

<b>1. Theoretische Einleitung</b> .....	2
1.1. Enzyme .....	2
1.2. Enzymkinetik .....	5
1.3. Hemmungsmechanismen bei Enzymen.....	7
1.3.1. Irreversible Hemmung.....	7
1.3.2. Reversible Hemmung.....	7
1.4. Regulation der Enzymaktivität.....	10
1.5. Funktionen von Phloem und Xylem .....	10
1.6. Transportvorgänge an Membranen.....	11
1.6.1. Passiver Transport.....	11
1.6.2. Aktiver Transport .....	12
1.7. Langstreckentransport in den Siebröhren.....	13
1.7.1. Symplastische Phloembeladung.....	14
1.7.2. Apoplastische Phloembeladung .....	15
1.7.3. Phloementladung .....	15
1.7.4. Die Druckstromtheorie.....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	17
2.1. Versuch 1: Bestimmung der Glucose-, Fructose- und Saccharose-Konzentration in Blättern der Kartoffel.....	17
2.2. Versuch 2: Stärkefärbung.....	18
<b>3. Ergebnisse</b> .....	18
3.1. Versuch 1.....	18
3.2. Versuch 2.....	20
<b>4. Diskussion</b> .....	20
4.1. Versuch 1.....	20
4.2. Versuch 2.....	21

# 1. Theoretische Einleitung

## 1.1. Enzyme

Unter Enzymen versteht man spezielle Proteine, die die Aufgaben von **Biokatalysatoren** erfüllen, das heißt, dass sie die für den Ablauf einer Reaktion nötige **Aktivierungsenergie** ( $E_A$ ) herabsetzen, ohne dass ihre chemische Struktur dabei verändert wird oder sie verbraucht werden. Durch Herabsetzen der Aktivierungsenergie können Bindungen bei den Körpertemperaturen der Organismen gespalten werden. Verglichen mit einer nicht katalysierten Reaktion steigt die Geschwindigkeit bei einer Reaktion, an der Biokatalysatoren beteiligt sind, an. Allerdings unterliegen sie den Gesetzen der **Thermodynamik**, sie können also nur freiwillig ablaufende (exergonische) Reaktionen katalysieren und die bereits vorliegende Gleichgewichtseinstellung beschleunigen.

Man unterscheidet je nach Bau und Struktur verschiedenen Arten von Enzymen:

- **Reine Proteine**, z.B. Urease, Pepsin oder Insulin
- **Proteide**: eine prosthetische (z.B. FAD, FADH<sub>2</sub>) Gruppe ist fest an das Protein gebunden, z.B. Cytochrome, Katalase
- **Holoenzyme**, die aus einem Proteinanteil (**Apoenzym**) und einem zusätzlichen **Coenzym** (bei fester Bindung) oder einem **Cosubstrat** (bei reversibler Bindung) bestehen. Im Gegensatz zum Cosubstrat, das bei der Reaktion verbraucht wird, bleibt das Coenzym bei der Reaktion erhalten, es wird nicht verbraucht. Man fasst Cosubstrat und Coenzym unter dem Begriff **Cofaktoren** zusammen. Diese Cofaktoren sind von großer Wichtigkeit, da sie als Überträger von Reduktionsäquivalenten oder anderen Atomgruppen dienen können. So liefern sie die für die Reaktion benötigte Energie in Form von ATP, NAD<sup>+</sup> oder auch NADP<sup>+</sup> und sind zudem meist von mehreren Enzymarten nutzbar. Die meisten der Cofaktoren sind anorganische Moleküle (z.B. Vitamine), aber auch anorganische Metallionen (z.B. Mg<sup>2+</sup> oder Ca<sup>2+</sup>) können als Cofaktoren wirken.

Man kann Enzyme aber auch nach den von ihnen katalysierten Reaktionen unterscheiden. Dabei ergeben sich 6 große Gruppen, die mit sogenannten **EC-Nummern** versehen wurden:

- 1.Oxidoreduktasen:** Katalyse von Redoxprozessen (z.B. Alkohol-Dehydrogenase)
- 2.Transferasen:** Katalyse von Gruppenübertragungsprozessen (z.B. Transaminase, Proteinkinasen )

- 3. Hydrolasen:** Katalyse von Hydrolisationsprozessen (z.B. Maltase, Peptidase)
- 4. Lyasen:** Abbau oder Spaltung von Molekülen (z.B. DNA-Ligase)
- 5. Isomerasen:** Katalyse der Überführung von speziellen Verbindungen in deren Spiegelbild-Isomere (z.B. Glucose-Isomerase)
- 6. Ligasen:** Zusammensetzung bestimmter Moleküle (z.B. Acetyl-CoA-Carboxylase)

Möglich wird diese Einteilung durch eine charakteristische Eigenschaft der Enzyme, nämlich ihre hohe **Spezifität**:

Jedes Enzym zeichnet sich durch ein typisch geformtes **aktives oder katalytisches Zentrum** aus. Dieses Zentrum befindet sich in einer wasserfreien, hydrophoben Tasche (Substratbindungstasche). Es verleiht dem Enzym seine Spezifität bei der Einwirkung auf ein bestimmtes Substratmolekül (Reaktand), da Substrat und aktives Zentrum nach dem **Schlüssel-Schloss-Prinzip** zusammenpassen müssen. Man spricht in diesem Fall von **Substratspezifität**. Diese Spezifität kann sich aber auch auf eine Gruppe ähnlich gebauter Moleküle beziehen, man spricht dann von **Gruppenspezifität**.

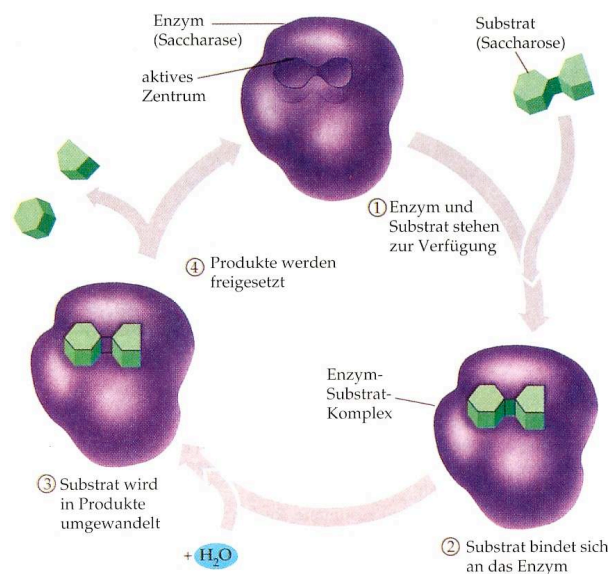


Abb.1: Katalysezyklus eines Enzyms (Campbell, Biologie, S. 108, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Jedes Enzym besitzt also nur für bestimmte Substrate oder Substratgruppen eine Affinität und kann auch nur ganz bestimmte Reaktionen katalysieren (**Reaktionsspezifität**). Wenn ein aktives Zentrum an ein Substrat bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms (**induced fit**), Enzym und Substrat passen dann zusammen wie zwei Hände bei einem „Händedruck“.

Allerdings gibt es auch Enzyme, die zwar eine unterschiedliche Struktur, aber die gleiche Substrat- und Wirksamkeit besitzen. Die strukturellen Unterschiede dieser sog. **Isoenzyme** sind sehr gering, sie werden aber trotzdem durch unterschiedliche Gene, bzw. unterschiedlich prozessierte mRNA codiert. Außerdem unterscheiden sich die Isoenzyme meist in ihren physikalischen Eigenschaften, wie z.B. ihrem pH- oder Temperaturoptimum, ihrer Hitzestabilität, kinetischen Parametern und regulatorischen Eigenschaften.

In manchen Fällen sind Enzyme, die verschiedene Schritte des gleichen Stoffwechselprozesses katalysieren, zu einem Komplex vereinigt. Dieser Proteinkomplex besitzt mehrere aktive Zentren, an denen die einzelnen Teilreaktionen ablaufen, wobei die Anordnung der Enzyme der Reihenfolge der Reaktionen entspricht. Das Produkt eines Enzyms kann dem nächsten Enzym sofort als Substrat dienen, wodurch sehr viel Zeit eingespart wird. Man nennt einen solchen Komplex **Multienzymkomplex**. Beispiele für einen Multienzymkomplex sind der Photosynthesekomplex, die Synthese von Fettsäuren oder der Atmungskomplex der Mitochondrien.

Neben den katalytischen Proteinen, den Enzymen, gibt es auch eine andere Klasse biologischer Katalysatoren, die **Ribozyme**. Hierbei handelt es sich um katalytisch wirksame Ribonukleinsäuren. Wie bei den Enzymen hängt auch bei diesen ihre Wirkweise mit ihrer Struktur zusammen. Sie katalysieren Reaktionen, wie z.B. das RNA-Splicing beim der RNA-Prozessierung.

Die Leistungsfähigkeit eines Enzyms ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Temperatur und dem pH-Wert.

Jedes Enzym besitzt ein **pH-Optimum**, das heißt, einen pH-Wert, bei dem es optimal arbeiten kann. Dieser ist von Enzym zu Enzym verschieden und begründet sich auf pH-abhängige Dissoziationen funktioneller Gruppen im aktiven Zentrum oder am Substrat. Bei den meisten Enzymen liegt dieses Optimum ungefähr bei pH 7, bei Enzymen im sauren oder im alkalischen Milieu ist es in die jeweilige Richtung verschoben (z.B. bei Pepsin: pH 2, bei Trypsin: pH 8).

Die **Temperaturabhängigkeit** von Enzymen lässt sich durch die von van't Hoff entwickelte **RGT- Regel** (Reaktions-Geschwindigkeits-Regel) beschreiben. Sie besagt, dass ein Temperaturanstieg von 10°C zu einer Verdopplung bis Vervierfachung der Enzymaktivität führt. Diese Regel gilt allerdings nur in einem bestimmten Bereich. Steigen die Temperaturen über 40°C werden die meisten Proteine denaturiert und verlieren ihre Aktivität. Nur sehr wenige Organismen, wie z.B. *Thermus aquaticus* besitzen Enzyme, die auch bei höheren Temperaturen noch aktiv sind.

## 1.2 Enzymkinetik

Chemische Reaktionen können auf katalysiertem und auf unkatalysiertem Wege ablaufen. Der Unterschied liegt darin, dass es oft erforderlich ist, die Aktivierungsenergie für die chemischen Reaktionen herabzusetzen. Dies geschieht durch spezielle Enzyme, sogenannte Katalysatoren, die die nötige Energie zuführen, um den Übergangszustand (energiereiche Zwischenstufe) zu erreichen.

Der Ablauf dieser beiden Reaktionstypen ist in folgender Abbildung dargestellt:

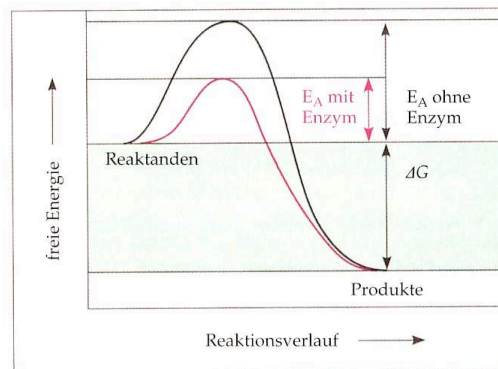


Abb.2: Herabsetzung der Aktivierungsenergiebarriere bei Enzymen (Campbell, Biologie, S. 106, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Die vom Katalysator benötigte Energie steckt in der Substratbindung. Sie wird freigesetzt, wenn das Substrat mit dem Katalysator einen Enzym-Substrat-Komplex (ES) einget.

Der erste Schritt der enzymkatalysierten Reaktion ist die Entstehung des Enzym-Substrat-Komplexes. Dieser wird auch als **Michaelis-Komplex** (nach Michaelis, 1913) bezeichnet. Der Komplex kann auf zwei Arten weiterreagieren. Zum einen kann er wieder in seine Bestandteile Enzym und Substrat zerfallen, zum anderen sind weitere Reaktionen hin zur Produktbildung möglich. Die Art und Weise der weiteren Reaktion ist stark von der Affinität des Enzyms zu seinem Substrat abhängig.

Zur mathematischen Beschreibung der Kinetik enzymatischer Umsetzungen wird die **Michaelis-Menten-Gleichung** verwendet:

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

- $v_0$  = anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit bei der Substratkonzentration [S]  
 $v_{\max}$  = Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Überschuss an Substrat  
 $K_M$  = Michaelis-Konstante  
[S] = Substratkonzentration

Die **Michaelis-Konstante ( $K_M$ )** ist enzyme-spezifisch und hat die Einheit mol/l. Sie gibt Auskunft über die Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit ( $1/2 v_{\max}$ ), wobei die maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) die Reaktionsgeschwindigkeit bei Enzymsättigung ist. Eine Enzymsättigung liegt vor, wenn alle Enzyme in einem ES-Komplex gebunden sind.

Die Wechselzahl  $k_{\text{kat}}$  (turnover number, in 1/s) gibt Auskunft darüber, wie viele Substratmoleküle vom Enzym pro Zeiteinheit umgesetzt werden. Sie ist folglich indirekt ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat.

Um die kinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $K_M$  besser ablesen zu können, wird die Michaelis-Menten-Gleichung linearisiert und nach **Lineweaver-Burk** dargestellt:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Hierbei wird der reziproke Wert der Reaktionsgeschwindigkeit  $1/v_0$  gegen den reziproken Wert der Substratkonzentration  $1/[S]$  aufgetragen. Die resultierende Gerade mit der Steigung  $\frac{K_M}{v_{\max}}$  hat zwei Schnittpunkte; es ist jetzt möglich,  $K_M$  als Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse, und  $v_{\max}$  als Schnittpunkt mit der x-Achse abzulesen.

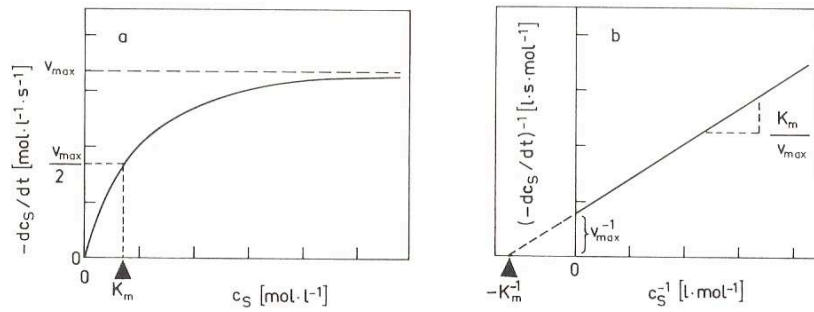


Abb.3: Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk- Diagramm

(a) Michaelis-Menten-Diagramm: hyperbolische Sättigungskurve

(b) Lineweaver-Burk-Diagramm: Gerade

(aus: Schopfer / Brennicke, Pflanzenphysiologie, S.66, 5. Auflage, 1999, Springer-Verlag)

Die international festgelegte Standardeinheit für die Umsatzgeschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen ist das **Katal (kat)**. Es beschreibt den Umsatz von 1mol Substrat pro 1Sekunde Zeiteinheit.

Oft wird auch das **Unit (U)** verwendet, das eine Umsatzrate von 1 mol pro Minute bedeutet.

### 1.3 Hemmungsmechanismen bei Enzymen

Die Enzymhemmung durch sog. **Inhibitoren** kann **reversibel** (Bindung an das Enzym über schwache Wechselwirkungen) oder **irreversibel** (kovalente Bindung an das Enzym) sein.

#### 1.3.1 Irreversible Hemmung

Der Inhibitor bindet kovalent an das katalytische Zentrum des Enzyms. Es ist in seiner Funktion irreversibel gestört und kann kein Substrat mehr umsetzen, da der Enzym-Substrat-Komplex nicht mehr gebildet werden kann. Typische Inhibitoren sind Enzymgifte wie beispielsweise Quecksilber- oder organische Phosphorverbindungen.

#### 1.3.2 Reversible Hemmung

Der Hemmstoff bindet nicht-kovalent und kann somit wieder vom Enzym entfernt werden. Diese Hemmung reguliert das Maß, in dem Reaktionen enzymatisch katalysiert werden. Es gibt drei Arten der reversiblen Hemmung: die kompetitive, die nicht-kompetitive und die unkompetitive Hemmung.

### - **Kompetitive Hemmung**

Bei dieser Art der reversiblen Hemmung konkurrieren die Inhibitoren (Kompetitoren, Substratanaloga) mit dem Substrat um die Bindungsstelle am aktiven Zentrum des Enzyms. Dies ist möglich, da der Inhibitor eine substratähnliche Struktur und Ladungsverteilung besitzt. Die aktiven Zentren sind folglich schon besetzt, und weniger „richtiges“ Substrat kann umgesetzt werden. Je mehr aktive Zentren von dem „falschen“ Substrat besetzt sind, desto weniger „richtiges“ Substrat kann an die Enzymmoleküle binden. Diese Hemmung kann durch eine Erhöhung der Substratkonzentration aufgehoben werden.

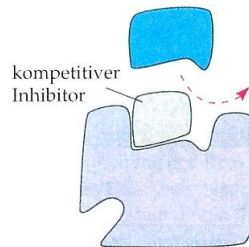


Abb.4: Kompetitive Enzymhemmung (Campbell, Biologie, S. 110, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Die kompetitive Hemmung lässt die erste Ableitung der Lineweaver-Burk-Gleichung wachsen, dies hat eine größere Steigung der Geraden zur Folge. Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von  $[S]$  nimmt folglich umso stärker ab, je mehr Inhibitor vorhanden ist. Dennoch bleibt der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse unverändert. Grund hierfür ist, dass  $v_{max}$  bei dieser Art der Hemmung unverändert bleibt, jedoch eine höhere Substratkonzentration nötig ist, um  $v_{max}$  zu erreichen. Der zweite Schnittpunkt, der sich auf der x-Achse befindet, wird in Richtung y-Achse nach rechts verschoben. Grund hierfür ist, dass bei Anwesenheit eines Inhibitors mehr Substrat nötig ist, um eine bestimmte Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen.



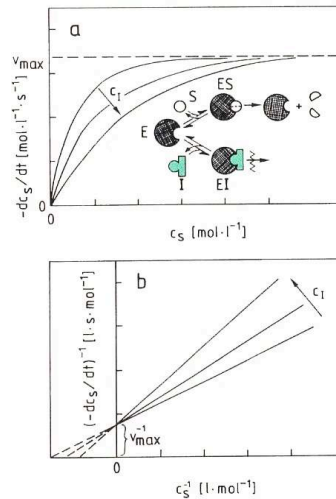


Abb.5: Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramm der kompetitiven Enzymhemmung

(a) Michaelis-Menten-Diagramm

(b) Lineweaver-Burk-Diagramm

(aus: Schopfer / Brennicke, Pflanzenphysiologie, S.67, 5. Auflage, 1999, Springer-Verlag)

### - Unkompetitive Hemmung

Der Inhibitor bindet an den bereits gebildeten Enzym-Substrat-Komplex und nicht wie oben an das freie Enzym. Der Enzym-Substrat-Komplex wird dadurch inaktiviert. Die Bindungsstelle des Inhibitors muss also nicht im Bereich des aktiven Zentrums liegen.

### - Nicht-kompetitive (allosterische) Hemmung

Diese Hemmung wird durch Substanzen verursacht, die mit Enzymabschnitten außerhalb des aktiven Zentrums reagieren. Durch die Bindung des Inhibitors an das allosterische Zentrum (entspricht **nicht** dem aktiven Zentrum), tritt eine Veränderung des Enzyms in seiner räumlichen Struktur und seiner Ladungsverteilung ein. Folglich ist die Bindung des Substrats an das aktive Zentrum erschwert bzw. unmöglich geworden.

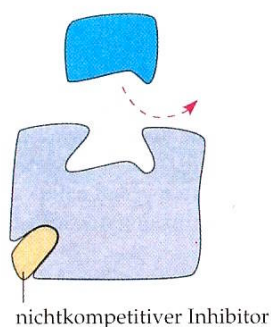


Abb.6: Nicht-kompetitive Enzymhemmung (Campbell, Biologie, S. 110, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Eine Erhöhung der Substratkonzentration hat keinerlei Einfluss, die Hemmung kann nur durch Verdünnung oder Beseitigung des Hemmstoffs aufgehoben werden.

Bei allosterischen Effektoren handelt es sich nicht immer um Inhibitoren, sondern zum Teil auch um Aktivatoren. Die Aktivatoren stimulieren die aktive Form des Enzyms und erleichtern so die Substratbindung.

## 1.4 Regulation der Enzymaktivität

Die verschiedenen Arten der Enzymhemmung sind ein wichtiger Bestandteil des Organismus zur Regulation der Enzymaktivität.

Zur Regulation der Enzymaktivität gibt es verschiedene Mechanismen:

- **Allosterische Hemmung bzw. Stimulation:** wie oben bereits erwähnt, befinden sich vom aktiven Zentrum entfernt allosterische Zentren (spezifische Bindungsstellen für Enzymregulatoren, die sog. allosterischen Effektoren, bei denen es sich um Inhibitoren oder Aktivatoren handeln kann); bindet ein Inhibitor an das allosterische Zentrum, wird die Enzymaktivität vermindert bzw. gehemmt, bindet ein Aktivator an das allosterische Zentrum, kommt es zur Stimulation bzw. Erhöhung der enzymatischen Aktivität
- **Endprodukt-Repression (Feedback-Hemmung):** ein Stoffwechselweg wird durch ein Produkt abgeschaltet, indem dieses als Inhibitor auf ein Enzym des Weges einwirkt
- **Feedforward-Stimulierungen:** die Enzymaktivität wird durch das Produkt einer vorgeschalteten Reaktion angeregt
- **Interkonversion:** das Enzym wird kovalent modifiziert, z.B. durch Phosphorylierungen oder Sulfurylierungen; diese Art der Regulation kann sowohl aktivierend als auch inaktivierend sein.

## 1.5 Funktionen von Phloem und Xylem

- **Phloem:** Die Hauptfunktion des Phloems liegt im Transport von Assimilaten und organischen Nährstoffen. Bei Pteridophyten und Gymnospermen besteht das Phloem aus Siebzellen, bei den Angiospermen aus Siebröhren und Geleitzellen.
- **Xylem:** Die wichtigste Aufgabe des Xylems liegt im Transport von Wasser und darin gelösten Ionen. Während das Xylem bei Pteridophyten und Gymnospermen nur aus Tracheiden besteht, setzt es sich bei Angiospermen aus Tracheiden und Tracheen zusammen.

Während der Transport im Xylem in einheitlicher Richtung abläuft, sind die Transportrichtungen in den Siebröhren variabel.

## 1.6 Transportvorgänge an Membranen

Der Transport eines Stoffes durch eine Membran kann auf passivem oder aktivem Weg erfolgen. Aus diesem Grund unterscheidet man zwischen passivem und aktivem Transport.

### 1.6.1 Passiver Transport

Der passive Transport lässt sich in die Diffusion und die erleichterte Diffusion untergliedern.

- **Diffusion:** Unter Diffusion versteht man einen Konzentrationsausgleich, bei dem sich die Teilchen im gesamten zur Verfügung stehenden Raum ausbreiten. Verschiedene Stoffe mit unterschiedlicher Konzentration vermischen sich und werden im Raum gleichmäßig verteilt.

Die Diffusion erfolgt stets vom Ort der höheren zum Ort der niedrigeren Konzentration, das bedeutet, die Teilchen wandern immer entlang des Konzentrationsgradienten

- **Erleichterte Diffusion:** Bei größeren Molekülen und bei geladenen Teilchen kann der Membrantransport nur mit Hilfe von Kanälen erfolgen. Die Kanäle sind Tunnelproteine, die in der Membran liegen und einen hydrophilen Weg durch den hydrophoben Innenbereich der Membran bilden. Die erleichterte Diffusion ist aber trotz des Transports mit Hilfe von Tunnelproteinen eine Form des passiven Transports, da die gelösten Stoffen ihrem Konzentrationsgefälle folgen.

Die Tunnelproteine weisen einige Gemeinsamkeiten mit Enzymen auf: vergleichbar mit der Substratspezifität eines Enzyms sind auch die Transportproteine auf bestimmte Substanzen spezialisiert; ebenso weisen sie auch eine spezielle Bindungsstelle für die gelösten Stoffe auf (vergleichbar mit dem aktiven Zentrum des Enzyms). Außerdem können auch Tunnelproteine abgesättigt und durch bestimmte Moleküle, die dem normalen Substratmolekül ähneln, gehemmt werden.

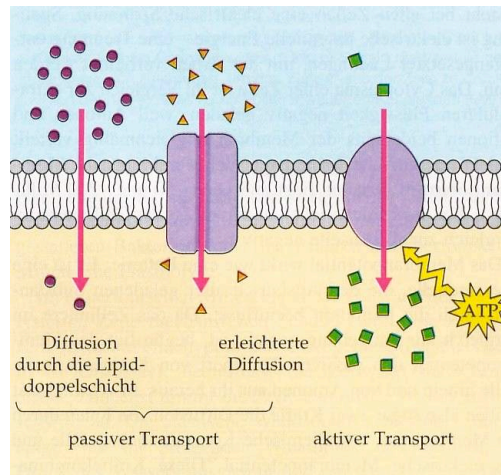


Abb.7: Vergleich zwischen aktivem und passivem Transport (Campbell, Biologie, S. 166, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

### 1.6.2 Aktiver Transport

Unter aktivem Transport versteht man das Pumpen eines gelösten Stoffes entgegen seinem Konzentrationsgefälle.

Da der Transport entgegen dem Konzentrationsgefälle erfolgt, ist Energie nötig. Die benötigte Energie stammt dabei aus dem Stoffwechsel der Zelle.

Die Arbeit des aktiven Transports wird von spezifischen Proteinen, den sog. *Carrier*-Proteinen, die in die Membran eingelagert sind, geleistet.

Bei den meisten aktiven Transportvorgängen stammt die benötigte Energie aus dem ATP. Dabei wird die endständige Phosphatgruppe direkt auf den *Carrier* übertragen; dadurch wird seine freie Energie erhöht und er verändert seine Konformation so, dass ein gebundenes Molekül durch die Membran befördert werden kann.

Ein Beispiel für den **sekundär aktiven Transport** ist die Aufnahme von Zuckern durch den Saccharose-/  $H^+$ - Cotransporter.

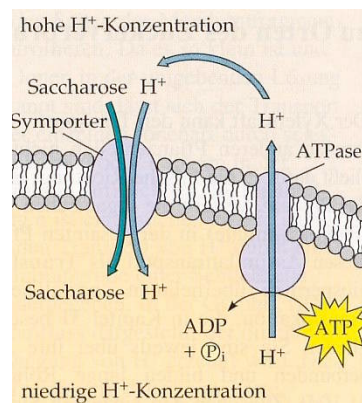


Abb.8: Saccharose-/  $H^+$ - Cotransporter (Campbell, Biologie, S. 776, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Eine ATP- getriebene Protonenpumpe speichert Energie, indem sie  $H^+$  auf einer Seite der Membran anhäuft. Wandern die Protonen anschließend über spezifische Transportproteine passiv durch die Membran zurück, nehmen sie Saccharosemoleküle mit (Beispiel für einen Symport).

Die membrangebundene Protonenpumpe führt also indirekt durch den Cotransport von  $H^+$  und Saccharose zu einer Anhäufung von Zucker in einer Pflanzenzelle.

## 1.7 Langstreckentransport in den Siebröhren

In den Siebröhren werden die Photoassimilate immer von den Zuckerquellen zu den Orten des Verbrauchs transportiert. Die Richtung und quantitative Aufteilung des Assimilatstroms ist nicht konstant, sondern unterliegt einer bedarfsabhängigen Regulation.

Unter Zuckerquellen (**sources**) versteht man Pflanzenorgane, in denen Zucker entweder durch Photosynthese oder durch den Abbau von Stärke gewonnen wird. In der Regel gehören die Blätter einer Pflanze zu den *sources*.

Bei der **Photoassimilatverteilung** werden aus den exportierenden Blättern die Photosyntheseprodukte meist auf mehrere Empfängerorgane (*sinks*) verteilt. Unter **sinks** (Abflüssen) versteht man Orte des Zuckerverbrauchs, an denen Zucker verwertet oder gespeichert wird. Zu den Zucker verbrauchenden Orten zählen im Wachstum befindliche Wurzeln, Sprossachsen und Früchte ebenso wie nicht-grüne Stengel oder Stämmen. Bei Speicherorganen wie Sprossen, Knollen oder Zwiebeln kann es sich sowohl um eine Zuckerquelle als auch um einen Ort des Zuckerverbrauchs handeln.

Als gutes Beispiel für eine **source-sink-Umstellung** kann die Kartoffel genannt werden. Bei Austreiben des Sprosses findet der Assimilattransport von der Knolle (*source*) in den Spross

(*sink*) statt, bis dieser Blätter ausgebildet hat, die Assimilate produzieren können. Daraufhin werden die Blätter selbst zu *sources*, von denen ein Stofftransport in Blüten, Früchte und sich entwickelnde Knollen (*sinks*) führt.

Die Beladung des Phloems kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen, die symplastische und die apoplastische Phloembeladung.

### 1.7.1 Symplastische Phloembeladung

Die symplastische Phloembeladung findet in den meisten Holzpflanzen. Der Transport von Saccharose erfolgt hier von den Mesophyllzellen bis in die Siebröhren über die plasmatischen Kanäle der Plasmodesmen.

Bei der symplastischen Phloembeladung tritt das Problem auf, dass ein Saccharosetransport entgegen dem Konzentrationsgradienten hier nicht möglich ist, da die Plasmodesmen keine Pumpeigenschaften besitzen. Dieses Problem kann aber umgangen werden, wenn der symplastische Transport ausschließlich an Stellen stattfindet, an denen die exportierenden Mesophyllzellen eine höhere Saccharosekonzentration aufweisen als das zu beladende Phloem und so eine Art Transportsog entsteht.

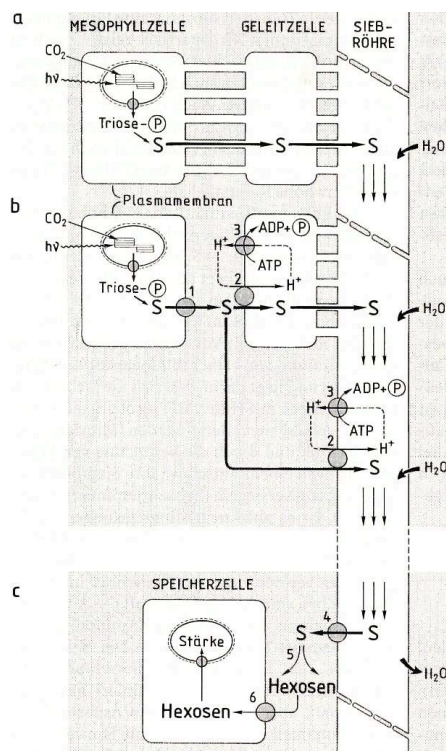


Abb.9: Transportwege der Saccharose bei Be- und Entladung des Phloems

- (a) Symplastische Phloembeladung
- (b) Apoplastische Phloembeladung
- (c) Ein Weg der apoplastischen Entladung

(aus: Schopfer / Brennicke, Pflanzenphysiologie, S.532, 5. Auflage, 1999, Springer-Verlag)

### 1.7.2 Apoplastische Phloembeladung

Den Weg der apoplastischen Phloembeladung findet man hauptsächlich in Familien mit krautigen Pflanzen, z.B. bei Brassicaceae oder Fabaceae. Diese Pflanzen weisen eine geringe Plasmodesmendichte zwischen Mesophyll und Phloem auf.

In diesem Fall sezerniert die Saccharose zwischen Mesophyll und Siebröhren in den Apoplasten und wird anschließend wieder in den Symplasten aufgenommen.

Durch die Plasmamembran der aufnehmenden Phloemzellen findet ein aktiver Transport entgegen dem Konzentrationsgradienten statt. In der Membran befindet sich ein aktives Saccharoseaufnahmesystem, der **Saccharose-/H<sup>+</sup>- Cotransporter** und eine H<sup>+</sup>-ATPase als Protonenpumpe.

Bei der apoplastischen Phloembeladung wird die Saccharose zunächst von den Mesophyllzellen über einen Saccharosetransporter in den Apoplasten sezerniert und von dort über den Saccharose-/H<sup>+</sup>- Cotransport in den Symplasten des Siebröhren-Geleitzellen-Komplexes aufgenommen. Der Cotransporter kann in den Geleitzellen und / oder in den Siebröhren lokalisiert sein.

Die Energie für diesen sekundären aktiven Transport stammt aus dem von einer H<sup>+</sup>-ATPase erzeugten Protonengradienten.

### 1.7.3 Phloementladung

Die Entladung des Phloems kann sowohl symplastisch über die Plasmodesmen als auch apoplastisch über Saccharose- oder Hexosetransporter (siehe Abb.7c) erfolgen.

Beim 1. Weg der apoplastischen Phloementladung wird die Saccharose in den Apoplast abgegeben und (z.B. vom Embryo) über einen Saccharose-/H<sup>+</sup>-Cotransporter aufgenommen.

Beim 2. Weg der apoplastischen Phloementladung wird die Saccharose ebenfalls in den Apoplasten abgegeben und dort durch eine Invertase in Hexosen (Glucose und Fructose) aufgespalten. In dieser Form werden die Hexosen über einen Hexosetransporter in die *sink*-Zellen aufgenommen.

### 1.7.4 Die Druckstromtheorie

Der Saft der Siebröhren wird mit Hilfe des Massenstroms, der auf Druckunterschieden beruht, bewegt.

Bei Beladung des Phloems entsteht in der Siebröhre eine an löslichen Stoffen hypertoniische Lösung. Aus osmotischen Gründen strömt Wasser in die Siebröhren nach (um die hypertoniische Lösung zu „verdünnen“). In der Siebröhre entsteht so ein hydrostatischer Druck, der in der Nähe der Zuckerquelle am höchsten ist. In der Nähe der *sinks* wird das

Wasser wieder abgegeben, der hydrostatische Druck ist dort am niedrigsten.

Die Wasserabgabe kommt dadurch zustande, dass außerhalb der Siebröhre das Wasserpotential auf Grund des Saccharoseaustritts abnimmt.

Dadurch, dass am *source*- Ende Druck aufgebaut wird, der zum *sink*- Ende hin abnimmt, kann das Wasser von der Quelle zum Verbrauchsort fließen und dabei den Zucker mitführen.

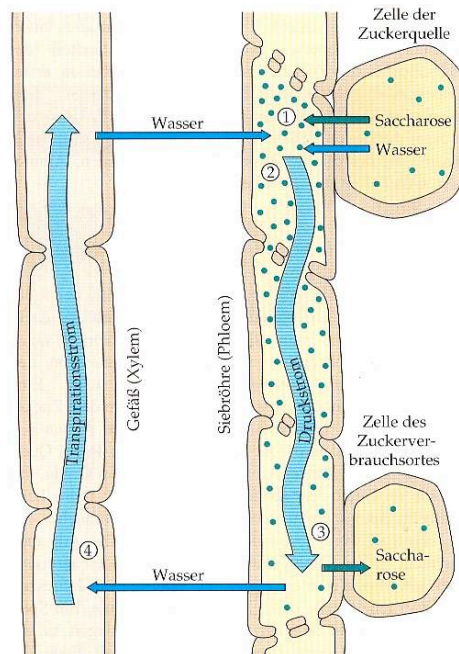


Abb.10: Druckstrom in einer Siebröhre (Campbell, Biologie, S. 776, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum-Verlag)

Der Rücktransport des Wassers von den *sinks* zu den *sources* erfolgt mit Hilfe des Xylems (Transpirationsstrom).



## 2. Material und Methoden

Für unseren Versuch haben wir Blätter von Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*, Varietät Désirée) verwendet. Wir hatten Blätter von Wildtyppflanzen und von SUT1-antisense Pflanzen,  $\square$ -SP34 und  $\square$ -SP5, deren Saccharose-Transporter in verschiedener Stärke gehemmt sind (Saccharosetransporter-Antisense-Pflanzen).

### 2.1 Versuch 1: Bestimmung der Glucose-, Fructose- und Saccharose-Konzentration in Blättern der Kartoffel

Das Prinzip der Zuckerbestimmung beruht darauf, dass reduzierte und nicht-reduzierte Nicotinamid-Moleküle unterschiedliche Absorptionsmaxima zeigen, die reduzierten Moleküle (NADH, NADPH) haben ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340nm.

Wir haben je ca. 50mg Frischgewicht der Blätter von der Wildtyp- und den Saccharosetransporter-Antisense-Pflanzen in 0,5ml Ethanol (80%) bei 70°C 30min lang extrahiert. Von diesen Extrakten haben wir je 10 $\mu$ l mit je 590 $\mu$ l Carbopuffer (100mM Imidazol HCl pH 6,9; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM NADP; 1mM ATP; 2units/ml Glucose-6-P-Dehydrogenase) gemischt (pro Pflanze zwei Proben zur Doppelbestimmung).

Zum Erstellen einer Glucose-Konzentration-Eichgerade haben wir einen Ansatz ohne Extrakt und Doppelproben mit einer Glucosestandardlösung (2mM) angesetzt. Je 20, 40, 60, 80 und 100 $\mu$ l der Glucosevergleichslösung sowie 20 $\mu$ l einer Glukoselösung mit unbekannter Konzentration wurde mit Carbopuffer auf 600 $\mu$ l aufgefüllt. Nachdem wir die Ansätze geschüttelt haben, haben wir die OD aller Proben bei 340nm bestimmt und als Nullwert registriert (E1).

Zu den Kartoffel-Proben haben wir 2 $\mu$ l Hexokinase (entspricht 0,5 units) gegeben und nach 15min Reaktionszeit bei 340nm photometriert. Unter der Einwirkung der Hexokinase wurde die in den Blättern enthaltene Glucose unter ATP-Verbrauch zu Glukose-6-P und ADP. Die Glukose-6-P wurde unter der Einwirkung der im Carbopuffer enthaltenen Glucose-6-P-Dehydrogenase mit NADP zu Gluconat-6-P und NADPH+H<sup>+</sup> umgesetzt. Die Zunahme von NADPH+H<sup>+</sup> kann dann durch eine Zunahme der Absorption bei 340nm gemessen werden (E2). Durch Berechnen der Differenz zwischen den beiden Extinktionswerten (E2-E1= $\square$ E1) kann die Glucosekonzentration mit Hilfe der Eichgeraden berechnet werden.

Dann haben wir 2 $\mu$ l Phosphoglucosomerase (entspricht 2 units) zu jeder Probe gegeben, wieder nach einer Reaktionszeit von 15min die OD bei 340nm bestimmt (E3) und die Differenz als Maß für die Fructosekonzentration errechnet (E3-E2= $\square$ E2). Die in den Blättern enthaltene Fructose-6-P wurde durch die Phosphoglucosomerase in Glucose-6-P umgewandelt, die dann wieder mit der im Puffer enthaltenen Glucose-6-P-Dehydrogenase reagiert hat, etc.

Dann haben wir 2 ml Invertase (entspricht 20 units) zu den Proben gegeben und sind wie oben fortgefahren. Die Messung der OD (E4) kann als Maß für die Saccharosekonzentration in den Blättern ( $E4 - E3 = \Delta E3$ ) verwendet werden.

Die Saccharose- und Fructosekonzentration werden als Glucoseäquivalente angegeben.

## 2.2 Versuch 2: Stärkefärbung

Die in den Blättern der Kartoffel als Energiespeicher enthaltene Stärke ist ein Zuckerpolymer, das sich aus Amylose und Amylopektin zusammensetzt. Aus deren Konformation ergibt sich für Stärkemoleküle eine typisch helicale Anordnung, in die sich Jodmoleküle einlagern können, was zu einer schwarzblauen Färbung führt.

Wir haben Blätter der Wildtyp- und der Antisensepflanzen, die im Dunkeln standen in Falcon-Röhrchen gegeben und 30min in 80% Ethanol bei 70°C im Wasserbad entfärbt. Dann haben wir die Blätter in Petrischalen gegeben und 20min lang in Lugol'scher Lösung inkubiert. Dann haben wir die Blätter kurz mit Wasser gewaschen und die Stärkefärbung ausgewertet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Versuch 1

In diesem Versuch wurden die Extinktionen der verschiedenen Blattextrakte gemessen und damit die Glucose-, Fructose- und Saccharose- Konzentrationen in den Extrakten bestimmt.

Tab.1: Ergebnisse Versuch 1

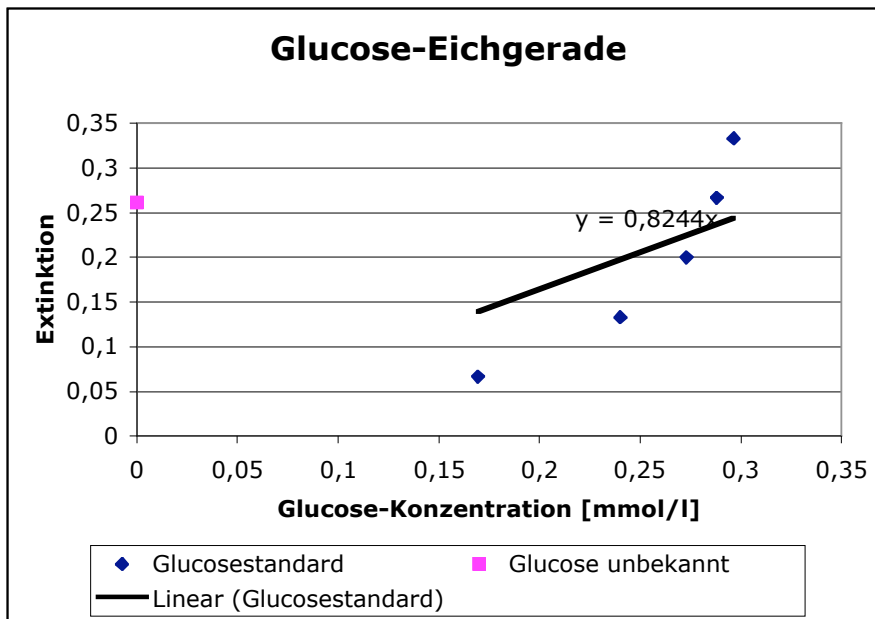
Probenbezeichnung	E1	$\bar{E}1$	E2	$\bar{E}2$	$E2 - E1 = \Delta E1$	E3	$\bar{E}3$
Wildtyp	0,107	0,102	0,115	0,1095	0,0075	0,12	0,118
Wildtyp	0,097		0,104			0,116	
a-SP 34	0,125	0,099	0,152	0,118	0,019	0,169	0,1545
a-SP 34	0,073		0,084			0,104	
a-SP 5	0,094	0,0885	0,114	0,1095	0,021	0,118	0,114
a-SP 5	0,083		0,105			0,11	

E3-E2= $\square$ E2	E4	$\varnothing$ E4	E4-E3= $\square$ E3
0,0085	0,24	0,2655	0,1475
	0,291		
1,0185	0,3	0,3055	0,169
	0,311		
0,0045	0,309	0,307	0,193
	0,305		

$\square$ E1=Glucose,  $\square$ E2=Fructose,  $\square$ E3=Saccharose

Mit einer bekannten Glucosestandard-Lösung wurde eine Eichgerade aufgestellt, mit Hilfe derer die Glucose-Konzentrationen der Extrakte ermittelt werden können.

Diagramm 1: Glucose-Eichgerade



Aus der Geradengleichung der Eichgerade in Diagramm 1 lässt sich die Konzentration der unbekanntes Glucoselösung ausrechnen: sie beträgt 0,31 mmol/l, das entspricht in den eingesetzten 20  $\square$ l einer Menge von  $1,86 \cdot 10^{-4}$  mmol, also einer Konzentration von 9,3 mmol/l.

Mit  $\square$ E1 lässt sich die Glucose-Konzentration der Pflanzen berechnen:

Wildtyp-Pflanzen:  $y = 0,0075$   $\ddot{E}$   $x = 9,0975 \cdot 10^{-3}$  mmol/l in der Gesamtlösung  
 entspricht  $c_{\text{Extrakt}} = 0,55$  mmol/l

SP34:  $y = 0,019$   $\ddot{E}$   $x = 0,023$  mmol/l in der Gesamtlösung  
 entspricht  $c_{\text{Extrakt}} = 1,38$  mmol/l

SP5:  $y = 0,021$   $\ddot{E}$   $x = 0,025$  mmol/l in der Gesamtlösung  
 entspricht  $c_{\text{Extrakt}} = 1,5$  mmol/l

Mit  $\square$ E2 lässt sich die Fructose-Konzentration der Pflanzen berechnen:

Wildtyp-Pflanzen:	$y = 0,0085$	$\ddot{E} x = 0,01 \text{ mmol/l}$ in der Gesamtlösung entspricht $c_{\text{Extrakt}} = 0,6 \text{ mmol/l}$
SP34:	$y = 0,0185$	$\ddot{E} x = 0,022 \text{ mmol/l}$ in der Gesamtlösung entspricht $c_{\text{Extrakt}} = 1,32 \text{ mmol/l}$
SP5:	$y = 0,0045$	$\ddot{E} x = 5,458 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/l}$ in der Gesamtlösung entspricht $c_{\text{Extrakt}} = 0,33 \text{ mmol/l}$

Da sich ein Saccharose-Molekül in ein Glucose- und ein Fructose-Molekül aufspaltet und der gemessene Wert sich auf die Glucose-Konzentration bezieht, muss zur Bestimmung der Saccharose-Konzentration die bestimmte Glucose-Konzentration durch zwei geteilt werden.

Mit  $1/2 \square$ E3 lässt sich die Saccharose-Konzentration der Pflanzen berechnen::

Wildtyp-Pflanzen:	$y = 0,1475$	$\ddot{E} x = 0,1789 \text{ mmol/l}$ in der Gesamtlösung entspricht $c_{\text{Extrakt}} = 5,367 \text{ mmol/l}$
SP34:	$y = 0,169$	$\ddot{E} x = 0,205 \text{ mmol/l}$ in der Gesamtlösung entspricht $c_{\text{Extrakt}} = 6,15 \text{ mmol/l}$
SP5:	$y = 0,193$	$\ddot{E} x = 0,234 \text{ mmol/l}$ in der Gesamtlösung entspricht $c_{\text{Extrakt}} = 7,02 \text{ mmol/l}$

## 3.2 Versuch 2

Man kann erkennen, dass die Blätter der Antisense-Pflanzen dunkler gefärbt sind als die Blätter der Wildtyp-Pflanzen, sie enthalten also mehr Stärke.

Die SP34-Pflanzen sind dunkler als die SP5-Pflanzen, wobei bei den SP34-Pflanzen die Blattränder schwarz gefärbt sind. Bei den SP5-Pflanzen und den Wildtyp-Pflanzen sind die Blattspitzen schwarz gefärbt.

Insgesamt lässt sich sagen, dass in den SP34-Pflanzen mehr Stärke als in den SP5-Pflanzen und in diesen mehr Stärke als in den Wildtyp-Pflanzen vorhanden ist.

## 4. Diskussion

### 4.1 Versuch 1

Aus den Ergebnissen kann man erkennen, dass die Konzentrationen aller drei Zucker in den Wildtyp-Pflanzen am niedrigsten ist. Hauptgrund hierfür ist die volle Funktionsfähigkeit des Saccharose- $H^+$ -Cotransporters. Bei der Photosynthese entsteht Stärke, die in einzelne

Saccharose- Moleküle gespalten und mit Hilfe des Saccharose-Transporters zu den Orten des Zucker-Verbrauchs (sinks) gebracht wird. Aus diesem Grund findet man in den Blättern sehr wenig Saccharose.

Bei den Antisense-Pflanzen findet man eine höhere Saccharosekonzentration als in den Wildtyp-Pflanzen, da dort der Saccharose-Transporter nicht vollständig funktionstüchtig ist. Aus diesem Grund häuft sich die Saccharose in den Blättern der Antisense-Pflanzen an.

Die Fructose-Konzentration des Wildtyps ist höher als die der SP5-Pflanze, was sich durch Mess- und Ablese-Fehler erklären lässt.

Allgemein entsprechen die Ergebnisse unseren Erwartungen, dass in den Wildtyp-Pflanzen in den Blättern weniger Zucker enthalten ist als in den Antisense-Pflanzen, dies stimmt auch mit den Ergebnissen des zweiten Versuchs überein.

## **4.2 Versuch 2**

Der unterschiedlichen Stärkekonzentrationen kommen dadurch zustande, dass die Antisense-Pflanzen nicht voll funktionsfähige Transportermoleküle in der Zellmembran besitzen und die gebildete Stärke nicht aus den Blättern in die Knollen transportieren können. So ist in den Wildtyp-Pflanzen die Färbung am geringsten, da hier die Transporter voll funktionsfähig sind und die Stärke gleich abtransportieren können. Die unterschiedlichen Stärke- Konzentrationen in den Antisense-Pflanzen kommen daher, dass die Pflanzen unterschiedlich stark gestörte Transporter haben, bei der SP5-Pflanze ist der Grad der Beeinträchtigung der Saccharose-Transporter anscheinend am größten.

## Literaturverzeichnis

- Campbell: Biologie, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum Verlag
- Nultsch: Allgemeine Botanik, 10. Auflage, 1996, Thieme Verlag
- Schopfer / Brennicke: Pflanzenphysiologie, 5. Auflage, 1999, Springer Verlag)
- Skript zum Grundpraktikum Pflanzenphysiologie und molekulare Botanik SS 2003
- Alte Protokolle