brittle-2 mutants of maize. *Biochem. Genet.* **14**: 547-560.
- Hannah L.C., Shaw J.R., Giroux M.J., Reyss A., Prioul J.L., Bae J.M., Lee J.Y. (2001) Maize genes encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **127**: 173-183.
- Hannah, L.C., Tuschall, D.M., Mans, R.J. (1980) Multiple forms of maize endosperm endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase and their control by shrunken-2 and brittle-2. *Genetics* **95**: 961-970.
- Hatzfeld, W.-D., und Stitt, M. (1990) A study of the rate of recycling of triose phosphates in heterotrophic *Chenopodium rubrum* cells, potato tubers, and maize endosperm. *Planta* **180**: 198-204.
- Heinlein, M., Starlinger, P. (1989) Tissue- and cell-specific expression of the two sucrose synthase isoenzymes in developing maize kernels. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 441-446.
- Hill, S.A. und ap Rees, T (1994) Fluxes in carbohydrate metabolism in ripening banana. *Planta* **192**: 52-60.
- Holder, D.G., Glover, D.V., Shannon, J.C. (1974) Interaction of Shrunken-2 and Sugary-1 in dosage series in corn endosperm. *Crop Science* **14**: 647-648.
- Ingle, J., Beitz, D., R.H., Hageman (1965) Changes in composition and maturation of maize seeds. *Plant Physiol.* **40**:835–839.

- Inouchi, N., Glover, D.V., Takaya, T., Fuwa, H. (1983) Development changes in fine structure of staches of several endosperm mutants of maize. *Starch* **11**: 371-376.
- James, M.G., Robertson, D.S., Myers, A.M. (1995) Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* **7**: 417-429.
- James, M.G., Denyer, K., Myers, A.M. (2003) Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 215-222.
- Jobling, S. (2004) Improving starch for food and industrial applications. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 210-218.
- Johnson P.E., Patron N.J., Bottrill A.R., Dinges J.R., Fahy B.F., Parker M.L., Waite D.N., Denyer K. (2003) A low-starch barley mutant, Riso 16, lacking the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform and the identity of the plastidial small subunit. *Plant Physiol.* **131**: 684-696.
- Jones, R.J., Gengenbach, B.G., Cardwell, V.B. (1981) Temperature effects on in vitro kernel development of maize. *Crop Science* **21**: 761-766.
- Keeling, P.L., Wood, J.R., Tyson, R.H., Bridges, I. (1988) Starch biosynthesis in developing wheat grain. *Plant. Phys.* **87**: 311-319.
- KEGG (2005). KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.  
<http://www.genome.ad.jp/kegg>
- Kim, K.-N., Gultinan, M. J. (1999) Identification of *cis*-Acting Elements Important for Expression of the Starch-Branching Enzyme I Gene in Maize Endosperm. *Plant Physiol.* **121**: 225-236.
- Kladnik, A., Chamusco, K., Dermastia, M., Chourey, P. (2004) Evidence of programmed cell death in post-phloem transport cells of the maternal pedicel tissue in developing caryopsis of maize. *Plant. Physiol.* **136**: 3572-3581.
- Koch, K.E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 509-540.
- Koch, K.E. (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 235-246.
- Kornexl, B.E., Werner, T., Roßmann, A., Schmidt, H.-L. (1997) Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients – a possible tool for origin assignment and quality control. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **205**: 19-24.
- Kossmann, J., and Lloyd, J. (2000) Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**: 171-226.
- Kossmann, J., Visser, R.G.F., Müller-Röber, B., Willmitzer, L., and Sonnewald, U. (1991). Cloning and expression analysis of a potato cDNA that encodes branching enzyme: Evidence for coexpression of starch biosynthetic genes. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 39-44.

- Krook, J., Vreugdenhil, D., Dijkema, C., van der Pals, L.H.W. (1998) Sucrose and starch metabolism in carrot (*Daucus carota* L.) cell suspensions analysed by <sup>13</sup>C-labelling: indications for a cytosol and a plastid-localized oxidative pentose phosphate pathway. *J. Exp. Bot.* **49**: 1917-1924.
- Kruger, N.J. and v.Schaewen, A. (2003) The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 236-246.
- Kruger, N.J., Ratcliffe, R.G., Roscher, A. (2003) Quantitative approaches for analysing fluxes through plant metabolic networks using NMR and stable isotope labelling. *Phytochem. Rev.* **2**: 17-30.
- Lampe, L. (1931) A microchemical and morphological study of the developing endosperm of maize. *Bot. Gaz.* **91**: 337-376.
- Lee, L., Tsai, C.Y. (1985) Effect of sucrose accumulation on zein synthesis in maize starch-deficient mutants. *Phytochemistry* **24**: 225-229.
- Liu, T.-T., Shannon, J.C. (1981) Measurement of metabolites associated with nonaqueously isolated starch granules from immature *Zea mays* L. endosperm. *Plant Physiol.* **67**: 525-529.
- Lowe, J, Nelson, O.E. (1946) Miniature seed – A study in the development of a defective caryopsis in maize. *Genetics* **31**: 525-533.
- Methoden der Enzymatischen BioAnalytik und Lebensmittelanalytik, Boehringer Mannheim GmbH, 1997
- Miller M.E., Chourey P.S. (1992) The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *Plant Cell* **4**: 297-305.
- Möhlmann, T., Tjaden, J., Henrichs, G., Quick, W.P., Häusler, R., Neuhaus, H.E. (1997) ADP-glucose drives starch synthesis in isolated maize endosperm amyloplasts: characterization of starch synthesis and transport properties across the amyloplast envelope. *Biochem. J.* **324**: 503-509.
- Moose, S.P., Dudley, J.W., Rocheford, T.R. (2004) Maize selection passes the century mark: a unique resource for 21st century genomics. *Trends Plant Sci.* **9**: 358-364.
- Mouille, G., Maddelein, M.L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B., Ball S. (1996) Preamylopectin processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* **8**: 1353-1366.
- Müller-Röber, B.T., Kossman, J., Hannah, L.C., and Willmitzer, L. (1990). One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 136–146.
- Myers A.M., Morell M.K., James M.G., Ball S.G. (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol.* **122**: 989-997.

- Nakamura, Y., Kubo, A., Shimamune, T., Matsuda, T., Harada, K., Satoh, H. (1997) Correlation between activities of starch debranching enzyme and  $\alpha$ -polyglucan structure in endosperms of *sugary-1* mutants of rice. *Plant J.* **12**: 143-153.
- Nelson O.E., Rines H.W. (1962) The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochem Biophys Res Commun.* **131**:297-300.
- Nelson, O. and Pan, D. (1995) Starch Synthesis in Maize Endosperms. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **46**: 475-496.
- Neuhaus, H.E., Batz, O., Thom, E., Scheibe, R. (1993) Purification of highly intact plastids from various heterotrophic plant tissues: Analysis of enzymic equipment and precursor dependency for starch biosynthesis. *Biochem. J.* **296**: 395-401.
- Neuhaus, H.-E., Henrichs, G., Scheibe, R. (1995) Starch degradation in intact amyloplasts isolated from cauliflower floral buds (*Brassica oleracea* L.) *Planta* **195**: 496-504.
- Plaxton, W.C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **47**: 185-214.
- Portais, J.-C., Delort, A.-M. (2002) Carbohydrate Cycling in micro-organisms: what can  $^{13}\text{C}$ -NMR tell us? *FEMS* **26**: 375-402.
- Porter, G.A., Knievel, D.P., Shannon, J.C. (1985) Sugar efflux from maize (*Zea Mays* L.) pedicel tissue. *Plant Phys.* **77**: 524-531.
- Pozueta-Romero, J., P., Akazawa, T. (1993) Biochemical mechanism of starch biosynthesis in amyloplasts from cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) *J. Exp. Bot.* **44(S)**: 197-306.
- Pozueta-Romero, J., Perata, P., Akazawa, T. (1999) Sucrose-Starch conversion in heterotrophic tissues of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**: 489-525.
- Rahman, A., Wong, K.-s., Jane, J.-J., Myers, A.M., James, M.G. (1998) Characterization of SU1 isoamylase, a determinant of storage starch structure in maize. *Plant Physiol.* **117**: 425-435.
- Ratcliffe, R.G., Sachar-Hill, Y. (2001) Probing plant metabolism with NMR. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 499-526.
- Recondo E., Leloir L.F. (1961) Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**: 85-88.
- Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zanduetta-Criado, A. Pozueta-Romero, J. (2000) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: A plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis. *PNAS* **97**: 8705-8710.
- Rolletschek, H., Koch, K., Wobus, U., Borisjuk, L. (2005) Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo. *Plant J.* **42**: 69-83.

- Rontein D., Dieuaide-Noubhani M., Dufoure E.J., Raymond P., Rolin D. (2002) The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 43948-43960.
- Roscher, A., Kruger, N.J., Ratcliffe, G. (2000) Strategies for metabolic flux analysis in plants using labelling. *J. Biotechn.* **77**: 81-102.
- Salanoubat, M., Belliard, G. (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene* **84**: 181-185.
- Salon C., Raymond P., Pradet A. (1988) Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *J. Biol. Chem.* **263**: 12278-12287.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklein, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467.
- Sauer, U. (2004) High-throughput phenomics: experimental methods for mapping fluxomes. *Curr. Opin. Biotech.* **15**: 58-63.
- Sauer, U., Hatzimanikatis V., Bailey J.E., Hochuli M., Szyperski T., Wuthrich K. (1997) Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nat. Biotechnol.* **15**: 448-452.
- Schäfer, J., Kier, L.D., Stejskal, E.O. (1980) Characterization of photorespiration in intact leaves using <sup>13</sup>carbon dioxide labeling. *Plant Physiol.* **65**: 254-259.
- Schuster S, Fell D.A., Dandekar T. (2000) A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nat. Biotech.* **18**: 326-332.
- Schwender, J., Ohlrogge, J.B. (2002) Probing in vivo metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant Physiol.* **130**: 347-361.
- Schwender, J., Ohlrogge, J.B., Shachar-Hill, Y. (2003) A flux model of glycolysis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *J. Biol. Chem.* **278**: 29443-29453.
- Schwender, J., Ohlrogge J., Shachar-Hill Y. (2004) Understanding flux in plant metabolic networks. *Curr Opin Plant Biol.* **7**: 309-317.
- Seo B.S., Kim S., Scott M.P., Singletary G.W. Wong K.S., James M.G., Myers A.M. (2002) Functional interactions between heterologously expressed starch-branching enzymes of maize and the glycogen synthases of Brewer's yeast. *Plant Physiol.* **128**:1189-1199.
- Shannon, J.C. (1968) Carbon-14 distribution in carbohydrates of immature *Zea mays* kernels following <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> treatment of intact plants. *Plant Physiol.* **43**: 1215-1220.

- Shannon, J.C. (1972) Movement of  $^{14}\text{C}$ -labeled assimilates into kernels of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **49**: 198-202.
- Shannon, J.C., Dougherty, C.T. (1972) Movement of  $^{14}\text{C}$ -labeled assimilates into kernels of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **49**: 203-206.
- Shannon, J.C., Knievel, D.P., Chourey, P.S., Liu, S.-Y., Liu, K.-C. (1993) Carbohydrate metabolism in the pedicel and endosperm of miniature maize kernels. *Plant Physiol.* **102** (Suppl.): 42 (Abstr.)
- Shannon, J.C., Pien, F.-M., Liu, K.-C. (1996) Nucleotides and nucleotide sugars in developing maize endosperms. *Plant Physiol.* **110**: 835-843.
- Shannon, J.C., Pien, F.-M., Cao, H., Liu, K.-C. (1998) Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplastidial synthesized ADP-Glucose into amyloplasts of maize endosperm. *Plant Physiol.* **117**: 1235-1252.
- Sikka V.K., Choi S.B., Kavakli I.H., Sakulsingharoj C., Gupta S., Ito H., Okita T.W. (2001) Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.* **161**: 461-468.
- Singletary G.W., Banisadr R., Keeling P.L. (1997) Influence of gene dosage on carbohydrate synthesis and enzymatic activities in endosperm of starch-deficient mutants of maize. *Plant Physiol.* **113**: 293-304.
- Slattery, C.J., Kavalki, I.H., Okita, T.W. (2000) Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends Plant Sci.* **5**: 291-298.
- Smith, A.M., Denyer, K., Martin, C. (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 67-87.
- Smith, A. (2001) The Biosynthesis of Starch Granules. *Biomacromolecules* **2**: 335-341.
- Smith-White, B.J., Preiss, J. (1992) Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J. Mol. Evol.* **34**: 449-464.
- Sriram G, Fulton D.B., Iyer V.V., Peterson J.M., Zhou R., Westgate M.E., Spalding M.H., Shanks J.V. (2004) Quantification of compartmented metabolic fluxes in developing soybean embryos by employing biosynthetically directed fractional  $^{13}\text{C}$  labeling, two-dimensional [ $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ] nuclear magnetic resonance, and comprehensive isotopomer balancing. *Plant Phys.* **136**: 3043-3057.
- Stinard, P.S., Robertson, D.S., Schnable, P.S. (1993) Genetic Isolation, Cloning, and Analysis of a Mutator-Induced, Dominant Antimorph of the Maize amylose extender1 Locus. *Plant Cell* **5**: 1555-1566.
- Stryer, L. Biochemie, 4. Auflage, 1999, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford.
- Sun, C., Sathish, P., Ahlandsberg, S., Jansson, C. (1999) Analyses of isoamylase gene activity in wild-type barley indicate its involvement in starch synthesis. *Plant Mol. Biol.* **40**: 431-443

- Sweetlove, L.J., Burell, M.M., ap Rees, T. (1996) Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.* **320**: 493-498.
- Szyperski, T. (1995) Biosynthetically directed fractional <sup>13</sup>C-labeling of proteinogenic amino acids. *Eur. J. Biochem.* **232**: 433-448.
- Szyperski, T. (1998) <sup>13</sup>C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Quart. Riev. Biophys.* **31**:41-106.
- Tetlow I.J., Morell M.K., Emes M.J. (2004) Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp. Bot.* **55**: 2131-2145.
- Trethewey, R.N., Geigenberger, P., Sonnewald, U., Hennig, A., Müller-Röber, B., Willmitzer, L. (1999) Induction of the activity of glycolytic enzymes correlates with enhanced hydrolysis of sucrose in the cytosol of transgenic potato tubers. *Plant Cell Environ.* **22**: 71-79.
- Thompson, W.L. Weather variability, climatic change, and grain production. *Science* **188**: 535-541.
- Thorne, H.T. (1985) Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. *Ann. Rev. Plant. Phys.* **36**: 317-343.
- Tobias, R.B., Boyer, C.D., Shannon, J.C. (1992) Alterations in carbohydrate intermediates in the endosperm of starch-deficient maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Plant Physiol.* **99**: 146-152.
- Tsai, C.Y. und Glover, D.V. (1974) Effect of the Brittle-1 Sugary-1 double mutant combination on carbohydrate an postharvest quality of sweet corn. *Crop Sci.* **14**: 808-810.
- Tsai, C.Y., Salamini, F., Nelson, O.E. (1970) Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing endosperm of maize. *Plant Physiol.* **46**: 299-306.
- Vilhar, B., Kladnik, A., Blejec, A., Chourey, P.S., Dermastia, M. (2002) Cytometrical evidence that the loss of seed weight in the *miniature1* seed mutant of maize is associated with reduced mitotic activity in the developing endosperm. *Plant Physiol.* **129**: 23-30.
- Viola, R., Davies, H.V., Chudeck, A.R. (1991) Pathways of starch and sucrose biosynthesis in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) and seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). *Planta* **193**: 202-208.
- Visser, R.G.F., Stolte, A., and Jacobsen, E. (1991). Expression of a chimaeric granule-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato plants. *Plant Mol. Biol.* **17**: 691–699.
- Wang, Y.-J., White, P., Pollack, L. and Jane, J.-L. (1993) Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh43 inbred line background. *Cereal Chem.* **70**: 171-179.
- Weber, H., Borisjuk, L., Wobus, U. (1997) Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Sci.* **2**: 169-174.

- Wiechert, W., Möllney, M., Petersen, S., de Graaf, A.A. (2001) A universal framework for  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* **3**: 265-283.
- Wiechert, W. (2001)  $^{13}\text{C}$  Metabolic Flux Analysis. *Metab. Eng.* **3**: 195-206.
- van Winden, W., Verheijen, P., Heijnen, S. (2001) Possible pitfalls of flux calculations based on  $^{13}\text{C}$ -labelling. *Metab. Eng.* **3**:151-162.
- Winter, H., Huber, S.C. (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**: 31-67.
- Wittich, P., Vreugdenhil, D. (1998) Localization of sucrose synthase activity in developing maize kernels by *in situ* enzyme histochemistry. *J. Exp. Bot.* **49**: 1163-1171.
- Zeeman S.C., Umemoto T., Lue W.L., Au-Yeung P., Martin C., Smith A.M., Chen J. (1998) A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and Phytoglykogen. *Plant Cell* **10**: 1699-1711.
- Zeeman S.C., Tiessen A., Pilling E., Kato K.L., Donald A.M., Smith A.M. (2002) Starch synthesis in Arabidopsis. Granule synthesis, composition, and structure. *Plant Physiol.* **129**:516-29.
- Zeng Y., Wu, Y., Avigne, W.T., Koch, K.E. (1998) Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and post-transcriptional responses. *Plant Physiol.* **116**:1573-1585.
- Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T., Koch, K.E. (1999) Rapid Repression of Maize Invertases by Low Oxygen. Invertase/Sucrose Synthase Balance, Sugar Signaling Potential, and Seedling Survival. *Plant Physiol.* **121**: 599-608.
- Zhang, X., Colleoni, C., Ratushna, V., Sirghie-colleoni, M., James, M., Myers, A. (2004) Molecular characterization demonstrates that the Zea mays gene sugary2 codes for the starch synthase isoform SSIIa *Plant Mol. Biol.* **54**:865-879.

## Danksagung

Prof. Dr. Alfons Gier danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das große Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt natürlich Dr. Ulrich Genschel, der meine Arbeit mit steter Diskussionsbereitschaft, mit viel Geduld und Humor betreut hat und immer ein offenes Ohr für Fragen aller Art hatte.

Ich bedanke mich bei meinen Kooperationspartnern vom Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der TU München unter Prof. Dr. Adalbert Bacher für die fachliche Zusammenarbeit. Dank an Dr. Wolfgang Eisenreich und Dr. Christian Ettenhuber sowie allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die Hilfsbereitschaft während meiner Aufenthalte in Garching. Besonders bedanken möchte ich mich dabei bei Dr. Lilla Margl für die stets gute Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Curt Hannah für seine herzliche Gastfreundschaft und die unkomplizierte Zusammenarbeit während meiner Aufenthalte in Florida. Ich danke ihm und seinen Mitarbeitern für die Anzucht der Pflanzen, für die Einarbeitung in die Sterilkultur, für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre im Labor.

All meinen Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl für Genetik danke ich für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit: Dr. Monika Frey, Dr. Ramon Torres Ruiz, Dr. Erich Glawischnig, Regina Hüttl, Dr. Regina Schuegger, Regina Stefanek, Hedi Kellner, Dr. Oksana Kortés, Dr. Woong June Park, Thomas Rauhut, Birgit Treml, Peter Dobos, Anne Osterrieder, Kathi Lange, Katrin Schullehner, Andi Fiesselmann, Sabine Merl und allen anderen.

Mein besonderer Dank gilt dabei dem Trio Verena Kriechbaumer, Rafal Jonczyk und Silvia Ronconi, die mit viel Humor und Zank immer für gute Stimmung gesorgt haben.

Danke auch an Dr. Karolin Schmäzlin, Dr. Christine Schäfer und Dr. Annette Martin für die schöne Zeit zu Beginn meiner Promotion.

Danke an Heidi Miller-Mommerskamp für ihren grünen Daumen bei der Pflanzenpflege und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Sterilkultur und Markierung.

Dank an Burkhardt Schmerling für den germanistischen Rat und das Korrekturlesen.

Zu guter letzt bedanke ich mich noch bei meinem Freund Mario, bei meinen Eltern und bei meinen Geschwistern Evi, Regina, Schosi, Monika, Elfi, Herbert und Christine für die Unterstützung vor, während und bestimmt auch nach der Doktorarbeit.