

# I. Enzyme

Enzyme gehören zur Klasse der Proteine und erfüllen im Stoffwechsel eine wichtige biologische Funktion. Sie katalysieren chemische Reaktionen, indem sie die Aktivierungsenergie  $E_A$  herabsetzen, d.h. die Energie, die zum Start einer Reaktion nötig ist. Dadurch können auch Reaktionen mit sehr hoher Aktivierungsenergie bei Körpertemperatur ablaufen. Die Enzyme werden während der Katalysereaktion weder verbraucht noch in ihrer chemischen Struktur verändert.

Man kann Enzyme aufgrund ihrer Wirkungsweise in 6 Großgruppen klassifizieren:

- Oxydoreduktasen: katalysieren Redoxreaktionen (Bsp.: Lactat-Dehydrogenase)
- Transferasen: Katalyse von Gruppenübertragungen wie Phosphorylierung oder Methylierung
- Hydrolasen: verantwortlich für Hydrolysereaktionen
- Lyasen: Bildung von Doppelbindungen durch Hinzufügen oder Entfernen von einzelnen Atomen oder Molekülgruppen
- Isomerasen: katalysieren die Bildung von Konstitutionsisomeren
- Ligasen: fügen einzelne Moleküle unter ATP-Verbrauch zusammen

Auch in ihrer chemischen Struktur können Enzyme unterschieden werden:

- Reine Proteine: bestehen aus Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind
- Holoenzyme: zusammengesetzte Proteine aus einem Apoenzym (Proteinanteil) und einem Cofaktor

Enzyme sind aufgrund verschiedener Eigenschaften hochspezifisch.

Sie sind in der Lage selektiv Substrate auszuwählen und in ihre entsprechenden Produkte umzusetzen (**Substratspezifität**). Dabei müssen die Substrate nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zum aktiven Zentrum des Enzyms passen.

Wenn nun ein spezifisches Substrat am aktiven Zentrum bindet, kann jeder Enzymtyp nur eine ganz bestimmte chemische Reaktion katalysieren (**Wirkungsspezifität**).

Zum Beispiel kann das Enzym Saccharase nur das Disaccharid Saccharose in Glucose und Fructose spalten.

Im Folgenden soll nun der Ablauf einer enzymatischen Reaktion erklärt werden.

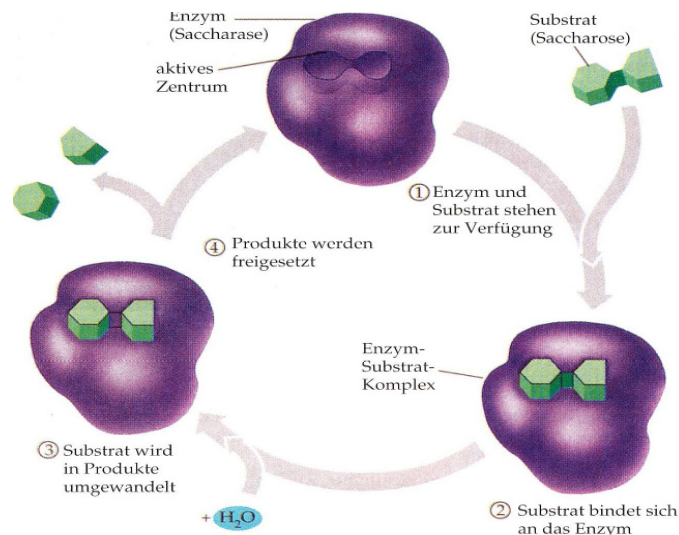
Voraussetzungen hierfür sind, dass Substrate in ausreichender Menge vorhanden und die aktiven Zentren der Enzyme nicht besetzt sind.

Ein Substrat bindet unter Bildung einer schwachen Wechselwirkung an das katalytische Zentrum, sodass ein **Enzym-Substrat-Komplex (ES)** entsteht. Durch die Enzym-Substrat-Wechselwirkung verändert das aktive Zentrum seine Konformation, um sich noch enger an das Substrat anzulagern.

Anschließend wandelt das aktive Zentrum das Substrat in seine Produkte um, welche anschließend wieder freigesetzt werden.

Nach der Reaktion liegt das Enzym wieder in seiner ursprünglichen Konformation vor und kann daher mit einem neuen Substratmolekül einen Komplex bilden.

In Abbildung 1 soll dieser Vorgang noch mal verdeutlicht werden. Hierbei dient als Beispiel die Umsetzung von Saccharose in Glucose und Fructose.



**Abb. 1:** Hydrolyse von Saccharose in Glukose und Fructose durch das Enzym Saccharase [aus: Campbell, Biologie, 1997]

## 1.1 Enzymaktivität

Die Enzymaktivität kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden:

### Temperatur:

Jedes Enzym besitzt ein bestimmtes Temperaturoptimum, bei dem seine Umsatzrate am höchsten ist. Bei steigender Temperatur nimmt die enzymatische Aktivität stets zu, weil sich durch eine schnellere Molekülbewegung (Brownsche Molekularbewegung) die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Substrat und Enzym aufeinander treffen.

Wenn die Temperatur jedoch zu hoch wird, nimmt die Aktivität rapide ab, da Enzyme ab einer bestimmten Temperatur denaturiert werden. Durch die hohe Wärmeenergie werden kovalente Bindungen gelöst und so die Tertiärstruktur des Proteins irreversibel zerstört.

### pH-Wert:

Neben einem Temperaturoptimum besitzen Enzyme auch einen pH-Bereich, bei dem sie optimal wirken können. Häufig sind elektrostatische Bindungen an der Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes beteiligt.

Durch eine Zunahme des pH-Wertes wird die Anzahl der negativen aktiven Zentren erhöht, wobei eine Bindung mit den positiven Gruppen des Substrats erleichtert wird. Bei einer Abnahme des pH-Wertes erhöht sich die Anzahl der positiven Zentren, die mit den negativen Substratgruppen reagieren können.

Je nach Wirkungsort unterscheiden sich die pH-Optima verschiedener Enzyme. Der optimale pH-Wert liegt für die meisten Enzyme zwischen 6 und 8.

### Chemische Substanzen:

Die Aktivität von Enzyme kann durch bestimmte Moleküle gehemmt werden. Solche Inhibitoren können das aktive Zentrum reversibel und sogar irreversibel verändern, sodass die Enzyme nicht mehr funktionsfähig sind.

Genauer es dazu wird auf Seite 10 erläutert.

## 1.2 Cofaktoren

Viele Enzyme benötigen für ihre katalytische Aktivität die Mitwirkung kleinerer Moleküle, so genannter Cofaktoren.

Diese können permanent und fest mit dem Apoenzym verbunden sein; man nennt sie dann auch prosthetische Gruppe (wenn organisch).

Wenn sie eine reversible Bindung mit dem Enzym eingehen, heißen sie **Cosubstrate** (wenn organisch), da sie zusammen mit dem Substrat an das aktive Zentrum gebunden werden.

Nach der katalytischen Reaktion werden sie mit den Produkten wieder freigesetzt.

Bei Cofaktoren kann es sich um anorganische Moleküle, wie zum Beispiel die Metallionen Zink, Eisen und Kupfer, handeln. Aber auch organische Moleküle können Cofaktoren sein; die meisten davon sind Vitamine.

## 1.3 Enzym-Substrat-Affinität

Eine enzymatische Reaktion erreicht ihre größtmögliche Reaktionsgeschwindigkeit, wenn alle beteiligten Enzyme mit Substratmolekülen gesättigt sind. Die Enzymkonzentration muss also einschränkend auf die Geschwindigkeit wirken, während die Konzentration der Substratmoleküle größer als die der Enzymmoleküle sein muss.

Das Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat wird als Michaelis-Konstante bezeichnet. Sie wird durch die Bestimmung des Substratumsatzes (in  $v$ ) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration  $[S]$  ermittelt. Hat die Konstante einen hohen Wert, ist die Halbsättigung erst bei einer relativ hohen Substratkonzentration erreicht (die Hälfte des Enzyms ist gesättigt). Ein Enzym wird bevorzugt das Substrat umsetzen, mit dem es die kleinste Michaelis-Konstante hat. Mit steigender Affinität sinkt also die Substratkonzentration, die erforderlich ist, um alle Enzymmoleküle zu sättigen.

## Michaelis-Menten-Gleichung

Diese Gleichung drückt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  von der Substratkonzentration  $\{S\}$  aus, wobei hier immer nur ein Substrat katalysiert wird.

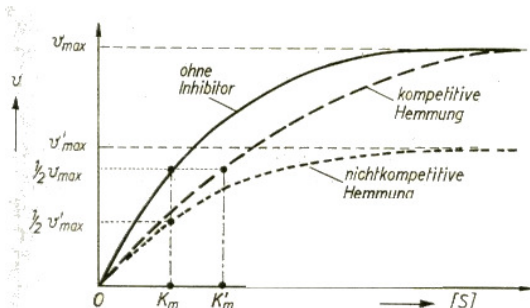
$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$v$  = anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit bei der Substratkonzentration  $\{S\}$

$v_{\max}$  = Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Überschuss an Substrat

$K_m$  = Michaelis-Menten-Konstante

$[S]$  = Substratkonzentration



**Abb. 4:** die normale Sättigungskurve eines Enzyms nach Michaelis-Menten (durchgezogene Linie) sowie deren Verlauf bei kompetitiver bzw. nichtkompetitiver Hemmung. (aus: Penzlin, Lehrbuch der Tierphysiologie, 1989)

## Lineweaver-Burk-Gleichung

Die Lineweaver-Burk-Gleichung ergibt sich aus der algebraischen Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung in die reziproke Form.

Sie wird verwendet, um die enzymatische Reaktion besser zu veranschaulichen, da diese in einer Geradengleichung linear dargestellt wird.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{v_{\max} \cdot [S]} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

In Abb. 5 wurde zur besseren Darstellung der Umkehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit  $1/v$  gegen den Umkehrwert der Substratkonzentration  $1/[S]$  aufgetragen. Die Gerade (durchgezogene Linie) hat zwei Schnittpunkte: den Schnittpunkt mit der x-Achse bei  $-1/K_m$  und den Schnittpunkt mit der y-Achse bei  $1/v_{\max}$ .

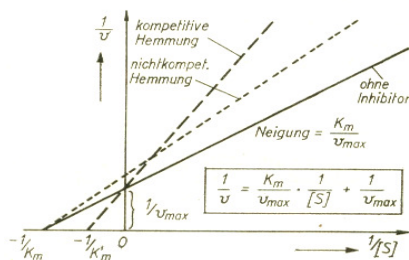


Abb.5: Lineweaver-Burk-Diagramm (aus: Penzlin, Lehrbuch der Tierphysiologie, 1989)

## Enzymhemmung

Bestimmte chemische Stoffe können selektiv eine hemmende Wirkung auf spezielle Enzyme ausüben.

Dabei kann die Inaktivierung **irreversibel** sein, wenn sich der Inhibitor stabil an das Enzym bindet (z.B. Schwermetalle wie Blei).

Bei einer **reversiblen** Hemmung bindet der Hemmstoff nur über schwache Wechselwirkungen an das Enzym; dadurch wird das Maß an enzymatisch katalysierten Reaktionen reguliert.

Viele Hemmstoffe ähneln chemisch den Substraten und konkurrieren mit diesen um den Eintritt in das aktive Zentrum. Andere Inhibitoren wirken indirekt, da sie nicht an das aktive Zentrum binden, verhindern aber ebenfalls die Substratbindung.

Ein Sonderfall ist hier die unkompetitive Hemmung, bei der der Inhibitor erst am Enzym-Substrat Komplex angreift.

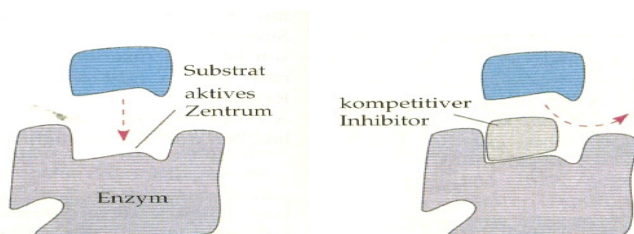


Abb. 6:

links: Ein Substrat bindet an das aktive Zentrum eines Enzyms  
rechts: Ein kompetitiver Inhibitor konkurriert mit dem Substrat um das aktive Zentrum.  
(aus: Campbell, Biologie, 1997)

### Kompetitive Inhibitoren

Stoffe, welche die Aktivität von Enzymen herabsetzen, indem sie das Substrat an der Besetzung des aktiven Zentrums hindern, bezeichnet man als kompetitive Inhibitoren

(Abb.6). Normalerweise ist die kompetitive Hemmung reversibel und kann durch eine Erhöhung der Substratkonzentration überwunden werden.

### Nichtkompetitive Inhibitoren

Anders als oben verhält sich die nichtkompetitive Hemmung. Hier ist  $v_{max}$  bei Anwesenheit des Hemmstoffs stets kleiner als im Normalfall (Abb.4). Der Inhibitor konkurriert nicht mit dem Substrat um das Enzym, sondern blockiert die Katalysereaktion von einer anderen Stelle des Enzymmoleküls, die nicht der Substratbindung dient. Diese Wechselwirkung führt dazu, dass das Enzymmolekül seine Gestalt ändert. Dadurch kann das aktive Zentrum so verändert werden, dass das Substrat zwar noch gebunden, aber weniger effektiv in das Produkt umgesetzt werden kann. Die Substratbindung kann aber auch ganz unmöglich sein.



**Abb. 7:**

Ein nichtkompetitiver Inhibitor bindet sich an einer vom aktiven Zentrum entfernten Stelle an das Enzym. Dadurch ändert sich die Struktur des Enzyms so stark, dass das aktive Zentrum nicht länger voll funktionsfähig ist.

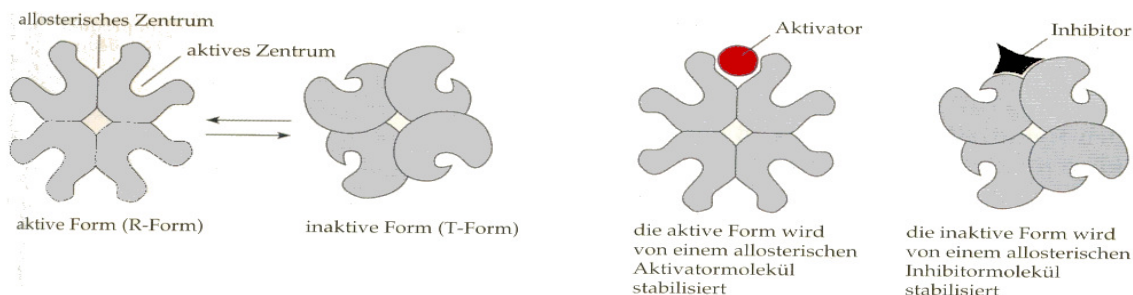
(aus: Campell, Biologie, 1997)

### Allosterische Regulation

Die selektive Hemmung und Aktivierung von Enzymen durch in der Zelle natürlich vorkommende Moleküle (Liganden) ist ein sehr wichtiger Mechanismus der Stoffwechselkontrolle.

Meistens binden Liganden an einen spezifischen Bereich des Enzymmoleküls, der oft weit vom aktiven Zentrum entfernt liegt; dieser Teil wird auch das allosterische Zentrum genannt (Abb.8a). Die meisten Enzyme mit allosterischen Zentren sind Proteine, die aus zwei oder mehr Polypeptidketten bzw. Untereinheiten bestehen. Jede Untereinheit besitzt ihr eigenes aktives Zentrum. Die allosterischen Zentren befinden sich dort, wo die Untereinheiten aneinander stoßen. Der gesamte Komplex pendelt zwischen zwei Zuständen hin und her; einem katalytisch aktiven und einem inaktiveren (Abb.8b). Die Bindung eines Aktivators an ein allosterisches Zentrum stabilisiert die aktive Konformation, während die Bindung eines allosterischen Inhibitors die inaktivere Form stabilisiert.

Da sich diese allosterischen Effektoren über schwache Bindungen an Enzyme heften, ändert sich bei wechselnder Regulatorkonzentration auch die Enzymaktivität. Selten gleichen sich Inhibitor und Aktivator allerdings so sehr in ihrer Gestalt, dass sie um dasselbe allosterische Zentrum konkurrieren.



**Abb. 8:** Allosterische Regulation (aus: Campell, Biologie, 1997)

a) R-Form von relaxed; T-Form von tense

b) heterotroper Effekt

## Antisense- Pflanzen

Bei diesen Pflanzen wurde ein Gen, mit einer bekannten Funktion, durch einsetzen eines Antisense- Gens inaktiviert.

Hierzu wird die RNA des abgelesenen Gens aus der Pflanze entfernt und im Labor in die komplementäre DNA überführt. Diese DNA wird dann mit Hilfe von Plasmiden in das Genom der Pflanze eingeschleust.

Wird nun das ursprüngliche Gen in eine RNA transkribiert, so wird auch das Antisense-Gen abgelesen und es bildet sich ein RNA- RNA- Hybrid aus, an das sich die Ribosomen nicht mehr anlagern können. Dadurch findet keine Translation des Gens mehr statt, wodurch die Funktion des Gens für die Pflanzen gehemmt wird und somit verloren geht.

## Material und Methoden

### **Versuch 1: Bestimmung der Glukose-, Fruktose- und Saccharose-Konzentration in den Blättern der Kartoffel**

Dieser Versuch beruht auf den unterschiedlichen Adsorptionsmaxima von NADPH und NADH. Die reduzierte Form des Moleküls besitzt ein zusätzliches Adsorptionsmaximum bei 340nm.

Von den Wildtyp- und Antisense- Pflanzen werden jeweils ca. 50mg Blattmasse entnommen und diese in je ein Eppendorf- Gefäß gegeben. Zu den Blättern werden nun 0,5ml 80% Ethanol zugegeben und darauf geachtet, dass sich die gesamte Blattmasse im Alkohol befindet. Dieses Gemisch wird nun, zum Entfärben der Blätter, für ca. 30 min in ein 70°C heißes Wasserbad gegeben. Danach werden aus jedem Eppendorfgefäß 10µl des Extraktes entnommen und mit 590µl Carbonatpuffer gemischt. Von jeder Pflanzenart werden Doppelproben angefertigt.

Parallel werden eine Probe ohne Extrakt und Doppelproben mit der Glukose-Standardlösung angefertigt. Hierzu werden je 20; 40; 60; 80 und 100µl der Glukose-Standardlösung mit Carbonatpuffer auf 600µl aufgefüllt. Von diesen Proben werden die OD bei 340nm bestimmt. Die aus diesen Werten ermittelte Glukosekonzentration dient uns bei den Blattproben als Eichgerade.

Zu allen Proben gibt man nun 2µl Hexokinase hinzu, um die Glukosemoleküle mit Hilfe von ATP in Glukose-6- P umzuwandeln. Nach 15 min Reaktionszeit wird erneut der OD bei 340nm gemessen. Anschließend werden zu allen Proben 2µl Phosphoglukoisomerase hinzugegeben und der OD wert nach 15 min ermittelt. Die Phosphoglukoisomerase wandelt die in den Blättern enthaltene Fruktose-6- P in Glukose-6 P um. Nun werden noch 2µl Invertase hinzugegeben und die letzte Messung durchgeführt. Die Invertase spaltet die Saccharosemoleküle in Glukose und Fruktose.

### **Versuch 2: Stärkefärbung**

In diesem Versuch wird der Stärkegehalt in den Blättern von einer Wildtyp- Pflanze und drei Antisense- Pflanzen mit Hilfe einer Iodlösung untersucht. Alle Pflanzen, außer die Antisense- Pflanze SP34, wurden vor dem Versuch im Dunkeln gehalten. Die geernteten

Blätter werden in Falcon- Röhrcchen überführt und 30 min. mit 80% Ethanol in ein ca. 70°C heißes Wasserbad gegeben. In dieser Zeit lösen sich alle Farbstoffe aus den Blättern; dies dient zur besseren Beobachtung der Stärkeinfärbung. Danach werden die Blätter in Petrischalen ca. 25 min. mit Lugol´scher- Lösung inkubiert und die Stärkeverteilung in den Blättern beurteilt.

Die blau- rote Färbung der Stärke beruht auf den Einlagerungen von Iod- Molekülen in die helikalen Bereiche des Zuckerpolymers. Diese helikalen Bereiche entstehen wenn sich die Untereinheiten der Amylose und des Amylopektins glykosidisch miteinander verknüpfen.

## Ergebnisse:

### Versuch 1

Die Ergebnisse der photometrischen Messungen sind in der Tabelle im Anhang zu finden. Anhand dieser Extinktionen kann auf die Konzentrationen an Glucose, Fructose bzw. Saccharose in den jeweiligen Blattproben zurückgerechnet werden.

Zuerst wird mithilfe eines bekannten Glucosestandards eine Kalibriergerade erstellt. Dabei wird auf der x-Achse die Konzentration der jeweiligen Probe und auf der y-Achse die dazugehörige Extinktion aufgetragen. Die Werte dazu sind in Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1: Werte für die Kalibriergerade

Extinktion 1	Extinktion 2	Ø Extinktionen	Konzentration [mM]
0	-	0	0
0,337	0,024	0,1085	0,0666
0,339	0,334	0,3365	0,1333
0,335	0,333	0,334	0,2
0,338	0,33	0,334	0,2666
0,334	0,333	0,3335	0,3333

Die Konzentrationen der Proben berechnet man über die Formel  $c = n \cdot V$ , wobei n die Stoffmenge des Glucosestandards und V das Volumen der Proben darstellt.

$$\begin{aligned}
 & \frac{2\text{mM} \cdot 0\mu\text{l}}{600\mu\text{l}} = 0\text{ mM} \\
 0\mu\text{l Glucose} \rightarrow c &= \frac{2\text{mM} \cdot 20\mu\text{l}}{600\mu\text{l}} = 0,0666\text{ mM} \\
 20\mu\text{l Glucose} \rightarrow c &= \frac{2\text{mM} \cdot 40\mu\text{l}}{600\mu\text{l}} = 0,1333\text{ mM} \\
 40\mu\text{l Glucose} \rightarrow c &= \frac{2\text{mM} \cdot 60\mu\text{l}}{600\mu\text{l}} = 0,2\text{ mM} \\
 60\mu\text{l Glucose} \rightarrow c &= \frac{2\text{mM} \cdot 80\mu\text{l}}{600\mu\text{l}} = 0,2666\text{ mM} \\
 80\mu\text{l Glucose} \rightarrow c &= \frac{2\text{mM} \cdot 100\mu\text{l}}{600\mu\text{l}} = 0,3333\text{ mM} \\
 100\mu\text{l Glucose} \rightarrow c &= \frac{2\text{mM} \cdot 100\mu\text{l}}{600\mu\text{l}} = 0,3333\text{ mM}
 \end{aligned}$$

Die dazugehörige Kalibriergerade ist im Diagramm 1 dargestellt.

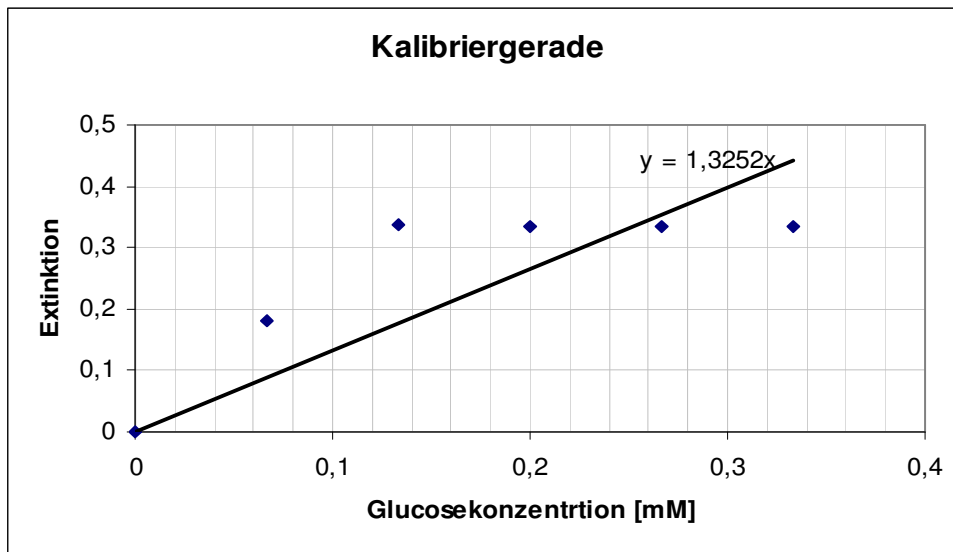


Diagramm 1: Kalibriergerade

Die vom Computer ermittelte Geradengleichung lautet:

$$y = 1,3252 x$$

Mithilfe dieser Geradengleichung können nun aus allen während des Versuchs gemessenen Extinktionen die dazugehörigen Konzentrationen an Glucose bzw. Fructose oder Saccharose berechnet werden.

Grundlage dieser Umrechnung ist das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$\Delta E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration der absorbierenden Substanz (für NADH:  $6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ )

d = Lichtweg (hier: 1cm)

Die Geradengleichung der Kalibriergerade wird folgendermaßen umgeformt:

$$x = \frac{y}{1,3252}$$

Indem für y die gemessenen Extinktionen eingesetzt werden, entspricht x der Konzentration.

Durch Einsetzen der  $\Delta E_{\text{I}}$ -Werte erhält man die Glucosekonzentrationen in den jeweiligen Blattproben. Es wird bei jeder Pflanze mit dem jeweiligen Mittelwert der Extinktionen gerechnet.

$$\text{Wildtyp: } x = \frac{0,039}{1,3252} = 0,029 \text{ mol/l}$$

$$\text{SP}_{34}: x = \frac{0,031}{1,3252} = 0,023 \text{ mol/l}$$

$$\text{SP}_5: x = \frac{0,0305}{1,3252} = 0,023 \text{ mol/l}$$



$$SP_5C: x = \frac{0,032}{1,3252} = 0,024 \text{ mol/l}$$

Die Fructose-Konzentrationen werden mithilfe der  $\Delta E_2$ -Werte ermittelt.

$$\text{Wildtyp: } x = \frac{0,0265}{1,3252} = 0,019 \text{ mol/l}$$

$$SP_{34}: x = \frac{0,0115}{1,3252} = 0,0087 \text{ mol/l}$$

$$SP_5: x = \frac{0,013}{1,3252} = 0,0098 \text{ mol/l}$$

$$SP_5C: x = \frac{0,015}{1,3252} = 0,012 \text{ mol/l}$$

Mithilfe der  $\Delta E_3$ -Werte kann die Saccharose-Konzentration bestimmt werden. Da aber ein Saccharose-Molekül in zwei Moleküle, nämlich ein Molekül Glucose und ein Molekül Fructose, gespalten wird, muss der erhaltene Wert noch durch zwei geteilt werden.

$$\text{Wildtyp: } x = \frac{-0,026}{1,3252} : 2 = -0,019 \text{ mol/l}$$

$$SP_{34}: x = \frac{0,018}{1,3252} : 2 = 0,014 \text{ mol/l}$$

$$SP_5: x = \frac{0,0215}{1,3252} : 2 = 0,016 \text{ mol/l}$$

$$SP_5C: x = \frac{0,0155}{1,3252} : 2 = 0,012 \text{ mol/l}$$

In der untenstehenden Tabelle 2 sind alle Ergebnisse nochmals zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle 2: Zuckerkonzentrationen in den Blattproben

	Glucose-konzentration [mol/l]	Fructose-konzentration [mol/l]	Saccharose-konzentration [mol/l]
Wildtyp	0,029	0,019	-0,019
SP <sub>34</sub>	0,023	0,0087	0,014
SP <sub>5</sub>	0,023	0,0098	0,016
SP <sub>5C</sub>	0,024	0,012	0,012

## Versuch 2:

Man konnte deutlich erkennen, dass die Blattfärbung der Wildtyp- Pflanze geringer war als die der Antisense- Pflanze vom Typ SP<sub>34</sub>. Allerdings erzielten die anderen Antisense- Pflanzen SP<sub>5</sub> und SP<sub>5C</sub> nicht die gewünschte Färbung. Sie hatten eher die Farbe der Wildtyp- Pflanze.

Daraus folgt, dass die Antisense- Pflanze SP<sub>34</sub> die meiste Stärke in ihren Blättern hatte und alle anderen Pflanzen (Wildtyp; SP<sub>5</sub> und SP<sub>5C</sub>) in etwa die gleiche Konzentration von Stärke enthielten.

## Diskussion:

### Versuch 1

Wie man Tabelle 2 entnehmen kann ist die Konzentration an Glucose und Fructose in den Blättern der Wildtyp-Pflanze höher als in den Blättern der 3 antisense-Pflanzen. Dies ist eher ungewöhnlich, da in der Wildtyp-Pflanze überschüssige Zuckermoleküle mithilfe des Saccharose/H<sup>+</sup>-Cotransporters zu den *sink*-Zellen abtransportiert werden und sich somit nur wenig Zucker in den Blättern befinden sollte. Erwartungsgemäß sollten die Zuckerkonzentrationen in den antisense-Pflanzen deutlich höher als in der Wildtyp-Pflanze sein, da deren Saccharose/H<sup>+</sup>-Cotransporter nur eingeschränkt funktionsfähig ist und sich folglich Zucker in den Blättern anreichert.

Auch die Werte für die Saccharosekonzentration ist sehr ungewöhnlich, vor allem das Ergebnis des Wildtyps. Da Konzentrationsangaben keine negativen Werte annehmen können, ist dieses Ergebnis für einen Vergleich ungeeignet.

Ursachen für dieses schlechte Gesamtergebnis können Pipetier – oder Messfehler sein. Dabei kommen vor allem Fehler des Photometers in Frage, da das Gerät schon sehr alt und eventuell nicht mehr richtig funktionstüchtig ist. Das schlechte Ergebnis der antisense-Pflanzen könnte auch daher kommen, dass die Übertragung des antisense-Gens nicht funktioniert hat oder das Gen nach einer bestimmten Zeit wieder von der DNA entfernt wurde. Dies könnte bei den Pflanzen SP<sub>34</sub> und SP<sub>5C</sub> der Fall sein, nicht aber bei SP<sub>5</sub>, da bei dieser Pflanze der zweite Versuch, nämlich der Nachweis an Stärke, funktioniert hat.

Allgemein entsprechen die erhaltenen Ergebnisse nicht unseren Erwartungen, da in den Blättern der antisense-Pflanzen eine höhere Zuckerkonzentration als in der Wildtyp-Pflanze enthalten sein sollte.

### Versuch 2

Die in diesem Versuch eingesetzten Wildtyp- und Antisense- Pflanzen erzielten nicht die gewünschten Ergebnisse. Zwar war die Blattfärbung der Antisense- Pflanze vom Typ SP<sub>34</sub> deutlich stärker als die des Wildtyps; dadurch konnte man darauf schließen, dass hier der Saccharose- Transporter inaktiv war, somit die Saccharose nicht aus den Blättern transportiert werden konnte und stattdessen in Stärke umgewandelt wurde. Allerdings konnte man keinen deutlichen Unterschied zwischen den anderen beiden Antisense-Pflanzen und dem Wildtyp erkennen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass mit dem Wachstum der Pflanze das eingesetzte Antisense- Gen wieder aus dem Erbgut der Pflanze entfernt wurde.