



**INAUGURAL-DISSERTATION**

**zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg**

**vorgelegt von**

**Diplom-Biologin Michelle Pfister  
aus Mannheim**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**Ektopische Expression von *Nt-CIF*  
und *Nt-VIF* in Kartoffelpflanzen:**

**Posttranslationale Inhibition  
der  
wundinduzierten ZWI- und VI-Aktivitäten  
zur Aufklärung  
ihrer  
*in vivo*-Funktionen**

**Gutachter: Prof. Dr. Thomas Rausch**

**Prof. Dr. Michael Wink**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>10</b>
2.1 Zielsetzung der Arbeit.....	10
2.2 Kulturpflanze Kartoffel ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....	11
2.3 Wundreaktion in Kartoffelknollen .....	12
2.4 Enzyme des Saccharose-Metabolismus.....	13
2.4.1 <i>Invertasen</i> .....	14
2.4.2 <i>Regulation der Invertasen</i> .....	17
2.5 Transformation von Kartoffelpflanzen mit Invertaseinhibitor-cDNAs: Expression des Nt-VIF und Nt-CIF-Proteins in Kartoffelknollen.....	19
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>21</b>
3.1 Verwundung von Kartoffelknollengewebe des Wildtyps: Expressionsanalyse von Zellwandinvertase (ZWI), vakuolärer Invertase (VI) und der korrespondierenden Substrate/Produkte .....	22
3.1.1 <i>Expressionmuster von ZWI- und VI-Transkripten und Darstellung der         Proteinexpression von ZWI und VI im Verlauf der Verwundung</i> .....	22
3.1.2 <i>Erhöhung der Zellwandinvertaseaktivität und der vakuolären         Invertase-Aktivität 16 Stunden nach Verwundung im Wildtyp</i> .....	22
3.1.3 <i>Anstieg der Hexosekonzentration (Fruktose und Glukose) und         Abnahme der Saccharosekonzentration nach Verwundung im Wildtyp</i> .....	23
3.2 Auswirkung der ektoptischen Expression von Nt-CIF und Nt-VIF auf die Wundreaktion .....	25
3.2.1 <i>Unverändertes Expressionsmuster der ZWI und VI auf Transkript- und         Proteinebene in Nt-VIF- und Nt-CIF-Transformanten im Vergleich zum         Wildtyp</i> .....	25
3.2.2 <i>Posttranslationale Regulation der Aktivität von Zellwandinvertase und         vakuolärer Invertase in den Transformanten durch die Inhibitorproteine</i> .....	25
3.2.3 <i>Ausbleiben der Hexosebildung und Anstieg der         Saccharosekonzentration in Nt-VIF-Transformanten nach Verwundung/         Keine Veränderung in der Hexoseakkumulation und dem Saccharoseabbau</i>	

<i>in den Nt-CIF-Transformanten nach Verwundung im Vergleich zum Wildtyp</i> .....	26
3.3. Verminderung der Stärkekonzentration in Transformanten und Wildtyp nach Verwundung.....	30
3.4 Erhöhung der Respirationsrate in den Transformanten im Vergleich zum Wildtyp.....	31
3.5 Bildung von Abschlussgewebe in verwundeten Kartoffelknollen .....	33
3.5.1 <i>Unveränderte Bildung von Wundperiderm in verwundetem     Kartoffelknollengewebe in Transformanten und Wildtyp</i> .....	33
3.5.2 <i>Die Einlagerung von Wachsen in die Zellwände der Wundoberfläche     ist unverändert in den Transformanten im Vergleich zum Wildtyp</i> .....	34
3.6 Untersuchung von Saccharose-Synthase und Saccharose-Phosphat- Synthase als weitere im Kohlenhydratmetabolismus beteiligte Enzyme .....	36
3.6.1 <i>Keine Veränderung in der Expression von SuSy und SPS in den     Transformanten im Vergleich zum Wildtyp</i> .....	36
3.6.2 <i>Die Gesamtaktivität und die selektive Aktivität der Saccharose-     Synthase (SuSy) ist unverändert im Vergleich zum Wildtyp</i> .....	37
3.7 Erhöhung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität nach Verwundung in WT und Transformanten gleichermaßen .....	39
3.8 Abnahme der Glutathionkonzentration (GSH) bis 16 Stunden und anschließende Regeneration des GSH-Pools ab 48 Stunden nach Verwundung .....	40
3.9 Infektion von Kartoffelknollenscheibchen mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : Überexpression von <i>Nt-CIF</i> und <i>Nt-VIF</i> erzeugen keine Verzögerung in der Tumorinduktion im Vergleich zum Wildtyp.....	42
<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>47</b>
4.1 Funktionelle Ausschaltung der wundinduzierten ZWI- und VI-Aktivität zur Aufklärung der <i>in vivo</i> -Funktion dieser Enzyme in Kartoffelknollengewebe.....	47
4.1.1 <i>Ektopische Expression von Nt-CIF und Nt-VIF in     Kartoffeltransformanten: Phänotyp</i> .....	47
4.1.2 <i>Ektopische Expression von Nt-CIF und Nt-VIF in     Kartoffeltransformanten: Auswirkung der verminderten Aktivität in den     Transformanten auf die transkriptionelle Induktion beider Gene, die Bildung     der Invertaseproteine und die wundinduzierte Bildung von Zuckern</i> .....	48

4.1.3 Funktion von Zuckermolekülen unter Stress .....	50
4.2 Auswirkung von Verwundungsstress auf Abwehr, Wund- peridermentwicklung, Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus und die Respiration in Wildtyp Kartoffelknollengewebe .....	52
4.2.1 Mobilisierung des Sekundärstoffwechsels: Abwehr und Wundheilung (Suberinisierung) .....	52
4.2.2 Bildung eines dauerhaften Wundabschlusses: Wundperidermbildung .....	54
4.2.3 Stärkeabbau, Kohlenhydratmetabolismus und Respiration nach Verwundung .....	56
4.3 Untersuchungen zur Wundreaktion von <i>Nt-VIF</i> - und <i>Nt-CIF</i> - Transformanten: Einfluss einer Inaktivierung von VI, bzw. ZWI auf Abwehrreaktionen, Wundperidermentwicklung, Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus und die Respiration im Vergleich zum Wildtyp.....	60
4.3.1 Untersuchung zur PAL-Expression und Konzentration löslicher Phenole .....	60
4.3.2 Bildung von Wundperiderm und die Einlagerung von Wachsen an der Wundoberfläche .....	62
4.3.3 Stärkeabbau und Wundatmung in den Transformanten .....	62
4.3.4 Bewertung der Befunde aus biotechnologischer Sicht .....	66
4.4 Prüfung der Hypothese, ob eine stark erhöhte ZWI-Aktivität in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Tumoren essentiell für das Tumorwachstum ist .....	68
4.5 Ausblick .....	71
<b>5 MATERIAL .....</b>	<b>73</b>
5.1 Pflanzenmaterial .....	73
5.2 DNA-Sonden .....	73
5.3 Antiseren .....	74
5.4 Lösungen und Chemikalien zu den Experimenten .....	74
5.4.1 Histologische Techniken (6.3) .....	74
5.4.2 Anfertigung von Suberinfärbung (6.4).....	75
5.4.3 Isolation und Messung der Zellwandinvertase und vakuoläre Invertase (6.5).....	75
5.4.4 Western Blot-Analyse (6.7).....	75

5.4.5 Amidoschwarzfärbung (6.8).....	75
5.4.6 Extraktion und Bestimmung von Saccharose-Synthase- und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität (6.9).....	76
5.4.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen (6.11).....	76
5.4.8 RNA-Isolation und Northern Blot-Analyse (6.12).....	76
5.4.9 Extraktion und enzymatische Bestimmung der Speicherkohlehydrate (6.13).....	76
5.4.10 Ermittlung von GSH über die HPLC-Methode (6.14).....	77
5.4.11 Bestimmung löslicher Phenole (6.15).....	77
5.4.12 Tumorinduktion an Kartoffelscheibchen durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (6.16).....	77
<b>6 METHODEN .....</b>	<b>78</b>
6.1 Verwundung von Kartoffelknollengewebe.....	78
6.2 Ermittlung der Respiration in verwundeten Kartoffelknollen .....	78
6.3 Histologische Techniken.....	81
6.3.1 Fixieren und Einbetten von Pflanzenmaterial .....	81
6.3.2 Anfertigung von Gewebedünnschnitten.....	82
6.3.3 Färbung der Schnitte mit Toluidinblau (SAKAI).....	82
6.4 Anfertigung von Suberinfärbung an Frischpräparaten/ Suberineigenfluoreszenz .....	82
6.5 Isolation der Zellwandinvertase und vakuolären Invertase .....	83
6.5.1 Extraktion .....	83
6.5.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten .....	83
6.5.3 Aufbereitung der Proteine für die Western Blot-Analyse .....	84
6.5.4 Proteinbestimmung nach Bradford .....	84
6.6 SDS-PAGE .....	84
6.7 Western Blot-Analyse .....	84
6.8 Amidoschwarzfärbung .....	85
6.9 Bestimmung von Saccharose-Synthase- und Glukose-6-Phosphat- Dehydrogenase-Aktivität.....	85
6.9.1 Enzymextraktion.....	85
6.9.2 Bestimmung der Saccharose-Synthase-Aktivität.....	86

6.9.3 Bestimmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität.....	87
6.10 Nicht radioaktive Markierung von DNA.....	87
6.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen .....	87
6.12 RNA-Isolation und Northern Blot-Analyse.....	88
6.13 Extraktion und enzymatische Bestimmung der Speicherkohlehydrate .	88
6.13.1 Bestimmung von Saccharose, Glukose und Fruktose.....	88
6.13.2 Bestimmung von Stärke .....	89
6.14 Ermittlung von GSH über die HPLC-Methode .....	89
6.14.1 Extraktion und Derivatisierung des Glutathion.....	89
6.14.2 HPLC-Messung.....	89
6.15 Bestimmung löslicher Phenole .....	90
6.16 Tumorinduktion an Kartoffelscheibchen durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	91
6.16.1 Agrobakterien-Kultur.....	91
6.16.2 Infektion des Knollenparenchym .....	91
6.16.3 Probenaufbereitung des Tumorgewebes.....	91
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>
<b>8 ANHANG .....</b>	<b>103</b>
8.1 Liste der Abkürzungen.....	103
8.2 Tabellen.....	105
8.3 Abbildungsverzeichnis .....	109



# 1 Zusammenfassung

Zur Aufklärung der Funktion(en) der Zellwandinvertase (ZWI) und der vakuolären Invertase (VI) bei mechanischer Verwundung von Kartoffelknollen wurden transgene Kartoffelpflanzen mit ektopischer Expression der Invertaseinhibitoren *Nt-CIF* (apoplastischer Inhibitor; Greiner, 1999) und *Nt-VIF* (vakuolärer Inhibitor; Greiner et al., 1999) eingesetzt. Hierfür wurden in Wildtyp-, *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Kartoffelknollen zunächst die Expression beider Invertasen (VI, ZWI) auf Transkript-, Protein- und Aktivitätsebene, sowie die wundinduzierten Konzentrationsänderungen von Glukose, Fruktose, Saccharose und Stärke untersucht. Parallel hierzu wurden die Expression der wundinduzierten Phenylalaninammoniumlyase (PAL), die Konzentration löslicher Phenole, die Wundperidermbildung, die Respirationsrate, die Expression weiterer Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus (SPS, SUSY, G-6-P-DH) und der Glutathion-Pool erfaßt.

Die Bestimmung der Konzentrationen von Saccharose, Fruktose und Glukose ergab eine nahezu vollständige Unterdrückung der wundbedingten Hexosebildung in *Nt-VIF*-Transformanten und eine Verzögerung der Hexoseformation nach Verwundung in *Nt-CIF*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp. Die posttranslationale Inhibition der ZWI-Aktivität in den *Nt-CIF*-Transformanten, bzw. der VI-Aktivität in den *Nt-VIF*-Transformanten hatte jedoch keinen Einfluß auf die Transkriptexpression von ZWI, VI, PAL, SUSY und SPS, sowie die Proteinexpression von ZWI und VI. Auch die Aktivitäten von SUSY und G-6-P-DH zeigten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und den Transformanten; ebenso blieben Stärkeabbau, Respirationsrate, Glutathionkonzentration und Anstieg löslicher Phenole nach Verwundung unbeeinflusst. In Übereinstimmung mit diesen Befunden war der Verlauf der Wundperidermbildung und der Einlagerung von Wachsen in Wildtyp und Transformanten identisch. Die Ergebnisse zeigen, dass *Nt-VIF*-Kartoffeltransformanten mit unterdrücktem *cold sweetening* (Greiner et al., 1999) in ihren Wundreaktionen nicht beeinträchtigt sind, ein wichtiger Befund für deren biotechnologische Nutzung.

Parallel zur Untersuchung der Wundreaktion in den Transformanten wurde die Infektion des Kartoffelknollengewebes mit *Agrobacterium tumefaciens* (*A.t.*) durchgeführt. *A.t.*-Infektion löst die Induktion von Tumoren aus, wobei ZWI als wichtiges Schlüsselenzym für die Tumorinduktion fungiert. *Nt-CIF*-Transformanten, welche eine Reduktion der ZWI-Aktivität *in vivo* aufweisen, zeigen keine Veränderungen in Induktion und Wachstum des Tumorgewebes. Die Studien am Tumorgewebe zeigten, dass die durch *A.t.*-Infektion ausgelöste, stark induzierte ZWI-Expression die über den CaMV35S-Promotor regulierte Inhibitorexpression offensichtlich übertrifft. Die vorhandene ZWI-Aktivität wird daher nicht vollständig gehemmt.

## 2 Einleitung

Innerhalb der meisten Pflanzenspezies wird der Langstreckentransport von Assimilaten in Form von Saccharose durchgeführt. Antriebskraft dieses Prozesses ist ein Konzentrationsgradient zwischen Ort der Synthese (*Source*) und Ort der Entnahme von Assimilaten (*Sink*). Am Zielort wird die Saccharose enzymatisch gespalten. Invertasen katalysieren im pflanzlichen Stoffwechsel die irreversible Hydrolyse der Saccharose zu den Hexosen Glukose und Fruktose und spielen daher bezüglich Substraterschließung und -mobilisierung eine zentrale Rolle in der Pflanze. Invertasen existieren in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle, sind involviert in die verschiedensten Stoffwechselvorgänge und übernehmen eine entscheidende Funktion innerhalb von Stressreaktionen (Roitsch et al., 2000). Die Rolle dieser Enzyme, ergibt sich aus der multiplen Funktion des Substrates Saccharose, welches sowohl als Transportzucker, Energiereserve und Signalmolekül (Chiou and Bush, 1998) fungiert. Die Regulation der Invertasen erfolgt auf Transkriptebene durch Effektoren wie Phytohormone und Zuckermoleküle oder auf posttranslationale Weise über Inhibitorproteine (Weil et al., 1994).

Die ektopische Expression von Invertaseinhibitoren in transgenen Kartoffelpflanzen, welche *in vivo* die posttranslationale Inhibition der Zellwandinvertaseaktivität und der vakuolären Invertaseaktivität in der gesamten Pflanze vorweisen, diente der Untersuchung der Rolle der Invertasen innerhalb der Wundreaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der stressbedingten Katalyse von Saccharose durch die Invertasen in reifen Kartoffelknollen und deren Einfluss auf weitere wundinduzierte Stoffwechselwege untersucht.

### 2.1 Zielsetzung der Arbeit

**Anhand der Transformanten sollten folgende Fragen beantwortet werden:**

- Welchen Einfluss hat die ektopische Expression von *Nt-CIF* und *Nt-VIF* auf die Synthese der ZWI- und VI-Transkripte, bzw. ZWI- und VI-Proteine?
- Wird die wundinduzierte Hexosenbildung in den Transformanten verhindert, bzw. ein messbarer Unterschied im Gesamtgehalt der wundinduzierten Hexosen vergleichend zum Wildtyp erreicht?
- Welchen Einfluss übt die wundinduzierte Hexosebildung auf Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus (SuSy, SPS, G-6-P-DH), auf den Stärkegehalt und die Respiration aus?

### **Funktion von Zuckern als Signale:**

Untersuchungen an Tabakpflanzen, welche durch Überexpressionen von Heifeinvertasen eine Veränderung in den Konzentrationen der Komponenten des Phenylpropanmetabolismus aufweisen, deuten auf eine Funktion von Zuckern als Signale innerhalb dieser Stoffwechselwege hin (Baumert et al., 2001).

- Bewirkt die Unterdrückung von ZWI und VI und das Ausbleiben der Saccharosehydrolyse in den entsprechenden Kompartimenten eine Veränderung im Phenylpropanmetabolismus (PAL, lösliche Phenole)?
- Hat dies auch Konsequenzen für die Einlagerung von Suberinen an der Wundoberfläche und für die Formation des Wundperiderms?

### **Funktion der ZWI bei der Induktion von *Agrobacterium tumefaciens*-Tumoren an Kartoffelknollen:**

ZWI spielt während der Induktion von *Agrobacterium tumefaciens*-Tumoren eine entscheidende Rolle (Weil und Rausch, 1990; Pradel et al., 1996).

- Welchen Einfluss hat die in den Transformanten reduzierte ZWI-Aktivität auf die Induktion und das Wachstum *Agrobacterium tumefaciens*-erzeugter Tumoren?

## **2.2 Kulturpflanze Kartoffel (*Solanum tuberosum*)**

Die Kartoffelpflanze besitzt mit 160 Wildarten und 8 Kulturarten eine der umfangreichsten Genressourcen unter den Kulturpflanzen. Die Mehrzahl der Arten ist diploid, neben wenigen tri- bis hexaploiden Arten. Die aus den Anden Südamerikas, Mittelamerika und Mexiko stammende Pflanze gehört zu den wichtigsten Nahrungspflanzen der Erde und breitet sich auch in den Entwicklungsländern stark aus. Diese Bezeichnung verdankt sie ihrer hohen Kohlenhydrat- und Eiweißproduktion pro Zeit- und Flächeneinheit, sowie ihrer guten Anpassung an verschiedenste Klimate.

Der Anbau von Kartoffelpflanzen erfolgt über Knollen, sogenannte Samenkartoffeln. Dies erhöht allerdings die Wahrscheinlichkeit von Virusbefall und anderer kartoffelspezifischer Krankheiten. Eine Vermehrung über Samen der Kartoffelpflanze, die das Risiko des Krankheitsbefalls mindern würde, ist aufgrund inhomogener Knollenernte wirtschaftlich nicht tragbar.

Es existieren etwa 30 Viren, welche Kartoffeln befallen. Darunter sind 8 weit verbreitet und schädigen den Anbau stark. Die Übertragung der Viren erfolgt über Wundkontakt oder Aphiden. Da diese Risiken durch Ernte (mechanische Verwundung) und z.B. Lausbefall nicht vollständig zu verhindern sind, wird zu-

nehmend auf Resistenzzüchtungen gesetzt. Auch Knollenbeschädigung während der Ernte erzeugt wirtschaftliche Einbußen. Besonders Knollen mit großlumigen Zellen sind extrem empfindlich gegenüber mechanischer Verwundung. Unter Druck und Stoß verfärbt sich das Knollengewebe schwarz und zudem wird nach Verwundung einer großen Anzahl an Erregern der Eintritt gewährt. Dazu gehören auch viel bakterielle und pilzliche Parasiten.

Die Kartoffelernte erfolgt in mitteleuropäischem Gebiet einmal im Jahr, was eine Lagerung der Knollen bedingt. Zur Vermeidung von Infektionen, vorfrühtem Austreiben und Stärkeabbau werden die Knollen unter 10°C gelagert. Dies bedingt allerdings ein Phänomen, das man *cold sweetening* nennt (ap Rees et al., 1981) und bei Temperaturen unter 10°C in Kartoffelknollen beobachtet wird. Der Kältestress führt zur Bildung und Anhäufung reduzierender Zucker. Durch Stress erzeugte Reaktionen in Knollen sind daher für die verarbeitende Industrie ein Problem mit weitreichenden Folgen. Dies macht eine Untersuchung an Kartoffelknollen zu diesem Aspekt erforschenswert.

### 2.3 Wundreaktion in Kartoffelknollen

Durch ihre sessile Lebensform sind Pflanzen nicht in der Lage Umwelteinflüssen zu entkommen. Unter den vielen abiotischen Faktoren, wie z.B. Kälte, Hitze, Trockenheit und Salzstress, gehören auch mechanische Verletzungen, erzeugt z.B. durch Insektenfraß. Die Kartoffelknolle ist als unterirdisches Speicherorgan vor Verwundung durch das Erdreich weitgehend geschützt. Durch die maschinelle Ernte der Knollen ist dieses Gewebe jedoch verstärkt Verletzungen ausgesetzt.

Verwundung erzeugt eine schnelle und komplexe Antwort in Kartoffelknollen. Es handelt sich dabei um eine generelle Stimulation der Translationsaktivität (Davis et al., 1990), aber auch um die Induktion spezifischer Gene. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Verwundung mit bakterieller Infektion einhergehen kann, beinhaltet die Wundreaktion in Kartoffelknollen auch eine Reihe von Pathogen-abwehrenden Mechanismen. Beispielsweise werden die Gene des Phenylpropanmetabolismus, darunter das Schlüsselenzym zwischen primärem und sekundärem Stoffwechsel Phenylalaninammoniumlyase (PAL), wenige Stunden nach Verwundung induziert (Vayda und Schaeffer, 1988; Vayda et al., 1992). Zu den früh exprimierten Genen gehören auch die Gene der Enzyme des Sesquiterpenmetabolismus (Stermer und Bostock, 1987; Yang et al., 1991; Choi et al., 1992).

Generell zeigt die Wundreaktion in Kartoffelknollen einen biphasischen Verlauf (Morelli et al., 1994). Dies wurde durch die Expression des Elongationsfaktors 1a (EF1a) als Marker der Translation festgestellt. Das Transkript des EF1a akkumuliert innerhalb einer Zeitphase von 0-12 h und 12-24 h nach Verwundung. In dem späteren Zeitraum der biphasischen Induktion wurde die Ex-

pression von Genen beobachtet, welche für den Aufbau der Zellwand verantwortlich sind, aber auch von Histonen.

Verwundung in Kartoffelknollengewebe erzeugt nicht nur die Induktion der Expression wundspezifischer Gene. Patatin, ein Hauptspeicherprotein in Kartoffelknollen, wird degradiert, ebenso wie das Transkript des Proteinaseinhibitor II, welcher bei Verwundung in *Solanum tuberosum* Blättern exprimiert wird. Dies zeigt in der Pflanze einen deutlichen Unterschied zwischen Speichergewebe und photosynthetisch aktivem Gewebe. Zudem ist die Stressantwort in Knollengewebe nur lokal begrenzt und nicht, wie im vegetativen Bereich, systemisch. Dies bedingt, dass nur ein kleiner Bereich um die Wundfläche betroffen ist und das restliche Gewebe keine Beeinflussung erfährt.

Innerhalb der Wundreaktion in der Knolle wird auch Indolessigsäure (IES) gebildet, ein Phytohormon welches den Auxinen zugeordnet wird. IES steigt bis zu 24 Stunden nach Verwundung in der Konzentration an, wird aber ab diesem Zeitpunkt wieder degradiert (Fabbri et al., 2000). Der Anstieg der Indolessigsäure wird in Zusammenhang mit mitotischer Aktivität und Lipoperoxidation im verwundeten Knollengewebe gebracht. Auxine sind ebenso wie Cytokinine (Roitsch und Ehness, 2000) wichtige Regulatoren von Invertasen (Weil und Rausch, 1990). Zudem sind Invertasen stark vertreten in sich rasch teilendem Gewebe (Ricardo und ap Rees, 1970) und innerhalb von Stressreaktionen (Sturm und Chrispeels, 1990; Zhang et al., 1996; Truernit et al., 1996). Es ist daher davon auszugehen, dass die genannten Vorgänge wie Auxinakkumulation, Invertaseaktivität und Zellteilung zeitlich ineinander greifen.

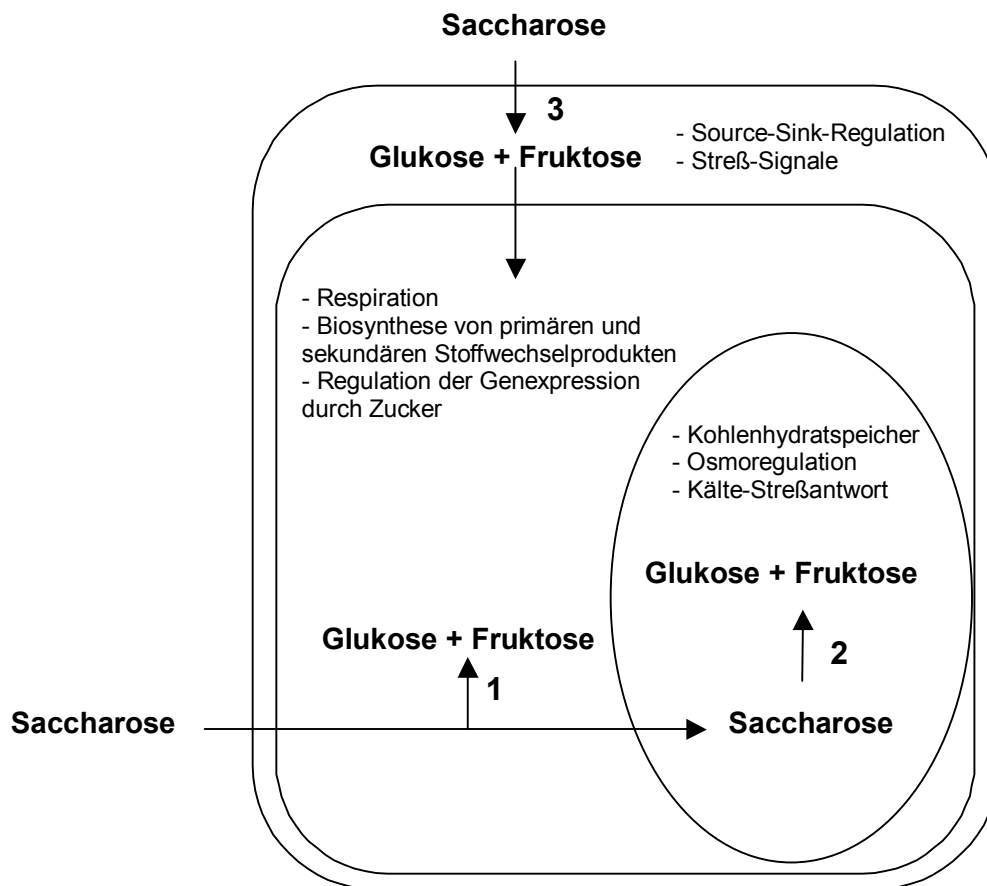
## 2.4 Enzyme des Saccharose-Metabolismus

Eine der häufigsten Kohlenhydrate und die Haupttransportform von Zuckern in höheren Pflanzen ist die Saccharose. Die Synthese des Disaccharids findet im Cytoplasma statt. Dabei wird das primär aus der Photosynthese hervorgehende Monosaccharid Fruktose-1,6-bisphosphat in Fruktose-6-Phosphat umgewandelt. Fruktosephosphat ist in Glukosephosphat umwandelbar, was einen weiteren Baustein der Saccharose zugänglich für die Verbindung mit einem energiereichen Nukleosidtriphosphat macht. Durch UTP und Glukose-1-Phosphat unter Katalyse einer Pyrophosphorylase entsteht UTP-Glukose, welche im Cytosol mit dem vorhandenen Fruktose-1-Phosphat durch Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) zu Saccharose-6-Phosphat synthetisiert wird. Diese kann durch Dephosphorylierung in die eigentliche Transportform umgewandelt werden.

Die bei der Photosynthese gebildete Haupttransportform von Zuckern wird hauptsächlich durch zwei Enzyme oder Enzymgruppen hydrolysiert. Dazu gehören die Saccharose-Synthase und die Invertasen. Saccharose-Synthase ist im Cytosol oder in gebundener Form an der Innenseite der Plasmamembran

lokalisiert. Sie katalysiert die Spaltung der Saccharose in UDP-Glukose und Fruktose. Das Enzym ist auch in der Lage, die reverse Reaktion zu katalysieren. Dies tritt *in vivo* jedoch selten auf. Invertasen existieren in mehreren Isoformen in unterschiedlichen Zellkompartimenten des gleichen Gewebes. Im Gegensatz zur Saccharose-Synthase ist die Saccharosehydrolyse der Invertasen in Glukose und Fruktose irreversibel.

### 2.4.1 Invertasen



**Abb.1:** (nach Sturm, 1999, verändert) Subzelluläre Anordnung und vermutliche Funktionen der unterschiedlichen Invertase-Isoformen (cytosolische (1), vakuoläre Isoform (2), Zellwand-Isoform (3) in den Kompartimenten der Zelle.

Die Expression der Invertasen erfolgt entwicklungsabhängig (Cheng et al., 1996; Koch et al., 1996; Miller und Chourey, 1992; Sturm et al., 1995; Weber et al., 1995). Invertasen existieren mit mehreren Isoformen in löslicher Form im Cytoplasma und der Vakuole, sowie gebunden an der Zellwand (siehe Abbildung 1).

Die Invertase-Isoformen unterscheiden sich bezüglich ihrer Glykosylierung. Die nicht-glykosylierte Form, charakterisiert durch ein alkalisches pH-

Optimum, ist aktiv im Cytosol. Eine erste Charakterisierung gelang durch die Sequenzierung einer neutral/alkalischen Invertase von *Lolium temulentum* (Gallagher und Pollock, 1998). Hochglykosylierte saure Invertasen mit einem pH-Optimum von etwa 4,5 befinden sich in löslicher Form in der Vakuole (VI) und gebunden in der Zellwand (ZWI).

Für die ZWI und die VI wurden verschiedene Isoformen kloniert (Sturm und Chrispeels, 1990; Elliott et al., 1993; Hedley et al., 1993; Lorenz et al., 1993; Ramloch-Lorenz et al., 1993; Sato et al., 1993; Unger et al., 1994; Roitsch et al., 1995; Greiner et al., 1995; Sturm et al., 1995; Tymowska-Lalanne et al., 1996; Zhang et al., 1996; Godt et al., 1997). Die Mehrzahl der Invertase-Enzyme hat ein Molekulargewicht von 55 bis 70 kDa. Die Analyse von gereinigtem Protein der Invertasen zeigten im SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen die Anwesenheit von Spaltprodukten.

An sauren Invertasen wurden Studien über die Regulation während der Entwicklung, gewebespezifischen Expression (Weber et al., 1995; Godt et al., 1997), Verwundungsreaktionen (Sturm und Chrispeels, 1990; Zhang et al., 1996; Truernit et al., 1996) und Pathogenabwehr (Herbers et al., 1996) durchgeführt. Invertasen erfüllen verschiedene Funktionen in Pflanzen, vor allem in Verbindung mit den verschiedenen Rollen, die Saccharose als Speicherstoff, Osmotikum und Signalmolekül im Stoffwechsel spielt. Nicht nur die Katalyse der Spaltung von Saccharose in die Hexosen, als Respirationssubstrat und Energiequelle für zahlreiche Stoffwechselwege, sondern auch die Funktion der Invertasen im Phloemtransport zeigen deren wichtige Rolle. Invertasen generieren den benötigten Saccharosegradienten zwischen Phloembe- und entladungsort (Escherich, 1980).

Die Substanzverlagerung in höheren Pflanzen gliedert sich in zwei Transportvorgänge: den Transpirationsstrom (Xylemtransport) und den Assimilatstrom (Phloemtransport). Der energiebedürftige Assimilatstrom wird durch die Druckstromtheorie (Münch, 1930) erklärt. Am Produktionsort der Assimilate (*Source*) werden die Siebröhren aktiv mit Saccharose beladen. Die dadurch bedingte hohe osmotische Konzentration führt zu einer verstärkten Wasseraufnahme und zu einem hohen Druckpotential. An den Entnahmeorten (*Sink*) führt das Entladen der Saccharose aus den Siebröhren zu einer Erniedrigung des osmotischen Potentials und des Druckpotentials. Der Druckausgleich zwischen Be- und Entladungsort erfolgt durch eine Massenströmung entlang dem Druckpotentialgradienten. Der Ferntransport von Assimilaten in den Siebröhren sowie der Kurzstreckentransport folgt daher dem Konzentrationsgradienten von *Source* nach *Sink*.

Die Hydrolyse der Saccharose in Glukose und Fruktose erhöht den osmotischen Druck der Zellen, was auf eine Funktion bei der Zellstreckung und dem Wachstum der Pflanze hinweist. Eine Studie über Zellstreckung an sich entwickelnden Sonnenblumenkeimlingen zeigte eine enge Korrelation zwischen der Elongationsrate und der Aktivität der löslichen Invertase (Pfeiffer und Kut-

schera, 1995). Daher werden hohe Invertaseaktivitäten verstärkt in sich rasch teilendem Gewebe, wie z.B. junge Karottenwurzeln (Ricardo und ap Rees, 1970) und wachsende Bohneninternodien (Morris und Athur, 1985) gefunden. Dabei spielt das Vorhandensein von Sauerstoff eine entscheidende Rolle. Unter hypoxischen Bedingungen wurde in wachsenden Wurzeln von Kartoffelpflanzen eine Inhibition der Invertasen beobachtet. Die Akkumulation von Hexosen, die dabei auftrat, war auf die erhöhte Expression der Saccharose-Synthase zurückzuführen (Biemelt et al., 1999). Dies weist auch aufgrund der Saccharosekonkurrenz, auf den gegenseitigen Einfluss von Invertasen und Saccharose-Synthase hin.

Zudem spielen Invertasen eine wichtige Rolle in der Speicherstoffbelastung von Früchten und Samen, den sogenannten *Sink*-Geweben. Sie zeichnen sich durch eine negative Assimilatbilanz aus (im Gegensatz zu *Source*-Gewebe, welche sich durch eine positive Assimilatbilanz auszeichnen) und bilden somit starke Attraktionszentren für diese Substanzen. Als *Sink*-Gewebe gelten auch Speicherorgane, wie z.B. Kartoffelknollen, welche durch Mobilisierung von Speicherstoffen wieder zu *Source*-Organen umgewandelt werden. Es handelt sich dabei um ein reversibles *Sink*.

An *Lycopersicon chmieleweskii*, einer Saccharose-speichernden Tomatensorte, wurde eine stark reduzierte Invertaseaktivität bei Beginn der Fruchtreifung festgestellt, während in den Hexose-speichernden Früchten von *Lycopersicon esculentum* eine hohe Invertaseaktivität gemessen wurde (Klann et al., 1993). Die antisense-Expression der Invertase in den Tomatenpflanzen führte zu einer Reduktion der Invertaseaktivität und einer Umwandlung von Hexose-speichernden zu Saccharose-speichernden Früchten (Klann et al., 1996; Ohyaama et al., 1995).

Auch im Verlauf von Stressreaktionen spielen Invertasen eine entscheidende Rolle. So steigt die Invertaseaktivität in Süßkartoffeln nach Verwundung stark an (Matsuhita und Uritani, 1974) und in Karotten-Speicherwurzeln wird eine veränderte Genexpression der Zellwandinvertase nach Verwundung detektiert (Sturm und Chrispeels, 1990). Die Maxima liegen dabei bezüglich der Invertaseaktivität in Süßkartoffel bei 18 h, die Erhöhung der mRNA in Karotte bei 12 h nach Verwundung. Die Reaktion auf die Verwundung war dabei nur lokal begrenzt und nicht systemisch. Dies ist vor allem in unterirdischem Speicherewebe wie Rüben und Knollen der Fall.

Ebenso ist ein Zusammenhang zwischen Infektionen und der Erhöhung von sauren Invertasen festzustellen. So zeigen Karotten-Speicherwurzeln nach Infektion mit *Erwinia carotovora*, dem Erreger der Weichfäule bei Kartoffelknollen, eine sehr schnelle Erhöhung des Transkripts der Invertasen (Sturm und Chrispeels, 1990).



### 2.4.2 Regulation der Invertasen

Saure Invertasen werden nicht nur über ihre Transkripte reguliert, sondern zudem über Phytohormone, hauptsächlich Cytokinine und Auxine, und über ihre Produkte, wobei Glukose als nicht kompetitiver und Fruktose als kompetitiver Inhibitor fungiert (Sturm, 1999).

Auf posttranslatonaler Ebene existiert eine Regulation durch Invertaseinhibitoren. Invertaseinhibitoren sind kleine Proteine unter 20 kDa, welche unter Komplexbildung mit den Invertasen deren Aktivität inhibieren können. Die Existenz von Invertaseinhibitoren wurde erstmals 1961 postuliert (Schwimmer et al., 1961). Invertaseinhibitoren wurden aus Tomate, Kartoffel und Tabak isoliert und bis zur Homogenität gereinigt (Bracho und Whitaker, 1990; Weil et al., 1994; Pressey, 1994). Die Inhibitoren besitzen vier konservierte Cysteinreste und einen C-Terminus, welcher vermutlich für die spezifische Wechselwirkung mit der Invertase-Isoform verantwortlich ist. Die Cysteinreste, die möglicherweise zwei Disulfidbrücken bilden, könnten eine maßgebliche Rolle für die Aktivität des Inhibitors spielen. Zwischen Invertase und Inhibitor werden keine Disulfidbrücken gebildet. Die Konformation des Inhibitors könnte jedoch indirekt für die Bindung zwischen den beiden Proteinen von Bedeutung sein (Greiner, persönliche Mitteilung).

Aus Tabakzellsuspensionskulturen wurde der apoplastische Invertaseinhibitor (**Nt-CIF**: *Nicotiana tabacum*- Cellwall Inhibitor of  $\beta$ -Fructosidase; ehemalige Bezeichnung **Nt-inh1** (Greiner, 1999)) bis zur Homogenität gereinigt (Weil et al.; 1994, Krausgrill et al., 1996). Er ist charakterisiert durch ein Molekulargewicht von 17 kDa und inhibiert die ZWI aus Tabakzellsuspensionskulturen innerhalb eines pH-Bereichs von 4,5-6,5 (pH-Optimum der ZWI-Aktivität; Weil et al., 1994). Die Inhibitionsaktivität des apoplastischen Invertaseinhibitor bezieht sich nicht nur auf die homologe Invertase. Auch nicht apoplastische Tabakinvertasen, wie z.B. die vakuoläre Invertase, werden *in vitro* durch den apoplastischen Inhibitor gehemmt (Sander et al, 1996). Weitere Studien an Tabakzellsuspensionskulturen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten zeigten, dass Nt-CIF und ZWI während der gesamten Kulturperiode koexprimiert werden, bzw. als Komplex vorliegen. Die Komplexbildung zwischen Invertase und Inhibitor führt jedoch nicht zwingend zur Hemmung der Invertaseaktivität (Krausgrill et al., 1996).

Voraussetzung für die Untersuchung der *in vivo* Funktion des Inhibitors war die Klonierung des Inhibitors und die Produktion transgener Pflanzen. Dazu wurde aus Tabakzellsuspensionskulturen aufgereinigtes Inhibitorprotein (Nt-CIF, ehemals Nt-inh1) sequenziert und anschließend mittels PCR-Klonierung aus Gesamt-RNA isoliert. Die Isolation des *Nt-VIF* gelang nach Durchmusterung der cDNA-Bibliothek (aus Tabakzellsuspensionskulturen) unter verringerter Stringenz (60% Homologie) auf der Suche nach vorhandenen Isoformen des *Nt-CIF* (Greiner, 1999). Die cDNA des *Nt-CIF* wurde in Tabakpflanzen in *sense*-

und *antisense*-Orientierung transformiert (Greiner und Sonnewald, unveröffentlicht).

Anhand dieser Transformanten sollte die physiologische Bedeutung des Nt-CIF während der pflanzlichen Entwicklung und bei der Samenbildung untersucht werden. Wie sich herausstellte hat Nt-CIF eine wichtige Funktion für die Regulation der ZWI vor allem während der Samenentwicklung. Die Beladung der Samen mit Speicherstoffen erfolgt hauptsächlich auf apoplastischem Weg, da kein Leitgewebe vom maternalen Gewebe in das Samengewebe führt. Studien zu diesem Vorgang wurden vor allem von Weber et al. (1995; 1996<sup>1</sup>; 1996<sup>2</sup>) durchgeführt. Die Autoren zeigten an *Vicia faba* die Kontrolle von Assimilatentladung und Speicherfunktion durch eine samenspezifische ZWI. Bei der apoplastischen Entladung wird die Saccharose durch ZWI hydrolysiert. Eigene Versuche an Wildtyp-Tabakpflanzen zeigten eine deutliche Expressionssteigerung der ZWI innerhalb dieser Phase. Eine Inhibition zu diesem Zeitpunkt durch überexprimierten Inhibitor in transgenen Tabakpflanzen erwies sich für die Samenentwicklung als besonders kritisch. Samen transgener Tabakpflanzen, die den apoplastischen Inhibitor überexprimieren, zeigen ein deutlich reduziertes Samengewicht (Greiner, 1999).

Dieser Aspekt zeigt sich auch in einer deutlichen Verzögerung des Keimungszeitpunktes (Pfister, 1998). Dieser Befund korreliert mit den Untersuchungen an Mais Miniatur-Mutanten, die ein Defizit samenspezifischer ZWI aufweisen (Miller und Chourey, 1992; Cheng et al., 1996). Es zeigt sich, dass eine verringerte ZWI-Aktivität im Zeitraum der Samenbeladung zu einem verringerten Samengewicht führt. Einschneidende Veränderungen wurden auch während der vegetativen Entwicklungsphase in den transgenen Tabakpflanzen beobachtet. Die Überexpression bzw. Repression des Nt-CIF zeigt deutliche Einwirkungen auf den Metabolismus. Transgene Tabakpflanzen, die den apoplastischen Inhibitor reprimieren (*antisense*-Transformanten) weisen eine Verschiebung des Glukose-/Fruktoseverhältnis vor allem im Source-Gewebe auf. Während im Wildtyp ein Glukose-/Fruktoseverhältnis von 0,6 vorliegt, befindet es sich in den *antisense*-Transformanten bei 0,8 bis 1. Dieser Befund zeigte sich bei mehreren unabhängigen Transformanten dieser Linie (Pfister, 1998).

Derartige Störungen des Zuckerhaushaltes wurden schon zu früherem Zeitpunkt an transgenen Pflanzen beobachtet, welche eine Hefe-Invertase in der Zellwand exprimieren (Heinecke et al., 1992; von Schaewen et al., 1990; Dickinson et al., 1990). Phänotypisch konnte bei diesen Transformanten ein reduziertes Wachstum und die Bildung von Nekrosen an den Blättern beobachtet werden. Transgene Tabakpflanzen, die apoplastischen Inhibitor in *sense*- und *antisense*-Orientierung exprimieren, zeigen bezüglich Wachstum und nekrotischer Ausbildungen keine Abweichungen zum Wildtyp (Pfister, 1998).

## 2.5 Transformation von Kartoffelpflanzen mit Invertaseinhibitor-cDNAs: Expression des Nt-VIF und Nt-CIF-Proteins in Kartoffelknollen

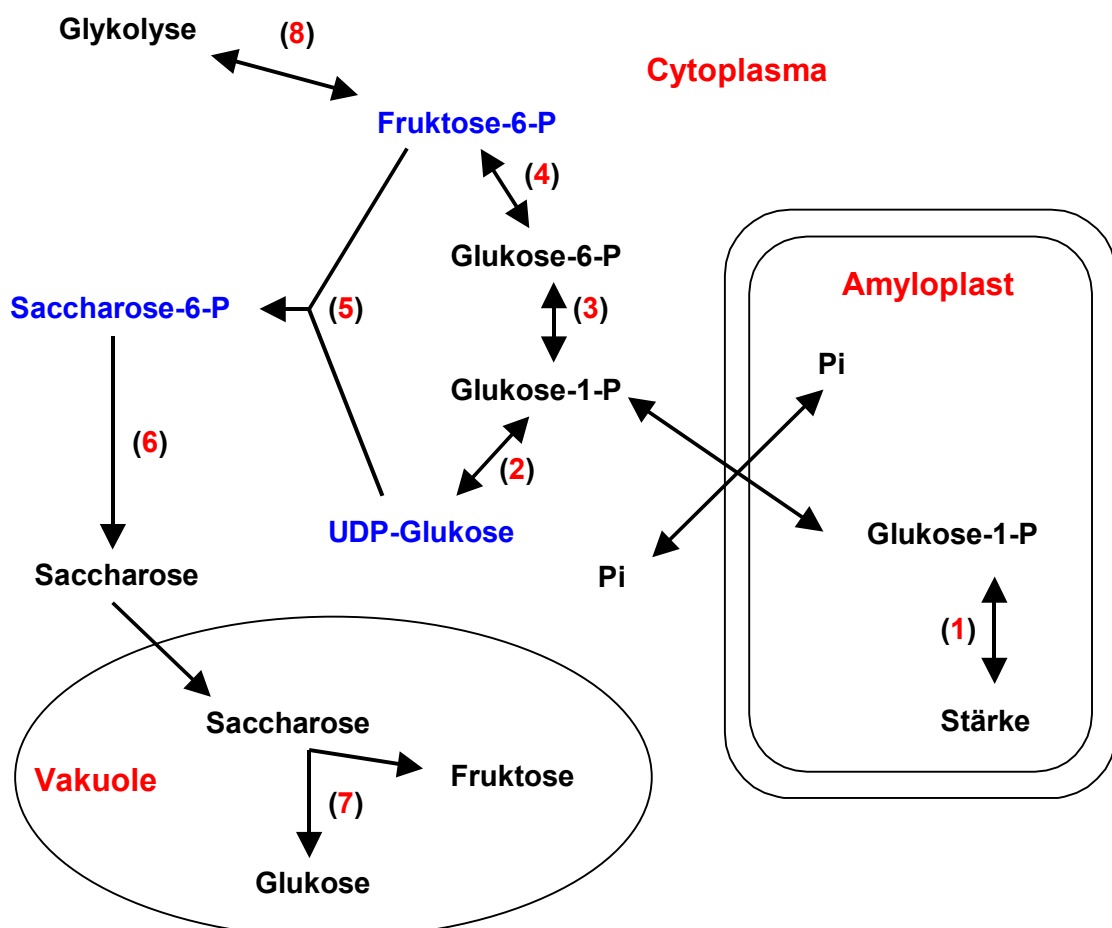
An Kartoffelpflanzen wurde die Transformation mit dem apoplastischen Tabakinhibitor (Nt-CIF) sowie dem Inhibitor der vakuolären Invertase aus Tabak, Nt-VIF in sense-Orientierung durchgeführt (Greiner, 1999). Das Nt-VIF-Protein hat ein Molekulargewicht von 17 kDa, besitzt vier konservierte Cysteinreste und weist eine Homologie zu Nt-CIF von 46% auf (Greiner et al., 1999). Die Transformanten der *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Linien zeigen unter normalen Anzuchtbedingungen keinen veränderten anatomischen, bzw. morphologischen Phänotyp. Die Inhibition der Invertasen im vegetativen Bereich der Pflanze übt keinen negativen Einfluss auf Wachstum und Knolleninduktion aus. Auch die Einlagerung von Speicherstoffen in die Knolle ist nicht beeinflusst.

Die Einbringung des Nt-VIF- und Nt-CIF-Proteins in die Kartoffelpflanzen wurde mit dem Zweck verfolgt, das verantwortliche Enzym zu identifizieren, welches die Hexosenbildung bei Kältelagerung in Kartoffelknollen vorantreibt. Eine vakuoläre Invertase in Kartoffelknollen wurde bereits von Zrenner et al. (1996) als verantwortliches Enzym in Betracht gezogen. Die Akkumulation von Zuckern in Kartoffeln ist ein bekanntes Stressphänomen bei Temperaturen unter 10°C. Es resultiert in einer Anhäufung von Abbauprodukten der Polysaccharide in der Knolle (ap Rees et al., 1981). Die schon nach wenigen Tagen in der Kälte entstehenden reduzierenden Zucker verhindern einen Anstieg der Respiration und das Keimen der Kartoffelknolle (Coffin et al.; 1987, Barichello et al., 1991). In industrieller Hinsicht ist dieses Phänomen eher unerwünscht, da die Zucker mit freien Aminosäuren interagieren und die Qualität der Knollen dadurch mindern (Burton, 1989). Die einerseits durch die reduzierenden Zucker verursachte Beeinträchtigung der Geschmacksqualität, aber auch das schnellere Verbräunen der Kartoffeln bei hohen Temperaturen (Fritieren) sind Probleme, die bei der Weiterverarbeitung der Kartoffel auftreten.

Die Hemmung der vakuolären Invertase (VI) durch überexprimierten Nt-VIF bewirkte eine deutliche Reduktion der Hexosebildung in den transgenen Knollen (Greiner et al., 1999). Dies bedingt, dass die VI eine maßgebliche Rolle für die Bildung von Hexosen bei Kälteeinfluss spielt. Dabei bleibt zu erwähnen, dass die Inhibition der vakuolären Invertase durch Nt-VIF effektiver ist als die Repression der verantwortlichen Invertase auf Transkriptebeine. Die *antisense*-Expression einer vakuolären Invertase aus Kartoffel brachte nicht den gewünschten Effekt der ausbleibenden Hexoseakkumulation (Zrenner et al., 1996). Transformantenlinien mit einer Restaktivität der vakuolären Invertase von 10% zeigten immer noch eine Akkumulation der Hexosen, die allerdings um 37% reduziert war. Es ist also davon auszugehen, dass geringe Aktivitäten der

vakuolären Invertase ausreichen, um die Hexosebildung zu fördern, oder dass nicht reprimierte Isoformen der Invertase deren Funktion übernehmen.

Die transgenen Kartoffelpflanzen (Nt-CIF und Nt-VIF) bilden eine interessante Grundlage zur Erforschung der Funktion der Invertasen bei Verwundung. Verwundung ist wie Kälte ein Auslöser für Stress, der zur Induktion verschiedener mRNA-Spezies und Proteine führt. Ein Teil der Stressantwort beinhaltet die Mobilisierung von Speicherstoffen, oder prinzipiell die Gewinnung von Energie. Zellwandinvertasen werden häufig bei Stress exprimiert (Sturm und Chrispeels, 1990; Zhang et al., 1996; Truernit et al., 1996) und auch vakuoläre Invertasen spielen aufgrund der Funktion der Vakuole als Speicherorgan für Saccharose innerhalb der Stressantwort eine Rolle (Rosenkranz et al., 2001). Nach Abtrennung von der Mutterpflanze dient innerhalb der Kartoffel die Stärke als Hauptspeichermolekül und Energielieferant. Die Mobilisierung der Stärke ist also einer der hauptsächlichen Vorgänge, welche beim Keimen der Knolle oder nach Verwundung lokal auftreten (Abb.2).



**Abb.2:** Der Weg der Stärke zu den reduzierenden Zuckern in Kartoffelknollen (nach Sowokinos, 1994, verändert). Die einzelnen Enzyme sind: Stärke-Phosphorylase (1.), UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (2.), Phosphoglukomutase (3.), Hexosephosphat-Isomerase (4.), Saccharose-6-Phosphat-Synthase (5.), Saccharose-6-Phosphat-Phosphatase (6.), vakuoläre Invertase (7.), Phosphofruktokinase (8.).

### 3 Ergebnisse

Das zentrale Thema dieser Arbeit bildete die Fragestellung über die *in vivo*-Funktion von wundinduzierter ZWI- und VI-Aktivität in Kartoffelknollen. Die Fragestellung wurde an Kartoffeltransformanten, welche die ektopische Expression von apoplastischem Invertaseinhibitor Nt-CIF oder dem vakuolären Invertaseinhibitor Nt-VIF aufweisen, untersucht. Die konstitutive Inhibitorexpression induziert die posttranslationalen Unterdrückung der Invertaseaktivitäten.

Die Analyse der ZWI- und VI-Transkripte und der ZWI- und VI-Proteine wurde mit dem Ziel verfolgt, den Einfluss des Transgens auf Translation und Proteinsynthese der Invertasen zu untersuchen. In Folge dessen wurde zudem der Einfluss auf weitere Transkripte, wie z.B. der PAL, SPS und SuSy, erörtert.

Die Untersuchung der Enzymaktivitäten der Invertasen sowie der Zuckerkonzentrationen (Saccharose, Glukose und Fruktose) wurde primär an der nicht transformierten Wildform anhand von zwei Experimente dargestellt. Es zeigt die Schwankungen innerhalb der Akkumulation von Zuckern und der unterschiedliche zeitliche Anstieg der Invertaseaktivitäten, die den verschiedenen Anzuchten zugrunde liegen. Im Anschluss wurde die Analyse der wundbedingten Invertaseaktivität und der Zuckerakkumulation in den Transformanten vergleichend zum Wildtyp durchgeführt.

Die Ermittlung der Stärkekonzentration im Verlauf der Wundreaktion, sowie die Untersuchung der wundinduzierten Respiration im Vergleich zwischen Wildtyp und Transformanten, stellten weitere wichtige Punkte innerhalb der Arbeit dar. Zudem wurde die Beeinflussung von inhibierter Invertaseaktivität auf in den Kohlenhydratmetabolismus involvierte Enzyme (SuSy, SPS, Glukose-6-P-DH) untersucht.

Zur Erläuterung der Funktion von Zuckermolekülen als Signalgeber im Wundprozess wurde die Bildung des Wundperiderms und die Einlagerung von Wachsen in Zellwände noch intakter Zellen unterhalb der Wundoberfläche in Wildtyp und Transformanten untersucht. Da Verwundung mit der potentiellen Gefahr eindringender Pathogene und daher mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einhergeht, wurde die Konzentration des Glutathion nach Verwundung in Wildtyp und Transformanten bestimmt. Glutathion ist ein wichtiges Antioxidans und der Grundbaustein für Produkte, die der Zellentgiftung dienen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Untersuchung von Tumorinduktion und Tumorstadium, induziert durch *Agrobacterium tumefaciens* an Kartoffelknollengewebe. Dieser abseits der vorherigen Experimente stehende Versuchsansatz begründet sich durch die Funktion der ZWI in der Tumorinduktion, bzw. der Etablierung von Tumorgewebe. Da diesem Enzym eine wichtige Rolle in diesem Prozess zugeschrieben wird, bieten die *Nt-CIF*-Transformanten durch die Regulation des überexprimierten apoplastischen Inhibitors eine interessante Grundlage zur Erforschung dieses Prozesses.

### **3.1 Verwundung von Kartoffelknollengewebe des Wildtyps: Expressionsanalyse von Zellwandinvertase (ZWI), vakuolärer Invertase (VI) und der korrespondierenden Substrate/Produkte**

#### ***3.1.1 Expressionmuster von ZWI- und VI-Transkripten und Darstellung der Proteinexpression von ZWI und VI im Verlauf der Verwundung***

Wie in Abbildung 1 (mRNA) ersichtlich, findet die Expression der Zellwandinvertase auf Transkriptebene in einem engen Zeitfenster statt. Das Transkript wird nur in einem Zeitraum von 8-24 h nach Verwundung detektiert und verschwindet danach wieder. Die mRNA der vakuolären Invertase wird ebenfalls nach 8 h sichtbar. Das Transkript ist allerdings bis 72 h nach Verwundung noch nachweisbar. Zur Kontrolle des Verlaufs der Wundreaktion wurde das Transkript des Enzyms Phenylalaninammoniumlyase (PAL) detektiert, welches wenige Stunden nach Verwundung exprimiert wird (Butler et al., 1990). Das Signal der mRNA der PAL ist innerhalb des erfassten Zeitrahmens bis 72 Stunden nach Verwundung konstant.

Die Proteinexpression der Zellwandinvertase zeigt ein anderes Muster (Abb. 1, Protein) im Vergleich zu deren Transkript. Die Induktion der Enzymexpression findet parallel mit dem Auftauchen des Transkripts 8 h nach Verwundung statt. Das Protein wird jedoch noch bis 72 h nach Verwundung detektiert. Dies spricht für eine hohe Stabilität des Proteins, was eine dauerhafte Erhöhung der Transkriptmenge nicht erfordert. Die Proteinexpression der vakuolären Invertase ist vergleichbar mit dem Expressionsmuster ihres Transkripts.

#### ***3.1.2 Erhöhung der Zellwandinvertaseaktivität und der vakuolären Invertase-Aktivität 16 Stunden nach Verwundung im Wildtyp***

Innerhalb des Verwundungsexperimentes wurden unterschiedliche Saaten von Kartoffelpflanzen für die Versuche herangezogen. Die Analyse der Invertaseaktivitäten und der korrespondierenden Substrate (Glukose, Fruktose, Saccharose) hat gezeigt, dass Schwankungen in Aktivitätshöhe, zeitlicher Aktivitätsanstieg und Konzentration der Zucker vorhanden sind. Dies begründet sich vermutlich in der Reife der verwendeten Knollen. Die Vermehrung der Kartoffelpflanzen über Stecklingskulturen und die gleichzeitige Ernte aller Pflanzen erzielte kein einheitliches Knollenmaterial. Die Verwendung der Knollen erfolgte nach Abtrocknen der Stolone, wonach sich die Knollen in dormantem Zustand befinden. Aufgrund der Schwankungen innerhalb der Versuchsreihen wurden innerhalb der Arbeit mehrere Experimente durchgeführt. Es sind zwei Versuche exemplarisch dargestellt, welche diesen Aspekt veranschaulichen (Abb.1: A und B, Experiment I und II).

Die Aktivität der Invertasen wird wie erwartet nach Verwundung im Wildtyp induziert (Abb.1 A: Exp.I und II). Es ist zu beobachten, dass die Zellwandin-

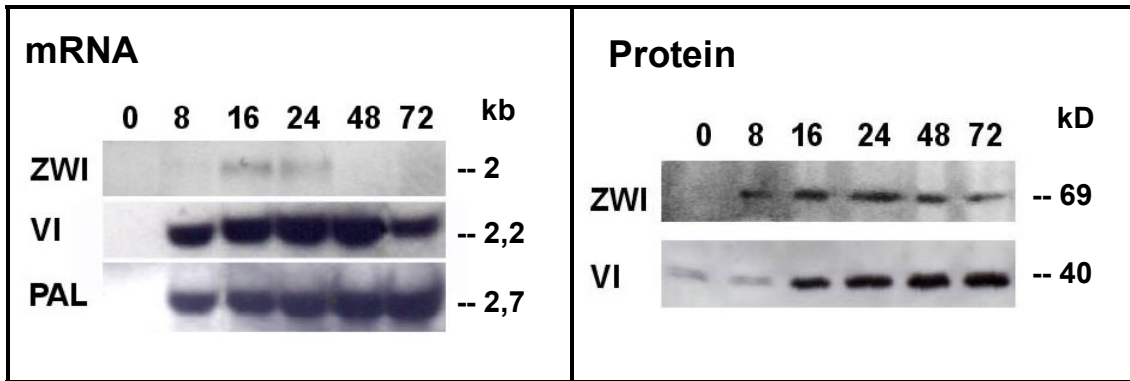
vertase und vakuoläre Invertase nach etwa 16 h in der Aktivität erhöht sind. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Verwundung in den gezeigten Experimenten übersteigt die Aktivität der VI die der ZWI.

### **3.1.3 Anstieg der Hexosekonzentration (Fruktose und Glukose) und Abnahme der Saccharosekonzentration nach Verwundung im Wildtyp**

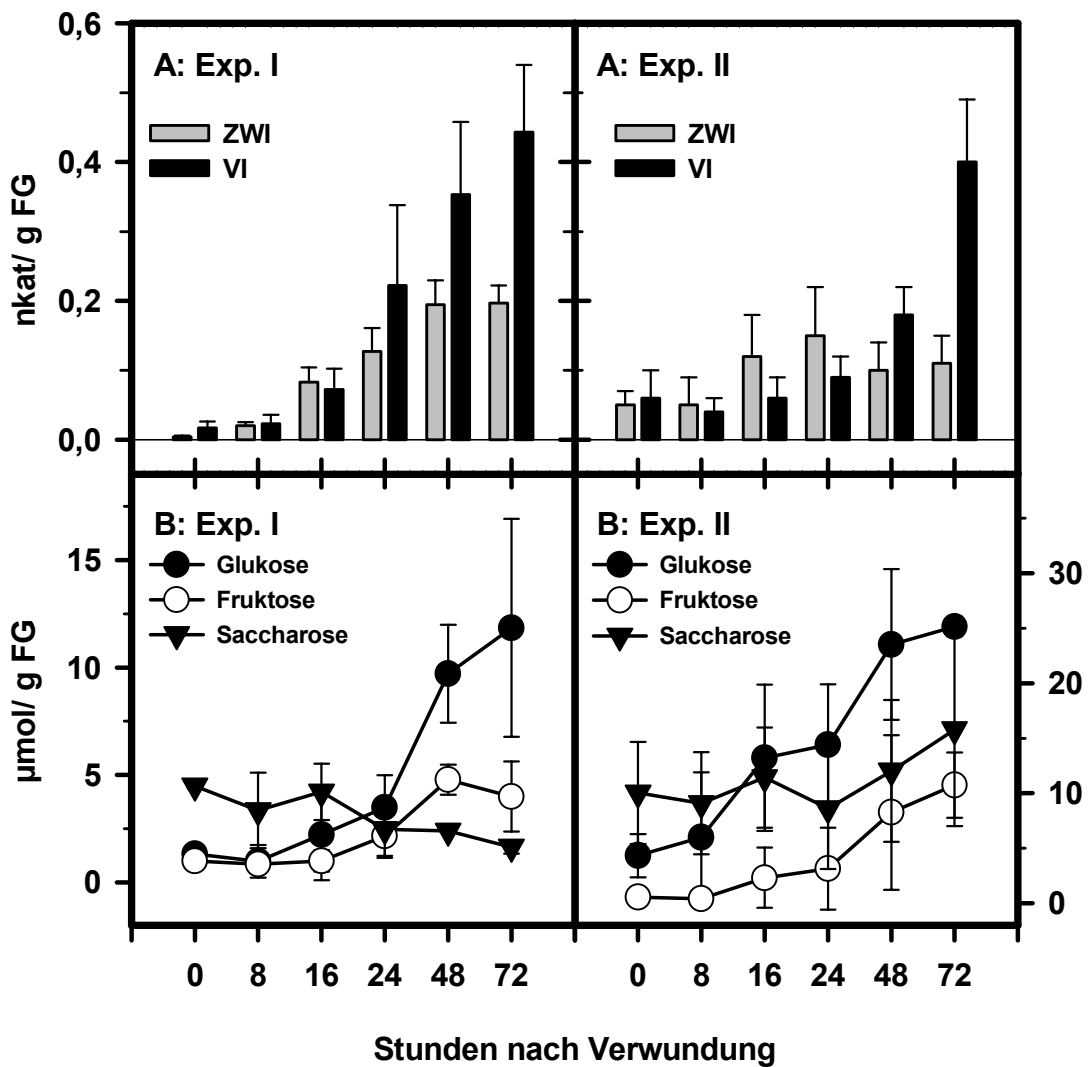
Der Gehalt der Saccharose als Substrat der Invertasen zeigt nach Verwundung eine Abnahme um 50% (Abb.1 B: Exp.I). Damit verbunden ist eine Zunahme der Hexosen Glukose und Fruktose um Faktor 12, wobei die Konzentration der Glukose die der Fruktose um ein 3-faches übersteigt. Dies begründet sich vermutlich darin, dass Fruktose schneller metabolisiert wird. Im zweiten Experiment ist die Konzentration der Saccharose innerhalb des zeitlich festgelegten Rahmens nach Verwundung gleichbleibend. Die Konzentration der Hexosen nimmt zu, allerdings nur um Faktor 4 im Vergleich zu Experiment I. Auch hier ist die Tatsache zu beobachten, dass der Gehalt an Glukose fast 3 mal so hoch wie der Fruktose ist. Zudem sind die tatsächlichen Konzentrationen der Zucker in Experiment II höher im Vergleich zu Experiment I.

---

**Abb.1 (Seite 24): mRNA:** Northern Blot-Analyse von ZWI, VI und PAL nach Verwundung. Aufgetragen sind jeweils 15 µg Gesamt-RNA/ Spur. **Protein:** Western Blot-Analyse der ZWI und VI. Zur Detektion der VI wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. 20 mg Frischgewichtäquivalent wurden zur Ermittlung der ZWI pro Spur geladen. **A: Exp.I/ Exp.II:** Darstellung der ZWI-Aktivität und VI-Aktivität in verwundetem Knollengewebe. **Exp.I Versuch 1:** Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (StabW) von 5 unabhängigen Proben (Kartoffelknollen). **Exp.II Versuch 2:** Fehlerbalken zeigen die StabW von 3 unabhängigen Proben (Kartoffelknollen). **B: Exp.I/ Exp.II** Auswirkungen der Verwundung auf die Hexosen und Saccharose in Kartoffelknollen vom Wildtyp. **Exp.I Versuch 1:** Die Mittelwerte (MW) sowie die StabW sind aus 5 unabhängigen Proben (Kartoffelknollen) zusammengesetzt. **Exp.II Versuch 2:** Die MW sowie die StabW sind aus 3 unabhängigen Proben (Kartoffelknollen) zusammengesetzt.



**Invertaseaktivitäten und Zuckerkonzentrationen**





## **3.2 Auswirkung der ektopischen Expression von Nt-CIF und Nt-VIF auf die Wundreaktion**

### **3.2.1 Unverändertes Expressionsmuster der ZWI und VI auf Transkript- und Proteinebene in Nt-VIF- und Nt-CIF-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp**

Eine erste Analyse der *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Kartoffeltransformanten im Vergleich zum Wildtyp bezog sich auf die Auswirkung der ektopischen Inhibitorexpression auf die Invertaseaktivität. Die posttranslationale Kontrolle der Invertasen durch die Inhibitorproteine wurde durch die Analyse des Expressionsmusters der Invertasen im Verlauf der Verwundung in den Transformanten im Vergleich zum Wildtyp bestätigt. Es zeigen sich keinerlei Unterschiede in den Expressionsmustern der Invertase mRNA zwischen Wildtyp und Transformanten (Abb.2/3 mRNA). Es steht daher fest, dass die heterologe Überexpression von *Nt-CIF* und *Nt-VIF* in den Kartoffelpflanzen keine Auswirkung auf die Expression der Transkripte der ZWI, VI und PAL (letzteres nicht gezeigt) nach Verwundung in den Knollen hat.

Auch auf Proteinebene kann der Schluss gezogen werden, dass die Transformation keine Veränderung der Invertaseproteinexpression erzeugte (Abb.2/3 Protein).

### **3.2.2 Posttranslationale Regulation der Aktivität von Zellwandinvertase und vakuolärer Invertase in den Transformanten durch die Inhibitorproteine**

Die Beweisführung zur Bestätigung einer posttranslationalen Regulation/Inhibition der Invertasen wurde durch die Ermittlung der Enzymaktivitäten durchgeführt. In Abbildung 3 (ZWI) zeigt sich, dass die heterologe Überexpression des *Nt-CIF*-Proteins in Kartoffelpflanzen eine starke Inhibition der Aktivität der ZWI im Verlauf der Verwundung zeigt.

Transformanten der *Nt-VIF*-Linien zeigen dieses Phänomen nicht (Abb.2: ZWI). Es ist daher davon auszugehen, dass das *Nt-VIF*-Protein keine Auswirkung auf die Aktivität der ZWI hat. In den *Nt-VIF*-Transformanten bleibt die Erhöhung der vakuolären Invertaseaktivität aus (Abb.2: VI), bzw. sie stagniert auf einem niedrigen Niveau bis 72 Stunden nach Verwundung.

In *Nt-CIF*-Transformanten ist die Aktivität der VI (Abb.3: VI) im Vergleich zum Wildtyp im Verlauf der Verwundung leicht erniedrigt. Dies könnte durch Verunreinigung mit Inhibitorprotein bei der Proteinextraktion verursacht sein. Bisher lässt sich noch nicht ausschließen, dass bei der Trennung von Zellwand- und löslichen Proteinen überexprimierter Inhibitor in die jeweiligen Fraktionen gelangt und die nicht zugehörige Invertase hemmt. In den Transformanten wird

die jeweilige Invertaseaktivität unterdrückt, was auch einen Einfluss auf Invertasen in anderen Kompartimenten hat.

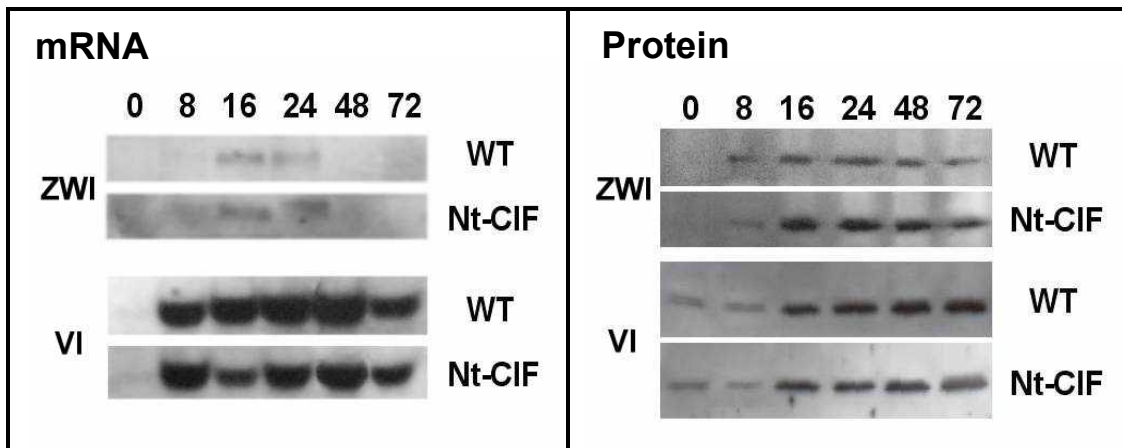
Aus früheren Studien mit apoplastischem Inhibitorprotein (Nt-CIF) ist bekannt, dass der Inhibitor nicht nur die ZWI, sondern auch die VI (Tomate) hemmt (Sander et al, 1996).

### **3.2.3 Ausbleiben der Hexosebildung und Anstieg der Saccharosekonzentration in Nt-VIF-Transformanten nach Verwundung/ Keine Veränderung in der Hexoseakkumulation und dem Saccharoseabbau in den Nt-CIF-Transformanten nach Verwundung im Vergleich zum Wildtyp**

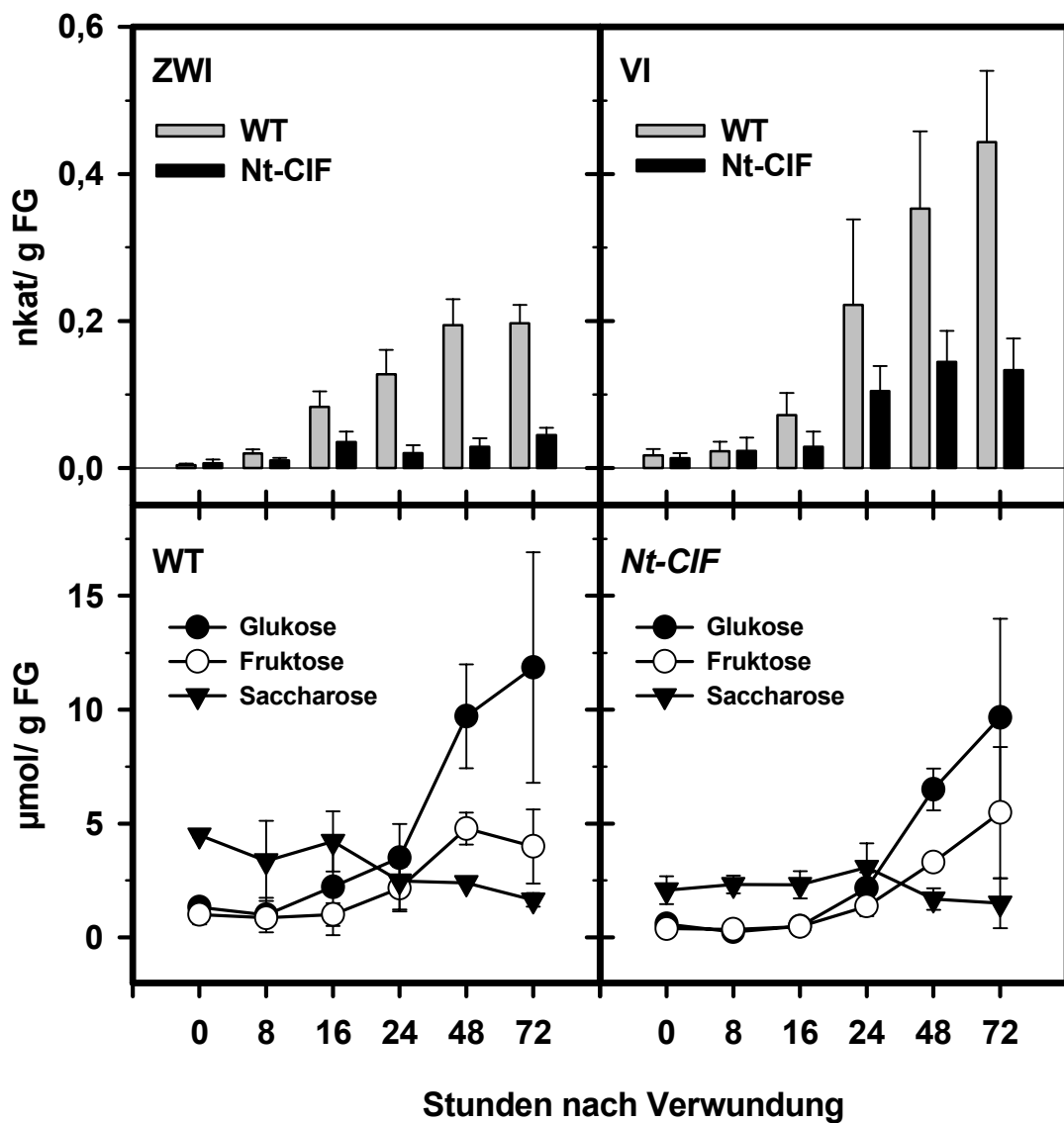
Die Anwendung von Verwundungsstress lässt in den Transformanten der *Nt-VIF*-Linien zwei Ergebnisse hinsichtlich der korrespondierenden Substrate der Invertasen beobachten. Erstens wird die Formation stressbedingter Hexosen unterbunden und zweitens ist eine Konzentrationserhöhung der Saccharose vergleichend zum Wildtyp zu verzeichnen (Abb.2: Nt-VIF im Vergleich zu Abb.2: WT). Dies lässt sich besonders gut veranschaulichen durch das Verhältnis der Hexosekonzentration zur Saccharosekonzentration (Abb.4).

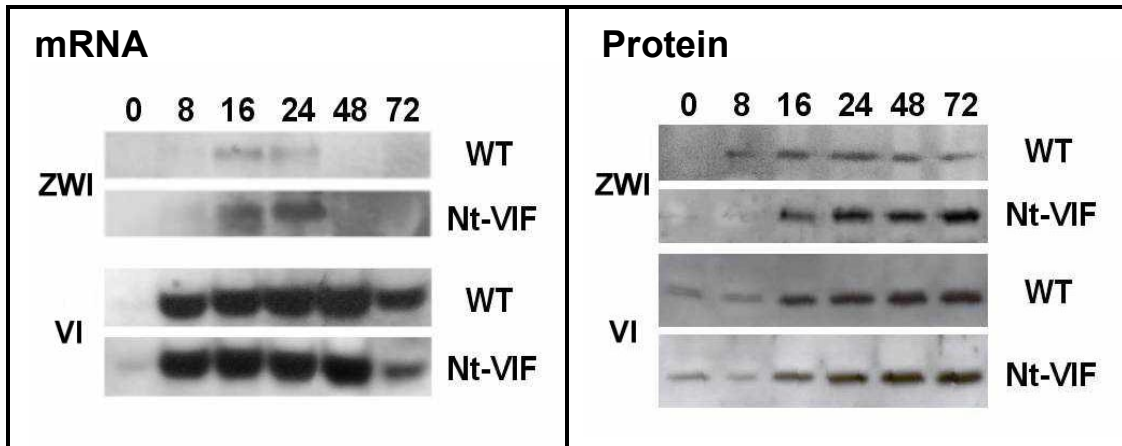
Dieses Ergebnis bestätigt, dass der Hauptteil der messbaren Hexosekonzentration in der Vakuole durch die dort lokalisierte Invertase gebildet wird. Zudem zeigt der Anstieg der Saccharosekonzentration, dass die Zulieferung des Zuckers in die Vakuole durch Saccharose synthetisierende Enzyme anhält und zu dessen Konzentrationserhöhung führt. Die Neusynthese der Saccharose wird vermutlich aus dem Abbau der Stärke gespeist (2. Einleitung: Abb.2).

Die Transformanten der Linie *Nt-CIF* verhalten sich im Wesentlichen ähnlich zum Wildtyp (Abb.3: WT/ *Nt-CIF*). Zu bemerken ist lediglich, dass verschiedene Experimente einen zeitlich differenzierten Verlauf der Hexoseformation zeigen, die sowohl im Wildtyp, als auch in den *Nt-CIF*-Transformanten zu beobachten ist. Zudem treten Unterschiede in den Konzentrationen der einzelnen Zucker auf (siehe Anhang: Tabelle 2 a/b). Wie die Daten des Verhältnis Saccharose zu den Hexosen Fruktose und Glukose zeigen (Abb.4/ Tabelle 2 a/b), ist eine Verzögerung der Hexoseformation zwischen 16 und 48 h nach Verwundung in *Nt-CIF*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. In einzelnen Transformanten (*Nt-CIF 1*) bleibt der Wert deutlich unter dem des Wildtyps (-50%).

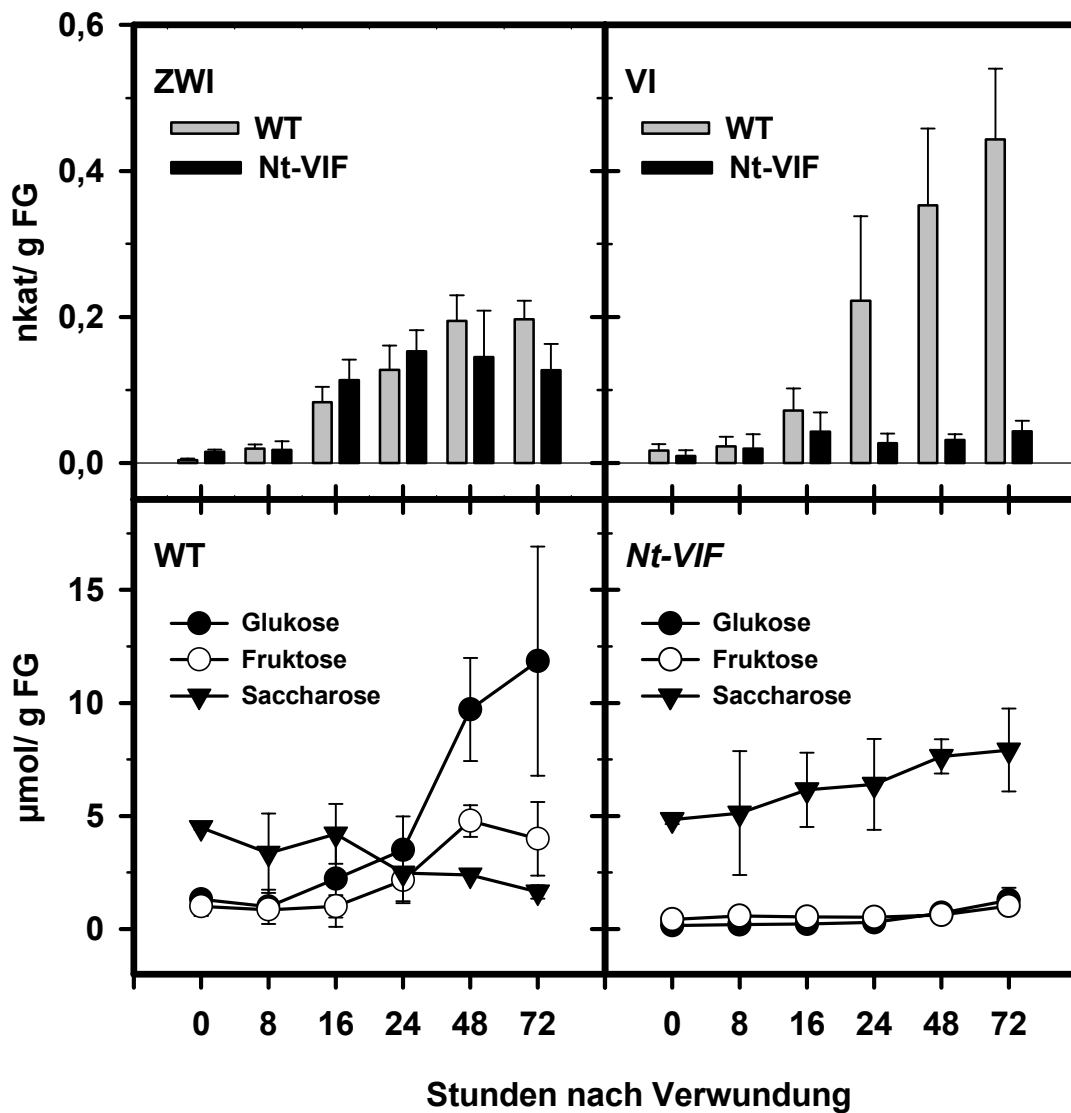


**Invertaseaktivitäten und Zuckerkonzentrationen**



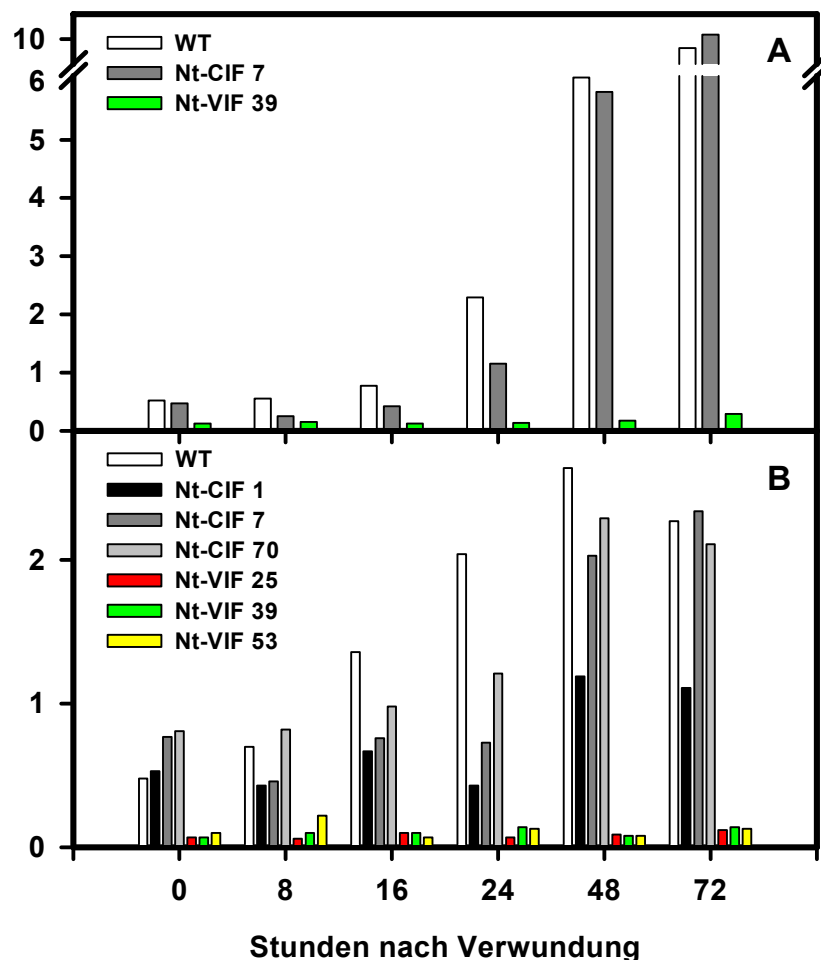


**Invertaseaktivitäten und Zuckerkonzentrationen**



**Abb.2 (Seite 27):** Northern Blot-Analyse von ZWI (mRNA, ZWI) und VI (mRNA, VI) in *Nt-CIF*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp bis 72 Stunden nach Verwundung. Aufgetragen sind jeweils 15 µg Gesamt-RNA pro Spur. Western Blot-Analyse der ZWI (Protein, ZWI) und VI (Protein, VI). Von der löslichen Fraktion zur Detektion der vakuolären Invertase wurden jeweils 20 µg Protein pro Spur aufgetragen. Von der Zellwandfraktion zur Detektion der ZWI wurden jeweils 20 mg Frischgewicht pro Spur geladen. Darstellung der apoplastischen Invertaseaktivität (ZWI) und sauren, löslichen Invertaseaktivität (VI) in verwundetem Kartoffelknollengewebe. Auswirkungen der Verwundung auf die Hexosen und Saccharose in Kartoffelknollen Wildtyp (WT) im Vergleich zu *Nt-CIF*-Transformante (*Nt-CIF*). Die Mittelwerte, sowie die Fehlerbalken der Invertaseaktivität und Zuckerkonzentrationen sind aus 5 unabhängigen Proben zusammengesetzt. Für alle Versuche ist exemplarisch die Transformantenlinie *Nt-CIF 7* aufgetragen. Daten zu anderen *Nt-CIF*-Linien finden sich im Anhang in Tabelle 1 und 2.

**Abb.3 (Seite 28):** Darstellung aller Daten zur exemplarisch vorgestellten *Nt-VIF*-Linie 39 wie in Legendentext zu Abbildung 2. Daten zu anderen *Nt-VIF*-Linien finden sich im Anhang in Tabelle 1 und 2.

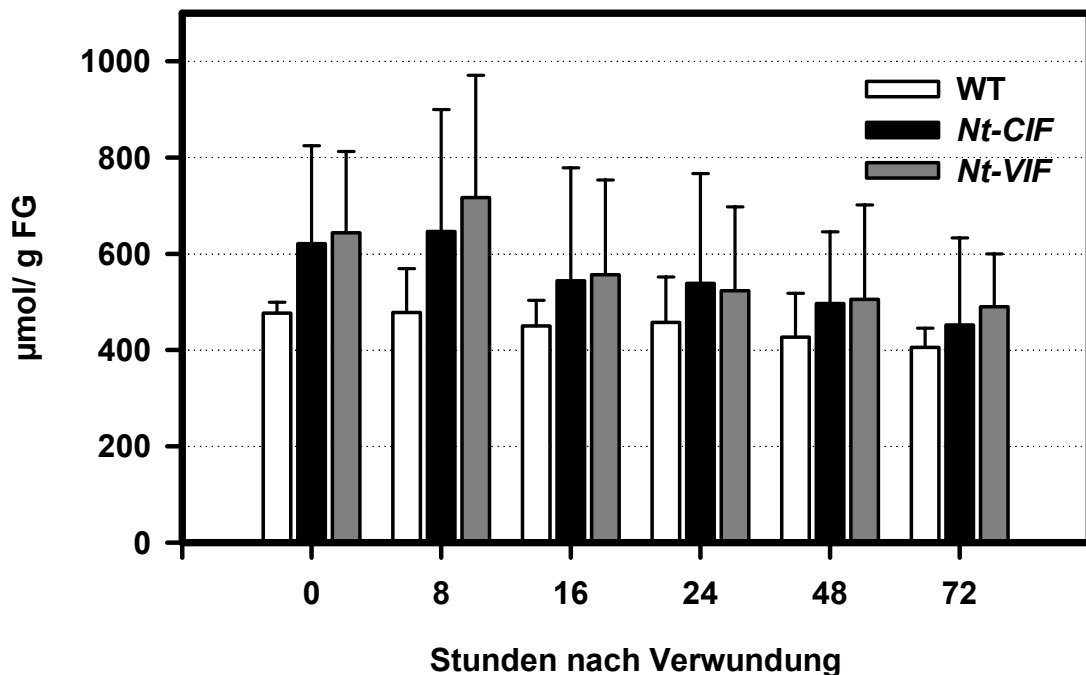


**Abb.4: Darstellung der Hexose/ Saccharose Verhältnisse** in den Transformanten im Vergleich zum Wildtyp nach Verwundung in Kartoffelknollengewebe aus Versuch 1 (A) und 2 (B). Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) sind aus 5 (A), bzw. 3 (B) unabhängigen Proben zusammengesetzt. Siehe auch Anhang Tabelle 2.

### 3.3. Verminderung der Stärkekonzentration in Transformanten und Wildtyp nach Verwundung

Der in der Sorte SOLARA ermittelte Stärkegehalt vor Verwundung beträgt im Durchschnitt 12-15% des Frischgewichtes.

Wie in Abbildung 5 ersichtlich, ist der wundinduzierte Abbau des Stärkegehaltes in Kartoffelknollengewebe aufgrund der verwendeten Methode innerhalb 72 h nach Verwundung nicht messbar. Die hohe Schwankung der Messergebnisse, lässt keinen eindeutigen Schluss über einen Unterschied zwischen Wildtyp und Transformanten zu. Betrachtet man allein die Mittelwerte der gemessenen Stärkekonzentrationen, so nimmt der Stärkegehalt in Wildtypknollengewebe um etwa 60  $\mu\text{mol}$  Glukoseeinheiten/g FG und in den Transformanten um 160  $\mu\text{mol}$  Glukoseeinheiten/g FG innerhalb 72 h nach Verwundung ab. In Bezug auf die stark unterschiedlichen Einzelwerte und einer errechneten Standardabweichung von durchschnittlich 80  $\mu\text{mol}$  Glukoseeinheiten/g FG bezüglich der ermittelten Stärkekonzentrationen des Wildtyps und 180  $\mu\text{mol}$  Glukoseeinheiten/g FG bezüglich der ermittelten Stärkekonzentrationen der Transformanten, ist dies kein Hinweis auf höheren Stärkeabbau in den Transformanten. Parallel wurde an Wildtyp-Kartoffelknollen die Konzentration der Stärke bis zu 5 Tage nach Verwundung ermittelt und zeigte ab 120 Stunden nach Verletzung des Gewebes ein um 40% reduzierter Stärkegehalt.



**Abb.5: Effekt der Wundreaktion in Kartoffelknollen auf den Stärkegehalt.** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) aus 3 unabhängigen Proben der *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp.

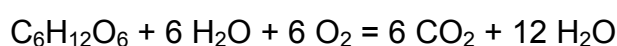
### 3.4 Erhöhung der Respirationsrate in den Transformanten im Vergleich zum Wildtyp

Welche Auswirkungen hat die in den *Nt-VIF*-Transformanten unterbleibende Hexoseformation auf weitere Wundreaktionen, wenn ein Umweg über die Invertasen zur Bereitstellung von Hexosen für die Glykolyse nicht notwendig ist? Ein Kriterium war die Induktion und Substratbereitstellung für die Respiration. Das Atmungssubstrat Glukose wird in Kartoffelknollen aus der Stärke und der in der Vakuole gespeicherten Saccharose bezogen. Aufgrund der Größe des Kompartimentes Vakuole, deren Speicherkapazität und der Beinhaltung des Saccharose- und Hexosegehalt-Hauptanteils im Knollengewebe, könnte ein Ausbleiben der Hexosenbildung in diesem Kompartiment in einer Verzögerung der Atmung der *Nt-VIF*-Kartoffeltransformanten resultieren. Ausgehend von einer schnellen Erhöhung der Atmungsrate sollte nur innerhalb eines kurzen Zeitraumes (8-16 h nach Verwundung) ein Unterschied zwischen Wildtyp und *Nt-VIF*-Transformante untersucht werden.

Die in den Experimenten ermittelten Respirationsraten zeigten jedoch ein gegenteiliges Ergebnis zu der vorausgestellten Vermutung. Für die Respiration der *Nt-VIF*-Transformanten konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden (Abb.6 B). Mehrmalige Wiederholungen des Experimentes zeigten allerdings eine geringe Erhöhung der Atmung im Vergleich zum Wildtyp.

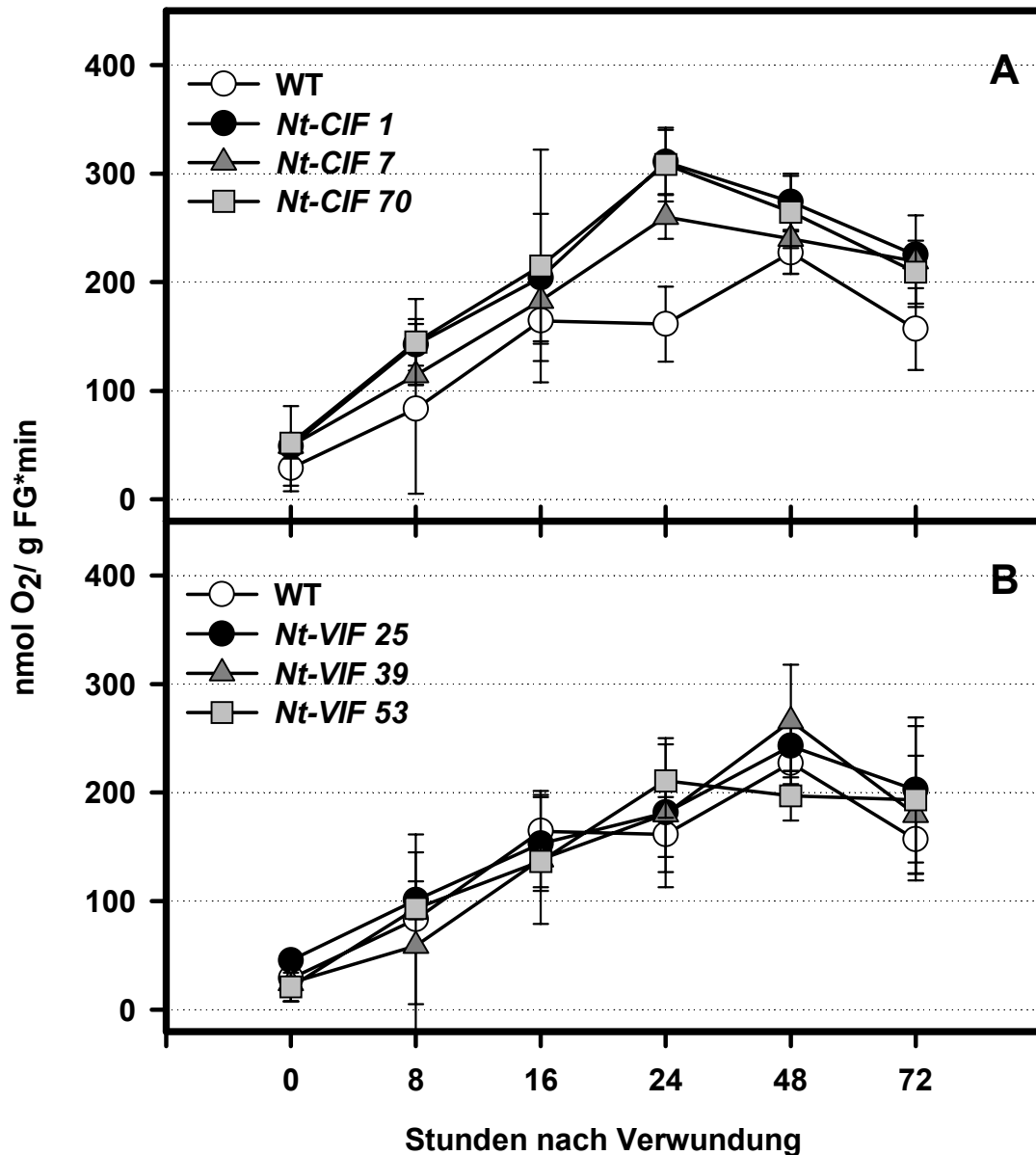
Die *Nt-CIF*-Transformanten weisen auch eine zeitweilige Erhöhung der Atmungsrate vergleichend zum Wildtyp auf und dieses Ergebnis wurde mehrfach bestätigt. Gezeigt ist für beide Transformantentypen, dass die Erhöhung der Respirationsrate nur innerhalb eines kurzen Zeitraumes stattfindet, etwa 24 bis 48 h nach Verwundung. Dies entspricht der Phase der höchsten Atmungsrate im Kartoffelknollengewebe nach Verwundung. Danach reduziert sich der Verbrauch an Sauerstoff durch das Gewebe.

In Wildtyppflanzen wird 48 h nach Verwundung, dem in diesem Experiment ermittelten Höhepunkt der Respirationsrate, eine Glukoseakkumulation von etwa 10-25  $\mu\text{mol/g}$  FG (Exp. I/ II) ermittelt. Im Wildtyp beträgt die Respirationsrate zu diesem Zeitpunkt 230  $\text{nmol O}_2/\text{g FG} \cdot \text{min}$ . Die Bruttogleichung der Atmung lautet wie folgt:



Zur Veratmung eines Moleküls Glukose werden 6 Sauerstoffmoleküle verbraucht. Der Verbrauch der Hexose entspricht daher 40  $\text{nmol Glukose/g FG} \cdot \text{min}$ . In einer Stunde wird 2,4  $\mu\text{mol}$  Glukose veratmet, an einem Tag 57  $\mu\text{mol}$  Glukose. Betrachtet man die Hexoseakkumulation des Wildtyps 48 h nach Verwundung, so wurde an diesem Tag doppelt bis 5-fache so viel Glukose veratmet, wie akkumuliert wurde. Innerhalb der Gesamtverwundungsphase des

Experiment stehen im Mittelwert 160  $\mu\text{mol}$  veratmete gegenüber 12-30  $\mu\text{mol}$  akkumulierter Glukose in der Vakuole. Der hohe Verbrauch an Glukose wird durch den Abbau der Stärke in Kartoffelknollen gedeckt, ist aber bei Betrachtung der gemessenen Stärkekonzentrationen bis 72 h nach Verwundung nach der dort verwendeten Methode nicht ermittelbar (Abb.5).



**Abb.6: Darstellung der Respiration in *Nt-CIF*-Transformanten (A) und *Nt-VIF*-Transformanten (B) im Vergleich zum Wildtyp.** Kartoffelknollenscheibchen wurden über einen Zeitraum von 30-45 min in einer Clarkzelle in einer geschlossenen Atmosphäre inkubiert. Angegebene Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus 3 Knollen.



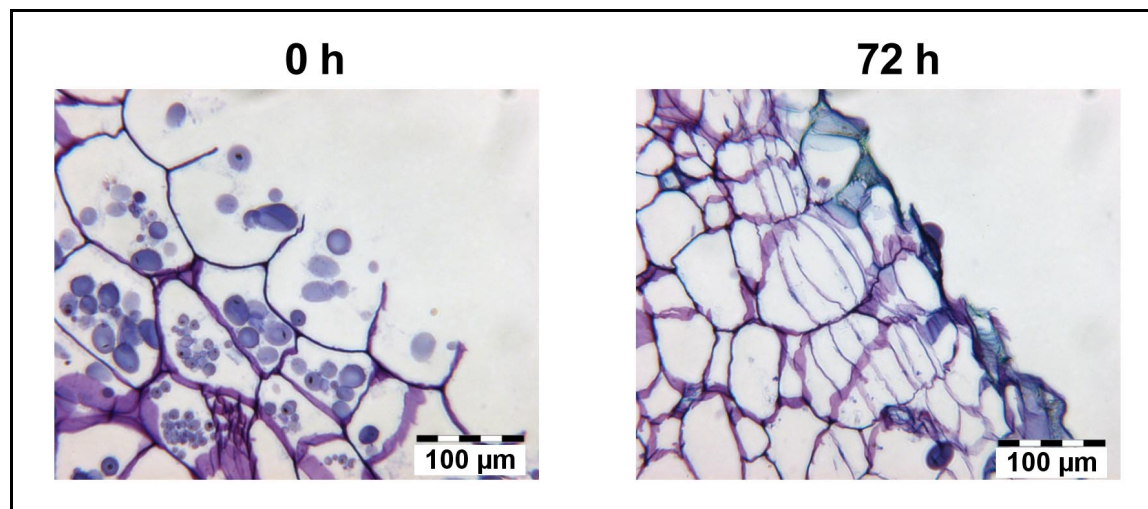
### 3.5 Bildung von Abschlussgewebe in verwundeten Kartoffelknollen

#### 3.5.1 Unveränderte Bildung von Wundperiderm in verwundetem Kartoffelknollengewebe in Transformanten und Wildtyp

Eine Reaktion auf Verwundung ist die Differenzierung einer physikalischen Barriere, bzw. die Bildung eines Wundperiderms (Morelli et al., 1994) an der verletzten Stelle. Dabei teilen sich die Zellen zwei bis drei Zellschichten unterhalb der Wunde und bilden damit ein Abschlussgewebe.

Die Zellteilung sollte anhand einer DAPI-Färbung, welche die Zellkerne anfärbt, gezeigt werden. Die Zunahme an Zellkernen im genannten Bereich würde dann auf eine Vermehrung der Zellen, bzw. eine vermehrte Zellteilung hinweisen. Aufgrund der starken Anfärbung der Stärkekörner im Präparat durch das DAPI-Reagenz und der Größe der Zellen, war es nicht möglich eine Untersuchung hinsichtlich Vermehrung von Zellkernen an der Wundfläche zu leisten.

Alternativ wurde eine Einbettung der Präparate in Paraffin durchgeführt. Diese Methode wird auch zur Anfertigung von *in situ*-Präparaten verwendet. Von den einzelnen Scheibchen wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt, welche wiederum in Toluidinblau angefärbt wurden. Dieser Farbstoff färbt simultan verholztes und nicht verholztes Gewebe und die möglichen Intermediärzustände in einem Farbverlauf von blaugrün zu rot an.



**Abb.7: Bildung von Wundperiderm in *Solanum tuberosum* Wildtyp.**

Darstellung der Wundoberfläche an Toluidinblau-gefärbten Objekten direkt nach Verwundung (**0 h**), und 72 Stunden (**72 h**) nach Verwundung gezeigt. 72 Stunden nach Verwundung sind schon deutliche Zelleinzüge unterhalb der Wundoberfläche sichtbar. Die Auflagerung von Wachsen ist durch deren Blaufärbung sichtbar. Die Kinetik der Wundperidermbildung verläuft in den *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Transformanten unverändert zum Wildtyp.

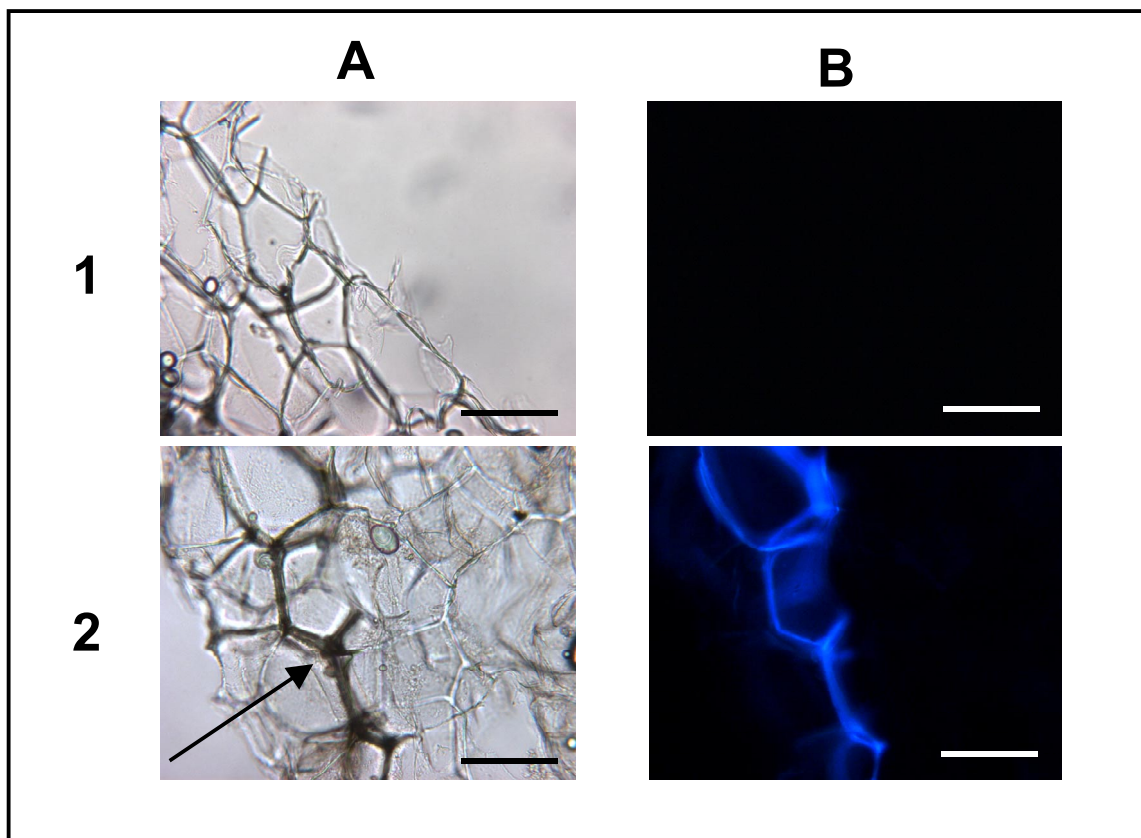
Abbildung 7 zeigt die Bildung von Wundperiderm 72 Stunden nach Verwundung im Wildtyp-Knollengewebe. Wie in der Abbildung zum Zeitpunkt 72 h nach Verletzung des Gewebes am Präparat sichtbar, teilen sich die Zellen zwei bis drei Zellschichten unterhalb der Wundoberfläche mehrfach und bilden somit eine dauerhafte Barriere gegen eindringende Pathogene. Sowohl *Nt-VIF*- als auch *Nt-CIF*-Transformanten zeigen ein identisches Bild im Vergleich zum Wildtyp (Abbildungen nicht dargestellt). Aufgrund der Färbemethode können auch Wachsauflagerungen im Präparat sichtbar gemacht werden, welche durch intensive Blaufärbung auffallen. Wie weitere Studien der Schnittstelle ergaben, erfolgt der Aufbau des Periderms spätestens 24 h nach Verwundung und ist in dieser Phase schon durch einzelne Querwände im relevanten Zellbereich erkennbar. Nach 72 h ist der Vorgang abgeschlossen, bzw. keine weitere Veränderung zu erkennen.

Laut allgemeiner Lehrbuchaussage treten erste mikroskopische Veränderungen hinsichtlich der Wundperidermbildung 12-15 h nach Eintreten der Verletzung auf und die Entwicklung des Abschlussgewebes ist nach 6-8 Tagen abgeschlossen. Dies entspricht der von Morelli et al. (1994) beobachteten biphasischen Transkriptionsaktivität und von der Induktion früher und später Gene. Innerhalb der Zeitphase von 0-12 h nach Verwundung wird z.B. PAL und Genprodukte, welche für die Abwehr zuständig sind exprimiert und in einer späteren Phase (12-24 h nach Verwundung) werden Gene abgelesen, welche für den Aufbau und die Neusynthese von Zellwand verantwortlich sind.

### ***3.5.2 Die Einlagerung von Wachsen in die Zellwände der Wundoberfläche ist unverändert in den Transformanten im Vergleich zum Wildtyp***

Da die Kartoffelknolle im Zeitraum 0-24 h nach Verwundung einem Wasserverlust durch die Wundoberfläche ausgesetzt ist, müssen frühere Mechanismen ein Austrocknen verhindern oder minimieren. Ein Mechanismus, welcher dem Risiko des Austrocknen entgegenwirkt, ist die Ein- und Auflagerung von Wachsen an der Wundoberfläche. Diese Substanzen aus dem sekundären Stoffwechsel, hauptsächlich Kutin und Suberin, zeichnen sich durch eine Eigenfluoreszenz unter UV-Anregung aus und können mittels eines DAPI-Filters am Mikroskop sichtbar gemacht werden.

In Abbildung 8 wird die Eigenfluoreszenz von Suberinen 48 h nach Verwundung beispielhaft am Wildtyp dargestellt. Eine erste sichtbare Fluoreszenz an der Wundoberfläche wurde 24 h nach Verwundung und eine vollständige Suberinisierung 72 h nach Verwundung erkannt. Zum späteren Zeitpunkt beginnt auch das restliche Gewebe unterhalb der Oberfläche zu fluoreszieren. Dies kann ebenso auf eine Erhöhung von weiteren phenolischen Substanzen hinweisen. Bezüglich der Suberinisierung und der Akkumulation löslicher Phenole im Gewebe ergab sich zwischen Wildtyp und Transformanten kein visuell erkennbarer Unterschied.



**Abb.8: Suberineinlagerung in verwundeten Kartoffelknollen.** Bilder unter der Bezeichnung (1) zeigen Weißlicht (Durchlicht-) Aufnahmen der Wundoberfläche (A) direkt nach Verwundung und das gleiche Präparat unter UV-Licht (B) am Wildtyp zur Sichtbarmachung der Eigenfluoreszenz von Wachsen und Suberinen. Bilder unter der Bezeichnung (2) zeigen Aufnahmen unter Weißlicht (A) und UV-Licht (B) im Wildtyp 48 Stunden nach Verwundung. Der Pfeil deutet auf die erste noch intakte Zellschicht unterhalb der Wundoberfläche. Innerhalb der Zellwände dieser Zellschicht werden Wachse zur Wundoberfläche gerichtet eingelagert. Der gleiche Versuch wurde für *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Transformanten nach Verwundung getätigt. Die Ergebnisse zu den Transformanten sind nicht dargestellt. Die Kinetik der Suberineinlagerung verläuft in den *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Transformanten unverändert zum Wildtyp. Die Balken entsprechen 100 µm.

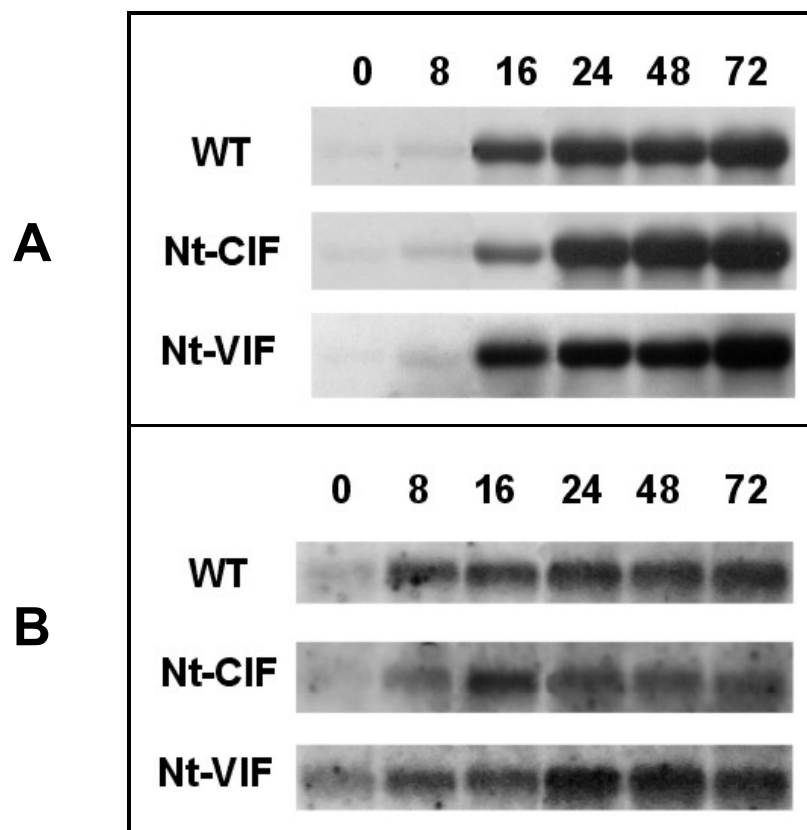
Vergleichend zur Detektion der Wachse und Phenole unter UV-Anregung kann die Färbung von Suberinen und Kutinen über Sudan III erfolgen. Der Farbstoff ermöglicht die Anfärbung dieser Substanzen in einem intensiven Orangeton, welcher sich in Frischpräparaten deutlich hervorhebt. Diese Methode wurde parallel durchgeführt und bestätigte die Untersuchungen des Gewebes, sowie die ermittelten Ergebnisse, welche unter UV-Licht gezeigt wurden.

Spätestens 48 h nach Verwundung wird die Wachseinlagerung an der Wundoberfläche auch durch eine sichtbare Verdickung der Zellwände an den verletzten Bereiche erkennbar (Abb.8, Pfeil).

### 3.6 Untersuchung von Saccharose-Synthase und Saccharose-Phosphat-Synthase als weitere im Kohlenhydratmetabolismus beteiligte Enzyme

#### 3.6.1 Keine Veränderung in der Expression von SuSy und SPS in den Transformanten im Vergleich zum Wildtyp

Eine Untersuchung der Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) und Saccharose-Synthase (SuSy) als wichtige Enzyme innerhalb des Saccharosemetabolismus ergaben ein einheitliches Ergebnis für Transformanten und Wildtyp (Abb.9). Aufgrund der Konkurrenz um das gleiche Substrat (Saccharose) wurde eine Expression der SuSy als wichtiger Anhaltspunkt in die Versuche mit einbezogen.



**Abb.9: Northern Blot-Analyse von (A) Saccharose-Synthase (SuSy) und (B) Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) in verwundeten Kartoffelknollen (0-72 Stunden nach Verwundung). Die Signale der hybridisierten mRNA von Saccharose-Synthase wurden bei 2,2 kb, die der SPS bei 3,6 kb detektiert. Aufgetragen sind jeweils 15 µg Gesamt-RNA pro Spur. *Nt-CIF* 7 und *Nt-VIF* 39 wurden exemplarisch für die *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Transformantenlinien vorgestellt.**

Eine Kompensation unterdrückter Invertaseaktivität könnte auch über eine erhöhte Expression der SuSy stattfinden. In Kartoffelpflanzen der Sorte Desiree, welche mit einem SuSy-Konstrukt in *antisense*-Orientierung transformiert wurden, stellte man eine Erhöhung aller Invertase-Isoenzym-Aktivitäten fest (Zrenner et al., 1995). Dieser Anstieg an Invertaseaktivität in den Knollen der Pflanzen führte vermutlich zu einer drastischen Produktion von Hexosen. Es ist also anzunehmen, dass beide Enzymgruppen (Invertasen/SuSy) sich gegenseitig aufgrund des gleichen Substrats regulieren.

SPS und Saccharose-Phosphat-Phosphatase (SPP), übernehmen im Kohlenhydratmetabolismus die Rolle des Aufbaus der Saccharose. SPS wurde ebenso auf RNA-Ebene untersucht, zur besseren Betrachtung des Saccharose-Stoffwechselweges. Da SPS und SPP auf Proteinebene vermutlich einen Komplex bilden (Echeverria et al., 1997), können die Expressionsdaten bezüglich SPS auch auf ein ähnliches Verhalten der SPP verweisen.

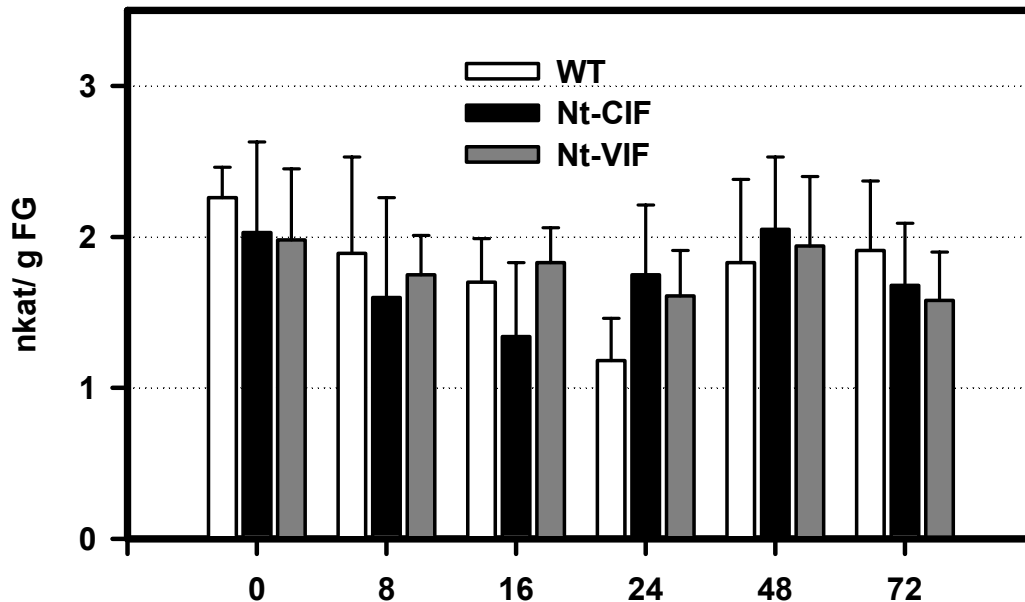
Beide Enzyme, SPS und SuSy, werden nach Verwundung exprimiert (Abb.9), wobei SuSy erst nach 8-16 h eine Erhöhung der Expression zeigt. Das Signal SPS ist schon vor Verwundung vorhanden, was dafür spricht, dass dieses Enzym schon vor Verwundung exprimiert wird. Die Verstärkung des Signals spätestens 8 h nach Verwundung zeigt aber zudem, dass SPS und SuSy der generellen Zunahme der Transkription unterworfen sind (Abb.9). Das Transkript der SPS bleibt auch während der Verwundungsperiode erhalten, was dafür spricht, dass der Bedarf der Neusynthese bestehen bleibt. Dies erklärt auch das Vorhandensein des Transkripts vor der Verwundung und die Wichtigkeit beider Enzyme im Saccharosemetabolismus in der Kartoffelknolle.

### **3.6.2 Die Gesamtaktivität und die selektive Aktivität der Saccharose-Synthase (SuSy) ist unverändert im Vergleich zum Wildtyp**

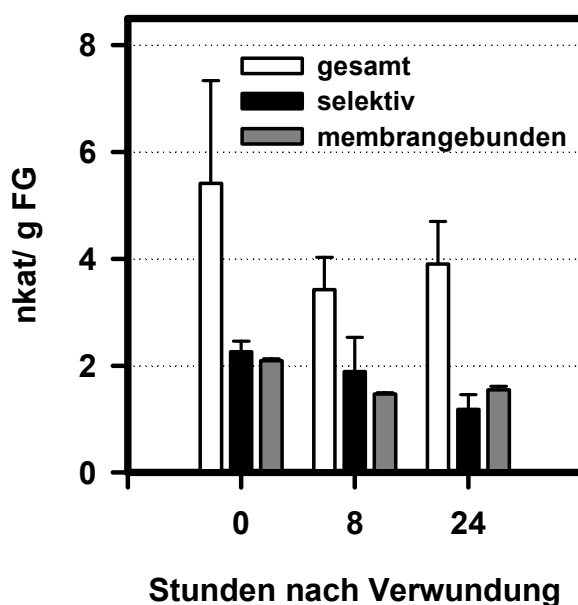
Die im Verlauf der Wundreaktion ermittelte Aktivität der SuSy verhält sich deutlich differenziert zu der gezeigten Expression der SuSy-mRNA. Wie in Abbildung 10 dargestellt, spiegelt sich die deutliche Induktion des Transkripts zwischen 8 und 16 h nach Verwundung (Abb.9) nicht in der Aktivität des Enzyms wieder. Die Daten zur Aktivität der SuSy zeigen, dass das Enzym schon vor Verwundung vorhanden, bzw. aktiv ist und 8 h nach Verwundung keinen Anstieg der Enzymaktivität erkennen lässt. Dies ist sowohl im Wildtyp als auch in den Transformanten der Fall. Eine Untersuchung der Expression des Enzyms auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse hätte Aufschluss geben können, ob Saccharose-Synthase-Protein vor Verwundung schon vorhanden war oder eine Neusynthese auch bezüglich der Proteinkonzentration sichtbar wird.

Abbildung 10 zeigt die selektive SuSy-Enzymaktivität, die experimentell durch die Limitierung der Substrate Saccharose und UDP erreicht wird. Die Untersuchung der Gesamtaktivität des SuSy-Enzyms wurde durch Einsatz der genannten Substrate im Überfluss durchgeführt und ergab eine Enzymaktivität der

SuSy um Faktor 2-3 erhöht (siehe Abb.11) zur selektiven SuSy-Aktivität. Die Messung membrangebundener SuSy-Aktivität ergab im Wildtyp keinen signifikanten Unterschied zur Höhe der selektiven SuSy-Aktivität.



**Abb.10: Selektive Aktivität der Saccharose-Synthase** im Verlauf der Verwundung in Kartoffelknollen. *Nt-CIF* 7 und *Nt-VIF* 39 wurden exemplarisch für die *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformantenlinien vorgestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) ergeben sich aus jeweils 3 unabhängigen Proben (Kartoffelknollen).

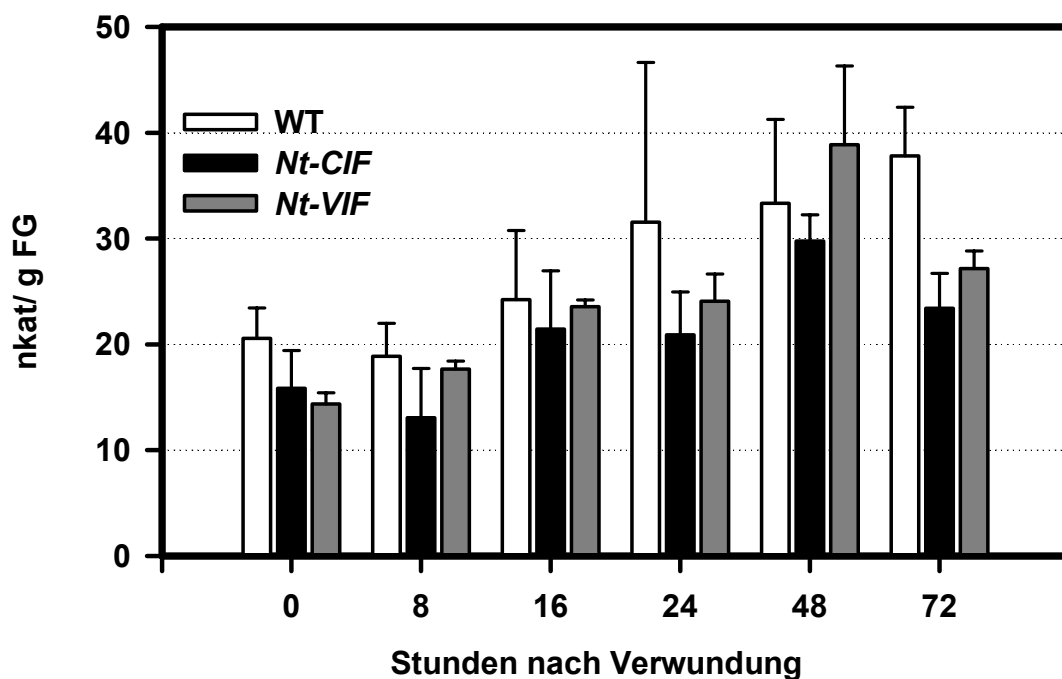


**Abb.11:** Darstellung der Gesamtaktivität, der selektiven und membrangebundenen Saccharose-Synthase-Aktivität bis 24 Stunden nach Verwundung in Kartoffelknollen des Wildtyps. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 3 unabhängigen Proben (Kartoffelknollen).

### 3.7 Erhöhung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität nach Verwundung in WT und Transformanten gleichermaßen

Das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) katalysiert den ersten Schritt im oxidativen Pentosephosphatzyklus, indem es Glukose-6-Phosphat unter Reduktion von NADP in 6-Phosphoglukonolakton umsetzt. Der oxidative Pentosephosphatzyklus, dessen Umsetzung im Cytoplasma und in Plastiden stattfindet, bildet einen Alternativweg zur Glykolyse und zum Zitronensäurezyklus, wobei die einfließende Glukose hier vollständig oxidiert wird. Vor allem dient jedoch der oxidative Pentosephosphatzyklus der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NADPH), Pentosephosphat zur Synthese von Nukleinsäuren und Triosephosphaten.

Die G-6-P-DH wird durch Verwundung oder Stress induziert (von Schaewen et al., 1995). In Kartoffelknollen ist dies allerdings unter den generellen Anstieg des Metabolismus einzuordnen, welcher nach Verwundung auftritt. Wie in Abbildung 12 dargestellt, findet die Erhöhung der Aktivität des Enzyms etwa 16 h nach Verwundung statt und fällt damit in den Zeitraum der frühen Stressantwort. Die Aktivität der G-6-P-DH steigt bis 48 Stunden nach Verwundung um den Faktor 2 an und sinkt ab diesem Zeitpunkt wieder. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Transformanten sichtbar.



**Abb.12: Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase** im Verlauf der Verwundung in Kartoffelknollen. *Nt-CIF* 7 und *Nt-VIF* 39 wurden exemplarisch für die *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformantenlinien vorgestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) ergeben sich aus jeweils 3 unabhängigen Proben (Kartoffelknollen).

### 3.8 Abnahme der Glutathionkonzentration (GSH) bis 16 Stunden und anschließende Regeneration des GSH-Pools ab 48 Stunden nach Verwundung

Glutathion (GSH/GSSG) ist ein Tripeptid, das dem zellulären Schutz dient. Ebenso ist es ein wichtiges Schwefelreservoir der Pflanze. Glutathion wird durch zwei ATP-abhängige Reaktionen aus Glutamat, Cystein und Glyzin synthetisiert. Diese Reaktionen werden katalysiert durch das Enzym  $\gamma$ -Glutamyl-cystein-Synthetase ( $\gamma$ -ECS) und Glutathion-Synthetase (GSase).

GSH oder Glutathion ist eines der wichtigsten Redoxreagenzien in Pflanzen. Zu dessen Funktionen gehören nicht nur die Entgiftung von Xenobiotika, sondern auch die Faltung von Proteinen, Mitwirkung bei der Zellteilung, als Transportform von reduziertem Schwefel und als Signaltransduktionsmolekül (Foyer et al., 2001). Glutathion kann in der monomeren reduzierten Form (GSH) als Antioxidans wirken. Die Konjugation einzelner Glutathionmoleküle, Phytochelatine, spielen eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Xenobiotika.

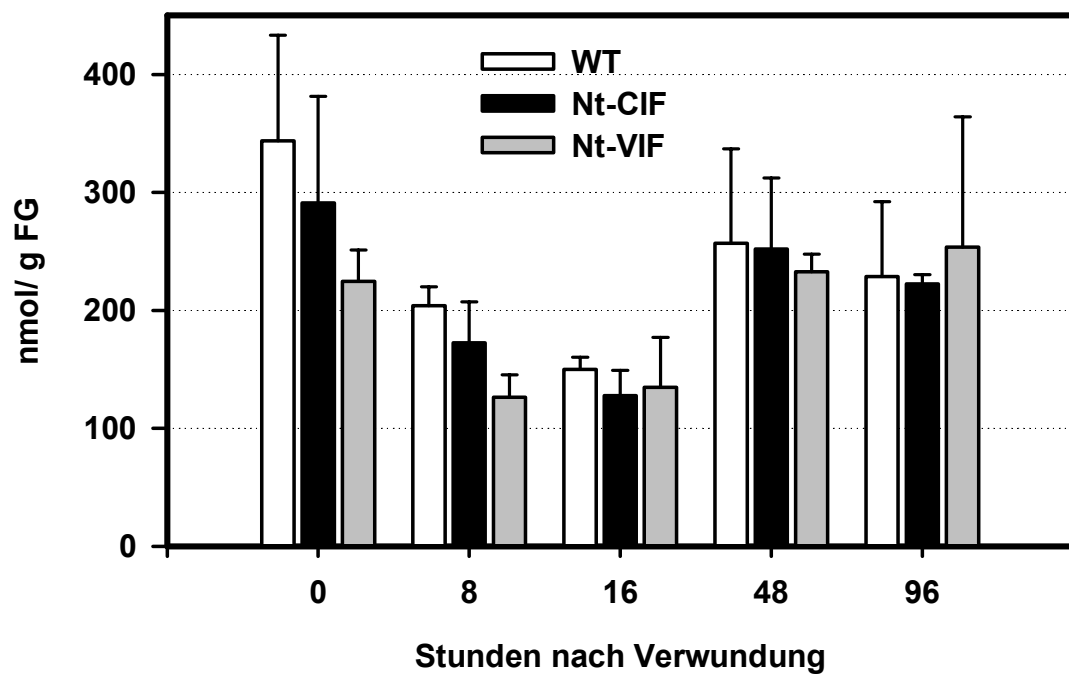
Die Glutathion-Biosynthese ist damit streng abhängig von Stresssituationen, wie z.B. die Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies. Hierbei wird GSH oxidiert zu GSSG oder Glutathion-Disulfid. Unter nicht gestressten Bedingungen baut sich die GSH-Konzentration durch Reduktion des GSSG wieder auf. Generell kann man davon ausgehen, dass die GSH-Konzentration unter Stress zunimmt, es wurden aber auch gegenteilige Ergebnisse erbracht (Foyer und Rennenberg, 2000 und darin zitierte Literatur). Dies begründet sich vermutlich in der Tatsache, dass GSH als wichtigste Schwefelquelle in Pflanzen für die Produktion von z.B. Proteinen dient.

Die Verteilung des reduzierten Glutathions (GSH) hängt von Zellkompartiment und Zelltyp ab. Variieren können GSH-Gesamtgehalt und das Verhältnis von GSH zu GSSG (Oxidierter Form des Glutathion) und steht in Zusammenhang mit der Funktion des Kompartiments.

Die Veränderung des Redoxpotentials in den Zellen nach Verwundungsstress war eines der Kriterien, einer Untersuchung der Glutathionkonzentration in Kartoffelknollengewebe nachzugehen. Die gewählte Bestimmungsmethode erfasst den Gesamtgehalt von Glutathion (GSH + GSSG).

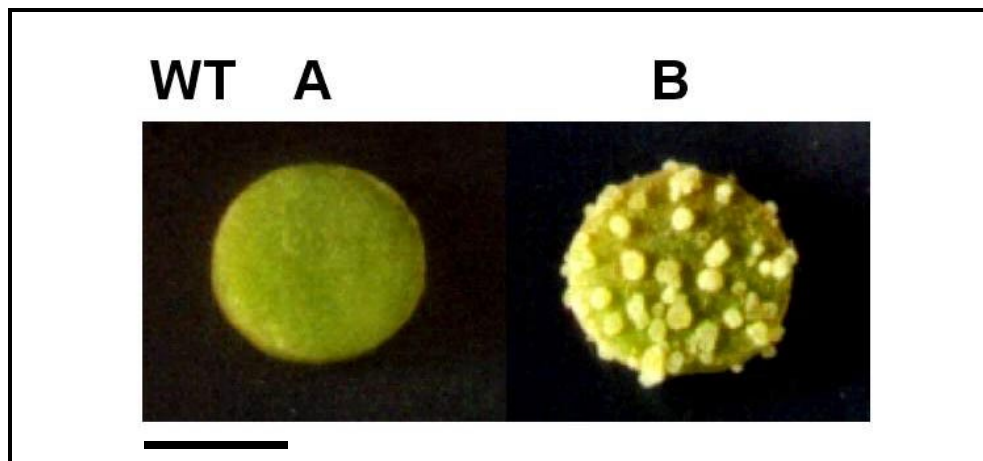
Wie aus der Graphik ersichtlich (Abb.13), sinkt die Gesamtkonzentration des GSH bis 16 h nach Verwundung um 60%. Dies ist sowohl im Wildtyp als auch in den Transformanten der Fall. Zu bemerken ist lediglich eine reduzierte Ausgangskonzentration des GSH in den *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Transformanten, abnehmend zum Wildtyp in der genannten Reihenfolge. Aufgrund der hohen Differenz der einzelnen Werte (Fehlerbalken) ist dieser Aspekt nicht als signifikant zu betrachten. Sowohl in Wildtyp als auch in den Transformanten regeneriert sich der GSH-Gehalt 48 h nach Verletzung des Gewebes und erreicht fast den Ausgangswert der GSH-Konzentration vor Verwundung.





**Abb.13: Konzentration von GSH** im Verlauf der Verwundung in Kartoffelknollen. *Nt-CIF* 7 und *Nt-VIF* 39 wurden exemplarisch für die *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformantenlinien vorgestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) ergeben sich aus jeweils 3 unabhängigen Proben (Kartoffelknollen).

### 3.9 Infektion von Kartoffelknollenscheibchen mit *Agrobacterium tumefaciens*: Überexpression von *Nt-CIF* und *Nt-VIF* erzeugen keine Verzögerung in der Tumorinduktion im Vergleich zum Wildtyp



**Abb.14:** Abbildung eines tumorbewachsenen Kartoffelknollenscheibchens (Wildtyp, B) im Vergleich zu nicht infiziertem Knollengewebe (A) in Aufsicht. Die Aufnahme der Kartoffelscheibchen wurde 18 Tage nach Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* angefertigt. Die Scheibchen besitzen den Durchmesser von 15 mm. Balken entspricht 10 mm.

Frühere Studien an Tumorgewebe, induziert durch *Agrobacterium tumefaciens* an *Ricinus communis* Internodien, zeigten eine stark erhöhte Aktivität der ZWI im Vergleich zum umgebenden Gewebe (Pradel et al., 1996). Die bis zu 9-fache Erhöhung der sauren, apoplastischen Invertaseaktivität weist auf eine wichtige Rolle dieses Enzyms im Metabolismus des Tumorgewebes hin. Dies lässt sich ebenso durch die deutliche Hervorhebung der ZWI- zur VI-Aktivität im Tumorgewebe im Vergleich zum umgebenden Gewebe zeigen. Während im nicht infizierten Gewebe des Internodiums der Rizinuspflanze die VI-Aktivität um das doppelte bis 4-fache die ZWI-Aktivität übersteigt, halten sich im Tumorgewebe die Invertaseaktivitäten die Waage, bzw. die ZWI-Aktivität ist doppelt so hoch zur VI-Aktivität. Es ist daher offensichtlich, dass Zellwandinvertasen wichtig für die Tumorinduktion und das Tumorstadium sind. Dieser Aspekt wurde auch schon vorher an Tumoren, induziert an Kalanchoeblättern (*Kalanchoe daigremontiana*) und Tabakinternodien (*Nicotiana tabacum*), gezeigt (Weil und Rausch, 1990). Das Tumorgewebe wies hierbei eine fast doppelt so hohe ZWI-Aktivität auf als das umgebende Gewebe. Versuche an mittels *Agrobacterium tumefaciens* transformierten Zellkulturen, welche Mutationen in der T-DNA be-

züglich der Auxinbiosynthese vorweisen, zeigten zugleich ein Zusammenhang zwischen ZWI-Aktivierung und Auxinsynthese (Weil und Rausch, 1990).

Die Tumorinduktion durch *Agrobacterium tumefaciens* an dikotylen Pflanzen verläuft nach folgenden Schritten: Das Bakterium dringt in verwundetes Gewebe ein und beginnt mit der Übertragung bestimmter Bereiche des bakterieneigenen Ti-Plasmids, der T-DNA, in die pflanzliche Zelle. Die eingeschleuste T-DNA bewirkt die tumorinduzierenden Mechanismen, welche sich durch starke Zellteilung und Ausbildung von Leitgewebe sichtbar machen. Die eingedrungene T-DNA kann sowohl in *Single-Copy*, als auch in hochrepetitiven Regionen der pflanzlichen DNA eingebaut werden. Die T-DNA ist beiderseits von einem kurzen sogenannten *Inverted Repeat* (rechter und linker Rand) flankiert. Benachbarte Sequenzen dieser Ränder werden ins pflanzliche Genom mit übertragen, aber nicht integriert. Die T-DNA liefert nach ihrer Integration in das Genom verschiedene Transkripte (mRNA), welche für Opinsynthese ebenso wie für die Tumorinduktion und –morphologie zuständig sind. Opine sind ungewöhnliche Aminosäure- und Zuckerderivate, welche nur von dem Bakterium selbst verwertet werden können. Die zuständigen Gene für Tumorinduktion und –morphologie sind letztendlich verantwortlich für die hohen Auxin- und Cytokinergehalte in den Tumorzellen. Die Pflanzenhormone bewirken Zellteilung und –streckung. Cytokinine aktivieren zudem die Expression der Invertasen.

Setzt man die Beobachtungen von Pradel et al. (1996) und Weil und Rausch (1990) bezüglich der gesteigerten ZWI-Aktivität in Zusammenhang mit den hohen Auxin- und Cytokininkonzentrationen in Tumorgewebe, so bestätigt dies eine essentielle Funktion der sauren apoplastischen Invertase in der Tumorinduktion. Hinsichtlich der *Nt-CIF*-Transformanten stellte sich daher die Frage, ob die Unterdrückung der ZWI in allen Geweben der Transformanten eine Tumorinduktion ausschließt, bzw. ein reduziertes Tumorstadium verursacht.

Der Versuch wurde an Kartoffelknollengewebe von Wildtyp und beiden Transformantenlinien (*Nt-CIF* und *Nt-VIF*, je 3 voneinander unabhängige Transformante) durchgeführt. Dieses wurde wie im Verwundungsversuch beschrieben in Scheibchen geschnitten und unter sterilen Bedingungen (Ausschließen von Fremdinfection) mittels *Agrobacterium tumefaciens* infiziert. Pro Scheibchen wurden jeweils  $10^9$  Bakterien aufgebracht und in feuchter Atmosphäre inkubiert. Die Beobachtung des Versuchs ergab keine Unterschiede in Zeitpunkt der Induktion und Wachstum der Tumore hinsichtlich Wildtyp und Transformanten. Vielmehr zeigte sich eine inhomogene Verteilung von unterschiedlich großen Tumoren pro Scheibchen innerhalb verschiedener Wildtypknollen und Transformantenknollen. Die wachsenden Tumore wurden daher nach Erreichen von Stecknadelkopfgröße (Abb. 14), nach 18-21 Tagen, von den Scheibchen getrennt. Nach dieser Zeit ist die „normale“ Wundreaktion weitgehend abgeschlossen. Da keinerlei visuellen Unterschiede im Tumorstadium ermittelt wurden, war eine Untersuchung der Gewebe, getrennt in Tumor- und

restliches Scheibchengewebe, hinsichtlich der Invertaseaktivitäten (ZWI,VI) von Interesse.

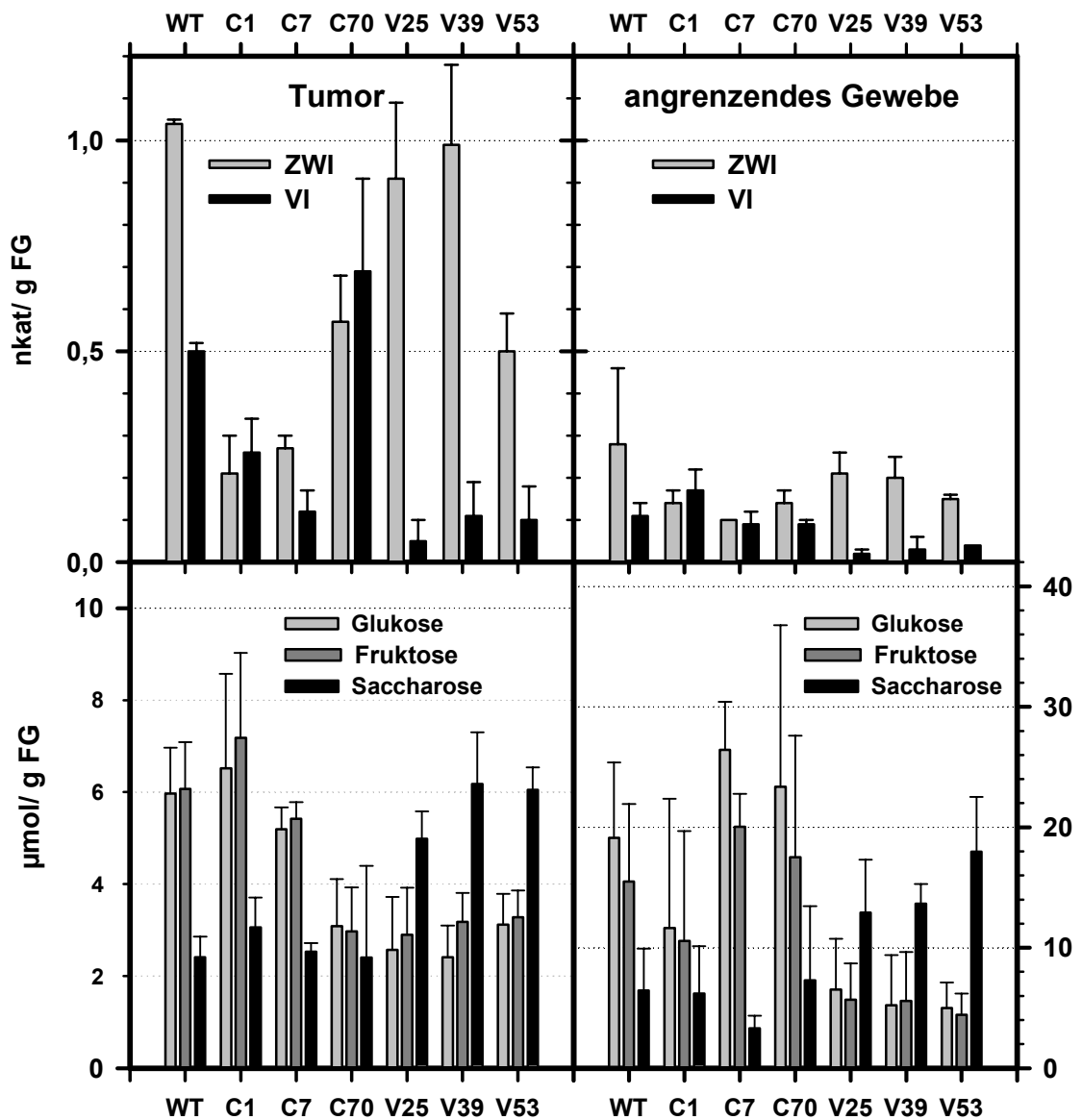
Die Bestimmung von ZWI und VI sollte Aufschluss geben über die Verteilung der Invertaseaktivitäten bezüglich Tumorgewebe und Scheibchen unter Berücksichtigung der Beobachtungen, die von Weil und Rausch (1990) an Tabaktumoren ermittelt wurden. Im Kontext dazu sollte die Ermittlung der zum Enzym korrespondierenden Kohlenhydrate, Saccharose, Glukose und Fruktose, Aufschluss über den Einfluss der Inhibitorexpression in den Transformanten auf die Invertase-katalysierte Saccharosehydrolyse geben.

Hinsichtlich der Untersuchung der Tumore auf die Invertaseaktivitäten ergab sich, dass die Aktivität der vakuolären Invertase im Tumorgewebe 5-fach so hoch, die der Zellwandinvertase um Faktor 4 höher im Vergleich zu der ermittelten Aktivität im angrenzenden Gewebe in Wildtypknollen ist (Abb. 15).

Im Tumorgewebe der *Nt-CIF*-Transformanten findet eine Reduktion der ZWI-Aktivität auf bis zu 20% im Vergleich zum Wildtyp statt. Einzelne Transformantenlinien (hier *Nt-CIF* 70) weisen eine 50%e Aktivität der ZWI im Vergleich zum Wildtyp und eine vergleichsweise dazu stark erhöhte VI-Aktivität auf. Zu bemerken ist, dass die ZWI-Aktivität in den *Nt-CIF*-Transformanten trotz Reduktion dem Niveau der Enzymaktivität nach Verwundung im Wildtyp entsprechen (Abb1). Dort beträgt die ZWI-Aktivität nach 72 h 0,2 nkat/ g FG. Die VI-Aktivität der meisten *Nt-CIF*-Transformanten ist in Tumorgewebe reduziert zur Wildtyp VI-Aktivität, in einzelnen Linien jedoch vergleichbar hoch. Die Betrachtung des Tumorgewebes bezüglich der Invertaseaktivitäten der *Nt-VIF*-Transformanten erbrachte folgende Resultate. Deren VI-Aktivität ist auf 1/5 der Wildtyp-VI-Aktivität reduziert, die ZWI-Aktivität der *Nt-VIF*-Transformanten ist unverändert, bzw. reduziert zum Wildtyp. Die Reduktion der VI in den Transformanten bewirkt keine Veränderung der Höhe der ZWI-Aktivität.

Entsprechend der Daten von Weil und Rausch (1990) und Pradel et al. (1996), ist in den von den Tumoren getrennten Scheibchen die Aktivität der Invertasen stark erniedrigt im Vergleich zum Tumorgewebe. Die ZWI-Aktivität des Wildtyps ist in Tumorgewebe etwa 4 mal so hoch wie im angrenzenden Gewebe, die der VI-Aktivität ist um Faktor 5 erhöht.

Die konstitutive Inhibitorexpression in den Transformanten prägt sich auch in Tumor-angrenzendem Gewebe aus, ist aber aufgrund der zum Tumorgewebe minimierten Invertase-Enzymaktivitäten weniger deutlich. Vergleiche zwischen Wildtyp und *Nt-CIF*-Transformanten bezüglich der ZWI-Aktivitäten in Tumor-angrenzendem Gewebe zeigten eine um Faktor 2 erniedrigte ZWI-Aktivität der *Nt-CIF*-Transformanten vergleichend zum Wildtyp. Die VI-Aktivität der Transformantenlinie ist vergleichbar zum Wildtyp. *Nt-VIF*-Transformanten weisen sowohl in Tumorgewebe, als auch in Tumor-angrenzendem Gewebe die Reduktion der VI-Aktivität um Faktor 5 vergelichend zum Wildtyp auf. In beiden Gewebetypen ist die ZWI-Aktivität der *Nt-VIF*-Transformanten vergleichbar zur Wildtyp ZWI-Aktivität.

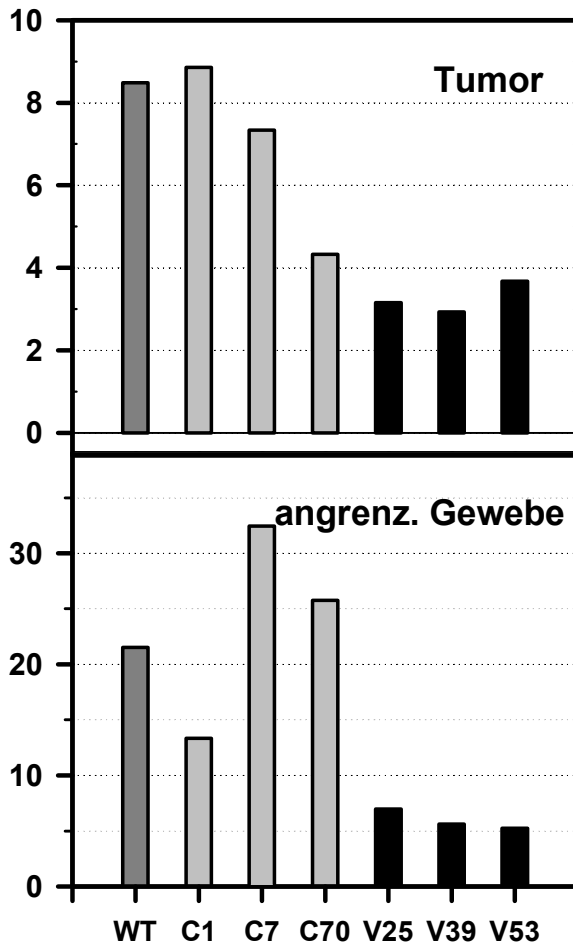


**Abb.15:** Invertaseaktivitäten in Tumor (**oben links**) und Kartoffelscheibchen (**oben rechts**), sowie die Konzentrationen von Glukose, Fruktose und Saccharose in Tumor (**unten links**) und in Kartoffelscheibchen (**unten rechts**). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Einzelknollen.

WT= Wildtyp

C1-70= *Nt-CIF*-Transformanten der Linien 1,7 und 70

V25-53= *Nt-VIF*-Transformanten der Linien 25,39 und 53

**Abb.16:**

Glukose+Fructose/Saccharose-verhältnis aus Abbildung 15 von Tumor und angrenzendem Gewebe von Wildtyp und den Transformanten der verwendeten Linien.

**WT**= Wildtyp

**C1-70**=

*Nt-CIF*-Transformanten der Linien 1,7 und 70

**V25-53**=

*Nt-VIF*-Transformanten der Linien 25,39 und 53

Der Vergleich zwischen Tumorgewebe und Tumor-angrenzendem Gewebe zeigt im eigenen Experiment keine Aktivitätsverschiebung der dominanten Invertaseisoform, wie in Pradel et al. (1996) gezeigt. Die ZWI-Aktivität ist in Tumor und angrenzendem Gewebe im Durchschnitt höher als die VI-Aktivität (nur Wildtypdaten).

Die Gesamtkonzentration der aufgeführten Zucker ist in Tumor-angrenzendem Gewebe um Faktor 3 höher als im Tumorgewebe. Zudem zeigen sich Unterschiede im Verhältnis der Hexosen Glukose und Fruktose zur Saccharose zwischen Tumorgewebe und Tumor-angrenzendem Gewebe. Im angrenzendem Gewebe ist das Verhältnis der Hexosen zur Saccharose bei 20, im Tumorgewebe bei 8 (Wildtyp; Abb.16). Es wurden daher doppelt so viel Hexosen im angrenzendem Gewebe gebildet vergleichend zum Tumorgewebe. Die Reduktion der vakuolären Invertaseaktivität in den *Nt-VIF*-Transformanten wird durch die Reduktion der Hexosen im Vergleich zum Wildtyp und den *Nt-CIF*-Transformanten deutlich, wie im Verhältnis von Saccharose zu den Hexosen in Abbildung 16 dargestellt. Die Saccharosekonzentrationen der *Nt-VIF*-Transformanten ist in Tumor und Scheibchen um Faktor 2 vergleichend zum Wildtyp erhöht, was ein ähnliches Verhalten zur Wundreaktion in diesen Transformanten zeigt. Innerhalb der Wundreaktion wird ebenfalls ein Anstau von Saccharose in den *Nt-VIF*-Transformanten beobachtet.

## 4 Diskussion

### 4.1 Funktionelle Ausschaltung der wundinduzierten ZWI- und VI-Aktivität zur Aufklärung der *in vivo*-Funktion dieser Enzyme in Kartoffelknollengewebe

#### 4.1.1 Ektopische Expression von *Nt-CIF* und *Nt-VIF* in Kartoffeltransformanten: Phänotyp

Ausgangsmaterial für die vorliegende experimentelle Arbeit waren dormante Knollen von Kartoffelpflanzen mit heterologer Überexpression des **Nt-CIF** bzw. **Nt-VIF**-Proteins (Greiner, 1999). Diese Transformanten exprimieren den apoplastischen Invertaseinhibitor (*Nt-CIF*), bzw. den Inhibitor der vakuolären Invertase (*Nt-VIF*) aus *Nicotiana tabacum*. Transformanten beider Linien besitzen keinen anatomischen bzw. morphologischen Phänotyp und sind in Wuchsform und Habitus vom Wildtyp nicht zu unterscheiden. Die Transformanten zeigen im vegetativen Gewebe (Greiner, 1999) und in Knollen eine Reduktion der Zellwandinvertase-Aktivität (*Nt-CIF*) und der vakuolären Invertase-Aktivität (*Nt-VIF*) vergleichend zum Wildtyp.

Der Zellwandinvertase wird innerhalb der Knolleninduktion eine wichtige Rolle zugeschrieben (Sonnewald et al., 1994). Es wurde daher im Vorfeld eine Untersuchung zu Knollenanzahl und Frischgewicht der *Nt-CIF*-Transformanten durchgeführt (Greiner, 1999). Bezüglich dieser Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp gezeigt werden. Die posttranslationale Unterdrückung der ZWI in den *Nt-CIF*-Transformanten führt daher nicht zu einer dramatischen Veränderung während der Knollenentwicklung. Die Autoren Sonnewald et al. (1997) beobachteten an Knollen von Kartoffelpflanzen, welche Hefeinvertase im Apoplasten überexprimieren, ein im Durchschnitt größeres Volumen im Vergleich zum Wildtyp. Die Transformation hatte aber keinen Einfluss auf den Metabolitpiegel (Hajirezaei et al, 2000). Im Falle der *Nt-CIF*-Transformanten ist es sehr wahrscheinlich, dass die Expression der Inhibitorproteine und die posttranslationale Inhibition der Invertasen unter normalen Umweltbedingungen und ausreichender Nährstoffversorgung durch die Pflanze kompensiert wird. Möglicherweise könnte die Anwendung von Stress in Form von Nährstofflimitierung, Lichtmangel, osmotischer Stress und Verwundung eine Veränderung der Knollenentwicklung der Transformanten im Vergleich zum Wildtyp provozieren. Ist die Veränderung der Knollenanzahl und der Knollengröße von der Aktivität der ZWI und VI abhängig, so tritt dieser Phänotyp erst auf, wenn der Schwellenwert der minimalen, bzw. maximalen Invertaseaktivität unter-, bzw. überschritten ist. Innerhalb dieser Werte wird vermutlich kein Phänotyp bezüglich der *Nt-CIF*-Transformanten sichtbar.

#### **4.1.2 Ektopische Expression von *Nt-CIF* und *Nt-VIF* in Kartoffeltransformanten: Auswirkung der verminderten Aktivität in den Transformanten auf die transkriptionelle Induktion beider Gene, die Bildung der Invertaseproteine und die wundinduzierte Bildung von Zuckern**

Es ist bekannt, dass Invertasen bei Stress exprimiert werden (Sturm und Chrispeels, 1990) und eine wichtige Rolle in der *Sink*-Regulation spielen (Klann et al., 1993). Die *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Expression, welche die posttranslationale Unterdrückung der ZWI, bzw. VI in Kartoffelpflanzen bewirken, sind Voraussetzung für die Aufklärung der *in vivo*- Funktion der Invertaseenzyme innerhalb von Stressreaktionen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Aspekt des Verwundungsstress zur Untersuchung der genannten Funktion herausgehoben. Im Kartoffelanbau ist mechanische Verletzung während der Ernte eine der Stressarten, dicht gefolgt von Trockenheit, Schädlingsbefall und Kältestress bei Lagerung der Knollen, welche die Qualität der Kartoffelknollen beeinflusst. Kältestress ist ein erhebliches Problem, da in Mitteleuropa nur einmal im Jahr geerntet wird und dadurch eine Lagerung unter 10°C erforderlich ist. Dies soll vor allem Infektionen vermeiden und ein Austreiben der Knollen verhindern. Nachteilig an der Kältelagerung ist, dass die Knollen Kältestresssymptome zeigen. Durch den Kälteeinfluss induzierte vakuoläre Invertasen tragen zu einer Akkumulation von Hexosen bei (ap Rees et al., 1981). Dies bedingt das an Knollen beobachtete *cold sweetening*-Phänomen, wobei Saccharose auch an diesem Effekt beteiligt ist. Von diesem Phänomen betroffene Knollen können nicht mehr weiterverarbeitet werden, da reduzierende Zucker, z.B. beim Frittieren ein Verbräunen des Gewebes bewirken. Eine Inhibition der entsprechenden Invertasen unter dieser Stressbedingung war Voraussetzung zur Untersuchung der Akkumulation von Zuckern in den Knollen bei Kälte. Linien der *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformanten wurden schon von Greiner et al. (1999) auf das Phänomen des *cold sweetening* untersucht. *Nt-VIF*-Transformanten zeigten nach 6-wöchiger Kältebehandlung eine starke Reduktion der kältebedingten Hexoseformation im Vergleich zum Wildtyp. In Kartoffelknollen spielt daher die vakuoläre Invertase eine wichtige Rolle im Prozess kälteinduzierter Hexoseformation.

Innerhalb dieser Arbeit wurden Kartoffelknollen der *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformanten zur Untersuchung der Rolle der Invertasen während Verwundungsstress herangezogen. Die Transformanten wurden innerhalb des Stressexperimentes zu folgenden Punkten untersucht: die Expression der Invertasetranskripte und Invertaseproteine nach Verwundung und die wundinduzierte Bildung von Saccharose, Glukose und Fruktose. Wie im Ergebnisteil 3.2 erläutert, zeigen Transformanten der Linie *Nt-CIF* eine starke Erniedrigung der ZWI-Aktivität und *Nt-VIF*-Transformanten eine Inhibition der VI-Aktivität im Verlauf der Verwundung. Die verminderte Aktivität der Invertasen übt jedoch keinen Einfluss auf die Expression deren Transkripte, sowie deren Proteinexpression aus. Die Inhibition der ZWI-Enzymaktivität in den *Nt-CIF*-Transformanten ver-



hindert nicht den Anstieg des Gesamthexosegehaltes. Lediglich die Darstellung der Verhältnisse von Hexosen zur Saccharose weisen auf eine Verzögerung der Hexoseakkumulation in der Phase 16-48 Stunden nach Verwundung hin. Dieser Effekt verschwindet nach dieser Zeitspanne jedoch vollständig. Transformanten der Linie *Nt-VIF* zeigen eine starke Reduktion (-90%) der VI-Aktivität bis 96 (gezeigt bis 72) h nach Verwundung. Betrachtet man die Konzentration der korrespondierenden Produkte und Substrate, Glukose, Fruktose und Saccharose, so wird eine Bildung der Hexosen in den *Nt-VIF*-Transformanten vermieden. Dies wird besonders anschaulich durch das Verhältnis der Hexosen zur Saccharose (Ergebnisse, Abb.4) gezeigt, welches deutlich unter 1 bleibt. Hieraus resultiert, dass die verantwortliche Invertase der wundbedingten Hexosebildung die vakuoläre Isoform ist. Dies begründet sich auch darin, dass die Zellen des Kartoffelknollengewebes trotz des massiven Vorkommens an Amyloplasten eine große Vakuole besitzen, welche im Vergleich zum cytosolischen Raum den Großteil des Gesamtsaccharosegehaltes enthält. Der Anstieg der Saccharosekonzentration in den *Nt-VIF*-Transformanten im Verlauf der Wundreaktion zeigt zudem deutlich einen aktiven Transport des Zuckers in die Vakuole, welcher sich durch inhibierte vakuoläre Invertaseaktivität dort anreichern kann.

Die Expression von Inhibitorproteinen ist im Resultat effizienteres Werkzeug zur Regulation der Aktivität der zugehörigen Invertasen, als eine *antisense*-Expression der Invertasen. Zur Vermeidung der kälteinduzierten Bildung von Hexosen wurde eine Expression einer kälteinduzierten vakuolären Invertase in *antisense*-Orientierung durchgeführt (Zrenner et al., 1996). Die transgenen Knollen zeigten direkt nach der Ernte keinen Einfluss auf die Hexosekonzentration und dem Verhältnis von Hexose zu Saccharose im Vergleich zum Wildtyp. Nach Kältelagerung bei 4°C zeigte sich eine entscheidende Veränderung im Hexose/Saccharose-Verhältnis. Die stärkste Reduktion der Hexosen (-34%) trat dabei nur in Linien auf, deren VI-Aktivität unter 10% lag. Es wurde daher angenommen, dass eine starke Reduktion der Invertasen unter 5% Restaktivität nötig ist für einen signifikanten Effekt auf die Zuckerverhältnisse und die Hexosekonzentration. Unterstützend zu dieser Theorie erweisen sich auch die Ergebnisse von Cheng et al. (1996), dessen Mais *miniature1*-Mutante erst bei einer Reduktion der Invertase-Enzymaktivität ab 6% Restaktivität phänotypische Auswirkungen zeigt.

In den verwundeten Kartoffelknollen liegt die Restaktivität der VI in den *Nt-VIF*-Transformanten jedoch über 10% verglichen mit dem Wildtyp. Trotzdem wird eine wundbedingte Hexoseformation unterbunden. Eine Erklärung für dieses Ergebnis begründet sich vermutlich in der von Zrenner et al. (1996) und Greiner et al. (1999) diskutierten Anwesenheit von Isoformen der kompartimentspezifischen Enzyme, welche die ausgeschalteten ersetzten. In Transformanten, welche durch Inhibitoren eine posttranslationale Hemmung der Invertasen hervorrufen, wird vermutlich auch das „Isoformen-Problem“ behoben, da

die Inhibitoren zwar an ihre spezifischen Invertasen binden, aber zwischen den VI-Isoformen oder ZWI-Isoformen des Gewebes nicht diskriminieren.

Zudem wurde schon bewiesen, dass Nt-CIF eine Reihe von pflanzlichen Invertasen inhibiert (Greiner, 1999), unter anderem auch VI aus Tomate (Sander et al., 1996). *In vivo* wird dieser Effekt durch die Kompartimentierung unterbunden, wenn kein gerichteter Transport des Inhibitorproteins in andere Kompartimente stattfindet. Ungeklärt ist dieser Aspekt bezüglich des Nt-VIF. Das Inhibitorprotein scheint sehr spezifisch vakuoläre Invertasen zu hemmen, die Effektivität gegenüber VIs aus anderen Pflanzengruppen ist noch nicht vollständig geklärt (Rausch, persönliche Mitteilung). Nicht zu vernachlässigen ist auch der experimentell nur sehr aufwändig nachzuweisende Unterschied zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Aktivität der Invertasen. Vermutliche Veränderungen der Aktivität von Invertasen und den Inhibitoren in den *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformanten durch das Enzymextraktionsverfahren sind daher nicht nachgewiesen. Die Frage, welche Aktivität die Inhibitoren in der Realität *in vivo* haben, bleibt unbeantwortet. Da die Transformanten keinen Phänotyp in Wachstum und Habitus aufweisen, ist davon auszugehen, dass die posttranslationale Unterdrückung der Invertasen unter Normalbedingungen von der Pflanze kompensiert werden.

Die Wundreaktion beinhaltet in ausgereiften Kartoffelknollen die Induktion der Expression einer Vielzahl von Proteinen/Enzymen (Butler et al., 1990). Einige davon sind Enzyme des Kohlehydratmetabolismus, sowie der Abwehr und in die Wundheilung involvierte Proteine. Die wundinduzierte Produktion von reduzierenden Zuckern verweist zudem auf die Diskussion über den Einfluss von Zuckermolekülen auf die Genexpression (Midori et al., 2001; Sinha et al., 2002). Die beobachtete Verminderung der Hexosebildung in den *Nt-VIF*-Linien und die Verzögerung in den *Nt-CIF*-Transformanten wirft die Frage nach einer Auswirkung auf weitere wundbedingte Reaktionen, z.B die Wundatmung, auf.

#### **4.1.3 Funktion von Zuckermolekülen unter Stress**

In jüngster Zeit werden Zuckermoleküle, neben der Aufgabe als energielieferndes Substrat, auch als wichtiges Signal zur Regulation von Genen und einer Vielzahl von physiologischen Vorgängen angesehen. Zuckermoleküle nehmen Einfluss auf die Regulation von Genen des Photosyntheseapparates, des *Sink*-Metabolismus und des Abwehrmechanismus (Koch, 1996; Smeekens, 1998; Roitsch, 1999; Sheen et al., 1999).

Der molekulare Mechanismus, der dem Vorgang der Signaletablierung durch Zucker zugrunde liegt, ist noch weitgehend unverstanden. Den Effekt, welche Zucker auf die Genregulation ausüben, ist hingegen gut untersucht, wobei in vielen Fällen Saccharose durch Glukose und Fruktose ersetzt werden kann. Nur in einzelnen Experimenten konnte die Existenz von Saccharose-spezifisch regulierten Stoffwechselwegen gezeigt werden (Chiou and Bush,

1998; Rook et al., 1998). Um den Mechanismus der Zuckersignalkette zu beleuchten, wurde der Effekt von Zuckerderivaten der Saccharose untersucht (Sinha et al., 2002). An Zellsuspensionskultur von Tomate wurde der Einfluss auf Photosynthesegene und Enzyme des Kohlehydratmetabolismus von metabolisierenden und nicht metabolisierenden Zuckern, wie Palatinose und Turanose, gezeigt. Es stellte sich heraus, dass eine extrazelluläre Invertase durch Saccharose, Glukose und die Zuckerderivate induziert wird. Die kleine Unter-einheit der Ribulose-bisphosphat-Carboxylase (RbcS), einem Enzym des Calvinzyklus wurde nur durch Saccharose und Glukose inhibiert, die Wirkung der Zuckerderivate blieb ohne Effekt auf das Transkript. Daraus ergibt sich, dass nicht metabolisierende Zucker vermutlich keinen Einfluss auf die Regulation von Genen des Photosyntheseapparates haben. Der umgekehrte Fall tritt bei Genen des Abwehrmechanismus auf. Proteinkinasen, wie z.B. MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) werden durch Turanose oder Palatinose aktiviert. Saccharose und Glukose bewirken keine Änderung der Transkriptmenge. Elicitorpräparationen aus *Fusarium oxysporum lycopersici*, welche in den Zellen eine starke Induktion von MAPKs und der extrazellulären Invertase bewirken, weisen auf die Wirkung der nicht metabolisierenden Zucker als Stresssignal hin.

Zucker dienen nicht nur als Energielieferanten und Transportmoleküle. Neben der Funktion als Signalgeber wird deren Funktion bei Stressarten wie Salzstress oder Wasserstress untersucht. So steigt die Salztoleranz von Tabakpflanzen, welche eine Invertase aus Hefe im Apoplasten exprimieren (Fukushima et al., 2001). Die Photosyntheserate wird unter Salzstress in Wildtyp-Tabakpflanzen leicht gedrückt, während die Transformanten keinerlei Veränderung zu normalen Umweltbedingungen zeigen. Die erheblich gesteigerte Salztoleranz der Transformanten resultiert aus einer Erhöhung des osmotischen Drucks in den Zellen, welcher durch eine starke Akkumulation von Zuckern, meist in Form von Glukose und Fruktose in den Chloroplasten bedingt ist. Die Inhibition des Zuckertransportes zu den *Sink*-Organen in den Transformanten führt zu einer Akkumulation der Saccharose in den *Source*-Organen, welche partiell durch die Invertase in die Hexosen gespalten wird. Dieser veränderte Umstand in den Transformanten schützt den Photosyntheseapparat vor Salzstress, wobei der molekulare Schutzmechanismus noch zu klären ist.

Wasserstress, in Form von Wasserdefizit, verursacht die Aktivierung einer vakuolären Invertase in gestressten Maispflanzen (Kim et al., 2000). Dies führt zur Hexoseakkumulation (Glukose und Fruktose) in den Organen der wassergestressten Pflanzen. *In situ*-Lokalisationsstudien zeigen, dass Glukoseakkumulation, vakuoläre Invertaseaktivität, sowie deren Signal auf Transkript- und Proteinebene exklusiv kolokalisiert sind in Leitbündelscheide und Zellen des vaskulären Gewebes von gestressten *Source*-Blättern und Primärwurzeln.

## 4.2 Auswirkung von Verwundungsstress auf Abwehr, Wundperidermentwicklung, Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus und die Respiration in Wildtyp Kartoffelknollengewebe

### 4.2.1 Mobilisierung des Sekundärstoffwechsels: Abwehr und Wundheilung (Suberinisierung)

Innerhalb der Evolution haben Pflanzen eine Reihe von effektiven Abwehrmechanismen entwickelt, um schädigenden Umwelteinflüssen entgegenzuwirken. Dies beinhaltet vor allem Stress, verursacht durch Verwundung, Pathogenbefall und ungünstige Umwelteinflüsse. Ist Verwundung eingetreten, so wird das betroffene vom nicht verwundeten Gewebe abgetrennt oder das verletzte Gewebe wird repariert. Bei Kartoffelknollengewebe ist die Abwehrreaktion lokal begrenzt, d.h. es wird keine systemische Antwort durch das gesamte Gewebe geschickt, wie es im vegetativen Bereich der Kartoffelpflanze der Fall ist. Tritt Verwundung ein und damit auch die potentielle Gefahr des Eindringens von Pathogenen, so werden hohe Konzentrationen von toxischen Chemikalien gebildet ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , sekundäre Metabolite), die eintretende Pathogene töten sollen. In verwundeten Kartoffelknollen werden große Mengen an freien Radikalen gebildet (Doke, 1983). Dieser Aspekt wird gefolgt von der Formation einer physikalischen Barriere (Wundperiderm). Eine möglichst schnelle Wundheilung ist notwendig um Austrocknen und weiteres Eindringen von Pathogenen (Lulai und Corsini, 1998) zu verhindern.

Neben dem direkten toxischen Effekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf Pathogene bewirken diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Quervernetzung von Zellwandkomponenten (*cross-linking*; Sutherland, 1991). Dieser Effekt ist zweifelsohne wichtig für den Wundheilungsprozess, da dies ein schnelles Abschließen der Wundoberfläche und ein Austrocknen sowie weiteres Eindringen von Pathogenen verhindert (Lamb und Dixon, 1997; Kolattukudy, 1980).

$\text{H}_2\text{O}_2$  ist nicht nur wichtig zur Vernetzung von Zellwandbestandteilen, es besteht zudem ein  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bedarf für die Herstellung komplexer Phenolverbindungen. Dies zeigt sich auch darin, dass betroffenes Gewebe nicht nur  $\text{H}_2\text{O}_2$  akkumuliert, sondern auch zu Ungunsten der Sauerstoffkonzentration produziert (Doke, 1983, Bernards und Razem, 2001). Versuche mit einem Inhibitor (DPI /Diphenyleniodonium), welcher die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion hemmt, zeigte an Kartoffelknollengewebe die veränderte Zusammensetzung und das Auftauchen von neuen phenolischen Komponenten (Razem und Bernards, 2002). Es wird vermutet, dass die Inhibition der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion im Gewebe die Oxidation und Polymerisation der löslichen Phenole durch lokalisierte Zellwandoxidase verhindert hat. Dies bestätigt sich auch in der Abnahme der Konzentration von Grundbausteinen des Lignin, wie z.B. Coniferylalkohol und Sinapylalkohol nach Einsatz des Inhibitors.

Die Wichtigkeit von phenolischen Komponenten für die Abwehr und die Wundheilung zeigt sich vor allem in der schnellen Aktivierung des Schlüsselenzyms dieser Stoffwechselwege, der Phenylalaninammoniumlyase (PAL). PAL wird in verwundetem Kartoffelknollen 1 h nach Verletzung des Gewebes gebildet (Butler et al, 1990). Es ist für die Bildung der meisten und wichtigsten sekundären Pflanzenstoffe verantwortlich, indem es Phenylalanin zu Zimtsäure katalysiert und damit eine Brücke zwischen primärem und sekundärem Metabolismus schlägt (siehe Abb.1). Zimtsäure wird durch Hydroxylierung und Methylierung in viele weitere Phenolsäuren abgeleitet, welche durch Reduktion zu Alkoholen Vorstufen der Lignine bilden können. Welchen Einfluss das Enzym in der Abwehrreaktion von Pflanzen einnimmt, zeigen Experimente, die manipulierend in die PAL-Aktivität eingreifen. So zeigt die Inhibition der PAL-Aktivität eine Reduktion der Akkumulation von autofluoreszierenden Stoffwechselprodukten und die negative Beeinflussung der systemischen Resistenz in *Blumeria graminis* (Stadnik und Buchenauer, 2000).

In Wildtyp-Kartoffelknollen wird nach Verwundung eine schnelle und einheitliche Erhöhung der PAL-mRNA (Ergebnisse, Abb.9) detektiert. Die schnelle Induktion dieses für die Wundreaktion notwendigen Enzyms weist auf die Produktion sekundärer Metabolite hin, welche zur Abwehr und zur Synthese von Zellwandkomponenten notwendig sind.

Gleichzeitig zum Phenylpropanmetabolismus spielt der Shikimat-Stoffwechsel eine entscheidende Rolle während Verwundungsstress. Er kontrolliert den Bedarf an Phenylalanin, der vom Phenylpropanmetabolismus benötigt wird. Transgene Ansätze, die Veränderungen in den genannten Stoffwechselwegen verursachen, haben dramatische Folgen auf die Gehalte von Phenylalanin, Tryptophan und phenolische Folgeprodukte (Yao et al., 1995 und dort zitierte Literatur).

Die Akkumulation von löslichen Phenolen ist nach früheren Untersuchungen von Laanest et al. (1995) zudem eine lichtbeeinflusste Reaktion. Die Autoren zeigten an der Wundheilung von Kartoffelscheibchen die starke Zunahme von phenolischen Verbindungen bis 3 Tage nach Verwundung, welche gefolgt wird von einer leichten Abnahme der Konzentration. Ein konstantes Niveau der Konzentration wurde 5 Tage nach Verwundung erreicht. Die Akkumulation der löslichen Phenole, im Besonderen der Chlorogensäure, zeigte sich weniger ausgeprägt bei Inkubation in Dunkelheit. Die Produktion der Flavonoide blieb völlig aus.

Der Phenylpropanmetabolismus ermöglicht die Synthese von Ligninvorstufen, welche zu dem komplexeren Phenylpropanderivat polymerisiert werden. Lignine und Wachse dienen der Zellwandverstärkung und dem Austrocknungsschutz. Vor allem nach Verwundung ist die Synthese dieser Stoffe notwendig, um die Wundoberfläche schnell zu verschließen. Aufgrund dessen ist spätestens 24 h nach Verwundung an Kartoffelknollengewebe direkt unterhalb der Wundoberfläche an der ersten intakten Zellschicht die Einlagerung von Wach-

sen erkennbar (Ergebnisse, Abb.8). Diese können durch Färbemethoden aber auch durch ihre Eigenfluoreszenz unter UV-Anregung sichtbar gemacht werden. Bestätigt wird dies durch Untersuchungen von Stark et al. (1994). Die Autoren beobachteten an Kartoffelknollen die Suberineinlagerung am Wundperiderm über die Zeit. Dabei wurde festgestellt, dass während der ersten 7 Tage nach Verwundung Suberine in der ersten noch intakten Zellschicht eingelagert werden und eine Barriere gegen weitere Infiltration des Gewebes bilden.

Der Anstieg an löslichen Phenolen im verwundeten Gewebe wird auch bei mikroskopischen Frischpräparaten des Kartoffelknollengewebes in den eigenen Experimenten sichtbar. Unter UV-Anregung ist die diffus verteilte Eigenfluoreszenz der Phenole 72 h nach Eintreten der Verletzung auch im restlichen Gewebe sichtbar. Der Hauptbestandteil der löslichen Phenole in Kartoffelknollen bildet die Chlorogensäure. Es ist daher davon auszugehen, dass die Zunahme an löslichen Phenolen hauptsächlich durch deren Zunahme bestimmt wird. Die Chlorogensäure gehört zu den weit verbreiteten Zimtsäureestern, bestehend aus Coffeoyl-CoA und Chinasäure. Coffeoyl-CoA ist eine Verbindung aus Kaffesäure und Coenzym A aus dem Phenylpropanmetabolismus. Die Chinasäure stammt aus dem Shikimat-Stoffwechsel. Dies zeigt, dass die Aktivierung beider Stoffwechselwege notwendig ist zur Neusynthese der Chlorogensäure.

#### **4.2.2 Bildung eines dauerhaften Wundabschlusses: Wundperidermbildung**

Sind Pflanzen Stress ausgesetzt, wie z.B. Insektenverbiss und mechanischer Verletzung, so wird eine Reihe von Genen aktiviert, die zur Abwehr und der Wundheilung beitragen. Letzterer Vorgang beinhaltet die Synthese wundverschließender Komponenten und letztendlich die Neusynthese oder Verstärkung der Zellwand. Im Falle des Wundabschlusses in Kartoffelknollengewebe nennt man den Einzug neuer Zellwände unterhalb der Wundoberfläche Wundperiderm. Laut allgemeiner Lehrbuchangaben treten erste mikroskopische Veränderungen, bzw. Zellwandeinzüge in der ersten intakten Zellschicht unterhalb der Wunde 12-15 h nach Eintreten der Verletzung auf. Der Prozess der Wundperidermbildung ist nach 6-8 Tagen abgeschlossen.

Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den eigenen Experimenten (Ergebnisse, Abb. 7) und den Untersuchungen der Autoren Morelli et al. (1994) überein, welche die Ausbildung von Wundperiderm in Kartoffelknollen in die Phase der Aktivierung später Gene, etwa 12-24 h nach Verwundung, eingliedern. Bei der Verwundung von Kartoffelknollengewebe erkennt man die Induktion früher und später Gene. Innerhalb einer Zeitphase von 0-12 h nach Verwundung wird z.B. PAL exprimiert und in einer späteren Phase werden Gene abgelesen, welche für den Aufbau und die Neusynthese von Zellwand verantwortlich sind.

Die Zellteilung bzw. der Einzug von neuen Zellwänden in Form eines Wundperiderms erfordert die Bereitstellung von Energie und wird durch eine Vielzahl von Signalen vermittelt. Die erhöhte metabolische Tätigkeit des Gewebes nahe der Wundoberfläche wird durch einen verstärkten Fluss an Saccharose in dieses Gewebe unterstützt. Motoren dieses Saccharoseflusses sind die hohen ZWI- und VI-Aktivitäten, welche oft nahe der Wundoberfläche detektiert werden. Zudem sind einfache Zucker, wie Saccharose und Glukose effiziente Modulatoren der Genexpression. In Pflanzen wurden schon viele Zucker-regulierte Gene identifiziert, deren Produkte in Metabolismus und Zellzyklus verwickelt sind. Die Signalverarbeitung bezüglich der Zuckersignale sind gewebespezifisch. So wird in *Vicia faba* Samen die Phase mit hoher mitotische Aktivität in den Samen durch steigende Invertaseaktivitäten in die Phase der Speicherstoffeinlagerung modifiziert (Weber<sup>2</sup> et al., 1996).

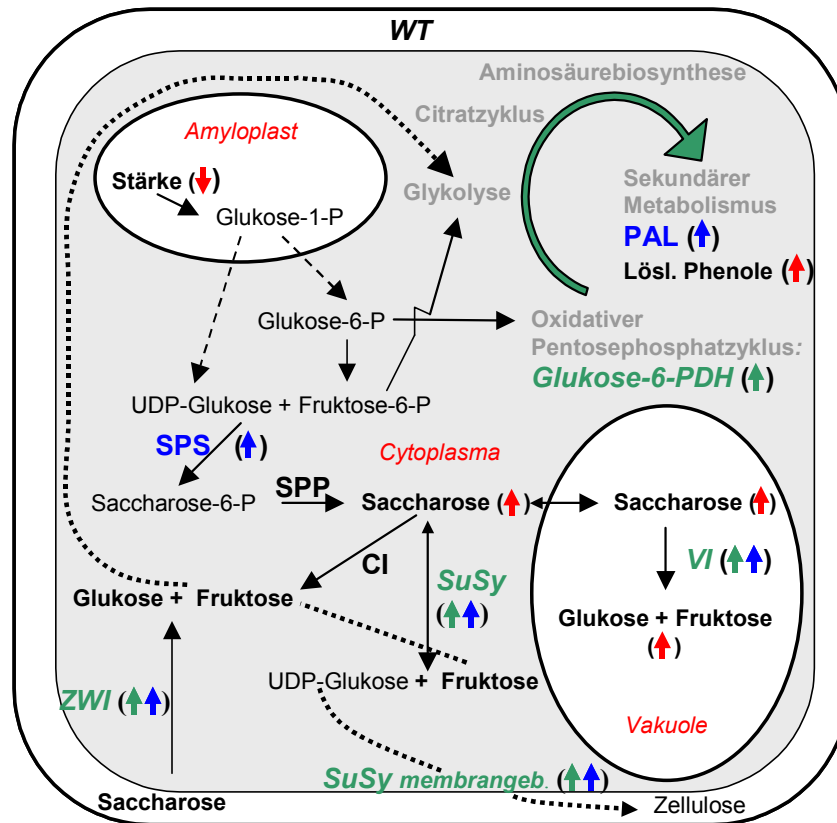
Merkliche Änderungen in der Aktivität von ZWI, VI und neutralen Invertasen sind eng korreliert mit Prozessen der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation. Transgene Karottenpflanzen mit reduzierter ZWI- oder VI-Aktivität zeigen phänotypische Veränderungen in frühesten Entwicklungsstadien (Tang et al., 1999). Dies reicht von nicht getrennten Kotylendonen bis hin zu gestauchtem Wuchs und veränderter Blattentwicklung. Die Anzucht der transgenen Pflanzen auf Medium, welches zur Saccharose noch Glukose und Fruktose enthält verhindert weitestgehend die Missbildungen und die Pflanzen zeigen einen ähnlichen Habitus zum Wildtyp. Dies zeigt, dass Invertasen eine wichtige Rolle während der Pflanzenentwicklung einnehmen, bzw. die Komposition der Zucker und der Fluss an Metaboliten entscheidend ist über Zelldifferenzierung und Zellproliferation.

Vor allem Zellwandinvertasen werden oft in Zusammenhang mit Zellteilung gebracht. Dabei ist die Regulation des Zellzyklus über Zuckermoleküle eine der Möglichkeiten, welche über die ZWI-Aktivität determiniert wird (Roitsch et al., 2000). Die Regulation des Zellzyklus wird über Phytohormone gesteuert, von denen Cytokinine eine vermutlich wichtige Rolle einnehmen. Cytokinine sind zudem Aktivatoren der Invertaseexpression. Es ist daher nicht erstaunlich, dass transgenen Tabakpflanzen, welche eine Cytokinin Überproduktion aufweisen, hohe extrazelluläre Invertasenaktivitäten in den beeinflussten Organen zeigen (Guivarc'h et al., 2002).

Ein Zusammenhang zwischen hohen Konzentrationen von Cytokininen und Auxinen und hoher Expression der ZWI findet sich auch im Tumorgewebe (Weil und Rausch, 1990, Pradel et al., 1996), was der ZWI in der Tumorgenese einen hohen Stellenwert einräumt.

Innerhalb von Verwundungsstress ist die ZWI-Expression häufig nahe der Wundoberfläche zu finden, in jener Zone, welche später das Wundperiderm bildet.

### 4.2.3 Stärkeabbau, Kohlenhydratmetabolismus und Respiration nach Verwundung



**Abb.1: Stoffwechselschema zum vermutlichen Ablauf wundinduzierten Stärkeabbaus in Zellen des Wildtypknollengewebes.** Rote Pfeile symbolisieren die untersuchten wundbedingten Veränderungen von Substrat/Produktkonzentrationen, grüne Pfeile bestimmen die Aktivität von Enzymen nach Wundinduktion, blaue Pfeile zeigen die Expression von Transkripten und/oder Proteinen nach Verwundung an. Schwarz und fett markierte Metabolite zeigen die im eigenen Experiment untersuchten Substanzen in verwundeten Kartoffelknollen an. Grün markierte Enzyme wurden auf Expression und/oder Aktivität untersucht, blau markierte ausschließlich auf die Expression des Transkripts.

Die Einwirkung von Stress auf dormante Kartoffelknollen bewirkt die Aktivierung von Transkription, Translation und des Metabolismus. Eine wichtige Funktion innerhalb der Stressantwort spielt im vegetativen Bereich der Pflanze und im besonderen Fall in Speicherorganen die Mobilisierung von Speicherstoffen.

In reifen Kartoffelknollen dient die Stärke als Hauptlieferant für Glukose-1-Phosphat, welche in die Glykolyse und als Glukose-6-Phosphat in den oxidativen Pentosephosphatzyklus einfließt (Abb.1). In industrieller Hinsicht ist es vor allem die Stärkekonzentration der Kartoffel, dessen größtes wirtschaftliches Interesse gilt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass biotechnologische Ansätze vor allem auf stärkewirksame und -abbauende Enzyme abzielen. Bezüg-



lich des Aussüßens der Knolle bei Kältelagerung unter 10°C wurde nicht nur die Verringerung der Zuckerakkumulation, sondern zudem die Reduktion des Stärkeabbaus innerhalb dieses Prozesses verfolgt. So zeigt die Klonierung eines Gens, dessen Protein in die Inkorporation von Phosphaten in stärkeähnliche Glukane verantwortlich ist, als Transgen in *antisense*-Expression in Kartoffelpflanzen eine Erniedrigung des Phosphatgehaltes in der Stärke (Lorberth et al., 1998). Dies führt zum erschwerten Abbau der Stärke, was bei Kältestress zu einer Erniedrigung des kältebedingten Aussüßens der Knollen führt.

Die Einwirkung von Stress führt in Kartoffelknollen zum Abbau von Stärke, welche im eigenen Verwundungsexperiment an Kartoffelknollen nur über die Akkumulation der Hexosen Glukose und Fruktose festgestellt wurde. Die Ausgangskonzentration der Stärke in Wildtypknollen vor Verwundung beträgt innerhalb der eigenen Untersuchungen im Mittelwert 480 µmol Glukose/g FG. 72 h nach Verwundung wurde eine Abnahme von 60 µmol Glukose/g FG im Mittelwert festgestellt, der im Verhältnis zur berechneten Standardabweichung von 80 µmol Glukose/g FG steht und daher nicht signifikant ist. Signifikante Konzentrationsabnahmen konnten bis 72 h nach Verwundung mit dem verwendeten Testsystem nicht ermittelt werden. Eigene Versuche dokumentierten die Abnahme des Stärkegehaltes in Kartoffelknollen 120 h nach Verwundung um 40% im Vergleich vor Verwundung. Der dramatische Konzentrationseinbruch der Stärke nach dieser Zeitspanne könnte einerseits auf einen logarithmisch ansteigenden Abbau der Stärke hinweisen, welcher vermutlich mit der Aktivierung des Metabolismus im dormanten Gewebe zusammenhängt. Demnach würden vorläufig deaktivierte Zyklen nach Verwundung kontinuierlich aktiviert. Andererseits können Ungenauigkeiten in der Messmethodik ein verzerrtes Bild über den tatsächlichen Stärkeabbau abgeben.

Einer dieser Zyklen und Alternativweg zur Glykolyse ist der oxidative Pentosephosphatzyklus, welcher die Breitstellung von Pentosephosphat zur Synthese von Nukleinsäuren, Triosephosphaten und NADPH als Reduktionsäquivalent durch Oxidation von Glukose-6-Phosphat sicherstellt. Den ersten Schritt dieses Zyklus katalysiert die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) unter Umsetzung von Glukose-6-Phosphat in 6-Phosphoglukonolaktone, welche die Reduktion von NADP bedingt. In Pflanzen existiert die G-6-P-DH lediglich in zwei Kompartimenten, dem Cytosol und dem plastidären Stroma (von Schaewen et al., 1995 und dort angegebene Literatur). Die cytosolische Isoform wird durch ihre Metabolite reguliert, während die plastidäre Isoform in einer lichtabhängigen Reaktion mittels Thioredoxin reguliert ist. Beide Enzyme wurden in verschiedenen Geweben der Kartoffelpflanze auf ihre Transkript-Expression untersucht. Während die plastidäre Form auf den vegetativen Bereich der Pflanze beschränkt ist, findet sich die cytosolische Isoform in allen Geweben, vor allem in der Speicherknolle. Die Verwundung von Blättern der Kartoffelpflanzen bedingte einen leichten Anstieg der cytosolischen G-6-P-DH-Expression, die mRNA des plastidären Enzyms war hingegen nicht mehr detek-

tierbar. Innerhalb der eigenen Experimente an verwundetem Kartoffelknollengewebe wurde die Erhöhung der G-6-P-DH-Aktivität 16 h nach Verwundung (Ergebnisse, Abb.12) festgestellt. Aufgrund der Daten von Schaewen et al. (1995) kann die gemessene Aktivität der cytosolischen Isoform zugeordnet werden.

Weitere Studien an Enzymen des Kohlenhydratmetabolismus (Abb.1) zeigte auch eine deutliche Wundinduzierbarkeit der Saccharose-6-Phosphat-Synthase (SPS). Gemeinsam mit dem Enzym Saccharose-6-Phosphat-Phosphatase (SPP) wird die Reaktion von energetisierten Hexosekomponenten zu Saccharose katalysiert, welche unter anderem in die Vakuole transportiert wird. Beide Enzyme sind so eng aneinander gekoppelt, dass die Transkriptmenge des einen Enzyms nach Verwundung Aufschluss über die des anderen geben kann.

SPS und SPP bilden nach Experimenten von Echeverria et al. (1997) einen Multienzymkomplex. Dabei wurde die Rate der Saccharose-6-Phosphat-Synthese und deren Hydrolyse in verschiedenen Experimenten mit partiell gereinigten Enzymen aus Spinat und Reis getestet. Durch Zugabe von SPP zu SPS wird eine Stimulation der Saccharose-6-Phosphat-Synthese erreicht. Im Gegensatz dazu wird die Hydrolyse des Saccharose-6-Phosphat inhibiert, wenn SPS ohne die entsprechenden Substrate (UDP-Glukose, Fruktose-6-Phosphat) SPP zugegeben wird. Bei Zugabe der Substrate wird die Hydrolyse des Saccharose-6-Phosphat und die damit verbundene SPP-Aktivität erhöht. Native Gelelektrophorese beider Enzyme zeigte zudem, dass SPS einen leichten Effekt auf die Mobilität des SPP-Enzyms hat. Aktivitätsstudien des Gellaufs beider Enzyme bestätigen zwei Aktivitätsspeaks. Ein Aktivitätsspeak entspricht dem freien SPS, der zweite deutet auf eine Komplexbildung beider Enzyme hin.

Die wundinduzierte mRNA-Synthese der SPS (Ergebnisse, Abb.9) in Kartoffelknollen des eigenen Experimentes zeigt, dass die Synthese von Saccharose unter dieser Stressbedingung erhöht wird. Ein Großteil der synthetisierten Saccharose wird in die Vakuole transportiert, welche das größte Kompartiment in der Zelle des Kartoffelknollengewebe darstellt. Dort wird der Transportzucker durch die lokale Invertase in die Hexosen gespalten. Durch SPS und SPP generierte Saccharose wird zudem durch cytosolische Enzyme hydrolysiert, wie z.B. neutrale Invertasen (CI, Abb.1) und Saccharose-Synthase (SuSy). SuSy existiert in löslicher und an der Innenseite der Plasmamembran gebundener Form in der pflanzlichen Zelle und letztere Isoform stellt ein wichtiges Schlüsselenzym in der Kette der Zellulosebiosynthese dar (Haigler et al., 2001). SuSy wird vor allem in sich entwickelnden Knollen exprimiert und ist in nahezu allen Gewebetypen mit unterschiedlichen Transkriptmengen vertreten (Salanoubat und Belliard, 1989). Bei Verwundung wird ein Rückgang der mRNA-Expression beobachtet, welche unter anaeroben Bedingungen jedoch wieder erneut stattfindet. Zudem wurde in Blättern und Petiolen eine Erhöhung des SuSy-Transkripts bei ansteigender Saccharosekonzentration gezeigt.

Die *antisense*-Expression von SuSy in Kartoffelpflanzen führt zu einem erhöhten Anstieg an reduzierenden Zuckern, einer Inhibition der Stärkeakkumulation und keiner Veränderung in der Saccharosekonzentration in sich entwickelnden Knollen (Zrenner et al., 1995). Die Bildung von reduzierenden Zuckern geht einher mit der bis zu 40-fachen Aktivitätserhöhung saurer Invertasen und einer bis 3,6-fachen bezüglich der neutralen Invertasen. Aus diesem Ansatz geht hervor, dass eine Reduktion der SuSy-Aktivität die Invertaseaktivität beeinflusst.

Eigene Untersuchungen bezüglich der SuSy-Transkriptexpression und der Enzymaktivität in Wildtyp-Knollen zeigen nach Verwundung eine Erhöhung der mRNA-Konzentration, aber keine signifikante Erhöhung der SuSy-Aktivität (Ergebnisse, Abb.9,10,11). Die Messung von Gesamtaktivität und selektiver Aktivität der SuSy, sowie der Aktivität membrangebundener SuSy in Kartoffelknollen zeigte keine Induktion des Enzyms nach Verwundung. Bezüglich der membrangebundenen SuSy beschreiben die Autoren Winter et al. (1997) eine gesteigerte Löslichkeit durch Phosphorylierung. Es kann daher zudem nicht ausgeschlossen werden, dass vorher membranassoziiertes Enzym durch Phosphorylierung in die lösliche Fraktion übergegangen ist.

Ein Grund für die Differenz zwischen Transkriptexpression und den Aktivitäten der SuSy könnte eine lokal begrenzte, wundinduzierte Induktion der SuSy-Expression in Kartoffelknollengewebe sein. In diesem Speicherorgan ist die Wundreaktion auf den Bereich um die Verletzung beschränkt, so auch die wundinduzierte Translation. Die mRNA-Synthese der SuSy ist folglich auf diesen bestimmten Bereich lokalisiert, während vorhandenes SuSy-Protein über das gesamte Gewebe verteilt sein könnte. Die Neusynthese des SuSy-Enzyms an der Wundoberfläche wäre dann nur ein geringer Anteil zum schon vorhandenen Protein im restlichen Gewebe. Ist dies der Fall, kann nur die Untersuchung der Wundoberfläche getrennt vom restlichen Gewebe Aufschluss über die Induktion der Proteinexpression geben.

Der in Abbildung 1 dargestellte Abbau von Stärke und die Wundinduktion von Saccharose spaltender Enzymen in reifen Knollen führt zu einer Erhöhung des Angebotes an Einfachzuckern. Dieses gesteigerte Angebot bewirkt nicht nur die Erhöhung des Metabolismus, sondern auch der Respiration. Eigene Untersuchungen des Kartoffelknollengewebes 8 h nach Verwundung dokumentieren eine einheitliche Erhöhung der Respiration in Wildtyp Kartoffelknollen (Ergebnisse, Abb.6), welche 48 h nach Verwundung wieder abnimmt. Als Atmungssubstrat dient Glukose, dass hauptsächlich aus der Stärke bezogen wird. Bemerkenswert ist, dass die Wundatmung nach eigener Rechnung bis zu 160  $\mu\text{mol}$  Glukose/g FG innerhalb 72 h nach Verwundung verbraucht, die Konzentration der Stärke in diesem Zeitraum im Mittelwert nur um 60  $\mu\text{mol}$  Glukose/g FG abnimmt. Zudem wird, wie zuvor diskutiert die Synthese von Saccharose betrieben, welche zugleich aus dem Stärkespeicher ermöglicht wird.

### **4.3 Untersuchungen zur Wundreaktion von *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformanten: Einfluss einer Inaktivierung von VI, bzw. ZWI auf Abwehrreaktionen, Wundperidermentwicklung, Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus und die Respiration im Vergleich zum Wildtyp**

#### **4.3.1 Untersuchung zur PAL-Expression und Konzentration löslicher Phenole**

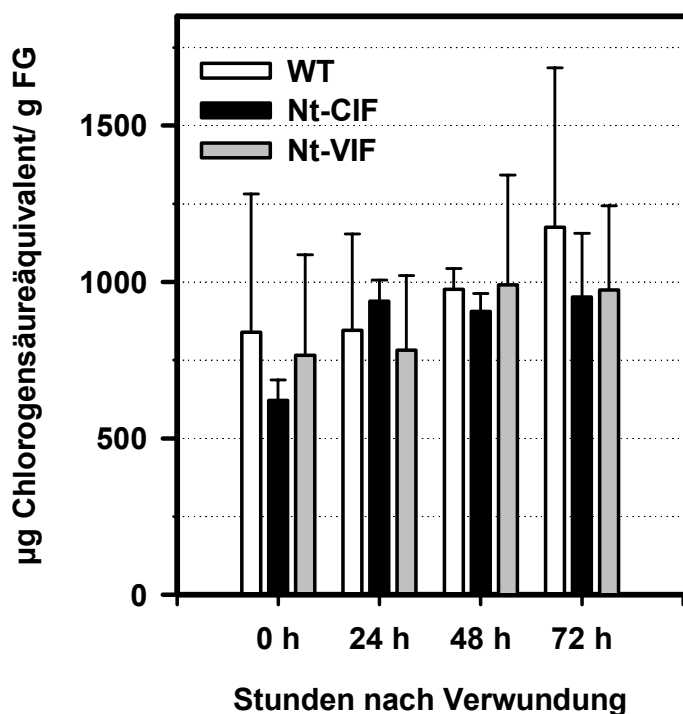
PAL gilt als Schlüsselenzym zwischen primärem und sekundärem Metabolismus. Untersuchungen an verwundetem Kartoffelknollengewebe zeigen eine schnelle Induktion des Transkripts nach Verwundung (Butler et al, 1990). Vergleiche zwischen *Nt-VIF*-, bzw. *Nt-CIF*-Transformanten und Wildtyp im eigenen Experiment zeigen bezüglich der PAL-Expression keinen Unterschied im Verlauf der Wundreaktion. Die Induktion der PAL-Expression weist auf die Benötigung von sekundären Metaboliten für Abwehr und Wundheilung hin. Stoffe, welche den Wundabschluss fördern, gehören zu der Klasse der Suberine und Kutine, aber auch komplexere phenolische Verbindungen, wie Lignine, dienen dem Wundabschluss.

Das Zuckermoleküle eine entscheidende Wirkung auf den Phenylpropanstoffwechsel haben können, zeigen Tabakpflanzen, welche Hefeinvertase im Apoplasten (CwInv) und Cytosol überexprimieren (CytInv). In Blättern dieser Tabakpflanzen wurde eine charakteristische Veränderung in der Konzentration der Komponenten des Phenylpropanstoffwechsels im Vergleich zum Wildtyp gezeigt (Baumert et al., 2001). Die Konzentration von Phenolen in Transformanten, welche Hefeinvertase im Cytosol exprimieren war erhöht, wohingegen sie in Transformanten der apoplastischen Hefeinvertase stagnierte, bzw. abnahm. Letztere zeigten zudem eine Neusynthese von Kaffeesäureamiden, wie z.B. *N*-caffeoylputrescin, und zusätzlich eine erhöhte Konzentration von Cumarinlucosiden, in diesem Fall Scopolin. Letzteres erklärt sich mit der gesteigerten Abwehrhaltung der CwInv-Transformanten, welche sich zudem in Blattlesionen und Nekrosen äußert. Die Transformanten ähneln Wildtypen, infiziert mit avirulenten Pathogenen, die phänotypisch den Tatbestand einer *Hypersensitiven Antwort* zeigen. Dies stimmt auch mit dem Resultat überein, dass an CwInv-Transformanten und Wildtyp nach Kartoffelvirus Y-Infektion beobachtet wurde. In CwInv-Transformanten wurde keine zusätzliche Zunahme von Cumarinen beobachtet, während Wildtypen eine leichte und CytInv-Transformanten eine starke Erhöhung der Konzentration zeigten.

Die Ergebnisse ermittelt an den CwInv- und CytInv-Pflanzen lassen den Schluss zu, dass Invertasen regulatorisch in den sekundären Metabolismus eingreifen. Aufgrund dessen wurde die Untersuchung bezüglich der wundbedingten Akkumulation löslichen Phenolen an *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-

Transformanten, welche eine Reduktion der ZWI-Aktivität und eine posttranslationale Unterdrückung der VI-Aktivität aufweisen, durchgeführt. Dabei war zum einen die Ausgangskonzentration in den Transformanten und Wildtyp von Bedeutung, aber auch die Veränderung des löslichen Phenolgehaltes während der Verwundung. Die Messung der Gesamtmenge an löslichen Phenolen in den Kartoffelknollen zeigt deren Anstieg im Verlauf der Verwundung in Wildtyp und Transformante (Abb.2) gleichermaßen. Die Ermittlung der löslichen Phenole über die HPLC-Messung könnte Aufschluss über eine differenzierte Verteilung der einzelnen Phenolsäuren in Wildtyp und Transformanten geben, die mit der verwendeten Methode jedoch nicht möglich ist.

Die im eigenen Test ermittelten Ergebnisse zur Konzentration löslicher Phenole zeigten einerseits einen hohen Grundgehalt und eine schwache Zunahme an löslichen Phenolen (Abb.2). Nach Laanest et al. (1995) ist die Akkumulation von Phenolen lichtabhängig und daher ausschlaggebend für deren Konzentrationszunahme. Das Verwundungsexperiment an *Nt-CIF*-, *Nt-VIF*-Transformanten und Wildtyp-Kartoffelknollen wurde im Dunkeln durchgeführt, bzw. die Scheibchen während der Inkubationszeiträume bei Dunkelheit belassen. Dies könnte ein Erklärungsansatz zur mäßigen Akkumulation der löslichen Phenole in diesem Experiment sein.



**Abb.2:** Darstellung der Konzentrationen von löslichen Phenolen in Kartoffelknollengewebe nach Verwundung. Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus jeweils 3 unabhängigen Proben (Knollen). Angegeben sind die Äquivalente zu einer Chlorogensäure-Eichkurve.

### **4.3.2 Bildung von Wundperiderm und die Einlagerung von Wachsen an der Wundoberfläche**

Zellwandinvertasen sind wichtige Enzyme innerhalb der Prozesse Zellteilung und Zellstreckung (s. Diskussionsteil 4.2.2). *Nt-CIF*-Transformanten mit inhibierter ZWI-Aktivität zeigen keine Veränderung in der Bildung eines Wundperiderms im Vergleich zum Wildtyp. Erklärungen für dieses Ergebnis könnte einerseits der hohe Substratfluss in den Bereich des betroffenen Gewebes sein, sowie hohe Saccharosekonzentrationen. Diese können den Substratschutz der Invertasen vor Inhibitorproteinen bewirken (Weil und Rausch, 1990). Möglicherweise ist dieser Effekt lokal begrenzt und im gesamten Scheibchen nicht erkennbar. Nachweislich ist die ZWI-Aktivität in den *Nt-CIF*-Transformanten auf 10% zur Wildtypaktivität inhibiert (Ergebnisse, Abb.2).

Der Einzug von neuen Zellwänden als Wundabschluss wird durch die Synthese von Zellulose ermöglicht. Enzyme, welche eine wichtige Rolle in der Zellulosebiosynthese spielen, sind die Zellulose-Synthase und die membrangebundene Saccharose-Synthase. Vermutlich findet ein kontinuierlicher Fluss des Substrates UDP-Glukose von membrangebundener Saccharose-Synthase zur Zellulose-Synthase statt, welches zur Synthese des komplexen  $\beta$ -1,4-Glukan herangezogen wird (Haigler et al., 2001). Membrangebundene Saccharose-Synthase ist daher ebenso in den Vorgang der Zellteilung involviert, wie der Bereitstellung von Fruktose für die angeführten cytosolisch lokalisierten Enzyme (Abb.3). Die Saccharose-Synthase-Aktivität ist im eigenen Experiment in den Transformanten nicht beeinflusst, sowie sind in den untersuchten Kompartimenten vor Verwundung Enzymaktivitäten dokumentiert.

### **4.3.3 Stärkeabbau und Wundatmung in den Transformanten**

Die Unterdrückung der kälteinduzierten vakuolären Invertase in *Nt-VIF*-Transformanten bedingte bei Lagerung der Knollen unter 10°C eine Vermeidung der Hexosebildung, aber keine signifikante Veränderung im Stärkegehalt im der Transformanten im Vergleich zum Wildtyp. Zudem zeigte sich nach Kältelagerung eine Erhöhung der Saccharosekonzentration in den Transformanten, die teilweise das 3-fache zum Wildtyp betrug (Greiner, 1999).

Unter Verwundungsstress verhalten sich die *Nt-VIF*-Transformantenlinien vergleichbar zum Kältestress. Die wundbedingte Hexoseformation bleibt aus und die Konzentration der Saccharose nimmt bis 72 h nach Verwundung um 50% zu (Ergebnisse, Abb.3), es ist jedoch kein signifikanter Stärkeabbau bis zu diesem Zeitpunkt und kein Unterschied zwischen Transformante und Wildtyp ermittelbar. Ein signifikanter Stärkeabbau konnte erst 120 h nach Verwundung, in Transformanten und Wildtyp äquivalent, bestimmt werden, welcher eine Reduktion von 40% zur Konzentration vor Verwundung zeigte. Grund für dieses

Ergebnis könnte einerseits Ungenauigkeiten verursacht durch die verwendete Methode oder ein logarithmisch ansteigender Stärkeabbau sein.

Als Hauptspeicherpolymer und Energielieferant stellt die Stärke in Kartoffelknollen die Quelle für die Metabolite des Kohlehydratmetabolismus und der Respiration dar. Die Abbauprodukte der Stärke fließen in die Stoffwechselwege der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus und den Oxidativen Pentosephosphatzyklus ein. Die G-6-P-DH katalysiert den ersten Schritt im oxidativen Pentosephosphatzyklus, welcher die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten, Pentosephosphat und Triosephosphat sichert. Die Anwendung von Verwundungsstress an den Knollen der *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp erbrachte eine Erhöhung der G-6-P-DH-Aktivität (Ergebnisse, Abb.12). Transformanten und Wildtyp verhalten sich in Verlauf und Höhe der Aktivität gleich und die Unterdrückung von VI oder ZWI in den Transformanten hat keinen Einfluss auf die Aktivität der G-6-P-DH. Ein Einfluss von apoplastischer Glukose als Signalgeber oder fehlende Bildung von Glukose in der Vakuole verändern den Verlauf der wundbedingten Aktivitätserhöhung des Enzyms nicht.

Ebenso wird der Aufbau von Saccharose aus dem Stärkespeicher getätigt (Abb.3). Die aus der Katalyse von SPS und SPP hervorgehende Saccharose wird hauptsächlich in die Vakuole transportiert und dort durch die ansässige VI in die Hexosen gespalten. Innerhalb des Wundmetabolismus hat dieser Vorgang vermutlich zwei Funktionen. Er dient einerseits der Energieversorgung des größten Kompartiments der Zellen des Kartoffelknollengewebes und der Osmoregulation. Aus Saccharose gewonnene Hexosen tragen zur Erhöhung des osmotischen Potentials in der Zelle bei, was dem Austrocknen entgegenwirkt und vor allem angrenzend an Wundflächen ein sehr nützlicher Prozess ist. Auch die Akkumulation von Saccharose bedingt die Erhöhung des osmotischen Potentials der Zelle. Zudem wird der Transport von Zuckern in andere Zellen durch die Synthese von Saccharose ermöglicht. Ein Ferntransportsystem existiert in der Knolle nicht, es ist daher davon auszugehen, dass nur benachbarte Zellen von der Wundreaktion und der Saccharose-Neusynthese beeinflusst werden.

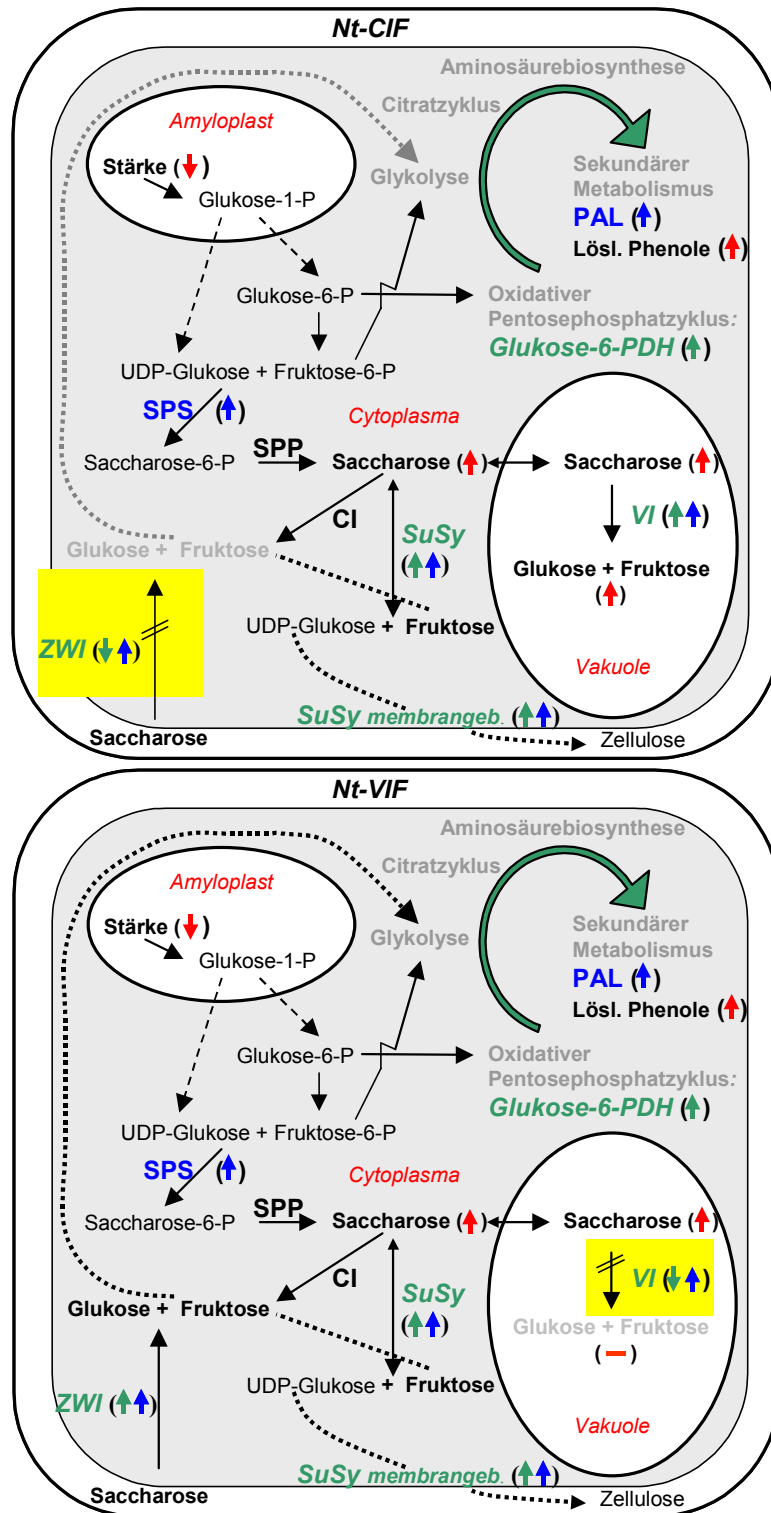
Die Saccharose-Neusynthese erklärt auch die vakuoläre Saccharoseakkumulation in den *Nt-VIF*-Transformanten, die aufgrund ausbleibender Hexosebildung stattfindet. Dies führt zu einer 50%-Erhöhung des Saccharosegehaltes in den genannten Transformanten nach 72 Stunden Verwundung im Vergleich zum Wildtyp. Die zu Experiment II gemessenen Zuckerkonzentrationen zeigen in den *Nt-VIF*-Linien eine bis zu 4-fache Erhöhung des Transportzuckers (Anhang, Tabelle 2b). In Bezug auf die *Nt-VIF*-Transformanten ergibt sich daraus, dass die Inhibition der VI keinen Einfluss auf die Wundaktivierung von SPS und sehr wahrscheinlich SPP hat. Versuche von Trethewey et al. (1999) zeigen, dass SPS verstärkt durch das Substrat reguliert wird und weniger über den Tatbestand des *sugar signaling* der eingebrachten Hefeinvertase. Eine Erhöhung

von Glukose-6-Phosphat als Folge von überexprimierter Hefeinvertase führt zu einer Aktivitätserhöhung der SPS-Aktivität. In Knollengewebe der *Nt-VIF*-Transformanten ist daher allein aufgrund der Inhibition der VI keine Substratlimitierung hinsichtlich der Enzyme SPS und SPP gegeben.

Die nach Verwundung im Cytosol generierte Saccharose wird hauptsächlich in die Vakuole importiert. Die Saccharosekonzentration ist vermutlich in Cytosol und Vakuole gleich, der Gesamtsaccharosegehalt aufgrund der stark differierenden Größen der Kompartimente zu > 90% der Vakuole zuzuordnen. Die vakuoläre Akkumulation des Transportzuckers in *Nt-VIF*-Transformanten ist daher die Folge einerseits der Größe und Speicherkapazität der Vakuole in diesem Gewebe und eines aktiven Transportes des Zuckers in das Kompartiment. Es ist davon auszugehen, dass ein kleiner Teil der Saccharose wieder aus der Vakuole gelangt, bzw. transportiert wird und somit den cytosolischen Enzymen zufließt. Bis auf weiteres ist jedoch kein Einfluss der erhöhten Saccharosekonzentration in der Vakuole der *Nt-VIF*-Transformanten auf die Stoffwechselwege im Cytosol nachgewiesen. Weder G-6-P-DH, noch SPS und SuSy sind in Expression oder Aktivität betroffen.

Auch das Unterbleiben der Hexosebildung in der Vakuole der *Nt-VIF*-Transformanten stellt keinen nachweisbaren Nachteil für das Gewebe dar. Aufgrund des erheblichen vakuolären Anteils am Gesamtgehalt der Hexosen in den Zellen, wurde die Wundatmung bezüglich der *Nt-VIF*-Transformanten dokumentiert, da Glukose als Atmungssubstrat bei verminderter Konzentration eine erniedrigte Respirationsrate auslösen könnte. Jedoch belegten mehrere Versuchsreihen eine schwache Erhöhung der Respirationsrate innerhalb 24 bis 48 Stunden nach Verwundung in *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp. Aus jetzigen Stand der Untersuchungen und Ergebnisse sind Erklärungen, welche für die Erhöhung der Atmung in den Transformanten sprechen, schwer zu formulieren.





**Abb.3: Stoffwechselschema zum vermutlichen Ablauf des wundinduzierten Stärkeabbaus in *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Transformanten.** Rote Pfeile/Striche symbolisieren die Veränderungen von Substrat/Produktkonzentrationen, grüne Pfeile bestimmen die Aktivität von Enzymen, blaue Pfeile zeigen die Expression von Transkript und/oder Protein nach Verwundung an. Schwarz und fett markierte Metabolite zeigen die im eigenen Experiment untersuchten Substanzen in verwundeten Kartoffelknollen. Grün markierte Enzyme wurden auf Expression und/oder Aktivität untersucht, blau markierte ausschließlich auf die Expression des Transkripts. Das gelbe Kästchen hebt die Beeinflussung durch den transgenen Ansatz hervor.

#### 4.3.4 Bewertung der Befunde aus biotechnologischer Sicht

Die Transgen-Expression von *Nt-CIF* und *Nt-VIF* in Kartoffelpflanzen wurde mit dem Ziel verfolgt das *cold sweetening* in Kartoffelknollen bei Lagerung unter 10°C zu reduzieren. Das postulierte und mittels Kälte-Experimenten an den *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Transformanten bestätigte verantwortliche Enzym für die kältebedingte Hexosebildung ist die vakuoläre Invertase. Insgesamt zeigen beide Transformationen keine biochemischen Nachteile für die Pflanzen, bzw. das Knollengewebe. In Stärkegehalt unterschieden sich die *Nt-VIF*-Transformanten nach Kältelagerung nicht vom Wildtyp und wiesen lediglich eine Erhöhung der Saccharosekonzentration auf (Greiner, 1999).

Das Verwundungsexperiment zeigt in den Grundzügen die Ergebnisse, welche beim Kältestress erzielt wurden. Verwundungsstress führt in den Kartoffelknollen zur Bildung von Hexosen, welche in verschiedene Stoffwechselwege einfließen (Abb.1). In den *Nt-VIF*-Transformanten unterbleibt die Saccharosehydrolyse in der Vakuole (Abb.3), was einschneidende Folgen auf den gemessenen Gesamtgehalt der Hexosekonzentration im Knollengewebe nach Verwundung hat. Die Tatsache, dass die Vakuole als Speicherorgan fungiert, bewirkt, dass Manipulationen an vakuolären Enzymen, wie z.B. der VI, messbare Unterschiede in den Substrat/ Produktkonzentrationen des Enzyms erzeugen. Die Inhibition der ZWI in den *Nt-CIF*-Transformanten scheint bezüglich der Gesamtkonzentration an Hexosen daher folgenlos zu bleiben. Folgenlos ist zudem der Einfluss der Transformationen auf die untersuchten Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus (G-6-P-DH, SuSy, SPS), sowie die Wundheilung (Wundperidermbildung) und den sekundären Metabolismus (PAL, lösliche Phenole, Suberinisierung). Die Technologie der Regulation von Invertasen über eingebrachte Inhibitorproteine bedingt daher keine negativen Veränderungen des Wundmetabolismus.

Da nach Verwundung die Gefahr von eindringenden Fremdorganismen groß ist, wird die Synthese einer Anzahl an Abwehrstoffen gefördert, unter anderem auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diese reaktive Sauerstoffspezies (ROS) schadet nicht nur Eindringlingen, sondern auch der Zelle. Ein Stoffwechselprodukt, welches die Konzentration an ROS minimiert, ist z.B. Glutathion. Glutathion ist eines der wichtigsten Redoxreagenzien in Pflanzen, das verschiedene Funktionen in der pflanzlichen Zelle einnimmt (Foyer et al., 2001). Im eigenen Experiment nimmt die Gesamt-GSH-Konzentration bis 16 Stunden nach Verwundung ab, regeneriert sich jedoch danach wieder und entspricht 48 Stunden nach Verwundung fast dem Ausgangswert vor Verwundung (Ergebnisse, Abb.12). Die Abnahme der GSH-Konzentration weist auf den Bezug von GSH als Schwefelquelle zur Produktion von Proteinen hin. Die nachfolgende Regeneration der Konzentration lässt auf die Neusynthese des Redoxreagenz schliessen.

Die Veränderung des Redoxpotential in der Zelle verursacht durch Stress und das Einwirken von Redoxreagenzien, wie z.B. GSH, deutet auf eine weitere

Möglichkeit der posttranslationalen Regulation wundinduzierter Enzymen/ Proteinen hin. Thioredoxin reguliert z.B. die plastidäre Form der G-6-P-DH innerhalb einer lichtabhängigen Reaktion. Auch die Inhibitoren besitzen vier konservierte Cysteinreste, die möglicherweise zwei Disulfidbrücken bilden und vermutlich eine Rolle für die Aktivität des Inhibitors spielen. Obwohl die Redoxregulation des Inhibitors noch nicht vollständig geklärt ist, besteht die Möglichkeit, dass *in vivo* die Aktivität von transgenem Inhibitor durch Veränderungen im Redoxpotential der Zelle beeinflusst wird.

Auch die Phosphorylierung von Proteinen und Enzymen kann einen entscheidenden Beitrag in der Regulation unabhängig von der Transkriptmenge leisten. Die Phosphorylierung der membrangebundenen Saccharose-Synthase führt zur erhöhten Hydrolyseaktivität und Löslichkeit des Enzyms (Huber et al., 1996; Winter et al., 1997). Unabhängig von der Translation können daher auch andere Mechanismen, wie Redoxregulation und Phosphorylierungsreaktionen in den Wundmetabolismus eingreifen.

#### 4.4 Prüfung der Hypothese, ob eine stark erhöhte ZWI-Aktivität in *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Tumoren essentiell für das Tumorwachstum ist

Ziel der Untersuchung des Tumorwachstums an Kartoffelknollengewebe, induziert durch Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens*, von Transformanten im Vergleich zum Wildtyp war die Funktion und die Wichtigkeit der Invertasen innerhalb Tumoretablierung und -wachstum. Da die Bildung des Tumors aus dem pflanzlichen Gewebe getätigt wird, d.h. die Zellen des Tumors in genetische Hinsicht identisch mit den Zellen der Pflanze sind, stellten *Nt-CIF*- und *Nt-VIF*-Transformanten eine wichtige Voraussetzung zur Untersuchung von ZWI und VI während der Tumorinduktion. Die posttranslationale Unterdrückung der Invertasen durch die überexprimierten Inhibitorproteine sollte zeigen, ob die Etablierung eines Tumors überhaupt ermöglicht wird, oder ob eine zeitliche Variation zwischen Wildtyp und Transformanten besteht.

Die Infektion von dikotylen Pflanzen durch *Agrobacterium tumefaciens* und die anschließende Bildung eines Tumors verläuft nach folgendem Schema. Die T-DNA des Bakteriums wird in die Pflanze eingeschleust und darauf befindliche Gene nach Integration in die pflanzliche DNA exprimiert. Diese kodieren für wichtige Enzyme zur Auxin- und Cytokinin-Synthese, sowie ungewöhnliche Aminosäure- und Zuckerderivate (Opine). Pflanzentumore sind *Sink*-Gewebe, welche ein starkes Attraktionszentrum für Metabolite und Wasser darstellen. Letzteres erklärt auch die hohe Transpirationsrate des Gewebes und zudem zeichnet sich der Tumor durch eine erhöhte Respirationsrate aus.

Sogenannte *Grown gall*-Tumore an *Ricinus communis* Internodien zeigen viele dieser genannten Aspekte. Das Tumorgewebe verhält sich damit grundlegend verändert zum nicht infizierten Gewebe und ist vergleichbar mit meristematischen Gewebetypen. Die ZWI-Aktivität in *Grown gall*-Tumoren ist stark erhöht zum angrenzenden Gewebe (Pradel et al, 1996). Die Autoren begründen diese gesteigerte Enzymaktivität mit der Rückgewinnung von Saccharose aus dem Apoplasten, da hohe ZWI-Aktivitäten oft unverwechselbare Indikatoren für apoplastische Phloementladung sind. Ein weiterer Grund für die erhöhte Enzymaktivität ist die bis zu 7-fach erhöhte Hexosekonzentration im Tumorgewebe, da Glukose die Expression von Genen stimuliert, welche für ZWI kodieren (Roitsch et al., 1995). Zudem bewirkt die erhöhte Konzentration von Saccharose im Tumorgewebe Substratschutz der Invertase gegenüber den Invertaseinhibitoren (Weil et al., 1994).

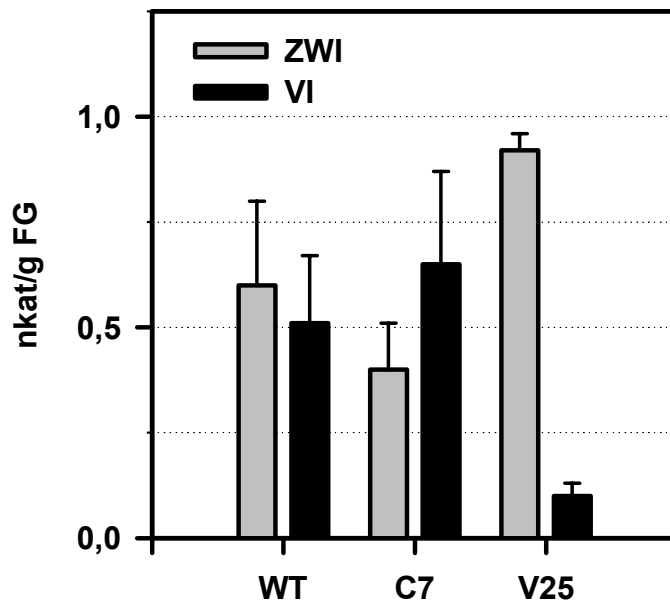
Die Tumorinduktion und deren Untersuchung wurde auch an Blättern von Kalanchoe und an Internodien von Tabakpflanzen durchgeführt (Weil und Rausch, 1990). Im Tumorgewebe wurde eine 2-fache Steigerung der ZWI-Aktivität im Vergleich zu angrenzendem Gewebe gemessen und es zeigt sich

eine deutliche Verschiebung der dominierenden Invertaseaktivität. Die ZWI-Aktivität ist in Tumorgewebe immer deutlich höher als die VI-Aktivität, während im angrenzenden Gewebe die VI- über der ZWI-Aktivität dominiert (Pradel et al, 1996).

Der Grund für die hohe ZWI-Aktivität im Tumor ist die Synthese der Phytohormone (Auxine, Cytokinine), welche durch die Transformation der bakterieneigene T-DNA eingeleitet wird. Dies zeigen auch mittels *Agrobacterium tumefaciens*-transformierten Zellkulturen, welche Mutationen in der T-DNA bezüglich der Auxinbiosynthese (SR1-gen1 Mutante) vorweisen (Weil und Rausch, 1990). Zellkulturen, welche mit unveränderter T-DNA (SR1) transformiert wurden, zeigen die höchste ZWI-Aktivität, da sie nachweislich die höchste Auxinkonzentration im Vergleich zu nicht transformierten Zelllinien und der Mutante aufweisen. Externe Zugabe von 1-NAA (Naphth-1-yllessigsäure) stimulieren die ZWI-Aktivität in der SR1-gen1 Mutante, nicht die der SR1-Zellkultur.

Aber auch Cytokinine steigern die Expression von Invertasetranskripten (Ehneß und Roitsch, 1997). In Maispflanzen werden zwei vakuoläre Invertasen über Zucker und Cytokinine reguliert (Koch et al., 1996). Es wird daher deutlich, dass die Synthese der Phytohormone die Induktion der Invertase-Expression hervorrufen und damit auf eine bedeutende Rolle der Enzyme im Tumorgewebe hinweisen.

Das Tumorwachstum an Kartoffelknollengewebe der *Nt-VIF*- und *Nt-CIF*-Transformanten zeigte keine Auffälligkeiten vergleichend zum Wildtyp. Die Annahme, dass eine posttranslationale Unterdrückung der ZWI-Aktivität in den *Nt-CIF*-Transformanten die Tumorinduktion erschwert, konnte nicht bewiesen werden. Innerhalb der eigenen Experimente konnte an Kartoffel-Wildtyp-Tumorgewebe die 4-fache Erhöhung der ZWI-Aktivität im Vergleich zu Tumorangrenzendem Gewebe gezeigt werden. Die VI-Aktivität im Tumorgewebe ist im Wildtyp um Faktor 5 zum angrenzenden Gewebe erhöht. Dies entspricht auch den Daten von Weil und Rausch (1990) und Pradel et al. (1996) und zeigt zudem, dass auch vakuoläre Invertasen in Tumorgewebe verstärkt exprimiert werden. Dies korreliert mit dem Befund von Koch et al. (1996), welche die Regulation von vakuolären Invertasen aus Mais über Zucker und Cytokinine zeigen. Die hohe Konzentration des Phytohormon im Tumorgewebe und der verstärkte Fluss von Saccharose in den Tumor erklären die im Wildtyp ermittelte hohe Aktivität des Enzyms. Die Inhibition der Invertaseaktivität durch die überexprimierten Inhibitoren wurde in Tumor und angrenzendem Gewebe der Transformanten dokumentiert. Trotz konstitutiver Inhibitorexpression in den *Nt-CIF*-Transformanten erreicht die ZWI-Aktivität in Tumorgewebe jedoch 50% der Aktivität ermittelt in Wildtyp-Tumoren. Die Aktivität der VI ist in Tumor und angrenzendem Gewebe der *Nt-VIF*-Transformanten vergleichend zur ZWI-Aktivität in den *Nt-CIF*-Transformanten stärker inhibiert. Dieser Aspekt zeigt, dass die Expression der ZWI eine bedeutende Rolle für den Metabolismus des Tumors spielt.



**Abb.4:** Aktivitäten der ZWI und VI in 14 Tage alten Tumoren, induziert an Kartoffelknollengewebe. Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus mehreren zusammengeführten Proben.

Vermutlich existieren zudem Unterschiede in der ZWI-Expression innerhalb bestimmter Phasen der Tumorentwicklung, die wesentlich sind für dessen Etablierung. Untersuchungen an jüngeren Tumoren von Kartoffelknollengewebe zeigten keine ausreichende Inhibition der ZWI-Aktivität in Tumoren von *Nt-CIF*-Transformanten (Abb.4). Die Aktivität der VI war in Tumoren von *Nt-VIF*-Transformanten vergleichsweise stärker inhibiert. Die über den CamV35S-Promotor regulierte Inhibitorexpression ist in fast allen Geweben der Kartoffelpflanze konstitutiv, aber in der initialen Phase der Tumorbildung ist die Expression des Inhibitors deutlich unter der bakterien-induzierten ZWI-Expression. Es gelingt daher nicht die ZWI-Aktivität unter einen kritischen Schwellenwert zu inhibieren, um das Tumorstadium zu verhindern (Abb.4). Das bedeutet, dass die Aktivität des Enzyms unter einen Schwellenwert sinken muss, damit die Etablierung des Tumors unterbunden wird. Zudem weist die Erhöhung der VI-Aktivität in den *Nt-CIF*-Transformanten und die Erhöhung der ZWI-Aktivität in den *Nt-VIF*-Transformanten vergleichend zum Wildtyp, welche in Abbildung 4 dokumentiert ist, auf die Regulation zwischen VI und ZWI im Tumorgewebe hin. Die durch Alterung des Tumorgewebes erzeugte Veränderung in der Aktivität der Invertasen zeigt zudem auf die zeitliche Differenzierung der Invertaseexpression in den Kartoffeltumoren.

Die Verteilung der Zucker ist in Tumor und angrenzendem Gewebe ähnlich. Während *Nt-CIF*-Transformanten und Wildtyp hohe Hexosekonzentrationen zu Ungunsten der Saccharosekonzentration vorweisen, ist in *Nt-VIF*-Transformanten der Gehalt an Saccharose doppelt so hoch, wie die der Hexosen. Dies begründet sich vor allem mit der erniedrigten VI-Aktivität der Transformante und der unterbundenen Saccharosehydrolyse in der Vakuole.

Deutlich differenziert zeigen sich die eigenen Ergebnisse zu den Ergebnissen der Autoren Pradel et al. (1996) bezüglich des Gesamtgehaltes der gemessenen Zucker, welche im eigenen Experiment in Wildtyp und Transformanten im angrenzenden Gewebe um Faktor 3 höher als in Tumorgewebe sind. Pradel et al. (1996) zeigten in den Untersuchungen des Tumorgewebes eine deutlich erhöhte Konzentration an Saccharose und den Hexosen im Vergleich zum angrenzenden Gewebe. Im Falle der Kartoffeltumore spricht dies nicht für die Aussage, Tumorgewebe sei ein Attraktionszentrum für Metabolite und allein die Tatsache der erhöhten Zellwandinvertase in diesem Gewebe weist auf einen hohen Umsatz von Saccharose zu den Hexosen hin. Vermutlich ist die vergleichsweise niedrige Konzentration von Gesamtzuckern im Tumorgewebe gegenüber dem angrenzenden Gewebe die Folge der erhöhten Metabolisierung des Zuckers im Tumor. Das Scheibchen verfügt zudem über den größeren Stärkevorrat, welcher in den Tumorzellen schon weitgehend verbraucht sein dürfte. Die hohe Zuckerkonzentration in den Scheibchen ist daher auch die Folge eines vermehrten Stärkeabbaus, beeinflusst auch durch die Nachbarschaft des Tumorgewebes.

#### 4.5 Ausblick

Die ektopische Expression von Nt-CIF und Nt-VIF in Kartoffelpflanzen zeigt mehrere Vor- und Nachteile in der Regulation von Invertasen unter Stressbedingungen. Die Einbringung von Inhibitorproteinen ist eine effiziente Methode zur Ausschaltung spezifischer Invertasen und deren Isoformen. Rekombinantes Nt-CIF-Protein wurde *in vitro* an diversen Invertasepräparaten auf dessen Funktion getestet (Greiner, 1999) und nach den ermittelten Ergebnissen darf daher die Möglichkeit der Inhibition von vakuolären Invertasen bei Transformation durch Nt-CIF nicht ausgeschlossen werden (Sander et al., 1996). Dies wird aber vermutlich durch die Kompartimentierung in der Zelle unterbunden.

Innerhalb der Experimente zum Wundstress an Nt-CIF- und Nt-VIF-Transformanten wurde durch die Inhibition der VI die wundinduzierte Saccharosehydrolyse in der Vakuole unterbunden, was einschneidende Veränderungen des messbaren Gesamthexosegehaltes bewirkte. Innerhalb der Wundreaktion war die Expression des transgenen Inhibitorproteins ausreichend, die Prävention der VI-Aktivität und der dadurch resultierenden Hexosebildung zu leisten. Doch zeigt sich die Expression des Inhibitors stark von der Promotoraktivität (CamV35S) abhängig, wenn eine Infektion des Gewebes mittels *Agrobacterium tumefaciens* eingeleitet wird. Die bakterieninduzierte Expression von ZWI und VI übertrifft die Expression des Transgens und dies bedingt nur die fragmentäre Inhibition der Invertaseaktivitäten. Das Tumorstadium war daher unbeeinträchtigt und die funktionell wichtige ZWI lediglich zu maximal 50% in Tumorgewebe inhibiert. In der sensiblen Zeitphase zu Beginn der Tumorstadiuminduktion ist

die ZWI in *Nt-CIF*-Transformanten nur 25% zur Wildtypaktivität reduziert (Abb.4). Die Verwendung eines tumorspezifischen Promotors könnte vermutlich innerhalb dieses Experimentes die Probleme bezüglich der Inhibitorexpression beheben. Möglicherweise bedingt diese Transformation Nachteile während der Entwicklung, bzw. der Knollenbildung der Pflanze.

Die Einbringung von Inhibitorproteinen beinhaltet auch die Gefahr der Regulation des transgenen Inhibitors *in vivo*. Da das Protein vermutlich redox-reguliert ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die pflanzliche Zelle zudem die Aktivität des Inhibitors reguliert. Auch Substratkonzentrationen innerhalb des Gewebes können Einfluss auf die Aktivität der Invertasen haben. Die ZWI wird z.B. über die Saccharosekonzentration vor Inhibition geschützt (Weil et al., 1994; Krausgrill et al., 1997). Da noch kein Nachweis eines knollenspezifischen Inhibitors existiert, kann über dessen Regulation in diesem Gewebe nur spekuliert werden.

Andere Strategien, welche die Invertaseexpression beeinflussen wie z.B. die *antisense*-Expression der VI in Kartoffelpflanzen, wurden zur Vermeidung kältebedingter Hexosebildung durchgeführt (Zrenner et al., 1996). Die Transformation führt jedoch nicht zur effektive Reduktion der kältebedingt ansteigenden Hexosekonzentration. Dies wurde einerseits mit der noch vorhandene Restaktivität der VI von über 5% und das Vorhandensein von nicht beeinflussten Isoformen der VI begründet. Die ektopische Expression des *Nt-VIF* allerdings konnte die kältebedingte Hexosebildung verhindern, was die Isoformenproblematik im *antisense*-Ansatz hervorhebt. Die Expression des Inhibitors schaltet vermutlich Isoformen der VI aus, welche im *antisense*-Ansatz nicht betroffen waren. Zudem ist ungeklärt, ob die Reduktion des Invertasetranskripts innerhalb der *antisense*-Expression mögliche Wechselwirkungen des Transkripts unterbindet. Auch die Anwendung von RNAi als weitere experimentelle Strategie weist einen schwerwiegenden Nachteil auf. Die Einbringung von doppelsträngiger RNA (RNAi) ist ein bis zu 10-fach effektiverer Mechanismus für *gene silencing* als *antisense*-Ansätze (Hannon, 2002). Auch unter Verwendung knollenspezifischer oder stressspezifischer Promotoren ist diese Methode ungeeignet zur Regulation der Invertasen in Kartoffelknollengewebe. Folgende transgene Pflanzen, akkumulieren weder Transkript noch Protein der entsprechenden Invertase und wirft die Problematik nicht geklärter Wechselwirkungen mit andere Transkripten oder Proteinen auf. Es ist daher auch nicht unlogisch, dass in Konsequenz dessen, *knock-out*-Transformationen von VIs an Kartoffelpflanzen zur Beeinflussung stressbedingter Hexosebildungen nicht realisierbar sind, da die funktionell wichtigen Invertaseexpression in der gesamte Pflanze beeinflusst wäre.

Die Inhibitoren sind daher eine Alternative zur funktionellen Regulation von Invertasen, welche zur gezielten Anwendung innerhalb transgener Ansätze eingesetzt werden können.



## 5 Material

### 5.1 Pflanzenmaterial

Zur Untersuchung der Wundreaktion an Kartoffelknollengewebe dienten transformierte Kartoffelpflanzen der Varietät SOLARA (*Solanum tuberosum* L. var. SOLARA). Es standen zwei Transformantentypen zur Verfügung:

- Kartoffelpflanzen, welche mit dem apoplastischen Inhibitor aus Tabak (**Nt-CIF**, Accession number: Y 12805) transformiert wurden und
- Kartoffelpflanzen, welche den putativen Inhibitor der vakuolären Invertase aus Tabak (**Nt-VIF**, Accession number: Y 12806) exprimieren.

Die Transformation mit beiden Genen wurde in *sense*-Orientierung durchgeführt und stehen unter der Kontrolle des CamV35S-Promotors (Greiner et al., 1999; Greiner 1999). Als Kontrollpflanzen dienten untransformierte Kartoffelpflanzen der genannten Varietät. Die Anzucht erfolgte in einem Gemisch aus Torfkultursubstrat (TKS, Torfstreuverband Oldenburg), Frühstorfererde (Firma Achut) und Rheinsand (Firma Schäfer, Mannheim) in einem Verhältnis 62:31:7 in 21 cm Töpfen. Die Licht- zu Dunkelperiode betrug 16 zu 8 h bei 21°C, bzw. 18°C unter konstanter Luftfeuchtigkeit von 60%.

### 5.2 DNA-Sonden

Zur Durchführung der Northern Blot-Analyse wurden nicht radioaktiv markierte DNA-Sonden (Biotin) verwendet. Zur Detektion der gewünschten mRNA wurden folgende DNA-Sonden hergestellt (Sondengröße 800-1000bp):

- 1.) Zellwandinvertase aus *Solanum tuberosum* (Acc.nu.: Z22645)  
Primer/ links: TGGATIAACGATCCAAATGGACCIATG (Inv-1, 27-mer)  
Primer/ rechts: TCAAAGAAIGTCTTKGAIGCRTA (Inv-4, 23-mer)
- 2.) Vakuoläre Invertase aus *Solanum tuberosum* (Acc.nu.: AJ305044)  
Primer/ links: GCAAATCTTGCGTACCCC (19-mer)  
Primer/ rechts: CTGAAACCTACATGATCTGC (20-mer)
- 3.) Saccharose-Synthase aus *Solanum tuberosum* (Acc.nu.: M18745)  
Primer/ links: GTTGTTGAGGAGCTGTCTGT (20-mer)  
Primer/ rechts: ACTTCAAAGCGAGAGATCCA (20-mer)
- 4.) Saccharose-Phosphat-Synthase aus *Solanum tuberosum* (Acc.nu.: X73477)  
Primer/ links: AGTCAGCAGAGAGGAAAGAA (20-mer)  
Primer/ rechts: TTACAGCCATACGAGGCATA (20-mer)

5.) Phenylalaninammoniumlyase (PAL) aus *Beta vulgaris* )\*

Primer/ links: GAITGGGTIATGRAIWSIATG (21-mer)

Primer/ rechts: TGYTCCATDATIGCIGCIGCYTC (23-mer)

)\* Verwendung eines partiellen cDNA-Klons aus *Beta vulgaris*, dessen Gewinnung durch degenerierte Primer abgeleitet aus Sequenzvergleichen anderer PAL durchgeführt wurde (Rosenkranz, persönliche Mitteilung)

Die Berechnung der Annealing-Temperatur der Primer berechnet sich aus  $A/T$   $2^{\circ}\text{C}$  und  $C/G$   $4^{\circ}\text{C}$  ( $= T_m$ ). Unterschiedliche Basenkombinationen an einer Position werden nach IUPAC wie folgt bezeichnet: D= (A/G/T); I= Innosit (Derivat des Adenosins, welches mit allen anderen Basen hybridisieren kann); K= (G/T); R= (A/G); S= (G/C); W= (A/T); Y= (C/T).

### 5.3 Antiseren

Zur Detektion von Zellwandinvertase in Kartoffeln wurde ein Antiserum gegen Tabak-Zellwandinvertase verwendet. Der 1. Antikörper wurde 1:5000 in TBST mit 1% Magermilchpulver (MMP) angesetzt.

Die Detektion der vakuolären Invertase aus Kartoffel wurde mittels eines Antiserums gegen nicht wundinduzierte vakuoläre Invertase (VI<sub>NIT</sub>) aus *Beta vulgaris* durchgeführt. Die Verdünnung des Antikörpers in TBST/ 1% MMP betrug 1:5000.

### 5.4 Lösungen und Chemikalien zu den Experimenten

Die nicht von einer spezifischen Firma bezogenen Chemikalien werden im folgenden Text ohne Herkunftsangaben geführt. Diese Chemikalien entsprachen der Reinheit p.a. (verwendbar zur Analyse) und wurden von unterschiedlichen Firmen bezogen, z.B.: Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

#### 5.4.1 Histologische Techniken (6.3)

**Fixativ:** 50 ml Ethanol p.a., 35 ml A. bidest, 5 ml Eisessig, 10 ml Formaldehyd (30%, Fisher Scientific, Schwerte-Geiseke)

**Paraffin:** Paraplast Plus (Fisher Scientific)

**Permout** (Einschließmittel, Fisher Scientific)

**TBA** (2-Butanol)

**Toluidinblaulösung:** 0,05% Toluidinblau O (Sigma, Deisenhofen) in A. bidest

#### **5.4.2 Anfertigung von Suberinfärbung (6.4)**

**Sudan III:** 0,01 g Sudan III (Sigma, Deisenhofen) in 5 ml 96% Ethanol und 5 ml Glycerin

#### **5.4.3 Isolation und Messung der Zellwandinvertase und vakuoläre Invertase (6.5)**

##### **Aceton**

**Assaypuffer:** 20 mM Triethanolamin *pH* 4,6, 6 mM Natriumcitrat

**ATP** (Sigma, Deisenhofen): 36 mM in A. bidest

**Concanavalin A-Puffer:** 50 mM Na-Acetat *pH* 6,3, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, Concanavalin A-Sepharose (Sigma)

**Extraktionspuffer:** 30 mM MOPS *pH* 6, 250 mM Sorbitol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM PMSF

**Hexokinase/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase:** Enzymsuspension aus beiden Enzymen (Roche, Mannheim)

**Metyl- $\alpha$ -glukopyranosid** (Sigma)

**NADP** (Calbiochem, Schwalbach): 30 mM in A. bidest

**Reaktionspuffer:** 100 mM Tris *pH* 8, 8 mM MgCl<sub>2</sub>

**SDS-Probenpuffer:** 250 mM Tris-Base *pH* 6,8, 9,2% SDS, 20%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 40% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau

#### **5.4.4 Western Blot-Analyse (6.7)**

**Proteinstandards:** 14,4–20,1–30–43–67–94 kDa (LMW Calibration KIT, Pharmacia, Freiburg); 4–6–17–22–30–42–60–148–250 kDa (MultiMark<sup>TM</sup> Multi-Coloured Standard, Novex, USA)

**Magermilchpulver** (Neuform, Reformhaus)

**TBST-Puffer:** 20 mM Tris-Base *pH* 7,5, 100 mM NaCl

#### **5.4.5 Amidoschwarzfärbung (6.8)**

**Amidoschwarz-Färbelösung:** 0,1% Amidoschwarz (Naphthol Blue Black, Sigma, Deisenhofen), 20 % Methanol, 7% Essigsäure

**Entfärber:** 20% Methanol, 7% Essigsäure

#### **5.4.6 Extraktion und Bestimmung von Saccharose-Synthase- und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität (6.9)**

**CHAPS** (Sigma, Deisenhofen)

**Entsalzungspuffer:** 50 mM HEPES *pH* 7,4, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT

**Extraktionspuffer:** 50 mM HEPES *pH* 7,4, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 0,1% Triton X-100, 1 mM PMSF

**Glukose-6-Phosphat** (200 mM in A. bidest)

**Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Assaypuffer:** 100 mM HEPES/KOH-Puffer *pH* 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Glyzinpuffer:** 200 mM Glyzin *pH* 8,7, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Hydrolysepuffer:** 100 mM Hepes/KOH *pH* 7

**NAD** (Roche, Mannheim): 5 mg/ml in A. bidest

**NADP** (Calbiochem, Schwalbach): 30 mM in A. bidest

**Proteaseinhibitor-Tablette** (Complete™Mini, Roche, Mannheim)

**PVPP** (Sigma)

**Sephadex G-25** (Sigma)

**UDP** (Uridin-Diphosphat, Sigma)

**UDP-Glukose-Dehydrogenase** (Sigma)

#### **5.4.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen (6.11)**

**Auftragungspuffer:** 50 %Glyzerin, 5x TAE, 0,1% Orange G

**TAE-Puffer:** 40 mM Tris-base *pH* 7,2, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA

#### **5.4.8 RNA-Isolation und Northern Blot-Analyse (6.12)**

**10 x SSC:** 0,3 M Na-Citrat *pH* 7, 3 M NaCl

#### **5.4.9 Extraktion und enzymatische Bestimmung der Speicherkohlehydrate (6.13)**

**α-Amylase** aus Schweinepankreas (Roche, Mannheim)

**Amyloglukosidase** aus *Aspergillus niger* (Roche)

**Assaypuffer (Zucker):** 100 mM Imidazol-HCl *pH* 6,9, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

**ATP** (Sigma, Deisenhofen): 36 mM in A. bidest

**Essigsäure** (1 M)

**Ethanol-Extraktionspuffer 1:** 10 mM Hepes *pH* 6, 50% Ethanol

**Ethanol-Extraktionspuffer 2:** 10 mM Hepes *pH* 6, 80% Ethanol

**Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase** aus Hefe (Roche)

**Hexokinase** aus Hefe (Roche)

**Hexokinase/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase:** Enzymsuspension aus beiden Enzymen (Roche)

**Hydrolysepuffer (Stärke):** 50 mM Na-Acetat-Puffer *pH* 5

**Invertase** aus Hefe (Sigma, Deisenhofen)

**KOH** (1 N)

**NADP** (Calbiochem, Schwalbach): 30 mM in A. bidest

**Phosphoglukoseisomerase** aus Hefe (Roche)

**Reaktionspuffer:** 100 mM Tris *pH* 8, 8 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **5.4.10 Ermittlung von GSH über die HPLC-Methode (6.14)**

**CHES-Puffer:** 0,5 M CHES (Sigma, Deisenhofen) *pH* 9,3

**DTT** (Dithiothreitol, 10 mM)

**Essigsäure** (10 %) gestoppt

**Extraktionspuffer:** 0,1 N HCl, 1 mM EDTA, 4 % (w/v) PVP

**GSH** (Sigma)

**MBB** (Monobrombiman, Fluka, Taufkirchen): 30 mM in Acetonitril, abgedunkeltes Gefäß

**Puffer A:** 10% Methanol, 0,25% Essigsäure, *pH* 4,3

**Puffer B:** 90% Methanol, 0,25% Essigsäure, *pH* 4,3

#### **5.4.11 Bestimmung löslicher Phenole (6.15)**

**Chlorogensäure** (Sigma, Deisenhofen)

**Cumarsäure** (Sigma)

**Extraktionspuffer:** 100 mM Natriumphosphat *pH* 7

**Folin-Ciocaltheu-Reagenz** (Sigma)

**Natriumcarbonatlösung** (18% in A.bidest)

#### **5.4.12 Tumorinduktion an Kartoffelscheibchen durch *Agrobacterium tumefaciens* (6.16)**

**Natrium-Hypochlorid-Lösung** (Endkonzentration Chlor: 6 %)

**YEB-Medium:** 1% Hefeextrakt, 0,5% Rinderextrakt, 0,5% Pepton, 0,5% Saccharose, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, *pH* 7,5

**Agar-Platten (steril):** 1,5% Agar (Invitrogen, Karlsruhe) in A. bidest

## **6 Methoden**

### **6.1 Verwundung von Kartoffelknollengewebe**

Die Kartoffelknollen wurden direkt nach der Ernte mit Hilfe eines Küchenhobels in 4 mm dicke Scheiben geschnitten. Anschließend wurden mittels eines Korkbohrers aus den Gewebequerschnitten Scheibchen mit einem Durchmesser von 1 cm ausgestanzt. Darauf folgte ein einmaliges Waschen der Scheibchen in VE-Wasser. Anschließend wurden die Gewebescheibchen unter wassergesättigter Atmosphäre in einem Exsikkator für die Dauer des Versuches inkubiert. Nach Beendigung des Versuchs erfolgte die Aufbewahrung des Gewebes nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **6.2 Ermittlung der Respiration in verwundeten Kartoffelknollen**

Die Respiration wurde in einer Clarkzelle (Abb.1) mittels einer Sauerstoffelektrode (Abb.2), die den  $\text{O}_2$ -Gehalt in der Luft bestimmt, durchgeführt (Walker, 1985). 7 Scheibchen einer Kartoffelknolle (siehe 6.1) wurden 30-45 min in der abgedunkelten Clarkzelle unter gleicher Ausgangsatmosphäre belassen. Während der genannten Zeit wurde die Abnahme des Sauerstoffgehaltes mittels eines Schreibers dokumentiert. Die Werte wurden in  $\text{nmol O}_2$  pro Minute angegeben.

Die Clarkzelle besteht aus vier Teilen. Der  $\text{O}_2$ -Sensor ist hierbei eine Sauerstoffelektrode, welche direkt unter der Blattkammer angebracht ist. Die Kathode der Sauerstoffelektrode (siehe Erklärung Clark-Elektrode) steht in direktem Kontakt zur Blattkammer und dessen Atmosphäre. Die Blattkammer besitzt einen Lufteinlass bzw. -auslass, über welchen die Zugabe von Luft, bzw. Stickstoff reguliert werden kann. Die Atmosphäre in der Clarkzelle kann über einen Wasserstrom temperiert werden und über eine Glasscheibe an der Oberseite der Zelle wird eine kontrollierte Belichtung ermöglicht. In diesem Versuch wurde die Kammer abgedunkelt und der Lufteinlass geschlossen.

Die Clark-Elektrode (Abb.2) besteht aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode. Die Anode umgibt die Kathode ringförmig, wobei die Kathode kuppelartig aus dem Ring hervorragt. Beide Elektroden tauchen in ein Elektrolyt ein (3 M KCl), über das sie elektrisch miteinander verbunden sind. Über das Elektrolyt wird eine Teflonmembran gespannt, welche die Elektroden vom Luftraum abgrenzt und nur für Gase durchlässig ist. Bei Anlegen einer Gleichspannung von 0,6-0,7 Volt werden an der Platinelektrode Elektronen an den Sauerstoff übertragen. Gleichzeitig wird das Silber an der Anode oxidiert und Silberchlorid schlägt sich nieder. Der Stromfluss wird durch das Elektrolyt vermittelt. Die Stromstärke ist im stöchiometrischen Verhältnis direkt proportional zu dem

an der Kathode reduzierten Sauerstoff. Der Stromfluss wird in Spannung transformiert und steht als Messsignal in Volt zur Verfügung. Die durch Sauerstoffzu- oder -abnahme entstehende Spannungsdifferenz wird durch den Spannungswandler (CB1D, H. Saur, Reutlingen) um den Faktor 1 verstärkt und zu einem Linienschreiber (Kipp + Zonen) geleitet.

Zur Ermittlung der Sauerstoffkonzentration in der Clarkzelle wird die Blattkammer mit reinem N<sub>2</sub> durchströmt. In diesem Fall erhält man ein Spannungssignal der Elektrode, das dem in Abwesenheit von O<sub>2</sub> entspricht (Nullsignal). Danach wird die Kammer belüftet. Die Differenz von Nullsignal und dem Signal nach Belüften entspricht der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre. Unter dieser Atmosphäre werden die Kartoffelscheibchen inkubiert und die Abnahme des Sauerstoffs durch die Respiration des Gewebes registriert.

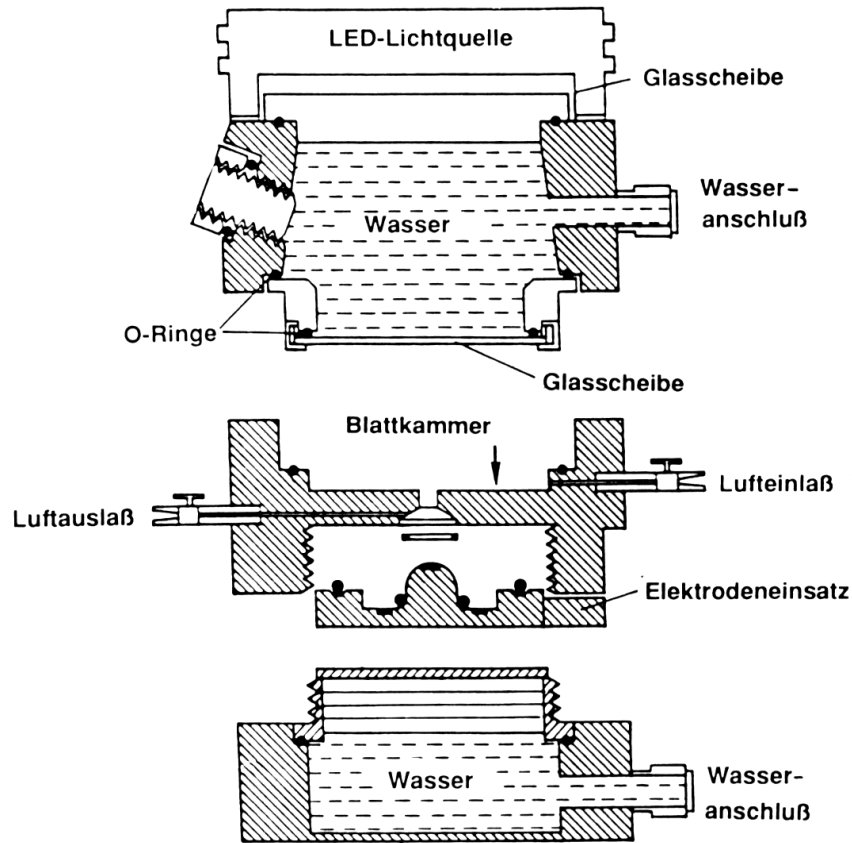
Die Bestimmung der absoluten Sauerstoffkonzentration erfolgt über die Zugabe einer bekannten Menge Luft in die Blattkammer, in diesem Fall 1 ml. Durch das Einpressen der Luft verändert sich der Sauerstoffgehalt in der Kammer. Dies führt wiederum zu einer Änderung des Spannungssignals. Die Spannungsänderung ist direkt proportional zur Menge des im Volumen vorhandenen Sauerstoffs. Die Berechnung wird wie folgt durchgeführt:

1 Mol Luft nimmt bei 0°C und 0,1013 MPa einen Raum von 22,414 Liter ein. Nach dem Gesetz von Gay-Lussac kann das Volumen für die geltende Versuchstemperatur (x) berechnet werden.

$$\frac{22,414 \text{ L}}{273 \text{ K}} = \frac{V(x^\circ\text{C}) \text{ L}}{273 \text{ K} + x^\circ\text{C}}$$

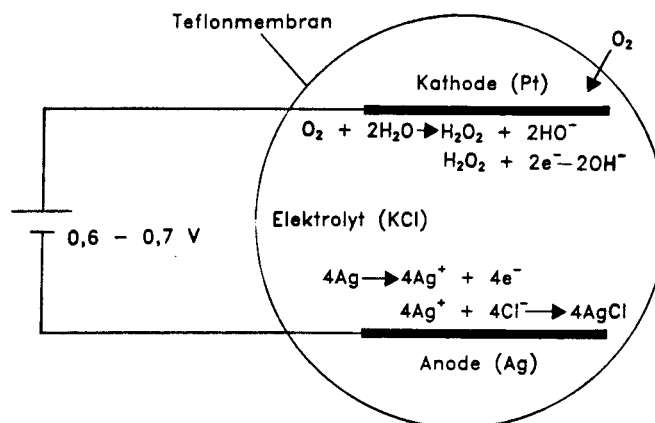
Bei 25°C entspricht das Luftvolumen 24,466 l. In einem ml Luft wäre demnach die Stoffmenge von 0,0416 mmol. Berechnet nach dem Sauerstoffgehalt in der Luft von 20,9%, enthält 1 ml Luft bei 25°C 8,54 µmol O<sub>2</sub>. Die durch das zugegebene Luftvolumen detektierte Spannungsänderung entspricht bei 25°C 8,54 µmol O<sub>2</sub>.

Die Respiration der Kartoffelscheibchen wurde über einen Zeitraum von 30–45 min bestimmt. Die Werte sind daher in nmol O<sub>2</sub> pro Minute angegeben. Die Versuche zur Ermittlung der Respiration mit der Sauerstoffelektrode wurden nach dem Leitfaden von David Walker (The use of the oxygen elektrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis, University of Sheffield) durchgeführt.



**Abb.1: Darstellung einer Clarkzelle** (LD 1, Hersteller: Hansatech Instruments Ltd., Kings Lynn, UK). Nach Willert et al., 1995.

Die Sauerstoffelektrode (oder auch Clark-Elektrode) funktioniert nach folgendem Prinzip:



**Abb.2: Reaktion in einer Sauerstoffelektrode.** Nach Willert et al., 1995.



## 6.3 Histologische Techniken

### 6.3.1 Fixieren und Einbetten von Pflanzenmaterial

**Tabelle 1:** Ethanol-TBA-Reihe

Schritt	95 % Ethanol ml	TBA ml	A.bidest ml	Inkubation (h)
1	40	10	50	16
2	50	20	30	16
3	50	35	15	16
4	45	55	0	16
5	25	75	0	16
6	0	100 <sup>*)</sup>	0	16
7	0	100	0	16
8	0	100	0	16

<sup>\*)</sup> Proben werden auf 60°C gestellt

Zur Fixierung und Einbettung des Kartoffelknollengewebes wurden die Scheibchen nochmals zum Querschnitt hin durchgeschnitten und die Hälften in Fixativ in kleine, verschließbare Glasgefäße gegeben. Danach wurden die Proben 5 x 10 min in Fixativ vakuumfiltriert bei maximalem Vakuum von  $\leq 0,4$  bar und anschließend über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt. Das fixierte Material wurde dann in aufsteigenden Ethanol/ TBA-Konzentrationen dehydriert (siehe Tabelle 1).

Nachdem die Proben in 100% TBA vorlagen, wurde auf die geöffneten Glasbehälter mit dem Probematerial an der Unterseite perforiert Filter gesetzt. In die Filter wurden 10-15 Paraffinchips (Paraplast Plus, Fisher Scientific, Schwerte-Geiseke) gegeben und in den Ofen bei 60°C gestellt. Die bereits geschmolzenen Chips wurden regelmäßig ersetzt, sodass eine langsam ansteigende Paraffinkonzentration erzeugt wurde. Nach mehrmaligem Zusetzen von Paraffinchips in die Filter kam es zu einem leichten Einrüben des Mediums in den Gläschen. Darauf folgt das Abgießen von  $\frac{1}{4}$  der Flüssigkeit und Zugabe von geschmolzenem Paraffin bis zu Füllgrenze. Die Behälter wurden verschlossen und über Nacht auf 60° C belassen. Diesen Vorgang wurde die folgenden 5 Tage wiederholt, an den letzten 3 Tagen wurden das Medium in den Gläschen jeweils ganz entleert und durch frisch geschmolzenes Paraffin ersetzt. Danach konnten die Präparate in Plastikformen (Plano, Wetzlar), die zuvor mit Paraffinchips befüllt und diese im Ofen bei 60°C geschmolzen wurden, überführt werden und auf RT oder auf Eis erhärten.

### **6.3.2 Anfertigung von Gewebedünnschnitten**

Die vorhandenen Paraffinblöckchen wurden auf 4°C aufbewahrt und vor dem Schneiden an der Schnittfläche gekühlt. An einem Mikrotom (RM 2125 RT, Leica) wurden 5-15 µm dicke Schnitte von den Präparaten angefertigt, wobei immer entlang dem Radius der Scheibchen geschnitten wurde. Die Schnitte wurden kurz zur Streckung in ein 42°C warmes Wasserbad transferiert und anschließend auf einen Objektträger (Super Frost, Super Frost Plus (positiv geladen)) gebracht. Danach erfolgte das Trocknen der Schnitte über Nacht bei 42°C.

### **6.3.3 Färbung der Schnitte mit Toluidinblau (SAKAI)**

Die Toluidinblaufärbung nach Sakai (Gerlach, 1977) bezeichnet man auch als Übersichtsfärbung, da sie im gleichen Präparat verholzte und nicht verholzte Strukturen simultan anfärbt. Dabei werden RNA-haltige Strukturen, Cytoplasma und unverholzte Zellwände rot angefärbt. DNA-haltige Strukturen, verholzte Zellwände, und Tannine färben sich blau bis blaugrün.

Die Objektträger mit den Dünnschnitten wurden 5 min in eine 0,05% Toluidinblaulösung (Toluidinblau O, Sigma) gegeben und anschließend 1 h in A.bidest gewaschen bis die überschüssige Farbe entfernt war. Danach werden die Präparate über Nacht getrocknet und am folgenden Tag mit Einschließmittel (Permount, Fisher Scientific) und einem Deckgläschen konserviert. Nach Trocknen des Einschließmittels konnte das Präparat unter dem Mikroskop betrachtet werden.

## **6.4 Anfertigung von Suberinfärbung an Frischpräparaten/ Suberineigenfluoreszenz**

Kartoffelknollenscheibchen aus dem Wundungsexperiment (siehe 6.1) wurden zum Nachweis von Suberinbildung und -einlagerung an der Wundoberfläche herangezogen. Aus den Scheibchen wurden dünne Schnitte angefertigt, welche auf den Objektträgern mit Sudan III (Sigma, Deisenhofen) angefärbt wurden. Dabei wurde das Objekt 30 min in einer 0,1% Sudan III-Lösung inkubiert und anschließend in Glycerol ausgewaschen. Die Eigenfluoreszenz von Wachsen (Suberine, Kutine..) wurde ebenso an Frischpräparaten durchgeführt. Querschnitte der Kartoffelknollenscheibchen wurden am Mikroskop unter UV-Licht (350-370 nm) mittels eines UV2A-Filters auf Suberinfluoreszenz untersucht.

## **6.5 Isolation der Zellwandinvertase und vakuolären Invertase**

### **6.5.1 Extraktion**

Das gefrorene Material wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Dann erfolgte die Zugabe von 2-3 Volumen Extraktionspuffer. Der Extrakt wurde anschließend bei 3000xg und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und aufbewahrt zur Bestimmung der vakuolären Invertaseaktivität und zum Nachweis des Proteins über die Western Blot Analyse. Das Pellet wurde in einem zweiten Schritt mit Extraktionspuffer plus 1% Triton X-100 gewaschen, 10 min auf Eis geschüttelt und danach bei 4000xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nochmals in Extraktionspuffer gewaschen. Danach folgt das nochmalige Zentrifugieren des Extrakts für 10 min bei 4000xg und 4°C. Das Pellet wurde zur Bestimmung der Zellwandinvertaseaktivität und zum Nachweis des Proteins über die Western Blot Analyse verwendet.

### **6.5.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten**

Der Überstand und das Pellet aus der oben beschriebenen Proteinextraktion wurden für die Aktivitätsbestimmung von Zellwandinvertase und vakuolärer Invertase verwendet.

Das Pellet mit der Zellwandfraktion konnte direkt für die Aktivitätsbestimmung verwendet werden. Das Protein des Überstands wurde durch Zugabe von eiskaltem Aceton gefällt. Die Volumina betragen hierbei immer 1 Volumen Überstand zu 4 Volumen Aceton. Die Fällungen wurden 20 min auf -20°C aufbewahrt und anschließend 20 min bei 16 000xg und 4°C zentrifugiert. Das Proteinsediment wurde anschließend in die Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

Beide Fraktionen, Gesamtprotein aus dem Zellwandbereich und gefälltes Protein aus dem Überstand wurden mit 200 µl Assaypuffer versetzt und resuspendiert. Die Proben wurden auf 37°C für 1 min vorinkubiert. Der Start der Reaktion begann mit der Umsetzung von Saccharose durch die Invertasen zu den Hexosen, durch die Zugabe von 100 µl 90 mM Saccharose in Assaypuffer. Die Proben wurden bis maximal 1 Stunde auf 37°C inkubiert und danach 5 min auf 95°C denaturiert. Das Verhältnis von Probe zu Assaypuffer sollte nicht über 100 mg Frischgewicht zu 300 µl Assaypuffer überschreiten. Als Kontrollen wurden Fraktionen von Zellwandprotein und Protein aus dem Überstand direkt nach Zugabe des Assaypuffers plus Saccharose auf 95°C denaturiert, sowie eine Negativkontrolle (nur 30 mM Saccharose/ Assaypuffer) bei 37°C zusätzlich zu den Proben inkubiert. Der Nachweis der entstandenen Glukose erfolgte über die Phosphorylierung der Hexose durch die Hexokinase und ATP und anschließende Umsetzung von Glukose-6-Phosphat durch die Glukose-6-Phosphat-

Dehydrogenase unter Reduktion von NADP zu NADPH, welches photometrisch bei 340 nm nachgewiesen wurde.

**Reaktionsansatz:** X  $\mu$ l Hydrolyseansatz, 30  $\mu$ l NADP, 30  $\mu$ l ATP 3  $\mu$ l Hexokinase/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ad 1000  $\mu$ l Reaktionspuffer. Nach 10 min erfolgte die Messung bei 340 mn.

### **6.5.3 Aufbereitung der Proteine für die Western Blot-Analyse**

Die Fraktionen aus der Proteinextraktion wurden ebenso für die Western Blot Analyse verwendet. Dabei wurde die Zellwandfraktion direkt in dem doppelten Volumen SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei Raumtemperatur 10 min geschüttelt. Danach erfolgte die Denaturierung 5 min bei 95°C.

Das gefällte Protein aus dem Überstand wurde mittels einer ConcanavalinA-Chromatographie (Weil et al., 1994) in glykosilierte und nicht-glykosilierte Proteine getrennt. Dabei wurde das Proteinpellet in ConcanavalinA-Puffer (ConA-Puffer) gelöst und nach Zugabe von ConcanavalinA-Sepharose (Matrix) auf Eis über Nacht geschüttelt. Nach Absetzen der Matrix wurde der Überstand (ungebundene Fraktion = ConA<sup>-</sup>) abgenommen und zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford auf Eis aufbewahrt. Danach erfolgte das zweimalige Waschen der Matrix mit ConA-Puffer und das Eluieren des Proteins mit 15% [w/v] Methyl- $\alpha$ -glukopyranosid in ConA-Puffer. Das Eluat (gebundene Fraktion = ConA<sup>+</sup>) wurde ebenso nach der Proteinkonzentration bestimmt. Danach wurden die Fraktionen acetongefällt (siehe 6.5.2), in SDS-Probenpuffer aufgenommen und denaturiert (s.o.). Das Volumen an SDS-Probenpuffer betrug immer 1  $\mu$ l zu 1  $\mu$ g Protein.

### **6.5.4 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde mittels eines KIT von der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt.

## **6.6 SDS-PAGE**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach Laemmli (1970). Als Proteinstandards dienten vorgefärbte und nicht vorgefärbte Marker im Bereich von 4–250 kDa.

## **6.7 Western Blot-Analyse**

Unter Verwendung einer *semi dry*-Blotapparatur (Trans Blot SD, Biorad, München) wurde der Proteintransfer nach Towbin et al. (1979) und wie in Weil und Rausch (1994) beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die Proteine auf eine

PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore, Eschborn) transferiert und anschließend kurz in TBST-Puffer gewaschen. Darauf folgte eine 30 min Inkubation in TBST/ 5% Magermilchpulver (MMP) zum Blocken der ungebundenen Bereiche der Membran. Anschließend wurde die Membran in der 1. Antikörperlösung (in 1% MMP/ TBST) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran in TBST 3 mal 5 min gewaschen und für 1 Stunde im 2. Antikörper (Anti-Rabbit IgG gekoppelt mit Meerrettich Peroxidase, Verdünnung 1:20 000 in 1% MMP/ TBST) inkubiert. Darauf folgte ein sich fünf mal wiederholender Waschschrift in TBST für jeweils 5 min. Die Entwicklung der Membran erfolgte nach der Beschreibung des SuperSignal™ Western Blotting Kit (Pierce, Rockford, IL 61105). Nach der Detektion wurde die Membran kurz in VE-Wasser gewaschen und in Amidoschwarz gefärbt. Dies diente zur Veranschaulichung der Gesamtproteinmenge auf der Membran, sowie zur Kontrolle der Transfereffizienz.

## **6.8 Amidoschwarzfärbung**

Zum Nachweis der Transfereffizienz und der Gesamtproteinmenge auf der PVDF-Membran wurde der Blot nach der Detektion in Amidoschwarz gefärbt. Die Membran wurde nach kurzem Waschen in VE-Wasser für 10-20 min in Amidoschwarz-Färbelösung geschüttelt. Anschließend erfolgte der Transfer der Membran in Entfärber bis deutliche Bandenmuster im Verhältnis zum Hintergrund sichtbar wurden.

## **6.9 Bestimmung von Saccharose-Synthase- und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität**

### **6.9.1 Enzymextraktion**

Die Kartoffelscheibchen wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Danach erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen unlösliches PVPP und 4 Volumen kalter Extraktionspuffer. Dem Extraktionspuffer wurden zuvor Proteaseinhibitoren zugesetzt, bestehend aus einer Pulvertablette (Complete™Mini, Roche, Mannheim) auf 10 ml Extraktionspuffer. Vor der Zentrifugation des Extraktes für 5 min bei 10 000xg und 4°C wurde Sephadex G-25-Medium in Entsalzungspuffer äquilibriert und in Plastikspritzen (7 ml, Bectin Dickinson, Heidelberg) mit Glasfritten gefüllt. Das Bettvolumen in den Spitzen sollte 5 ml Sephadex G-25-Medium betragen. Die Spritzen wurden in passenden Zentrifugenröhren 2 min bei 560xg und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt diente zum Entfernen überschüssigen Entsalzungspuffers im Medium. 500 ml des Überstandes aus der Extraktion wurde das Medium einer Spritze gegeben und 2 min bei 560xg und 4°C zentrifugiert. Der entsalzte Extrakt wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Extraktion der membrangebundenen Form der Saccharose-Synthase wurde der klare Überstand des Extrakt nach dem Zentrifugieren bei 10 000xg bei 4°C nochmals 1h bei 100 000xg in der Ultrazentrifuge (Mini-UZ, Beckman) zentrifugiert. Der Überstand aus dieser Zentrifugation wird zur Messung der löslichen Saccharose-Synthase Aktivität verwendet (nach entsalzen, s.o.), das Pellet enthält die mikrosomale Membran zur Messung membrangebundener Saccharose-Synthase. Das Pellet wird vorsichtig mit Extraktionspuffer gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 0.5 ml Extraktionspuffer inklusiv 1% CHAPS gelöst. Die Messung der Saccharose-Synthase Aktivität ( $V_{\max}$ ) wird nach dem Entsalzen wie folgend beschrieben durchgeführt.

### 6.9.2 Bestimmung der Saccharose-Synthase-Aktivität

**Tabelle 2:** Pipettierschema des Saccharose-Synthase-Aktivitäts Assay

	$V_{\max}$	$V_{\text{sel}}$
100 mM Hepes/KOH, pH 7	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
500 mM Saccharose	30 $\mu\text{l}$	-
100 mM Saccharose	-	20 $\mu\text{l}$
20 mM UDP	20 $\mu\text{l}$	-
4 mM UDP	-	15 $\mu\text{l}$
Probe	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$
A. bidest	-	15 $\mu\text{l}$
Total Vol.	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$

Die Bestimmung der Saccharose-Synthase-Aktivität erfolgte über die Zugabe von Saccharose und UDP. Das Enzym katalysiert unter Verbrauch von UDP die Umsetzung der Saccharose in Fruktose und UDP-Glukose. Letzteres Produkt kann über einen enzymatisch gekoppelten Test unter Umsetzung von NAD zu NADH bestimmt werden.

30  $\mu\text{l}$  des entsalzten Extraktes wurden in den Saccharose-Synthase Test eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde dabei differenziert in selektive ( $V_{\text{sel}}$ ) und maximale ( $V_{\max}$ ) Aktivität, welche in dem angezeigten Pipettierschema dargestellt ist (Tabelle 2). Die Proben wurden 20 min bei 25°C inkubiert und danach 5 min auf 95°C denaturiert. Die Proben können auf -20°C gelagert werden. Die Bestimmung der UDP-Glukose erfolgte durch Katalyse des Enzyms UDP-Glukose-Dehydrogenase unter Umsetzung von NAD zu NADH, welches bei 340 nm nachgewiesen wurde. 40  $\mu\text{l}$  des Testansatzes wurden zu 730  $\mu\text{l}$  Glycinpuffer und 30  $\mu\text{l}$  NAD gegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,02 U UDP-Glukose-Dehydrogenase. Die Enzymaktivität wurde in nmol/ min \* FG angegeben.

### 6.9.3 Bestimmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität

20-30 µl des entsalzten Extrakts wurden in den Aktivitätsassay eingesetzt. Der Ansatz bestand aus HEPES/KOH-Puffer inklusive MgCl<sub>2</sub> und 20 µl NADP. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Glukose-6-Phosphat. Die dabei stattfindende Umsetzung des NADP zu NADPH kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden. Siehe auch 6.5.2. Das Volumen des Ansatzes betrug 800 µl.

## 6.10 Nicht radioaktive Markierung von DNA

Mittels PCR (Polymerase chain reaction) unter Verwendung von Biotin markiertem dUTP (Biotin-16-dUTP, Roche, Mannheim) wurde die nichtradioaktive Markierung von DNA durchgeführt.

**Tabelle 3:** PCR-Ansatz

Templat (Plasmid, 10-20 ng/µl):	1 µl
Primer/links:	50 pmol
Primer/rechts:	50 pmol
dNTPs (10 mM):	1 µl
Biotin-16-dUTP (1 mM):	1 µl
10 x Reaktionspuffer:	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM):	1,5 µl
Taq-Polymerase:	0,1 µl

Die PCR wurde unter Verwendung der Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen, Leek, NL) und unter folgendem Programm in einem Robocycler (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt:

**1.)** 10 min Denaturieren bei 95°C; **2.)- 4.)** 45 sec Denaturieren bei 95°C – 1 min Annealing bei T<sub>m</sub> des schlechter hybridisierenden Primers – 1 min 20 sec Elongation bei 72°C (Schritte 2-4 wiederholen sich 35 mal), **5.)** 10 min Elongation bei 72°C. Das Gesamtvolumen der PCR betrug 50 µl.

Man rechnet 1 min Elongation pro kb zu amplifizierende DNA. Die Größe der markierten DNA-Fragmente wurde maximal auf 900 kb festgesetzt. Die Markierung konnte anschließend mittels eines Agarosegels nachgewiesen werden. Markierte DNA-Fragmente zeichnen sich durch ein verändertes Laufverhalten aus. Diese Banden sind im Vergleich zu den nicht markierten Kontrollen diffus und laufen etwas höher im Gel.

## 6.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die DNA-Proben wurden mit 5x Auftragspuffer versetzt und auf ein 0,8-1% Agarosegel (angesetzt in 1x TAE-Puffer) geladen. Als Laufpuffer diente 1x TAE-

Puffer. Zur Überprüfung der nicht radioaktiv markierten DNA-Sonden wurde eine Minigelapparatur (Biometra, Göttingen) verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 10 Volt/cm oder 70 V. Anschließend konnten die DNA-Banden im Gel durch interkalierendes Ethidiumbromid „gefärbt“ werden und unter UV-Licht detektiert werden. Als Größen- und Mengenstandard diente Smart Ladder (Eurogentec, Darmstadt).

## **6.12 RNA-Isolation und Northern Blot-Analyse**

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll von Logemann et al. (1987). Die mit nicht radioaktiven DNA-Sonden durchgeführte Northern Blot-Analyse erfolgte nach Löw und Rausch (1996). Der Transfer der RNA auf die Membran (Duralon UV, Stratagene, Heidelberg) erfolgte nicht alkalisch sondern über Nacht in 10 x SSC.

## **6.13 Extraktion und enzymatische Bestimmung der Speicherkohlehydrate**

### ***6.13.1 Bestimmung von Saccharose, Glukose und Fruktose***

Maximal 200 mg verwundetes Kartoffelmaterial wurde zu einem feinen Pulver gemörsert und in 500 µl 50% Ethanol/ 10 mM Hepes pH 6 aufgenommen. Dieser Ansatz wurde 30 min auf 80° C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation 5 min bei 10 000xg und der Transfer des Überstands in ein neues Eppendorfgefäß. Im Folgenden wurde auf das Pellet weitere 2 mal 500 µl 80% Ethanol/ 10 mM Hepes pH 6 gegeben und wiederum 30 min auf 80°C inkubiert. Nach Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand abgenommen und die 3 Überstände vereinigt. Das Pellet wurde zur Stärkeanalyse weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Zucker im ethanolischen Extrakt erfolgte nach Jones et al., 1977). Der Testansatz bestand aus x µl ethanolischen Extrakt, 2 mM NADP, 1 mM ATP und 0,28 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ad 800µl Assaypuffer. Die Reaktion wurde gestartet durch die Zugabe von 0,6 U Hexokinase zur Ermittlung der Glukosekonzentration. Nach Beendigung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 2,5 U Phosphoglukoseisomerase die Ermittlung der Fruktosekonzentration. Die Messung der Saccharosekonzentration wurde mittels 350 U Invertase pro Ansatz eingeleitet. Die Ermittlung der Zuckerkonzentrationen erfolgte über Reduktion von NADP zu NADPH, welche photometrisch bei 340 nm zu detektieren ist.



### **6.13.2 Bestimmung von Stärke**

Die nach der ethanolischen Extraktion erhaltenen Sedimente wurden in 2 x 1 ml A. bidest gewaschen. Danach wurde das Sediment nochmals in 1 ml A. bidest resuspendiert. 100 µl der Suspension wurden entnommen und 500 µl 1 N KOH zugegeben. Der Ansatz inkubierte 30 min auf 95°C und wurde anschließend mit 600 µl 1M Essigsäure neutralisiert (pH bei 5). Danach folgte die Zugabe von 300 µl Pufferenzymgemisch, welches aus 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5, 1,7 U Amyloglukosidase und 1,2 U  $\alpha$ -Amylase bestand. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung erfolgte über die Freisetzung der Glukoseeinheiten aus der Stärke. Nachweis siehe 6.5.2.

**Reaktionsansatz:** X µl Stärkehydrolyseansatz, 30 µl NADP, 30 µl ATP und 3 µl Hexokinase/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ad 800 µl Reaktionspuffer. Nach 10 min erfolgte die Messung.

## **6.14 Ermittlung von GSH über die HPLC-Methode**

### **6.14.1 Extraktion und Derivatisierung des Glutathion**

Extraktion, Derivatisierung und Messung des Glutathion wurden nach Noctor und Foyer (1998) durchgeführt.

Verwundetes Kartoffelknollengewebe wurde unter flüssigen Stickstoff gemörsert und 30 mg des Materials wurden mit 1 ml Extraktionspuffer versetzt, resuspendiert und bei 16 000xg und 4°C 10 min zentrifugiert. Nach Überführen des Überstand in ein neues Eppendorfgefäß wird dieser in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Der Überstand wurde direkt nach dem Auftauen und vor der Weiterverarbeitung 1:1 mit A. bidest verdünnt und anschließend in die Glutamyl-Aminogruppen Derivatisierung eingesetzt. Dabei wurden 200 µl des verdünnten Überstandes mit 100 µl CHES-Puffer versetzt und 20 µl DTT zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde der Ansatz anschließend mit 20 µl MBB versetzt und weitere 15 min im Dunkeln auf RT inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 800 µl Essigsäure gestoppt. Nach 30 min Zentrifugieren bei 10 000xg konnte der Ansatz in die Messung eingesetzt werden. Die Derivatisierung der GSH-Standardlösungen erfolgte auf die gleiche Weise. Die Proben wurden bis zu Messung auf -20°C aufbewahrt. Das zur Messung eingesetzte Probevolumen betrug 50 µl.

### **6.14.2 HPLC-Messung**

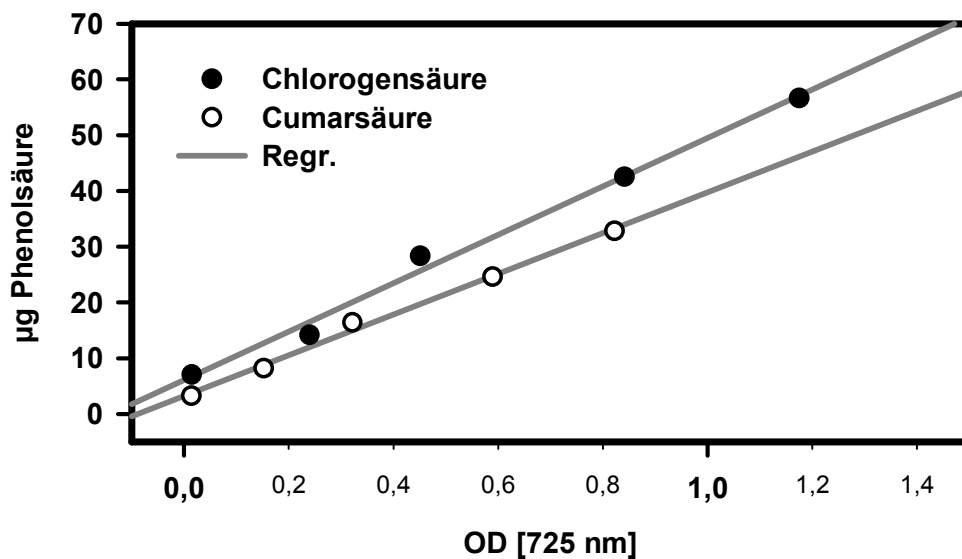
Zur Ermittlung des GSH diente ein Kontron (Neufahrn) 322 Pumpensystem mit einer zusätzlichen für die Nachsäulenderivatisierung 422 Pumpe. Die Detektion des Monobrombimane erfolgte über einen Fluoreszenzdetektor (FP-1520, Jas-

co, Groß-Umstadt) bei einer eingestellten Wellenlänge von 490 nm (Anregung bei 394 nm). Als Säule wurde eine Nova-Pak<sup>®</sup>C18 der Größe 4,6 x 250 mm und 4 µm Körnung (Firma Waters) verwendet. Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch von 10% Methanol in A. bidest und 0,25% Essigsäure (Puffer A) und 90% Methanol in A. bidest und 0,25% Essigsäure (Puffer B), pH 4,3 mit einer Flussrate von 1ml/ min. Das Programm verlief nach folgenden Gradienten:

**Tabelle 4:** Puffer-Gradient zur Bestimmung von Glutathion

Zeit (1= 60 sec)	% B	Gradient
0 – 0,27	2	
0,27 – 16,27	2 - 18	linear
16,28 – 23	100	
23,01 – 40,01	2	

### 6.15 Bestimmung löslicher Phenole



**Abb.3: Bestimmung löslicher Phenole.** Standard: Mittels Chlorogen- und Cumarsäure erstellte Eichkurven.

Proben des verwundeten Kartoffelmaterials (200 mg) wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert in 1 ml Extraktionspuffer suspendiert und bei 10 000 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert, bis ein klarer Überstand entstand. Zu 200 µl Überstand (oder Eichlösung) wurden 50 µl Folin-Ciocalthau-Reagenz gegeben und darauf folgend sofort 200 µl 18% Natriumcarbonatlösung. Die Flüssigkeiten wurden vorsichtig gemischt und ad 2 ml mit A. bidest aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 90 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Messung der Proben bei 725 nm.

## **6.16 Tumorinduktion an Kartoffelscheibchen durch *Agrobacterium tumefaciens***

### **6.16.1 Agrobakterien-Kultur**

Die Anzucht von Agrobakterien erfolgte in YEB-Medium.

Die Bakterien wurden auf Platten kultiviert und Einzelkolonien der Platten in Flüssigkultur für die Infektion des Knollengewebes angezogen. Die Flüssigkulturen wurden 2 Tage bei 28°C auf einem Schüttler (120 U/min) im Dunkeln inkubiert.

### **6.16.2 Infektion des Knollenparenchym**

Eine Inkubation der Knollen für 10 min in einer Natrium-Hypochlorid-Lösung dient der Oberflächensterilisation. Anschließend wurden die Knollen in sterilem A.bidest gewaschen und getrocknet. Danach erfolgte die Herstellung von Scheibchen, wie in 6.1 beschrieben. Alle Vorgänge fanden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) statt. Die Scheibchen wurden auf Agar-Medium in Petrischalen gelegt. Das Medium soll das Austrocknen der Scheibchen über eine längere Inkubationsdauer verhindern. Anschließend wurden die Scheibchen mit jeweils  $10^9$  Bakterien infiziert, in die Schalen transferiert, welche mit Parafilm versiegelt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 23°C im Dunkeln. Die Ernte der Tumore auf den Kartoffelscheibchen erfolgte bei Stecknadelkopfgroße der Tumore oder spätestens nach 5 Wochen.

### **6.16.3 Probenaufbereitung des Tumorgewebes**

Die Ernte der Tumore erfolgte durch Abheben mittels einer Pinzette oder Abschaben durch ein Rasiermesser. Nach vollständigem Entfernen der Tumore von den Scheibchen wurden die Tumore in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die verbleibenden Scheibchen wurden zerkleinert, schockgefroren und als „Restgewebe“ bei -80°C gelagert.

Die Aufbereitung des Materials zur Bestimmung von Invertaseaktivitäten, Speicherkohlenhydrate und Protein über die Western Blot-Methode erfolgte wie in 6.5 – 6.7 und 6.13 beschrieben.

## 7 Literaturverzeichnis

- ap Rees**, T., Dixon, W.L., Pollock, C.J., Franks, F. (1981)  
Low temperature sweetening in higher plants.-In: Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables (J. Friend and M.J.C. Rhodes. eds.). pp 41-61. Academic Press, New York.
- Barichello**, Yada, R., Coffin, R. (1991)  
Starch properties of various potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars susceptible and resistant to low-temperature sweetening. J. Sci. Food Agric. 56, 385-397
- Baumert**, A., Mock, H.P, Schmidt J., Herbers, K., Sonnewald U., Strack D. (2001)  
Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase. Phytochemistry 56(6), 535-541
- Bernards**, M.A.; Susag, L.M. , Bedgar, L.B., Anterola, A.M., Lewis, N.G.(2000)  
Induced phenylpropanoid metabolism during suberization and lignification: a comparative analysis. J. Plant Physiol. 157, 601-607
- Bernards**, M. A.; Razem, F.A. (2001)  
The poly(phenolic) domain of potato suberin: A nonlignin plant cell wall bio-polymer. Phytochemistry 57, 1115-1122
- Biemelt**, S., Hajirezaei, M.R., Melzer, M., Albrecht, G., Sonnewald, U. (1999)  
Sucrose synthase activity does not restrict glycolysis in roots of transgenic potato plants under hypoxic conditions. Planta 210, 41-49
- Bracho**, G.E. , Whitaker, J.R. (1990)  
Purification and partial characterization of potato (*Solanum tuberosum*) invertase and its endogenous proteinaceous inhibitor. Plant Physiol. 92, 386-394
- Bradford**, M. (1976)  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochem. 72, 248
- Burton**, W.G. (1989)  
The potato. 3<sup>rd</sup> edition (Longman scientific and technical, Harlow, Essex, England)
- Butler**, W., Cook, L., Vayda, M.E. (1990)  
Hypoxic stress inhibits multiple aspects of potato tuber wound response. Plant Physiol. 93, 264-270
- Cheng**, W.H., Taliercio, E.W., Chourey, P.S. (1996)  
The *miniature1* seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. Plant Cell 8, 971-983
- Chiou**, T.J., Bush, D.R. (1998)

- Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. Proc Natl Acad Sci USA 95, 4784-4788
- Choi, D., Ward, B.L., Bostock, R.M. (1992)**  
Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzym A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. Plant Cell 4, 1333-1344
- Clausen, W., Loveys, B.R., Hawkers, J.S. (1986)**  
Influence of sucrose and hormones on the activity of sucrose synthase and invertase in detached leaves and leaf sections of egg-plant (*Solanum melongena*). Plant Physiol. 124, 345-358
- Coffin, R.H., Yada, R., Parkin, K.L., Grodzinski, B., Stanley, D.W. (1987)**  
Effekt on low-temperature storage on sugar concentration and chip colour of certain processing potato cultivars and selections. J: Food Sci. 52, 639-645
- Davis, M., Butler, W., Vyda, M.E. (1990)**  
Molecular response to environmental stresses and their relationship to soft rot. In: Molecular and cellular biology of the potato (M.E. Vayda, W.D. Park. eds.). pp 71-87. CAB International, Wallingford, UK.
- Dickinson, C.D., Altabella, T., Chrispeels, M.J. (1991)**  
Slow-growth phenotype of transgenic tomato expressing apoplasmic invertase. Plant Physiol. 95, 420-425
- Doehlert, D.C. (1987)**  
Substrate inhibition of maize endosperm sucrose synthase by fructose and its interaction with glucose inhibition. Plant Sci. 52, 153-157
- Doke, N. (1983)**  
Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. Physiol. Plant Pathol. 23, 345-357
- Echeverria, E., Salvucci, M.E., Gonzales, P., Paris, G., Salerno, G. (1997)**  
Physical and kinetic evidence for an association between Sucrose-phosphate Synthase and Sucrose-phosphate Phosphatase. Plant Physiol. 115, 223-227
- Ehneß, R., Roitsch, T. (1997)**  
Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. Plant Journal 11, 539-548
- Elliott, K.J., Butler, W.O., Dickinson, C.D., Konno, Y., Vedvick, L.F., Mirkov, E. (1993)**  
Isolation and characterisation of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. Plant Mol. Biol. 21, 515-524
- Escherich, W. (1980)**

- Free space invertase, its possible role in phloem unloading. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 93, 363-378
- Fabbri, A., Fanelli, C., Reverberi, M., Ricelli, A., Camera, E., Urbanelli, S., Rossini, A., Picardo, M., Altamura, M. (2000)**  
Early physiological and cytological events induced by wounding in potato tuber. J. Exp. Bot. 51, 1267-1275
- Fahrendorf, T., Ni, W., Shorrosh, B.S., Dixon, R.A. (1995)**  
Stress response in alfalfa XIX. Transkriptional activation of pentose phosphae pathway genes at the onset of the isoflavonoid phytoalexin response. Plant Mol. Biol. 28, 885-900
- Foyer, C., Rennenberg, H. (2000)**  
Regulation of glutathione synthesis and ist role in abiotic and biotic stress defence. In: Sulur nutrition and sulfur assimilation inhigher plants (C. Brunold et al. eds.). pp 127-153. Paul Haupt Verlag, Bern, Switzerland.
- Foyer, C., Theodoulou, F., Delrot, S. (2001)**  
The function of inte- and extracellular glutathione transport systems in plants. TIPS 6, 486-492
- Fukushima, E., Arata, Y., Endo, T., Sonnewald, U., Sato, F. (2001)**  
Improved salt tolerance of transgenic tobacco expressing apoplastic yeast-derived invertase. Plant & Cell Physiology, 42(2), 245-249
- Gerlach, D. (1977)**  
Botanische Mikrotechniken. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Godt, D.E., Roitsch, T. (1997)**  
Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. Plant Physiol. 115, 273-282
- Graeve, K., von Schaewen, A., Scheibe, R. (1994)**  
Purification, characterisation, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Journal. 5 (3), 353-361
- Greiner, S., Weil, M., Krausgrill, S., Rausch, T. (1995)**  
A tobacco cDNA coding for cell wall invertase. Plant Physiol. 108, 825-826
- Greiner, S., Krausgrill, S., Rausch, T. (1998)**  
Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor: proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. Plant Physiol. 116, 733-742
- Greiner, S., Rausch, T., Sonnewald, U., Herbers, K., (1999)**  
Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. Nature BioTech. 17, 708-711
- Greiner, S. (1999)**  
Invertase-Inhibitoren in höheren Pflanzen: Eine neue Genfamilie. Inaugural- Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

- Guivarc'h**, A., Rembur, J., Goetz, M., Roitsch, T., Noin, M., Schmülling, T., Chriqui, D. (2002)  
Local expression of *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. *J. Exp. Botany* 53, 621-629
- Haigler**, H.C., Ivanova-Datcheva, M., Hogan, P.S., Salnikov, V.V., Hwang, S., Martin, K., Delmer, D.P. (2001)  
Carbon partitioning in cellulose synthesis. *Plant Mol. Biol.* 47, 29-51
- Hajirezaei**, M., Takahata, Y., Trethewey, R.N. Willmitzer, L., Sonnewald, U. (2000)  
Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *J. Exp. Bot.* 51, 439-445
- Hannon**, G.J. (2002)  
RNA interference. *Nature* 418, 244-21
- Hedley**, P.E., Machray, G.C., Davies, H.V., Burch, L., Waugh, R. (1993)  
cDNA cloning and expression of a potato (*Solanum tuberosum*) invertase. *Plant Mol. Biol.* 22, 917-922
- 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. Effects on photosynthesis, leaf solute composition, water relations and tuber composition. *Plant Physiol.* 100, 301-308
- Herbers**, K., Meuwly, P., Frommer, W.B., Metraux, J.P., Sonnewald, U. (1996)  
Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8, 793-803
- Hill**, M., Reimholz, R., Schröder, R., Nielsen, T.H., Stitt, M. (1996)  
The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose-phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. *Plant, Cell & Environment* 19, 1223-1237
- Huber**, S.C., Huber, J.L., Liao, P., Gage, D.A., McMichael, R.W. Jr., Chourey, P.S., Hannah L.C. Koch K. (1996)  
Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. *Plant Physiol.* 112(2), 793-802
- Jaynes**, T.A., Nelson, O.E. (1971)  
An invertase inactivator in maize endosperm and factors affecting inactivation. *Plant Physiol.* 47, 629-634
- Jones**, M.G.K., Outlaw, W.H., Lowry, O.H. (1977)  
Enzymic assay of  $10^{-7}$  to  $10^{-14}$  moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiol.* 60, 379-383
- Kim**, J.Y. Mahe, A., Brangeon, J., Prioul, J.L. (2000)

- A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiol.* 124(1), 71-84
- Klann, E.M., Chetelat, R.T., Bennet, A.B. (1993)**  
Expression of acid invertase gene controls sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. *Plant Physiol.* 103, 863-870
- Klann, E.M., Hall, B., Bennet, A.B. (1996)**  
Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiol.* 112, 1321-1330
- Koch, K.E. (1996)**  
Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 509-540
- Kolattukudy, P. E. (1980)**  
Biopolyester membranes of plants: Cutin and suberin. *Science* 208, 990-1000.
- Krause, K.P., Hill, L., Reimholz, R., Hamborg Nielsen, T., Sonnewald, U., Stitt, M. (1998)**  
Sucrose metabolism in cold-stored potato tubers with decreased expression of sucrose-phosphate-synthase. *Plant, Cell & Environment* 21, 285-299
- Krausgrill, S., Sander, A., Greiner, S., Weil, M., Rausch, Th. (1996)**  
Regulation of cell wall invertase by a proteinaceous inhibitor. *J. Exp. Bot.* 47, 1193-1198
- Krausgrill, S., Greiner, S., Köster, U., Vogel, R., Rausch, Th. (1998)**  
In transformed tobacco cells the apoplastic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase. *Plant Journal*, 13, 275-280
- Laanest, L.; Tohver, A., Palm, E. (1995)**  
Soluble and alicyclic acids in aging potato tuber slices. *Eesti Teaduste Akadeemia Toimetised Bioloogia* 44, 1-10
- Laemmli, U.K., (1970)**  
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamb, C.; Dixon, R. A. (1997)**  
The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275
- Löw, R., Rausch, T. (1996)**  
Detection of nucleic acids with biotinylated PCR-amplified probes. In: *A Laboratory Guide to Biotin-Labeling in Biomolecule Analysis* (T. Meier, F. Fahrenholz, eds.). pp 201-213. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Logeman, J., Schell, J., Willmitzer, L. (1987)**  
Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Anal. Biochem.* 163, 16-20
- Lorberth, R., Ritte, G., Willmitzer, L., Kossmann, J. (1998)**



- Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nature Biotechnology* 16(5), 473-477
- Lorenz, K., Lienhard, S., Sturm, A. (1995)**  
Structural organisation and differential expression of carrot  $\beta$ -fructofuranosidase genes: identification of a gene coding for flower bud-specific isoenzyme. *Plant Mol. Biol.* 28, 189-194
- Lozano, R.M., Wong, J.H., Yee, B.C., Peters, A., Kobrehel, K., Buchanan, B.B. (1996)**  
New evidence for a role for thioredoxin *h* in germination and seedling development. *Planta* 200, 100-106
- Lulai, E. C.; Corsini, D. L. (1998)**  
Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) woundhealing. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53, 209-222.
- Matsuhita, K., Uritani, I. (1974)**  
Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertases. *Plant Physiol.* 54, 60-66
- Miller, E.M., Chourey, P.S. (1992)**  
The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *Plant Cell* 4, 297-305
- Midori, Y., Dingbo, L., Akira K. (2001)**  
Sugar-induced expression of wheat fructan synthesis genes and their promoter response to sugar signaling. *Plant & Cell Physiology* 42(Supplement), S. 122
- Morelli, J.K., Shewmaker, C.K., Vayda, M.E. (1994)**  
Biphasic stimulation of translational activity correlates with induction of translational elongation factor 1 subunit a upon wounding in potato tubers. *Plant Physiol.* 106, 897-903
- Morelli, J.K., Zhou, W., Yu, J., Lu, C., Vayda, M.E. (1998)**  
Actin depolymerization affects stress-induced translational activity of potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 116, 1227-1237
- Morris, D.A., Athur, E.D. (1985)**  
Invertase activity, carbohydrate metabolism and cell expansion in the stem of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* 36, 632-633
- Noctor, G., Foyer, C.H. (1998)**  
Simultaneous Measurement of foliar glutathione,  $\gamma$ -glutamylcysteine and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other methods for glutathione. *Analytical Biochemistry* 264, 98-110
- Ohyama, A., Ito, H., Sato, T., Nishimura, S., Imai, T., Hirai, M. (1995)**  
Suppression of acid invertase activity by antisense RNA modifies the sugar composition of tomato fruit. *Plant Cell Physiol.* 36, 369-376
- Ovalle, R., Keyes, A.C., Ewing, E.E., Quimby, F.W. (1995)**

- Purification and characterization of the acid-stable proteinaceous inhibitor of potato tuber by nonideal size exclusion chromatography. *J. Plant Physiol.* 147, 334-340
- Pfeiffer, I., Kutschera, U. (1995)**  
Sucrose metabolism and cell elongation in developing sunflower hypocotyls. *J. Exp. Bot.* 46, 631-638
- Pfister, M. (1998)**  
Zur Funktion des apoplastischen Inhibitors in Pflanzen.  
Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Karl-Rupprechts-Universität Heidelberg
- Pradel, K.S., Rezmer, C., Krauskirill, S., Rausch, T., Ullrich, C. (1996)**  
Evidence for symplastic phloem unloading with concomitant high activity of acid cell wall invertase in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors. *Bot. Acta* 109, 397-404
- Pressey, R. (1994)**  
Invertase inhibitors in tomato fruit. *Phytochemistry* 36, 543-546
- Ramloch-Lorenz, K., Knudsen, S., Sturm, A. (1993)**  
Molecular characterisation of the gene for carrot cell wall  $\beta$ -fructosidase. *Plant Journal* 4, 545-554
- Razem, F.A., Bernards, M.A. (2002)**  
Hydrogen peroxide is required for poly(phenolic) domain formation during wound-induced suberization. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1009–1015
- Ricardo, C.P.P., ap Rees, T. (1970)**  
Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry* 9, 123-131
- Roitsch, T., Bittner, M., Godt, D.E. (1995)**  
Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant. Physiol.* 108, 285-294
- Roitsch, T. (1999)**  
Source-sink regulation by sugars and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 198–206
- Roitsch, T., Ehneß, R. (2000)**  
Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* 32 (2-3), 359-367
- Roitsch, T., Ehneß, R., Goetz, M., Hause, B., Hofmann, M., Sinha, A.K. (2000)**  
Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress response and sugar signaling. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 815-825
- Rook, F., Gorris, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeck, P., Smeekens, S. (1998)**  
Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant Journal* 15, 253–263
- Rosenkranz, H., Vogel, R., Greiner, S., Rausch, T. (2001)**

- In wounded sugar beet (*Beta vulgaris*) tap-root, hexose accumulation correlates with the induction of vacuolar isoform. *J. Exp. Bot.* 52, 2381-2385
- Salanoubat, M., Belliard, G. (1989)**  
The steady state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose. *Gene* 84, 181-185
- Sander, A., Krausgrill, S., Greiner, S., Weil, M., Rausch, T. (1996)**  
Sucrose protects cell wall invertase but not vacuolar invertase against proteinaceous inhibitor. *FEBS Lett.* 385, 171-175
- Sato, T., Iwatsubo, T., Takahashi, M., Nakagawa, H., Ogura, N., Mori, H. (1993)**  
Intercellular localisation of acid invertase in tomato fruit and molecular cloning of the cDNA for the enzyme. *Plant Cell Physiol.* 43, 263-269
- Schwimmer, S., Makower, R.U., Romem, E.S. (1961)**  
Invertase and invertase inhibitor in potato. *Plant Physiol.* 36, 313-316
- Sheen, J., Zhou, L., Jang, J.C. (1999)**  
Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 410-418
- Sinha, A.K., Hofmann, M.G., Römer, U., Köckenberger, W., Elling, L., Roitsch, T. (2002)**  
Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiol.* 128, 1480-1489
- Smeekens, S. (1998)**  
Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 230-234
- Sonnewald, U., Lerchl, J., Zrenner, R., Frommer, W. (1994)**  
Manipulation of sink-source relationships in transgenic plants. *Plant, Cell & Environment*, 17, 649-658
- Sonnewald, U., Hajirezaei, M., Kossmann, J., Heyer, A., Trethewey, R.N., Willmitzer, L. (1997)**  
Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnology.* 15(8), 794-797
- Sowokinos, J., Varns, J.L. (1992)**  
Induktion of sucrose synthase in potato tissue culture: effect of carbon source and metabolic regulators on sink strength. *J. Plant Physiol.* 139, 672-679
- Sowokinos, J. (1994)**  
Post-harvest regulation of sucrose accumulation in transgenic potatoes: role and properties of potato tuber UDP-glucose pyrophosphorylase. In: *The molecular and cellular biology of the potato* (Belknap, W.R., Vayda, M.E., Park, W.D. eds.). 2<sup>nd</sup> edition. CAB International, Oxon, UK.
- Stadnik, M.J., Buchenauer, H. (2000)**  
Inhibition of phenylalanin ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. *Physiological & Mol. Plant Pathol.* 57, 25-34
- Stark, R.E., Sohn, W., Pacchiano, R.A. Jr., Al-Bashir, M., Garbow, J.R. (1994)**

- Following suberization in potato wound periderm by histochemical and solid-state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance methods. *Plant Physiol.* 104(2), 527-533
- Stermer**, B.A. , Bostock, R.M. (1987)  
Involvement of 3-hydroxy-3-methylglutharyl coenzym A reductase in the regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. *Plant Physiol.* 84, 404-408
- Sturm**, A., Chrispeels, J. (1990)  
cDNA cloning of carrot extracellular  $\beta$ -fructosidase and ist expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2, 1107-1119
- Sturm**, A., Sebkova, V., Lorenz, K., Hardegger, M., Lienhard, S., Unger, C. (1995)  
Development- and organ-specific expression of genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid  $\beta$ -fructofuranosidase in carrot. *Planta* 195, 601-610
- Sturm**, (1999)  
Invertases. Primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.*, Vol. 121, 1-7
- Sutherland**, M. W. (1991)  
The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 79-93
- Swain**, T., Hillis, W.E. (1959)  
The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10, 63-68
- Tang**, G.-Q., Lüscher, M., Sturm, A. (1999)  
Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* 11, 177-189
- Towbin**, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 4350-4354
- Trethewey**, R.N., Riesmeier, J.W., Willmitzer L., Stitt, M., Geigenberger, P. (1999)  
Tuber-specific expression of a yeast invertase and a bacterial glukokinase in potato leads to an activation of sucrose phosphate synthase and the creation of a sucrose futile cycle. *Planta* 208, 227-238
- Trethewey**, R.N., Fernie, A.R., Bachmann, A., Fleischer-Notter, H., Geigenberger, P., Willmitzer L. (2001)  
Expression of a bacterial sucrose phosphorylase in potato tubers results in a glucose-independent induction of glycolysis. [Article] *Plant, Cell & Environment*, 24(3), 357-365
- Truernit**, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J., Sauer, N. (1996)

- The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogene challenge. *Plant Cell* 8, 2169-2182
- Tymowska-Lalanne**, Z., Schwebel-Dugue, N., Lecharny, A., Kreis, M. (1996)  
Expression and cis-acting elements of the *Atβfruct1* gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a cell wall invertase. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 431-442
- Unger**, C., Hardegger, M., Lienhard, S., Sturm, A. (1994)  
cDNA cloning of carrot (*Daucus carota*) soluble acid β-fructofuranosidases and comparison with the cell wall enzyme. *Plant Physiol.* 104,1351-1357
- Vayda**, M.E., Schaeffer, H.J. (1988)  
Hypoxic stress inhibits the appearance of wound-response proteins in potato tuber. *Plant Physiol.* 88, 805-809
- Vayda**, M.E., Antonov, L.S., Yang, Z., Butler, W.O., Lacy, G.H. (1992)  
Hypoxic stress inhibits aerobic wound-induced resistance and activates hypoxic resistance to bacterial soft rot. *Am. Potato Journal* 69, 239-253
- Vitale**, A., Raikhel, N. (1999)  
What do proteins need to reach different vacuoles? *TIPS Vol.4 Nr. 4*, 149-155
- von Willert**, D.J., Matyssek, R., Herppich, W. (1995)  
Experimentelle Pflanzenökologie. Grundlagen und Anwendung. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- von Schaewen**, A., Stitt, M., Schmidt, R., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1990)  
Expression of 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, 3033-3044
- Walker**, D.A. (1985)  
Measurement of oxygen and chlorophyll fluorescence.  
Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis (J. Coombs, D.O. Hall, S.P. Long, J.M.O. Seurlock. eds.). 2<sup>nd</sup> edition. Pergamon Press, Oxford.
- Weber**, H., Borisjuk, L., Heim, U., Buchner, P., Wobus, U. (1995)  
Seed coat-associated invertases of faba bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNA's and cell type-specific expression. *Plant Cell* 7, 1835-1846
- Weber**<sup>1</sup>, H., Borisjuk, L., Heim, P., Wobus, U. (1996)  
Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant Journal* 10(5), 823-834
- Weber**<sup>2</sup>, H., Borisjuk, L., Heim, P., Wobus, U. (1996)  
Sugar import and metabolism during seed development. *TIPS* 2(5), 169-174
- Weil**, M., Rausch, T. (1994)

- Acid invertase in *Nicotiana tabacum* crown-gall cells: molecular properties of the cell wall isoform. *Planta* 193, 430-437
- Weil**, M., Krausgrill, S., Schuster, A., Rausch, Th. (1994)  
A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell wall peptide acts as an *in vitro* inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase. *Planta* 193, 438-445
- Winter**, H., Huber, J.L., Huber, S.C. (1997)  
Membrane association of sucrose synthase: Changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation. *FEBS Letters* 420(2-3), 151-155
- Yang**, Z., Park, H., Lacy, G.H., Cramer, C.L. (1991)  
Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutryl coenzyme A reductase genes by wounding and pathogen challenge. *Plant Cell* 3, 397-405
- Yao**, K., De Luca, V., Brisson, N. (1995)  
Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 7, 1787-1799
- Zhang**, L., Cohn, N.S., Mitchell, J.P. (1996)  
Induction of a pea cell-wall invertase gene by wounding and its localized expression in phloem. *Planta* 112, 1111-1117
- Zrenner**, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., Sonnewald, U. (1995)  
Evidence for the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum*). *Plant Journal* 7(1), 97-107
- Zrenner**, R., Schüler, K., Sonnewald, U. (1996)  
Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato. *Planta* 198, 246-252

## 8 Anhang

### 8.1 Liste der Abkürzungen

β-M	2- Mercaptoethanol
μ	mikro
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
Abb.	Abbildung
A. bidest	bidestilliertes Wasser
Acc.-Nr.	englisch: Accession number, Zugangsnummer für Sequenzdatenbank
A.t.	Agrobacterium tumefaciens
ATP	Adenosin-5-Triphosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHES	2-[N-Cyclohexylamino]ethanesulfonsäure
ConA	ConcanavalinA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Dioxynukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Dioxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)
FG	Frischgewicht
g	Gramm/ Erdbeschleunigung: $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$
G-6-P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion/ reduziert
GSSG	Glutathion/ oxidiert
h	Stunde/hour
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie/high pressure liquid chromatographie
IgG	Immunglobulin G
kat	katal/ Einheit für katalytische Aktivität = mol/sec
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid

I	Liter
LMW	englisch: <b>Low molecular weight marker</b> , Proteingrößenmarker
m	milli/ Meter
M	Molarität/ mol/l
MBB	Monobrombimane
min	Minuten
MMP	Magermilchpulver
Mol	Stoffmenge
MOPS	3-(N-Morpholino)propansäure
MPa	Mega-Pascal, Einheit für Druck = $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
mRNA	englisch: messenger RNA/ Boten-RNA
N	Normal
NAD/H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte/ reduzierte Form)
NADP/H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte/ reduzierte Form)
Nt-CIF )*	englisch: <i>Nicotiana tabacum</i> - <b>Cellwall Inhibitor of <math>\beta</math>-Fructosidase</b> , ehemals <b>Nt-inh1</b>
Nt-VIF )*	englisch: <i>Nicotiana tabacum</i> - <b>Vacuolar Inhibitor of <math>\beta</math>-Fructosidase</b> , ehemals <b>Nt-inhh</b>
OD	optische Dichte
p.a.	per analysum
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	<b>Phenylalaninamoniumlyase</b>
PCR	Polymerase chain reaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RNA	englisch: ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
ROS	englisch: reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffmoleküle wie z.B. $\text{H}_2\text{O}_2$
SDS	englisch: Sodium dodecyl sulfate/ Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunden/ second
SPS	<b>Saccharose-Phosphat-Synthase</b>
SPP	<b>Saccharose-Phosphat-Phosphatase</b>
SuSy	englisch: <b>sucrose-synthase</b> , Saccharose-Synthase
TAE	Tris-base, Acetat, EDTA-Puffer
TBA	tert-Butanol/ 2-Butanol
TEA	Triethanolamin
Tm	berechnet für AT 2°C/ GC 4°C



---

U	englisch: Unit/ Einheit für Enzymaktivität = $\mu\text{mol}/\text{min}$
UDP	Uridin-Diphosphat
VI	vakuoläre Invertase
WT	Wildtyp
YEB	englisch: <b>Y</b> east <b>E</b> xtract <b>B</b> ovine, Medium
z.B.	zum Beispiel
ZWI	Zellwandinvertase

)\*:

Die in der Inaugural-Dissertation von S.Greiner (1999) beschriebenen Invertaseinhibitoren

Nt-inh1 (**N**icotiana **t**abacum **i**nhibitor **1**)  
und *Nt-inhh* (**N**icotiana **t**abacum **i**nhibitor **h**omolog)

wurden aufgrund Vereinheitlichung der Bezeichnungen von pflanzlichen Inhibitoren und die Einteilung der Invertasen in die Kategorie der  $\beta$ -Fruktosidasen in

Nt-CIF (**N**icotiana **t**abacum- **C**ellwall **I**nhibitor of  $\beta$ -**F**ruktosidase)  
und Nt-VIF (**N**icotiana **t**abacum- **V**acuolar **I**nhibitor of  $\beta$ -**F**ruktosidase)

umbenannt.

## 8.2 Tabellen

Alle Angaben zu Aktivitäten der Invertasen entsprechen der Einheit Katal, bezeichnend für „katalytische Aktivität“. 1 katal oder kat entspricht 1 mol/s Substratumsatz (1 U = 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  = 16,67 nkat). Die errechneten Werte sind auf 1g Frischgewicht (FG) bezogen. Die Einheit lautet daher nkat/g FG. Alle Werte zu Glukose-, Fruktose- und Saccharosekonz. sind in  $\mu\text{mol}/\text{g}$  FG angegeben. Die in den Experimenten ermittelten Daten zu Zuckerkonzentrationen und Invertaseaktivitäten wurden innerhalb der Zeiträume 0-72 h und 0-96 h nach Verwundung ermittelt.

**Tabelle 1:** Versuch I und II, Invertaseaktivitäten (Seite 106)

**Tabelle 2:** Versuch I und II, Hexose- und Saccharosekonzentrationen (Seite 107-108)

<i>Versuch I, In- vertase- aktivitäten</i>	<b>0 h</b>	<b>8 h</b>	<b>16 h</b>	<b>24 h</b>	<b>40 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h n. Verw.</b>
<b>Wildtyp ZWI</b>	0,0048 ± 0,0035	0,0199 ± 0,0055	0,0831 ± 0,0212	0,1274 ± 0,0333	0,1496 ± 0,0619	0,1881 ± 0,0500	0,1967 ± 0,0254
<b>VI</b>	0,0154 ± 0,0073	0,0226 ± 0,0128	0,0722 ± 0,0299	0,2630 ± 0,0816	0,3389 ± 0,0934	0,3539 ± 0,1724	0,4783 ± 0,0661
<b>Nt-VIF 39 ZWI</b>	0,0115 ± 0,0030	0,0224 ± 0,0075	0,1135 ± 0,0282	0,1531 ± 0,0286	0,1569 ± 0,0411	0,1449 ± 0,0476	0,1273 ± 0,0358
<b>VI</b>	0,0133 ± 0,0105	0,0245 ± 0,0188	0,0430 ± 0,0263	0,0271 ± 0,0131	0,0354 ± 0,0105	0,0398 ± 0,0121	0,0433 ± 0,0143
<b>Nt-CIF 7 ZWI</b>	0,0078 ± 0,0059	0,0106 ± 0,0031	0,0352 ± 0,0142	0,0204 ± 0,0106	0,0241 ± 0,0073	0,0365 ± 0,0083	0,0449 ± 0,0099
<b>VI</b>	0,0119 ± 0,0044	0,0232 ± 0,0185	0,0290 ± 0,0205	0,1048 ± 0,0338	0,2231 ± 0,0153	0,1481 ± 0,0480	0,1331 ± 0,0433
<i>Versuch II, Invertase- aktivitäten</i>							
<i>Versuch II, Invertase- aktivitäten</i>	<b>0 h</b>	<b>8 h</b>	<b>16 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h n. Verw.</b>
<b>Wildtyp ZWI</b>	0,0451 ± 0,0204	0,0518 ± 0,0357	0,1218 ± 0,0584	0,1481 ± 0,0692	0,1041 ± 0,0415	0,1132 ± 0,0377	0,1156 ± 0,0356
<b>VI</b>	0,0602 ± 0,0425	0,0377 ± 0,0153	0,0612 ± 0,0252	0,0855 ± 0,0311	0,1833 ± 0,0368	0,3971 ± 0,0884	0,2892 ± 0,1388
<b>Nt-VIF 25 ZWI</b>	0,0376 ± 0,0325	0,0575 ± 0,0111	0,1320 ± 0,0075	0,1353 ± 0,0270	0,1065 ± 0,0170	0,1044 ± 0,0711	0,0904 ± 0,0216
<b>VI</b>	0,0243 ± 0,0113	0,0249 ± 0,0135	0,0209 ± 0,0077	0,0397 ± 0,0104	0,0135 ± 0,0020	0,0425 ± 0,0515	0,0528 ± 0,0269
<b>Nt-VIF 39 ZWI</b>	0,0222 ± 0,0310	0,0472 ± 0,0034	0,1273 ± 0,0740	0,1579 ± 0,0255	0,1024 ± 0,0257	0,1193 ± 0,0190	0,0898 ± 0,0275
<b>VI</b>	0,0128 ± 0,0028	0,0310 ± 0,0191	0,0366 ± 0,0304	0,0252 ± 0,0184	0,0186 ± 0,0192	0,0333 ± 0,0171	0,0449 ± 0,0285
<b>Nt-CIF 1 ZWI</b>	0,0200 ± 0,0170	0,0178 ± 0,0165	0,0150 ± 0,0083	0,0318 ± 0,0250	0,0214 ± 0,0153	0,0295 ± 0,0137	0,0244 ± 0,0222
<b>VI</b>	0,0338 ± 0,0285	0,0537 ± 0,0355	0,0778 ± 0,0353	0,0745 ± 0,0125	0,1055 ± 0,0195	0,1690 ± 0,0180	0,2411 ± 0,0422
<b>Nt-CIF 7 ZWI</b>	0,0290 ± 0,0187	0,0145 ± 0,0036	0,0356 ± 0,0249	0,0202 ± 0,0054	0,0607 ± 0,0331	0,0630 ± 0,0263	0,0496 ± 0,0092
<b>VI</b>	0,0703 ± 0,0465	0,0481 ± 0,0183	0,0682 ± 0,0453	0,1738 ± 0,0760	0,1803 ± 0,0239	0,1792 ± 0,0816	0,2189 ± 0,0677

<i>Versuch I,</i> Zuckerkonz.	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>40</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>Wildtyp Glukose</b>	1,32 ± 1,33	0,98 ± 0,76	2,22 ± 2,13	3,49 ± 1,49	13,1 ± 3,76	9,71 ± 4,81	11,9 ± 5,07
<b>Fruktose</b>	1,00 ± 0,55	0,85 ± 0,35	1,00 ± 0,50	2,16 ± 0,93	5,73 ± 1,93	4,78 ± 1,87	3,99 ± 1,63
<b>Saccharose</b>	4,49 ± 1,21	3,35 ± 1,76	4,21 ± 1,32	2,47 ± 1,33	3,72 ± 1,18	2,39 ± 0,30	1,64 ± 0,30
<b>Nt-VIF 39 Glukose</b>	0,16 ± 0,01	0,20 ± 0,11	0,22 ± 0,08	0,29 ± 0,15	0,50 ± 0,19	0,70 ± 0,09	1,27 ± 0,55
<b>Fruktose</b>	0,42 ± 0,04	0,57 ± 0,24	0,53 ± 0,23	0,52 ± 0,33	0,51 ± 0,19	0,62 ± 0,02	1,02 ± 0,36
<b>Saccharose</b>	4,84 ± 0,20	5,13 ± 2,74	6,16 ± 1,64	6,40 ± 2,01	7,76 ± 2,01	7,63 ± 0,76	7,92 ± 1,83
<b>Nt-CIF 7 Glukose</b>	0,59 ± 0,01	0,23 ± 0,19	0,49 ± 0,26	2,15 ± 0,70	5,12 ± 2,83	6,49 ± 0,92	9,66 ± 4,33
<b>Fruktose</b>	0,38 ± 0,07	0,34 ± 0,09	0,47 ± 0,17	1,36 ± 0,44	2,67 ± 1,43	3,30 ± 0,16	5,48 ± 2,88
<b>Saccharose</b>	2,07 ± 0,61	2,32 ± 0,39	2,31 ± 0,60	3,07 ± 1,06	2,09 ± 0,66	1,68 ± 0,47	1,49 ± 1,09
<b>Glukose + Fruktose/ Saccharose-Verhältnis</b>							
<b>Wildtyp</b>	0,52	0,55	0,77	2,29	5,07	6,07	9,64
<b>Nt-VIF 39</b>	0,12	0,15	0,12	0,13	0,13	0,17	0,29
<b>Nt-CIF 7</b>	0,47	0,25	0,42	1,15	3,72	5,82	10,17
<b>Versuch II,</b> Zuckerkonz.							
	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
<b>Wildtyp Glukose</b>	4,32 ± 1,97	6,00 ± 5,89	13,2 ± 6,66	14,4 ± 5,47	23,5 ± 6,85	25,2 ± 0,88	30,2 ± 2,75
<b>Fruktose</b>	0,55 ± 0,48	0,41 ± 0,32	2,32 ± 2,73	3,15 ± 3,73	8,26 ± 7,02	10,7 ± 2,98	14,1 ± 4,4
<b>Saccharose</b>	10,0 ± 4,65	9,09 ± 4,64	11,4 ± 4,56	8,61 ± 5,49	12,0 ± 6,45	15,8 ± 8,77	12,8 ± 7,13
<b>Nt-VIF 25 Glukose</b>	0,31 ± 0,09	0,23 ± 0,11	0,59 ± 0,64	0,34 ± 0,24	0,86 ± 0,39	3,07 ± 2,09	3,89 ± 3,04
<b>Fruktose</b>	0,52 ± 0,16	0,32 ± 0,28	0,50 ± 0,32	0,39 ± 0,03	0,86 ± 0,55	2,13 ± 1,22	2,49 ± 1,33
<b>Saccharose</b>	11,9 ± 1,32	8,93 ± 4,24	10,9 ± 2,93	10,1 ± 8,21	18,6 ± 5,06	42,8 ± 7,87	34,7 ± 16,2

<i>Versuch II,</i> <b>Zuckerkonz.</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
<b>Nt-VIF 39</b> <b>Glukose</b>	0,29 ± 0,18	0,31 ± 0,15	0,69 ± 0,35	1,59 ± 1,16	0,88 ± 0,37	2,15 ± 1,34	6,61 ± 5,24
<b>Fruktose</b>	0,41 ± 0,21	0,43 ± 0,09	0,42 ± 0,13	0,65 ± 0,53	0,65 ± 0,29	1,35 ± 0,78	2,47 ± 1,4
<b>Saccharose</b>	10,6 ± 6,92	7,21 ± 3,16	11,3 ± 4,99	16,5 ± 10,4	18,5 ± 3,03	25,7 ± 7,55	38,8 ± 19,6
<b>Nt-VIF 53</b> <b>Glukose</b>	1,33 ± 1,98	1,37 ± 1,99	0,29 ± 0,11	1,07 ± 0,94	1,70 ± 0,78	2,15 ± 1,13	3,75 ± 1,4
<b>Fruktose</b>	0,28 ± 0,11	1,94 ± 2,74	0,47 ± 0,42	0,60 ± 0,34	0,99 ± 0,15	1,24 ± 0,64	1,88 ± 1,03
<b>Saccharose</b>	16,4 ± 7,62	15,2 ± 0,69	11,5 ± 2,76	12,84 ± 3,72	31,8 ± 11,04	25,7 ± 5,54	37,0 ± 3,42
<b>Nt-CIF 1</b> <b>Glukose</b>	5,21 ± 3,06	4,91 ± 4,14	5,95 ± 6,08	5,06 ± 3,6	18,0 ± 15,58	19,7 ± 7,82	22,4 ± 4,89
<b>Fruktose</b>	1,21 ± 1,68	0,30 ± 0,11	1,44 ± 1,16	2,14 ± 1,29	8,34 ± 6,01	12,9 ± 4,92	15,7 ± 3,2
<b>Saccharose</b>	12,1 ± 9,69	12,0 ± 8,91	11,0 ± 9,33	11,0 ± 5,24	15,4 ± 7,63	15,3 ± 4,17	19,8 ± 8,94
<b>Nt-CIF 7</b> <b>Glukose</b>	8,19 ± 3,05	4,50 ± 2,77	7,29 ± 5,05	6,88 ± 4,94	18,7 ± 2,71	26,2 ± 11,54	26,4 ± 13,22
<b>Fruktose</b>	0,58 ± 0,46	0,28 ± 0,04	0,80 ± 0,06	1,13 ± 0,4	6,91 ± 1,45	15,2 ± 6,71	17,8 ± 9,63
<b>Saccharose</b>	11,4 ± 10,17	10,4 ± 7,06	10,7 ± 5,75	10,9 ± 10,08	12,6 ± 6,51	17,7 ± 4,55	20,2 ± 7,64
<b>Nt-CIF 70</b> <b>Glukose</b>	9,64 ± 12,65	8,71 ± 8,36	10,8 ± 6,18	12,7 ± 1,43	28,2 ± 9,56	31,4 ± 2,05	39,4 ± 7,46
<b>Fruktose</b>	1,13 ± 1,44	0,41 ± 0,21	1,10 ± 0,95	4,15 ± 2,86	13,5 ± 7,13	17,5 ± 3,75	18,4 ± 8,2
<b>Saccharose</b>	13,3 ± 11,42	11,1 ± 8,66	12,2 ± 9,48	14,0 ± 8,13	18,2 ± 15,49	23,1 ± 16,51	20,7 ± 15,03
<b>Glukose + Fruktose/ Saccharose-Verhältnis</b>							
<b>Wildtyp</b>	0,48	0,70	1,36	2,04	2,64	2,27	3,47
<b>Nt-VIF 25</b>	0,53	0,43	0,67	0,43	1,19	1,11	1,38
<b>Nt-VIF 39</b>	0,77	0,46	0,76	0,73	2,03	2,34	2,18
<b>Nt-VIF 53</b>	0,81	0,82	0,98	1,21	2,29	2,11	2,79
<b>Nt-CIF 1</b>	0,07	0,06	0,10	0,07	0,09	0,12	0,18
<b>Nt-CIF 7</b>	0,07	0,10	0,10	0,14	0,08	0,14	0,23
<b>Nt-CIF 70</b>	0,10	0,22	0,07	0,13	0,08	0,13	0,15

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Verzeichnis	Abbildung	Seite
<b>Einleitung</b>	Subzelluläre Anordnung und vermutliche Funktion der Invertasen	14
	Der Weg der Stärke zu den reduzierenden Zuckern in Kartoffelknollen	20
<b>Ergebnisse</b>	Gesamtabbildung: wundinduzierte mRNA- und Proteinexpression der ZWI, VI, (PAL), ZWI- und VI-Aktivitäten und Glukose-, Fruktose und Saccharosekonz. im Wildtyp in zwei Experimenten	24
	Gesamtabbildung: wundinduzierte mRNA- und Proteinexpression der ZWI, VI, ZWI- und VI-Aktivitäten und Glukose-, Fruktose und Saccharosekonz. in den Transformanten vergleichend zum WT	27/ 28
	<b>WT; Transformanten:</b> Hexosen/ Saccharose-Verhältnis nach Verwundung	29
	wundinduzierter Stärkeabbau	30
	wundinduzierte Respiration	32
	<b>WT:</b> Wundperidermbildung	33
	Wachseinlagerung an der Wundoberfläche	35
	<b>WT; Transformanten:</b> mRNA-Expression von SuSy und SPS	36
	selektive SuSy-Aktivität	38
	<b>WT:</b> Vergleich: membrangebundene, selektive, gesamte SuSy-Aktivität	38
	<b>WT; Transformanten:</b> Aktivität der G-6-P-DH	39
	Konzentration von GSH	41
	<b>WT:</b> Abbildung eines tumor- zu nicht-tumorbewachsenen Kartoffelscheibchens	42
<b>WT; Transformanten:</b> Invertaseaktivitäten und Glukose-, Fruktose und Saccharosekonz. in A.t.-Tumor und angrenzendem Gewebe	45	

---

	Hexosen/ Saccharose-Verhältnis in Tumor und angrenzendem Gewebe	46
<b>Diskussion</b>	Stoffwechselschema zum vermutlichen Ablauf wundinduzierten Stärkeabbaus in Zellen des Wildtypknollengewebes	56
	<b>WT; Transformanten:</b> Darstellung der Konzentration löslicher Phenole nach Verwundung	61
	Stoffwechselschema zum vermutlichen Ablauf wundinduzierten Stärkeabbaus in den Transformanten	65
	<b>WT; Transformanten:</b> Aktivitäten von ZWI und VI in 14 Tage alten Tumoren	70

**Ich danke:**

Professor Dr. Thomas Rausch für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und die konstruktive Kritik.

Professor Dr. Michael Wink für die Übernahme des Korreferates.

Der Arbeitsgruppe Rausch des  
Katja, Manu und Ulrike.

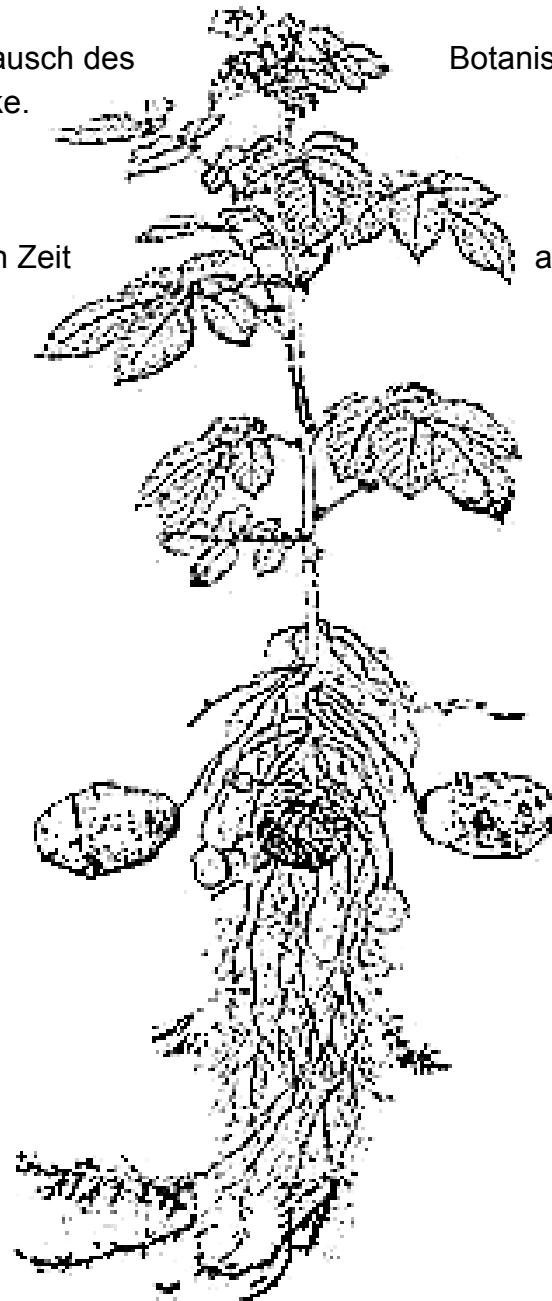
Botanischen Institutes.

Ruth, die zur richtigen Zeit

am richtigen Ort war.

Meiner Familie

und Chris.



Die Arbeiten wurden u.a. ermöglicht durch den Erhalt eines Stipendiums nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetzes (LGFG); Universität Heidelberg, Landesgraduiertenförderung. Die Förderung bezog sich auf den Zeitraum Okt. 1999 bis Sept. 2001.