

Molekulare und biochemische Charakterisierung der Hexokinase-Genfamilie von *Nicotiana tabacum*



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Jens-Otto Giese
geb. am 25.12.1972 in Köln

Gutachter:

1. Prof. Dr. Uwe Sonnewald
2. Prof. Dr. Udo Johanningmeier

Halle (Saale), den 29. August 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009139

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009139>]

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Hexokinase als erstes Enzym des Glukose-Stoffwechsels	1
1.2	Triosephosphate, Saccharose und Stärke als Produkte der Photosynthese.....	2
1.3	Abbau von Stärke	3
1.4	Transport von Saccharose in <i>Sink</i> -Gewebe und dortige Spaltung	3
1.5	Hexokinase als Zuckersensor	5
1.6	Zelluläre und subzelluläre Lokalisierung pflanzlicher Hexokinasen	7
1.7	Biochemische Eigenschaften von Hexokinasen.....	9
1.7.1	Substratspezifität	9
1.7.2	pH-Abhängigkeit	11
1.7.3	Inhibitoren	11
1.8	Struktur und Reaktionsmechanismus	12
1.9	Zielsetzung der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	15
2.2	Anzucht von Pflanzen.....	15
2.2.1	Anzucht von <i>Nicotiana tabacum</i>	15
2.2.2	Anzucht von <i>Nicotiana glauca</i>	15
2.2.3	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.3	Bakterienstämme und Vektoren	16
2.4	Pflanzentransformation	17
2.4.1	Stabile Pflanzentransformation	17
2.4.2	Transiente Pflanzentransformation durch Agrobakterien-Infiltration.....	18
2.4.3	Transiente biolistische Transformation	18

2.5	Sterilisierung von Samen	19
2.6	Molekularbiologische Methoden	19
2.6.1	Allgemeine Verfahren der Nukleinsäure-Manipulation	19
2.6.2	Oligonukleotide und Sequenzierungen	19
2.6.3	Isolierung pflanzlicher RNA und Northern-Analyse	19
2.6.4	Isolierung pflanzlicher DNA.....	20
2.6.5	Southern-Analyse.....	20
2.6.6	Reverse Transkription	21
2.6.7	RACE-PCR	21
2.6.8	„Genome Walking“	22
2.6.9	Durchmusterung von Phagen-DNA-Bibliotheken	22
2.7	Proteinbiochemische Methoden	22
2.7.1	Proteinfärbung mit Coomassie Brilliantblau.....	22
2.7.2	Western-Analyse	23
2.7.2.1	Entwicklung mittels Farbreaktion durch alkalische Phosphatase	23
2.7.2.2	Entwicklung mittels Chemolumineszenz durch Meerrettich-Peroxidase	23
2.7.3	Protein-Expression in <i>E. coli</i> und Gewinnung von Antiseren	24
2.7.4	Affinitätsreinigung von Antiseren	25
2.8	Mikroskopische Techniken	25
2.8.1	Fluoreszenzmikroskopie	25
2.8.2	Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien mit „MitoTracker CM-H ₂ TMRos“	26
2.8.3	Transmissionselektronenmikroskopie und Immunolokalisierung	26
2.9	Aktivitätsmessungen von Enzymen	27
2.9.1	Herstellung pflanzlicher Extrakte für Enzymmessungen.....	27
2.9.2	Messung von Hexokinase-Aktivität.....	27
2.9.3	Messung von Adenylatkinase-Aktivität.....	28
2.9.4	Histochemischer Nachweis von β -Glukuronidase-Aktivität.....	28
2.9.5	Messung von β -Glukuronidase-Aktivität.....	29
2.10	<i>In vitro</i> Translation und Chloroplastenimport	29
2.11	Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten und Stärke	30

3	Ergebnisse	31
3.1	Isolierung und Sequenzanalyse pflanzlicher Hexokinasen	31
3.1.1	Isolierung von Hexokinase-Genen aus <i>Nicotiana tabacum</i>	31
3.1.1.1	Durchmusterung einer cDNA-Bank	32
3.1.1.2	PCR mit degenerierten Primern	32
3.1.1.3	RACE PCR	33
3.1.2	Sequenzanalyse pflanzlicher Hexokinasen	34
3.2	Southern-Analysen	37
3.2.1	Southern-Analysen von <i>NtHxk1</i> , 3 und 7	38
3.2.2	Southern-Analysen von <i>NtHxk4</i> und <i>NtHxk5</i>	39
3.2.3	Southern-Analyse von <i>NtHxk2</i>	40
3.2.4	Southern-Analyse von <i>NtHxk6</i>	40
3.3	Heterologe Expression von NtHxk1a und NtHxk2 in <i>E. coli</i> zur Gewinnung von Antiseren	42
3.3.1	Erstellung von Konstrukten zur bakteriellen Expression von NtHxk1a und NtHxk2	42
3.3.2	Expression und Reinigung der Proteine NtHxk1a und NtHxk2(1-231)	43
3.3.3	Test der Antiseren	43
3.4	Innerzelluläre Verteilung der Hexokinasen	45
3.4.1	Konstruktion von Hexokinase-GFP-Fusionen	46
3.4.1.1	Fusionen von NtHxk1, 2 und 7 mit GFP	47
3.4.1.2	Konstruktion des binären GFP-Fusionsvektors pBinGFP	48
3.4.1.3	Fusionen von NtHxk3, 4a, 5 und 6 mit GFP	48
3.4.1.4	Fusion des N-Terminus von NtHxk4a mit GFP	49
3.4.2	Transformation von Tabakpflanzen mit Hexokinase-GFP-Fusionen	50
3.4.3	NtHxk1 ist mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert	50
3.4.4	NtHxk3 ist mit Mitochondrien assoziiert	52
3.4.5	NtHxk4a ist mit Mitochondrien assoziiert	53
3.4.6	NtHxk5 ist vermutlich mit Mitochondrien assoziiert	54
3.4.7	NtHxk6 ist vermutlich mit Mitochondrien assoziiert	54
3.4.8	NtHxk7 ist mit Mitochondrien assoziiert	55
3.4.9	Nachweis von NtHxk2 im Chloroplastenstroma	55

3.4.10	Auch StHxkRP1 aus Kartoffel ist ein plastidäres Enzym.....	58
3.5	Untersuchungen zu den Mitochondrien-Konglomeraten.....	59
3.5.1	Herstellung weiterer Fusionsproteine von NtHxk1 und NtHxk1N mit GFP und GUS.....	60
3.5.1.1	Konstruktion der binären Vektoren pBinGFP-GUS, pBinGUS-GFP und pBinGUS	60
3.5.2	Untersuchung der Fusionsprodukte in transgenen Tabakpflanzen	61
3.5.3	Mitochondrien-Konglomerate bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
3.6	Vorkommen der verschiedenen Hexokinase-Isoformen in unterschiedlichen Geweben.....	62
3.6.1	Hexokinase-Aktivität in verschiedenen Geweben von Tabak	63
3.6.2	Tabak-Hexokinasen werden differentiell exprimiert	64
3.6.3	Induktion der Hexokinasen durch Glukose.....	65
3.7	Isolierung und Charakterisierung von Hexokinase-Promotoren.....	66
3.7.1	Durchmusterung einer genomischen Phagenbibliothek von <i>N. sylvestris</i> , Isolierung von <i>PNsHxk4</i>	67
3.7.2	Isolierung von <i>PNtHxk1</i> und <i>PNtHxk2</i> durch „Genome Walking“	68
3.7.3	Sequenzanalyse der Hexokinase-Promotoren.....	68
3.7.3.1	Sequenzanalyse des <i>NtHxk1</i> -Promotors.....	69
3.7.3.2	Sequenzanalyse des <i>NtHxk2</i> -Promotors.....	70
3.7.3.3	Sequenzanalyse des <i>NsHxk4</i> -Promotors	71
3.7.4	Konstruktion von Promotor-GUS-Fusionen	72
3.7.5	Verteilung von GUS-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen.....	72
3.7.5.1	<i>PNtHxk1</i> vermittelte keine GUS-Aktivität	73
3.7.5.2	<i>PNtHxk2</i> vermittelte Aktivität in Leitgewebe, Schließzellen und Wurzelspitze	73
3.7.5.3	<i>PNsHxk4</i> vermittelte hauptsächlich Aktivität in Pollen.....	75
3.8	Konstitutive Überexpression von Hexokinase-Isoformen in Tabak.....	77
3.8.1	Herstellung von Konstrukten zur Überexpression verschiedener Hexokinase-Isoformen	78
3.8.2	Erzeugung transgener Tabakpflanzen mit erhöhter Hexokinase-Expression	79
3.8.3	Charakterisierung der Tabakpflanzen mit erhöhter Hexokinase-Expression	81

3.8.3.1	NtHxk6-Pflanzen zeigten einen veränderten Phänotyp.....	82
3.8.3.2	Lösliche Zucker und Stärke in Hexokinase überexprimierenden Pflanzen.....	82
3.9	Messungen der Hexokinase-Aktivitäten nach stabiler Überexpression in Tabak	85
3.9.1	Überexpression von NtHxk6 resultierte nicht in erhöhter Hexokinase-Aktivität	86
3.9.2	pH-Abhängigkeit der Hexokinasen	86
3.9.3	Affinitäten der Hexokinasen zu Glukose.....	88
3.9.4	Affinitäten der Hexokinasen zu Mannose	90
3.9.5	Affinitäten der Hexokinasen zu Fruktose.....	92
3.9.6	Phosphorylierungskoeffizienten der untersuchten Hexokinase-Isoformen.....	95
3.9.7	Affinitäten der Hexokinase-Isoformen zu ATP.....	95
3.9.8	Inhibition der Hexokinase-Isoformen durch ADP.....	97
3.9.9	Aktivität mit ADP.....	99
3.9.10	Inhibition durch AMP.....	100
3.9.11	Inhibition durch Trehalose-6-phosphat	101
4	Diskussion	102
4.1	Anzahl der Hexokinase-Gene in Tabak.....	102
4.2	Innerzelluläre Verteilung der Tabak-Hexokinasen.....	105
4.2.1	NtHxk2 ist ein stromales Protein.....	105
4.2.2	NtHxk1, 3, 4a, 5, 6, und 7 sind mit Mitochondrien assoziiert.....	105
4.2.3	Gibt es lösliche zytosolische Hexokinasen in Pflanzen?.....	106
4.3	In der äußeren Mitochondrienmembran verankertes GFP führt zu Konglomeraten aus Mitochondrien	107
4.4	Gewebespezifität der Hexokinase-Isoformen.....	109
4.4.1	Gewebespezifität von NtHxk1 und NtHxk7.....	109
4.4.1.1	Analyse des <i>NtHxk1</i> -Promotors	110
4.4.1.2	Analyse des <i>NsHxk4</i> -Promotors	111
4.4.2	Gewebespezifität von NtHxk2.....	112
4.4.2.1	Analyse des <i>NtHxk2</i> -Promotors	113
4.4.3	Gewebespezifität von NtHxk3.....	114
4.4.4	Gewebespezifität von NtHxk4, 5 und 6.....	115

4.5	Aktivitätsmessungen	115
4.5.1	Überexpression von NtHxk6 führte nicht zu erhöhter Hexokinase-Aktivität....	116
4.5.2	pH-Abhängigkeiten	117
4.5.3	Affinitäten zu Glukose, Mannose und Fruktose	118
4.5.4	Affinitäten zu ATP	119
4.5.5	Inhibition durch ADP	121
4.5.6	Inhibition durch andere Metabolite	122
4.5.7	Hexokinase-Aktivität im Wildtyp-Blatt.....	122
4.6	Messung von Kohlenhydraten und Fütterungsversuch	123
4.7	Integration der Einzelergebnisse in Modelle	124
4.7.1	Funktion von NtHxk1, 3, und 7	124
4.7.2	Funktion von NtHxk2	127
4.7.3	Funktion von NtHxk4 und NtHxk5	130
4.7.4	Funktion von NtHxk6	131
5	Zusammenfassung	133
6	Abkürzungsverzeichnis	135
7	Literaturverzeichnis.....	138
8	Anhang	154
I	Sequenzen	154
I.1	Verwendete Primer für PCR	154
I.2	Sequenz der isolierten <i>NtHxk1</i> cDNA, Akzession AF118133.....	156
I.3	Sequenz der isolierten <i>NtHxk1a</i> cDNA, Akzession AY553214	157
I.4	Sequenz der isolierten <i>NtHxk2</i> cDNA, Akzession AY553215	158
I.5	Sequenz der isolierten <i>NtHxk3</i> cDNA, Akzession AY553216	159
I.6	Sequenz der isolierten <i>NtHxk4a</i> cDNA, Akzession AY553217	160

I.7	Sequenz der isolierten <i>NtHxk4b</i> cDNA, Akzession AY553218.....	161
I.8	Sequenz der <i>NtHxk5</i> cDNA, Akzession AY553219.....	162
I.9	Sequenz der isolierten <i>NtHxk6</i> cDNA, Akzession AY553220.....	163
I.10	Sequenz der isolierten <i>NtHxk7</i> cDNA, Akzession AY664010.....	164
I.11	Sequenz des isolierten <i>NtHxk1</i> Promotors, Akzession AY664411	165
I.12	Sequenz des isolierten <i>NtHxk2</i> Promotors, Akzession AY664412	166
I.13	Sequenz des isolierten <i>NsHxk4</i> Promotors, Akzession AY664409.....	166
II	Sequenzvergleich von Hexokinasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Nicotiana tabacum</i>	167
III	Übersicht bislang charakterisierter pflanzlicher Hexokinase- Aktivitäten	168
IV	Ergänzende Versuche in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen	172
IV.1	RNA-Interferenz von <i>NtHxk2</i> und <i>NtHxk6</i>	172
IV.2	Doppeltransformationen mit zytosolischer Invertase	172
	Publikationsliste	174
	Danksagung.....	175
	Lebenslauf.....	176
	Erklärung	177

1 EINLEITUNG

1.1 Hexokinase als erstes Enzym des Glukose-Stoffwechsels

D-Glukose (des Weiteren nur Glukose genannt) ist ein zentraler Metabolit im Stoffwechsel aller Lebewesen. In Pflanzen ist sie Bestandteil wichtiger Kohlenhydrate wie Saccharose und Stärke, sowie der Strukturpolysaccharide Zellulose, Hemizellulose und Kallose. Ausgehend von Glukose können die sekundären Pflanzenstoffe, Aminosäuren, Fettsäuren und Vorstufen der Nucleotidzucker synthetisiert werden. Durch Abbau in der Glykolyse und anschließender Veratmung wird die in den chemischen Bindungen des Glukosemoleküls gespeicherte Energie dem Organismus zugeführt (s. Abb. 1).

Erster Schritt der Metabolisierung von Glukose ist die Phosphorylierung des Kohlenstoffatoms C-6. Katalysiert wird die Reaktion durch das Enzym Hexokinase (Hxk) unter Verbrauch einer energiereichen Phosphatbindung von ATP.

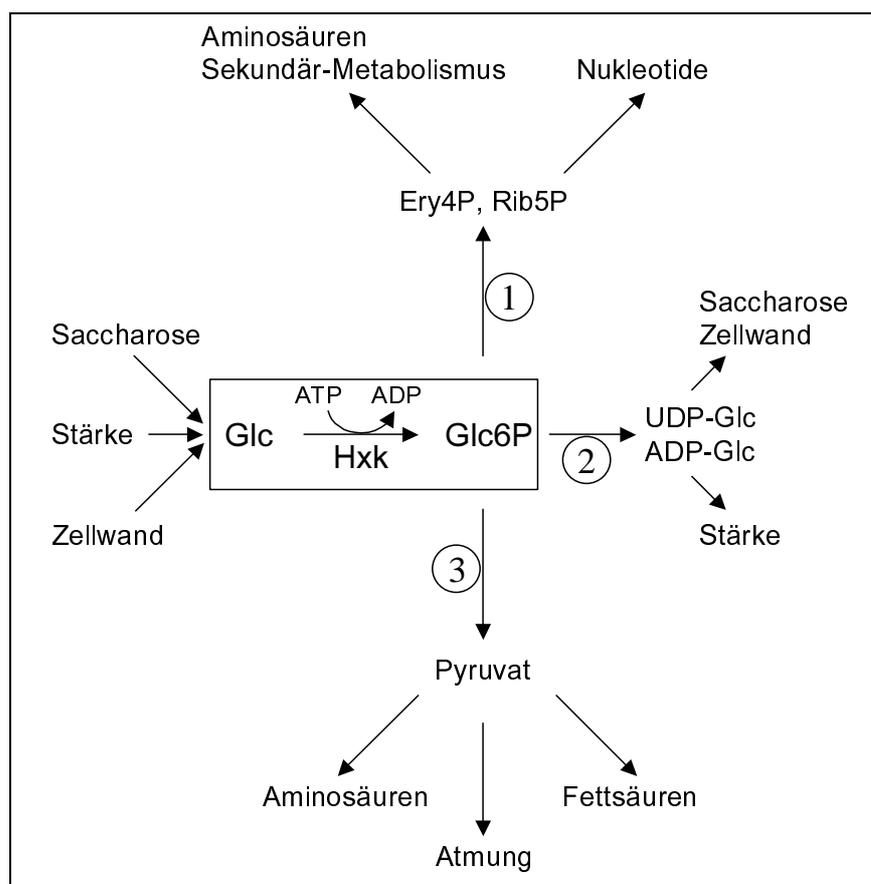


Abbildung 1: Zentrale Stellung von Glukose und Hexokinase im Stoffwechsel, eingerahmt die Hexokinase-Reaktion. **1:** Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase führt in den Oxidativen Pentosephosphatweg, **2:** Phosphoglukomutase führt in die Synthese von UDP-Glukose und ADP-Glukose, **3:** Phosphoglukoisomerase führt in die Glykolyse. Abkürzungen: Ery4P: Erythrose-4-phosphat, Glc: Glukose, Glc6P: Glukose-6-phosphat, Rib5P: Ribose-5-phosphat.

Aufgrund der Universalität von Glukose im Stoffwechsel sind Hexokinasen in allen Lebewesen verbreitete Enzyme (Cardenas *et al.*, 1998). Das Wort „Hexokinase“ besagt, dass außer Glukose auch andere Hexosen, z.B. Fruktose oder Mannose, dem Enzym als Substrat dienen können, wenn auch mit unterschiedlichen Affinitäten. So ist die Affinität zu Fruktose in der Regel deutlich geringer als zu Glukose oder Mannose (s. 1.7.1). Für die Phosphorylierung von Fruktose gibt es daher auch spezialisierte Fruktokinasen, die strukturell nicht mit Hexokinasen im engeren Sinne verwandt sind (Bork *et al.*, 1993). Gleiches gilt für prokaryotische Hexosekinasen, die z.B. als Glukokinasen in der Regel nur für eine einzige Hexose spezifisch sind (Cardenas *et al.*, 1998).

In den folgenden Abschnitten werden grundlegende Aspekte des pflanzlichen Zuckerstoffwechsels dargestellt und die Rolle der Hexokinase darin beschrieben, sowie die Eigenschaften bisher charakterisierter Hexokinasen dargelegt. Enzymatische Reaktionen, die zum Hexokinase-Substrat Glukose führen, sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

1.2 Triosephosphate, Saccharose und Stärke als Produkte der Photosynthese

Photosynthetisch aktive Pflanzen sind in der Lage, aus CO₂ und Wasser energiereiche Kohlenhydrate zu erzeugen. Die dazu erforderliche Energie wird durch Photosynthese aus Sonnenlicht gewonnen. Diese Reaktionen laufen in den Chloroplasten ab. Produkte der CO₂-Assimilation sind die Triosephosphate Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat. Sofern diese nicht bereits in den Chloroplasten metabolisiert werden, werden sie durch einen Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT) ins Zytosol transportiert (Fliege *et al.*, 1978; Flügge, 1999). Dort werden sie in die Glykolyse eingeschleust oder in Saccharose (Suc) umgewandelt. Überschüssige Triosephosphate werden in den Chloroplasten in Form transitorischer Stärke zwischengespeichert. Pflanzengewebe, die mehr CO₂ assimilieren, als sie selber verbrauchen, werden als *Source* bezeichnet. Pflanzengewebe, die auf den Import von Assimilaten aus *Source*-Geweben angewiesen sind, hauptsächlich in Form von Saccharose, nennt man *Sink*. Ein sich entwickelndes Blatt z.B. ist zuerst ein *Sink* und entwickelt sich zum *Source*.

1.3 Abbau von Stärke

Der Abbau von Stärke im Blatt ist noch nicht im Detail verstanden (Zeeman *et al.*, 2004). Studien transgener Pflanzen mit reduzierter TPT-Aktivität zeigten, dass der Triosephosphat/Phosphat-Translokator für den Export der Abbauprodukte transitorischer Stärke nicht essentiell ist (Riesmeier *et al.*, 1993, Schneider *et al.*, 2002). Dagegen zeigten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit mutiertem Maltose-Transporter MEX1 deutlich verringerten Wuchs und Chlorophyllgehalt, was darauf hindeutet, dass Maltose das Hauptprodukt des Stärkeabbaus ist (Niittylä *et al.*, 2004). Dies wurde für den nächtlichen Stärkeabbau in Spinat experimentell bestätigt (Weise *et al.*, 2004). Homologe Gensequenzen zu MEX1 in anderen Pflanzen lassen vermuten, dass dieser Abbauweg in Pflanzen konserviert ist.

Die ins Zytosol exportierte Maltose wird von einer Glukosyltransferase in zwei Glukose-Moleküle gespalten, von denen eines auf ein noch weitgehend unbekanntes Polyglukan oder Heteroglykan übertragen wird (Chia *et al.* 2004; Fettke *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004). Dieses Polyglukan wird vermutlich durch eine zytosolische Stärke-Phosphorylase zu Glukose-1-phosphat abgebaut, welches anschließend in die Saccharose-Produktion einfließen kann (Fettke *et al.*, 2004; Sharkey *et al.*, 2004). Auf- und Abbau des Polyglukans durch die genannten Enzyme ist auf noch unverstandene Weise essentiell für den Stärkeabbau, wie entsprechende *Arabidopsis thaliana* Mutanten zeigten (Sharkey *et al.*, 2004). Die bei der zytosolischen Glukosyltransferase-Reaktion freigesetzte Glukose ist Substrat für die Hexokinase. Geringe Mengen Glukose entstehen auch beim β -amylolytischen Abbau der Stärke im Plastiden durch Aktivität einer plastidären Glukosyltransferase, Maltose-Phosphorylase oder α -Glukosidase (Critchley *et al.*, 2001; Zeeman *et al.*, 2004).

1.4 Transport von Saccharose in *Sink*-Gewebe und dortige Spaltung

In den meisten höheren Pflanzen ist Saccharose die Haupttransportform von Kohlenhydraten. Die im *Source*-Gewebe produzierte Saccharose wird durch Plasmodesmen bis zum Phloem-Parenchym transportiert, wo sie über einen apoplastischen Schritt und aktiven Transport in die Phloem-Elemente aufgenommen wird (Turgeon, 1989; Riesmeier *et al.*, 1994). Die Entladung des Phloems erfolgt je nach Spezies, Gewebe und Entwicklungszustand symplastisch oder apoplastisch (Patrick, 1997). Im Zielgewebe kann die Saccharose durch zwei Enzyme gespalten werden, um sie dem weiteren Stoffwechsel zuzuführen (Koch, 2004):

Saccharose-Synthase (SuSy) katalysiert die Reaktion $\text{Suc} + \text{UDP} \leftrightarrow \text{Fruktose} + \text{UDP-Glukose}$, Invertase spaltet die Saccharose in ihre Untereinheiten Glukose und Fruktose. Die dabei entstehende Glukose dient der Hexokinase als Substrat. Invertasen kommen im Zytosol, in der Vakuole und in der Zellwand vor. Es gibt Hinweise auf zyklischen Abbau und Synthese von Saccharose unter Mitwirkung von Invertasen und Hexokinase (Moore *et al.*, 1998, Nguyen-Quoc und Foyer, 2001).

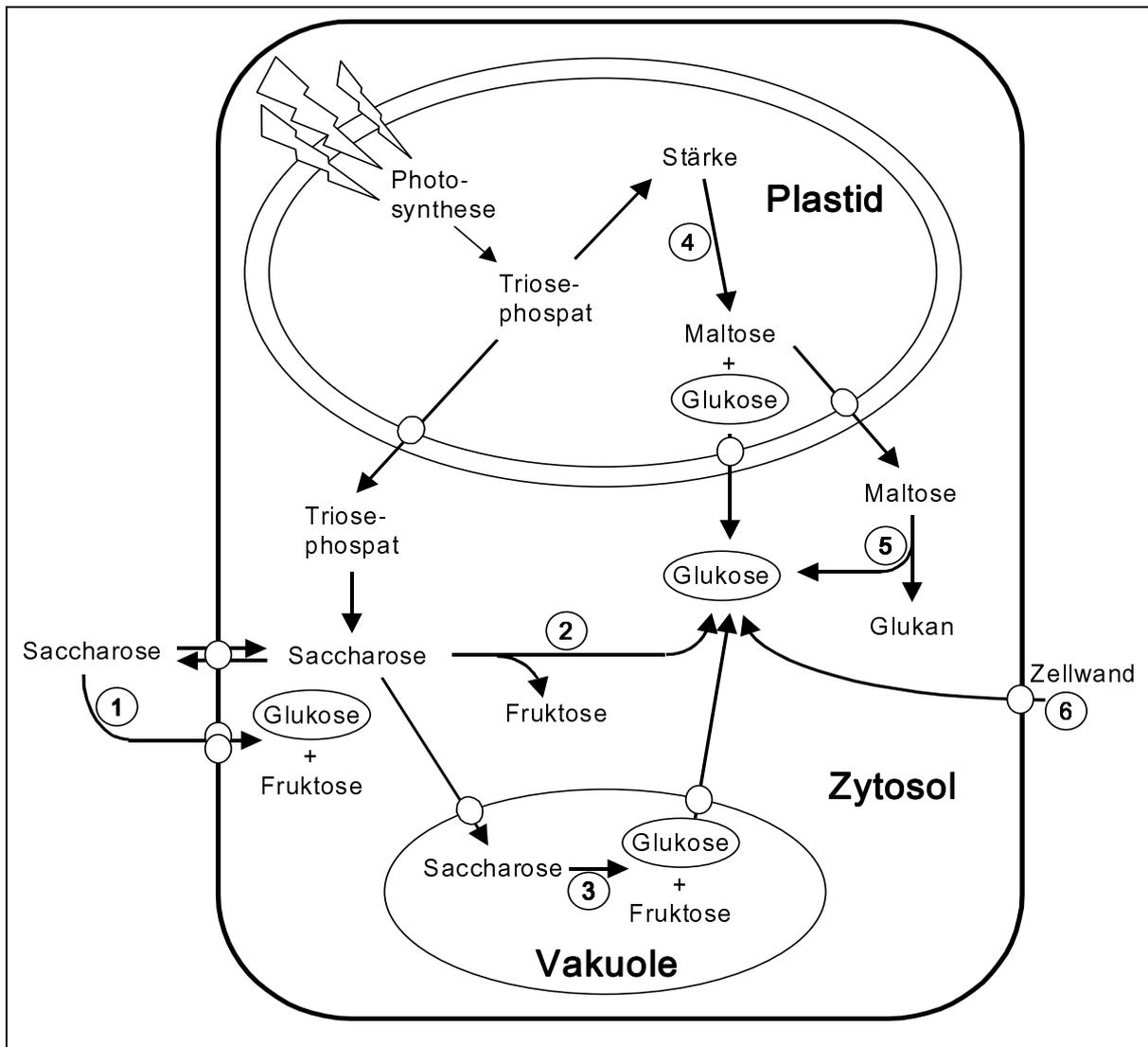


Abbildung 2: Schematische Übersicht des zu Glukose führenden Stoffwechsels in einer Pflanzenzelle. Der Einfachheit halber wurde auf Unterscheidung von *Source*- und *Sink*-Zelle verzichtet. Durch Zahlen gekennzeichnete enzymatische Reaktionen führen zu Glukose. 1: Zellwandgebundene Invertase, 2: zytosolische Invertase, 3: vakuoläre Invertase, 4: plastidäre β -Amylase und Glukosyltransferase, Maltose-Phosphorylase oder α -Glukosidase, 5: zytosolische Glukosyltransferase, 6: Glukanase, Zellulase, Kallase.

1.5 Hexokinase als Zuckersensor

Zucker sind nicht nur Energiequelle und Ausgangspunkt vielfältiger Synthesewege, sondern üben auch einen regulatorischen Effekt auf die Expression spezifischer Gene, z.B. des Kohlenhydrat-Stoffwechsels, Sekundär-Metabolismus, der Stickstoff-Assimilation und Photosynthese aus. Beeinflusst von Zuckern sind Embryogenese, Keimung, Entwicklung von Wurzel und Blatt, Blüte, Stress-Antwort, Pathogen-Abwehr, Wund-Antwort und Seneszenz (zusammengefasst von Koch, 1996; Sheen *et al.*, 1999; Halford und Paul, 2003). Bei der Perzeption des Zucker-Signals werden verschiedene Mechanismen verwendet, die unter dem Begriff „*Sugar Sensing*“ zusammengefasst werden. Für einen dieser Mechanismen gilt Hexokinase als wesentlicher Bestandteil. Über enge Verbindungen zu den Pflanzenhormonen Auxin und Cytokinin werden komplexe Wechselwirkungen möglich (Moore *et al.*, 2003). Durch Hexokinase vermittelte Genregulation wurde für verschiedene Gene der Photosynthese (Jang und Sheen, 1994), des Glyoxylatzyklus (Graham *et al.*, 1994), für Mannitol-Dehydrogenase (Prata *et al.*, 1997) und α -Amylase (Umemura *et al.*, 1999) beschrieben.

Nach transienter Transformation von Maisprotoplasten mit sieben verschiedenen Promotoren photosynthetischer Gene wurde festgestellt, dass deren Aktivität nach Zugabe verschiedener Zucker reprimiert wurde (Sheen, 1990). Bei späteren Versuchen wurde festgestellt, dass innerzelluläre Glukose die Reprimierung auslöst, wobei die Phosphorylierung durch Hexokinase das entscheidende Element ist (Jang und Sheen, 1994; Pego *et al.*, 1999). Hexose-Phosphate hatten keine reprimierende Wirkung, was zeigte, dass keine weitere Metabolisierung zur Signalgenerierung nötig ist. Glukose-Analoga wirkten nur, wenn sie Substrat von Hexokinase waren. Durch den Hexokinase-Inhibitor Mannoheptulose konnte die Reprimierung aufgelöst werden. Überexpression der Hexokinasen AtHxk1 oder AtHxk2 in *Arabidopsis thaliana* führte zu Hypersensitivität von Keimlingen gegenüber Glukose, Inhibition durch *Antisense*-Technik zu Hyposensitivität (Jang *et al.*, 1997). Starke Expression von AtHxk1 in Tomatenpflanzen resultierte in vermindertem Wuchs und geringerer Photosynthese, sowie verfrühter Seneszenz (Dai *et al.*, 1999). Dagegen zeigten Kartoffelpflanzen mit erhöhter oder verminderter endogener Hexokinase-Aktivität keine Auffälligkeiten, die auf Hexokinase als Zuckersensor schließen ließen. Gleichwohl hoben beide dabei verwendeten Isoformen in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit verminderter endogener Hexokinase-Aktivität deren Hyposensitivität gegenüber Glukose auf (Veramendi *et al.*, 1999, 2002). Aufgrund experimenteller Schwächen und der vielfältigen Möglichkeiten pleiotroper Effekte durch Manipulation der Hexokinase-Aktivität war (und ist) die Rolle von Hexokinase als Zuckersensor umstritten (Halford *et al.*, 1999). Die Isolierung zweier Mutanten von

AtHxk1 aus *Arabidopsis thaliana*, die trotz fehlender katalytischer Funktion noch Einfluss auf die Genexpression nehmen können, ist allerdings ein denkbar guter Beleg für ihre Funktion als Zuckersensor (Moore *et al.*, 2003).

Wie das Signal von der Hexokinase zur Genregulation weitergeleitet wird, ist für Pflanzen noch gänzlich unbekannt. Es werden mehrere Möglichkeiten diskutiert, wobei man auf Modelle aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* angewiesen ist (Rolland *et al.*, 2002 B). Wie aus Strukturuntersuchungen bekannt ist, vollzieht das Hexokinase-Protein während der Katalyse mehrere Konformationsänderungen bei Bindung von Glukose, vermutlich bei Bindung von ATP, und bei Dissoziation der Produkte Glukose-6-phosphat und ADP (s. 1.8). Es ist anzunehmen, dass beide mutierten Formen von AtHxk1 noch Glukose binden und eine Konformationsänderung durchführen, die Katalyse jedoch nicht weiter ausführen können. Diese Konformationsänderung könnte Interaktion mit noch unbekanntem Proteinen ermöglichen, die das Signal weiterleiten (Frommer *et al.*, 2003; Harrington und Bush, 2003). Interaktionen zwischen Hexokinase und anderen Proteinen, sowie Mechanismen zur Genregulation durch Zucker sind in der Bäckerhefe besser erforscht und könnten in Pflanzen in ähnlicher Weise vorkommen. In der Bäckerhefe wird die Transkription von Genen zur Metabolisierung anderer Kohlenstoffquellen in Gegenwart von Glukose reprimiert. Als wichtige Komponente zur langfristigen Reprimierung der Invertase SUC2 wurde Hexokinase PII (ScHxk2) identifiziert (Entian und Mecke, 1982; Hohmann *et al.*, 1999). ScHxk2 ist hauptsächlich im Zytosol lokalisiert, geringe Mengen wurden aber auch im Zellkern nachgewiesen (Randez-Gil *et al.*, 1998). Dort bindet sie, komplexiert mit anderen Proteinen, an den Promotor von SUC2 und reprimiert diesen (Herrero *et al.*, 1998). Die DNA-Bindung wird von dem Repressor Mig1 vermittelt, vermutlich auch der Import in den Zellkern in Gegenwart von Glukose (Ahuatzi *et al.*, 2004). Weiterer Bestandteil des Repressor-Komplex ist der Corepressor-Komplex Cyc8(Ssn6)-Tup1 (Treitel und Carlson, 1995). Bei Glukosemangel wird die Proteinkinase SNF1 (Sucrose Nonfermenting 1) aktiviert, welche Mig1 phosphoryliert. Daraufhin löst sich der Repressor-Komplex, Mig1 und ScHxk2 verlassen den Zellkern und SUC2 kann transkribiert werden (DeVit *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999). Defekte in SNF1 führen zu ständiger Reprimierung des SUC2-Gens mit der Folge, dass die Zellen nicht mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen können (Carlson *et al.*, 1981).

ScHxk2 kann außer Hexosen auch in geringerem Umfang Proteine phosphorylieren, wobei maximale Aktivität bei hoher Glukose-Konzentration erreicht wird (Herrero *et al.*, 1988).

Grundsätzlich böte auch diese Reaktion die Möglichkeit der Weiterleitung eines Signals. Hierfür gibt es jedoch keine Belege.

Für die Aktivierung von Genen zur Galaktose-Metabolisierung ist in Hefen ein Signalweg bekannt, der auch für Hexokinasen vorstellbar ist. Gene zur Metabolisierung von Galaktose werden von der Bäckerhefe nur in Anwesenheit dieses Zuckers transkribiert. Gal4p ist ein Aktivator dieser Transkription und wird durch Gal80p inhibiert. Gal3p ist ein Paralog der Galaktokinase mit ähnlicher Sequenz, aber ohne entsprechende katalytische Aktivität. In Gegenwart von ATP und Galaktose bindet Gal3p den Inhibitor Gal80p, wodurch der Aktivator Gal4p aktiv wird und die Transkription der GAL-Gene ermöglicht (Peng und Hopper, 2002). In der Milchhefe *Kluyveromyces lactis* ist es die Galaktokinase selber, die den Inhibitor Gal80p bindet (Menezes *et al.*, 2003).

Analoge Signalwege in der pflanzlichen Zelle sind bislang unbekannt. Zur Aufklärung der Signalwege des *Sugar Sensing*, insbesondere des von Hexokinase abhängigen, können Pflanzen beitragen, die aufgrund von Mutationen verändert auf Zucker reagieren. Von *Arabidopsis thaliana* sind eine Vielzahl von *cai* (carbohydrate insensitive), *gin* (Glucose insensitive), *sis* (sugar insensitive), *sun* (sucrose uncoupled) und weiterer Mutanten bekannt, die nach Identifizierung der Mutation Rückschlüsse auf Signalwege zulassen. Häufig werden dabei Gene identifiziert, die bereits in anderen Mutanten beschrieben wurden. Dies zeigt, wie komplex die Signalwege sind, und dass es Überschneidungen gibt, insbesondere mit Pflanzenhormonen (Rolland *et al.*, 2002 A; Leon und Sheen, 2003; Moore *et al.*, 2003; Gibson, 2004).

Eine andere Möglichkeit zur Aufklärung von Signalwegen bieten Genchips, mittels derer sich komplette Transkriptionsprofile erstellen lassen. Dabei wurden insbesondere Interaktionen zwischen Glukose und Stickstoff bei der Genregulation festgestellt (Price *et al.*, 2004). Es wurde auch festgestellt, dass für Glukose-Aktivierung der Transkription häufiger neue Proteine synthetisiert werden müssen als für die Reprimierung.

1.6 Zelluläre und subzelluläre Lokalisierung pflanzlicher Hexokinasen

Pflanzen bestehen aus verschiedenen spezialisierten Organen wie Wurzel, Spross, Blatt oder Blüte. Ihre Zellen besitzen eine Vielzahl spezialisierter Organellen wie Mitochondrien, Plastiden, Dictyosomen, Vakuolen oder Peroxisomen. Diese Kompartimentierung im Großen wie im Kleinen erlaubt unabhängige Regulation verschiedener Stoffwechselwege und kontrollierten Metabolit-Austausch. Für ein Verständnis der Rolle von Hexokinasen im

Metabolismus und als Zuckersensor sind Kenntnisse über ihre Lokalisierung in der Pflanze unerlässlich. Besonders über die Gewebespezifität verschiedener Isoformen ist sehr wenig bekannt.

Biochemische Untersuchungen, die ohne Kenntnis der Proteinsequenzen durchgeführt wurden, beschränkten sich auf die Charakterisierung verschiedener Isoformen innerhalb eines Gewebes (s. Anhang, III). Dabei wurden Hexokinasen im Zytosol, mit Plastiden und mit Mitochondrien assoziiert gefunden. Während Lokalisierungen im Zytosol und besonders an der äußeren Mitochondrienmembran weit verbreitet erscheinen, wurde die Lokalisierung an oder in Plastiden verschiedentlich auch ausgeschlossen (Dry *et al.*, 1983; Tanner *et al.*, 1983). Inzwischen gibt es auch Daten über die subzelluläre Lokalisierung pflanzlicher Hexokinasen bekannter Sequenz. AtHxk1 (Rolland *et al.*, 2002), Athxk2 und At1g50460 (Giegé *et al.*, 2003) von *Arabidopsis thaliana* sind mit Mitochondrien assoziiert. SoHxk1 aus Spinat wurde an der äußeren Chloroplastenmembran und möglicherweise auch an der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen (Wiese *et al.*, 1999). PpHxk1 aus *Physcomitrella patens* ist im Plastidenstroma lokalisiert (Olsson *et al.*, 2003). Aufgrund von Sequenzvergleichen und Computerberechnungen wird angenommen, dass es zwei Gruppen pflanzlicher Hexokinasen mit N-terminalem hydrophoben Membrananker gibt, der das Protein in der äußeren Mitochondrien- oder Plastidenmembran befestigt. Diese beiden Gruppen werden als Typ B1 und B2 bezeichnet. Eine weitere Gruppe ist in sich heterogener und besitzt N-terminal vermutlich ein abspaltbares Transitpeptid für den Transport in das Plastidenstroma. Diese Gruppe vom Typ A ist bislang kaum untersucht und in ihrer computerberechneten Lokalisierung nicht immer eindeutig, so dass auch eine zytosolische oder membrangebundene Lokalisierung im Einzelfall nicht ausgeschlossen wird (Olsson *et al.*, 2003). Bis auf die genannten Beispiele mit bekannter subzellulärer Lokalisierung fehlen jedoch experimentelle Überprüfungen der Computer-Berechnungen.

In *Ricinus communis* wurde eine Hexokinase charakterisiert, die durch Glukose-6-phosphat, Fruktose-6-phosphat und eingeschränkt durch ATP reversibel von der Mitochondrienmembran gelöst wurde (Miernyk und Dennis 1983). Solch eine variable Lokalisierung wurde bislang nicht durch weitere Experimente bestätigt (Dry *et al.*, 1983; Tanner *et al.*, 1983; Copeland und Tanner, 1988), wäre jedoch insofern plausibel, als dass diese Eigenschaft von tierischen Hexokinasen bekannt ist (Bustamante und Pedersen, 1980; Kabir und Wilson, 1993). Für ScHxk2 der Bäckerhefe wurde eine variable Lokalisierung im Zytosol und im Zellkern festgestellt, was ihr als Zuckersensor Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren ermöglicht (s. 1.5).

Umfassende vergleichende Aktivitätsmessungen in verschiedenen Geweben wurden nicht veröffentlicht; Gewebespezifität der verschiedenen Hexokinasen wurde nur mit wenigen Isoformen bekannter Sequenz mittels Northern-Hybridisierung oder Immunlokalisierung untersucht. AtHxk1 und AtHxk2 zeigten deutliche Transkriptmengen in Schoten, Blüten und Wurzeln, AtHxk1 außerdem in Stängel, Rosette, und schwach in Stängelblättern (Jang *et al.*, 1997). Die anderen vier Hexokinase-Gene von *Arabidopsis thaliana* werden deutlich schwächer transkribiert. Basierend auf den öffentlich zugänglichen „Affymetrix“-Genchips (Zimmermann *et al.*, 2004, <https://www.genevestigator.ethz.ch>) lässt sich zur Zeit keine verlässliche Aussage über ihre Gewebespezifität treffen. Transkripte von LeHxk1 aus Tomate wurden hauptsächlich in meristematischen Geweben und jungen Früchten nachgewiesen (Dai *et al.*, 2002), LeHxk2 in Blüten (Menu *et al.*, 2001). Transkripte von StHxk1 und StHxk2 aus Kartoffel wurden ohne nähere Details als vorhanden in jungen und reifen Blättern, Stängel, Wurzel, Stolon, sich entwickelnden und reifen Knollen beschrieben (Veramendi *et al.*, 1999, 2002). SoHxk1 wurde durch Antikörper in *Sink*-Blatt, Petiole, Wurzel, und deutlich schwächer in *Source*-Blatt nachgewiesen. Die Typ A Hexokinase StHxkRP1 aus Kartoffel wurde durch Antikörper in Petiole, Stolon, frischer und gelagerter Kartoffelknolle, nicht jedoch in Lamina oder Vene 2. Ordnung von *Source*-Blatt detektiert (Wiese, 2000).

Obwohl nicht direkt nachgewiesen, ist davon auszugehen, dass Hexokinasen bei Entwicklung und Keimung von Pollen eine wichtige Rolle spielen und dementsprechend in Tapetumzellen und keimenden Pollen aktiv sind. Die Entwicklung von Tabakpollen ist von der Aktivität einer extrazellulären Invertase abhängig, die Saccharose in Glukose und Fruktose spaltet (Goetz *et al.*, 2001). Für die weitere Metabolisierung beider Zucker sind Hexokinase und Fruktokinase erforderlich. Keimende Petunienpollen zeigten ebenfalls extrazelluläre Invertase-Aktivität und große Transkriptmengen eines Monosaccharid-Transporters, der die außerhalb des Pollenschlauchs entstehenden Hexosen einer innerzellulären Hexokinase zuführt (Ylstra *et al.*, 1998).

1.7 Biochemische Eigenschaften von Hexokinasen

1.7.1 Substratspezifität

Hexokinasen können verschiedene Substrate mit unterschiedlicher Effizienz umsetzen. Während Prokaryonten in der Regel spezifische Kinasen für den jeweiligen Zucker besitzen, sind die Hexokinasen von Eukaryonten weniger spezifisch (Cardenas *et al.*, 1998). Allerdings besitzen sie in der Regel eine deutlich höhere Affinität zu Glukose als zu Fruktose (Easterby

und Quadri, 1982; Cardenas *et al.*, 1984; Fernandez *et al.*, 1985; Magnani *et al.*, 1988; Petit *et al.*, 1996; Panneman *et al.*, 1998).

Untersuchungen von Hexokinasen bekannter Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (Dai *et al.*, 1999; Gonzali *et al.*, 2002), Tomate (Menu *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2002), Kartoffel (Veramendi *et al.*, 1999) und Spinat (Wiese *et al.*, 1999) belegten hohe Affinität zu Glukose und geringe zu Fruktose. Mehrere biochemische Charakterisierungen ohne Kenntnis der Proteinsequenz unterstützten diese Beobachtung, jedoch nicht alle. K_m -Werte für Glukose und Mannose bewegen sich typischerweise im Rahmen von 18 bis 150 μM , für Fruktose liegen sie zwischen 2,5 und 30 mM (s. Anhang, III). Die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion ist mit Fruktose häufig höher als mit Glukose.

In einigen Publikationen wurden Hexokinasen beschrieben mit untypisch hoher Affinität zu Fruktose oder Aktivität mit Galaktose (Bajjal und Sanwal, 1976; Miernyk und Dennis, 1983), während Aktivität mit Galaktose andererseits auch ausgeschlossen wurde (Turner *et al.* 1977; Copeland und Tanner, 1988; Gonzali *et al.*, 2002). Möglicherweise sind die untypischen Aktivitäten mit Fruktose und Galaktose auf unzureichende Trennung der Hexokinasen von den entsprechenden spezifischen Enzymen Fruktokinase (Pego und Smeekens, 2000) und Galaktokinase (Dey, 1983; Kaplan *et al.*, 1997) zurückzuführen (Renz *et al.*, 1993).

Angesichts der deutlichen Präferenz für Glukose gegenüber Fruktose übernehmen pflanzliche Hexokinasen *in vivo* die Rolle einer Glukokinase. Hinweise auf spezifische pflanzliche Glukokinasen in Tomate (Martinez-Barajas und Randall, 1998) und Reis (Guglielminetti, 2000) sind möglicherweise Fehlinterpretationen aufgrund besonders hoher K_m -Werte für Fruktose (Dai *et al.*, 2002). Auch das „Glukokinase“ genannte Enzym der Bäckerhefe ist keine ausschließliche Glukokinase, sondern phosphoryliert mit einem K_m -Wert von 31 mM auch Fruktose (Maitra, 1975). Freie Mannose kommt in Pflanzen nur in Spuren vor, z.B. beim Abbau von Mannose-Untereinheiten der Zellwand (Herold und Lewis, 1977; Reid *et al.*, 2003). Sie wird dann sehr schnell metabolisiert, weshalb die hohe Affinität pflanzlicher Hexokinasen zu Mannose durchaus relevant sein kann (Schnarrenberger, 1990).

Bevorzugter Phosphat-Donor der Hexokinasen ist ATP mit typischen K_m -Werten von 50-300 μM (s. Anhang, III). Andere Trinukleotidphosphate werden deutlich schlechter umgesetzt (Doehlert, 1989; Schnarrenberger, 1990; Renz und Stitt, 1993; da-Silva *et al.*, 2001).

1.7.2 pH-Abhängigkeit

Die meisten in dieser Hinsicht untersuchten pflanzlichen Hexokinasen besitzen einen weiten Toleranzbereich im basischen pH (s. Anhang, III). Häufig wird ein Aktivitätsplateau um pH 8,2 erreicht, das sich über eine pH-Einheit erstreckt. Hexokinasen mit engerem pH-Optimum wurden für *Ricinus communis* (Miernyk und Dennis, 1983) und Kartoffel (StHxk1, Renz und Stitt, 1993) beschrieben.

1.7.3 Inhibitoren

Als physiologische Inhibitoren von Hexokinasen sind die Reaktionsprodukte Glukose-6-phosphat und ADP wahrscheinliche Kandidaten. ADP wurde bei den meisten Untersuchungen als Inhibitor beschrieben, lediglich zytosolische Hexokinasen aus Mais (Galina *et al.*, 1995) und Soja (Copeland und Morell, 1985) wurden nicht inhibiert. Inhibitorische Wirkung von AMP wurde gelegentlich mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht. Auch zur Inhibition durch Glukose-6-phosphat gibt es unterschiedliche Ergebnisse, die teilweise auf einer pH-Abhängigkeit der Inhibition beruhen. Für StHxk1 aus Kartoffelknolle (Renz und Stitt, 1993) und eine Glukokinase bzw. Hexokinase aus Tomate (Martinez-Barajas und Randall, 1998) wurde beobachtet, dass Glukose-6-phosphat bei pH 7, aber nicht bei pH 8 inhibitorisch wirkte.

Glukosamin (Salas *et al.*, 1965) und Mannoheptulose (Coore und Randle, 1964) wurden als Inhibitoren tierischer Hexokinasen beschrieben und auch zur Inhibition pflanzlicher Enzyme eingesetzt, um deren Funktion als Zuckersensor zu überprüfen (Jang und Sheen, 1994; Umemura *et al.*, 1998; Pego *et al.*, 1999). Inzwischen ist bekannt, dass zumindest Glukosamin nicht nur auf Hexokinasen wirkt und somit als Inhibitor für physiologische Fragestellungen ungeeignet ist. Auch die Aktivität einer durch Glukose aktivierbaren MAP-Kinase wurde dosisabhängig von Glukosamin stimuliert oder inhibiert (Hofmann und Roitsch, 2000).

Pilzliche und womöglich auch tierische Hexokinasen werden in unterschiedlichem Ausmaß durch Trehalose-6-phosphat inhibiert, insbesondere die als Zuckersensor bekannte ScHxk2 der Bäckerhefe (Blazquez *et al.*, 1993; Panneman *et al.*, 1998). Nachdem auch in *Arabidopsis thaliana* die Fähigkeit zur Trehalose-Synthese nachgewiesen wurde (Blazquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998), lag die Vermutung nahe, dass Trehalose-6-phosphat auch Inhibitor pflanzlicher Hexokinasen sei und somit Einfluss auf das durch Hexokinase vermittelte *Sugar Sensing* nehmen könne (Goddijn und Smeekens, 1998; Müller *et al.*, 1999). Die bislang veröffentlichten Untersuchungen mit Hexokinasen aus Spinat (Wiese *et al.*, 1999) und

Arabidopsis thaliana (Eastmond *et al.*, 2002; Gonzali *et al.*, 2002) konnten jedoch keine inhibitorische Wirkung nachweisen.

1.8 Struktur und Reaktionsmechanismus

Ausgehend von bislang veröffentlichten Sequenzen ist ein allgemein übliches Molekulargewicht von ca. 54 kDa für pflanzliche Hexokinasen anzunehmen. Ähnliche Größen wurden experimentell bestätigt, allerdings gab es mit 38 kDa für Enzyme aus *Ricinus communis* (Miernyk und Dennis, 1983) und 100 kDa für Enzyme aus Weizen (Meunier *et al.*, 1971) auch deutliche Abweichungen, für die noch keine Sequenzen vorliegen. Für zwei Hexokinasen aus Kartoffel wurde durch Gelfiltration ein Molekulargewicht von 66 kDa bestimmt (Renz *et al.*, 1993), obwohl die aus den bislang bekannten Proteinsequenzen berechneten Molekulargewichte auch 54 kDa betragen. Ursache dieser Abweichung ist entweder die Ungenauigkeit der Methode oder eine posttranslationale Modifikation der Proteine.

ScHxk1 und ScHxk2 der Bäckerhefe und Hexokinase 4 der Säugetiere haben ebenfalls Größen von 54 bzw. 52 kDa. Hexokinase 1, 2 und 3 der Säugetiere dagegen haben Molekulargewichte von ca. 100 kDa. Hier geht man von einer Genverdoppelung und anschließender Fusion als Ursache aus (Cardenas *et al.*, 1998).

Hexokinasen besitzen charakteristische Sequenzbereiche, welche die Bindung von ATP und eine Konformationsänderung bei der Katalyse erlauben (*Adenosine*, *Phosphate1*, *Phosphate2* bzw. *Connect1*, *Connect2*, s. Abb. 3). Hierbei gibt es Homologien zu Aktin, HSP70-Proteinen und zu den prokaryotischen Zellzyklus-Proteinen MreB, FtsA und StbA (Bork *et al.*, 1992, 1993). Die daraus resultierende konservierte Tertiärstruktur wird „*Actin Fold*“ genannt (Kabsch und Holmes, 1995). Hexokinasen besitzen außerdem eine charakteristische Zucker-Bindungsstelle (Andreone *et al.*, 1989; Bork *et al.*, 1993).

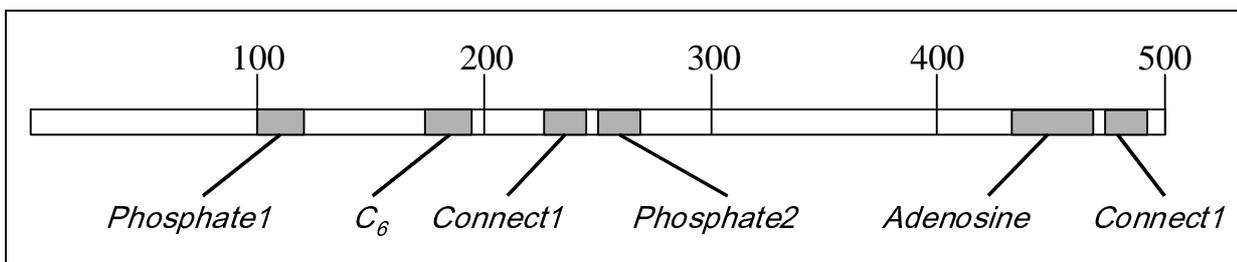


Abbildung 3: Konservierte Strukturbereiche im Hexokinase-Protein nach Bork *et al.* (1993). Zahlen oberhalb der Struktur geben die Position der Aminosäuren an.

Die Tertiärstrukturen beider Hexokinasen aus Bäckerhefe wurden röntgenkristallographisch aufgeklärt und bislang am intensivsten untersucht (Bennett und Steitz, 1978, 1980; Kuser *et al.*, 2000). Ihr Reaktionsmechanismus hat Einzug in Biochemie-Lehrbücher gehalten und gilt als Beispiel für das „*Induced Fit Modell*“ (Koshland, 1959). Es wurde festgestellt, dass die Proteine aus zwei Domänen bestehen, die von den zwei α -Helices *Connect1* und *Connect2* wie durch ein Gelenk verbunden sind. Bei der Bindung von Glukose dreht sich eine Domäne um 12° in Bezug zur anderen und schließt die Spalte zwischen beiden. Dadurch wird das Glukosemolekül bis auf die Hydroxylgruppe am Atom C-6 vom Protein umschlossen und die Bindung von ATP erleichtert (Peters und Neet, 1978). Durch Bindung von ATP erfolgt vermutlich eine weitere Konformationsänderung, welche für die nötige Nähe zwischen γ -Phosphat des ATP-Moleküls und der C-6-Hydroxylgruppe der Glukose sorgt (Shoham und Steitz, 1980; Kuser *et al.*, 2000). Nach Übertragung des γ -Phosphats bewirken die Abstoßungskräfte zwischen dem β -Phosphat des ATP und dem jetzt an Glukose gebundenen Phosphat die Öffnung des Spalts zwischen beiden Hexokinase-Domänen. Zuerst wird ADP und dann Glukose-6-phosphat aus dem Reaktionskomplex entlassen. Die Abstoßungsreaktion wird vermutlich durch einen Kanal aus stark konservierten hydrophoben Aminosäuren erleichtert, der Protonen aus dem Reaktionszentrum entfernt, die andernfalls die Abstoßungskräfte abschwächen (Kuser *et al.*, 2000).

Die ebenfalls bekannten Tertiärstrukturen einer Hexokinase aus *Schistosoma mansoni* und der Hxk1 von Mensch und Ratte (Mulichak *et al.*, 1998; Aleshin *et al.*, 1998) ähneln sehr stark denjenigen der Bäckerhefe, weshalb von vergleichbaren Reaktionsmechanismen ausgegangen wird (Kuser *et al.*, 2000). Bei der 100 kDa großen Säugetier-Hxk1 findet die Reaktion nur in der C-terminalen Hälfte statt, weil die N-terminale Hälfte ihre katalytische Funktion verloren hat.

Außer der hier geschilderten gerichteten Abfolge von Bindung von Glukose, Bindung von ATP, Dissoziation von ADP und Dissoziation von Glukose-6-phosphat, gibt es auch Hinweise auf eine zufällige Komponente der Substratbindung (Wilson und Schwab, 1996; Cardenas *et al.*, 1997). Hxk3, die am wenigsten untersuchte Isoform der Säugetiere, bindet ATP möglicherweise sogar gerichtet vor Glukose (Cardenas *et al.*, 1997). Für Ratten-Hxk4, ein Enzym der 50 kDa-Klasse, wurde gezeigt, dass Glukose-6-phosphat vor ADP aus dem Komplex entlassen wird (Monasterio und Cardenas, 2003). Ein allgemeingültiger Reaktionsmechanismus der Hexokinasen existiert demnach nicht.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die zentrale Stellung der Hexokinasen im pflanzlichen Zuckerstoffwechsel detailliert untersucht und Unterschiede zwischen einzelnen Isoformen aufgezeigt werden.

Hexokinasen sind für die Metabolisierung von Glukose unerlässlich. Einer Vielzahl biochemischer Charakterisierungen pflanzlicher Hexokinasen steht eine Vielzahl von Sequenzen gegenüber; eine Kombination beider liegt nur in Ausnahmefällen vor. Das Wissen über die subzelluläre und organspezifische Verteilung der verschiedenen Isoformen einer Pflanze ist noch sehr lückenhaft. Dabei sind Kenntnisse der biochemischen Parameter und Lokalisierung eines Enzyms essentiell für das Verständnis seiner Funktion. Dies gilt insbesondere, wenn es mehrere Isoformen eines Enzyms gibt, wie es für Hexokinasen vielfach beobachtet wurde. Es ist anzunehmen, dass diese sich katalytisch unterscheiden, unterschiedlich exprimiert und reguliert werden, oder aufgrund ihrer Lokalisierung innerhalb der Zelle und durch Interaktion mit unterschiedlichen Enzymen verschiedene Funktionen im Stoffwechsel ausüben. Ein zuletzt in den Mittelpunkt gerückter Aspekt der Hexokinase-Forschung ist ihre postulierte Funktion als Sensor des zellulären Zuckerstatus.

Zur Klärung der Rolle verschiedener Hexokinase-Isoformen sollten mehrere Aspekte beitragen:

- (1) Isolierung verschiedener Isoformen der Hexokinase-Genfamilie von *Nicotiana tabacum*
- (2) Nachweis ihrer subzellulären Verteilung
- (3) Bestimmung ihrer gewebespezifischen Verteilung
- (4) Charakterisierung ihrer biochemischen Eigenschaften
- (5) Analyse der Konsequenzen ihrer ektopischen Expression auf den Fluss und die Regulation des Zuckerstoffwechsels

Die Kombination der gewonnenen Daten sollte es ermöglichen, für die individuellen Isoformen Modelle aufzustellen, die ihre Rolle innerhalb des pflanzlichen Stoffwechsels beschreiben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht weiter spezifiziert, in analytischer Qualität von den Firmen Amersham Pharmacia (Braunschweig), Biomol (Hamburg), Boehringer Mannheim (Mannheim), Bio-Rad (München), Calbiochem (San Diego, USA), Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), New England Biolabs (Frankfurt), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (Steinheim), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), und Whatman (Maidstone, England) bezogen.

2.2 Anzucht von Pflanzen

2.2.1 Anzucht von *Nicotiana tabacum*

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. Varietät Samsun NN) wurden von Vereinigte Saatzuchten EG (Ebstorf) bezogen und in Gewebekultur unter einem 16 h Licht / 8 h-Dunkelrhythmus bei 24°C, 50 % Luftfeuchte, sowie einer Belichtung von ca. 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf Murashige Skoog (MS) Medium (Sigma) mit 2 % (w/v) Saccharose und geeigneten Hormonen und Antibiotika gehalten. Im Gewächshaus wurden die Pflanzen bei 16 h Licht mit Zusatzbeleuchtung (ca. 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 8 h Dunkelheit kultiviert. Die relative Feuchte lag zwischen 60 und 70 %, die Temperatur betrug 25°C während der Licht- und 18°C während der Dunkelphase.

2.2.2 Anzucht von *Nicotiana sylvestris*

Samen von *Nicotiana sylvestris* wurden von der Genbank des IPK Gatersleben bezogen. Die Anzucht erfolgte bei gleichen Bedingungen wie für *Nicotiana tabacum*.

2.2.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Saatgut des *Arabidopsis thaliana* Ökotypen C24 wurde von Ricarda Jost (IPK Gatersleben) und Helke Hillebrand (Sungene, Gatersleben) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht in Gewebekultur erfolgte nach Stratifizierung der Aussaat (2 Tage in Dunkelheit, 4°C) unter

vergleichbaren Bedingungen wie die Kultivierung von Tabakpflanzen, aber bei 21°C und auf modifiziertem MS-Medium (Sigma) ergänzt durch Gamborgs Vitaminlösung (1:1000, Sigma). Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* unter Kurztagbedingungen erfolgte in einem Klimaraum bei 21°C, 9 h Licht (150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 60-65 % relativer Luftfeuchte mit einer Nachtabenkung auf 18°C.

2.3 Bakterienstämme und Vektoren

Für allgemeine Klonierungsverfahren, die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*, Durchmusterung von Phagen-DNA-Bibliotheken und Pflanzentransformation wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Bakterienstämme und in Tabelle 2 aufgeführten Vektoren eingesetzt.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> XLI Blue	<i>recA1 endA, gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F', <i>proAB, lacI^qZAM15, Tn10 (Tet^r)</i> ^c	Bullock <i>et al.</i> (1987), Stratagene
<i>E. coli</i> XLI Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1$ <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)</i> ^c	Stratagene
<i>E. coli</i> XLOLR	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1$ <i>recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZAM15 Tn10</i> (Tet ^r) ^c Su ⁻ λ^r	Stratagene
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	<i>nal^S str^S rif^R thi⁻ lac⁻ ara⁺ gal⁺ mtl⁻ f⁻ recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i>	Qiagen
<i>E. coli</i> TOP10F'	<i>F'(tet^r) mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80lacZAM15$</i> <i>$\Delta lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU$</i> <i>galK rspL (Str^R) end A1 nupG</i>	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>pGV2260 in C58C1</i>	Deblaere <i>et al.</i> (1985)

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Verwendung/Resistenz	Herkunft/Referenz
pBi101	binärer Vektor mit GUS, Kan ^r	Jefferson <i>et al.</i> (1986)
pBinAR	binärer Vektor, Kan ^r	Höfgen und Willmitzer (1990)
pBinGFP	binärer Vektor mit GFP, Kan ^r	diese Arbeit
pBinGFP-GUS	binärer Vektor mit GFP und GUS, Kan ^r	diese Arbeit
pBinGUS	binärer Vektor mit GUS, Kan ^r	diese Arbeit
pBinGUS-GFP	binärer Vektor mit GUS und GFP, Kan ^r	diese Arbeit
pBKCMV	<i>E. coli</i> Phagemidvektor, Amp ^r	Stratagene
pBluescript SK-	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp ^r	Stratagene
pCAMBIA 1303	binärer Vektor mit GUS, GFP, His-Tag,	CAMBIA, Canberra, Australien
pCAMBIA 1304	binärer Vektor mit GFP, GUS, His-Tag,	CAMBIA, Canberra, Australien
pCR-Blunt	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp ^r	Invitrogen
pCR2.1	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Kan ^r	Invitrogen
pFF19	Biolistische Transformation, Amp ^r	Timmermans <i>et al.</i> (1990)
pUC18, pUC19	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pQE9	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp ^r	Qiagen

2.4 Pflanzentransformation

2.4.1 Stabile Pflanzentransformation

Stabile Pflanzentransformationen wurden durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer unter Verwendung des Agrobakterien-Stamms C58C1 mit dem Helferplasmid pGV2260 (Deblaere *et al.*, 1985) durchgeführt. Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte in YEB-Medium (Vervliet *et al.*, 1975), deren Transformation mit binären Vektoren wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (1988) ausgeführt. Die stabile Transformation von Tabakpflanzen folgte der von Rosahl *et al.* (1987) beschriebenen Methode.

Arabidopsis thaliana Pflanzen wurden zur Transformation etwa 4 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und danach zur Blüteninduktion in den Langtag transferiert. Blütensprosse sechs bis acht Wochen alter Pflanzen wurden mit *Agrobacterium*-Suspension [OD₆₀₀ = 0,8; 5 % (w/v) Saccharose; 0,05 % (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA)] entweder nach der Vakuum-Infiltrationsmethode von Bechthold *et al.* (1993) oder nach dem Protokoll von Clough und Bent (1998) infiltriert. Die Pflanzen wurden anschließend unter einer abgedunkelten Haube für 24 h bei RT stehen gelassen und danach im Gewächshaus bis zur Samenreife gehalten. Das reife Saatgut (T1-Generation) wurde sterilisiert (s. 2.5), zur Selektion der transgenen Pflanzen auf MS-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert und unter Langtagbedingungen kultiviert. Kanamycin-resistente Keimlinge

wurden auf MS-Medium umgesetzt und nach 2-3 Wochen ins Gewächshaus in Erdkultur transferiert.

2.4.2 Transiente Pflanzentransformation durch Agrobakterien-Infiltration

Zu 50 ml der Agrobakterien-Kultur wurden Endkonzentrationen von 10 mM MES pH 5,2 (KOH) und 20 μ M Acetosyringon (in Dimethylsulfoxid gelöst) gegeben. Nach 15 min Zentrifugation bei 2000 g wurde das Pellet in 10 mM $MgCl_2$ gelöst, so dass bei 600 nm Wellenlänge eine Optische Dichte von 0,7 bis 1,0 eingestellt wurde. Die Suspension wurde mit Endkonzentrationen von 10 mM MES pH 5,2 (KOH) und 100 μ M Acetosyringon versetzt und zwei bis drei Stunden bei RT geschüttelt. Mittels einer Spritze ohne Nadel wurde die Bakterien-Suspension in die Unterseite fast ausgewachsener Blätter gespritzt.

2.4.3 Transiente biolistische Transformation

60 mg Goldpartikel von 1 μ m Durchmesser wurden 2 min in 1 ml 70 % Ethanol rigoros gemischt (Vortex). Nach 10 s Zentrifugation wurden sie in 1 ml H_2O gewaschen, wieder 10 s zentrifugiert und in 500 μ l 50 % Glycerin aufgenommen. In dieser Lösung konnten sie 6-8 Wochen bei RT gelagert werden.

Die gelagerten Goldpartikel wurden 2 min geschüttelt, 50 μ l wurden in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und eine weitere Minute geschüttelt. Während des Schüttelns wurden 1-5 μ g des hochreinen zu transformierenden Plasmids, 50 μ l 2,5 M $CaCl_2$ und 20 μ l 0,1 M Spermidin hinzugegeben. Nach einer weiteren Minute Schütteln wurde der Ansatz auf Eis gelagert. Während der Lagerung wurden Blattscheiben mit ca. 2 cm Durchmesser aus frischen *Source*-Blättern von Tabak gestochen und mit der Oberseite nach unten auf eine Petrischale mit festem LB-Agar (Sambrook *et al.*, 1989) gelegt. Die vorbereiteten Goldpartikel wurden 15 s in einer Tischzentrifuge bei 14000 Upm zentrifugiert, das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 30 μ l Ethanol resuspendiert. Vorher in Ethanol sterilisierte Zerreißscheiben wurden mit jeweils 4-5 μ l der Suspension beschichtet und getrocknet in ein „PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System“ (Bio-Rad) eingespannt. Der Beschuss der Blattscheiben mit den Goldpartikeln erfolgte mit 900-1100 psi nach Herstellerangaben.

2.5 Sterilisierung von Samen

Zur Sterilisierung von Tabak- oder *Arabidopsis thaliana* Samen wurden diese in ein dünnes Gewebe eingeschlagen. Tabaksamen wurden 3 min in 70 % Ethanol und 10 min in 1 % NaOCl inkubiert, anschließend dreimal kurz in H₂O gewaschen. *Arabidopsis thaliana* Samen wurden 2 min in 70 % (v/v) Ethanol und 5 min in 5 % (v/v) NaOCl inkubiert und anschließend fünfmal kurz mit H₂O gewaschen.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Allgemeine Verfahren der Nukleinsäure-Manipulation

Grundlegende Techniken der Nukleinsäure-Manipulation wie z.B. Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen, Verknüpfen von DNA mit Hilfe von Ligasen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon-Membranen, Anzucht von Bakterien, Transformation von *E. coli*-Zellen, Präparation von Plasmiden, und die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten zur Verwendung als Hybridisierungssonde wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.6.2 Oligonukleotide und Sequenzierungen

Universelle Sequenzierprimer (SK, KS, M13 universal, BK reverse, T7) wurden von der Firma Stratagene bezogen. Spezielle Sequenzier- und PCR-Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) synthetisiert (s. Anhang I.1). Sequenzierungen wurden als Serviceleistung von Susanne König und Bettina Brückner am IPK Gatersleben (PGRC) durchgeführt.

2.6.3 Isolierung pflanzlicher RNA und Northern-Analyse

RNA aus Pflanzengewebe wurde nach der Methode von Logemann *et al.* (1987) isoliert. Zwischen 10 und 50 µg Gesamt-RNA wurden nach einem Denaturierungsschritt in einem 1,5 % (w/v) Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und durch Kapillartransfer ü. N. auf GeneScreen Membranen (NEN, Boston, USA) übertragen. Die radioaktive Markierung von cDNA Fragmenten erfolgte durch Verwendung des „High Prime“-Kits (Boehringer,

Mannheim) und [α - ^{32}P]-dCTP (Amersham). Die Hybridisierung der Membranen in „Church“-Puffer (Church und Gilbert, 1984) wurde wie bei Herbers *et al.* (1995) beschrieben durchgeführt. Transkript-spezifische Signale wurden durch Exposition gegen einen Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart) detektiert oder mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji FLA-3000; Fuji, Tokio, Japan).

2.6.4 Isolierung pflanzlicher DNA

Ungefähr sechs Gramm junger Blätter wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das noch gefrorene Homogenisat wurde zusammen mit 15 ml DNA-Extraktionspuffer (500 mM NaCl / 100 mM Tris-HCl pH 8 / 50 mM EDTA / 10 mM β -Mercaptoethanol) in ein Corex-Röhrchen gegeben und suspendiert. Nach 1 min wurde 1 ml 20 % SDS hinzugefügt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 65 °C wurden 5 ml 5 M Kaliumacetat zugegeben und gut vermischt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis schloss sich eine dreißigminütige Zentrifugation mit 12000 g an. Der Überstand wurde durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem) zu 10 ml Isopropanol filtriert. Nach einer zwanzigminütigen Lagerung bei -20° C wurde erneut 30 min mit 12000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 700 μ l 50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 10 mM EDTA gelöst. Nach Zugabe von 75 μ l 3 M Natriumacetat wurde 15 min mit 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 μ l Isopropanol versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation mit 10000 g wurde das Pellet in 200 μ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) suspendiert.

2.6.5 Southern-Analyse

30 μ g genomische DNA wurde mit HindIII bzw. EcoRI verdaut und in einem einprozentigen TBE-Gel aufgetrennt. Zur Mobilisierung großer DNA-Fragmente wurde das Gel anschließend 20 min in 0,25 N HCl inkubiert, kurz in Wasser gewaschen, 20 min in 0,4 N NaOH inkubiert und abschließend noch einmal kurz mit Wasser gewaschen. Über mindestens 14 Stunden wurde die DNA mit 0,4 N NaOH auf „Hybond-N+“ Membran (Amersham) übertragen. Geeignete cDNA-Sonden wurden mittels „High Prime“ Kits (Boehringer, Mannheim) und [α - ^{32}P]-dCTP (Amersham) radioaktiv markiert. Die Hybridisierung der Membranen in „Church“-Puffer (Church und Gilbert, 1984) wurde wie bei Herbers *et al.* (1995) beschrieben durchgeführt. Transkript-spezifische Signale wurden durch Exposition gegen einen

Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart) detektiert oder mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji FLA-3000; Fuji, Tokio, Japan).

2.6.6 Reverse Transkription

Die reverse Transkription pflanzlicher RNA und Amplifizierung der einzelsträngigen cDNA über PCR erfolgte nach dem Protokoll M-MLV (H-) Reversen Transkriptase (Promega). 20 µg pflanzlicher RNA wurden zunächst mit DNase (Boehringer, Mannheim) bei 37°C für 45 min behandelt und anschließend für 10 min bei 65°C inhibiert. Nach Reinigung mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die RNA mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) gefällt, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 100 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst. Die cDNA Erststrang-Synthese wurde in einem Ansatz mit 12,5 µl DNase-behandelter RNA, 5 µl 5x Reaktions-Puffer, 2 µl dNTPs (je 2,5 mM), 1 µl Oligo-dT-Primer (50 mM, dT₃₀) und 2,5 µl DEPC-behandeltem H₂O nach Inkubation für 5 min bei 65°C, dann für 5 min bei 37°C, und schließlich nach Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase [M-MLV (H-), Promega] und 1 µl RNase-Inhibitor (Boehringer, Mannheim) bei 37°C (60 min) durchgeführt. Durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C wurde die Reaktion abgestoppt. Die erhaltene cDNA wurde als Matrize für PCR-Reaktionen mit rTaq DNA-Polymerase (Takara Shouzo, Japan) eingesetzt.

Zur vergleichenden Quantifizierung wurden PCR-Reaktionen parallel mit genspezifischen Primern und Kontrollprimern für Ubiquitin (Nt Ubiquitin 5' / Nt Ubiquitin 3', s. Anhang I.1) oder Aktin (Actin AC1_5 / Actin AC2_3, s. Anhang I.1) durchgeführt. Es wurden mehrere Amplifikationen mit unterschiedlicher Zyklenzahl durchgeführt, um den Bereich exponentieller Amplifikation zu ermitteln.

2.6.7 RACE-PCR

Zur Isolierung unbekannter 5'- und 3'-Bereiche einer cDNA durch RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) wurde das „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ (Clontech, Palo Alto, USA) eingesetzt. Es wurden spezifische Oligonukleotide des Zielgens, die Primer des „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“, sowie RNA aus Blattmaterial verwendet. Nach der reversen Transkription wurden die genspezifischen 5'- und 3'-cDNA-Enden mit Hilfe des „Advantage® 2 Polymerase Mix“ (Clontech) und einer „touch down“-PCR (Temperaturgradient zur Anlagerung der Oligonukleotide) nach dem folgenden

Programm amplifiziert: 5 Zyklen Denaturierung bei 94°C (10 s) mit Primer-Anlagerung und Elongation bei 72°C (3 min), danach 5 Zyklen Denaturierung bei 94°C (10 s) mit Primer-Anlagerung bei 70°C (20 s) und Elongation bei 72°C (3 min), und schließlich 25 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C (10s), Primer-Anlagerung bei 68°C (20 s) und Elongation bei 72°C (3 min). Die erhaltenen 5' und 3' PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des „TOPO TA Cloning® Kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben in den Vektor pCR2.1 kloniert und die erhaltenen Plasmide sequenziert.

2.6.8 „Genome Walking“

Zur Identifizierung der genomischen DNA-Sequenzen im 5'- und 3' Bereich bereits bekannter Gen-Abschnitte wurde das „Universal GenomeWalker™ Kit“ von Clontech nach Hersteller-Abgaben verwendet. Die eingesetzten acht genomischen Bibliotheken waren durch jeweils eins der Enzyme DraI, EcoRV, HpaI, MmaI, PvuII, ScaI, SmaI oder StuI verdaut.

Es wurden Zweischnitt-PCRs durchgeführt, bestehend aus sieben Zyklen mit vierminütiger Anlagerung / Elongation bei 70°C und 30 Zyklen mit viereinhalbminütiger Anlagerung / Elongation bei 68°C. Zwischen den Einzelschritten fand jeweils eine dreisekündige Denaturierung bei 95°C statt. Die anschließende zweite PCR mit eingebetteten Primern bestand aus sieben Zyklen bei 70°C und 25 Zyklen bei 68°C Elongation.

2.6.9 Durchmusterung von Phagen-DNA-Bibliotheken

Die Durchmusterung einer Phagen λ -ZAP II cDNA-Bank aus Tabak-Blattmaterial (Herbers *et al.*, 1995) und einer Phagen pBKCMV ZAP Express (Stratagene) genomischen Bank aus *Nicotiana sylvestris* zur Isolierung von Hexokinase-Isoformen erfolgte mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989).

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliantblau

SDS-Polyacrylamidgele (Lämmli, 1970) wurden für 5-30 min in einer Lösung aus 0,2 % Coomassie R250; 42,3 % Wasser; 42,5 % Ethanol; 10 % Essigsäure; 5 % Methanol gefärbt. Entfärbung erfolgte in einer Lösung aus 10 % Essigsäure und 50 % Methanol.

2.7.2 Western-Analyse

Gewebeproben gleicher Proteinmenge oder Blattfläche wurden in 2x SDS-Probenpuffer [50 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS] homogenisiert. Nach Hitzedenaturierung für 10 min wurden die Zelltrümmer pelletiert und gleiche Volumen des Überstandes auf 10-15 % (v/v) SDS-Polyacrylamidgelen durch Gelelektrophorese getrennt (Lämmli, 1970). Die Proteine wurden auf Nitrozellulose-Membranen (Porablot; Macherey-Nagel, Düren) transferiert.

Die Entwicklung der Membranen erfolgte alternativ auf zwei verschiedene Weisen. Dabei wurde TBS/T-Puffer aus 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Tween 20 (Sigma) verwendet.

2.7.2.1 Entwicklung mittels Farbreaktion durch alkalische Phosphatase

Die Membran wurde für eine Stunde in TBS/T-Puffer mit 3 % (w/v) Rinderserum-Albumin (BSA) abgesättigt und dreimal mit TBS/T-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem spezifischen ersten Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:1000 in TBS/T mit 1 % (w/v) BSA für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht. Nach drei fünfminütigen Waschschrritten mit TBS/T wurde der zweite, biotinylierte Antikörper (Amersham) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS/T mit 1 % BSA (w/v) zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschrritten wurde die Membran für 30 min mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase (Amersham), 1:500 verdünnt in TBS/T, behandelt und erneut dreimal 5 min gewaschen. Durch Zugabe der Substrate Nitro Blue Tetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-p-toluidin (BCIP) in 0,017 bzw. 0,033 prozentiger Verdünnung in Diethanolamin-Puffer (10 % Diethanolamin (v/v), 1 mM MgCl₂, 0,002 % (w/v) NaN₃, pH 9,6 mit HCl) wurden die Bindungsstellen des ersten Antikörpers markiert.

2.7.2.2 Entwicklung mittels Chemolumineszenz durch Meerrettich-Peroxidase

Die Membran wurde für eine Stunde in TBS/T-Puffer mit 5 % (w/v) filtriertem Magermilchpulver abgesättigt und nachfolgend dreimal mit TBS/T-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem spezifischen ersten Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:3000 bis 1:5000 in TBS/T mit 1 % (w/v) filtriertem Magermilchpulver für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht.

Die Entwicklung der Immunoblots erfolgte nach Hersteller-Angaben mit dem „SuperSignal West Dura Extended Duration“-Substrat (Pierce, Rockford, USA) nach Inkubation (1 h) mit an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:20000-1:100000 in TBS/T mit 1% (w/v) Milchpulver). Antikörper-spezifische Signale wurden durch Exposition gegen Röntgenfilme (Kodak, Stuttgart) detektiert.

2.7.3 Protein-Expression in *E. coli* und Gewinnung von Antiseren

Für die Herstellung von Antikörpern wurden die entsprechenden kodierenden cDNA-Fragmente in den Expressionsvektor pQE9 ligiert und die erhaltenen Plasmide in *E.coli*-M15-Zellen transformiert. Mit 1 ml einer ü.N.-Kultur wurden 50 ml LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) mit geeigneten Antibiotika inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 bei 37°C inkubiert. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Zellen wurden nach 4 Stunden durch Zentrifugation für 15 min bei 2500 g und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml Lösung A (8 M Harnstoff / 0,1 M NaH₂PO₄ / 10 mM Tris-HCl pH 8,0) aufgenommen, eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend sechsmal zehn Sekunden sonifiziert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 2500 g wurde der Überstand mit 2 ml zuvor equilibrierter Nickel-NTA-Agarose (Qiagen) versetzt und 30 min bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Sediment dreimal mit Lösung B (wie Lösung A, pH 6,3-6,9) gewaschen. Elution des Proteins von der Matrix erfolgte mit viermal 1 ml Lösung C (wie Puffer A, pH 4,5). Die finale Aufreinigung erfolgte über ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel (Lämmli, 1970). Die entsprechende Proteinbande wurde nach Färbung mittels „Roti-White“ Lösung (Roth) nach Herstellerangaben identifiziert, ausgeschnitten und in einer „Electro Eluter Model 422“-Apparatur (Bio-Rad) nach Herstellerangaben in einen Puffer aus 250 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl pH 8,3 elektroeluiert. Die Quantifizierung erfolgte durch die vergleichende Coomassie-Färbung einer Verdünnungsreihe mit bekannten BSA-Konzentrationen. Von allen Zwischenschritten der Reinigung wurden zur Kontrolle Aliquots genommen und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Die aufgereinigten Proteine wurden zur Antikörper-Herstellung an die Firmen Biogenes (Berlin) geschickt.

2.7.4 Affinitätsreinigung von Antisera

0,6–1 mg Proteine wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Lämmli, 1970). Nach Übertragen der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Porablot; Macherey-Nagel, Düren) wurden die Proteinbanden mit Ponceau-Färbelösung (0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % Essigsäure) markiert. Die Bande von Interesse wurde ausgeschnitten und in PBS-Puffer entfärbt. Der Streifen wurde 1 h in Blockierungslösung (3 % BSA (w/v) in PBS-Puffer mit 0,02 % NaN_3) mit Proteinen abgesättigt. Danach wurde das zu reinigende Antiserum in einer Endverdünnung von 1:1000 hinzugegeben und 5 h bei RT oder 16 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Streifen jeweils 20 min in 0,15 M NaCl und PBS-Puffer gewaschen. Zum Eluieren der gebundenen Antikörper wurde der Streifen in einer feuchten Atmosphäre für 20 min mit Elutionspuffer (0,2 M Glycin, 1 mM EGTA, pH 2,8) überschichtet. Das gesammelte Eluat wurde mit 0,1 Volumen 1 M Tris-HCl pH 8,2 neutralisiert. Der pH-Wert wurde mittels Indikatorpapier überprüft. Das neutralisierte Eluat wurde mit 0,1 Vol zehnfach konzentriertem PBS-Puffer und 0,02 % (w/v) NaN_3 versetzt und bei 4°C gelagert. Bindung und Elution des Antikörpers wurden insgesamt sechsmal mit demselben Streifen wiederholt.

PBS-Puffer:

NaCl:	8 g
KCl:	0,2 g
Na_2HPO_4 :	1,44 g
KH_2PO_4 :	0,24 g
H_2O :	<i>ad</i> 1 l
pH:	7,4 mit HCl

2.8 Mikroskopische Techniken

2.8.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von GFP-Fusionsproteinen in transgenen Pflanzen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena) und dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena) Die Signaldetektion erfolgte mit Hilfe von geeigneten Filtersätzen in den aufgeführten Wellenlängenbereichen.

	Axiovert 135		LSM 510 META	
	Anregung	Emission	Anregung	Emission
GFP:	450 – 490 nm	515 – 565 nm	488 nm Ar-Laser	510 – 525 nm
Chlorophyll:	450 – 490 nm	515 – 700 nm	488 nm Ar-Laser	645 – 700 nm

2.8.2 Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien mit „MitoTracker CM-H₂TMRos“

Der Farbstoff „MitoTracker CM-H₂TMRos“ (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) liegt zunächst in einer reduzierten, nicht fluoreszierenden Form vor und wird in Mitochondrien angereichert und durch Oxidation in die fluoreszierende Form umgesetzt.

Untersucht wurden Stücke der unteren Blattepidermis, die abgezogen und in den Inkubationspuffer gelegt wurden. Nach Zugabe von 100 nM Endkonzentration des Farbstoffs wurden die Proben in einem verdunkelten Exsikkator bei leichtem Vakuum 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal für 10 min im verdunkelten Exsikkator mit Inkubationspuffer gewaschen und im Konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena) analysiert. Die Anregung erfolgte mit einem HeNe-Laser bei 543 nm Wellenlänge, die Emission wurde bei 558-601 nm detektiert (Optimales Anregungslicht: 554 nm, Emissionsmaximum: 576 nm).

Inkubationspuffer:

Hepes / KOH pH 5,6-7,0: 10 mM
 Sorbitol: 350 mM
 MitoTracker CM-H₂TMRos: 100 nM

2.8.3 Transmissionselektronenmikroskopie und Immunolokalisierung

Elektronenmikroskopische Techniken wurden von Dr. Twan Rutten und Dr. Michael Melzer am IPK Gatersleben durchgeführt. Gewebeproben wurden in HM20- oder Spurr-Harz (Plano GmbH, Marburg) fixiert. Die Untersuchung der Objekte erfolgte an einem Zeiss CEM 902A Transmissionselektronenmikroskop bei 80 kV.

2.9 Aktivitätsmessungen von Enzymen

2.9.1 Herstellung pflanzlicher Extrakte für Enzymmessungen

Pflanzliches Gewebe wurde in fünffacher Menge (w/v) Enzym-Extraktionspuffer homogenisiert und durch eine Sephadex G25 medium Säule entsalzt. Die Menge des anschließend eingesetzten Proteins wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

Enzym-Extraktionspuffer:

Tris/HCl pH 6,8:	50 mM
MgCl ₂ :	5 mM
β-Mercaptoethanol:	5 mM
Glyzerin:	15 % (v/v)
EDTA:	1 mM
EGTA:	1 mM
Pefabloc:	0,1 mM

2.9.2 Messung von Hexokinase-Aktivität

Die Glukose, Fruktose und Mannose phosphorylierenden Aktivitäten von Hexokinasen wurden in einem gekoppelten Enzymtest ermittelt. Das bei der Reaktion entstehende Glukose-6-phosphat wurde durch im Messpuffer vorliegende Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase oxidiert. Das dabei entstehende NADH wurde an einem Photometer (Tecan Spectra Rainbow Thermo, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 340 nm quantifiziert. Zur Messung von Fruktokinase- und Mannokinase-Aktivität wurde dem Reaktionsansatz Phosphoglukoisomerase zugegeben, für Mannokinase außerdem Phosphomannoisomerase.

Reaktionsansatz:

Hepes/KOH pH 8,4:	100 mM	
ATP:	4 mM	
MgCl ₂ :	[ATP] +1,5 mM	
NAD:	0,8 mM	
Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (von <i>Leuconostoc mesenteroides</i>):	0,5 U	
Phosphoglukoisomerase:	0,5 U	für Fruktokinase und Mannokinase
Phosphomannoisomerase:	0,5 U	für Mannokinase

Die Reaktion wurde bei 30°C in einem Gesamtvolumen von 300 µl durch Zugabe der Substrate Glukose, Fruktose oder Mannose gestartet. Es wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit über 20 Messpunkte, entsprechend 10 min, ermittelt.

Für die Messungen zur ATP-Affinität wurde 1 mM Glukose im Reaktionsansatz vorgelegt und die Messung durch Zugabe von ATP gestartet.

2.9.3 Messung von Adenylatkinase-Aktivität

Die Messung der Adenylatkinase (auch Myokinase genannt) erfolgte in einem gekoppelten Enzymtest nach Kawai und Uchimiya (1995). Da nur die Hintergrundreaktion bei der Hexokinase-Messung bestimmt werden sollte, wurde der Messaufbau dieser angepasst (s. 2.9.2). Die Konzentrationsabnahme von NADH während der Reaktionen wurde an einem Photometer (Tecan Spectra Rainbow Thermo, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 340 nm quantifiziert.

Reaktionsansatz:

Hepes/KOH pH 8,4:	100 mM
AMP:	0,1 mM
MgCl ₂ :	1,7 mM
NADH:	0,4 mM
PEP:	0,85 mM
Laktat-Dehydrogenase:	0,25 U
Pyruvatkinase:	0,25 U

Die Reaktion wurde bei 30°C in einem Gesamtvolumen von 300 µl durch Zugabe von 0,1 mM Endkonzentration ATP gestartet. Es wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit über 20 Messpunkte, entsprechend 10 min, ermittelt.

2.9.4 Histochemischer Nachweis von β-Glukuronidase-Aktivität

Histochemische β-Glukuronidase-Färbungen erfolgten nach Martin *et al.* (1992). Schnitte von Pflanzengewebe wurden in GUS-Färbepuffer infiltriert und bei 37 °C inkubiert. Nach ausreichender Blaufärbung der Gewebe wurden sie durch Ethanol gebleicht.

GUS-Färbepuffer:

Natriumphosphat-Puffer pH 7,2:	100 mM
TritonX-100:	0,1 % (v/v)
β-Mercaptoethanol:	15 mM
X-Gluc:	1 mM

2.9.5 Messung von β -Glukuronidase-Aktivität

Fluorimetrische Bestimmung der β -Glukuronidase-Aktivität erfolgte nach Jefferson *et al.* (1987). Blattscheiben von 4 mm Durchmesser wurden in 200 μ l GUS-Extraktionspuffer homogenisiert und 5 min zentrifugiert. 10 μ l des Überstands wurden mit 200 μ l GUS-Reaktionspuffer (GUS-Extraktionspuffer mit 2 mM Methylumbelliferylglukuronid) versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 800 μ l 0,2 M Na₂CO₃ wurde die Reaktion abgestoppt. Die Messung der Fluoreszenz nach Anregung bei 360 nm und Emission bei 465 nm Wellenlänge erfolgte an einem Photometer (Tecan Spectra Fluor, Crailsheim) gegen eine zuvor vermessene Eichreihe aus Methylumbelliferon (MU). Als Kontrolle dienten die jeweiligen Extrakte mit sofortigem Reaktionsstopp durch Na₂CO₃.

GUS-Extraktionspuffer:

Natriumphosphat-Puffer pH 7,2:	50 mM
TritonX-100:	0,1 % (v/v)
β -Mercaptoethanol:	10 mM
EDTA:	10 mM

2.10 *In vitro* Translation und Chloroplastenimport

Experimente zur *in vitro* Translation von cDNAs und zum Transport der Proteine in Chloroplasten wurden von Manuela Hoffmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) nach Molik *et al.* (2001) durchgeführt. Transkription und Translation der Gene erfolgte durch Vermittlung des T3 bzw. T7 Promotors im Plasmid pBluescript SK- in zellfreiem Kaninchen-Retikolytenlysat in Gegenwart radioaktiv markierten ³⁵S-Methionins. Intakte Chloroplasten aus Erbsen- oder Spinatblättern wurden durch Zentrifugation in einem Percoll-Gradienten gewonnen. Die radioaktiv markierten Proteine wurden zu den Chloroplasten gegeben und 20 min bei 25°C im Licht inkubiert. Durch Behandlung mit 180 μ g/ml der Protease Thermolysin wurden nicht importierte Proteine, sowie zytosolisch exponierte Proteine der äußeren Hüllmembran zerstört. Nach Reinigung der Chloroplasten in einem Percoll-Gradienten wurden sie durch einen osmotischen Schock aufgebrochen und durch Zentrifugation in Stroma und Thylakoide aufgetrennt. Die Thylakoide wurden in zwei Fraktionen aufgeteilt, von denen eine mit Thermolysin behandelt wurde. Dadurch ließen sich Proteine identifizieren, die weiter ins Thylakoidlumen oder in deren Membran transportiert wurden. Stöchiometrisch gleiche Mengen der drei Fraktionen, entsprechend 12,5 μ g Chlorophyll, wurden in einem 10-17,5 % SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden 0,25

µg des translatierten Proteins mit aufgetragen. Die radioaktiven Signale wurden an einem Phosphoimager visualisiert.

In einem Kontrollexperiment wurden die translatierten Proteine 20 min auf Eis durch verschiedene Mengen Thermolysin behandelt und anschließend ebenfalls auf dem Gradientengel aufgetrennt.

2.11 Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten und Stärke

Lösliche Zucker wurden mit 80 % (v/v) Ethanol bei 80°C für 2 h aus Pflanzengewebe extrahiert. Die Bestimmung von Glukose, Fruktose, und Saccharose im Überstand erfolgte mit einem gekoppelten optisch-enzymatischen Test wie bei Stitt *et al.* (1989) beschrieben. Zur Stärkebestimmung wurde anschließend das restliche Gewebe mit 0,2 N KOH für 1 h bei 95°C aufgeschlossen und homogenisiert. Der pH-Wert wurde mit 1N Essigsäure auf 5,5-6,0 eingestellt. Die Quantifizierung der Stärke erfolgte nach Hydrolyse mit Amyloglukosidase (2U/ml, Boehringer, Mannheim) für 2 h bei 55°C über die Messung der Glukoseeinheiten.

3 ERGEBNISSE

3.1 Isolierung und Sequenzanalyse pflanzlicher Hexokinasen

Pflanzliche Hexokinase-Aktivität wurde erstmals in Weizenkeimlingen nachgewiesen (Saltman, 1953). Bei Charakterisierungen weiterer pflanzlicher Hexokinasen wurden Aktivitäten in zytosolischen, plastidären und mitochondrialen Fraktionen gefunden (s. Anhang, III). Durch Komplementation einer Hexokinase-defizienten Hefemutante gelang die Isolierung des ersten pflanzlichen Hexokinase-Gens aus *Arabidopsis thaliana* (Dai *et al.*, 1995).

Basierend auf Sequenzvergleichen mit bereits bekannten Hexokinasen aus Pflanzen, Tieren und Pilzen können weitere Gene identifiziert werden. Bereiche hoher Homologie erlauben Rückschlüsse auf die Funktion dieser Sequenz-Abschnitte, sowie auf die Lokalisierung des Proteins innerhalb der Zelle. Inzwischen sind mehrere pflanzliche Hexokinase-Sequenzen bekannt (Olsson *et al.*, 2003), von denen jedoch nur wenige näher untersucht wurden (Jang *et al.*, 1997; Wiese *et al.*, 1999; Veramendi *et al.*, 1999, 2002).

Arabidopsis thaliana nimmt als vollständig sequenzierte Modellpflanze eine Schlüsselposition bei der Charakterisierung pflanzlicher Hexokinasen ein. Dort sind sechs Gene bekannt, die typische Merkmale von Hexokinase-Sequenzen zeigen. Die Isolierung möglichst aller Hexokinasen von Tabak sollte Vergleiche zwischen ihnen ermöglichen.

Im Folgenden werden neu isolierte Hexokinase-Gene aus Tabak vorgestellt und mit bereits bekannten Sequenzen verglichen. Dazu wurden die Programme „BLAST Search“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), „Megalign 5.07“ (DNASTAR Inc.) mit Algorithmus ClustalW, „ClustalX 1.83“ (Thompson *et al.*, 1997) und „NJPlot“ (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>) verwendet. Sofern nicht extra erwähnt, wurden die Programme mit ihren Standardparametern verwendet.

3.1.1 Isolierung von Hexokinase-Genen aus *Nicotiana tabacum*

Zur Isolierung von Hexokinase-Genen aus Tabak wurden cDNAs durch Plaque-Hybridisierung und PCR-Techniken durchmustert. Letztendlich konnten 9 verschiedene Sequenzen isoliert werden, die in Tabelle 3 aufgeführt sind.

Tabelle 3: Auflistung der aus Tabak isolierten Hexokinase-cDNAs samt Größenangaben

Name, Akzession	cDNA gesamt	ORF	5' UTR	3'UTR
NtHxk1, AF118133	1827	1494	146	187
NtHxk1a, AY553214	1853	1494	81	278
NtHxk2, AY553215	2300	1500	316	484
NtHxk3, AY553216	1849	1494	43	312
NtHxk4a, AY553217	1568	1497	37	34
NtHxk4b, AY553218	1568	1497	37	34
NtHxk5, AY553219	1966	1500	100	366
NtHxk6, AY553220	1824	1533	46	245
NtHxk7, AY664410	1916	1494	118	273

3.1.1.1 Durchmusterung einer cDNA-Bank

Zu Beginn der Arbeit standen vier verschiedene Hexokinase-Sequenzen zur Verfügung, die im Vorfeld von Dr. Karin Herbers (damals IPK Gatersleben) isoliert worden waren. Mit *AtHxk1* und *AtHxk2* als Sonden war eine cDNA-Phagenbank aus Tabakblatt (Herbers *et al.*, 1995) durchmustert worden. Es konnten vier Klone (Nr. 8, 9, 10, 23) isoliert werden, die aufgrund ihrer Sequenz als Hexokinase-Gene identifiziert wurden. Klon 9 entsprach der bereits veröffentlichten *NtHxk1*, Akzessionsnummer AF118133, (Wiese *et al.*, 1999). Klon 8 wurde aufgrund der sehr hohen Homologie *NtHxk1a* genannt, Klon 23 *NtHxk3*. Klon 10 zeigte einen Fehler im offenen Leserahmen, weshalb die Phagenbank mit ihm als Sonde erneut durchmustert wurde. Es wurde eine entsprechende korrekt kodierende Sequenz mit größeren untranslatierten Bereichen gefunden. Dieser größere Klon wurde *NtHxk2* genannt.

Nach Veröffentlichung des vollständigen *Arabidopsis thaliana* Genoms wurde die Bank erneut nach homologen Tabak-Sequenzen durchmustert. Mit der genomischen Sequenz von *At3g20040* wurde eine Sequenz gefunden, die *NtHxk6* genannt wurde. Eine homologe Sequenz zu *At4g37840* wurde nicht gefunden.

3.1.1.2 PCR mit degenerierten Primern

Ausgehend von den von Dr. Karin Herbers isolierten Hexokinase-Sequenzen aus Tabak, sowie von den zum damaligen Zeitpunkt bekannten Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, Kartoffel und Spinat wurden Bereiche hoher Homologie identifiziert und die Primer HKIso_5 und HKIso_3 abgeleitet, welche den Bereich 292-1094 homolog zum Leserahmen von

NtHxk1 umfassen. Bei nicht identischen Basen wurde der Schwerpunkt dabei auf die Tabak-Sequenzen gelegt (s. Abb. 4). Mit diesen Primern wurde cDNA aus Wurzel, *Source*- und *Sink*-Blatt sowie aus Fruchtknoten amplifiziert. In jeweils zehn untersuchten Sequenzen waren *NtHxk1/1a* und *NtHxk3* die vorherrschenden Isoformen. *NtHxk2* wurde in *Sink*-Blatt und Fruchtknoten je einmal gefunden. In cDNA aus *Sink*-Blatt entsprach eine Sequenz der neuen Isoform *NtHxk4a*. Mittels „Universal GenomeWalker™ Kit“ (Clontech) konnte die Sequenz nach 3' und 5' ausgeweitet werden (Primer GW3NtHK24_5, GW3NtHK24nest_5 und GW5NtHK24_3, GW5NtHK24nest_3). Die anschließende Amplifizierung des gesamten Leserahmens aus cDNA brachte eine zusätzliche Isoform, *NtHxk4b* zutage (Primer HK24copy_5 / HK24copy_3).

Primer	0 500 1000 1500	
	HKIso_5	HKIso_3
	TATGCR TTGGAYCTTGGTGGW ACAAA	GACACCDGAWATRTSTGCNATGCAKCA
<i>NtHxk1</i>	TATGCGTTGGATCTTGGTGGAA CA AAA	GACACCTGATATGTCTGCGATGCATCA
<i>NtHxk2</i>	TATGCATTGGACCTTGGTGGTACAAA	GACACCGGATATATGTGCAATGCAGCA
<i>NtHxk3</i>	TATGCATTGGATCTTGGTGGAA CA AAA	GACACCTGAAATGTCTGCTATGCATCA
<i>AtHxk1</i>	TATGCATTGGACCTAGGGGGGACAAA	GACTCCTCACATGTCTGGCTATGCACAA
<i>AtHxk2</i>	TATGCGTTGGATCTAGGCGGA CA AAA	GACCCCAACATGTCTGCTATGCACAG
<i>StHxk1</i>	TATGCATTGGATCTTGGTGGAA CA AAA	GACACCTGATATGTCTGCTATGCATCA
<i>StHxk2</i>	TATGCATTGGATCTTGGTGGAA CA AAA	GACACCTGAAATGTCTGCTATGCATCA
<i>SoHxk1</i>	TATGCGTTAGACCTTGGCGGCAC CA AA	GACACCAGACATGTCTGCCATGCATCA
<i>NtHxk4a</i>	TATGCATTAGATCTAGGCGGCACAAA	GACTCCGGACATGTCTGCTATGCATCA
<i>NtHxk5</i>	TATGCATTGGATCTAGGCGGCACAAA	GACTCCGGATATGGCTGCTATGCATCA
<i>NtHxk6</i>	TATGCTCTGCACCTTGGTGGTACGAA	GACACCGTTGATGGCTGCTATGCACGA
<i>NtHxk7</i>	TATGCATTGGATCTTGGTGGAA CA AAA	GACACCTGATATGTCTGCTATGCATCA

Abbildung 4: Ableitung der degenerierten Primer HKIso_5 / HKIso_3 und Vergleich mit Hexokinase-Sequenzen. Unterstrichene Basen hybridisieren nicht mit den Primern. Wobble-Basen: D=A/G/T, K=G/T, N=A/C/G/T, R=A/G, S=C/G, W=A/T, Y=C/T

3.1.1.3 RACE PCR

Versuche, den vollständigen Leserahmen von *NtHxk4a* durch RACE PCR zu amplifizieren, führten stattdessen zu der nah verwandten Isoform *NtHxk5* (Primer 5RaceHK24_686_3). Deren Leserahmen wurde durch RACE PCR vervollständigt (Primer 3Race HK5 ORF).

Die Suche nach weiteren homologen Sequenzen zu *NtHxk1* und *NtHxk3* mittels RACE PCR führte zu *NtHxk7* (Primer Hxk1_331_3). Deren 3' Bereich wurde anschließend ebenfalls durch RACE PCR amplifiziert (Primer 3RaceNtME4_2).

3.1.2 Sequenzanalyse pflanzlicher Hexokinasen

Die isolierten Tabak-Hexokinasen weisen für pflanzliche Hexokinasen typische Größen von ca. 500 AS auf. Olsson *et al.* (2003) schlugen die Einteilung pflanzlicher Hexokinasen in die Typen A, B1 und B2 vor, die problemlos auf die Tabak-Isoformen übertragbar ist. *NtHxk2* gehört als einziger Vertreter Typ A an und besitzt laut Computerberechnungen ein 30 AS großes abspaltbares Transitpeptid für den Chloroplastenimport (Nielsen *et al.*, 1997; Emanuelsson *et al.*, 2000). *NtHxk6* ist der einzige Vertreter des Typ B1, die anderen Isoformen gehören Typ B2 an (s. Abb. 5). Die Typ B Isoformen besitzen einen potentiellen Membrananker innerhalb der ersten 24 N-terminalen Aminosäuren (Nakai und Horton, 1999). Ein Sequenzvergleich der Hexokinasen von Tabak und *Arabidopsis thaliana* findet sich im Anhang, Abschnitt II.

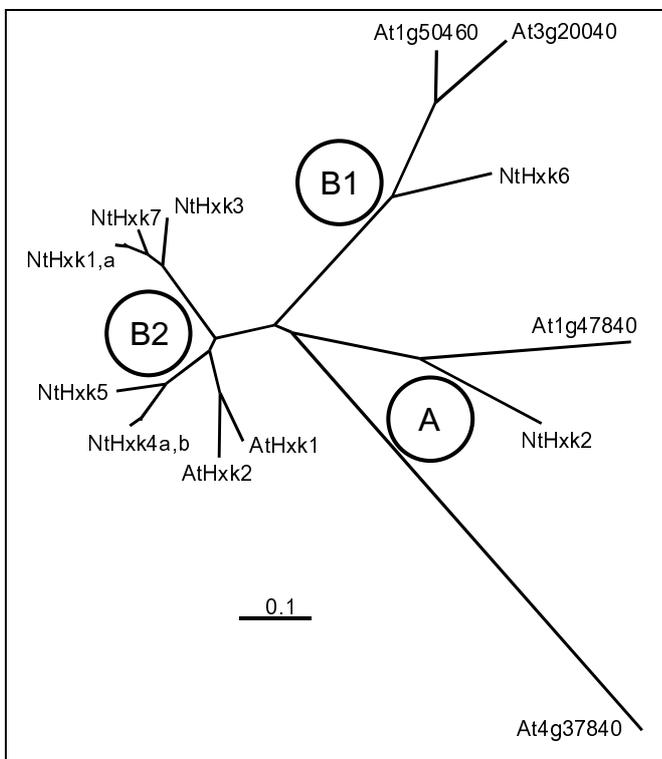


Abbildung 5: Radialer phylogenetischer Baum der bekannten Hexokinase-Proteine aus Tabak (Nt) und *Arabidopsis thaliana* (At). Die Hauptäste sind der Typisierung Olssons *et al.* (2003) folgend beschriftet. Sequenzvergleich mit ClustalX. Baumerstellung mit Korrektur multipler Substitutionen, Ausschluss lückenhafter Positionen, Bootstrapping. Darstellung mit NJPlot (Unrooted). Der Maßstab gibt die Anzahl von Substitutionen pro Position an.

Hexokinasen besitzen typische konservierte Sequenzbereiche, denen Funktion bei der Substratbindung und Katalyse zugeschrieben werden (s. 1.8). Beim Vergleich der Adenosine-Bereiche gibt es Auffälligkeiten bei den vier bekannten Typ B1 Hexokinasen aus Tabak,

Arabidopsis thaliana und Reis. Diese weichen mit mehreren inserierten Aminosäuren deutlich vom Konsensus ab (s. Abb. 6). Dabei ist die veröffentlichte Protein-Sequenz von At3g20040 an der genannten Stelle offensichtlich falsch aus der genomischen Sequenz abgeleitet worden. Der mutmaßliche Fehler beruht auf der Berechnung eines Introns, welches nach Vergleich der bekannten genomischen Sequenzen an dieser Stelle aber ungewöhnlich wäre und auch nicht den Leserahmen zerstören würde. In Abbildung 6 wird die mutmaßlich richtige Proteinsequenz angegeben.

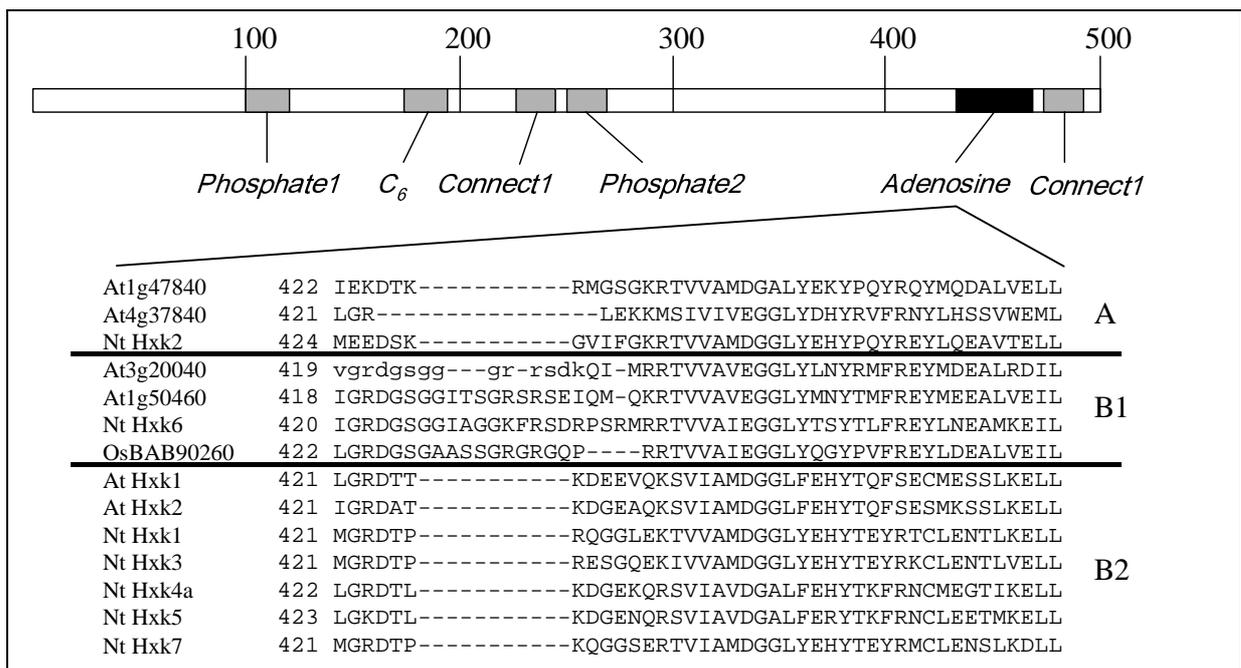


Abbildung 6: Sequenzvergleich der Adenosine-Bereiche von Hexokinasen aus Tabak (Nt), *Arabidopsis thaliana* (At) und Reis (Os) nach Bork *et al.*, 1993. Klein geschriebene Aminosäuren bei At3g20040 sind von mir korrigierend eingefügt worden.

Durch gezielten Aminosäure-Austausch konnten wichtige einzelne Aminosäuren identifiziert werden. Ser603, Asp657, Glu708 und Glu742 von Maus-Hxk2 aus Hepatomzellen sind für die Hexose-Bindung wichtig (Arora *et al.*, 1991), Asp532, Arg539, Gly896 und Gly989 von Ratte-Hxk2 für die ATP-Bindung (Bajjal *et al.* 1995). Die Aktivität der Enzyme wurde durch die Austausche um mindestens 90 % reduziert. Die entsprechenden Aminosäuren sind, mit einer Ausnahme, in den hier untersuchten Tabak-Hexokinasen konserviert (s. Abb. 7). Bezüglich der für die ATP-Bindung wichtigen Aminosäure Aspartat532 gibt es Auffälligkeiten in den Sequenzen der Typ B1 Proteine NtHxk6, At3g20040 und At1g50460. Die entsprechende Aminosäure 101 ist bei den genannten Proteinen ein Histidin (s. Abb. 7). Aufgrund beider aufgezeigten Sequenzabweichungen ist es fraglich, ob Typ B1 Hexokinasen tatsächlich ATP binden und die Katalyse durchführen können.

NtHxk2	MSVTVS	SPAGRSFHISRS	SPYKKISKPRV	I	IAAVRSGVSLAVAPILTKLQKDCATPLPVL	R	60		
NtHxk1	---	MKK	ATVGA	AVIGAAT	-VCAVAALIV	NHRMRKSSKWARAMAILREFE	EKC	56	
NtHxk3	---	MKK	ATVGAV	VVGA	AV-TVAVGALIV	RHRMRKSSKWARARAILKEFE	EKC	56	
NtHxk4a	---	MGK	VVVGAA	VVCTAA	-VCAA	AVLLM	RHKMKNSGKWAKAMDILKEFE	EKC	56
NtHxk5	---	MGK	LVVGV	SVVCTAA	VVCGVAVLLM	KRRMKNSGEWGKVEALLKDFE	EKC	57	
NtHxk6	---	MGR	LAVGI	SAGFAVA	-ACIVAAAMV	GKRVKRRRKWKMMVKVLEELE	EESC	56	
NtHxk7	---	MKK	VTVGA	AAVVGAAA	-VCAVAALIV	NHRMRKSSKWGRAMAILREFE	EKC	56	
<i>Phosphate1</i>									
NtHxk2	HVADAMAVDMRAGLAVDGGSDLK	MILSYIDTLPTGNEKG	LFYALDLGGTNF	RVLRVQLGG			120		
NtHxk1	QVADAMTVEMHAGLASEGGTKL	KMLITYVDNLPTGDEAG	VFYALDLGGANF	RVLRVQLGG			116		
NtHxk3	QVADAMTVEMHAGLASEGGSKL	KMLISYVDNLPTGDEEG	VFYALDLGGTNF	RVLRVQLGG			116		
NtHxk4a	QVADAMTVEMHAGLASEGGSKL	KMLISYVDNLPTGDETG	LFYALDLGGTNF	RVMRVQLGG			116		
NtHxk5	QVADAMTVEMHAGLASEGGSKL	KMLISYVDNLPTGDEEG	LFYALDLGGTNF	RVMRVQLGG			117		
NtHxk6	QVVDAMAVEMHAGLASEGGSKL	KMLLLTYVDKLPNGREKG	TYVALHLGGTNF	RVLRVHLGG			116		
NtHxk7	QVADAMTVEMHAGLASEGGSKL	KMLITYVDNLPTGDEAG	VFYALDLGGTNF	RVLRVQLGG			116		
<i>Z</i>									
<i>Zucker</i>									
NtHxk2	KEERVIATEFEQVSI	PQELMFA-TSEELFD	FIASELGKFSQSEGGK	FEMQQ	GRTREIGFTF		180		
NtHxk1	KDGGIVHQEFAEAS	IPP	NLMVG-TSEALFDYIAAELAK	FVNEE	EKEK	FQQPP	176		
NtHxk3	KDGGIVHQEFTEAS	IPP	NLMVG-TSEALFDYIAAELAK	FVAEEEE	EKFH	QPP	176		
NtHxk4a	KEKRIVKQEVKEVSI	PKNVMAGSSDAL	FDFIATALVKFVATED	DDDFRLPP	GRQREL	GFTF	177		
NtHxk5	NEKRIVKHEVKEVSI	PQNV	MAGSSSEVLFDFIATALAE	FVATEGDDFHLPP	GRQREL	GFTF	178		
NtHxk6	QRSAILGQDIERQPI	PQHLMTS-TSEDL	LLDFVASSLKDFIEKEG	NGLEQPS	PRRREL	GFTF	176		
NtHxk7	KDGGI	IHQEFAEAS	IPPSLMVG-TSDAL	FDYIAAELAK	FVAEEEE	EKFH	176		
<i>Z</i>									
<i>Connect1</i>									
NtHxk2	SFPVKQTSVK	SGILIKWTKGFAVSGTAGK	DVVAAC	NEAMERQGLGMQ	VSALVNDTVATLA		240		
NtHxk1	SFPVMQTSIN	SGT	IMRWT	KGFSIDDAV	QDVV	GELAKAMKRKGVDMR	236		
NtHxk3	SFPIMQTSIN	SGTLIR	WTKGFSID	DTV	QDVVAELTKAMQRKGVDMR	VSALVNDTVGTLA	236		
NtHxk4a	SFPVKQLSIA	SGTLIK	WTKGFSID	DTV	QDVVRELTKAMERVGLDVR	VAALVNDTVGTLA	237		
NtHxk5	SFPVKQLSIA	SGTLIK	WTKGFSIE	DV	VGQDVV	GELAKAMERAGLDVR	238		
NtHxk6	SFPVKQTSAS	SGILIK	WTKGFSIE	DMIG	RDVSECLQAIARKGQDVR	VAALINDTVGTLA	236		
NtHxk7	SFPVMQTSIN	SGT	IMRWT	KGFSIDDAV	QDVV	GELTKAMKRKGVDMR	236		
<i>Z</i>									
<i>Phosphate2</i>									
NtHxk2	GARYWD	N	DVMVAVILGTGTNACYVE	RVDAIPKLPQRMSNSPETIVNT	EWGAF-SNGLPL		298		
NtHxk1	GGKYTH	N	DVAVAVILGTGTNAAYVE	RVQAI	PKWHG	PVPKSGEMVINMEWGNFRSSHLPL	295		
NtHxk3	GGRFSN	K	DVSI	AVILGTGTNAAYVE	RAQAI	PKWHG	PLPKSGEMVINMEWGNFRSSHLPL	295	
NtHxk4a	GGRYNN	P	DVIA	AVILGTGTNAAYVE	RANTIP	PKWHG	LLPKSGDMVINMEWGNFRSSHLPLV	296	
NtHxk5	GGRYND	P	DVIA	AVILGTGTNAAYVE	RAHAIP	PKWHG	LLPKSGEMVINMEWGNFRSSHLPLV	297	
NtHxk6	LGHYND	E	DTVA	AVVIGTGTNACYLE	RADAI	IKCQGLLTTSGGMVVNMEWGNFWSSHLPR	295		
NtHxk7	GGKYTQ	K	DVAVAVILGTGTNAAYVE	RVQAI	PKWHG	PVPKSGEMVINMEWGNFRSSHLPL	295		
<i>Z</i>									
NtHxk2	TEFDREMDAESINPGEQIF	EKTIS	SGMYLGEIVRRV	LVKMAKVGGLFGGGYVPEKLV	TPFVLR		360		
NtHxk1	TQYDHALD	TNSLNP	GDQIF	EKMTSGMYLGEILRRV	LLRVAEEAGIFGD-EVPPK	LKSPFVLR	356		
NtHxk3	TEYDHAM	TD	SLNPGEQIF	EKICSGMYLGEILRRV	LLRMSEEA	AI	356		
NtHxk4a	TEYDQSLD	TESLNP	GEQIYE	EKMIS	SGMYLGEILRRV	LCRMAEEASFFDD-YVPPK	LKTPFILR	357	
NtHxk5	TEYDQNL	DVESLNP	GEQIYE	EKMIS	SGMYLGEILRRV	LCRMAKEASLFGD-YVPSK	LKIPFILR	358	
NtHxk6	TSYDIDLD	VASPNP	NDQGF	EKMIS	GLYLGDIVRRV	LLRMSQESDDFG--PASSK	LAVPFALR	355	
NtHxk7	TEYDHALD	NESLNP	GEQIF	EKMTSGMYLGEILRRV	LLRVSE	EAGVFGD-EVPPK	LKDSFVLR	356	
<i>Z</i>									

durch Restriktionsschnittstellen differieren, lassen sie sich durch Southern-Analyse unterscheiden.

Sequenzanalyse der Hexokinase-Gene aus *A. thaliana* belegt eine Struktur aus sieben bis neun Exons. Der größte translatierte Bereich wird jeweils vom letzten Exon kodiert, welches den Bereich von ca. 1150 bp bis zum Stopkodon und wahrscheinlich darüber hinaus abdeckt. Dieser Bereich der jeweiligen Tabak-Hexokinase wurde bis zum Stopkodon mittels PCR amplifiziert und als Sonde für die Southern-Analyse eingesetzt (s. Tab. 4).

Neben DNA von *N. tabacum* wurde auch DNA von *N. sylvestris* für die Analyse verwendet, um eine Abschätzung über die Herkunft der isolierten Tabak-Hexokinasen treffen zu können. Die Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII wurden ausgewählt, weil sie nicht in den von den Sonden abgedeckten Bereichen schneiden.

Tabelle 4: Identität der für Southern-Analysen eingesetzten Sonden. Berechnungen mit Megalign. In Fettdruck hervorgehoben sind die jeweils nah verwandten Paare aus *NtHxk1/NtHxk3* und *NtHxk4a/NtHxk5*.

	<i>NtHxk1</i>	<i>NtHxk2</i>	<i>NtHxk3</i>	<i>NtHxk4a</i>	<i>NtHxk5</i>	<i>NtHxk6</i>	verwendete Primer (s. Anhang, I.1)
<i>NtHxk1</i>	***	52.1	79.9	56.3	56.1	45.8	HK9_1150_5 / S15
<i>NtHxk2</i>	52.1	***	57.4	57.1	55.1	51.1	HK10_1165_5 / S6
<i>NtHxk3</i>	79.9	57.4	***	59.6	59.3	48.1	HK9_1150_5 / S12
<i>NtHxk4a</i>	56.3	57.1	59.6	***	87.8	49.0	HK24A_1167_5 / HK24_ORF_3
<i>NtHxk5</i>	56.1	55.1	59.3	87.8	***	49.9	HK5_1170_5 / HK5_fSense_Sall_3
<i>NtHxk6</i>	45.8	51.1	48.1	49.0	49.9	***	HK6_1175_5 / HK6_Sall_3

3.2.1 Southern-Analysen von *NtHxk1*, 3 und 7

Die eingesetzten Sonden für *NtHxk1* und *NtHxk3* waren zu 79,9 % identisch (s. Tab. 4). Die Bandenmuster beider Hybridisierung unterschieden sich aufgrund dieser hohen Homologie nur unwesentlich. Von einer zusätzlichen Hybridisierung mit der in diesem Bereich zu 80-88 % ebenfalls sehr ähnlichen *NtHxk7* wurde daher abgesehen. Exemplarisch abgebildet wird hier die Hybridisierung mit der Sonde für *NtHxk3* (s. Abb. 8).

Aufgrund der Markierung von mindestens drei verschiedenen Isoformen im Tabakgenom ergab sich ein komplexes Bandenmuster. Der Vergleich mit dem einfacheren Muster im Genom von *N. sylvestris* erleichterte die Interpretation.

In EcoRI geschnittener DNA von *N. tabacum* wurden vier Banden von 1,6 – 2,6 – 4,2 und 7 kb Größe markiert. Die 1,6 und 4,2 kb großen Banden fanden sich auch in *N. sylvestris* DNA. In HindIII geschnittener DNA wurden Banden von 1,6 – 1,7 – 1,9 – 2,3 kb, sowie sehr

schwach von 3,8 und >10 kb Größe markiert. In *N. sylvestris* DNA fanden sich korrespondierende Banden von 1,6 / 1,7 und 2,3 kb Größe.

Die Anzahl der starken Banden deutet auf vier verschiedene Isoformen der Homologiegruppe *NtHxk1/3/7* in *N. tabacum*, und zwei oder drei in *N. sylvestris* hin. Tatsächlich wurden später im Genom von *N. sylvestris* die drei Isoformen *NsHxk1*, *NsHxk3* und *NsHxk4* gefunden (s. 3.7.1). *NsHxk1* und *NsHxk4* sind als identisch mit *NtHxk1a* bzw. *NtHxk7* anzusehen, *NsHxk3* ist ein zusätzliches Homolog zu *NtHxk3*. Zusammen mit *NtHxk3* bilden diese drei Gene von *N. sylvestris* die bei der Southern-Analyse von Tabak nachgewiesene Homologiegruppe aus vier Genen. *NtHxk1* und *NtHxk1a* sind demnach verschiedene Allele des gleichen Gens.

3.2.2 Southern-Analysen von *NtHxk4* und *NtHxk5*

Auch *NtHxk4* und *NtHxk5* ließen sich unter den gegebenen Bedingungen bei 87,8 % Identität der verwendeten Sonden nicht durch Southern-Hybridisierung unterscheiden. Exemplarisch abgebildet wird die Hybridisierung mit der Sonde für *NtHxk4* (s. Abb. 8).

In EcoRI geschnittener *N. tabacum* DNA wurde eine intensive Bande von 2,2 kb, sowie eine schwache Bande von 6 kb Größe markiert. Die 6 kb große Bande fand sich auch in *N. sylvestris* DNA. Die zusätzliche sehr schwache Bande von 1,6 kb Größe in EcoRI geschnittener *N. sylvestris* DNA ist vermutlich auf eine Kreuzhybridisierung mit *NtHxk1/3/7* zurückzuführen.

In HindIII geschnittener *N. tabacum* DNA wurde eine intensive Bande von 1,3 kb und eine schwache Bande von 0,3 kb Größe markiert. Außerdem waren zwei sehr schwache Banden von 1,7 und 1,9 kb Größe zu sehen, bei denen eine Kreuzhybridisierung mit *NtHxk1/3/7* anzunehmen ist. Die 0,3 kb große Bande fand sich auch in *N. sylvestris* DNA wieder. Die 1,7 und 2,3 kb großen Banden in HindIII geschnittener *N. sylvestris* DNA lassen ebenfalls eine Kreuzhybridisierung mit *NtHxk1/3/7* vermuten. Außerdem waren zwei sehr schwache Banden von 0,8 und 1,2 kb Größe sichtbar, deren Herkunft unklar ist.

Im *N. tabacum* Genom sind daher zwei verschiedene Isoformen der Homologiegruppe *NtHxk4/5* zu vermuten, also *NtHxk4* und *NtHxk5*, davon eine aus dem *N. sylvestris* Genom stammend. *NtHxk4a* und *NtHxk4b* sind demnach verschiedene Allele des gleichen Gens.

3.2.3 Southern-Analyse von *NtHxk2*

Aufgrund der geringen Homologie von *NtHxk2* zu den anderen bekannten Isoformen fanden sich keine Hinweise auf Kreuzhybridisierungen mit diesen (s. Abb. 8).

In EcoRI geschnittener *N. tabacum* DNA wurden zwei Banden von ca. 10 und 12 kb Größe markiert, von denen die größere auch in *N. sylvestris* DNA zu sehen war.

In HindIII geschnittener *N. tabacum* DNA wurde eine 3,3 kb große Doppelbande stark markiert. Eine deutlich weniger intensiv markierte Einzelbande fand sich auch im *N. sylvestris* Genom.

Im *N. tabacum* Genom ist daher von zwei Isoformen der *NtHxk2*-Homologiegruppe auszugehen, bei *N. sylvestris* von einer.

3.2.4 Southern-Analyse von *NtHxk6*

Auch bei *NtHxk6* gab es aufgrund des geringen Homologiegrads zu den anderen bekannten Isoformen keine Hinweise auf Kreuzhybridisierungen mit diesen (s. Abb. 8).

In EcoRI geschnittener *N. tabacum* DNA wurden zwei Banden von 2,1 und 3,0 kb Größe markiert, wovon die größere auch in *N. sylvestris* DNA auftauchte.

In HindIII geschnittener *N. tabacum* DNA waren zwei Banden von 1,8 und 9 kb sichtbar, von denen die kleinere auch in *N. sylvestris* markiert wurde.

Im Genom von *N. tabacum* ist daher von zwei verschiedenen Isoformen der *NtHxk6* Homologiegruppe auszugehen, bei *N. sylvestris* von einer.

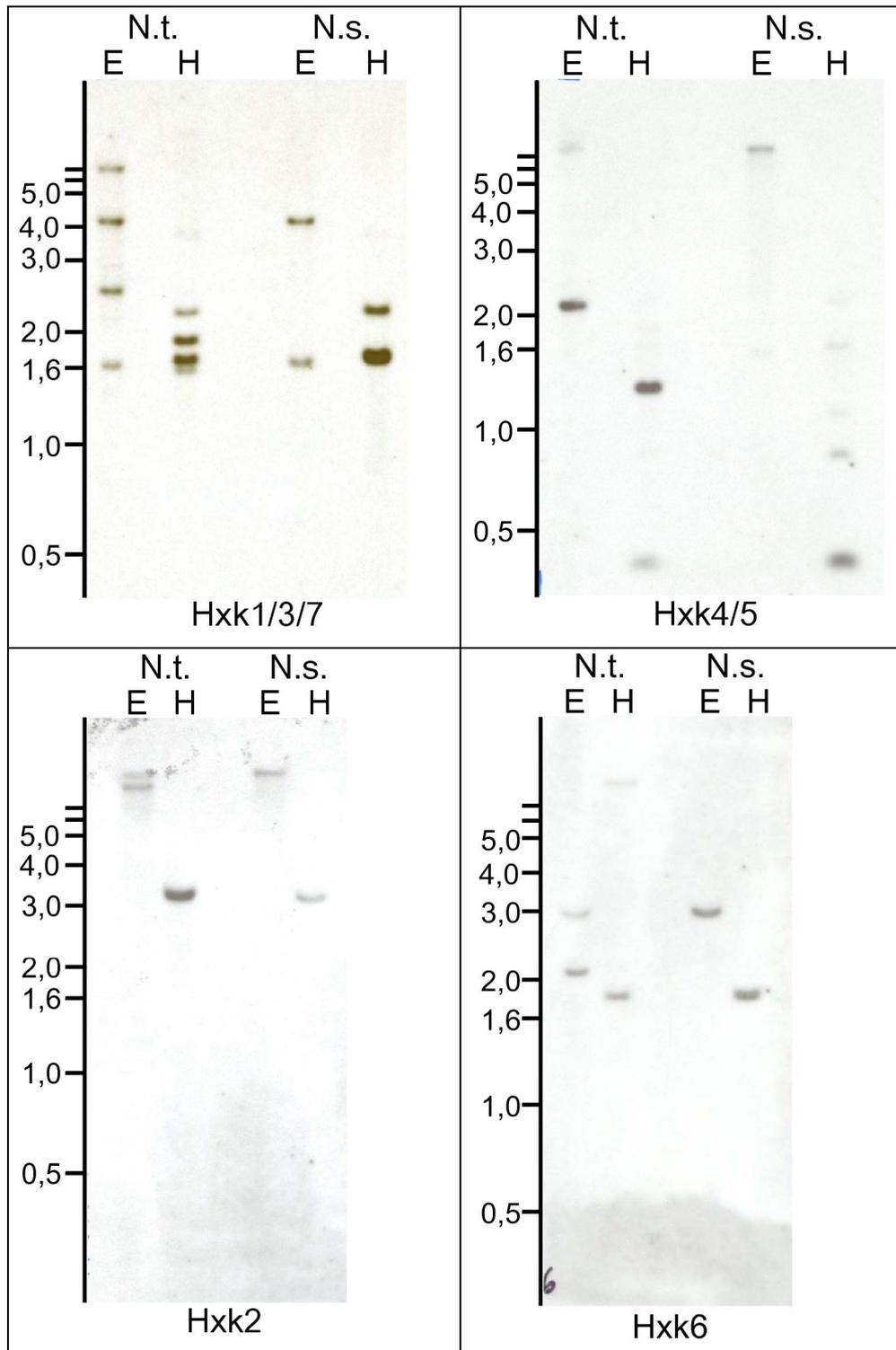


Abbildung 8: Southern-Analysen von *NtHxk1/3/7*, *NtHxk4/5*, *NtHxk2* und *NtHxk6*. Links der Abbildungen sind die Laufhöhen des Größenmarkers in kb angegeben. Pro Spur wurden ca. 30 µg DNA aufgetragen. N.t.: *Nicotiana tabacum*, N.s.: *Nicotiana sylvestris*, E: EcoRI, H: HindIII.

3.3 Heterologe Expression von NtHxk1a und NtHxk2 in *E. coli* zur Gewinnung von Antiseren

Antiseren gegen NtHxk1/NtHxk1a und NtHxk2 sollten helfen, transgene Pflanzen mit erhöhter Expression zu identifizieren und nach Markierung elektronenmikroskopisch die subzelluläre Lokalisierung aufzuklären.

Um große Mengen des reinen Proteins zu gewinnen, wurden NtHxk1a und NtHxk2 bakteriell exprimiert und anschließend gereinigt. Die Proteine wurden Kaninchen injiziert, die daraufhin Antikörper gegen die entsprechenden Hexokinasen entwickelten.

3.3.1 Erstellung von Konstrukten zur bakteriellen Expression von NtHxk1a und NtHxk2

Vektoren der pQE-Serie (Qiagen) versehen das zu exprimierende Protein mit einem *Tag* aus sechs Histidinen, die eine Reinigung über Nickel-Agarose erlauben. Bei dem verwendeten Vektor pQE-9 wird der *Tag* an den N-Terminus des Proteins fusioniert.

Beide Hexokinase-Sequenzen wurden über den gesamten kodierenden Bereich amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI / Sall in den Vektor pQE-9 ligiert. Für NtHxk1a wurden die Primer S13 und S15 verwendet, für NtHxk2 die Primer S5 und S6 (s. Abb. 9). Die zur Amplifizierung von NtHxk2 verwendete cDNA trug eine bis dahin unentdeckte Störung des Leserahmens, die zu einem frühzeitigen Translationsstopp nach 234 statt 499 Aminosäuren führte. Da am C-Terminus des verkürzten Proteins lediglich drei falsche Aminosäuren translatiert wurden, wurde es dennoch für die Herstellung des Antiserums verwendet. Nach Vergleich der Sequenz mit dem genomischen Klon der homologen *NsHxk2* (s. 3.7.1) ist anzunehmen, dass die Störung auf einem fehlerhaften Spleißen zwischen viertem und fünftem Exon der RNA beruhte.

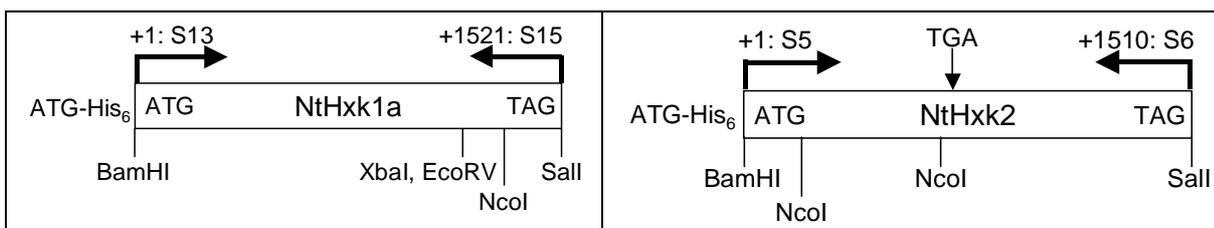


Abbildung 9: Schemazeichnungen der zur Antikörperproduktion verwendeten Konstrukte NtHxk1a und NtHxk2 im Plasmid pQE-9. Mit Richtungspfeilen angegeben sind die verwendeten Primer samt Positionsangaben in Relation zum Translationsstart (s. Anhang, I.1). Außerdem eingezeichnet sind einige interne Schnittstellen der Konstrukte.

3.3.2 Expression und Reinigung der Proteine NtHxk1a und NtHxk2(1-231)

Beide Hexokinase-Proteine wurden in *E. coli*, Stamm M15, nach Zugabe von 1 mM IPTG effizient exprimiert (s. Abb. 10). Das NtHxk1a-Protein zeigte im Gel eine etwas geringere Laufhöhe als die berechneten 55 kDa, die verkürzte NtHxk2 lag wie berechnet bei 27 kDa. Beide Proteine lagen hauptsächlich unlöslich in Protein-Einschlusskörpern vor. Die denaturierende Reinigung über Nickel-Agarose war in beiden Fällen unbefriedigend, weshalb eine abschließende Reinigung über ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel durchgeführt wurde (s. 2.7.3). Nach diesem Schritt lag das Protein in genügend reiner Form für die Produktion von Antiseren vor.

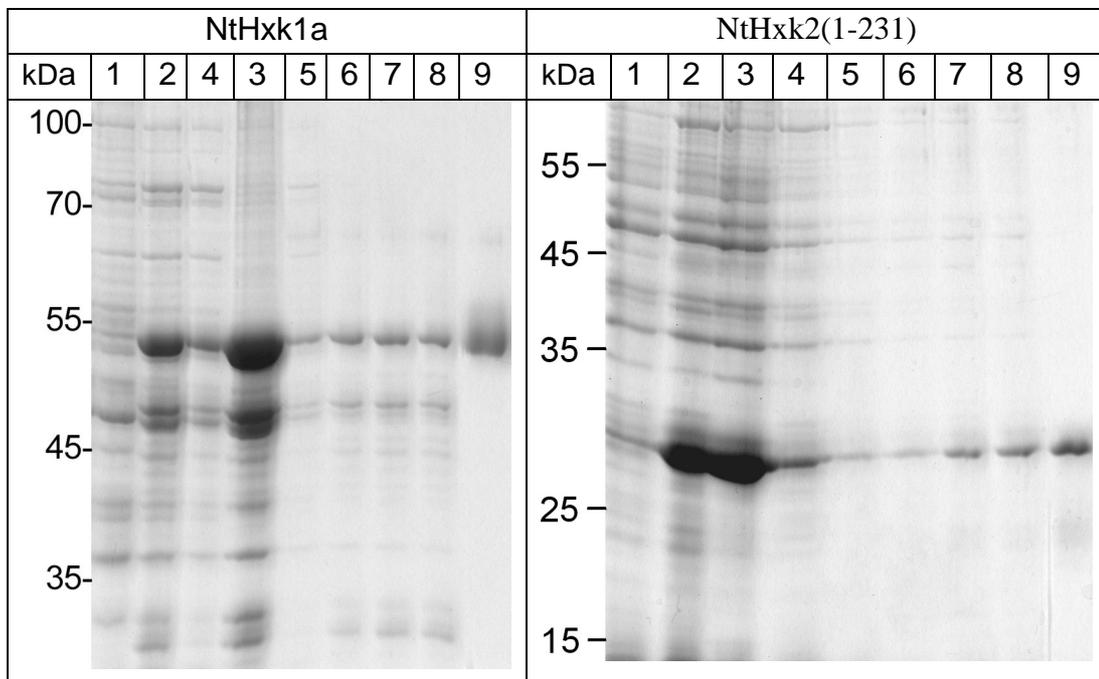


Abbildung 10: Coomassiegefärbte SDS-Polyacrylamidgel nach bakterieller Expression und Reinigung von NtHxk1a und NtHxk2(1-231). Links der Bilder sind die Laufhöhen des Größenmarkers aufgetragen.

1: bakterielle Proteine ohne IPTG-Induktion, **2:** nach 4 h Induktion mit 1 mM IPTG, **3:** unlösliche Proteine, **4:** lösliche, nicht von der Nickel-Agarose gebundene Proteine (bei NtHxk1a sind 3 und 4 in umgekehrter Reihenfolge!), **5:** Durchfluss des ersten Waschschriffs, **6-8:** konsekutive Elutionen der Proteine von der Nickel-Agarose, **9:** ca. 2 µg des Zielproteins nach Reinigung über ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel.

3.3.3 Test der Antiseren

Die nach Immunisierung von Kaninchen gewonnenen Antiseren gegen NtHxk1/1a und NtHxk2 erkannten das jeweilige bakteriell oder pflanzlich exprimierte Protein. Die entsprechenden Präimmunsereen taten dies nur sehr schwach mit 100 ng des gereinigten

Proteins (s. Abb. 11 und 12). Beide Präimmunsereen zeigten deutliche Reaktionen mit unbekanntem Proteinen von 56 und 64 kDa. In pflanzlichen Extrakten wurde ein 32 kDa großes unbekanntes Protein stark markiert, sowie deutlich schwächer mehrere Proteine unterschiedlicher Größe, darunter RubisCO bei 52-55 kDa. In Staubbeutel-Gewebe wurde ein ca. 17 kDa großes unbekanntes Protein markiert. Das Präimmunsereum gegen NtHxk1a markierte außerdem ein ca. 52 kDa großes Protein, was insbesondere in Staubbeutel-Gewebe zu einer deutlich sichtbaren Bande führte.

Die geringste nachweisbare Proteinmenge der Antiseren lag bei 1-5 ng. In Blattextrakten wurden NtHxk1/1a und NtHxk2 von der RubisCO auf eine Laufhöhe von ca. 50 kDa gedrückt. Ohne störende RubisCO wurde NtHxk1 in Staubbeutel-Gewebe bei 53 kDa markiert, NtHxk2 in Mittelrippe bei 52 kDa. Zur Steigerung der Spezifität wurden beide Antiseren erfolgreich mit den entsprechenden bakteriell exprimierten Proteinen affinitätsge-reinigt (s. 2.7.4). Dadurch wurden deutlich spezifischere Signale in der Western-Analyse erreicht, insbesondere die starke Reaktion mit den 56 und 64 kDa großen Proteinen wurde in pflanzlichen Extrakten abgeschwächt. Weiterhin bestehen blieb die starke Markierung des unbekanntem 32 kDa großen Proteins. Besonders in Staubbeutel-Gewebe waren noch schwach andere Proteine markiert. Durch den NtHxk1/1a-Antikörper erfolgte die Markierung des 52 kDa großen unbekanntem Proteins deutlich stärker.

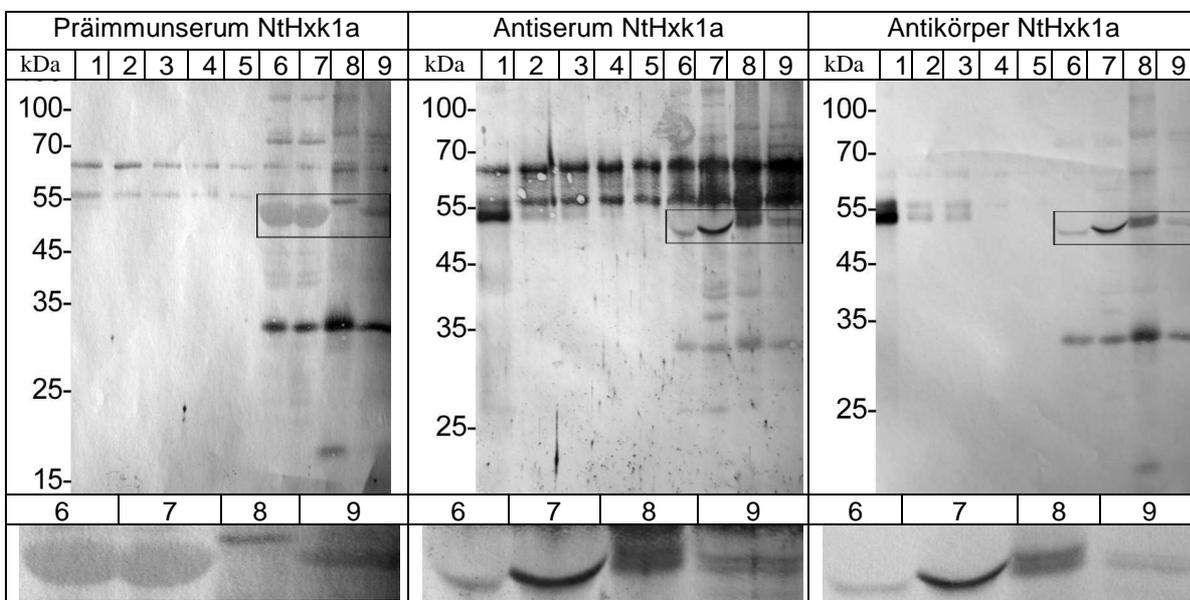


Abbildung 11: Test des Antikörpers gegen **NtHxk1/1a**. Western-Analyse mit Detektion des Antikörpers durch Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum aus Ziege mit gekoppelter alkalischer Phosphatase. Im unteren Teil der Abbildung sind detaillierter die eingerahmten Bereiche aufgeführt.

1: 100 ng gereinigtes Protein, 2: 10 ng, 3: 5 ng, 4: 1 ng, 5: 0,1 ng, 6: 25 µg Protein aus *Source*-Blatt Lamina, 7: 25 µg Protein aus *Source*-Blatt Lamina von NtHxk1 Überexpression Linie 1, 8: 25 µg Protein aus Staubbeutel, 9: 25 µg Protein aus *Source*-Blatt Mittelrippe.

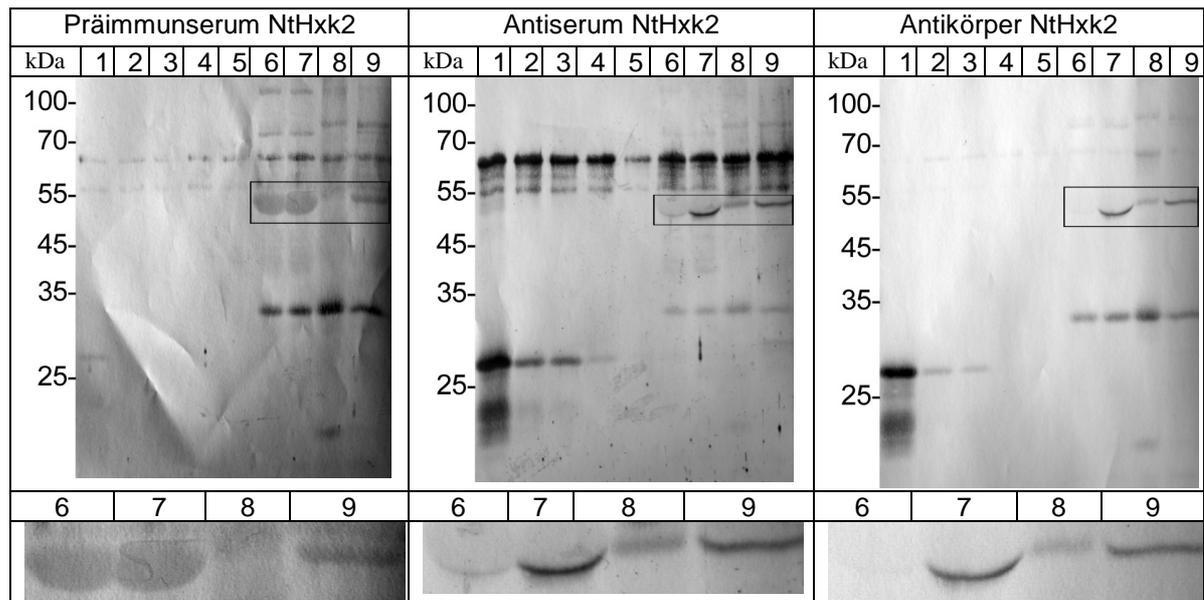


Abbildung 12: Test des Antikörpers gegen **NtHxk2**. Western-Analyse mit Detektion des Antikörpers durch Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum aus Ziege mit gekoppelter alkalischer Phosphatase. Im unteren Teil der Abbildung sind detaillierter die eingerahmten Bereiche aufgeführt.

1: 100 ng gereinigtes Protein, **2:** 10 ng, **3:** 5 ng, **4:** 1 ng, **5:** 0,1 ng, **6:** 25 µg Protein aus *Source*-Blatt Lamina, **7:** 25 µg Protein aus *Source*-Blatt Lamina von NtHxk2 Überexpression Linie 33, **8:** 25 µg Protein aus Staubbeutel, **9:** 25 µg Protein aus *Source*-Blatt Mittelrippe.

Der Antikörper gegen NtHxk1/1a erwies sich auch als geeignet zur Immunolokalisierung des Proteins in elektronenmikroskopischen Schnitten (s. 3.4.3). Der Antikörper gegen NtHxk2 zeigte dafür keine Eignung.

3.4 Innerzelluläre Verteilung der Hexokinasen

Zum Verständnis der Funktion eines Proteins im Stoffwechsel ist es notwendig, dessen genaue Lokalisierung innerhalb der Zelle zu kennen. In der unterschiedlichen Kompartimentierung ist ein Grund für die Vielzahl von Isoformen eines Enzyms zu sehen.

Aufgrund biochemischer Untersuchungen war frühzeitig erkannt worden, dass pflanzliche Hexokinasen in lösliche und mit Organellen assoziierte unlösliche Formen unterteilt werden können (Saltman, 1953). In nachfolgenden Untersuchungen konnte die Lokalisierung in zytosolisch, plastidär und mitochondrial unterschieden werden (Baldus *et al.*, 1980; Miernyk und Dennis, 1983; Schnarrenberger, 1990), wobei nicht in allen untersuchten Pflanzen Vertreter jedes Kompartiments gefunden wurden.

Die bisher bekannten pflanzlichen Hexokinasen sind in zwei verschiedene Hauptgruppen, Typ A und Typ B, einzuteilen (Olsson *et al.*, 2003). Laut Computerberechnungen besitzen

Typ A Hexokinasen ein abspaltbares N-terminales Transitpeptid für den Plastidenimport, wobei im Einzelfall eine andere Lokalisierung innerhalb der Zelle nicht auszuschließen ist. Typ B Hexokinasen besitzen laut Computerberechnungen einen N-terminalen Membrananker, der sie in der äußeren Mitochondrien- Plastidenmembran befestigen könnte. Die bislang bekannten Ergebnisse zur Lokalisierung von Hexokinasen bekannter Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (AtHxk1: Rolland *et al.*, 2002; AtHxk2 und At1g50460: Giegé *et al.* 2003), Spinat (SoHxk1: Wiese *et al.*, 1999) und als Vertreter des Typ A aus *Physcomitrella patens* (PpHxk1: Olsson *et al.*, 2003) bestätigen die Computerberechnungen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Tabak-Hexokinasen, mit Ausnahme von NtHxk2, gehören dem Typ B an und sollten demnach in der äußeren Hüllmembran von Mitochondrien oder Chloroplasten verankert sein. NtHxk2 besitzt als Typ A Hexokinase ein potentiell abspaltbares Transitpeptid von 30 AS für den Transport in das Plastidenstroma (s. 3.1.2).

Eine geeignete molekularbiologische Methode zur Klärung der innerzellulären Verteilung eines Enzyms ist dessen Fusion mit dem „Grün Fluoreszierenden Protein“ (GFP) mit anschließendem visuellen Nachweis in transgenen Zellen.

Durch Fusion aller Hexokinase-Isoformen an den N-Terminus von GFP sollte ihre innerzelluläre Verteilung aufgeklärt und die Computerberechnungen überprüft werden. Für die fluoreszenzmikroskopischen Arbeiten wurde zur Identifizierung von Mitochondrien der organellspezifische Fluoreszenzfarbstoff „MitoTracker CM-H₂TMRos“ (s. 2.8.2) verwendet, während für Chloroplasten die Autofluoreszenz des Chlorophylls herangezogen wurde. Die Aufnahmen erfolgten am Konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena).

Darüber hinaus ermöglichen elektronenmikroskopische Methoden wie die Immunogoldmarkierung durch die Verwendung spezifischer Antikörper die innerzelluläre Lokalisierung. Für NtHxk1 stand ein geeigneter Antikörper zur Verfügung.

3.4.1 Konstruktion von Hexokinase-GFP-Fusionen

Da zu Beginn der Arbeiten kein geeigneter binärer Vektor mit GFP zur Verfügung stand, wurden zur Herstellung der Hexokinase-GFP-Fusionen verschiedene Strategien verfolgt.

3.4.1.1 Fusionen von NtHxk1, 2 und 7 mit GFP

Mit den Oligonukleotiden K75 und K76 wurde mGFP5 aus dem Vektor pBin m-gfp5-ER (Haseloff, 1997) amplifiziert und über EcoRI / SalI in den Vektor pBluescript SK- ligiert. Anschließend wurden mit den in Tabelle 5 aufgeführten Primern die Hexokinase-Sequenzen amplifiziert und über die EcoRI-Schnittstelle mit GFP fusioniert. Über BamHI / SalI wurden die Fusionen ausgeschnitten und in den Vektor pBinAR zwischen den CaMV 35S Promotor und den ocs-Terminator ligiert. NtHxk1 und NtHxk2 wurden in voller Länge mit GFP fusioniert. Des Weiteren wurden nur die N-Termini mit GFP fusioniert, um ihre Funktion als Signalpeptid für die Lokalisierung zu überprüfen. Von NtHxk1 und NtHxk7 wurden die ersten 44 Aminosäuren mit GFP verbunden, von NtHxk2 die ersten 66 (s. Abb. 13).

Tabelle 5: Verwendete Primer zur Konstruktion von GFP-Fusionen mit NtHxk1, 2 und 7 (s. Anhang, I.1).

Konstrukt	5' Primer	3' Primer	Größe der Hexokinase
NtHxk1::GFP	HK9GFP5	HK9GFP3	497 AS
NtHxk1N::GFP	HK9GFP5	HK9LGFP3	44 von 497 AS
NtHxk2::GFP	HK10_BamHI_5	HK10GFP3	499 AS
NtHxk2N::GFP	S7	HK10LGFP3	66 von 499 AS
NtHxk7N::GFP	HK9GFP5	HK9LGFP3	44 von 497 AS

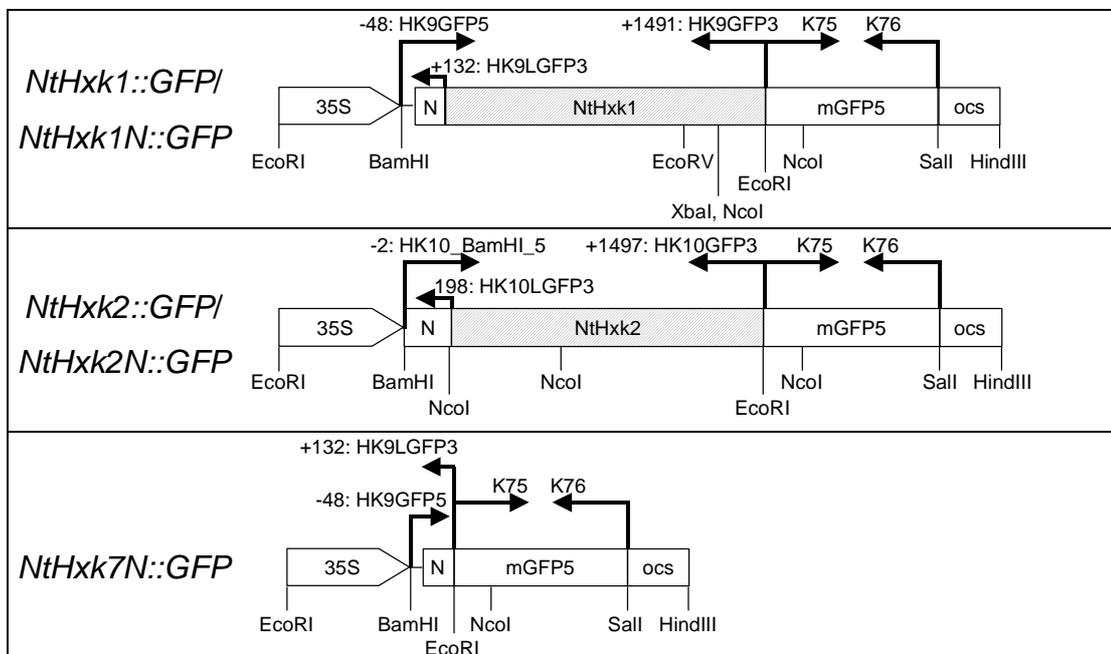


Abbildung 13: Maßstabgetreue Schemazeichnungen der GFP-Fusionen von *NtHxk1*, 2 und 7 im Plasmid pBinAR. Schraffierte Bereiche von *NtHxk1* und *NtHxk2* fehlen in den verkürzten Konstrukten mit N-Terminus (N). Mit Richtungspfeilen angegeben sind die verwendeten Primer samt Positionsangaben in Relation zum Translationsstart (s. Anhang, I.1). Außerdem eingezeichnet sind einige interne Schnittstellen der Konstrukte.

3.4.1.2 Konstruktion des binären GFP-Fusionsvektors pBinGFP

Um die Konstruktion weiterer GFP-Fusionen zu erleichtern, wurde ein auf pBin19 (Bevan, 1984) basierender Vektor mit integriertem GFP hergestellt (s. Abb. 14).

Mit den Primern GFP-SalI_5 und NOS-HindIII_3 wurde aus dem Vektor pCAMBIA 1303 mGFP5 mitsamt Histidin-Tag und nos-Terminator amplifiziert. Über SalI / HindIII wurde das Fragment in den Vektor pBinAR ligiert, wobei dessen ocs-Terminator gegen den nos-Terminator ausgetauscht wurde. Außerdem wurde die Multiple Klonierungsregion um eine SpeI-Schnittstelle aus dem pCAMBIA Vektor erweitert.

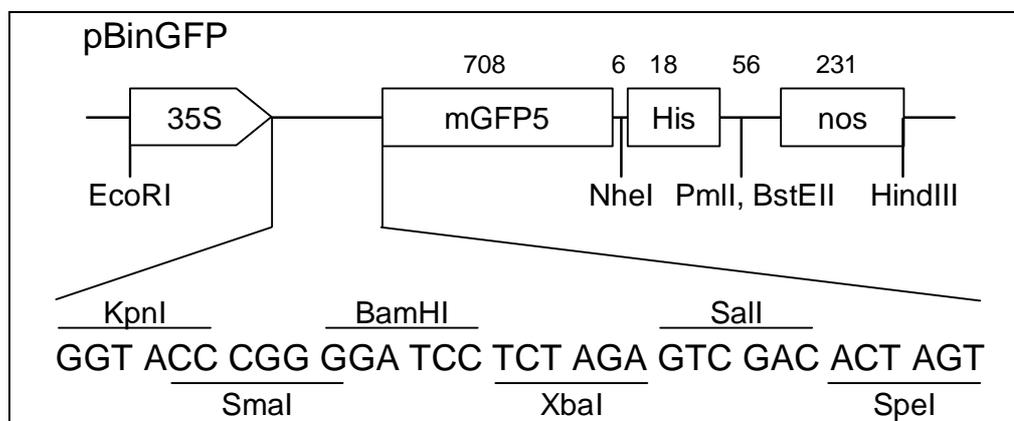


Abbildung 14: Schemazeichnung des neu erstellten binären GFP-Fusionsvektors pBinGFP. Die Sequenz der Multiplen Klonierungsregion ist in Triplets entsprechend dem Leserahmen von GFP (ohne ATG) eingeteilt. Das Rückgrat des Vektors basiert auf pBin19 (Bevan, 1984).

3.4.1.3 Fusionen von NtHxk3, 4a, 5 und 6 mit GFP

NtHxk3, *4a*, *5* und *6* wurden mit den in Tabelle 6 aufgeführten Primern amplifiziert und über BamHI / SpeI (*NtHxk3*) bzw. BamHI / SalI (andere) in den neu konstruierten Vektor pBinGFP ligiert (s. Abb. 15).

Tabelle 6: Verwendete Primer zur Konstruktion von GFP-Fusionen mit NtHxk3, 4a, 5 und 6 (s. Anhang, I.1).

Konstrukt	5' Primer	3' Primer	Größe der Hexokinase
NtHxk3::GFP	HK23BamHI_5	HK23-SpeI_3	497 AS
NtHxk4a::GFP	HK24_BamHI_5	HK24AfGFP_SalI_3	498 AS
NtHxk5::GFP	HK5_BamHI_5	HK5_fGFP_SalI_3	499 AS
NtHxk6::GFP	HK6_BamHI_5	HK6fGFP_SalI_3	510 AS

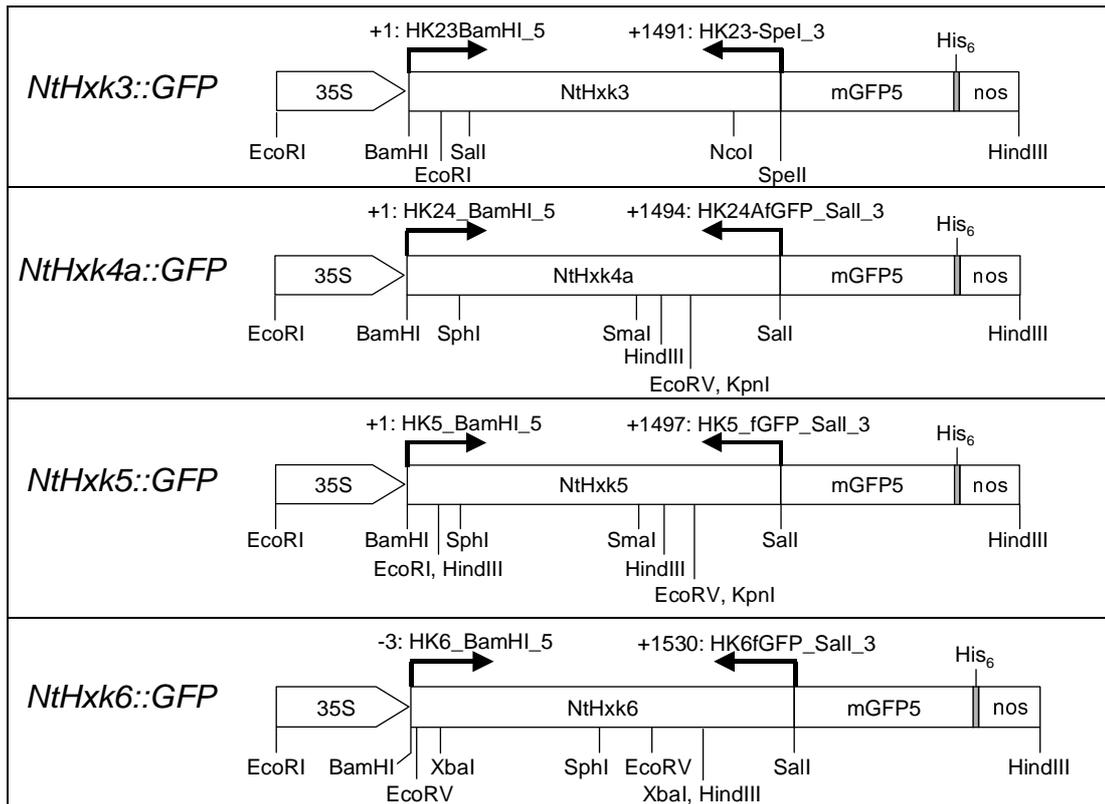


Abbildung 15: Maßstabgetreue Schemazeichnungen der GFP-Fusionen von *NtHxk3*, *4a*, *5* und *6* im Vektor pBinGFP. Mit Richtungspfeilen angegeben sind die verwendeten Primer samt Positionsangaben in Relation zum Translationsstart (s. Anhang, I.1). Außerdem eingezeichnet sind einige interne Schnittstellen der Konstrukte.

3.4.1.4 Fusion des N-Terminus von *NtHxk4a* mit GFP

Nach Amplifikation des 5'-Bereichs von *NtHxk4a* mit den Primern HK24-2_BamHI_5 und HK24L_XbaI_3 wurden die ersten 44 N-terminalen Aminosäuren von *NtHxk4a* im Plasmid pFF19-GFP mit GFP zu *NtHxk4aN::GFP* fusioniert (s. Abb. 16). Das Plasmid pFF19-GFP wurde freundlicherweise von Dr. Andreas Wachter, Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

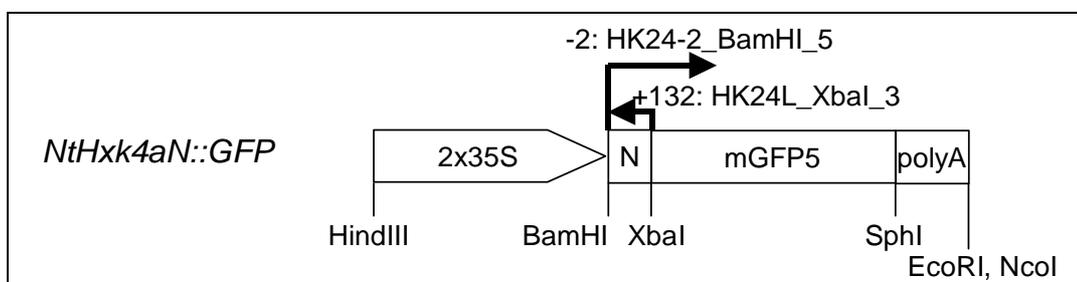


Abbildung 16: Maßstabgetreue Schemazeichnungen von *NtHxk4aN::GFP* im Plasmid pFF19-GFP. Mit Richtungspfeilen angegeben sind die verwendeten Primer samt Positionsangaben in Relation zum Translationsstart (s. Anhang, I.1). Außerdem eingezeichnet sind einige interne Schnittstellen der Konstrukte. N: N-Terminus von *NtHxk4a*.

3.4.2 Transformation von Tabakpflanzen mit Hexokinase-GFP-Fusionen

Mit allen im Abschnitt 3.4.1 aufgeführten Konstrukten, mit Ausnahme von NtHxk4aN::GFP, wurden stabil transformierte Tabakpflanzen hergestellt. NtHxk4aN::GFP wurde transient mittels Biolistik transformiert. Regenerierte Pflanzen wurden am Fluoreszenzmikroskop nach GFP-Signalen in der unteren Blattepidermis durchmustert. Von positiven Pflanzen wurden Samen für die Vermehrung genutzt.

3.4.3 NtHxk1 ist mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert

Aufgrund deutlicher Signale von NtHxk1::GFP und NtHxk1N::GFP im Fluoreszenzmikroskop wurden die Linien 1, 8, 14, 17 (NtHxk1::GFP) bzw. 3, 4, 5, 11, 15 (NtHxk1N::GFP) zur weiteren Vermehrung ausgewählt. Interessanterweise gab es deutliche Unterschiede in der Signaldichte zwischen den beiden Fusionsproteinen. Das kleinere Protein NtHxk1N::GFP ergab das für Mitochondrien zu erwartende Bild mit vielen kleinen distinkten Signalen innerhalb der Zelle, teilweise waren größere Ansammlungen zu sehen (s. Abb. 17). Färbung mit „MitoTracker CM-H₂TMRos“ bestätigte, dass es sich dabei um Mitochondrien handelte. Die Fusion der gesamten Hexokinase mit GFP zeigte neben vereinzelt kleinen Signalen auch GFP-Markierungen, die der Größe eines Chloroplasten oder sogar eines Zellkerns entsprachen (s. Abb. 18). Auch für diese wurde durch „MitoTracker CM-H₂TMRos“ ein mitochondrialer Ursprung nachgewiesen.

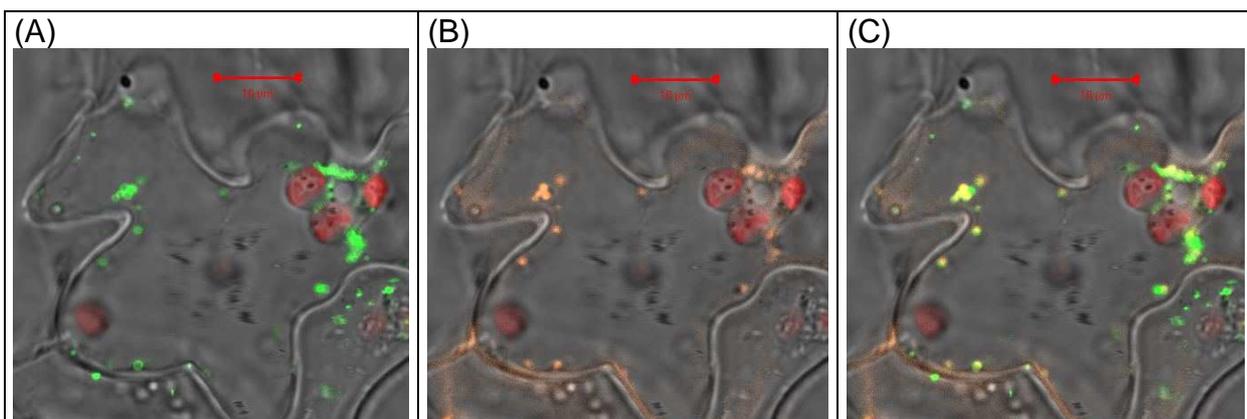


Abbildung 17: Verteilung von NtHxk1N::GFP innerhalb einer transgenen Epidermiszelle der Linie 5.

(A) Nachweis von GFP, (B) Nachweis von Mitochondrien durch den Farbstoff „MitoTracker CM-H₂TMRos“, (C) Überlagerung beider Signale. Chloroplasten sind rot gefärbt. CLSM-Aufnahmen, der Größenmaßstab entspricht 10 µm.

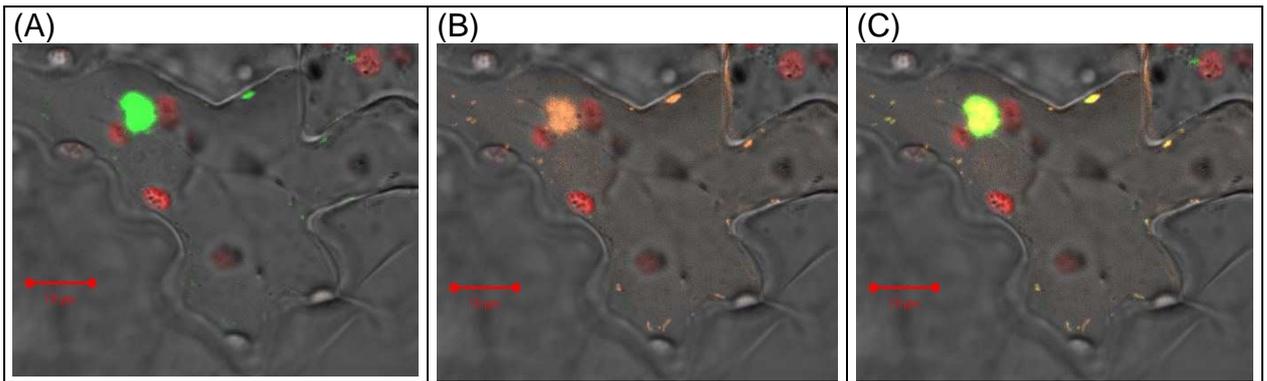


Abbildung 18: Verteilung von NtHxk1::GFP innerhalb einer transgenen Epidermiszelle der Linie 1.

(A) Nachweis von GFP, (B) Nachweis von Mitochondrien durch den Farbstoff „MitoTracker CM-H₂TMRos“, (C) Überlagerung beider Signale. Chloroplasten sind rot gefärbt. CLSM-Aufnahmen, der Größenmaßstab entspricht 10 µm.

Zur genaueren Betrachtung dieser bislang unbekanntes Mitochondrien-Konglomerate wurden Ultradünnschnitte angefertigt und im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht. Diese Untersuchungen bestätigten, dass es sich bei den großen Organellen tatsächlich um Mitochondrien-Ansammlungen, teilweise zusammen mit Peroxisomen, handelte. Die Mitochondrien konnten durch Antikörper gegen NtHxk1/1a oder gegen GFP markiert werden. Sie waren entweder geordnet in Stapeln oder Ringen angeordnet, oder chaotisch miteinander verbunden, auch Zwischenstufen existierten (s. Abb. 19, Abschnitt 3.5).

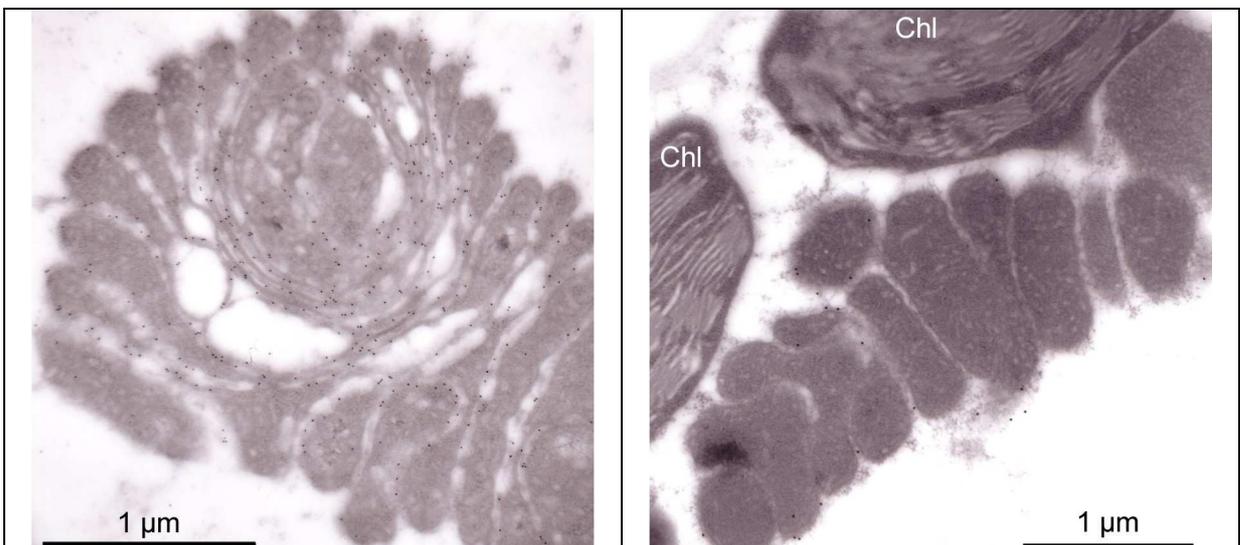


Abbildung 19: Immunogoldmarkierung von NtHxk1::GFP mit polyklonalem Antikörper gegen NtHxk1/1a und Gold-konjugiertem Protein A (10 nm). TEM-Aufnahmen von Mitochondrien in NtHxk1::GFP exprimierenden Mesophyllzellen der Linie 1, Chl: Chloroplasten. HM20-Einbettung, angefertigt von Dr. Twan Rutten, IPK Gatersleben.

Die Mitochondrien-Konglomerate traten nicht bei Überexpression von NtHxk1 alleine auf, wie Abbildung 20 zeigt.

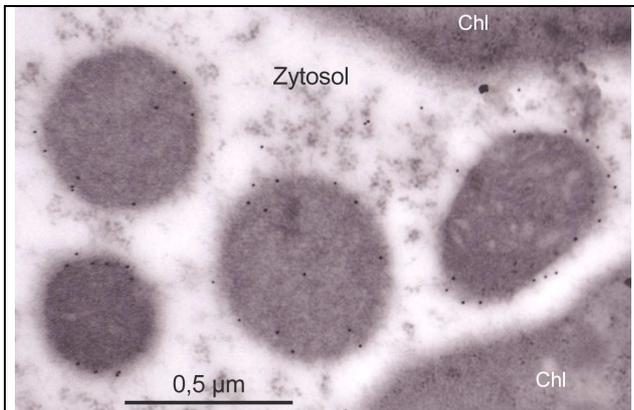


Abbildung 20: Immunogoldmarkierung von NtHxk1 mit polyklonalem Antikörper gegen NtHxk1/1a und Gold-konjugiertem Protein A (10 nm). TEM-Aufnahme von Mitochondrien in NtHxk1 überexprimierenden Mesophyllzellen der Linie 1. Chl: Chloroplasten. HM20-Einbettung, angefertigt von Dr. Twan Rutten, IPK Gatersleben.

Die bevorzugte Immunogoldmarkierung der äußeren Mitochondrien-Bereiche ist ein Hinweis, dass NtHxk1 als zytosolisches Protein in der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist.

3.4.4 NtHxk3 ist mit Mitochondrien assoziiert

Die Überexpression von NtHxk3::GFP führte zu der gleichen Markierung und Verteilung von einzelnen Mitochondrien und Konglomeraten, die schon bei NtHxk1::GFP zu sehen war (Abb. 21). Als positiv wurden die Linien 1, 7, 15, 19, 23, 33 und 41 identifiziert. Auch hier konnten im TEM Mitochondrien-Konglomerate beobachtet werden (Abb. 22). Somit ist auch für NtHxk3 eine Lokalisierung an der äußeren Mitochondrienmembran anzunehmen.

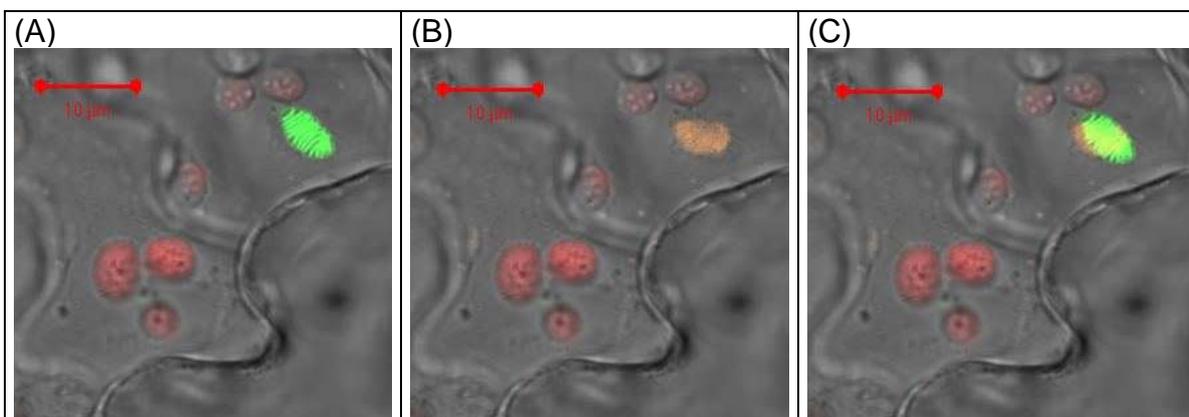


Abbildung 21: Verteilung von NtHxk3::GFP innerhalb einer transgenen Epidermiszelle der Linie 33.

(A) Nachweis von GFP, (B) Nachweis von Mitochondrien durch den Farbstoff „MitoTracker CM-H₂TMRos“, (C) Überlagerung beider Signale. Chloroplasten sind rot gefärbt. CLSM-Aufnahmen der, Größenmaßstab entspricht 10 µm. Die nicht vollständige Deckung von Farbstoff- und GFP-Signalen ist auf eine dejustierte Mikroskop-Optik zurückzuführen.

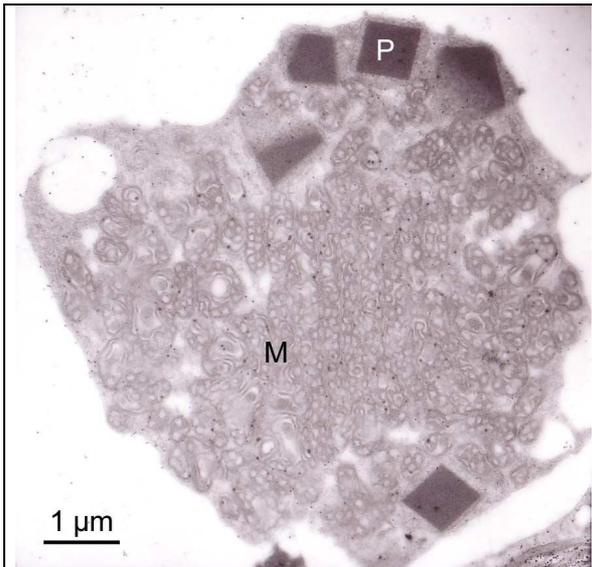


Abbildung 22: TEM-Aufnahme eines Konglomerats von Mitochondrien (M) und Peroxisomen (P) in NtHxk3::GFP exprimierender Mesophyllzelle der Linie 33. Bei den vereinzelt sichtbaren Punkten handelt es sich nicht um markierte Antikörper, sondern um Artefakte der Spurr-Einbettung. Angefertigt von Dr. Twan Rutten, IPK Gatersleben.

3.4.5 NtHxk4a ist mit Mitochondrien assoziiert

Durch Northern-Analyse positiv identifizierte Linien mit NtHxk4a::GFP zeigten auch in der T1-Generation keine GFP-Signale im CLSM. Deshalb wurde NtHxk4aN::GFP zur transienten Transformation mittels Biolistik verwendet. Anders als bei NtHxk1N::GFP überwogen hierbei große Mitochondrien-Konglomerate (s. Abb. 23).

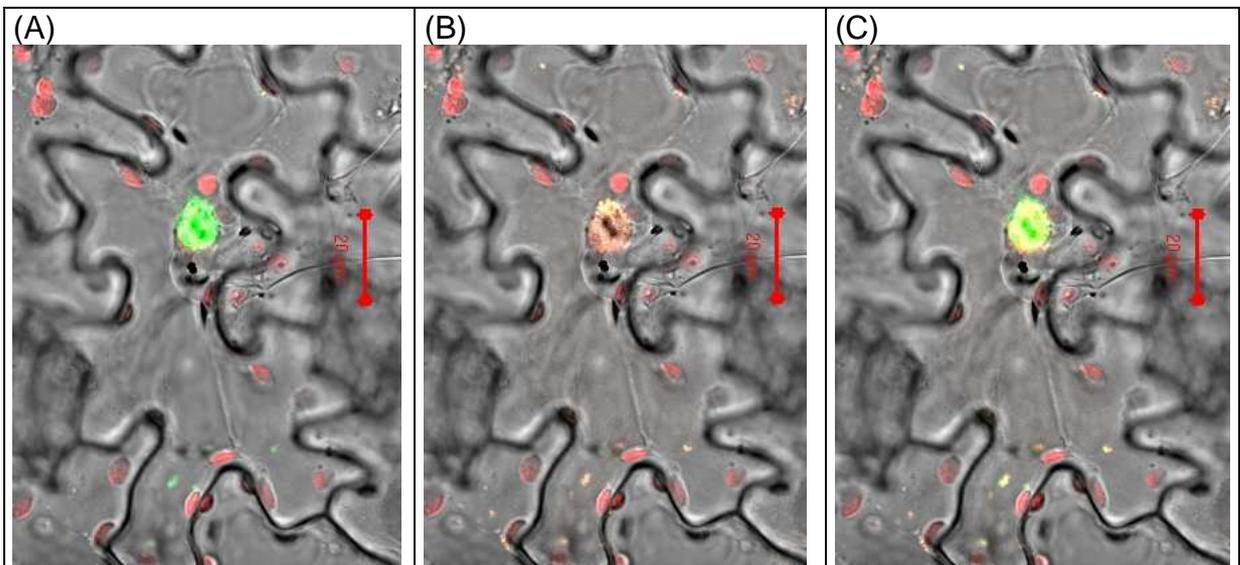


Abbildung 23: Verteilung von NtHxk4aN::GFP innerhalb einer Epidermiszelle nach biolistischer Transformation. (A) Nachweis von GFP, (B) Nachweis von Mitochondrien durch den Farbstoff „MitoTracker CM-H₂TMRos“, (C) Überlagerung beider Signale. Chloroplasten sind rot gefärbt. CLSM-Aufnahmen, der Größenmaßstab entspricht 20 µm.

3.4.6 NtHxk5 ist vermutlich mit Mitochondrien assoziiert

Für NtHxk5::GFP konnten nur sehr schwache Fluoreszenzsignale im CLSM beobachtet werden. Als positiv wurden lediglich die Linien 8, 38 und 39 identifiziert. Die gleichzeitige Verwendung des Mitochondrien-Farbstoffs gelang nicht in GFP-positiven Zellen. Auch bei diesem Konstrukt waren teilweise Konglomerate GFP-markierter Organellen zu sehen. Deren Struktur deutete darauf hin, dass es sich dabei um die bereits beschriebenen Mitochondrien handelte (s. Abb. 24).

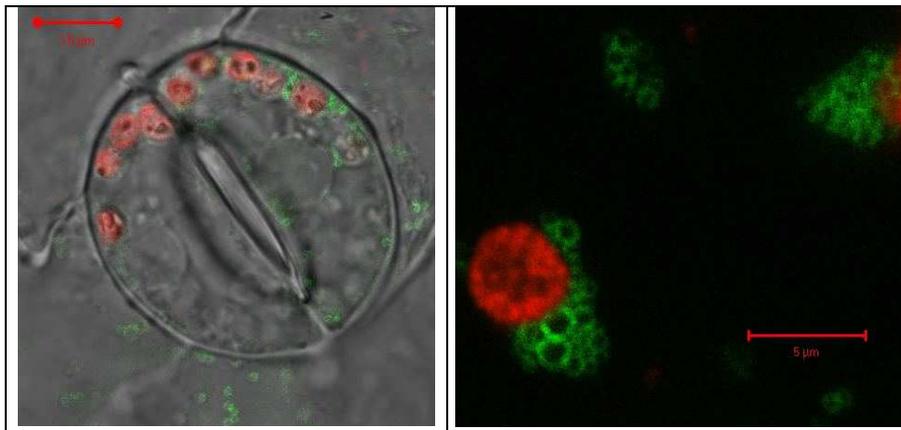


Abbildung 24: Verteilung von NtHxk5::GFP innerhalb transgener Epidermiszellen der Linie 38. Chloroplasten sind rot gefärbt. CLSM-Aufnahmen, der Größenmaßstab links entspricht 10 µm, rechts 5 µm.

3.4.7 NtHxk6 ist vermutlich mit Mitochondrien assoziiert

Auch für NtHxk6::GFP konnten nur sehr schwache Fluoreszenzsignale im CLSM beobachtet werden. Beim ersten Durchmustern wurde lediglich Linie 3 als positiv identifiziert. Daher wurde von allen Pflanzen RNA präpariert und in einer Northern-Analyse mit einer Sonde für *NtHxk6* hybridisiert (s. Abb. 25). Die dabei als positiv identifizierten Linien 2, 3, 15, 16, 21 und 27 wurden in der T1-Generation erneut analysiert. Interessanterweise zeigten diese positiven Pflanzen einen Phänotyp, der sich in bleicheren *Sink*-Bereichen nicht ausgewachsener Blätter äußerte und auch in Pflanzen auftrat, die NtHxk6 überexprimierten (s. 3.8.3.1).

W	1	2	3		5				10				15	16			20	21			25		27
		*	*										*	*				*					*

Abbildung 25: Northern-Analyse von NtHxk6::GFP Pflanzen mit einer Sonde für *NtHxk6*. Jeweils 50 µg RNA aus *Source*-Blatt Lamina wurden aufgetragen. Mit Sternchen versehene Nummern bezeichnen die für die Vermehrung ausgewählten positiven Linien.

Wie schon bei NtHxk5::GFP beobachtet, misslang auch bei NtHxk6::GFP die Markierung der Mitochondrien durch „MitoTracker CM-H₂TMRos“ in GFP-positiven Zellen. Zwar konnten kleinere Zusammenlagerungen GFP-markierter Organellen mit den typischen Strukturen beobachtet werden, große Konglomerate waren jedoch nicht zu sehen (s. Abb. 26). Es ist anzunehmen, dass NtHxk6 wie auch ihr Homolog At50460 aus *Arabidopsis thaliana* in der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist (Giegé *et al.*, 2003).

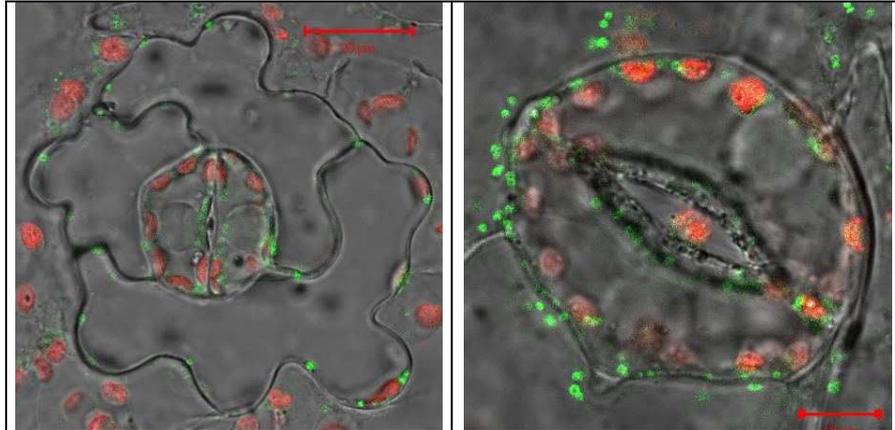


Abbildung 26: Verteilung von NtHxk6::GFP innerhalb transgener Epidermiszellen, links Linie 2, rechts Linie 3. Chloroplasten sind rot gefärbt. CLSM-Aufnahmen, die Größenmaßstäbe entsprechen 10 µm.

3.4.8 NtHxk7 ist mit Mitochondrien assoziiert

Das Verteilungsmuster von NtHxk7N::GFP entsprach demjenigen von NtHxk1N::GFP und wird daher nicht gesondert gezeigt. Als positiv wurden die Linien 2, 6, 13, 16, 24 und 27 identifiziert.

3.4.9 Nachweis von NtHxk2 im Chloroplastenstroma

NtHxk2::GFP und NtHxk2N::GFP waren in Pflanzen der T₀-Generation auch durch hohe Verstärkung des Signals nicht eindeutig zu sehen. Zur Auswahl positiver Pflanzen wurden daher Northern- und Western-Analysen durchgeführt. 17 von 51 T₀-Pflanzen von NtHxk2::GFP wurden in einer an alkalische Phosphatase gekoppelten Western-Analyse als positiv erkannt. Aufgrund starker Hintergrundsignale bei der Entwicklung der Western-Membran war die Interpretation unsicher und es wurde eine weitere Analyse mit diesen Pflanzen durchgeführt. Die Entwicklung mittels Chemolumineszenz erwies sich als spezifischer und erlaubte die sicherere Diagnose. Die positiv identifizierten Linien 1, 4, 11, 18, 19, 37, 39 wurden weiter vermehrt (s. Abb. 27).

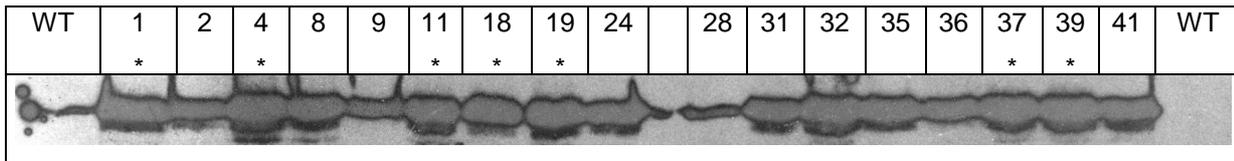


Abbildung 27: Western-Analyse von NtHxk2::GFP Pflanzen mit polyklonalem Antikörper gegen Aminosäuren 1-231 von NtHxk2. Detektion des Antikörpers mit Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum aus Ziege mit gekoppelter Peroxidase, Entwicklung mittels Chemolumineszenz. Mit Sternchen versehene Nummern bezeichnen die für die Vermehrung ausgewählten positiven Linien. Aufgetragen wurde Gesamtprotein entsprechend ca. 0,3 cm² *Source*-Blatt Lamina.

NtHxk2N::GFP Pflanzen wurden mittels Northern-Analyse mit den fusionierten Genen als Sonde durchmustert. Die positiven Linien 12, 14, 17, 18, 21 und 27 wurden für weitere Analysen vermehrt (s. Abb. 28).

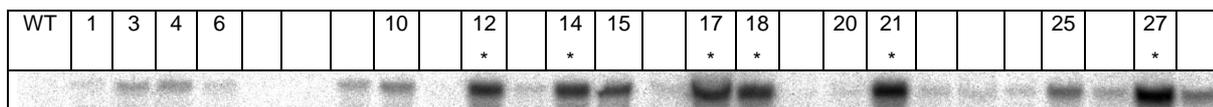


Abbildung 28: Northern-Analyse von NtHxk2N::GFP Pflanzen mit einer Sonde des Fusionsgens. Jeweils 20 µg RNA aus *Source*-Blatt Lamina wurden aufgetragen. Mit Sternchen versehene Nummern bezeichnen die für die Vermehrung ausgewählten positiven Linien.

Nach Selbstung wurden Pflanzen der T1-Generation erneut am CLSM untersucht. In beiden Fällen konnte GFP-Fluoreszenz in Plastiden lediglich mit sehr hoher Verstärkung des Signals detektiert werden (s. Abb. 29).

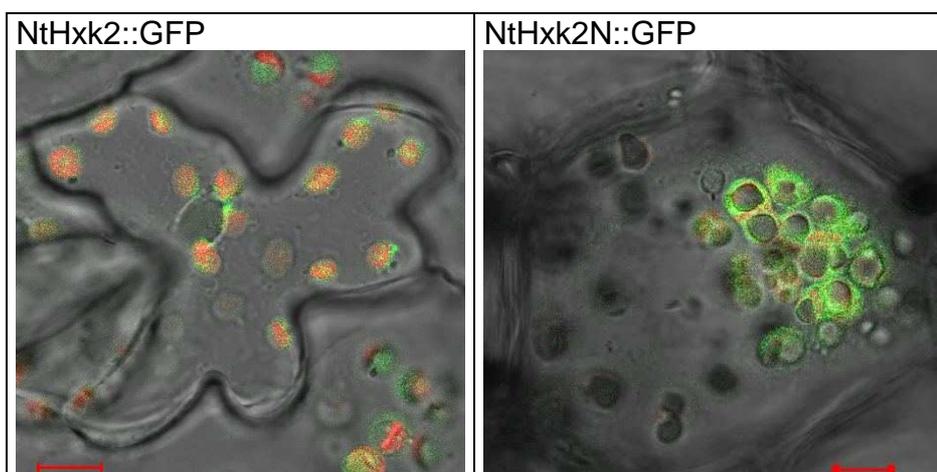


Abbildung 29: Verteilung von NtHxk2::GFP innerhalb einer transgenen Epidermiszelle von Linie 1, Verteilung von NtHxk2N::GFP innerhalb einer transgenen Zelle der Stärkescheide einer *Source*-Blatt Petiole von Linie 17. Chloroplasten sind rot gefärbt. CLSM-Aufnahmen, die Größenmaßstäbe entsprechen 10 µm.

Zwar wurden durch beide Fusionsproteine Chloroplasten markiert, jedoch war daraus nicht ersichtlich, in welchen Bereichen der Chloroplasten sich die Proteine genau befanden. Zur Klärung der genauen Lokalisierung von NtHxk2 wurden *in vitro* Chloroplastenimport-Experimente durchgeführt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Ralf Bernd Klösgen (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) wurden diese Arbeiten von Manuela Hoffmann durchgeführt (s. 2.10). Zur Verwendung kam der vollständige cDNA-Klon von *NtHxk2*, so wie er im Plasmid pBluescript SK- aus der Phagenbank isoliert worden war. Auch *NtHxk2N::GFP*, ebenfalls im Plasmid pBluescript SK-, wurde untersucht.

Beide *in vitro* translatierten Proteine wurden reproduzierbar in das Stroma intakter Spinat- und Erbsen-Chloroplasten importiert, wobei ein ca. 3 kDa großes Transitpeptid abgespalten wurde. Das reife NtHxk2-Protein besaß danach eine Größe von ca. 52 kDa, das reife *NtHxk2N::GFP* von ca. 31 kDa (s. Abb. 30).

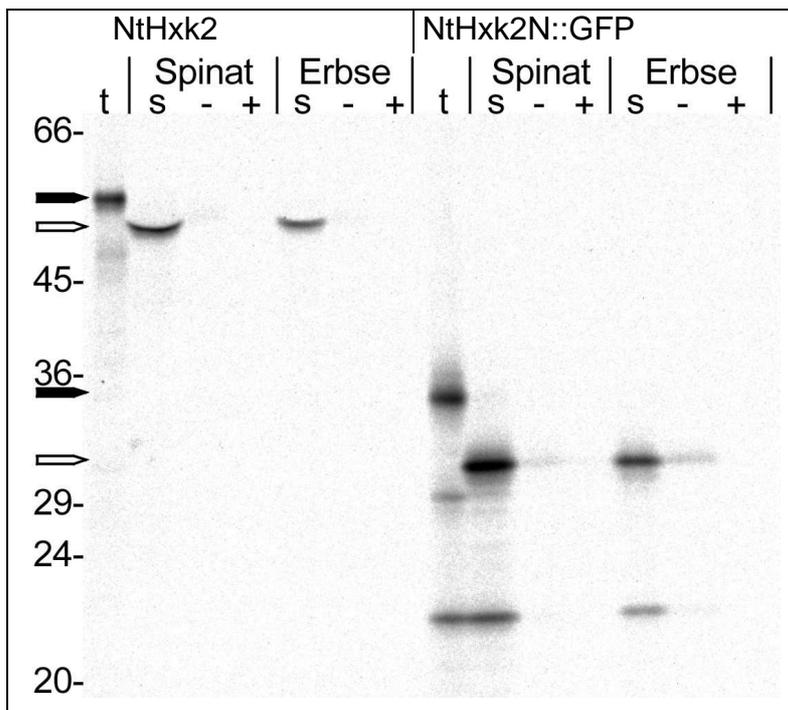


Abbildung 30: *In vitro* Translation und Transport ins Stroma intakter Chloroplasten von Spinat und Erbsen bei NtHxk2 und NtHxk2N::GFP. Am linken Rand ist der Größenstandard in kDa aufgetragen. Schwarze Pfeile zeigen auf die Vorläuferproteine, weiße Pfeile zeigen auf die ins Stroma transportierten reifen Proteine ohne prozessiertes Transitpeptid.

s: Stroma, t: Translationskontrolle, -: unbehandelte Thylakoide, +: mit Thermolysin behandelte Thylakoide. Angefertigt von Manuela Hoffmann, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

In einem hier nicht gezeigten Kontrollexperiment wurde sichergestellt, dass die verkürzten Proteine keine artifiziellen Abbauprodukte der Thermolysin-Behandlung waren. Nicht importierte NtHxk2 wurde durch 50 µg/ml Thermolysin nahezu vollständig abgebaut, NtHxk2N::GFP durch 100 µg/ml. Keines der Abbauprodukte hatte die gleiche Größe wie die importierten reifen Proteine. Bei dem eigentlichen Importexperiment wurde mit 180 µg/ml Thermolysin deutlich mehr eingesetzt, so dass davon auszugehen ist, dass nicht importierte Proteine vollständig abgebaut wurden.

Kodon 66 von NtHxk2 diene bei beiden Experimenten in geringem Ausmaß als alternativer Translationsstart. Dementsprechend sind bei beiden aufgetragenen Translationskontrollen geringe Mengen der um 5 kDa kleineren Proteine zu sehen. Von *NtHxk2N::GFP* wurde außerdem ein 22 kDa großes Protein translatiert und ins Stroma transportiert. Die Identität dieses Proteins ist unbekannt, allerdings ist es häufig bei *in vitro* Importexperimenten mit GFP-Fusionen zu beobachten (Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen, persönliche Mitteilung).

3.4.10 Auch StHxkRP1 aus Kartoffel ist ein plastidäres Enzym

Aus Kartoffel ist das NtHxk2-Homolog StHxkRP1 (Hexokinase Related Protein 1) bekannt; die Aminosäure-Identität beider beträgt 92 %. In ihrer Dissertation untersuchte Anika Wiese eine GFP-Fusion von StHxkRP1 durch biolistischer Transformation von Zwiebel-Epidermiszellen (Wiese, 2000). Die dabei punktuell markierten Organellen konnten nicht eindeutig identifiziert werden, lediglich Mitochondrien wurden durch spezifische Färbung ausgeschlossen. Das gleiche Verteilungsmuster wurde für die GFP-Fusion der homologen Hexokinase SoHxk2 aus Spinat beobachtet. Aufgrund der hohen Homologie von NtHxk2 und StHxkRP1 ist die gleiche Lokalisierung innerhalb der Zelle anzunehmen. Zur Überprüfung wurde StHxkRP1 mit den Primern HK10A_BamHI_5 / HK10(a)fGFP_XbaI_3 amplifiziert und über BamHI / XbaI in den Vektor pFF19-GFP ligiert (s. Abb. 31).

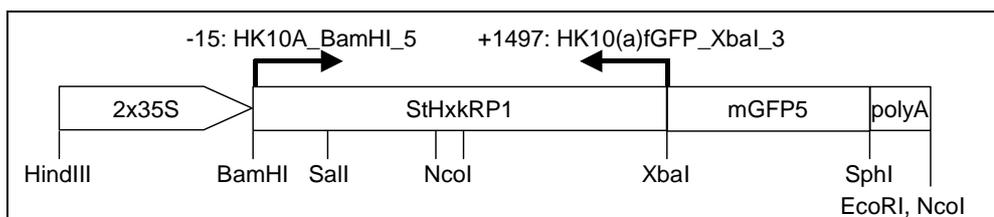


Abbildung 31: Maßstabgetreue Schemazeichnung von *StHxkRP1::GFP* im Plasmid pFF19-GFP. Mit Richtungspfeilen angegeben sind die verwendeten Primer samt Positionsangaben in Relation zum Translationsstart (s. Anhang, I.1). Außerdem eingezeichnet sind einige interne Schnittstellen der Konstrukte.

Nach biolistischer Transformation von Blattscheiben aus Tabak waren sowohl punktuelle, als auch Plastiden ausfüllende GFP-Signale zu sehen (s. Abb. 32). Es ist davon auszugehen, dass die punktuellen Ansammlungen, die auch von Anika Wiese beobachtet wurden, artifizieller Natur sind.

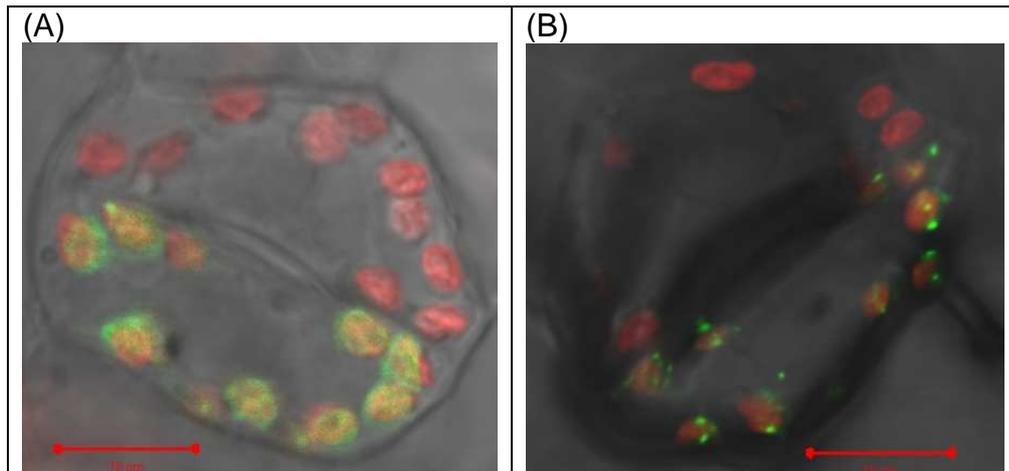


Abbildung 32: Unterschiedliche Verteilungsmuster des Fusionsproteins StHxkRP1::GFP in biolistisch transformierten Tabak-Epidermiszellen. (A) Verteilung innerhalb der Plastiden; nicht passgenaue Deckung von grünem GFP und rotem Chlorophyll ist auf eine dejustierte Optik zurückzuführen. (B) Punktuelle Anhäufung an der äußeren Plastidenmembran. Chloroplasten sind rot gefärbt. CLSM-Aufnahmen, die Größenmaßstäbe entsprechen 10 µm.

3.5 Untersuchungen zu den Mitochondrien-Konglomeraten

Bei allen untersuchten Fusionsproteinen von mitochondrial gebundenen Hexokinase-GFP-Fusionen fiel die Zusammenballung dieser Organellen auf. Besonders stark ausgeprägt war sie bei NtHxk1::GFP, NtHxk3::GFP und dem biolistisch transient transformierten NtHxk4aN::GFP, bei denen Durchmesser der Konglomerate von 10 µm erreicht wurden (s. 3.4). Auch durch Agrobakterien-Infiltration mit NtHxk1::GFP transformierte Tabakpflanzen zeigten dieses Phänomen. Die Mitochondrien-Konglomerate lagen entweder geordnet oder ungeordnet in großen Knäueln vor. Häufig waren ringförmige Mitochondrien zu sehen (s. Abb. 33), im CLSM beobachtete Konglomerate zeigten häufig globuläre Strukturen. Die verschiedenen Strukturen konnten gemeinsam innerhalb einer einzigen Zelle vorliegen und auch gemischte Strukturen waren zu beobachten. Dieser Effekt von GFP-Fusionsproteinen war bislang nicht in der Literatur beschrieben worden und die genaue Ursache ist unklar. Es sollte untersucht werden, ob der Effekt GFP-spezifisch ist, oder ob er auch durch andere Fusionspartner, z.B. GUS, hervorgerufen wird.

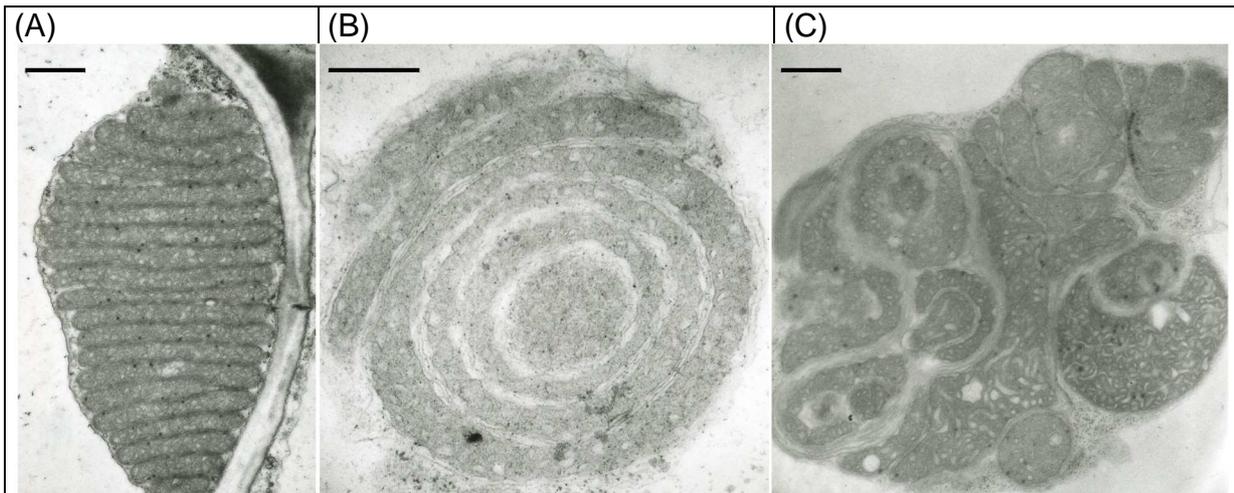


Abbildung 33: Unterschiedliche Strukturen von Tabak-Mitochondrien, hervorgerufen durch NtHxk1::GFP.

(A) Münzstapel-Struktur, Größenmaßstab 1 µm, (B) ringförmige Mitochondrien, entspricht womöglich dem Münzstapel von oben betrachtet, Größenmaßstab 0,5 µm, (C) gemischte Struktur, Größenmaßstab 1 µm. (A) und (C) HM20 Einbettung, (B) Spurr. Angefertigt von Dr. Twan Rutten, IPK Gatersleben.

3.5.1 Herstellung weiterer Fusionsproteine von NtHxk1 und NtHxk1N mit GFP und GUS

Bei den zuerst untersuchten Proben von NtHxk1::GFP und NtHxk1N::GFP war die Bildung der Strukturen bei NtHxk1::GFP wesentlich stärker ausgeprägt als bei dem kleineren Fusionsprotein NtHxk1N::GFP. Daher war die erste Annahme, dass das Ausmaß der Zusammenballung von der Größe des Proteins abhängt. Zur Überprüfung wurden NtHxk1 und NtHxk1N mit GUS, GUS::GFP und GFP::GUS fusioniert und in Tabak transformiert. Dazu wurden, analog zum Vektor pBinGFP (s. 3.4.1.2), geeignete binäre Vektoren auf Basis des pBin19-Rückgrats erstellt (Bevan, 1984) erstellt.

3.5.1.1 Konstruktion der binären Vektoren pBinGFP-GUS, pBinGUS-GFP und pBinGUS

Mit den Primern GUS-SalI_5 / NOS-HindIII_3 wurde aus dem Vektor pCAMBIA 1303 die zusammenhängende Sequenz aus GUS, GFP, His-Tag und nos-Terminator amplifiziert. Diese wurde über SalI / HindIII in den binären Vektor pBinAR ligiert, wobei dessen ocs-Terminator gegen nos ausgetauscht wurde. Die Multiple Klonierungsregion wurde um eine SpeI-Schnittstelle erweitert (s. Abb. 34). Dieser Vektor wurde pBinGUS-GFP genannt.

Analog dazu wurde mit den Primern GFP-Sall / NOS-HindIII_3 aus dem Vektor pCAMBIA 1304 die Sequenz aus GFP, GUS, His-Tag und nos-Terminator in pBinAR übertragen, wodurch pBinGFP-GUS entstand (s. Abb. 34).

Mit den Primern GUS-Sall_5 / NOS-HindIII_3 wurde aus dem Vektor pCAMBIA 1304 die Sequenz aus GUS, His-Tag und nos-Terminator amplifiziert und in pBinAR übertragen, wodurch pBinGUS entstand (s. Abb. 34).

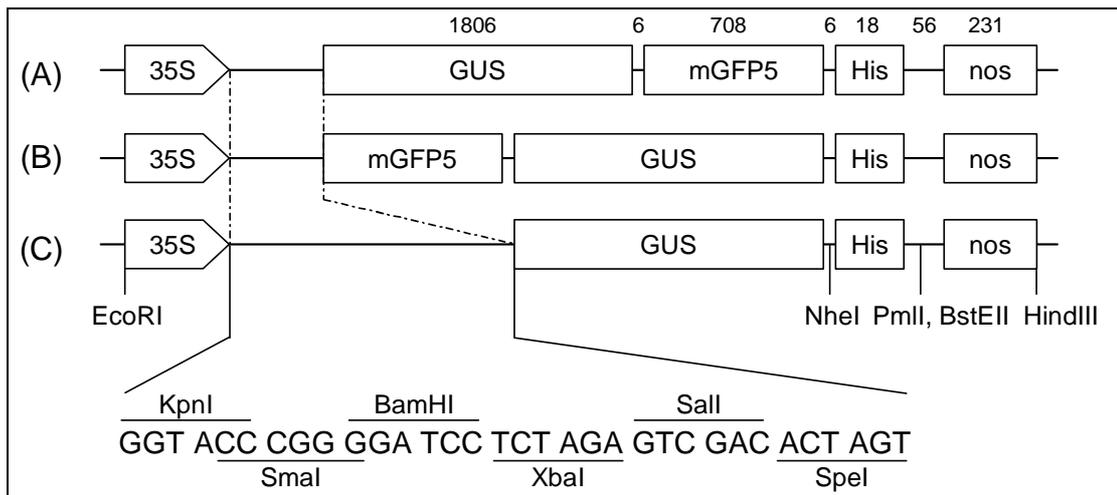


Abbildung 34: Schemazeichnungen der neu erstellten binären Fusionsvektoren

(A) pBinGUS-GFP, (B) pBinGFP-GUS, (C) pBinGUS. Die Sequenz der Multiplen Klonierungsregion ist in Triplets entsprechend dem Leseraster des Fusionsgens (ohne ATG) eingeteilt. Das Rückgrat des Vektors basiert auf pBin19 (Bevan, 1984).

3.5.2 Untersuchung der Fusionsprodukte in transgenen Tabakpflanzen

Nach stabiler Transformation von Tabak wurden durch histochemischen GUS-Nachweis (s. 2.9.4) mehrere stark positive Pflanzen identifiziert (s. Tab. 7).

Tabelle 7: Liste der positiv identifizierten Pflanzen mit NtHxk1(N)::GUS/GFP-Fusionen

Konstrukt	GUS-positive Linien
NtHxk1::GFP-GUS	1, 7, 14, 24, 31, 35, 36, 40, 41
NtHxk1::GUS-GFP	2, 7, 19, 20, 27, 28, 29, 31, 35, 39
NtHxk1::GUS	3, 6, 11, 21, 24, 31, 34, 45, 46, 55, 60
NtHxk1N::GFP-GUS	17, 25, 26, 27, 33, 37
NtHxk1N::GUS-GFP	3, 9, 12, 13
NtHxk1N::GUS	1, 4, 6, 7, 8, 10, 13, 18, 20, 30, 32, 37

Von jeweils vier Pflanzen wurde die untere Blattepidermis mit dem Mitochondrien-Farbstoff „MitoTracker CM-H₂TMRos“ behandelt, um Konglomerate zu identifizieren. Lediglich in denjenigen Proben mit NtHxk1::GUS-GFP waren Konglomerate zu sehen. Dieses Konstrukt war auch das einzige, das zu sichtbaren GFP-Signalen führte. Demnach ist die Größe des Fusionsproteins nicht das entscheidende Kriterium, wie auch die später durchgeführte transiente Transformation mit NtHxk4aN::GFP zeigte. Vielmehr scheint GFP, und zwar nur korrekt gefaltetes und aktives, der Verursacher zu sein. Ausmaß der Zusammenballung ist vermutlich von der Menge des Proteins abhängig, denn NtHxk4aN::GFP besaß aufgrund des doppelt vorhandenen CaMV 35S-*Enhancers* im pFF19-Vektor einen stärkeren Promotor als NtHxk1N::GFP und NtHxk7N::GFP.

3.5.3 Mitochondrien-Konglomerate bei *Arabidopsis thaliana*

Um zu überprüfen, ob der Effekt auch in anderen Pflanzen auftritt, wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Ökotyp C24) mit NtHxk1::GFP transformiert. Die positiven Linien 2, 3, 4, 6, 13, 16, 17, 18, 19 und 20 ließen sich sehr leicht aufgrund ihrer großen GFP-markierten Mitochondrien-Konglomerate im Fluoreszenzmikroskop identifizieren. Auch im Elektronenmikroskop wurden die großen Strukturen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Demnach ist der Effekt nicht auf Tabak beschränkt.

3.6 Vorkommen der verschiedenen Hexokinase-Isoformen in unterschiedlichen Geweben

Als ein Grund für die Vielzahl von Hexokinase-Isoformen kann eine unterschiedliche Gewebespezifität vermutet werden. Das wurde für pflanzliche Hexokinasen bislang kaum untersucht, da in der Regel nur verschiedene Isoformen eines Gewebes isoliert und charakterisiert wurden. Northern-Analysen einzelner Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* (Jang *et al.*, 1997) und Tomate (Menu *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2002) zeigten gewebespezifische Unterschiede zwischen diesen auf, allerdings beschränkten sich diese Analysen auf nur wenige Gewebe.

Aktivitätsmessungen in insgesamt 18 Geweben sollten ein genaueres Bild der Verteilung pflanzlicher Hexokinase- und Fruktokinase-Aktivität geben. Durch Northern-Analyse sollte der Anteil der einzelnen Isoformen an diesen Aktivitäten aufgeklärt werden.

3.6.1 Hexokinase-Aktivität in verschiedenen Geweben von Tabak

Glukose und Fruktose phosphorylierende Aktivität wurde in 18 verschiedenen Geweben von Tabakpflanzen gemessen. Die Proben wurden gegen 17 Uhr genommen. Gewebe unterhalb der Blüte stammte aus etwa acht Wochen alten Pflanzen. Blütengewebe wurde aus reifen Blüten, ca. einen Tag vor Blütenentfaltung entnommen, und aus jungen Blüten, bei denen sich die Knospen gerade öffneten. Die verwendeten Keimlinge waren acht Tage lang steril auf MS-Medium gewachsen. Über die Tage 4-7,5 waren sie verdunkelt worden, weshalb bei ihnen das Hypokotyl einen größeren Anteil ausmachte als bei normalem Tag/Nacht-Rhythmus (Jang *et al.*, 1997). Als Substrate wurden 5 mM Glukose bzw. Fruktose mit 4 mM ATP verwendet. Als Puffer diente 100 mM Tricin pH 8,4.

Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abb. 35 zu sehen. Geringste Aktivitäten wurden in der Lamina ausgewachsener *Source*-Blätter und in reifen Fruchtknoten gemessen. Höchste Aktivität war in reifen Staubbeutel und im Stängel festzustellen. In Wurzelspitzen, *Sink*-Blättern und reifen Staubbeutel war die Phosphorylierung von Fruktose deutlich stärker als die von Glukose. Im Blütenboden und in Griffel mit Narbe wurde Glukose stärker umgesetzt, in den anderen Geweben war es ausgeglichen.

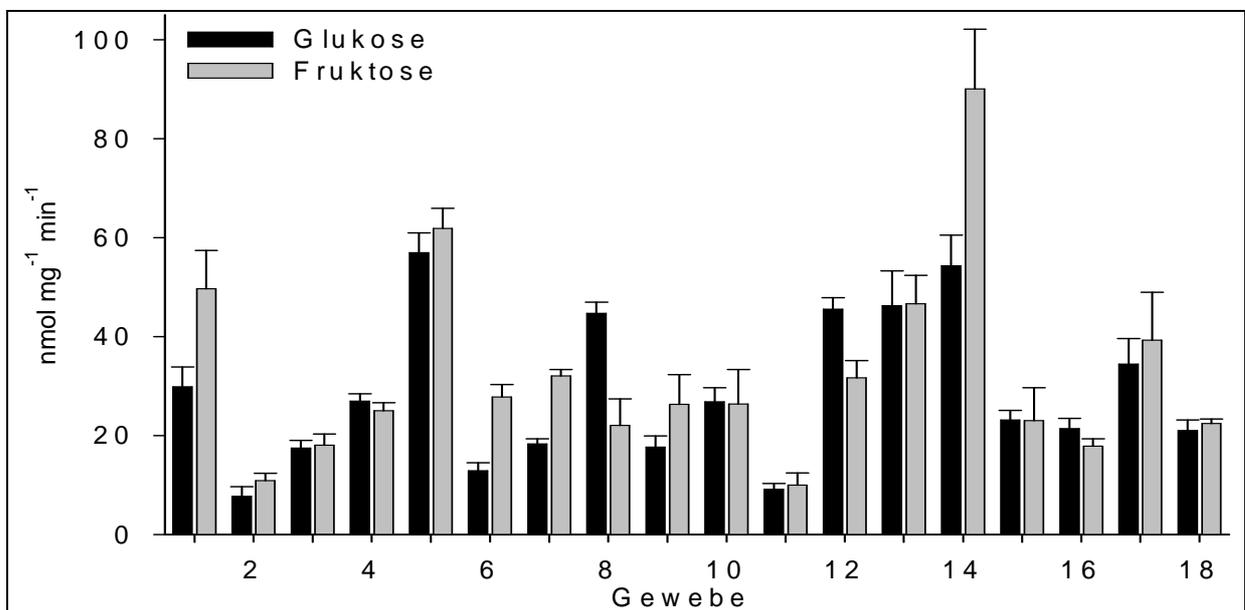


Abbildung 35: Phosphorylierung von 5 mM Glukose (schwarz) und 5 mM Fruktose (grau) in verschiedenen Geweben von Tabak.

1: Wurzelspitze (ca. 1 cm), 2: *Source*-Blatt Lamina, 3: *Source*-Blatt Mittelrippe, 4: *Source*-Blatt Vene 2. Ordnung, 5: Stängel, 6: *Sink*-Blatt Lamina, 7: *Sink*-Blatt Mittelrippe, 8: Blütenboden, 9: Kelchblatt, 10: Blütenblatt, 11: reifer Fruchtknoten, 12: Griffel + Narbe, 13: Filament, 14: reifer Staubbeutel, 15: junges Blütenblatt, 16: junger Fruchtknoten + Griffel + Narbe, 17: junger Staubbeutel, 18: 8 Tage alter Keimling. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder, n=4.

3.6.2 Tabak-Hexokinasen werden differentiell exprimiert

Aus den gleichen Geweben wie in 3.6.1 wurde RNA isoliert, mit der Northern-Analysen durchgeführt wurden (s. Abb. 36). Als spezifische Sonden wurden die gleichen Bereiche im 3'-Bereich der Gene verwendet wie für die Southern-Analyse (s. 3.2).

NtHxk1 und *NtHxk7* ließen sich in der Northern-Analyse aufgrund ihrer hohen Homologie von 88 % im entsprechenden Bereich nicht unterscheiden. Die markierten Banden waren etwas diffuser als normalerweise bei Northern-Analysen beobachtet, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Transkriptgrößen von *NtHxk1* und *NtHxk7*. Die deutlich meisten Transkripte wurden in reifen Staubbeutel nachgewiesen, geringere Mengen in jungen Staubbeutel und in Wurzeln. Transkripte in anderen Geweben wurden nur sehr schwach markiert.

NtHxk3 wurde ebenfalls deutlich am stärksten in reifen Staubbeutel nachgewiesen. Die Transkriptmengen in diesem Gewebe unterschieden sich zwar auch sehr deutlich von denjenigen in anderen Geweben, aber nicht so stark ausgeprägt wie bei *NtHxk1* und *NtHxk7*.

NtHxk2 zeigte ein deutlich anderes Verteilungsmuster innerhalb der Pflanze. Transkripte konnten in allen Geweben bis auf *Source*-Blatt Lamina und reifen Staubbeutel nachgewiesen werden.

NtHxk4, *5* und *6* konnten mittels Northern-Analyse in keinem Gewebe von Tabakpflanzen nachgewiesen werden. *NtHxk4* und *NtHxk5* waren auch durch PCR von cDNA aus verschiedenen Geweben kaum nachzuweisen. *NtHxk6* dagegen konnte mittels PCR aus allen Geweben amplifiziert werden. Relativ gut gelang die Amplifikation von cDNA aus *Sink*-Blatt, eine verlässliche Quantifizierung der Mengen mit Ubiquitin oder Aktin als Standard misslang allerdings.

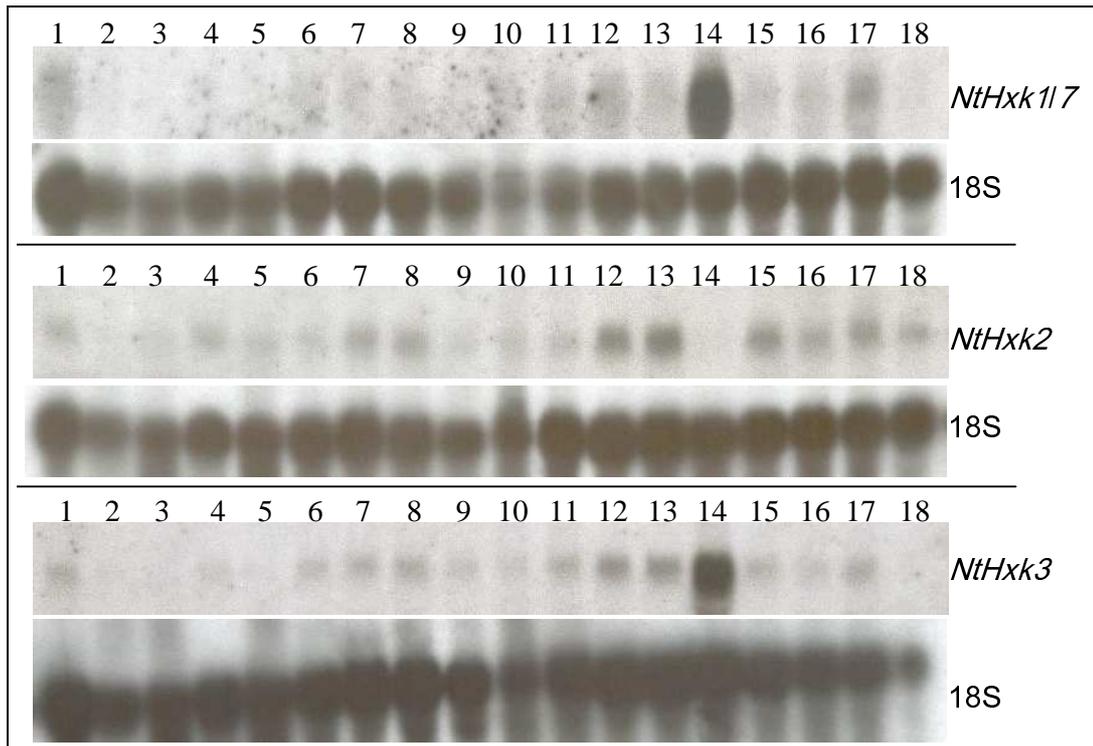


Abbildung 36: Northern-Hybridisierung von Hexokinase-mRNA in verschiedenen Geweben von Tabak. Es wurden jeweils 50 µg RNA aufgetragen. Als Mengenstandard wurde 18S rRNA markiert.

1: Wurzelspitze (ca. 1 cm), **2:** *Source*-Blatt Lamina, **3:** *Source*-Blatt Mittelrippe, **4:** *Source*-Blatt Vene 2. Ordnung, **5:** Stängel, **6:** *Sink*-Blatt Lamina, **7:** *Sink*-Blatt Mittelrippe, **8:** Blütenboden, **9:** Kelchblatt, **10:** Blütenblatt, **11:** reifer Fruchtknoten, **12:** Griffel + Narbe, **13:** Filament, **14:** reifer Staubbeutel, **15:** junges Blütenblatt, **16:** junger Fruchtknoten + Griffel + Narbe, **17:** junger Staubbeutel, **18:** 8 Tage alter Keimling.

3.6.3 Induktion der Hexokinasen durch Glukose

Es gibt Hinweise, dass die Expression von Hexokinasen abhängig von der Glukosekonzentration reguliert wird. Die als Zuckersensor wirkende Hexokinase ScHxk2 der Bäckerhefe aktiviert ihre eigene Expression in Gegenwart von Glukose und reprimiert diejenige von ScHxk1 und der Glukokinase (Rodriguez *et al.*, 2001). *SoHxk1* aus Spinat wurde in einem differenziellen Vergleich revers transkribierter mRNA aus glukosegefütterten Spinatblättern mit entsprechenden Kontrollblättern isoliert (Wiese *et al.*, 1999). Die zur Isolierung der Tabak-Hexokinasen verwendete cDNA-Bank war aus Pflanzenmaterial erstellt worden, in dem durch Überexpression einer zytosolischen Pyrophosphatase große Mengen löslicher Zucker vorlagen (Sonnewald, 1992; Herbers *et al.*, 1995). Zur Klärung der Regulation durch Glukose wurden Blattscheiben von Wildtyp-Pflanzen 24 Stunden in Dunkelheit auf Wasser, 100 mM und 300 mM Glukose flotiert. Die daraus isolierte RNA wurde mit Sonden für die verschiedenen Hexokinase-Isoformen hybridisiert.

NtHxk4, *5* und *6* waren nicht nachweisbar, *NtHxk1/7*, *2* und *3* nach mehrtägiger Exposition im Phosphoimager schwach (s. Abb. 37). Transkripte von *NtHxk1/7* und *NtHxk3* akkumulierten durch Glukose-Fütterung, bei *NtHxk2* fiel die Akkumulation sehr gering aus.

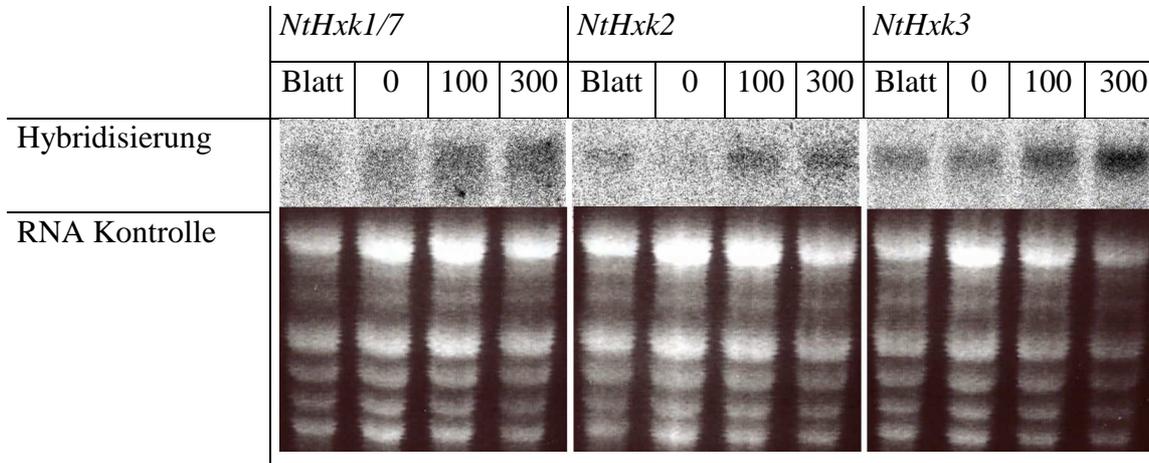


Abbildung 37: Induktion der Transkripte von *NtHxk1/7*, *2* und *3* durch 0 mM, 100 mM und 300 mM Glukose im *Source*-Blatt. Darunter ist die Ladekontrolle von je 40 µg RNA abgebildet.

3.7 Isolierung und Charakterisierung von Hexokinase-Promotoren

Zur weiteren Aufklärung der Gewebespezifität der Hexokinasen sollten deren Promotoren isoliert und charakterisiert werden. Besonderes Interesse bestand darin, von den sehr unterschiedlich exprimierten *NtHxk1* und *NtHxk2* funktionale Promotoren zu isolieren. *Nicotiana tabacum* ist eine allotetraploide Pflanze, die aus Vorfahren von *N. sylvestris* und vermutlich *N. tomentosiformis* entstanden ist (Murad *et al.*, 2002). Aufgrund der dabei veränderten Genomorganisation besteht bei *N. tabacum* eine höhere Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von Pseudogenen (Comai, 2000). Um die Wahrscheinlichkeit funktionale Promotoren zu isolieren zu erhöhen, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die sehr spezifische „Genome Walking“ Methode mit DNA aus *N. tabacum* durchgeführt (s. 2.6.8), zum anderen wurde eine genomische Phagenbibliothek aus *N. sylvestris* nach 5'-Bereichen von Hexokinase-Genen durchmustert. Die in Abschnitt 3.2 dargestellten Southern-Analysen belegen die Anwesenheit nah verwandter Gene in *N. sylvestris*.

3.7.1 Durchmusterung einer genomischen Phagenbibliothek von *N. sylvestris*, Isolierung von *PNsHxk4*

Durch HincII-Verdau wurde aus *NtHxk1* cDNA eine Sonde gewonnen, welche die ersten 611 Nukleotide der cDNA umfasste. Von *NtHxk2* wurden die Nukleotide -46 bis +530 amplifiziert (Primer S7, HK10_5Sonde3'). Mit beiden Fragmenten als Sonde wurde eine genomische Phagenbibliothek (pBKCMV Zap Express, Stratagene) von *N. sylvestris* durchmustert.

Es wurden 11 Klone isoliert, die vier verschiedenen Hexokinase-Genen zugeordnet werden konnten und Homologie zu den bekannten Isoformen aus *N. tabacum* zeigten (s. Tab. 8).

Tabelle 8: Übersicht der isolierten genomischen Klone aus *Nicotiana sylvestris*

Klon	Gesamtgröße	Identität im Bereich des homologen ORF	Name, Akzession
7/8/25/36	4555 bp	99,7 %: <i>NtHxk1a</i> -146-1152	<i>NsHxk1</i> , AY664406
21/22/51	3566 bp	96,7 %: <i>NtHxk2</i> 284-1442	<i>NsHxk2</i> , AY664407
3	4260 bp	92,9 %: <i>NtHxk3</i> 1-1494	<i>NsHxk3</i> , AY664408
4	4333 bp	99,8 %: <i>NtHxk7</i> -118-1068	<i>NsHxk4</i> , AY664409

Durch Vergleich der genomischen Sequenzen mit den entsprechenden Leserahmen von *N. tabacum* konnten Exons und Introns identifiziert werden (s. Abb. 38). Der vollständig isolierte Leserahmen von *NsHxk3* besteht aus neun Exons. Diese Struktur erscheint bei Hexokinase-Genen weitgehend konserviert zu sein (Olsson *et al.*, 2003). Abweichungen davon gibt es bei *AtHxk1*, wo Exons 5 und 6, sowie 8 und 9 nicht durch Introns getrennt sind, und bei *At4g37840*, wo Exons 3 und 4 direkt verbunden sind.

NsHxk1 und *NtHxk1a*, sowie *NsHxk4* und *NtHxk7* fallen durch sehr hohe Homologien von mehr als 99 % auf (s. Tab. 8). Diese Homologie erstreckt sich auch über die 5' UTRs. Es ist daher davon auszugehen, dass die entsprechenden Gene identisch sind.

NsHxk4 besaß mit 950 Nukleotiden 5' des Translationsstarts als einziger Klon einen für einen Promotor ausreichend großen Bereich.

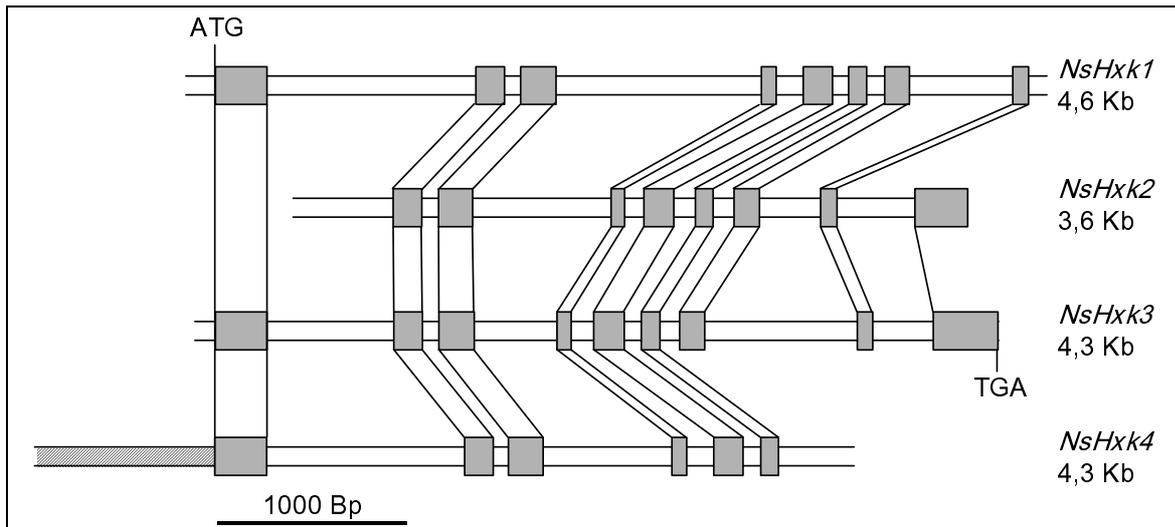


Abbildung 38: Struktur der isolierten Hexokinase-Gene von *N. sylvestris*. Innerhalb der Gene sind potentiell kodierende Bereiche grau hervorgehoben. Homologe Exons sind durch Linien vertikal miteinander verbunden. Der Promotorbereich von *NsHxk4* ist durch Schraffur markiert.

3.7.2 Isolierung von *PNtHxk1* und *PNtHxk2* durch „Genome Walking“

Bei der „Genome Walking“-Methode wird genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen zerschnitten. An die glatten 5'-Enden werden DNA-Adaptoren bekannter Sequenz ligiert. Der Bereich zwischen diesen und bereits bekannter Sequenz des Zielgens kann dann durch PCR amplifiziert werden.

Nach PCR mit den Primern GWHK9_3 und GWHK9_NEST3 wurde, ausgehend von PvuII geschnittener DNA, ein Fragment amplifiziert, welches 1406 bp 5' des Translationsstarts von *NtHxk1* enthielt (Akz. AY664411).

Mit den Primern GWHK10_3 und GWHK10_NEST3 wurde aus EcoRV geschnittener DNA eine Sequenz amplifiziert, die 924 bp 5' des Translationsstarts von *NtHxk2* beinhaltet (Akz. AY664412).

3.7.3 Sequenzanalyse der Hexokinase-Promotoren

Die Aktivität eines Promotors wird durch Interaktion von cis- und trans-Elementen reguliert. Durch Deletionen und Mutationen wurden viele regulative cis-Elemente identifiziert und veröffentlicht. Diese bestehen typischerweise aus kurzen DNA-Sequenzen von ca. 4-20 Nukleotiden Länge. Die Datenbank PLACE erlaubt die Suche nach bekannten cis-Elementen innerhalb eines Promotors (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>; Higo *et al.*, 1999). Dadurch

können Hinweise gewonnen werden, wodurch die Transkription der Hexokinasen reguliert wird.

3.7.3.1 Sequenzanalyse des *NtHxk1*-Promotors

Im *NtHxk1*-Promotor wurden cis-Elemente gefunden, die für Regulation durch Zucker und Gibberellin (GA), sowie für pollenspezifische Expression verantwortlich sein könnten (s. Tab. 9).

Tabelle 9: Auflistung potentiell regulatorischer cis-Elemente im *NtHxk1*-Promotor (Akz. AY664411). Die angegebenen Positionen entsprechen der maximalen Entfernung vom Translationsstartpunkt. Mit Sternchen versehene Positionen markieren revers komplementäre Sequenzen.

cis-Element	Sequenz	Position	Funktion	Referenz
AAATGA	AAATGA	-346	pollenspezifisch	Weterings <i>et al.</i> , 1995
Amylase	TATCCA	-446	Induktion durch Zuckermangel,	Lu <i>et al.</i> , 2002
		-328	GA	
AtMYB2	TAACTG	-1067*	Induktion durch ABA, Trockenheit, Salz	Urao <i>et al.</i> , 1993; Abe <i>et al.</i> , 2003
BBF1	ACTTTA	-600*	wurzelspezifisch, langsame Induktion durch Auxin	Baumann <i>et al.</i> , 1999
CCAAT	TCAAT	-370	Enhancer	Shahmuradov <i>et al.</i> , 2003
CGACG	CGACG	-924*	Induktion durch Zuckermangel	Hwang <i>et al.</i> , 1998
GA/ABRE	ACGTGTC	-996*	Reduktion durch GA, Induktion durch ABA	Ogawa <i>et al.</i> , 2003 ; Busk und Pages, 1998
GARE	TAACAAA	-281	Induktion durch GA	Gubler <i>et al.</i> , 1995
G-Box	CACGTG	-994	vielfältig	Menkens <i>et al.</i> , 1995 ; Toyofuku <i>et al.</i> , 1998
LAT52-1	AGAAA	-622	pollenspezifisch	Bate und Twell, 1998
LAT52-2	TCCACAATA	-650	pollenspezifisch	Bate und Twell, 1998
Pyrimidin	CCTTTT	-1391*	Induktion durch GA	Mena <i>et al.</i> , 2002
		-965*		
		-954*		
		-220		
SURE1	AATAGAAAA	-1223	Induktion durch Suc	Grierson <i>et al.</i> , 1994
SURE2	AATACTAAT	-514	Induktion durch Suc	Grierson <i>et al.</i> , 1994
TATA	TAATAAAA	-255	Transkriptionsstart	Shahmuradov <i>et al.</i> , 2003
TATA	TTATTT	-310	Transkriptionsstart	Tjaden <i>et al.</i> , 1995

3.7.3.2 Sequenzanalyse des *NtHxk2*-Promotors

Die cis-Elemente im *NtHxk2*-Promotor deuten auf eine vielfältige Regulation des Promotors hin, unter anderem durch Gibberellin, Abscisinsäure (ABA), Auxin, Ethylen und Licht (s. Tab. 10).

Tabelle 10: Auflistung potentiell regulatorischer cis-Elemente im *NtHxk2*-Promotor (Akz. AY664412). Die angegebenen Positionen entsprechen der maximalen Entfernung vom Translationsstartpunkt. Mit Sternchen versehene Positionen markieren revers komplementäre Sequenzen.

cis-Element	Sequenz	Position	Funktion	Referenz
Amylase	TATCCA	-550	Induktion durch Zuckermangel, GA	Lu <i>et al.</i> , 2002
AtMYB1	[T/A]AACCA	-853 -254	Induktion durch ABA, Trockenheit	Urao <i>et al.</i> , 1993; Abe <i>et al.</i> , 2003
AtMYB2	TAACTG	-152	Induktion durch ABA, Trockenheit	Urao <i>et al.</i> , 1993; Abe <i>et al.</i> , 2003
AuxRE	TGTCTC	-635 -52	Induktion durch Auxin und Brassinosteroide	Ulmasov <i>et al.</i> , 1997 ; Goda <i>et al.</i> , 2004
CARE	CAACTC	-738*	Induktion durch GA	Sutoh und Yamauchi, 2003
CCA1	AAAAATCT	-757*	Regulation durch Licht	Wang <i>et al.</i> , 1997
CCAAT	TCAAT	-429	Enhancer	Shahmuradov <i>et al.</i> , 2003
DRE1	ACCGAGA	-411	Induktion durch ABA, Trockenheit	Busk und Pages, 2002; Kizis und Pages, 2002
DRE2	ACCGAC	-267	Induktion durch ABA, Trockenheit	Busk und Pages, 2002; Kizis und Pages, 2002
E2F	ATTCCCGC	-807	Regulation des Zellzyklus	Kosugi und Ohashi, 2003
ERE	AATCAAA	-534*	Induktion durch Ethylen	Montgomery <i>et al.</i> , 1993, Itzhaki <i>et al.</i> , 1994
GARE	TAACAGA	-714*	Induktion durch GA	Sutoh und Yamauchi, 2003
I-Box	GATAAG	-786 -543*	Regulation durch Licht	Borello <i>et al.</i> , 1993
Pyrimidin	CCTTTT	-747 -22 -703*	Induktion durch GA	Mena <i>et al.</i> , 2002
TATA	TAATAAAA	-374	Transkriptionsstart	Shahmuradov <i>et al.</i> , 2003

3.7.3.3 Sequenzanalyse des *NsHxk4*-Promotors

Im *NsHxk4*-Promotor befinden sich cis-Elemente, die eine pollenspezifische, durch Zucker, Gibberellin, Abscisinsäure und Auxin regulierte Transkription vermitteln könnten (s. Tab. 11).

Tabelle 11: Auflistung potentiell regulatorischer cis-Elemente im *NsHxk4*-Promotor (Akz. AY664409). Die angegebenen Positionen entsprechen der maximalen Entfernung vom Translationsstartpunkt. Mit Sternchen versehene Positionen markieren revers komplementäre Sequenzen.

cis-Element	Sequenz	Position	Funktion	Referenz
AACA	AACAAAC	-813	endospermspezifisch	Wu <i>et al.</i> , 2000
AtMYB1	[T/A]AACCA	-823	Induktion durch ABA,	Urao <i>et al.</i> , 1993; Abe <i>et al.</i> ,
		-625*	Trockenheit	2003
		-445		
		-90		
BBF1	ACTTTA	-934*	wurzelspezifisch, langsame	Baumann <i>et al.</i> , 1999
		-270	Induktion durch Auxin	
		-66		
CARE	CAACTC	-907	Induktion durch GA	Sutoh und Yamauchi, 2003
CATATG	CATATG	-556	Induktion durch Auxin	Xu <i>et al.</i> , 1997
CCAAT	GCAAT	-341	Enhancer	Shahmuradov <i>et al.</i> , 2003
ERE	AATTCAA	-386	Induktion durch Ethylen	Montgomery <i>et al.</i> , 1993, Itzhaki <i>et al.</i> , 1994
GA/ABRE	ACGTGTC	-590	Reduktion durch GA, Induktion durch ABA	Ogawa <i>et al.</i> , 2003 ; Busk und Pages, 1998
I-Box	GATAAG	-496*	Regulation durch Licht	Borello <i>et al.</i> , 1993
LAT52-1	AGAAA	-655	pollenspezifisch	Bate und Twell, 1998
LAT52-2	TCCACAATA	-695	pollenspezifisch	Bate und Twell, 1998
Pyrimidin	CCTTTT	-140	Induktion durch GA	Mena <i>et al.</i> , 2002
Pyrimidin	TTTTTTCC	-740	Induktion durch GA	Cercos <i>et al.</i> , 1999
Q-Element	AAAGTCA	-379*	pollenspezifischer Enhancer	Hamilton <i>et al.</i> , 1998
Sp8b-Box	TACTATT	-603	Induktion durch Suc?	Ishiguro und Nakamura, 1992
T/G-Box	AACGTG	-809	Induktion durch Jasmonat und Verwundung	Boter <i>et al.</i> , 2004
TATA	TAATAAAT	-198	Transkriptionsstart	Shahmuradov <i>et al.</i> , 2003
W-Box	TTGACC	-380	Pathogenabwehr	Eulgem <i>et al.</i> , 2000

3.7.4 Konstruktion von Promotor-GUS-Fusionen

Die isolierten Promotorbereiche (P) von *NtHxk1*, *NtHxk2* und *NsHxk4* wurden mit den in Tabelle 12 aufgeführten Primern amplifiziert und über HindIII / BamHI (*PNtHxk1* und *PNtHxk2*) bzw. SalI / BamHI (*PNsHxk4*) in den Vektor pBi101 ligiert (s. Abb. 39).

Tabelle 12: Verwendete Primer zur Klonierung von Promotor-GUS-Fusionen (s. Anhang, I.1).

	5' Primer	3' Primer	amplifizierter Bereich
<i>PNtHxk1</i>	PrHK9HindIII_5	PrHK9ATGBamHI_3	-1406 bis +3
<i>PNtHxk2</i>	Pr_HKNt10_GUS_5	Pr_HKNt10_GUS_3	-924 bis -47
<i>PNsHxk4</i>	ME4Prom5	ME4Prom3	-950 bis -1

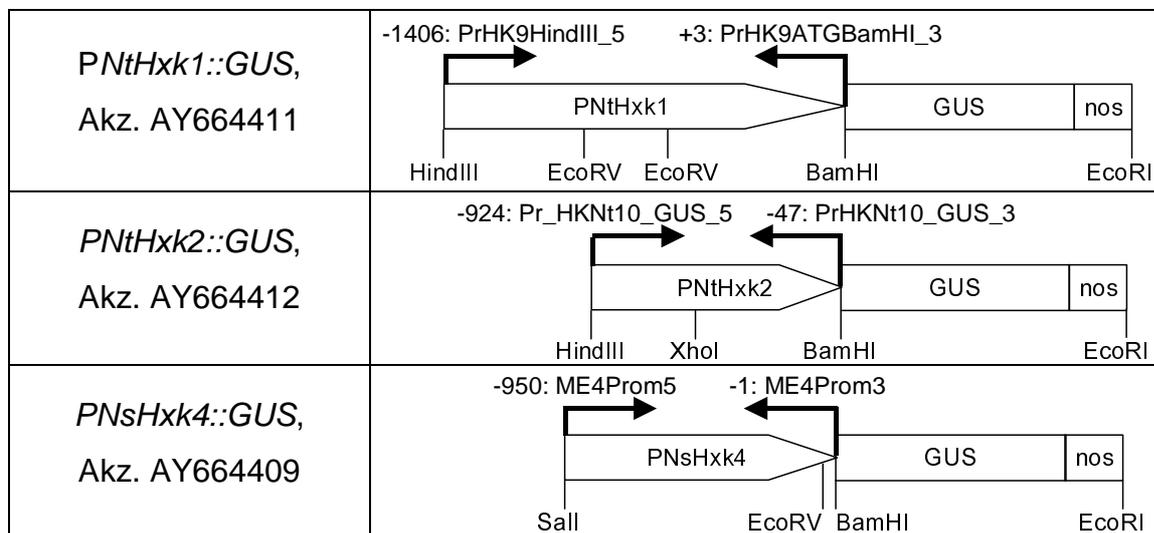


Abbildung 39: GUS-Fusionen der Promotoren von *NtHxk1*, *NtHxk2* und *NsHxk4* im Vektor pBi101. Mit Richtungspfeilen angegeben sind die verwendeten Primer samt Positionsangaben in Relation zum Translationsstart (s. Anhang, I.1). Außerdem eingezeichnet sind einige interne Schnittstellen der Promotoren.

3.7.5 Verteilung von GUS-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen

Tabakpflanzen wurden stabil mit den Promotor-GUS-Fusionen *PNtHxk1::GUS*, *PNtHxk2::GUS* und *PNsHxk4::GUS* transformiert. Es wurden jeweils mindestens 50 auf Kanamycin selektierte Pflanzen ins Gewächshaus transferiert und in verschiedenen Geweben histochemisch auf GUS-Aktivität getestet (s. 2.9.4). Positive Pflanzen wurden geselbstet und in der nächsten Generation detaillierter untersucht. Pro Linie wurden vier bis fünf Pflanzen untersucht.

3.7.5.1 *PNtHxk1* vermittelte keine GUS-Aktivität

Verschiedene Gewebe transformierter Pflanzen wurden histochemisch auf GUS-Aktivität untersucht. Dabei wurde in keiner der 50 Pflanzen Aktivität festgestellt, insbesondere nicht in Staubbeuteln und Pollen. Aufgrund von Northern-Analysen war dort stärkste Aktivität erwartet worden (s. 3.6.2). Northern-Analyse mit RNA aus Staubbeuteln zeigte in nur zwei von 25 Proben sehr schwache Hybridisierung mit einer Sonde für GUS. Weitere Untersuchungen wurden wegen dieser negativen Befunde nicht durchgeführt.

3.7.5.2 *PNtHxk2* vermittelte Aktivität in Leitgewebe, Schließzellen und Wurzelspitze

Die Durchmusterung von 50 Pflanzen erfolgte durch histochemische GUS-Färbung von Blättern in Gewebekultur. Es wurden 14 Pflanzen aufgrund deutlicher GUS-Aktivität im Leitgewebe als positiv identifiziert. Die zehn Linien 2, 5, 9, 31, 32, 35, 36, 40, 43 und 48 wurden für weitere Analysen geselbstet.

Allen untersuchten Linien gemeinsam war GUS-Aktivität im Xylem-Parenchym und in der Stärkescheide des Leitgewebes, sowie in Stomata und Pollen. Aktivität in Wurzeln war variabler in der Intensität und häufig in der Wurzelspitze erhöht. Variable Aktivität wurde in verschiedenen Blütenteilen festgestellt, geringe in Samen (s. Abb. 40). In weniger als 50 % aller untersuchten Proben war Aktivität in Trichomen zu sehen. Stärkste Aktivität, jedoch mit sehr großer Streuung, wurde in Stängel-Querschnitten gemessen (s. Abb. 41). Geringste Aktivität war in der Lamina von Blättern vorhanden, trotz der Aktivität in den Stomata.

Die im Mittel stärkste Aktivität war in den Linien 31 und 48 zu messen, wobei nicht in allen Geweben die jeweils stärkste Aktivität erreicht wurde. Als repräsentativ für den Durchschnitt aller Untersuchungen sind die Linien 2, 5 und 9 zu nennen.

Bis auf die starke Aktivität in Pollen korrelierten die GUS-Aktivitäten recht gut mit den Transkriptmengen, die in der Northern-Analyse detektiert wurden (s. Abb. 36).

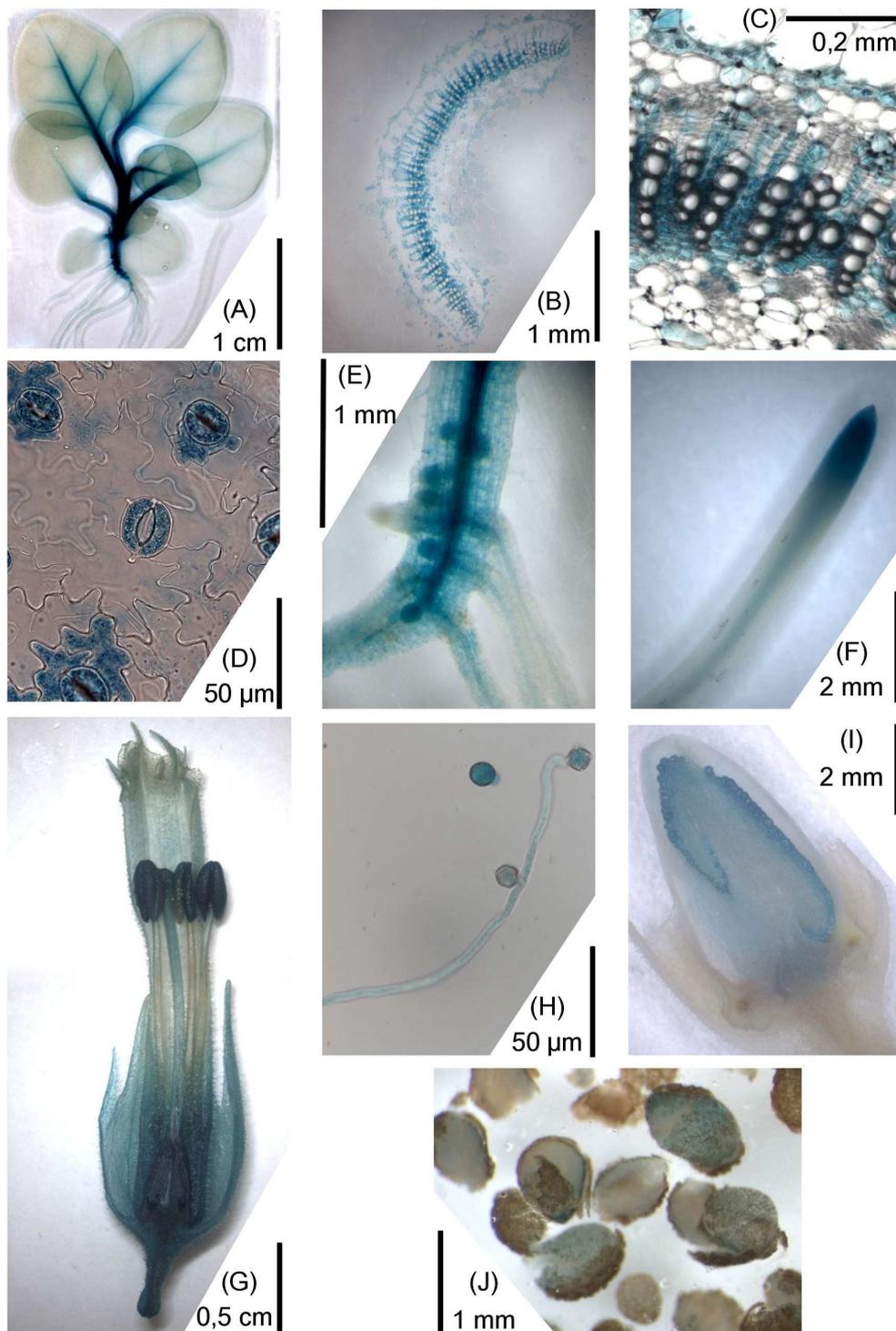


Abbildung 40: Histochemische Färbung der durch *PNtHxk2::GUS* vermittelten GUS-Aktivität. Die Proben wurden wenige Stunden bis über Nacht in Färbepuffer inkubiert und anschließend mit Ethanol gebleicht.

(A) In Gewebekultur gewachsene Pflanze (Linie 35), (B) Leitgewebe einer Petiole (Linie 2), (C) Detailaufnahme von (B) mit gefärbter Stärkescheide oben und gefärbtem Xylem-Parenchym in der Mitte, (D) untere Blattepidermis mit gefärbten Schließzellen (Linie 2), (E) Wurzelansätze einer in Gewebekultur gewachsenen Pflanze (Linie 2), (F) Wurzelspitze einer in Gewebekultur gewachsenen Pflanze (Linie 2), (G) Blüte (Linie 36), (H) Pollen und gekeimter Pollen (Linie 2), (I) sich entwickelnde Samen im befruchteten Fruchtknoten (Linie 2), (J) ca. 6 Monate alte Samen (Linie 48). Aufnahmen A, B, E, F, G, I, J an Stereolupe DC300 (Leica, Bensheim), C, D, H an Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena).

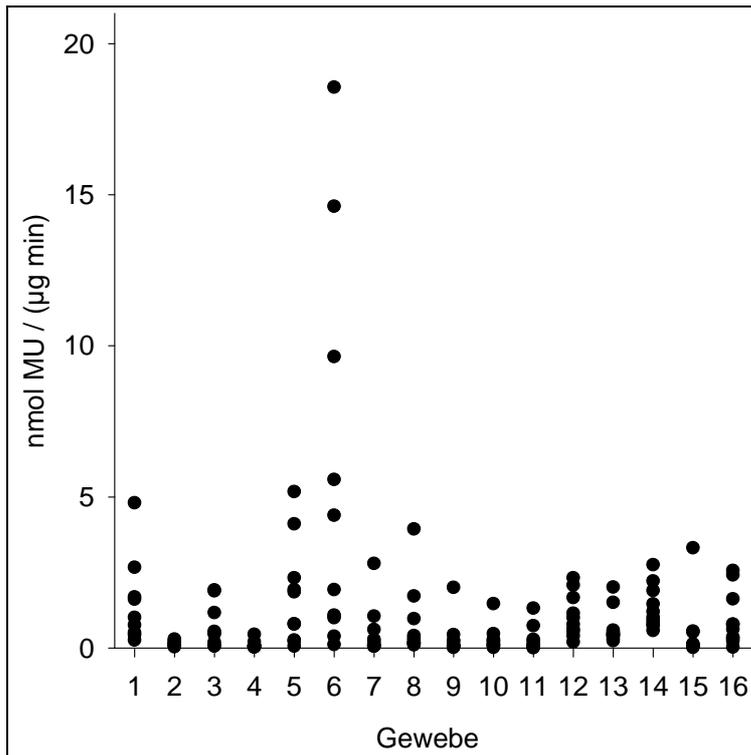


Abbildung 41: Messung von GUS-Aktivität in verschiedenen Geweben nach stabiler Transformation mit *PNtHxk2::GUS*. Jeder Punkt entspricht der durchschnittlichen Aktivität einer Linie, gemittelt aus vier bis fünf untersuchten Pflanzen.

1: Keimlingswurzel, 2: Keimlingsblatt, 3: Wurzel (1-3 aus Gewebekultur), 4: *Source*-Blatt Lamina, 5: *Source*-Blatt Mittelrippe, 6: Stängel, 7: *Sink*-Blatt Lamina, 8: *Sink*-Blatt Mittelrippe, 9: junger Fruchtknoten, 10: reifer Fruchtknoten, 11: Griffel, 12: Filament, 13: junger Staubbeutel, 14: reifer Staubbeutel, 15: junges Blütenblatt, 16: rosa Blütenblattspitze.

3.7.5.3 *PNsHxk4* vermittelte hauptsächlich Aktivität in Pollen

Eine Auswahl von 80 ins Gewächshaus transferierten Pflanzen erfolgte durch histochemische GUS-Färbung von Pollen. Aufgrund verschiedener Blühzeitpunkte wurden nur 28 Pflanzen untersucht, davon waren 15 positiv. Die Pflanzen 1, 2, 3, 12, 15, 16, 17, 27, 28, 39, 40, 43 und 77 wurden geselbstet. Linie 2 wurde später aufgrund untypisch starker GUS-Aktivitäten in nahezu allen getesteten Geweben bei weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Am deutlichsten wurde Aktivität in Pollen sichtbar (s. Abb. 42). Die starke Aktivität schlug sich in den mit Abstand höchsten Messwerten von allen untersuchten Geweben nieder (s. Abb. 43). Weitere Aktivitäten wurden in Wurzeln, reifen Fruchtknoten und in Tapetumzellen registriert. GUS-Färbung der Fruchtknoten war sehr variabel und deutlich stärker, als die Messwerte erwarten ließen. Samen waren nur ausnahmsweise schwach gefärbt (Linien 1, 27, 39, 43). Stärkste Aktivität in Staubbeuteln wurde in Linien 27, 43, 39 und 6 gemessen. Als repräsentativ für den Durchschnitt aller Untersuchungen sind die Linien 3, 15, und 77 zu nennen.

Insgesamt korrelierte die Promotoraktivität gut mit den bei der Northern-Analyse festgestellten Transkriptmengen von *NtHxk1/NtHxk7* (s. Abb. 36).

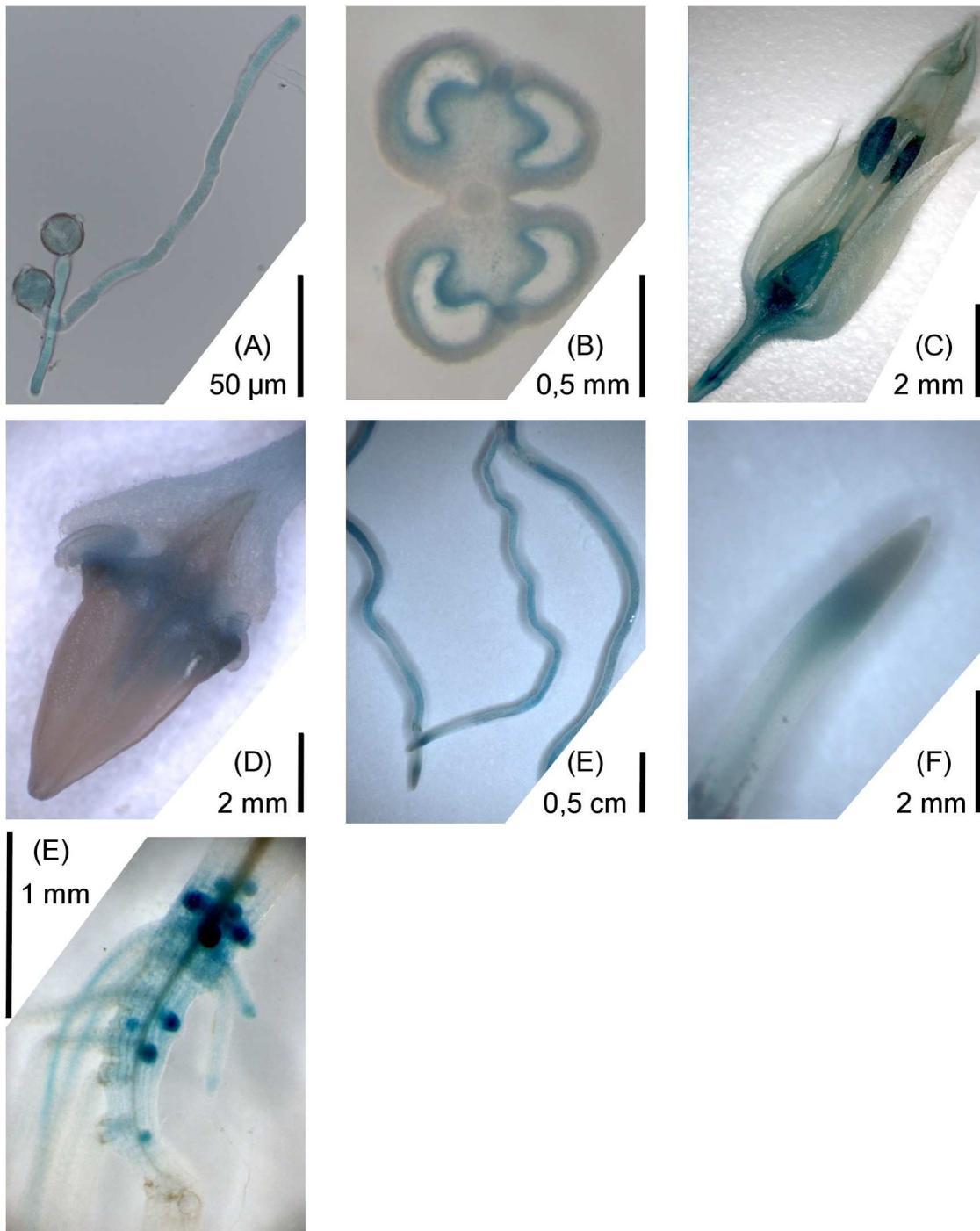


Abbildung 42: Histochemische Färbung der durch *PNsHxk4::GUS* vermittelten GUS-Aktivität. Die Proben wurden wenige Stunden bis über Nacht in Färbepuffer inkubiert und anschließend mit Ethanol gebleicht
(A) gekeimte Pollen (Linie 15), **(B)** Querschnitt eines jungen Staubbeutels mit gefärbtem Tapetum (Linie 15), **(C)** Blüte (Linie 28), **(D)** Fruchtknoten kurz nach Befruchtung (Linie 15), **(E)** Wurzeln einer in Gewebekultur gewachsenen Pflanze (Linie 15), **(F)** Wurzelspitze einer in Gewebekultur gewachsenen Pflanze (Linie 15), Wurzelansätze einer in Gewebekultur gewachsenen Pflanze (Linie 43). Aufnahme A an Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena)., B-E an Stereolupe DC300 (Leica, Bensheim).

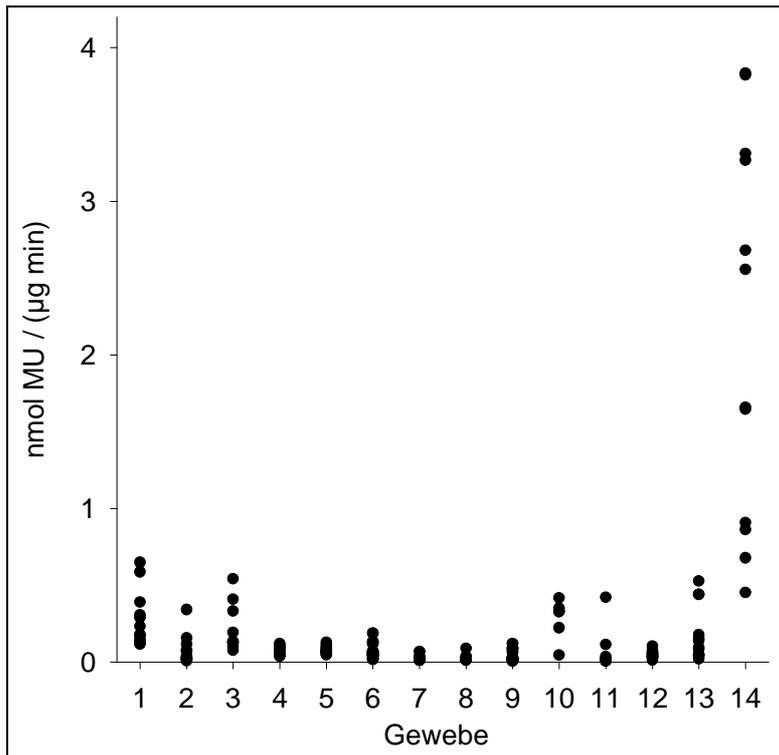


Abbildung 43: Messung von GUS-Aktivität in verschiedenen Geweben nach stabiler Transformation mit *PNsHxk4::GUS*. Jeder Punkt entspricht der durchschnittlichen Aktivität einer Linie, gemittelt aus vier bis fünf untersuchten Pflanzen.

1: Keimlingswurzel, 2: Keimlingsblatt, 3: Wurzel (1-3 aus Gewebekultur), 4: *Source*-Blatt Lamina, 5: *Source*-Blatt Mittelrippe, 6: Stängel, 7: *Sink*-Blatt Lamina, 8: *Sink*-Blatt Mittelrippe, 9: junger Fruchtknoten, 10: reifer Fruchtknoten, 11: Griffel, 12: Filament, 13: junger Staubbeutel, 14: reifer Staubbeutel.

3.8 Konstitutive Überexpression von Hexokinase-Isoformen in Tabak

Nach stabiler Überexpression der einzelnen Hexokinase-Isoformen sollten deren biochemische Eigenschaften bestimmt und ihr Einfluss auf den Zuckerstoffwechsel überprüft werden. Bisherige Studien zu überexprimierten pflanzlichen Hexokinasen führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Überexpression von AtHxk1 oder AtHxk2 in *Arabidopsis thaliana* hatte Hypersensitivität von Keimlingen gegenüber Glukose zur Folge; unter normalen Bedingungen gab es keine großen Auffälligkeiten (Jang *et al.*, 1997). In Tomate dagegen führte AtHxk1 zu teilweise deutlich verändertem Phänotypen mit vermindertem Wuchs, geringerer Photosynthese und verfrühter Seneszenz (Dai *et al.*, 1999). In beiden Fällen wurde der Einfluss von AtHxk1 auf ihre Funktion als Zuckersensor zurückgeführt. Überexpression von StHxk1 oder StHxk2 in Kartoffel hatte keinen auffälligen Einfluss auf Phänotyp oder Zuckerstoffwechsel (Veramendi *et al.*, 1999, 2002). Es konnten demnach keine eindeutigen Erwartungen an eine Überexpression der Tabak-Isoformen formuliert werden.

3.8.1 Herstellung von Konstrukten zur Überexpression verschiedener Hexokinase-Isoformen

Die verschiedenen Hexokinase-Isoformen wurden mit den in Tabelle 13 angegebenen Primern amplifiziert und über BamHI / XbaI (*NtHxk3*) bzw. BamHI / Sall (alle anderen) in den binären Vektor pBinAR, zwischen CaMV 35S Promotor und ocs-Terminator, ligiert. *NtHxk7* wurde nicht in die Untersuchungen mit einbezogen. Übersichtszeichnungen der Konstrukte finden sich in Abbildung 44.

Tabelle 13: Verwendete Primer zur Klonierung der verschiedenen Konstrukte zur Hexokinase-Überexpression (s. Anhang, I.1)

Konstrukt	5' Primer	3' Primer
<i>NtHxk1</i>	S14	S15
<i>NtHxk2</i>	HK10_BamHI_5	Hk10_SalI_3
<i>NtHxk3</i>	HK23BamHI_5	S12
<i>NtHxk4a</i>	HK24_BamHI_5	HK24A_SalI_3
<i>NtHxk5</i>	HK5_BamHI_5	HK5_fSense_SalI_3
<i>NtHxk6</i>	HK6_BamHI_5	HK6_SalII_3

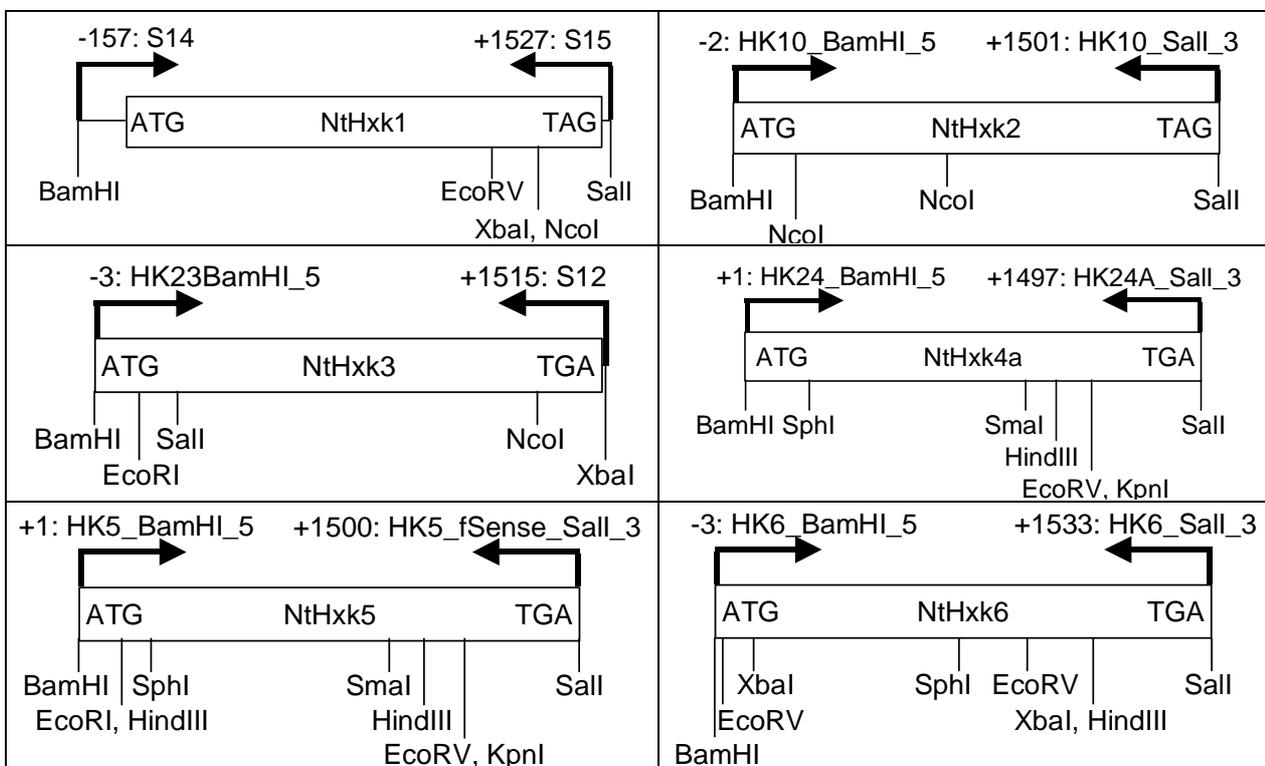


Abbildung 44: Maßstabgetreue Schemazeichnungen von *NtHxk1*, 2, 3, 4a, 5 und 6 im Plasmid pBinAR. Mit Richtungspfeilen angegeben sind die verwendeten Primer samt Positionsangaben in Relation zum Translationsstart (s. Anhang, I.1). Außerdem eingezeichnet sind einige interne Schnittstellen der Konstrukte.

3.8.2 Erzeugung transgener Tabakpflanzen mit erhöhter Hexokinase-Expression

Tabakpflanzen wurden stabil mit den Hexokinase-Isoformen 1, 2, 3, 4a, 5 und 6 transformiert. Nach Selektion auf Kanamycin wurden ca. 40 regenerierte Pflanzen ins Gewächshaus transferiert und mittels Northern- oder Western-Analyse nach positiven Pflanzen durchmustert (s. Abb. 45-51). Positive NtHxk4a-Pflanzen wurde durch Aktivitätsmessungen identifiziert. In mehreren Messreihen waren die Aktivitäten von NtHxk4a in der T0-Generation nur geringfügig gegenüber dem WT erhöht. Erst in der T1-Generation konnten vier vorselektierte Linien eindeutig als positiv identifiziert werden (s. Abb. 48).

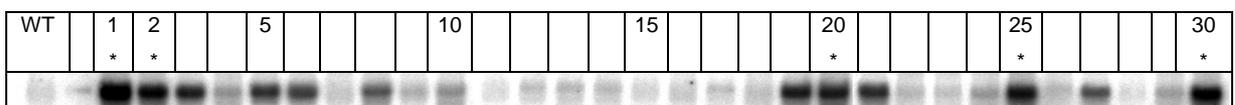


Abbildung 45: Auswahl von NtHxk1-Linien durch Northern-Analyse. Jeweils 40 µg RNA aus *Source*-Blatt Lamina wurden aufgetragen und mit einer Sonde für *NtHxk1* hybridisiert. Mit Sternchen versehene Nummern bezeichnen die für die Vermehrung ausgewählten positiven Pflanzen.

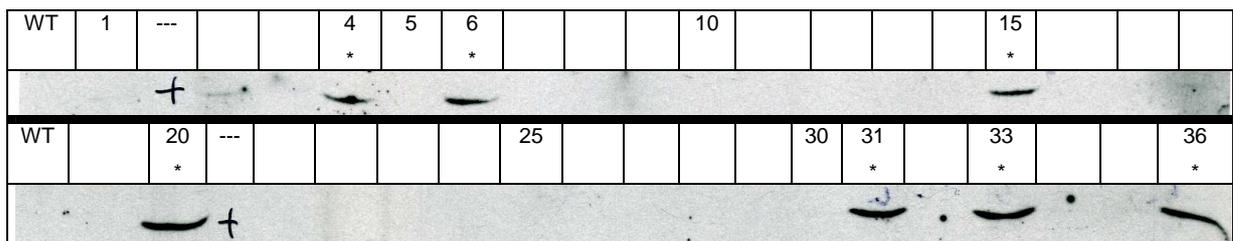


Abbildung 46: Auswahl von NtHxk2-Linien durch Western-Analyse mit polyklonalem Antikörper gegen Aminosäuren 1-231 von NtHxk2. Mit Sternchen versehene Nummern bezeichnen die für die Vermehrung ausgewählten positiven Pflanzen. Detektion des Antikörpers mit Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum aus Ziege mit gekoppelter Peroxidase, Entwicklung mittels Chemolumineszenz. Aufgetragen wurde Gesamtprotein entsprechend ca. 0,3 cm² *Source*-Blatt Lamina.

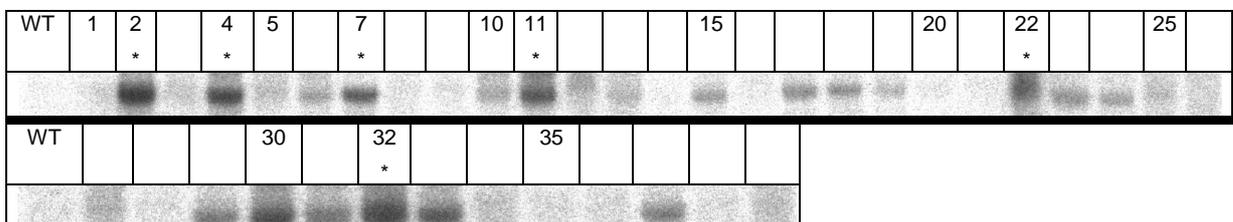


Abbildung 47: Auswahl von NtHxk3-Linien durch Northern-Analyse. Jeweils 25 µg RNA aus *Source*-Blatt Lamina wurden aufgetragen und mit einer Sonde für *NtHxk3* hybridisiert. Mit Sternchen versehene Nummern bezeichnen die für die Vermehrung ausgewählten positiven Pflanzen.

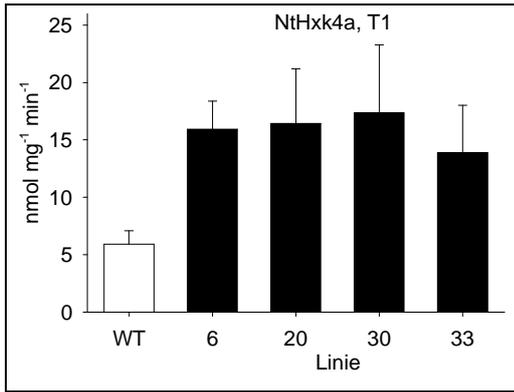


Abbildung 48: Auswahl von NtHxk4a-Linien der T1-Generation durch Messung der Glukokinase-Aktivität in der *Source*-Blatt Lamina. Es wurden fünf Pflanzen je Linie gemessen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

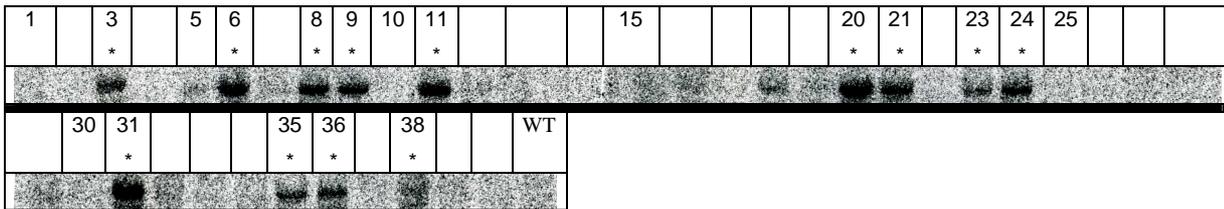


Abbildung 49: Auswahl von NtHxk5-Linien durch Northern-Analyse. Jeweils 25 µg RNA aus *Source*-Blatt Lamina wurden aufgetragen und mit einer Sonde für *NtHxk5* hybridisiert. Mit Sternchen versehene Nummern bezeichnen die für die Vermehrung ausgewählten positiven Pflanzen.

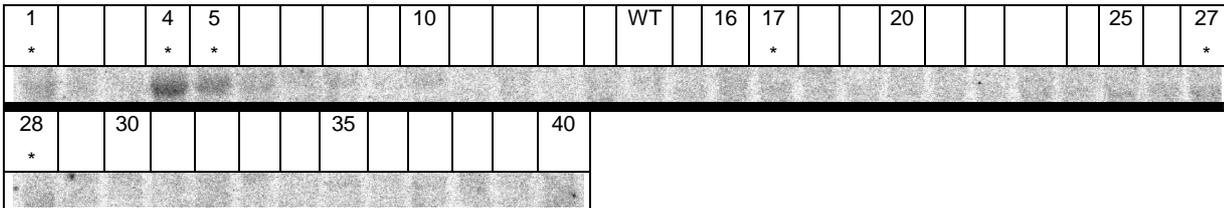


Abbildung 50: Auswahl transgener NtHxk6-Linien durch Northern-Analyse. Jeweils 50 µg RNA aus *Source*-Blatt Lamina wurden aufgetragen und mit einer Sonde für *NtHxk6* hybridisiert. Mit Sternchen versehene Nummern bezeichnen die für die Vermehrung ausgewählten positiven Pflanzen.

Aufgrund der sehr schwachen Signale wurden NtHxk6-Pflanzen der T1-Generation erneut durch Northern-Analyse untersucht. Dadurch wurde die Auswahl der Linien bestätigt (s. Abb. 51).

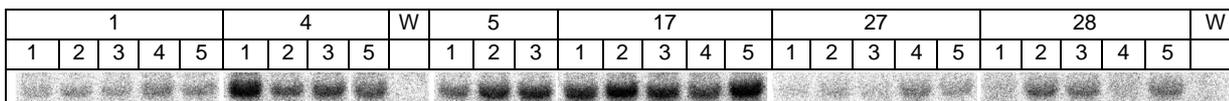


Abbildung 51: Northern-Analyse von NtHxk6-Pflanzen der T1-Generation. Jeweils 25 µg RNA aus *Source*-Blatt Lamina wurden aufgetragen und mit einer Sonde für *NtHxk6* hybridisiert. Die obere Zahlenreihe gibt die Linie an, darunter die einzelnen Pflanzen jeder Linie, W=Wildtyp. Linien 1, 4, 5 und 17 waren auf derselben Membran aufgetragen und damit direkt vergleichbar, Linien 27 und 28 waren gemeinsam auf einer anderen Membran aufgetragen.

Mindestens vier Pflanzen jeder überexprimierten Isoform wurden durch Selbstung vermehrt. Diejenigen Linien mit der jeweils höchsten durchschnittlichen Hexokinase-Aktivität wurden für die folgenden Untersuchungen verwendet (s. Tab. 14). Ihre Aktivitäten werden detailliert in Abschnitt 3.9 behandelt. In der T2-Generation war keine Aufspaltung der Kanamycin-Resistenz mehr zu beobachten.

Zusätzlich wurden Tabakpflanzen untersucht, die stabil eine bakterielle Glukokinase von *Zymomonas mobilis* (ZmGlk, Akzession D37855) exprimierten. Als Vektor wurde ebenfalls pBinAR verwendet. Die Pflanzen waren von Dr. Karin Herbers (damals IPK Gatersleben) im Vorfeld dieser Arbeit hergestellt und ausgewählt worden.

Tabelle 14: Auflistung der hergestellten transgenen Linien mit überexprimierter Hexokinase oder Glukokinase. Die fett und mit Sternchen markierten Linien wurden für detailliertere Untersuchungen verwendet. Aktivitäten dieser Linien sind in Tabelle 15 und ausführlich in Abschnitt 3.9 angegeben.

Konstrukt	Positive Linien
NtHxk1	1* , 2, 20, 25, 30
NtHxk2	4, 6, 15, 20, 31, 33* , 36
NtHxk3	2, 4* , 7, 11, 22, 32
NtHxk4a	6, 20, 30* , 33
NtHxk5	3, 6, 8, 11, 20, 31, 36* , 38
NtHxk6	1, 4, 5* , 17, 27, 28
ZmGlk	7, 9, 24* , 29

3.8.3 Charakterisierung der Tabakpflanzen mit erhöhter Hexokinase-Expression

Durch Überexpression der Hexokinasen sind Einflüsse auf den Stoffwechsel der Pflanze zu erwarten. Diese können je nach Isoform unterschiedlich ausfallen. Die Fähigkeit, das Reaktionsprodukt Glukose-6-phosphat in bestimmte Stoffwechselwege zu kanalisieren, die potentielle Funktion als Zuckersensor und die Stärke der Aktivität sind Faktoren, die Einfluss auf die Ausprägung der Änderung nehmen. Eine deutlich erhöhte Aktivität kommt womöglich nur bei sehr großem Glukose-Angebot zum Tragen, wenn die normalerweise vorhandene Aktivität nicht ausreicht.

3.8.3.1 NtHxk6-Pflanzen zeigten einen veränderten Phänotyp

Von allen überexprimierten Hexokinase-Isoformen führte nur NtHxk6 zu einem veränderten Phänotyp transgener Pflanzen. Dieser äußerte sich in allen sechs untersuchten Linien ab der T1-Generation in bleichen Bereichen an der Basis wachsender Blätter (s. Abb. 52). Dieser Phänotyp trat auch in Pflanzen auf, die NtHxk6::GFP exprimierten (s. 3.4.7).

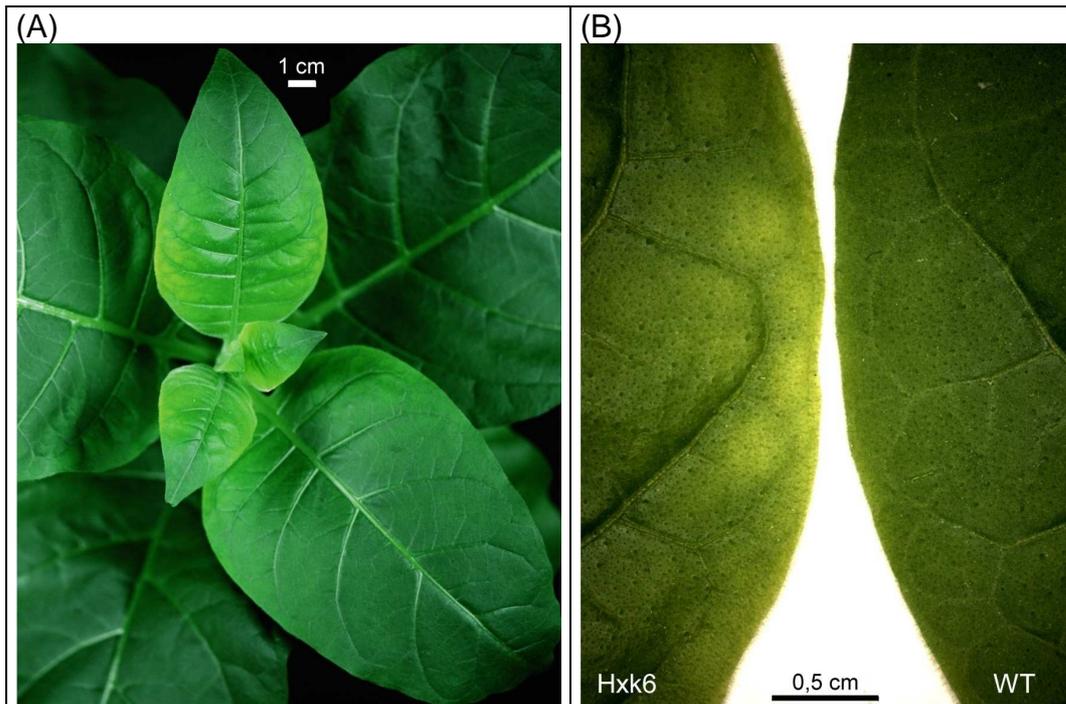


Abbildung 52: Durch Überexpression von NtHxk6 verursachter Phänotyp.

(A) Blick auf eine ca. sechs Wochen alte Pflanze der Linie 5. (B) Ausschnitte zweier ca. acht cm großer Blätter, links NtHxk6 Linie 17, rechts Wildtyp.

3.8.3.2 Lösliche Zucker und Stärke in Hexokinase überexprimierenden Pflanzen

Der Einfluss der Hexokinasen auf den Zuckerstoffwechsel der Pflanzen wurde durch Messung der Kohlenhydrate Stärke, Glukose, Fruktose und Saccharose untersucht. Die dafür verwendeten Pflanzen waren mindestens in der T2-Generation, eine Aufspaltung der Kanamycin-Resistenz war bei ihnen nicht zu beobachten. Blattscheiben von 0,5 – 0,9 cm Durchmesser wurden ca. fünf Stunden nach Beginn der Lichtphase aus *Source*-Blättern entnommen. In einem Fütterungsexperiment wurde ein Teil dieser Proben für 24 Stunden in Dunkelheit auf 300 mM Glukose flotiert. Dadurch sollte der Zuckerstoffwechsel mit Substrat abgesättigt werden, um den Einfluss gesteigerter Hexokinase-Aktivität deutlicher herauszustellen.

Der Versuch wurde zweimal mit Pflanzen derselben Aussaat durchgeführt. Sie wurden im Abstand einer Woche von MS-Medium ins Gewächshaus transferiert und dort nach fünf Wochen untersucht. Ihre Hexokinase-Aktivitäten sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Im Vergleich beider Versuche fielen starke Schwankungen im Stärkegehalt auf (s. Tab. 16-18). Bei NtHxk2- und NtHxk3-Pflanzen waren keine signifikanten Unterschiede zum WT auszumachen, NtHxk5, NtHxk6 und ZmGlk dagegen führten zu deutlicher erhöhtem Stärkegehalt nach Flotierung. NtHxk4a-Pflanzen zeigten nur im zweiten Versuch mehr Stärke als der WT. In NtHxk1-Pflanzen nahm der Stärkegehalt dagegen reproduzierbar ab. Bei den im zweiten Versuch zusätzlich bestimmten Gehalten löslicher Zucker waren keine auffälligen Unterschiede zwischen den Linien auszumachen. Die Änderungen im Stärkegehalt korrelierten nicht mit den veränderten Hexokinase-Aktivitäten.

Tabelle 15: Hexokinase-Aktivitäten im WT und in den Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen bei verschiedenen pH-Werten. pH 7,25 entspricht dem zytosolischen, pH 7,7 dem stromalen Wert (Oja *et al.*, 1999). Bei pH 8,4 zeigten alle Tabak-Hexokinasen maximale Aktivität (s. 3.9.2). Als Substrate wurden 1 mM Glukose und 4 mM ATP eingesetzt, der Messpuffer basierte auf 100 mM Hepes. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung, n = 4-5.

Linie	Hxk-Aktivität [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]		
	pH 7,25	pH 7,7	pH 8,4
WT	6,5 ± 0,5	8,1 ± 0,9	8,5 ± 1,0
NtHxk1 1	149 ± 15	---	173 ± 19
NtHxk2 33	34 ± 4	46 ± 6	46 ± 6
NtHxk3 4	42 ± 9	---	65 ± 13
NtHxk4a 30	26 ± 1	---	33 ± 1
NtHxk5 36	15 ± 4	---	19 ± 5
NtHxk6 5	7,6 ± 2,0	---	9,9 ± 2,1
ZmGlk 24	176 ± 24	---	80 ± 16

Tabelle 16: Erster Fütterungsversuch, Stärkegehalt in Blattscheiben vor und nach Flotierung auf 300 mM Glukose. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung, n = 8-12

Pflanze	Stärke vor Flot.	Stärke nach Flot.
	[mmol C ₆ /m ²]	[mmol C ₆ /m ²]
WT	2,4 ± 0,4	6,3 ± 0,8
NtHxk1	5,2 ± 1,2	2,4 ± 0,9
NtHxk2	3,8 ± 0,5	5,7 ± 2,3
NtHxk3	2,0 ± 0,6	5,3 ± 1,3
NtHxk4a	2,4 ± 0,9	6,1 ± 0,6
NtHxk5	3,4 ± 0,6	10,7 ± 1,4
NtHxk6	4,9 ± 0,8	12,3 ± 1,7
ZmGlc	3,7 ± 0,7	10,9 ± 1,5

Tabelle 17: Zweiter Fütterungsversuch, Kohlenhydrate in Blattscheiben vor Flotierung. Glc: Glukose, Fru: Fruktose, Suc: Saccharose. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung, n = 8-12

Pflanze	Stärke vor Flot.	Glc vor Flot.	Fru vor Flot.	Suc vor Flot.
	[mmol C ₆ /m ²]	[mmol/m ²]	[mmol/m ²]	[mmol/m ²]
WT	8,8 ± 1,5	8,7 ± 1,1	4,0 ± 1,0	2,2 ± 0,4
NtHxk1	8,4 ± 2,5	6,5 ± 1,5	2,3 ± 0,5	2,0 ± 0,5
NtHxk2	6,3 ± 1,1	5,7 ± 0,9	4,9 ± 0,6	1,7 ± 0,2
NtHxk3	9,7 ± 1,2	8,5 ± 1,8	3,2 ± 0,4	1,9 ± 0,5
NtHxk4a	6,9 ± 1,1	7,5 ± 1,1	4,8 ± 1,1	1,4 ± 0,2
NtHxk5	10,7 ± 1,1	8,8 ± 1,3	5,4 ± 1,1	1,9 ± 0,2
NtHxk6	9,1 ± 2,5	7,0 ± 0,9	5,1 ± 1,3	2,0 ± 0,5
ZmGlc	10,7 ± 1,6	8,2 ± 1,4	4,6 ± 0,7	1,7 ± 0,3

Tabelle 18: Zweiter Fütterungsversuch, Kohlenhydrate in Blattscheiben nach Flotierung auf 300 mM Glukose. Glc: Glukose, Fru: Fruktose, Suc: Saccharose. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung, n = 8-12

Pflanze	Stärke nach Flot.	Glc nach Flot.	Fru nach Flot.	Suc nach Flot.
	[mmol C ₆ /m ²]	[mmol/m ²]	[mmol/m ²]	[mmol/m ²]
WT	12,6 ± 1,8	22,2 ± 2,7	9,5 ± 1,8	3,1 ± 0,7
NtHxk1	5,6 ± 1,6	17,3 ± 2,1	7,3 ± 2,1	3,6 ± 1,1
NtHxk2	12,2 ± 3,0	18,0 ± 2,5	8,3 ± 2,1	2,9 ± 0,6
NtHxk3	11,2 ± 3,6	24,6 ± 3,3	14,5 ± 4,7	4,1 ± 1,1
NtHxk4a	16,7 ± 1,5	22,5 ± 2,0	14,0 ± 3,1	4,1 ± 0,6
NtHxk5	18,9 ± 2,6	21,9 ± 4,3	10,5 ± 3,1	4,1 ± 0,5
NtHxk6	18,3 ± 2,4	22,0 ± 1,8	11,9 ± 2,5	4,0 ± 0,7
ZmGlc	18,7 ± 0,8	20,7 ± 3,1	12,2 ± 2,3	4,1 ± 0,7

3.9 Messungen der Hexokinase-Aktivitäten nach stabiler Überexpression in Tabak

Nach Überexpression der Hexokinase-Isoformen in Tabak sollten deren Aktivitäten genauer charakterisiert werden, um Unterschiede zwischen ihnen aufzuzeigen.

Aufgrund bisher veröffentlichter Charakterisierungen war zu erwarten, dass es Unterschiede bei der Substrat-Affinität, der pH-Abhängigkeit (s. Anhang, III), oder der Sensitivität gegenüber Inhibitoren gibt, welche als Anpassungen an die physiologische Rolle der einzelnen Isoform zu interpretieren sind (Galina und da Silva, 2000; da-Silva *et al.*, 2001).

Die für die Messungen verwendeten Pflanzen (s. Tab. 14) waren sieben bis neun Wochen alt. Sie befanden sich nicht alle in der gleichen T-Generation. Hxk4a- und Hxk6-Pflanzen wurden in der T1-Generation untersucht. Hxk5-Pflanzen befanden sich bei den Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit ebenfalls in der T1-Generation, für die anderen Messungen in der T2-Generation. Die weiteren Linien waren mindestens in der T2-Generation, wobei es keine Aufspaltung der Kanamycin-Resistenz mehr gab. Die Messungen erfolgten mit entsalzten Rohextrakten ausgewachsener *Source*-Blätter. Die Enzyme wurden nicht weiter biochemisch getrennt oder konzentriert.

Messungen zur pH-Abhängigkeit wurden mit jeweils 20 mM Glukose bzw. Fruktose, sowie 4 mM ATP durchgeführt. Für pH 5,2-6,8 wurde 100 mM MES-Puffer verwendet, für 6,6-7,8 100 mM MOPS, für 7,6 bis 9,2 100 mM Tricin.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m (Michaelis-Menten-Konstante) und V_{max} (Maximale Reaktionsgeschwindigkeit) wurde 100 mM HEPES pH 8,4 als Messpuffer verwendet. Die Messungen zur Hexose-Affinität erfolgten mit 4 mM ATP im Messpuffer und variablen Mengen Hexose, mit denen die Reaktionen gestartet wurden. Für die Messung der Affinität zu ATP wurde 1 mM Glukose vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe variabler Mengen ATP gestartet. Mindestens vier individuelle Proben wurden jeweils doppelt gemessen, um Ungenauigkeiten des Photometers auszugleichen. Für die Berechnung des Standardfehlers ist demnach statt n $2n$ angegeben.

Es ist nicht bekannt, in welchem Ausmaß endogene Hexokinasen in den transgenen Pflanzen zur gemessenen Aktivität beitragen. Zur Abschätzung dieser Unsicherheit werden für die Messungen zur Substrat-Affinität jeweils zwei alternative Werte angegeben. Ein Wert ist direkt von den gemessenen Daten abgeleitet. Der andere Wert wurde unter der Annahme berechnet, dass in den transgenen Pflanzen dieselbe endogene Hexokinase-Aktivität

vorherrschte wie im WT. Von jedem ermittelten Messwert wurde deshalb der entsprechende des WT subtrahiert, bevor er zur Berechnung der Konstanten verwendet wurde.

3.9.1 Überexpression von NtHxk6 resultierte nicht in erhöhter Hexokinase-Aktivität

Bei den durchgeführten Messungen zur pH-Abhängigkeit (s. Abb. 53) und Affinität zu Glukose und ATP zeigten NtHxk6 überexprimierende Pflanzen keine signifikante Abweichung zur im WT gemessenen Hexokinase. Daher wird bei den Messungen nicht weiter auf NtHxk6 eingegangen.

3.9.2 pH-Abhängigkeit der Hexokinasen

ZmGlk zeigt eine eindeutig andere pH-Abhängigkeit als die Tabak-Hexokinasen (s. Abb. 53). Bei dem bakteriellen Enzym liegt eine deutliche Optimumskurve mit einem bevorzugten pH um 7,2 vor. Außerdem ist die klare Bevorzugung von Glukose gegenüber Fruktose als Substrat zu erkennen.

Hexokinase im WT, NtHxk1 und NtHxk3 waren einander sehr ähnlich pH-abhängig mit einem breiten bevorzugten Bereich oberhalb 7,6. NtHxk2 zeigte oberhalb von pH 8,0 ihren bevorzugten pH-Bereich mit klarer Präferenz für Glukose als Substrat. NtHxk4a und NtHxk5 zeigten eine relativ stetige Aktivitätszunahme mit steigendem pH-Wert, ohne ein Plateau zu erreichen. Insgesamt zeigten sie sich am wenigsten pH-abhängig. Auffällig bei beiden war die deutlich höhere Aktivität mit Fruktose als Substrat.

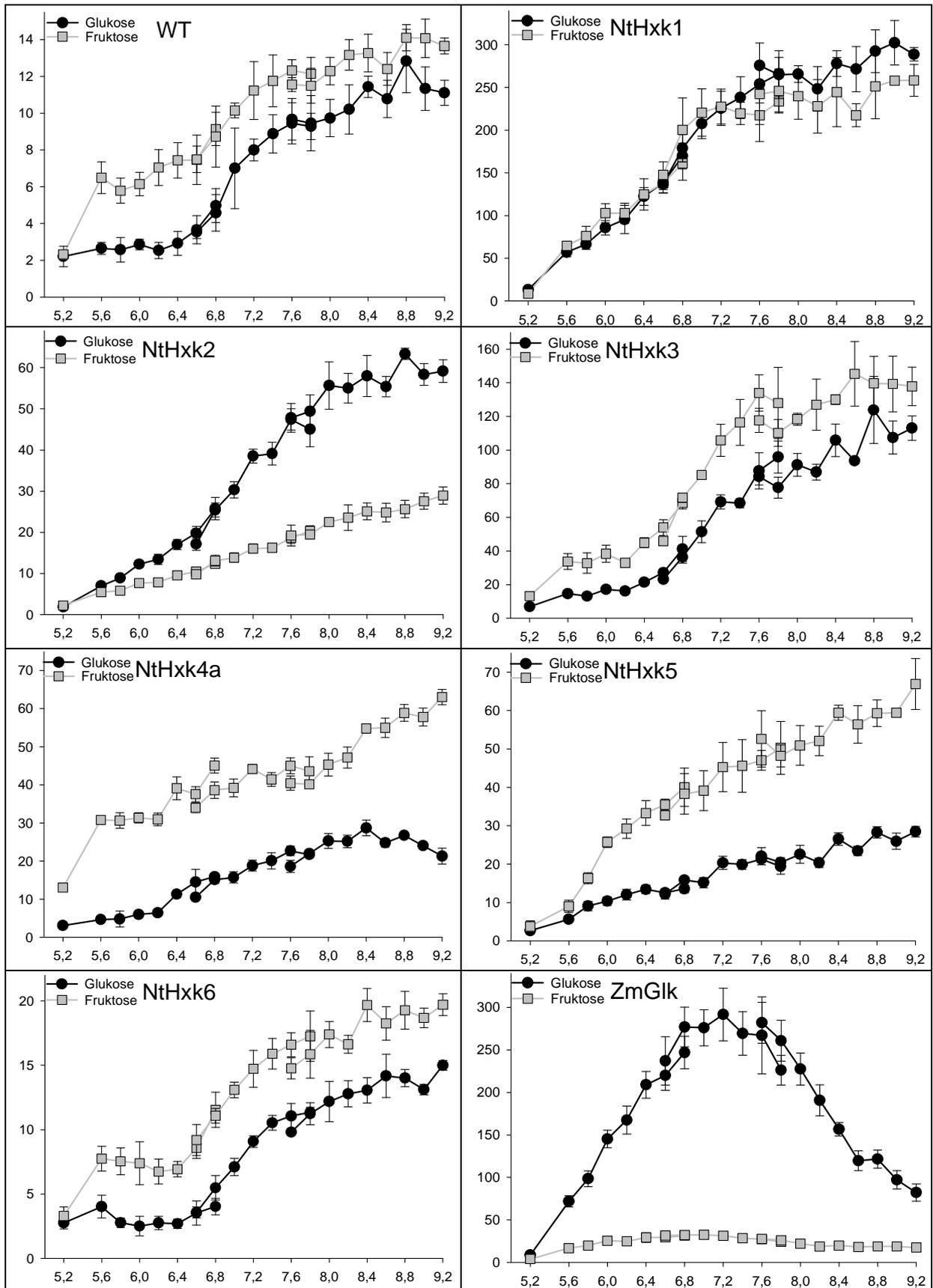


Abbildung 53: **pH**-Abhängigkeit der Hexokinase-Reaktion mit 20 mM Glukose (dunkle Kreise) und 20 mM Fruktose (helle Quadrate) in WT und Hexokinase überexprimierenden Pflanzen. Die Abszisse gibt den steigenden pH-Wert wieder, die Ordinate die Aktivität in $[\text{nmol} (\text{mg Protein})^{-1} \text{min}^{-1}]$. n=4 mit Standard-Abweichung.

3.9.3 Affinitäten der Hexokinasen zu Glukose

Alle Reaktionen mit Glukose als variablem Substrat folgten einer Michaelis-Menten-Kinetik, Sättigung wurde zwischen 200 und 500 μM Glukose erreicht (s. Abb. 54). K_m -Werte ohne Berücksichtigung einer eventuell vorhandenen endogenen Aktivität lagen zwischen 30 und 35 μM , lediglich NtHxk2 zeigte einen höheren K_m -Wert von 53 μM (s. Tab. 19). Nach Abzug der im WT gemessenen Aktivität erhöht sich der K_m -Wert nur bei der schwach aktiven NtHxk5 deutlich auf 47 μM , bei NtHxk2 auf 60 μM .

Tabelle 19: Messung der **Glukose**-Affinität von Hexokinasen in Rohextrakten von Wildtyp und Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen. Als Cosubstrat wurde 4 mM ATP eingesetzt. Aufgeführt sind apparente K_m -Werte und Maximalgeschwindigkeiten. In der linken Tabellenhälfte sind Rohwerte angegeben. In der rechten Tabellenhälfte sind die Werte um die im Wildtyp gemessene endogene Aktivität bereinigt. Als Fehler angegeben ist der Standardfehler, $2n=8$, $*2n=16$.

Isoform	K_m^{app}	V_{max}	$K_m^{\text{app-WT}}$	$V_{\text{max-WT}}$
	[μM Glc]	[$\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]	[μM Glc]	[$\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]
WT*	$29,5 \pm 1,5$	$9,3 \pm 0,1$	---	---
NtHxk1	$34,5 \pm 1,3$	273 ± 3	$34,7 \pm 1,4$	264 ± 3
NtHxk2	$52,7 \pm 1,9$	$54,1 \pm 0,6$	$60,0 \pm 2,7$	$45,0 \pm 0,7$
NtHxk3	$31,2 \pm 1,5$	104 ± 1	$30,2 \pm 1,2$	$92,6 \pm 1,1$
NtHxk4a	$35,4 \pm 1,7$	$29,7 \pm 0,4$	$38,7 \pm 2,7$	$20,4 \pm 0,4$
NtHxk5	$34,0 \pm 1,9$	$14,1 \pm 0,2$	$47,1 \pm 6,8$	$4,8 \pm 0,2$

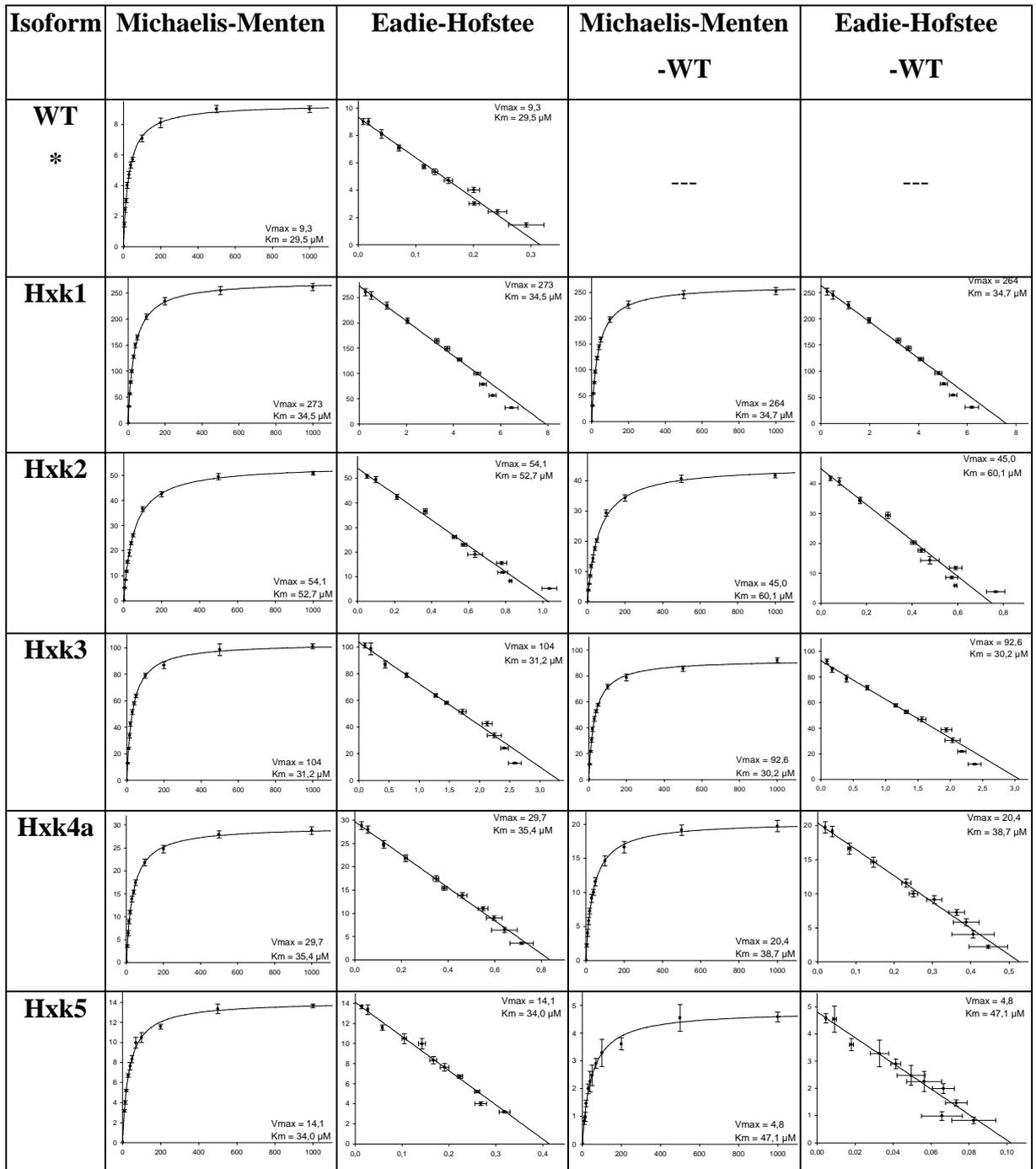


Abbildung 54: Messung der **Glukose**-Affinität von Hexokinasen in Rohextrakten von Wildtyp und Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen. Als Cosubstrat wurde 4 mM ATP eingesetzt. Direkte Auftragungen nach Michaelis-Menten (Abszisse: $\mu\text{M Glc}$, Ordinate: $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) und linearisierte nach Eadie-Hofstee (Abszisse: $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} / \mu\text{M Glc}$, Ordinate: $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). In der rechten Hälfte Auftragungen nach Abzug der entsprechenden im WT gemessenen Werte. $2n=8$, $*2n=16$ mit eingezeichnetem Standardfehler jedes Messwerts.

3.9.4 Affinitäten der Hexokinasen zu Mannose

Auch mit Mannose als variablem Substrat folgten alle Reaktionen einer Michaelis-Menten-Kinetik (s. Abb. 55). Sättigung wurde zwischen 200 und 500 μM Glukose erreicht, lediglich NtHxk2 benötigte 500-1500 μM . Die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion war bei allen Isoformen geringer als mit dem Substrat Glukose (s. Tab. 20). Der K_m -Wert von NtHxk1 und besonders von NtHxk2 war für Mannose höher als für Glukose. NtHxk3, NtHxk4a und die im WT gemessene Isoform dagegen besaßen eine höhere Affinität zu Mannose, NtHxk5 zeigte keine eindeutige Präferenz. Nach Subtraktion einer möglichen endogenen Hexokinase-Aktivität erhöhte sich der K_m -Wert von NtHxk2 für Mannose noch einmal deutlich auf 149 μM , die anderen Isoformen waren davon weniger betroffen. Es fällt auf, dass durch diese Korrektur der Reaktionsverlauf bei NtHxk4a und NtHxk5 deutlich von einer Michaelis-Menten-Kinetik abwich; ein Hinweis, dass die endogene Hexokinase in diesen Pflanzen eine geringere Aktivität aufwies als im WT.

Tabelle 20: Messung der **Mannose**-Affinität von Hexokinasen in Rohextrakten von Wildtyp und Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen. Als Cosubstrat wurde 4 mM ATP eingesetzt. Aufgeführt sind apparente K_m -Werte und Maximalgeschwindigkeiten. In der linken Tabellenhälfte sind Rohwerte angegeben. In der rechten Tabellenhälfte sind die Werte um die im Wildtyp gemessene endogene Aktivität bereinigt. Als Fehler angegeben ist der Standardfehler, $2n=8$. * $2n=16$.

Isoform	K_m^{app}	V_{max}	$K_m^{\text{app-WT}}$	$V_{\text{max-WT}}$
	[$\mu\text{M Man}$]	[$\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]	[$\mu\text{M Man}$]	[$\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]
WT*	$20,7 \pm 1,5$	$4,9 \pm 0,1$	---	---
NtHxk1	$43,6 \pm 1,6$	$208 \pm 2,5$	$44,4 \pm 1,7$	203 ± 3
NtHxk2	$96,4 \pm 5,1$	$22,9 \pm 0,3$	149 ± 10	$18,5 \pm 0,3$
NtHxk3	$25,1 \pm 1,0$	$69,0 \pm 0,7$	$25,5 \pm 1,0$	$64,1 \pm 0,7$
NtHxk4a	$14,9 \pm 1,2$	$10,1 \pm 0,2$	$10,8 \pm 1,8$	$5,2 \pm 0,2$
NtHxk5	$32,4 \pm 3,0$	$7,5 \pm 0,2$	$77,2 \pm 21,1$	$3,0 \pm 0,3$

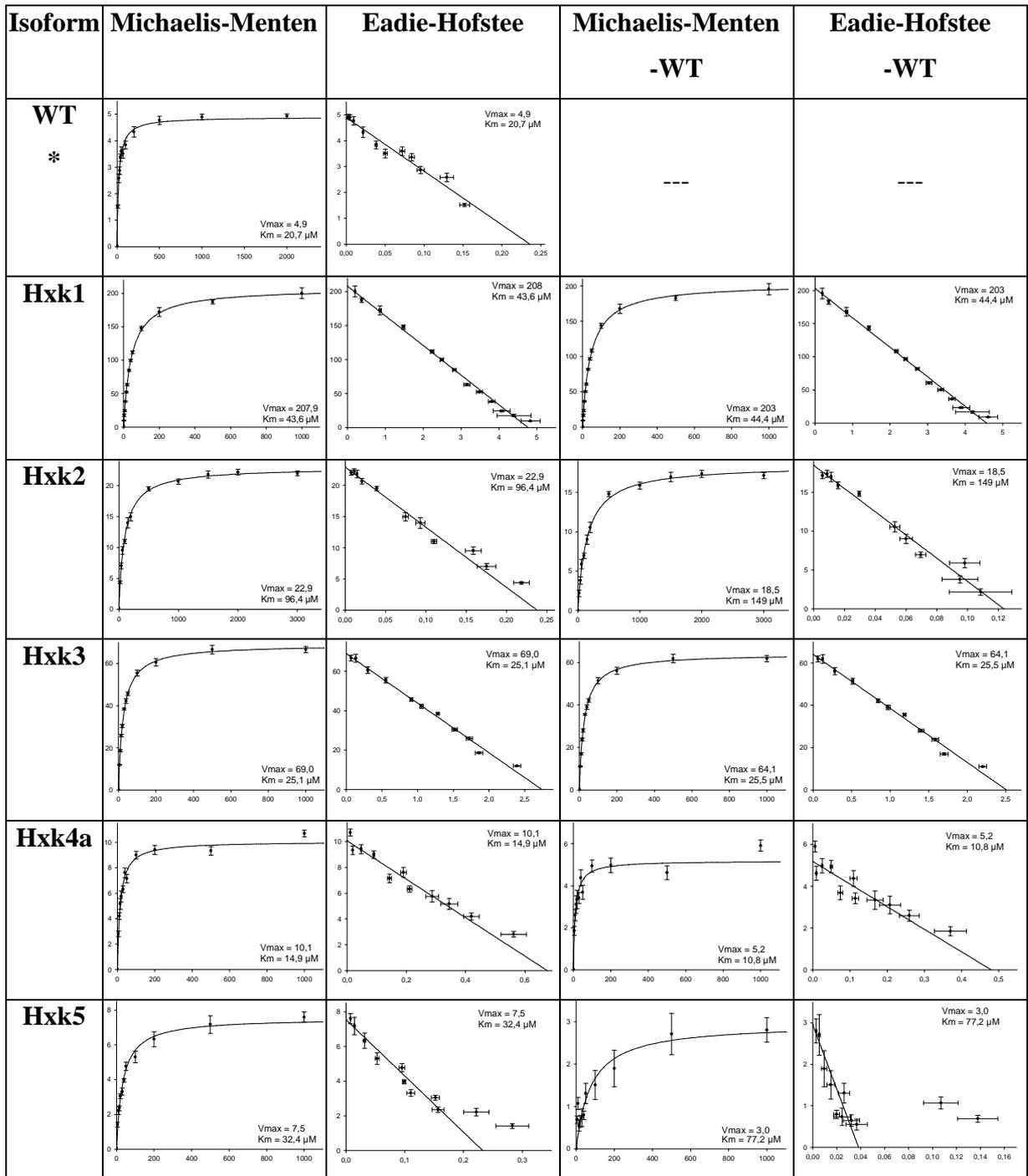


Abbildung 55: Messung der **Mannose**-Affinität von Hexokinasen in Rohextrakten von Wildtyp und Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen. Als Cosubstrat wurde 4 mM ATP eingesetzt. Direkte Auftragungen nach Michaelis-Menten (Abszisse: μM Man, Ordinate: $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) und linearisierte nach Eadie-Hofstee (Abszisse: $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} / \mu\text{M}$ Man, Ordinate: $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). In der rechten Hälfte Auftragungen nach Abzug der entsprechenden im WT gemessenen Werte. $2n=8$, $*2n=16$ mit eingezeichnetem Standardfehler jedes Messwerts.

3.9.5 Affinitäten der Hexokinasen zu Fruktose

Mit Fruktose als Substrat war ein zweiphasiger Reaktionsverlauf zu beobachten, der auf die zusätzliche Aktivität einer Fruktokinase zurückzuführen ist (s. Abb. 56). Der Einfluss dieser Fruktokinase auf das Messergebnis war umso stärker, je schwächer die zu messende Hexokinase aktiv war, also maximal im WT und minimal bei NtHxk1. Sättigung dieser Fruktokinase wurde bei 500 μM erreicht, der K_m -Wert lag bei 82 μM . Wegen dieser Aktivität ließ sich für die im WT gemessene Hexokinase keine ausreichend genaue Kinetik erstellen. Für eine grobe Schätzung wurde angenommen, dass sich die Fruktokinase-Aktivität oberhalb von 1 mM Fruktose nicht änderte. Die bei 1 mM Fruktose zu messende Aktivität wurde daher als Hintergrund definiert und von den Messwerten bei höheren Konzentrationen subtrahiert. Die Messwerte der überexprimierten Hexokinasen wurden dagegen um die gesamte im WT gemessene Aktivität korrigiert.

Die im WT gemessene Hexokinase wurde erst von Fruktose-Konzentrationen oberhalb 100 mM gesättigt, der K_m -Wert wurde grob mit 20 mM bestimmt.

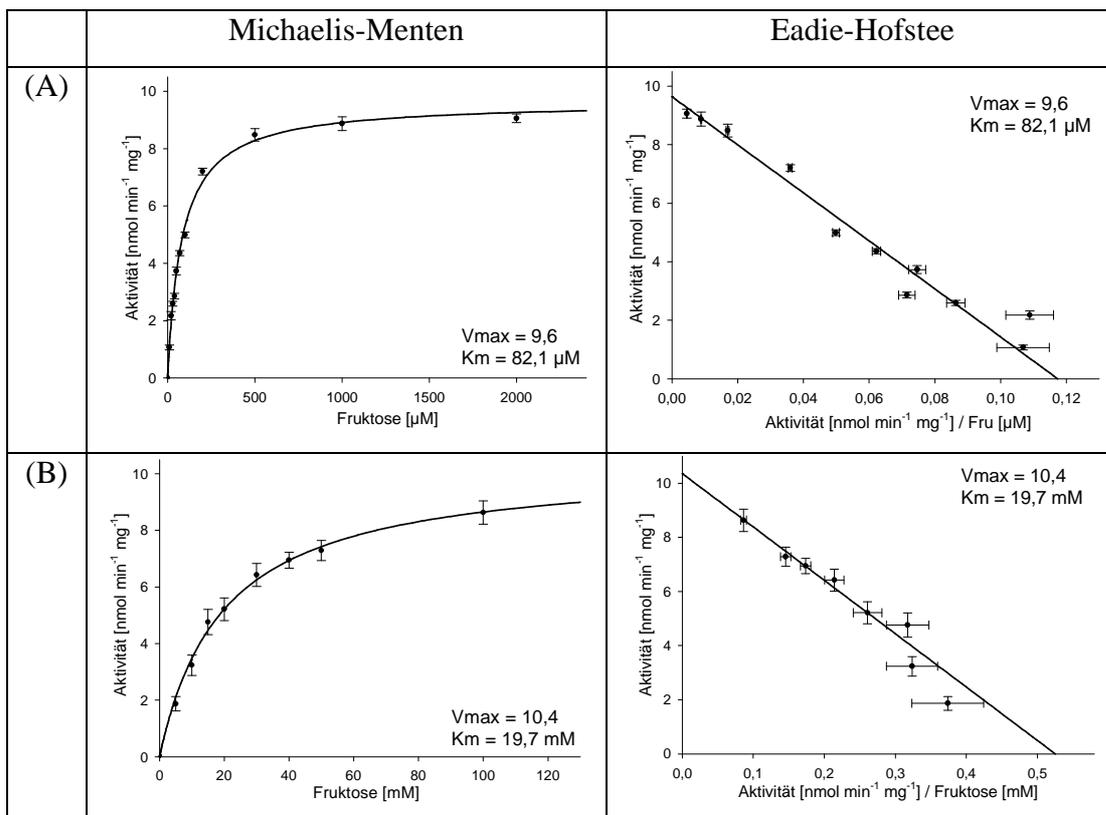


Abbildung 56: Messung der **Fruktose**-Affinität von Fruktokinasen und Hexokinasen in Rohextrakten von WT-Tabakpflanzen. Als Cosubstrat wurde 4 mM ATP eingesetzt. Direkte Auftragungen nach Michaelis-Menten (links) und linearisierte nach Eadie-Hofstee (rechts). **(A)** Fruktose-phosphorylierende Aktivität im mikromolaren Bereich. **(B)** Fruktose phosphorylierende Aktivität im millimolaren Bereich nach Subtraktion der in (A) gezeigten Aktivität. Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder, $2n=8$.

Affinitäten der überexprimierten Isoformen zu Fruktose waren deutlich geringer als zu Glukose oder Mannose (s. Tab. 21). Maximale Aktivität mit Fruktose wurde von NtHxk4a und NtHxk5 oberhalb von 50 mM erreicht, K_m -Werte der beiden lagen bei auffällig niedrigen 2-3 mM. NtHxk1 und NtHxk3 benötigten mindestens 100 mM Fruktose zur Sättigung, ihre K_m -Werte lagen bei 11-12 bzw. 7-8 mM. NtHxk2 benötigte mit mindestens 200 mM Fruktose am meisten Substrat zur Sättigung, ihr K_m -Wert lag unkorrigiert bei 14 mM (s. Abb. 57). Die Berücksichtigung einer potentiellen endogenen Hexokinase wirkte sich besonders auf den K_m -Wert von NtHxk2 aus, der dadurch von 14 auf 25 mM korrigiert wurde. Bei NtHxk4a und NtHxk5 wurde ohne Korrektur eine negative Kooperativität festgestellt. Nach Subtraktion der im WT gemessenen Aktivität, auch alleine durch Subtraktion der Fruktokinase-Aktivität, war diese Kooperativität nicht mehr festzustellen. Die Maximalgeschwindigkeit mit Fruktose war bei NtHxk2 geringfügig niedriger als mit Glukose, bei den anderen Isoformen dagegen höher.

Tabelle 21: Messung der **Fruktose**-Affinität von Hexokinasen in Rohextrakten von Wildtyp und Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen. Als Cosubstrat wurde 4 mM ATP eingesetzt. Aufgeführt sind apparente K_m -Werte und Maximalgeschwindigkeiten. In der linken Tabellenhälfte sind Rohwerte angegeben. In der rechten Tabellenhälfte sind die Werte um die im Wildtyp gemessenen endogenen Aktivität bereinigt. Als Fehler angegeben ist der Standardfehler, $2n=8$. *NtHxk4a weist ohne Berücksichtigung endogener Aktivitäten eine negative Kooperativität mit Fruktose auf, $n_H=0,63 \pm 0,03$. **NtHxk5 weist ohne Berücksichtigung endogener Aktivitäten eine negative Kooperativität mit Fruktose auf, $n_H=0,61 \pm 0,04$.

Isoform	K_m^{app}	V_{max}	K_m^{app} -WT	V_{max} (Fru) -WT
	[mM Fru]	[nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]		
WT FK	0,082 ± 0,003	9,6 ± 0,1	---	---
WT Hxk	19,7 ± 2,8	10,4 ± 0,6	---	---
NtHxk1	10,9 ± 0,5	351 ± 5	12,1 ± 0,6	340 ± 5
NtHxk2	13,9 ± 0,7	51,0 ± 0,7	25,2 ± 1,9	34,2 ± 0,8
NtHxk3	7,4 ± 0,2	209 ± 2	8,2 ± 0,3	194 ± 2
NtHxk4a*	2,7 ± 0,3	53,9 ± 1,4	2,1 ± 0,1	30,8 ± 0,3
NtHxk5**	2,7 ± 0,4	57,2 ± 2,3	2,0 ± 0,1	32,9 ± 0,5

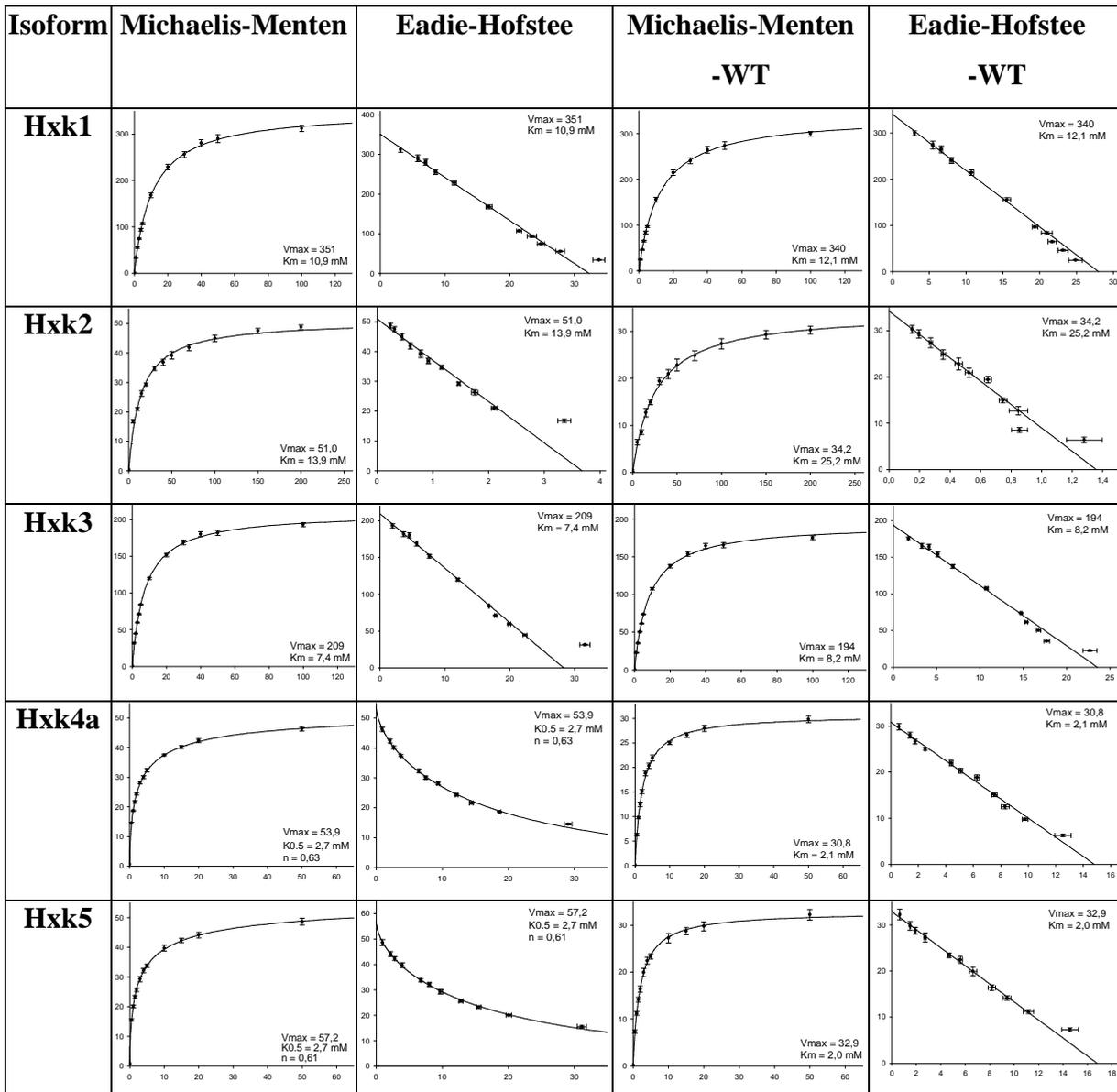


Abbildung 57: Messung der **Fruktose**-Affinität von Hexokinasen in Rohextrakten von Hexokinase über-exprimierenden Tabakpflanzen. Als Cosubstrat wurde 4 mM ATP eingesetzt. Direkte Auftragungen nach Michaelis-Menten (Abszisse: mM Fru, Ordinate: $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) und linearisierte nach Eadie-Hofstee (Abszisse: $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} / \text{mM Fru}$, Ordinate: $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). In der rechten Hälfte Auftragungen nach Abzug der entsprechenden im WT gemessenen Werte. $2n=8$ mit eingezeichnetem Standardfehler jedes Messwerts.

3.9.6 Phosphorylierungskoeffizienten der untersuchten Hexokinase-Isoformen

Der relative Phosphorylierungskoeffizient PK_G (Sols und Crane, 1954) ist ein Indikator für die physiologische Eignung eines Hexokinase-Substrats im Vergleich zu Glukose. Er berechnet sich folgendermaßen:

$$PK_G = (V_{\max}^{\text{Substrat}} / V_{\max}^{\text{Glukose}}) \times (K_m^{\text{Glukose}} / K_m^{\text{Substrat}})$$

Für Glukose als Substrat gilt der Wert 1. Aufgrund der etwa hundertfach höheren Affinität zu Glukose und Mannose gegenüber Fruktose ist der Phosphorylierungskoeffizient für Fruktose sehr klein (s. Tab. 22).

Tabelle 22: Phosphorylierungskoeffizienten der einzelnen Hexokinase-Isoformen, in der rechten Hälfte unter Berücksichtigung einer potentiell vorhandenen endogenen Hexokinase-Aktivität in den transgenen Pflanzen.

Isoform	PK_G (Man)	PK_G (Fru)	PK_G (Man-WT)	PK_G (Fru-WT)
WT	0,75	0,002	---	---
NtHxk1	0,60	0,004	0,60	0,004
NtHxk2	0,23	0,004	0,17	0,002
NtHxk3	0,82	0,008	0,82	0,008
NtHxk4a	0,81	0,032	0,91	0,028
NtHxk5	0,56	0,071	0,38	0,161

3.9.7 Affinitäten der Hexokinase-Isoformen zu ATP

Mit 1 mM Glukose als Cosubstrat wurde die Affinität der Hexokinasen zu ATP ermittelt. Dabei fielen deutliche Abweichungen zur Michaelis-Menten-Kinetik auf. Die im WT gemessene Hexokinase, NtHxk1, 2 und 3 zeigten eine Hill-Kinetik mit negativer Kooperativität (s. Abb. 58). Der sättigende Bereich wurde auch mit 4 mM ATP nicht erreicht. Halbmaximale Aktivität wurde von NtHxk1 mit 0,15 mM ATP erreicht, für NtHxk3 und die im WT gemessene Hexokinase waren zwischen 0,2 und 0,3 mM notwendig (s. Tab. 23). Die Affinität von NtHxk2 zu ATP war mit 0,55 bis 0,62 mM deutlich geringer.

NtHxk4a und NtHxk5 zeigten eine deutlich geringer ausgeprägte negative Kooperativität und mit 40 bzw. 14 μ M auffällig niedrige K_m - bzw. $K_{0,5}$ -Werte. Durch Subtraktion der potentiellen endogenen Hexokinase wurden diese Werte noch weiter verringert, allerdings konnten die Messwerte dann, besondere von NtHxk5, keinem Kinetiktyp mehr eindeutig zugeordnet werden. Dies ist wieder ein Hinweis, dass die endogene Hexokinase in diesen Pflanzen eine geringere Aktivität aufwies als im WT.

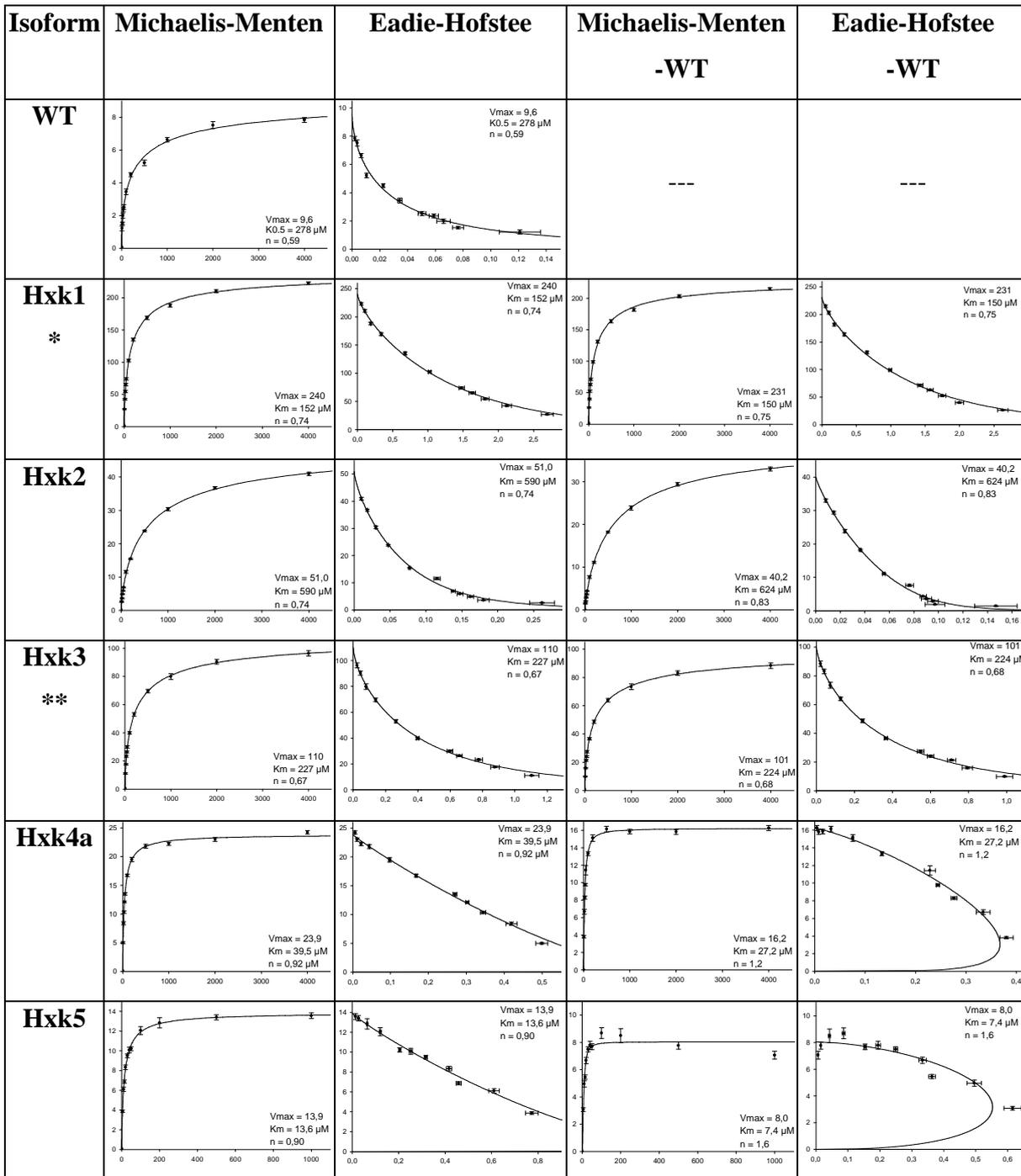


Abbildung 58: Messung der ATP-Affinität von Hexokinasen in Rohextrakten von Wildtyp und Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen. Als Cosubstrat wurde 1 mM Glukose eingesetzt. Direkte Auftragungen nach Michaelis-Menten (Abszisse: μM ATP, Ordinate: $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) und linearisierte nach Eadie-Hofstee (Abszisse: $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} / \mu\text{M}$ ATP, Ordinate: $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). In der rechten Hälfte Auftragungen nach Abzug der entsprechenden im WT gemessenen Werte. $2n=16$, $*2n=15$, $**2n=8$ mit eingezeichnetem Standardfehler jedes Messwerts.

Tabelle 23: Messung der ATP-Affinität von Hexokinasen in Rohextrakten von Wildtyp und Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen. Als Cosubstrat wurde 1 mM Glukose eingesetzt. Aufgeführt sind apparente $K_{0,5}$ -Werte, Maximalgeschwindigkeiten und Hill-Koeffizienten. In der linken Tabellenhälfte sind Rohwerte angegeben. In der rechten Tabellenhälfte sind die Werte um die im Wildtyp gemessene endogene Aktivität bereinigt. Als Fehler angegeben ist der Standardfehler, $2n=16$, $*2n=15$, $**2n=8$.

Isoform	$K_{0,5}^{app}$	V_{max}	n_H	$K_{0,5}^{app} - WT$	$V_{max} - WT$	$n_H - WT$
	[μM ATP]	[$nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$]		[μM ATP]	[$nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$]	
WT	278 ± 60	$9,6 \pm 0,5$	$0,60 \pm 0,04$	---	---	---
NtHxk1*	152 ± 8	240 ± 3	$0,74 \pm 0,02$	150 ± 8	231 ± 3	$0,75 \pm 0,02$
NtHxk2	590 ± 43	$51,0 \pm 1,1$	$0,74 \pm 0,02$	624 ± 44	$40,2 \pm 0,9$	$0,83 \pm 0,02$
NtHxk3**	227 ± 23	110 ± 3	$0,67 \pm 0,02$	224 ± 24	101 ± 3	$0,68 \pm 0,02$
NtHxk4a	$39,5 \pm 1,3$	$23,9 \pm 0,2$	$0,92 \pm 0,03$	$27,2 \pm 0,9$	$16,2 \pm 0,2$	$1,23 \pm 0,06$
NtHxk5	$13,6 \pm 0,8$	$13,9 \pm 0,3$	$0,90 \pm 0,07$	$7,4 \pm 0,6$	$8,0 \pm 0,2$	$1,65 \pm 0,23$

3.9.8 Inhibition der Hexokinase-Isoformen durch ADP

ADP wurde als kompetitiver Inhibitor in Bezug auf ATP für Hexokinasen aus Kartoffel (Renz und Stitt, 1993) und Tomate (Martinez-Barajas und Randall, 1998) beschrieben. In Keimlingswurzeln von Mais konnten zwei Hexokinasen unterschieden werden, von denen die zytosolische von bis zu 1 mM ADP nicht gehemmt wurde, die mitochondriale dagegen nichtkompetitiv zu ATP und Glukose (Galina *et al.*, 1995).

Die Messungen wurden mit 1 mM Glukose im Messpuffer durchgeführt, Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe variabler Mengen ATP. Inhibition wurde durch Vorlage von ADP im Messpuffer getestet. Eine eventuell vorhandene endogene Hexokinase-Aktivität in den transgenen Pflanzen konnte bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

NtHxk1, 2, 3 und die im WT gemessene Hexokinase wurden kompetitiv durch ADP inhibiert, d.h. der K_m -Wert für ATP stieg, während V_{max} im Rahmen der Messgenauigkeit konstant blieb. Der Hill-Koeffizient vergrößerte sich etwas, d.h. die negative Kooperativität verringerte sich (s. Abb. 59). Die inhibitorische Konstante K_i für ADP wurde grafisch ermittelt durch Auftragung der ermittelten $K_{0,5}$ -Werte über der Inhibitor-Konzentration. K_i ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Regressionsgerade mit der x-Achse. Für NtHxk1 und NtHxk3 betrug der Wert 23 μM , für NtHxk2 49 μM (s. Tab. 24). Der Wert von 12 μM für die im WT gemessene Hexokinase ist aufgrund der Messungenauigkeit mit einem großen Unsicherheitsfaktor behaftet (s. Tab. 24).

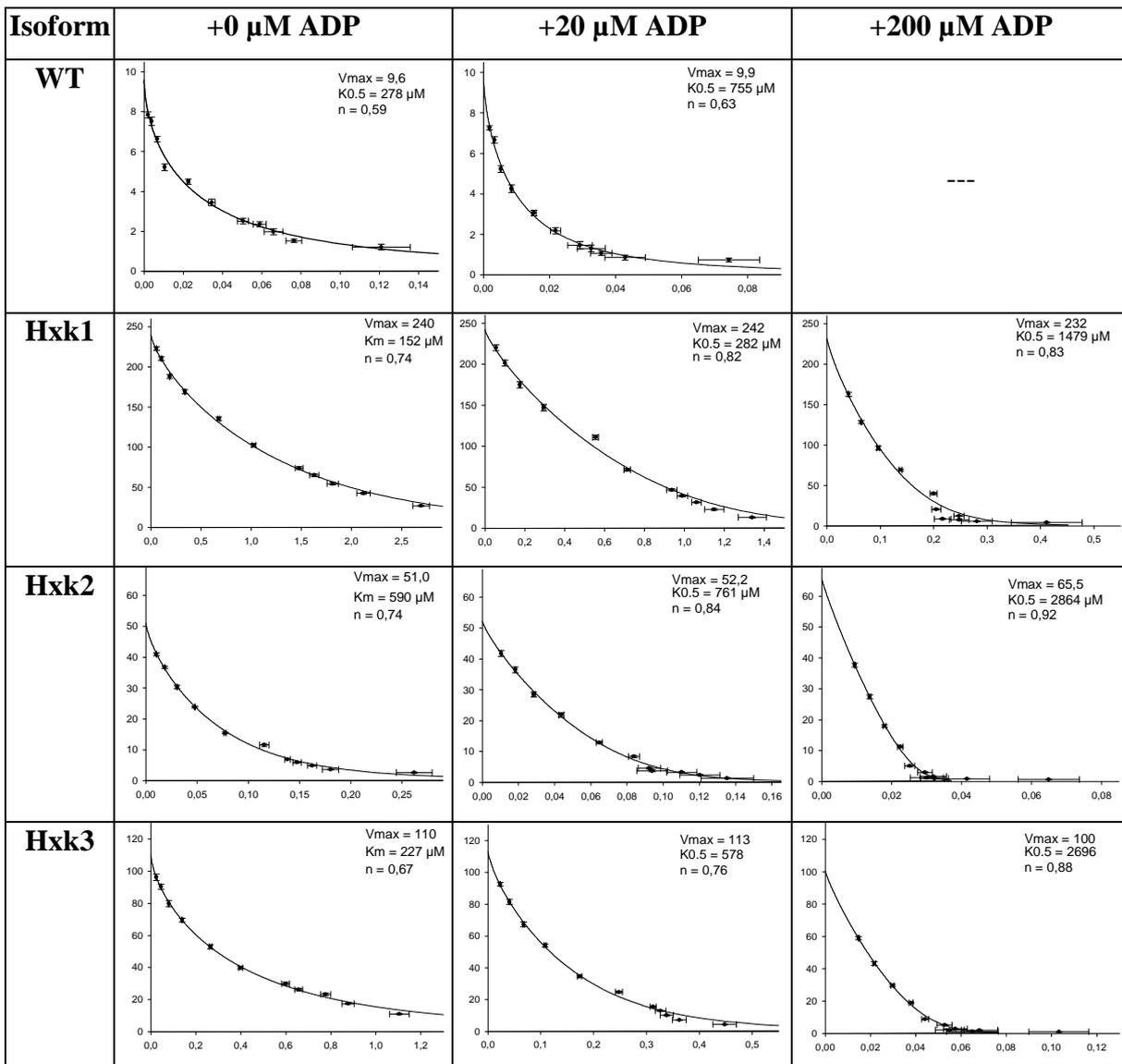


Abbildung 59: Messung der ATP-Affinität von Hexokinasen in Rohextrakten von Wildtyp und Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen ADP. Als Cosubstrat wurde 1 mM Glukose eingesetzt. Hill-Auftragungen nach Eadie-Hofstee (Abszisse: $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1} / \mu\text{M ATP}$, Ordinate: $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). Mit eingezeichnet ist der Standardfehler jedes Messwerts, n wie in Tabelle 23.

Tabelle 24: Kompetitive Inhibition von im WT gemessener Hexokinase, NtHxk1, 2 und 3 durch ADP in Bezug auf ATP. Die K_i -Werte wurden grafisch ermittelt. Als Fehler angegeben ist der Standardfehler, $2n=8$, $*2n=16$, $**2n=15$.

Isoform	$K_{0.5}$ [μM]	$K_{0.5}$ [μM]	$K_{0.5}$ [μM]	K_i (ADP) [μM]
	0 μM ADP	20 μM ADP	200 μM ADP	
WT*	278 ± 60	755 ± 208	---	12
NtHxk1	152 ± 8 **	282 ± 21	1479 ± 161	23
NtHxk2*	590 ± 43	761 ± 87	2863 ± 416	49
NtHxk3	227 ± 23	578 ± 48	2696 ± 410	23

NtHxk4a und NtHxk5 wurden nichtkompetitiv gehemmt, d.h. bei ihnen sank V_{\max} , während K_m konstant blieb. K_i -Werte wurden mit 142 ± 9 bzw. $76 \pm 6 \mu\text{M}$ berechnet (s. Abb. 60).

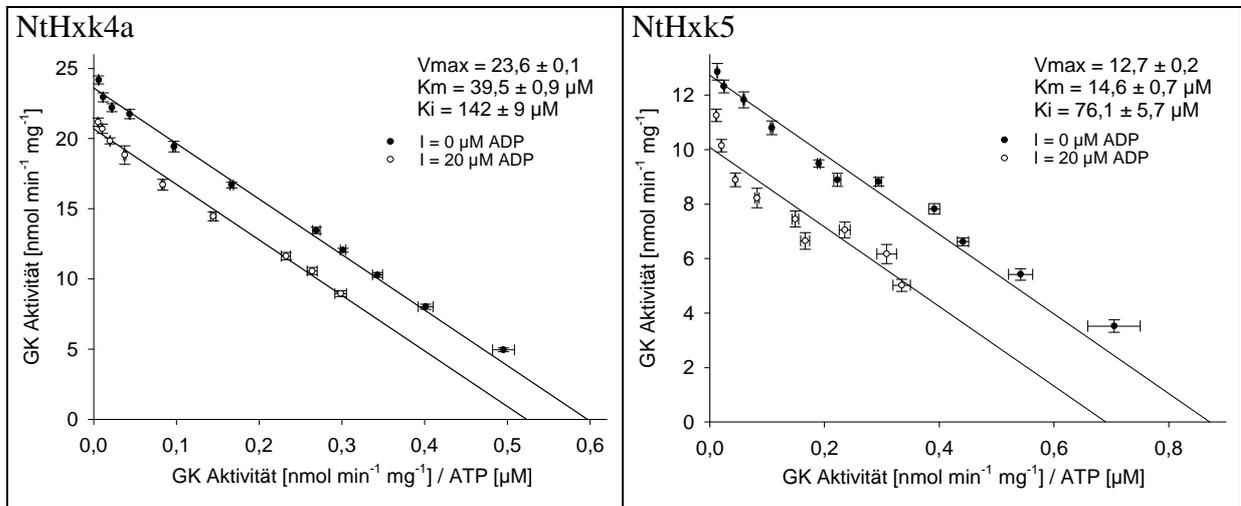


Abbildung 60: Nichtkompetitive Inhibition von NtHxk4a und NtHxk5 durch ADP in Bezug auf ATP. Linearisierte Auftragungen nach Eadie-Hofstee. Als Cosubstrat wurde 1 mM Glukose eingesetzt. Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder, NtHxk4a: $2n=16$, NtHxk5: $2n=8$.

3.9.9 Aktivität mit ADP

Bei den Messungen zur Inhibition durch ADP fiel eine Hintergrund-Aktivität auf, die mit ADP und ohne ATP ablief. Mit $100 \mu\text{M ADP}$ zeigten die Hexokinase des WT, NtHxk1, 2 und 3 ca. ein Zehntel der Aktivität, die sie mit $100 \mu\text{M ATP}$ aufwiesen. Bei NtHxk4a und NtHxk5 war diese Aktivität besonders auffällig und betrug ca. ein Drittel der mit $100 \mu\text{M ATP}$ möglichen Aktivität. Auffällig war der um 10-20 Minuten verzögert einsetzende Beginn der Reaktion. Zwar gibt es ADP nutzende Hexokinasen, allerdings unterscheiden sich diese strukturell von den hier behandelten (Ronimus und Morgan, 2004). Es ist daher anzunehmen, dass die hier beobachteten Aktivitäten nicht direkt mit ADP abliefen, sondern dass das von einer Adenylatkinase aus ADP synthetisierte ATP für die Reaktion genutzt wurde. Adenylatkinase (auch Myokinase genannt) katalysiert die reversible Umwandlung von 2 ADP in $\text{ATP} + \text{AMP}$ (Kawai und Uchimiya, 1995). Die in den Rohextrakten gemessene Adenylatkinase-Aktivität lag bei $75\text{--}90 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ mit jeweils $100 \mu\text{M AMP}$ und ATP als Substraten (s. 2.9.3). Durch Zugabe von $500 \mu\text{M}$ Endkonzentration des Inhibitors Ap_5A ($\text{P}^1, \text{P}^5\text{-Di(adenosin-5')pentaphosphat}$, Lienhard und Secemski, 1973) wurde die Aktivität auf $15\text{--}20 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ gesenkt. Auch diese Aktivität reichte theoretisch für die beobachteten

Hexokinase-Aktivitäten aus. Eine käufliche Adenylatkinase aus Kaninchenmuskel wurde dagegen durch den Inhibitor vollständig inhibiert.

Da ADP für die Tabak-Hexokinasen als Inhibitor wirkt, ergibt sich für die Reaktion eine komplexe Abhängigkeit von der Konzentration. Diese wurde für NtHxk4a überprüft und ähnelte einer Substratinhibition (s. Abb. 61).

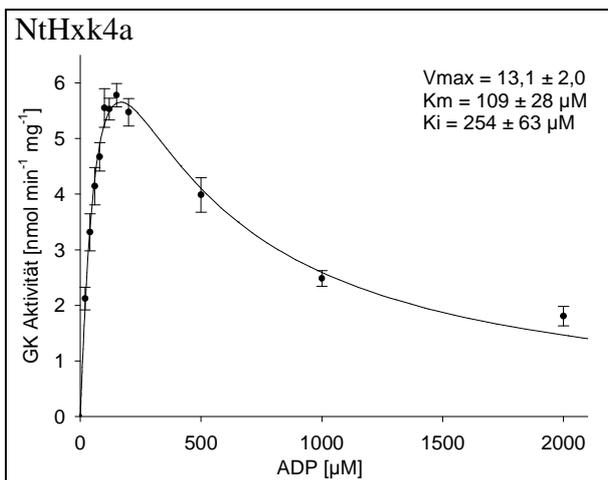


Abbildung 61: Komplexer Reaktionsverlauf von NtHxk4a in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration (ohne extra ATP). Als Cosubstrat wurde 1 mM Glukose verwendet. Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder, $2n=8$.

3.9.10 Inhibition durch AMP

Weniger erforscht als die Inhibition durch ADP ist diejenige durch AMP. Für Hexokinasen aus Kartoffel (Renz und Stitt, 1993) und Tomate (Martinez-Barajas und Randall, 1998) wurde eine schwache inhibitorische Wirkung erwähnt, Hexokinasen aus Mais-Keimlingswurzeln wurden nicht inhibiert (Galina *et al.*, 1995).

Getestet wurde Inhibition durch AMP mit 100 µM ATP im Messansatz, dem wahlweise 100 µM AMP zugefügt wurde. Start der Reaktion erfolgte mit 1 mM Glukose. In einem weiteren Ansatz wurde 500 µM des Adenylatkinase-Inhibitors Ap₅A beigemischt (s. 3.9.9). Dadurch sollte verhindert werden, dass ATP und AMP zu ADP reagierten und so verfälschenden Einfluss nahmen.

Ohne Ap₅A zeigte sich eine inhibitorische Wirkung des AMP besonders stark bei der im WT gemessenen Hexokinase und bei NtHxk3. Die Zugabe von Ap₅A zeigte allerdings, dass diese inhibitorische Wirkung nicht auf AMP selber beruhte, sondern auf dem durch Adenylatkinase synthetisierten ADP, wobei gleichzeitig ATP verbraucht wurde (s. Abb. 62).

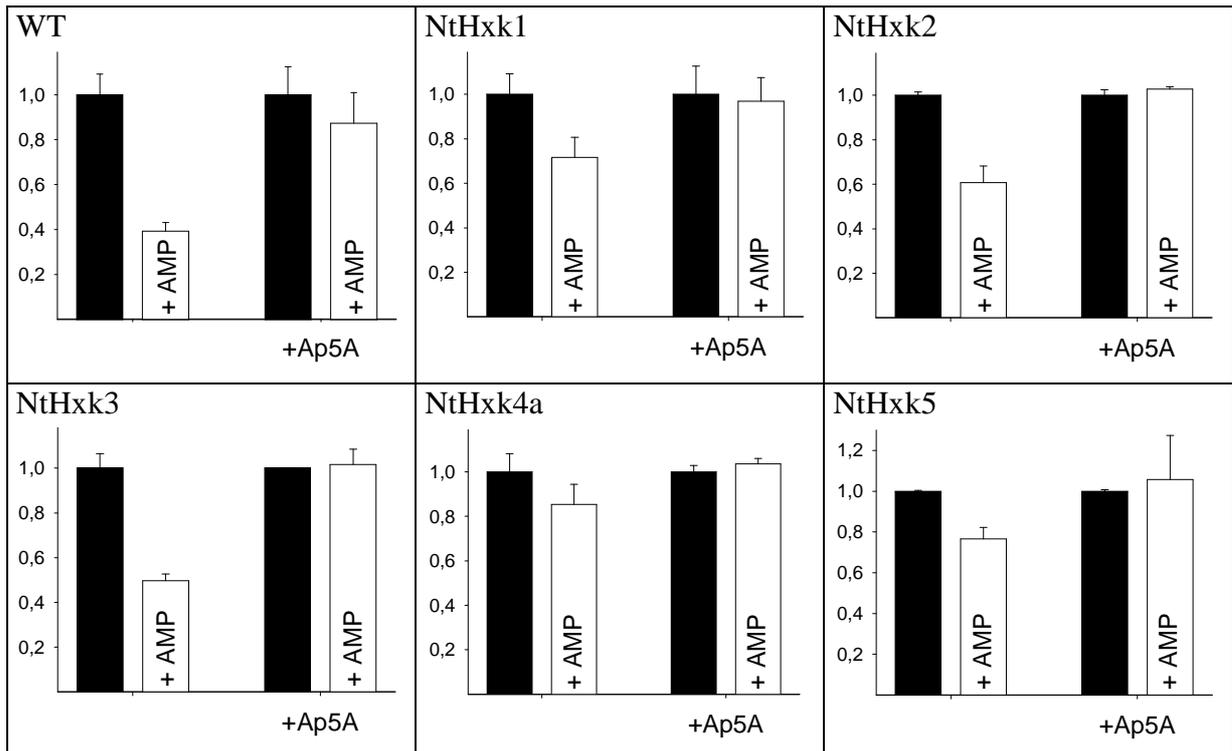


Abbildung 62: Inhibition durch AMP von Hexokinasen in Rohextrakten von Wildtyp und Hexokinase überexprimierenden Tabakpflanzen in Abwesenheit und Gegenwart des Adenylatkinase-Inhibitors Ap₅A. Als Cosubstrat wurde 1 mM Glukose eingesetzt. Angegeben sind relative Werte, n=2 mit Abweichungen vom Mittelwert.

3.9.11 Inhibition durch Trehalose-6-phosphat

Trehalose-6-phosphat wurde für einige pilzliche Hexokinasen als kompetitiver Inhibitor zu Glukose und Fruktose beschrieben. Mit 1 mM Glukose oder 10 mM Fruktose als Substrat wurde durch 1 mM Trehalose-6-phosphat eine Inhibition von 23-100 % erreicht. Auch Hexokinase aus Rattenhirn war davon betroffen (Blazquez *et al.*, 1993).

Zum Testen der Tabak-Hexokinasen und der Glukokinase aus *Zymomonas mobilis* wurden Messungen mit 0,5 mM Glukose und 2 mM ATP als Substrate bei pH 8,4 durchgeführt. Im Messpuffer wurden 0, 10, 100 oder 1000 µM Trehalose-6-phosphat vorgelegt. In keinem Fall wurde die Reaktion dadurch signifikant beeinflusst. Trehalose-6-phosphat ist demnach kein Inhibitor der getesteten Hexokinasen.

4 DISKUSSION

Hexokinasen katalysieren die Phosphorylierung von Glukose und eingeschränkt auch anderer Hexosen. Dadurch werden diese Zucker dem weiteren Stoffwechsel zugeführt.

Das Vorkommen verschiedener Hexokinase-Isoformen innerhalb eines Organismus legt nahe, dass diese Isoformen wohldefinierte unterschiedliche Aufgaben im Metabolismus besitzen. Zur Klärung dieser unterschiedlichen Aufgaben sind Kenntnisse der zellulären und subzellulären Lokalisierung der Isoformen unerlässlich. Das Wissen über diese Lokalisierung ist derzeit noch sehr lückenhaft. In den letzten Jahren rückte die Rolle pflanzlicher Hexokinasen als Zuckersensor in den Mittelpunkt des Interesses. Für *Arabidopsis thaliana* liegen inzwischen überzeugende Daten vor, die diese These unterstützen. Durch gezielte Mutagenese von AtHxk1 wurden Hexokinasen erzeugt, die trotz fehlender katalytischer Aktivität Eigenschaften eines Zuckersensors zeigten (Moore *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Hexokinase-Isoformen aus Tabak isoliert und charakterisiert. Die dabei gewonnen Ergebnisse erlauben es, konkrete Aufgabenbereiche der entsprechenden Isoformen zu postulieren und Modelle aufzustellen.

4.1 Anzahl der Hexokinase-Gene in Tabak

Aus Tabak wurden mehrere Hexokinase-Sequenzen isoliert, die die Transkription von mindestens sieben verschiedenen Isoformen belegen. Diese Isoformen wurden entsprechend ihrer Entdeckung fortlaufend von eins bis sieben nummeriert und veröffentlicht (s. 3.1.1). Laut Southern-Analyse ist anzunehmen, dass *NtHxk1* und *NtHxk1a* verschiedene Allele des gleichen Gens sind. Gleiches gilt für *NtHxk4a* und *NtHxk4b* (s. 3.2).

Die verschiedenen Isoformen sind unterschiedlichen Homologiegruppen zuzuordnen. *NtHxk1*, 3 und 7 bilden eine Gruppe nah verwandter Gene. Laut Southern-Analyse gibt es im Tabakgenom vier verschiedene Gene dieser Gruppe. Das vierte Gen ist vermutlich identisch mit *NsHxk3* aus *Nicotiana sylvestris*. *NtHxk1a* und *NtHxk7* sind nahezu identisch im Genom von *Nicotiana sylvestris* als *NsHxk1* bzw. *NsHxk4* konserviert.

NtHxk4 und *NtHxk5* bilden eine weitere Homologiegruppe im Tabakgenom. Laut Southern-Analyse gibt es keine weiteren Isoformen dieser Gruppe. Eines der beiden Gene ist auch im Genom von *Nicotiana sylvestris* vorhanden.

NtHxk1, 3, 4, 5 und 7 sind Mitglieder der übergeordneten Homologiegruppe der Typ B2 Hexokinasen (Olsson *et al.*, 2003). Diese zeichnen sich durch einen N-terminalen Membrananker aus.

Das NtHxk6-Protein besitzt ebenfalls einen N-terminalen Membrananker, gehört allerdings der noch sehr kleinen und bislang komplett unerforschten Homologiegruppe der Typ B1 Hexokinasen an. Laut Southern-Analyse befinden sich zwei homologe Gene im Tabakgenom, von denen eines auch im Genom von *Nicotiana sylvestris* vorkommt.

NtHxk2 gehört zu der Gruppe der Typ A Hexokinasen ohne Membrananker und mit plastidärem Transitpeptid. Im Tabakgenom befinden sich zwei Gene dieser Gruppe, von denen eines, *NsHxk2*, im Genom von *Nicotiana sylvestris* konserviert ist.

Zusammengefasst besitzt Tabak mindestens zehn Hexokinase-Gene: *NtHxk1-7* plus je ein Homolog zu *NtHxk2*, 3 und 6. Es ist nicht bekannt, ob die letztgenannten drei Homologe in Tabak auch tatsächlich transkribiert werden; entsprechende cDNAs wurden nicht gefunden.

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* sind sechs Hexokinase-Gene bekannt. Zu fünf von ihnen gibt es entsprechende nah verwandte Gene bei Tabak, lediglich zu *At4g37840* ist kein direktes Homolog bekannt (s. Abb. 5 und 63). Möglicherweise befinden sich auch im Tabakgenom ein oder zwei entsprechende Gene, die noch nicht gefunden wurden.

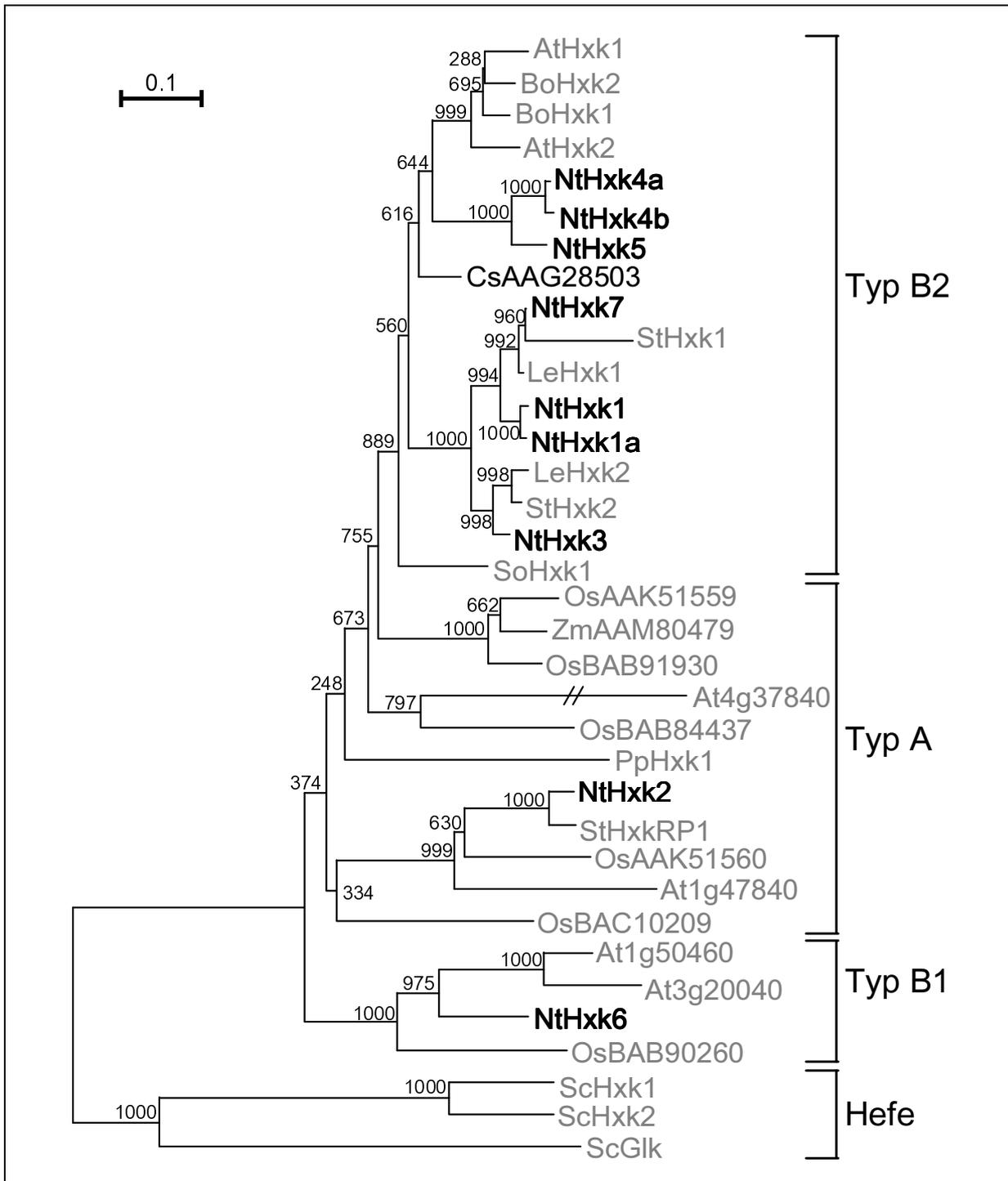


Abbildung 63: Phylogenetischer Baum pflanzlicher Hexokinase-Proteine mit denen der Bäckerhefe als Extragruppe. Reproduktion des von Olsson *et al.* (2003) erstellten Baums mit zusätzlichen Tabak-Hexokinase 1-7. Benennung der Sequenzen mit Kürzel des Organismus, gefolgt von Namen oder Akzessionsnummer des Proteins. At: *Arabidopsis thaliana*, Bo: *Brassica oleracea*, Nt: *Nicotiana tabacum*, Cs: *Citrus sinensis*, Le: *Lycopersicon esculentum*, St: *Solanum tuberosum*, So: *Spinacia oleracea*, Os: *Oryza sativa*, Zm: *Zea mais*, Pp: *Physcomitrella patens*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*. Sequenzen wurden am N- und C-Terminus entsprechend den AS 61-443 von PpHxk1 gekürzt, um Verfälschungen durch diese zwischen den Proteinen stärker divergierender Bereiche zu vermeiden. Baumerstellung mit Korrektur multipler Substitutionen, Ausschluss lückenhafter Positionen, Bootstrapping. Der Maßstab gibt die Anzahl von Substitutionen pro Aminosäure an, die Zahlen sind Bootstrap-Werte.

4.2 Innerzelluläre Verteilung der Tabak-Hexokinasen

Alle sieben verschiedenen Hexokinase-Isoformen aus Tabak wurden vollständig oder teilweise mit GFP fusioniert und *in vivo* auf ihre Lokalisierung innerhalb der Zelle untersucht (s. 3.4).

4.2.1 NtHxk2 ist ein stromales Protein

NtHxk2 als Enzym der Typ A Hexokinasen wurde wie erwartet im Plastidenstroma gefunden (s. 3.4.9). Die ersten 66 N-terminalen Aminosäuren von NtHxk2 waren ausreichend, um das ansonsten zytosolische oder nukleäre GFP-Protein in das Stroma zu dirigieren. Eine *in vitro* Importstudie bestätigte den Befund und belegte außerdem das Abtrennen eines Transitpeptids von drei bis vier kDa Größe beim Eintritt ins Stroma. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Computerberechnungen, die ein Transitpeptid von 30 Aminosäuren und 3,3 kDa Größe vorhersagen (Nielsen *et al.*, 1997; Emanuelsson *et al.*, 2000). Für die nah verwandte Hexokinase StHxkRP1 aus Kartoffel konnte mittels GFP-Fusion ebenfalls eine plastidäre Lokalisierung gezeigt werden. Nach biolistischer Transformation von Blattscheiben aus Tabak waren sowohl punktuelle, als auch die Plastiden ausfüllende GFP-Signale zu sehen (s. Abb. 32). Die punktuellen Signale traten optisch hervor, so als ob die Proteine durch wenige Poren drängten, aber nicht hindurch kämen. Punktuelle GFP-Signale waren zuvor für StHxkRP1 und das homologe Protein SoHxk2 aus Spinat beschrieben worden, wobei Mitochondrien als markierte Organellen ausgeschlossen wurden (Wiese, 2000). Es ist demnach davon auszugehen, dass auch diese beiden Homologe im Plastidenstroma lokalisiert sind. Die konkrete Ursache der punktuellen Lokalisierung ist unbekannt und liegt entweder in der Transformation durch Biolistik oder in der Verwendung des verstärkten CaMV 35S Promotors.

4.2.2 NtHxk1, 3, 4a, 5, 6, und 7 sind mit Mitochondrien assoziiert

Alle Typ B Hexokinasen besitzen am N-Terminus einen potentiellen Membrananker aus ca. 24 hydrophoben Aminosäuren (Olsson *et al.*, 2003). In welche Membranen die Proteine verankert werden, lässt sich nicht verlässlich vorhersagen und muss experimentell bestimmt werden. AtHxk1 wurde nach GFP-Fusion an Mitochondrien lokalisiert (Rolland *et al.*, 2002), Proteine von AtHxk2 und At1g50460 wurden an der äußeren Mitochondrienmembran

gefunden (Giegé *et al.* 2003). SoHxk1 wurde an der äußeren Chloroplastenmembran nachgewiesen; eine zusätzliche Lokalisierung an Mitochondrien wurde nicht ausgeschlossen (Wiese *et al.*, 1999). In Mais-Keimlingswurzeln wurde außerdem Hexokinase-Aktivität an Golgi-Membranen gefunden (da Silva *et al.*, 2001).

Bei allen hier untersuchten Typ B Hexokinasen aus Tabak ist eine zytosolische Lokalisierung mit Verankerung in der äußeren Mitochondrienmembran anzunehmen (s. 3.1.2, 3.4). Eine ins Innere der Mitochondrien weisende oder an der inneren Membran verankerte Lokalisierung kann nicht prinzipiell ausgeschlossen werden, allerdings gibt es Indizien für die Lokalisierung außen. Ein Antikörper gegen NtHxk1 markierte Proteine an der Mitochondrien-Peripherie; in den durch NtHxk1::GFP verursachten Mitochondrien-Konglomeraten lagen diese markierten Proteine mittig zwischen den Mitochondrien. Untersuchungen an intakten Mitochondrien aus Erbse (Tanner *et al.*, 1983) und *Arabidopsis thaliana* (Giegé *et al.*, 2003) zeigten, dass nach Protease-Behandlung keine Hexokinase-Aktivität mehr zu messen war. Die Hexokinasen waren also nicht von einer mitochondrialen Membran geschützt, sondern dem Zytosol zugewandt. Auch für tierische Hexokinasen ist diese Lokalisierung bekannt (Wilson, 1995). Sie ermöglicht ihnen die Kopplung der Glukose-Phosphorylierung an die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette (de Cerqueira Cesar und Wilson, 2002; Wilson, 2003). Außerdem werden mitochondriales Membranpotential und die Entstehung reaktiven Sauerstoffs kontrolliert (da-Silva *et al.*, 2004).

Wegen der sehr schwachen GFP-Signale von NtHxk5::GFP und NtHxk6::GFP war bei ihnen keine Überprüfung der mitochondrialen Lokalisierung mit dem Farbstoff „MitoTracker CM-H₂TMRos“ möglich. Aufgrund der hohen Homologien von NtHxk5 zu NtHxk4, AtHxk1 und Athxk2, sowie von NtHxk6 zu At1g50460, ist allerdings auch bei ihnen davon auszugehen, dass es sich bei den markierten Organellen tatsächlich um Mitochondrien handelte.

4.2.3 Gibt es lösliche zytosolische Hexokinasen in Pflanzen?

Eine offene Frage ist die Existenz löslicher zytosolischer Hexokinasen in Pflanzen. Bisher gibt es keine Sequenzen, die diese Lokalisierung erwarten ließen. Außerdem wirken die membrangebundenen Hexokinasen auch im Zytosol, weshalb es keinen unmittelbar einleuchtenden Grund für die Existenz löslicher zytosolischer Isoformen gibt. Diese wurden jedoch mehrfach biochemisch nachgewiesen (s. Anhang, III). Für eine zytosolische Lokalisierung kommen von den bislang bekannten Hexokinasen die Typ A Enzyme in

Betracht. Diese besitzen zwar laut Computerberechnungen in der Regel ein plastidäres Transitpeptid, grundsätzlich kann für einzelne Vertreter eine andere Lokalisierung als im Stroma aber nicht ausgeschlossen werden (Olsson *et al.*, 2003). Auch für Spinat wurden lösliche zytosolische Hexokinasen beschrieben (Baldus *et al.*, 1981; Schnarrenberger, 1990; Wiese *et al.*, 1999). Das einzig bekannte Typ A Enzym von Spinat, SoHxk2, ist jedoch wahrscheinlich ein stromales Protein (s. 4.2.1; Wiese, 2000). Es stellt sich daher die Frage, ob es noch eine weitere Gruppe von Hexokinasen gibt, die aufgrund großer Unterschiede in der Sequenz bislang nicht als solche erkannt wurden und möglicherweise auch nicht mit den bereits bekannten verwandt sind. In diesem Fall müssten mehrere Publikationen neu interpretiert werden, die Hexokinasen mit aus heutiger Sicht ungewöhnlichen Eigenschaften beschrieben, z.B. untypisch hoher Affinität zu Fruktose oder Galaktose (Meunier *et al.*, 1971; Higgins und Easterby, 1974; Bajjal und Sanwal, 1976; Miernyk und Dennis, 1983).

Alternativ könnten membrangebundene Hexokinasen reversibel gelöst werden, wie es nach Zugabe von Glukose-6-phosphat, Fruktose-6-phosphat oder ATP für HK1 aus *Ricinus communis* Endosperm gezeigt wurde (Miernyk und Dennis, 1983). Auch für tierische Hexokinasen ist diese Eigenschaft bekannt (Rose und Warms, 1967, Wilson, 1995).

Nicht auszuschließen ist, dass lösliche zytosolische Hexokinasen ein Artefakt der Präparation sind. In Extrakten aus Kartoffelknollen war der Anteil löslicher Hexokinase abhängig von der Präparation. Eine Extraktion durch Mörsern mit Sand, wie sie für die Präparation von intakten Mitochondrien etabliert war, führte zu vollständig partikulär gebundener Hexokinase-Aktivität. Dreiminütige Homogenisation in einem „Waring Blendor“ dagegen resultierte darin, dass zwei Drittel der Aktivität löslich waren. Bei Weizenkeimlingen wurde festgestellt, dass der Anteil löslicher Hexokinasen in kommerziell erhältlichen, dampfbehandelten höher war als in handpräparierten (Saltman, 1953). Auch für Tabak-Hexokinasen wurde festgestellt, dass mitochondrial gebundene Isoformen sehr empfindlich durch Solubilisierung auf die Präparation reagieren (Sindelarova und Sindelar, 1988).

4.3 In der äußeren Mitochondrienmembran verankertes GFP führt zu Konglomeraten aus Mitochondrien

Bei allen untersuchten Proben mit überexprimiertem membrangebundenen Hxk::GFP oder HxkN::GFP fiel die Zusammenballung von Mitochondrien auf (s. 3.5).

Aufgrund der unterschiedlichen Ausprägung dieses Phänomens bei NtHxk1::GFP und NtHxk1N::GFP war die erste Annahme, dass das Ausmaß der Zusammenballung von der

Größe des membrangebundenen Proteins abhängt. Diese Annahme konnte nach Fusion von NtHxk1 und NtHxk1N mit GUS, GUS::GFP und GFP::GUS nicht bestätigt werden. Vielmehr schien allein aktives GFP der Verursacher des Phänomens zu sein, denn einzig das GFP-positive NtHxk1::GUS-GFP führte zu Konglomeraten. Wie später die biolistische Transformation von NtHxk4aN::GFP unter Kontrolle des verstärkten CaMV 35S Promotors zeigte, sind grundsätzlich auch die kleinen Fusionsproteine zur Bildung großer Konglomerate fähig. Eine weitere Annahme war, dass die Mitochondrien-Konglomerate durch unvollständige Teilung während der Zell-Differenzierung entstehen. Transiente Transformationen mittels Biolistik oder Agrobakterien-Infiltration zeigten jedoch, dass die Konglomerate innerhalb von zwei Tagen nach Transformation auch in ausdifferenzierten Zellen auftraten.

Als Ursachen des Phänomens wären eine direkte, quasi verklebende Wirkung des GFP möglich, oder eine indirekte, die den mitochondrialen Stoffwechsel so beeinflusst, dass diese sich in dem gezeigten Maß verändern. Ein verklebender Effekt des GFP ist in der Literatur bislang nicht beschrieben worden. Es gibt Hinweise, dass der Effekt durch Sauerstoffmangel ausgelöst sein könnte. Mitochondrien sind flexible Organellen, die ihre Form, Größe und Position ändern können (Logan und Leaver, 2000). Vergrößerte Mitochondrien wurden bei Sauerstoffmangel festgestellt (Bereiter-Hahn und Vöth, 1983; Ramonell *et al.*, 2001). Tabak-Mitochondrien verschmolzen bei Sauerstoffmangel im Labor innerhalb von vier Stunden reversibel zu bis zu 80 µm langen Fäden oder formten Ringe und Platten (Van Gestel und Verbelen, 2002). Diese sahen zwar anders aus als die bei Hxk::GFP beobachteten, das mag aber an den unterschiedlichen Versuchsbedingungen liegen (Protoplasten, gezielter Sauerstoffmangel).

Dass in den GFP-markierten Mitochondrien tatsächlich Sauerstoffmangel herrschte, wird von der Beobachtung gestützt, dass der Farbstoff „MitoTracker CM-H₂TMRos“ häufig nur in denjenigen Zellen Mitochondrien anfärbte, in denen kein GFP sichtbar war. Laut Herstellerangaben diffundiert die zunächst farblose Substanz durch die Plasmamembran in die Zelle. Dort wird sie hauptsächlich in den Mitochondrien zum leuchtenden Farbstoff oxidiert und angereichert. Sauerstoffmangel in den Mitochondrien hätte zur Folge, dass NADH nicht mehr in der Atmungskette oxidiert würde und die Mitochondrien damit in einem reduzierten Zustand vorlägen. Dann könnten sie auch, wie beobachtet, den Farbstoff nicht mehr oxidieren. Hexokinasen könnten diesen Effekt noch verstärken, da das durch sie erzeugte ADP den Sauerstoffverbrauch in den Mitochondrien stimuliert (Dry *et al.*, 1983; Galina *et al.*, 1995). GFP verbraucht zur Ausbildung des Chromophors molekularen Sauerstoff, um Tyrosin-66 zu dehydrogenieren (Hansen *et al.*, 2001). Die Anzahl der vorhandenen

Sauerstoffmoleküle dürfte die der GFP-Moleküle allerdings bei weitem übertreffen. Sofern also die Dehydrogenierung des GFP-Moleküls stabil ist, ist es unwahrscheinlich, dass sie die einzige Ursache für Sauerstoffmangel ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Bindung der GFP-Moleküle an die Mitochondrienmembran deren Durchlässigkeit für Sauerstoff verringert. Die verringerte Durchlässigkeit könnte sich auch auf den Farbstoff auswirken. Bei einem generell auftauchenden Effekt von mitochondrial lokalisiertem GFP hätte er schon früher bekannt werden sollen. Womöglich tritt er bei den dabei häufig verwendeten Protoplasten nicht in diesem Umfang auf.

4.4 Gewebespezifität der Hexokinase-Isoformen

Es wurden nur wenige Daten über die Gewebespezifität pflanzlicher Hexokinasen veröffentlicht, entsprechende Promotorstudien gab es bislang nicht. Überraschenderweise ist auch keine Studie bekannt, die umfassend Hexokinase-Aktivitäten in verschiedenen pflanzlichen Geweben vergleicht. Die in Abbildung 35 gezeigten Messungen belegen die sehr unterschiedlichen Aktivitäten in verschiedenen Geweben. Auffällig sind die geringe Aktivität im *Source*-Blatt, sowie die hohe Aktivität in Stängel, Blütenboden, Griffel/Narbe, Filament und reifem Staubbeutel. In letzterem Gewebe ist außerdem die Aktivität mit Fruktose deutlich am höchsten.

4.4.1 Gewebespezifität von NtHxk1 und NtHxk7

Aufgrund der großen Ähnlichkeit von NtHxk1 und NtHxk7 von ca. 91 % im kodierenden DNA-Bereich konnten diese durch Northern- oder Southern-Hybridisierung nicht unterschieden werden. Die häufig beobachteten diffusen Banden bei der Northern-Hybridisierung deuten auf ein Gemisch verschieden langer Transkripte hin, wie es bei einer Kreuzhybridisierung von NtHxk1 und NtHxk7 zu erwarten wäre. Es fiel die deutliche Präferenz für reife Staubbeutel, ca. einen Tag vor Blütenentfaltung, auf. Wesentlich geringere Transkriptmengen hybridisierten in jüngeren Staubbeuteln der noch geschlossenen Knospen, sowie in Wurzeln. Beide Isoformen wurden nahezu identisch im Genom von *Nicotiana sylvestris* gefunden (*NsHxk1* bzw. *NsHxk4*, s. 3.7.1). Von *NsHxk4* konnte ein funktionaler Promotor isoliert werden, der weitgehend das Ergebnis der Northern-Analyse bestätigte und präziserte. Demnach ist die Aktivität in Staubbeuteln auf die Pollen, in jungen Stadien auch auf das Tapetum, beschränkt. Hexokinase-Aktivität in diesen Geweben ist nicht überraschend. Pollen

müssen über einen apoplastischen Schritt von der Pflanze versorgt werden, da keine symplastische Verbindung besteht. Für die Entwicklung von Tabakpollen ist eine zellwandgebundene Invertase essentiell (Goetz *et al.*, 2001). Auch beim Wachstum von Pollenschläuchen aus *Petunia hybrida* wurde Aktivität einer solchen festgestellt, außerdem Aktivität eines Monosaccharidtransporters in der Plasmamembran (Ylstra *et al.*, 1998). Von *Arabidopsis thaliana* sind fünf Monosaccharidtransporter der Plasmamembran mit höchster oder exklusiver Expression in Pollen bekannt (Schneidereit *et al.*, 2005). Es ist demnach davon auszugehen, dass große Mengen Glukose durch die Aktivität zellwandgebundener Invertase entstehen, ins Zytosol der Pollen transportiert werden und dort als Substrat der Hexokinasen dienen.

4.4.1.1 Analyse des *NtHxk1*-Promotors

Ausgehend von Northern-Analysen war anzunehmen, dass die Promotoren von *NtHxk1* und *NsHxk4* gleiche oder sehr ähnliche Expression vermitteln. *PnHxk1* vermittelte allerdings gar keine GUS-Aktivität in den untersuchten Pflanzengeweben.

Es wurden 1,4 kb genomischer Sequenz 5' des Translationsstarts eingesetzt. Da Länge des 5' UTR und Position des Transkriptionsstarts nicht bekannt sind, kann über die tatsächliche Promotorlänge keine gesicherte Aussage getroffen werden. Es sind eine Reihe von Promotoren bekannt, die zur Entfaltung ihrer vollen Aktivität oder Spezifität auf Introns oder Elemente 3' der kodierenden Region angewiesen sind (An *et al.*, 1989; Dean *et al.*, 1989; Dietrich *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1995 A; Fu *et al.*, 1995 B; Nakata und Okita, 1996; Bourdon *et al.*, 2000). Womöglich benötigt auch der *NtHxk1*-Promotor solche hier nicht erfassten Bereiche.

Es wurden einige potentielle cis-Elemente gefunden, die bei der Regulation des Zuckerstoffwechsels durch Hexokinase eine Rolle spielen könnten. Auffällig ist die Anwesenheit der vier aus α -Amylasen bekannten cis-Elementen *Amylase*, *CGACG*, *GARE* und *Pyrimidin* (Gubler *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 1998; Mena *et al.*, 2002). Da Amylasen im Stärkeabbau involviert sind und dabei letztlich auch Glukose erzeugt wird (Zeeman *et al.*, 2004), erscheinen gemeinsame Regulationselemente von Amylasen und Hexokinasen sinnvoll. Die zwei aus einem Patatin-Promotor bekannten *SURE*-Elemente (Sucose Responsive) wurden für die Induktion durch Saccharose oder deren Spaltprodukte Glukose und Fruktose verantwortlich gemacht (Grierson *et al.*, 1994). Die *SURE*-Elemente im *NtHxk1*-Promotor könnten antago-

nistisch zu den α -Amylase-Elementen wirken und eine differenzierte Regulation ermöglichen. Glukose führte tatsächlich zu einer leichten Induktion der Transkription von *NtHxk1* oder *NtHxk7* (s. 3.6.3).

Die cis-Elemente *Amylase*, *GARE*, *Pyrimidin*, *AtMYB2* und *GA/ABRE* weisen auf eine Regulation durch Gibberellin und dessen Antagonisten Abscisinsäure hin (Skriver *et al.*, 1992; Gubler und Jacobsen, 1992; Lovegrove und Hooley, 2000). Der Einfluss von Gibberellin wurde mit zwei Wochen alten Tabakkeimlingen überprüft, die aufgrund einer überexprimierten GA20-Oxidase erhöhte, oder aufgrund einer überexprimierten GA2-Oxidase verminderte Gibberellinhalte hatten (Biemelt *et al.*, 2004). In Wurzel, Hypokotyl oder Blatt wurden in einer Western-Analyse keine signifikant veränderten NtHxk1-Mengen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Eine Regulation durch Gibberellin ist somit nicht genereller Natur und betrifft, wenn überhaupt, nur spezifische Gewebe oder physiologische Situationen.

Den Erwartungen entsprechend wurden mit *LAT52* und *AAATGA* auch pollenspezifische cis-Elemente gefunden. *LAT52-2* ist in *PNtHxk1* und *PNsHxk4* gleichermaßen in einer der neun Basen gegenüber der Originalsequenz des *LAT52*-Promotors verändert, A6 ist im Original C: TCCACAAATA. Dieses Element ist abhängig von der *LAT52-1*-Sequenz GAAA, welche im *LAT52*-Promotor 11 bp stromaufwärts liegt (Bate und Twell, 1998). Im *NtHxk1*-Promotor liegt sie 29 bp stromabwärts. Das Pollen-Element *AAATGA* wurde in Promotoren zweier homologer Gene aus Tabak und Raps in 94 bp Entfernung von der TATA-Box gefunden (Weterings *et al.*, 1995). Im *NtHxk1*-Promotor befindet sich eine der potentiellen TATA-Boxen (-255 bp) 91 bp entfernt und könnte somit in passender Entfernung liegen.

4.4.1.2 Analyse des *NsHxk4*-Promotors

Die aus *Nicotiana sylvestris* isolierte Sequenz *NsHxk4* ist im bekannten Bereich zu mehr als 99 % identisch mit *NtHxk7*. Beide Gene sind als dieselben anzusehen, so dass für die Expression von *NsHxk4* gefundene Ergebnisse wahrscheinlich auch für *NtHxk7* zutreffen.

Der Promotor zeigte eindeutig Präferenz für Pollen und bestätigte somit Northern-Analysen. Die relativ starke variable Aktivität in Fruchtknoten war nicht zu erwarten gewesen, auch die Aktivität in Wurzeln war stärker als erwartet. Der als pollenspezifisch geltende *LAT59*-Promotor zeigte ebenfalls stärkere Aktivität in Wurzeln, als eine Northern-Analyse erwarten ließ (Twell *et al.*, 1990). Deletionsanalysen deuteten auf die Existenz diesbezüglich negativer und positiver Elemente hin (Twell *et al.*, 1991). Möglicherweise fehlen *PNsHxk4* entsprechende negative Elemente.

Der Promotor besitzt einige potentielle cis-Elemente, die auch im *NtHxk1*-Promotor vorkommen. Die Vielzahl der Elemente könnte eine differenzierte, an Entwicklung und Metabolismus orientierte Regulation erlauben.

Aus pollenspezifischen Promotoren ist die wie im *NtHxk1*-Promotor veränderte *LAT52-2* Box bekannt (Bate und Twell, 1998). Auch hier befindet sich das nächste dazugehörige Element GAAA stromabwärts statt -aufwärts. Möglicherweise kann aber auch die ähnliche Sequenz CAAA 14 bp stromaufwärts die Rolle des *LAT52-1*-Elements übernehmen. Das *Q-Element* (quantitativ) wurde im *Zm13*-Promotor aus Mais als *Enhancer*-Element der pollenspezifischen Aktivität identifiziert (Hamilton *et al.*, 1998).

Wie auch der *NtHxk1*-Promotor besitzt der *NsHxk4*-Promotor mit *SP8b* ein Element, das für die Induktion durch Zucker verantwortlich gemacht wurde (Ishiguro und Nakamura, 1992).

Neben Elementen, die wie beim *NtHxk1*-Promotor auf Regulation durch Gibberellin und Abscisinsäure hinweisen, fallen Elemente zur Regulation durch Auxin auf. Es gibt drei potentielle Bindestellen für den BBF1-Faktor, der in Tabak unter anderem stark in Primärwurzelspitzen und Sekundärwurzelsprimordien exprimiert wird (Baumann *et al.*, 1999). In beiden Gewebetypen war auch der *NsHxk4*-Promotor aktiv. GUS-Aktivität in anderen Meristemen als denen der Wurzeln wurde nicht festgestellt.

Ethylen ist an der Regulation der Fruchtreifung beteiligt; das *ERE-Element* (Ethylene Responsive Element) wurde in einem Promotor gefunden, der in reifen Tomatenfrüchten aktiv ist (Montgomery *et al.*, 1993). Interessanterweise lässt die Expression der zu *NsHxk4/NtHxk7* homologen *LeHxk1* aus Tomate in reifenden Früchten nach (Dai *et al.*, 2002). Eine in diesem Fall negative Regulation durch Ethylen ist daher nicht unwahrscheinlich. Tabak hat keine Früchte wie Tomate, allerdings könnte die variable Aktivität des Promotors in Fruchtknoten darin seine Entsprechung haben.

4.4.2 Gewebespezifität von *NtHxk2*

Die Northern-Analyse von *NtHxk2* zeigte ein gänzlich anderes Bild als die von *NtHxk1* bzw. *NtHxk7*. Schwache Expression war in allen Geweben nachzuweisen bis auf *Source*-Blatt und reife Staubbeutel, wo die Transkriptmengen an der Nachweisgrenze lagen. Stärkste Expression war in Griffel/Narbe und Filament zu sehen. Bei früheren Hybridisierungen, die allerdings weniger Gewebetypen umfassten, war RNA von Stängel und *Source*-Blatt Mittelrippe verhältnismäßig stärker markiert als in Abb. 36. Daher wurde schon frühzeitig angenommen, dass *NtHxk2* vornehmlich im Leitgewebe exprimiert würde. Die Promotorana-

lyse (s. 3.7.5.2) bestätigte diese Vermutung und offenbarte Aktivität in Stärkescheide und Xylem-Parenchym, sowie in Stomata und in der Wurzelspitze.

Die nächstverwandte bekannte Hexokinase zu *NtHxk2* ist *StHxkRP1* aus Kartoffel. Diese wurde von Anika Wiese in ihrer Dissertation durch Western-Analyse am stärksten in Petiolen und Stolonen nachgewiesen (Wiese, 2000). Die Anwesenheit in Stolonen entspricht womöglich der für *NtHxk2* beobachteten Promotoraktivität in Wurzelspitzen. In Venen zweiter Ordnung war deutlich weniger *StHxkRP1* vorhanden als in Petiolen. Dies wurde mit dem Antikörper gegen *NtHxk2* verifiziert, der auch in Kartoffel und Tomate ein Protein entsprechender Größe detektierte. Bei Tabak und Tomate wurden ungefähr gleiche Mengen des Proteins in Petiole und Venen zweiter Ordnung detektiert (Daten nicht gezeigt). Im Detail unterscheidet sich demnach die Gewebespezifität der *NtHxk2*-Homologe. Das *NtHxk2*-Homolog *At1g47840* aus *Arabidopsis thaliana* wird laut „Microarray“-Daten hauptsächlich in Wurzeln exprimiert und nur schwach in überirdischen Geweben (<https://www.genevestigator.ethz.ch>, Zimmermann *et al.*, 2004). Auch bei Erbse gibt es Hinweise auf eine stromale Hexokinase in Keimlingswurzeln (Bowsher *et al.*, 1992), in Stängelgewebe dagegen wurde nur mitochondrial gebundene Hexokinase isoliert (Tanner *et al.*, 1983).

4.4.2.1 Analyse des *NtHxk2*-Promotors

Die Aktivität des *NtHxk2*-Promotors in Stärkescheide und Xylem-Parenchym des Leitgewebes ist in guter Übereinstimmung mit der Northern-Analyse verschiedener Gewebe. Aktivität in Schließzellen kann angesichts des geringen Anteils von Stomata am Blatt leicht übersehen werden. Nicht zu erwarten war die hohe Aktivität in Pollen. Zwar wurden endogene und artifizielle GUS-Aktivitäten in Pollen beschrieben (Plegt und Bino, 1989; Mascarenhas und Hamilton, 1992; Uknes *et al.*, 1993), diese wurden aber bei Kontrollversuchen für diese Arbeit nicht beobachtet. Die Aktivität ist daher womöglich auf ein fehlendes negatives Kontrollelement zurückzuführen.

Mehrere potentielle cis-Elemente im *NtHxk2*-Promotor weisen auf eine Regulation durch Gibberellin und Abscisinsäure hin. In zwei Wochen alten Keimlingen mit erhöhtem oder vermindertem Gibberellin Gehalt (Biemelt *et al.*, 2004) wurden durch Western-Analyse allerdings keine Unterschiede für *NtHxk2* festgestellt (Daten nicht gezeigt, vgl. 4.4.1.1).

Interessant ist das Vorkommen der *DRE*- (Drought Responsive Element) und *AtMYB*-Elemente, die eine Regulation durch Trockenheit und Abscisinsäure vermitteln könnten (Kizis und Pagès, 2002; Abe *et al.*, 2003). Trockenheit ist für die Regulation der Schließzellen ein wichtiger Faktor. Die *AtMYB*-Elemente könnten auch der Regulation in Stärkescheide und Xylem-Parenchym dienen. Die Promotoren dreier MYB-Transkriptionsfaktoren aus Gerste zeigten in transgenem Tabak hohe Aktivität in diesen Geweben (Wissenbach *et al.*, 1993).

Auch eine Regulation durch Licht, vermittelt durch *I-Box* und das *CCA1*-Element, könnte in Schließzellen eine Rolle spielen. Solch eine Regulation wurde in Schließzellen für den Monosaccharidtransporter der Plasmamembran *AtSTP1* aus *Arabidopsis thaliana* beobachtet (Stadler *et al.*, 2003). Auch in dessen Promotorsequenz befinden sich mehrere *I-Box* Kernelemente, sowie eine revers komplementäre *CCA1*-Box. In Mittelrippen unterlagen *NtHxk2*-Transkriptmengen keinen auffälligen Schwankungen im Tagesverlauf.

Die zweimal vorkommende *AuxRE*-Sequenz (Auxin Responsive Element) TGTCTC kommt gehäuft in Promotoren von Genen vor, die durch Auxin und Brassinosteroide reguliert werden (Goda *et al.*, 2004). Außerdem ist sie Bestandteil von (C/T)TGTCNC, welches in mehreren Promotoren Pathogen-induzierter Gene (PR-Gene) vorkommt und als repressives Element beschrieben wurde (Boyle und Brisson, 2001). Für *NtHxk2* könnte dies eine Rolle spielen z.B. in der Wurzel, die ständig Pathogenen, Fraßfeinden und Nährstoffkonkurrenten ausgesetzt ist (Flores *et al.*, 1999; Bais *et al.*, 2004).

Für das ERE-Element (Ethylene Responsive Element) gilt sinngemäß das Gleiche wie für den *NsHxk4*-Promotor beschrieben (vgl. 4.4.1.2). Im Perikarp grüner und roter Tomatenfrüchte wurden zwei Hexokinase-Aktivitäten beschrieben, die mit der Fruchtreifung abnahmen (Dai *et al.*, 2002). Bei der in jener Arbeit HXK2 bezeichneten Aktivität könnte es sich um das noch unbekanntes *NtHxk2*-Homolog handeln.

4.4.3 Gewebespezifität von *NtHxk3*

Die Northern-Analyse zeigte, dass *NtHxk3* und *NtHxk1/NtHxk7* grundsätzlich ähnlich transkribiert werden. Allerdings war bei *NtHxk3* die Präferenz für reifen Staubbeutel nicht so deutlich ausgeprägt.

4.4.4 Gewebespezifität von NtHxk4, 5 und 6

Keine der drei Hexokinasen konnte mittels Northern-Analyse im Wildtyp nachgewiesen werden, auch nicht nach 24 Stunden Fütterung von Blattscheiben mit Glukose. *NtHxk4* und *NtHxk5* ließen sich auch durch reverse PCR kaum amplifizieren. Dies deutet auf eine strikte gewebespezifische oder physiologische Regulierung hin.

NtHxk6 ließ sich mit 30 PCR-Zyklen ähnlich gut aus verschiedenen Geweben amplifizieren wie *NtHxk1* und *NtHxk3*. Demnach ist anzunehmen, dass *NtHxk6* ähnlich schwach wie diese außerhalb der Staubbeutel exprimiert wird und daher kaum durch Northern-Analyse nachweisbar ist.

Aufschluss über die Expression aller drei Isoformen könnten Promotorstudien geben.

4.5 Aktivitätsmessungen

Zur Bestimmung enzymatischer Charakteristika eines Proteins ist dessen Reinigung bzw. Konzentrierung notwendig, um störende Hintergrundreaktionen zu vermeiden. Dazu bedient man sich z.B. eines geeigneten Hefe-Stammes ohne diese Aktivität, wie es für die Charakterisierung von AtHxk1 (Dai *et al.*, 1999), StHxk1 (Veramendi *et al.*, 1999), LeHxk2 (Menu *et al.*, 2000) und LeHxk1 (Dai *et al.*, 2002) beschrieben wurde. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass gegebenenfalls posttranslationale Modifikationen des Enzyms nicht wie in Pflanzen stattfinden und sich daher die enzymatischen Eigenschaften ändern können. Die pH-Abhängigkeit von StHxk1 unterschied sich nach Expression in Hefe deutlich von derjenigen, die nach Isolierung aus Pflanzen festgestellt wurde (Veramendi *et al.*, 1999). Der K_m -Wert für Fruktose des in Hefe exprimierten Enzyms betrug 1,4 mM, derjenige des aus Knollen isolierten 11 mM (Renz und Stitt, 1993). Auch für die sehr ähnliche LeHxk1 wurde bei dem in Hefe exprimierten Enzym eine deutlich höhere Affinität zu Fruktose festgestellt (Dai *et al.*, 2002). Typ A Hexokinasen wie NtHxk2 lassen sich aufgrund ihres plastidären Transitpeptids nicht funktional in Hefe überexprimieren (Wiese, 2000; Olsson *et al.*, 2003).

Die Mehrzahl der Hexokinase-Charakterisierungen erfolgte nach biochemischer Reinigung aus Pflanzenextrakten. Ein Nachteil dieser Methode ist die Ungewissheit über die isolierten Isoformen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach unvollständiger Trennung am Ende ein Gemisch ähnlicher Enzyme vorliegt. Es gibt drei detaillierte Arbeiten zu Hexokinase-Isoformen aus Spinatblatt, bei denen die isolierten Aktivitäten und Isoformen nicht eindeutig einander zugeordnet werden können (Baldus *et al.*, 1981; Schnarrenberger, 1990; Wiese, 2000). Es wurde spekuliert, dass die an der äußeren Chloroplastenmembran

befindliche SoHxk1 bei früheren Arbeiten der löslichen Fraktion zugeschlagen wurde, die damit ein Gemisch darstellen würde (Wiese, 2000). Bei zu rigider Trennung der Isoformen ist ein proteolytischer Abbau nicht auszuschließen, so dass bei sehr geringen Aktivitäten nicht immer zu unterscheiden ist, ob es sich dabei um eine sehr schwach aktive Isoform oder ein Abbauprodukt handelt (Veramendi *et al.*, 2002). Aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung von Isoformen innerhalb der Pflanze lassen sich nicht alle aus einem Gewebe isolieren.

Für die Charakterisierung der Tabak-Hexokinasen wurde eine andere Strategie gewählt. Durch Überexpression sollten sie in ihrer Aktivität soweit verstärkt werden, dass sie vor dem Hintergrund einer endogenen Hexokinase gut messbar würden. Die Lamina des *Source*-Blatts bietet sich für diese Analysen an, weil endogene Aktivität dort vergleichsweise niedrig ist und sich dieses Gewebe sehr leicht bearbeiten lässt (s. 3.6.1). Diese Strategie ist nur teilweise geglückt. NtHxk1 und NtHxk3 ließen sich sehr gut überexprimieren, wodurch die Hexokinase-Aktivität in den transgenen Pflanzen teilweise mehr als verzehnfacht wurde. Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter machte es dadurch einen vernachlässigbaren Unterschied, ob im Hintergrund weitere endogene Hexokinasen mit zur Aktivität beitrugen. Durch Überexpression von NtHxk2 wurde die Aktivität ungefähr versechsfacht. Hierbei machte die Berücksichtigung einer endogenen Hexokinase-Aktivität bereits einen Unterschied aus, insbesondere, weil die Affinität von NtHxk2 zu den Substraten merklich geringer war als die der im WT gemessenen Hexokinase. Überexpression von NtHxk4 und NtHxk5 führte nur zu einer Verdreifachung bzw. Verdoppelung der Aktivität, was die Interpretation der Ergebnisse bereits deutlich erschwert. Durch Überexpression von NtHxk6 schließlich wurde keine Erhöhung der Aktivität erreicht.

Für eine genauere Charakterisierung der Isoformen ist es wünschenswert, zukünftig die Überexpression mit einer biochemischen Reinigung zu kombinieren, um Hintergrundreaktionen auszuschließen.

4.5.1 Überexpression von NtHxk6 führte nicht zu erhöhter Hexokinase-Aktivität

In keinem Fall konnte in NtHxk6-Pflanzen eine gegenüber dem WT signifikant erhöhte Hexokinase-Aktivität nachgewiesen werden. Der aus der Überexpression entstehende Phänotyp, der auch bei NtHxk6::GFP Pflanzen auftrat, zeigte aber, dass das Protein tatsächlich translatiert wurde und eine Wirkung hatte. Wie in Abschnitt 3.1.2 dargelegt wurde, besitzen NtHxk6 und die anderen bekannten Typ B1 Hexokinasen eine gegenüber dem Konsensus stark veränderte Adenosin-Bindestelle. Dies könnte dazu führen, dass kein ATP

mehr gebunden oder gespalten werden kann. Auch durch Zugabe von CTP, GTP oder UTP konnte keine erhöhte Aktivität erreicht werden. Demnach ist davon auszugehen, dass NtHxk6 zwar Glukose, vielleicht auch noch ATP binden kann, aber nicht in der Lage ist, das γ -Phosphat von ATP auf Glukose zu übertragen. Aufgrund fehlender katalytischer Funktion könnten Typ B1 Hexokinasen nicht durch Komplementation Hexokinase-defizienter Hefestämme isoliert werden. Da sie außerdem in ihrer Sequenz stark von den besser bekannten Typ B2 Enzymen abweichen, können sie auch bei der Durchmusterung einer DNA-Bank leicht übersehen werden. Somit ist es nicht überraschend, dass die drei anderen bekannten Typ B1 Sequenzen nur in den komplett sequenzierten Genomen von *Arabidopsis thaliana* und Reis gefunden wurden.

4.5.2 pH-Abhängigkeiten

NtHxk1, 2 und 3 zeigten eine große pH-Toleranz im leicht basischen Bereich, wie sie ähnlich bereits für HK2 aus Kartoffel (Renz und Stitt, 1993), LeHxk1, LeHxk2 (Dai *et al.*, 2002) und SoHxk1 (Wiese, 2000) beschrieben wurde. Der bei NtHxk2 deutlich abweichende Verlauf mit Fruktose ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die eingesetzten 20 mM Fruktose bei weitem nicht sättigend waren. Maximale Aktivität von NtHxk2 war etwas weiter in den basischen Bereich verschoben und könnte eine Anpassung an den im Vergleich zum Zytosol basischeren pH des Stromas sein (Oja *et al.*, 1999).

Der bei NtHxk4 und NtHxk5 beobachtete Verlauf wich deutlich von den erstgenannten ab und belegte eine geringere pH-Abhängigkeit. Wenn man von einer zusätzlichen geringen endogenen Hexokinase-Aktivität ausgeht, dürfte der Verlauf zwischen pH 7 und 9 nahezu linear sein. Solch ein Verlauf wurde für die Hexokinase GK-2 aus sich entwickelnden Maiskörnern beschrieben (Doehlert, 1989), deren Sequenz leider unbekannt ist.

Es sollte erwähnt werden, dass bei Verwendung von Tris als Puffer die Aktivität von NtHxk1 und NtHxk3 ab einem pH von 8,3 wieder leicht abnahm. Dadurch ähnelte der Verlauf mehr demjenigen der nah verwandten StHxk1 (Renz und Stitt, 1993; Veramendi *et al.*, 1999). Von einer weiteren Verwendung des Tris-Puffers wurde allerdings abgesehen, da es beim Übergang von MOPS- zum Tris-Puffer zu einer Verminderung der Aktivität um bis zu 50 % kam. Lediglich NtHxk5 war davon nicht betroffen, für NtHxk4 wurde es nicht getestet. Mit Tricin als Puffer trat die Verminderung nicht auf.

4.5.3 Affinitäten zu Glukose, Mannose und Fruktose

Die Affinitäten zu Hexosen bewegten sich durchweg im Rahmen der bereits charakterisierten Hexokinasen (s. Anhang, III).

Die zu NtHxk1 und NtHxk3 nächst verwandten Hexokinasen sind die Isoformen 1 und 2 aus Kartoffel und Tomate. Bei LeHxk1 wurde eine etwas geringere Affinität zu den Hexosen festgestellt als bei LeHxk2 (Dai *et al.*, 2002; Menu *et al.*, 2001). Gleiches gilt für NtHxk1 und NtHxk3 aus Tabak. Es ist davon auszugehen, dass dieses Verhältnis auch bei den homologen Kartoffel-Hexokinasen existiert. In Kartoffelknolle wurden drei Hexokinase-Aktivitäten charakterisiert (Renz und Stitt, 1993), HK1 wurde später der Sequenz StHxk1 zugeordnet (Veramendi *et al.*, 1999). Basierend auf den Hexose-Affinitäten ist zu vermuten, dass Aktivität HK3 von StHxk2 stammt.

Auffällig an NtHxk2 war die im Vergleich zu den anderen Isoformen generell niedrigere Affinität zu Hexosen. Noch gibt es keine vergleichbaren Charakterisierungen anderer Typ A Hexokinasen, allerdings wurden in Kartoffelknolle (Renz und Stitt, 1993) und Tomatenfrucht (Martinez-Barajas und Randall, 1998; Dai *et al.*, 2002) Aktivitäten charakterisiert, die keiner damals bekannten Hexokinase-Sequenz zugewiesen werden konnten. Auch bei diesen waren auffällig niedrige Affinitäten gemessen worden, insbesondere zu Fruktose, weshalb das Tomaten-Enzym erst als Glukokinase bezeichnet wurde. Vermutlich entstammt die aus Kartoffel isolierte Aktivität HK2 der Typ A Hexokinase StHxkRP1, und die als Glukokinase (Martinez-Barajas und Randall, 1998) oder HXK2 (Dai *et al.*, 2002) bezeichnete Aktivität aus Tomate entstammt dem noch nicht näher bekannten Homolog aus Tomate.

Bemerkenswert an NtHxk4a und NtHxk5 war die hohe Affinität zu Fruktose mit einem K_m -Wert von 2-3 mM. Ähnlich niedrige K_m -Werte wurden für eine zytosolische Hexokinase aus Soja (Copeland und Morell, 1985) und für eine mitochondrial gebundene aus Mais-Keimlingswurzeln ermittelt (Galina *et al.*, 1999). Zu beiden Enzymen gibt es keine Sequenzinformationen. Von den Hexokinasen bekannter Sequenz besitzt SoHxk1 mit 3,8 mM den niedrigsten K_m -Wert für Fruktose (Wiese *et al.*, 1999). Der für StHxk1 angegebene Wert von 1,5 mM (Veramendi *et al.*, 1999) ist unglaubwürdig und widerspricht dem von Renz und Stitt (1993) ermittelten Wert von 11 mM. AtHxk1 ist die nächstverwandte Hexokinase, für die Messwerte veröffentlicht wurden. Für Fruktose wurde ein K_m -Wert von 17 mM ermittelt (Dai *et al.*, 1999); dieser unterscheidet sich demnach deutlich von dem der beiden Tabak-Isoformen. Der Wert ist allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da er von einem in Hefe exprimierten Protein stammt.

4.5.4 Affinitäten zu ATP

Die Affinitäten von NtHxk1, 2, 3 und der im WT gemessenen Hexokinase zu ATP unterschieden sich mit ihrer negativen Kooperativität von bisher veröffentlichten Hexokinasen. Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik sind für Enzyme keineswegs ungewöhnlich (Hill *et al.*, 1977). Zur Analyse negativer Kooperativität ist es notwendig, einen weiten Konzentrationsbereich abzudecken, da sie sich bei niedrigen und hohen Konzentrationen am deutlichsten als Abweichung von der Michaelis-Menten-Kinetik bemerkbar macht. Bei niedrigen Substratkonzentrationen wird eine vergleichsweise höhere Aktivität erreicht, Sättigung erfolgt dagegen erst bei höheren Konzentrationen.

Kooperativität ist nicht auf Enzyme mit mehreren Untereinheiten beschränkt, sondern kommt auch bei monomeren Enzymen vor. Als Ursache dieser kinetischen Kooperativität gilt die Überlagerung der katalytischen Reaktion durch eine vergleichsweise langsame Bindung der Substrate (Cornish-Bowden und Cardenas, 1987). Bei Hexokinasen könnte diese überlagernde langsame Reaktion in der Konformationsänderung bei Bindung von Glukose und ATP bestehen (s. 1.8; Shoham und Steitz, 1980; Kuser *et al.*, 2000).

Weizen-Hxk L₁ verhält sich negativ kooperativ zu Glukose (Meunier *et al.*, 1974), Ratten-Hxk4 positiv (Neet *et al.*, 1990). Den veröffentlichten Diagrammen nach zu urteilen verhalten sich auch Hexokinasen aus Endosperm und Scutellum von Mais negativ kooperativ zu Glukose und vermutlich auch zu ATP (Cox und Dickinson, 1973). Diese Abweichungen von der Michaelis-Menten-Kinetik wurden von den Autoren aber nicht als negative Kooperativität diskutiert. Für das Enzym aus Ratte wurde bei geringen Glukosekonzentrationen in 30 % Glycerin ebenfalls eine negative Kooperativität gegenüber ATP festgestellt. Andere Veröffentlichungen zu pflanzlichen Hexokinasen sind nicht detailliert genug, um eine eventuell vorhandene Kooperativität festzustellen. Bei der Charakterisierung dreier Hexokinase-Aktivitäten aus Kartoffelknolle (Renz und Stitt, 1993) gibt es allerdings Hinweise, dass sie auch bei diesen vorliegt. Die HK1 genannte Aktivität entstammt StHxk1 (Veramendi *et al.*, 1999) und ist somit nah mit NtHxk1 verwandt (s. Abb. 63). Die Aktivität HK2 entstammt vermutlich dem NtHxk2-Homolog StHxkRP1 (s. 4.5.3). Es wurden keine Messwerte für ATP-Konzentrationen unterhalb 50 μM gezeigt, bei denen eine negative Kooperativität deutlicher zutage treten würde. Bei Nichtbeachtung dieser Konzentrationen wäre auch bei den Tabak-Hexokinasen 1-3 die negative Kooperativität nicht eindeutig sichtbar und die Diagramme ähnelten denen der entsprechenden Kartoffel-Enzyme. Nach Zugabe von ADP erreichten letztere nicht mehr V_{max} , was als kompetitive Inhibition mit kleiner nichtkompetitiver Komponente interpretiert wurde. Es ist anzunehmen, dass die

grafische Auftragung unter Berücksichtigung einer negativen Kooperativität sehr wohl gleiche V_{\max} -Werte liefern würde.

Abgesehen von der negativen Kooperativität fällt auf, dass NtHxk3 eine geringere Affinität zu ATP aufwies als NtHxk1. Dies wurde auch bei den homologen Isoformen aus Kartoffel festgestellt (Renz und Stitt, 1993). NtHxk2 zeigte eine nochmals niedrigere Affinität zum Substrat, wie schon für die Hexosen festgestellt wurde.

Bezüglich der negativen Kooperativität ist anzumerken, dass diese artifiziell durch mehrere Faktoren zustande kommen kann, insbesondere durch nicht vollständig getrennte Isoformen unterschiedlicher Affinität zum Substrat (Cornish-Bowden und Cardenas, 1987). Da in dieser Arbeit pflanzliche Rohextrakte und nicht gereinigte Enzyme untersucht wurden, ist dieser Punkt besonders zu berücksichtigen. Allerdings ist anzunehmen, dass der Effekt dann bei schwach überexprimierten Isoformen stärker auftreten würde, was nicht der Fall war. Als weitere Quelle artifizieller negativer Kooperativität wurden Al^{3+} -Ionen identifiziert, die als Verunreinigung in kommerziell erhältlichem ATP vorkommen (Womack und Colowick, 1979). Deren Einfluss verschwindet bei pH-Werten oberhalb von 7,5, auch Citrat als Chelator der Ionen vermindert den Effekt (Neet *et al.*, 1982). Da die Tabak-Hexokinasen bei pH 8,4 gemessen wurden, ist dieser Effekt nicht für die negative Kooperativität verantwortlich. Dies wurde durch Kontrollmessungen mit 0,5 mM NaCitrat im Messpuffer bestätigt. NaCitrat hatte auch keinen Einfluss auf die pH-Abhängigkeiten von NtHxk1 und NtHxk2 (Daten nicht gezeigt).

NtHxk4a und NtHxk5 zeigten nur sehr geringe negative Kooperativität, die vermutlich auf eine gering vorhandene endogene Hexokinase zurückzuführen ist. Es gibt keine vergleichbaren Werte der nah verwandten Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* und Broccoli. Angesichts der exponierten Stellung von AtHxk1 als Zuckersensor (Moore *et al.*, 2003) verwundert dies. Die K_m -Werte für ATP von 26-41 μM bzw. 7-14 μM sind außergewöhnlich niedrig für pflanzliche Hexokinasen. Die niedrigsten veröffentlichten K_m -Werte stammen mit 30 μM von der zytosolische HK3 aus *Ricinus communis* Endosperm (Miernyk und Dennis, 1983), 48 μM von HK L_{II} aus Weizenkeim (Higgins und Easterby, 1974), 50-156 μM von mitochondrial gebundener Hexokinase aus Mais-Keimlingswurzeln (Galina *et al.*, 1995; da-Silva *et al.*, 2001) und 66 μM von GK-2 aus sich entwickelnden Maiskörnern (Doehlert, 1989). Von keiner der genannten Hexokinasen ist die Sequenz bekannt. Es fällt auf, dass GK-2 außerdem eine zu NtHxk4a und NtHxk5 ähnliche pH-Abhängigkeit aufwies (s. 4.5.2) und die

mitochondrial gebundene Hexokinase aus Mais-Keimlingswurzeln eine ähnliche Affinität zu Fruktose (s. 4.5.3). Möglicherweise haben sie vergleichbare Funktionen wie NtHxk4 und NtHxk5.

Die Affinität von Hexokinasen zu ATP ist wahrscheinlich abhängig von der zuvor gebundenen Hexose. Für ScHxk2 wurde gezeigt, dass die Konformationsänderung nach Bindung der Hexose abhängig vom Substrat unterschiedlich ausfällt und dementsprechend die nachfolgende Bindung von ATP beeinflusst (Ohning und Neet, 1983). Da die Bindestellen für ATP auf beide Domänen der Hexokinase verteilt sind, ist ihre Lage zu einander abhängig von der durch die Hexose hervorgerufene Konformationsänderung (Wilson und Schwab, 1996). Wenn Fruktose als schlechtes Substrat pflanzlicher Hexokinasen eine ungünstige Konformationsänderung bewirkt, hätte dies eine schlechtere ATP-Bindung zur Folge. Für pflanzliche Hexokinasen gibt es hierzu noch keine detaillierten Untersuchungen.

4.5.5 Inhibition durch ADP

Auch bei der Inhibition durch ADP reagierten NtHxk4a und NtHxk5 anders als NtHxk1, 2, 3 und die im WT gemessene Hexokinase. Letztere wurden kompetitiv zu ATP gehemmt, erstere wahrscheinlich nichtkompetitiv.

Bei den aus Kartoffelknollen isolierten Aktivitäten HK1 und HK2 bewirkte ADP eine kompetitive Hemmung mit kleiner nichtkompetitiver Komponente in Bezug auf ATP (Renz und Stitt, 1993). Wie im vorigen Abschnitt 4.5.4 dargelegt wurde, ist diese „kleine nichtkompetitive Komponente“ wahrscheinlich eine Fehlinterpretation aufgrund der nicht erkannten negativen Kooperativität der Enzyme.

Bei NtHxk4a und NtHxk5 ist von einer nichtkompetitiven Inhibition auszugehen. Die Abweichungen vom Idealverlauf der Kinetik wurden vermutlich von einer zusätzlich vorhandenen endogenen Hexokinase-Aktivität verursacht, welche die zu messende Reaktion überlagerte und kompetitiv durch ADP gehemmt wurde. Nichtkompetitive Inhibition durch ADP wurde für eine mitochondrial gebundene Hexokinase aus Mais-Keimlingswurzeln (Galina *et al.*, 1995) und HK L_{II} aus Weizenkeim (Higgins und Easterby, 1974) ermittelt.

4.5.6 Inhibition durch andere Metabolite

Inhibition durch AMP wurde nicht festgestellt. Es wirkte allerdings indirekt durch Aktivität einer Adenylatkinase, die AMP und ATP in den Inhibitor ADP umwandelte.

Keine der Tabak-Hexokinasen wurde durch Trehalose-6-phosphat inhibiert. Gleiches gilt für SoHxk1 (Wiese *et al.*, 1999), AtHxk1 und AtHxk2 (Eastmond *et al.*, 2002; Gonzali *et al.*, 2002). Vermutlich werden nur pilzliche und tierische Hexokinasen in unterschiedlichem Ausmaß durch diesen Metaboliten beeinflusst (Blazquez *et al.*, 1993).

Inhibition durch Glukose-6-phosphat konnte mit der in dieser Arbeit verwendeten Aktivitätsmessung nicht bestimmt werden. Es gibt Hinweise, dass Inhibition nur bei neutralem pH-Wert stattfindet, z.B. bei dem NtHxk1-Homolog StHxk1 aus Kartoffel. Das vermutliche NtHxk2-Homolog HK2 aus Kartoffel wurde dagegen nicht inhibiert (Renz und Stitt, 1993). In Tomate wurde das NtHxk3-Homolog LeHxk2 bei pH 7,5 inhibiert (Menu *et al.*, 2001), das vermutliche NtHxk2-Homolog „Glukokinase“ nur im neutralen pH-Bereich (Martinez-Barajas und Randall, 1998). Hexokinasen aus Weizenkeim wurden bei pH 7,5 (Higgins und Easterby, 1974) und auch bei pH 8,0 inhibiert (Saltman, 1953). Aufgrund der eventuell vorhandenen pH-Abhängigkeit besitzen negative Ergebnisse, die nur bei einem basischen pH gemacht wurden, nur eingeschränkte Aussagekraft (Turner *et al.*, 1977; Doehlert, 1989; Galina *et al.*, 1995). Sofern vorhanden, ist die Inhibition vermutlich nichtkompetitiv zu Glukose (Renz und Stitt, 1993) und ATP (Higgins und Easterby, 1974).

4.5.7 Hexokinase-Aktivität im Wildtyp-Blatt

Keine der bekannten Hexokinasen wird stark in der *Source*-Blatt Lamina transkribiert. Die Identität der dort aktiven Isoform ist demnach unklar. Es könnte sich um eine noch nicht entdeckte Isoform handeln oder um eine schwach exprimierte mit hoher Aktivität. Auch ein Gemisch verschiedener Isoformen ist möglich. Die im WT gemessene Hexokinase ähnelte in pH-Abhängigkeit, Affinität zu Glukose, Mannose und ATP NtHxk3. Abweichungen gab es bei der Affinität zu Fruktose und der Inhibition durch ADP. Erstere konnte im WT aufgrund der in Relation dazu starken Fruktokinase nicht genau gemessen werden, zumal diese vermutlich einer Substratinhibition unterworfen war (Pego und Smeekens, 2000). Letztere konnte wegen der geringen Aktivität im WT nicht mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden (s. Tab. 24).

4.6 Messung von Kohlenhydraten und Fütterungsversuch

Die Überexpression der Tabak-Hexokinasen hatte unter physiologischen Bedingungen keinen oder nur geringen Einfluss auf den Zuckerstoffwechsel. Dies wurde auch nach Überexpression von StHxk1 oder StHxk2 in Kartoffel festgestellt (Veramendi *et al.*, 1999, 2002). Die im WT vorhandene Hexokinase-Aktivität stellt im *Source*-Blatt demnach keinen Flaschenhals dar, der durch Überexpression geweitet würde. Erst durch Fütterung von Glukose wurde ein Einfluss der Hexokinasen auf den Stärkegehalt sichtbar. Dieser zeigte zwischen beiden durchgeführten Versuchen deutliche Unterschiede. Vermutlich waren der Altersunterschied von einer Woche und äußere Bedingungen wie Licht oder Temperatur dafür verantwortlich.

Besonders auffällig ist das durch NtHxk1 verursachte Absinken des Stärkegehalts nach Glukose-Fütterung. Es ist anzunehmen, dass das von NtHxk1 synthetisierte Glukose-6-phosphat nicht der Stärkesynthese zur Verfügung stand, sondern z.B. in die Glykolyse kanalisiert wurde. Warum allerdings die Pflanze trotz Überangebots von Glukose weiterhin Stärke abbaute, ist unklar. Aufgrund von Studien des NtHxk1-Homologs StHxk1 aus Kartoffel ist für sie eine Rolle beim Stärkeabbau anzunehmen. *Antisense*-Inhibition von StHxk1 resultierte bei *Source*-Blättern in temporär erhöhtem Stärkegehalt am Ende der Dunkelphase (Veramendi *et al.*, 1999). Allerdings wären dann bei Überexpression von NtHxk1 generell geringere Stärkegehalte zu erwarten, welche jedoch nicht beobachtet wurden.

Für die Erhöhung der Stärkesynthese bei NtHxk5, NtHxk6 und ZmGlc überexprimierenden Pflanzen sind aufgrund ihrer deutlich unterschiedlichen Aktivitäten verschiedene Mechanismen zu vermuten. NtHxk5 bewirkte trotz relativ geringer Aktivität eine deutlich erhöhte Stärkesynthese. Möglicherweise liegt hier eine Kanalisierung von Glukose-6-phosphat zu Glukose-1-phosphat vor. Dieses könnte über einen entsprechenden Transporter in die Plastiden transportiert (Flügge, 1999) und dort in ADP-Glukose und Stärke umgewandelt werden. Für eine mitochondrial gebundene Hexokinase aus Mais-Keimlingswurzeln wurde eine entsprechende Kanalisierung von Glukose-6-phosphat zu NDP-Glukose nachgewiesen (Galina und da Silva, 2000). Alternativ könnte ihre extrem hohe Affinität zu ATP einen erhöhten Substratumsatz ermöglichen. Für die bakterielle ZmGlc ist eine Interaktion mit pflanzlichen Enzymen und daraus resultierende Kanalisierung dagegen unwahrscheinlich. Das von ihr synthetisierte Glukose-6-phosphat dürfte allen Stoffwechselwegen gleichermaßen zur Verfügung stehen und somit auch der Stärkesynthese. Da NtHxk6 selber vermutlich keine katalytische Funktion als Hexokinase besitzt, muss ihre Wirkung indirekter Natur sein. Sie

könnte als Sensor des Zuckerstatus eine generelle Aktivierung des entsprechenden Stoffwechsels bewirken.

Die detaillierte Analyse von Metaboliten und Schlüsselenzymen wird eine genauere Aussage über die Beeinflussung des Stoffwechsels durch die verschiedenen Hexokinasen ermöglichen.

4.7 Integration der Einzelergebnisse in Modelle

In dieser Arbeit wurden sieben verschiedene Hexokinase-Isoformen in unterschiedlichem Ausmaß charakterisiert. Abhängig von der Güte der Einzelergebnisse lassen sich für die verschiedenen Isoformen Modelle aufstellen, die ihre Aufgabe im pflanzlichen Metabolismus zu beschreiben versuchen. Dabei werden Ergebnisse anderer Veröffentlichungen integriert.

Die in Abb. 63 gezeigten Verwandtschaftsverhältnisse spiegeln sich in diesen Modellen wieder, indem ähnlichen Isoformen ähnliche Funktionen zugeschrieben werden.

4.7.1 Funktion von NtHxk1, 3, und 7

Deutlich die meisten Transkripte von *NtHxk1*, *3* und *7* wurden in reifen Staubbeutel nachgewiesen. Für NtHxk7 konnte die Gewebespezifität durch die Promotoranalyse von *NsHxk4* hauptsächlich auf Pollen eingeschränkt werden. Es ist anzunehmen, dass für NtHxk1 und NtHxk3 die gleiche Beschränkung gilt. Daher soll bei den folgenden Betrachtungen der Zuckerstoffwechsel in Pollen im Mittelpunkt stehen.

Keimende Pollen sind metabolisch höchst aktive Gewebe. Für Pollenschläuche aus Tabak wurde ein Wachstum von 1,7 mm/h ermittelt (Sanchez *et al.*, 2004). Um dieses Wachstum aufrecht zu erhalten, müssen unablässig Energie und Vorstufen für Plasmamembran und Zellwand bereitgestellt werden. Da Pollen symplastisch von der restlichen Pflanze isoliert sind, erfolgt ihre Versorgung über einen apoplastischen Schritt (Scott *et al.*, 2004). Für Tabakpollen konnte gezeigt werden, dass dafür eine zellwandgebundene Invertase notwendig ist (Goetz *et al.*, 2001). *Antisense*-Inhibition dieser Invertase führte zu schlecht entwickelten sterilen Pollen. Der Transport der Spaltprodukte Glukose und Fruktose in die Pollen erfolgt durch gewebespezifische Monosaccharidtransporter, von denen in *Arabidopsis thaliana* fünf identifiziert wurden (Schneiderei *et al.*, 2005). Auch Saccharose wird in die Pollen transportiert und zusammen mit anderen löslichen Zuckern in Vakuolen eingelagert (Clement und Audran, 1993; Lemoine *et al.*, 1999; Stadler *et al.*, 1999). Keimende Pollen werden außer durch die angehäuften Speicherstoffe auch durch die Narbenflüssigkeit aus Fettsäuren,

Zuckern und Aminosäuren ernährt (Konar und Linskens, 1966). In keimenden Petunienpollen wurden dementsprechend ebenfalls zellwandgebundene Invertase und Monosaccharidtransporter nachgewiesen (Ylstra *et al.*, 1998). Pollen haben demnach einen regen Zuckerstoffwechsel und einen Bedarf an hoher Hexokinase-Aktivität.

Viele Transkripte werden stabil in Pollen gelagert und erst während der Pollenkeimung translatiert (Mascarenhas, 1993; Ylstra und McCormick, 1999). Dies ist vermutlich auch bei den Hexokinasen der Fall, andernfalls wäre in Staubbeuteln eine deutlicher erhöhte Aktivität gegenüber anderen Geweben zu erwarten (vgl. Abb. 35 und 36). Wenn während der Pollenkeimung das schnelle Wachstum im Mittelpunkt steht, liefert die Glykolyse unter optimalen Bedingungen mehr Pyruvat, als die nachfolgenden Reaktionen verarbeiten können. Pyruvat wird in Pollen über einen aus der Bäckerhefe bekannten alternativen Weg im Zytosol zu Acetyl-CoA umgewandelt, um die Synthese von Lipiden zu optimieren. Dabei kommt es vorübergehend zur Akkumulation von Ethanol (Bucher *et al.*, 1995; Mellema *et al.*, 2002). Diese Effizienz verdankt die Glykolyse vermutlich der räumlichen Anordnung ihrer Enzyme an der äußeren Mitochondrienmembran (Giegé *et al.*, 2003). Hexokinase aus Sellerie wurde in Situationen hohen Substratumsatzes in einem 280 kDa großen Komplex mit anderen, nicht identifizierten Proteinen gefunden (Yamamoto *et al.*, 2000). Vermutlich erfolgt durch solche Komplexe eine gezielte Kanalisierung von Stoffwechselprodukten. Wie die Glukose-Fütterung zeigte, könnte NtHxk1 eine Kanalisierung des Stoffwechsels in die Glykolyse bewirken (s. 4.6), und somit in Pollenschläuchen erhöhte Respiration und Lipidsynthese ermöglichen (Mellema *et al.*, 2002).

Außer einer Kanalisierung von Glukose-6-phosphat in die Glykolyse ist auch eine Kanalisation hin zu UDP-Glukose denkbar. Diese wurde für eine mitochondrial gebundene Hexokinase aus Mais-Keimlingswurzeln nachgewiesen (Galina und da Silva, 2000). In Pollenschläuchen von *Nicotiana glauca* wurde eine sehr hohe zytosolische UDP-Glukose-Konzentration von 3,5 mM bestimmt (Schlupmann *et al.*, 1994). UDP-Glukose ist elementarer Baustein der Zellwand, die bei Pollenschläuchen zu mehr als 80 % aus Kallose besteht (Schlupmann *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1999). Sofern NtHxk1 tatsächlich in die Glykolyse kanalisiert, wäre für NtHxk7 oder NtHxk3 eine Kanalisierung zu UDP-Glukose sinnvoll. NtHxk7 konnte diesbezüglich nicht untersucht werden, für NtHxk3 wurden keine entsprechenden Hinweise gefunden.

In Pollen anderer Pflanzen verläuft der Zuckerstoffwechsel stärker über Fruktokinasen. In Pollen von Paprika (Karni und Aloni, 2002), *Camellia japonica* und zweier Lilienarten

(Nakamura *et al.*, 1991) wurde vergleichsweise wenig Hexokinase-Aktivität gemessen, jedoch sehr viel Fruktokinase.

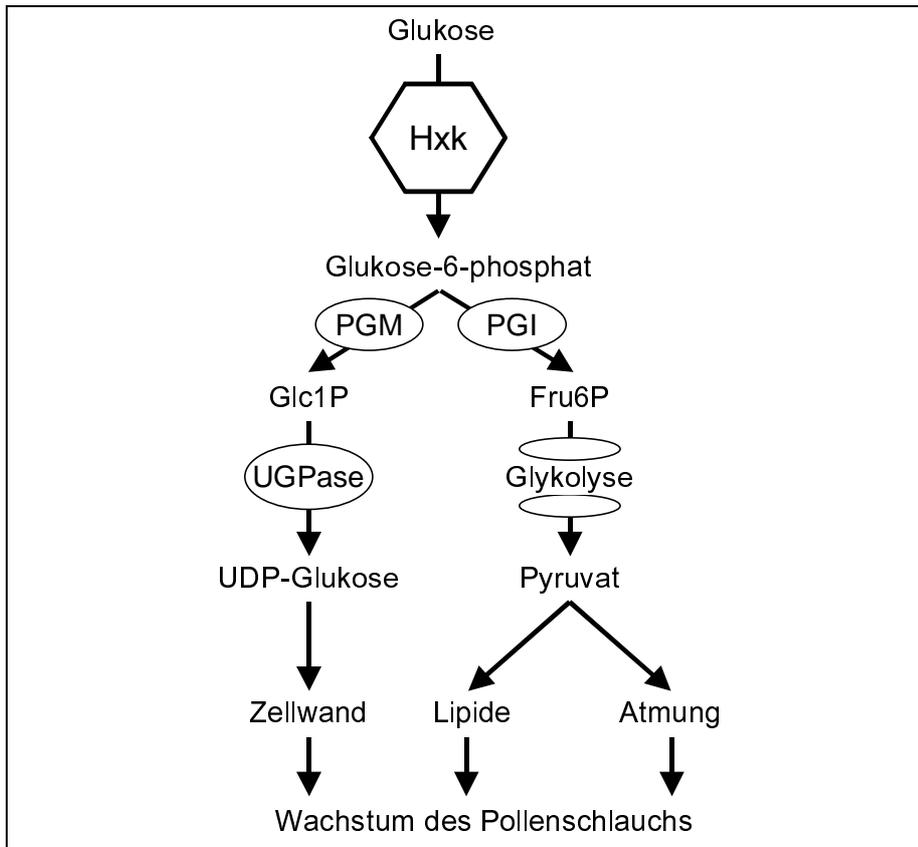


Abbildung 64: Modellvorstellungen zur Rolle der mitochondrial gebundenen Hexokinasen NtHxk1, 3 und 7 im Zuckerstoffwechsel von Pollenschläuchen. Fru6P: Fruktose-6-phosphat, Glc1P: Glukose-1-phosphat, Hxk: Hexokinase, PGI: Phosphoglukoisomerase, PGM: Phosphoglukomutase, UGPase: UDP-Glukose-Pyrophosphorylase.

In anderen Geweben als Pollen steht das schnelle Wachstum nicht im Vordergrund. In Kartoffelpflanzen wurde durch *Antisense*-Inhibitionen der zu NtHxk7 und NtHxk1 homologen StHxk1, sowie der zu NtHxk3 homologen StHxk2 die Gesamtaktivität zu mehr als 50 % verringert, ohne dass schwerwiegende Folgen für die Pflanzen beobachtet wurden. In *Source*-Blättern von Pflanzen mit verringerter StHxk1 wurde lediglich ein temporär erhöhter Stärkegehalt am Ende der Dunkelphase festgestellt (Veramendi *et al.*, 1999). Demnach spielt StHxk1 eine Rolle beim Abbau transitorischer Stärke. Es ist noch nicht geklärt, ob sie der Aufrechterhaltung eines Glukose-Gradienten über die Plastidenmembran dient (Wiese *et al.*, 1999), oder ob sie zur Synthese eines noch weitgehend unbekanntes Polyglukans durch eine Glukosyltransferase notwendig ist (s. 1.3; Sharkey *et al.*, 2004). Leider wurde der Einfluss der *Antisense*-Inhibition von StHxk2 im *Source*-Blatt nicht untersucht (Veramendi *et al.*, 2002). Vermutlich konnte die jeweils andere Isoform die *Antisense*-Inhibition ausreichend kompensieren.

4.7.2 Funktion von NtHxk2

Sowohl Gewebespezifität als auch subzelluläre Lokalisierung von NtHxk2 sind außergewöhnlich. Besonders über den Zuckerstoffwechsel in Stärkescheide und Xylem-Parenchym ist wenig bekannt, was die Interpretation der Rolle von NtHxk2 erschwert. In den Plastiden laufen zahlreiche Stoffwechselwege ab, unter anderem Photosynthese, Synthese von Stärke, Fettsäuren, Aminosäuren, sekundären Pflanzenstoffen, Assimilation von Stickstoff und Schwefel.

Stärkescheide, Schließzellen und Wurzelspitze sind reich an Stärke. Promotoren von ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen aus Kartoffel (Müller-Röber *et al.*, 1994) und *Arabidopsis thaliana* (Siedlecka *et al.*, 2003) zeigten überlappende Gewebespezifität mit dem NtHxk2-Promotor. Der Promotor aus *Arabidopsis thaliana* war auch im Xylem-Parenchym aktiv, wo weniger Stärke akkumuliert. Auch der Promotor einer plastidären β -Amylase war hier aktiv (Lao *et al.*, 1999). Womöglich herrscht in diesem Gewebe ein rascher Kreislauf aus Auf- und Abbau der Stärke. Eine stromale Hexokinase könnte an beiden Vorgängen beteiligt sein.

Zum Aufbau der Stärke über eine stromale Hexokinase wäre der Import von Glukose in die Plastiden notwendig. Der einzige bisher beschriebene plastidäre Glukosetransporter aus Tabak wird in den entsprechenden Geweben nur sehr gering transkribiert und ist wahrscheinlich nicht der geeignete Transporter (Weber *et al.*, 2000). Basierend auf der Analyse des *Arabidopsis thaliana* Genoms ist allerdings anzunehmen, dass es noch weitere plastidäre Glukosetransporter mit womöglich besser entsprechenden Gewebespezifität gibt (Weber, 2004).

Amylolytischer Abbau von Stärke resultiert immer auch in kleinen Mengen Glukose (Zeeman *et al.*, 2004), die der stromalen Hexokinase als Substrat dienen können. Das entstehende Glukose-6-phosphat könnte anschließend in die Glykolyse oder in den oxidativen Pentosephosphatweg eingeschleust werden.

Basierend auf Promotoranalysen der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase PAL2 und PAL3 aus Bohne ist anzunehmen, dass in Xylem-Parenchym, Stärkescheide und Wurzelspitze ein sehr aktiver Phenylpropanstoffwechsel stattfindet (Shufflebottom *et al.*, 1993; Hatton *et al.*, 1995). Dieser ist abhängig vom Shikimatweg, in dem aus Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat Chorismat und nachfolgend Phenylalanin synthetisiert wird. Phosphoenolpyruvat wird vermutlich vom Zytosol in die Plastiden transportiert, da diese häufig keine vollständige Glykolyse aufweisen (Plaxton, 1996). Der Promotor des entsprechenden Transporters AtPPT1 aus *Arabidopsis thaliana* zeigte im Leitgewebe eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem von NtHxk2 (Knappe *et al.*, 2003). Erythrose-4-phosphat ist Zwischenprodukt des reduktiven

(„Calvin-Zyklus“) und oxidativen Pentosephosphatwegs. Während nachts und im Wurzelgewebe nur der oxidative Weg abläuft (Emes und Neuhaus, 1997, Kruger und von Schaewen, 2003), dürfte im oberirdischen Teil des Leitgewebes tagsüber der reduktive Weg vorherrschen (Hibberd und Quick, 2002). Entnahme von Erythrose-4-phosphat aus den zyklischen Pentosephosphatwegen würde ein Leerlaufen der Zyklen bewirken. Der oxidative Weg könnte von NtHxk2 direkt mit Glukose-6-phosphat aufgefüllt werden, für den reduktiven Weg wäre erst eine Umwandlung in Fruktose-6-phosphat nötig, ein Intermediat beider Zyklen.

Auch in Schließzellen könnte NtHxk2 als anaplerotisches Enzym der Pentosephosphatwege dienen, wobei allerdings nicht der Phenylpropanstoffwechsel als Ziel anzusehen ist. Der Stärkevorrat der Schließzellen dient der Synthese organischer Osmotika, mittels derer Turgor und somit Öffnung der Stomata reguliert wird (Talbot und Zeiger, 1997). Schließzellen von *Vicia faba* exportierten im Licht Triosephosphate, Glukose, Maltose und nicht näher identifizierte Hexosephosphate (Ritte und Raschke, 2003). Die Autoren schlugen die Existenz einer stromalen Hexokinase vor, welche die aus amylolytischem Stärkeabbau entstandene Glukose phosphoryliert. Glukose-6-phosphat könnte über Fruktose-6-phosphat in den Calvin-Zyklus eingeschleust werden, um dort den CO₂-Akzeptor Ribulose-1,5-bisphosphat zu regenerieren. Durch die gering vorhandene RubisCO-Aktivität könnte so zusätzliches CO₂ in die Synthese von Triosephosphaten einfließen, die letztlich dem Aufbau des Turgors dienen. Alternativ könnte das Glukose-6-phosphat auch in den oxidativen Pentosephosphatweg eingeschleust werden, da in den untersuchten Schließzellen dessen beide Dehydrogenasen im Licht in ähnlichem Ausmaß wie die RubisCO aktiv waren (Ritte und Raschke, 2003).

Es stellt sich die Frage, in wieweit NtHxk2 durch eine Fruktokinase oder eine zytosolische Hexokinase ersetzt werden könnte. Sollte die Pflanze eine durch RNA-Interferenz inhibierte NtHxk2 nicht kompensieren können, wären vielfältige Phänotypen denkbar. Eine Verringerung des Flusses durch den Shikimatweg könnte zu einem Phänotyp ähnlich *cue1* führen. Dieser wird durch eine Mutation des bereits erwähnten plastidären Phosphoenolpyruvat-Transporters AtPPT1 hervorgerufen und äußert sich in bleichen Interkostalen des Blatts und einer gestörten Entwicklung von Chloroplasten und Mesophyll (Voll *et al.*, 2003; Knappe *et al.*, 2003).

Stärkegefüllte Plastiden in Stärkescheide und Wurzelspitze dienen dem Gravitropismus (Blancaflor und Masson, 2003). Störungen in deren Stoffwechsel könnten Auswirkungen auf

den Wuchs der Pflanze haben. Auch ein verminderter Lignifizierungsgrad aufgrund verminderten Phenylpropanstoffwechsels des Leitgewebes könnte Wuchsstörungen hervorrufen. Tomatenpflanzen mit verringerter Fruktokinase LeFRK2 im Stängel zeigten verminderten Wuchs und welkten schneller aufgrund weniger entwickelten Xylems (German *et al.*, 2003). In Tomatenpflanzen überwiegt die Fruktokinase-Aktivität in Stängeln die der Hexokinase um das zehnfache bis vierzigfache (German *et al.*, 2003). Im Tabakstängel ist das Verhältnis ausgeglichener (s. Abb. 35), so dass hier von einem größeren Einfluss von NtHxk2 auszugehen ist.

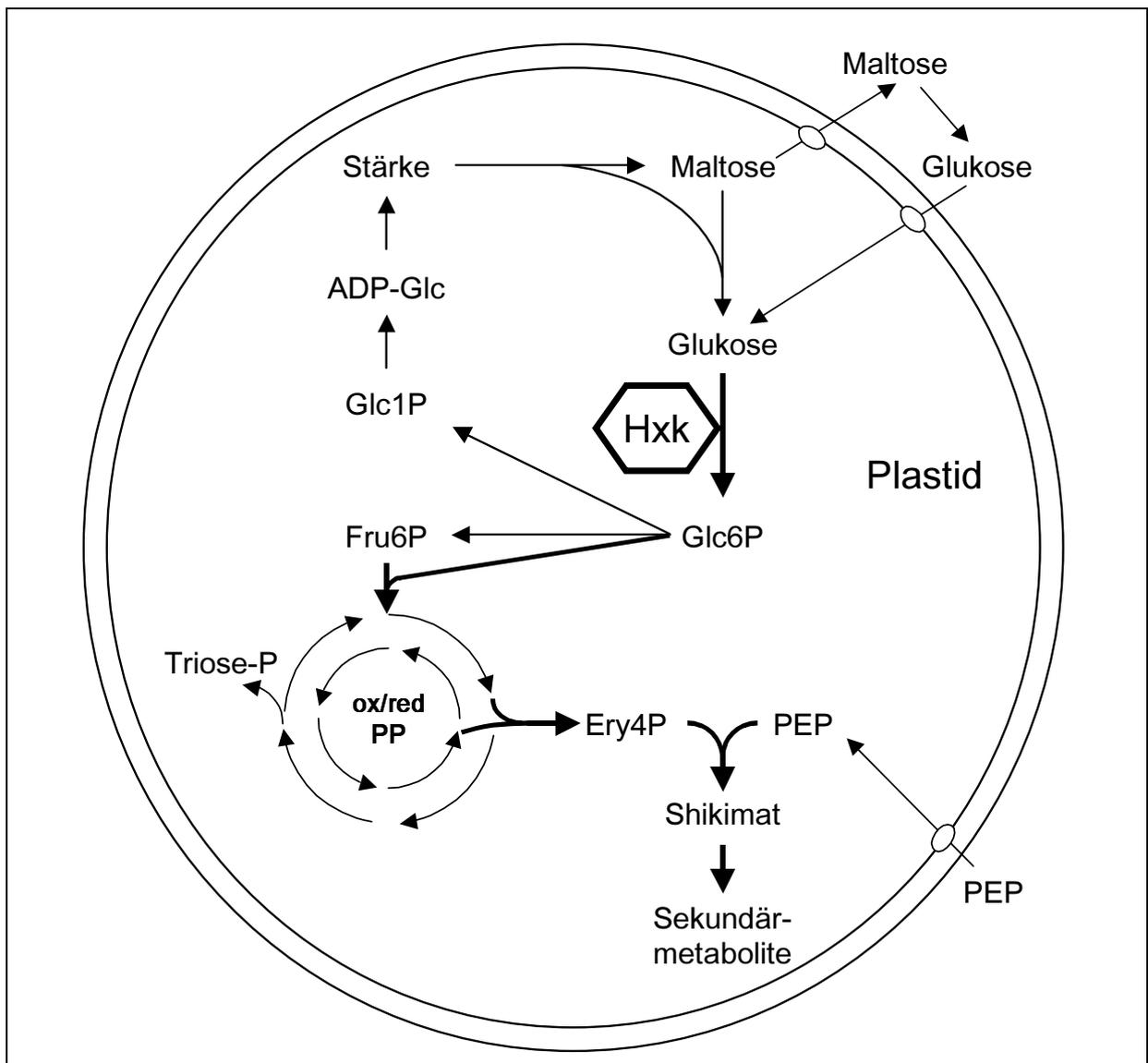


Abbildung 65: Modellvorstellungen zur Rolle der plastidären Hexokinase NtHxk2 im Zuckerstoffwechsel.

ADP-Glc: ADP-Glukose, Ery4P: Erythrose-4-phosphat, Fru6P: Fruktose-6-phosphat, Glc1P: Glukose-1-phosphat, Glc6P: Glukose-6-phosphat, ox/red PP: oxidativer / reduktiver Pentosephosphatweg, PEP: Phosphoenolpyruvat, Triose-P: Triosephosphat.

4.7.3 Funktion von NtHxk4 und NtHxk5

In keinem Gewebe des Wildtyps konnten signifikante Transkriptmengen nachgewiesen werden, demnach ist die Expression beider Isoformen strikt reguliert. Möglicherweise ist eine starke Überexpression auch schädlich für die Pflanze, was eine Erklärung wäre für die vergleichsweise geringe Aktivität in regenerierten transgenen Pflanzen. Aufgrund der unbekanntem Gewebespezifität beider Isoformen kann über ihre Rolle im Stoffwechsel nur spekuliert werden. Als Basis dieser Spekulationen dienen ihre besonderen biochemischen Eigenschaften. Beide Isoformen unterscheiden sich in diesen teilweise deutlich von den anderen Isoformen. Es ist zu vermuten, dass ihre geringere pH-Abhängigkeit eine Anpassung an niedrige pH-Werte ist. Die sehr hohe Affinität zu ATP und vergleichsweise geringe Inhibition durch ADP prädestinieren sie für Gewebe mit geringer Energieladung AEC (Adenylate Energy Charge). Die AEC gibt den Anteil der energiereichen Phosphatbindungen von ATP und ADP am gesamten Adenylat-*Pool* an:

$$\text{AEC} = ([\text{ATP}] + 0,5 \times [\text{ADP}]) / ([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]).$$

In aktiv metabolisierenden Geweben ohne Limitierungen durch Nährstoffe oder Sauerstoff sind AEC-Werte von 0,8 bis 0,9 normal (Pradet und Raymond, 1983). Geringe AEC und teilweise niedrige pH-Werte werden durch Sauerstoffmangel bewirkt. Der Stoffwechsel wird entsprechend angepasst, um den ATP-Verbrauch zu vermindern (Geigenberger, 2003). In anoxischen Tabakwurzeln fiel die AEC auf 0,38 (Tadege *et al.*, 1998), für Tomatenwurzeln wurden Werte von 0,28-0,56 beobachtet (Germain *et al.*, 1997). Gleichzeitig nahm auch die Gesamtmenge der Adenylate ab. In hypoxisch akklimatisierten Reiswurzeln wurde gesteigerte Hexokinase-Aktivität als wichtiger Faktor zum längeren Überleben in Anoxie festgestellt (Bouny und Saglio, 1996), in Tomaten dagegen wurde sie inhibiert (Germain *et al.*, 1997).

In aeroben Maiswurzelspitzen wurden Konzentrationen von ATP, ADP und AMP von 0,7 / 0,1 / 0,02 mM gemessen, in hypoxischen von 0,2 / 0,2 / 0,15 mM. In den hypoxischen Wurzelspitzen waren nur 10-15 % Prozent dieses ATPs nicht proteingebunden und damit frei verfügbar für den Stoffwechsel (Hooks *et al.*, 1994). NtHxk4 und NtHxk5 wären unter diesen Bedingungen aktiver als NtHxk1, 2 oder 3. Ihre Expression in hypoxischen Wurzeln könnte daher eine geeignete Maßnahme der Pflanze sein, um den Stoffwechsel unter Energiemangel aufrecht zu erhalten. In einem vorläufigen Versuch wurden vier Wochen alte Pflanzen mit ihren Wurzeln in eine Nährlösung gestellt, die entweder mit Luft, oder zur Erzeugung von Hypoxie mit Stickstoff begast wurde (Biemelt *et al.*, 1999). Nach einer Woche Hypoxie

waren Transkripte des typischen Gärungsenzyms Alkohol-Dehydrogenase nachweisbar, jedoch weder NtHxk4, noch NtHxk5 (Daten nicht gezeigt). Somit sind diese Isoformen keine generell bei Sauerstoffmangel exprimierten Enzyme. Für eine abschließende Antwort sind weitergehende Versuche notwendig.

Andere Gewebe, in denen typischerweise Sauerstoffmangel und geringe AEC vorherrschen, finden sich in nicht-photosynthetischen Samen aufgrund ihrer festen Schale (Gibon *et al.*, 2002). In reifen, trockenen Samen wurden AEC-Werte bis hinab zu 0,2 gemessen (Hourmant und Pradet, 1981). In Tabak-Embryonen verringerte sich die maximale Hexokinase-Aktivität 16 Tage nach Blütenentfaltung um ca. 30 %, bis zur Samenreife 14 Tage später blieb sie dann konstant (Tomlinson *et al.*, 2004). NtHxk4 und NtHxk5 hätten unter diesen Bedingungen mit geringer AEC Vorteile gegenüber den anderen Isoformen.

In Embryonen und Keimlingswurzeln von Mais wurden Hexokinase-Aktivitäten gefunden, die denen von NtHxk4 und NtHxk5 ähnelten. Die aus 20 Tage alten Embryonen isolierte Hexokinase GK-2 zeigte eine konstante Aktivität zwischen pH 7 und 9, sowie eine hohe Affinität zu ATP mit einem K_m -Wert von $66 \pm 9 \mu\text{M}$ (Doehlert, 1989). Für eine mitochondrial gebundene Hexokinase aus Wurzeln drei bis fünf Tage alter Keimlinge wurde ein K_m -Wert für ATP von 50-156 μM ermittelt; Inhibition durch ADP erfolgte nichtkompetitiv (Galina *et al.*, 1995; da-Silva *et al.*, 2001). Sie besaß außerdem eine relativ hohe Affinität zu Fruktose mit einem K_m -Wert von 2-6 mM (Galina *et al.*, 1999). Aufgrund dieser ähnlichen Eigenschaften sind vergleichbare Rollen im Metabolismus plausibel. Wegen ihrer schwierigen Präparation waren Tabaksamen nicht in die Untersuchungen zu NtHxk4 und NtHxk5 einbezogen worden.

4.7.4 Funktion von NtHxk6

Obwohl NtHxk6 vermutlich keine katalytische Funktion als Hexokinase besitzt, führte ihre Überexpression zu einem veränderten Phänotyp in den Pflanzen. Dieser äußerte sich in helleren *Sink*-Bereichen der Blätter und verschwand in älteren Blättern (s. Abb. 52). Bei fehlender katalytischer Aktivität von NtHxk6 könnte ihr Effekt auf einer sensorischen Funktion beruhen, wie er für Hexokinasen aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt wurde (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003). NtHxk6 könnte nach Bindung von Glukose mit anderen Proteinen interagieren und dadurch die Gegenwart des Zuckers signalisieren. Bei Überexpression von NtHxk6 könnte diese Signalkette verstärkt ablaufen, wodurch die Pflanze überempfindlich auf ansonsten normale Mengen Glukose reagierte. Als Folge würden

photosynthetische Gene herunterreguliert, wie es aufgrund der bleichen Blattbereiche auch für NtHxk6-Pflanzen anzunehmen ist (Jang *et al.*, 1997). Leider kann derzeit keine verlässliche Aussage über die Gewebespezifität von NtHxk6 gemacht werden. Möglicherweise hat NtHxk6 nur im *Sink*-Blatt eine Funktion als Zuckersensor, was eine Erklärung dafür wäre, dass beim typischen Phänotyp nur dieses Gewebe auffällig ist.

Für Tabak und Kartoffel gab es bislang keine Hinweise auf sensorische Hexokinasen (Herbers *et al.*, 1996; Veramendi *et al.*, 2002). Allerdings zeigten in *Arabidopsis thaliana* überexprimierte NtHxk1 (Wiese, 2000), StHxk1 und StHxk2 (Veramendi *et al.*, 2002) durchaus Eigenschaften eines Zuckersensors, indem sie die Sensitivität von Keimlingen gegenüber Glukose erhöhten. Demnach sind in dieser Hinsicht gewonnene Ergebnisse nicht ohne weiteres von einer Pflanze auf die andere übertragbar.

Zur Klärung der Rolle von NtHxk6 in Pflanzen ist eine genaue Analyse des Phänotyps notwendig. Falls er auf einer sensorischen Funktion beruht, sollten Fütterungsversuche mit Glukose stärkere Effekte hervorrufen als bei Kontrollpflanzen. Als zusätzliche Kontrolle böten sich Pflanzen mit verringerter NtHxk6-Expression an. Kreuzung mit anderen Hexokinase überexprimierenden Pflanzen könnte zu Konkurrenz zwischen beiden Isoformen führen, was den Phänotyp verringern sollte. Keimlinge von *Arabidopsis thaliana*, die ScHxk2 exprimierten, waren weniger sensitiv gegenüber Glukose, was auf Konkurrenz zurückgeführt wurde (Jang *et al.*, 1997).

Bezüglich der fehlenden katalytischen Aktivität von NtHxk6 ist zu untersuchen, ob sie durch gezielte Mutagenese zu restaurieren ist. Dies könnte wahlweise durch Deletion der inserierten Aminosäuren 426-436 geschehen (s. Abb. 6), oder durch Konstruktion eines chimären Proteins. Durch Austausch des gesamten *Adenosine*-Bereichs mit denjenigen anderer Isoformen ließe sich gleichzeitig deren Einfluss auf die ATP-Affinität überprüfen. Vermutlich müsste auch Histidin-101 zu Aspartat mutiert werden, um die Katalyse vollständig zu restaurieren (s. 3.1.2, Bajjal *et al.*, 1995). Sollte die Restauration gelingen, wäre weiterhin interessant, ob dadurch der durch NtHxk6 verursachte Phänotyp beeinflusst wird.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden durch Plaque-Hybridisierungen und PCR-Techniken sieben verschiedene Hexokinase-Isoformen aus *Nicotiana tabacum* isoliert und entsprechend ihrer Entdeckung von 1 bis 7 benannt. Southern-Analysen und Gensequenzen aus *Nicotiana sylvestris* belegen die Existenz von drei weiteren Genen, die homolog zu den Isoformen 2, 3 und 6 sind. Insgesamt liegen somit mindest zehn verschiedene Hexokinase-Gene im *Nicotiana tabacum* Genom vor. Die Isoformen 1 bis 7 wurden in unterschiedlichem Ausmaß charakterisiert.

NtHxk2 wurde nach Fusion mit GFP und durch *in vitro* Transportstudien mit intakten Chloroplasten im Plastidenstroma nachgewiesen. Transkripte ließen sich schwach in allen untersuchten Geweben nachweisen; in *Source*-Blatt Lamina und reifen Staubbeuteln lagen die Mengen an der Nachweisgrenze. Das Verteilungsmuster von NtHxk2 in verschiedenen Geweben konnte nach Isolierung des Promotors weiter spezifiziert werden. Die genomische Sequenz von 924 bp 5' des Translationsstarts vermittelte mit GUS als Reporter gen Aktivität in Xylem-Parenchym und Stärkescheide des Leitgewebes, sowie in Schließzellen und Wurzelspitzen.

GFP-Fusionen der anderen Hexokinase-Isoformen wurden zu Mitochondrien dirigiert. Es ist anzunehmen, dass sie mit ihren N-Termini in der äußeren Mitochondrienmembran verankert sind und mit den C-Termini im Zytosol wirken. Durch die GFP-Fusionen entstanden Mitochondrien-Konglomerate von bis zu 10 µm Durchmesser. Die genaue Ursache hierfür ist unklar, möglicherweise ist durch GFP induzierter Sauerstoffmangel der Auslöser.

NtHxk1 und *NtHxk7* ließen sich durch Northern-Analyse aufgrund ihrer hohen Homologie nicht unterscheiden. Die mit Abstand meisten Transkripte akkumulierten in reifen Staubbeuteln. Der Promotor des mit *NtHxk7* identischen Gens *NsHxk4* aus *Nicotiana sylvestris*, bestehend aus 950 bp 5' des Translationsstarts, zeigte mit GUS als Reporter gen in Pollen die höchste Aktivität.

Auch die Transkripte der relativ nah verwandten *NtHxk3* akkumulierten in reifen Staubbeuteln am stärksten, allerdings war die Präferenz nicht so deutlich ausgeprägt wie bei *NtHxk1* und *NtHxk7*. Vermutlich ist NtHxk3 auch die im *Source*-Blatt-Mesophyll aktive Isoform und dort für den vergleichsweise geringen Grundumsatz von Glukose verantwortlich.

Fütterung von Glukose in Dunkelheit führte bei NtHxk1 überexprimierenden Tabakpflanzen zu einer Abnahme des Stärkegehalts im *Source*-Blatt.

NtHxk4 und NtHxk5 konnten in keinem der untersuchten Gewebe in nennenswerten Mengen festgestellt werden. Aufgrund ihrer sehr hohen Affinität zu ATP und vergleichsweise geringen Inhibition durch ADP ist zu vermuten, dass sie an Situationen niedriger Energieladung angepasst sind. Diese liegen typischerweise bei Sauerstoffmangel und in Samen vor. Nach Fütterung von Glukose in Dunkelheit wurden in *Source*-Blättern NtHxk5 überexprimierender Tabakpflanzen deutlich erhöhte Stärkegehalte festgestellt.

NtHxk6 besitzt, wie auch die entsprechenden homologen Isoformen aus Reis und *Arabidopsis thaliana*, eine durch mehrere inserierte Aminosäuren zerstörte Bindungsstelle für Adenosin. Dass durch Überexpression von NtHxk6 keine erhöhte Hexokinase-Aktivität erreicht wurde, ist demnach nicht überraschend. Allerdings bewirkte die Überexpression in den transgenen Pflanzen einen Phänotyp mit bleicheren *Sink*-Bereichen der Blätter. NtHxk6 könnte trotz fehlender katalytischer Aktivität noch Glukose binden und somit die Funktion eines Glukose-Sensors erfüllen.

Durch Überexpression der Isoformen 1, 2, 3, 4a und 5 in Tabak wurde eine erhöhte Hexokinase-Aktivität in den transgenen Pflanzen erzielt. Die für die einzelnen Isoformen ermittelten kinetischen Parameter lagen durchweg im Bereich bereits veröffentlichter Hexokinasen (s. Anhang, III). K_m -Werte für Glukose und Mannose lagen zwischen 29 und 159 μM , für Fruktose zwischen 2 und 27 mM, für ATP zwischen 7 und 668 μM .

NtHxk4a und NtHxk5 zeigten auffällig hohe Affinitäten zu ATP mit K_m -Werten zwischen 7 und 41 μM , und zu Fruktose mit einem K_m -Wert von 2-3 mM. Außerdem waren sie relativ unbeeinflusst von pH-Änderungen im physiologischen Bereich. Inhibition durch ADP erfolgte nichtkompetitiv zu ATP.

NtHxk1 und NtHxk3 ähnelten in ihren Parametern den homologen Isoformen 1 und 2 aus Kartoffel und Tomate. Die Affinität zu den Hexosen war bei NtHxk3 höher als bei NtHxk1, die Affinität zu ATP dagegen geringer. In beiden Fällen wurde eine negative Kooperativität in Bezug auf ATP festgestellt. Inhibition durch ADP erfolgte kompetitiv zu ATP.

NtHxk2 hatte zu allen Substraten die jeweils niedrigste Affinität. Auch hier wurde eine negative Kooperativität in Bezug auf ATP festgestellt. ADP wirkte als kompetitiver Inhibitor. Bei keiner Isoform wurde ein direkter inhibitorischer Einfluss von AMP oder Trehalose-6-phosphat festgestellt.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

35S	CaMV 35S Promotor
A	Adenin
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGPase	ADP-Glucose Pyrophosphorylase
Akz.	Akzessionsnummer
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-p-toluidin ()
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca.	circa
CaMV	„Cauliflower mosaic virus“, Blumenkohl-Mosaikvirus
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
CLSM	„Confocal laser scanning microscope“ (Konfokales Laserscanning-Mikroskop)
C-Terminus/C-terminal	carboxyterminales Ende einer Aminosäuresequenz
cv.	„cultivar“, Kultivar
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Einstein (= 1 mol Photonen)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
Ery4P	Erythrose-4-phosphat
EST	„Expressed Sequence Tag“
FK	Fruktokinase
Flot.	Flotierung
Fru	Fruktose
Fru6P	Fruktose-6-phosphat
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GA	Gibberellin
GFP	Green Fluoreszierendes Protein
GK	Glukokinase
Glc	D-Glukose
Glc1P	D-Glukose-1-phosphat
Glc6P	D-Glukose-6-phosphat
Glk	Glukokinase
Glukose	D-Glukose

GUS	β -Glukuronidase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HK	Hexokinase
Hxk	Hexokinase
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl-b-D-Galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
Le	<i>Lycopersicum esculentum</i>
Lsg.	Lösung
m	Meter
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“, Boten-RNA
MS	Salze bzw. Nährmedium nach Murashige und Skoog
MU	Methylumbelliferon
MUG	Methylumbelliferylglukuronid
N.	<i>Nicotiana</i>
n.d.	Nicht detektiert
NAD / NADH	oxidiertes / reduziertes Nikotinamiddinukleotid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NDP	Nukleotiddiphosphat
nos	Nopalinsynthase
Ns	<i>Nicotiana sylvestris</i>
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
N-Terminus/N-terminal	Aminoterminales Ende einer Aminosäuresequenz
ocs	Oktopinsynthase
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“; offener Leserahmen
Os	<i>Oryza sativa</i>
P	Promotor
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGI	Phosphoglukoisomerase
PGM	Phosphoglukomutase
polyA	Polyadenylierungssignal
PP	Pentosephosphatweg
PR-Protein	„pathogenesis-related protein“, Pathogen-induziertes Protein
RACE	„Rapid amplification of cDNA ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

s	Sekunde
s.	siehe
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNN	Samsun NN (<i>Nicotiana tabacum</i>)
So	<i>Spinacia oleracea</i>
St	<i>Solanum tuberosum</i>
Suc	Saccharose
T	Thymin
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TPT	Triosephosphat/Phosphat-Translokator
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Triose-P	Triosephosphat
Tris	Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Uracil
U	U „Units“ ($\mu\text{Mol/min}$)
ü.N.	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
UGPase	UDP-Glukose-Pyrophosphorylase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierter Bereich
Var.	Varietät
vgl.	vergleiche
V_{\max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumenprozent
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsprozent
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Glukuronsäure
Zm	<i>Zymomonas mobilis</i> oder <i>Zea mays</i>

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003)** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*. **15(1)**: 63-78
- Ahuatzi D, Herrero P, de la Cera T, Moreno F (2004)** The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J Biol Chem*. **279(14)**: 14440-14446
- Aleshin AE, Fromm HJ, Honzatko RB (1998)** Multiple crystal forms of hexokinase I: new insights regarding conformational dynamics, subunit interactions, and membrane association. *FEBS Lett*. **434(1-2)**: 42-46
- Allen RD, Bernier F, Lessard PA, Beachy RN (1989)** Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer. *Plant Cell* **1(6)**: 623-631
- An G, Mitra A, Choi HK, Costa MA, An K, Thornburg RW, Ryan CA (1989)** Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *Plant Cell* **1(1)**: 115-122
- Andreone TL, Printz RL, Pilkis SJ, Magnuson MA, Granner DK (1989)** The amino acid sequence of rat liver glucokinase deduced from cloned cDNA. *J Biol Chem*. **264(1)**: 363-369
- Arora KK, Filburn CR, Pedersen PL (1991)** Glucose phosphorylation. Site-directed mutations which impair the catalytic function of hexokinase. *J Biol Chem*. **266(9)**: 5359-5362
- Baijal M, Sanwal, GG (1976)** Isolation and properties of hexokinase from *loranthus* leaves. *Phytochemistry* **15**: 1859-1863
- Baijal M, Sanwal, GG (1977)** Intracellular localisation of hexokinase in *Cuscuta reflexa*. *Phytochemistry* **16(3)**: 329-332
- Baijal M, Wilson JE (1995)** Residues putatively involved in binding of ATP and glucose 6-phosphate to a mammalian hexokinase: site-directed mutation at analogous positions in the N- and C-terminal halves of the type I isozyme. *Arch Biochem Biophys*. **321(2)**: 413-420
- Bais HP, Park SW, Weir TL, Callaway RM, Vivanco JM (2004)** How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci*. **9(1)**: 26-32
- Baldus B, Kelly GJ, Latzko E (1981)** Hexokinases Of Spinach Leaves. *Phytochemistry* **20**: 1811-1814
- Barnell WO, Yi KC, Conway T (1990)** Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. *J Bacteriol*. **172(12)**: 7227-7240
- Bartlett SG, Grossman AR, Chua NH, Edelman M, Hallick RB, Chua NH (Herausgeber) (1982)** *Methods in Chloroplast Molecular Biology* (Elsevier, Amsterdam).
- Bate N, Twell D (1998)** Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol*. **37(5)**: 859-869
- Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G (1999)** The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. *Plant Cell* **11(3)**: 323-334
- Bechthold N, Ellis J und Pelettier G (1993)** In planta *Agrobacterium*-mediated transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Academy of Sciences Paris* **316**: 1194-1199
- Bennett WS Jr, Steitz TA (1978)** Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75 (10)**: 4848-4852

- Bennett WS Jr, Steitz TA, Steitz TA (1980)** Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. *J Mol Biol.* **140(2)**: 183-230
- Bereiter-Hahn J, Vöth M (1983)** Metabolic control of shape and structure of mitochondria *in situ*. *Biology of the Cell* **47**: 309-322
- Bevan, M (1984)** Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**: 8711-8721
- Biemelt S, Hajirezaei MR, Melzer M, Albrecht G, Sonnewald U (1999)** Sucrose synthase activity does not restrict glycolysis in roots of transgenic potato plants under hypoxic conditions. *Planta* **210(1)**:41-49
- Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U (2003)** Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* **135(1)**: 254-265
- Blancaflor EB, Masson PH (2003)** Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiol.* **133(4)**:1677-1690
- Blazquez MA, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo JM (1993)** Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.* **329(1-2)**: 51-54
- Blazquez MA, Santos E, Flores CL, Martinez-Zapater JM, Salinas J, Gancedo C (1998)** Isolation and molecular characterization of the Arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* **13(5)**: 685-689
- Borello U, Ceccarelli E, Giuliano G (1993)** Constitutive, light-responsive and circadian clock-responsive factors compete for the different 1 box elements in plant light-regulated promoters. *Plant J.* **4(4)**: 611-619
- Bork P, Sander C, Valencia A (1993)** Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: The hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Science* **2**: 31-40
- Bork PC, Sander C, Valencia A (1992)** An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 7290-7294.
- Boter M, Ruiz-Rivero O, Abdeen A, Prat S (2004)** Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes Dev.* **18**: 1577-1591
- Bouny JM, Saglio PH (1996)** Glycolytic Flux and Hexokinase Activities in Anoxic Maize Root Tips Acclimated by Hypoxic Pretreatment. *Plant Physiol.* **111(1)**: 187-194
- Bourdon V, Harvey A, Lonsdale DM (2000)** Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells. *EMBO Rep.* **2(5)**: 394-398
- Bowsher CG, Boulton EL, Rose J, Nayagam S, Emes MJ. (1992).** Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic plastids. *Plant J* **2**: 893-898
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-54
- Bucher M, Brander KA, Sbicego S, Mandel T, Kuhlemeier C (1995)** Aerobic fermentation in tobacco pollen. *Plant Mol Biol.* **28(4)**: 739-750
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987)** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-378
- Busk PK, Jensen AB, Pages M (1997)** Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic acid responsive gene rab17 from maize. *Plant J.* **11(6)**: 1285-1295
- Busk PK, Pages M (1998)** Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol.* **37(3)**: 425-435

- Bustamante E, Pedersen PL (1980)** Mitochondrial hexokinase of rat hepatoma cells in culture: solubilization and kinetic properties. *Biochemistry* **19(22)**: 4972-4977
- Cardenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T (1998)** Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta*.**1401(3)**: 242-264
- Cardenas ML, Rabajille E, Niemeyer H (1984)** Fructose is a good substrate for rat liver 'glucokinase' (hexokinase D). *Biochem J.* **222(2)**: 363-370
- Carlson M, Osmond BC, Botstein D (1981)** Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* **98(1)**: 25-40
- Carrington JC, Freed DD, Leinicke AJ (1991)** Bipartite Signal Sequence Mediates Nuclear Translocation of the Plant Potyviral N1a Protein. *Plant Cell* **3**: 953-962
- Cercos M, Gomez-Cadenas A, Ho TH (1999)** Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. *Plant J.* **19(2)**: 107-118
- Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, Zeeman SC, Smith SM, Smith AM (2004)** A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *Plant J.* **37(6)**: 853-863
- Church GM, Gilbert W (1984)** Genomic Sequencing. *Proc Natl Acad Sci. USA* **81**: 1991-1995
- Clement C, Audran JC (1999)** Anther carbohydrates during in vivo and in vitro pollen development. In Clement C, Pacini E, Audran JC (Hrsg.): *Anther and Pollen. From Biology to Biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York S 69-90
- Clough SJ und Bent AF (1998)** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **16**: 735-743
- Comai L (2000)** Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol Biol.***43(2-3)**: 387-399
- Coore HG, Randle PJ (1964)** Inhibition of glucose phosphorylation by mannoheptulose. *Biochem J.* **91(1)**: 56-59
- Copeland L, Morell, M (1985)** Hexose kinases from the plant cytosolic fraction of soybean *Glycine max* cultivar Williams nodules. *Plant Physiol.* **79**: 114-117
- Copeland L, Tanner GJ (1988)** Hexose kinases of avocado. *Physiol. Plant.* **74**: 531-536
- Cornish-Bowden A, Cardenas ML (1987)** Co-operativity in monomeric enzymes. *J Theor Biol.* **124(1)**: 1-23
- Cosio E, Bustamante E (1984)** Subcellular Localization of Hexokinase in Pea Leaves. *J. Biol. Chem.* **259 (12)**: 7688-7692
- Cox EL, Dickinson DB (1973)** Hexokinase from Maize Endosperm and Scutellum. *Plant Physiol.* **51**: 960-966
- Critchley JH, Zeeman SC, Takaha T, Smith AM, Smith SM (2001)** A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis. *Plant J.* **26(1)**: 89-100
- Dai N, Kandel-Kfir M, Petreikov M, Hanael R, Levin I, Ricard B, Rothan C, Schaffer AA, Granot D (2002)** The tomato hexokinase LeHXK1 cloning, mapping, expression pattern and phylogenetic relationship. *Plant Science* **164**: 581-590
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D (1999)** Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* **11(7)**: 1253-1266

- Dai N, Schaffer AA, Petreikov M, Granot D (1995)** *Arabidopsis thaliana* hexokinase cDNA isolated by complementation of yeast cells. *Plant Physiol.* **108**: 879 – 880
- da-Silva WS, Gomez-Puyou A, de Gomez-Puyou MT, Moreno-Sanchez R, De Felice FG, de Meis L, Oliveira MF, Galina A (2004)** Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J Biol Chem.* **279(38)**:39846-39855
- da-Silva WS, Rezende GL, Galina A (2001)** Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *J Exp Bot.* **52(359)**: 1191-1201
- da-Silva WS, Rezende GL, Galina A (2001)** Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *J Exp Bot.* **52(359)**: 1191-1201
- de Cerqueira Cesar M, Wilson JE (2002)** Functional characteristics of hexokinase bound to the type a and type B sites of bovine brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* **397(1)**: 106-112
- Dean C, Favreau M, Bond-Nutter D, Bedbrook J, Dunsmuir P (1989)** Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of two petunia rbcS genes. *Plant Cell* **1(2)**: 201-208
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985)** Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13(13)**: 4777-4788
- Degenhardt J, Tobin EM (1996)** A DNA binding activity for one of two closely defined phytochrome regulatory elements in an Lhcb promoter is more abundant in etiolated than in green plants. *Plant Cell* **8(1)**: 31-41
- DeVit MJ, Waddle JA, Johnston M (1997)** Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell* **8(8)**: 1603-1618
- Dey PM (1983)** Galactokinase of *Vicia faba* seeds. *Eur. J. Biochem.* **136(1)**: 155-159
- Dietrich RA, Radke SE, Harada JJ (1992)** Downstream DNA sequences are required to activate a gene expressed in the root cortex of embryos and seedlings. *Plant Cell* **4(11)**: 1371-1382
- Doehlert DC (1989)** Separation and Characterization of Four Hexose Kinases from Developing Maize Kernels. *Plant Physiol.* **89**: 1042-1048
- Dry, IB, Nash D, Wiskich T (1983)** The mitochondrial localization of hexokinase in pea leaves. *Planta* **158**: 152-156
- Easterby JS, Qadri SS (1982)** Hexokinase type II from rat skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **90 Pt E**: 11-15
- Eastmond PJ, van Dijken AJ, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JD, Smeekens SC, Graham IA (2002)** Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J.* **29(2)**: 225-235
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000)** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* **300(4)**: 1005-1016
- Emes MJ, Neuhaus, HE (1997)** Metabolism and transport in non-photosynthetic plastids. *J Exp Bot.* **317**: 1995-2005
- Entian KD, Mecke D (1982)** Genetic evidence for a role of hexokinase isozyme PII in carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **257(2)**: 870-874

- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000)** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **5**: 199-206
- Fernandez R, Herrero P, Moreno F (1985)** Inhibition and inactivation of glucose-phosphorylating enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* by D-xylose. *J Gen Microbiol.* **131 (Pt 10)**: 2705-2709
- Fettke J, Eckermann N, Poeste S, Pauly M, Steup M (2004)** The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization. *Plant J.* **39(6)**: 933-946
- Fliege R, Flugge UI, Werdan K, Heldt HW (1978)** Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta.***502(2)**: 232-247
- Flores HE, Vivanco JM, Loyola-Vargas VM (1999)** 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci.* **4(6)**: 220-226
- Flügge, UI (1999)** Phosphate translocators in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**: 27-45
- Frommer WB, Schulze WX, Lalonde S (2003)** Hexokinase, Jack-of-all-trades. *Science* **300(5617)**: 261-263
- Fu H, Kim SY, Park WD (1995 A)** A potato *Sus3* sucrose synthase gene contains a context-dependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissue-specific effects. *Plant Cell* **7(9)**: 1395-1403
- Fu H, Kim SY, Park WD (1995 B)** High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* **7(9)**: 1387-1394
- Fukaki H, Wysocka-Diller J, Kato T, Fujisawa H, Benfey PN, Tasaka M (1998)** Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14(4)**: 425-30
- Galina A, da Silva WS (2000)** Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates. *Phytochemistry* **53(1)**: 29-37
- Galina A, Logullo C, de Souza EF, Rezende GL, da Silva WS (1999)** Sugar phosphorylation modulates ADP inhibition of maize mitochondrial hexokinase. *Physiol. Plant.* **105**: 17-23
- Galina A, Reis M, Albuquerque MC, Puyou AG, Puyou MT, de Meis L (1995)** Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Biochem J.* **309 (1)**: 105-112
- Geigenberger P (2003)** Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr Opin Plant Biol.* **6(3)**: 247-256
- Genschik P, Marbach J, Uze M, Feuerman M, Plesse B, Fleck J (1994)** Structure and promoter activity of a stress and developmentally regulated polyubiquitin-encoding gene of *Nicotiana tabacum*. *Gene* **148(2)**: 195-202
- Germain V, Ricard B, Raymond P, Saglio PH (1997)** The Role of Sugars, Hexokinase, and Sucrose Synthase in the Determination of Hypoxically Induced Tolerance to Anoxia in Tomato Roots. *Plant Physiol.* **114(1)**:167-175
- German MA, Dai N, Matsevitz T, Hanael R, Petreikov M, Bernstein N, Ioffe M, Shahak Y, Schaffer AA, Granot D (2003)** Suppression of fructokinase encoded by *LeFRK2* in tomato stem inhibits growth and causes wilting of young leaves. *Plant J.* **34(6)**: 837-846
- Gibon Y, Vigeolas H, Tiessen A, Geigenberger P, Stitt M (2002)** Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *Plant J.* **30(2)**: 221-235

- Gibson SI (2004)** Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot.* **55(395)**: 253-264
- Giegé P, Heazlewood JL, Roessner-Tunali U, Millar AH, Fernie AR, Leaver CJ, Sweetlove LJ (2003)** Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *Plant Cell* **15(9)**: 2140-2151
- Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y, Yoshida S (2004)** Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **134(4)**: 1555-1573
- Goddijn O, Smeekens S (1998)** Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J.* **14(2)**: 143-146
- Goetz M, Godt DE, Guivarc'h A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsch T (2001)** Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98(11)**: 6522-6527
- Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ (1994)** Carbon Catabolite Repression Regulates Glyoxylate Cycle Gene Expression in Cucumber. *Plant Cell* **6(5)**: 761-772
- Grierson C, Du JS, de Torres Zabala M, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan M (1994)** Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* **5(6)**: 815-826
- Gubler F, Jacobsen JV (1992)** Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pI alpha-amylase gene. *Plant Cell* **4(11)**: 1435-1441
- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV (1995)** Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* **7(11)**: 1879-1891
- Guglielminetti L, Perata P, Morita A, Loreti E, Yamaguchi J, Alpi A (2000)** Characterization of isoforms of hexose kinases in rice embryo. *Phytochemistry* **53(2)**: 195-200
- Halford NG, Paul MJ (2003)** Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotechnol. J.* **1**: 381-398
- Halford NG, Purcell PC, Hardie DG (1999)** Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends Plant Sci.* **4(3)**: 117-120
- Hamilton DA, Schwarz YH, Mascarenhas JP (1998)** A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Mol Biol.* **38(4)**: 663-669
- Hansen MC, Palmer RJ Jr, Udsen C, White DC, Molin S (2001)** Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. *Microbiology* **147(5)**: 1383-1391
- Harrington GN, Bush DR (2003)** The Bifunctional Role of Hexokinase in Metabolism and Glucose Signaling. *Plant Cell* **15**: 2493-2496
- Haseloff J, Siemerling KR, Prasher DC, Hodge S (1997)** Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94(6)**: 2122-2127
- Hatton D, Sablowski R, Yung MH, Smith C, Schuch W, Bevan M (1995)** Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a PAL2 promoter in transgenic tobacco. *Plant J.* **7(6)**: 859-876
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Metraux JP, Sonnewald U (1996)** Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *Plant Cell* **8(5)**: 793-803

- Herbers K, Mönke G, Badur R, Sonnewald U (1995)** A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol.* **29(5)**: 1027-1038
- Herold A, Lewis DH (1977)** Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. *New Phytol.* **79**: 1-40
- Herrero P, Fernandez R, Moreno F (1988)** The Hexokinase Isoenzyme PII of *Saccharomyces cerevisiae* is a Protein Kinase. *J Gen Microbiol.* **135 (5)**: 1209-1016
- Herrero P, Martinez-Campa C, Moreno F (1998)** The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the SUC2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **434(1-2)**: 71-76
- Higgins TJC, Easterby JS (1974)** Wheatgerm Hexokinase: Physical and Active-Site Properties. *Eur. J. Biochem.* **45**: 147-160
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999)** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* **27(1)**: 297-300
- Höfgen R und Willmitzer L (1990)** Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*) *Plant Sci.* **66(2)**: 221-230
- Hofmann M, Roitsch T (2000)** The hexokinase inhibitor glucosamine exerts a concentration dependent dual effect on protein kinase activity *in vitro*. *J. Plant Physiol.* **157**: 13-16
- Hohmann S, Winderickx J, de Winde JH, Valckx D, Cobbaert P, Luyten K, de Meirsmann C, Ramos J, Thevelein JM (1999)** Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of SUC2. *Microbiology* **145 (3)**: 703-714
- Hooks MA, Shearer GC, Roberts J (1994)** Nucleotide Availability in Maize (*Zea mays* L.) Root Tips. Estimation of Free and Protein-Bound Nucleotides Using ³¹P-Nuclear Magnetic Resonance and a Novel Protein-Ligand-Binding Assay. *Plant Physiol.* **104(2)**: 581-589
- Huang N, Sutliff TD, Litts JC, Rodriguez RL (1990)** Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol Biol.* **14(5)**: 655-668
- Hwang YS, Karrer EE, Thomas BR, Chen L, Rodriguez RL (1998)** Three cis-elements required for rice alpha-amylase Amy3D expression during sugar starvation. *Plant Mol Biol.* **36(3)**: 331-341
- Ishiguro S, Nakamura K (1992)** The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol. Biol.* **18**: 97-108
- Itzhaki H, Maxson JM, Woodson WR (1994)** An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91(19)**: 8925-8929
- Jang JC, Léon P, Zhou L, Sheen J (1997)** Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**: 5 – 19
- Jang JC, Sheen J (1994)** Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell.* **6(11)**: 1665-1679
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986)** β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83(22)**: 8447-8451
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MV (1987)** GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907
- Journet EP, Douce R (1985)** Enzymic Capacities of Purified Cauliflower Bud Plastids for Lipid Synthesis and Carbohydrate Metabolism. *Plant Phys.* **79**: 458-467

- Kabir F, Wilson JE (1993)** Mitochondrial hexokinase in brain of various species: differences in sensitivity to solubilization by glucose 6-phosphate. *Arch Biochem Biophys.* **300(2)**: 641-650
- Kabsch W, Holmes KC (1995)** The actin fold. *FASEB J.* **9(2)**: 167-174
- Kaplan CP, Tugal HB, Baker A (1997)** Isolation of a cDNA encoding an Arabidopsis galactokinase by functional expression in yeast. *Plant Mol. Biol.* **34(3)**: 497-506
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P (2005)** Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci.* **10(3)**: 103-105
- Karni L, Aloni B (2002)** Fructokinase and hexokinase from pollen grains of bell pepper (*Capsicum annuum* L.): possible role in pollen germination under conditions of high temperature and CO₂ enrichment. *Annals of Botany* **90(5)**: 607-612
- Kawai M, Uchimiya H (1995)** Biochemical properties of rice adenylate kinase and subcellular location in plant cells. *Plant Mol Biol.* **27(5)**: 943-951
- Kizis D, Pages M (2002)** Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J.* **30(6)**: 679-689
- Knappe S, Lottgert T, Schneider A, Voll L, Flugge UI, Fischer K (2003)** Characterization of two functional phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) genes in Arabidopsis - AtPPT1 may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *Plant J.* **36(3)**: 411-420
- Koch K (2004)** Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol.* **7(3)**: 235-246
- Koch KE (1996)** Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **47**: 509-540
- Konar RN, Linskens HF (1966)** Physiology and biochemistry of the stigmatic fluid of *Petunia hybrida*. *Planta* **71**: 372-387
- Koshland DE (1959)** The Enzymes. Herausgeber: Boyer PD, Lardy H, Myrbäck K. 2nd Ed., Vol. 1, 305-346. Academic Verlag, New York
- Kosugi S, Ohashi Y (1993)** Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type-specific manner. *Plant Physiol.* **132(4)**: 2012-2022
- Kruger NJ, von Schaewen A (2003)** The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol.* **6(3)**:236-246
- Kuser PR, Krauchenco S, Antunes OA, Polikarpov I (2000)** The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. *J Biol Chem.* **275(27)**:20814-20821
- Lämmlli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lao NT, Schoneveld O, Mould RM, Hibberd JM, Gray JC, Kavanagh TA (1999)** An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase. *Plant J.* **20(5)**: 519-527
- Larkin JC, Oppenheimer DG, Pollock S, Marks MD (1993)** Arabidopsis GLABROUS1 Gene Requires Downstream Sequences for Function. *Plant Cell* **5(12)**: 1739-1748
- Lemoine R, Burkle L, Barker L, Sakr S, Kuhn C, Regnacq M, Gaillard C, Delrot S, Frommer WB (1999)** Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Lett.* **454(3)**:325-330
- Leon P, Sheen J (2003)** Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* **8(3)**: 110-116

- Lienhard GE, Secemski II (1973)** P¹,P⁵-Di(adenosine-5')pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J Biol Chem.* **248(3)**: 1121-1123
- Logan DC, Leaver CJ (2000)** Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J Exp Bot.* **51(346)**: 865-871
- Logemann J, Schell J, L Willmitzer L (1987)** Improved method for the preparation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**: 16-20
- Lovegrove A, Hooley R (2000)** Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.* **5(3)**: 102-110
- Lu CA, Ho TH, Ho SL, Yu SM (2002)** Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of alpha-amylase gene expression. *Plant Cell.* **14(8)**: 1963-1980
- Lu Y, Sharkey TD (2004)** The role of amyloamylase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* **218(3)**: 466-473
- Magnani M, Stocchi V, Serafini G, Chiarantini L, Fornaini G (1988)** Purification, properties, and evidence for two subtypes of human placenta hexokinase type I. *Arch Biochem Biophys.* **260(1)**: 388-399
- Maitra PK (1975)** Glucokinase from Yeast. *Methods Enzymol.* **42**: 25-30
- Martin T, Wöhner RV, Hummel S, Willmitzer L, Frommer WB (1992)** The GUS reporter system as a tool to study plant gene expression. In Gallagher (Hrsg.): GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press: 23-43
- Martinez-Barajas E, Randall DD (1998)** Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) fruit. *Planta* **205(4)**: 567-73
- Mascarenhas JP (1993)** Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell.* **5(10)**: 1303-1314
- Mascarenhas JP, Hamilton DA (1992)** Artifacts in the localization of GUS activity in anthers of petunia transformed with a CaMV 35S-GUS construct. *Plant J.* **2(3)**: 405-408
- Mellema S, Eichenberger W, Rawyler A, Suter M, Tadege M, Kuhlemeier C (2002)** The ethanolic fermentation pathway supports respiration and lipid biosynthesis in tobacco pollen. *Plant J.* **30(3)**:329-36
- Menezes RA, Amuel C, Engels R, Gengenbacher U, Labahn J, Hollenberg CP (2003)** Sites for interaction between Gal80p and Gal1p in *Kluyveromyces lactis*: structural model of galactokinase based on homology to the GHMP protein family. *J Mol Biol.* **333(3)**:479-492
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR (1995)** The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci.* **20(12)**: 506-510
- Menu T, Rothan C, Dai N, Petreikov M, Etienne C, Destrac-Irvine A, Schaffer A, Granot D, Ricard B (2001)** Cloning and characterization of a cDNA encoding hexokinase from tomato. *Plant Sci.***160(2)**: 209-218
- Meunier JC, Buc J, Navarro A, Ricard J (1974)** Regulatory behavior of monomeric enzymes. 2. A wheat-germ hexokinase as a mnemonical enzyme. *Eur J Biochem.* **49(1)**: 209-223
- Meunier JC, Buc J, Ricard J (1971)** Purification and characterization of wheat germ hexokinases. *FEBS Lett.* **14**: 25-28
- Miernyk JA, Dennis DT (1983)** Mitochondrial, Plastid, and Cytosolic Isozymes of Hexokinase from Developing Endosperm of *Ricinus communis*. *Arch. Biochem. Biophys* **226**: 458-468

- Molik S, Karnachov I, Weidlich C, Herrmann RG, Klösgen RB (2001)** The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J Biol Chem.* **276(46)**: 42761-42766
- Monasterio O, Cardenas ML (2003)** Kinetic studies of rat liver hexokinase D ('glucokinase') in non-cooperative conditions show an ordered mechanism with MgADP as the last product to be released. *Biochem J.* **371(1)**: 29-38
- Montgomery J, Goldman S, Deikman J, Margossian L, Fischer RL (1993)** Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(13)**: 5939-5943
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003)** Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300(5617)**: 332-336
- Moore BD, Cheng SH, Rice J, Seemann JR (1998)** Sucrose cycling, rubisco expression, and prediction of photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant Cell and Environment* **21**: 905-915
- Moser D, Johnson L, Lee CY (1980)** Multiple forms of Drosophila hexokinase. Purification, biochemical and immunological characterization. *J Biol Chem.* **255(10)**: 4673-4679
- Mulichak AM, Wilson JE, Padmanabhan K, Garavito RM (1998)** The structure of mammalian hexokinase-1. *Nat Struct Biol.* **5(7)**: 555-560
- Müller-Rober B, La Cognata U, Sonnewald U, Willmitzer L (1994)** A truncated version of an ADP-glucose pyrophosphorylase promoter from potato specifies guard cell-selective expression in transgenic plants. *Plant Cell* **6(5)**: 601-612
- Murad L, Lim KY, Christopodoulou V, Matyasek R, Lichtenstein CP, Kovarik A, Leitch AR (2002)** The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* **89**: 921-928
- Nakai K, Horton P (1999)** PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* **24(1)**: 34-36
- Nakamura N, Shimizu M, Suzuki H (1991)** Characterization of hexose kinases from camellia and lily pollen grains. *Physiol. Plant.* **81**: 215-220
- Nakata PA, Okita TW (1996)** Cis-elements important for the expression of the ADP-glucose pyrophosphorylase small-subunit are located both upstream and downstream from its structural gene. *Mol Gen Genet.* **250(5)**: 581-592
- Neet KE, Furman TC, Hueston WJ (1982)** Activation of yeast hexokinase by chelators and the enzymic slow transition due to metal-nucleotide interactions. *Arch Biochem Biophys.* **213(1)**: 14-25
- Neet KE, Keenan RP, Tippett PS (1990)** Observation of a kinetic slow transition in monomeric glucokinase. *Biochemistry* **29(3)**: 770-777
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH (2001)** A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J Exp Bot.* **52(358)**: 881-889
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997)** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10(1)**: 1-6
- Niittyla T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC (2004)** A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* **303(5654)**: 87-89
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003)** Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell* **15(7)**: 1591-1604

- Ohning GV, Neet KE (1983)** 6-(p-toluidinyl)naphthalene-2-sulfonic acid as a fluorescent probe of yeast hexokinase: conformational states induced by sugar and nucleotide ligands. *Biochemistry* **22(12)**: 2986-2995
- Oja V V, Savchenko G, Jakob B, Heber U (1999)** pH and buffer capacities of apoplastic and cytoplasmic cell compartments in leaves. *Planta* **209(2)**: 239-249
- Olsson T, Thelander M, Ronne H (2003)** A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem.* **278(45)**: 44439-44447
- Panneman H, Ruijter GJ, van den Broeck HC, Visser J (1998)** Cloning and biochemical characterisation of *Aspergillus niger* hexokinase--the enzyme is strongly inhibited by physiological concentrations of trehalose 6-phosphate. *Eur J Biochem* **258(1)**: 223-232
- Patrick JW (1997)** Phloem Unloading: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 191-222
- Pego JV, Smeekens SC (2000)** Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends Plant Sci.* **5(12)**: 531-536
- Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekens SC (1999)** Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol.* **119(3)**: 1017-1023
- Peng G, Hopper JE (2002)** Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(13)**: 8548-8553
- Petit T, Blazquez MA, Gancedo C (1996)** *Schizosaccharomyces pombe* possesses an unusual and a conventional hexokinase: biochemical and molecular characterization of both hexokinases. *FEBS Lett.* **378(2)**: 185-189
- Plaxton WC (1996)** The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **47**: 185-214
- Plegt L, Bino RJ (1989)** β -Glucuronidase activity during development of the male gametophyte from transgenic and non-transgenic plants. *Mol Gen Genet.* **216**: 321-327
- Pradet A, Raymond P (1983)** Adenine Nucleotide Ratios and Adenylate Energy Charge in Energy Metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **34**: 199-224
- Prata R, Williamson JD, Conkling MA, Pharr DM (1997)** Sugar Repression of Mannitol Dehydrogenase Activity in Celery Cells. *Plant Physiol.* **114(1)**: 307-314
- Price J, Laxmi A, St Martin SK, Jang JC (2004)** Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell* **16(8)**:2128-2150
- Ramonell KM, Kuang A, Porterfield DM, Crispi ML, Xiao Y, McClure G, Musgrave ME (2001)** Influence of atmospheric oxygen on leaf structure and starch deposition in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ.* **24(4)**: 419-428.
- Randez-Gil F, Herrero P, Sanz P, Prieto JA, Moreno F (1998)** Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **425(3)**: 475-478.
- Reid JS, Edwards ME, Dickson CA, Scott C, Gidley MJ (2003)** Tobacco transgenic lines that express fenugreek galactomannan galactosyltransferase constitutively have structurally altered galactomannans in their seed endosperm cell walls. *Plant Physiol.* **131(3)**: 1487-1495
- Renz A, Merlo L, Stitt M (1992)** Partial purification from potato tubers of three fructokinases and three hexokinases which show differing organ and developmental specificity. *Planta* **190**: 156-165

- Renz A, Stitt M (1993)** Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers. *Planta* **190**: 166-175
- Riesmeier JW, Flugge UI, Schulz B, Heineke D, Heldt HW, Willmitzer L, Frommer WB (1993)** Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90(13)**: 6160-6164
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1994)** Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J*. **13(1)**: 1-7
- Ritte G, Raschke K (2003)** Metabolite export of isolated guard cell chloroplasts of *Vicia faba*. *New Phytol* **159**: 195-202
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1991)** Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*. **64(3)**: 615-623
- Rodriguez A, De La Cera T, Herrero P, Moreno F (2001)** The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. **355(3)**: 625-631
- Roessner-Tunali U, Hegemann B, Lytovchenko A, Carrari F, Bruedigam C, Granot D, Fernie AR (2003)** Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiol* **133(1)**: 84-99.
- Rolland F, Moore, B, Sheen J (2002 A)** Sugar Sensing and Signaling in Plants. *Plant Cell* **14**, Supplement: 185-205
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2002 B)** Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.***2(2)**: 183-201
- Ronimus RS, Morgan HW (2004)** Cloning and biochemical characterization of a novel mouse ADP-dependent glucokinase. *Biochem Biophys Res Commun*. **315(3)**: 652-658
- Rosahl S, Schell J, Willmitzer L (1987)** Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants: demonstration of an esterase activity. *EMBO J* **6**: 1155-1159
- Rose IA, Warms JV (1967)** Mitochondrial hexokinase. Release, rebinding, and location. *J Biol Chem*. **242(7)**: 1635-1645
- Salas J, Salas M, Vinuela E, Sols A (1965)** Glucokinase of Rabbit Liver. Purification and Properties. *J Biol Chem*. **240**: 1014-1018
- Saltman P (1953)** Hexokinase in higher plants. *J. Biol Chem*. **200**: 145-154
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Sanchez AM, Bosch M, Bots M, Nieuwland J, Feron R, Mariani C (2004)** Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell*. **16 Suppl**: S98-106
- Schnarrenberger C (1990)** Characterization and compartmentation, in green leaves, of hexokinases with different specificities for glucose, fructose, and mannose and for nucleoside triphosphates. *Planta* **181**: 249-255
- Schneider A, Hausler R, Kolukisaoglu U, Kunze R, van der Graaff E, Schwacke R, Catoni E, Desimone M, Flugge UI (2002)** An *Arabidopsis thaliana* knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. *Plant J*. **32(5)**: 685-699

- Schneidereit A, Scholz-Starke J, Sauer N, Büttner M (2005)** AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in Arabidopsis. *Planta* **221**(1): 48-55
- Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG (2004)** Stamen structure and function. *Plant Cell*. **16 Suppl**: S46-60
- Shahmuradov IA, Gammerman AJ, Hancock JM, Bramley PM, Solovyev VV (2003)** PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 2003 **31**(1): 114-117
- Sharkey TD, Laporte M, Lu Y, Weise S, Weber AP (2004)** Engineering plants for elevated CO₂: a relationship between starch degradation and sugar sensing. *Plant Biol (Stuttg)*. **6**(3): 280-288
- Sheen J (1990)** Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**(10): 1027-1038
- Sheen J, Zhou L, Jang JC (1999)** Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol*. **2**(5): 410-418
- Shufflebottom D, Edwards K, Schuch W, Bevan M (1993)** Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns. *Plant J*. **3**(6): 835-845
- Siedlecka A, Ciereszko I, Mellerowicz E, Martz F, Chen J, Kleczkowski LA (2002)** The small subunit ADP-glucose pyrophosphorylase (ApS) promoter mediates okadaic acid-sensitive uidA expression in starch-synthesizing tissues and cells in Arabidopsis. *Planta* **217**(2): 184-192
- Sindelarova M, Sindelar L (1988)** Hexokinase of Tobacco Leaves: Subcellular Localization and Characterization. *Biol Plant* **30**(4): 275-284
- Singh KK, Chen C, Epstein DK, Gibbs M (1993)** Respiration of Sugars in Spinach (*Spinacia oleracea*), Maize (*Zea mays*), and *Chlamydomonas reinhardtii* F-60 Chloroplasts with Emphasis on the Hexose Kinases. *Plant Physiol*. **102**(2): 587-593
- Skriver K, Olsen FL, Rogers JC, Mundy J (1991)** cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**(16): 7266-7270
- Smith FC, Davies SP, Wilson WA, Carling D, Hardie DG (1999)** The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1. *FEBS Lett*. **453**(1-2): 219-223
- Sols A, Crane RK (1954)** Substrate specificity of brain hexokinase. *J Biol Chem*. **210**(2): 581-95
- Sonnwald U (1992)** Expression of E. coli inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning. *Plant J*. **2**(4): 571-581.
- Stadler R, Büttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Shearson SM, Smith SM, Sauer N (2003)** Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of Arabidopsis. *Plant Physiol*. **133**(2): 528-537
- Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N (1999)** The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in Arabidopsis. *Plant J*. **19**(3): 269-278
- Stitt M, Mc Lilley R, Gerhardt R und Heldt HW (1989)** Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol*. **174**: 518-552
- Sutoh K, Yamauchi D (2003)** Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. *Plant J*. **34**(5): 635-645
- Tadege M, Brandle R, Kuhlemeier C (1998)** Anoxia tolerance in tobacco roots: effect of overexpression of pyruvate decarboxylase. *Plant J*. **14**(3): 327-335
- Talbott LD, Zeiger E (1997)** The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *J. Exp. Bot* **49**: 329-337

- Tanner GJ, Copeland L, Turner JF (1983)** Subcellular localization of hexose kinases in pea stems: mitochondrial hexokinase. *Plant Physiol.* **72**: 659-663
- Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D (1997)** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25(24)**: 4876-4882
- Timmermans MCP, Maliga P, Vieira J, Messing J (1990)** The pFF plasmids: cassettes utilising CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. *J Biotechnol.* **14(3-4)**: 333-344
- Tjaden G, Edwards JW, Coruzzi GM (1995)** Cis elements and trans-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Physiol.* **108(3)**: 1109-1117
- Tomlinson KL, McHugh S, Labbe H, Grainger JL, James LE, Pomeroy KM, Mullin JW, Miller SS, Dennis DT, Miki BL (2003)** Evidence that the hexose-to-sucrose ratio does not control the switch to storage product accumulation in oilseeds: analysis of tobacco seed development and effects of overexpressing apoplastic invertase. *J Exp Bot.* **55(406)**: 2291-2303
- Toyofuku K, Umemura T, Yamaguchi J (1998)** Promoter elements required for sugar-repression of the RAmy3D gene for alpha-amylase in rice. *FEBS Lett.* **428(3)**: 275-280
- Treitel MA, Carlson M (1995)** Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92(8)**: 3132-3136
- Trethewey RN, Geigenberger P, Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier J, Willmitzer L (1998)** Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant J.* **15(1)**: 109-118
- Turner JF, Chensee QJ, Harrison DD (1977)** Glucokinase of pea seeds. *Biochim Biophys Acta* **480(2)**: 367-375
- Turner JF, Copeland L (1981)** Hexokinase II of Pea Seeds. *Plant Physiol.* **68**: 1123-1127
- Twell D, Yamaguchi J, McCormick S (1990)** Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* **109(3)**: 705-713
- Twell D, Yamaguchi J, Wing RA, Ushiba J, McCormick S (1991)** Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes Dev.* **5(3)**: 496-507
- Uknes S, Dincher S, Friedrich L, Negrotto D, Williams S, Thompson-Taylor H, Potter S, Ward E, Ryals J (1993)** Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* **5(2)**: 159-169
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997)** ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276(5320)**: 1865-1868
- Ulmasov T, Liu ZB, Hagen G, Guilfoyle TJ (1995)** Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* **7(10)**: 1611-1623
- Umemura TA, Perata P, Futsuhara Y, Yamaguchi J (1998)** Sugar sensing and α -amylase gene repression in rice embryos. *Planta* **204**: 420-428
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K (1993)** An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5(11)**: 1529-1539

- Van Gestel K, Verbelen JP (2002)** Giant mitochondria are a response to low oxygen pressure in cells of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) *J Exp Bot.* **53(371)**: 1215-1218
- Varagona MJ, Schmidt RJ, Raikhel NV (1992)** Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2. *Plant Cell.* **4(10)**: 1213-1227
- Veramendi J, Fernie A, Leisse A, Willmitzer L, Trethewey R (2002)** Potato hexokinase 2 complements transgenic Arabidopsis plants deficient in hexokinase 1 but does not play a key role in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Mol Biol* **49(5)**: 491-501
- Veramendi J, Roessner U, Renz A, Willmitzer L, Trethewey RN (1999)** Antisense Repression of Hexokinase 1 Leads to an Overaccumulation of Starch in Leaves of Transgenic Potato Plants But Not to Significant Changes in Tuber Carbohydrate Metabolism. *Plant Physiol.* **121**: 123-133
- Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J (1975)** Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in Agrobacterium. *J Gen Virol.* **26(1)**: 33-48
- Wang ZY, Kenigsbuch D, Sun L, Harel E, Ong MS, Tobin EM (1997)** A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene. *Plant Cell* **9(4)**: 491-507
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Groner F, Hebbeker U, Flugge UI (2000)** Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell.* **12(5)**: 787-802
- Weber AP (2004)** Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr Opin Plant Biol.* **7(3)**:247-253
- Weise SE, Weber AP, Sharkey TD (2004)** Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* **218(3)**: 474-482
- Weterings K, Schrauwen J, Wullems G, Twell D (1995)** Functional dissection of the promoter of the pollen-specific gene NTP303 reveals a novel pollen-specific, and conserved cis-regulatory element. *Plant J.* **8(1)**: 55-63
- Wiese A (2000)** Pflanzliche Hexokinasen – Funktion und subzelluläre Lokalisierung. Diss. Universität zu Köln. Shaker Verlag, Aachen
- Wiese A, Gröner F, Sonnewald U, Deppner H, Lerchl J, Hebbeker U, Flügge UI, Weber A (1999)** Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. *FEBS Lett.* **461(1-2)**: 13-18
- Wilson JE (1995)** Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **126**:65-198
- Wilson JE (2003)** Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol.* **206(12)**: 2049-2057
- Wilson JE, Schwab DA (1996)** Functional interaction of hexokinase with ATP requires participation by both small and large lobes of the enzyme: implications for other proteins using the actin fold as a nucleotide binding motif. *FASEB J.* **10(7)**: 799-801
- Womack FC, Colowick SP (1979)** Proton-dependent inhibition of yeast and brain hexokinases by aluminum in ATP preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76(10)**: 5080-5084
- Wu C, Washida H, Onodera Y, Harada K, Takaiwa F (2002)** Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant J.* **23**: 415-421
- Xu N, Hagen G, Guilfoyle T (1997)** Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter. *Plant Sci* **126**: 193-201

- Yamamoto YT, Prata RTN, Williamson JD, Weddington M, Pharr DM (2000)** Formation of a hexokinase complex is associated with changes in energy utilization in celery organs and cells. *Physiol. Plant.* **110**: 28-37
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33(1)**: 103-119
- Ylstra B, Garrido D, Busscher J, van Tunen AJ (1998)** Hexose transport in growing petunia pollen tubes and characterization of a pollen-specific, putative monosaccharide transporter. *Plant Physiol.* **118(1)**: 297-304
- Ylstra B, McCormick S (1999)** Analysis of mRNA stabilities during pollen development and in BY2 cells. *Plant J.* **20(1)**: 101-108
- Zeeman SC, Smith SM, Smith AM (2004)** The breakdown of starch in leaves. *New Phytol.* **163**: 247-261
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004)** GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136(1)**: 2621-2632

8 ANHANG

I Sequenzen

I.1 Verwendete Primer für PCR

Name	Sequenz	Verwendung
3Race HK5 ORF	ATGGGAAAATTGGTTGTAGGTGTATCAGTTG	RACE NtHxk5 nach 3'
3RaceNtME4_2	GGACCAACTTTTTGCCAACCTCAAATTC	RACE NtHxk7 nach 3'
5RaceHK24_686_3	TTGACCAAAGCAGCCACGCGCACGTCAA	RACE NtHxk4/5 nach 5'
actin AC1_3	GCCTTTGCAATCCACATCTGTTG	3' von Aktin
actin AC1_5	ATGGCAGACGGTGAGGATATTC	5' von Aktin
GFP-SalI_5	GTCGACACTAGTAAAAGGAGAAGAACT	5' von mGFP5
GUS-SalI_5	GTCGACACTAGTTTACGTCTGTAGA	5' von GUS
GW3NtHK24_5	TGGGGTAATTTCCGCTCATCACAT	Genome Walking NtHxk4 nach 3'
GW3NtHK24nest_5	GCGCAGAGTCTTGTGTAGAATGGC	Genome Walking NtHxk4 nach 5'
GW5NtHK24_3	ACCGTATCATCGATGGAGAAGCCC	Genome Walking NtHxk4 nach 5'
GW5NtHK24nest_3	GATGATCCAGCCATCACATTCCTT	Genome Walking NtHxk4 nach 3'
GWHK10_3	TAAACTAACACCAGATCGGACGGCAGCG	Genome Walking für Promotor NtHxk2
GWHK10_NEST3	ACACGTGGCTTGGAGATCTTTTTGTAAGG	Genome Walking für Promotor NtHxk2
GWHK9_3	CTTGCTACCACCTTCGGAGGCAAGTCCA	Genome Walking für Promotor NtHxk1
GWHK9_NEST3	TTTCTCAAATTCACGAAGAATAGCCAT	Genome Walking für Promotor NtHxk1
HK10(a)fGFP_XbaI_3	TCTAGAATAATCATGTTTCATACTTTGAGTT	3' von NtHxk2 und StHxkRP1
HK10_1165_5	AAATCTGATCTAAGTGCAAGGAAAAC	5' von Sonde NtHxk2
HK10_2_EcoRI_5	GAATTCTCGGTCACCGTTAGCTCGCC	5' von NtHxk2
HK10_5SONDE3'	CCTATTTCTCTAGTCCTT	NtHxk2 ORF 530
HK10_BamHI_5	GGATCCTTATGTCGGTCACCGTTAGCTC	5' von NtHxk2
HK10_SalI_3	GTCGACCTAATAATCATGTTTCATACTTTGAGT	3' von NtHxk2
HK10A_BamHI_5	GGATCCTCACTGTTACCCAAAATGTCG	5' von StHxkRP1
HK10GFP3	GAATTCATAATCATGTTTCATACTTTG	3' von NtHxk2
HK10LGFP3	GAATTCATGGCATCAGCCACGTG	3' von N-Term. NtHxk2
HK23BamHI_5	GGATCCGAGATGAAGAAGGCGACG	5' von NtHxk3
HK23-SpeI_3	ACTAGTAGACTTGTCTTCAACATA	3' von NtHxk3
HK24_BamHI_5	GGATCCATGGGAAAAGTGGTGGTGGTGCA	5' von NtHxk4
HK24_ORF_3	TCAAGATTCCTCGAGTCCGA	3' von NtHxk4
HK24-2_BamHI_5	GGATCCATATGGGAAAAGTGGTGGTGG	5' von NtHxk4
HK24A_1167_5	CTGGAAAATGAGGAAAATAATTGTAG	5' von Sonde NtHxk4

Name	Sequenz	Verwendung
HK24A_SalI_3	GTCGACTCAAGATTCTCCAGTCCGAGATA	3' von NtHxk4a
HK24AfGFP_SalI_3	GTCGACAGATTCTCCAGTCCGAGATATTG	3' von NtHxk4a
HK24C_SalI_3	GTCGACTCAAGATTCTTTGAGTCCGAGGTA	3' von NtHxk4b
HK24copy_3	CCATCTCAGGCTTTTTCTATCACTCT	3' von NtHxk4
HK24copy_5	AGAACAATTGTGTGTTGTTGTGTTACAAGTGA	5' von NtHxk4
HK24L_XbaI_3	TCTAGAAAACCTCTTTCAATATATCCATAGC	3' von N-Term. NtHxk4
HK5_1170_5	CTTGAAAATGAGGAAAATAGTTGTGG	5' von Sonde NtHxk5
HK5_BamHI_5	GGATCCATGGGAAAATTGGTTGTAGGTGTA	5' von NtHxk5
HK5_fGFP_SalI_3	GTCGACTGATTCTCGAGATCTGTGTATTG	3' von NtHxk5
HK5_fSense_SalI_3	GTCGACTCATGATTCTCGAGATCTGTGTA	3' von NtHxk5
HK6_1175_5	AGCTTGTAGTGAAGGTATGTGATGTA	5' von Sonde NtHxk6
HK6_BamHI_5	GGATCCGTATGGGGAGGTTAGCG	5' von NtHxk6
HK6_SalI_3	GTCGACTCAGTGCAGCTGTACCCTATCCAC	3' von NtHxk6
HK6+1301_5	GGAGCGATAGACCAAGTCGGATGA	Fragment von NtHxk6
HK6+1548_3	GTATTTGCTTTATATTTCAGTGCAGCTGTACCC	Fragment von NtHxk6
HK6fGFP_SalI_3	GTCGACGTGCAGCTGTACCCTATCCACTTC	3' von NtHxk6
HK9_1150_5	ATATCTAATACCTCCTTGAAGACAAG	5' von Sonde NtHxk1, 3, 7
HK9_33_BamHI_5	GGATCCATGAAATGGGCACGTGCTATGGCTA	5' von Hxk1d32
HK9GFP3	GAATTCGGACTTATCTTCAAGGTA	3' von NtHxk1
HK9GFP5	GGATCCCAACTTTTAGCCAACCTCC	5' von NtHxk1, 1a, 7
HK9LGFP3	GAATTCACGAAGAATAGCCATAGC	3' von N-Term. NtHxk1, 1a, 7
HKIso_3	TGMTGCATnGCASAYATWTCHGGTGTCT	Degenerierter 3' Primer für Hxk-Isoformen
HKIso_5	TATGCrTTGGaYCTTGGTGGwACAAA	Degenerierter 5' Primer für Hxk-Isoformen
Hxk1_331_3	GCAATACTCGAAAATTTGTTCCACCAAGAT	RACE NtHxk1/3 nach 5'
K75	ATGAATTCAGTAAAGGAGAAGAACTT	5' von mGFP5
K76	ATGTCGACTTATTTGTATAGTTCATCCATGC	3' von mGFP5
ME4Prom3	GGATCCTTTTTTTTGCCGGAATTTGAG	3' PNsNtHxk4
ME4Prom5	GTCGACGAAAGATTATTTTTTTTTTAAAG	5' PNsNtHxk4
NOS-HindIII_3	AAGCTTCCCGATCTAGTAACATAGAT	3' von nos
Nt Ubiquitin 3'	ACCACCACGGAGACGGAG	3' von Ubiquitin
Nt Ubiquitin 5'	ATGCAGATCTTCGTSAAAC	5' von Ubiquitin
Pr_HKNt10_GUS_3	GGATCCGAGACAATAAATGGTGATGC	PNtHxk2, 3'
Pr_HKNt10_GUS_5	AAGCTTCGACGGCCCGGGCTGGTATC	PNtHxk2, 5', hybridisiert auf GW-Adaptor
PrHK9ATGBamHI_3	GGATCCCATCCTTTCTTTTTGTACCGG	PNtHxk1, 3'
PrHK9HindIII_5	AAGCTTTCGACGGCCCGGGCTGGTCTG	PNtHxk1, 5', hybridisiert auf GW-Adaptor
S12	TATCTAGATAAATATCATCTTGATCGCTC	3' von NtHxk3
S13	TAGGATCCATGAAGAAAGCGACGGTG	5' von NtHxk1a
S14	TAGGATCCATAACAAACACCCCTGTAATTTAT	5' von NtHxk1
S15	TAGTCGACTCTAGCAAGAAAGGGATTTGA	3' von NtHxk1
S6	TAGTCGACTACCATTTTCTAATAATCATG	3' von NtHxk2
S7	TAGGATCCTCTTTTTTTCTCCGTCAC	5' von NtHxk2

I.2 Sequenz der isolierten *NtHxk1* cDNA, Akzession AF118133

Start- und Stop-Kodons sind unterstrichen

```

-147   ATAACAA ACACCCCTGT AATTTATTAC TGTCCTTAAA AGTACAAAA
-100  TCCCCAGTCT TTTTGTTCAT TTTGTATTTT TTTTTTCATT TGTTTCGGTG
-50   GACCAACTTT TAGCCAACCT CCAATTCCTC TGCCGTGACA AAAAGAAAGG
1     ATGAAGAAAG CGACGGTGGG AGCCGCCGTA ATTGGCGCCG CTACGGTATG
51    TGCAGTGGCG GCATTAATAG TGAACCACCG TATGCGCAAA TCTAGCAAAT
101   GGGCACGTGC TATGGCTATT CTTCGTGAAT TTGAGGAAAA GTGTGGGACC
151   CCTGATGCTA AGCTCAAGCA AGTCGCTGAT GCTATGACCG TCGAGATGCA
201   CGCTGGACTT GCCTCCGAAG GTGGTAGCAA GCTCAAGATG CTTATCACTT
251   ACGTCGATAA TCTCCCCACC GGTGATGAAG CTGGCGTCTT TTATGCGTTG
301   GATCTTGGTG GAACAAATTT TCGAGTATTG CGAGTGCAAC TTGGTGGAAA
351   AGATGGTGGT ATTGTTTCATC AGGAATTTGC GGAGGCATCA ATTCCTCCAA
401   ATTTGATGGT TGGGACTTCA GAAGCACTTT TTGATTATAT TGCGGCAGAA
451   CTTGCAAAAT TTGTCAACGA GGAAGGGGAA AAGTTTCAAC AACCTCCTGG
501   TAAGCAGAGA GAACTAGGTT TCACCTTCTC ATTCCCGGTA ATGCAGACTT
551   CAATCAACTC TGGGACTATT ATGAGGTGGA CAAAGGGCTT CTCCATTGAT
601   GATGCGGTTG GCCAAGATGT TGTGGAGAA CTCGCAAAAG CTATGAAAAG
651   AAAAGGAGTT GATATGCGGG TCTCAGCTTT GGTGAATGAT ACTGTTGGGA
701   CGTTGGCTGG TGGTAAATAT ACACACAACG ACGTAGCTGT TGCTGTTATC
751   TTAGGTACAG GGACCAATGC AGCCTATGTG GAACGGGTGC AGGCGATTCC
801   AAAGTGGCAT GGTCCCTGTGC CAAAATCTGG TGAAATGGTT ATCAACATGG
851   AATGGGGTAA TTTTAGGTCA TCCCATCTTC CCTTGACACA GTATGATCAT
901   GCGTTGGATA CTAATAGTTT GAATCCTGGT GATCAGATAT TTGAGAAGAT
951   GACTTCTGGC ATGTACTTGG GAGAAATTTT ACGCAGAGTT CTA CT CAGGG
1001  TGGCCGAAGA AGCTGGCATT TTTGGTGATG AGGTCCCTCC AAAGCTCAAG
1051  AGTCCATTTG TATTGAGGAC ACCTGATATG TCTGCGATGC ATCATGACGC
1101  ATCCTCTGAT CTGAGAGTGG TTGGTGACAA GCTGAAGGAT ATTTTAGAGA
1151  TATCTAATAC CTCCTTGAAG ACAAGGAGAT TAGTCATTGA GCTGTGCAAC
1201  ATCGTTGCGA CACGTGGGGC AAGGCTTGCA GCTGCGGGTG TATTGGGCAT
1251  CTTGAAAAAG ATGGGAAGGG ATACTCCTCG GCAAGGTGGT CTAGAGAAGA
1301  CGGTTGTAGC CATGGATGGC GGATTGTACG AGCACTATAC AGAATACAGG
1351  ACGTGCTTAG AGAACACTTT GAAGGAATTG CTTGGAGATG AATTGGCGAC
1401  AAGCATTGTT TTCGAGCACT CCAATGATGG TTCTGGCATT GGTGCAGCTC
1451  TTCTTGCTGC CTCTAACTCA ATGTACCTTG AAGATAAGTC CTAGGAGTGA
1501  TCAAATCCCT TTCTTGCTAG AGGAAACCAC CTTTTACTCT TTATATTTTG
1551  CTCTCGAGCA TTTTTTTTCA ATTTTTCTTC GGATTATACC ATCAAGTATA
1601  TTTAATAAAT TTTCCAGTA CCTTTTTATC TCTAGGAAAT TTTTCCTAGA
1651  AATGCCTATA CATCATCTAG CATGCCTTTT T

```

I.3 Sequenz der isolierten *NtHxk1a* cDNA, Akzession AY553214

Start- und Stop-Kodons sind unterstrichen

```

-81                T TTTTTGTATT TTTTTTCATT TGTTTCGGTG
-50 GACAACTTTT AGCCAACCTC CAATTCCTCC GCCGTGACAA AAAAGAAAGG
  1  ATGAAGAAAG CGACGGTGGG AGCCGCCCGTG GTTGGCGCCG CTACGGTATG
 51  TGCTGTGGCG GCATTCATAG TGAACCACCG TATGCGCAAA TCTAGTAAAT
101  GGGCACGTGC TATGGCTATT CTTCGTGAAT TTGAGGAAAA GTGTGGGACC
151  CCTGATGCTA AGCTCAAGCA AGTCGCTGAT GCTATGACCG TCGAGATGCA
201  CGCTGGACTT GCCTCCGAAG GTGGTAGCAA GCTCAAGATG CTTATCACTT
251  ACGTCGATAA TCTCCCACC GGTGATGAAG CCGGCGTCTT TTATGCGTTG
301  GATCTTGGTG GAACAAATTT TCGAGTATTG CGAGTGCAAC TTGGTGGAAA
351  AGATGGTGGT ATTGTTTCATC AAGAAATTTGC GGAGGCATCA ATTCCCTCAA
401  ATTTGATGGT CGGGACTTCA GAAGCACTTT TTGATTATAT TGCGGCAGAA
451  CTTGCAAAAAT TTGTCGCTGA GGAAGAGGAA AAGTTTCAAC AACCTCCTGG
501  TAAGCAGAGA GAACTAGGTT TCACCTTCTC ATTCCCGGTA ATGCAGACTT
551  CAATCAACTC TGGGACTATT ATGAGGTGGA CAAAGGGCTT CTCCATTGAT
601  GATGCGGTTG GCCAAGATGT TGTGGAGAA CTCACAAAAG CTATGAAAAG
651  AAAAGGAGTT GATATGCGGG TCTCAGCTCT GGTGAATGAT ACTGTTGGGA
701  CGTTGGCTGG TGGTAAATAT ACACACAACG ACGTAGCTGT TGCTGTTATC
751  TTAGGTACAG GGACCAATGC AGCTTATGTG GAACGGGTGC AGGCGATTCC
801  AAAGTGGCAT GGTCCAGTGC CAAAATCTGG TGAAATGGTT ATCAACATGG
851  AATGGGGTAA TTTTAGGTCA TCCCATCTTC CCTTGACACA GTATGATCAC
901  GCGTTGGATA CTAATAGTTT GAATCCTGGT GATCAGATAT TTGAGAAGAT
951  GACTTCTGGC ATGTACTTGG GAGAAATTTT ACGCAGAGTT CTACTCAGGG
1001 TGGCTGAAGA TGCTGGCATT TTTGGTGATG AGGTCCCTCC AAAGCTCAAG
1051 AGTCCATTTG TATTGAGGAC ACCTGATATG TCTGCTATGC ATCATGACAT
1101 ATCCTCTGAT CTGAGAGTGG TTGGTGACAA GCTGAAGGAT ATTCTAGAGA
1151 TATCTAATAC CTCTTGAAG ACAAGGAGAT TAGTCGTTGA GCTGTGCAAC
1201 ATCGTTGCAA CACGAGGGGC AAGGCTTGCA GCTGCAGGTA TATTGGGTAT
1251 CTTAAAGAAG ATGGGAAGGG ATACACCTAG GCAAGGTGGT CCAGAAAAGA
1301 CGGTTGTAGC CATGGATGGC GGATTGTATG AGCACTATAC AGAGTACAGA
1351 ACGTGCTTAG AGAACACATT GAAGGAATTG CTTGGAGATG AATTGGCGAC
1401 AAGCATTGTT TTCGAGCACT CCAATGATGG TTCTGGCATT GGTGCTGCTC
1451 TTCTTGCTGC CTCTAACTCA ATGTACCTTG AAGATAAGTC CTAGGAGTGA
1501 TCAAATCCCT TTCTTGCTAG AGGAAACCAC CTTTTACTCT TTATATTTTG
1551 CTCTCGAGCA TTTTCTTCA ATTTTTCTCC GGATTATACC ATCAAGCATA
1601 TTTAATAAAT TTTCCAGTA CCTTTTTATC TCTAGGAATT TTTTCCTAGA
1651 AATGCCTACA CATCTAGCAT ACCTTTTTAA GTCGCTTTCA GCACTGTTGG
1701 TTCTCTCTTT AATCTCTTTT TCATTTACTT TTGAAATCAA ATTCAAAGGC
1751 AATAAATTGG GGAATTTCC GC

```

I.4 Sequenz der isolierten *NtHxk2* cDNA, Akzession AY553215

Start- und Stop-Kodons sind unterstrichen

```

-316                               GTGAAT TGCTACATTA
-300 TTACGGCAAC TATGAATATG AAAGTAAGGA ACAGTCGGTA GTTAGCTAAC
-250 CATACCTTCC AACGCAACAA TAACGGCGTA CAACAGTAGT ATAGTAATAT
-200 TCATCGTTTA AATCCTTACA TATATTTTCAT CATTAAATTTA TTCAAATCTA
-150 ACTGTTTCGCT TACCATCATT ACGATATAAA AAAGAAAATT TATATAGTGT
-100 TAAAGATTCA CAACTGTATA AACTCTCTGT TTCAGCATCA CCATTTATTG
-50  TCTCTTCTTT TTTTCTCCGT CACACGTTCC TTTTGATCTC ACTGTTAATT
1   ATGTTCGGTCA CCGTTAGCTC GCCGGCCGGC CGATCCTTCC ATATTTACAG
51  ATCACCTTAC AAAAAGATCT CCAAGCCACG TGTCATTATC GCTGCCGTCC
101 GATCTGGTGT TAGTTTAGCG GTAGCACCAA TATTGACTAA GTTGCAGAAA
151 GACTGTGCAA CTCCACTTCC TGTTTTGCGC CACGTGGCTG ATGCCATGGC
201 CGTTGATATG CGGGCTGGAC TTGCCGTCGA TGGTGGCAGT GATCTGAAGA
251 TGATCCTTAG TTATATTGAC ACTTTACCAA CTGGGAATGA GAAAGGTTTG
301 TTCTATGCAT TGGACCTTGG TGGTACAAAT TTCCGAGTGT TAAGAGTGCA
351 GTTAGGTGGT AAAGAAGAGC GCGTAATCGC CACTGAGTTT GAGCAAGTCT
401 CTATACCTCA AGAATTGATG TTTGCAACCT CTGAGGAGTT GTTCGATTTT
451 ATAGCTTCTG AGCTAGGAAA ATTTTCACAA AGTGAAGGCG GTAAGTTTGA
501 GATGCAACAA GGAAGGACTA GAGAAATAGG ATTCACATTT TCTTTCCAG
551 TGAAGCAGAC TTCAGTTAAA TCTGGCATCC TAATCAAGTG GACAAAGGGT
601 TTTGCAGTCT CTGGAACTGC AGGAAAAGAT GTGGTTGCTT GTTTAAATGA
651 AGCCATGGAA AGGCAGGGAT TGGGAATGCA AGTCTCGGCC CTGGTCAATG
701 AACTGTAGC AACACTTGCT GGAGCGAGAT ACTGGGACAA TGATGTCATG
751 GTTGCTGTCA TTCTTGGGAC TGGAACCAAT GCTTGCTACG TAGAACGTGT
801 GGATGCTATT CCTAAACTGC CACAAAGGAT GTCCAACTCT CCAGAAACAA
851 TTGTGAATAC TGAATGGGGA GCATTTTCAA ATGGCCTTCC TTTAACTGAG
901 TTTGATAGAG AAATGGATGC CGAGAGCATT AACCCCTGGTG AGCAGATTTT
951 TGAGAAAACA ATCTCTGGTA TGTACCCTGG AGAAATTGTA AGACGGGTGC
1001 TGGTCAAAAT GGCCAAGGTT GGCGGCTTAT TTGGCGGTGG CTATGTTCCA
1051 GAAAAGTTAG TCACTCCATT TGTGCTGAGG ACACCGGATA TATGTGCAAT
1101 GCAGCAGGAT ACATCCAGAG ATCTTGAAGC TGTTGAGTCT GTCCTCTATG
1151 ATATAGCTGG GGTA AAAATCT GATCTAAGTG CAAGGAAAAC AGTCGTAGAC
1201 ATTTGCGATA CTATTGCAAA TCGAGGGGGG CGTCTAGCTG GTGCAGGAAT
1251 TGTTGGGATT CTCCAGAAAA TGGAAGAGGA TTCAAAAAGGC GTAATCTTCC
1301 GTAAGAGAAC AGTTGTAGCA ATGGATGGAG GTTTATATGA GCACTATCCT
1351 CAGTACAGAG AATACCTCCA AGAAGCTGTC ACAGAACTTC TTGGATCAGA
1401 AATTTCTAAA AATGTAGTGA TAGAGCATTC AAAAGATGGA TCTGGAATTG
1451 GAGCTGCATT ATTAGCTGCT GCAA ACTCAA AGTATGAACA TGATTATTAG
1501 GAAAATGGTA ATTTTCATGT CTA AAAATGC TGGTAGAGCA TTTGTAATTT
1551 TGTTTTTGCA ATTTAGAATG TATTAAGAAG GATTGATCAT TGGATTTCTC
1601 ATTCCTTTAAG GGCTCGTTTG GTACGAGGGA TAAGAGATAA TTACATCCGG
1651 GATTAAATTT GAGATAAGTT TATCCCACGT TTGGTTGGGA TAAAATCGCG
1701 GTATAACTAA TCCC GGGATT AGTTAT TCCG GGATTGTAGT GTTATTTTAA
1751 TCCC TATGAG ATGGTGGGAT AACTAATCCT AAGATAATTA ATTCTGGGAT
1801 AATCTGTTTC CCAACCAAAC GATCCTTAAG AAGTGGCTTG TTGTATTTAA
1851 TGCCATTTTT GTATTACCAT AATGCAGCAG TGAAGTATTT ATGTGCTAAA
1901 AGCAGATGTA TCAGTAAATA TAGAATATCT TGTTTGCTTA TAAATTGTTA
1951 AATAAGCATA TTTCTGTGGT ATTTGAGGCG GCCG

```

I.5 Sequenz der isolierten *NtHxk3* cDNA, Akzession AY553216

Start- und Stop-Kodons sind unterstrichen

```

-43      GCT AATTACCCTT CTCCATCATT TTTCTTTAGT ATTAAGAGAT
1      ATGAAGAAGG CGACGGTGGG AGCGGTGGTG GTGGGGGCGG CGGTGACGGT
51     AGCTGTGGGG GCACTCATCG TCCGGCACCG AATGCGGAAA TCGAGCAAGT
101    GGGCACGTGC GAGGGCAATT CTGAAAGAAT TCGAGGAGAA GTGTGGGACC
151    CCAGATGCCA AGCTAAAGCA AGTGGCGGAT GCCATGACGG TGGAGATGCA
201    CGCCGGCCTC GCCTCTGAGG GCGGCAGCAA ACTCAAGATG CTTATCAGCT
251    ATGTCGACAA TCTCCCAACT GGCATGAAG AAGGAGTCTT TTATGCATTG
301    GATCTTGGTG GAACAAATTT TCGAGTATTG CGGGTGCAAT TGGGGGGAAA
351    AGATGGTGGT ATTGTCCATC AAGAAATTTAC GGAGGCATCA ATTCTCCAA
401    ATTTGATGGT TGGGACTTCA GAAGCACTTT TTGACTATAT TCGGCAGAA
451    CTTGCAAAAT TTGTTGCTGA AGAAGAAGAA AAATTTTCATC AACCTCCTGG
501    TAAGCAGAGG GAACTCGGTT TCACTTTCTC ATTCCCAATC ATGCAGACTT
551    CAATCAATTC TGGAACTCTT ATCAGGTGGA CGAAAGGTTT CTCCATTGAT
601    GACACGGTTG GACAAGATGT TGTTCAGAA CTGACAAAAG CCATGCAAAG
651    AAAAGGAGTT GATATGAGGG TGTCGGCGCT GGTGAATGAT ACTGTTGGAA
701    CATTGGCTGG TGGTAGATTC TCCAATAAGG ATGTATCCAT TGCTGTGATA
751    TTAGGTAAGT GGACCAATGC AGCATATGTG GAACGGGCTC AGGCAATTC
801    CAAATGGCAT GGTCTCTGCG CTAATCTGAG AGAAATGGTT ATCAACATGG
851    AATGGGGTAA CTTTAGGTCC TCCCATCTCC CCTTGACAGA GTACGACCAT
901    GCAATGGATA CAGATAGTTT AAATCCTGGT GAACAGATAT TTGAGAAGAT
951    ATGCTCTGGC ATGTAAGTGG GAGAAATTTT ACGCAGAGTT CTAATCAGAA
1001   TGTCTGAAGA AGCTGCCATT TTCGGTGATG AGGTCCCCC AAAACTCAAG
1051   AATCAATTCA TATTGAGGAC ACCTGAAATG TCTGCTATGC ATCATGACAC
1101   ATCCTCTGAT TTGAGAGTGG TTGGCGACAA GTTGAAGGAT ATCTTAGAGA
1151   TATCCAATAC CTCTTGAAG ACAAGAAGAT TAGTTGTTGA GCTGTGCAAC
1201   ATTGTTGCAA CACGTGGCGC AAGGCTTGCA GCGGCTGGGG TCTTGGGCAT
1251   TGTCAAAAAG ATGGGCAGGG ATACACCCAG GGAAAGTGGT CAAGAAAAGA
1301   TAGTCGTAGC CATGGATGGT GGATTGTACG AGCACTATAC AGAATACAGA
1351   AAGTGCTTGG AGAACACTTT AGTTGAATTG CTTGGAGAGG AAATGGCAAC
1401   AAGTATTGTT TTCGAGCACG CAAATGATGG TTCTGGCATT GCGCTGCAC
1451   TTCTTGCGGC CTCTAACTCC CTATATGTTG AAGACAAGTC TTGAGAGCGA
1501   TCAAGATGAT ATTTAGCTAG AGGAAACTCT CTCAACCTTT TATATAGTGC
1551   TTTTCTCTAG CCTTTCTTT TGATTTCTCT CCTTTTGGT TCTTCTACCA
1601   ATTATATTCA TAATTTTGCA GCACTTGTGC TTGGTTTATA GTTTAGGATA
1651   TTTTCTCTGG GAATGCCTAC TTATTTCTTC TGAAAAGGG TGCAAGCAAA
1701   TTGTATAACA CTCAGCACTG CTGATTCCTC CCCTTGGTCT TTTGTTTTCA
1751   ATCTGCGATC AAATTTTAGG GTTTAATAAA ATGGGGTGT T AAGTTTTTGT
1801   TAAAGC

```

I.6 Sequenz der isolierten *NtHxk4a* cDNA, Akzession AY553217

Start- und Stop-Kodons sind unterstrichen

```

-47             AGAACAA TTGTGTGTTG TTGTGTTACA AGTGAAAAAT
1   ATGGGAAAAG TGGTGGTGGG TGCAGCAGTA GTATGTACAG CTGCAGTATG
51  TGCTGCTGCT GTTTTATTAA TGAGGCACAA AATGAAAAAT TCAGGTAAAT
101 GGGCTAAAGC TATGGATATA TTGAAAGAGT TTGAGGAGAA ATGTGAAACT
151 CCAATAGGAA AATTAAGGCA AGTGGCTGAT GCTATGACTG TAGAGATGCA
201 TGCTGGTCTT GCTTCTGAAG GTGGTAGCAA ACTCAAGATG CTTATTAGCT
251 ATGTTGATAA CCTCCCTACT GGGGACGAAA CCGGTCTGTT TTATGCATTA
301 GATCTAGGCG GCACAAACTT CCGTGTGATG CGAGTGCAGT TGGGCGGGAA
351 GGAAAAGCGT ATAGTTAAAC AAGAAGTTAA AGAAGTTTCA ATTCCAAAGA
401 ATGTGATGGC TGGATCATCA TCTGATGCGT TATTTGATTT TATTGCCACG
451 GCGCTTGTA  AATTTGTTGC TACAGAAGAC GACGATTTTC GTCTTCCACC
501 CGGTAGACAA AGGGAGCTGG GCTTCACCTT CTCTTTCCCA GTTAAACAAC
551 TGTCAATTGC ATCAGGGACT CTTATTTAAAT GGACAAAGGG CTTCTCCATC
601 GATGATACGG TTGGGCAAGA TGTGTTTAGA GAGTTAACAA AAGCAATGGA
651 AAGGGTCGGT CTTGACGTGC GCGTGGCTGC TTTGGTCAAT GATACTGTTG
701 GAACATTAGC AGGAGGTCCG TATAACAACC CTGATGTCAT TGCTGCAGTA
751 ATATTGGGTA CTGGAACCAA TGCAGCATAT GTTGAGCGGG CAAATACAAT
801 TCCCAAATGG CATGGCCTGC TGCCTAAATC AGGAGATATG GTTATTAACA
851 TGGAATGGGG TAATTTCCGC TCATCACATC TTCCGGTAAC AGAATACGAC
901 CAAAGTCTTG ACACTGAGAG TTTAAACCCC GGGGAGCAGA TTTATGAGAA
951 GATGATTTCC GGGATGTATC TTGGAGAAAT TTTGCGCAGA GTCTTGTGTA
1001 GAATGGCTGA AGAAGCTTCA TTTTTTGATG ATTATGTCCC ACCGAAACTG
1051 AAAACTCCAT TCATATTGAG GACTCCGGAC ATGTCTGCTA TGCATCACGA
1101 CAAGTCTGCT GATCTCAAGG TGGTTGGCGA CAAGCTGAAG GATATCTTAG
1151 AGGTACCTAA TTCTACCTGG AAAATGAGGA AAATAATTGT AGAGCTATGT
1201 GACATTATTA CCTCTCGTGG AGCTCGTCTT TCTGCAGCAG GAATTGTGGG
1251 CATCCTCAAG AAATTGGGAA GAGACACTTT GAAGGATGGA GAGAAGCAGA
1301 GGTCAGTAAT AGCTGTTGAC GGCGCATTGT TTGAGCATT  CACAAAGTTC
1351 AGAAATTGCA TGGAGGGAAC TATCAAAGAG TTGTTGGGAG ACGCTGCGGA
1401 AAGCATAGTC ATTGAGCTTT CGAATGATGG TTCAGGCATT GGAGCTGCAC
1451 TATTGGCTGC TTCTCATTCA CAATATCTCG GACTGGAGGA ATCTTGATCA
1501 TGGTCAGAGT GATAGAAAAA GCCTGAGATG G

```

I.7 Sequenz der isolierten *NtHxk4b* cDNA, Akzession AY553218

Start- und Stop-Kodons sind unterstrichen

```

-47          AGAACAA TTGTGTGTTG TTGTGTTACA AGTGAAAAAT
1   ATGGGAAAAG TGGTGGTGGG TGCAGCAGTA GTATGTACAG CTGCAGTATG
51  TGCTGCTGCT GTTTTATTAA TGAGGCACAA AATGGAAAAAT TCAGGTA AAT
101 GGGCTAAAGC TATGGATATA TTGAAAGAGT TTGAGGAGAA GTGTGAAACT
151 CCAATAGGAA AACTTAGGCA AGTGGCTGAT GCTATGACTG TAGAGATGCA
201 TGCTGGACTT GCTTCTGAAG GTGGTAGCAA ACTCAAGATG CTCATTAGCT
251 ATGTTGATAA CCTCCCCACT GGGGACGAAA CCGGTCTGTT TTATGCATTA
301 GATCTAGGCG GCACAAACTT CCGTGTGATG CGTGTGCAGT TGGGCGGGAA
351 AGAAAAGCGT ATAGTTAAAC AAGAA GTTAA AGAAGTTTCA ATTCCAAAGA
401 ATGTGATGGC TGGATCGTCA TCTGACGCGT TATTTGATTT TATTGCCACG
451 ACGCTTGTA AATTTGTTGC TACAGAAGGC GACGATTTTC ATCTTCCACC
501 CGGTAGACAA AGGGAGTTGG GCTTCACCTT CTCTTTCCCA GTTAAACAAC
551 TGTCAATTGC ATCAGGAACT CTTATTAAAT GGACAAAGGG CTTCTCTATA
601 GATGATGCGG TTGGCCAAGA TGTGTTAGA GAGTTAACAA AAGCAATGGA
651 AAGGGTCGGT CTTGACGTGC GCGTGGCTGC TTTGATCAAT GATACTGTTG
701 GAACATTAGC AGGAGGTCGG TATAACAACC CTGATGTCAT TGCTGCAGTA
751 ATATTGGGTA CTGGAACCAA TGCAGCATAT GTTGAGCGGG CAAATACGAT
801 TCCCAAATGG CATGGTCTGC TGCCTAAATC AGGAGATATG GTTATTAAACA
851 TGGAATGGGG TAATTTCCGC TCATCACATC TTCCGGTAAC AGAATACGAC
901 CAAAGTCTTG ACGCTGAGAG TTTAAACCCA GGGGAGCAGA TTTATGAGAA
951 GATGATTTCC GGGATGTATC TTGGAGAAAT TTTGCGCAGA GTCTTGTGTA
1001 GAATGGCTGA AGAAGCTTCA TTTTTTGATG ATTATGTCCC ACCAAAAC TG
1051 AAAACTCCAT TCATTTTAAG GACTCAGGAC ATGTCTGCTA TGCATCACGA
1101 CAAGTCTGCT GATCTCAAGG TGGTTGGCGA CAAGCTGAAG GATATCTTAG
1151 AGGTACCTAA TTCTACCTGG AAAATGAGGA AAATAATTGT TGAGCTATGT
1201 GACATTATTA CCTCTCGTGG AGCTCGTCTT TCTGCAGCAG GAATCGTGGG
1251 TATCCTCAAG AAATTGGGAA GAGACACTTT GAAGGATGGA GAGAAGCAGA
1301 GGTCAGTAAT AGCTGTTGAC GGTGCATTGT TTGAGCATTA CACAAAGTTC
1351 AGAAATTGCA TGGAGGGAAC TATTAAAGAG TTGTTGGGAG ACGCCGCAGA
1401 AAACATAGTC GTTAAGCTTT CGTATGATGG TTCTGGTGTG GGAGCTGCAC
1451 TATTGGCTGC TTCTCATTCC CAGTACCTCG GACTCAAGGA ATCTTGATCA
1501 TGGTCAGAGT GATAGAAAAA GCCTGAGATG G

```

I.8 Sequenz der *NtHxk5* cDNA, Akzession AY553219

Start- und Stop-Kodons sind unterstrichen

```

-100 TCTTTAACAA ACCCCATTTA AAATCAACCA AAAAAAGTTTC AATCTTTACG
-50 GTATATTCAC TCAAATATAC ACAAAAAGTT TGATTTTTTTT TCAAGAAAAT
1   ATGGGAAAAAT TGGTTGTAGG TGTATCAGTT GTGTGTACTG CTGCTGTAGT
51   ATGTGGGGTG GCAGTTTTGT TAATGAAGCG CAGGATGAAG AATTCTGGGG
101  AGTGGGGAAA AGTTGAAGCT TTATTGAAGG ATTTTGAGGA GAAGTGTGCA
151  ACTCCAATGG GGAAACTTAA GCAGGTAGCT GATGCTATGA CTGTAGAGAT
201  GCATGCTGGA CTTGCTTCTG AAGGTGGGAG TAAGCTCAAG ATGCTTATTA
251  GCTATGTTGA TAACCTTCCT ACTGGGGACG AAGAAGGTCT GTTTTATGCA
301  TTGGATCTAG GCGGCACAAA CTTTCGTGTG ATGCGTGTGC AGTTGGGTGG
351  GAACGAAAAG CGTATAGTTA AACATGAAGT TAAAGAAGTT TCAATTCCAC
401  AGAATGTGAT GGCTGGATCA TCATCTGAAG TGTTATTTGA TTTTATTGCC
451  ACGGCACTTG CAGAATTTGT AGCTACAGAA GGTGATGATT TTCATCTTCC
501  ACCTGGTAGA CAAAGGGAAT TAGGCTTTAC CTTCTCTTTC CCTGTGAAAC
551  AATTGTCAAT TGCATCAGGA ACTCTTATTA AATGGACAAA GGGCTTCTCC
601  ATAGAAGACG TGGTTGGCCA AGATGTGGTG GGAGAATTAG CAAAAGCAAT
651  GGAAAGGGCC GGCCTTGATG TCGGTGTGAC TGCTTTAGTC AATGATACTG
701  TTGGAACGTT AGCAGGGGGT CGGTACAATG ATCCTGATGT CATTGCTGCA
751  GTAATTTTGG GTACTGGAAC CAATGCAGCA TATGTTGAAC GGGCTCATGC
801  GATTCCCAAA TGGCATGGTC TGTGCCGAA ATCCGGAGAG ATGGTTATCA
851  ACATGGAATG GGGTAATTTT C'TCTCATCAC ATCTTCCAGT AACAGAATAT
901  GACCAAAATC TTGATGTTGA GAGTTTAAAC CCCGGGGAGC AGATTTATGA
951  AAAGATGATC TCCGGGATGT ATCTTGGAGA AATTTTGCCT AGAGTATTGT
1001 GTAGAATGGC TAAAGAAGCT TCATTATTTCG GTGATTATGT CCCATCCAAA
1051 CTGAAAATTC CTTTCATATT GAGGACTCCG GATATGGCTG CTATGCATCA
1101 CGACGAGTCG GCTGATCTCA AAGTGGTTGG CAATAAACTG AAGGATATCT
1151 TAGAGGTACC TAATTCTACC TTGAAAATGA GGAAAATAGT TGTGGAGCTA
1201 TCGGACATCA TCACCTCTCG TGGAGCTCGT CTTTCTGCAG CAGGAATCGT
1251 GGGCATCCTC AAGAAATTTG GAAAAGACAC TTTGAAGGAC GGAGAGAACC
1301 AGAGGTCTGT CATAGCTGTG GACGGTGCAT TGTTTGAGCG TTACACCAAG
1351 TTCAGAAATT GCTTGGAGGA AACTATGAAA GAGTTACTGG GAGACACTGC
1401 GGACAGCATA GTTATTGAGC TTTCTAATGA TGGTTCAGGT GTTGGAGCTG
1451 CACTTTTGGC TGCCTCGCCT TCCCAATACA CAGATCTCGA GGAATCATGA
1501 TCATGGTCAG AGTGACACAA CAAAAGTGC CTAGCCAAAG TTTGTACGTT
1551 TACAATCACC CCTCTTCTTG C'TAAAGAGAA CCCTCTTCTT ACTTTCTTCT
1601 CCGAGATGAT TGAAATATTC CTTGCTTCCCT TGTGCACCGC ATCATGTAAG
1651 AGTGAGCTTT GAAGTGAGCC ATAGTTCAAT GTATCAAATG AGCACATCTC
1701 TCTTCAGCTA AACATCAATA TGCTGACCTT TTCACTCCTG GTGCCTCTAA
1751 GGATCATCTT TATCCCAAGT GTAAGCTTAA ATTTTTTCTT CACTAGTCAG
1801 AAATAAAGCT AGGATACAAA TAAAGTTCTT CTAGTAGCAA AAAAAAAAAA
1851 AAAAAAAAAA AAAA

```

I.9 Sequenz der isolierten *NtHxk6* cDNA, Akzession AY553220

Start- und Stop-Kodons sind unterstrichen

```

-32                CC TCAAATAAAA AGAAAAATAA ACGGTGTCGT
1   ATGGGGAGGT TAGCGGTGGG GATATCGGCG GGGTTTGC GG TGGCGGCGTG
51  TATTGTGGCG GCAGCTATGG TGGGTAAGAG GGTA AAAAGG AGGAGGAAGT
101 GGAAGAAGAT GGTGAAGGTT CTAGAAGAAC TGGAAGAGTC GTGTGGTACA
151 CCCGTGGGTA GGCTAAAGCA AGTAGTGGAT GCTATGGCTG TTGAAATGCA
201 CGCTGGACTT GCCTCTGAAG GCGGGAGTAA ACTCAAGATG TTGCTTACTT
251 ATGTTGATAA GCTCCCAAAT GGGAGGGAAA AGGGAACATA TTATGCTCTG
301 CACCTTGGTG GTACGAATTT TAGAGTCTTG AGAGTCCACT TAGGAGGCCA
351 AAGGTCTGCT ATTCTTGGAC AAGATATAGA ACGACAACCC ATTCCGCAAC
401 ATCTAATGAC TAGCACAAAG GAGGATCTCC TTGATTTTCGT TGCCTCATCA
451 TTAAAGGACT TCATTGAAAA GGAAGGTAAT GGCTTGGAGC AGCCTTCACC
501 CAGGAGGAGA GAACTTGGCT TTACATTTTC ATTTCCCTGTG AAGCAA ACTT
551 CCGCTCATC TGGCATTTTG ATCAAATGGA CAAAGGGATT TTCGATTGAA
601 GACATGATTG GAAGAGATGT TTCTGAATGT CTACAACAAG CAATTGCTAG
651 AAAAGGTCAA GATGTGCGGG TGGCAGCATT GATAAATGAC ACTGTGGGAA
701 CTCTAGCTCT TGGACATTAT AATGATGAAG ACACAGTTGC CGCGGTTGTA
751 ATTGGGACCG GCACTAACGC ATGCTATTTG GAGCGGGCAG ATGCAATTAT
801 TAAGTGCCAA GGTCTTTTAA CAACATCAGG AGGCATGGTA GTCAATATGG
851 AATGGGGAAA CTTTTGGTCA TCTCATTTAC CTAGAACCCTC ATATGATATT
901 GACTTGGATG TTGCTAGCCC AAACCCAAAT GATCAGGGTT TTGAGAAAAT
951 GATATCAGGA CTGTATTTGG GAGACATTGT CAGGAGAGTA CTCCTTAGAA
1001 TGTCACAGGA ATCAGATGAT TTTGGACCTG CATCATCAAA ATTAGCAGTT
1051 CCTTTCGCCCT TGAGGACACC GTTGATGGCT GCTATGCACG AGGATGATTC
1101 ACCTGACTTA AGTGAAGTAG CCAGGATTCT GGGAGAAGTT CTAGAGTTAC
1151 CTGATGTCCC AGTGAAAGTT CGGAAGCTTG TAGTGAAGGT ATGTGATGTA
1201 ATTACTCGAA GGGCTGCTAG ATTAGCAGCT GCTGGTATCG TGGGAATATT
1251 GAAGAAGATA GGTTCGAGATG GAAGTGGAGG CATAGCTGGT GGAAAATTCA
1301 GGAGCGATAG ACCAAGTCGG ATGAGAAGAA CGGTTGTGGC TATCGAGGGT
1351 GGTTTATACA CAAGTTACAC CTTATTCAGA GAATACCTGA ATGAAGCGAT
1401 GAAGGAAATT TTAGGGGAAG AAATTTCCCTC GAACGTCATT CTTAGGGTCA
1451 TGGAAGATGG ATCAGGGATT GGAGCAGCTC TTCTTGCTGC TGCAAATTCA
1501 GCCTCTGAAG TGGATAGGGT ACAGCTGCAC TGAATATAAA GCAAATACTA
1551 CTATATATAC ACATCTATAC ACAGCTTTGT AAATTGTAGC AAAATTGTTT
1601 CATATATTCA AATCCTATCA CAATGTAATA GGAAGGTTGT GTATATGTGT
1651 CATATACTGT TCAAATCTGA TGTTATAGTC TAGAATATCC CCACTTGTGT
1701 TCTTAGTAAT GATCATTGCA ACCCTTGTAT GTGAAATTAA TGCTATTGAT
1751 GATTCAGTA TTTAG

```

I.10 Sequenz der isolierten *NtHxk7* cDNA, Akzession AY664010

Start- und Stop-Kodons sind unterstrichen

```

-118                               GAACTCTC CTTTGATCGG
-100 ATCTCCTTCT TAACCAACAC AGACACAAAT TTTTACTTTA CTGATATCAT
-50  TTTTTCTCAG TGGACCAACT TTTTGCCAAC CTCAAATTCC GGCAAAAAAA
1    ATGAAGAAAG TGACGGTGGG AGCCGCCGTG GTTGGTGCAG CTGCGGTGTG
51   TGCAGTGGCG GCGTTAATAG TGAACCACCG GATGCGGAAA TCTAGTAAAT
101  GGGTCTGTGC TATGGCTATT CTTCGCGAGT TTGAGGAAAA GTGTAAGACT
151  CAAGATGCAA AGCTTAAGCA AGTTGCTGAT GCTATGACTG TTGAGATGCA
201  CGCCGGAATT GCTTCTGAAG GCGGCAGCAA GCTCAAGATG CTTATCACCT
251  ATGTCGATAA TCTCCCAACT GGTGATGAAG CTGGCGTCTT TTATGCATTG
301  GATCTTGGTG GAACAAATTT TCGAGTATTG CGAGTGCAAT TGGGTGGAAA
351  AGATGGTGGT ATTATTCATC AAGAATTTGC TGAGGCATCA ATTCTCTCAA
401  GTTTGATGGT TGGGACTTCA GATGCACTTT TTGATTATAT TGCGGCTGAG
451  CTTGCAAAAT TTGTTGCTGC GGAAGAGGAA AAATTTTCATC AACCTCTTGG
501  TAAGCAGAGA GAACTAGGTT TCACCTTCTC ATTCCCAGTA ATGCAGACTT
551  CAATCAACTC TGGGACTATT ATGCGGTGGA CAAAAGGCTT CTCTATTGAT
601  GATGCGGTTG GCCAAGATGT TGTGGAGAA CTCACAAAAG CTATGAAAAG
651  AAAAGGTGTC GATATGCGGG TCTCAGCTCT GGTGAATGAT ACTGTTGGAA
701  CATTAGCTGG TGGTAAATAT ACGCAAAAGG ATGTAGCTGT TGCTGTTATC
751  TTAGGTACAG GGACCAATGC AGCTTATGTG GAGCGGGTGC AGGCAATTCC
801  AAAGTGGCAT GGTCCCTGTGC CAAAATCTGG TGAAATGGTT ATCAATATGG
851  AATGGGGTAA TTTTAGGTCA TCCCATCTGC CCTTGACGGA GTATGATCAT
901  GCATTGGATA ACGAGAGTTT AAATCCTGGT GAACAGATAT TTGAGAAGAT
951  GACTTCTGGC ATGTACTTGG GAGAAATTTT ACGCAGAGTT CTA CT CAGGG
1001 TGCTGAAGA AGCTGGCGTT TTTGGTGATG AGGTCCCTCC AAAGCTCAAG
1051 GATTCATTTG TGTAAAGGAC ACCTGATATG TCTGCTATGC ATCATGACAC
1101 ATCCCCTGAT CTGAAAGTGG TTGGTGAAAA GCTGAAGGAT ATTTTAGAGA
1151 TATCTAATAC CTCCTTGAAG ACAAGGAAAT TAGTGGTTGA GCTGTGCAAT
1201 ATCGTTGCAA CACGTGGGGC AAGACTTGCA GCTGCAGGGG TACTAGGCAT
1251 CTTGAAAAAG ATGGGAAGAG ATACGCC TAA GCAGGGTGGT TCAGAAAGGA
1301 CGGTTATAGC CATGGATGGC GGGTTGTATG AGCACTATAC AGAATATAGA
1351 ATGTGTTTAG AGAACTCTTT GAAGGACTTG CTCGGAGAGG AATTGGCAAC
1401 GAGCATCGTT TTTGTGCACT CCAATGATGG TTCTGGCATT GGTGCTGCTC
1451 TTCTTGCTGC CTCTCATTCA ATGTACCTTG AAGATCAAGC TTAGGAGAGT
1501 GTGATCAAAT CCATATCTTG TTAGAGGGGA CTACCTTTAG ACTCTATATT
1551 TTGCTCTCAA GCATTTTTCGG TATTTTCTCT CCTTTATTGT ACCATCAAAT
1601 GAAATTAATA ATATCCCAG CAGATACTTT TGA CTTT TAT CTCCAGGAGA
1651 GTTTTCCTAG AAGTGCCTTC AAGCACAGAA TTTTCATGGA TAAAAGATCC
1701 TTTTACTACC TGA C TGGATG ATCTTCAATC ATTTACTGAA AAACATACAG
1751 AATTTTTCGTA GTTGAACAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA

```

I.11 Sequenz des isolierten *NtHxk1* Promotors, Akzession AY664411

Potentielle TATA- und CCAAT-Boxen sind unterstrichen, bekannte cDNA ist klein geschrieben

```

-1406                                     CTGAGC
-1400 TGGCCTAAGA AAAGGTCTCT AATTTGGTGT ATCCCACTCA TATTGCTTTA
-1350 ATAGGTGAAC TCGAAAATCT GATTTAACTA CACCTATTTT CACGCTTGTC
-1300 TTCTAAATTT TGATAGTTGG AGACTTGGAG TAATAAATAA GACATATACA
-1250 TTTTTTGGAGT GTTTTTTTTTT TTTTTATAAT AGAAAAAGTA TCAAGGATCA
-1200 GTAGCACACA GTTGAAACTT GGTATTCAAA TTAGTGTTCAG TGCCTTAAT
-1150 TCACGTACTG TGTTCTTACC GCTAGATCAA TCCTGAGTCA TATTATGAGT
-1100 GTATTATTAT TATTAAAAAA AAAAAGAATG GCACAGTTAG TATAATTAAT
-1050 TTGTACACAG CTCAACCAAA ACAAATTTCC AAAATATCAA AATTGGAGAG
-1000 AAAAGACACG TGATACGATA TTTCTTGCCT TGCCCAAAAG GTCGAAAAAA
-950  GGACGTTTTTT GGCTGGTTGC TCCTACCGTC GATATCAGAC AAATATAAAA
-900  TCTTGGTAAA TATATTGGTT CAAATATGTA AATATGTTGG TCTCACCAAT
-850  ATATGAGCAA TTATAGTAAG TGTGAGAGAT AATTTTGAAA GAGGCTAGCT
-800  GCTTTTACTT CTTTTGATTT CGGATGATTT TGGCTTAACT AGATGCGTGT
-750  TGGAGTCTAA ATGCATCTTA AATCCTAATC AAAAAACAT AAATGCTAAT
-700  AATTACTCAC TCCGATCTAA TTTAATTGAT TTTTGGCTAT TTTTTTGTG
-650  TCCACAATAT TTTATTTTTT CAGATATCAG AAAGAATTAA TTTTTTTTTT
-600  TAAAGTTGTC AGTGGAGTAA AGAGCCTAAG AGTATTGTTA TATTTTCAAT
-550  GAATAAAGGT TAATATGATC AATTTTACTG TTAACTAATA CTAATAATAT
-500  AGAGTTATCT TGACTTTTAA CTTTGCCTTA TTACTTCAAT TAACACTTAA
-450  CTACTATCCA ATTAGCTAAT AACATATAAT TATTTTTTTTT TAAATTTACC
-400  ATTCATCAAC CAAACATCAA AAGATATATT TCAATAAAAT TTCTTTTCCA
-350  TCAGAAATGA CTTCCCTAAT TTTATCCATT AAATATTTTA TTATTTATTA
-300  TTCACTCTCA AAGGTAGATT AACAAAATCT TGCTAATAAA TAGAGTAATA
-250  AAATTCATCT CATCCACTAA TAAATTCCCC CCTTTTCTCG TTCGATTACT
-200  GAAGTCCTAC CCCCACCTA CCCACCCAAA GGTGTGATGA TCCGATCTCA
-150  TTCataacaa acaccctgt aatattattac tgccttaaa agtacaacaaa
-100  tccccagtct ttttgttcat tttgtatatt ttttttcatt tgtttcgggtg
-50   gaccaacttt tagccaacct ccaattcctc tgccgtgaca aaaagaaagg

```

I.12 Sequenz des isolierten *NtHxk2* Promotors, Akzession AY664412

Potentielle TATA-und CCAAT-Boxen sind unterstrichen, bekannte cDNA ist klein geschrieben

```

-924                               ATCG AGACCGCAAT CCCGGAATCG
-900 ATACTAGCCT CGAACAACTT CGAAGAATAT TGTCAGACGA TCTAGCATAA
-850 CCAACAGAAG GCTGAAAATA TTCGTGACCA GCCGAATGTC ACGGCGGGAA
-800 TCTCGGCACG TATCGATAAG GAACCAACAA TTAGAGAATC AAAAGATTTT
-750 TTACCTTTTA TAGAGTTGTA CTTAAAATAT GACTCCTCTG TTATGTAAAA
-700 AGGGTCTAAC GATTCATTCG ACACATTGTA ACACGCACTC AAAAGCAATA
-650 CATTATTATT TTCTCTGTCT CCAAGCTCTT GTTCTTTTGT TTATCGACAC
-600 TTGCTGTGGT GAGCCCGGCT CGAGGGCAAT TATTCTATCA AGGCTGAAAT
-550 TATCCAACCT ATCTGGTTTG AATTTATGTT ATCTTTATTT ACTCAATAGC
-500 AACTTAATTT ATCGTTTTGT ATCAAGTTAA TCCGCGTATC TATAAAATCA
-450 CTTAAAATTT TTAATTGTTA TTCAATTTTG AGTGTAACA CCGAGAAAGT
-400 GAAATTTTCC AAAAAATGGA AAGAAATAAT AAAAGAATTA CTCCACTAAG
-350 TTGACGAAGA AAGGGGAAGA AAAAAGATTT TATTgtgaat tgctacatta
-300 ttacggcaac tatgaatatg aaagtaagga acagtcggta gttagctaac
-250 cataccttcc aacgcaaca taacggcgta caacagtagt atagtaatat
-200 tcatcgttta aatccttaca tatatttcat cattaattta ttcaaatcta
-150 actgttcgct taccatcatt acgatataaa aaagaaaatt tatatagtgt
-100 taaagattca caactgtata aactctctgt ttcagcatca ccatttattg
-50  tctcttcttt ttttctcctt cacacgttcc ttttgatctc actgttaatt

```

I.13 Sequenz des isolierten *NsHxk4* Promotors, Akzession AY664409

Potentielle TATA-und CCAAT-Boxen sind unterstrichen, bekannte cDNA ist klein geschrieben

```

-950 AAAGATTATT TTTTTTTAAA GTTTTCTATA TTAATAATGT ACACAACCTCA
-900 AGCAAATAAA TATCTAAAAT ACAAAGTTA GCAACAAAGA AAGATATATA
-850 TATGATGTGA TATTTCTTCT ATTGCCCTAA CCATCACAAC AAACGTGGGG
-800 GAGAAGGACG TTTTTGGCGG TCTGCTCTTA CATCAACATC CCACAAAATA
-750 TAAATCTTGG GAAAAAATA AAATTTGTTG ATAAATAGGT ACAAATTTGT
-700 TGTTTTCCAC AATATATAAT TAAAAAAGT ATAAAGATTT CATTTAGAAA
-650 ATAGGTTAGC TGTTCTACT TCTTTTGGTT TCGAATAATT ATAGGGGTAC
-600 TATTTTACTT ACGTGTGCGA ATCTAATAAA TACACTAAAC ATGGCATATG
-550 ATAACATAAA TATATAAATC TCAAATAATT TCTTATATTT AAGGGTTATA
-500 ATCTTATCAA GTATTCGTAA AATTTCTCTC GATCCGTTTC CCTTAATTAA
-450 TTACTTAACC AAATCGAATC TACATTAAG AAATCTAACA CTAAAAATAA
-400 ATACTAAAAG CCTGTTTGAA TTGACCTATT TTATTTTCTT TTGTGATCCC
-350 TCGAATAATG CAATTCATTA ATCATAGAAG AATTTTTTTT TCTGTTTTTT
-300 TTTTTTTACC AACTACCAA CATAAGTAAG ACTTTATTTT TTGTCATTTT
-250 CTGTTTTAAT ATTAACCTCT ATTCAAAGCA AAATTATGAA AATCTAAATT
-200 TGTAATAAAT AGAGAGTAAG TATATCCTAA TCCAGTCTAC AAATTAACCT
-150 TAAATTTCCC CCTTTTTTCT Cattgaatta ctgaactctc ctttgatcgg
-100 atctccttct taaccaacac agacacaaat ttttacttta ctgatatcat
-50  tttttctcag tggaccaact ttttgccaac ctcaaattcc ggcaaaaaaa

```

II Sequenzvergleich von Hexokinasen aus *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*

Rechts der Diagonale Vergleich der Proteine, links der Diagonale Vergleich der entsprechenden Leserahmen. Homologiegruppen nach Olsson *et al.* (2003) sind farblich abgesetzt. At: *Arabidopsis thaliana*, Nt: *Nicotiana tabacum*. Berechnet mit Megalign, ClustalW.

	At Hxk1	At Hxk2	Nt Hxk1	Nt Hxk1a	Nt Hxk7	Nt Hxk3	Nt Hxk4a	Nt Hxk4b	Nt Hxk5	At 1g50460	At 3g20040	Nt Hxk6	At 1g47840	Nt Hxk2	At 4g37840
At Hxk1	***	84,9	68,3	69,0	70,0	70,2	79,0	75,6	74,4	51,8	48,0	53,2	49,8	55,4	39,9
At Hxk2	82,4	***	68,1	68,1	68,7	69,5	75,9	75,5	73,5	50,0	46,2	51,6	48,4	53,0	38,6
Nt Hxk1	70,1	67,9	***	97,6	91,1	87,9	69,2	68,6	68,0	50,3	48,1	53,9	48,7	52,9	39,0
Nt Hxk1a	70,9	68,5	97,3	***	92,0	88,7	70,0	69,2	68,2	51,7	48,3	54,3	49,5	53,3	39,4
Nt Hxk7	70,4	68,4	90,9	91,4	***	86,1	70,0	69,6	68,6	51,5	48,3	53,9	47,7	52,7	38,8
Nt Hxk3	68,9	67,6	85,1	85,5	84,5	***	70,4	69,4	68,2	50,3	47,9	53,3	48,9	52,7	39,8
Nt Hxk4a	72,8	72,9	69,7	70,4	71,4	70,3	***	97,2	87,1	49,4	48,4	53,0	48,8	52,4	39,6
Nt Hxk4b	72,9	72,6	69,4	70,1	71,3	69,8	96,8	***	85,9	49,4	48,6	52,6	48,4	51,6	38,8
Nt Hxk5	72,2	71,1	69,0	69,2	69,7	68,9	88,2	88,2	***	49,3	49,1	55,3	49,7	53,9	39,9
At 1g50460	57,2	57,6	57,4	58,0	58,8	57,9	56,6	56,9	56,5	***	80,1	69,9	43,2	46,4	33,5
At 3g20040	56,4	56,5	56,2	56,5	56,6	55,8	57,0	57,0	57,0	80,5	***	66,1	42,6	43,8	31,7
Nt Hxk6	58,0	57,9	59,6	59,6	60,0	58,8	57,6	57,8	59,2	68,5	67,2	***	43,7	48,4	35,1
At 1g47840	55,3	53,1	55,4	56,0	55,6	55,4	54,3	54,3	55,2	52,4	51,6	50,2	***	63,3	33,7
Nt Hxk2	57,7	56,7	58,8	59,3	58,1	59,0	57,6	57,0	57,3	52,4	51,3	52,5	66,2	***	36,5
At 4g37840	53,4	51,3	52,8	53,6	53,1	54,1	52,4	52,5	51,9	48,8	47,3	47,0	49,7	50,9	***

III Übersicht bislang charakterisierter pflanzlicher Hexokinase-Aktivitäten

Arabidopsis thaliana: exprimiert in Hefe (Dai *et al.*, 1999)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
AtHxk1	44 µM	17 mM	-	-	-	-

Avocado: Mesokarp (Copeland und Tanner, 1988)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
HK	46±4 µM	120±30 µM	n.d.	140±20 µM	8,2	Zytosol

Dendrophthoe falcata: Blatt (Baijal und Sanwal, 1976)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
HK	140 µM	580 µM	190 µM	160 µM	8,5	-

Erbse: Samen (HxkI: Turner *et al.*, 1977; HxkII: Turner und Copeland, 1981)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
HxkI	70 µM	30 mM	500 µM	1 mM	8,2 (7,8-8,8)	-
HxkII	48 µM	10 mM	76 µM	86 µM	8,2 (7,5-9,5)	-

Erbse: Stängel (Tanner *et al.*, 1983)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
HK	76 µM	15,7 mM	71 µM	180 µM	8,2 (7,5-9,5)	Äußere Mitochondrienmembran

Erbse: Blatt (Dry *et al.*, 1983)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
HK	53 µM	5,1 mM	-	-	-	-

Kartoffel: Knolle (Renz und Stitt, 1993)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
HK1	41 µM	11 mM	52 µM	90 µM	7,4-8,2	-
HK2	130 µM	22 mM	290 µM	280 µM	7,8-9,2	-
HK3	35 µM	8,7 mM	38 µM	560 µM	-	-

Kartoffel: exprimiert in Hefe (Veramendi *et al.*, 1999)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
StHxk1	33 µM	1,5 mM	29 µM	103 µM	7,4-7,7	-

Mais: Samen (Cox und Dickinson, 1973)

Isoform	$K_m(\text{Glc})$	$K_m(\text{Fru})$	$K_m(\text{Man})$	$K_m(\text{ATP})$	pH-Optimum	Kompartiment
Endosperm	110-160 μM	150-170 μM	-	183 μM	-	-
Scutellum	110 μM	42-48 μM	-	-	-	-

Mais: Keimlingswurzel (Galina *et al.*, 1999)

Isoform	$K_m(\text{Glc})$	$K_m(\text{Fru})$	$K_m(\text{Man})$	$K_m(\text{ATP})$	pH-Optimum	Kompartiment
mtHK	80 \pm 2 μM	2-6 mM	-	-	-	Mitochondrienmembran

Mais: Keimlingswurzel (da-Silva *et al.*, 2001)

Isoform	$K_m(\text{Glc})$	$K_m(\text{Fru})$	$K_m(\text{Man})$	$K_m(\text{ATP})$	pH-Optimum	Kompartiment
1	80 \pm 2 μM	80 \pm 1 μM	-	-	-	Zytosol
NC-Hxk	60 \pm 1 μM	5,1 \pm 1 mM	-	50 \pm 1 μM	-	Mitochondrien-/ Golgi-Membran

Mais: Keimlingswurzel (Galina *et al.*, 1995)

Isoform	$K_m(\text{Glc})$	$K_m(\text{Fru})$	$K_m(\text{Man})$	$K_m(\text{ATP})$	pH-Optimum	Kompartiment
cytHK	49 \pm 25 μM	-	-	167 \pm 84 μM	-	Zytosol
mtHK	129 \pm 50 μM	-	-	156 \pm 56 μM	-	Mitochondrienmembran

Mais: Embryonen (Doehlert *et al.*, 1989)

Isoform	$K_m(\text{Glc})$	$K_m(\text{Fru})$	$K_m(\text{Man})$	$K_m(\text{ATP})$	pH-Optimum	Kompartiment
1	750 \pm 135 μM	-	-	182 \pm 4 μM	8-9	-
2	117 \pm 17 μM	-	-	66 \pm 9 μM	7-9	-

Reis: Embryonen (Guglielminetti *et al.*, 2000)

Isoform	$K_m(\text{Glc})$	$K_m(\text{Fru})$	$K_m(\text{Man})$	$K_m(\text{ATP})$	pH-Optimum	Kompartiment
GK1	<0,2 mM	-	-	-	-	-
GK2	<0,2 mM	-	-	-	-	-
GK3	4-7,5 mM	-	-	-	-	-
HK1	0,1-0,6 mM	ca. 5 mM	-	-	-	-
HK2	0,1-0,6 mM	ca. 5 mM	-	-	-	-

***Ricinus communis*: Endosperm (Miernyk und Dennis, 1983)**

Isoform	$K_m(\text{Glc})$	$K_m(\text{Fru})$	$K_m(\text{Man})$	$K_m(\text{ATP})$	pH-Optimum	Kompartiment
HK1	410 \pm 10 μM	-	-	70 \pm 10 μM	7,8	Äußere Mitochondrienmembran
HK2	2,9 \pm 0,7 mM	60 \pm 8 μM	-	290 \pm 40 μM	7,2	Stroma
HK3	240 \pm 10 μM	-	-	30 \pm 2 μM	7,8	Zytosol

Soja: Wurzelknolle (Copeland und Morell, 1985)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
HK	75±5 µM	2,5±0,1 mM	-	62±3 µM	8,2-8,9	Zytosol

Spinat: Blatt (Baldus *et al.*, 1981)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
HxkII	63 µM	9,1 mM	-	-	7,5-8,5	Zytosol
HxkIV	71 µM	210 µM	-	-	7,5-8,5	Zytosol

Spinat: Blatt (Schnarrenberger, 1990)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
Hxk1	150 µM	8 mM	18 µM	-	-	Zytosol
Hxk2	18 µM	15 mM	15 µM	-	-	Mitochondrien

Spinat: Blatt (Wiese *et al.*, 1999; Wiese, 2000)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
SoHxk1	24-35 µM	3,8±0,3 mM	21-23 µM	-	7,7-8,5	Äußere Plastiden- membran

Tabak: Blatt (Sindelarova und Sindelar, 1988)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
mtHK	26,8 µM	17,6 mM	-	-	7,9-9,1	Mitochondrien

Tabak: überexprimiert im *Source*-Blatt (diese Arbeit)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _{0,5} (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
Hxk1	33-36 µM	10-13 mM	42-46 µM	142-160 µM	7,6-≥9,2	Mitochondrien- membran
Hxk2	51-63 µM	13-27 mM	91-159 µM	547-668 µM	8,0-≥9,2	Stroma
Hxk3	29-33 µM	7-9 mM	24-27 µM	200-250 µM	7,6-≥9,2	Mitochondrien
Hxk4a	34-41 µM	2-3 mM	9-16 µM	26-41 µM	7,2-≥9,2	Mitochondrien
Hxk5	32-54 µM	2-3 mM	29-98 µM	7-14 µM	7,2-≥9,2	Mitochondrien
Hxk6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Mitochondrien

Tomate: junge Frucht (Martinez-Barajas und Randall, 1998)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
GK	62 µM	n.d.	630 µM	223 µM	7,5-8,5	-

Tomate: exprimiert in Hefe (Menu *et al.*, 2001)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
LeHxk2	21 µM	7,7 mM	38 µM	-	-	-

Tomate: Frucht (Dai *et al.*, 2002)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
LeHxk1	45 µM	26 mM	84 µM	89 µM	8,0	-
HXK2	93 µM	86 mM	37 µM	304 µM	8,0-9,0	-

Tomate: exprimiert in Hefe (Dai *et al.*, 2002)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
LeHxk1	77 µM	10,6 mM	100 µM	156 µM	-	-

Weizen: Keimling (Saltman, 1953)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
HK	440 µM	-	-	870 µM	8,0-10,5	Mitochondrien

Weizen: Keimling (Higgins und Easterby)

Isoform	K _m (Glc)	K _m (Fru)	K _m (Man)	K _m (ATP)	pH-Optimum	Kompartiment
L _{II}	960±60 µM	40±10 µM	940±10 µM	480±70 µM	-	-

IV Ergänzende Versuche in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen

IV.1 RNA-Interferenz von NtHxk2 und NtHxk6

Zur Überprüfung der Funktionen von NtHxk2 und NtHxk6 im Stoffwechsel wurden Plasmide zu ihrer Inhibition mittels RNA-Interferenz konstruiert. Von *NtHxk2* wurden die Nukleotide 284-664 amplifiziert, von *NtHxk6* die Nukleotide 574-980. Beide Fragmente wurden in entsprechenden Orientierungen in den *Gateway*-Vektor pK7GWIWG2(II) (Karimi *et al.*, 2005) zwischen CaMV 35S Promotor und Terminator transferiert. Damit wurden Tabak und Kartoffel (Varietät Solara) stabil transformiert.

IV.2 Doppeltransformationen mit zytosolischer Invertase

Wie die Messungen der Kohlenhydrate zeigten, hatte gesteigerte Hexokinase-Aktivität unter normalen Bedingungen keinen sichtbaren Einfluss auf die Pflanze und ihren Zuckerstoffwechsel. Nach Fütterung mit Glukose dagegen wurden Änderungen im Stärkegehalt offenbar, der bei NtHxk1 und NtHxk5 auf eine Kanalisierung von Glukose-6-phosphat in die Glykolyse bzw. Stärkesynthese hindeutete (s. 3.8.3.2). Für NtHxk2 wurde eine Rolle im Stärkeabbau spezifischer Gewebe postuliert, obwohl sie grundsätzlich auch am Aufbau beteiligt sein könnte. Um den Einfluss der genannten Isoformen zu überprüfen, wurden Kartoffeln (Varietät Solara) stabil mit den Plasmiden zur konstitutiven Überexpression von NtHxk1, 2 und 5 transformiert. Aufgrund der stärkehaltigen Knollen eignen sich Kartoffeln gut zur Untersuchung des Stärkestoffwechsels. Um die Mengen freier Glukose in den Knollen zu erhöhen, wurden die Pflanzen zusätzlich mit der im Zytosol lokalisierten Hefe-Invertase SUC2 unter Kontrolle des Patatin-Promotors B33 transformiert. Die gleiche Strategie wurde bereits mit der Glukokinase aus *Zymomonas mobilis* verfolgt und führte in den Knollen zu erhöhter Glykolyse auf Kosten des Stärkegehalts (Trethewey *et al.*, 1998).

Sofern NtHxk1 tatsächlich eine Kanalisierung von Glukose-6-phosphat in die Glykolyse bewirkt, ist diese vermutlich abhängig von Interaktionspartnern an der äußeren Mitochondrienmembran (Yamamoto *et al.*, 2000; Giegé *et al.*, 2003). Um diese These zu prüfen, wurde der mitochondriale Membrananker von NtHxk1 durch Deletion der Aminosäuren 1-32 entfernt (s. Abb. 66, Primer HK9_33_BamHI / S15).

NtHxk2 wurde mit dem NtHxk1-Membrananker NtHxk1N (s. 3.4.1.1) fusioniert, um sie statt ins Stroma an die äußere Mitochondrienmembran zu dirigieren (s. Abb. 66, Primer für

NtHxk2: HK10_2_EcoRI_5 / S6). Hierdurch soll überprüft werden, ob sie in einem ihr fremden Kompartiment einen anderen Einfluss auf den Stoffwechsel hat.

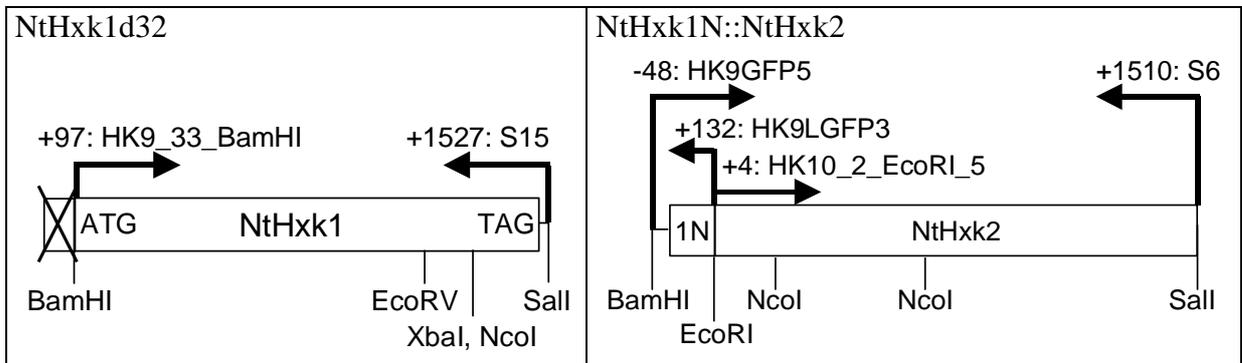


Abbildung 66: Maßstabgetreue Schemazeichnungen von NtHxk2d32 und NtHxk1N::NtHxk2 im Plasmid pBinAR. Mit Richtungspfeilen angegeben sind die verwendeten Primer samt Positionsangaben in Relation zum jeweiligen Translationsstart (s. Anhang, I.1). Außerdem eingezeichnet sind einige interne Schnittstellen der Konstrukte.

Publikationsliste

Publikationen

- 2005: J-O. Giese, K. Herbers, M. Hoffmann, R.B. Klösger, U. Sonnewald.
Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*.
FEBS Lett. 579(3): 827-831

Posterbeiträge

- 2000: J. Giese, T. Rutten, K. Herbers, U. Sonnewald.
Molecular Characterisation of the hexokinase gene family in *Nicotiana tabacum*.
Symposium "Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism". Potsdam, 04.-07.10.2000
- 2001: J. Giese, T. Rutten, K. Herbers, U. Sonnewald.
Molecular Characterisation of the hexokinase gene family in *Nicotiana tabacum*.
Tagung des Sonderforschungsbereich am 03.09.2001 in Halle.
- 2002 - J. Giese, T. Rutten, K. Herbers, U. Sonnewald.
Molecular Characterisation of the hexokinase gene family in *Nicotiana tabacum*.
15. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“, Wermelskirchen-Dabringhausen,
26.02.-01.03.2002

Patente

- 2001: J-O. Giese, U. Sonnewald.
Verfahren zur Erzeugung und Transformation von Mitochondrien-Konglomeraten.
Patentanmeldung DE 101 07 677.0, PCT/EP02/01737

Danksagung

Ich danke...

Herrn Prof. Dr. Uwe Sonnewald für die Überlassung des Themas, die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten und helfende Ratschläge in jeder noch so verfahrenen Situation.

allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Pflanzenphysiologie“ für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfen, wenn es alleine nicht mehr weiterging. Und für Süßigkeiten.

Anita Winger für die menschliche und technische Organisation des Labors, sowie technische Assistenz in Zeiten größter Not.

Dr. Karin Herbers für die Isolierung der ersten Isoformen.

Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen und Manuela Hoffmann von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Zusammenarbeit beim Chloroplastenimport-Experiment und die dadurch ermöglichte Publikation.

Andrea Knospe und Sibylle Freist für die Transformation und Pflege meiner Pflanzen.

stellvertretend für alle Mitarbeiter der Gärtnerei Martina Maier und Katrin Eikenroth für die Pflege meiner Pflanzen im Gewächshaus.

Dr. Twan Rutten, Bernhard Claus und Dr. Michael Melzer für die mikroskopischen Arbeiten.

Dr. Mohammad-Reza Hajirezaei, Dr. Frederik Börnke, Melanie Ruff, Dr. Twan Rutten und Dr. Henning Tschiersch dafür, meine Gedanken auch mal hemmungslos abseitig schweifen lassen zu dürfen.

meinen Eltern und Großeltern, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglichten und bei denen ich immer den Alltagsstress hinter mir lassen konnte.

meinem größten Schatz Kathrin Sadlowski, bei der ich mich immer wohlfühlte, auch wenn sonst alles trostlos war. Dieser Dank gebührt auch ihren Eltern Karin und Heinz.

Murphy's Law für den abgrundtief erschütternden Optimismus.

allen Beteiligten für ihre Geduld.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jens-Otto Konrad Giese
Geburtsdatum	25. Dezember 1972
Geburtsort	Köln
Eltern	Dr. med. Brigitte Giese, geb. Kottwitz Berthold Giese
Familienstand	ledig

Schulbildung

1979-1980	Grundschule Rheine
1980-1983	Grundschule Bad Bentheim
1983-1985	Orientierungsstufe Bad Bentheim
1985-1992	Burg-Gymnasium Bad Bentheim mit Abitur

Grundwehrdienst

01.07.1992-30.06.1993 Fürstenau und Lingen

Studium

WS 1993	Beginn des Studiums der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
19.10.1995	Vordiplom Biologie
27.06.1997	Mündliche Diplomprüfung im Hauptfach Biochemie und in den Nebenfächern Mikrobiologie und Chemie
August 1997-Juli 1998	Diplomarbeit am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Sonnewald unter Anleitung von Dr. Marcus Ebnet: Funktionelle Analyse des Promotors einer cytosolischen FBPase aus Kartoffel in transgenen Pflanzen
seit August 1998	Doktorand am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Sonnewald, Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass ich den Doktorgrad nicht besitze und mich auch früher nicht um den Doktorgrad beworben habe.

Gatersleben, im Mai 2005

Jens-Otto Giese

