

**Expressionsanalyse des Promotors  
einer cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase  
aus Kartoffel in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Marcus Ebneith  
aus Berlin

Gatersleben  
1996

**Expressionsanalyse des Promotors  
einer cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase  
aus Kartoffel in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Marcus Ebnet  
aus Berlin

Gatersleben  
1996

**Expressionsanalyse des Promotors  
einer cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase  
aus Kartoffel in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Marcus Ebneith  
aus Berlin

Gatersleben  
1996

**Expressionsanalyse des Promotors  
einer cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase  
aus Kartoffel in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Marcus Ebneht  
aus Berlin**

**Gatersleben  
1996**

1. Gutachter: Prof. Dr. Schieder
2. Gutachter: Prof. Dr. Willmitzer

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Transgene Pflanzen	1
1.1.1 Transformationssysteme	1
1.1.2 „Targeting“ der eingeführten Proteine	2
1.1.3 Promotoren	3
1.2 Möglichkeiten und Probleme transgener Pflanzen	6
1.2.1 Heterologe Expression	7
1.2.2 Ausschaltung endogener Proteine durch „Antisense“-Technik	7
1.2.3 Ausschaltung endogener Proteine durch Kosuppression	8
1.3 Zielsetzungen bei transgenen Pflanzen	8
1.3.1 Möglichkeiten und Perspektiven transgener Pflanzen in Landwirtschaft und Industrie	8
1.3.2 Analyse von Stoffwechselprozessen	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit	12
<b>2 Material</b>	15
2.1 Chemikalien und Enzyme	15
2.2 Plasmide und Vektoren	16
2.3 Bakterienstämme	16
2.4 Pflanzen	16
2.5 Oligonukleotide	16
<b>3 Methoden</b>	17
3.1 Enzymatische Manipulation an Nukleinsäuren	17
3.1.1 Erstellen einer genomischen Bank aus Kartoffel ( <i>Solanum tuberosum</i> L. Varietät Désirée)	17
3.1.2 Durchmustern einer genomischen Bank	18
3.1.3 Isolierung von Phagen-DNA	18
3.1.4 Festlegung des Transkriptionsstartpunkts	18
3.2 Transformationen	19
3.2.1 Bakterientransformation	19
3.2.2 Pflanzentransformation und Gewebekultur	19
3.3 Pflanzenhaltung	20

3.4 Analyse von DNA: „Southern-Blot“	20
3.5 Analyse von RNA: „Northern-Blot“	20
3.6 Analyse von Proteinen	21
3.6.1 Detektion von $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität	21
3.6.2 Bestimmung der Aktivität der cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase	21
3.7 Bestimmung von löslichen Zuckern und Stärke	22
3.8 Bestimmung der Stoffwechselflüsse	22
3.8.1 Markierung von Blattscheiben mit $^{14}\text{CO}_2$ in der Sauerstoffelektrode	22
3.8.2 Messung der Photosyntheserate in der Sauerstoffelektrode und Bestimmung der Stoffwechselflüsse	22
3.9 Mikroskopie	23
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>24</b>
4.1 Kopienzahl der cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase-Gene im Genom von Kartoffelpflanzen	24
4.2 Isolierung und Klonierung eines cyt FBPase-Promotors	26
4.2.1 Durchmustern einer genomischen Kartoffel-Bank nach cytosolischer Fruktose-1,6- bisphosphatase Promotorsequenzen	26
4.2.2 Klonierung eines Promotors der cytosolischen FBPase	26
4.2.3 Sequenzanalyse des Promotorfragments der cyt FBPase	28
4.2.4 Fusion des cytosolischen FBPase-Promotors mit der kodierenden Region des <i>Escherichia coli</i> $\beta$ -Glucuronidase-Gens	31
4.3 Erste Analyse der Primärtransformanden	33
4.3.1 Analyse der Tabak-Primärtransformanden die das ME-1 Konstrukt enthalten	33
4.3.2 Analyse der Tabak-Primärtransformanden die das ME-11 Konstrukt enthalten	34
4.4 Gewebespezifität des cyt FBPase-Promotors in transgenen Tabakpflanzen	36
4.4.1 Gewebespezifische Expression des chimären $\beta$ -Glucuronidase Gens	36
4.4.2 Histochemische Lokalisierung von GUS-Aktivität im Tabakstamm	38
4.4.3 Cytologische Untersuchung des Nodienbereichs des Tabakstammes	40
4.4.4 Expression des chimären GUS-Gens im Tabakstamm	42
4.4.5 Expression des chimären GUS-Gens in Tabakknospen und -blüten	43
4.4.6 Expression des chimären GUS-Gens in Tabakkeimlingen	45
4.5 Zellspezifische Expression des chimären GUS-Gens	46

4.6	Entwicklungsabhängigkeit der durch den cyt FB Pase Promotor vermittelten Expression in Tabakblättern	48
4.6.1	Aktivität des chimären GUS-Gens in sich entwickelnden Tabakblättern	48
4.6.2	Untersuchung der GUS-Aktivität und der Expression des chimären GUS-Gens in allen Blättern von Tabakpflanzen	50
4.6.3	Untersuchung der Expression und Aktivität der endogenen cyt FB Pase in Tabakblättern	54
4.7	Expression des chimären GUS-Gens unter verschiedenen Umwelteinflüssen	57
4.7.1	Tagesgang der GUS-Expression	57
4.7.2	GUS-Expression in Keimlingen	58
4.7.3	Kälte-Induktion der GUS-Expression	59
4.7.4	Zuckerregulation der Expression des chimären GUS-Gens	64
4.8	Bestimmung von Zuckergehalt, Photosyntheserate und Stoffwechselflüssen in Blättern von Tabakpflanzen	66
4.8.1	Bestimmung der Zuckergehalte in Blättern von Tabakpflanzen	66
4.8.2	Bestimmung der Saccharosesyntheserate in Blättern von Tabakpflanzen	68
4.9	Analyse der Kartoffel-Primärtransformanden der Linien KME-1 und KME-11	74
4.10	Gewebespezifische Expression des chimären GUS-Gens in Kartoffeln	77
4.10.1	Gewebespezifische Expression und Aktivität in Kartoffelpflanzen	78
4.10.2	Expression des chimären GUS-Gens in Kartoffelknollen	81
4.11	Zellspezifische Expression des chimären GUS-Gens in Kartoffelblättern	85
4.12	Entwicklungsspezifische Expression des chimären GUS-Gens in Kartoffelblättern	86
4.13	Anhang	87
4.13.1	Durchmustern einer genomischen Kartoffel-Bank nach Stärkephosphorylase Promotorsequenzen	87
4.13.2	Klonierung eines Promotors der Stärkephosphorylase P1	87
4.13.3	Fusion des Stärkephosphorylase-Promotors mit der kodierenden Region des <i>Escherichia coli</i> $\beta$ -Glucuronidase-Gens	89
4.13.4	Analyse der Primärtransformanden TME-2 und KME-2	90
4.13.5	Sequenzanalyse des Promotorfragments der STP-P1	91
5	<b>Diskussion</b>	92
5.1	Klonierung und Sequenzanalyse eines Promotors der cyt FB Pase aus Kartoffel	92
5.2	Analyse der Primärtransformanden	93



5.3 Gewebe- und zellspezifische Expression des chimären GUS-Gens	94
5.4 Entwicklungsspezifische Expression des chimären GUS-Gens	96
5.5 Regulation des chimären GUS-Gens durch Umwelteinflüsse	97
5.6 Bestimmung der Photosyntheserate und Stoffwechselflüsse in Blättern von Tabakpflanzen	100
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>7 Literaturliste</b>	<b>103</b>

## 1 Einleitung

Die Veränderung von Pflanzen, um diese an die Bedürfnisse der Menschen anzupassen, wird in der Züchtung seit langer Zeit durchgeführt. Die Pflanzenzucht beruht auf der Kombination von Genomen durch Kreuzung oder Zellfusion. Die Nachkommen mit der jeweils besten Kombination von Genen werden selektioniert und für weitere Züchtungsschritte verwendet. Diese Methoden sind aufwendig und zeitintensiv. Mit Hilfe der Gentechnik ist es möglich geworden, gezielt Veränderungen in Pflanzen einzuführen. In diesem Fall werden nur einzelne Gene übertragen, das Genom der transformierten Pflanze bleibt vollständig erhalten. Seit den ersten Erkenntnissen über die Möglichkeiten zur Herstellung transgener Pflanzen hat ihre Verwendung in Forschung und Industrie stark zugenommen.

### 1.1 Transgene Pflanzen

#### 1.1.1 Transformationssysteme

Die Grundvoraussetzung für die Herstellung transgener Pflanzen ist die Etablierung effektiver Methoden zur Transformation und Regeneration. Die bei Dikotyledonen am weitesten verbreitete Technik zur Transformation ist die Agrobakterien vermittelte Transformation. Dabei macht man sich die natürliche Fähigkeit von *Agrobacterium tumefaciens* zunutze, eigene Plasmid-DNA auf Pflanzen zu übertragen. Der Mechanismus der Übertragung bakterieller DNA in die Pflanzenzelle und der stabilen Integration in das pflanzliche Genom ist inzwischen weitgehend verstanden (Zambryski, 1989; Hooykaas und Schilperoort, 1992; Zupan und Zambryski, 1995). Auf den von *Agrobacterium tumefaciens* übertragenen Plasmiden sind Gene lokalisiert, die in Pflanzen Tumorwachstum verursachen. Durch die Entfernung dieser Gene kann die Gallenbildung infizierter Pflanzen verhindert werden. Gleichzeitig ist es möglich geworden, fremde DNA in das Plasmid einzuführen und auf Pflanzen zu übertragen. Damit können eine Vielzahl von Pflanzen unaufwendig und effektiv transformiert werden (Zambryski et al., 1983; Bevan, 1984).

Für die Agrobakterien vermittelte Transformation ist Freisetzung phenolischer Substanzen als Reaktion der Pflanze auf Verwundung notwendig. Monokotyledonen zeigen diese Reaktion nicht. Sie sind mit Agrobakterien daher schlecht transformierbar.

Für diese und einige Dikotyledonen, die ebenfalls mit Agrobakterien nicht oder ineffektiv zu transformieren waren, wurden andere Transformationsmethoden entwickelt. Die effektivste für viele Pflanzenarten ist Transformation durch „Beschuss“ von Kalli, Meristemen oder

embryonalem Gewebe mit Partikeln, die mit DNA ummantelt sind (Christou, 1992). Gelangt ein solcher Partikel in den Nukleus einer Zelle, kann die daran haftende DNA stabil in das Pflanzengenom integriert werden. Mit dieser Methode ist es gelungen, unter anderem Soja, Mais und Weizen zu transformieren (Christou et al., 1990; Fromm et al., 1990; Vasil et al., 1991).

Weitere Methoden zur Übertragung von DNA in das Pflanzengenom sind Transformation durch virale Vektoren (Joshi und Joshi, 1991), Protoplastentransformation mittels Elektroporation (Potyrkus, 1991) oder Injektion von DNA in Protoplasten (Crossway, 1986).

### **1.1.2 „Targeting“ der eingeführten Proteine**

Viele Stoffwechselprozesse in der Pflanze sind auf bestimmte Kompartimente der Zellen beschränkt. Soll in diese Stoffwechselprozesse durch Überexpression endogener oder fremder Proteine eingegriffen werden, muß gewährleistet sein, daß diese in die jeweiligen Kompartimente gelangen. Zum gerichteten Transport von Proteinen sind deren Aminosäuresequenzen ein oder mehrere spezifische Transportsignale vorgeschaltet. Der Transport von Proteinen kann in Pflanzen kotranslational oder posttranslational erfolgen. Beim kotranslationalen Transport werden die Proteine an der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) synthetisiert und gelangen direkt in das Lumen des ER. Zum Transport vom ER in die Vakuole bedarf es zusätzlicher Targetingsignale. Proteine, die in den Apoplasten sekretiert werden sollen, benötigen dagegen keine weiteren Signalpeptide (von Schaewen et al., 1990; Sonnwald et al., 1991; Chrispeels, 1991; Wandelt et al., 1992). Der posttranslationale Transport in die Mitochondrien und Chloroplasten benötigt Transitpeptide, die den im Cytosol synthetisierten Vorläuferproteinen vorgeschaltet sind (van den Broeck et al., 1985; Boutry et al., 1987). Ist das Protein in das jeweilige Kompartiment gelangt, werden die Transportsignale entfernt. Für das Verbleiben der Proteine im Cytosol bedarf es keiner besonderen Information.

### **1.1.3 Promotoren**

Bei vielen Experimenten ist die Expression eines Transgens in allen Geweben der Pflanze unproblematisch oder erwünscht. In einigen Fällen ist dies aber schlecht, da Eingriffe in den Stoffwechsel, die in bestimmten Geweben gewollt sind, sich negativ auf die Funktionsfähigkeit anderer Gewebe auswirken können und den eigentlich beabsichtigten Effekt verhindern (Sonnwald, 1992; Lerchl et al., 1995). Hier bedarf es der möglichst gewebe- oder

entwicklungsspezifischen Expression eines Transgens. Die Spezifität der Expression wird durch Promotoren vermittelt, von denen eine große Zahl isoliert und charakterisiert ist (Edwards und Coruzzi, 1990). Promotoren sind nicht kodierende DNA-Sequenzen, die vor dem Transkriptionsstart der Gene liegen und deren Expression regulieren. Die Spezifität der Genexpression ist abhängig von der Bindung regulatorischer Proteine an kurze Erkennungssequenzen innerhalb des Promotors. Die Bindung eines Proteins an den Promotor kann sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Transkription wirken (Brand et al., 1985; Osborne et al., 1985; Simpson et al., 1986).

Frühe Promotorstudien in transgenen Pflanzen wurden zur Analyse der Kontrolle der Genexpression durchgeführt (Simpson et al., 1985; Fluhr et al., 1986). Man hat bestimmte Promotoren untersucht, um deren Regulation zu analysieren. In Folge der Versuche, Stoffwechselwege in Pflanzen gezielt zu verändern, wurde die Isolierung von Promotoren mit definierter Spezifität immer wichtiger.

#### **1.1.3.1 Unterschiedliche Techniken zur Isolierung von Promotoren**

Zur Isolierung von gewebe- oder entwicklungsspezifischen Promotoren werden zunächst differentiell exprimierte cDNAs gesucht. Dazu werden Techniken angewendet wie das differentielle Display (Liang et al., 1993; Bauer et al., 1993), differentielle Screening (Hildmann et al., 1992) oder die Herstellung subtraktiver Banken und anschließendes differentielles Screening (Strauss und Ausubel, 1990; Herbers et al., 1995). Zu diesen cDNAs können anschließend die zugehörigen Promotoren isoliert werden. Viele Gene liegen in mehreren Kopien im Genom vor. Diese werden häufig differentiell exprimiert. Von daher ist es oft Zufall, wenn der untersuchte Promotor genau die erwünschte Spezifität hat. In einigen Fällen ist gezeigt worden, daß durch die Einführung von Deletionen in einen Promotor sich die Expression in verschiedenen Geweben voneinander trennen ließ (Müller-Röber et al., 1994; Lorberth et al., 1992). Andere Gruppen konnten durch Einführung von regulatorischen Elementen in andere Promotoren verschiedene Expressionsmuster miteinander kombinieren (Benfey und Chua, 1989; Dammann et al., 1994). Ein anderer Ansatz zur Promotorisolierung ist das sogenannte Reporter-Gen-Tagging. Hierbei werden Reportergene ohne Promotor in Pflanzen transformiert. Eine große Anzahl unabhängiger Transformanden wird anschließend daraufhin untersucht, ob das Reportergen in einer erwünschten Weise exprimiert wird, es also zufällig in der Nähe einer entsprechenden regulatorischen Sequenz in das Genom integriert worden ist. Der Promotor läßt sich dann mit den üblichen Methoden isolieren (André et al., 1988; Koncz et al., 1989; Koncz et al., 1990b). Dieser Ansatz ist zielgerichteter als die oben

beschriebenen. Aufgrund der großen Zahl von zu untersuchenden Transformanten ist er jedoch aufwendig, obwohl die Quote der das Reporter-gen exprimierenden Pflanzen mit 8% aller regenerierten Pflanzen hoch ist (Walden und Schell, 1990).

### 1.1.3.2 Promotorspezifitäten

Einer der am häufigsten verwendeten Promotoren ist der Blumenkohlmosaikvirus CaMV35S-Promotor. Er kontrolliert die Expression einer polycistronischen 8,2 kb umfassenden mRNA (Covey und Hull, 1985) und soll in allen Pflanzenzellen starke Expression vermitteln (Franck et al., 1980; Odell et al., 1985). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß der CaMV35S-Promotor in einigen Geweben stärkere Expression vermittelt als in anderen und die Stärke der Expression vom Entwicklungsstadium eines Gewebes abhängen kann (Jefferson et al., 1987; Williamson et al., 1989).

Für einige Anwendungen ist die nur zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgende Expression eines Transgens wünschenswert. Dazu bedarf es induzierbarer Promotoren. Beschrieben sind durch Hitzeschock oder Verwundung induzierbare Promotoren (Ainley und Key, 1990; Keil et al., 1990). Das Problem hierbei ist, daß die Induktion der Promotoren zu einer ganzen Reihe von Reaktionen der Pflanze führt, von denen die Wirkung des Transgens unterschieden werden muß. Ein in Pflanzen induzierbares Promotorsystem ist von Gatz et al. (1988; 1991) beschrieben worden. In Pflanzen wurde ein Konstrukt eingeführt, das konstitutiv die Expression eines bakteriellen Repressors vermittelt. In diese Pflanzen transformierte chimäre Promotoren, die Bindestellen für den Repressor enthalten, sind nicht aktiv. Eine Induktion dieser Promotoren erfolgte durch Zugabe von Tetrazyklin, einem Antibiotikum, das die Pflanze sonst nicht beeinflußt, aber die Bindung des Repressors an die Operatorsequenzen verhindert. Die Autoren konnten jedoch nicht ausschließen, daß der Repressor auch an regulatorische Sequenzabschnitte in pflanzlichen Promotoren bindet und so zu unerwünschten Nebeneffekten führt. Außerdem ist die gleichmäßige Verteilung des Tetrazyklins in den Pflanzen schwierig.

Desweiteren ist eine Vielzahl von Promotoren beschrieben worden, die verschiedene Gewebe- oder Entwicklungsspezifitäten besitzen. So sind Promotoren isoliert worden, die spezifische Aktivität in Samen (Bäumlein et al., 1987), Knollen (Rocha-Sosa et al., 1989), Wurzeln (Keller und Lamb, 1990) aber auch in Meristemen (Ito et al., 1994) und Früchten (Mansson et al., 1985) vermitteln. Promotoren, die Expression im Blatt vermitteln, wurden isoliert von photosynthetischen Genen. Dazu gehören die Promotoren der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Fluhr et al., 1986), des Chlorophyll a/b bindenden Proteins (Simpson et al., 1985) oder des 10 kd-Proteins des Sauerstoff produzierenden Komplexes des Photosystems II (Stockhaus et al., 1989). Die genannten

Promotoren werden in Mesophyll- und in anderen Chloroplasten enthaltenden Zellen, wie Schließ- und Geleitzellen exprimiert. Diese Zellen erfüllen im Blatt sehr unterschiedliche Funktionen. Das Mesophyll ist das wichtigste Kohlenstoff fixierende Gewebe der Pflanze, Stomata regulieren Wasserabgabe und Kohlendioxidaufnahme des Blattes und Geleitzellen bewerkstelligen die Beladung des Phloems. Es kann notwendig sein, nur in einzelnen dieser Gewebe Expression zu erzielen. Schließzellenspezifische Expression kann durch einen verkürzten Promotor der ADP-Glukose Pyrophosphorylase vermittelt werden (Müller-Röber et al., 1994). Expression im Leitgewebe wird bewirkt durch den Promotor *rolC* aus *Agrobacterium rhizogenes* (Schmülling et al., 1989). In C3-Pflanzen führt der aus einer C4-Pflanze stammende Promotor der Phosphoenolpyruvat Carboxylase zu Expression nur im Mesophyll des Blattes (Stockhaus et al., 1994). Dieser Promotor vermittelt im Mesophyll jedoch nur niedrige Aktivität. Außerdem ist er zwar im Blatt nur im Mesophyll aktiv, zeigt aber in Wurzeln ebenfalls Aktivität. Beides ist für viele Anwendungen problematisch.

#### 1.1.3.3 Markergene

Zur Analyse von Promotoren ist es notwendig, diese mit sogenannten Markergenen zu fusionieren und anschließend in Pflanzen zu übertragen. Als Markergene werden Gene gewählt, die sich leicht quantifizieren lassen, möglichst einen gewebespezifischen, histochemischen Nachweis ermöglichen und in Pflanzen nicht vorkommen, und damit es keine störende Hintergrundaktivität gibt.

Bereits früh wurden die bakteriellen Gene Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) (Gorman et al., 1982; Velten und Schell, 1985) und Neomycin Phosphotransferase II (NPT) (Reiss et al., 1984) verwendet. Sie bewirken Resistenz gegen Chloramphenicol beziehungsweise Kanamycin und haben so den Vorteil, daß sie gleichzeitig als Selektionsmarker verwendet werden können. Im Vergleich mit neueren Markergenen sind die Nachweise jedoch wenig sensitiv und aufwendig. Außerdem ist es sehr schwierig festzustellen, in welchen Zellen die Gene exprimiert werden.

Die aus *E. coli* stammende  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) ermöglicht sowohl eine schnelle und empfindliche Quantifizierung als auch einen leichten zellspezifischen Nachweis (Jefferson et al., 1987). Beim histochemischen Test wird das Gewebe allerdings zerstört, es ist also nicht möglich innerhalb eines Organs einen entwicklungsabhängigen Verlauf der Expression zu verfolgen. Somit können lediglich einzelne Situationen untersucht werden. Ein weiteres Problem beim Nachweis der GUS-Aktivität ist die hohe Stabilität des Proteins im Pflanzengewebe. Aufgrund dieser Stabilität ist es nicht möglich zu entscheiden, ob das Gen im

Moment der Probennahme exprimiert wurde oder bereits zu einem früheren Zeitpunkt. Auch eine Abnahme der GUS-Aktivität aufgrund von Inhibierung des Promotors kann nicht gezeigt werden. In diesem Fall muß auf mRNA-Ebene eine Veränderung der Transkriptmenge untersucht werden.

Mit den seit kurzer Zeit verwendeten Luciferasen aus Bakterien oder Leuchtkäfer (Koncz et al., 1990a) kann ein qualitativer Nachweis *in vivo* durchgeführt werden. Bei dieser Nachweismethode ist das Problem, daß das Enzymsubstrat gleichmäßig in das Gewebe infiltriert werden muß, ohne es zu zerstören. Dieses Problem kann vermieden werden durch Verwendung des Green-Fluorescence-Protein (GFP) (Baulcombe et al., 1995; Sheen et al., 1995) als Markergen. GFP benötigt keine Substratzugabe, sondern fluoresziert bei Einstrahlung von UV- oder blauem Licht. Allerdings können dabei Zellbestandteile stören, die bei gleicher Wellenlänge fluoreszieren.

## 1.2 Möglichkeiten und Probleme transgener Pflanzen

Ein Problem bei der Herstellung transgener Pflanzen ist, daß es keine Möglichkeit gibt festzulegen, in welcher Region des Genoms das Transgen integriert wird (Zambryski, 1989; Koncz et al., 1989). Der Integrationsort kann aber eine wichtige Rolle bei der Expression eines Transgens spielen. Gelingt es beispielsweise in eine Umgebung, die nicht transkribiert wird, kann es zu sehr geringer oder fehlender Expression des Transgens kommen. Andererseits kann das Transgen auch in der Nähe regulatorischer Sequenzen integriert werden, was dazu führen kann, daß es anders exprimiert wird, als der verwendete Promotor erwarten ließe. Diese Effekte werden als Positionseffekte bezeichnet (Horsch et al., 1985; van der Hoeven et al., 1994).

Ein weiteres Problem, das sich bei der Herstellung transgener Pflanzen stellt, ist, daß ein Transgen von der Pflanze inaktiviert werden kann. Eine Ursache für dieses sogenannte „Gene-Silencing“ wird in der Methylierung der eingeführten Fremd-DNA gesehen (Bestor und Coxon, 1993; Matzke und Matzke, 1995).

Die Strategien, die eingeschlagen wurden, transgene Pflanzen für Forschung und Anwendung in Landwirtschaft und Industrie zu schaffen, sind vielfältig. Einige dieser Strategien sollen im folgenden dargestellt werden.

### 1.2.1 Heterologe Expression

Eine Möglichkeit, Pflanzen gentechnisch zu verändern ist die Einführung heterologer Proteine. Damit können zum Beispiel die Konzentrationen von Signalmetaboliten und Phytohormonen verändert werden. Indem Antikörper gegen Phytohormone in Pflanzen exprimiert werden (Artsaenko et al., 1995) kann deren Konzentration gesenkt werden. Scott et al. (1995) haben Pflanzen beschrieben, in denen durch Überexpression eines tierischen Enzyms das Signalmetabolit Fruktose-2,6-bisphosphat vermehrt produziert wurde.

Außerdem können Gleichgewichtsreaktionen durch Entfernung eines ihrer Produkte verschoben und so Stoffwechselwege in eine bestimmte Richtung gelenkt werden (Sonnwald, 1992; Lerchl et al., 1995).

Durch Expression nicht regulierbarer Enzyme aus anderen Organismen können bestimmte posttranslationale Regulationsmechanismen der Enzymaktivität in Pflanzen umgangen werden und so ebenfalls Stoffwechselprozesse verändert werden (Worrell et al., 1991; Stark et al., 1992).

Desweiteren ist es möglich, Pflanzen neue Produkte herstellen zu lassen, die für eine industrielle Nutzung von Interesse sind (Nawrath et al., 1994; van der Meer et al., 1994; Herbers und Sonnwald, 1996).

### 1.2.2 Ausschaltung endogener Proteine durch „Antisense“-Technik

Die „Antisense“-Technik ermöglicht es, bestimmte Gene in Pflanzen stillzulegen. Dazu werden Gene des zu manipulierenden Organismus oder solche mit hoher Homologie in reverser Orientierung in die Pflanze übertragen. Die dadurch überexprimierte mRNA ist komplementär zu der, deren Produkt ausgeschaltet werden soll. Der Mechanismus der „Antisense“ ist noch nicht verstanden. Es wird vermutet, daß es zur Bildung von RNA:RNA-Hybriden kommt. Diese verhindern möglicherweise direkt die Translation oder sie werden bevorzugt von Ribonukleasen abgebaut was zur verminderten Expression des Zielgens führt (van der Krol et al., 1988a/b).

Die „Antisense“-Technik ermöglicht es, Pflanzen herzustellen, die sich in der Aktivität eines bestimmten Enzyms graduell unterscheiden, das heißt, in denen ein Enzym in seiner Aktivität verschieden stark reduziert ist (Müller-Röber et al., 1992; Riesmeier et al., 1993; Zrenner et al., 1996). „Antisense“-Technik erfaßt außerdem alle homologen Gene im Genom, so daß die Kopienzahl eines Genes nicht von Bedeutung für die Produktion von Mutanten ist (Rodermel et al., 1988). Diese Technik ist vor allem eingesetzt worden zur Analyse von Stoffwechselprozessen und der Bedeutung einzelner Enzyme in der Pflanze.



### **1.2.3 Ausschaltung endogener Proteine durch Kosuppression**

Kosuppression führt wie die „Antisense“-Technik zur Unterdrückung bestimmter Gene. Auch hier werden Gene verwendet, die dem Zielgen zumindest homolog sind. Im Falle der Kosuppression wird ein Transgen in richtiger Orientierung in das Genom eingefügt und überexprimiert (Napoli et al., 1990; Jorgensen, 1995). Warum dieser Überschuss an „sense“-mRNA die Reduktion der Menge des betroffenen Proteins zur Folge hat ist unklar. Eine der vorgeschlagenen Hypothesen besagt, daß die hohe Konzentration identischer mRNA zu einer Erhöhung des RNA-Abbaus dieses Messengers führt. Eine weitere Vermutung ist, daß durch die erhöhte mRNA Konzentration ein Methylierungsprozeß in Gang gesetzt wird, der spezifisch das Transgen und das homologe endogene Gen betrifft (van Blokland et al., 1994; Flavell, 1994). Ein Problem bei der Anwendung der Kosuppression ergibt sich aus der Beobachtung, daß in Petunien mit kosupprimierter Chalconsynthase der dadurch ausgelöste Phänotyp in einigen Pflanzen teilweise aufgehoben war. Das führte zu Pflanzen, die nur in manchen Geweben supprimiert waren, in anderen Bereichen dem Wildtyp glichen (Jorgensen, 1995). Diese Erscheinung macht die Analyse kosupprimierter Pflanzen ohne Phänotyp schwierig.

### **1.3 Zielsetzungen bei transgenen Pflanzen**

Die Anwendung der oben beschriebenen Methoden zur Manipulation von Pflanzen ist in einer Vielzahl von Veröffentlichungen beschrieben worden. Sowohl für Untersuchungen von Stoffwechselwegen und Regulationsmechanismen in Pflanzen, für die Verbesserung von Pflanzeigenschaften als auch für die Produktion von industriell nutzbaren Rohstoffen sind transgene Pflanzen eingesetzt worden.

#### **1.3.1 Möglichkeiten und Perspektiven transgener Pflanzen in Landwirtschaft und Industrie**

Ein wichtiger Ansatz in der Pflanzenzucht ist die Übertragung von Resistenzgenen gegen Stress und Schädlinge. Die Verbesserung von Salz- und Wassermangeltoleranz (Tarchinsky et al., 1993; Lilius et al., 1996; Xu et al., 1996) sowie Kälteresistenz (Murata et al., 1992) durch Anwendung der heterologen Expression sind ebenso beschrieben worden, wie die Resistenz gegen Insektenfraß und Pflanzenviren (Perlak et al., 1991; Fitch et al., 1993; Shade et al., 1994).

Des Weiteren wurde versucht, die Zusammensetzung von Pflanzeninhaltsstoffen so zu verändern, daß sie für die menschliche Ernährung wertvoller sind. Es sind beispielsweise einige Ansätze publiziert worden, wie die Ölzusammensetzung von Raps- und Sojasamen verbessert werden kann (Töpfer et al., 1995).

Andere Pflanzen wurden gentechnisch manipuliert, um nachwachsende Rohstoffe zu erzeugen: Es wurden Kartoffelpflanzen hergestellt, die statt Amylose und Amylopektin nur noch Amylopektin speichern (Visser et al., 1991) oder die neue, in der chemischen Industrie nutzbare Polymere statt Stärke speichern (Nawrath et al., 1994; van der Meer et al., 1994). Desweiteren wurden Ölpflanzen manipuliert, um industriell nutzbare Öle in besserer Qualität und Quantität zu erhalten (Ohlrogge, 1994).

Eine weitere Idee ist es, Pflanzen als Bioreaktoren zur Produktion technischer Enzyme wie Chymosin, Impfstoffen oder ähnlichem zu verwenden (zusammengefaßt in Herbers und Sonnwald, 1996)).

Nicht zuletzt wurde versucht, Ernteerträge durch Manipulation des Kohlenhydratstoffwechsels zu erhöhen (Sonnwald et al., 1994, Stitt und Sonnwald, 1995).

### 1.3.2 Analyse von Stoffwechselprozessen

Transgene Pflanzen wurden in der Forschung eingesetzt zur *in vivo* Analyse von Stoffwechselprozessen. Der Metabolismus primärer und sekundärer Pflanzenstoffe ist hoch reguliert und die verschiedenen Stoffwechselwege sind miteinander verknüpfte Vorgänge, die durch Umwelteinflüsse ebenso bestimmt werden wie durch Entwicklungsvorgänge in der Pflanze. Dem Saccharosestoffwechsel kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu, denn Saccharose ist neben Stärke das primäre Produkt der Kohlenstofffixierung. Die Synthese der Saccharose liefert eine Vielzahl von Vorstufen für andere Stoffwechselprozesse, und Saccharose ist die Haupttransportform des fixierten Kohlenstoffs in den meisten Pflanzen.

Nicht alle Gewebe der Pflanze sind in der Lage, Photosynthese zu betreiben und sich dadurch selbst mit Kohlenstoff zu versorgen. Die voll entfaltenen Blätter sind die wichtigsten Kohlenstoff fixierenden Organe der Pflanze. Nur in geringem Maße findet Photosynthese im Stamm und jungen Blättern statt. Zudem verbrauchen junge Blätter erheblich mehr reduzierten Kohlenstoff für ihr Wachstum als sie zu fixieren in der Lage sind. Von den voll entfaltenen Blättern wird der Kohlenstoff über das Phloem zu den Organen transportiert, die sich nicht selber versorgen können (Abb. I).

Organe, die Kohlenstoff exportieren werden als „source“ bezeichnet, solche die Kohlenstoff importieren als „sink“. Sink Organe wie Wurzeln und Meristeme verstoffwechseln den

importierten Kohlenstoff. Andere, darunter Samen und Knollen, speichern ihn in Form von Saccharose, Stärke, Fetten oder Proteinen (Ho, 1988). Einige Organe machen einen Wechsel von sink zu source durch. Junge Blätter beginnen während ihrer Reifung von der Spitze an mehr Kohlenstoff zu fixieren als zu verbrauchen und fangen an, Saccharose zu exportieren (Turgeon, 1989). Auch Samen und Knollen beginnen bei der Keimung mit dem Export von Kohlenstoff und werden zu source-Organen (Sonnewald und Willmitzer, 1992; Sonnewald et al., 1994). Der Verbrauch, der Transport und die Produktion von Kohlenstoffen in den verschiedenen Organen der Pflanze sind miteinander abgestimmt. Kommt es in Blättern aufgrund limitiertem Transports zu einem Anstau der Assimilate, wird die Photosynthese und die Saccharosebiosynthese reprimiert (Mayoral et al., 1985; von Schaewen et al., 1990; Goldschmidt und Huber, 1992).

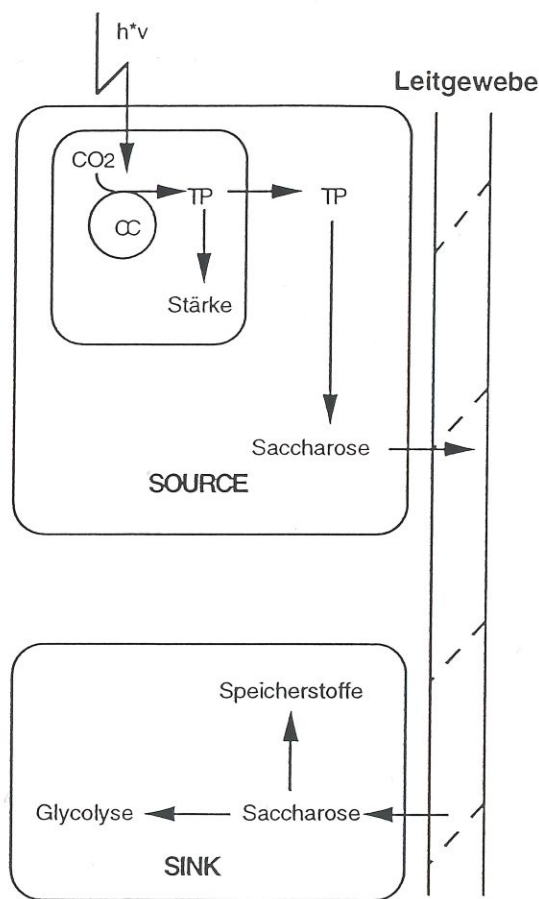


Abb. I: Schema der Saccharosesynthese in source-Zellen und Verteilung der Saccharose in der Pflanze. Saccharose wird im Cytosol der Mesophyllzellen gebildet und über das Leitgewebe zu den Zellen transportiert, die Speicherfunktion haben oder die Saccharose veratmen. Übersteigt die Photosyntheseleistung in source die Kapazität der Saccharosesynthese oder des Transports, werden die Assimilate im Chloroplasten als transiente Stärke zwischengelagert. CC: Calvin Zyklus; TP: Triosephosphat.

Die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels ist mittels transgener Pflanzen an vielen Punkten untersucht worden.

Eine der Fragestellungen war, welche Faktoren die Kapazität zur Fixierung von Kohlenstoff der source-Blätter beeinflussen. Für diese Untersuchungen wurden eine Reihe von Enzymen und Proteine durch „Antisense“-Technik ausgeschaltet die im Calvin-Zyklus eine Rolle spielen (plastidäre Fruktose-1,6-Bisphosphatase (Kosmann et al., 1994); plastidäre Aldolase (Sonnewald et al., 1994); Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase (Quick et al., 1991)), die den Transport der Assimilate aus den Chloroplasten in das Cytosol bewerkstelligen (Triosephosphat Translokator (Riesmeier et al., 1993)) und die an der photosynthetischen Saccharosebiosynthese beteiligt sind (cytosolische Fruktose-1,6-Bisphosphatase (Zrenner et al., 1996); Pyrophosphat abhängige Phosphofruktokinase (Hajirezaei et al., 1993)). Auch durch Überexpression nicht regulierter fremder Enzyme und die Veränderung der Konzentration wichtiger Metabolite in transgenen Pflanzen wurde die Bedeutung dieser Enzyme und Metabolite für die source Kapazität untersucht (Worrell et al., 1991; Sonnewald, 1992; Scott und Kruger, 1994; Lerchl et al., 1995).

Andere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Beladung des Phloems mit Saccharose. Die Überexpression einer Hefe-Invertase im Apoplasten transgener Kartoffeln verhalf zu der Erkenntnis, daß die Beladung des Phloems in Kartoffeln einen apoplastischen Schritt beinhaltet (von Schaewen et al., 1990; Heineke et al., 1992). Die Beladung bedarf außerdem eines spezifischen Transporters, wie in Pflanzen gezeigt wurde, in denen ein Saccharosetransporter durch „Antisense“-Technik ausgeschaltet worden ist (Riesmeier et al., 1994).

Nicht zuletzt wurde anhand transgener Pflanzen untersucht, wie in sink Knollen Saccharose aus dem Phloem aufgenommen wird. Die knollenspezifische Expression einer Invertase im Apoplast zeigte, daß ein apoplastischer Schritt auch am Entladen der Saccharose beteiligt ist.

Die Anwendung transgener Pflanzen in der Analyse von Stoffwechselwegen ist auch für den Stärkestoffwechsel in Knollen beschrieben worden (Visser et al., 1991; Müller-Röber und Kosmann, 1994).

Ein Ansatz zur Erhöhung der Saccharosebiosynthese transgener Pflanzen war die Überexpression einer Pyrophosphatase aus *E coli* im Blatt (Sonnewald, 1992). Pyrophosphat wird bei zwei Reaktionen in Verlauf der Saccharosesynthese freigesetzt. Dadurch, daß in den Pflanzen Pyrophosphat hydrolysiert wird, sollte die Reaktion verstärkt in Richtung Synthese von Saccharose verlaufen. Die Pyrophosphatase exprimierenden Pflanzen zeigten tatsächlich eine deutliche Steigerung des Verhältnisses von löslichen Zuckern zu Stärke, gleichzeitig wiesen sie jedoch reduziertes Wachstum und eine starke Akkumulation löslicher Zucker im

Blatt auf. Dieser Effekt konnte erklärt werden durch die verringerte Beladung des Phloems in den Pflanzen. Der Entzug des Pyrophosphates und damit die Unterbindung der Saccharoseveratmung verhinderte die Bereitstellung von ausreichender Energie zur Phloembeladung. Um dieses zu umgehen und einen vermehrten Abtransport zu sink-Geweben zu gewährleisten, wäre ein Promotor notwendig, der spezifisch im Mesophyll, jedoch nicht in Geleitzellen aktiv ist.

Auch andere Eingriffe in die photosynthetische Saccharosebiosynthese sind ohne einen solchen Promotor nur schwer möglich, da bei den vorliegenden Promotoren die Funktion der Stomata oder des Phloems mit betroffen sein können. Etwaige Veränderungen in der Pflanze könnten dann auf diese eigentlich unerwünschten pleiotropen Effekte zurückzuführen sein und nicht auf den Eingriff in das Mesophyll.

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, einen starken, mesophyllspezifischen Promotor zu isolieren und zu charakterisieren. Dieser sollte dazu verwendet werden, spezifisch in die photosynthetische Saccharosebiosynthese einzugreifen.

Die bisher isolierten Promotoren, die Expression überwiegend im Blatt vermitteln stammen von Genen, die an der Photosynthese beteiligt sind. Deren Spezifität war nicht hoch genug und einige waren zusätzlich zu schwach für bestimmte Experimente. Daher wurden Promotoren von Genen, die für Proteine kodieren, die an der photosynthetischen Saccharosebiosynthese beteiligt sind, gesucht.

Dies sollte geschehen durch (1) die Herstellung einer genomischen Bank von Kartoffel. (2) Die Durchmusterung der Bank nach genomischen Klonen mit Hilfe homologer cDNAs, die Enzyme der Saccharosebiosynthese kodieren. (3) Isolierung von Promotorbereichen der genomischen Klone. (4) Fusion der Promotorabschnitte mit dem Markergen  $\beta$ -Glucuronidase aus *Escherichia coli*. (5) Übertragung dieser Konstrukte auf Kartoffel der Varietät Desirée und Tabak der Varietät Samsun NN. (6) Untersuchung der durch den Promotor vermittelten Gewebespezifität in den transgenen Pflanzen.

Desweiteren sollte untersucht werden, wie der Promotor durch Umwelteinflüsse reguliert wird, und inwiefern die durch den Promotor vermittelte Expression des Markergens in den transgenen Pflanzen die Expression des endogenen Enzyms repräsentiert.

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AGPase	Adenosin-5'-diphosphoglukosepyrophosphorylase
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'triphosphat
bp	Basenpaar(e)
CaMV	Cauliflower Mosaik Virus
Cb	Carbenicillin
CTP	Cytosin-5'triphosphat
cyt	cytosolisch
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FBPase	Fruktose-1,6-Bisphosphatase
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
M	Mol/Liter
m	milli
$\mu$	mikro
min	Minuten
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
MU	4-Methylumbelliferon
MUG	4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NAA	Nicotianamin

NAD(P)	Nikotinamidadeninukleotid(phosphat)
PEG	Polyethylenglycol
pl	plastidär
Pi	anorganisches Phosphat
PPi	Pyrophosphat
PFK	ATP-abhängige Phosphofruktokinase
PFP	pyrophosphatabhängige Phosphofruktokinase
PGI	Phosphoglukoseisomerase
PGM	Phosphoglukosemutase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPS	Saccharosephosphat Synthase
SPP	Saccharosephosphat Phosphatase
TPT	Triosephosphattranslokator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit, Einheit für Enzymaktivität
v/v	Volumenprozent vom Volumen
w/v	Gewichtsprozent vom Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Amersham Buchler, Braunschweig: [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (>110 Tbq/mmol), Nylon-Membran „Hybond-N“.

AGS, Heidelberg: Qualex Gold Agarose.

BioRad, Richmond CA, USA: „Bio-Rad protein assay“ (Bradford Reagenz), Gelatine, SDS.

Biomol, Hamburg: MUG, Phenol, X-Gluc, X-Gal.

Boehringer, Mannheim: Alkalische Phosphatase, DnaseI, IPTG, NADP, „Highprime“ DNA Labeling Kit, Restriktionsendonukleasen, RNaseA, RNaseH, Stärkebestimmungssortiment, T4-DNA-Polymerase, T4-Polynukleotidkinase.

BRL-Gibco, Gaithersburg MD, USA: Restriktionsendonukleasen.

Calbiochem Behring, Hoechst CA, USA: Ethidiumbromid, Miracloth.

Difco Laboratories, Detroit, USA: Bacto-Agar, Bacto-Tryptone, BiTek™-Agar, Yeast-Extract.

Duchefa, Brüssel, Belgien: 1,3  $\beta$ -Bactyl, Murashige-Skoog Vollmedium Festsubstanz.

Fluka, Buchs, Schweiz: Mercaptoethanol, Chloralhydrat, Milchsäure.

Hoechst AG, Frankfurt: Claforan.

LKB-Pharmacia, Bromma, Schweden: Sephadex G50.

Roth, Karlsruhe: Chloroform, Formaldehyd, Formamid, Glycerin, Isoamylalkohol, Isopropanol.

Schleicher und Schüll, Dassel: Faltenfilter.

Serva, Heidelberg: DMF, DMSO, HEPES, Natriumbisulfit, Triton X-100.

Siemens, Berlin: Kodak X-OMAT Röntgenfilme.

Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA: Bromphenolblau, Gibberellinsäure (GA3), Kanamycinsulfat, MOPS, MU, NAA, Rifampicin, Tetracyclin, Trizma-base (Tris).

Stratagene, Heidelberg: Lambda EMBL3/BamHI Vector Kit, Gigapack III Gold Packaging Extract.

Whatman, Maidstone, England: 3MM-Papier.



## 2.2 Plasmide und Vektoren

pBi101	Kan <sup>r</sup> (Jefferson et al., 1987)
pBin19	Kan <sup>r</sup> (Bevan, 1984)
pBluescript SK <sup>-</sup>	Cb <sup>r</sup> (Stratagene)
pUC19	Cb <sup>r</sup> (Yanisch-Perron et al., 1985)

## 2.3 Bakterienstämme

### *E.coli*-Stämme:

XL-1 Blue	(Bullock et al., 1987)
P2392	(Stratagene)
DH5 $\alpha$	(Bethesda Research Laboratories)

### *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm:

pGV 2216 in C58C1 (Deblaere et al., 1985).

## 2.4 Pflanzen

*Solanum tuberosum* L Varietät Desirée wurde bezogen von Vereinigte Saatzuchten eG Ebstorf.

*Solanum tuberosum* Klon BP 89/22 wurde bezogen von Bio Plant GmbH Ebstorf.

*Nicotiana tabaccum* L Samsun NN wurde bezogen von Vereinigte Saatzuchte eG Ebstorf.

## 2.5 Oligonukleotide

Das Oligonukleotid F-3 wurde zur Identifizierung des genomischen Klons der cyt FBPase verwendet. Das Oligo T-13 diente zur Identifizierung des genomischen Klons der Stärkephosphorylase P1. Das Oligo ME-15 wurde verwendet zur Feststellung des Transkriptionsstartpunkts der cyt FBPase und die Oligos ME-01 und ME-08 dienten zur Sequenzierung des cyt FBPase Promotors.

F-3:	5'- GAC AAG AAT GCA TGT TCG -3'
T-13:	5'- ATT TCA GAA GCA AAA ACT -3'
ME-01:	5'- CAG ATT AGA TAG CCC GG -3'
ME-08:	5'- GAG CCA GTG GCA GAG CAA -3'
ME-15:	5'- GAT AAA GCG TGA TCC AAT TCG -3'

### 3 Methoden

#### 3.1 Enzymatische Manipulation an Nukleinsäuren

Standardtechniken der molekularen Genetik wurden nach Sambrook et. al. (1989) durchgeführt.

##### 3.1.1 Erstellen einer genomischen Bank aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. Varietät Desirée)

Genomische DNA aus Kartoffel wurde nach dem Verfahren von Fulton et al. (1995) isoliert. 300 µg der genomischen DNA wurde mit Sau3A partiell verdaut und die Aliquots durch Auftrennung im Agarosegel bestimmt, in denen der überwiegende Teil der DNA über 10 kb groß war.

Durch Phenolisieren und Fällern wurde das Enzym entfernt. Um nur die DNA-Fragmente zu erhalten, die zwischen 12 und 20 kb groß waren, wurde die DNA in Ultrazentrifugenröhrchen auf einen Saccharosegradienten aufgetragen und mit 22000 U, bei 20°C, für 24 h in einem Ausschwingrotor SW40Ti in einer Ultrazentrifuge der Firma Beckmann zentrifugiert. Der Saccharosegradient wurde hergestellt, indem eine Lösung mit 20% Saccharose, 1 M NaCl, 20 mM Tris, pH 8,0, 5 mM EDTA in den Zentrifugenröhrchen eingefroren und anschließend im Kühlschrank aufgetaut wurde. Dabei baute sich ein Gradient auf. Bevor die DNA aufgetragen wurde, wurde sie für 10 min auf 65°C erhitzt und anschließend wieder auf RT abgekühlt.

Im Anschluß an die Zentrifugation wurden die Röhrchen mit Hilfe von Injektionsnadeln unten angestochen und Aliquots von etwa 300 µl gesammelt. Die, in denen die Fragmente zwischen 12 und 20 kb enthalten waren wurden über Nacht in 4 l 1 X TE bei 4°C dialysiert. Das Volumen wurde anschließend durch Ausschütteln mit 2Butanol bei Raumtemperatur auf 1 ml eingengt und die DNA anschließend einmal gefällt durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen Ethanol. Die DNA wurde wieder in Wasser aufgenommen und ein zweites Mal gefällt durch Zugabe von 1/3 Volumen 7 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol. Die Fällung erfolgte für eine Stunde auf Eis. Das Pellet wurde 10 min in der SpeedVac entsalzt und anschließend in etwa 50 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde durch Auftrag auf ein Agarosegel überprüft.

Anschließend wurden die Fragmente in *EcoRI/BamHI* vorgeschchnittene EMBL 3 Arme (Stratagene, Heidelberg) ligiert. Die Ligationsprodukte wurden mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Stratagene, Heidelberg) verpackt.

Die Anzahl der Phagen, die Inserts enthielten betrug 430000 in einem Milliliter Verpackungsextrakt. Die Bank wurde vollständig platiert und die Phagen nach 11 h bei 37°C abgeschwemmt. Der Titer der amplifizierten Bank war  $1 \times 10^5$  pfu/ $\mu$ l.

### 3.1.2 Durchmustern einer genomischen Bank

Die genomische Bank wurde in geeigneter Verdünnung ausplatiert. Die Phagen-DNA wurde nach Standardverfahren auf Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham Buchler) überführt und durch Inkubation bei 80 °C immobilisiert. Anschließend wurden die Membranen mit durch Standardtechniken radioaktiv markierten Sonden (Mega-Prime Kit, Boehringer Mannheim,  $\alpha^{32}$ p-dCTP, Amersham Buchler) in PEG/Formamid-Puffer (Amasino, 1986) bei 42 °C hybridisiert, zweimal gewaschen bei 42 °C in 0,1% SDS und 1 X SSC und danach autoradiographiert.

### 3.1.3 Isolierung von Phagen-DNA

Zur Isolierung von DNA aus Phagen wurden lytische Platten über Nacht angesetzt und anschließend das Phagenlysats abgeschwemmt. 450  $\mu$ l des Lysats wurden mit je einer Spatelspitze DNase I und RNase H versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5  $\mu$ l 0,5 M EDTA und 10  $\mu$ l 10% SDS zugesetzt und 30 min auf 70°C erhitzt. Dem Ansatz wurden dann 225  $\mu$ l 3 M Kaliumacetat pH 4,8 zugesetzt und die Lösung nach mischen fünf Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert, der Überstand mit einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und nach erneuter Zentrifugation die DNA im Überstand gefällt. Nach zweimaligem waschen des Pellets in 70% Ethanol wurde es in 100  $\mu$ l Wasser aufgenommen, auf 0,2 M Kaliumchlorid eingestellt und durch Zugabe von zwei Volumen Ethanol die DNA gefällt. Nach erneutem zweimaligen Waschen des Pellets in 70% Ethanol wurde es in 30  $\mu$ l TE/RNase aufgenommen.

### 3.1.4 Festlegung des Transkriptionsstartpunkts

Die Festlegung des Transkriptionsstartpunktes erfolgte am Automatic Laser Fluorescence DNA Sequenzer (ALF) von Pharmacia nach Herstellerangaben und wurde wie folgt durchgeführt. Gesamt RNA wurde aus source-Blättern extrahiert nach Logeman et al. (1987). 5  $\mu$ g der RNA wurden mit 10 pmol des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids ME-15 zusammengegeben und kurz bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mischung mit Ethanol gefällt, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 5  $\mu$ l 10 X Taq-Puffer von Promega gelöst.

Jedes Deoxynukleotid sowie deaza-dGTP (Boehringer) wurden zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Außerdem wurde DTT und Magnesiumchlorid in einer Endkonzentration von 10 mM, 5 U RNasin sowie 4 U Reverse Transcriptase „Superscript“ (Gibco) hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 48°C inkubiert, danach 1 µl 0,5 M EDTA, je 2 U RNase A und RNase H zugegeben und 30 min in 37°C gestellt. Dem folgte eine Extraktion mit Phenol:Chloroform (1:1) und eine Fällung der Nucleinsäuren. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 µl Wasser und 1 µl ALF Stop Puffer (Pharmacia) gelöst.

Die Analyse erfolgte am ALF, gleichzeitig wurde eine Sequenzreaktion des Promotorfragments mit dem Oligonukleotid ME-15 und eine Negativkontrolle, die ohne Reverser Transskriptase durchgeführt wurde, auf das PAA-Gel aufgetragen.

Die „Primer-Extension“ Reaktion ergibt am ALF nur ein Signal am Transkriptionsstart. Dieses entspricht einem Signal der parallel gelaufenen Sequenzreaktion.

## **3.2 Transformationen**

### **3.2.1 Bakterientransformation**

*Escherichia coli* wurde nach Hanahan (1983) transformiert.

*Agrobacterium tumefaciens* wurde durch die Gefrier-Tau Methode nach Höfgen und Willmitzer (1988) transformiert.

### **3.2.2 Pflanzentransformation und Gewebekultur**

#### **3.2.2.1 Gewebekultur**

Tabakpflanzen in axenischer Kultur wurden auf 2MS (MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962) mit 2% (w/v) Saccharose) mit 0,8% (w/v) Bacto-Agar und entsprechenden Hormonen und Antibiotika in Kulturkammern mit 28 °C, 60% Luftfeuchtigkeit, 450 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Lux und 16/8 h LD Rhythmus gehalten.

Kartoffelpflanzen wurden bei 22 °C und 50 % Luftfeuchte bei gleichem hell/dunkel Rhythmus gehalten.

### 3.2.2.2 Pflanzentransformation

Pflanzentransformation erfolgte durch *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58C1, pGV2260) vermittelten Gentransfer. Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L Desirée) wurden nach der Methode von Rocha-Sosa et. al. (1989) transformiert. Die Transformation von Tabak (*Nicotiana tabaccum* L Samsun NN) erfolgte wie bei Rosahl et al. (1987) beschrieben. Die regenerierten Pflanzen wurden auf Proteinebene auf funktionale Transformation getestet. Positive Pflanzen wurden durch Stecklinge in Sterilkultur in Kultur gehalten, anschließend zur weiteren Analyse in Erde gepflanzt und ins Gewächshaus überführt.

### 3.3 Pflanzenhaltung

Tabakpflanzen wuchsen im Gewächshaus bei 28 °C, 60 % Luftfeuchte bei 16 h Licht (ca. 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 8 h Dunkel heran.

Kartoffelpflanzen wurden im Gewächshaus bei 21 °C und 60 % Luftfeuchte bei 16 h Licht (ca. 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 15 °C bei 8 h Dunkelheit gehalten.

### 3.4 Analyse von DNA: „Southern-Blot“

Pflanzliche DNA wurde nach Fulton et al. (1995) isoliert, bakterielle DNA wurde nach Sambrook et al. (1989) isoliert. Nach entsprechender Restriktionsspaltung wurde die DNA auf Agarosegelen aufgetrennt und durch Kapillartransfer auf Hybond-N Membranen (Herstellerprotokoll) überführt. Die Hybridisierung in PEG-Puffer mit 50% Formamid (Amasino, 1986) erfolgte über Nacht bei 42°C. Gewaschen wurde die Membran bei 42°C, 58°C, und 65°C in 0,1% SDS und 0,1 X SSC für jeweils 20 min. Als Sonde diente die gesamte cDNA der cytosolischen bzw. der plastidären FBPase aus Kartoffel.

### 3.5 Analyse von RNA: „Northern-Blot“

Pflanzliche RNA wurde nach Logemann et al. (1987) isoliert. Nach Denaturierung wurde die RNA in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (Lehrbach et al., 1977) und durch Kapillartransfer auf Hybond-N Membranen übertragen und wie in Kapitel 3.4. beschrieben hybridisiert. Gewaschen wurde die Membran bei 42°C in 0,1% SDS und 0,1 X SSC für 20 min. Als Sonde diente die gesamte cDNA der cytosolischen FBPase aus Kartoffel beziehungsweise ein 5' 600bp *HincII* Fragment der  $\beta$ -Glucuronidase aus *E. coli*.

### 3.6 Analyse von Proteinen

Proteine wurden in den jeweils angegebenen Puffern extrahiert. Der Proteingehalt der Extrakte wurde nach Bradford (1976) mit dem BioRAD Proteinassay bestimmt.

#### 3.6.1 Detektion von $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität

Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität wurden wie bei Jefferson et al. (1987) beschrieben durchgeführt. Als Substrat wurde 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (MUG) verwendet. Für die Messungen wurde ein Lumineszenzspektrometer LS50B der Firma Perkin-Elmer verwendet.

Histochemische  $\beta$ -Glucuronidase-Färbungen mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid (X-Gluc) wurden wie beschrieben bei Martin et al. (1992) durchgeführt. Die gefärbten Objekte wurden in einer Ethanol-Konzentrationsreihe entfärbt wie bei Martin et al. (1992) beschrieben, oder mit Hilfe von Lactophenol/Chloralhydrat, wie beschrieben von Beeckman und Engler (1994).

Um Hintergrundaktivität in Blüten und Knospen zu unterdrücken wurde hier die Färbelösung mit 30% Methanol versetzt. In Färbungen von Wildtypknospen mit und ohne Methanol in der Lösung wurde gezeigt, daß tatsächlich vorhandene Aktivität bei Zugabe von Methanol nicht auftrat. Die Spezifität der Reaktion in den transgenen Pflanzen wurde durch Methanol nicht beeinflusst.

#### 3.6.2 Bestimmung der Aktivität der cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase

Für die Bestimmung der Aktivität der cytosolischen FBPase wurde Pflanzengewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in folgendem Puffer homogenisiert: 50 mM HEPES-KOH, pH 7,4; 5 mM  $MgCl_2$ ; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF; 2 mM DTT; 0.1% Triton X-100; 10% Glycerol. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 4°C in einer Heraeus Biofuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entsalzt, indem 200  $\mu$ l des Extrakts durch 4 ml in Extraktionsmedium equilibriertes Sephadex G25 Medium zentrifugiert wurde. Die Messung der cytosolische FBPase wurde bei 25°C in einem Endvolumen von 800  $\mu$ l durchgeführt (nach Kelly et al., 1982). Der Reaktionspuffer bestand aus 100 mM Imidazol-HCl, pH 7,1; 5 mM  $MgCl_2$ ; 250  $\mu$ M NADP; 1 unit Phospho-Glukose Isomerase aus Hefe; 1 unit Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase aus Hefe; pro Messung wurden 50  $\mu$ l entsalzter Proteinextrakt eingesetzt. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von Fruktose-1,6-bisphosphat zu einer Endkonzentration von 60  $\mu$ M.

Die Messungen erfolgten an einem Photometer Uvikon 930 der Firma Kontron bei 334 nm.

### 3.7 Bestimmung von löslichen Zuckern und Stärke

Für die Bestimmung von Stärke und löslichen Zuckern wurden Gewebestücke von 1 cm<sup>2</sup> zweimal für 1 h in 500 µl 80 % Ethanol mit 10 mM HEPES pH 7,5 bei 80 °C extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und für die Bestimmung von Fruktose, Glukose und Saccharose verwendet. Die Bestimmung erfolgte über einen gekoppelten optischen Test wie bei Stitt et al. (1989) beschrieben.

Zur Stärkebestimmung wurden die extrahierten Gewebestücke in 400 µl 0,2 N KOH homogenisiert und für mindestens eine Stunde bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 70 µl 1 N Essigsäure der pH-Wert auf 5,5 bis 6,0 eingestellt. Die Stärkebestimmung wurde unter Verwendung eines Sortiments zur Stärkebestimmung (Boehringer, Mannheim) nach Herstellerangaben zunächst mit Amyloglukosidase hydrolysiert und anschließend die freigesetzte Glukose enzymatisch bestimmt.

### 3.8 Bestimmung der Stoffwechselflüsse

#### 3.8.1 Markierung von Blattscheiben mit <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in der Sauerstoffelektrode

Blattscheiben von Tabak (4-5, Ø 0,9 cm) wurden nach zwei Stunden Belichtungsdauer in einer feuchten, lichtundurchlässigen Dose gelagert und sukzessive in eine Blatt-Sauerstoffelektrode (Hansatech, Kings Lynn, London) gelegt. In der Sauerstoffelektrode befand sich eine Lösung aus 2 M KHCO<sub>3</sub>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,0 und <sup>14</sup>C-KHCO<sub>3</sub>, wodurch eine gesättigte CO<sub>2</sub> Atmosphäre (5-10%) entstand. Die Scheiben wurden 5 min im Dunkeln belassen und danach 20 min mit Licht sättigend (650 mmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>) bestrahlt. Die Sauerstoffentwicklung wurde an einem Schreiber aufgezeichnet. Nach Inkubation wurden die Scheiben in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 3.8.2 Messung der Photosyntheserate in der Sauerstoffelektrode und Bestimmung der Stoffwechselflüsse

Die Messung der Photosyntheserate wurde durchgeführt wie bei Quick et al. (1989) beschrieben.

Die Stoffwechselflüsse wurden bestimmt, indem der Einbau in die unlösliche sowie die lösliche neutrale, anionische und kationische Fraktion bestimmt wurde. Die Fraktionierung der löslichen Bestandteile erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie. Die ethanolischen

Extrakte wurden nach der Einengung und Aufnahme in Wasser auf Kationenaustauschsäulen gegeben und der Durchlauf auf Anionenaustauschsäulen. Die neutrale Fraktion konnte mit Wasser aus beiden Säulen eluiert werden, die kationische Fraktion wurde mit 5 M Ammoniaklösung eluiert und die anionische Fraktion mit 2 M Salzsäure. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines Szintillationszählers. Unter den gewählten Bedingungen verhielten sich Aminosäuren wie Kationen, organische Säuren wie Anionen (Quick et al., 1989).

Zur Bestimmung der unlöslichen Fraktion, die im wesentlichen Stärke repräsentiert, wurden die Blattscheiben aus der Sauerstoffelektrode nach der ethanolischen Extraktion homogenisiert und die eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen (Quick et al., 1989; Krause, 1994)

### **3.9 Mikroskopie**

Für mikroskopische Analysen wurde ein Axiophot-Photomikroskop der Firma Zeiss (Oberkochen) sowie ein Makroskop der Firma Wild Leitz (Heerbrugg, Schweiz) eingesetzt. Für fotografische Aufnahmen wurden Fujichrome RTP 135 64-T Filme der Firma Fuji verwendet.



## 4 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, einen starken, mesophyllspezifischen Promotor zu isolieren und zu charakterisieren. Die bisher klonierten Promotoren, die Expression vor allem im Blatt vermitteln stammen von Genen, die an der Photosynthese beteiligt sind.

Die photosynthetische Saccharosebiosynthese ist ein Stoffwechselprozeß, der überwiegend im Blatt stattfindet. Daher wurde der Promotor eines an der photosynthetischen Saccharosebiosynthese beteiligten Gens untersucht. Analysiert wurde der Promotor der cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase (cyt FBPase). Die cyt FBPase katalysiert den ersten regulierten Schritt in der photosynthetischen Saccharosebiosynthese. Der Promotor wurde für die Analyse mit dem Markergen  $\beta$ -Glucuronidase (GUS, Jefferson et al., 1987) fusioniert und in Pflanzen übertragen. GUS ermöglicht sowohl einen quantitativen als auch einen histochemischen Nachweis. Es wurde die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression, sowie die Expression unter Einfluß verschiedener Umweltparameter untersucht.

### 4.1 Kopienzahl der cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase-Gene im Genom von Kartoffelpflanzen

Um zu untersuchen, wie hoch die Kopienzahl des Gens für cyt FBPase im Genom von Kartoffelpflanzen ist, wurde eine „Southern-Blot“ Analyse durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA aus der dihaploiden Kartoffel *Solanum tuberosum* Klon 89/22 extrahiert. Jeweils 10  $\mu$ g der genomischen DNA wurde in getrennten Restriktionsansätzen mit den Enzymen *EcoRI*, *HindIII* und *EcoRI/HindIII* verdaut, in einem 1% igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nylon-Membran transferiert und gegen die radioaktiv markierte cDNA der cyt FBPase hybridisiert. Die cDNA der cyt FBPase enthält keine *HindIII*- und keine *EcoRI*-Schnittstellen. Bei den Untersuchungen über die Expression der cyt FBPase in Kartoffel fand Zrenner (1993) Kreuzhybridisierung zwischen den Nukleinsäuresequenzen der cytosolischen und der plastidären Isoform. Um festzustellen, welche der Signale in der „Southern-Blot“ Analyse von der Kreuzhybridisierung mit der pl FBPase verursacht werden, wurde der Southern-Blot nach vollständiger Entfernung der radioaktiven cyt FBPase Probe mit der cDNA der pl FBPase hybridisiert. Die cDNA der pl FBPase enthält keine Schnittstelle für *EcoRI* und eine Schnittstelle für *HindIII* bei Basenpaar 1319, bei einer Gesamtlänge von 1,4 kb.

Die Ergebnisse der „Southern-Blot“ Analysen sind in Abbildung 1 (A) und (B) dargestellt. Abbildung 1 (A) zeigt die „Southern-Blot“ Analyse der cyt FBPase. Die durch Verdau mit

*EcoRI* erzielten Signale in Spur 1 repräsentieren Fragmente der Größen 10 kb, 4,5 kb, 3,9 kb und 3,5 kb. Die Restriktion der DNA mit *HindIII* (Spur 2) führt zu Fragmenten der Länge 6 kb, 3,7 kb, 3,1 kb und 1,7 kb. Spur 3 zeigt die Signale, die durch Verdau der genomischen DNA mit *EcoRI* und *HindIII* entstanden sind. Sie repräsentieren Fragmente von 4,3 kb, 2,7 kb, 1,9 kb und 1,7 kb Größe.

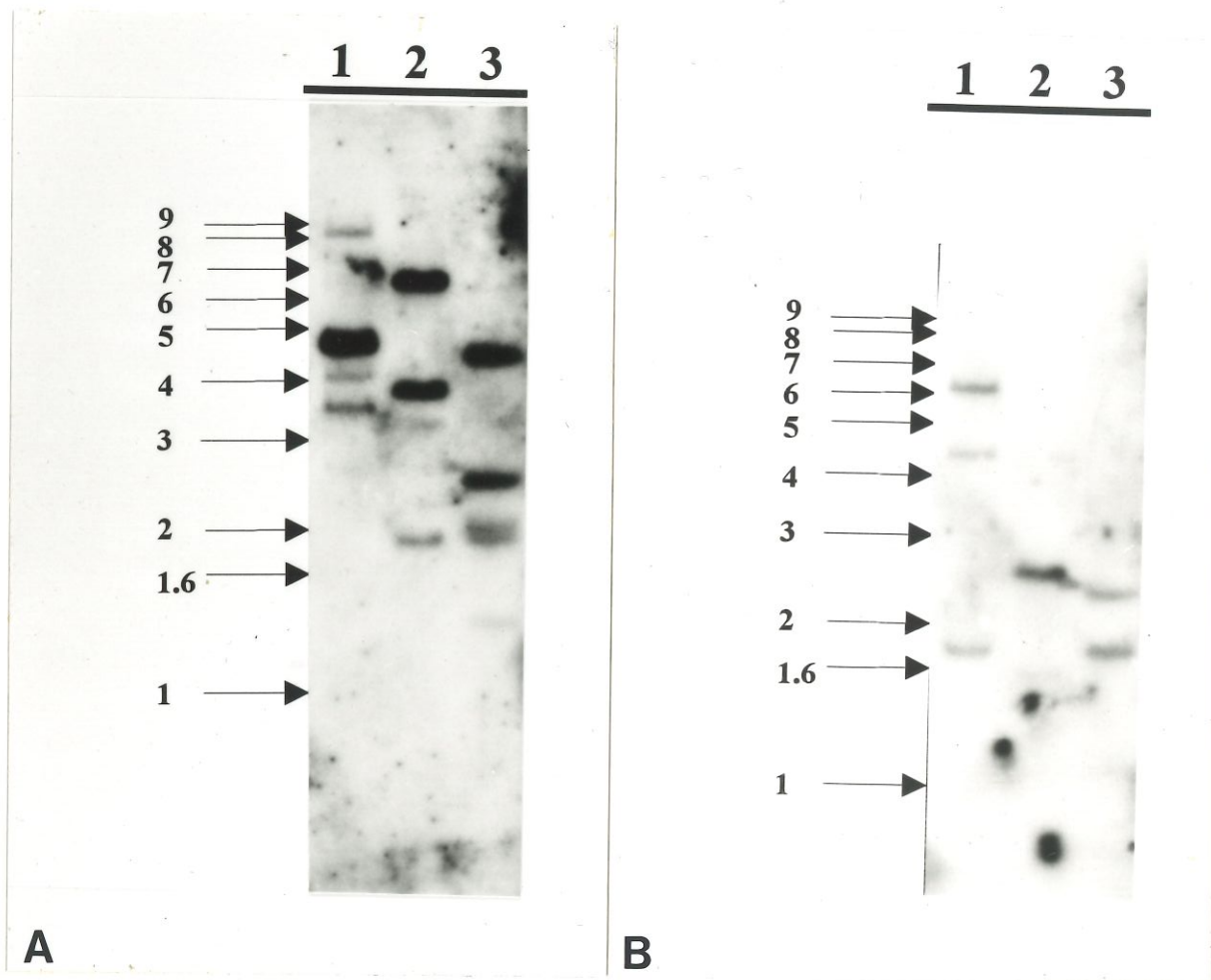


Abb. 1: „Southern-Blot“ Analyse der cyt FBPase (A) und pl FBPase (B) im Genom des dihaploiden Kartoffelklons 89/22. Genomische DNA wurde extrahiert, in einem 1% igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Pro Spur wurden 10 µg DNA aufgetragen. Spur 1: genomische DNA gespalten mit *EcoRI*, Spur 2: Genomische DNA gespalten mit *HindIII*, Spur 3: genomische DNA gespalten mit *EcoRI/HindIII*. Der Blot wurde hybridisiert mit radioaktiv markierter cDNA der cyt FBPase (A), beziehungsweise der radioaktiv markierten cDNA der pl FBPase (B). Die Pfeile markieren die Höhe der Fragmente des mitaufgetrennten Größenstandards in Kilobasen.

Die Hybridisierung des Blots mit der cDNA der pl FBPase (Abb. 1 (B)) ergibt in Spur 1 Fragmentgrößen von 5,8 kb, 4,3 kb und 1,8 kb. Der Verdau mit *HindIII* führt zu einem Signal, welches ein Fragment von 2,3 kb repräsentiert (Spur 2). Der Doppelverdau mit *EcoRI* und *HindIII* (Spur 3) ergibt Fragmente von 2,2 kb und 1,8 kb.

Die „Southern-Blot“ Analyse zeigt, daß im Genom der Kartoffel wenige Kopien der cyt FBPase vorliegen.

## 4.2 Isolierung und Klonierung eines cyt FBPase-Promotors

### 4.2.1 Durchmustern einer genomischen Kartoffel-Bank nach cytosolischer Fruktose-1,6-bisphosphatase Promotorsequenzen

Eine genomische Bank der Kartoffelsorte Desirée wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben angelegt.

Die genomische Bank wurde verwendet, um Promotorsequenzen der cyt FBPase zu finden. Dazu wurden 300000 rekombinante Phagen mit Hilfe der radioaktiv markierten cDNA der cyt FBPase durchmustert und 9 positiv reagierende Phagenplaques identifiziert. Sechs Plaques konnten in der nachfolgenden Plaqueeinzelung als positive Phagen isoliert werden. Sie wurden als CF-1 - CF-6 bezeichnet. Mit den Phagenklonen wurden „Southern-Blot“ Analysen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß alle 6 Klone identisch waren. Es konnte in einer zweiten Durchmusterung der Bank kein Phagenklon isoliert werden, der sich von den zuerst gefundenen unterschied. Es wurde daher nur der Klon CF-1 weiterbearbeitet.

### 4.2.2 Klonierung eines Promotors der cytosolischen FBPase

Der Phagenklon CF-1 wurde *BamHI* geschnitten und im „shot-gun“ Verfahren in den Plasmid-Vektor pUC19 subkloniert. Die Identifizierung positiver Subklone erfolgte über eine Kolonihybridisierung, wobei als radioaktive Sonde die gesamte cDNA der cyt FBPase verwendet wurde. In der nachfolgenden Analyse der positiven Kolonien durch Restriktionsspaltung und Auftrennung in einem Agarosegel wurde der Klon mit der längsten Insertion von ungefähr 7,2 kb ausgewählt (genannt: FB-19). Durch Ansequenzierung des Klons mit Hilfe eines synthetischen Oligonukleotids, das von Zrenner (1993) zur Sequenzierung der cDNA verwendet worden war, konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem genomischen Klon um eine cytosolische FBPase handelte. Die Übereinstimmung mit der cDNA in den sequenzierten etwa 300 bp betrug 100%.

Die Plasmid-DNA des Klons FB-19 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und im „Southern-Blot“ Verfahren analysiert. Als Sonde dienten die 5'- 342 bp (*HincII/EcoRI*) und 3'- 216 bp (*EcoRI/EcoRV*) Subfragmente der cDNA der cyt FBPase. Es wurde eine grobe Restriktionskarte angelegt und mit Hilfe der Hybridisierung der „Southern-Blots“ mit den 5'- und 3'- Fragmenten der cDNA der cyt FBPase konnte die ungefähre Lage des Promotorbereichs auf dem Subklon identifiziert werden (Abb. 2).

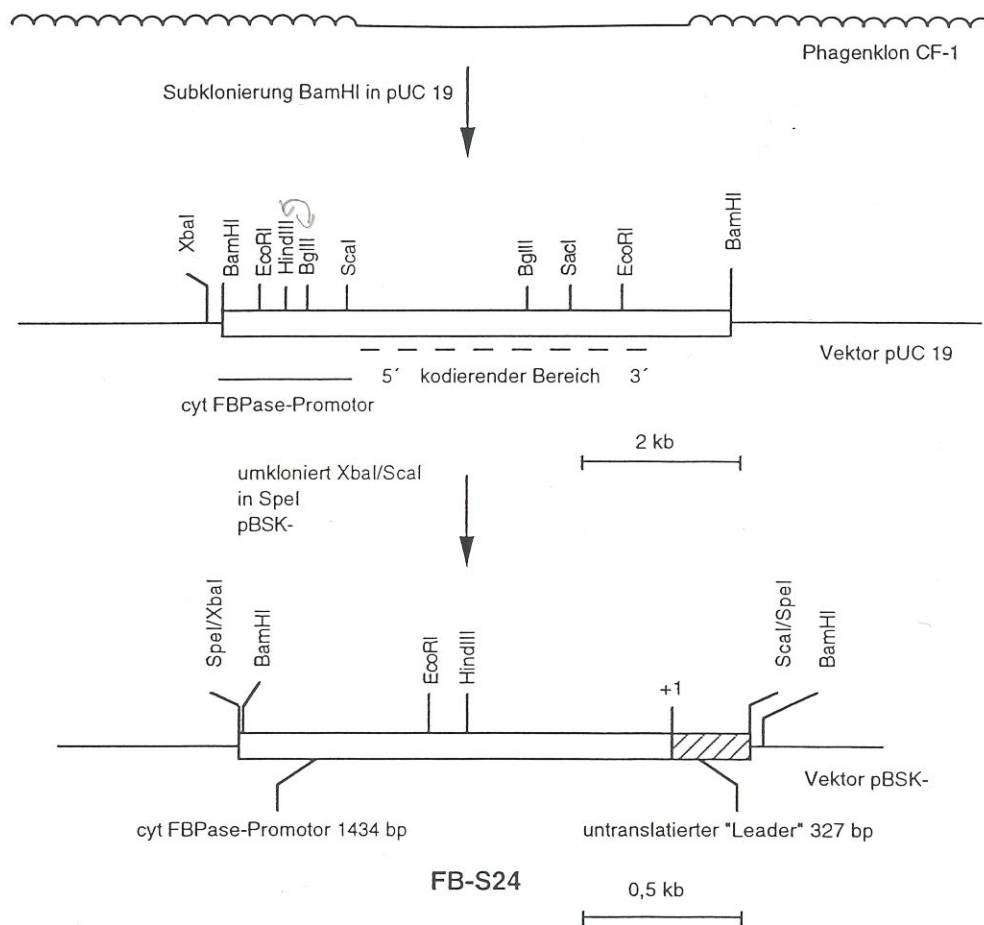


Abb. 2: Klonierung eines Promotorfragments der cyt FBPase aus genomischer DNA von Kartoffel *Solanum tuberosum* L Desirée. Ausgehend von einem genomischen Phagenklon wurde ein etwa 7,2 kb umfassendes *BamHI* Fragment in den Vektor pUC19 subkloniert. Durch Restriktionsspaltungen und „Southern-Blot“ Analyse wurde eine grobe Restriktionskarte erstellt und die Lage des Promotors ermittelt. Das Promotorfragment, etwa 1,7 kb umfassend, wurde *Scal/XbaI* von der kodierenden Region getrennt und nach auffüllen der Enden in einen *SpeI* vorgeschneittenen und ebenfalls aufgefüllten pBSK<sup>-</sup>-Vektor ligiert.

Die Promotorregion umfaßte etwa 1700 bp. Aus der Sequenz der cDNA der cytosolischen FBPase (Zrenner, 1993) war bekannt, daß das Restriktionsenzym *ScaI* im nicht kodierenden 5'-Bereich der cDNA schneidet. Im genomischen Klon FB-19 war eine singuläre *ScaI*-Schnittstelle zu finden. Durch die Sequenzinformation über den genomischen Klon konnte gezeigt werden, daß es sich hierbei um die der cDNA entsprechende Schnittstelle handelte. Sie wurde benutzt, um den Promotorbereich von der kodierenden Region abzutrennen. Dazu wurde die Promotorregion *XbaI/ScaI* aus dem Klon FB-19 ausgeschnitten, die Enden aufgefüllt und in den Vektor pBSK<sup>-</sup> ligiert, der zuvor *SpeI* geschnitten und aufgefüllt worden war. Dieser Subklon wurde FB-S24 genannt.

#### 4.2.3 Sequenzanalyse des Promotorfragments der cyt FBPase

Von dem Klon FB-S24 wurden Subklone erstellt, um den Promotorbereich vollständig sequenzieren zu können. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der von Pharmacia erworbenen Primer „uni“ und „revers“, sowie der Primer ME-01 und ME-08 am Automatic Laser Fluorescence DNA Sequenzer (A.L.F.) von Pharmacia. In Abbildung 3 ist die Sequenzierungsstrategie dargestellt.

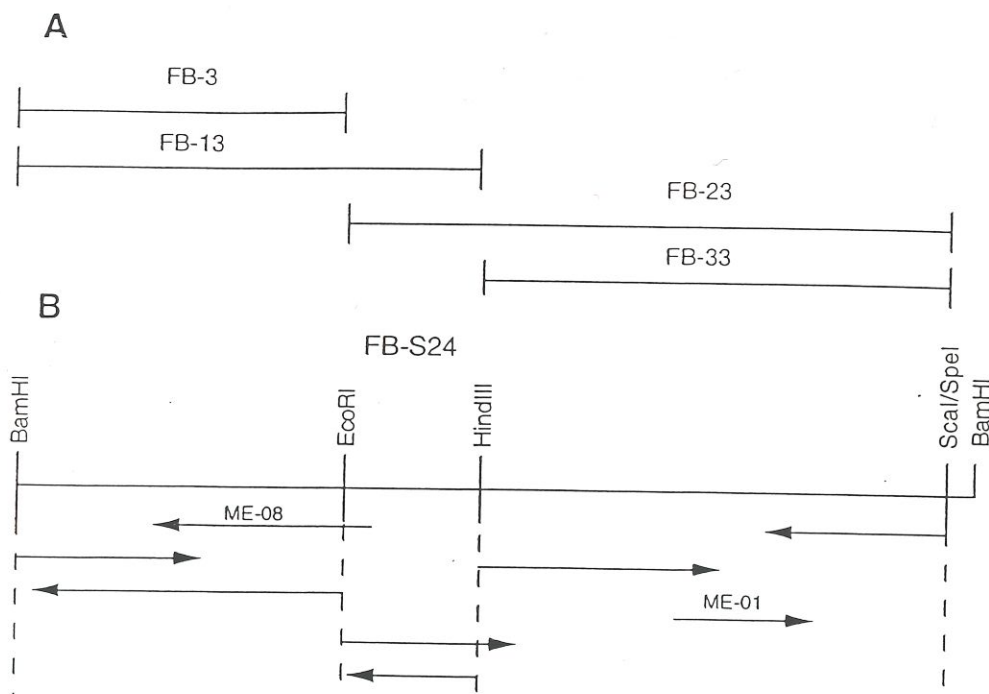


Abb. 3: Strategie zur Sequenzierung des Promotors der cyt FBPase aus Kartoffel. Von dem Promotorfragment FB-S24 wurden Subklone im Vektor pUC19 erstellt und mittels der Primer „uni“, „revers“, ME-01 und ME-08 am A.L.F. sequenziert. In A sind die Fragmente dargestellt, in B die sequenzierten Bereiche. Die Sequenzierung wurde mit jedem möglichen Fragment durchgeführt.

Die vollständige Sequenz ist in Abbildung 4 dargestellt. Der Transkriptionsstart wurde mit Hilfe von „Primer Extension“ am A.L.F. festgelegt. Dazu wurde ein Oligonukleotid angefertigt, das zu einer GC-reichen 21 bp langen Region im Promotor von +150 bis +171 komplementär ist. Mit Hilfe dieses Primers wurde einzelsträngige cDNA aus source-Blättern der Kartoffel doppelsträngig gemacht. Dabei wurde fluoreszenzmarkiertes dCTP verwendet. Die nicht durch den Primer erkannte, einzelsträngig gebliebene cDNA wurde anschließend verdaut. Die cDNA wurde dann am A.L.F. gleichzeitig mit der mit dem gleichen Primer sequenzierten Promotor DNA analysiert. Der Transkriptionsstart konnte durch Vergleich der Signale im Sequenzgel identifiziert werden. Er ist in Abbildung 4 überschrieben mit +1.

Der in ME-1 klonierte DNA-Abschnitt umfaßt demnach 1434 bp Promotorregion und 295 bp 5' untranslatierten Bereich der *cyt* FB Pase. 28 bp oberhalb des Startpunktes konnte eine TATA-Box-Sequenz (Breathnach und Chambon, 1981) gefunden werden („TTATAAA“), sowie 136 bp oberhalb des Startpunktes eine CCAAT-Box („ATCATCCAAACAT“) (Kreidberg und Kelly, 1986). Außerdem wurden drei invertierte und sieben direkte Sequenzwiederholungen festgestellt, die keine Homologien zu Sequenzwiederholungen aufweisen, die in anderen Promotoren gefunden wurden. Sie wurden in der Abbildung nicht markiert. Zusätzlich wurden zwei 10 bp umfassende fast identische palindromische Sequenzabschnitte identifiziert, die je zweimal das Motiv TGCA enthalten. Dieses Motiv liegt im Gegenstrang als ACGT vor, einer Box, die von verschiedenen Arbeitsgruppen als regulatorische Sequenz (Guliano et al., 1988; Blecken et al., 1994; Kwon et al., 1994) und als Bindestelle für DNA-bindende Leucin-Zipper-Proteine (Armstrong et al., 1992; Izawa et al., 1993; Frohberg, 1994) identifiziert worden ist. Die Bindung von Leucin-Zipper-Proteinen ist durch die Orientierung des Motivs wahrscheinlich nicht beeinflusst. Ob die Bindeproteine dort eine regulatorische Funktion haben können, bedarf weiterer Untersuchungen. Diese Sequenzen sind durch punktierte Unterstreichung markiert.

Der in ME-11 klonierte DNA-Abschnitt umfaßt 815 bp der Promotorregion der *cyt* FB Pase und die 295 bp der 5' untranslatierten Region.

-1434	GGATCCAGCT AATGCTGCTC TTGTCACTCA AAATGATGGT ATCCCTCTCG	50
-1384	TCATCCAGTG TTTGTCAAGT CCTGTTAGGA ACACAGTAAG GATATAAACA	100
-1334	AACATTTTGT GGTCTTCTTG GTTATTGAGT GCTTGCTGTT CACTTGTTAA	150
-1284	AATTGCACAT ATACGTAGTG AGAAACTCAA CTGTTGAGTA CCATTGATCC	200
-1234	GTCAATCTTG TCGATAACTT TGATAAGGAT ATTTCAGGCA TCAGACATGT	250
-1184	CACCTCTATA GAACTTGGTC TTTTTTTT <u>TTA</u> AAAATAAAAA TAA <u>AA</u> ATGTT	300
-1134	TGGCATCATA CGAACTTCTG T <u>TACTTT</u> AGG CTGTATCCAG AATAAAATGT	350
-1084	TGTTTCCTCA TTCTGGAATT AGTTGTTTTG CACACGGAAG ACTTTCGAAA	400
-1034	TTACTAATT GTGTTCGTCC GTCTCAA <u>ACT</u> GGCTCACACT TTGGTGGTCA	
-984	ATTTTACTTC TCAAGGTAAG CAATTACAGA ATATGAATGT CGCTCTCCTC	500
-934	ATATTTATCC GAACAATAAA AAATGATATC TGTTTGCATA <u>TGCATGT</u> AGA	
-884	TCACACACCC CCCCCCCCC CGCCCCTAGA TTCCCTCGAT TTAGATTAAA	600
-834	TATAATCATC TACAAGAATT CCGTTGGGCT TCATTATGTG TTTTACATA	
-784	TTCGTTTCTG AACCACCCCC ACCCCGGTGA AAAACATTGC TCTGCCACTG	700
-734	GCTCAATGTA TTGACACAAA TGA <u>ACTT</u> CAA ACTGGGCAGG TGAATTATGC	
-684	TCTAGGAGCA TTGTATTATC TATGCAATGC ATCAAACAAG GAAGAGATCT	800
-634	TAAAGCCAGA AGTAATTGAT GCAATCAAAA GTTATGCAGC <u>TGCAGGT</u> GGA	
-584	GTTAGTACAA GCTTCAGTAA TTTGGCTCAG GCTTTCTTAG ATCAACATGT	900
-534	TCCTCAGCTT AATTAAAATG GAGGAAACCA AAGATTATGT TGTA <u>AA</u> ATCA	
-484	TTTTCTATCC TAGATGATGG TCTATCGGAA ACAATTTATT TATTACTCCT	1000
-434	ATCCAATTCA TTATATTTTC AAAAGTTATG AAGTCCACGA AATATGTGAC	
-384	GTGGGTAAAG AAGACCCATG CCAAGCCAGT GGGATATAGA AACAAAACAT	1100
-334	GTAATAAAGA GAACAAATAA TGAGTTTCGA AAAGAACAGA AGTTAGCATA	
-284	AGGACGAGAA TCACATTATC TTAGGTGCCA ACCACTAATC CTATGTATCA	1200
-234	TTCTCCTCTT TCCACGTGTC ATCCTACACT TCCTTTGCCA TCAGATTAGA	
-184	TAGCCCGGTT AGTACCTACA CTGTATATCA AAAAATACGT AAC <u>AAT</u> CATC	1300
-134	<u>CAAACAT</u> ATC ATCGATCAAA GGATATTTAT CTTGATGTGC TTTCGCCGTC	
-84	CATTGTAACG AGTTTGGATG AATTTGATAT ACACCCACTC AGATATCAAT	1400
-34	ATATTTTATA <u>AAAAG</u> AAACA AAATTGAATA CTAGT	
+1	A <sup>+1</sup> ATATCTATG TAGATATTTA TTTTTTCAAC AATCCTGTAA GTTATAAGGA	
+51	TAACTCACTT ATATGTGACG TGGATAATGA AGAGCTAGGC AGGCAGTGAG	

```

+101      AGATAGAAAC AAATTAAGCA GAGACGAAAA ACAAATCAGT TAACAGAATG
+151      ACGAATTGGA TCACGCTTTA TCTTAGTGCC AACCACTGAT CCCATGCATC
+201      ACTCTGCTCT TTCCACGTGG CATCCTCTGA CGTCAGATCA GATTCTCTTT
+251      CTTTCTTTTT TTTTCTGTA TATATATGAG CATTTTAGT AGGT -3' +294

```

Abb. 4: DNA-Sequenz der im ME-1 Konstrukt klonierten cyt FBPase-Promotorregion aus Kartoffel.

Die Abbildung zeigt den gesamten klonierten Bereich. Durch +1 gekennzeichnet ist der Transkriptionsstart des Promotors. Hervorgehoben durch doppelte Unterstreichung ist die „TATA“-Box, 23 bp aufwärts vom Transkriptionsstart, sowie durch einfache eine „CCAAT“-Box, die sich von Position -130 bis -142 erstreckt. Durch punktierte Unterstreichungen sind zwei palindromische Sequenzabschnitte von -900 bis -890 und von -600 bis -590 markiert.

#### 4.2.4 Fusion des cytosolischen FBPase-Promotors mit der kodierenden Region des *Escherichia coli* $\beta$ -Glucuronidase-Gens

Um die durch den Promoter vermittelte Expression analysieren zu können, wurde er mit dem Markergen  $\beta$ -Glucuronidase fusioniert. GUS-Aktivität läßt sich in einem fluorimetrischen Nachweis einfach quantifizieren. Zusätzlich läßt sich GUS-Aktivität histochemisch nachweisen. Dies ermöglicht es festzustellen, in welchen Geweben und Zellen der Promotor aktiv ist (Jefferson, 1987).

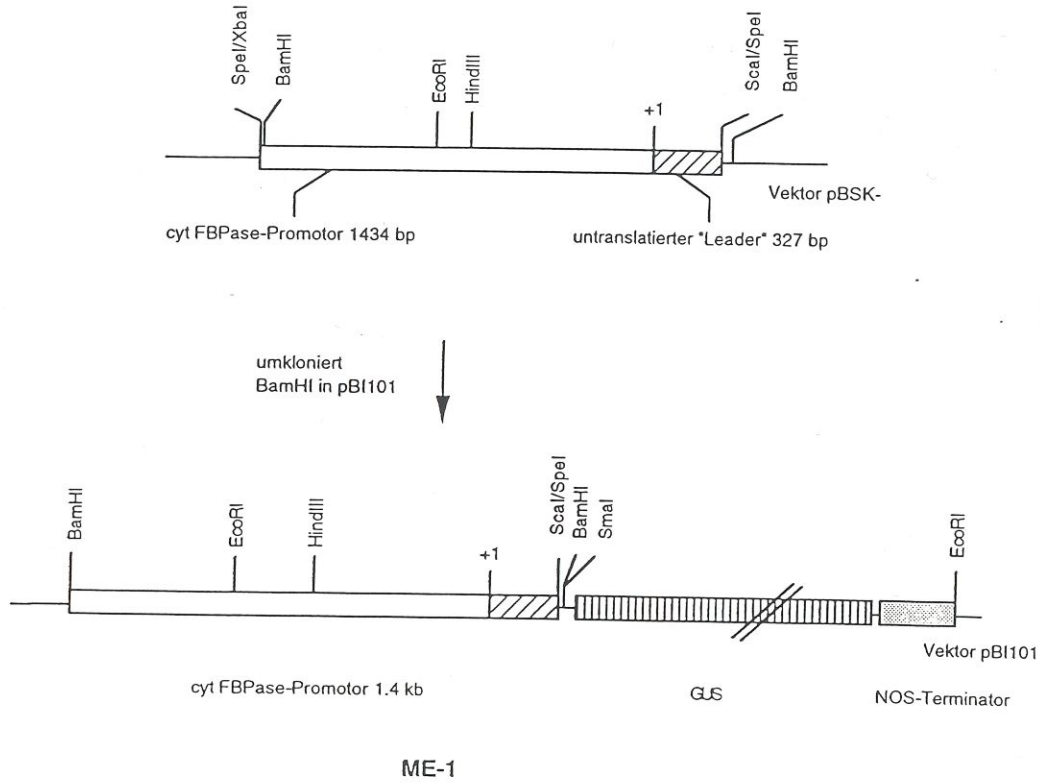
Aus dem Subklon FB-S24 wurde der Promotorbereich als *Bam*HI Fragment ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pBI101 (Jefferson et al., 1987) in die *Bam*HI Schnittstelle ligiert (transkriptionale Fusion). Dieser Vektor enthält die kodierende Region des *E. coli*  $\beta$ -Glucuronidase-Gens sowie die Terminationssequenz des Nopalinsynthase-Gens (NOS-Gen) des Ti-Plasmids aus *Agrobacterium tumefaciens*. Die richtige Orientierung des Fragments im pBI101 wurde mittels Spaltung mit *Eco*RI/*Xba*I überprüft. Dieses Konstrukt wurde ME-1 genannt. Das Konstrukt ME-1 wurde zur Agrobakterium vermittelten Transformation von *Nicotiana tabaccum* Samsun NN und *Solanum tuberosum* L Desirée verwendet. Die Pflanzen wurden TME-1 (Tabak) beziehungsweise KME-1 (Kartoffel) genannt. Die Klonierungsstrategie für die Konstruktion der Promotor-GUS-Fusion ist in Abbildung 5 (A) wiedergegeben.

Vom Konstrukt ME-1 wurde zusätzlich ein Deletionsklon angefertigt, der etwa 1100 bp der Promotorsequenz umfaßt. Dazu wurde aus dem Klon ME-1 mittels *Eco*RI-Verdau ein Fragment ausgeschnitten, das das GUS-Gen, den NOS-Terminator sowie 1100 bp des Promotors umfaßt. Dieses Fragment wurde isoliert, gereinigt und in die *Eco*RI Schnittstelle des Vektors pBin19 (Bevan, 1984) ligiert (Abb. 5 (B)). Die Orientierung des Fragments im pBin19 wurde durch Spaltung mit *Bam*HI überprüft. Dieser Deletionsklon wurde ME-11 benannt und



ebenfalls zur Transformation von Tabak- und Kartoffelpflanzen verwandt. Die aus dieser Transformation hervorgehenden Pflanzen wurden TME-11 beziehungsweise KME-11 genannt.

A



327?  
Seq → 294

B

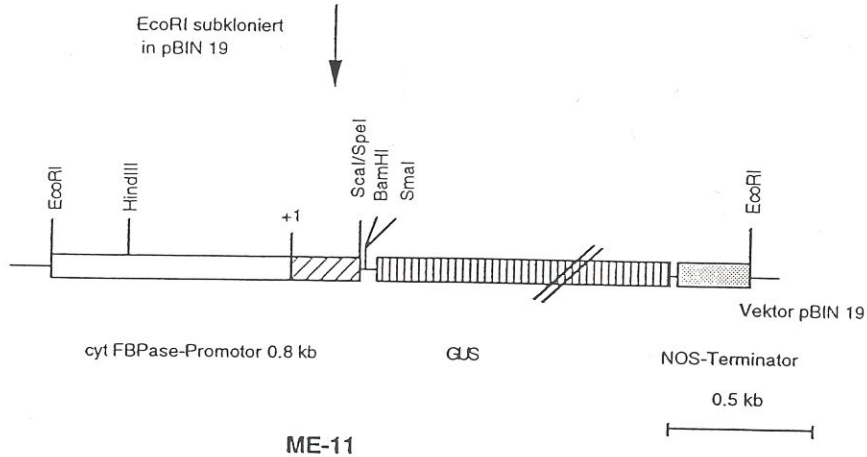


Abb. 5: Fusion des cytosolischen FBPase-Promotorfragments mit der kodierenden Region des GUS-Gens aus *E. coli* (A), sowie Klonierung eines Deletionsklons des Promotorfragments (B). Aus dem in Abbildung 2 dargestellten Klon FB-S24 wurde das 1,7 kb umfassende Promotorfragment als *BamHI*-Fragment ausgeschnitten und in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektor pBI101 kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde ME-1 genannt (A). Aus diesem ME-1 Konstrukt wurde ein *EcoRI*-Fragment ausgeschnitten und in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektor pBin19 kloniert. Das Deletionskonstrukt umfaßt etwa 1,1 kb der Promotorsequenz und wurde ME-11 genannt (B).

### 4.3 Erste Analyse der Primärtransformanden

Auf Tabakpflanzen *Nicotiana tabaccum* der Varietät SNN wurden durch Agrobakterien vermittelte Transformation nach Rosahl et al. (1987) die Konstrukte ME-1 beziehungsweise ME-11 übertragen.

#### 4.3.1 Analyse der Tabak-Primärtransformanden die das ME-1 Konstrukt enthalten

Die 94 Pflanzen, die aus der Transformation mit dem Konstrukt ME-1 regeneriert werden konnten, wurden in Gewebekultur mittels Inkubation von Blättchen in X-Gluc-Lösung auf funktionelle Transformation getestet. 34 Pflanzen zeigten GUS-Aktivität im Blatt, sie wurden ins Gewächshaus gebracht. Von zehn dieser Pflanzen der Linie TME-1 wurde in der T1-Generation der geselbsteten Linien die Stärke der Expression getestet. Dazu wurden sterile Samen der in Gewebekultur positiv getesteten Pflanzen auf MS-Medium mit 0,5% Agar und 100 mg/l Kanamycin ausgesät. Das Kanamycin unterdrückt das Wachsen der Keimlinge, die kein Konstrukt mehr enthielten. Als Kontrolle wurden Samen des Wildtyps SNN auf MS-Medium ohne Kanamycin angezogen. Nach 2 Wochen wurden von jeder Linie und dem Wildtyp vier mal 10 Keimlinge geerntet und in diesen die Stärke der Expression durch Fluoreszenzmessungen bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 6 dargestellt. Die GUS-Aktivität in den Keimlingen der verschiedenen Linien variierte stark. Zehn Keimlinge der schwächste Linie bildeten  $6,9 \text{ nmol MU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , zehn der stärksten  $92,4 \text{ nmol MU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . In Keimlingen des Wildtyps war nur eine geringe Hintergrundaktivität zu finden. Für weitere Analysen wurden die Linien TME-1/67, TME-1/75 und TME-1/82 ausgewählt.

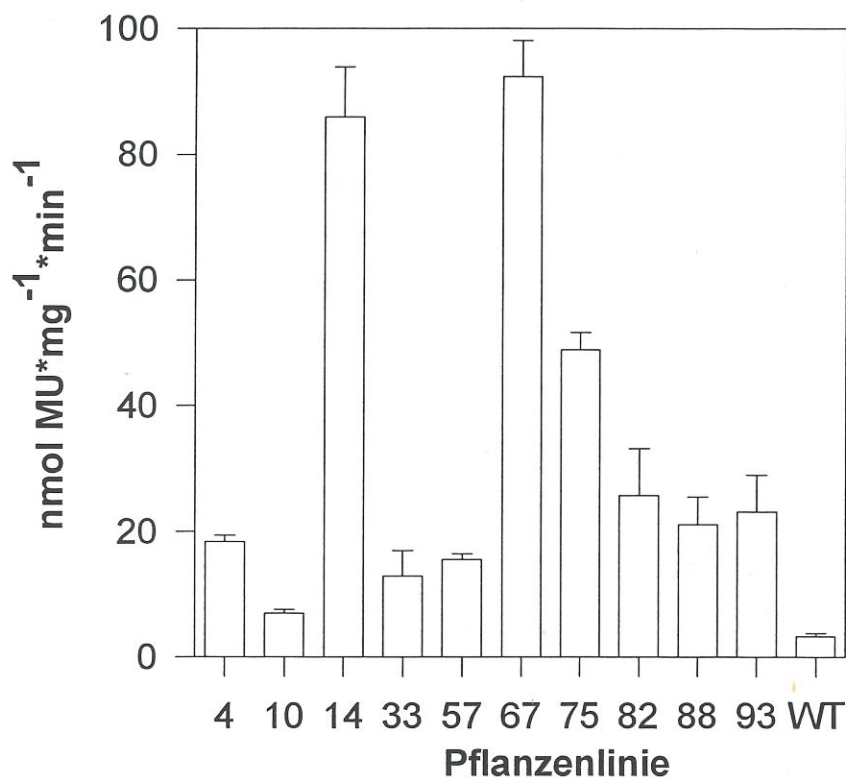


Abb. 6: Bestimmung der GUS-Aktivität in zwei Wochen alten Keimlingen der Transformationslinie TME-1. Die Keimlinge wurden 14 Tage auf MS-Medium mit 0,5% Agar und, mit Ausnahme des Wildtyps, 100 mg/l Kanamycin angezogen. Pro Linie wurden vier Messungen mit je 10 Keimlingen durchgeführt. Die Einheit der Angaben ist nmol gebildetes 4-Methyl-Umbelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

#### 4.3.2 Analyse der Tabak-Primärtransformanten die das ME-11 Konstrukt enthalten

Aus der Transformation mit dem Konstrukt ME-11 wurden 87 Pflanzen regeneriert. Sie wurden in Gewebekultur durch GUS-Färbung der Blättchen auf funktionelle Transformation getestet. Die 33 positiven TME-11 Pflanzen wurden ins Gewächshaus transferiert. Die Primärtransformanten wurden im Hinblick auf die Stärke der Expression in sink- und source-Blättern analysiert, da erwartet wurde, daß der Promotor der *cyt* FBPase in sink-Blättern schwächere Expression vermittelt als in source-Blättern. Als sink-Blätter wurden solche geerntet, die zum Zeitpunkt der Ernte zu maximal einem Viertel entfaltet und kürzer als 4 cm waren. Als source wurden Blätter bezeichnet, die völlig entfaltet waren. Zur Kontrolle wurde die Hintergrundaktivität in nicht transformierten Tabakpflanzen bestimmt. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Ernte 6 Wochen im Gewächshaus angezogen. Pro Blatt wurde eine Probe

gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. Auch hier waren die Werte sehr unterschiedlich und lagen in source-Blättern der verschiedenen Primärtransformanten zwischen 25 und 360 nmol gebildetes MU pro Milligramm Protein pro Minute. Die Expression in source Blättern war bei den meisten Linien höher als in sink-Blättern. Bei acht der 33 positiv getesteten Linien waren die Aktivitäten in sink- und source-Blättern etwa gleich hoch oder die Aktivität in sink höher als in source. Die Hintergrundaktivität im Wildtyp lag deutlich unter den Aktivitäten in den Transformanten. Von der Transformationslinie TME-11 wurden die Linien TME-11/13, TME-11/23 und TME-11/58 für weitere Analysen ausgewählt.

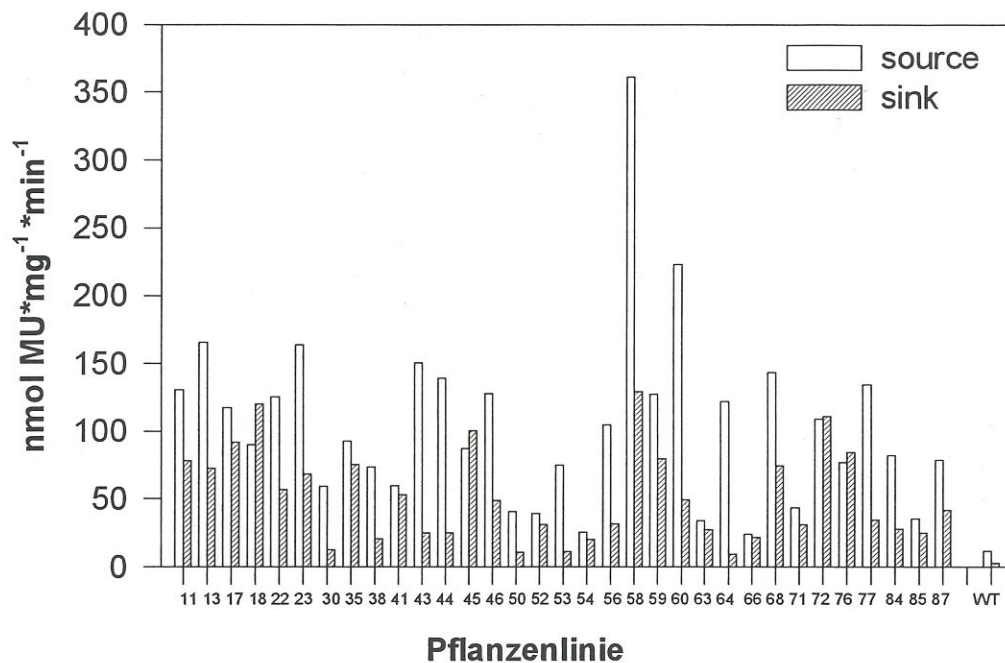


Abb. 7: Bestimmung der GUS-Aktivität in sink- und source-Blättern der im Gewächshaus gezogenen Primärtransformanten der Transformationslinie TME-11. In sink-Blättern (schraffierte Balken) war die GUS-Aktivität überwiegend niedriger als in source-Blättern (weiße Balken). Zum Vergleich ist die Hintergrundaktivität in einer Wildtyppflanze dargestellt (WT). Pro Blatt wurde eine Probe gemessen. Die Einheit der Angaben ist nmol gebildetes 4-Methyl-Umbelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

#### 4.4 Gewebespezifität des cyt FB Pase-Promotors in transgenen Tabakpflanzen

Im folgenden sollte die Spezifität der Expression des chimären GUS-Gens und die Höhe der GUS-Aktivität in verschiedenen Geweben der Tabaktransformationslinien TME-1 und TME-11 untersucht werden.

##### 4.4.1 Gewebespezifische Expression des chimären $\beta$ -Glucuronidase Gens

Die zur weiteren Analyse ausgewählten Tabakpflanzen der Linien TME-1 und TME-11 wurden in Hinblick auf die Expression des chimären GUS-Gens in bestimmten Geweben untersucht. Dazu wurde von Samen, sowie sink- und source-Blättern, Stengel und Wurzel von 9 Wochen alten Tabakpflanzen mittags, 6 h nach Beginn der Belichtung, Proben genommen, gesamt RNA extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembran übertragen und hybridisiert mit einem 630 bp *HincII* 5'-Fragment der  $\beta$ -Glucuronidase aus *E. coli*. Dabei konnte gezeigt werden, daß große Mengen mRNA der  $\beta$ -Glucuronidase in voll entfaltenen Blättern zu finden ist (Abb. 8 (A) und (B) Spur 1). In jungen Blättern war in den Tabakpflanzen der Transformationslinie TME-11 (Abb. 8 (B)) eine geringe Menge mRNA zu finden (2), in TME-1 (Abb. 8 (A) Spur 2) nicht. In keinem der anderen untersuchten Organe konnte mRNA der GUS gefunden werden.



Abb. 8: „Northern-Blot“ Analyse der gewebespezifischen Expression der GUS unter der Kontrolle des cyt FB Pase-Promotors in den Transformationslinien TME-1 (A) und TME-11 (B). Gesamt RNA wurde extrahiert von 9 Wochen alten Pflanzen aus source- und sink-Blättern, Stamm, Wurzel und Samen. Die Probennahme erfolgte mittags. Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylon-Membran transferiert und hybridisiert mit einem *HincII* 5'-Fragment der GUS. Pro Spur wurden 30  $\mu$ g RNA aufgetragen. In Abbildung 8 (A) ist das Ergebnis für die Linie TME-1 dargestellt, in 8 (B) für TME-11. Aufgetragen wurde gesamt RNA aus source-Blättern (Spur 1), sink-Blättern (2), Stamm (3), Wurzel (4) und Samen (5).

Die fluorimetrische Bestimmung der GUS-Aktivität in den Organen sink- und source-Blatt, Stamm und Wurzel von 9 Wochen alten Tabakpflanzen sowie Samen ergab, daß in beiden Transformationslinien die höchste Aktivität in source-Blättern zu finden ist, in sink-Blättern eine deutlich geringere. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse exemplarisch für je eine Pflanze der Linien TME-1 und TME-11 dargestellt, sowie zum Vergleich die Ergebnisse für Wildtyp Tabak. Die anderen transgenen Pflanzen zeigten eine vergleichbare Verteilung der GUS-Aktivität. Die Meßwerte in sink-Blättern waren innerhalb eines Blattes stets sehr unterschiedlich. Die Aktivität in Stamm und Wurzel lag nur unerheblich über der Hintergrundaktivität, die in Wildtyp Tabak gemessen wurde. Der Promotor ist in diesen Geweben nicht aktiv. In Tabaksamen konnte im Vergleich zu Samen des Wildtyps leicht erhöhte Aktivitäten gemessen werden, obwohl im „Northern-Blot“ keine mRNA nachzuweisen war. Die GUS-Aktivität in Samen wurde auch bei Inkubation von Samenhomogenat in X-Gluc-Lösung gefunden. Wildtyp Samen zeigten hier keine Färbung (nicht gezeigt). Möglicherweise ist der Promotor im Verlauf der Samenentwicklung aktiv und nicht in den reifen Samen selber. Die GUS-Aktivität könnte auf gespeichertes Protein zurückzuführen sein.

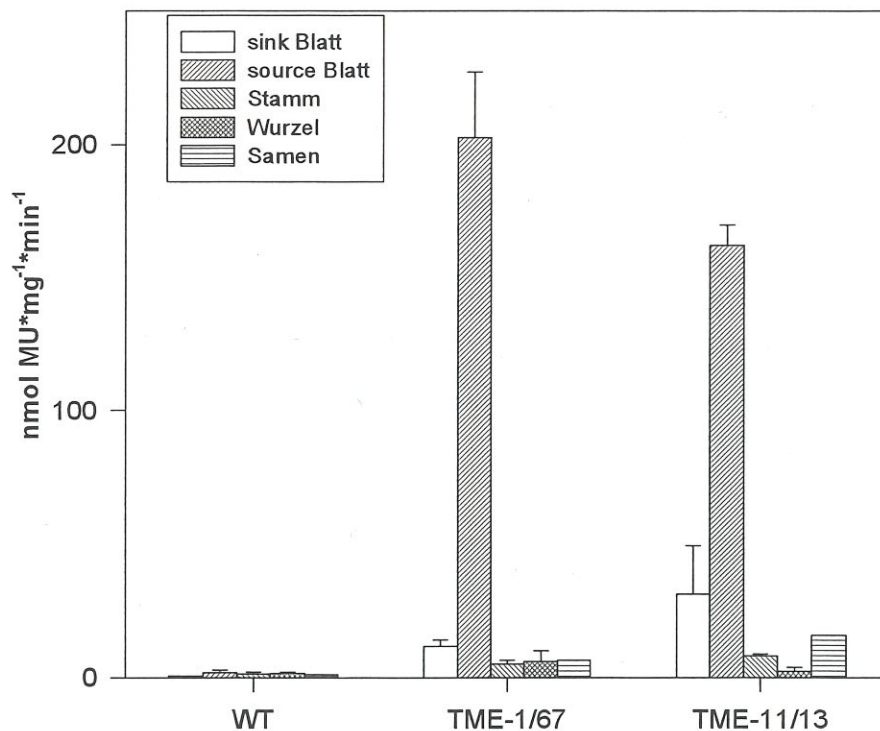


Abb. 9: GUS-Aktivität in verschiedenen Organen von Wildtyp und transgenen Tabakpflanzen, die das GUS-Gen unter der Kontrolle des cyt FBPase-Promotors enthalten. Die Probenahme erfolgte mittags aus 9 Wochen alten Pflanzen, pro Organ wurden vier Proben gemessen. Im Wildtyp ist keine Hintergrundaktivität zu messen.

Von rechts nach links sind die GUS-Aktivitäten aus sink-Blatt, source-Blatt, Stamm, Wurzel und Samen aus Wildtyp, der Transformationslinie TME-1 und TME-11 dargestellt. Die Angaben erfolgen in nmol gebildetes 4-Methyl-Umbelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

#### 4.4.2 Histochemische Lokalisierung von GUS-Aktivität im Tabakstamm

In Abschnitt 4.4.1. wurde gezeigt, daß im Tabakstamm keine durch den Promotor der *cyt*FBPase vermittelte GUS-Aktivität zu finden war. Dabei waren Internodien für die Quantifizierung der GUS-Aktivität und RNA-Extraktion verwendet worden. Bei einer histochemischen Untersuchung verschiedener Stammabschnitte wurde festgestellt, daß in Höhe des Blattabzweiges im Stamm in einem sehr begrenzten Bereich GUS-Aktivität zu finden war. In Abbildung 11 A-H sind mehrere Querschnitte durch den Nodienbereich des Tabakstamms gezeigt. In Abbildung 11 I ist dargestellt, wo die abgebildeten Querschnitte im Stamm lokalisiert waren. Diese Färbung war in beiden Transformationslinien TME-1 und TME-11 zu finden. Gezeigt wird das Ergebnis für die Linie TME-1/75, die im Stamm die stärkste Färbung zeigte. Es ist deutlich, daß das Leitgewebe nicht gefärbt war, sondern lediglich Bereiche des Parenchyms in der Umgebung des Blattabzweiges.

In Abbildung 10 sind gefärbte Längsschnitte durch den Stamm gezeigt. Das Gewebe, welches unmittelbar an die Blattachselknospe anschließt zeigte GUS-Aktivität. Die Knospen selber waren nicht gefärbt.

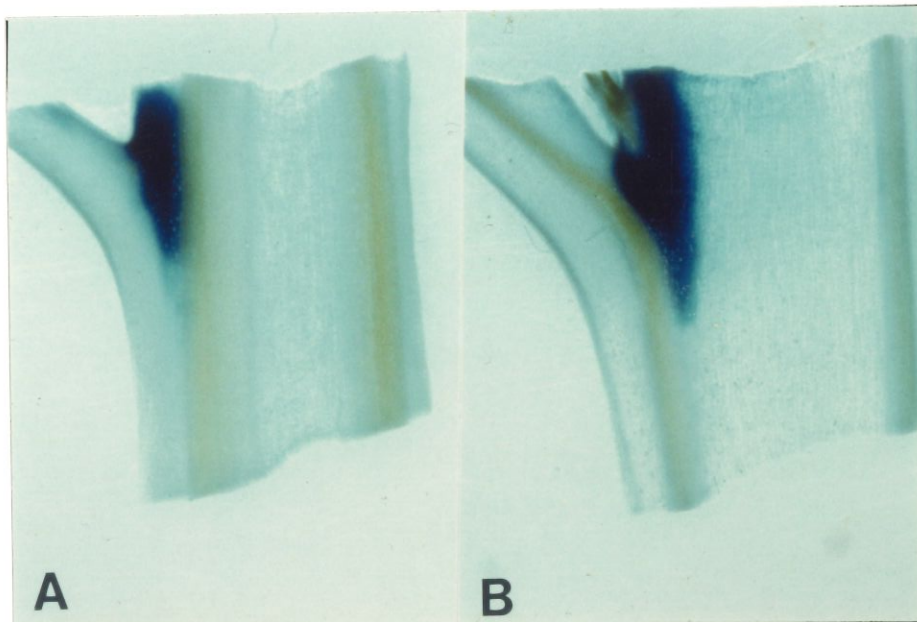


Abb. 10: Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität in Nodien des Tabakstammes. Längsschnitte durch den Nodienbereich eines Tabakstammes der Linie TME-1/75. In (A) ist ein Schnitt durch den Rand des Stammes, in (B) einer durch die Mitte des Stammes gezeigt. In (B) ist die Seitenknospe zu sehen. Die Schnitte wurden über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert und anschließend das Chlorophyll mit 70% igem Ethanol entfernt.

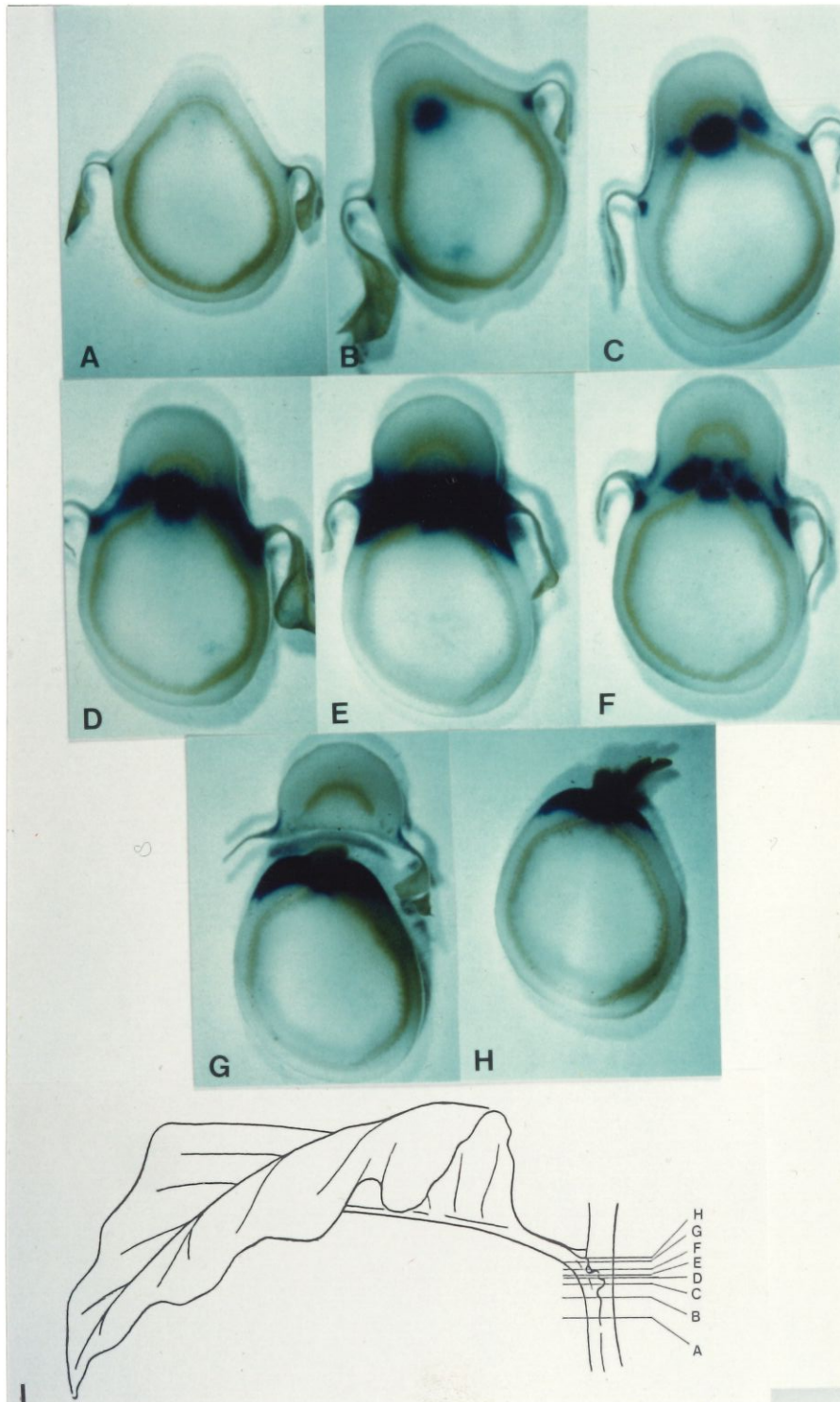


Abb. 11: Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität im Nodienbereich des Tabakstammes. Serienquerschnitte durch den Nodienbereich eines Tabakstammes der Linie TME-1/75 (A-H). In (I) ist dargestellt, in welchem Bereich des Stammes die Querschnitte gemacht wurden. Die Schnitte wurden über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert und anschließend das Chlorophyll mit 70% igem Ethanol entfernt.



Da zwei der untersuchten Linien keine Färbung im Stamm zeigten wurden je Transformationslinie 6 weitere Linien auf Expression im Stamm untersucht. Von den insgesamt 18 getesteten Linien zeigten 14 Expression in diesem Bereich. Die Intensität der Färbung im Stamm war in den untersuchten Pflanzen sehr unterschiedlich und unabhängig von der Stärke der GUS-Aktivität im Blatt. Einige der im Blatt schwach exprimierenden Pflanzen zeigten im Stamm mit der Linie TME-1/75 vergleichbar starke Färbung, TME-1/67 und TME-11/58, als zwei im Blatt stark exprimierende Linien, zeigten dagegen dort keine detektierbare Expression.

#### 4.4.3 Cytologische Untersuchung des Nodienbereichs des Tabakstammes

Um festzustellen, ob die im Stamm GUS-Aktivität zeigenden Bereiche sich cytologisch von ihrer Umgebung unterschieden, wurden Quer- und Längsschnitte mit 70% igem Ethanol entfärbt und untersucht. Quer- und Längsschnitte des Stammes (Abb. 12) zeigen, daß das Gewebe, in dem GUS-Aktivität zu finden war, auf dunklem Hintergrund heller erschienen als die anderen Stammbereiche. Es handelte sich um Zellen, die kleiner waren und dichter zusammenlagen als die umgebenden parenchymatischen Zellen.

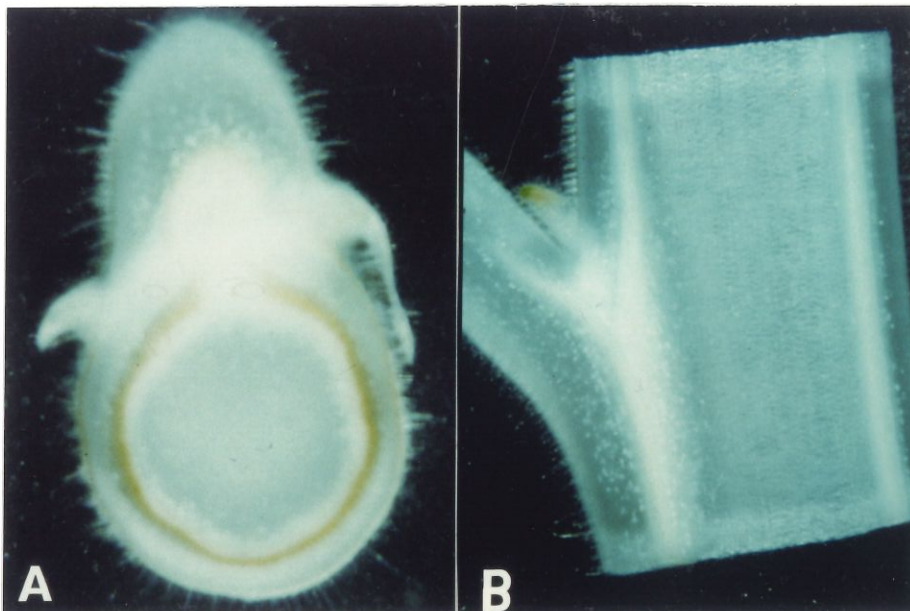


Abb. 12: Mit Ethanol entfärbte Quer- (A) und Längsschnitt (B) durch die Nodienbereiche des Tabakstammes.

Eine mögliche Funktion dieses Gewebes könnte die Versorgung der Seitenknospe sein. Man sollte dann größere Mengen Kohlenhydrate in diesen Bereichen finden. Eine Färbung der löslichen Zucker in den Stammschnitten mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TPTC) in heißer Natronlauge war nicht aussagekräftig. Alle Zellen enthielten hohe Mengen löslicher Zucker, so daß keine Differenzierung möglich war (nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurden in Längs- und Querschnitten des Stammes die eingelagerte Stärke mit 0,5% iger Lugolscher Lösung gefärbt. Den Schnitten waren zuvor das Chlorophyll mit Etanol entzogen worden. Wie in Abbildung 13 gezeigt, korrespondierte die Promotoraktivität im Stamm mit Stärkeakkumulation. Lediglich die Zellen der Stärkescheide um das Leitgewebe enthielten Stärke ohne Promotoraktivität aufzuweisen..

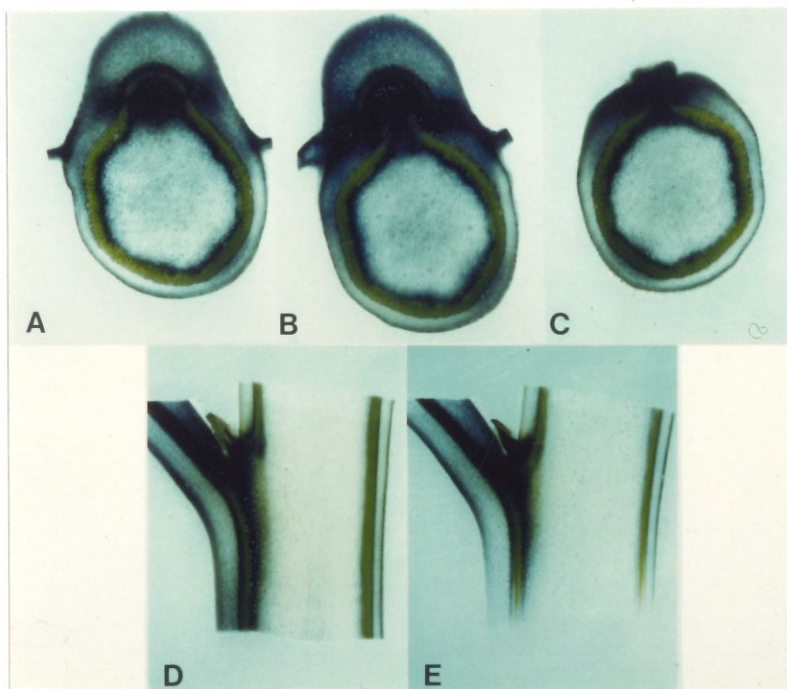


Abb. 13: Färbung von Stärke in Quer- (A - C) und Längsschnitten (D - E) des Tabakstammes mit 0,5%iger Lugolscher Lösung. Der Querschnitt A entspricht dem Schnitt C, der Schnitt B entspricht etwa E und C entspricht ungefähr dem Schnitt H aus Abbildung 10. Die dunkelblaue Färbung kennzeichnet Zellen, in denen Stärke eingelagert ist. Den Schnitten wurde vor der Inkubation in Lugolscher Lösung mit 70% iger Ethanol das Chlorophyll entzogen.

#### 4.4.4 Expression des chimären GUS-Gens im Tabakstamm

In den unter Abschnitt 4.4.1. in Abbildung 8 gezeigten „Northern-Blot“ Analysen konnte keine GUS mRNA im Stamm nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob in den Nodienabschnitten des Stammes GUS mRNA nachweisbar ist, wurde gesamt RNA aus verschiedenen Regionen des Stammes der Transformationslinie TME-1/75 isoliert. Dabei wurde der Stamm in drei Bereiche unterschieden: (1) Internodien (2) Nodienbereiche in denen keine cyt FB Pase-Promotoraktivität zu finden war und (3) Nodienbereiche, in denen der Promotor aktiv war. Das Ergebnis der „Northern-Blot“ Analyse ist in Abbildung 14 gezeigt. Alle drei Bereiche des Stammes zeigten annähernd gleiche Mengen GUS mRNA. Der „Northern-Blot“ wurde eine Woche exponiert. Der in Abbildung 8 gezeigte nur über Nacht. Dadurch ist in Abbildung 8 kein vergleichbares Signal für GUS mRNA im Stamm zu erkennen. Der Befund, daß in allen drei Stammabschnitten etwa gleiche Mengen GUS mRNA zu finden war, steht im Gegensatz zu der Beobachtung, daß nur in einem eingeschränkten Bereich des Stammes GUS-Aktivität nachzuweisen war. Eine Erklärung dafür ist, daß aus den unterschiedlichen Gewebetypen sehr unterschiedliche Mengen gesamt RNA extrahierbar waren. Aus Internodien und Nodienabschnitten, die keine Expression zeigten, war nur wenig gesamt RNA zu extrahieren. Dadurch integriert man hier bei gleichen Mengen gesamt RNA über eine erheblich größere Gewebemenge als im Falle der Nodienbereiche, die Expression zeigten. Der Promotor war demnach im Stamm überall aktiv. In den meisten Abschnitten jedoch auf so niedrigem Niveau, das dies mittels GUS-Färbungen nicht zu zeigen war.

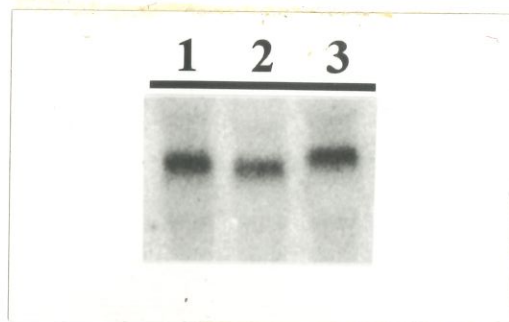


Abb. 14: „Northern-Blot“ Analyse des Tabakstammes. Gesamt RNA wurde extrahiert aus Internodien (Spur 1), Nodienbereichen, die keine Expression des chimären GUS-Gens bei histochemischer Färbung zeigten (Spur 2) und Nodienbereichen, in denen GUS-Aktivität detektierbar war (Spur 3). Pro Spur wurden 30 µg gesamt RNA aufgetragen. Der Blot wurde hybridisiert mit dem 5'-*HincII* Fragment des GUS-Gens.

#### 4.4.5 Expression des chimären GUS-Gens in Tabakknospen und -blüten

Von transgenen Tabakpflanzen wurden Knospen verschiedener Entwicklungsstadien und Blüten mit gefärbten aber noch nicht geöffneten Kronblättern in X-Gluc-Lösung über Nacht inkubiert. Da für Knospen und Blüten eine hohe Hintergrundaktivität in Wildtyppflanzen beschrieben ist (Martin et al., 1992), wurden auch Knospen und Blüten von Wildtypen zur Kontrolle in X-Gluc-Lösung inkubiert. Außerdem wurde, um den Hintergrund zu reduzieren, die Lösung mit 20% Methanol versetzt und der pH-Wert auf pH 8 erhöht (Martin et al., 1992). Den Proben wurde anschließend Chlorophyll durch Ethanol entzogen. In Knospen der transgenen Pflanzen fand sich in allen Geweben Färbung unterschiedlicher Intensität (Abb. 15). In Blüten fand sich die Aktivität überwiegend in Kelchblatt, Fruchtknoten und Blütenboden. Blüten und Knospen der Kontrollpflanzen zeigten in keinem Gewebe Blaufärbung (nicht gezeigt).



Abb. 15: Histochemische Detektion der GUS-Aktivität und Knospen von Tabakpflanzen der Linie TME-1/67. Die Knospen wurden nach Vakuumfiltration über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert. Um Hintergrundaktivität zu unterdrücken war der pH-Wert der Lösung auf pH 8 erhöht und 20% Methanol zugegeben worden. Nach der Inkubation wurde den Knospen mit Ethanol das Chlorophyll entzogen.

Um die Stärke der Expression in den einzelnen Organen der Knospen und Blüten zu untersuchen, wurden Knospen mit nicht gefärbten Kronblättern, die weniger als doppelt so lang wie die Kelchblätter waren, sowie Blüten mit gefärbten Blütenblättern unmittelbar vor deren Öffnung geerntet und die GUS-Aktivität in verschiedenen Geweben der Knospen und Blüten bestimmt (Abb. 16). Die Knospen und Blüten wurden unterteilt in Blütenboden (1), Kelchblatt (2), Kronblatt (3), Fruchtknoten (4), Pistill (5), Narbe (6), Filament (7) und Pollensack (8). In diesen Organen wurde die GUS-Aktivität bestimmt. In Abbildung 16 ist das

Ergebnis grafisch dargestellt. Die stärkste Aktivität war in Blütenboden (1) und Kelchblatt (2) zu finden, also in den Organen die Chlorophyll enthalten und Photosynthese betreiben können. Im Pollensack (8) war eine im Vergleich zu den anderen Organen leicht erhöhte Aktivität meßbar. Zur Kontrolle wurden die Hintergrund-Aktivitäten in Blütenorganen von Wildtypen gemessen. Diese lagen erheblich unter den in den Transgenen gemessenen (nicht gezeigt). In Abbildung 21 sind die Werte für die transgenen Pflanzen abzüglich der Daten, die für Wildtyp ermittelt wurden dargestellt.

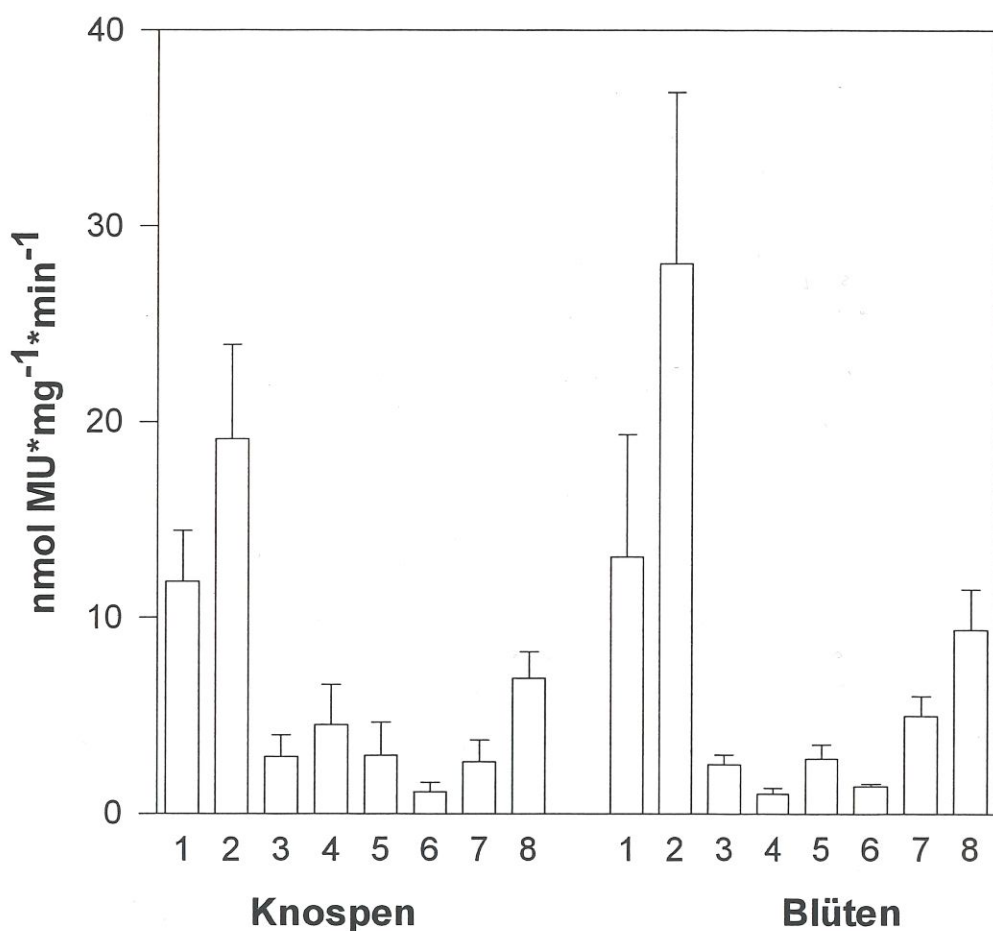


Abb. 16: Verteilung der  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität in Knospen und Blüten von transgenen Tabakpflanzen, die das cyt FBpase-Promotor-GUS Konstrukt tragen. Knospen wurden geerntet so lange die Kronblätter maximal doppelt so lang waren wie die Kelchblätter. Blüten wurden geerntet wenn die Kronblätter gefärbt waren, sich aber noch nicht geöffnet hatten. Die Knospen und Blüten wurden unterteilt in Blütenboden (1), Kelchblatt (2), Kronblatt (3), Fruchtknoten (4), Pistill (5), Narbe (6), Filament (7) und Pollensack (8). Von jedem Gewebe wurde in drei Proben die GUS-Aktivität fluorimetrisch bestimmt. Die Angabe erfolgen in nmol gebildetes 4-Methyl-Umbelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

#### 4.4.6 Expression des chimären GUS-Gens in Tabakkeimlingen

Im folgenden wurde untersucht, ob in Tabakkeimlingen GUS-Aktivität zu finden ist und in welchen Geweben des Keimlings der Promotor aktiv ist. Dazu wurden Samen sterilisiert und auf MS-Medium mit 0,5% Agar und 100 mg/l Kanamycin ausgesät. Um mögliche Effekte durch Belichtung der Wurzeln auszuschließen, wurde das Medium mit pulverisierter Kohle geschwärzt. Kurz nach Beginn der Keimung und nach 14 Tagen wurden Keimlinge verschiedener Entwicklungsstadien geerntet und in X-Gluc-Lösung über Nacht inkubiert.

Wie in Abbildung 17 dokumentiert, zeigten die älteren Keimlinge Expression in den entfalteten Kotyledonen mit Ausnahme des zentralen Leitgewebes und der Petiole. Wurzeln und Stamm sowie Primärblätter zeigten keine GUS-Aktivität. In Keimlingen, bei denen die Kotyledonen die Samenhülle noch nicht verlassen hatten, war schwache Expression im Übergang von Stamm zum Samen zu finden (nicht gezeigt).



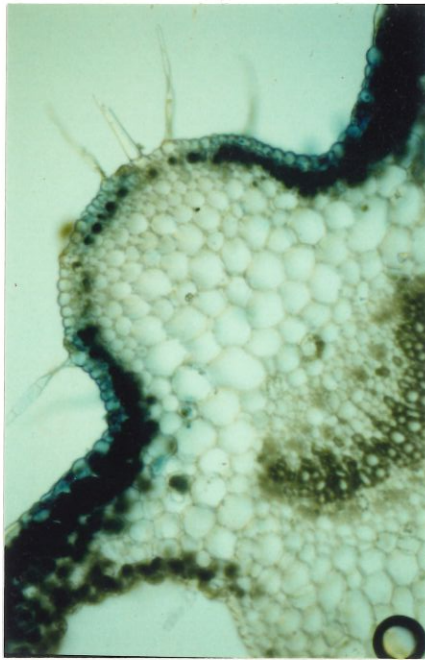
Abb. 17: Histochemische Detektion der GUS-Aktivität in zwei Wochen alten Tabakkeimlingen. Keimlinge wurden auf MS-Medium mit 0,5% Agarose, 100 mg/l Kanamycin und Kohlepulver angezogen. Anschließend wurden sie Vakuumfiltriert und über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert. Das Chlorophyll wurde danach mit Ethanol entzogen.

#### 4.5 Zellspezifische Expression des chimären GUS-Gens

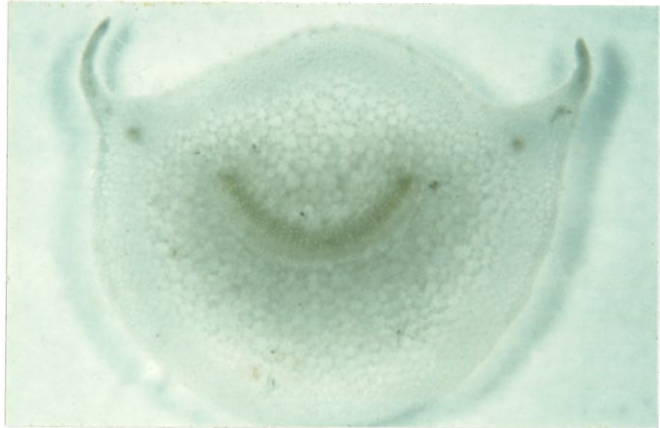
Im pflanzlichen Blatt liegt eine Vielzahl verschiedener Zelltypen vor. Um die Zellspezifität des cyt FB Pase-Promotors im Blatt genauer zu untersuchen, wurden Blatt-Querschnitte von voll entfaltenen Tabakblättern im Gewächshaus gezogener 8 Wochen alter Pflanzen angefertigt. Die Schnitte wurden in 3% igem Paraformaldehyd für 20 min fixiert, über Nacht in X-Gluc-Lösung gefärbt und anschließend das Chlorophyll mit 70% igem Ethanol entfernt. Zusätzlich wurde die Epidermis vom Mesophyll abgezogen und getrennt inkubiert, um Kontaminationen durch Dibromo-Dichloro-Indigo, das in die Färbelösung von beschädigten Mesophyllzellen abgegeben worden war zu vermeiden. Die Ergebnisse waren für die Transformationslinien TME-1 und TME-11 identisch. Exemplarisch werden in der Abbildung 18 A-D die Ergebnisse der Linie TME-1/82 gezeigt.

In Abbildung 18 (A) ist ein Querschnitt durch das zentrale Leitgewebe eines source-Blattes gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, daß im zentralen Leitgewebe nur die Mesophyllzellen an der Oberseite gefärbt waren. Das parenchymatische Gewebe, sowie Xylem, Phloem und andere hier lokalisierte Gewebe waren nicht gefärbt. Einige der Epidermiszellen schienen gefärbt zu sein. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich nicht um Aktivität in den Zellen, denn die isoliert inkubierte Epidermis zeigte keine GUS-Aktivität in Trichomen, Stomata und Epidermiszellen (B). Die Färbung der Epidermiszellen in (A) könnte an Kontaminationen aus angeschnittenen Mesophyllzellen liegen oder daran, daß die Schnitte mehrschichtig waren und hinter den Epidermiszellen liegende Mesophyllzellen durchschienen. In der Petiole fand sich keine Blaufärbung (C). Im Querschnitt durch das Mesophyll zeigte sich sehr starke Expression im Palisadenparenchym und etwas geringere im Schwammparenchym (D). In Schnitten, die kleine Leitgewebe enthielten, sowie in gefärbten Blattscheiben war GUS-Aktivität auch assoziiert mit Leitgewebe dritter und höherer Ordnung nachzuweisen. Es war in den Schnitten und Blattscheiben jedoch nicht zu erkennen, ob es sich um Färbung des Leitgewebes selber handelte, oder um Zellen, die das Leitgewebe umgaben (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse für die beiden Transformationslinien TME-1 und TME-11 waren in diesem Fall, wie auch in allen weiteren Untersuchungen identisch. Es wird im folgenden daher nicht mehr ausdrücklich auf beide Transformationslinien eingegangen, sondern exemplarisch die Ergebnisse für jeweils eine gezeigt.



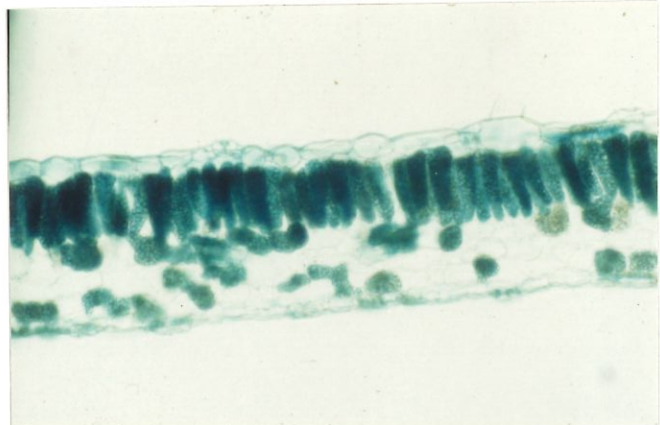
**A**



**C**



**B**



**D**

Abb. 18: Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität in verschiedenen Geweben des Tabakblattes der transgenen Linie TME-1/82. (A) Querschnitt durch das zentrale Leitgewebe eines source Blattes, (B) Epidermis, (C) Querschnitt durch die Petiole, (D) Querschnitt durch das Mesophyll eines source-Blattes. Die Schnitte wurden 20 min in 3%iger Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert. Danach wurde das Chlorophyll durch 70%iges Ethanol entfernt.



#### **4.6 Entwicklungsabhängigkeit der durch den cyt FBPase Promotor vermittelten Expression in Tabakblättern**

Zu Beginn ihrer Entwicklung sind Blätter vom Import von Kohlehydraten abhängig. Im Verlauf ihrer Reifung beginnen die Blätter von der Spitze an fixierten Kohlenstoff zu exportieren. Diese Entwicklung vom sink- zum source-Blatt ist begleitet von Umstellungen im Kohlehydratstoffwechsel des Blattes (Turgeon, 1989). In seneszierenden Blättern kommt es zu einer Reduktion der Photosynthese und entsprechend der photosynthetischen Saccharosebiosynthese (Thomas und Stoddard, 1980). Zrenner (1993) konnte zeigen, daß die cytosolische FBPase in sink-Blättern der Kartoffel schwächer exprimiert wird als in source-Blättern. Im folgenden sollte überprüft werden, ob der isolierte Promotor in Blättern entwicklungsabhängig exprimiert wird. Gleichzeitig wurde untersucht, ob dieser Promotor die Expression der endogenen cyt FBPase repräsentiert.

##### **4.6.1 Aktivität des chimären GUS-Gens in sich entwickelnden Tabakblättern**

In sink-Blättern fiel bei den in Abschnitt 4.4.1. gezeigten Fluoreszenzmessungen auf, daß die Werte innerhalb eines Blattes erheblich stärker schwankten als in den anderen Organen. Es wurde daher untersucht, ob die Expression in sink-Blättern auf das gesamte Blatt verteilt ist oder ob es Zonen von starker und schwacher beziehungsweise fehlender Expression gibt. Dazu wurden mehrere sich entwickelnde Blätter von im Gewächshaus gezogenen 8 Wochen alten Tabakpflanzen der Linien TME-1 und TME-11 als ganzes vakuumfiltriert und über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert. Das Gewebe wurde anschließend in Lactophenol/Chloralhydrat aufgeklärt und das Chlorophyll entfernt. Exemplarisch wird in Abbildung 12 das Ergebnis für die Linie TME-1/67 gezeigt. Die gezeigten Blätter waren 1.1 cm, 1.4 cm, 3.3 cm, 3.7 cm, 4,7 cm, 5,2 cm und 6,5 cm lang. Das längste Blatt war noch nicht völlig entfaltet. Die source-Blätter der getesteten Pflanzen waren zwischen 12 cm und 16 cm lang. In den kleinsten Blättern (Abb. 19 (A)) war eine Blaufärbung nur in der Blattspitze zu erkennen. Die Expression breitete sich basipetal mit zunehmendem Alter der Blätter aus und die Intensität der Blaufärbung nahm zu. Dabei waren die um das zentrale Leitgewebe gelegenen Zellen die ersten, die Blaufärbung zeigten, was zu einer keilförmigen blauen Fläche im gefärbten Blatt führte.

Völlig entfaltete Blätter wurden aufgrund ihrer Größe nicht im Ganzen gefärbt. Es wurden stattdessen 12 Blattscheiben in kurzen Abständen von oben nach unten entnommen und gefärbt. Dadurch konnte gezeigt werden, daß im Mesophyll von source-Blättern in allen Bereichen annähernd gleiche GUS-Aktivität vorhanden war (nicht gezeigt).

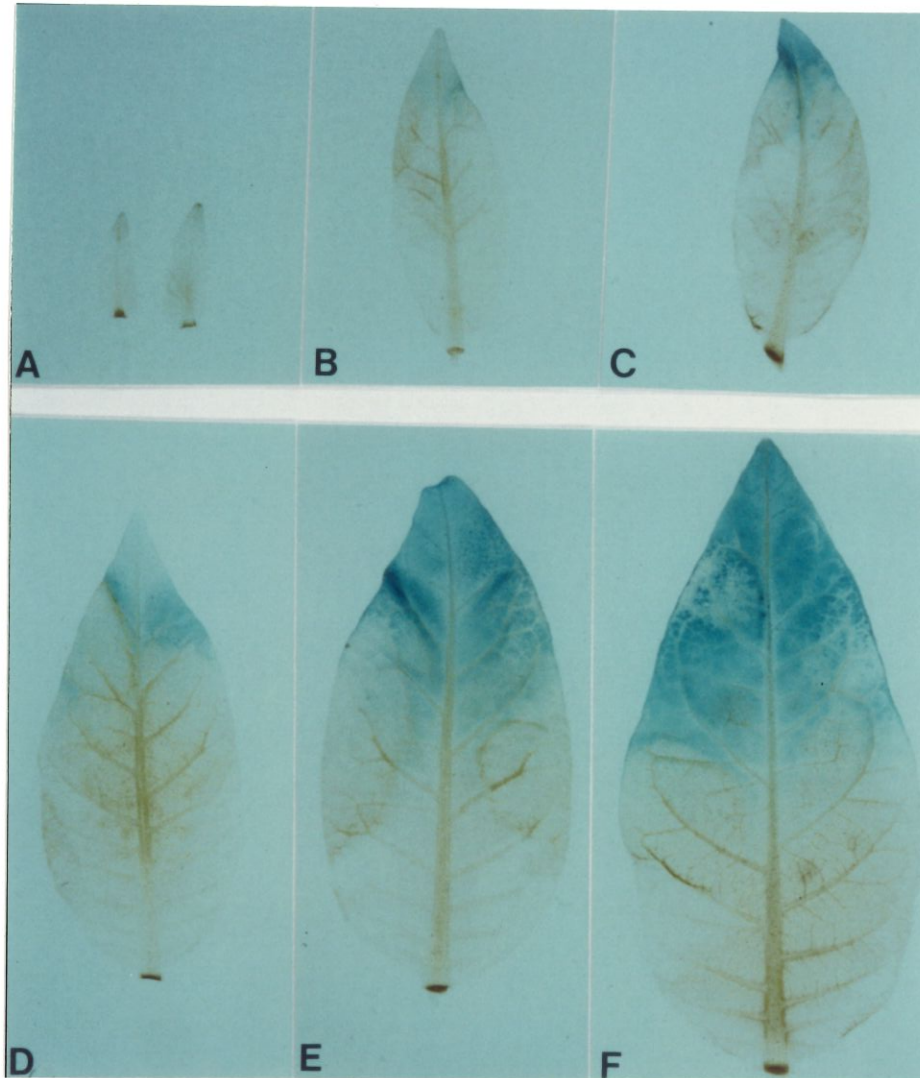


Abb. 19: Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität in sich entwickelnden Tabakblättern. Junge Tabakblätter von 8 Wochen alten Pflanzen wurden nach Vakuuminfiltration über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert und anschließend geklärt in Lactophenol/Chloralhydrat. Die Blätter waren 1.1 cm (A), 1.4 cm (A), 3.3 cm (B), 3.7 cm (C), 4,7 cm (D) und 5.2 cm (E) lang.

#### 4.6.2 Untersuchung der GUS-Aktivität und der Expression des chimären GUS-Gens in allen Blättern von Tabakpflanzen

In den Abschnitten 4.5.1. und 4.6.1. konnte gezeigt werden, daß die Stärke der Expression in Blättern von deren Entwicklungszustand abhängig ist. Aus diesem Grund wurde in Tabakpflanzen die Expression des GUS-Gens unter der Kontrolle des cyt FB Pase-Promotors in jeweils allen Blättern untersucht.

Um die Expression des GUS-Gens und die GUS-Aktivität in Blättern von Tabakpflanzen zu bestimmen, wurde von 8 Wochen alten Tabakpflanzen um 13 Uhr Proben von allen Blättern genommen, gesamt RNA extrahiert und im „Northern-Blot“ Verfahren analysiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einem 5'-Fragment der GUS. In Abbildung 20 ist repräsentativ ein Ergebnis für eine Pflanze dokumentiert. In sink-Blättern, die zwischen 3 cm und 6,8 cm lang waren, ist wenig mRNA der GUS zu finden. Im vierten Blatt der Pflanze, das eine Länge von 10,5 cm hatte, waren die höchsten Mengen mRNA akkumuliert. Dieses Level war konstant in den beiden folgenden Blättern (13,6 cm bzw. 14 cm lang) und begann ab dem 7. Blatt (15,5 cm) bis zu den untersten seneszierenden Blättern kontinuierlich zu sinken. Die Blätter 11 und 12 waren deutlich sichtbar seneszent. Das Chlorophyll war zum Teil degradiert, so daß sie gelb/grün waren. Blatt 10 (14,2 cm) war nicht von den anderen source-Blättern zu unterscheiden.

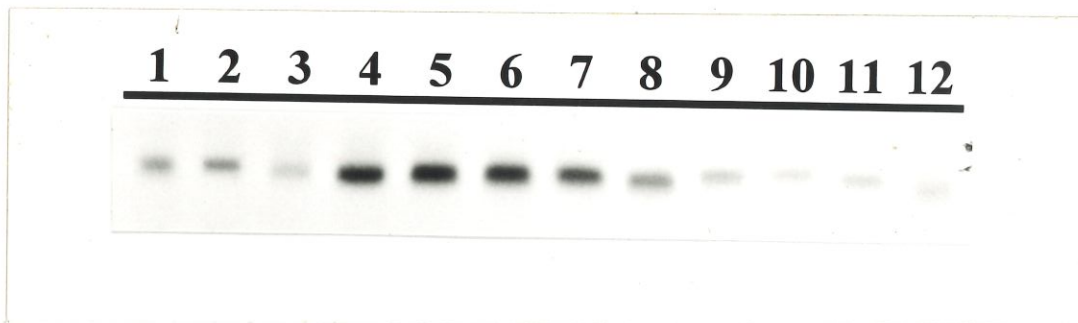


Abb. 20: „Northern-Blot“ Analyse aller Blätter einer 8 Wochen alten Tabakpflanze. Gesamt RNA wurde extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylon-Membran übertragen. Hybridisiert wurde mit einem 5'-Fragment der GUS. Pro Spur wurden 30 µg RNA aufgetragen. Spur 1: sink-Blatt, 3 cm; Spur 2: sink-Blatt 5,2 cm; Spur 3: sink-Blatt: 6,8 cm; Spur 4: source-Blatt, 10,5 cm, Spur 5: source-Blatt, 13,6 cm; Spur 6: source-Blatt, 14 cm; Spur 7: source-Blatt, 15,5 cm; Spur 8: source-Blatt, 14,9 cm; Spur 9: source-Blatt, 13,5 cm; Spur 10: source-Blatt, 14,2 cm; Spur 11: seneszierendes Blatt, 14,2 cm; Spur 12: seneszierendes Blatt, 12,9 cm.

Von den gleichen Pflanzen, aus deren Blättern Proben für die „Northern-Blot“ Analyse genommen worden waren, wurden zeitgleich Proben zur fluorimetrischen GUS-Bestimmung geerntet. Pro Blatt wurden vier Proben gemessen, die aus den Blattbereichen stammten, die für die Extraktion der gesamt RNA verwendet worden waren. Die Ergebnisse der fluorimetrischen Bestimmung der GUS-Aktivität in allen Blättern einer Pflanze ist in Abbildung 21 dargestellt.

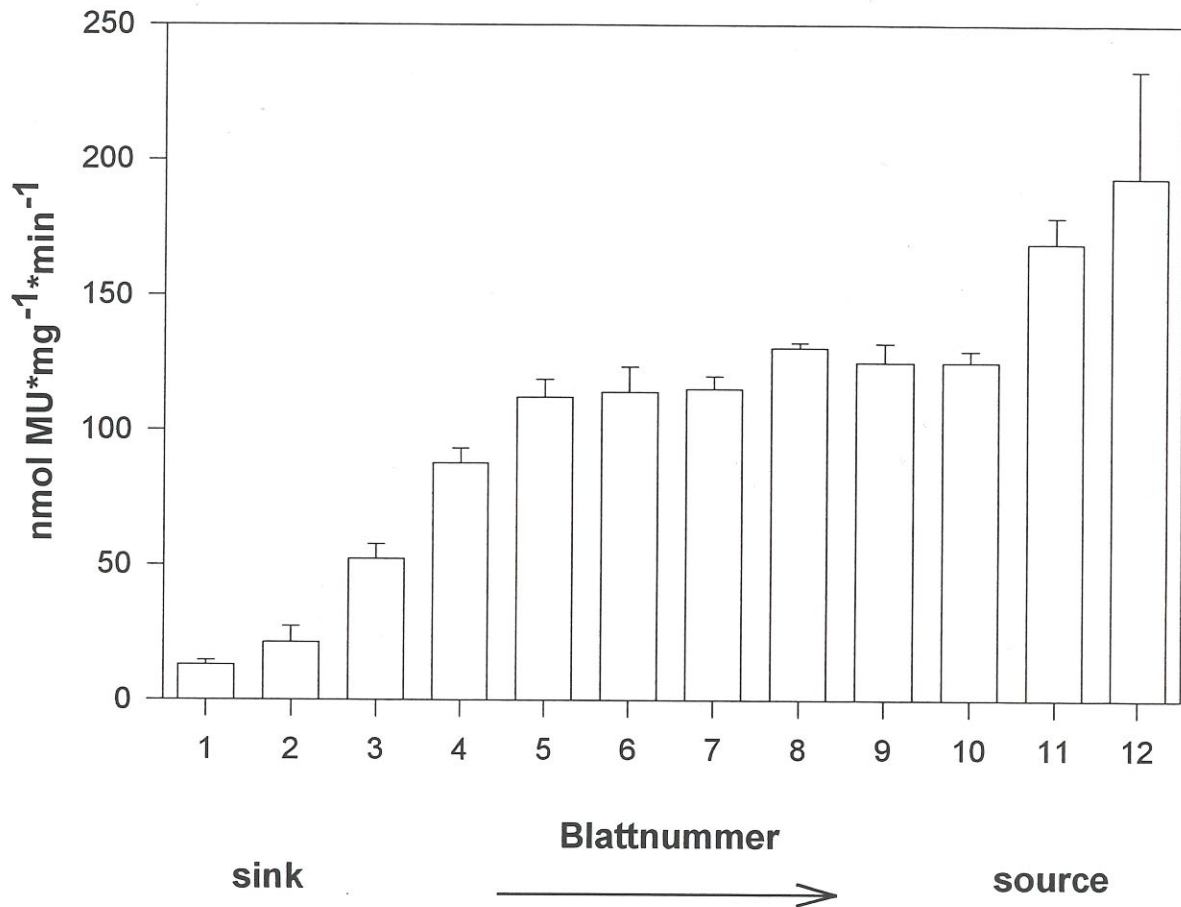


Abb. 21: Fluorimetrische Bestimmung der GUS-Aktivität in Blättern einer Tabakpflanze der Linie TME-1/75. Von allen Blättern einer Pflanze wurden je vier Proben gemessen. Die Aktivität im jüngsten Blatt ist links in Balken 1 dargestellt, die im ältesten Blatt rechts in Balken 12. Die Angaben erfolgen in nmol gebildetes 4-Methyl-Umbelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

Die Daten aus der fluorimetrischen Bestimmung der GUS-Aktivität stimmen nicht überein mit dem „Northern-Blot“, nachdem ab Blatt 7 eine stetige Abnahme der GUS-Aktivität zu erwarten wäre. Stattdessen zeigt sich ein Anstieg der GUS-Aktivität von 13,1 nmol MU\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> im jüngsten sink-Blatt auf 193,4 nmol MU\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> im ältesten Blatt. Dies liegt

wesentlich daran, daß in seneszierenden Blättern die Proteinmenge erheblich stärker sinkt als die relative Fluoreszenz. In Abbildung 22 ist die Proteinmenge pro Quadratmeter der Blätter dargestellt. Es wird deutlich, daß in diesem Versuch ein Bezug der fluorimetrischen Daten auf die Proteinmenge die Ergebnisse verfälscht, da die Proteinmengen kontinuierlich von 5800 mg Protein auf 566 mg Protein pro Quadratmeter Blattfläche sinken. Daher wurde als Bezugsgröße für die Daten in Abbildung 23 die Blattfläche verwendet.

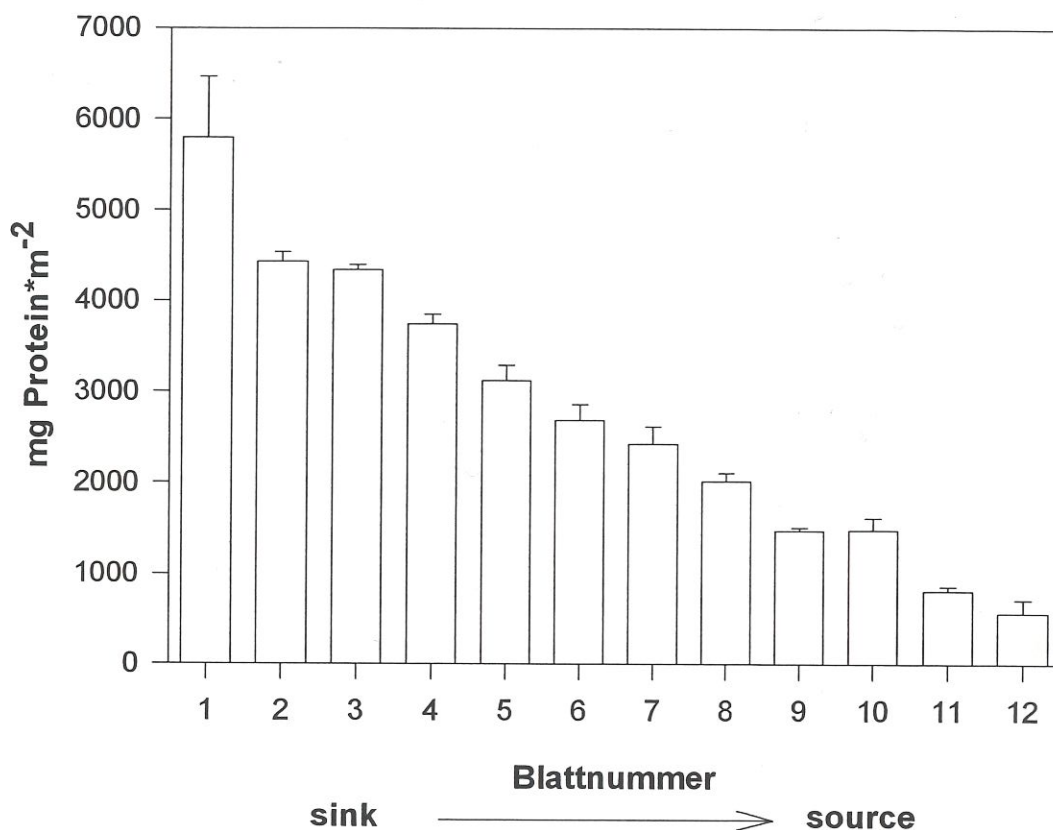


Abb. 22: Proteinmenge in Blättern einer Tabakpflanze. Die Proben stammen aus der gleichen Pflanze, von der die GUS-Aktivität in Abbildung 21 dargestellt ist. Pro Blatt wurden vier Proben gemessen. Die Proteinmenge im jüngsten Blatt ist links in Balken 1 dargestellt, die im ältesten Blatt rechts in Balken 12. Die Angaben erfolgen in mg Protein pro Quadratmeter Blattfläche.

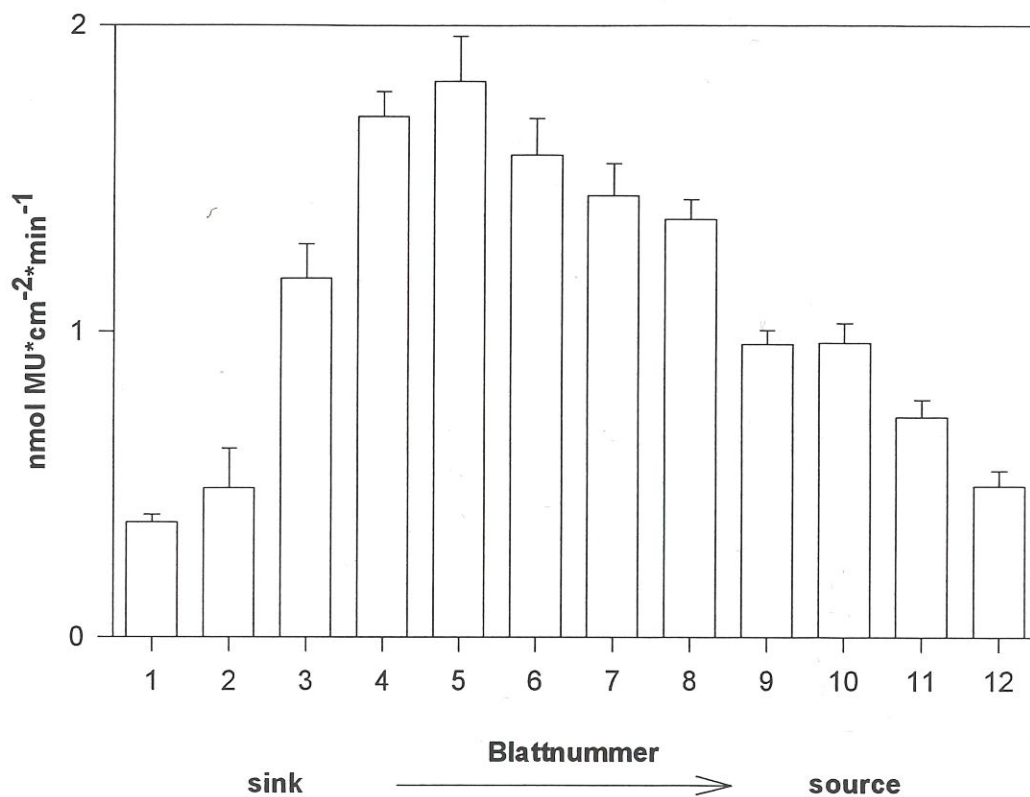


Abb. 23: Fluorimetrische Bestimmung der GUS-Aktivität in Blättern einer Tabakpflanze der Linie TME-1/75. Je vier Proben von allen Blättern einer Pflanze wurden gemessen. Die Aktivität im jüngsten Blatt ist links in Balken 1 dargestellt, die im ältesten Blatt rechts in Balken 12. Die Angaben erfolgen in nmol gebildetes 4-Methyl-Umbelliferon pro Quadratzentimeter Blattfläche pro Minute.

Bei Bezug der fluorimetrischen Daten auf die Blattfläche ergab sich ein Verlauf der GUS-Aktivität von sink- nach source-Blättern, wie sie die Daten aus dem „Northern-Blot“ nahelegten. Die Aktivität war in jungen sink-Blättern mit  $0,37 \text{ nmol MU} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$  niedrig und stieg mit Reifung der Blätter stark bis zum fünften Blatt auf  $1,82 \text{ nmol MU} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$  an. Dies war mit  $13,6 \text{ cm}$  Länge das erste völlig entfaltete source-Blatt. In den folgenden Blättern sank die GUS-Aktivität wieder ab und erreichte im untersten seneszierenden Blatt fast wieder das Niveau der sink-Blätter ( $0,49 \text{ nmol MU} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

#### 4.6.3 Untersuchung der Expression und Aktivität der endogenen cyt FBPase in Tabakblättern

Es wurde überprüft, inwieweit die Daten, die im Gradientenexperiment mit GUS erzielt wurden, mit Daten für die cyt FBPase aus Tabakblättern übereinstimmen.

Dazu wurde zunächst der „Northern-Blot“, der in Abbildung 20 dargestellt ist, mit der radioaktiv markierten cDNA der cyt FBPase aus Kartoffel hybridisiert. In Abbildung 24 ist zu erkennen, daß auch die cytosolische FBPase in sink-Blättern nur schwach exprimiert wurde. Die maximale Menge mRNA der cyt FBPase war in Blatt 4 zu detektieren. Im Gegensatz zu dem Ergebnis für GUS sank die mRNA Menge schon ab dem 5. Blatt wieder bis zum Blatt 9. In den Blättern 10 bis 12 schien es eine Induktion der Expression zu geben.

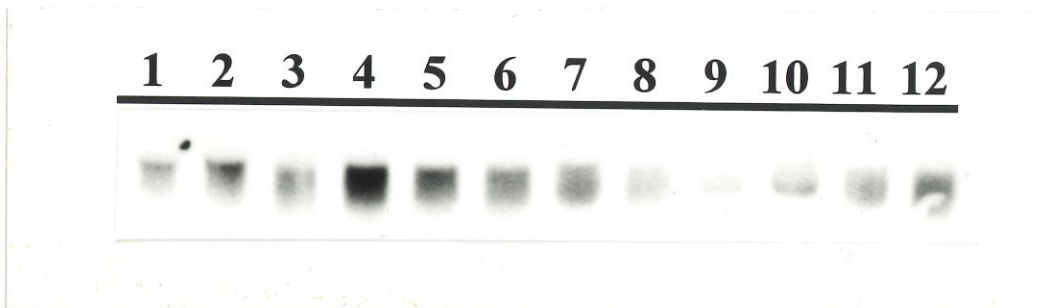


Abb. 24: „Northern-Blot“ Analyse der Expression der cyt FBPase in den Blättern von Tabak. Gesamt RNA wurde extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylon-Membran übertragen. Hybridisiert wurde mit der cDNA der cyt FBPase aus Kartoffel. Pro Spur wurden 30 µg RNA aufgetragen. Spur 1: sink-Blatt, 3 cm; Spur 2: sink-Blatt 5,2 cm; Spur 3: sink-Blatt: 6,8 cm; Spur 4: source-Blatt, 10,5 cm, Spur 5: source-Blatt, 13,6 cm; Spur 6: source-Blatt, 14 cm; Spur 7: source-Blatt, 15,5 cm; Spur 8: source-Blatt, 14,9 cm; Spur 9: source-Blatt, 13,5 cm; Spur 10: source-Blatt, 14,2 cm; Spur 11: seneszierendes Blatt, 14,2 cm; Spur 12: seneszierendes Blatt, 12,9 cm.

Von acht Pflanzen im gleichen Entwicklungsstadium wie die Pflanzen, die für die Analyse der GUS-Aktivität in Blättern verwendet worden waren, wurden Proben für die Bestimmung der maximalen Aktivität der cyt FBPase aus jedem Blatt genommen. Pro Pflanze und Blatt wurde eine Probe geerntet und jeweils zwei Blattscheiben zusammengefaßt, so daß vier Messungen pro Blattstadium durchgeführt wurden. Die Probennahme erfolgte 6 h nach Beginn der Belichtung. In Abbildung 25 ist die cyt FBPase-Aktivität in Bezug auf Blattfläche dargestellt. Die Verteilung der Aktivität war der der GUS-Aktivität sehr ähnlich. Die Aktivität der cyt FBPase nahm bis zum 5. Blatt von 7,9 bis 39,3 µmol umgesetztes F-1,6-bisP \*m<sup>-2</sup>\*min<sup>-1</sup> zu und fiel dann wieder ab. In seneszenten Blättern war die Aktivität mit 6,6 µmol F-1,6-bisP\*m<sup>-2</sup>\*min<sup>-1</sup> wieder so niedrig wie in den jüngsten sink-Blättern. Dies widersprach den Ergebnissen aus den „Northern-Blot“ Analysen, in dem, im Gegensatz zur Abnahme der GUS mRNA

Menge in seneszenten Blättern, eine Zunahme der cyt FB Pase mRNA festzustellen war. Der Unterschied in der Expression der beiden Gene könnte an unterschiedlicher Stabilität der mRNAs in den untersten Blättern liegen. Die Differenz zwischen Expression der cyt FB Pase und ihrer maximalen Aktivität in seneszenten Blättern könnte damit erklärt werden, daß die mRNA in diesen Blättern nicht effektiv transkribiert wurde.

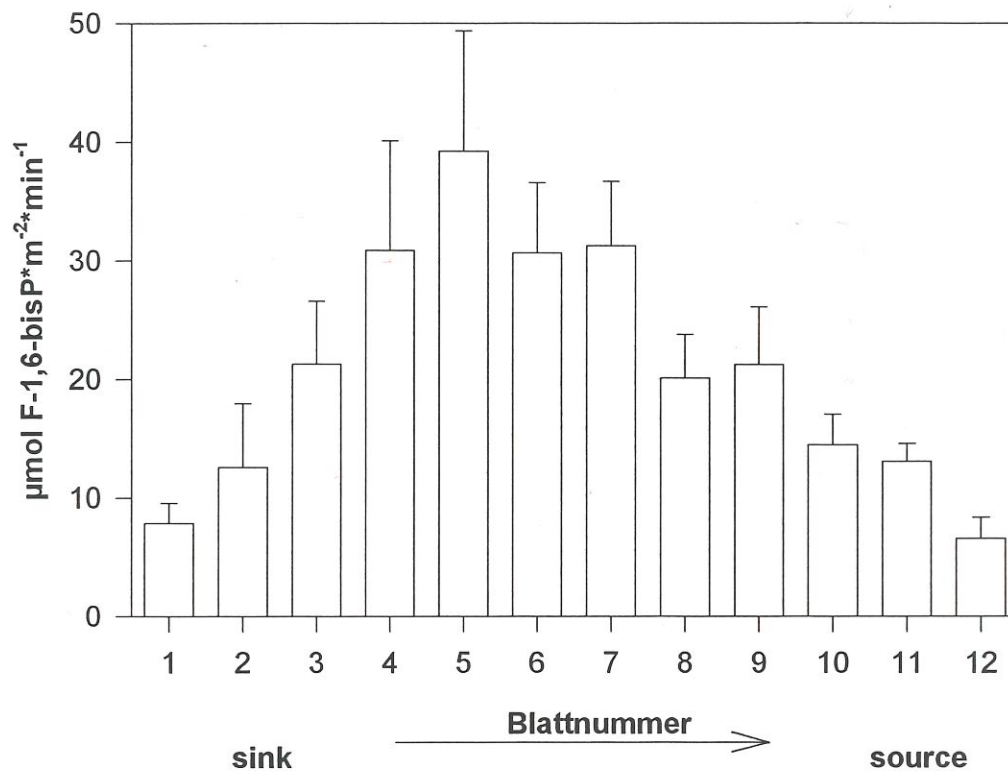


Abb. 25: Aktivität der cyt FB Pase in Blättern von 8 Wochen alten, im Gewächshaus gezogenen Tabakpflanzen. Von acht Pflanzen wurden Proben aus jedem Blatt genommen und je zwei Proben zusammengefaßt. Pro Blattstadium wurden vier Messungen durchgeführt. Die Angaben erfolgen in  $\mu\text{mol}$  umgesetzttes Fruktose-1,6-bisphosphat  $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ . Links ist die Aktivität im jüngsten sink-Blatt dargestellt (Balken 1), rechts die im untersten, seneszierenden Blatt (Balken 12).

Um zu überprüfen, inwieweit die Ergebnisse aus der Bestimmung der GUS-Aktivität und der FB Pase-Aktivität korrelieren, wurden die Daten mit Hilfe des Zeichen- und Statistikprogramms Sigma Plot<sup>®</sup> gegeneinander aufgetragen und eine Regressionsgerade hineingelegt (Abb.26). Aus dem Bezug der Datensätze aufeinander kann die Korrelation der Datensätze in X und Y berechnet werden. Die Korrelation wird angegeben mit dem



Bestimmtheitsmaß  $r^2$  dessen Wert zwischen 0 und 1 liegt. Je höher  $r^2$  ist, desto stärker sind zwei Datensätze miteinander korreliert. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade in Abbildung 26 beträgt 0,90. Demnach korrelierten die Werte für GUS-Aktivität und Aktivität der cyt FBPase in Blättern von Tabakpflanzen stark. Die GUS-Expression, vermittelt durch den klonierten Promotorbereich der cyt FBPase in den Pflanzen der Linien TME-1 und TME-11 entsprach der Expression der endogenen cyt FBPase in den Blättern von Tabak.

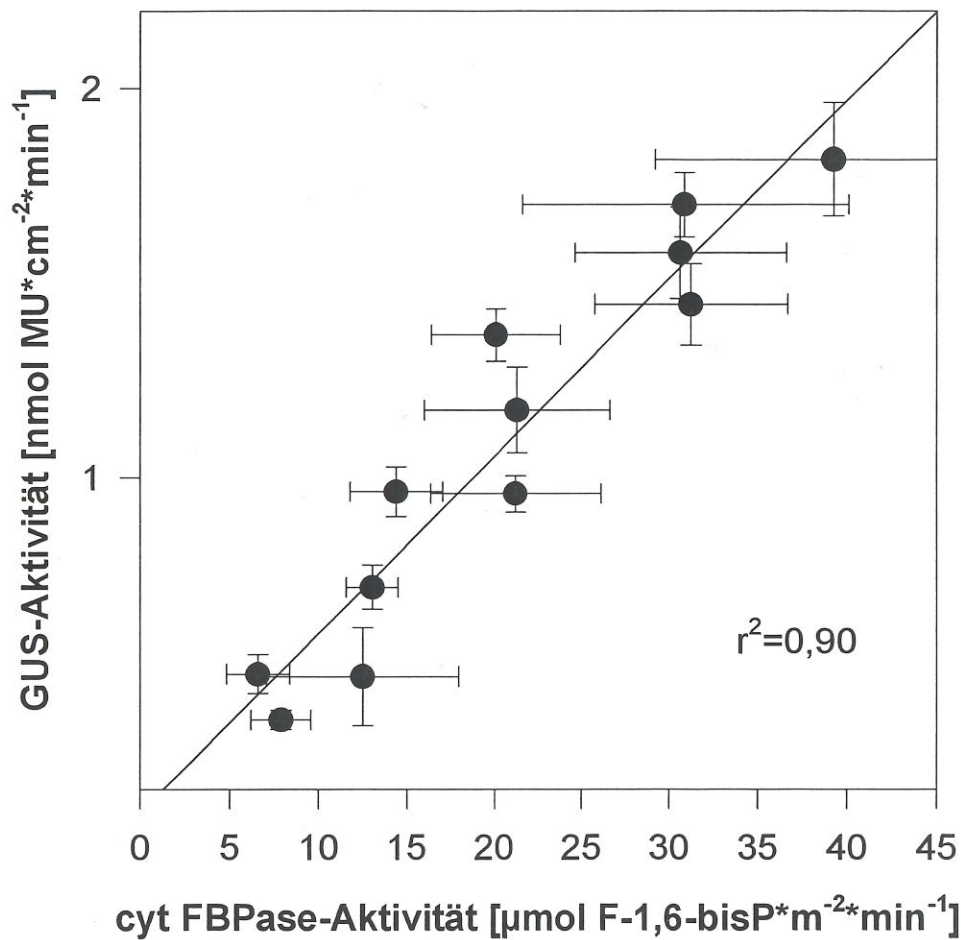


Abb. 26: Korrelation der Aktivität der cyt FBPase und GUS-Aktivität in den Blättern von Tabakpflanzen. Es wurden die Daten aus Abbildung 25 (cyt FBPase-Aktivität) und Abbildung 23 (GUS-Aktivität) verwendet. Der Bestimmtheitsgrad der Regressionsgeraden beträgt  $r^2=0,90$ .

#### 4.7 Expression des chimären GUS-Gens unter verschiedenen Umwelteinflüssen

Im folgenden wurde untersucht, wie sich der Promotor unter variierten äußeren Einflüssen verhält. Da der Promotor hauptsächlich in voll entfaltenen Blättern aktiv ist, wurden die Untersuchungen auf diese beschränkt.

Die Versuche wurden mit Tabak durchgeführt, da er leichter anzuziehen ist und die großen Blattflächen die Probennahme vereinfachen.

Alle Versuche wurden mit den Transformationslinien TME-1 und TME-11 durchgeführt. Die Ergebnisse waren in beiden identisch, weshalb nur jeweils eine Linie exemplarisch gezeigt wird.

##### 4.7.1 Tagesgang der GUS-Expression

Khayat et al. (1993) konnten zeigen, daß die mRNA der cyt FB Pase in Blättern der Zuckerrübe während des Tages im Licht akkumuliert, in Dunkelheit konnten dagegen nur geringe Mengen gefunden werden.

Um zu überprüfen, ob der cyt FB Pase-Promotor im Tagesverlauf konstante Expression vermittelt, wurde über 24 Stunden von im Gewächshaus gezogenen 9 Wochen alten transgenen Tabakpflanzen alle zwei Stunden Proben genommen. Bei jeder Probennahme wurde aus je vier voll entfaltenen Blättern der Pflanze je eine Blattscheibe mit dem Korkbohrer entnommen. Diese wurden zusammengefaßt, gesamt RNA extrahiert und im „Northern-Blot“ Verfahren analysiert. Der Versuch wurde um 10 Uhr gestartet und um 8 Uhr des folgenden Tag beendet. Die Pflanzen waren von 6 Uhr bis 22 Uhr 16 h belichtet.

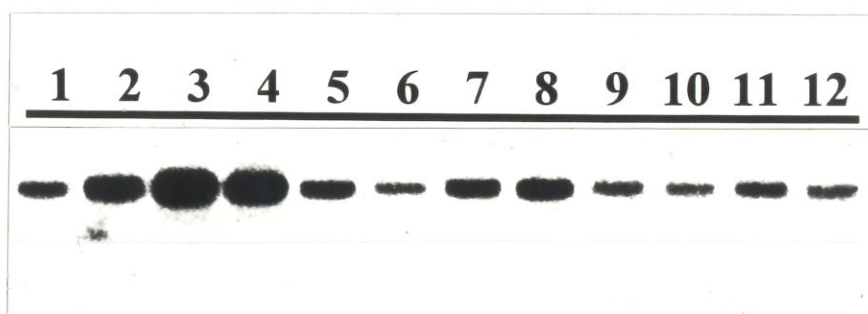


Abb. 27: „Northern-Blot“ Analyse der Expression der GUS im Tagesverlauf. Gesamt RNA (30 µg pro Spur) wurde aus Blattproben extrahiert, die alle zwei Stunden während eines Tages geerntet wurden. Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylon-Membran übertragen und mit einem radioaktiv markierten GUS Fragment hybridisiert. Spur 1: 10 Uhr, 4 h nach Beginn der Belichtung, Spur 2: 12 Uhr, 3: 14 Uhr, 4: 16 Uhr, 5: 18 Uhr, 6: 20 Uhr, 7: 22 Uhr, Ende der Lichtperiode, 8: 24 Uhr, 9: 2 Uhr, 10: 4 Uhr, Spur 11: 6 Uhr, Beginn der Belichtung, 12: 8 Uhr..

Zur Hybridisierung des „Northern-Blots“ wurde das 5' *HincII* Fragment des GUS-Gens verwendet. Wie in Abbildung 27 gezeigt, stieg die Menge an mRNA der  $\beta$ -Glucuronidase im Blatt von 10 bis 14 Uhr an (Abb 27, Spur 1-3). Zwei Stunden später war eine geringere Menge zu detektieren (Spur 4), die zum Abend weiter abfiel. Ein leichter Anstieg der mRNA Menge war um 24 Uhr zu finden (Spur 8). Anschließend fiel der Level an mRNA wieder und blieb bis 8 Uhr (Spur 12), 2 Stunden nach Beginn der Belichtung konstant.

Da unbekannt war, ob und wie sich die Menge an mRNA der cytosolischen FBPase im Tagesverlauf ändert, wurde der „Northern-Blot“ anschließend mit der cDNA der cyt FBPase hybridisiert. Es wurde festgestellt, daß von 8 Uhr bis 18 Uhr nur geringe Mengen mRNA der cyt FBPase in Tabak zu detektieren sind. Ab 20 Uhr bis zum nächsten Morgen um 6 Uhr war die mRNA nicht nachweisbar (nicht gezeigt).

#### 4.7.2 GUS-Expression in Keimlingen

In Abschnitt 4.7.1. wurde gezeigt, daß die Transkriptmenge der  $\beta$ -Glucuronidase unter Kontrolle des Promotors der cyt FBPase nachts stark abnimmt. Zrenner (1993) konnte für Kartoffelpflanzen nachweisen, daß das Transkript der cyt FBPase in Kartoffelpflanzen lichtinduzierbar ist. Im folgenden sollte untersucht werden, ob der Promotor der cyt FBPase in etiolierten Tabakkeimlingen aktiv ist oder Licht zum Aktivieren des Promotors notwendig ist.

Dazu wurden sterilisierte Samen der Linien TME-1 und TME-11 auf mit pulverisierter Kohle geschwärztem MS-Medium mit 0,5% Agar und 100 mg/l Kanamycin ausgesät. Von jeder Linie wurde je eine Petrischale mit Samen in die Gewebekulturräume, eine andere in Dunkelheit bei gleicher Temperatur gestellt. Nach 14 Tagen wurden Keimlinge geerntet und nach Vakuuminfiltration in X-Gluc-Lösung über Nacht inkubiert. In Abbildung 28 sind zwei 14 Tage alte Keimlinge gezeigt, wovon der eine in Licht angezogen wurde, der andere in Dunkelheit. Der etiolierte Keimling zeigte in keinem Gewebe GUS-Aktivität, der in Licht gezogene zeigte nur in den Kotyledonen Aktivität. Der Promotor der cyt FBPase wurde lichtabhängig exprimiert, möglicherweise wurde er aktiviert durch den Anstau von Produkten der Photosynthese im Cytosol.

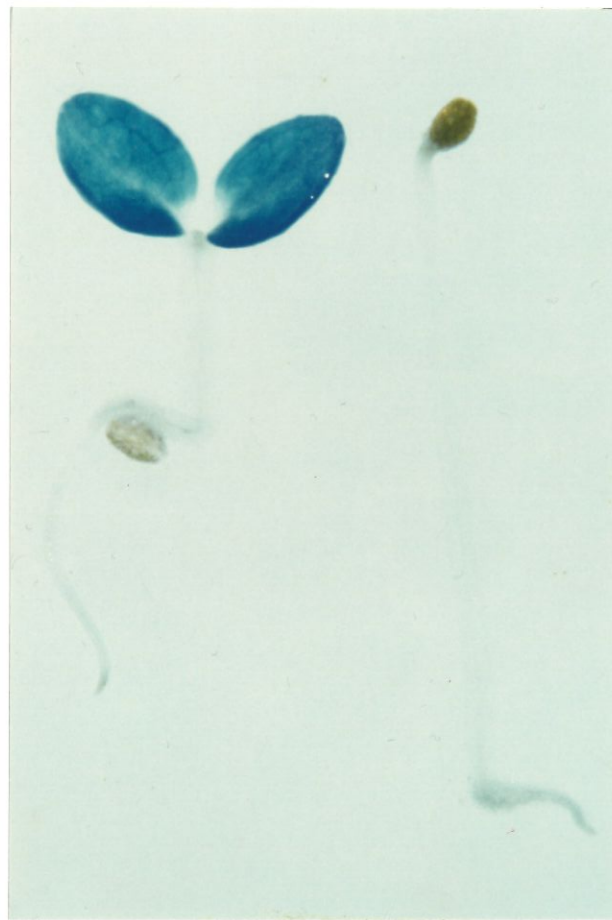


Abb. 28: Histochemische Detektion der Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase unter Kontrolle des cyt FBPase-Promotors in Keimlingen. Die Keimlinge wurden nach 14 Tagen geerntet und über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert. Anschließend wurde Chlorophyll durch Ethanol entzogen. Links ist ein Keimling gezeigt, der in Licht angezogen wurde, rechts ein etiolierter Keimling.

#### 4.7.3 Kälte-Induktion der GUS-Expression

Pflanzen, die in Kälte gehalten werden akkumulieren Zucker, zumeist Saccharose (Guy et al., 1992). Um zu testen, ob dabei der Promotor der cyt FBPase aktiviert wird, wurden 9 Wochen alte transgene Tabakpflanzen kälteinkubiert. Dazu wurden TME-1 und TME-11 Pflanzen vom Gewächshaus in einen Kühlraum transferiert. Im Kühlraum herrschten gleiche Lichtbedingungen wie im Gewächshaus, die Temperatur betrug konstant 4°C. Über 24 Stunden wurde von den im Gewächshaus gezogenen Tabakpflanzen alle zwei Stunden Proben genommen. Bei jeder Probennahme wurde aus je vier voll entfalten Blättern der Pflanze je

eine Blattscheibe mit dem Korkbohrer entnommen. Diese wurden zusammengefaßt. Der Versuch wurde um 8 Uhr gestartet. Die Pflanzen waren nicht in Kälte vorinkubiert, zum Zeitpunkt der ersten Probennahme standen die Pflanzen noch im Gewächshaus.

Aus den Proben wurde gesamt RNA extrahiert und im „Northern-Blot“ Verfahren analysiert. Der Blot wurde mit dem 5'-Fragment des GUS-Gens hybridisiert. Wie in Abbildung 29 gezeigt, stieg die Menge detektierbarer GUS mRNA von 10 Uhr bis 14 Uhr (Spuren 2 - 4) leicht an. Dies entsprach abgeschwächt dem Mittagmaximum der GUS mRNA Menge im Tagesgang (vgl. 4.7.1.). Nach 14 Uhr fiel die Transkriptmenge leicht ab und blieb bis 24 Uhr konstant (Spuren 5-9). Während sie im Tagesgang nach 24 Uhr wieder abfiel, stiegen die Transkriptmengen in Kälte stark an (Spuren 10-13). Der Promotor zeigte nach 18 Stunden Inkubation in Kälte eine Induktion der Transkription.

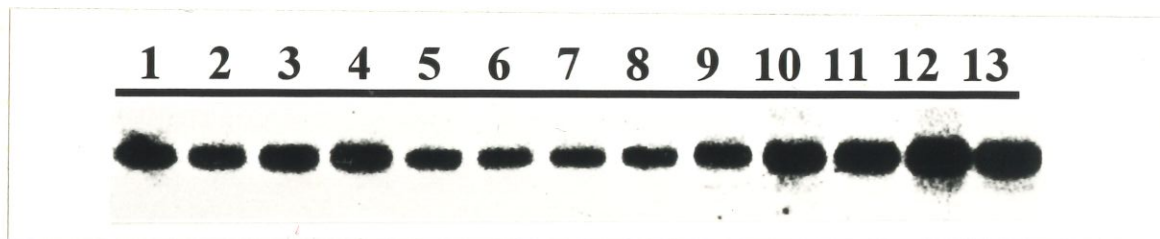


Abb. 29: „Northern-Blot“ Analyse von kälteinkubierten Tabakpflanzen, die das GUS-Gen unter der Kontrolle des *cyt* FBPase-Promotors exprimieren. Die Tabakpflanzen der Linie TME-1/67 wurden nach Probennahme um 8 Uhr in einen Kühlraum mit konstant 4°C und dem Gewächshaus gleichenden Lichtbedingungen gebracht. Alle zwei Stunden wurden Proben aus voll entfalteten Blättern entnommen. Es wurde gesamt RNA extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Aufgetragen wurden jeweils 30 µg gesamt RNA. Der Blot wurde mit einem 5'-*HincII*-Fragment hybridisiert. In Spur 1 ist die 0-Kontrolle aufgetragen, die um 8 Uhr, 2 h nach Beginn der Belichtung genommen wurde, Spur 2: 10 Uhr, 3: 12 Uhr, 4: 14 Uhr, 5: 16 Uhr, 6: 18 Uhr, 7: 20 Uhr, 8: 22 Uhr, Ende der Belichtungsperiode, 9: 24 Uhr, 10: 2 Uhr, 11: 4 Uhr, 12: 6 Uhr, Beginn der Belichtung, 13: 8 Uhr.

Die Induktion der Transkription konnte auf Ebene der GUS-Aktivität nicht nachvollzogen werden. Für die Quantifizierung der GUS-Aktivität wurde von den in Kälte inkubierten Pflanzen alle 4 h je 4 Proben aus einem source-Blatt genommen. Wie in Abbildung 30 dargestellt, blieb die GUS-Aktivität in den source-Blättern während des Versuchs konstant. Möglicherweise reichte die Inkubationszeit nicht aus, um in meßbaren Mengen zusätzliches GUS-Protein zu synthetisieren. Ohl et al. (1990) zeigten für GUS unter Kontrolle eines verwundungsinduzierten PAL-Promotor aus *Arabidopsis* in transgenen *Arabidopsis*, daß drei Stunden nach Verwundung die mRNA der GUS detektierbar war, GUS-Aktivität konnte bis

12 Stunden nach Induktion nicht gefunden werden. Zusätzlich hätte eine Zunahme der GUS-Aktivität in den kälteinkubierten Pflanzen vor einem hohen Aktivitätshintergrund erfolgen müssen, wie er in den source-Blättern vorlag. Dieser hohe Hintergrund könnte eine leichte Erhöhung der GUS-Aktivität überlagern.

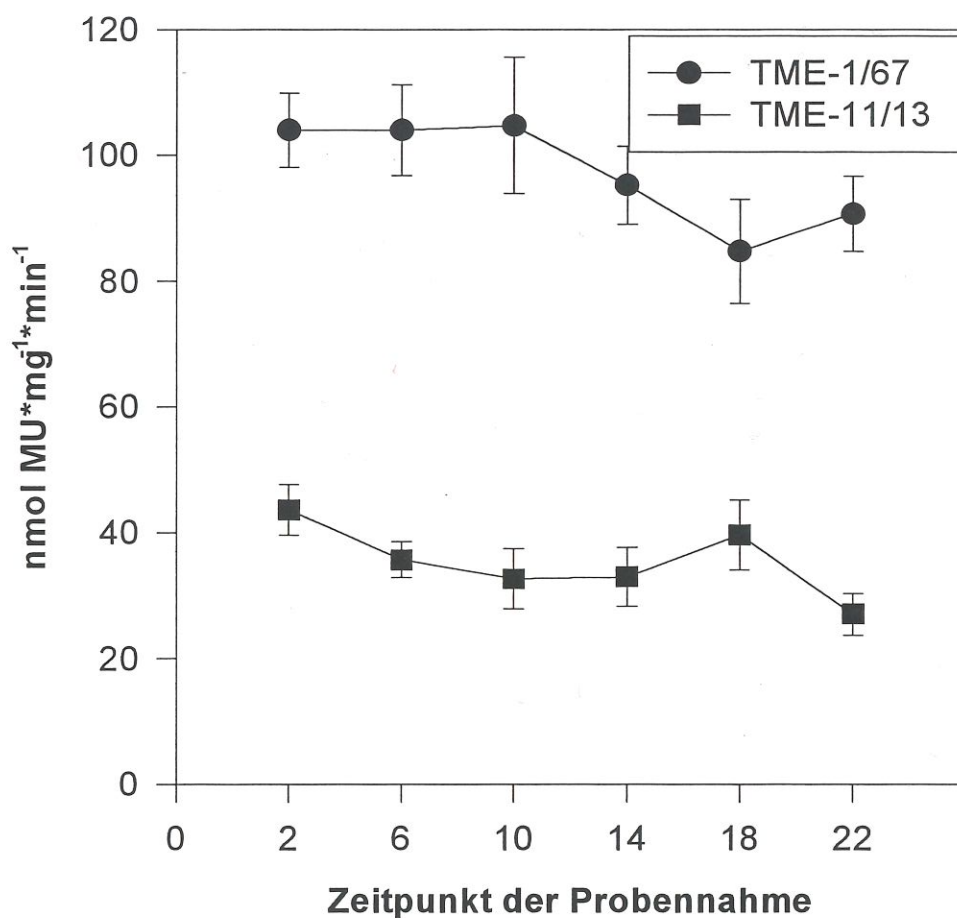


Abb. 30: GUS-Aktivität in kälteinkubierten Tabakpflanzen der Linien TME-1/67 und TME-11/13. Nach 2 Stunden Inkubation der Pflanzen bei 4°C im Kühlraum wurden um 10 Uhr Proben für die Quantifizierung der GUS-Aktivität genommen. Die weiteren Probennahmen erfolgten alle 4 h bis zum nächsten Tag um 6 Uhr. Auf der X-Achse ist die Dauer der Kälteinkubation angegeben. Pro Zeitpunkt wurden vier Messungen durchgeführt. Die Angaben erfolgen in nmol gebildetes 4-Methylumelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

Von den kälteinkubierten Pflanzen wurden die Zuckergehalte im Blatt während des Versuchs bestimmt. Zur Kontrolle wurden auch Proben von Pflanzen, die im Gewächshaus standen geerntet und die Zuckergehalte gemessen. Die Probennahme erfolgte zum Zeitpunkt 0 um 8

Uhr. Anschließend wurden die Pflanzen in Kälte gestellt. Die weitere Probennahme erfolgte alle 4 Stunden bis 8 Uhr am nächsten Tag. In Abbildung 31 sind die Saccharose und Stärkekonzentrationen in source-Blättern im Tagesgang (A) und in Kälte (B) dargestellt. Im Tagesgang stieg die Stärkekonzentration, die hier in mmol Glukose pro Quadratmeter Blatt angegeben wird, bis 16 Uhr stark an (Zeitpunkt 8), blieb dann bis 20 Uhr konstant und fiel bis zum nächsten Morgen wieder stark ab. Die Belichtung im Gewächshaus begann um 6 Uhr und endete um 22 Uhr. Die Stärkekonzentration stieg demnach während der Belichtung bis zu einem bestimmten Punkt an. In Dunkelheit wurde die Stärke dann abgebaut und abtransportiert. Die Saccharosekonzentration blieb im Tagesverlauf konstant, außer zu Beginn des Experiments lag ihre Konzentration immer unterhalb der Stärkemenge. In kälteinkubierten Pflanzen blieben Stärke- und Saccharosekonzentration konstant auf niedrigem Niveau, die Saccharosekonzentration war hier immer höher als die der Stärke.

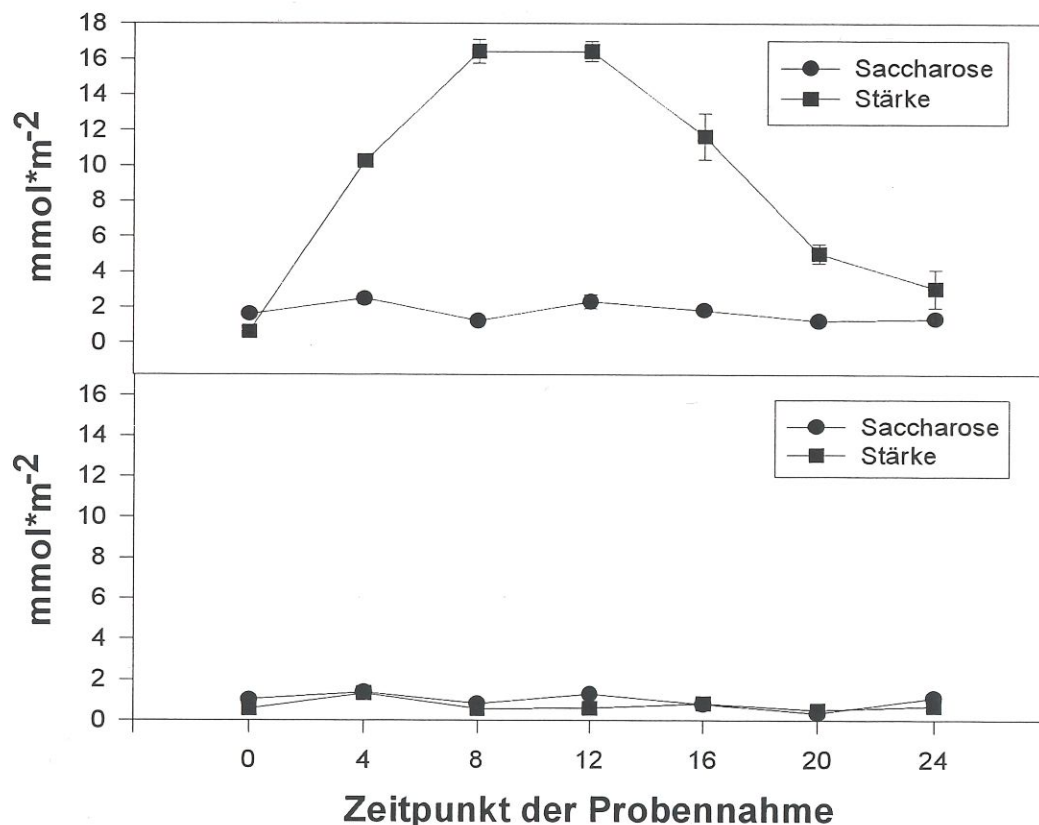


Abb. 31: Zuckergehalt in Blättern von Tabak im Tagesgang (A) und bei Kälteinkubation (B). Pro Zeitpunkt wurden vier unabhängige Proben gemessen. Die Proben für kälteinkubierten Tabak stammen aus den Pflanzen, aus denen die GUS-Aktivität bestimmt wurde. Zum Zeitpunkt 0 befanden sich die Pflanzen noch im Gewächshaus, an der X-Achse ist die Dauer der Kälteinkubation angegeben. 0 entspricht 8 Uhr. Die Angabe

für Saccharose erfolgt in mmol Saccharose pro Quadratmeter, die für Stärke in mmol Glukose pro Quadratmeter Blattfläche.

Es fällt auf, daß der Saccharosegehalt in Blättern bei Inkubation in Kälte nicht anstieg, was im Widerspruch zu den Veröffentlichungen steht, die zeigten, daß in Kälte die Konzentration an Saccharose in Pflanzen anstieg (Guy, 1990). Dies könnte daran liegen, daß die hier dargestellten Ergebnisse von Pflanzen stammten, die nicht in Kälte vorinkubiert wurden und eine Zunahme an Saccharose erst später zu messen ist. Die von Guy bei der Untersuchung von Spinat gewählte Dauer der Kälteexposition war 14 Tage (Guy et al., 1992). Außerdem wurde von Guy darauf hingewiesen, daß ein Teil der Saccharose aus dem Abbau von Speicherstoffen stammte. Der Tabak enthielt zu Beginn dieses Experiments nur geringe Mengen transienter Stärke, dem Hauptkohlenstoffspeicher im Tabakblatt, so daß deren Abbau nicht zu einer Steigerung der Zuckerkonzentration beitragen konnte. Die Photosynthese ist in Kälte in ihrer Effizienz verringert. Die Menge an Assimilaten reichte in diesen Pflanzen nicht aus, Stärke aufzubauen. Vergleicht man das Verhältnis von Saccharose zu Stärke im Tagesverlauf und in Kälte zeigt sich, daß in kälteinkubierten Pflanzen der Einbau des fixierten Kohlenstoffs bevorzugt in Saccharose erfolgte (Abb. 32).



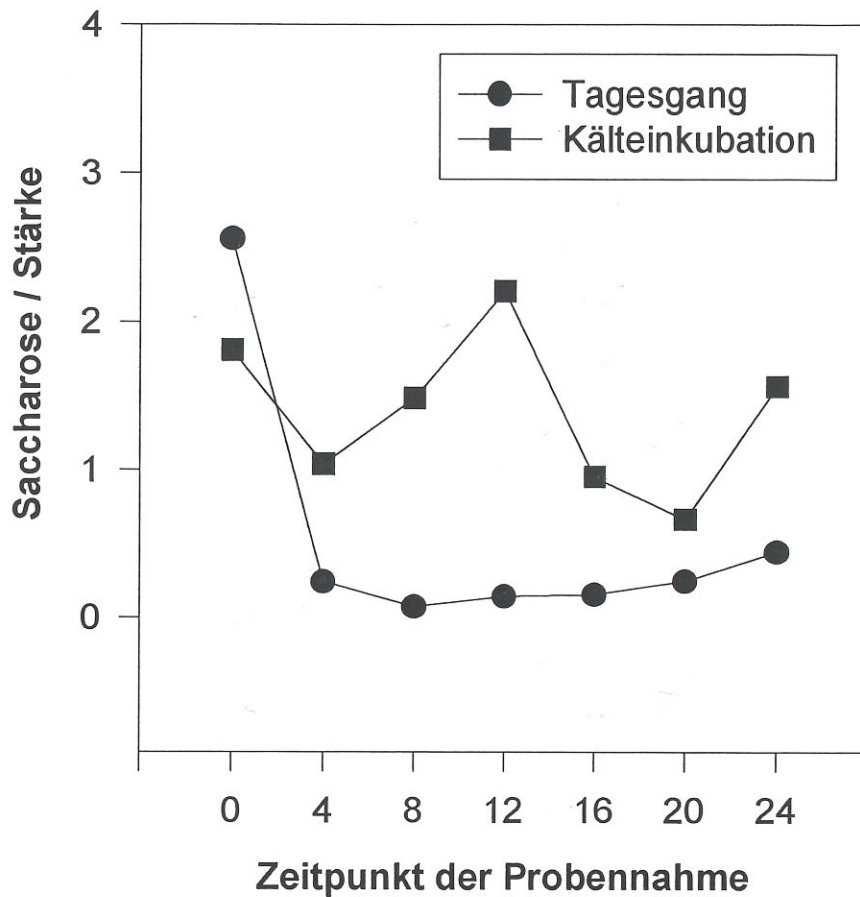


Abb. 32: Verhältnis des Gehalts an Saccharose zum Gehalt an Stärke in Blättern von Tabakpflanzen im Tagesgang (Kreise) und bei Kälteinkubation (Quadrate). Die Daten stammen aus den Messungen, die in Abbildung 37 dargestellt sind.

#### 4.7.4 Zuckerregulation der Expression des chimären GUS-Gens

Die Genexpression kann durch Metabolite reguliert werden, wie Sheen (1990), sowie Krapp und Stitt (1995) für photosynthetische Gene zeigen konnten. Auch die Transkriptmengen der cyt FBPase sanken bei Inkubation von Kartoffelpetiolen in Zuckerlösungen erheblich (Zrenner, 1993). Es wurde daher getestet, wie sich der klonierte Promotor bei Inkubation in Zuckerlösungen verhält.

Dazu wurden Blattscheiben von source-Blättern ausgestanzt und auf 1% igen Saccharose-, Glukose- und Fruktoselösungen floriert. Als Kontrolle, ob mögliche Effekte auf osmotischen Streß zurückzuführen sind, wurden Blattscheiben auf 1%iger Sorbitollösung floriert. Sorbitol

kann von den Zellen nicht aufgenommen und verwertet werden. Als Negativkontrolle wurden außerdem Blattscheiben auf Wasser flotiert. Das Experiment wurde morgens gestartet, damit sich die Abnahme der GUS mRNA im Tagesverlauf (vgl. Abschnitt 4.7.1.) und eine mögliche Abnahme durch die Inkubationen nicht überlagern. Nach 1 h, 3 h und 6 h wurden Proben genommen, gesamt RNA extrahiert und im „Northern-Blot“ Verfahren analysiert. Zur Hybridisierung wurde ein 5'-Fragment der GUS verwendet. Wie in Abbildung 33 gezeigt, sank in der Wasserkontrolle die mRNA Menge der GUS nach 3 h ab, war nach 6 h Inkubation aber wieder auf dem Niveau wie zu Beginn des Experiments. Bei Flotierung der Blattscheiben auf Saccharose war nach 6 h fast keine mRNA der GUS mehr detektierbar. Dies kann kein Effekt durch osmotischen Streß sein, denn bei Flotierung auf Sorbitol kam es im Gegenteil zu einer starken Induktion der GUS-Expression (Spur 14 - 16). Auf Fruktose und Glukose inkubierte Blattscheiben zeigten nach sechs Stunden etwas geringere Mengen GUS mRNA als nach einer Stunde detektierbar war.

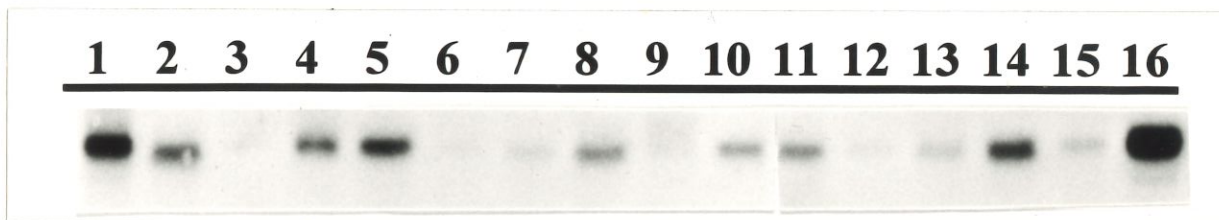


Abb. 33: „Northern-Blot“ Analyse der Expression der GUS in Blattscheiben, die auf Zuckerlösungen flotiert wurden. Gesamt RNA wurde aus Blattscheiben extrahiert, die auf Wasser (Spur 2-4), 1% Saccharose (5-7), 1% Fruktose (8-10), 1% Glukose (11-13) und 1% Sorbitol (14-16) für jeweils 1 h, 3 h und 6 h flotiert wurden. In Spur 1 ist RNA aus einem source-Blatt der Tabakpflanze zu Beginn des Versuchs aufgetragen. Pro Spur wurden 30 µg gesamt RNA aufgetragen. Hybridisiert wurde mit einem 5'-Fragment der GUS.

Die Hybridisierung des „Northern-Blots“ mit der cDNA der cyt FB Pase ergab, daß auch die Menge dieses Messengers bei Flotierung auf Saccharose, Glukose und Fruktose abnahm und eine Inkubation auf Wasser keinen Einfluß auf die Expression hatte. Im Gegensatz zur GUS mRNA wurde die Menge an mRNA der cyt FB Pase bei Flotierung auf Sorbitol jedoch nicht erhöht sondern entsprechend stark reduziert (nicht gezeigt).

#### **4.8 Bestimmung von Zuckergehalt, Photosyntheserate und Stoffwechselflüssen in Blättern von Tabakpflanzen**

Im Rahmen der Untersuchung der entwicklungspezifischen Expression der GUS und der cyt FBPase in Tabakblättern (vgl. Abschnitt 4.6.) wurden zusätzlich die Parameter Zuckergehalt, maximale Photosyntheserate und Stoffwechselflüsse der Blätter bestimmt. Dabei sollte überprüft werden, ob und wie stark die Expression der Gene unter der Kontrolle des cyt FBPase Promotors im Zusammenhang stehen mit der Saccharosesyntheserate und der Konzentration an Saccharose, als Endprodukt der Reaktionskette, an der die cyt FBPase beteiligt ist.

##### **4.8.1 Bestimmung der Zuckergehalte in Blättern von Tabakpflanzen**

Im folgenden sollte untersucht werden, wie hoch die Gehalte an Zucker in den Blättern von Tabakpflanzen ist. Die dazu verwendeten Pflanzen waren, wie die Pflanzen aus deren Blättern in 4.6. GUS- und cyt FBPase-Aktivität bestimmt wurde, 8 Wochen alt. Aus dem untersten Blatt wurden keine Proben entnommen. Die Probennahme erfolgte mittags nach 7 h Belichtung. Pro Blatt wurden vier Blattscheiben genommen und die Zuckergehalte bestimmt. Glukose und Fruktose waren in den Blättern, die die höchste cyt FBPase-Aktivität zeigten am niedrigsten. In den sink- und seneszenten Blättern konnten höhere Mengen Glukose und Fruktose detektiert werden. Der Saccharosegehalt in Blättern nahm von den oberen sink zu den unteren seneszierenden Blättern kontinuierlich von  $4,85 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$  auf  $0,77 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$  ab. Die niedrige Saccharosekonzentration in Blättern mit hoher cyt FBPase Aktivität und daher potentiell hoher Saccharosebiosynthesekapazität läßt sich erklären mit einem schnellen Abtransport der Saccharose aus source-Blättern. Die Stärkeakkumulation zeigte ein vergleichbares Muster wie die Verteilung der Aktivität der cyt FBPase in den Blättern. Die voll entfalteten Blätter enthielten die höchsten Mengen Stärke ( $35,5 \text{ mmol Glukose} \cdot \text{m}^{-2}$ ), die sink- und seneszierenden Blätter die niedrigsten ( $4,27 \text{ mmol Glukose} \cdot \text{m}^{-2}$  in sink;  $2,82 \text{ mmol Glukose} \cdot \text{m}^{-2}$  in seneszenten Blättern) (Abb. 34).

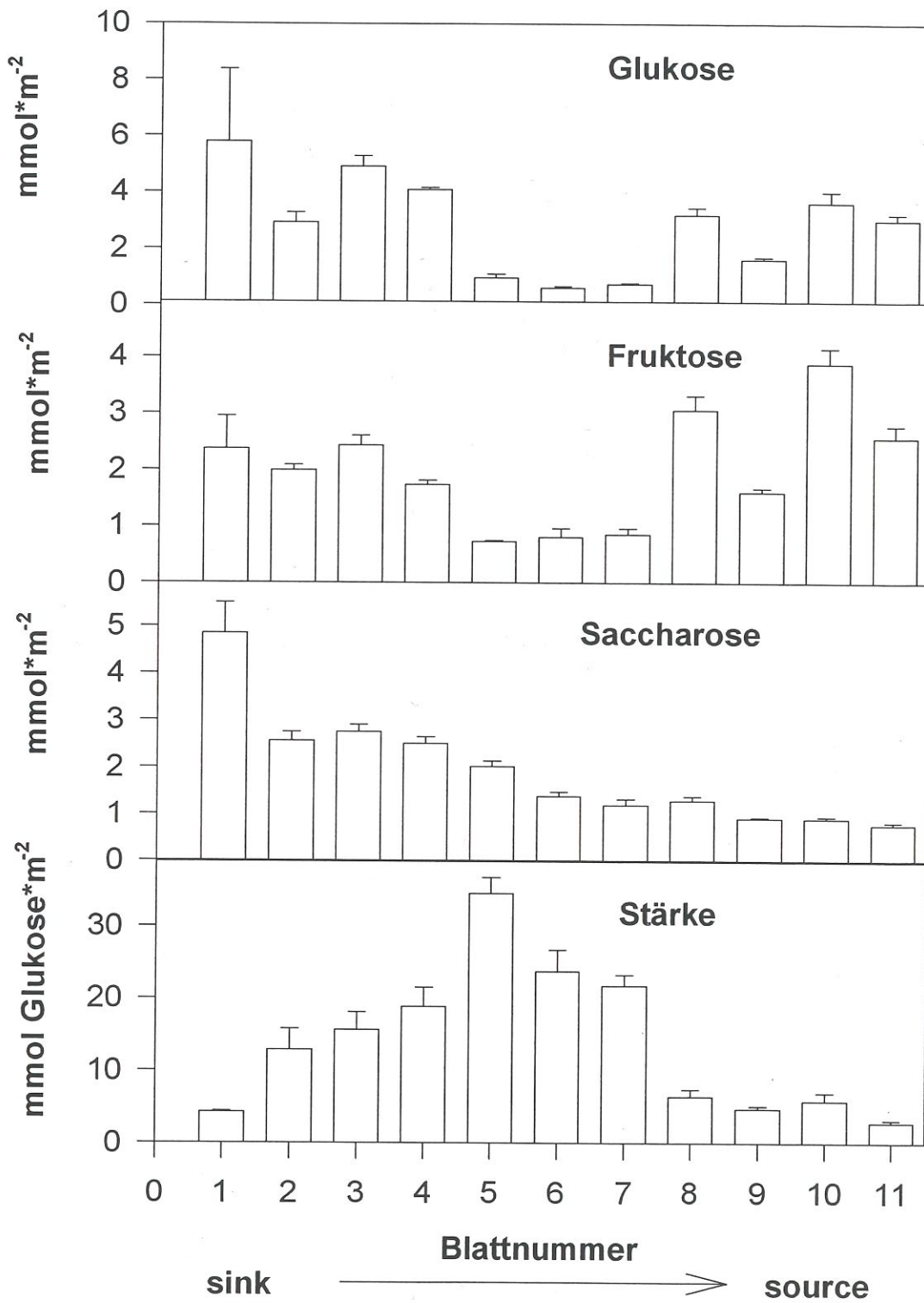


Abb. 34: Zuckergehalt in den Blättern von 8 Wochen alten Tabakpflanzen. Pro Blatt wurden vier Proben gemessen. Die Probennahme erfolgte nach 7 h Belichtung. Die Angaben erfolgen in mmol des angegebenen Zuckers pro Quadratmeter. Stärke wird in mmol Glukose pro Quadratmeter angegeben.

#### 4.8.2 Bestimmung der Saccharosesyntheserate in Blättern von Tabakpflanzen

Die photosynthetische Saccharosebiosynthese hängt ab von der Photosyntheseleistung des Blattes. Aus der Bestimmung der maximalen Photosyntheseleistung des Blattes und der Messung von Einbau von Radioaktivität im Blatt in einer Sauerstoffelektrode mittels radioaktiv markiertem  $\text{CO}_2$  läßt sich die maximale Saccharosesyntheserate bestimmen. Um zu überprüfen, ob die Aktivität der *cyt* FB Pase und entsprechend der GUS-Aktivität mit der maximalen Saccharosesyntheseleistung des Blattes korreliert ist, wurde von 8 Wochen alten Pflanzen zunächst die maximale Photosyntheseleistung der Blätter gemessen. Von drei Pflanzen wurden von oben nach unten aus 11 Blättern je 2 Blattscheiben gerntet und in einer Sauerstoffelektrode mit gesättigtem  $\text{CO}_2$  die pro Stunde und Blattfläche freigesetzte Menge Sauerstoff bestimmt.

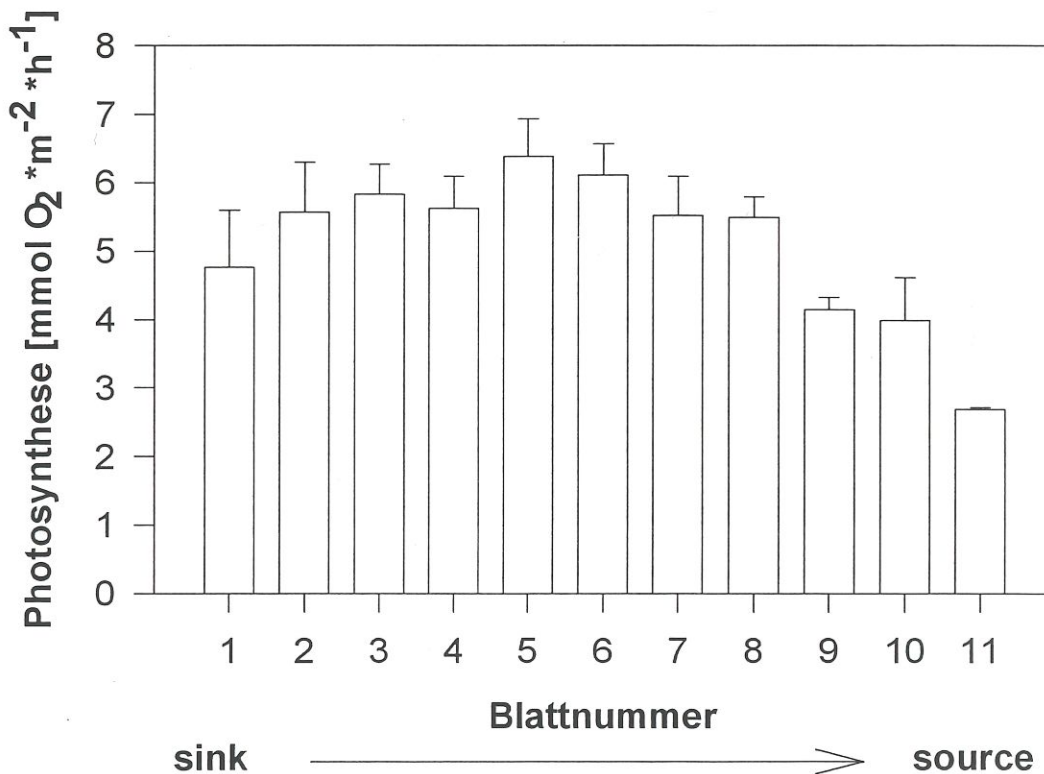


Abb. 35: Maximale Photosyntheserate in Blättern von 8 Wochen alten Tabakpflanzen. Die Probennahme erfolgte morgens aus 3 Pflanzen gleichen Entwicklungsstadiums. Mit Ausnahme des Blattes 11, von dem nur 2 Proben gemessen wurden, wurden pro Blatt 6 Messungen durchgeführt. Die Angabe erfolgt in  $\text{mmol}$  freigesetzter Sauerstoff pro Quadratmeter Blattfläche pro Stunde.

Das erste Blatt, aus dem in diesem Experiment Proben genommen wurden entsprach vom Entwicklungszustand in etwa dem Blatt 2 in den oben dargestellten Messungen. Die Blätter wichen in ihrer maximalen Photosynthesekapazität nur geringfügig voneinander ab. Lediglich im ältesten source-Blatt kam es zu einer Halbierung der maximalen Photosyntheseleistung im Vergleich zu den anderen source-Blättern (Abb. 35).

Aus den Blattproben wurden anschließend die Flüsse des fixierten CO<sub>2</sub> in die Saccharose, Stärke, organische Säuren und Aminosäuren bestimmt. Dazu wurden ethanolische Extrakte aus den Blattscheiben nach Quick et al. (1989) hergestellt und der Einbau der Radioaktivität in die unlösliche und die lösliche Fraktion bestimmt. Letztere wurde aufgetrennt in neutrale, anionische und kationische Bestandteile. Die unlösliche Fraktion repräsentiert den Einbau in Stärke, die neutrale lösliche den Einbau in Zucker, wobei mit über 90% Saccharose am meisten repräsentiert wird (persönliche Mitteilung K.-P. Krause). Organische Säuren verhalten sich in der Auftrennung wie Anionen und Aminosäuren wie Kationen.

Vom Blatt 11 wurden keine Stoffwechselflüsse bestimmt, da die Probenzahl zu niedrig war. In Abbildung 36 ist die Saccharosesyntheserate in den verschiedenen Blättern einer Pflanze dargestellt. Die Syntheserate war am geringsten in sink-Blättern ( $2,08 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) und alten source-Blättern ( $1,7 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Sie unterschied sich in diesen aber nur wenig von den mittleren Blattstadien, die Syntheseraten zwischen  $2,5$  und  $2,8 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  aufwiesen.

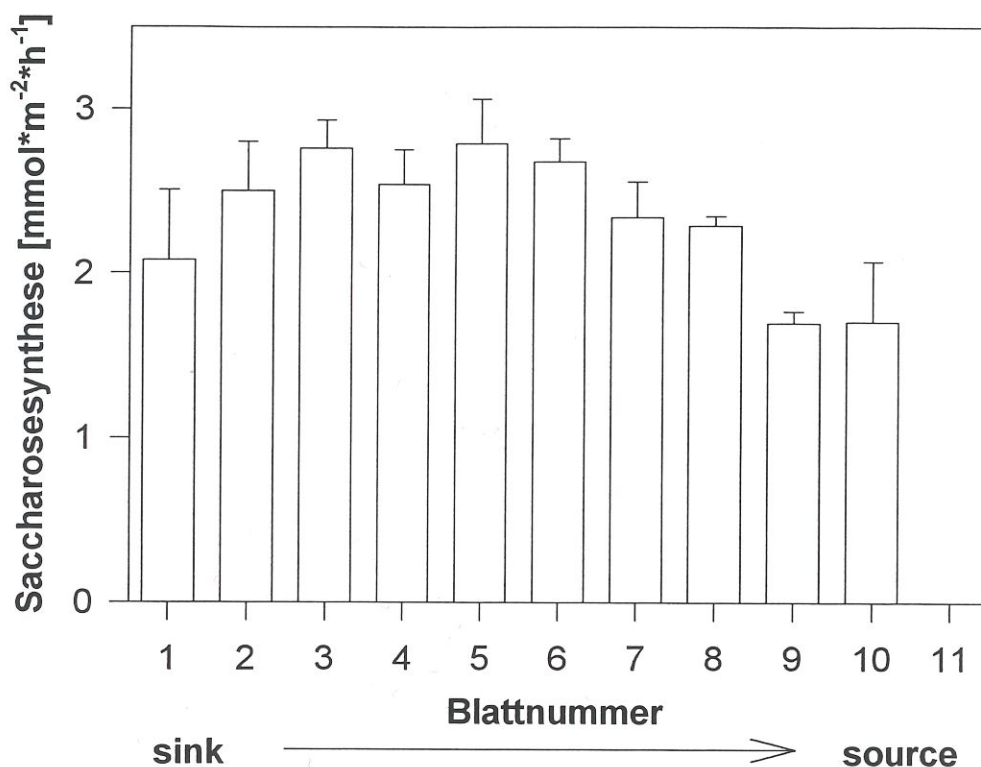


Abb. 36: Maximale Saccharosesyntheserate in verschiedenen Blättern von Tabakpflanzen. Zum Zeitpunkt der Ernte waren die Pflanzen 8 Wochen alt. Links sind die Daten für das jüngste sink-Blatt dargestellt (Balken 1), rechts die Daten für ein altes source-Blatt (Balken 10). Die Angaben erfolgen in mmol gebildete Saccharose pro Quadratmeter Blattfläche pro Stunde.

Die weiteren Stoffwechselflüsse sind in Abbildung 37 dargestellt. Die maximale Syntheserate der Stärke war in den Blättern ähnlich wie die der Saccharose. Die Unterschiede in den einzelnen Blättern waren gering, am niedrigsten war die Rate in sink- und alten source-Blättern. Die Werte schwanken zwischen  $1,94 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  in alten source-,  $2,07 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  in sink- und maximal  $2,79 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  in jungen source-Blättern. Die Syntheseraten der organischen Säuren in den Blättern wiesen deutliche Unterschiede auf, die Rate blieb von sink-Blättern zu mittleren source Blättern fast konstant um  $0,65 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  und fiel dann ab dem 6. Blatt stark ab. Das älteste source-Blatt wies eine Syntheserate von organischen Säuren von nur noch  $0,16 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  auf. Die Aminosäuresyntheserate war in alten source-Blättern um den Faktor zwei niedriger, als in den anderen Blättern, die nur geringe Unterschiede aufwiesen.

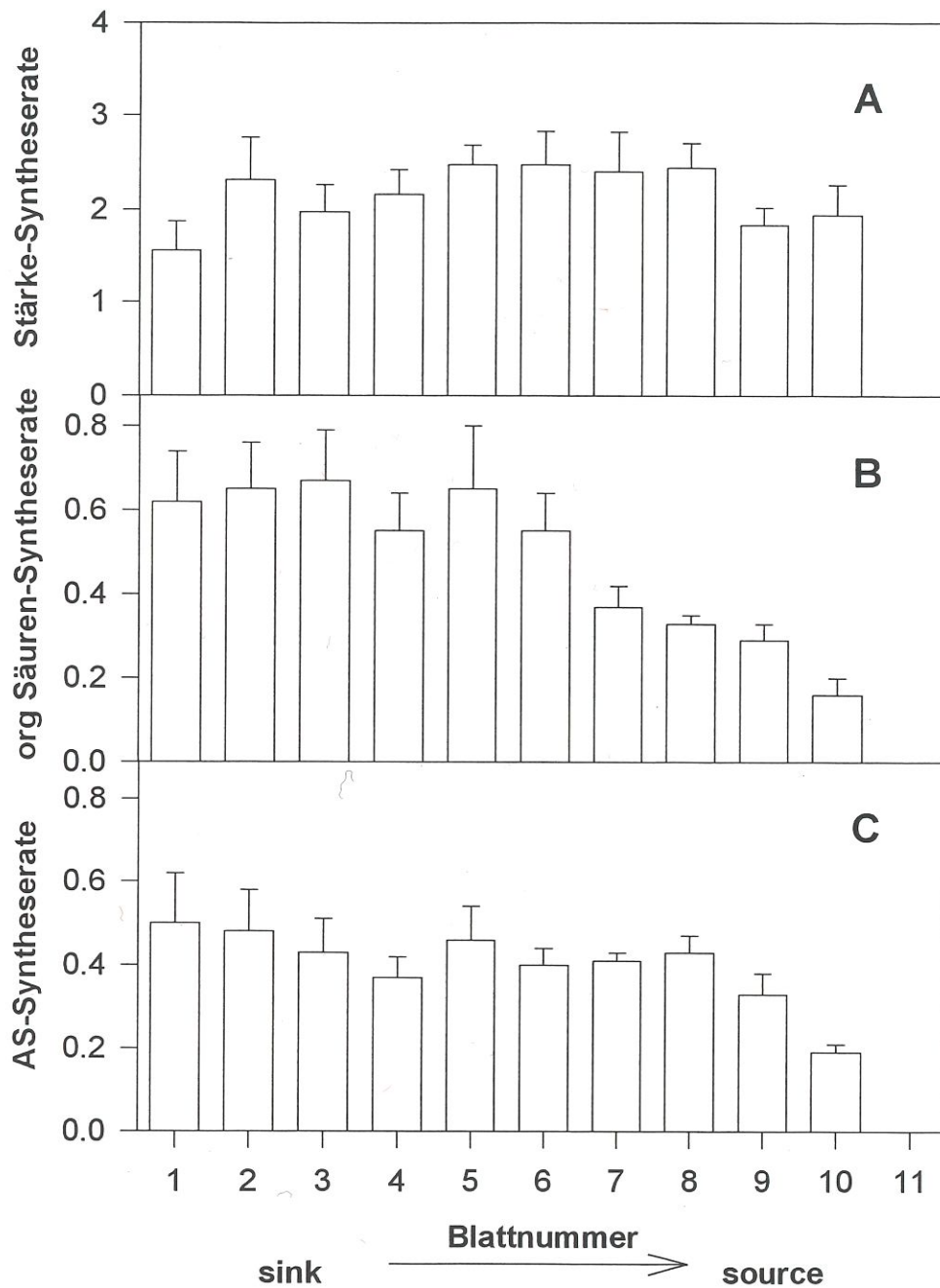


Abb. 37: Syntheserate in Blättern von Tabakpflanzen. (A) Stärkesynthese, (B) Synthese von organische Säuren und (C) Aminosäuren. Die Angaben erfolgen in mmol gebildeter Stoff pro Quadratmeter pro Stunde, Stärke wird in mmol Glukose pro Quadratmeter pro Stund angegeben. Der linke Balken 1 repräsentiert die Syntheserate in sink-Blättern, der rechte Balken 10 die in alten, noch nicht seneszierenden source-Blättern.



Um zu prüfen, ob die Saccharosesyntheseleistung im Blatt und die Photosyntheserate miteinander korreliert waren, wurden die Daten aus Abbildung 35 (maximale Photosyntheserate) und Abbildung 36 (Saccharosesynthese) gegeneinander aufgetragen und eine Korrelationsgerade hineingelegt. Die maximale Photosyntheserate und die Saccharosesyntheserate in Blättern von Tabakpflanzen waren miteinander korreliert. Der Bestimmtheitsgrad der Regressionsgeraden beträgt  $r^2=0,95$ .

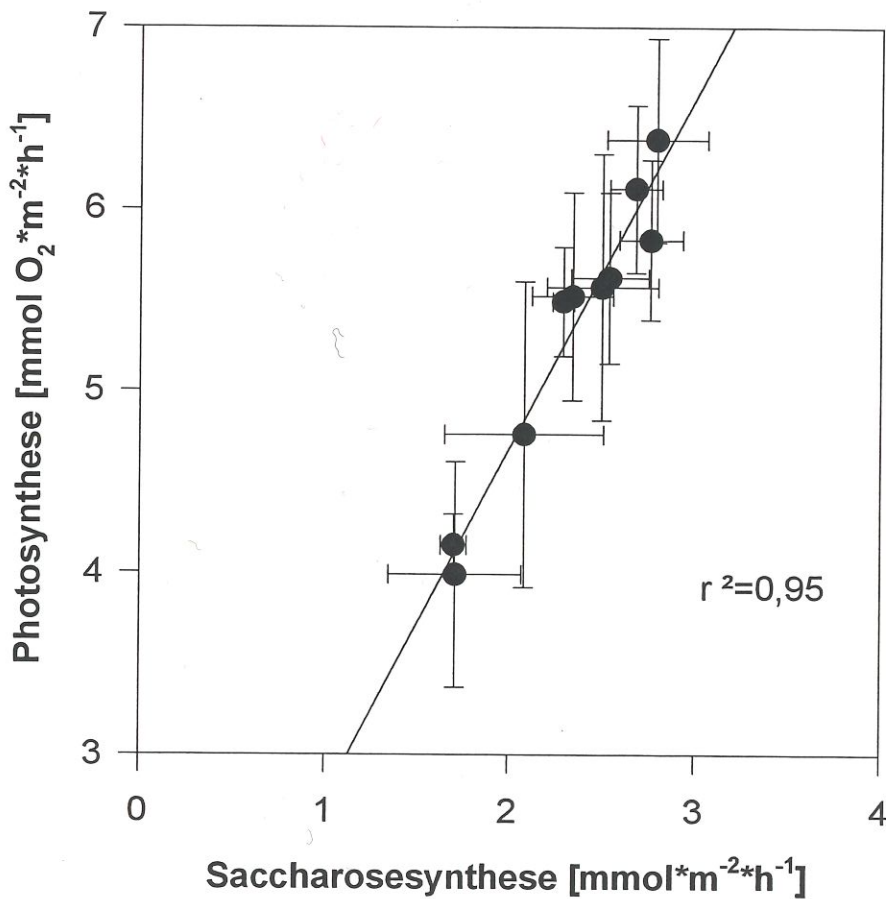


Abb. 38: Korrelation der Saccharosesynthese mit der Photosyntheserate in Blättern von 8 Wochen alten Tabakpflanzen. Die Daten aus Abbildung 35 (Photosyntheserate) und 36 (Saccharosesyntheserate) wurden gegeneinander aufgetragen. Der Bestimmtheitsgrad der Regressionsgeraden beträgt  $r^2=0,95$ .

Die photosynthetische Saccharosesyntheserate im Blatt wird reguliert über die Aktivität der Enzyme cyt FBPase und SPS (Stitt, 1990; Huber und Huber, 1992; Daie, 1993). Die cyt FBPase kontrolliert eine am Beginn der Saccharosesynthese stehenden Reaktion und steuert darüber die Versorgung der folgenden Enzyme mit Edukten ihrer Reaktion (Daie, 1993). Die Aktivität der cyt FBPase im Blatt könnte daher mit der Saccharosesynthese im Blatt korreliert sein. In Abbildung 38 wurde die Saccharosesyntheseleistung korreliert mit der Aktivität der cyt FBPase. Der Bestimmtheitsgrad der Korrelationsgeraden betrug lediglich  $r^2=0,68$ . Danach ist die Saccharosesyntheserate im Blatt nicht direkt mit der Aktivität der cyt FBPase korreliert.

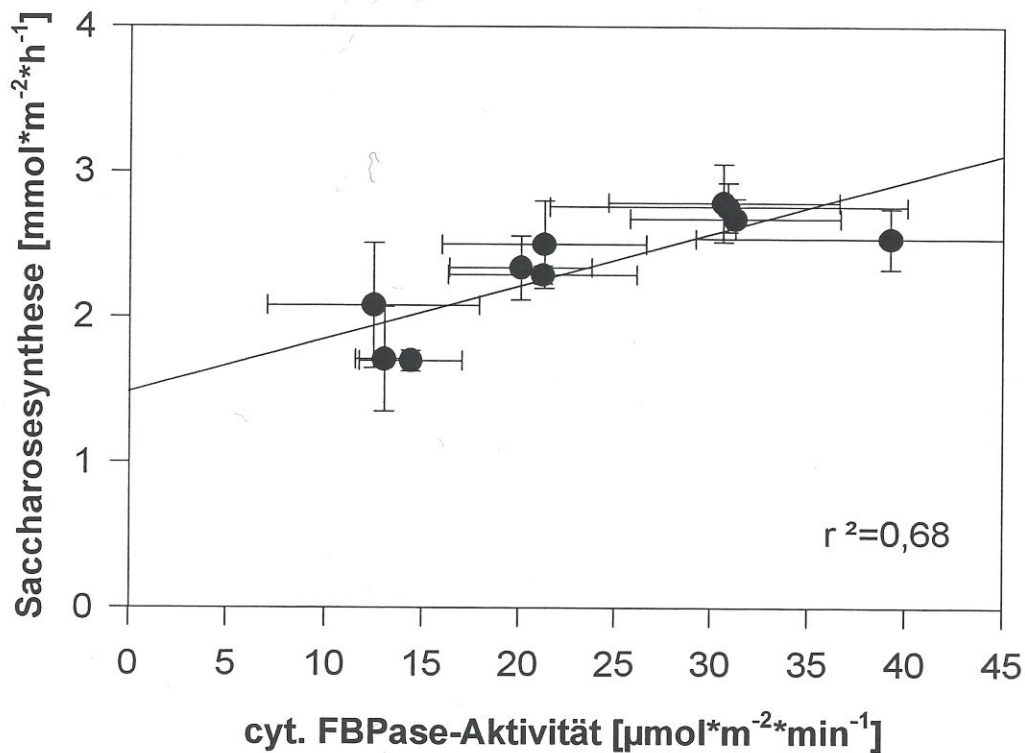


Abb. 39: Korrelation der Aktivität der cyt FBPase und der Saccharosesynthese in Blättern von Tabakpflanzen. Es wurden die Datensätze aus Abb. 29 (Saccharosesynthese) und Abb. 24 (cyt FBPase-Aktivität) verwendet. Der Bestimmtheitsgrad  $r^2$  beträgt 0,68.

#### 4.9 Analyse der Kartoffel-Primärtransformanden der Linien KME-1 und KME-11

Die Transformation der Kartoffelpflanzen mit den Promotor-GUS Konstrukten ME-1 und ME-11 wurde durchgeführt wie von Rocha-Sosa et al. (1989) beschrieben. Die Kartoffeltransformation mit dem Konstrukt ME-1 führte zu 62 regenerierten Pflanzen. Diese wurden zunächst in Gewebekultur durch Inkubation von Blättern in X-Gluc-Lösung auf funktionelle Transformation getestet. Die 19 positiven Linien wurden ins Gewächshaus transferiert. Aus der Transformation mit dem Konstrukt ME-11 konnten 50 Pflanzen regeneriert werden. Auch sie wurden in Gewebekultur auf funktionelle Transformation getestet. Hier waren 15 Linien positiv, die ins Gewächshaus gebracht wurden.

Die Pflanzen wurden nach 8 Wochen in sink- und source-Blättern durch Fluoreszenzmessungen auf die Stärke der Expression getestet. Als sink wurden Blätter bezeichnet, die kleiner als 1,5 cm lang waren, als source solche, die voll entfaltet waren. Pro Blatt wurde nur je eine Probe gemessen. In der Abbildung 40 sind die Ergebnisse der Analyse der Transformationslinie KME-1, in Abbildung 41 die der Transformationslinie KME-11 dargestellt. In Blättern der Transformationslinie KME-11 war die Expression deutlich niedriger als in den Tabakblättern der Linie TME-11. Ein Grund dafür ist der pro Fläche um den Faktor 2-3 höhere Proteingehalt in Kartoffelblättern. Bei Bezug der Fluoreszenz auf Fläche ist die Expression in Tabak nur etwa 3,5 mal höher als in Kartoffeln, im Gegensatz zu einer 13 fach höheren GUS-Aktivität bei Bezugnahme auf die Proteinmenge, wie in den Grafiken gezeigt. In den Pflanzen der Transformanden KME-1 war die Expression in den source-Blättern im Durchschnitt höher als in den source-Blättern der Transformanden KME-11, wohingegen die Expression in sink-Blättern in den KME-11 und KME-1 Pflanzen fast gleich war. Dies führte zu einem starken Unterschied in der GUS-Aktivität in source- und sink-Blättern in Pflanzen der Linie KME-1, wohingegen dieser Unterschied in Pflanzen der Linie KME-11 nur gering war. In Abbildung 42 ist das Verhältnis der GUS-Aktivität in source-Blättern zu GUS-Aktivität in sink-Blättern für die Primärtransformanden beider Linien dargestellt. Nur wenige Pflanzen zeigten in sink-Blättern ähnlich hohe oder höhere Expression als in source-Blättern. Für weitere Analysen wurden die Linien KME-1/9; KME-1/11 und KME-1/20, sowie KME-11/33, KME-11/40 und KME-11/48 ausgewählt.

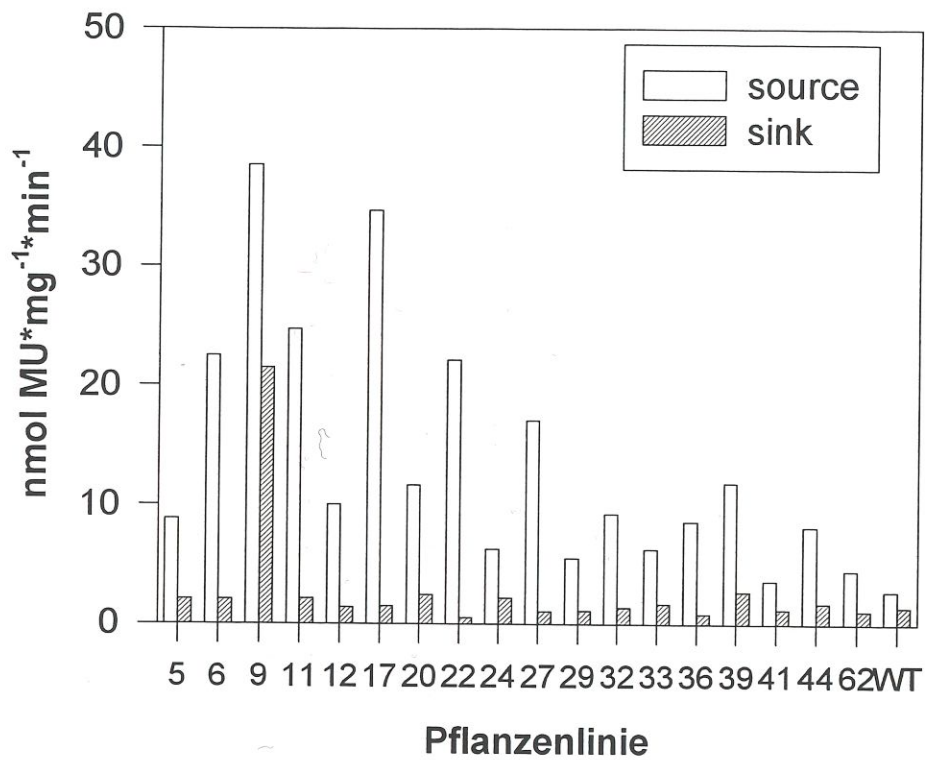


Abb. 40: Bestimmung der GUS-Aktivität in sink- und source-Blättern der im Gewächshaus gezogenen Primärtransformanten der Transformationslinie KME-1. Zum Zeitpunkt der Ernte waren die Pflanzen 8 Wochen alt. Leere Balken repräsentieren die GUS-Aktivität in source-Blättern, schraffierte die Aktivität in sink-Blättern. Pro Blatt wurde eine Probe gemessen. Die Einheit der Angaben ist nmol gebildetes 4-Methyl-Umbelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

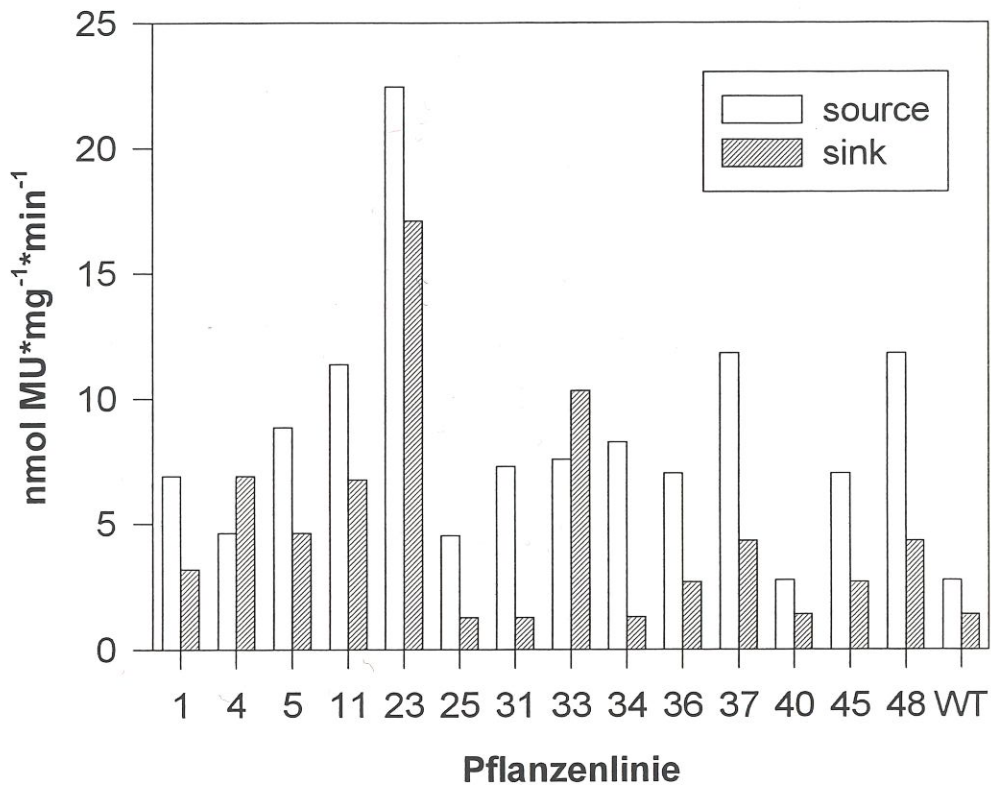


Abb. 41: Bestimmung der GUS-Aktivität in sink- und source-Blättern der im Gewächshaus gezogenen Primärtransformanten der Transformationslinie KME-11. Zum Zeitpunkt der Ernte waren die Pflanzen 8 Wochen alt. Leere Balken repräsentieren die GUS-Aktivität in source-Blättern, schraffierte die Aktivität in sink Blättern. Pro Blatt wurde eine Probe gemessen. Die Einheit der Angaben ist nmol gebildetes 4-Methyl-Umbelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

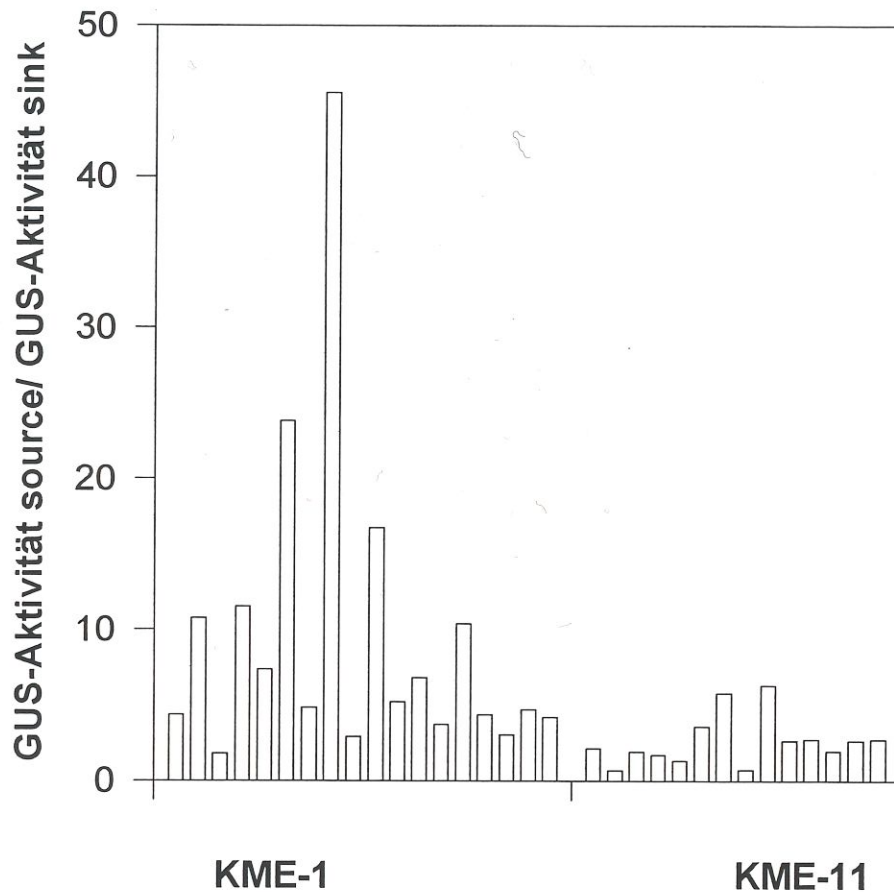


Abb. 42: Verhältnis der GUS-Aktivität in source-Blättern zur GUS-Aktivität in sink-Blättern von Pflanzen der Linien KME-1 und KME-11. Für die Darstellung wurden die Daten aus Abbildung 40 und 41 gewählt.

#### 4.10 Gewebespezifische Expression des chimären GUS-Gens in Kartoffeln

Im folgenden wurde untersucht, in welchen Geweben der Kartoffelpflanze das chimäre GUS-Gen exprimiert wird und wie hoch die GUS-Aktivität ist. Die Knollen wurden einer genaueren Analyse unterworfen und die Expression in verschiedene Situationen untersucht. In den Untersuchungen unterschieden sich die Promotorkonstrukte ME-1 und ME-11 in ihrer Spezifität auch in Kartoffelpflanzen nicht voneinander, weswegen nicht ausdrücklich immer beide Konstrukte beschrieben werden. Alle dargestellten Untersuchungen an Kartoffelpflanzen sind mit beiden Transformationslinien durchgeführt worden.

#### 4.10.1 Gewebespezifische Expression und Aktivität in Kartoffelpflanzen

Die gewebespezifische Expression des GUS-Gens unter Kontrolle des cyt FB Pase-Promotors wurde in den zur weiteren Analyse ausgewählten Linien der Kartoffeltransformanden KME-1 und KME-11 untersucht. Proben von 9 Wochen alten Pflanzen von sink- und source-Blättern, Stamm, Wurzeln, Stolonen und wachsenden Knollen wurden um 13 Uhr geerntet, gesamt RNA extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembran übertragen und hybridisiert mit einem 630 bp *HincII* 5'-Fragment der  $\beta$ -Glucuronidase aus *E. coli* (Abb. 43). Dabei konnte gezeigt werden, daß geringe Mengen mRNA der  $\beta$ -Glucuronidase in voll entfaltenen Blättern zu finden war (Spur 1). In keinem der anderen untersuchten Gewebe war GUS mRNA nachzuweisen. Dies steht im Gegensatz zu den Daten, die für cyt FB Pase mRNA gefunden wurden. Hier konnte in nahezu allen Geweben mRNA nachgewiesen werden (Zrenner et al., 1993).

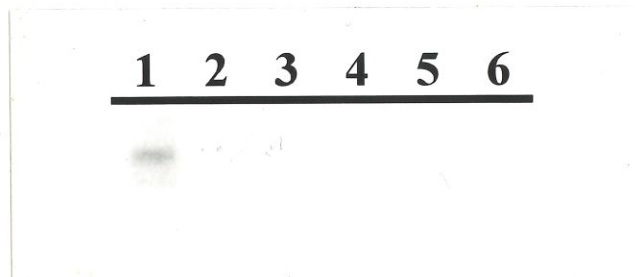


Abb. 43: „Northern-Blot“ Analyse der Expression des GUS-Gens unter der Kontrolle des Promotors der cyt FB Pase in Organen von Kartoffelpflanzen. Von 9 Wochen alten Pflanzen wurden Proben genommen aus source-Blatt (Spur 1), sink-Blatt (2), Stamm (3), Stolon (4), sink-Knolle (5) und Wurzel (6). Es wurde gesamt RNA extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran übertragen. Pro Spur wurden 30  $\mu$ g gesamt RNA aufgetragen. Hybridisiert wurde mit einer für GUS spezifischen Probe.

Der „Northern-Blot“ wurde daher abgewaschen und anschließend mit der gesamten cDNA der cyt FB Pase hybridisiert. Die mRNA der cyt FB Pase konnte nur in source und sink Blättern, nicht aber in Stamm, Wurzel, Stolon und sink-Knolle detektiert werden (Abb. 44). Möglicherweise war die Empfindlichkeit des Nachweises in den von Zrenner gezeigten „Northern-Blots“ höher als in dem in Abbildung 43 und 44 dargestellten. Dies könnte daran liegen, daß Zrenner mehr gesamte RNA in den „Northern-Blots“ analysiert oder eine längere Expositionszeit bei der Autoradiographie gewählt hatte.

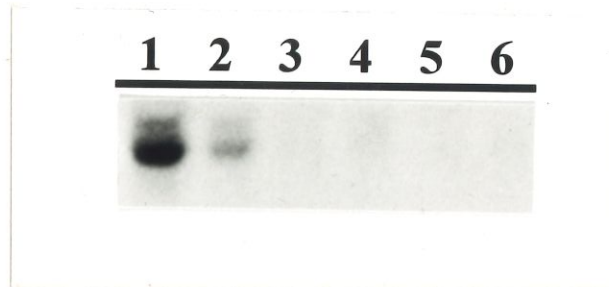


Abb. 44: „Northern-Blot“ Analyse der Expression der cyt FB Pase in Organen von Kartoffelpflanzen. Von 9 Wochen alten Pflanzen wurden Proben genommen aus source-Blatt (Spur 1), sink-Blatt (2), Stamm (3), Stolon (4), sink-Knolle (5) und Wurzel (6). Es wurde gesamte RNA extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran übertragen. Pro Spur wurden 30 µg gesamte RNA aufgetragen. Hybridisiert wurde mit der radioaktiv markierten cDNA der cyt FB Pase.



Gleichzeitig mit der Probennahme für die „Northern-Blot“ Analyse wurde von den gleichen Pflanzen Proben für fluorimetrische GUS Aktivitätsbestimmungen geerntet. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 45 gezeigt.

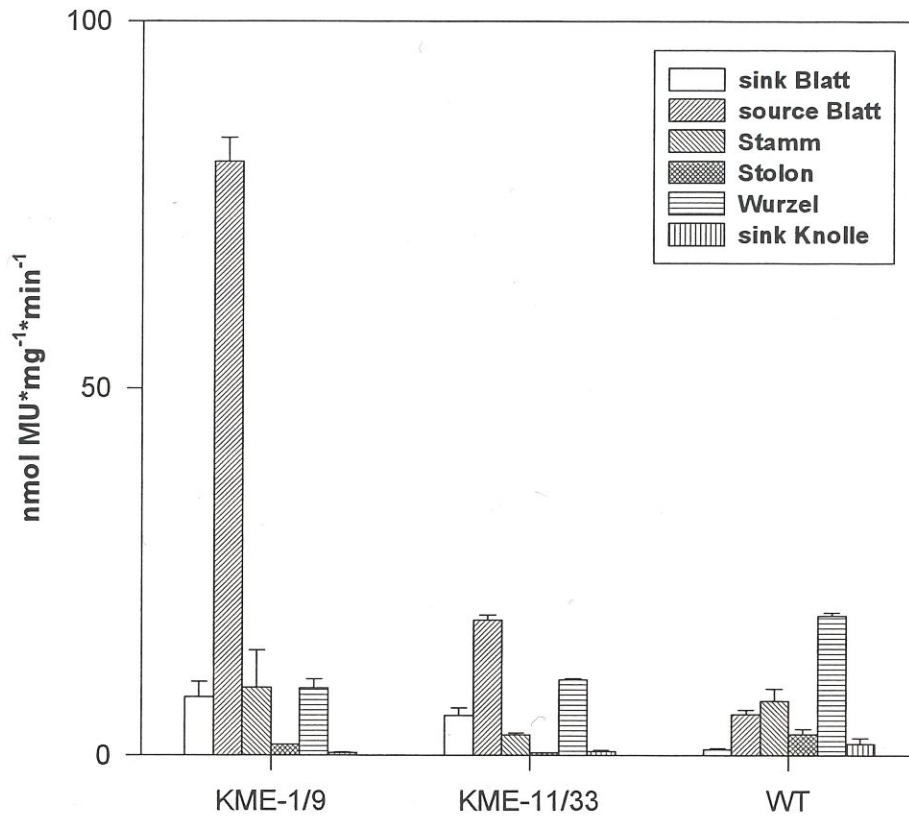


Abb. 45: GUS-Aktivität in verschiedenen Organen der Transformationslinien KME-1 und KME-11, sowie in Wildtyp. Die Probennahme erfolgte mittags von im Gewächshaus gezogenen 9 Wochen alten Kartoffelpflanzen. Für jedes Gewebe wurden pro Pflanze vier Proben gemessen. Von links nach rechts ist die GUS-Aktivität in sink-Blatt, source-Blatt, Stamm, Stolon, Wurzel und sink-Knolle aus den Transformationslinien KME-1, KME-11 sowie Wildtyp dargestellt. Die Angabe ist in nmol produziertes 4-Methyl-Umbelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

Die höchste Aktivität wurde in source-Blättern gefunden. Die Stärke der Aktivität in Kartoffelpflanzen liegt deutlich niedriger als in Tabak (vgl. Abb. 9). Die Kartoffeltransformationslinien unterschieden sich untereinander in der Höhe der Expression, wobei in den KME-1 Pflanzen, die den längeren Promotor enthielten, höhere GUS-Aktivität zu finden war, als in den Pflanzen der Transformationslinie KME-11, die das verkürzte Promotorfragment enthalten, was schon bei den Primärtransformanden gezeigt werden konnte

(vgl. Abschnitt 4.8.). Exemplarisch sind die Ergebnisse für die Linien KME-1/9 und KME-11/33 gezeigt. Die Gewebespezifität die die beiden Promotorkonstrukte vermittelten war identisch. Auffällig bei der Bestimmung der GUS-Aktivität in Kartoffelpflanzen war die hohe Hintergrundaktivität in Wildtypen, insbesondere in Wurzeln. In Tabakwildtyppflanzen wurden um den Faktor 5-10 niedrigere Hintergrundaktivitäten in Wurzeln gefunden. Bei Kartoffelpflanzen konnte aber weder in „Northern-Blot“ Analysen, noch in histochemischen Untersuchungen in den Wurzeln der Transformanten und des Wildtyps GUS mRNA beziehungsweise GUS-Aktivität nachgewiesen werden.

Im Stamm von Kartoffelpflanzen konnte weder durch „Northern-Blot“ Analyse, noch durch fluorimetrische GUS Bestimmung oder durch Färbungen der Expression im Tabakstamm vergleichbare GUS-Aktivität nachgewiesen werden.

#### 4.10.2 Expression des chimären GUS-Gens in Kartoffelknollen

Im weiteren sollte untersucht werden, ob dieser Promotor einer *cyt* FBPase in Knollen aktiv ist. Dafür wurden sich entwickelnde Knollen untersucht, Knollen die gerade geerntet worden waren, Knollen die bei Raumtemperatur oder bei Kälte gelagert wurden und solche, die keimten. Für die Untersuchung wurden pro Transformationslinie sechs Pflanzen ausgewählt.

Wie bereits in Abschnitt 4.9.1. gezeigt, konnte in Stolonen und sink Knollen kurz nach der Ernte weder GUS mRNA noch GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Für die Untersuchung gelagerter Knollen wurden Knollen nach der Ernte in Dunkelheit bei Raumtemperatur oder 4°C gelagert. Wöchentlich wurden bis acht Wochen Lagerung Proben zur Färbung entnommen. Dabei konnte zu keinem Zeitpunkt der Lagerung in Kälte oder in Raumtemperatur GUS-Aktivität gefunden werden. Lediglich in den Knollen einer Pflanze zeigte sich bereits bei der Ernte und in beiden Lagersituationen geringe Expression (nicht gezeigt). Auch mit Hilfe der fluorimetrischen GUS-Bestimmung konnte im Verlauf der Kältelagerung und der Lagerung bei Raumtemperatur keine GUS-Aktivität gemessen werden (nicht gezeigt). Nach acht Wochen Lagerung in Raumtemperatur und Kälte wurde aus den Knollen gesamt RNA extrahiert und im „Northern-Blot“ Verfahren analysiert. Hybridisiert wurde der „Northern-Blot“ mit einem 630 bp 5' *HincII* Fragment der GUS. In beiden Lagerungssituationen zeigte sich keine GUS mRNA in den Knollen (nicht gezeigt). Für *cyt* FBPase ist nachgewiesen worden, daß deren mRNA in kältegelagerten Knollen akkumuliert, in Knollen, die bei Raumtemperatur gelagert wurden jedoch kaum zu detektieren ist (Zrenner, 1993).

Zur Kontrolle, ob die Bedingungen in diesem Experimenten richtig gewählt waren, wurde der „Northern-Blot“ mit der cDNA der *cyt* FBPase hybridisiert. In Abbildung 46 ist gezeigt, daß

die mRNA der cyt FBPase bei den in Kälte gelagerten Knollen stark akkumulierte. In Knollen die bei Raumtemperatur gelagert wurden, war keine cyt FBPase mRNA detektierbar.

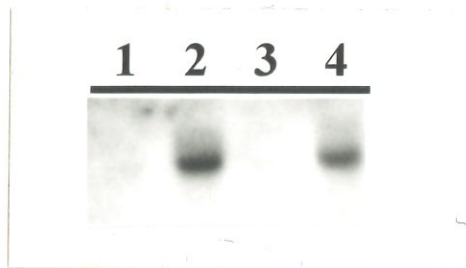


Abb. 46: „Northern-Blot“ Analyse von Knollen nach 8 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur (Spur 1 und 3) oder Kälte (Spur 2 und 4) in Dunkelheit. In jeder Spur wurden 30 µg gesamt RNA aufgetragen. Hybridisiert wurde mit der cDNA der cyt FBPase aus Kartoffel.

Weiterhin wurde untersucht, ob der cyt FBPase-Promotor in keimenden Knollen aktiv ist. Dazu wurden von bei Dunkelheit in Raumtemperatur gelagerten Knollen zum Zeitpunkt der Keimung Proben zur Färbung entnommen. In vier der 12 getesteten Knollen verschiedener Linien konnte durch Färbungen GUS-Aktivität bei der Keimung gefunden werden. In Abbildung 47 (B) ist ein Querschnitt durch eine der keimenden Knollen gezeigt, in denen GUS-Aktivität gefunden wurde. In den Keimen war keine Blaufärbung festzustellen. In der Knolle begann die Blaufärbung kurz unterhalb des Keimansatzes. Die Hauptaktivität war innerhalb des Leitgeweberinges nachzuweisen, die Schale der Knolle zeigte keinerlei Aktivität.

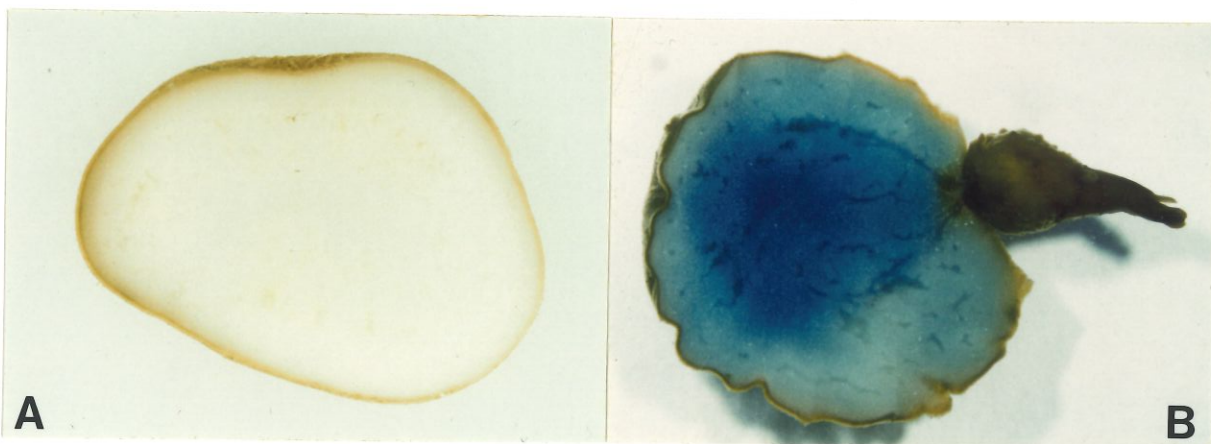


Abb. 47: Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase in keimenden Knollen transgener Kartoffelpflanzen, die das cyt FBPase-Promotor GUS Konstrukt tragen. Keimende Knollen wurden am Keimansatz längs in Scheiben geschnitten und nach Vakuuminfiltration für 12 h in X-Gluc-Lösung inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht keimende Knollen der gleichen Linie geschnitten und gleich behandelt. (A) Knollenquerschnitt einer nicht keimenden Knolle (B) Querschnitt durch eine keimende Knolle.

Acht der 12 getesteten Linien zeigten bei Keimung keine detektierbare Blaufärbung. Dies könnte daran liegen, daß sie GUS so schwach exprimieren, daß die Aktivität mit Hilfe der Färbemethode nicht nachweisbar ist. Möglich ist auch, daß die vier Linien aufgrund von Positionseffekten Blaufärbung zeigten. Der Promotor könnte in bei der Keimung aktivierte Bereiche des Genoms geraten sein. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die Promotoren in den positiven Linien permanent geringe Expression vermitteln und die GUS-Aktivität mit der Zeit akkumuliert. Dieses ist jedoch wegen der Gewebespezifität der Blaufärbung in den keimenden Linien unwahrscheinlich. Um zu prüfen, ob die acht negativen Linien eine geringe GUS-Aktivität enthalten und diese bei Keimung steigt, wurde für eine Wiederholung des Versuchs die GUS-Aktivität fluorimetrisch bestimmt. Diese Nachweismethode ist sensitiver als die histochemische Färbung. In diesem Experiment wurde aus zwei Monate gelagerten, nicht keimenden und sechs Monate gelagerten, keimenden Knollen Proben genommen. Die Keime waren zum Zeitpunkt der Probennahme zwischen 5 cm und 15 cm lang. Zur Probennahme wurde mit dem Korkbohrer am Keimansatz in die Knolle gebohrt und an fünf verschiedenen Stellen Proben aus der Bohrung entnommen. Wie in Abbildung 48 gezeigt, kam es in den Knollen von 8 der 12 getesteten Linien zu einem Anstieg der GUS-Aktivität. Der Promotor war in keimenden Knollen aktiv. Die Aktivität war in keimenden Knollen im Vergleich mit sink- und source-Blättern um den Faktor 2 bis 5 niedriger. Die Linien KME-1/39 und KME-11/36 zeigten keine Zunahme der GUS-Aktivität und in den Knollen der Linie KME-11/48 wurde eine Abnahme festgestellt.

Acht der 12 getesteten Linien zeigten bei Keimung keine detektierbare Blaufärbung. Dies könnte daran liegen, daß sie GUS so schwach exprimieren, daß die Aktivität mit Hilfe der Färbemethode nicht nachweisbar ist. Möglich ist auch, daß die vier Linien aufgrund von Positionseffekten Blaufärbung zeigten. Der Promotor könnte in bei der Keimung aktivierte Bereiche des Genoms geraten sein. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die Promotoren in den positiven Linien permanent geringe Expression vermitteln und die GUS-Aktivität mit der Zeit akkumuliert. Dieses ist jedoch wegen der Gewebespezifität der Blaufärbung in den keimenden Linien unwahrscheinlich. Um zu prüfen, ob die acht negativen Linien eine geringe GUS-Aktivität enthalten und diese bei Keimung steigt, wurde für eine Wiederholung des Versuchs die GUS-Aktivität fluorimetrisch bestimmt. Diese Nachweismethode ist sensitiver als die histochemische Färbung. In diesem Experiment wurde aus zwei Monate gelagerten, nicht keimenden und sechs Monate gelagerten, keimenden Knollen Proben genommen. Die Keime waren zum Zeitpunkt der Probennahme zwischen 5 cm und 15 cm lang. Zur Probennahme wurde mit dem Korkbohrer am Keimansatz in die Knolle gebohrt und an fünf verschiedenen Stellen Proben aus der Bohrung entnommen. Wie in Abbildung 48 gezeigt, kam es in den Knollen von 8 der 12 getesteten Linien zu einem Anstieg der GUS-Aktivität. Der Promotor war in keimenden Knollen aktiv. Die Aktivität war in keimenden Knollen im Vergleich mit sink- und source-Blättern um den Faktor 2 bis 5 niedriger. Die Linien KME-1/39 und KME-11/36 zeigten keine Zunahme der GUS-Aktivität und in den Knollen der Linie KME-11/48 wurde eine Abnahme festgestellt.

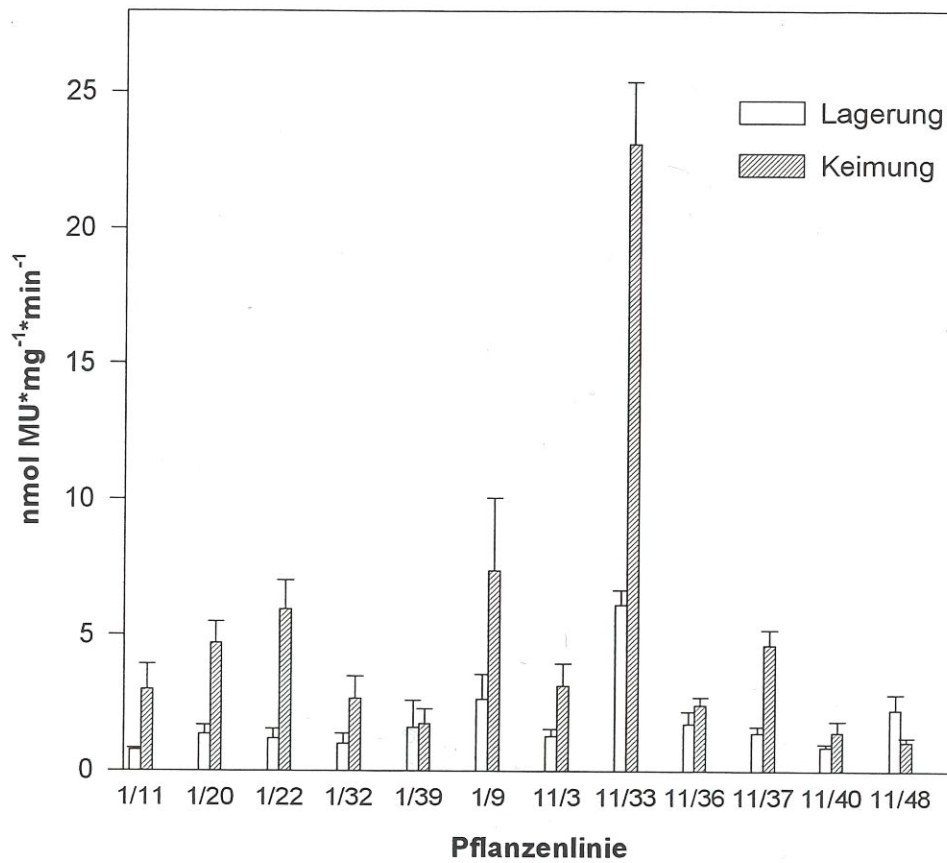


Abb. 48: Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase in gelagerten und keimenden Knollen. Die Knollen waren zum Zeitpunkt der ersten Probenahme zwei Monate in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert worden (weiße Balken). Nach weiteren vier Monaten Lagerung wurde von den keimenden Knollen mit Keimlängen zwischen 5 cm und 15 cm erneut Proben genommen (schraffierte Balken). Pro Knolle wurden 5 Proben aus verschiedenen Bereichen der Knolle gemessen. Die GUS-Aktivität ist angegeben in nmol gebildetes 4-Methyl-Umbelliferon pro Milligramm Protein pro Minute.

#### 4.11 Zellspezifische Expression des chimären GUS-Gens in Kartoffelblättern

In Kartoffelblättern sollte untersucht werden, in welchen Zellen des Blattes der Promotor Aktivität vermittelt. Dazu wurden Schnitte durch die Petiole und das Blatt angefertigt, in 3% igem Paraformaldehyd fixiert und über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert. Die Spezifität im Kartoffelblatt war die gleiche, wie für Tabakblatt bereits gezeigt. Der Promotor ist nicht aktiv in den Zellen der Epidermis, den Trichomen und Stomata, nicht im zentralen Leitbündel, mit Ausnahme der seitlich/oberen Mesophyllzellen und nicht in der Petiole. Er vermittelt im Palisadenparenchym stärkere Expression als im Schwammparenchym. In der Umgebung von Leitgewebe dritter und höherer Ordnung war immer Blaufärbung zu finden. Auch hier konnte nicht ermittelt werden, ob die Zellen des Leitgewebes selber oder umliegende Zellen gefärbt wurden. In Abbildung 49 ist ein Schnitt durch das zentrale Leitgewebe eines Blattes der Kartoffeltransformationslinie KME-1/9 gezeigt.

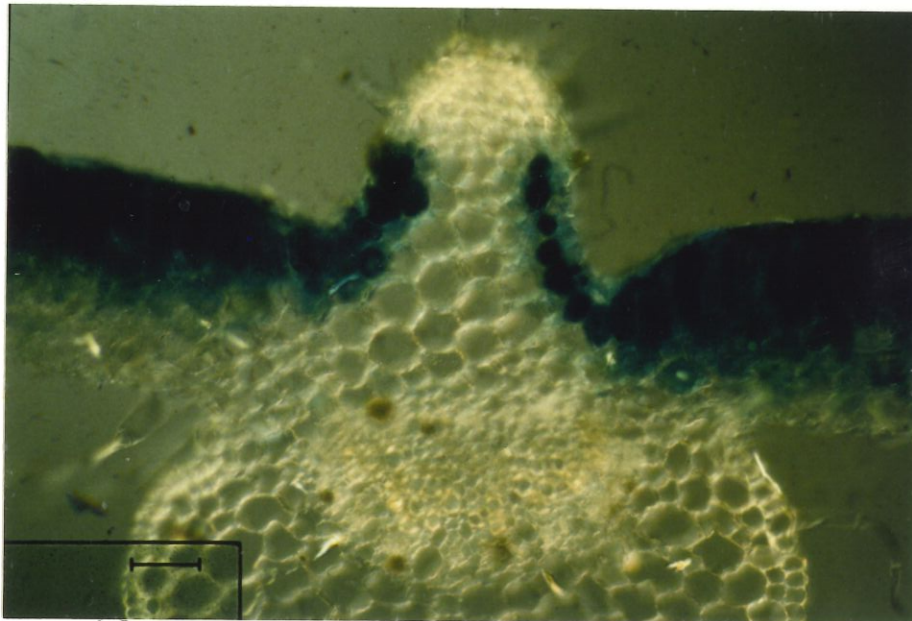


Abb. 49: Histochemische Detektion der vom cyt FBPase-Promotor vermittelten GUS-Aktivität im source-Blatt von Kartoffeln. Querschnitt durch das zentrale Leitgewebe. Die Schnitte wurden über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert und das Chlorophyll anschließend mit Ethanol entzogen.

#### 4.12 Entwicklungsspezifische Expression des chimären GUS-Gens in Kartoffelblättern

Es wurde untersucht, ob es einen dem Tabakblatt vergleichbaren Verlauf der Expression während der Entwicklung eines Blattes vom sink- zum source-Blatt gibt. Dazu wurden Blätter verschiedener Entwicklungsstufen transgener Kartoffelpflanzen in X-Gluc-Lösung über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Blätter in Lactophenol/Chloralhydrat geklärt und das Chlorophyll entzogen. In Abbildung 50 ist zu sehen, daß der Verlauf der Expression mit dem in Tabakblättern gefundenen vergleichbar war. Die erste Blaufärbung war in jungen Blättern in der Spitze des obersten Fiederblattes zu finden (Abb. 50 (A)). Erst wenn in dieser Blattfieder die Blaufärbung etwa 2/3 des Blattes erfasst hatte, begann in den darunterliegenden Fiederblättern die Expression an der Spitze (B). In den untersten Blattfiedern setzte die Blaufärbung entsprechend noch später ein (C). Die gezeigten Blätter waren 1,5 cm, 4,5 cm und 7,5 cm lang. Die source-Blätter dieser Pflanze hatten eine Länge von etwa 15 cm.

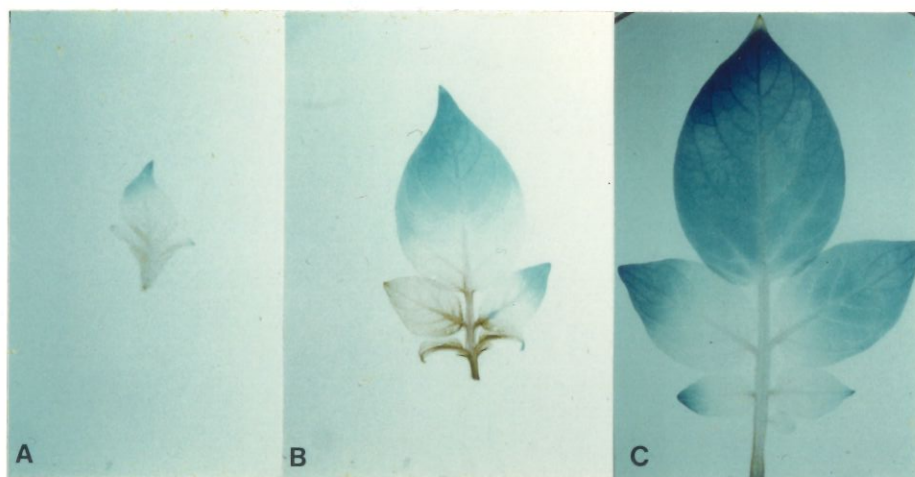


Abb. 50: Histochemische Detektion der GUS-Aktivität in sich entwickelnden Kartoffelblättern. Die Blätter wurden Vakuumfiltriert und über Nacht in X-Gluc-Lösung inkubiert. Das Chlorophyll wurde anschließend mit Lactophenol/Chloralhydrat entzogen. Die gezeigten sink-Blätter sind 1,5 cm (A), 4,5 cm (B) und 7,5 cm (C) lang.



## 4.13 Anhang

### 4.13.1 Durchmustern einer genomischen Kartoffel-Bank nach Stärkephosphorylase Promotorsequenzen

Zur Isolierung eines Promotors einer Stärkephosphorylase P1 (STP-P1) aus Kartoffel wurde die genomische Kartoffelbank platiert und 300000 rekombinanter Phagen mit Hilfe eines radioaktiv markierten 5'-Fragments der cDNA der STP-P1 (*Pst*I-Fragment, 420 bp) durchgemustert und 6 positiv reagierende Phagenplaques identifiziert. Zwei Plaques konnten in der nachfolgenden Plaqueeinzelung als positive Phagen isoliert werden. Sie wurden mit STP-1 und STP-2 bezeichnet. Mit den Phagenklonen wurden „Southern-Blot“ Analysen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß sie identisch waren. Es konnte in einer zweiten Durchmusterung der Bank kein Phagenklon isoliert werden, der sich von den zuerst gefundenen unterschied. Es wurde daher nur der Klon STP-1 weiterbearbeitet.

### 4.13.2 Klonierung eines Promotors der Stärkephosphorylase P1

Der Phagenklon STP-1 wurde *Pst*I geschnitten und im „shot-gun“ Verfahren in den Plasmid-Vektor pUC19 subkloniert. Die Identifizierung positiver Subklone erfolgte über einen Koloniehybridisierung, wobei als radioaktive Sonde ein 465 bp langes *Eco*RI 5'-Fragment aus der cDNA der STP-P1 verwendet wurde. In der nachfolgenden Analyse der positiven Kolonien durch Restriktionsspaltung und Auftrennung in einem Agarosegel wurde der Klon mit der längsten Insertion ausgewählt (genannt: STP1-34). Dessen Insertion hatte eine Länge von ungefähr 4,7 kb. Von diesem Klon wurde eine Restriktionskarte erstellt und durch Hybridisierung mit dem 5'- und einem 3'-Fragment (*Sca*I/*Not*I, 600 bp) der cDNA die Lage des Promotors auf dem Klon festgelegt. Außerdem wurden zur Ansequenzierung mit ExonukleaseIII Deletionsklone hergestellt und diese mit dem von Pharmacia erworbenen Oligo „uni“ sowie einem von Uwe Sonnewald (persönliche Mitteilung) zur Sequenzierung der cDNA verwendeten Oligo einer Sequenzanalyse unterworfen. Durch Sequenzvergleich der 200 gelesenen Basen mit der cDNA der STP-P1 konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem genomischen Klon um eine STP-P1 handelte. Es fand sich beim Sequenzvergleich cDNA mit dem genomischen Klon in den sequenzierten 200 bp nur ein Basenaustausch.

Im Exonuklease-Deletionsklon STP-E19 war die gesamte kodierende Region entfernt, er enthielt jedoch noch 68 bp der nicht translatierten Region der cDNA. Das Promotorfragment umfaßte etwa 3500 bp. Es wurde in den Vektor pUC19 überführt, indem es aus STP-E19 als *EcoRI/HindIII* Fragment ausgeschnitten aufgefüllt wurde und in *HincII* vorgeschrittenen pUC19 ligiert wurde. Dieser Klon STP-6-19 wurde zur weiteren Klonierung des Promotors verwendet.

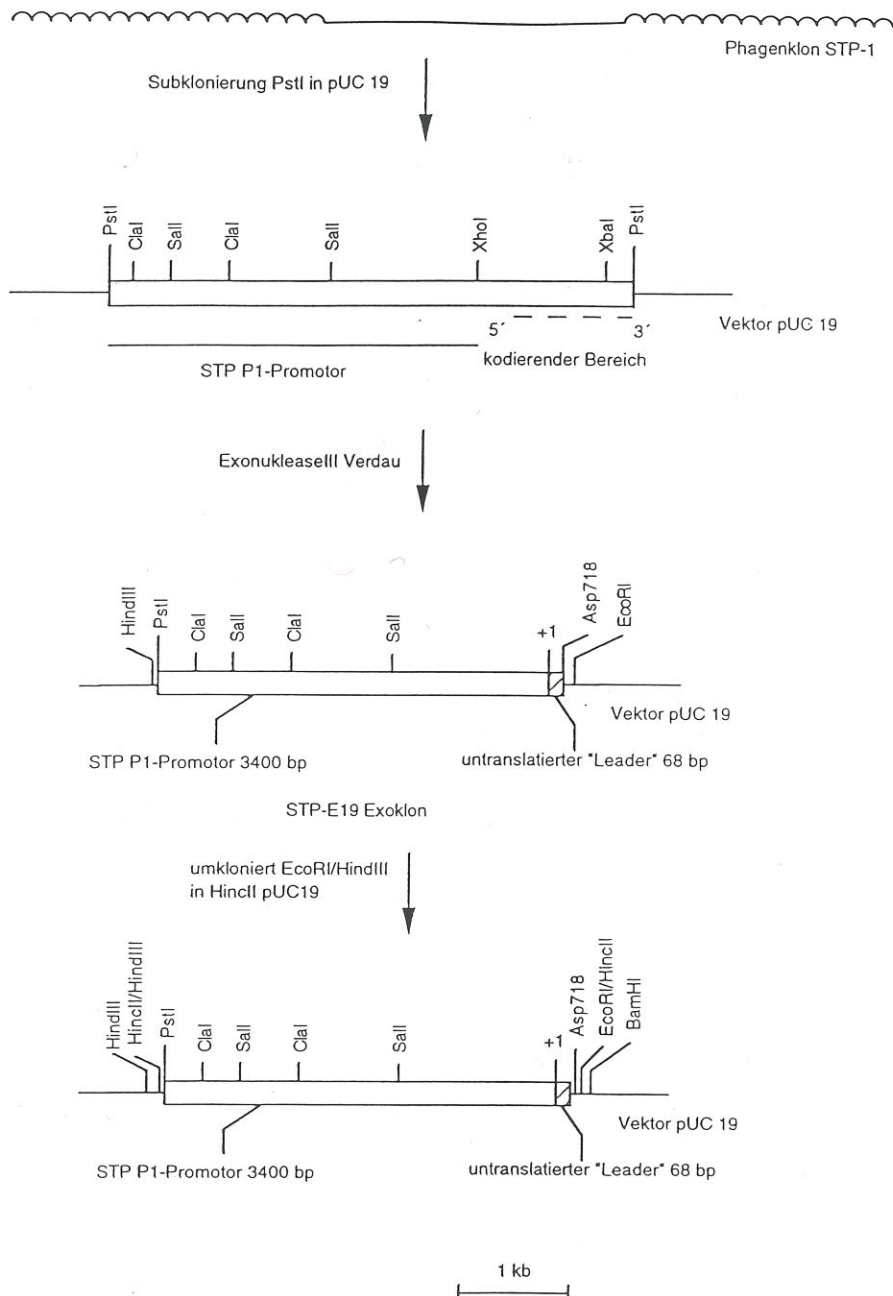


Abb. 51: Klonierung eines Promotorfragments der STP-P1 aus genomischer DNA von Kartoffel *Solanum tuberosum* L. Désirée. Ausgehend von einem genomischen Phagenklon wurde ein etwa 4 kb umfassendes *PstI* Fragment in den Vektor pUC19 subkloniert. Durch Restriktionsspaltungen und „Southern-Blot“ Analyse wurde eine grobe Restriktionskarte erstellt und die Lage des Promotors ermittelt. Das Promotorfragment, 3,5 kb umfassend, wurde *EcoRI/HindIII* nach auffüllen der Enden in *HincII* vorgeschrittenen pUC19 ligiert.

#### 4.13.3 Fusion des Stärkephosphorylase-Promotors mit der kodierenden Region des *Escherichia coli* $\beta$ -Glucuronidase-Gens

Aus dem oben beschriebenen STP-6-19 Subklon wurde ein *Bam*HI/*Hind*III Fragment ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pBI101 (Jefferson et al., 1987) in die *Bam*HI/*Hind*III Schnittstellen ligiert (transkriptionale Fusion). Dieser Vektor enthält die kodierende Region des *E. coli*  $\beta$ -Glucuronidase-Gens sowie die Terminationssequenz des Nopalinsynthase-Gens (NOS-Gen) des Ti-Plasmids aus *Agrobacterium tumefaciens*. Die richtige Orientierung des Fragments im pBI101 wurde mittels Spaltung mit *Eco*RI/*Sa*I überprüft. Das Konstrukt wurde ME-2 genannt. Es wurde zur Agrobakterien vermittelten Transformation von *Nicotiana tabaccum* Samsun NN und *Solanum tuberosum* L. Desirée verwendet. Die Pflanzen wurden TME-2 (Tabak) beziehungsweise KME-2 (Kartoffel) genannt. Die Klonierungsstrategie für die Konstruktion der Promotor-GUS-Fusion ist in Abbildung 52 wiedergegeben.

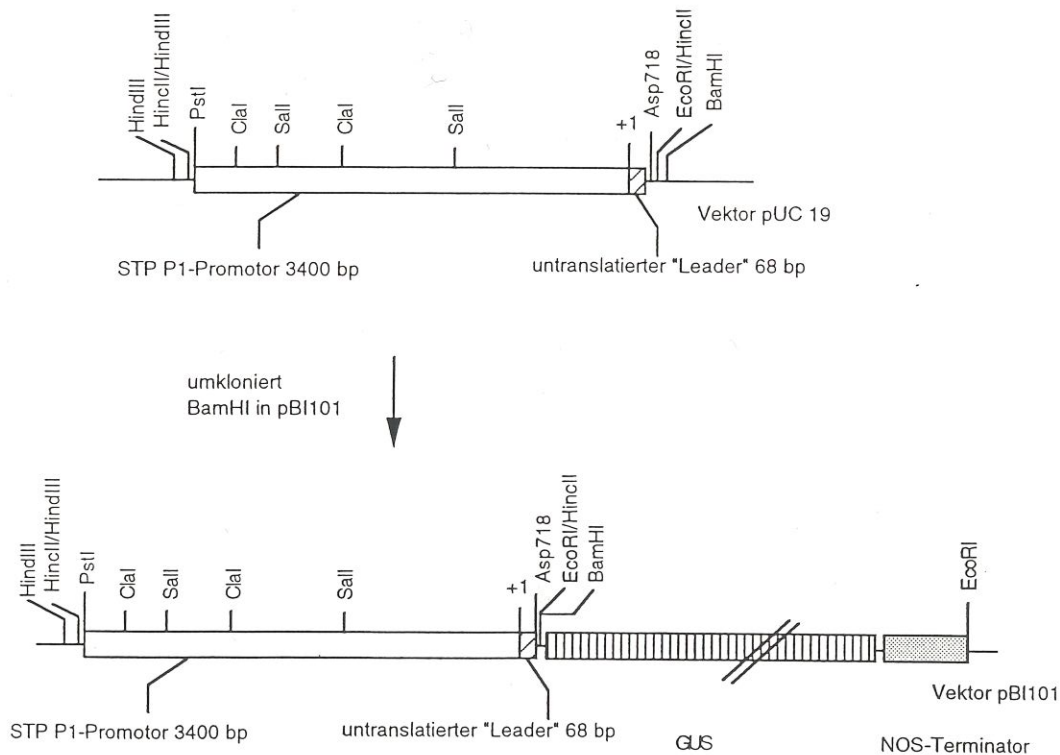


Abb. 52: Fusion des Stärkephosphorylase-Promotorfragments mit der kodierenden Region des GUS-Gens aus *E. coli*. Aus dem Klon STP-6-19 wurde das 3,5 kb umfassende Promotorfragment als *Bam*HI/*Hind*III-Fragment ausgeschnitten und in den Vektor pBI101 kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde ME-2 genannt

#### 4.13.4 Analyse der Primärtransformanden TME-2 und KME-2

In Gewebekultur wurden Blättchen der aus der Transformation mit ME-2 hervorgegangenen Tabak- und Kartoffelpflanzen getestet auf funktionelle Transformation. Dabei zeigte nur etwa jede zehnte Pflanze GUS-Aktivität in Blättern. Deshalb wurden alle 50 Kartoffel und 50 der 100 regenerierten Tabakpflanzen ins Gewächshaus transferiert, um weitere Gewebe zu untersuchen. In Blättern, Stamm, Wurzel, Knospen, Blüten und Samen von TME-2 konnte keine gewebespezifische Expression gefunden werden, die in mehr als drei der 50 Pflanzen gleich war. Auch in Kartoffelpflanzen konnte in keinem der genannten Gewebe vergleichbare Expression in mehr als drei Transformanden detektiert werden. Lediglich Knospen, Blüten und Samen wurden von Kartoffelpflanzen nicht untersucht, da die Pflanzen trotz mehrerer Versuche nie geblüht haben. In Stolonen, in Raumtemperatur und Kälte gelagerten oder keimenden Knollen konnte ebenfalls keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden.

Desweiteren wurde versucht, durch Inkubation von Blattscheiben auf Saccharoselösung die im Blatt eingelagerte Stärkemenge zu erhöhen, um so möglicherweise den Promotor zu aktivieren. Auch dies führte nicht zum Erfolg. Die Analyse wurde nicht weitergeführt.

#### 4.13.5 Sequenzanalyse des Promotorfragments der STP-P1

Von dem Klon STP-6-19 wurden Subklone in pUC19 erstellt, um den Promotorbereich vollständig sequenzieren zu können. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der von „Pharmacia“ erworbenen syntetischen Oligos „uni“ und „revers“.

Da die Analyse der TME-2 und KME-2 Primärtransformanden keine Expression in einem der getesteten Gewebe ergab, wurde die Sequenzierung nicht vollständig durchgeführt. Dargestellt in Abbildung 53 sind die angefertigten Subklone sowie durch Pfeile markiert die sequenzierten Bereiche.

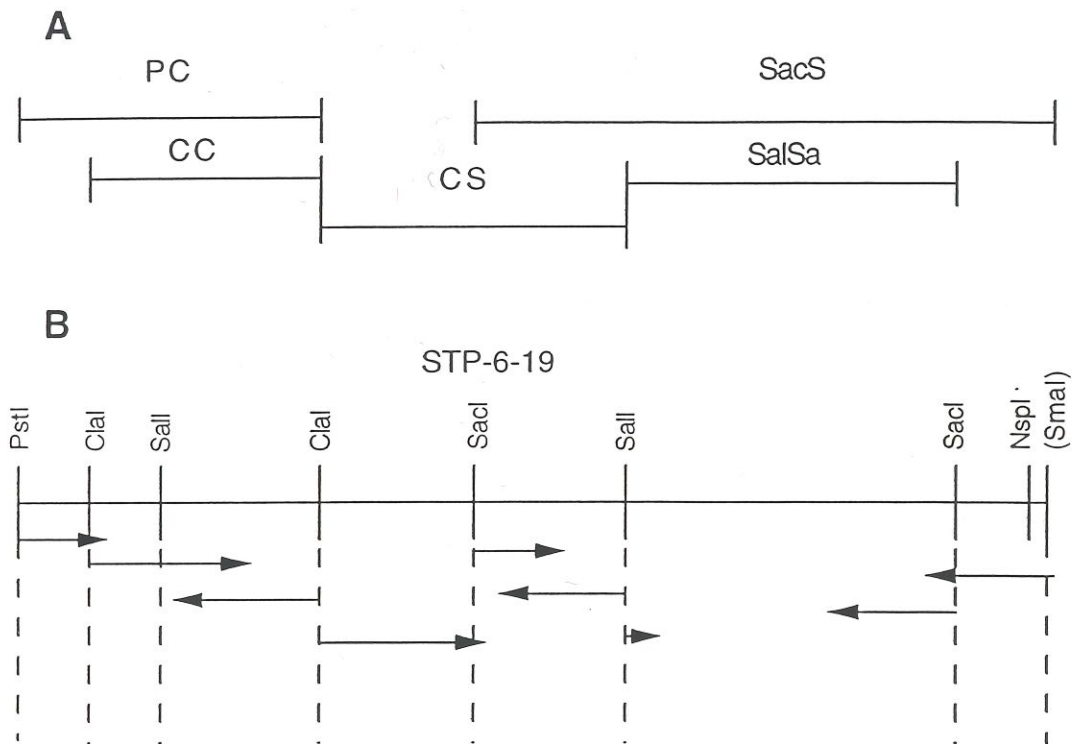


Abb. 53: Sequenzierungsstrategie des Promotorbereichs der STP-P1. In A sind die hergestellten Subklone des Fragments STP-6-19 in pUC19 dargestellt. In B sind die sequenzierten Bereiche durch Pfeile dargestellt.

## 5 Diskussion

Mit Hilfe transgener Pflanzen können Untersuchungen über Stoffwechselfvorgänge durchgeführt und für Landwirtschaft oder Industrie nutzbare Pflanzen hergestellt werden. Eine der Grundlagen dafür ist die Verfügbarkeit von Promotoren, die ein Transgen in gewünschter, gewebe- oder entwicklungspezifischer Weise exprimieren.

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung eines starken mesophyllspezifischen Promotors, um gezielt in die photosynthetische Saccharosebiosynthese eingreifen zu können, ohne die Funktion anderer Gewebe im Blatt wie Stomata oder Leitgewebe zu beeinflussen. Von Stockhaus et al. (1994) ist ein Promotor beschrieben worden, der Expression in Mesophyllzellen von C3-Pflanzen vermittelt. Dieser Promotor stammt vom Gen der Phosphoenolpyruvat Carboxylase einer C4-Pflanze. Die durch ihn vermittelte Expression ist deutlich schwächer als die des konstitutiv exprimierten CaMV 35S-Promotors. Zusätzlich ist geringe Expression auch in Wurzeln zu finden. Der Promotor erfüllt damit nicht die Anforderung nach hoher Spezifität und starker Expression, wie sie für eine Reihe von Anwendungen nötig ist.

Die anderen bisher isolierten Promotoren, die überwiegend im Blatt Expression vermitteln, stammen von Genen, die für an der Photosynthese beteiligte Proteine kodieren. Die Spezifität dieser Promotoren ist für viele Anwendungen nicht ausreichend, da sie in allen Chloroplasten enthaltenden Zellen, also auch im Stamm, Geleitzellen und in Stomata exprimiert werden. Ein überwiegend im Blatt stattfindender Stoffwechselprozeß ist die photosynthetische Saccharosebiosynthese. Promotoren von an diesem Prozeß beteiligten Genen könnten mesophyllspezifische Expression vermitteln. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Promotor einer cyt FBPase analysiert, einem Protein, das einen stark regulierten frühen Schritt in der Saccharosebiosynthese katalysiert. Zur Analyse des Promotors wurde dieser mit dem Markergen  $\beta$ -Glucuronidase aus *E. coli* fusioniert und in Pflanzen übertragen.

### 5.1 Klonierung und Sequenzanalyse eines Promotors der cyt FBPase aus Kartoffel

Durch „Southern-Blot“ Analyse wurde gezeigt, daß im Genom einer dihaploiden *Solanum tuberosum* Linie mehrere Kopien der cyt FBPase vorliegen (Abb. 1, S. 25).

Mit Hilfe der cDNA der cytosolischen FBPase, die von Zrenner et al. (1996) zur Verfügung gestellt wurde, konnte aus einer genomischen Bank von *Solanum tuberosum* der Sorte Désirée ein genomischer Klon isoliert werden, der 1434 bp Promotorsequenz enthielt (Abb. 2, S. 27). Mittels „Primer-Extension“ wurde der Transkriptionsstart festgelegt. 23 bp stromaufwärts vom

Startpunkt wurde eine „TATA“-Box identifiziert. Außerdem wurde von Position -130 bis -142 eine „CAAT“-Box gefunden (Breathnach und Chambon, 1981; Kreidberg und Kelly, 1986). In der Sequenz befinden sich weiterhin drei invertierte und sieben direkte Sequenzwiederholungen von mindestens 10 Basen Länge. Durch Deletionsanalysen muß geklärt werden, ob diese regulatorische Funktionen erfüllen. Zwei nahezu identische, 10 Basen umfassende palindromische Sequenzabschnitte im Abstand von genau 300 Basen voneinander enthielten je zweimal das Motiv TGCA, welches als Zentralsequenz von Leucin-Zipper-Protein-Bindestellen beschrieben worden ist (Armstrong et al., 1992; Izawa et al., 1993). Es ist von verschiedenen Gruppen als Proteinbindedomäne in unterschiedlichen Promotoren identifiziert worden (Giuliano et al., 1988; Froberg, 1994; Blecken et al., 1994; Kwon et al., 1994). So wurde es von Blecken et al. (1994) in einem Promotor eines „early-light-induced-protein“ aus Erbse als notwendiges aber nicht ausreichendes Element für Lichtinduktion identifiziert. Gilmartin et al. (1990) spekulierten, daß es sich bei dem Motiv weniger um ein regulatorisches als um ein die Expressionsstärke modulierendes handelt. Die für Lichtinduktion eines Promotors als notwendig beschriebene GT-Box mit der konservierten Sequenz GTGTGGA/T (Fluhr et al., 1986; Gilmartin et al., 1990) konnte im Promotor der *cyt* FBPase nicht gefunden werden. Eine mögliche regulatorische Funktion der palindromischen Sequenzen muß durch weitere Analysen wie Deletionen, Einführung von Punktmutationen und Gelshift-Assays untersucht werden. Die 1434 Basenpaare der Promotorregion sowie 295 Basenpaare des untranslatierten Leaders der *cyt* FBPase wurden isoliert und mit dem Markergen  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) fusioniert. Das chimäre GUS-Gen wurde in Tabak und Kartoffel übertragen. Zusätzlich wurde ein Deletionklon angefertigt, der 819 bp des Promotors und den Leaderbereich umfasste. Auch dieses Konstrukt wurde in Tabak und Kartoffel eingeführt.

## 5.2 Analyse der Primärtransformanden

Vergleicht man die Stärke der Expression beider Konstrukte in sink- und source-Blättern der Kartoffeltransformanden, fällt auf, daß in sink-Blättern vergleichbare GUS-Aktivität meßbar ist, in source-Blättern dagegen der längere Promotor etwa doppelt so hohe GUS-Aktivität bewirkt (Abb. 42, S. 77). Möglicherweise ist beim Deletionsklon ein für hohe Expression in source-Blättern notwendiges Element entfernt oder zerstört worden. Zum Beispiel fehlt eine der oben beschriebenen palindromischen Sequenzen. Außer bei der Stärke der Expression in source-Blättern konnte kein Unterschied in der durch die beiden Promotorfragmente vermittelten Expression festgestellt werden.

In Tabakpflanzen lassen sich im Blatt deutlich höhere GUS-Aktivitäten als in Kartoffelpflanzen nachweisen. Dies könnte an einem „Silencing“-Effekt in Kartoffeln liegen. Eine für das „Silencing“ von Transgenen diskutierte Hypothese lautet, daß durch Duplizierung von Sequenzen, sowohl Genen als auch Promotorsequenzen, ein spezifischer „Silencing“-Prozeß in Gang gesetzt wird. Dieser muß nicht zu einer völligen Abschaltung eines Transgens führen, sondern kann auch eine Reduktion der Expression zur Folge haben. Da der Promotor aus Kartoffeln stammt, könnte ein solcher Mechanismus in Kartoffel eher wirksam werden, als in Tabak (Matzke et al., 1995, Park et al., 1996).

### 5.3 Gewebe- und zellspezifische Expression des chimären GUS-Gens

Die Untersuchungen zur Zell- und Gewebespezifität des Promotors in den Tabaktransformanden haben gezeigt, daß er überwiegend im Blatt Expression vermittelt. Die stärkste Blaufärbung bei histochemischen Untersuchungen ist im Palisadenparenchym zu detektieren (Abb. 18, S. 47). Es bleibt offen, inwieweit der Eindruck einer stärkeren Blaufärbung aufgrund erhöhter Expression oder erhöhter Zelldichte des Palisadenparenchyms entsteht. Im Blatt wurde in feinem Leitgewebe Blaufärbung beobachtet, wobei nicht festgestellt werden konnte, ob es sich um das Leitgewebe umgebende Zellen oder das Leitgewebe selber handelte, welches die Färbung aufwies. In keinem anderen Gewebe des Blattes konnte Aktivität gefunden werden.

Wie in Abbildung 15 gezeigt, wurde in Blüten und Knospen vor allem dort GUS-Aktivität detektiert, wo Photosynthese stattfindet, das heißt in den grünen Geweben wie Kelchblatt oder Blütenboden. Samen zeigen GUS-Aktivität, obwohl keine mRNA detektierbar war (S. 43). Möglicherweise ist der Promotor hier nur sehr schwach exprimiert, das Protein aber relativ stabil, so daß es mit der Zeit akkumuliert oder der Promotor ist im Verlauf der Samenentwicklung aktiv. Die festgestellte GUS-Aktivität wäre dann zurückzuführen auf gespeichertes Protein.

Im Tabakstamm ist die Aktivität beschränkt auf einen Bereich in den Nodien, der unmittelbar an die Blattachselknospe anschließt. Dieser Bereich unterscheidet sich cytologisch insofern von den anderen Geweben im Stamm, als daß dort die Zellen kleiner und dichter gepackt sind und verstärkte Akkumulation von Stärke stattfindet (Abb. 10/11, S. 38/39). Diese Bereiche könnten eine Versorgung der Blattachselknospen mit Assimilaten zur Aufgabe haben und daher höhere Saccharosesyntheseraten aufweisen als die anderen Stammabschnitte. Stockhaus et al. (1994) zeigen Expression in einem vergleichbaren Gewebe einer *Flaveria* Sorte durch einen Promotor einer Phosphoenolpyruvat Carboxylase aus derselben Sorte. Dieser



Stammbereich unterscheidet sich demnach in seinem Expressionsmuster von anderen Teilen des Stammes. Während der Keimung ist GUS-Aktivität im Übergang zwischen Samen und Keimling zu erkennen. In älteren Keimlingen ist dagegen nur in Kotyledonen Blaufärbung detektierbar (S. 45).

Die in Kartoffeltransformanden beobachtete Zell- und Gewebespezifität des Promotors war im wesentlichen identisch, wenngleich die Aktivität geringer als in Tabak war. Lediglich im Stamm von Kartoffel konnte im Gegensatz zu Tabak keine GUS-Aktivität gefunden werden. Möglicherweise ist die Aktivität im Kartoffelstamm nicht zu zeigen, weil die Expression in Kartoffel insgesamt deutlich unter der im Tabak lag und so die niedrige Aktivität im Stamm von Kartoffel nicht mehr nachweisbar wäre. Dagegen spricht, daß die Stärke der Expression im Blatt und im Stamm von Tabak unabhängig voneinander war. Es könnte auch deshalb keine Aktivität im Stamm der Kartoffelpflanzen gefunden worden sein, weil dieser anders organisiert ist als der des Tabaks. Eventuell ist der Zelltyp, der Expression im Tabakstamm zeigte, im Kartoffelstamm nicht vertreten.

Zrenner (1993) konnte zeigen, daß mRNA der endogenen cyt FB Pase in Kartoffel in allen Geweben nachzuweisen ist. Dies steht im Gegensatz zu dem oben beschriebenen fehlenden Nachweis der GUS-Aktivität bzw. des GUS-Transkripts in Stamm aber auch in Stolonen, Knollen und Wurzeln (Abb. 43/45, S. 78/80). Im Unterschied zu der veröffentlichten Arbeit wurde in den gezeigten „Northern-Blot“ Untersuchungen 30 µg statt 50 µg gesamt RNA aufgetragen. Dies vermindert die Sensitivität der Analyse. Zusätzlich könnten längere Expositionszeiten für die Autoradiographie gewählt worden sein. Für diese Annahme spricht, daß die Hybridisierung des in Abschnitt 4.10.1. auf Seite 79 gezeigten „Northern-Blots“ mit der cDNA der cyt FB Pase keine Signale außer in sink- und source-Blatt ergab.

Die Messung der GUS-Aktivität in den verschiedenen Geweben der Kartoffeltransformanden zeigte ebenfalls nur in sink- und source-Blatt GUS-Aktivität, die höher als der Hintergrund im Wildtyp ist. Da die Messung der GUS-Aktivität ein erheblich empfindlicherer Nachweis ist als die „Northern-Blot“ Analyse, kann man davon ausgehen, daß dieser Promotor tatsächlich nicht in Stamm, Stolon, Wurzel und sink-Knollen aktiv ist. Die von Zrenner (1993) gezeigten Signale für cyt FB Pase in allen Geweben wären dann auf differentiell exprimierte cyt FB Pase Kopien zurückzuführen.

Der analysierte Promotor repräsentiert eine überwiegend im Blatt exprimierte cyt FB Pase.

Die Analyse der Knollen ergab, daß der Promotor in sink-Knollen, frisch geernteten und gelagerten Knollen ebenso wie in kälteinkubierten Knollen nicht aktiv ist. Nur in keimenden Knollen konnte schwache GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Dies ist auf den Seiten 82 bis

84 dargestellt. Auch hier kam Zrenner (1993) bei Untersuchung der endogenen cyt FB Pase zu Ergebnissen, die sich damit nicht decken. Sie fand in sink-Knolle große Mengen mRNA der cyt FB Pase und konnte zeigen, daß in kältegelagerten Knollen die mRNA stark akkumuliert. Dagegen fand sie in keimenden Knollen an der Nachweisgrenze liegende Mengen cyt FB Pase mRNA. In der vorliegenden Arbeit konnte in kältegelagerten Knollen kein GUS Messenger gefunden werden, wohl aber mRNA der cyt FB Pase. Diese Diskrepanz der Ergebnisse läßt sich damit erklären, daß es sich entweder um differentiell exprimierte Kopien der cyt FB Pase handelt oder die Promotorfragmente unvollständig sind und ihnen bestimmte regulatorische Bereiche fehlen.

Die einzige Situation in Knollen, in der GUS-Aktivität gefunden wurde, ist in keimenden Knollen (Abb. 48, S. 84). Hier ist von allen von Zrenner (1993) getesteten Situationen die geringste Menge mRNA der cyt FB Pase zu detektieren. Eventuell differentiell exprimierte Kopien der cyt FB Pase könnten hier nicht aktiv sein, sondern nur die, von der dieser Promotor stammt. Es ist unwahrscheinlich, daß der Promotor nur „undicht“ und die niedrige Aktivität auf Akkumulation des Proteins zurückzuführen ist. Dann träte keine gewebespezifische, sondern in allen Bereichen der Knolle Färbung auf, was nicht der Fall ist. Eine weitere Erklärung für diese Diskrepanz in den Beobachtungen der GUS unter der Kontrolle eines cyt FB Pase Promotors und der endogenen cyt FB Pase ist, daß ein für keimende Knollen spezifischer „Silencer“ deletiert worden ist.

Der Promotor wird nur in source-Gewebe exprimiert: im source-Blatt, keimenden Knollen, einem möglichen Versorgungsgewebe der Seitenknospen und grünem Gewebe der Knospen und Blüten.

#### **5.4 Entwicklungsspezifische Expression des chimären GUS-Gens**

In jungen sink-Blättern wird das chimäre GUS-Gen nicht exprimiert. Im Übergang zum source Blatt beginnt die Expression an der Spitze des Blattes und breitet sich mit zunehmender Blattrife zur Blattbasis aus (Abb. 19, S. 49). Dies entspricht dem sink-source Übergang im Blatt (Avery, 1933; Turgeon, 1989). Demnach ist der Promotor nur aktiv in source-Blättern und den Abschnitten junger Blätter, die bereits zum source geworden sind. In seneszenten Blättern nimmt die GUS-Aktivität wieder ab, und die mRNA verschwindet (Abb. 20, S. 50). Dies läßt sich erklären mit der in seneszenten Blättern gefundenen Degradierung des Chlorophylls und der daher abnehmenden Photosynthese (Thomas und Stoddart, 1980). Entsprechend nimmt die photosynthetische Saccharosebiosynthese ab und der Bedarf an Aktivität der daran beteiligten Enzyme.

Bei der Untersuchung der GUS-Aktivität und der Aktivität der endogenen cyt FB Pase in allen Blättern von Tabakpflanzen konnte gezeigt werden, daß diese stark miteinander korreliert sind. Der Bestimmtheitsgrad ist hier  $r^2 = 0,9$ . (Abb. 26, S. 56) Der Promotor scheint die Expression der cyt FB Pase im Blatt genau widerzuspiegeln. Dabei ist anzumerken, daß in diesem Experiment der in der Literatur überwiegend verwendete Bezug der Aktivitätsdaten auf Proteinmenge nicht sinnvoll ist, da diese sich in den Blättern dramatisch im Verlaufe der Blattalterung verändert (Abb. 22, S. 52). Daher wurde auf Seite 53 in Abbildung 23 Blattfläche als Bezugsgröße gewählt.

Der Übereinstimmung der Aktivitäten von GUS und cyt FB Pase in Blättern widerspricht der Vergleich der „Northern-Blot“ Analysen, die auf den Seiten 50 und 54 in den Abbildungen 20 und 24 dargestellt sind. Während die GUS mRNA Mengen in den Blättern den darin gemessenen GUS-Aktivitäten entsprechen und eine Zunahme des Messengers von sink- nach source-Blättern und eine Abnahme in seneszenten Blättern zu finden ist, nimmt die mRNA der cyt FB Pase in den untersten seneszierenden Blättern von Tabakpflanzen nach einer leichten Abnahme wieder zu. Da die Aktivitäten des endogenen Enzyms in diesen Blättern nicht zunehmen, muß man annehmen, daß dieser Messenger nicht oder nur sehr ineffektiv translatiert wird. Ob in den seneszenten Blättern die Stabilität der cyt FB Pase mRNA erhöht ist oder ein anderes Gen in seneszenten Blättern angeschaltet wird, kann hier nicht entschieden werden. In Wildtyp Kartoffelpflanzen konnte gezeigt werden, daß der Messenger der cyt FB Pase in seneszenten Blättern verschwindet (Ebner, Zrenner und Sonnwald, in Vorbereitung).

Der isolierte Promotor repräsentiert eine cyt FB Pase, die in Blättern dominiert. Im Gegensatz zu Knollen oder Stamm spielen anders als die durch den isolierten Promotor regulierte cyt FB Pase-Gene im Blatt keine entscheidende Rolle.

### 5.5 Regulation des chimären GUS-Gens durch Umwelteinflüsse

Der Promotor der cyt FB Pase vermittelt im Tagesgang keine konstante Expression. Bei der Untersuchung der steady-state mRNA Mengen im Tagesverlauf zeigte sich ein Maximum um 14 Uhr (Abb. 27, S. 57). Wie bereits für Kartoffeln (Zrenner, 1993) und Zuckerrübe (Khayat et al., 1993) gezeigt, unterliegt der Promotor einer vom Licht abhängigen Regulation. Bei Licht akkumuliert der Messenger, in Dunkelheit nimmt die GUS mRNA Menge stark ab. Auch bei der Untersuchung von Tabakkeimlingen konnte gezeigt werden, daß Licht notwendig ist, um den Promotor zu aktivieren (Abb. 28, S. 59). Die Ausnahme sind keimende Knollen, die in Dunkelheit gelagert worden sind und trotzdem GUS-Aktivität zeigen, wie in Abbildung 47 auf Seite 82 dargestellt ist. Gegen die Annahme, daß Licht einen direkten regulatorischen Einfluß

auf die Expression hat, spricht weiter, daß im Promotor keine entsprechende GT-Box (Fluhr et al., 1986; Gilmartin et al., 1990) gefunden wurde, und daß in belichteten sink-Blättern die Expression entwicklungs- und nicht lichtabhängig ist. Dies legt nahe, daß die Regulation des Promotors nur insofern von Licht abhängig ist, als daß Metabolite, die durch die Photosynthese im Blatt akkumulieren, die eigentlichen Regulatoren sind.

Regulation der Transkription durch Metabolite wurde auch gezeigt in den Flotierungsversuchen, die auf Seite 65 dargestellt sind. Hier wurde eine Feedback-Regulation durch Saccharose nachgewiesen, das heißt, die Transkriptmenge der GUS sinkt bei Flotierung von Blattscheiben auf Saccharose stark. Eine ähnliche Regulation wurde von Krapp et al. (1993, 1995) und Sheen (1990, 1994) für photosynthetische Gene beschrieben. Beide finden jedoch, daß Glukose einen stärkeren Einfluß auf die Transkription hat als Saccharose.

Daß es sich bei der Repression der Transkription des chimären GUS-Gens durch Saccharose und Glukose nicht um Folgen von osmotischem Streß handelte, zeigt die starke Akkumulation des Messengers bei Flotierung auf Sorbitol. Bei der Hybridisierung der „Northern-Blots“ mit der cDNA der cyt FB Pase erwies sich, daß die Abnahme der mRNA bei Inkubation mit Saccharose, Glukose und Fruktose auch hier erfolgte. Der Zunahme des Transkripts der GUS bei Flotierung auf Sorbitol stand jedoch eine Abnahme des cyt FB Pase Messengers gegenüber. Eine Abnahme des Messengers, der Proteinmenge und der Proteinaktivität der cyt FB Pase bei Wasserstreß ist von Harn und Daie (1992) für Blätter der Zuckerrübe gezeigt worden. Für cyt FB Pase in Kartoffelblättern wurde eine vergleichbare Abnahme der mRNA bei Inkubation von Petiolen in Saccharose und Sorbitol gezeigt (Ebneht, Zrenner und Sonnewald, in Vorbereitung). Der Unterschied zwischen cyt FB Pase und GUS Messenger bei Inkubation mit Sorbitol könnte erklärt werden durch unterschiedliche Stabilität der mRNA unter diesen Bedingungen. Es könnte auch ein regulatorischer Bereich auf den Promotorfragmenten deletiert sein. Da sich die mRNA bei Flotierung auf Saccharose gleich verhält, müßten für die Abnahme der cyt FB Pase mRNA auf Saccharose und Sorbitol verschiedene Promotorbereiche verantwortlich sein. Für diese Annahme spricht, daß bei Kartoffelblättern festgestellt wurde, daß Inkubation in Sorbitol zu einem Welken der Blätter führte, Inkubation in Saccharose aber nicht (Ebneht, Zrenner und Sonnewald, in Vorbereitung). Demnach könnte die Abnahme des Messengers verschiedene Ursachen haben, eine Feedback-Regulation bei Saccharose und Wasserstreß bei Sorbitol.

In Kälteinkubierten transgenen Tabakpflanzen konnte eine Akkumulation des GUS Transkripts nach 18 Stunden nachgewiesen werden (Abb. 29, S. 60). In vielen Pflanzen steigt die Saccharosekonzentration in Kälte. Außerdem sinkt die Konzentration an Fruktose-2,6-

Bisphosphat in Kälte ab, was zu einer Erhöhung der Aktivität der *cyt* FBPase führt. Auch die Aktivität der SPS steigt in Kälte, so daß die Saccharosesyntheserate erhöht wird (Guy, 1990; Guy et al., 1992). Eine verstärkte Expression des Promotors in Kälte war daher zu erwarten. In den kälteinkubierten Pflanzen konnte jedoch keine Zunahme der GUS-Aktivität gemessen werden. Möglicherweise war die Expositionszeit der Pflanzen in Kälte zu kurz. Andere Autoren fanden, daß ein Anstieg der Transkriptmenge eines endogenen Proteins, der  $\beta$ -Fructosidase (Sturm und Chrispeels, 1990), oder von GUS unter der Kontrolle eines PAL-Promotors (Ohl et al., 1990) bereits kurze Zeit nach Induktion des Promotors durch Verwundung meßbar ist. Ohl findet 12 h nach Verwundung jedoch keine Zunahme der GUS-Aktivität, Sturm findet erst etwa 24 h nach Verwundung eine Zunahme der  $\beta$ -Fructosidase-Aktivität, 20 Stunden nach Anstieg des Messengers. Dies spricht dafür, daß die Inkubationszeiten im oben beschriebenen Experiment zu kurz gewählt worden sind, um eine Zunahme der GUS-Aktivität messen zu können. Versuche mit längerer Inkubation der transgenen Tabakpflanzen bei 4°C waren nicht möglich, da die Pflanzen nach 26 h in Kälte eingingen. In den vorliegenden Experimenten wurden lediglich die steady-state Mengen der GUS mRNA bestimmt. Daher ist eine weitere mögliche Erklärung für die Akkumulation der GUS mRNA eine erhöhte Stabilität der mRNA in Kälte. Diese beiden Möglichkeiten könnten durch „run-off“ Experimente unterschieden werden. Dabei wird die aktuelle Transkriptionsrate in einem Gewebe bestimmt.

Eine Zunahme der Saccharosekonzentration war in den kälteinkubierten Tabakpflanzen ebenfalls nicht meßbar. Auch hier waren wahrscheinlich die Inkubationszeiten zu kurz. Guy et al. (1992) zeigten den Anstieg der Saccharosekonzentration in Spinatblättern nach 14 Tagen Kälteinkubation. Immerhin konnte hier gezeigt werden, daß im Gegensatz zu im Gewächshaus stehenden Pflanzen, der fixierte Kohlenstoff bevorzugt in Saccharose und nicht in Stärke eingebaut wird. Die Experimente sollten bei anderen Temperaturen mit längerer Inkubationszeit wiederholt werden. Dazu müsste zunächst die niedrigste Temperatur ermittelt werden, die Tabakpflanzen über längere Zeiträume überleben.

Wie in Abschnitt 4.10.2. auf Seite 81 beschrieben, wird der Promotor in kältegelagerten Knollen nicht aktiviert. Auch Knollen akkumulieren in Kälte Zucker. In Kälte kommt es in Knollen zu einem verstärkten Abbau der Stärke (Hammond et al., 1990) und gleichzeitig ist die Glycolyse durch die kältebedingten Instabilität der PFK stark reduziert (Dixon und ap Rees, 1980). Die Abbauprodukte der Stärke werden daher vornehmlich für die Saccharosesynthese verwendet. Bei Saccharosesynthese nach Stärkeabbau ist die Aktivität der *cyt* FBPase nicht vonnöten, da vermutlich Glukosephosphate und nicht Triosephosphate aus Plastiden exportiert

werden (Neuhaus et al., 1993; Batz et al., 1994; Quick et al., 1996). Entsprechend ist ein Anstieg der Transkription nicht erforderlich. Die Transkriptmenge der endogenen FB Pase steigt in kältegelagerten Knollen jedoch an. Hier handelt es sich entweder um differentiell exprimierte Kopien, oder den Promotoren fehlen die entsprechenden regulatorischen Elemente, oder es handelt sich um eine erhöhte Stabilität der mRNA der endogenen cy t FB Pase bei Kälte.

#### **5.6 Bestimmung der Photosyntheserate und Stoffwechselflüsse in Blättern von Tabakpflanzen**

Im Rahmen der Untersuchung der Aktivität und Expression der GUS und der cy t FB Pase in den Blättern von Tabakpflanzen wurden auch Zuckergehalte, Photosyntheserate und die Stoffwechselflüsse in den Blättern bestimmt. Es zeigte sich, daß der Saccharosegehalt in Tabakblättern von oberen sink- zu den unteren source- beziehungsweise seneszenten Blättern kontinuierlich zurückgeht. Der Gehalt an Stärke nimmt von sink nach source zu, um in älteren Blättern wieder zu sinken. Die Verteilung von Glukose und Fruktose verhält sich dazu umgekehrt (Abb. 34, S. 67).

Die Photosyntheserate stieg in den untersuchten Blättern von sink nach source leicht an, die niedrigsten Photosyntheseraten zeigten die alten Blätter, wie in Abbildung 35 auf Seite 68 dargestellt ist

Vom untersten Blatt wurden keine Stoffwechselflüsse bestimmt, da die Probenzahl zu niedrig war. Die Saccharosesyntheserate verhielt sich wie die Photosyntheserate, das heißt, der Anteil des aufgenommenen radioaktiven Kohlenstoff, der in Saccharose eingebaut wurde, war in allen Blättern nahezu gleich. Entsprechend sind die Photosyntheserate und die Saccharosesyntheserate stark miteinander korreliert. Auch die Stärkesyntheserate war in source-Blättern am höchsten und in sink- und alten source- Blättern niedrig (Abb. 36/37, S. 70/71).

Die kontinuierliche Abnahme der Saccharosekonzentration in den Blättern bei steigender Saccharosesyntheserate von sink nach source läßt sich mit einem schnellen Abtransport der Saccharose zu den sink-Blättern erklären. Die von sink nach source zunehmende Photosyntheserate und damit die zunehmende Kohlenstofffixierung schlägt sich in einer steigenden Menge an transienter Stärke in source-Blättern nieder. Die Stärkesyntheserate ist in diesen auch höher als in sink- und alten Blättern.

Die Saccharosesyntheserate und die Aktivität der cy t FB Pase zeigen einen vergleichbaren Verlauf. Niedrig in sink-Blättern, zunehmend nach source- und abnehmend in alten source- und seneszierenden Blättern. Trotzdem sind sie nur gering miteinander korreliert, der

Bestimmtheitsgrad der Regressionsgeraden beträgt lediglich  $r^2 = 0,68$ . Dies liegt im wesentlichen daran, daß in dem Blatt mit der höchsten Aktivität der cyt FB Pase die Saccharosesyntheserate niedriger ist als nach den Daten in den anderen Blättern zu erwarten wäre.. Nimmt man dieses Blatt aus der Korrelation heraus, beträgt der Bestimmtheitsgrad  $r^2 = 0,85$ .

Der Grund für die geringe Korrelation zwischen Saccharosesyntheserate und Aktivität der cyt FB Pase könnte darin begründet sein, daß andere Schritte in der Regulation der Saccharosesynthese eine wichtige Rolle spielen, zum Beispiel die von der SPS regulierte Synthese von Saccharosephosphat. Außerdem könnte von Bedeutung sein, daß die cyt FB Pase einen frühen Schritt der Saccharosesynthese katalysiert und möglicherweise die Menge der aus der Synthesefolge in andere Syntheseketten geschleusten Zwischenprodukte die Saccharosesyntheserate drückt. Dafür spricht, daß im Blatt, welches die höchste Aktivität der cyt FB Pase zeigt, die Saccharosesyntheserate die aus der Korrelation der anderen Datenpaare zu erwarten wäre, zu niedrig ist. Es wäre möglich, daß dieses Blatt gerade beginnt, die Zellwände zu verstärken, weil es das erste vollständig entfaltete ist. Dies würde große Mengen UDP-Glukose aus der Saccharosesynthese entfernen.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Promotor einer cytosolischen FB Pase aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. Varietät Désirée) untersucht.

Dazu wurde eine genomische Bank von Kartoffel angelegt, durchgemustert mit der cDNA der cyt FB Pase aus Kartoffel und Phagen, die Promotorfragmente enthielten, isoliert. Ein Promotorbereich wurde von der kodierenden Region getrennt, vor das Markergen  $\beta$ -Glucuronidase aus *Escherichia coli* kloniert und anschließend in Kartoffel- und Tabakpflanzen übertragen. Der Promotor umfaßte 1434 Basenpaare. Außerdem wurde ein Deletionsklon mit 819 Basenpaaren hergestellt und ebenfalls in Tabak- und Kartoffelpflanzen eingeführt.

Der Promotorbereich wurde vollständig sequenziert. Der Transkriptionsstartpunkt wurde mittels „Primer Extension“-Experiment identifiziert. 23 bp vom Transkriptionsstart wurde eine „TATA“-Box und 136 bp vom Transkriptionsstart eine „CAAT“-Box festgestellt. Außerdem konnten mehrere direkte und invertierte Sequenzwiederholungen im Promotorbereich gefunden werden, die möglicherweise Einfluß auf die Regulation haben.

Der Deletionsklon unterschied sich vom größeren Promotorfragment durch die Stärke der Expression in den source-Blättern der Kartoffel Primärtransformanden. Die sink-Blätter zeigten bei beiden Konstrukten vergleichbare Expression. Sonst konnte in der

Gewebespezifität kein Unterschied festgestellt werden und auch bei den weiteren Analysen zeigten sich keine Differenzen. In Kartoffelblättern war die GUS-Aktivität deutlich niedriger als in Tabakblättern.

Die Expressionsanalyse der GUS unter der Kontrolle des Promotors einer *cyt* FBPase ergab, daß dieser überwiegend im source-Blatt aktiv ist. Er ist dabei auf Palisaden- und Schwammparenchym, sowie Leitgewebe dritter und höherer Ordnung oder dieses umgebende Zellen beschränkt. In Stomata, epidermalen Zellen, Trichomen, dem zentralen Leitgewebe und den Geweben der Petiole ist keine Expression detektierbar. Im Stamm der transgenen Tabakpflanzen ist nur im Bereich der Nodien im Gewebe, welches die Blattachselknospe umgibt, Expression zu ermitteln. Die Blattachselknospe, die Internodien und der größte Teil der Nodien zeigten keine Aktivität. Im Stamm der transgenen Kartoffelpflanzen war keine Aktivität zu detektieren; in Blättern fand sich die gleiche Spezifität wie in Tabak. In Wurzeln konnte weder in Kartoffel- noch in Tabakpflanzen GUS-Aktivität festgestellt werden. In Kartoffelpflanzen ist der Promotor nicht aktiv in Stolonen, sink-Knollen, bei Raumtemperatur oder Kälte gelagerten Knollen. In keimenden Knollen findet sich eine schwache Induktion der Expression.

In Tabakknospen ist in allen Geweben Aktivität feststellbar, in Blüten findet sie sich in den grünen Geweben. In Tabaksamen ist keine mRNA der GUS zu detektieren, allerdings ist GUS-Aktivität meßbar. Möglicherweise ist der Promotor im Laufe der Samenentwicklung aktiv und das GUS-Protein wird gespeichert.

Die Menge der Boten-RNA der GUS wird auch durch äußere Einflüsse reguliert. Die Expression wird reprimiert bei Inkubation in Zuckerlösungen und induziert bei Inkubation in Osmolyten wie Sorbitol.

Zur Induktion des Promotors in Keimlingen ist Licht notwendig, eine Regulation durch Photoassimilate ist dabei eher zu vermuten als durch Licht, denn dieses alleine reicht zur Expression in jungen Blättern nicht aus.

Bei Untersuchung der GUS- und der FBPase-Aktivität in allen Blättern von Tabakpflanzen wurde gezeigt, daß der isolierte Promotor eine *cyt* FBPase repräsentiert, die in Blättern dominiert. Die Korrelation der GUS- und *cyt* FBPase-Aktivitäten miteinander war sehr hoch. In jungen Blättern ist nur geringe Aktivität zu messen. Diese steigt bis zu völlig entfalteten Blättern an. In alternden Blättern sinkt die Aktivität stark ab.

Der Promotor vermittelt nicht die erhoffte Spezifität, da er außer im Mesophyll möglicherweise auch im feinen Leitgewebe des Blattes, sicher aber im Nodienbereich des Tabakstammes und in keimenden Knollen exprimiert wird. Im Vergleich zu den bisher für blattspezifische Expression



verwendeten Promotoren weist er aber eine erhöhte Spezifität auf, und die durch ihn vermittelte Expression ist stärker, er stellt also diesen gegenüber eine relative Verbesserung dar. Der Promotor wird spezifisch in source-Gewebe exprimiert. Er eignet sich daher für die Manipulation des source-Stoffwechsels.

## 7 Literaturliste

- Ainley, W.M., Key, J.L. (1990) Development of a heat shock inducible expression cassette for plants: characterization of parameters for its use in transient expression assays. *Plant Mol. Biol.* 14, 949-966
- Amasino, R.M. (1986) Acceleration of nucleic acid hybridisation rate by polyethylene glycol. *Anal. Biochem.* 152, 304-307
- André, D., Colau, D., Schell, J., van Montagu, M., Hernalsteens, J.-P. (1988) Gene tagging in plants by a T-DNA insertion mutagen that generates APH(3')-plant genes fusions. *Mol. Gen. Genet.* 204, 512-518
- Armstrong, G.A., Weisshaar, B., Hahlbrock, K. (1992) Homodimeric and heterodimeric Leucine Zipper Proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores. *Plant Cell* 4, 525-537
- Artsaenko, O., Peisker, M., zur Nieden, U., Fiedler, U., Weiler, E.W., Müntz, K., Conrad, U. (1995) Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J.* 8 (5), 745-750
- Avery, G.S. (1933) Structure and development of the tobacco leaf. *American J. Bot.* 20 (9), 565-592
- Barnes, S.A., Knight, J.S., Gray, J.C. (1994) Alteration of the amount of the chloroplast phosphate translocator in transgenic tobacco affects the distribution of assimilate between starch and sugar. *Plant Physiol.* 106, 1123-1129
- Batz, O., Maass, U., Heinrichs, G., Scheibe, R., Neuhaus, H.E. (1994) Glucose and ADP-Glucose dependent starch synthesis in isolated cauliflower-bud amyloplasts - analysis of the interaction of various potential precursors. *Biochim. Biophys. Acta* 1200, 148-154
- Bauer, D., Müller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., Strauss, M. (1993) Identification of differentially expressed mRNAs by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucl. Acids Res.* 21, 4272-4280
- Baulcombe, D.C., Chapman, S., Santa Cruz, S. (1995) Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* 7 (6), 1045-1053
- Bäumlein, H., Müller, A.J., Schiemann, J., Helbing, D., Manteuffel, R., Wobus, U. (1987) A legumin B gene of *Vicia faba* is expressed in developing seeds of transgenic tobacco. *Biol. Zentralbl.* 106, 569-575
- Beeckman, T., Engler, G. (1994) An easy technique for the clearing of histochemically stained plant tissue. *Plant Molecular Biology Rep.* 12(1), 37-42
- Benfey, P.N., Chua, N.-H. (1989) Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244, 174-181

- Bestor, T.H., Coxon, A.** (1993) The pros and cons of DNA methylation. *Curr. Biol.* **3**, 384-386
- Bevan, M** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8711-8721
- Blecken, J., Weisshaar, B., Herzfeld, F.** (1994) Two distinct *cis*-acting elements are involved in light-dependent activation of the pea *elip* promoter. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 371-379
- Boutry, M., Nagy, F., Poulsen, C., Aoyagi, K., Chua, N-H.** (1987) Targeting of bacterial chloramphenicol acetyltransferase to mitochondria in transgenic plants. *Nature* **328**, 340-342
- Bradford, M.M.** (1976) Rapid and quantitative method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-252
- Brand, A.H., Breeden, L., Abraham, J., Sternglanz, R., Nasmyth, K.** (1985) Characterization of a „silencer“ in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell* **41**, 41-48
- Breathnach, R., Chambon, P.** (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 349-383
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M.** (1987) XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**, 376-378
- Chrispeels, M.J.** (1991) Sorting of proteins in the secretory system. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 21-53
- Christou, P., McCabe, D.E., Martinell, B.J., Swain, W.F.** (1990) Soybean genetic engineering - commercial production of transgenic plants. *Trends Biotech.* **8**, 145-151
- Christou, P.** (1992) Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J.* **2**, 275-281
- Conrad, U., Fiedler, U.** (1994) Expression of engineered antibodies in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1023-1030
- Covey, S.N., Hull, R.** (1985) Advances in Cauliflower Mosaic Virus research. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, vol. 2, 339-346
- Crossway, A., Oakes, J.V., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C., Shewmaker, C.K.** (1986) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 79-85
- Dammann, C., Ebnet, M., Sanchez-Serrano, J.J.** (1994) Insertion of a 200 bp Pin2 promoter fragment alters the expression of the light induced ST-LS1 promoter. In: Abstracts, 4th international congress of plant molecular biology, Amsterdam, 1994.
- Daie, J.** (1993) Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: a key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. *Photosynthesis Research* **38**, 5-14

- Deblaere, R., Bytebier, B., de Greve, H., Debroek, F., Schell, J., van Montagu, M., Leemans, J.** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors of *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acid Res.* **13**, 4777-4788
- Dixon, W.L., ap Rees, T.** (1980) Carbohydrate metabolism during cold-induced sweetening of potato tubers. *Phytochemistry* **19**, 1653-1656
- Ebneth, M., Zrenner, R., Sonnewald, U.** (Manuskript in Vorbereitung)
- Edwards, J.W., Coruzzi, G.M.** (1990) Cell-specific gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **24**, 275-303
- Fitchen, J.H., Beachy, R.N.** (1993) Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 739-763
- Flavell, R.B.** (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3490-3496
- Fluhr, R., Kuhlemeier, C., Nagy, F., Chua, N.-H.** (1986) Organ-specific and light-induced expression of plant genes. *Science* **232**, 1106-1112
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., Hirth, L.** (1980) Nucleotide sequence of Cauliflower Mosaik Virus DNA. *Cell* **21**, 285-294
- Frohberg, K.** (1994) *Funktionsanalyse zweier DNA-Bindeproteine von Solanum tuberosum L.* Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin.
- Fromm, M.E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J., Klein, T.M.** (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Tech.* **8**, 833-844
- Fulton, T.M., Chunwongse, J., Tanksley, S.D.** (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Rep.* **13(3)**, 207-209
- Gatz, C., Quail, P.H.** (1988) Tn-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1394-1397
- Gatz, C., Kaiser, A., Wendenburg, R.** (1991) Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded tet repressor in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **227**, 229-237
- Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J., Chua, N.-H.** (1990) Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* **2**, 369-378
- Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V.S., Timko, M.P., Scolnik, P.A., Cashmore, A.R.** (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* **85**, 7089-7093
- Goddijn, O., Pen, J.** (1995) Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol.* **13**, 379-387

- Goldschmidt, E.E., Huber, S.C.** (1992) Regulation of Photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose and hexose sugars. *Plant Physiol.* **99**, 1443-1448
- Gorman, C.M., Mofat, L., Howard, B.H.** (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044-1051
- Guy, C.L.** (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **41**, 187-223
- Guy, C.L., Huber, J.L.A., Huber, S.C.** (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol.* **100**, 502-508
- Hajirezaei, M.R., Sonnewald, U., Viola, R., Carlisle, S., Dennis, D., Stitt, M.** (1994) Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate, 1-phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta* **192**, 16-30
- Hammond, J.B.W., Burrell, M.M., Kruger, N.J.** (1990) Effect of low temperature on the activity of Phosphofructokinase from potato tubers. *Planta* **180**, 613-616
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of bacteria with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Harn, C., Daie, J.** (1992) Regulation of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase by post-translational modification and protein level in drought-stressed leaves of sugarbeet. *Plant Cell Physiol.* **33** (6), 763-770
- Heineke, D., Sonnewald, U., Büssis, D., Günter, G., Leidreiter, K., Wilke, I., Raschke, K., Willmitzer, L., Heldt, H.W.** (1992) Apoplastic expression of yeast-derived Invertase in potato. *Plant Physiol.* **100**, 301-308
- Heineke, D., Kruse, A., Flügge, U.I., Frommer, W.B., Riesmeier, J.W., Heldt, H.W.** (1994) Effect of antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator on photosynthetic metabolism in transgenic potato plants. *Planta* **193**, 174-180
- 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**, 1027-1038
- Herbers, K., Sonnewald, U.** (1996) Manipulating metabolic partitioning in transgenic plants. *Trends Biotech.* **14**, 198-205
- Hildmann, T., Ebnet, M., Pena-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J.J., Willmitzer, L., Prat, S.** (1992) General roles of Abscisic and Jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* **4**, 1157-1170
- Ho, L.C.** (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 355-378

- Höfgen, R., Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9877
- Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* **19**, 15-38
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231
- Huber, S.C., Huber, J.L.A. (1992) Role of sucrose phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Phys.* **99**, 1275-1278
- Ito, M., Sato, T., Fukuda, H., Komamine, A. (1994) Meristem-specific gene expression directed by the promoter of the S-phase-specific gene, *cyc07*, in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **24**, 863-878
- Izawa, T., Foster, R., Chua, N.-H. (1993) Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J. Mol. Biol.* **230**, 1131-1144
- Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.V. (1987) GUS fusions:  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907
- Jorgensen, R. (1992) Silencing of plant genes by homologous transgenes. *AgBiotech. News and Information* **4** (9), 265N-273N
- Jorgensen, J.A. (1995) Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression states. *Science* **268**, 686-691
- Joshi, R.L., Joshi, V. (1991) Strategies for expression of foreign genes in plants. *FEBS Lett.* **281**, 1-8
- Khayat, E., Harn, C., Daie, J. (1993) Purification and light-dependent molecular modulation of the cytosolic Fructose-1,6-bisphosphatase in sugarbeet leaves. *Plant Physiol.* **101**, 57-64
- Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J., Willmitzer, L. (1990) Localization of elements important for the wound-inducible expression of a chimeric potato proteinase inhibitor II-CAT gene in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **2**, 61-70
- Keller, B., Lamb, C.J. (1990) Specific expression of a novel cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation. *Genes Dev.* **3**, 1639-1646
- Kelly, J.G., Zimmermann, G., Latzko, E. (1982) Fructose bisphosphatase from spinach chloroplast and cytoplasm. *Methods Enzymol.* **90**, 371-373
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Körber, H., Redei, G.P., Schell, J. (1989) High frequency T-DNA mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8467-8471

- Höfgen, R., Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16, 9877
- Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19, 15-38
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231
- Huber, S.C., Huber, J.L.A. (1992) Role of sucrose phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Phys.* 99, 1275-1278
- Ito, M., Sato, T., Fukuda, H., Komamine, A. (1994) Meristem-specific gene expression directed by the promoter of the S-phase-specific gene, *cyc07*, in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 24, 863-878
- Izawa, T., Foster, R., Chua, N.-H. (1993) Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J. Mol. Biol.* 230, 1131-1144
- Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.V. (1987) GUS fusions:  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907
- Jorgensen, R. (1992) Silencing of plant genes by homologous transgenes. *AgBiotech. News and Information* 4 (9), 265N-273N
- Jorgensen, J.A. (1995) Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression states. *Science* 268, 686-691
- Joshi, R.L., Joshi, V. (1991) Strategies for expression of foreign genes in plants. *FEBS Lett.* 281, 1-8
- Khayat, E., Harn, C., Daie, J. (1993) Purification and light-dependent molecular modulation of the cytosolic Fructose-1,6-bisphosphatase in sugarbeet leaves. *Plant Physiol.* 101, 57-64
- Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J., Willmitzer, L. (1990) Localization of elements important for the wound-inducible expression of a chimeric potato proteinase inhibitor II-CAT gene in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 2, 61-70
- Keller, B., Lamb, C.J. (1990) Specific expression of a novel cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation. *Genes Dev.* 3, 1639-1646
- Kelly, J.G., Zimmermann, G., Latzko, E. (1982) Fructose bisphosphatase from spinach chloroplast and cytoplasm. *Methods Enzymol.* 90, 371-373
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Körber, H., Redei, G.P., Schell, J. (1989) High frequency T-DNA mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8467-8471

- Koncz, C., Langridge, W.H.R., Olsson, O., Schell, J., Szalay, A.A.** (1990a) Bacterial and firefly luciferase genes in transgenic plants: Advantages and disadvantages of a reporter gene. *Dev. Genet.* **11**, 224-232
- Koncz, C., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Reiss, B., Redei, G.P., Schell, J.** (1990b) Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **9**, 1337-1346
- Koßmann, J., Sonnewald, U., Willmitzer, L.** (1994) Reduction of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth. *Plant J.* **6**, 637-650
- Krapp, A., Hofmann, B., Schäfer, C., Stitt, M.** (1993) Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the „sink regulation“ of photosynthesis. *Plant J.* **3**(6), 817-828
- Krapp, A., Stitt, M.** (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the „sink-regulation“ of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* **195**, 313-323
- Krause, K.-P.** (1994) *Zur Regulation des Saccharosestoffwechsels in photosynthetisch aktiven und heterotrophen Pflanzengewebe*. Fakultät für Biologie, Universität Bayreuth
- Kreidberg, J.A., Kelly, T.J.** (1986) Genetic analysis of the human Thymidine Kinase gene promoter. *Mol. Cell Biol.* **6**, 2903-2909
- Kwon, H.-B., Park, S.-C., Peng, H.-P., Goodman, H.M., Dewdney, J., Shih, M.-C.** (1994) Identification of a light-responsive region of the nuclear gene encoding the B subunit of chloroplast Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **105**, 357-367
- Lehrbach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtke, H.** (1977) RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem.* **16**, 4743-4751
- Lerchl, J., Geigenberger, P., Stitt, M., Sonnewald, U.** (1995) Inhibition of long-distance sucrose transport by inorganic pyrophosphatase can be complemented by phloem-specific expression of cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *Plant Cell* **7**, 259-270
- Liang, P., Averboukh, L., Pardee, A.B.** (1993) Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: Refinements and optimization. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3269-3275
- Lilius, G., Holmberg, N., Bulow, L.** (1996) Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Bio/Technology* **14**, 177-180
- Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L.** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 21-26



- Lorberth, R., Dammann, C., Ebnet, M., Amati, S., Sanchez-Serrano, J.J. (1992) Promoter elements involved in environmental and developmental control of potato proteinase inhibitor II expression. *Plant J.* 2 (4), 477-486
- Mansson, P.-E., Hsu, D., Stalker, D. (1985) Characterization of fruit-specific cDNAs from tomato. *Mol. Gen. Genet.* 200, 356-361
- Mason, H.S., Arntzen, C.J. (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends Biotechnol.* 13, 388-392
- Martin, T., Wöhner, R.V., Hummel, S., Willmitzer, L., Frommer, W.B. (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
- Matzke, M.A., Matzke, A.J.M. (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.* 107, 679-685
- Mayoral, M.L., Plaut, Z., Reinhold, L. (1985) Effect of translocation-hindering procedures on source leaf photosynthesis in cucumber. *Plant Physiol.* 77, 712-717
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11 (4), 1229-1238
- Müller-Röber, B., Koßmann, J. (1994) Approaches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants: a commissioned review. *Plant Cell Environm.* 17, 601-613
- Müller-Röber, 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, 601-612
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497
- Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y., Nishida, I. (1992) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* 356, 710-713
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289
- Nawrath, C., Poirier, Y., Sommerville, C. (1994) Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12760-12764
- Neuhaus, H.E., Batz, O., Thom, E., Scheibe, R. (1993) Purification of highly intact plastids from various heterotrophic plant tissues - analysis of enzymic equipment and precursor dependency for starch biosynthesis. *Biochemical J.* 296, 395-401

- Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N.-H.** (1985) Identification of DNA sequences required for the activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812
- Ohl, S., Hedrick, S.A., Chory, J., Lamb, C.J.** (1990) Functional properties of a Phenylalanine Ammonia-Lyase promoter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 837-848
- Ohlrogge, J.B.** (1994) Design of new plant products: engineering of fatty acid metabolism. *Plant Physiol.* **104**, 821-826
- Osborne, T.F., Goldstein, J.L., Brown, M.S.** (1985) 5' end of HMG CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. *Cell* **42**, 203-212
- Park, Y.-D., Papp, I., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J.M., Matzke, M.A.** (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* **9** (2), 183-194
- Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L., Fischhoff, D.A.** (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3324-3328
- Potyrkus, I.** (1991) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 205-225
- Quick, P., Siegl, G., Neuhaus, E., Feil, R., Stitt, M.** (1989) Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. *Planta* **177**, 535-546
- Quick, P., Schurr, U., Scheibe, R., Schulze, E.-D., Rodermeil, L., Bogorad, L., Stitt, M.** (1991) Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in transgenic tobacco transformed with „antisense“ rbcS. I. Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. *Planta* **183**, 542-554
- Quick, W.P., Scheibe, R., Neuhaus, H.E.** (1996) Induction of hexose-phosphate translocator activity in spinach chloroplasts. *Plant Phys.* **109** (1), 113-121
- Reiss, B., Sprengel, R., Will, H., Schaller, H.** (1984) A new sensitive method for qualitative and quantitative assay of neomycin phosphotransferase in crude cell extracts. *Gene* **30**, 211-218
- Riesmeier, J.W., Flügge, U.-I., Schulz, B., Heineke, D., Heldt, H.W., Willmitzer, L., Frommer, W.B.** (1993) Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6160-6164
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., Frommer, W.B.** (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J.* **13**, 1-7

- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J., Willmitzer, L.** (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* **8**, 23-29
- Rodermel, S.R., Abbott, M.S., Bogorad, L.** (1988) Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense gene inhibits ribulose biphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell* **55**, 673-681
- 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
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scott, P., Kruger, N.J.** (1994) Fructose-2,6-bisphosphate levels in mature leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and potato (*Solanum tuberosum*). *Planta* **193**, 16-20
- Scott, P., Lange, A.J., Pilgis, S.J., Kruger, N.J.** (1995) Carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing elevated fructose-2,6-bisphosphate levels. *Plant J.* **7** (3), 461-469
- Schmülling, T., Schell, J., Spena, A.** (1989) Promoters of the *rolA*, *B* and *C* genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differently regulated in transgenic plants. *Plant Cell* **1**, 665-670
- Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.M., Murdock, L.L., Higgins, T.J.V., Chrispeels, M.J.** (1994) Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -Amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technology* **12**, 793-796
- Sheen, J.** (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**, 1027-1038
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H., Galbraith, D.W.** (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* **8** (5), 777-784
- Simpson, J., Timko, M.P., Cashmore, A.R., Schell, J., van Montagu, M., Herrera-Estrella, L.** (1985) Light-inducible and tissue-specific expression of a chimeric gene under control of the 5' flanking sequence of a pea chlorophyll a/b-binding protein gene. *EMBO J.* **4**, 2723-2729
- Simpson, J., Schell, J., van Montagu, M., Herrera-Estrella, L.** (1986) Light-inducible and tissue specific pea *lhcp* gene expression involves an upstream element combining enhancer- and silencer-like properties. *Nature* **323**, 551-554
- Sonnewald, U.** (1992) Expression of *E. coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning. *Plan J.* **2**, 571-581
- Sonnewald, U., Sturm, A., Chrispeels, M.J., Willmitzer, L.** (1989) Targeting and glycosylation of patatin, the major potato tuber protein in leaves of transgenic tobacco. *Planta* **179**, 171-180

- Sonnewald, U., Brauer, M., von Schaewen, A., Stitt, M., Willmitzer, L. (1991) Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *Plant J.* 1, 95-106
- Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1992) Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiol.* 99, 1267-1270
- Sonnewald, U., Lerchl, J., Zrenner, R., Frommer, W. (1994) Manipulation of sink-source relations in transgenic plants. *Plant Cell Environment* 17, 649-658
- Stark, D.M., Timmermann, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., Kishore, G.M. (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science* 258, 287-292
- Stitt, M. (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 153-185
- Stitt, M., Lilley, R.M.C., Gerhardt, R., Heldt, H.W. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.* 174, 518-552
- Stitt, M., Sonnewald, U. (1995) Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 341-368
- Stockhaus, J., Schell, J., Willmitzer, L. (1989) Identification of enhancer elements in the upstream region of the nuclear photosynthesis gene ST-LS1. *Plant Cell* 1, 805-813
- Stockhaus, J., Poetsch, W., Steinmüller, K., Westhoff, P. (1994) Evolution of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase promoter of the C4 dicot *Flaveria trinervia*: an expression analysis in the C3 plant tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 245, 286-293
- Strauss, D., Ausubel, F.M. (1990) Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations. *Proc. Acad. Sci. USA* 87, 1889-1893
- Sturm, A., Chrispeels, M.J. (1990) cDNA cloning of carrot extracellular  $\beta$ -Fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2, 1107-1119
- Tarczynski, M.C., Jensen, R.G., Bohnert, J.H. (1993) Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259, 508-510
- Thomas, H., Stoddart, J.L. (1980) Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 31, 83-111
- Töpfer, R., Martini, N., Schell, J. (1995) Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268, 681-686
- Turgeon, R. (1989) The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 119-138
- van Blokland, R., van der Geest, N., Mol, J.N.M., Kooter, J.M. (1994) Transgene mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* 6, 861-877

- van den Broeck, G., Timko, M.P., Kausch, A.P., Cashmore, A.R., van Montagu, M., Herrera-Estrella, L. (1985) Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Nature* 313, 358-363
- van der Hoeven, C., Dietz, A., Landsmann, J. (1994) Variability of organ-specific gene expression in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research* 3, 159-165
- van der Krol, A.R., Lenting, P.E., Veestra, J., van der Meer, I.M., Koes, R.E. (1988a) An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333, 866-869
- van der Krol, A.R., Mol, J.N.M., Stuitje, A.R. (1988b) Antisense genes in plants: an overview. *Gene* 72, 45-50
- van der Meer, I.M., Ebskamp, M.J.M., Visser, R.G.F., Weisbeek, P.J., Smeekens, S.C.M. (1994) Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. *Plant Cell* 6, 561-570
- Vasil, V., Brown, S.M., Re, D., Fromm, M.E., Vasil, I.K. (1991) Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Tech.* 9, 743-747
- Velten, J., Schell, J. (1985) Selection expression plasmid vectors for use in genetic transformation in higher plants. *Nucl. Acids Res.* 13, 6981-6991
- Visser, R.G.F., Somhorst, I., Kuipers, G.J., Ruys, N.J., Feenstra, W.J., Jacobsen, E. (1991) Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol. Gen. Genet.* 225, 289-296
- von Schaewen, A., Stitt, M., Schmidt, R., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.* 9 (10), 3033-3044
- Walden, R., Schell, J. (1990) Techniques in plant molecular biology - progress and problems. *Eur. J. Biochem.* 192, 563-576
- Wandelt, C.I., Khan, M.R.I., Craig, S., Schroeder, H.E., Spencer, D., Higgins, T.J.V. (1992) Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in leaves of transgenic plants. *Plant J.* 2, 181-192
- Williamson, J.D., Hirsch-Wyncott, M.E., Larkins, B.A., Gelvin, S.B. (1989) Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 90, 1570-1576
- Worrell, A.C., Bruneau, J-M., Summerfelt, K., Boersig, M., Voelker, T.A. (1991) Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* 3, 1121-1130

- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T-H., Wu, R.** (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Phys.* 110, 249-257
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., van Montagu, M., Schell, J.** (1983) Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150
- Zambryski, P.** (1989) *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer. In: Berg, D.E., Howe, M.M. (Hrsg.), *Mobile DNA*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 309-333
- Zrenner, R.** (1993) *Klonierung und funktionelle Analyse von Genen kodierend für am Saccharosestoffwechsel der Kartoffel beteiligter Proteine*. Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin.
- Zrenner, R., Krause, K.-P., Apel, P., Sonnewald, U.** (1996) Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *Plant J.* 9 (5), 671-681
- Zupan, J.R., Zambryski, P.** (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107, 1041-1047

## Danksagung

Ich danke Herrn Dr. Uwe Sonnewald für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die hilfreichen Diskussionen.

Professor Schieder möchte ich für die Bereitwilligkeit danken, mit der er den Vorsitz über die Prüfungskommission bei dieser Doktorarbeit übernommen hat.

Weiterhin danke ich Rita Zrenner für die Überlassung der cDNA der cyt FBPase, hilfreiche Auskünfte und Feminismusdebatten.

Klaus-Peter Krause danke ich für verschärfte Unterstützung bei verschiedensten Experimenten und beim Computern (Klaus-Peter, kommst Du mal?!).

Karin Herbers gilt mein Dank für nimmermüde Auskünfte über Techniken und Fakten ebenso wie für die Geduld beim Lesen und Kritisieren diverser von mir verfasster Texte.

Astrid Basner bin ich zu Dank verpflichtet für sowohl moralische als auch praktische Unterstützung im ersten Jahr der Arbeit.

Christiane Prüßner danke ich für Hilfe und Ermahnung aber besonders für schöne Nachmittage und Abende, ohne die Gatersleben nur halb so gut auszuhalten gewesen wäre.

Andrea Knospe gilt mein Dank für Transformation und Betreuung der Pflanzen und die frischesten Hühnereier im Ort.

Heike Deppner hatte immer alle mir fehlenden Lösungen parat und diese zur Verfügung gestellt. Danke!

Susanne König danke ich für die Sequenzen und Heike Ernst und Birgit Schäfer für die hervorragenden und überaus zügig durchgeführten Photoarbeiten.

Der ganzen Gruppe Sonnewald danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die vielen Grillabende. Eines zumindest kann man sagen: Es war nie langweilig.

## Lebenslauf

Name: Marcus Ebneith  
Geburtstag: 07.11.1965  
Geburtsort: Idar-Oberstein

### Schulbildung:

1972-1976 Besuch der Grundschule in Bergisch-Gladbach, Lüneburg und Köln  
1976-1985 Besuch des Gymnasiums in Köln und Bad Bramstedt  
Juni 1985 Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung:

1985-1992 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin  
Juli 1988 Vordiplomprüfung  
Mai 1992 Hauptdiplomprüfung  
1991-1992 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Genbiologische Forschung Berlin-Dahlem unter Anleitung von Prof. Dr. Willmitzer.  
Titel der Diplomarbeit: „Untersuchung über die Rolle der Pflanzenhormone Abscisinsäure und Jasmonsäure bei der Regulation des Proteinaseinhibitor II Promotors in Tomate und Kartoffel“  
August 1992 Anfertigung der Dissertation am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben, Sachsen-Anhalt in der Arbeitsgruppe von Dr. Sonnwald.

### Titel der Doktorarbeit:

„Expressionsanalyse der cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase aus Kartoffel in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen“