

**Untersuchungen zur pflanzlichen
Pyrimidin *de-novo* Synthese:
Bedeutung des Enzyms
Dihydroorotase**

MICHAEL SCHRÖDER

2002

INAUGURAL DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

DIPLOM-BIOLOGE
Michael Schröder
aus
MANNHEIM

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Titel:

**Untersuchungen zur pflanzlichen
Pyrimidin *de-novo* Synthese:
Bedeutung des Enzyms
Dihydroorotase**

Gutachter:

Prof. Dr. Mark Stitt
Prof. Dr. Thomas Rausch

Erklärungen gemäß § 7 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

1. Ich erkläre hiermit, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.
2. Ich erkläre hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderen Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 27. November 2002

MICHAEL SCHRÖDER

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von März 1999 bis Mai 2001 am **Botanischen Institut der Universität Heidelberg** und im Zeitraum von Juli 2001 bis April 2002 am **Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie** in Golm durchgeführt.



Dieses Dokument wurde erstellt mit $\text{\LaTeX 2}_{\epsilon}$

„La perfection est atteinte
non quand il ne reste rien à ajouter,
mais quand il ne reste rien à enlever.“

*Vollkommenheit ist nicht erreicht,
wenn man nichts mehr hinzufügen kann,
sondern dann, wenn man nichts mehr weglassen kann.*

Antoine de Saint-Exupéry

**Wir können alles.
Außer Hochdeutsch.**



Baden-Württemberg

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Der Pyrimidin-Metabolismus	2
1.1.1. Die Pyrimidin <i>de-novo</i> Synthese	2
1.1.2. Der Salvage Pathway	5
1.1.3. Der Pyrimidin-Abbauweg	7
1.2. Genomische Organisation in verschiedenen Spezies	8
1.2.1. Organisation in Prokaryonten	9
1.2.2. Organisation in Eukaryonten	9
1.2.3. Spezies mit außergewöhnlichem Pyrimidin-Metabolismus	10
1.3. Subzelluläre Lokalisation der Enzyme	11
1.3.1. Computergestützte Lokalisationsvorhersage	12
1.3.2. GFP Fusionsproteine	13
1.3.3. Confocale Laser Scanning Mikroskopie	14
1.4. Modellorganismen in der pflanzlichen Biotechnologie	15
1.4.1. <i>Solanum tuberosum</i> als Modell-Nutzpflanze	16
1.4.2. Bedeutung transgener Pflanzen zur Erforschung regulativer Stoffwech- selvorgänge	17
1.5. Zielsetzung der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1. Materialien und Geräte	20
2.1.1. Spezielle Chemikalien	20
2.1.2. Spezielle Geräte	20
2.1.3. Bakterienstämme	22
2.1.4. Enzyme	22
2.1.5. Membranen	23
2.1.6. Elektrophorese Standards	23
2.1.7. Plasmide	23
2.1.8. Pflanzen	23
2.1.9. Software	23
2.2. Anzuchtbedingungen	24

2.2.1. Nährmedien	24
2.2.2. Kartoffelkultur	24
2.3. Mikrobiologische Methoden	24
2.3.1. Bakterielle Kulturmedien	24
2.3.2. Lagerung von Bakterienstämmen	25
2.3.3. Bestimmung der Bakteriendichte	25
2.3.4. Herstellung transformationskompetenter Zellen	25
2.3.5. Transformation von <i>E.coli</i> durch Hitzeschock	26
2.3.6. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> durch Elektroporation	26
2.4. Verarbeitung von Nukleinsäuren	27
2.4.1. Extraktion von Plasmid DNA aus Bakterien	27
2.4.2. DNA Gelelektrophorese	28
2.4.3. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.4.4. Ligation linearisierter DNA-Moleküle in Plasmidvektoren	28
2.4.5. Ermittlung der vollständigen 5'-Region bekannter cDNA	29
2.4.6. Isolation von RNA aus Pflanzengewebe	29
2.4.7. RNA Gelelektrophorese	29
2.4.8. Northern Hybridisierung	29
2.5. Biochemische Methoden	31
2.5.1. Homogenisation von Pflanzengewebe	31
2.5.2. Ethanolische Extraktion	31
2.5.3. TCA-Extraktion	32
2.5.4. Denaturierende Proteinisolation und PAGE	32
2.5.5. Direkte Visualisierung der Proteine im Gel	33
2.5.6. Western Transfer und immunologische Detektion	33
2.5.7. Enzymextraktion aus Pflanzengewebe	34
2.5.8. Native Proteinextraktion aus <i>E.coli</i>	35
2.5.9. DHODH Aktivitäts Assay	36
2.5.10. DHOase Aktivitäts Assay	36
2.5.11. Zucker-, Protein und Stärkebestimmung	37
2.5.12. Nukleinsäurebestimmung durch HPLC	39
2.6. Zellkultur	39
2.6.1. BY2 Suspensionskultur	39
2.6.2. Pflanzen in Gewebekultur	39
2.6.3. Ballistische Transformation	39
2.7. Mikroskopie	41
2.7.1. Bestimmung der Zellzahl und Zelldichte in Blattgewebe	41
2.7.2. Confocale Laser Scanning Mikroskopie	42

2.8. Digitale Bildverarbeitung	42
2.8.1. Bestimmung der Blattflächen	42
2.8.2. Bestimmung der Zelldichte	43
2.9. Statistische Auswertung	44
2.9.1. Arithmetisches Mittel & Standardabweichung	44
2.9.2. Beurteilung der Signifikanz	44
3. ERGEBNISSE	45
3.1. Klonierung pflanzlicher Dihydroorotase	45
3.1.1. Klon St5 kodiert das aktive Protein DHOase aus Kartoffel	45
3.1.2. Klon At11 kodiert das aktive Protein DHOase aus <i>A.thaliana</i>	46
3.2. Enzymatischer Nachweis der DHOase-Aktivität	46
3.2.1. Änderung der Absorption durch Entstehung von Orotat	47
3.2.2. Klonierung, Überexpression und Isolation von DHODH aus <i>E.coli</i> als Hilfsmittel zum DHOase Aktivitäts-Assay	48
3.2.3. Flourimetrische Detektion	50
3.3. Charakterisierung der pflanzlichen Dihydroorotase	51
3.3.1. Aktivität der DHOase aus <i>S.tuberosum</i> läßt sich in <i>E.coli</i> bestimmen	51
3.3.2. Abhängigkeit der DHOase aus <i>S.tuberosum</i> vom pH Wert	51
3.3.3. Enzymkinetik pflanzlicher Dihydroorotase	52
3.3.4. Aktivität der DHOase aus <i>S.tuberosum</i> läßt sich in pflanzlichem Gewebe bestimmen.	55
3.4. Subzelluläre Lokalisation	56
3.4.1. Die Sequenz von St5 zeigt keine typischen Targetmuster	56
3.4.2. Herstellung zweier DHOase:GFP-Fusionsproteine	58
3.4.3. Transiente Expression der GFP-Fusionen durch ballistische Transformation	61
3.5. Transgene Pflanzen mit reduzierter DHOase-Expression	66
3.5.1. Transformation von <i>S.tuberosum</i> mit St5 Antisense-DNA	66
3.5.2. Transformierte Pflanzen zeigen unterschiedlich starke Reduktion im DHOase- Gehalt.	67
3.5.3. Verminderter DHOase-Gehalt beeinflusst das Wachstum.	68
3.5.4. Einfluss der DHOase-Expression auf die Kohlehydrat-Akkumulation	74
3.5.5. Verminderte DHOase-Expression hat nur geringe Auswirkung auf den Nukleotidhaushalt.	76
3.6. Herstellung und Durchmusterung transgener Pflanzen mit erhöhter DHOase- Expression.	78
3.6.1. Klonierung der <i>E.coli</i> DHOase für die Überexpression in Pflanzen	78

3.6.2. Die Transformante RMECs exprimiert DHOase aus <i>E.coli</i> unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors.	80
3.6.3. Kartoffeltransformante D-RMBECs exprimiert DHOase aus <i>E.coli</i> unter Kontrolle des B33 Patatin-Promotors.	81
3.7. Charakterisierung der transgenen Pflanzen mit DHOase-Expression in allen Geweben.	82
3.7.1. Wachstum und Phänotyp	82
3.7.2. Enzym-Aktivität	84
3.7.3. Kohlehydrat- und Protein-Akkumulation	84
3.8. Charakterisierung transgener Pflanzen mit DHOase-Expression unter Kontrolle des B33 Promotors.	87
3.8.1. Wachstum und Phänotyp	87
3.8.2. Enzym-Aktivität	89
3.8.3. Kohlehydrat- und Protein-Akkumulation	91
4. DISKUSSION	94
4.1. Charakterisierung der pflanzlichen Dihydroorotase	94
4.1.1. Klonierung des pflanzlichen DHOase-Gens	95
4.1.2. Entwicklung von Nachweissystemen zur Meßung der DHOase-Aktivität	99
4.1.3. Subzelluläre Lokalisation der DHOase	102
4.1.4. Resumée des Abschnitts 4.1	104
4.2. Einfluß reduzierter DHOase-Expression auf Wachstum und Metabolismus	105
4.2.1. Reduzierte DHOase-Expression beeinflusst das Wachstum	105
4.2.2. Auswirkungen reduzierter DHOase-Expression auf den Metabolismus.	108
4.2.3. Resumée des Abschnitts 4.2	110
4.3. Einfluß erhöhter DHOase-Expression auf Wachstum und Metabolismus	111
4.3.1. Auswirkung erhöhter DHOase-Expression auf den Metabolismus	111
4.3.2. Auswirkung erhöhter DHOase-Expression auf den Phänotyp	113
4.3.3. Resumée des Abschnitts 4.3	114
5. AUSBLICK & ZUSAMMENFASSUNG	115
5.1. Ausblick	115
5.2. Zusammenfassung	117
5.3. Summary in english	118
A. ANHANG	119
A.1. Abkürzungen	119
A.2. Lateinische Bezeichnung diverser Spezies	124
A.3. Oligonukleotid Primer	125

A.4. Danksagung	126
Literaturverzeichnis	127

Abbildungsverzeichnis

1.1. Reaktionsprinzip: ATCase	2
1.2. Reaktionsprinzip: DHOase	2
1.3. Reaktionsprinzip: DHODH	3
1.4. Reaktionsprinzip: OPRTase	3
1.5. Reaktionsprinzip: ODCase	3
1.6. Reaktionsprinzip: UGPase	4
1.7. Reaktionsprinzip: CTPSase	4
1.8. Salvage-Pathway (Schema)	6
1.9. Pyrimidin Abbau (Reduktion)	7
1.10. Pyrimidin Abbau (Spaltung)	7
3.1. DHODH Aktivität (ELISA Platte mit MTT Farbreaktion)	48
3.2. Fluorimetrischer DHOase Assay (Schema)	50
3.3. Fluorimetrischer DHOase-Assay (zeitl. Verlauf)	51
3.4. pH-Optimum der DHOase	52
3.5. DHOase (Kinetik)	54
3.6. N-Terminus der St5 Peptidsequenz	56
3.7. N-Terminus der St5xl Peptidsequenz	57
3.8. Konstrukt EGFP pUC18/244	59
3.9. Konstrukt Transitsequens+GFP	59
3.10. Subklonierung St5 in Vektor pCR4BluntTOPO	60
3.11. St5-xl:GFP	60
3.12. Kontrollkonstrukt KDEL-GFP (CLSM)	61
3.13. Kontrollkonstrukt pre101 (CLSM)	63
3.14. Kontrollkonstrukt pA7 (CLSM)	63
3.15. STCG1	64
3.16. STCG1-Dapi	64
3.17. STCG2	65
3.18. St5AS	66
3.19. Westenblot St5- <i>Antisense</i> Transformanten	67
3.20. Foto der ROSa-Kartoffeln	68

3.21. ROSa 40 (Detailaufnahme)	68
3.22. Wurzelwachstum der St5- <i>Antisense</i> Pflanzen	69
3.23. ROSa Frisch- / Trockengewicht	70
3.24. ROSa Sproß:Wurzel Relation	71
3.25. ROSa relative Blattflächen	72
3.26. ROSa Zelldichte	73
3.27. ROSa Kohlehydrate	75
3.28. Konstrukt ECC1	79
3.29. Konstrukt ECC2	79
3.30. Peptidantikörper Erkennungsregion (Kartoffel, <i>E.coli</i>)	80
3.31. RMECs Northernblot Analyse	81
3.32. D-RMBECs Northernblot Analyse	81
3.33. RMECs Frischgewichte	83
3.34. Phänotyp RMECs 50 und WT	83
3.35. RMECs Enzym-Aktivität Sink Blätter	84
3.36. RMECs Kohlehydrate	85
3.37. RMECs Proteingehalt	86
3.38. Phänotyp RMECs25	88
3.39. RMBECs Frischgewichte	89
3.40. D-RMBECs Enzym-Aktivität Knolle	90
3.41. D-RMBECs Kohlehydrate	92
3.42. D-RMBECs Proteingehalt	93
4.1. Alignment der DHOase Peptidsequenzen St5xl, At11, AthZhou	96
4.2. Phylogenetischer Vergleich unterschiedlicher DHOasen	97
4.3. Konservierte Domänen der DHOase	98

1. EINLEITUNG

Nukleinsäuren gehören zu den größten Molekülen, welche von der Zelle synthetisiert werden. Ihre Bausteine sind Purin- und Pyrimidinbasen, die glycosidisch mit Ribose, respektive Desoxyribose verbunden sind (*Nukleoside*). In der Zelle liegen Nukleoside hauptsächlich in ihrer phosphorylierten Form als Mono-, Di-, oder Triphosphate vor (*Nukleotide*).

Man kann Nukleotide als eine der wichtigsten Metabolitklassen im Zellstoffwechsel ansehen, denn sie spielen eine zentrale Rolle im zellulären Metabolismus. Neben ihrer Funktion als Bausteine der Erbinformation DNA und RNA, sind sie unter anderem als Energieträger für Phosphorylierungsreaktionen (*ATP*) oder als Mediatoren in zellulären Signaltransduktionsketten (*cAMP*, *cGMP*) bekannt, oder stellen wichtige Edukte oder Zwischenprodukte im zellulären Stoffwechsel dar. Den größten Anteil des Gesamtnukleotidpools der Pflanze (ohne DNA und RNA) nehmen dabei Nukleosid-Diphosphat-Zucker (NDP-Zucker) ein (Wagner & Backer, 1992). ADP-Glucose ist der Hauptglycosyldonor der Stärkesynthese. UDP-Glucose ist nicht nur wichtig als Lieferant von Glucoseeinheiten für die Polysaccharid- und Zellwandsynthese, es spielt auch eine zentrale Rolle in der Synthese und der Bereitstellung von Saccharose - dem wichtigsten Transportmolekül für Kohlenstoff innerhalb der Pflanze.

In höheren Pflanzen werden Pyrimidin-Nukleotide aus Aminosäuren und anderen kleinen Molekülen (***de-novo Synthese***) und aus bereits existierenden Pyrimidinbasen und ihren Ribonukleosid-Derivaten (***Salvage Pathway***) synthetisiert. Diese Stoffwechselwege sind in ihren Abläufen hochkonserviert bei Prokaryonten, Hefen, Protozoen, Insekten, Säugern und Pflanzen. Unterschiede zeigen sich in allen bisher untersuchten Spezies lediglich in der Organisation der Gene [1.2, S.8], der Lokalisation der Genprodukte [1.3, S.11], sowie deren Fusion zu Multienzymkomplexen (Jones, 1980; Doremus & Jagendorf, 1985; Kim *et al.*, 1992; Nasr *et al.*, 1994; Santoso & Thornburg, 1998).

Die vorliegende Arbeit wird sich näher mit dem pflanzlichen *Pyrimidinstoffwechsel* im Allgemeinen und der *de-novo* Synthese im Speziellen auseinandersetzen, unter besonderer Berücksichtigung des Enzyms **Dihydroorotase**.

1.1. Der Pyrimidin-Metabolismus

1.1.1. Die Pyrimidin *de-novo* Synthese

Während die Neusynthese von Pyrimidin-Nukleotiden in Prokaryonten, Hefen und tierischen Organismen recht gut untersucht ist (Doremus & Jagendorf, 1985; Denis-Duphil, 1989; Lacroute, 1968; Chen & Jones, 1976; Kim *et al.*, 1992), lagen zu Beginn dieser Arbeiten nur vereinzelte Erkenntnisse über die Organisation des pflanzlichen Pyrimidin-stoffwechsels vor. Die chemischen Abläufe sind bei allen bisher untersuchten Organismen gleich (Wagner & Backer, 1992; Boldt & Zrenner, 2002), während die Organisation der einzelnen Schritte variiert.

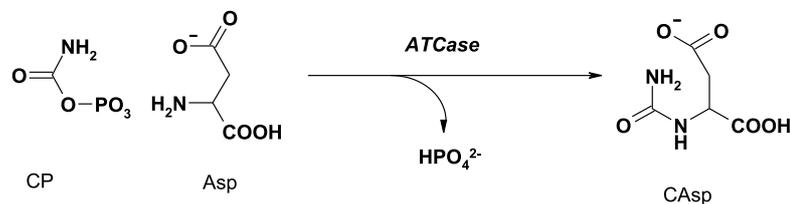


Abbildung 1.1.: Pyrimidin *de-novo* Synthese: Umsetzung von Carbamyl-Phosphat (CP) und Aspartat (Asp) zu Carbamoyl-Aspartat (CAsp) durch ATCase.

Glutamin und HCO_3^- bilden die Ausgangsstoffe, die von der Carbamyl-Phosphat Synthetase (**CPSase** EC 6.3.5.5) unter Aufwendung zweier Moleküle ATP zu Carbamyl-Phosphat umgesetzt werden. Aspartat-Transcarbamoylase¹ (**ATCase** EC 2.1.3.2) verbindet Carbamyl-Phosphat mit Aspartat zu N-Carbamoyl-Aspartat (CAsp) [Abb. 1.1].

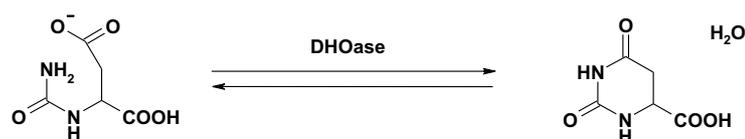


Abbildung 1.2.: Pyrimidin *de-novo* Synthese: Intramolekularer Ringschluß von Carbamoyl-Aspartat zu Dihydroorotat durch DHOase.

Im dritten Schritt [Abb. 1.2, S.2] katalysiert Dihydroorotase (**DHOase** EC 3.5.2.3) die intramolekulare Kondensation von Carbamoyl-Aspartat zu Dihydroorotat (DHO), wel-

¹Aspartat-Carbamoyltransferase

ches von der Dihydroorotat-Dehydrogenase (**DHODH** EC 1.3.3.1) zu Orotat oxidiert wird [Abb. 1.3, S.3].

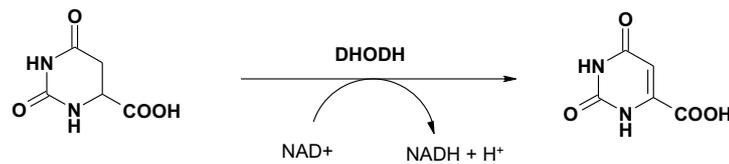


Abbildung 1.3.: Pyrimidin *de-novo* Synthese: Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat durch die Dihydroorotat Dehydrogenase (DHODH).

Mit Hilfe der Orotat-Phosphoribosyltransferase (**OPRTase** EC 2.4.2.10) reagiert Orotat mit Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) unter Phosphatabspaltung zu Orotidinmonophosphat (OMP) [Abb.1.4]. Dieses wiederum wird von Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase (EC 4.1.1.23) zu Uridinmonophosphat (UMP) decarboxyliert [Abb.1.5].

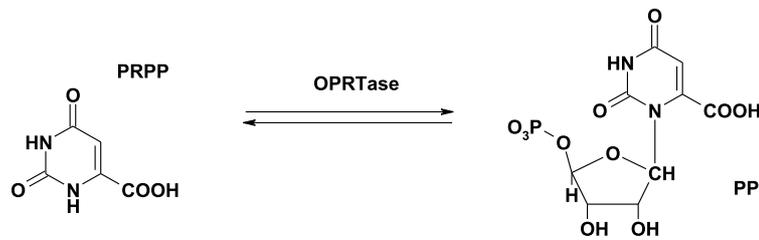


Abbildung 1.4.: Pyrimidin *de-novo* Synthese: Übertragung von Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) auf Orotat durch die Orotat-Phosphoribosyltransferase (OPRTase) und Bildung von Orotidinmonophosphat (OMP) unter Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i).

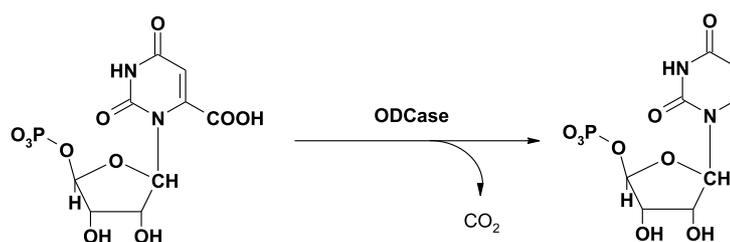


Abbildung 1.5.: Pyrimidin *de-novo* Synthese: Decarboxylierung von Orotidinmonophosphat (OMP) zu Uridinmonophosphat (UMP) durch die Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase (ODCase).

UMP dient als Ausgangsprodukt für weitere Pyrimidin-Nukleotide wie UDP, UDP-Glucose, UTP, CTP und deren Derivate. Die Enzyme Nukleosid-Monophosphat Kinase

(EC 2.7.4.13) und Nukleosid-Diphosphat Kinase (EC 2.7.4.6) übertragen zur Synthese von UTP unter Verbrauch von ATP nacheinander eine Phosphatgruppe auf UMP, bzw. UDP.

Zur Synthese von UDP-Glucose wird UTP mit α -D-Glucose-1-Phosphat durch UDP-Glucose Pyrophosphorylase (**UGPase** EC 2.7.7.9) unter Freisetzung von Pyrophosphat umgesetzt [Abb. 1.6]. Der Reaktionstyp ist ein Nucleotidyl-Gruppentransfer auf Glucose-1-Phosphat.

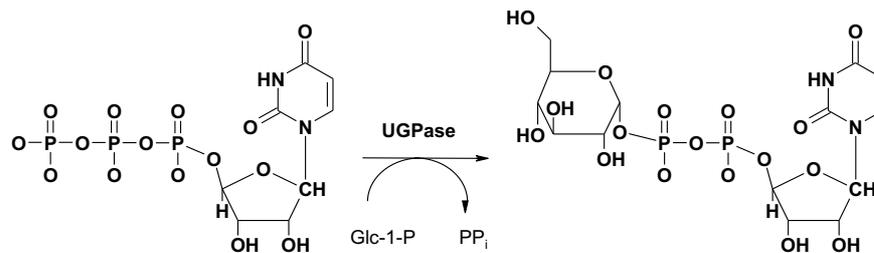


Abbildung 1.6.: Folgereaktionen der Pyrimidin *de-novo* Synthese: Bildung von UDP-Glucose aus UTP durch Nucleotidyl Gruppentransfer auf α -D-Glucose-1-Phosphat (Glc-1-P), katalysiert durch UDP-Glucose Pyrophosphorylase (UGPase, EC 2.7.7.9).

CTP-Synthase (**CTPSase**, EC 6.3.4.2) bildet Cytidin-5'-Triphosphat (CTP) aus Uridin-5'-Phosphat (UTP) unter Verbrauch von ATP und NH₃ [Abb. 1.7].

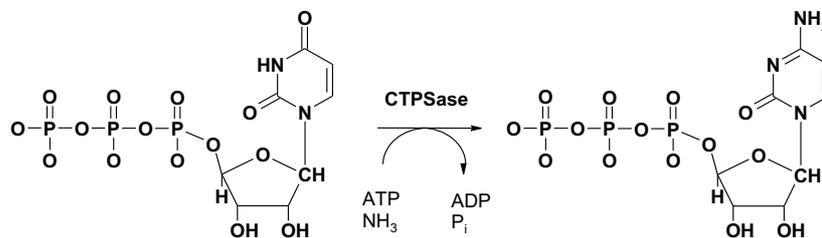


Abbildung 1.7.: Folgereaktionen der Pyrimidin *de-novo* Synthese: Aminierung von UTP durch die CTP-Synthase (CTPSase, EC 6.3.4.2) unter Verbrauch von ATP.

1.1.2. Der Salvage Pathway

Salvage (zu dt. „Bergung, Rettung“) Stoffwechselwege erfüllen verschiedene physiologische Aufgaben. Sie haben eine bedeutende Rolle in der Wiederverwertung von Nukleotiden, Nucleosiden und Nucleobasen. Diese können beispielsweise aus Speichergewebe, dem zellulären Nucleinsäurestoffwechsel oder auch aus seneszenten Blättern stammen. Die Neusynthese als energieintensiver Prozeß macht Nucleinsäurederivate zu einem wertvollen Rohstoff für die Pflanze, dessen Wiederverwertung sich lohnt.

Man kann nicht von „dem“ Salvage Pathway im Nucleotidstoffwechsel sprechen. Vielmehr handelt es sich um eine Reihe von Reaktionen, welche Desoxypyrimidinmonophosphate (dPMP) und Pyrimidinmonophosphate (PMP) wieder zu UMP oder CMP umwandeln (Kanamori-Fukuda *et al.*, 1981). Als zentrales Zwischenprodukt der *de-novo* Synthese kann UMP erneut zum Aufbau von Nucleinsäuren genutzt werden.

In Scheiben wachsender Kartoffelknollen wurde von Katahira & Ashihara (2002) der metabolische Weg ¹⁴C markierter Ribo- und Desoxyribonucleotide untersucht. Die folgende Zusammenfassung und die Übersichtsgrafik [Abb. 1.8, S.6] beziehen sich vorwiegend auf deren Ergebnisse.

Die Wiederverwertung der Pyrimidin Ribonucleoside Uridin und Cytidin verläuft bevorzugt über das Enzym Uridin/Cytidin Kinase (EC 2.7.1.48), aber auch über Nucleosid Phosphotransferase (EC 2.7.1.77). Die Nucleobasen Uracil und Cytosin können prinzipiell direkt zu ihren korrespondierenden Nucleotid Monophosphaten UMP und CMP umgewandelt werden. Tatsächlich wird aus beiden primär UMP regeneriert. Cytosin wird durch die Pyrimidin-Nucleosid Phosphorylase (EC 2.4.2.2) zu Cytidin und dieses wiederum durch die Cytidin-Deaminase (EC 3.5.4.5) zu Uridin umgewandelt, welches mittels Uridin/Cytidin Kinase zu UMP umgesetzt wird. Uracil wird direkt unter Kondensation mit PRPP durch die Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase, EC 2.4.2.9), oder mit Uridin als Zwischenprodukt über die Uridin/Cytidin Kinase zu UMP umgewandelt. Dabei übernimmt die UPRTase den größten Teil des Umsatzes (Kanamori-Fukuda *et al.*, 1981; Mazus & Buchowicz, 1972), während Uridin/Cytidin Kinase *in vivo* nur eine Nebenreaktion zu UMP darstellt, die bei Zugabe von Uridin genutzt wird (Grenson, 1969).

Die Desoxyribonucleotide Thymidin und Desoxycytidin (dCytidin) können in ihre korrespondierenden Desoxy-Monophosphate umgesetzt werden. Dabei wird Desoxycytidin durch Nucleosid Phosphotransferase zu dCMP phosphoryliert. Alternativ kann dCytidin auch zu Desoxyuracil desaminiert werden. Das verantwortliche Enzym dafür

ist die Desoxycytidin-Deaminase (EC 3.5.4.14).

Mit Desoxyuracil oder Thymidin als Substrat bildet die Thymidin-Kinase (EC 2.7.1.21) Thymidinmonophosphat (dTMP²). Desoxyuridin, und somit auch Desoxycytidin, kann durch die Pyrimidin Desoxyribonukleosid-2'-Hydroxylase zu Uridin umgesetzt werden. Mit diesem Enzym ist eine Umverteilung von Desoxyribonukleotiden zu Ribonukleotiden möglich.

Fütterungsexperimente zeigten, daß ein großer Teil des exogen zugegebenen ¹⁴C-Uracil abgebaut wird und sich schnell in ¹⁴CO₂ wiederfindet (Kanamori-Fukuda *et al.*, 1981). Ebenso wird exogen zugegebenes ¹⁴C-Thymidin schnell abgebaut. Nur sehr geringe Anteile finden sich in RNA und DNA wieder (Katahira & Ashihara, 2002).

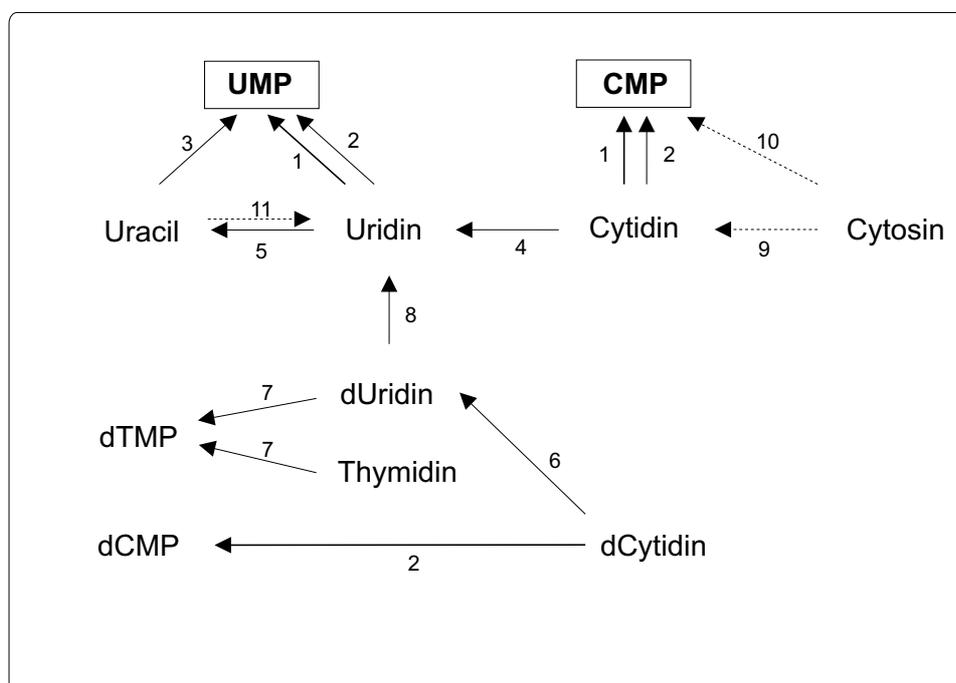


Abbildung 1.8.: Enzyme des *Salvage-Pathway* in *Solanum tuberosum*. Schema erstellt nach Katahira & Ashihara (2002). (1) Uridin/Cytidin-Kinase; (2) Nucleosid Phosphotransferase; (3) Uracil Phosphoribosyltransferase; (4) Cytidin Deaminase; (5) Uridin Nucleosidase; (6) Desoxycytidin Deaminase; (7) Thymidin-Kinase; (8) Pyrimidin-Desoxyribonukleosid 2'-Hydroxylase; (9) Pyrimidin-Nucleosid Phosphorylase; (10) Cytosin Phosphoribosyltransferase; (11) Uridin Phosphorylase.

²Der Zusatz „desoxy“ ist in Verbindung mit Thymidin Nucleotiden redundant, dient aber der einheitlichen Nomenklatur mit den anderen Desoxynucleotiden.

1.1.3. Der Pyrimidin-Abbauweg

Der Pyrimidin-Abbauweg umfaßt prinzipiell drei Enzyme: Dihydropyrimidin Dehydrogenase (**DPDH** EC 1.3.1.2), Dihydropyrimidinase (**DHPase** EC 3.5.2.2) und β -Ureidopropionase (**BUPase** EC 3.5.1.6).

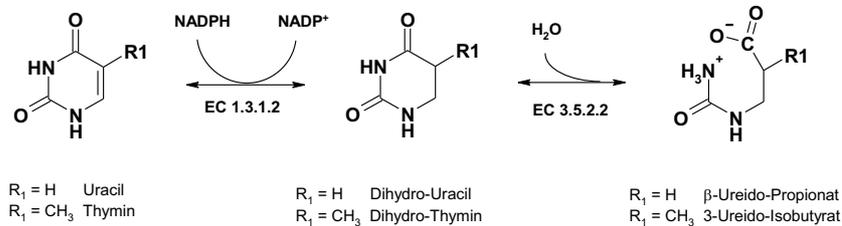


Abbildung 1.9.: Pyrimidin-Abbau: Pyrimidin-Reduktion zu 5,6-Dihydropyrimidin durch DPDH und hydrolytische Ringöffnung durch DHPase.

Edukte für den Pyrimidinabbau sind Uracil oder Thymin. Diese werden in drei Schritten zu NH_3 , CO_2 und β -Alanin bzw. 3-Amino-Isobutanoat abgebaut (Kanehisa, 2002; Ogawa & Shimizu, 1994).

Uracil oder Thymin wird von der NADPH abhängigen Dihydropyrimidin Dehydrogenase (EC 1.3.1.2) zu 5,6-Dihydrouracil bzw. 5,6-Dihydrothymin reduziert [Abb. 1.9, S.7]. Dihydropyrimidinase (5,6-Dihydropyridin Amidohydrolase) öffnet hydrolytisch die Ringstruktur [Abb. 1.9, S.7], was die irreversible Abspaltung von NH_3 und CO_2 durch β -Ureidopropionase ermöglicht [Abb. 1.10, S.7].

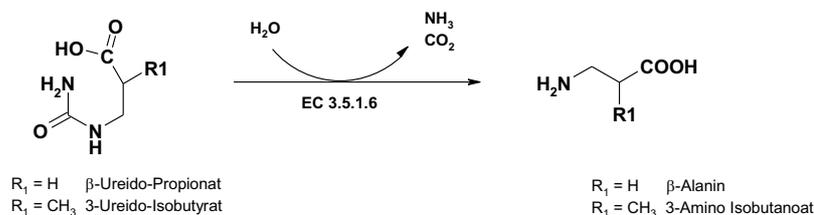


Abbildung 1.10.: Pyrimidin Abbau: irreversible Hydrolyse unter Abspaltung von CO_2 und NH_3 durch β -Ureidopropionase.

Alternativ zur NADPH abhängigen Dihydropyrimidin Dehydrogenase wurde im Organismus *Clostridium uracilicum* die NADH abhängige Dihydropyrimidin Dehydrogenase (EC 1.3.1.1) beschrieben (Campbell, 1957). Beide Reaktionen sind reversibel und unterscheiden sich lediglich in ihren Cofaktoren NADH und NADPH.

Es wurde diskutiert, daß der Oxidation von Dihydropyrimidin *in-vivo* keine bedeutende metabolische Funktion zukommt. Dies wird gestützt durch den hohen K_m ($1,5 \cdot 10^{-3}$ M) des Enzyms für Dihydropyrimidin und die irreversible β -Ureidopropionase Reaktion (Wasternack *et al.*, 1979).

Uracil kann auf zwei verschiedenen Wegen zu UMP regeneriert werden [1.1.2, S.5], jedoch zeigen Untersuchungen von Wasternack *et al.* (1979) und Kanamori-Fukuda *et al.* (1981), daß ein erheblicher Anteil katabolisiert wird. In photoorganotrophen Kulturen von *Euglena gracilis* fanden sich 30-40% des aufgenommenen $[2-^{14}\text{C}]$ -Uracil und 80% des aufgenommenen $[2-^{14}\text{C}]$ -Thymin in CO_2 wieder (Wasternack *et al.*, 1979). Unter *in-vivo* Bedingungen wird Uracil und Thymin im konstanten Verhältnis 1:4 abgebaut (Wasternack *et al.*, 1977).

Obwohl der Pflanze mit dem *Salvage Pathway* [1.1.2, S.5] Wege zur Wiederverwertung von Pyrimidinnukleotiden zur Verfügung stehen, scheint deren vorwiegende Verwendung im Katabolismus zu liegen (Walsh *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu steht das effektive Recycling des Purins Adenin, beschrieben durch Ashihara *et al.* (2000). Aber auch wenn dieser Stoffwechsel als katabolisch bezeichnet wird, so ist er doch eine biosynthetische Quelle für β -Alanin. Dieses ist ein essentieller Bestandteil der Pantothen- und damit auch der CoenzymA-Synthese (Kanehisa, 2002) und bildet den Ausgangsstoff für β -Alanin-Betain, das in vielen Vertretern der *Plumbaginaceae* eine wichtige osmoprotektive Funktion inne hat (Rathinasabapathi *et al.*, 2000).

1.2. Genomische Organisation in verschiedenen Spezies

Die Pyrimidin *de-novo* Synthese umfaßt sechs enzymatische Schritte zur Synthese von UMP [1.1.1, S. 2] und ist in nahezu allen untersuchten Spezies vorhanden, mit Ausnahme einiger Parasiten wie z.B. *Giardia lamblia* (Lindmark & Jarroll, 1982) und *Trichomonas vaginalis* (Heyworth *et al.*, 1984).

Obwohl die Pyrimidin *de-novo* Synthese quasi ubiquitär ist, gibt es zwischen den Arten doch Unterschiede in der Organisation der Enzyme und der dafür kodierenden Gene. Die Zahl der Gene, welche an den sechs enzymatischen Schritten beteiligt sind, nimmt von Prokaryonten zu Eukaryonten ab, jedoch nimmt die Komplexität der Enzyme in gleicher Weise zu. Es bilden sich sog. *Cluster-Gene*, die für multifunktionelle Enzyme kodieren (Denis-Duphil, 1989). Der evolutionäre Vorteil, der sich aus dieser Fusion von individuellen Genen ergibt, ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

1.2.1. Organisation in Prokaryonten

In Bakterien kodieren sechs unterschiedliche Gene (**pyrA-pyrF**) für sechs unabhängige Enzyme (Beckwith *et al.*, 1962; O'Donovan & Neuhard, 1970). Die Regulation der Pyrimidinsynthese erfolgt durch „*feedback*“ Kontrolle (Denis-Duphil, 1989). Ein extrazellulärer Überschuss an Pyrimidin-Nukleotiden führt zur transkriptionellen Kontrolle der Pyrimidinsynthese durch Bindung des regulatorischen PyrR³ Proteins an mRNA der *pyr*-Gene (Turner *et al.*, 1998).

In *E. coli* kodieren die Gene **carA** und **carB** für die beiden Untereinheiten des ersten Enzyms CPSase. Dieses stellt sowohl den Ausgangspunkt der Pyrimidinsynthese, als auch der Argininsynthese dar. Als einzigem Prokaryonten konnten bisher in *Bacillus subtilis* zwei unterschiedliche CPSasen für Arginin- und Pyrimidinsynthese nachgewiesen werden (Paulus & Switzer, 1979). Auch die Tendenz seiner Pyrimidingene zur *Cluster*-Bildung, steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Damit zeigt er eine komplexere Organisation, welche mehr Ähnlichkeit mit der von Tieren oder Hefen, nicht aber mit anderen Prokaryonten oder Pflanzen hat (Denis-Duphil, 1989).

1.2.2. Organisation in Eukaryonten

1.2.2.1. Niedere Eukaryonten

In *Saccharomyces cerevisiae* kodiert das Gen **ura2** für ein Enzym mit bifunktionaler CPSase-ATCase Aktivität (Lacroute, 1968; Denis-Duphil, 1989). Dieses Enzym ließ sich außerdem aus *Neurospora crassa* (Williams *et al.*, 1970) und *Aspergillus* (Palmer & Cove, 1975) isolieren. Die folgenden vier enzymatischen Schritte werden kodiert durch die eigenständigen Gene **ura4** (DHOase), **ura1** (DHODH), **ura5;ura10** (OPRTase) und **ura3** (ODCase). Diese Organisation findet sich auch in *Schizosaccharomyces pombe*, jedoch ist die Bezeichnung der Gene nicht identisch mit *S.cerevisiae*.

1.2.2.2. Höhere Eukaryonten

In höheren Eukaryonten, mit Ausnahme der Pflanzen, sind drei Strukturgene an der Pyrimidinsynthese beteiligt. Dabei kodiert ein *Clustergen* **pyr1-3** für ein multifunktionelles Polypeptid, welches für die ersten drei Syntheseschritte verantwortlich ist. In Säugern wird es **cad** genannt, abgeleitet von CPSase, ATCase und DHOase. Ein

³PyrR ist ebenso eine Uracil-Phosphoribosyltransferase (URPTase).

vergleichbares Gen findet sich möglicherweise bei allen Tieren ab der Ordnung *Diptera* (Jones, 1980). Das zweite Gen **pyr4** kodiert für Dihydroorotat Dehydrogenase (DHODH). Das dritte ist wiederum ein *Clustergen* **pyr5-6** und kodiert für ein Polypeptid, welches OPRTase und ODCase Aktivität besitzt (Jones, 1980).

Die Pyrimidinsynthese in Pflanzen zeigt auch eine Tendenz zur Bildung von Fusionsgenen, jedoch gibt es keinen Hinweis auf einen multifunktionellen Komplex, der mehr als einen der ersten vier enzymatischen Schritte katalysiert (Denis-Duphil, 1989). Die Gene werden bezeichnet als **carA/carB** (CPSase), **pyrB** (ATCase), **pyrC** (DHOase) und **pyrD** (DHODH). Die Umsetzung von Orotat zu UMP erfolgt in Pflanzen durch UMP-Synthase (**pyrE-F**), einem dimeren Polypeptid, dessen Monomere jeweils beide Enzymaktivitäten der OPRTase und ODCase haben (Walther *et al.*, 1984).

Bei Betrachtung des vollständig sequenzierten *A.thaliana* Genoms (Arabidopsis-Genome-Initiative, 2000) fällt auf, daß für jedes Enzym in der Pyrimidin *de-novo* Synthese nur je ein Genlokus vorhanden ist (Boldt & Zrenner, 2002).

<i>E.coli</i>	Gen <i>Arabidopsis</i>	Enzym E.C. Nummer	vorauss. subz. Lokalisation	klonierte <i>Arabidopsis</i> cDNA	funktionell charakterisierte pflanzliche cDNA
<i>carA</i>	<i>AtcarA</i> At3g27740	CPSase klUE EC 6.3.5.5	chloroplastidär	U73175 Brandenburg <i>et al.</i> (1998)	nicht bekannt
<i>carB</i>	<i>AtcarB</i> At1g29900	CPSase grUE EC 6.3.5.5	chloroplastidär	U40341 Williamson <i>et al.</i> (1996)	nicht bekannt
<i>pyrB</i>	<i>AtpyrB</i> At3g20330	ATCase EC 2.1.3.2	chloroplastidär	X71843 Nasr <i>et al.</i> (1994)	<i>A.thaliana</i> (Nasr <i>et al.</i> , 1994) <i>S.tuberosum</i> (Giermann <i>et al.</i> , 2002)
<i>pyrC</i>	<i>AtpyrC</i> At4g22930	DHOase EC 3.5.2.3	putativ cytosolisch	AF000146 Zhou <i>et al.</i> (1997)	<i>S.tuberosum</i> (Giermann <i>et al.</i> , 2002)
<i>pyrD</i>	<i>AtpyrD</i> At5g23300	DHODH EC 1.3.1.14	putativ mitochondrial	X62909 Minet <i>et al.</i> (1992)	<i>A.thaliana</i> (Minet <i>et al.</i> , 1992)
<i>pyrEF</i>	<i>AtpyrEF</i> At3g54470	UMP Synthase EC 2.4.2.10 EC 4.1.1.23	putativ cytosolisch	Q42586 Nasr <i>et al.</i> (1994)	<i>A.thaliana</i> (Nasr <i>et al.</i> , 1994)

Tabelle 1.1.: Zusammenfassung der Gene der Pyrimidin *de-novo* Synthese in Bakterien und Pflanzen. Verändert nach Boldt & Zrenner (2002).

1.2.3. Spezies mit außergewöhnlichem Pyrimidin-Metabolismus

Alle lebenden Organismen sind von der Verfügbarkeit von Pyrimidin- und Purin-Nucleotiden abhängig. Diese wird durch zwei Stoffwechselwege gewährleistet: die *de-novo* Synthese [1.1.1, S.2] und den *Salvage* Stoffwechsel [1.1.2, S.5]. Dennoch gibt es Lebensformen, bei denen nur einer der beiden Wege ausgeprägt ist. Es handelt sich dabei zumeist um parasitierende Eukaryonten oder aber um komplexe symbiotische Gemeinschaften.

Eine nicht vorhandene *de-novo* Pyrimidinsynthese konnte bisher in den parasitierenden Protozoen *Giardia lamblia* (Lindmark & Jarroll, 1982) und *Trichomonas vaginalis*

(Wang *et al.*, 1983) gezeigt werden, während *Trypanosoma* und *Leishmania* über keine *de-novo* Purinsynthese verfügen (Hammond & Gutteridge, 1984). Die Nukleotidversorgung erfolgt exogen durch den Wirt mittels *Salvage Pathway*.

Im Gegensatz dazu verfügt *Toxoplasma gondii* über eine intakte *de-novo* Synthese und einen fragmentierten *Salvage Pathway*. Sämtliche vom Wirt stammenden oder eigene Pyrimidine werden über das Enzym Uracil-Phosphoribosyltransferase [1.1.2, S.5] geschleust (Fox & Bzik, 2002).

Ein interessantes Beispiel einer symbiontischen Verteilung des Pyrimidinstoffwechsels ist der Röhrenwurm *Riftia pachyptila* (Simon *et al.*, 2000; Minic *et al.*, 2001), der in der Nähe hydrothermaler Tiefseeschlote vorkommt. Er lebt in enger Symbiose mit einem Schwefel oxidierenden Bakterium. Die ersten drei Enzyme der Pyrimidin *de-novo* Synthese (CPSase, ATCase und DHOase) kommen ausschließlich in einem speziellem Gewebe (Trophosom) vor, das den Endosymbiont enthält und sind bakterieller Herkunft. Die Versorgung mit UMP erfolgt entweder durch Aufnahme von Dihydroorotat aus dem Bakterium und Fortsetzung der Synthese oder durch Lyse der Bakterien (Minic *et al.*, 2001).

1.3. Subzelluläre Lokalisation der Enzyme

Die Pyrimidin *de-novo* Synthese wurde in genetischer und biochemischer Hinsicht in unterschiedlichen Organismen beschrieben, wie z.B. *Escherichia coli* von O'Donovan & Neuhard (1970), *S.cerevisiae* von Lacroute (1968); Denis-Duphil (1989) und Benoist *et al.* (2000), *Schizosaccharomyces pombe*, *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster* von Jones (1980), oder *Homo sapiens* von Suttle *et al.* (1988).

Die Frage der subzellulären Lokalisation der Enzyme wird dabei recht kontrovers diskutiert. Einzig in Bezug auf DHODH herrscht Einigkeit über die mitochondriale Lokalisation in allen untersuchten eukaryontischen Spezies (Chen & Jones, 1976; Jones, 1980; Doremus & Jagendorf, 1985). In Hefe gelten CPSase/ATCase (*ura2*), DHOase (*ura4*), ORPTase (*ura10,ura5*) und ODCase (*ura3*) als cytosolische Enzyme (Benoist *et al.*, 2000). In tierischen Geweben konzentrierte sich die Forschung vor allem auf CAD, das mit unterschiedlichen Methoden als nukleär, mikrosomal (Bottomley & Lovig, 1967; Spors & Merker, 1969) oder cytoplasmatisch (Chaparian & Evans, 1988) identifiziert wurde.

Mit Hilfe der Bleiphosphat Präzipitation wurde **ATCase** im Nucleus von *Lycopersicon esculentum* nachgewiesen (Walther *et al.*, 1989). Mit der gleichen Methode wurde

S.cerevisiae **ATCase** als nukleoplasmatisch identifiziert (Nagy *et al.*, 1982) und putative nukleäre Lokalisations-Sequenzen (NLS) im Ura2 Polypeptid beschrieben (Nagy *et al.*, 1989). Berichten von Orlovich & Ashford (1993) zu Folge, liefert diese Technik jedoch zahlreiche Artefakte. Spätere Überprüfung von Benoist *et al.* (2000) mit der weniger fehlerhaften Ceriumphosphat Präzipitation und anderen Methoden zeigte **ATCase** als cytoplasmatisch in *S.cerevisiae*.

Bei höheren Pflanzen beschränkte sich das Wissen noch bis vor wenigen Jahren auf enzymatische Studien subzellulärer Fraktionen. **CPSase** und **ATCase** wurden so als cytosolisch (Kanamori *et al.*, 1980) bzw. chloroplastidär (Doremus & Jagendorf, 1985; Shibata *et al.*, 1986) identifiziert. Ebenfalls chloroplastidär sind laut Doremus (1986) **DHOase**, **OPRTase** und **ODCase**, deren Lokalisation durch Präparation intakter Organellen und anschließender Aktivitätsbestimmung ermittelt wurde. Diese Ergebnisse stehen in Konflikt mit denen von Ashihara (1978) und Kanamori *et al.* (1980), die **ATCase**, **OPRTase** und **ODCase** in *Vinca rosea* sowie **OPRTase** und **ODCase** in *Phaseolus mungo* als vorwiegend cytosolisch beschrieben. Lovatt *et al.* (1979) konnten die vollständige Pyrimidin *de-novo* Synthese in Chloroplasten freiem Gewebe von *Cucurbita pepo* nachweisen.

In Anbetracht dieser nicht eindeutigen Aussagen ist es von großem Interesse, den Aspekt der Lokalisation vom molekularbiologischen Standpunkt zu erleuchten. Ein Ansatzpunkt ist die Suche nach möglichen Targetsequenzen und Mustern auf Ebene des Prä-Proteins [1.3.1, S.12]. Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen [1.3.2, S.13] kann die Lokalisation dann auf histologischer Ebene untersucht werden.

1.3.1. Computergestützte Lokalisationsvorhersage

Chloroplasten und Mitochondrien verfügen über ein eigenes Genom, welches im Falle der Plastiden für etwa 100 Proteine kodiert (Sugiura, 1989). Dennoch ist die Mehrheit ihrer Proteine im Kern kodiert und diese müssen in Form von Prä-Proteinen aus dem Cytoplasma importiert werden. Transitpeptidsequenzen am N-terminalen Teil des Proteins ermöglichen die korrekte Adressierung in das entsprechende Organell (Robinson *et al.*, 1998; Peltier *et al.*, 2000). Die Transitsequenzen werden nach Ankunft am Bestimmungsort proteolytisch entfernt (Robinson & Ellis, 1984; Hawlitschek *et al.*, 1988). Das Problem bei der Voraussage liegt in der Uneinheitlichkeit dieser Transitpeptide. Sie sind zwischen 30 und 100 AS Einheiten lang und haben keine konservierten Homologie Blöcke (von Heijne *et al.*, 1989; Keegstra & Cline, 1999). Über die Komposition der Aminosäuren und deren Eigenschaften lassen sich Rückschlüsse ziehen

auf die Lokalisation des Proteins und die vorgesehene Schnittstelle zwischen Transitpeptid und Protein. Mit Hilfe neuronaler Netzwerke [Tab. 1.2, S.13] können Wahrscheinlichkeiten errechnet werden, nach welchen das betreffende Protein in Mitochondrion, Plastid oder zur Sekretion ins ER dirigiert wird (TargetP, Predotar, PSORT). Es sind auch Organellen-spezifische Verfahren verfügbar. Sie ermitteln Targetsequenzen und Schnittstellen für plastidäre (ChloroP), sekretorische (SignalP) oder mitochondriale (MitoProt) Proteine (Emanuelsson & Von Heijne, 2001). Andere Verfahren bedienen sich neuronaler Netzwerke in Kombination mit logistischer Regression (PCLR).

Server	URL	Ref.
TargetP	www.cbs.dtu.dk/services/TargetP	Emanuelsson <i>et al.</i> (2000)
SignalP	www.cbs.dtu.dk/services/SinalP	Nielsen <i>et al.</i> (1997)
ChloroP	www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP	Emanuelsson <i>et al.</i> (1999)
PCLR	apicoplast.cis.upenn.edu/pclr	Schein <i>et al.</i> (2001)
PSORT	psort.nibb.ac.jp	Nakai & Kanehisa (1992)
MitoProt	www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter	Claros & Vincens (1996)
Predotar	www.inra.fr/internet/produits/predotar	

Tabelle 1.2.: Im Internet verfügbare Ressourcen zur Lokalisationsanalyse (Juni 2002)

1.3.2. GFP Fusionsproteine

Green Fluorescent Protein (GFP), eine Proteinfamilie isoliert aus marinen Invertebraten wie z.B. *Aequorea victoria* (*Hydrozoa*), wurde von einer anfänglichen Kuriosität zum vielseitigen Marker für Genexpression und Protein-Lokalisation (Kendall & Badminton, 1998; Tsien, 1998). GFP eignet sich besonders gut als Reportergen *in vivo*, da es nicht toxisch ist und seine Detektion weder invasiv, noch destruktiv ist.

Aequorea-GFP ist ein Protein aus 238 Aminosäureeinheiten (27 kD). Seine beiden Absorptionsmaxima liegen bei 395 nm und 475 nm. Die Eigenschaften von GFP sind außergewöhnlich. Anregung mit UV-Licht (395 nm) oder blauem Licht (475 nm) führt zur Emission von leuchtend grüner Fluoreszenz (510 nm). Dazu muß keinerlei Substrat zugegeben werden, was einen klaren Vorteil zu anderen Reportergenen wie Luciferase (LUC) oder β -Glucuronidase (GUS) bietet (Reichel *et al.*, 1996). Das fluoreszente Chromophor ist thermostabil bis 65°C, behält seine Konformation in einem breiten pH Bereich (5,5-11,0) und behält seine Fluoreszenz auch nach längerer Behandlung mit denaturierenden Agenzien wie Guanidin-HCl (bis 6 M), Harnstoff oder SDS (bis 1%) (Cubitt *et al.*, 1995). Auch wenn die Fluoreszenz durch Hitze oder extreme pH-Werte verloren geht, so kann sie in vielen Fällen wieder vollständig renaturiert werden (Prasher *et al.*, 1992).

GFP eignet sich besonders gut zur Herstellung von Fusionsproteinen, einerseits wegen seiner geringen Größe (27 kD) (Grebenok *et al.*, 1997) und andererseits aufgrund der Tatsache, daß es auch noch im fusionierten Zustand seine Fluoreszenz behält (Leffel *et al.*, 1997). Somit lassen sich relativ einfach subzelluläre Vorgänge beobachten, wie z.B. Genexpression, Protein-Protein Wechselwirkungen, Proteinverteilung und -lokalisation.

Diese Anwendungen wurden nochmals verbessert durch gezielten Austausch von Aminosäuren am GFP-Chromophor (Cormack *et al.*, 1996). Das modifizierte EGFP (*enhanced GFP*) zeichnet sich beispielsweise durch eine Verschiebung der Anregungsmaxima (395 nm und 475 nm) zu einem einzelnen langwelligerem Maximum (488 nm) aus, einhergehend mit einer verstärkten Grünfluoreszenz bei 507 nm.

Nicht zuletzt wegen ihrer relativ hohen Toleranz gegenüber der Photobleiche (Cubitt *et al.*, 1995) werden viele GFP gerne als Fluorophor in der Mikroskopie eingesetzt. Obwohl einer der Großen Vorteile von GFP die Anwendung in lebendem Gewebe ist, übersteht es auch Fixierungsprozeduren mit Glutaraldehyd oder Formaldehyd, vorausgesetzt die Fixierlösungen sind nicht zu sauer und enthalten keine stark denaturierenden organischen Lösemittel.

Die erfolgreichste und häufigste GFP-Anwendung ist die genetische Fusion mit Trägerproteinen, deren Lokalisation man anschließend verfolgen kann. Dazu wird das GFP kodierende Gen „*in frame*“ mit dem Gen, welches das endogene Protein kodiert, fusioniert. Im Idealfall behält dieses chimäre Protein seine biologische Funktion und Lokalisation, ist nun aber fluoreszent. GFP kann, abhängig vom Trägerprotein, an dessen Amino- oder Carboxyterminus fusioniert werden.

Die Herstellung transgener Pflanzen mit GFP-Konstrukten ist mittlerweile ein Routineverfahren. In vielen Fällen scheint die Expression des GFP-Fusionsproteins keinerlei sichtbare Auswirkungen auf Wachstum, Morphologie oder Fruchtbarkeit der transformierten Pflanze zu haben (Hawes *et al.*, 2001).

1.3.3. Confocale Laser Scanning Mikroskopie

Confocale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM⁴) ermöglicht hochauflösende virtuelle Schnitte durch Gewebe, ohne dessen Unversehrtheit zu beeinflussen. Dabei werden die für klassische Hellfeldmikroskopie typischen Unschärfen eliminiert, welche durch Gewebeteile außerhalb des Fokus entstehen. Durch computergesteuerte Verschiebung des Fokus können Serien zweidimensionaler X-Y Ebenen (sog. *Z-Serien*) auf-

⁴Die Bezeichnung LCSM (Laser Confocal Scanning Microscopy) ist in der Literatur ebenso vertreten.

genommen werden, die sich mit entsprechender Software zu dreidimensionalen Ansichten des untersuchten Objektes zusammenfügen lassen.

Gegenwärtige CLSM-Systeme erlauben die synchrone Detektion von bis zu drei Fluoreszenzfarbstoffen. So lassen sich beispielsweise Zellkerne (DAPI), Chloroplasten (Chlorophyllfluoreszenz) und Mitochondrien (MitoTracker) zeitgleich in unterschiedlicher Colorierung im selben Bildausschnitt darstellen.

Viele Fluorochrome sind lichtempfindlich und neigen dazu, innerhalb kürzester Zeit auszubleichen. Durch Verwendung einer scharf begrenzten punktförmigen Lichtquelle (Laserstrahl), welche die Objektebene in Zeilen abtastet, wird die Einwirkung energiereicher Lichtstrahlen auf das Objekt minimiert. Nur der unmittelbar beobachtete Ausschnitt wird beleuchtet. Dies ermöglicht die Aufnahme von Zeitserien, da das Gewebe über längere Zeit physiologisch intakt bleiben kann. Die Kombination aus GFP markierten Proteinen und *Confokaler Laser Scanning Mikroskopie* (CLSM) beinhaltet ein wertvolles Werkzeug zum Studium der Proteinlokalisierung in subzellulären Kompartimenten.

1.4. Modellorganismen in der pflanzlichen Biotechnologie

Viele biologische Aspekte sind in den meisten, wenn nicht sogar allen Organismen, ähnlich. Es ist jedoch zuweilen einfacher, bestimmte Aspekte in speziellen Modellorganismen zu untersuchen. Beispielsweise lassen sich genetische Untersuchungen besser an kleinen, schnell wachsenden Organismen mit kurzen Generationszeiten und kleinem Genom durchführen. Ergebnisse unterschiedlicher Experimente lassen sich besser vergleichen, wenn sie am selben Organismus durchgeführt wurden.

In der pflanzlichen Molekularbiologie hat sich *Arabidopsis thaliana* aus der Familie der *Brassicaceae* als ideales Studienobjekt bewährt. *Arabidopsis* dominiert durch seine Einfachheit. Die Pflanze ist klein, leicht zu kultivieren, hat mit etwa sechs Wochen einen kurzen Lebenszyklus und verfügt über ein relativ kleines Genom ($1,2 \cdot 10^8$ bp) mit etwa 26.000 Genen. Zum Vergleich ist das Genom von Mais mit $2,5 \cdot 10^9$ bp, Kartoffel mit 10^9 bp oder Weizen mit $1,6 \cdot 10^{10}$ bp um ein Vielfaches größer.

Die vollständige Sequenzierung aller fünf Chromosomen durch die Arabidopsis-Genome-Initiative (2000) stellt einen Meilenstein der pflanzlichen Molekularbiologie dar und verleiht der Erforschung anderer Pflanzen - insbesondere Nutzpflanzen - einen Schub. Durch die Verfügbarkeit der vollständigen Sequenz können nun molekulare Aspekte unterschiedlichster Gene untersucht werden. Boldt & Zrenner (2002) bezeich-

nen dies als Chance, mit molekulargenetischen Ansätzen Enzymeigenschaften und deren Steuerung im pflanzlichen Nukleotidstoffwechsel zu erforschen.

Warum *Arabidopsis* zur Modellpflanze erkoren wurde und nicht etwa Reis, Mais, Weizen oder Kartoffel, läßt sich nur mit den oben genannten Argumenten erklären. Schließlich ist das unscheinbare Kraut von keinerlei ökonomischem Nutzen. Um so interessanter ist die Erforschung von Nutzpflanzen mit den aus der *Arabidopsis*-forschung gewonnenen Erkenntnissen.

1.4.1. *Solanum tuberosum* als Modell-Nutzpflanze

Die Speisekartoffel *Solanum tuberosum* aus der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) ist nahe verwandt mit Tomate (*Lycopersicon esculentum*), Paprika (*Cap-sicum annuum*) und Aubergine (*Solanum melongena*). Die Ursprünge der Kartoffel liegen im Gebiet der Anden im heutigen Peru und Bolivien, wo noch schätzungsweise 180 wilde Arten vorkommen. Als Nutzpflanze wird sie seit mehr als 6.000 Jahren kultiviert und kam im 16. Jahrhundert im Zuge der spanischen Eroberung Perus nach Europa.

Die Kartoffel gehört weltweit zu den wichtigsten Nahrungsträgern. Gemessen an der Weltjahresproduktion für Nahrungsmittel werden Kartoffeln mit 300 Mio t nur von Mais (600 Mio t), Weizen (550 Mio t) und Reis (530 Mio t) übertroffen und sind damit der wichtigste Nahrungslieferant aus der Klasse der *Dicotyledonae*. Alle landwirtschaftlich genutzten Kartoffel-Kultivare sind tetraploid ($4n=48$). Die Samen der Kartoffel können nicht zur Vermehrung genutzt werden, da diese meist unfruchtbar sind. Statt dessen verwendet man Knollen zur vegetativen Vermehrung.

Erkenntnisse, die man aus der Erforschung von *Arabidopsis thaliana* gewonnen hat, können auf Nutzpflanzen wie die Kartoffel übertragen werden und hier für physiologische Studien, Methoden zur Pathogenabwehr oder die Ertragsteigerung genutzt werden. Ein bedeutender Fortschritt stellte die vollständige Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms dar (*Arabidopsis*-Genome-Initiative, 2000). Auch die zahlreichen *Arabidopsis Knockout* Mutanten eröffnen wichtige Möglichkeiten in der Erforschung von Nutzpflanzen.

1.4.2. Bedeutung transgener Pflanzen zur Erforschung regulativer Stoffwechselfvorgänge

In den vergangenen 15-20 Jahren wurden beachtliche Erfolge auf dem Gebiet der molekulargenetischen Manipulation des pflanzlichen Stoffwechsels erzielt. Neben der transienten Einbringung fremder Gene durch Partikelbeschuss (Klein *et al.*, 1988), wurden Methoden zur stabilen Transformation pflanzlicher Zellen unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* etabliert (Hernalsteens *et al.*, 1980; Bevan, 1984; Horsch *et al.*, 1985). Damit ist es möglich, fremde oder pflanzeneigene Gene unter Kontrolle des jeweils gewünschten Promotors ins pflanzliche Genom einzubringen.

Eine sehr effektive Methode um Gene „auszuschalten“ ist die zufällige Insertion von T-DNA in Strukturgene durch *Agrobacterium*. Eine solche Mutation führt zu einer „Nullmutante“, die man gemeinhin als „*Knockout*“-Mutante bezeichnet. T-DNA Mutagenese ist derzeit die bevorzugte Methode zur Untersuchung von Strukturgenen in *Arabidopsis* (Krysan *et al.*, 1999) und zunehmend auch in anderen Spezies wie z.B. Mais und Reis. Die Vorzüge und Nachteile dieser Methode werden ausführlich diskutiert von Thorneycroft *et al.* (2001).

Im Gegensatz zur *Knockout* Technik, bei der durch Insertion ein Gen komplett ausgeschaltet wird, kann die Expression eines Gens auch graduell reduziert werden. Man spricht dann von „*Gene silencing*“. Die Verwendung der „*antisense*“ Technik in Pflanzen (van der Krol *et al.*, 1988) bietet eine Alternative, wenn „*Knockout*“ Mutanten nicht verfügbar sind, das Gen einer Multigenfamilie angehört, oder die betreffende Mutation letal wäre (Stitt & Sonnewald, 1995). Eine weitere Möglichkeit der abgestuften und gezielten Expressionsreduktion ist das Phänomen der „*Co-Suppression*“ (van der Krol *et al.*, 1990; Napoli *et al.*, 1990).

In Pflanzen fasst man „*Antisense*“-RNA und *Co-Suppression* unter dem Begriff „*post-translational gene silencing*“ (PTGS) zusammen (Vaucheret *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 1998; Kooter *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000; Stam *et al.*, 2000). PTGS ist ein wirkungsvoller, spezifischer, intrazellulärer Regulationsmechanismus, der sich wahrscheinlich aus der Notwendigkeit zur Abwehr von Virusinfektionen entwickelt hat (Waterhouse *et al.*, 1999). Dieser wird in Gang gesetzt, sobald die Transkriptmenge einen Schwellenwert überschreitet (Jorgensen *et al.*, 1998). Auch wenn der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt ist, so spielt doch in beiden Fällen das Auftreten von Doppelstrang-RNA (dsRNA) eine Schlüsselrolle (Waterhouse *et al.*, 1999). An deren Bildung ist womöglich cRNA beteiligt, die durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase synthetisiert wird (Schiebel *et al.*, 1993a,b; Fagard

et al., 2000). Damit lassen sich direkte Parallelen zur „*RNA interference*“ (**RNAi**) ziehen, bei der durch Injektion von dsRNA in Nematoden und andere Invertebraten eine drastische Reduktion der Genexpression erreicht wurde (Fire *et al.*, 1998; Boshier & Labouesse, 2000; Fagard *et al.*, 2000). Die Reaktionen zu RNAi und PTGS finden im Cytoplasma statt (Boshier & Labouesse, 2000).

Während mit herkömmlichen *Antisense*- oder *Co-Suppressions*-Konstrukten nur eine gemäßigte Reduktion der Genexpression erzeugt werden konnte, haben Wesley *et al.* (2001) mit selbst-komplementärer „*hairpin*“-RNA (**hpRNA**) ein wesentlich effektiveres Verfahren demonstriert. Derartige Konstrukte tragen die entsprechende DNA Sequenz sowohl in *sense*- als auch in *antisense*- Orientierung, wobei beide Teilssequenzen auch durch ein Intron miteinander verbunden werden können. Das Transkript kann durch seine „*inverted repeat*“-Sequenz mit sich selbst hybridisieren und dsRNA bilden. Transformierte Pflanzen zeigten je nach Gestaltung des Introns eine Reduktion der Expression von 25-90% (Smith *et al.*, 2000).

Transformiert man ein heterologes Gen unter Kontrolle eines starken Promotors, so tritt in der Regel keine *Co-Suppression*⁵ auf. Das neu eingeführte Gen darf dabei für ein pflanzliches, oder auch für ein weniger verwandtes, Protein kodieren. Auf diese Art läßt sich beispielsweise die Aktivität eines bestimmten Enzyms erhöhen, wenn das artfremde Enzym keinerlei posttranslationaler oder metabolischer Kontrolle unterliegt (Stitt & Sonnewald, 1995). Auch im Empfängerorganismus gänzlich unbekannt Gene können somit eingeführt werden, oder die Transformation kann z.B. zu einer funktionellen Revertierung einer *Knockout*-Mutante führen.

⁵Durch Mehrfachintegration und/oder durch Integration nahe an einem endogenen Promotor am 3' Ende können PTGS-Effekte eintreten (Waterhouse *et al.*, 1998).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die Erkenntnisse über die pflanzliche Pyrimidin *de-novo* Synthese gründeten sich zu Beginn der Arbeit weitgehend auf enzymatische Studien fraktionierter Gewebehomogenate (Lieberman & Kornberg, 1954; Mazus & Buchowicz, 1966, 1972; Kanamori *et al.*, 1980; Kanamori-Fukuda *et al.*, 1981; Doremus, 1986; Doremus & Jagendorf, 1987). In den 90er Jahren wurden darüber hinaus erstmals pflanzliche Gene der Pyrimidinsynthese kloniert (Williamson & Slocum, 1994; Nasr *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das in Pflanzen noch unbekannte und für Dihydroorotase kodierende Gen **pyrC** zu klonieren. Dies soll mittels heterologer Komplementation von *E.coli* *Knockout*-Mutanten mit cDNA aus *Solanum tuberosum* und *Arabidopsis thaliana* erfolgen.

Das Gen soll in *E.coli* exprimiert, gereinigt und charakterisiert werden. Dazu soll ein sensitiver Enzymassay auf der Basis einer nichtradioaktiven Detektionsmethode entwickelt werden.

Die Ermittlung der vollständigen 5' untranslatierten Region (5'-UTR) des pflanzlichen pyrC Gens soll Aufschluß über eventuell vorhandene Transitsequenzen und somit über die subzelluläre Lokalisation des Enzyms Dihydroorotase geben. Das Ergebnis der Expression und Lokalisation mit Reporter gen Fusionen (GFP) soll in Vergleich gesetzt werden mit den z.T. widersprüchlichen Resultaten älterer Publikationen [1.3, S.11].

Mit Hilfe transgener Pflanzen, die pyrC-Antisense mRNA exprimieren, soll der Einfluß von reduziertem DHOase Gehalt auf Wachstum, Metabolismus und Nährstoffverteilung untersucht werden. Im Gegenzug sollen Pflanzen mit einem heterologen pyrC Gen (*E.coli*) transformiert werden, das unter der Kontrolle eines starken Promotors (CaMV 35S, Franck *et al.* (1980)) bzw. eines gewebespezifischen Promotors (Patatin-B33, Rocha-Sosa *et al.* (1989)) steht. Die Auswirkungen dieser globalen bzw. lokalen Überexpression einer nicht regulierten DHOase sollen weitere Einblicke in den Pyrimidin Metabolismus der Pflanze geben und eventuell Möglichkeiten zur Ertragssteigerung aufzeigen. Die Speisekartoffel *Solanum tuberosum* soll hierfür als Modellpflanze dienen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Spezielle Chemikalien

2.1.1.1. Antibiotika & Antimykotika

Stammlösung	gelöst in	Einsatz	Ansatz	
Ampicillin	100 mg/ml	50 % Ethanol	1:1000	200 mg/ml in H ₂ O; mit EtOH abs. auf Endkonz.
Amphotericin B	25 mg/ml	H ₂ O		
Chloramphenicol				
Claforan	250 mg/ml	H ₂ O	1:500	
Kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O	1:1000	
Rifampicin	50 mg/ml	DMSO	1:1000	
Tetracyclin	30 mg/ml	50 % Ethanol	1:1000	

2.1.1.2. Antikörper

Anti Digoxigenin-AP „Fab Fragments“, Boehringer Mannheim/Roche

2.1.2. Spezielle Geräte

- **Zentrifugen:** Beckmann J2-21 mit Rotor JA14 (r=137mm); Eppendorf Centrifuge 5417R mit Rotor F 45-30-11; Heraeus Megafuge 1.0R mit Rotor BS 4402/A; Heraeus Biofuge13 mit Rotor #3757
- **Homogenisator:** Schwingmühle MM 300, Retsch GmbH; French Press, Glen Mills Inc.
- **Hybridisierungsöfen:** Hybridiser HB-19 (Techne Cambridge, UK)
- **Photometer:** Uvikon Spektrophotometer 930 (Kontron Instruments); LKB Ultrospec III (Pharmacia); SmartSpec 3000 (BIO-RAD); Anthos HT-2 (Anthos Mikrosysteme GmbH)
- **Fluorimeter:** Spektrofluorimeter SFM25 (Kontron Instruments)
- **HPLC:** HPLC-Pump 422 (Kontron); Autosampler 360 (Kontron); Data-System 450 MT2 (Kontron); Absorbance Detector 757 (Applied Biosystems)

- **PCR Thermocycler:** T Personal Cyler (Biometra); T1 Thermocycler (Biometra); Robo-cycler (Statagene)
- **Geldokumentation:** Enhanced Analysis System (Herolab); ChemiDoc (BIO-RAD)
- **UV-Crosslinker:** UV-Stratalinker (Stratagene)
- **Mikroskopie Systeme:**
 - Olympus BX-40 für Auflicht Fluoreszenz Detektion mit CCD-Kamera Sony XC-75
 - Leica DM IRBE mit Leica TCS SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH)
- **Pipettier Roboter:** Microprobe II HT EX mit *Gripper Integration Platform* (Packard)

2.1.3. Bakterienstämme

- *Agrobacterium tumefaciens* **C58C1**
Rif^R
- *E. coli* **BL21-CodonPlus (DE3)-RIL** (Stratagene)
B⁻ F⁻ ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r galλ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]
- *E. coli* **DH5α**
supE44 ΔlacU169(φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1
- *E. coli* **JM109** (Promega)
endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_k⁻,m_k⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F['] traD36 proAB lacI^qΔM15]
- *E. coli* **M15[pREP4]** (Qiagen)
Nal^s Str^s rif^s thi⁻ lac⁻ ara⁺ gal⁺ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺ lon⁺
- *E. coli* **TOP10** (Invitrogen)
F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG
- *E. coli* **XL1-Blue** (Stratagene)
recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F['] proAB lacI^q ZΔM15Tn10(Tet^r)]
- *E. coli* **XL10-Gold** (Stratagene)
Tet^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F[']proAB lacI^qZ ΔM15Tn10(Tet^R) Amy Cam^R]
- *E. coli* **CS101-2U5** (*E. coli* Genetic Stock Center)
Hfr fhuA22, pyrC45, fadL701(T2R), relA1, spoT1, metB1, creC510
- *E. coli* **MA1004** (*E. coli* Genetic Stock Center)
Hfr lacZ43(Fs), λ⁻, pyrD68, relA1, thi-1
- *E. coli* **CA234** (*E. coli* Genetic Stock Center)
Hfr lacZ43(Fs), pyrD36, relA1, thi-1

2.1.4. Enzyme

Für DNA Restriktionsverdauung wurden Enzyme von Roche, New England Biolabs und MBI-Fermentas verwendet.

Für die PCR wurden folgende DNA-Polymerasen verwendet: *Taq* DNA Polymerase (Qiagen); SureStart™ *Taq* DNA Polymerase (Stratagene); Cloned *Pfu* DNA Polymerase (Stratagene); *PfuTurbo*® Hotstart Polymerase (Stratagene)

Weitere zur Klonierung verwendete Enzyme: T4 DNA Ligase (Promega)

Enzyme für biochemische Analyse: α-Amylase (Roche); Amyloglucosidase (Roche); G6PDH (Roche); Hexokinase (Roche); Invertase (Sigma); Peroxidase (Horseradish, Roche); PGI (Roche)

2.1.5. Membranen

Duralon UV (Stratagene); **Immobilon-P** 0,45 µm Porenweite (Millipore)

2.1.6. Elektrophorese Standards

- **Protein Standard für PAGE:** Kaleidoscope prestained Standard (BIO-RAD); Broad Range 10-250 kD (BIO-RAD, #161-0362); Marker 14,5-116 kD (Fermentas, #SM0431)
- **DNA Standard:** SmartLadder 200bp - 10.000bp (Eurogentec)

2.1.7. Plasmide

pBluescript SK (Stratagene); **pPCR-Script Amp** (Stratagene); **pCR4Blunt-TOPO** (Invitrogen); **pGEM-T Easy** (Promega); **pQE 9,10,11,60** (Qiagen); **pBinAR** (Höfgen & Willmitzer, 1992), **pUC 18,19**

2.1.8. Pflanzen

Arabidopsis thaliana: Columbia 0, C24

Solanum tuberosum: cv. Solara, cv. Desireé

2.1.9. Software

Zur Fertigstellung dieser Dissertation eingesetzte, oder an der Erfassung und Aufbereitung von Daten beteiligte Software mit Urheber.

Kommerzielle Software:

Windows2000 (Microsoft Corp.); Microsoft Excel2000 (Microsoft Corp.); Adobe Photoshop 5 LE (Adobe Syst. Inc.); SigmaPlot2000 (SPSS Inc.); CorelDraw9 (Corel Corp.); Heurisko (Aeon); Chromas 2.13 (Technelysium Pty Ltd, Australia); PMView2000 2.31 (P.Nielsen)

Für den nicht kommerziellen Einsatz freie Software:

ISIS Draw 2.4 (MDL); StarOffice 5.2 (Sun Microsystems)

Software unter der GPL¹ Richtlinie:

L^AT_EX 2_ε/ MiKTeX 2.2 (www.miktex.org); TeXnic Center, 6.01β (ToolsCenter.org); GIMP 1.2.0 (Wilber & Sons); GSView 4.2 (Ghostgum); AFPL Ghostscript 7.04

Bioinformatische Dienste:

HUSAR² 5.0 basierend auf dem Wisconsin Package 10.2-UNIX (Genetics Computer Group, Inc.)

¹GNU Public Licence; www.gnu.org

²Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources

2.2. Anzuchtbedingungen

2.2.1. Nährmedien

- **Mikroelemente 1000x:** H₃BO₃ [120mg/l], ZnSO₄ · 7 H₂O [180 mg/l], Na₂MoO₄ · 2 H₂O [44 mg/l], MnCl₂ · 4 H₂O [180 mg/l]
- **6N-Ara:** KH₂PO₄ / K₂HPO₄ [500 µM], KNO₃ [1 mM], Ca(NO₃)₂ [4 mM], MgSO₄ [500 µM], Fe-EDTA [8 mg/l], Mikroelemente [1x]

2.2.2. Kartoffelkultur

2.2.2.1. Sterilkultur

Licht: 12 h ca. 80-100 µEs

Temperatur: 20 °C

Feuchte: 60%

2.2.2.2. Klimakammer

Licht: 16 h ca. 350 µEs

Temperatur: 25 °C (Lichtperiode), 15 °C (Dunkelperiode)

Feuchte: 70%

2.2.2.3. Gewächshaus

Licht: 16 h

Temperatur: 20 °C (Lichtperiode), 18 °C (Dunkelperiode)

Feuchte: 50-60%

2.3. Mikrobiologische Methoden

2.3.1. Bakterielle Kulturmedien

2.3.1.1. Flüssigmedien

- **LB:** Bacto Trypton [1% (g/v)], Hefeextrakt [0,5% (g/v)], NaCl [0,5% (g/v)], pH 7 (NaOH)
- **YEB:** Rinderextrakt [5 g/l], Hefeextrakt [1 g/l], Pepton [5 g/l], Saccarose [5 g/l], MgSO₄ [2 mM]
- **SOC:** Bacto Trypton [2% (g/v)], Hefeextrakt [0,5% (g/v)], NaCl [10 mM], KCl [2,5 mM], MgCl₂ [10 mM], MgSO₄ [10 mM], Glucose [20 mM]

2.3.1.2. Selektions Agar

- **M9-Agar:** 7,5 g Agar wurden in 375 ml Aqua bidest. autoklaviert und nacheinander sterile Lösungen der Zusätze zugegeben. Unter ständigen Rühren wurden 100 ml 5x M9-Salze [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 64 g/l, KH_2PO_4 15 g/l, NaCl 2,5 g/l, NH_4Cl 5 g/l], 10 ml Glucose [20% (g/v)], 500 μl MgSO_4 [1M], 5 ml CaCl_2 [10 mM] und 1250 μl IPTG [100 mM] zugegeben. Für Mutante CS101 mußten darüber hinaus je 500 μl Methionin [100 mM] und Thiamin [100 mM] zugegeben werden.
- **LB-Agar:** 7,5 g Agar in 500 ml LB Medium autoklavieren
- **YEB-Agar:** 7,5 g Agar in 500 ml YEB Medium autoklavieren

2.3.2. Lagerung von Bakterienstämmen

Zur Sicherung von Zelllinien wurden Aliquots (850 μl) einer Übernachtskultur mit 150 μl sterilfiltriertem Glycerin 87% (v/v) vermischt und in flüssigem N_2 eingefroren. Lagerung der Zellen bei -80°C .

2.3.3. Bestimmung der Bakteriendichte

Die Dichte einer Bakterienkultur wurde ermittelt über die Extinktion bei $\lambda=600$ nm. Als Referenz diente eine Küvette mit bakterienfreiem Nährmedium.

2.3.4. Herstellung transformationskompetenter Zellen

2.3.4.1. *E.coli* für Hitzeschocktransformation

Eine Kolonie der zu transformierenden Zellen wurde in 1-2 ml ψ -Medium [Bacto Trypton 2% (g/v), Hefeextrakt 0,5% (g/v), MgSO_4 0,4% (g/v), KCl 0,84 g/l, pH 7,6 (KOH)] angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1 ml der Übernachtskultur wurde zu 100 ml ψ -Medium gegeben und bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis zum Erreichen einer optische Dichte des Mediums bei $\lambda=600$ nm von etwa 700 mOD. Als Referenz diente steriles Medium. Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde die Zellsuspension auf Eis gestellt.

Die abgekühlten Zellen wurden in sterilen Zentrifugenbechern 5 Minuten mit 2460 rcf (4000 rpm, Beckmann J2-21 mit JA-14) bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 30 ml TFB1 je 100 ml Ansatz resuspendiert, 10 min auf Eis ruhen lassen und anschließend 5 min bei 2460 rcf (rpm wie oben) und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde an der Sterilbank in 4 ml TFB2 je 100ml Ansatz suspendiert, in sterile Gefäße à 200 μl aliquotiert und sofort in flüssigem N_2 gefroren. Die Zellaliquots können bei -80°C gelagert werden.

	TFB 1	TFB 2
K-Acetat	30 mM	-
MOPS pH 7	-	10 mM
MnCl_2	50 mM	-
CaCl_2	10 mM	75 mM
RbCl	100 mM	10 mM
Glycerin (v/v)	15 %	15 %

Tabelle 2.1.: TFB-Puffer

2.3.4.2. *Agrobacterium tumefaciens*

100 ml YEB-Medium [Rinder Extrakt 5 g/l, Hefe Extrakt 1 g/l, Pepton 5 g/l, Saccharose 5 g/l, MgSO₄ 2 mM] mit Rifampicin [100 mg/l] und Ampicillin [100 mg/l] wurden mit *Agrobacterium* angeimpft und bei 28 °C über Nacht wachsen lassen. Die Übernachtskultur wurde zu 400 ml YEB-Medium mit gleicher Konzentration an Rif und Amp gegeben und die Kultur bis zur Absorption ($\lambda=600$ nm) von etwa 700 mOD heranwachsen lassen. Als Referenz diente nicht-infiziertes YEB-Medium mit Rif und Amp. Die Kultur wurde in sterilen Zentrifugenbechern 20 Minuten bei 4500 rpm (Beckmann J2-21 mit JA-14) und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden mit je 10 ml sterilem, kaltem (4 °C) TE-Puffer [TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 (HCl)] gewaschen. Danach wurden die Pellets in je 5 ml YEB-Medium ohne Antibiotika resuspendiert und die Suspensionen vereinigt. Die Zellen wurden in Reaktionsgefäße zu je 500 μ l aliquotiert und in flüssigem N₂ eingefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

2.3.5. Transformation von *E.coli* durch Hitzeschock

Zur Transformation von *E.coli* wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Dem Zellaliquot wurde die zu transformierende Plasmidlösung zugegeben, sanft gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 100 Sekunden auf 42 °C erwärmt und anschließend 3 Minuten auf Eis inkubiert. Dem Transformationsansatz wurden 800 μ l SOC Medium [Bacto Trypton 2% (g/v), Hefeextrakt 0,5% (g/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucose 20 mM] zugegeben und 45 Minuten bei 37 °C unter Bewegung inkubiert.

Der Zellansatz wurde kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment im gewünschten Volumen (100 μ l) resuspendiert und auf Selektionsmedium ausgestrichen.

2.3.6. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* durch Elektroporation

Die kompetenten *Agrobacterium* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, die Plasmidlösung zugegeben und eine Minute auf Eis inkubiert. Die DNA/Bakteriensuspension (50 μ l) wurde in eine sterile, kalte Elektroporations Küvette (2 mm Elektrodenabstand, BioRad) pipettiert. Nach Auslösen des Pulses (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω) wurde den Zellen sofort 1 ml SOC Medium [Bacto Trypton 2% (g/v), Hefeextrakt 0,5% (g/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucose 20 mM] zugegeben und eine Stunde bei 37 °C unter Bewegung inkubiert.

Der Zellansatz wurde kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment im gewünschten Volumen (100 μ l) resuspendiert und auf Selektionsmedium ausgestrichen.

2.4. Verarbeitung von Nukleinsäuren

2.4.1. Extraktion von Plasmid DNA aus Bakterien

2.4.1.1. Herstellung von TE-RNase

RNaseA wurde in sterilem *Aqua bidest.* [$10 \frac{mg}{ml}$] 10 Minuten bei 95 °C erhitzt und langsam auf RT abkühlen lassen. Diese Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert und bei Bedarf 1:100 in sterilen TE-Puffer [TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 (HCl)] aliquotiert. Die Gebrauchslösung wurde bei RT oder 4 °C gelagert.

2.4.1.2. Mini-Präparation von Plasmid DNA

3 ml LB Selektionsmedium wurden in sterilen Reagensgläsern mit der gewünschten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im ständiger Bewegung gehalten. Von der Übernachtskultur wurden 1,5-2 ml in sterile Mikroreaktionsgefäße überführt und 30 sec bei 2460 rcf (14000 rpm, Eppendorf Centrifuge) pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl Präparationslösung I [TRIS-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, Glucose 50 mM, pH 8] suspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl Präparationslösung II [NaOH 200 mM, SDS 1% (g/v)]. Der Ansatz wurde gemischt und 1-2 min stehen lassen. Durch Zugabe von 150 µl Präparationslösung III [K-Acetat 3 M, pH 4,8] wurde die chromosomale DNA gefällt. Zur Inaktivierung zellulärer Proteine wurden 200 µl CIP-Lösung [Chloroform, Isoamylalkohol, Phenol 24:1:24] zugegeben und der Ansatz gut gevortext. Durch 5 min Zentrifugation bei 2460 rcf erfolgte die Trennung der organischen von der wässrigen Phase mit der Plasmid DNA. Diese wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt.

Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol abs. gefällt. Der Ansatz wurde gevortext und 10 Minuten bei RT und 2460 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl Ethanol 80 % (v/v) gewaschen und erneut 5 min mit 2460 rcf bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich und vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 30-50 µl TE-Puffer/RNaseA aufgenommen und zur Eliminierung der RNA ca. 15 Minuten bei RT inkubiert.

2.4.1.3. Maxi-Präparation von Plasmid DNA

In einem Weithals-Erlenmeyerkolben (1000 ml) werden 300 ml LB-Medium [Bacto Trypton 1% (g/v), Hefeextrakt 0,5 % (g/v), NaCl 0,5 % (g/v), pH 7 (NaOH)] mit der gewünschten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C in ständiger Bewegung gehalten.

Die Übernachtskultur wurde gleichmäßig auf zwei Zentrifugenbecher verteilt und 5 min bei 4 °C, 2460 rcf (4000 rpm, Beckmann Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu jedem Gefäß wurden je 5 ml Präparationslösung I geben und die Zellen darin suspendiert.

Anschließend wurden je 10 ml Präparationslösung II zur Zellsuspension gegeben, geschwenkt und 2-3 min stehen lassen. Danach wurden je 7,5 ml Präparationslösung III zugegeben, geschwenkt und 20 min bei 2460 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Lage Miracloth in 50 ml Reaktionsröhren filtriert. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 0,7 VT Isopropanol bei RT für 30 Minuten und anschließender Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 6.000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R). Zur Reinigung der DNA über QIAGEN Säulen wurden die Pellets in je 1,5 ml sterilem H₂O bidest. suspendiert, vereinigt und mit 600 µl NaCl (5M) und 400 µl MOPS (0,5M pH 7,0) gepuffert. Protokoll laut Hersteller Angabe (Qiagen, 2000).

2.4.2. DNA Gelelektrophorese

Laufpuffer und Gelpuffer wurde vor Gebrauch aus 50x TAE [242g TRIS, 57,1 ml Essigsäure, 18,6g EDTA, ad 100 ml, pH 8,2] mit *Aqua bidest.* verdünnt. Zur Trennung von DNA Fragmenten wurden TAE-Gele mit 1% (g/v) Agarose verwendet. Den zu trennenden Proben wurden $\frac{1}{20}$ Volumen Probenauftragspuffer [Glycerin 30%, (v/v), EDTA 10 mM, Bromphenolblau 0,25% (g/v), Xylencyanol 0,25% (g/v)] zugesetzt und die Gele in 1x TAE Puffer bei einer elektr. Feldstärke von ca. 10-15 $\frac{V}{cm}$ entwickelt.

2.4.3. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Verwendet wurde das „QIAquick“ Verfahren der Firma QIAGEN. Die Puffer PE, QG und der Elutionspuffer sind als gebrauchsfertige Lösungen in dem QIAquick-System enthalten.

Die mit Restriktionsendonukleasen geschnittene und über 1% TAE-Agarosegel getrennte DNA wurde mit schwachem UV-Licht im Gel lokalisiert und mit einer sauberen Rasierklinge ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden in tarierte Mikroreaktionsgefäße überführt und die Masse des Gelstückchens ermittelt. Die Isolation der DNA erfolgte gemäß dem „QIAquick“ Protokoll (Qiagen, 2001). Zur Kontrolle und Konzentrationsbestimmung werden $\frac{1}{10}$ Volumen (3 µl) auf ein 1% TAE-Agarosegel geladen.

2.4.4. Ligation linearisierter DNA-Moleküle in Plasmidvektoren

Die T4-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung der 5'-Phosphatgruppe zur 3'OH Gruppe zweier DNA-Enden.

- Ligation von PCR-Produkten ohne Basenüberhang („*blunt-end*“)
Zur Erhöhung der Ligationseffizienz wurde das PCR-Script System (Stratagene) verwendet. Die Methode ist veröffentlicht unter (Stratagene, 1999).
- Ligation von PCR-Produkten mit A-Basenüberhang
Verwendet wurde das pGEM-T Easy Vektor System (Promega). Die Methode ist veröffentlicht unter (Promega, 1998).

- Ligation von DNA-Fragmenten mit Basenüberhang („sticky“) Vektor und zu ligierendes DNA-Fragment wurden mit T4-Ligase in einem molaren Verhältnis Vektor zu Insert von 1:10 bzw. 1:3 bei 26 °C für eine Stunde ligiert.

2.4.5. Ermittlung der vollständigen 5'-Region bekannter cDNA

Mit der RNA Ligase vermittelten RACE Technik (RLM-RACE) wurde der vollständige 5'-Bereich eines bekannten cDNA Klons ermittelt. Es wurde dazu das Generacer Kit (Invitrogen) eingesetzt und streng nach Anleitung (Invitrogen, 2000) verfahren.

2.4.6. Isolation von RNA aus Pflanzengewebe

Die Gewinnung von pflanzlicher RNA erfolgte nach der Methode, beschrieben vom Zrenner *et al.* (1995) und in speziellen Fällen mit Hilfe des Plant RNEasy Systems (Qiagen).

2.4.7. RNA Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von RNA wurde analog den von Lehrach *et al.* (1977) beschriebenen Methoden durchgeführt.

2.4.8. Northern Hybridisierung

Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran (Duralon UV, Stratagene) erfolgte mittels Kapillarblot mit 10x SSC Puffer als Laufmittel. Nach etwa 6-8 Stunden ist der passive Transfer der RNA auf die Membran beendet. Die Fixierung erfolgte durch Bestrahlung mit 120 mJ UV-Licht bei 366 nm (Stratalinker 1800).

Die SSC-Stammlösung wurde 20x angesetzt [NaCl 3M, Na-Citrat 300 mM, pH 7,5-8] und autoklaviert.

2.4.8.1. Prähybridisierung

Die Prähybridisierung der Membran mit ca. $0,2 \frac{ml}{cm^2}$ Hybridisierungspuffer (DIG EasyHyb, Roche) erfolgte zwei Stunden im Hybridisierungssofen (Hybridizer HB19, Techne) bei 50 °C.

2.4.8.2. Herstellung der Sonde

Die mit DIG-11-dUTP (Roche) dotierte Sonde wurde mit Standard PCR Methoden synthetisiert. Dabei ist das DIG-11-dUTP zu dTTP Verhältnis 1:20.

2.4.8.3. Hybridisierung

Die mit DIG-11-dUTP markierte DNA-Sonde wurde 10 Minuten bei 95 °C denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und dem Hybridisierungspuffer zugegeben, so daß ihre Konzentration zwischen 5-25 $\frac{ng}{ml}$ lag. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei gleicher Temperatur wie die Prähybridisierung.

Die Sonden im Hybridisierungspuffer wurden mehrmals wiederverwendet. Vor erneutem Einsatz mußten diese jedoch 5 Minuten bei 68 °C denaturiert werden.

2.4.8.4. Detektion mittels Chemilumineszenz

Die Hybridisierungslösung mit der Sonde wurde durch kurzes Waschen mit Waschlösung1 (2xSSC, 0.1% SDS) von der Membran entfernt. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch zweimaliges Waschen der Membran mit Waschlösung1 für 15 Minuten bei 55 °C und weiteren zwei Waschungen mit Waschlösung2 (0.1x SSC, 0.1% SDS) für je 10 Minuten bei bis zu 65 °C entfernt.

10x Maleinsäurepuffer	
Maleinsäure	1 M
NaCl	1,5 M
pH 7.5 mit NaOH	

Nach der Waschung wurde die Membran für wenige Minuten bei RT in Detektionspuffer1 (1x Maleinsäurepuffer mit 0.3% (v/v) Tween 20) äquibriert. Freie Bindungsstellen auf

10% Blockreagens	
Blocking Reagens (Roche)	5 g
1x Maleinsäurepuffer	50 ml

der Membran wurden abgesättigt durch eine Stunde Inkubation in Detektionspuffer2 (Detektionspuffer1 mit 1% Blocking Reagens) bei RT.

Das Antikörper Konjugat (Anti DIG, FAB-Fragments) wurde 1:10.000 in Detektionspuffer2 verdünnt und die Membran darin 45 Minuten bei RT inkubiert. Überschüssige Antikörperlösung wurde durch zweimaliges Waschen (je 15 Minuten) mit Detektionspuffer1 entfernt.

Die Membran wurde 5 Minuten in AP Puffer [TRIS 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM; pH 9.5 mit HCl] äquibriert, anschließend mit gebrauchsfertiger Substratlösung CDP-Star (Roche) benetzt und in Klarsichtfolie gelegt. Mit einer Gummihandwalze wurde die Substratlösung gründlich von der Membran gepresst und die Folie anschließend verschweißt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte in einer Filmkassette mit Hyperfilm ECL (Amersham).

2.5. Biochemische Methoden

2.5.1. Homogenisation von Pflanzengewebe

2.5.1.1. Homogenisation mit Mörser

Größere Mengen leicht homogenisierbaren, gefrorenen Pflanzenmaterials wurden in N₂ gekühlten Keramikmörsern zerkleinert und dort entweder direkt extrahiert oder in gekühlte Mikroreaktionsgefäße eingewogen.

2.5.1.2. Homogenisation mit Schwingmühle

In flüssigem Stickstoff (-195,8°C) gefrorenes Pflanzengewebe wurde mittels Homogenisator (Retsch) fein pulverisiert. Für große Blätter wurden Mahlbecher aus Edelstahl mit 20 mm Wolframcarbid (WC) Kugeln eingesetzt. Kleine Gewebeproben wurden in Mikroreaktionsgefäßen mit Edelstahl- oder Wolframcarbid-Kugeln (ø5 mm) eine Minute bei 20 Hz homogenisiert.

Hartes Gewebe wie Kartoffelscheiben (ø5 mm, 1 mm) wurde mit der 2-Kugel Methode in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen pulverisiert. Eine 5 mm Kugel reicht bis zum konischen Boden des Gefäßes, während eine darüber liegende 9 mm Kugel für den notwendigen Impuls sorgt. Homogenisiert wurde eine Minute, beginnend mit 30 Hz. Nach 5-10 sek. wurde die Frequenz auf 20 Hz gesenkt.

2.5.2. Ethanolische Extraktion

Die hier beschriebene Methode ist optimiert auf die Verarbeitung der Proben mit den Pipettier Roboter und die Messung am Microplatten Photometer.

Etwa 20 mg fein homogenisiertes [vgl. Abschnitt 2.5.1], gefrorenes Pflanzenmaterial wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel eingewogen. Die Extraktion erfolgte in drei Schritten bei dicht geschlossenem Deckel, beginnend mit 250 µl Ethanol 80% (v/v) bei 80°C. Nach 20 Minuten wird die Probe zentrifugiert (5 min, 16.000g) und der Überstand in eine kalte (4°C) 96-*deep-well* Mikrotiterplatte (Qiagen) überführt. Das Sediment wurde im zweiten Schritt mit 150 µl Ethanol 80% (v/v) resuspendiert und wiederum 20 Minuten bei 80°C inkubiert, danach zentrifugiert und der Überstand mit dem des ersten Extraktionsschrittes vereinigt. Im letzten Schritt wurde das Sediment mit 250 µl Ethanol 50% (v/v) resuspendiert, weitere 20 Minuten bei 80°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich abgenommen und mit den Überständen des ersten und zweiten Schrittes vereinigt. Das Sediment wurde zur Stärkebestimmung verwendet.

2.5.3. TCA-Extraktion

Etwa 200 mg Pflanzengewebe wurde in N₂ gekühlten Mörsern in flüssigem N₂ homogenisiert. Dem Homogenat wurden 1,5 ml TCA/Diethylether Lösung (16% g/v) zugegeben und bis zur Erstarrung weiter gemörsert. Zur Vermeidung von Kondensationsfeuchte wurde der Mörser abgedeckt. Nach Verflüssigung der Probe (ca. 10-15 Minuten) wurden 800 µl TCA/Wasser [16% (g/g)] zugegeben und mit der Probe vermengt. Die flüssige Suspension wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt, mit wassergesättigtem³ Diethylether überschichtet, drei Stunden auf Eis inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 2460 rcf und 4 °C zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mehrmals (3-4) mit eiskaltem, wassergesättigtem Diethylether gewaschen und zentrifugiert. Die organische Phase wurde nach jedem Schritt abgenommen und verworfen. Am Ende der Waschprozedur wurde der Extrakt mit 5M KOH (in 1M TEA gelöst) vorsichtig in den pH Bereich 5-7 titriert⁴. Die neutralisierten Extrakte wurden in flüssigem N₂ gefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.4. Denaturierende Proteinisolation und PAGE

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel wurde eine definierte Menge homogenisiertes und gefrorenes Gewebe mit 10 µl 1x Probenpuffer je Milligramm Frischgewicht aufgenommen und 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Unlösliche Partikel wurden durch eine Minute Zentrifugation bei max. Drehzahl (Tischzentrifuge) am Boden des Gefäßes gesammelt und die gelösten Proteine mit einer Hamilton Spritze aus dem Überstand genommen. Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden Polyacrylamidgele (10% bzw 12.5%) mit TRIS-Laufpuffer (TRIS 1,23 g, Glycin 7,2 g, SDS 0,1% (g/v)) in Protean Minigelsystemen (BioRad) verwendet.

250 mM	TRIS-HCl pH 6,9
8 %	SDS (g/v)
40 %	Glycerin (v/v)
20 %	β-Mercaptoethanol (v/v)
<0,1 %	Bromphenolblau (g/v)

Tabelle 2.2.: 4x Probenpuffer

	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12,5 %	3,9 %
Acrylamid/Bisacrylamid (29,2:0,8)	6 ml	7,5 ml	1,3 ml
TRIS-HCl 3M pH 8,8	2,25 ml	2,25 ml	-
TRIS-HCl 1M pH 6,9	-	-	2,5 ml
Aqua bidest.	9,4 ml	7,9 ml	6,1 ml
SDS 10% (g/v)	180 µl	180 µl	100 µl
APS 10% (g/v)	135 µl	135 µl	50 µl
TEMED	15 µl	15 µl	10 µl

Tabelle 2.3.: Komponenten zur Herstellung denaturierender PAA Gele.

Die Gele wurden in der Sammelphase spannungslimitiert mit 100 V und in der Trennphase mit 180-200 V entwickelt. Die Laufweite richtete sich nach der Größe des gesuchten Proteins.

³Vorratslösung mit einigen ml *Aqua bidest.* unterschichten

⁴Extrakt sollte nicht alkalisch werden; ggf. mit TCA/Diethylether ansäuern

2.5.5. Direkte Visualisierung der Proteine im Gel

2.5.5.1. SYPRO Orange

SYPRO-Orange (BIO-RAD) ist eine sensitive Färbemethode mit geringem Hintergrund. Es bietet die Option, das Gel im Anschluß zum Western Transfer verwenden zu können. Die Fluoreszenz der mit SYPRO Orange gefärbten Proteine erreicht durch UV-Anregung mit 302 nm ein Emissionsmaximum bei etwa 590 nm. Zur vollen Ausnutzung der Sensitivität muß das Gel digital erfaßt werden. Es dürfen nur ungefärbte Protein Standards verwendet werden. Mit Coomassie vorgefärbte Standards binden kein SYPRO Orange und fluoreszieren somit nicht.

Zur Färbung wurde das Gel 30 Minuten in 50 ml Essigsäure (7,5 %) mit 10 µl SYPRO Orange unter leichtem Schwenken inkubiert. Zum Schutz des Farbstoffes vor Licht wurde die Färbeschale abgedeckt. Nach 30 Minuten wurde das Gel für genau 30 Sekunden in frischer Essigsäure (7,5%) gewaschen und gleich darauf am Geldokumentationssystem aufgenommen. War das Signal zu schwach, konnte nachgefärbt werden. Eine Überfärbung tritt nicht ein.

2.5.5.2. Coomassie Brilliant Blau

Nach dem Lauf wurde das Gel für 10-20 Minuten in Coomassie Färbelösung getaucht und unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung [7% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Ethanol] geschwenkt⁵ bis zum Aufklaren des Hintergrundes vor den blauen Proteinbanden. Gebrauchter Entfärber wurde durch Aktivkohlebehandlung regeneriert und über einen Papierfilter von Kohlepartikeln getrennt.

Coomassie Färbelösung		
R-250	0,2 %	(g/v)
G-250	0,05 %	(g/v)
Ethanol	42,5 %	(v/v)
Methanol	5 %	(v/v)
Essigsäure	10 %	(v/v)
Wasser	42,5 %	(v/v)

2.5.6. Western Transfer und immunologische Detektion

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden im *semi-dry* Verfahren (Khyse-Anderson, 1984) elektrophoretisch vom Sammelgel auf eine PVDF (Immobilon-P, Millipore) Membran übertragen.

Das Trenngel wurde vom Sammelgel befreit und 5 Minuten in Transferpuffer [TRIS 48 mM, Glycin 39 mM, Methanol 10% (v/v)] äquilibriert. Die Membran wurde für einige Sekunden in Methanol befeuchtet und dann mit dem Filterfließ in Transferpuffer getränkt. Auf der befeuchteten Anodenplatte werden nacheinander luftblasenfrei 1.Filterfließ, Membran, Gel, 2.Filterfließ und schließlich die Kathodenplatte aufgelegt.

Der Transfer erfolgte 45-60 Minuten spannungslimitiert bei 20V und einer initialen Stromstärke von 1,5 bis 3 $\frac{mA}{cm^2}$. Gegen Ende des Transfers sinkt die Stromstärke merklich ab.

⁵mehrfacher Wechsel der Lösung beschleunigt den Vorgang

2.5.6.1. Transferkontrolle mit Ponceau-S

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran 3 Minuten in 1x Ponceau-S geschwenkt und anschließend mit *Aqua bidest.* gewaschen bis sich rote Banden vom Hintergrund abhoben.

10x Ponceau-S	
TCA	30 g
Sulfosalicylsäure	30 g
Ponceau-S	2 g
<i>Aqua bidest.</i>	auf 100 ml

2.5.6.2. Immunodetektion

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung an die Membran wurde diese mit Protein gesättigt. Dazu wurde sie mindestens 30 Minuten bei RT in Blocklösung [5 % (g/v) Magermilchpulver (Blotto, BIORAD) in TBST] inkubiert.

Anschließend wurde die Membran 1 Stunde mit dem Primärantikörper [1:50 in 1/2x Blocklösung]⁶ inkubiert. Die Membran wurde kurz mit TBS [TBST ohne Tween20] Puffer gespült, und in einem neuen Gefäß 5 Minuten in TBS, 10 Minuten in TBST und 10 Minuten in TBS gewaschen. Danach wurde sie 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper [Ziege anti Kaninchen, konjugiert mit alkalischer Phosphatase 1:3000 in 1/2x Blocklösung] inkubiert und anschließend gewaschen wie zuvor. Vor der Detektion wurde die Membran 5 Minuten in AP-Puffer [100 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5 (HCl)] äquilibriert. Die Detektion mittels Chemilumineszenz wurde analog zu Abschnitt 2.4.8.4 [S.30] durchgeführt.

TBST	
TRIS	20 mM
NaCl	500 mM
Tween 20 (g/v)	0,1 %
pH 7,5 mit HCl	

Alternativ zur Chemilumineszenz kann die Detektion auch direkt auf der Membran durch Farbstoffpräzipitation erfolgen. Dabei entsteht unter Einwirkung der Alkalischen Phosphatase aus den Substraten NBT⁷ und BCIP⁸ ein blauer Azofarbstoff, der am Ort seiner Entstehung präzipitiert. Das Verfahren ist gut geeignet für sehr schwache Signale und kann im Anschluß an eine unbefriedigende Chemilumineszenz Detektion durchgeführt werden. Eine Quantifizierung starker Signale ist u.U. ungenau, da dann das Präzipitat die Alkalische Phosphatase blockiert.

Die Substrate NBT [50 $\frac{mg}{ml}$ in DMF] und BCIP [25 $\frac{mg}{ml}$ in DMF] wurden 1:150 in AP-Puffer angesetzt und die Membran darin inkubiert bis die gewünschte Farbtintensität sichtbar war. Die Reaktion wurde gestoppt durch kurzes Waschen in *Aqua bidest.* und anschließender Trocknung der Membran auf Filterpapier.

2.5.7. Enzymextraktion aus Pflanzengewebe

Die Aufgabe des Enzymextraktionspuffers ist die Stabilisierung der Enzyme und die sofortige Inaktivierung von Proteasen. Der Puffer kann mit Ausnahme der Proteaseinhibitoren Benzamidin, ϵ -Aminocapronsäure, und PMSF als Vorratslösung bereitet werden. PMSF hat in wässriger

⁶Verdünnung empirisch ermittelt für den Orotase Peptid Antikörper

⁷4'-Nitro-tetrazoliumblau

⁸5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat

Lösung eine Halbwertszeit von 15-30 Minuten und muß daher unmittelbar vor der Extraktion aus der Stammlösung [100 mM in Isopropanol] zugegeben werden. Sofern der geplante enzymatische Assay dies zuläßt, kann dem Extraktionspuffer DTT [10 mM] zugegeben werden.

Das zu untersuchende Gewebe wurde mit Hilfe einer Homogenisiermühle (Retsch) unter N₂ Kühlung gemahlen (vgl. Abschnitt 2.5.1, S.31). Dem Homogenat wurde ca. 1-2 Volumenteile PVPP und Extraktionspuffer im Verhältnis 1:5 (g/v) zugegeben und noch vor der Erstarrung mit einem Microspatel grob vermengt. Die Probe wurde auf Eis gestellt und in kurzen Abständen gevortext bis zum Auftauen des Puffers. Nicht lösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation (2 min 4°C, 16.000g) sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Extraktionspuffer	
HEPES pH 6,8	50 mM
BSA (g/v)	0,05 %
KCl	25 mM
MgCl ₂	5 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Glycerin (v/v)	10 %
Benzamidin	2 mM
ε-Aminocaprinsäure	2 mM
PMSF	1 mM

2.5.8. Native Proteinextraktion aus *E.coli*

4 ml einer *E.coli* Übernachtskultur mit dem pyrD Gen aus *E.coli* im Expressionsvektor pQE60 wurde zu 400 ml LB Medium mit 100 $\frac{mg}{l}$ Ampicillin überimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte ($\lambda=600$ nm) von 0,5 wurden die Zellen mit IPTG [1 mM] für 2 Stunden induziert, 5 min bei 4.000 rpm (Beckman JA14) zentrifugiert, das Pellet mit N₂(l) gefrosten und bei -80°C bis zur weiteren Verwertung gelagert.

Das gefrorene Zellpellet wurde in 12ml Aufschlusspuffer (3 ml/100 ml Medium) mit PMSF [1 mM] resuspendiert. Die Zellen wurden mittels French-Press homogenisiert und 30 min bei 4°C und 50.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine präequilibrierte Ni-NTA (Qiagen) Säule geladen, die mit einer Econo Gradient Pump (BioRad) gekoppelt war. Zur Überwachung der Bindung und Elution des Proteins war ein Econo UV-Monitor (260 nm) vor den Proben-sammler geschaltet, der die präzise Zuordnung des Protein Peaks zu den gesammelten Fraktionen ermöglichte.

	AP	WP	EP
HEPES pH 7,6 (KOH)	20 mM	20 mM	20 mM
MgCl ₂	5 mM	5 mM	5 mM
Imidazol	5 mM	25 mM	250 mM
Saccharose (g/v)	10 %	10 %	10 %

Tabelle 2.4.: Puffer zur nativen Proteinextraktion aus *E.coli*. **BP:** Aufschlusspuffer zum Aufbrechen der Zellen. **WP:** Waschpuffer, entfernt unspezifisch gebundene Proteine. **EP:** Eluierungspuffer, verdrängt 6xHis von Ni-NTA Matrix.

Die Pumpgeschwindigkeit für alle Reinigungsschritte betrug 1 $\frac{ml}{min}$. Nach Beladung der Säule mit dem Zellextrakt (12 ml) wurde nochmals mit 2 ml Brechpuffer die Leitung gespült. Unspe-

zifisch gebundenes Protein wurde mit Waschpuffer von der Säulenmatrix eluiert. Die Eluierung des N-terminal mit sechs Histidin dotierten Enzyms DHODH erfolgte mit 10 ml Eluierungspuffer. Die Fraktionen mit der höchsten Absorption wurden vereinigt und direkt zum Aktivitätsassay verwendet.

2.5.9. DHODH Aktivitäts Assay in *E.coli*

Der Assay diente zur Aktivitäts-Kontrolle von *E.coli* DHODH Überexpressionskulturen. Der Nachweis⁹ beruht auf der Oxigenase Eigenschaft der *E.coli* DHODH.

Die Induktion der Kulturen erfolgte wie unter 2.5.8 [S.35] beschrieben. Die Bakteriensedimente wurden in 100 µl TE Puffer mit 100 mM NaCl resuspendiert. Nach 2-5 Minuten wurden je 10 µl der Suspension auf zwei Zellen einer Mikrotiterplatte aliquotiert, mit jeweils 10 µl Lysozym [20 mg/ml] versetzt, gut

Reaktionspuffer	
2 VT	PMS 20 mM
10 VT	MTT 10 mM
50 VT	Tricin/KOH 200 mM pH 8
5 VT	Triton-X100 10 % (v/v)
33 VT	Wasser

vermischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Lysozym verdaut die Mureinschicht um die Bakterienzelle. Die Lyse der Zellmembranen erfolgte mit 2 µl Triton-X100 [1%] unter vorheriger Zugabe von 2 µl PMSF [100 mM in 2-Propanol] und anschließender gründlicher Durchmischung. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wurden 50 µl Aqua bidest. zugegeben, geschüttelt und für weitere 2-5 Minuten bei RT inkubiert.

Unmittelbar vor der Messung wurde jeder Kammer 100 µl Tricin/KOH-Puffer [100 mM pH 8 mit PMS 2 mM, MTT 1 mM, TritonX-100 0,5%] zugegeben. Der Nachweis beruht auf der Reduktion des Tetrazoliums Salzes MTT durch Dehydrogenasen, wodurch sich ein blaues Formazan Produkt bildet (Lippold, 1982). Gemessen wurde die Absorption bei 570 nm in 30 Sekunden-Intervallen bis die Reaktionsgeschwindigkeit nach etwa 10 Minuten einen stabilen Wert annahm. Danach wurde einem der Duplikate eines jeden Klons 2 µl Dihydroorotat [100 mM] als Substrat zugegeben.

2.5.10. DHOase Aktivitäts Assay

Der hier gezeigt Assay beruht auf der Eigenschaft der *E.coli*-DHODH, die anfallenden Elektronen und H⁺ Ionen auf Sauerstoff (Ox. Zahl 0) zu übertragen. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid¹⁰ kann von dem Enzym Peroxidase gespalten werden. Die daraus resultierenden freien Radikale oxidieren eine chromogene Substanz (Amplex Red) und machen sie optisch anregbar bei 560 nm. Die emittierte Fluoreszenz hat ihr Maximum bei 587 nm und kann detektiert werden. Die Detektion findet somit in einem Teil des sichtbaren Spektrums statt, in dem es relativ wenige Störungen durch Absorption und Emission anderer Substanzen gibt.

⁹Methode adaptiert auf DHODH von Yves Gibon.

¹⁰Oxidationszahl beider Sauerstoffatome: -1

Als Hilfsenzyme wurden DHODH aus *E.coli* und Peroxidase (HRP) aus Meerrettich (Roche) im Überschuß eingesetzt. Zur Detektion wurde das Fluorimeter SFM25 der Firma Kontron-Instruments verwendet. Die Messung erfolgte bei konstant 25°C (Wasser-temperiert) unter ständiger Durchmischung (Teflon Rührfisch) in Fluorimeterküvetten der Firma Sigma.

2.5.10.1. Bereitung der Extrakte

Die Reaktion kann durch Reste von Reduktionsmitteln wie DTT oder 2-Mercaptoethanol empfindlich gestört werden. Es ist daher auf eine möglichst geringe Konzentration dieser Substanzen im Extraktionspuffer zu achten (grünes Gewebe 5 mM, Knollen 1 mM). Zur Vermeidung von Oxidationen, bedingt durch den Sauerstoff aus der Luft, kann die Probe mit Argon überschichtet werden.

Das Pflanzenmaterial wird wie in Abschnitt 2.5.7 beschrieben aufgeschlossen und mit Reaktionspuffer (HEPES 50 mM pH 6.8, MgCl₂ 5 mM, ZnSO₄ 5 µM) 1:10 (v/v) verdünnt.

2.5.10.2. Assay

Die Küvette wurde mit 1950 µl Reaktionspuffer befüllt und zur Temperierung in das Fluorimeter gestellt. Nach Zugabe von 15 µl HRP (250 U/ml) und 10 µl Extrakt läßt man den Ansatz für einige Sekunden inkubieren, gibt anschließend 0,5 µl AmplexRed [2 mM] zu und startet die Aufzeichnung. Unmittelbar nach dem Start gibt man 5 µl DHODH zu und wartet, bis die Zunahme der Hintergrundfluoreszenz einen konstanten Wert annimmt (Nullwert). Die nachträgliche Zugabe der DHODH resultierte in einer kurzen Zunahme der Fluoreszenz und diente der Kontrolle des Assays. Dabei wird binnen weniger Sekunden im Extrakt vorhandenes Dihydroorotat verbraucht.

Der Start der Messung erfolgte durch Zugabe von 20 µl Carbamoyl-Aspartat [100 mM]. Die Reaktion wurde mehrere Minuten verfolgt bis die Zunahme der Fluoreszenz einen konstanten Wert annahm. Von der gemessenen Zunahme wurde der Nullwert subtrahiert.

2.5.11. Zucker-, Protein und Stärkebestimmung

Glucose, Fructose, Saccharose, Protein und Stärke wurden in 96-well Mikrotiterplatten am ELISA-Reader gemessen.

2.5.11.1. Bestimmung löslicher Zucker

Unter den löslichen Zuckern wurden Glucose, Fructose und Saccharose in ethanolischen Extrakten [2.5.2, S.31] bestimmt, die der Pipettierroboter jeweils in Duplikaten zu 50 µl auf die Mikrotiterplatte plaziert hatte. Reaktionspuffer, ausreichend für eine Mikrotiterplatte: 15,5 ml Imidazolpuffer [100 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 6,9 (HCl)], 480 µl ATP [60 $\frac{mg}{ml}$], 480 µl NADP [36 $\frac{mg}{ml}$],

200 μl G6PDH¹¹ [80 μl Susp. gelöst in 200 μl Puffer]. Zum Extrakt wurden 160 μl Reaktionspuffer pipettiert, die Platte geschüttelt, ggf Luftblasen entfernt und die Messung gestartet. Die Kinetik der Reaktion wurde über einen Zeitraum von 2 Stunden mit einer Messung pro Minute bei $\lambda=340$ nm ermittelt. Dabei wurden nach Stabilisierung von ΔOD sukzessive die einzelnen Reaktionen durch Zugabe folgender Enzyme gestartet: 1 μl Hexokinase [120 μl Susp. gelöst in 200 μl Imidazolpuffer 0,1M], 1 μl Phosphoglucosomerase [60 μl Suspension gelöst in 200 μl Imidazolpuffer 0,1M], 2 μl Invertase [gesättigte Lösung in 200 μl Puffer 0,1M].

2.5.11.2. Proteinaufschluß und -Bestimmung

Das unlösliche Sediment der ethanolischen Extraktion [2.5.2, S.31] wurde im Schraubdeckelgefäß mit 400 μl 0,1M NaOH versetzt, gevortext und 30 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach dem abkühlen auf RT wurde das Gefäß nochmals gevortext und 5 Minuten bei ca. 16.000g zentrifugiert. Mit dem Roboter wurden vom Überstand 3 μl in Duplikaten auf die Mikrotiterplatte übertragen. Zusätzlich wurde auf die Platte je 3 μl eines BSA Standard in den Konzentrationen 0, 80, 160, 240, 320 und 400 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ [0,1M NaOH] pipettiert. Zu jeder Probe wurden 160 μl einer Verdünnung (20 %, frisch) der Bradfordstammlösung pipettiert. Die Platte wurde geschüttelt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OD_{595} am ELISA-Reader ermittelt. Die Proteinkonzentration errechnet sich aus der Steigung der Eichgeraden. Von der ermittelten OD ist die des Nullwertes der proteinfreien Probe abzuziehen.

2.5.11.3. Stärkeaufschluß und -Bestimmung

Pellet und Überstand des Proteinaufschlusses wurden mit 80 μl HCl/Acetatpuffer [0,5 M HCl, 0,1 M Na-Acetate, pH 4,9 (NaOH)] versetzt und gründlich suspendiert. 200 μl der Suspension wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß aliquotiert. Unmittelbar vor dem Transfer wurde jede Suspension nochmals gründlich suspendiert. Zur Hydrolyse der Stärke wurde jeder Suspension 300 μl Amylasepuffer [500 μl Amyloglucosidase, 5 μl α -Amylase, suspendiert in 25 ml 50 mM Na-Acetatepuffer] zugegeben, das geschlossene Gefäß 10-16 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 16.000g zentrifugiert.

Reaktionspuffer¹²: 15,5 ml HEPES-Puffer [100 mM, MgCl_2 3 mM, pH 7 (KOH)], 480 μl ATP [60 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$], 480 μl NADP [36 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$], 200 μl G6PDH [80 μl Susp. gelöst in 200 μl Puffer].

Aus dem Überstand wurden 10-50 μl zur Glucosebestimmung in Duplikaten auf eine Mikrotiterplatte übertragen, mit 160 μl Reaktionspuffer versetzt und anschließend geschüttelt. Die Kinetik der Reaktion wurde über 1 Stunde mit einer Messung pro Minute bei $\lambda=340$ nm ermittelt. Nach Stabilisierung von ΔOD wurde die Messung gestartet mit 2 μl Hexokinase [120 μl Susp. gelöst in 200 μl Puffer 0,1M].

¹¹Glucose-6-phosphat Dehydrogenase

¹²ausreichend für eine Mikrotiterplatte

2.5.12. Nukleinsäurebestimmung durch HPLC

Das Gewebe wurde wie in Abschnitt 2.5.3 [S.32] aufgeschlossen und extrahiert. Zur Eliminierung eventueller Diethylether Reste wurden 200 µl der neutralisierten TCA Extrakte lyophilisiert und mit 50 µl *Aqua bidest.* aufgenommen und 2 Minuten bei 16.000g zentrifugiert, um nicht lösliche Schwebeteilchen zu sedimentieren. Vom Überstand wurden 40-45 µl in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß ohne Deckel überführt und in den Autosampler (4 °C) platziert.

Als Vorsäule und zur Trennung der Nukleotide wurde jeweils eine Partisil 10 SAX (N(CH₃)₃⁺) Matrix verwendet über die mit einer Flußrate von 1 $\frac{ml}{min}$ und einem nicht linearen Gradienten der Laufpuffer A [10 mM NH₄H₂PO₄ (pH 2,8 / HCl)] und B [700 mM NH₄H₂PO₄, 800 mM NaCl (pH 3,7 / HCl)] getrennt wurde.

Zu Beginn der Messung und nach jeder 5. Probe wurde ein Standard gemessen.

AMP, UMP, GMP	20 µM
ADP, UDP, GDP	50 µM
ATP, UTP, GTP	100 µM
UDP-Glc, ADP-Glc	50 µM

Tabelle 2.5.: Nukleotidstandard für HPLC

2.6. Zellkultur

2.6.1. BY2 Suspensionskultur

Die Zellen wurden in 100 ml Enghals-Erlenmeyerkolben bei 26 °C und Dunkelheit gehalten. Die Umsetzung in neues Medium erfolgte im Abstand von 7 Tagen im Verhältnis 1:10.

2.6.2. Pflanzen in Gewebekultur

Pflanzen wurden auf 0,8 % Phyto-Agar [Agar 8 $\frac{g}{l}$, Murashige & Skoog Salze¹³ 4,409 $\frac{g}{l}$, Saccharose 2% (g/v), pH 6 (KOH)] kultiviert, dem unmittelbar vor dem Gießen 500 $\frac{mg}{l}$ Claforan zugesetzt wurde.

2.6.3. Ballistische Transformation

Alle ballistischen Transformationen wurden durchgeführt an einer PDS 1000 / He (BIO-RAD) Genkanone.

¹³Mikro- und Makroelemente plus Vitamine

2.6.3.1. Vorbereitung der Goldsuspension:

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 60 mg Goldpartikel (0,6 µm BIO-RAD) eingewogen, 1 ml EtOH 70% (v/v) zugegeben und 2 Minuten mit dem Vortexer suspendiert. Die Suspension wurde 5 Minuten im Ultraschallbad bei maximaler Leistung sonifiziert und anschließend kurz (ca. 5 sek.) bei maximaler Drehzahl sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen (Waschvorgang dreimal wiederholt). Das Sediment wurde schließlich in 1 ml sterilem Glycerin 50% (v/v) suspendiert.

2.6.3.2. Beladung der Goldpartikel:

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden nacheinander 50 µl Goldsuspension, 5 µl DNA in TE-Puffer [0,5 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$], 50 µl CaCl₂ [2,5 M] und 20 µl Spermidin¹⁴ [0,1 M] gegeben. Danach wurde die Suspension gevortext, 10 sec bei 8.000 rpm zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen.

Das Sediment wurde in 200 µl EtOH (100%) gut resuspendiert, 5-10 sec bei 8.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Ethanolwäsche wurde noch 3 mal durchgeführt und das letzte Sediment in 45 µl EtOH (100%) resuspendiert.

Die Partikel wurden bis zu ihrem Einsatz auf Eis gehalten.

2.6.3.3. Vorbereitung der Träger und Berstscheiben

Vor der Beladung wurden die Makrocarrier (BIO-RAD) kurz in Ethanol abs. getaucht und an der Luft getrocknet. Je 6 µl der Suspension aus beladenen Goldpartikeln wurden zentral auf den Makrocarrier pipettiert und nach Trocknung mit der Partikelseite nach unten in der Projektionhalterung fixiert. Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Blättern wurde das 1. Einschubfach (v.o.) der PDS 1000/He gewählt.

Berstscheiben (900 psi, BIO-RAD) und Fangnetze wurden ebenfalls in Ethanol abs. getaucht und nach vollständiger Trocknung installiert.

2.6.3.4. Transformation

Der Boden einer Petrischale wurde mit einem Rundfilter ausgelegt und mit M&S Medium¹⁵ ohne Zucker getränkt. Zwei bis vier *Arabidopsis* Blätter¹⁶ von ca. 6-10 mm Länge wurden mit der Blattunterseite nach oben auf das feuchte Filterpapier gelegt und die Schale im 2. Einschub von unten plziert.

¹⁴freie Base

¹⁵alternativ kann auch Wasser verwendet werden

¹⁶etwa 4-5 Wochen nach Aussaat

Die Kammer wurde evakuiert bis zu einem Druck von 27 inch Hg (119,7 mbar) und anschließend der Gasweg für Helium vor die Berstscheibe freigegeben. Bei Erreichen ihres Solldrucks reißt die Scheibe und eine Heliumdruckwelle trifft den Makrocarrier, dessen Goldpartikel dann mit hoher Geschwindigkeit auf das Pflanzengewebe beschleunigt werden. Der verminderte Luftdruck minimiert Reibungseffekte der Goldpartikel bei der Beschleunigung.

Die Petrischale mit dem transformierten Gewebe wurde verschlossen und mit Parafilm gegen Austrocknung geschützt. Die Schalen wurden für mindestens 12, jedoch höchstens 24 Stunden bei 26 °C in Dunkelheit inkubiert und anschließend am CLSM analysiert.

2.7. Mikroskopie

2.7.1. Bestimmung der Zellzahl und Zelldichte in Blattgewebe

Dem 4. Folgeblatt der Knospe wurde mittels Korkbohrer (d=4mm) jeweils an der Spitze der Blattspreite, sowie an deren Basis eine Scheibe entnommen. Die Blattscheiben wurden sofort in Fixierungspuffer überführt und darin 45 min inkubiert. Anschließend werden die Scheiben dreimal mit PBS Puffer gewaschen.

PBS - Puffer		Fixierungspuffer	
NaCl	140 mM	PBS	88% v/v
KCl	2,6 mM	DMSO	10% v/v
Na ₂ HPO ₄	8 mM	Formaldehyd	2% v/v
KH ₂ PO ₄	1,4 mM		
pH 7,2		pH 7,2	

Tabelle 2.6.: Puffer zur Waschung und Fixierung pflanzlicher Präparate für die Mikroskopie.

Zur Aufhellung des Gewebes wurden die Proben über Nacht bei RT in wassergesättigtem Phenol (90%) inkubiert. Neutralisation und Auswaschung des Phenols erfolgte durch dreimalige Behandlung mit 4M KOH Lösung und anschließenden drei Waschschritten mit PBS.

Die Färbung der Zellkerne erfolgte mittels Vakuuminfiltration des Gewebes mit DAPI Lösung (1:100000). Dazu wurde die Vakuumkammer wiederholt (3-4 mal) evakuiert und anschließend wieder schnell belüftet. Zur Verbesserung der Haltbarkeit wurden die fertig gefärbten Präparate in „*mounting solution*“ [DABCO 100 mg/ml, Glycerin 90 % (v/v) in PBS] eingebettet. Die Objektträger wurden bis zur Auswertung vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert.

2.7.2. Confocale Laser Scanning Mikroskopie

Die transformierten und inkubierten Arabidopsis Blätter wurden auf einen Objektträger¹⁷ überführt, mit Wasser benetzt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Suche der positiv transformierten Zellen erfolgte visuell am Fluoreszenzmikroskop. Die Probe wurde mit Transmissionslicht fokussiert und mit dem Kreutztisch die linke obere Ecke des Blattes in das Sichtfeld bewegt. Zur Anregung der Fluoreszenz wurde die Blende der Hg-Lampe möglichst weit geschlossen und der Filter in Stellung #3 (blaue Anregung) gebracht. Das Gewebe wurde zeilenweise bis zur Identifikation der für GFP typischen Fluoreszenz durchmustert. Zellen mit GFP Fluoreszenzsignalen wurden bei höherer Vergrößerung fokussiert, so daß sie einen möglichst großen Anteil des Sichtfeldes ausfüllten. Zum scannen des Objekts wurde der Fluoreszenzverschluß geschlossen, der Filter in die Stellung „SCAN“ gedreht und der Scannerverschluß geöffnet. Die Datenerfassung der Scanserien wurde über die TCS Software (Leica) gesteuert.

2.8. Digitale Bildverarbeitung

Die Aufnahme, Erfassung und Verarbeitung von Bildinformationen mit digitalen Mitteln stellt ein wichtiges Hilfsmittel in der Bearbeitung vieler Einzelparameter dar. Die rechnergestützte Automatisierung immer gleicher Vorgänge mit hoher Präzision ersetzt die oft mühevollen und weniger genauen Messungen mit Lineal, Waage und Handauszählung. Das Verfahren hierzu wurde am Botanischen Institut der Universität Heidelberg entwickelt (Schmundt *et al.*, 1998) und erweitert (Walter, 2001). Grundlage bildet die Entwicklerumgebung Heurisko (Aeon). Mit Hilfe von Skripten, sog. „Workspaces“, kann der Anwender mit der Hardware kommunizieren und grafische Operationen an den gewonnenen Daten ausführen.

2.8.1. Bestimmung der Blattflächen

Blätter, deren Fläche zu bestimmen war, wurden auf einem Flachbettscanner mit einer Auflösung von 300 dpi¹⁸ und 1 Bit Farbtiefe¹⁹ gescannt. Die Farbtiefe ist ein Maß für die Anzahl der möglichen annehmbaren Farbwerte. Mit n Bit lassen sich 2^n verschiedene Farbwerte darstellen.

Das resultierende Bild wurde im TIFF Format abgespeichert und von der Bildverarbeitungssoftware analysiert. Mit dem Workspace „leafarea“ wird das Bild eingelesen, angezeigt und durch anklicken der gesuchten Bereiche, deren Fläche in einem Logfile festgehalten. Auf diese Weise wurden sowohl die Einzelflächen, als auch die Summe der Flächen berechnet. Der

¹⁷sofern diese noch nicht mit DABCO eingebettet waren

¹⁸*dots per inch* = Bildpunkte pro Zoll

¹⁹Der Farbwert kann bei einem Bit Farbtiefe zwei Zustände annehmen; schwarz oder weiss

Workspace läßt sich auf beliebige Bildauflösungen eichen. Sinnvoll erscheinen jedoch nur solche zwischen 75 und 300 dpi. Durch weitere Steigerung der Auflösung läßt sich kein Informationsgewinn erzielen.

Der Workspace erwartet schwarze Flächen auf weissem Hintergrund. Sollte aufgrund systemspezifischer Unterschiede in der Belegung der Farbpalette die Bits für schwarz und weiss vertauscht sein, erledigt eine Erweiterung zur Invertierung²⁰ die Umkehr der Farbwerte.

2.8.2. Bestimmung der Zelldichte

Die Ermittlung der Anzahl Zellen pro Flächensegment in einer bestimmten Region eines Blattes gestaltet sich mit herkömmlichen Methoden schwierig, da die Zellen vielschichtig und nicht regelmäßig im Gewebe angeordnet sind. Ein Indikator der sich in jeder Zelle markieren läßt ist der Zellkern. Er kommt in jeder Zelle genau einmal vor und die darin enthaltenen Nukleinsäuren lassen sich mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. DAPI) markieren. Die manuelle Auszählung der markierten Kerne wird jedoch erschwert durch die Tatsache, daß beim Fokussieren durch ein Gewebe nicht nur die Kerne im Fokus erfaßt werden, sondern auch jene die sich darüber oder darunter befinden.

Der Workspace „Zellsegmentierung3D“²¹ löst das Problem durch Integration und Vergleich der Helligkeitsintensitäten der Kerne. Dazu werden die digitalen Bilder einer Fokusserie durch ein Gewebe miteinander verglichen. Eine zunehmende Intensität bedeutet, daß sich der Fokus auf den Kern zubewegt, während eine abnehmende Intensität auf eine Entfernung vom Fokus hindeutet. Auf diese Weise kann sicher gestellt werden, daß ein Kern nicht versehentlich doppelt gezählt wird.

2.8.2.1. Datenaquisition

Mit einer CCD Kamera wurden Bilderserien direkt am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und automatisch mit fortlaufenden Dateinamen versehen. Die Kommunikation zwischen Kamera und Rechner übernahm ein Heurisko-Workspace. Lediglich die schrittweise Fokussierung und das Auslösen der Kamera wurde manuell betätigt. Zur Vermeidung von Fehlern durch Unschärfe wurde jede Probe durch wenden des Objektträgers aus zwei Richtungen aufgenommen und das Ergebnis gemittelt. Die Bildserien wurden gespeichert und konnten zu späterem Zeitpunkt mit dem Workspace „Zellsegmentierung3D“ ausgewertet werden.

²⁰Norbert Kirchgessner, IWR Universität Heidelberg

²¹Tobias Dierig, IWR Universität Heidelberg

2.9. Statistische Auswertung

2.9.1. Arithmetisches Mittel & Standardabweichung

Alle in Schaubildern und Tabellen aufgeführten Werte wurden aus einer Menge von n Messwerten durch das arithmetrische Mittel \bar{x} [Gleichung 2.1] berechnet.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.1)$$

Eine Fehlerbetrachtung erfolgte mit Hilfe der Standardabweichung \bar{s} [Gleichung 2.2].

$$\bar{s} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.2)$$

2.9.2. Beurteilung der Signifikanz

Die Mittelwerte zweier Gruppen von Messwerten (A,B) werden als *signifikant verschieden* betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit **P** kleiner oder gleich 5% ist. Ausgangshypothese ist dabei: $\bar{x}_A \neq \bar{x}_B$. Die Berechnung von P erfolgt mit dem ungepaarten²² Student'schen t-Test nach *William Sealey Gosset* (1876-1937).

²²Beide Wertegruppen entspringen nicht einer gemeinsamen Ursprungsgruppe

3. ERGEBNISSE

3.1. Klonierung pflanzlicher Dihydroorotase

Ein Schritt in Richtung Verständnis der pflanzlichen Pyrimidinsynthese ist die Aufklärung der molekularen Aspekte. Es war das Ziel, die DNA-Sequenz (*pyrC*) der pflanzlichen Dihydroorotase zu bestimmen. Dies sollte durch heterologe Komplementation von *E.coli* Mutanten bewerkstelligt werden.

Die pyrimidinauxotrophe Mutante *E.coli* CS101-2U5 ist ein *pyrC-Knockout*. Durch Transformation mit cDNA Banken aus *Arabidopsis thaliana* (Uni-ZAP XR vector, *whole plant*, Stratagene) und *Solanum tuberosum* (cv. Desireé, *sink leaf*; 10 Wochen alt; Gewächshaus), sollten komplementierte Klone auf M9-Minimalmedium selektioniert werden.

Die cDNA der Banken wurde ungerichtet *EcoRI/EcoRI* (Kartoffel) bzw. gerichtet *EcoRI/XhoI* (*Arabidopsis*) in den Vektor pBluescript SK ligiert. Dieser verleiht Ampicillinresistenz und stellt die cDNA unter Kontrolle des *lacZ* Promotors, welcher die Induktion mit IPTG ermöglicht.

3.1.1. Klon St5 kodiert das aktive Protein DHOase aus Kartoffel

Die Transformation der *Solanum tuberosum* cDNA-Bank erfolgte in acht Ansätzen zu je 500 ng cDNA mittels Elektroporation. Vor dem Ausstreichen auf M9 Selektionsmedium [2.3.1.2, S.25] wurden die Zellen mit M9 Medium gewaschen, um das Transformationsmedium auszutauschen. Nach zwei Tagen Inkubation bei 37 °C konnten insgesamt 36 Kolonien selektiert werden. Nach Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse wurden repräsentativ für alle vorkommenden Restriktionsmuster sechs Plasmide zur Retransformation in CS101-2U5 ausgewählt. Damit sollte die Richtigkeit der ausgewählten Plasmide verifiziert werden.

Nach Transformation und Inkubation auf Selektionsmedium M9 war bei vier der sechs Ansätze Koloniebildung zu beobachten. Eine erneute Restriktionsanalyse zeigte, daß sich darunter mindestens zwei identische Plasmide befanden und somit Plasmid-DNA Präparationen dreier unterschiedlicher Klone zur Sequenzanalyse gegeben

werden konnten.

Laut Ergebnis der Sequenzierung waren die drei untersuchten Plasmide identisch, so daß das Plasmid No.5 mit der cDNA St5 für alle weiteren Arbeiten ausgewählt wurde. Die Aktivität des Enzyms konnte durch Retransformation in CS101-2U5 bestätigt werden. Die DNA-Sequenz umfaßt 1271 bp, die vom mutmaßlichen Start bis zum Stopcodon 346 Aminosäuren kodiert. Auf DNA Ebene besteht 52,6% Homologie zu *E.coli* (EMBL Acc. X04469, Bäckström *et al.* (1986)), 35,6% zu *Homo sapiens* (EMBL Acc. M38561, Davidson *et al.* (1990)) und 68,9% zu *Arabidopsis thaliana* (EMBL Acc. AF000146, Zhou *et al.* (1997)). Die übersetzte Aminosäure-Sequenz zeigte 70,3% Homologie zur Dihydroorotase in *E.coli*, 42,4% zu *Homo sapiens* und 88,4% zu *Arabidopsis thaliana*.

3.1.2. Klon At11 kodiert das aktive Protein DHOase aus *A.thaliana*

Analog zur Verfahrensweise, geschildert unter 3.1.1, wurde die *E.coli* Mutante CS101-2U5 mit cDNA aus *Arabidopsis thaliana* komplementiert. Es konnten 20 Klone auf M9 Medium selektiert werden, mit insgesamt zwei unterschiedlichen Restriktionsmustern der Plasmid-DNA. Stellvertretend für diese beiden Typen wurden zwei Plasmide zur Retransformation ausgewählt. Beide zeigten deutliche Koloniebildung auf Selektionsmedium und wurden daraufhin zur Sequenzanalyse ausgewählt.

Beide cDNA-Sequenzen in den untersuchten Plasmiden kodieren für aktive DHOase und sind in der Peptidsequenz identisch, jedoch von unterschiedlicher Länge in der 3'-UTR. Das mit 1203 bp längere Stück und der Bezeichnung At11 kodiert vom mutmaßlichen Start bis zum Stopcodon für 345 Aminosäuren. Es ist identisch mit der Sequenz AF000146, aber N-terminal verkürzt.

3.2. Enzymatischer Nachweis der DHOase-Aktivität

Im Hinblick auf die Charakterisierung von Pflanzen mit veränderter DHOase-Expression, aber auch zur generellen Messung der DHOase in Pflanzen sollte ein nichtraadioaktiver Enzymassay zur Bestimmung der Orotaseaktivität entwickelt werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Erstens die direkte Messung der Absorptionsänderung des gebildeten Orotats [3.2.1, S.47], oder zweitens die fluorimetrische Detektion von H₂O₂ als Teil einer gekoppelten enzymatischen Reaktion [3.2.3, S.50].

3.2.1. Änderung der Absorption durch Entstehung von Orotat

Dihydroorotase katalysiert die Kondensation von Carbamoyl-Aspartat (CAsp) zu Dihydroorotat (DHO) [Abb.1.2, S.2]. Im Folgeschritt wird durch DHODH die gesättigte Ringstruktur von Dihydroorotat zu Orotat oxidiert [Abb.1.3, S.3]. Das Absorptionsmaximum von Orotat liegt bei $\lambda=280$ nm ($\epsilon=6,7 \cdot 10^3$ M⁻¹ cm⁻¹).

Die für pflanzliche Dihydroorotase kodierenden Konstrukte At11 und St5 (beide in pBluescript SK) wurden in *E.coli* CS101-2U5¹ transformiert. Zur Kontrolle wurde CS101-2U5 mit einem leeren pBluescript Vektor transformiert. Positive Klone mit den DHOase Konstrukten wurden jeweils bei 37°C über Nacht in M9-Minimalmedium mit Methionin [20 mg/l], Ampicillin [100 mg/l] und IPTG [2 mM] angezogen. Der Kontrolle wurde zusätzlich noch Orotat [500 µM] zugegeben. Die Bakterien wurden zentrifugiert, mit M9-Medium gewaschen, zweifach in Enzym-Extraktionspuffer konzentriert und sonifiziert. Die Messung der Aktivität erfolgte bei Raumtemperatur. Die Proteinmenge wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

CS101-2U5 mit Plasmid	Orotat-Bildung [mOD·min ⁻¹ ·µg ⁻¹]
St5	0,049 ± 0,001
At11	0,035 ± 0,004
pBluescript	0,009 ± 0,000

Tabelle 3.1.: Direkter Nachweis der DHOase-Aktivität durch spektroskopische Messung des gebildeten Orotats bei 280 nm. Änderung der Absorption pro Minute, bezogen auf die Gesamt-Proteinmenge im Extrakt. Die Messung erfolgte bei 30°C. Kontrolle: leerer pBluescript-Vektor in CS101-2U5.

Es ist ein deutlicher Unterschied in der Aktivität der beiden DHOase-Konstrukte und der Kontrolle mit dem leeren pBluescript Vektor zu erkennen.

Eine Messung der DHOase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten mittels direkter Bestimmung des entstehenden Orotats durch Messung der Absorptionsänderung war nicht möglich. Zahlreiche Substanzen mit phenolischem Charakter störten die Messung bei 280 nm erheblich, so daß eine Detektion der ohnehin schwachen Signale ausgeschlossen war.

Die für den Assay notwendige Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) mußte käuflich erworben werden (Sigma). Es handelte sich dabei jedoch um ungereinigten Rohextrakt aus *Clostridium roticum*. Die Einstellung der Produktion durch den einzigen Anbieter verlangte nach der Erschließung einer neuen Quelle für DHODH.

¹*E.coli* pyrC Knockout Mutante

3.2.2. Klonierung, Überexpression und Isolation von DHODH aus *E.coli* als Hilfsmittel zum DHOase Aktivitäts-Assay

Mit Hilfe der Oligonukleotide ECpyrD-fw und ECpyrD-rv [A.2, S.125] wurde durch PCR (*Pfu* Polymerase) das *pyrD* Gen, welches für DHODH kodiert, aus *E.coli* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über eine Säulenmatrix gereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) und mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Bsp*LU111 verdaut.

Der Vektor pQE60 wurde *Bam*HI/*Nco*I verdaut und mit dem *Bam*HI/*Bsp*LU111 *pyrD* Fragment ligiert². Das Ligationsprodukt (ECD1) wurde in *E.coli* XL10 Gold vermehrt und nach erfolgreicher Kontrolle in *E.coli* M15 [pREP4] zur Expression transformiert.

3.2.2.1. Expression

Extrakte von 20 der positiv transformierten Klone wurden am ELISA-Reader auf ihre DHODH Aktivität überprüft. Die *E.coli* M15 Kulturen mit dem ECpyrD Expressionskonstrukt **ECD1** wurde wie beschrieben in Abschnitt 2.5.9 [S.36] angezogen und aufgeschlossen. Der Nachweis beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalses MTT durch die DHODH, wodurch sich ein

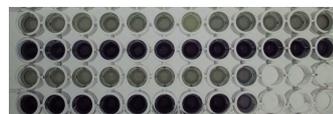


Abbildung 3.1.: Mikrotiterplatte mit MTT Farbreaktion. Messung der DHODH Aktivität. (vgl. Tab. 3.2, S.48)

blaues Formazan Produkt bildet. Dazu wurden zu 20 μ l Extrakt 50 μ l H₂O und 100 μ l Tricin/KOH-Puffer [100 mM pH 8 mit PMS 2 mM, MTT 1 mM, TritonX-100 0,5% (v/v)] gegeben. Die Änderung der Absorption bei 570 nm wurde alle 30 Sekunden gemes-

Klon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
mOD/s	-6,2 108,3	-3,0 67,5	-2,1 73,2	-4,0 79,2	-2,6 64,5	-3,2 72,0	-0,2 87,8	-3,4 84,0	-4,2 89,9	-3,2 93,3	-3,1 100,3	-2,4 98,1
Klon	13	14	15	16	17	18	19	20	Kontr.			
mOD/s	-5,6 110,1	-4,3 93,5	-3,2 101,6	-4,9 96,1	-4,2 112,8	-3,9 87,8	-3,4 87,8	-3,1 96,1	-7,2 2,5			

Tabelle 3.2.: Belegung der Mikroreaktionskammern (*wells*) mit relativer Aktivität der DHODH. Als Kontrolle diente eine nicht transformierte *E.coli*-Kultur. Die jeweils obere Zeile zeigt den Extrakt mit MTT, jedoch ohne Zugabe von Substrat.

sen bis sich Δv stabilisierte. Zur Kontrolle wurden alle Proben als Duplikate auf die Mikrotiterplatte gebracht und nur in einer der Proben die Reaktion durch Zugabe von 2 μ l Dihydroorotat [100 mM] gestartet. Zur Verdeutlichung, welchen Anteil die eigene,

²*Nco*I und *Bsp*LU111 produzieren einen kompatiblen Basenüberhang.

chromosomal kodierte DHODH von *E.coli* an der Gesamtreaktion hat, wurde eine nicht transformierte Kultur des gleichen Stammes als Kontrolle aufgetragen.

Prinzipiell zeigten alle 20 Klone eine gute DHODH Expression [Abb. 3.1 und Tab. 3.2, S.48], die mindestens um den Faktor 25 über der der *E.coli* eigenen Expression lag. Daher wurde Klon 1 für die quantitative Produktion von DHODH ausgewählt. Das Enzym wurde wie in Abschnitt 2.5.8 [S.35] beschrieben isoliert. Tabelle 3.3 zeigt die Aktivitäten der eluierten Fraktionen in [mOD/min].

Fraktion	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	RohEx.
Aktivität [mOD/min]	14,4	957,2	1520,6	550,8	193,4	89,6	39,2	787,4

Tabelle 3.3.: DHODH Aktivität der eluierten Fraktionen nach Passage der Ni-NTA Matrix.

3.2.2.2. Änderung der Aktivität nach Schockfrostung

Jeder der eluierten Fraktionen wurde ein Aliquot entnommen, in N₂ (l) schockgefrostet, auf Eis aufgetaut und zur vergleichenden Aktivitätskontrolle mit nicht gefrorenen Fraktionen eingesetzt. Die Proben wurden jeweils in Duplikaten auf die Mikrotiterplatte gebracht. Tabelle 3.4 zeigt, daß das einmalige Einfrieren und anschließende Auftauen

Fraktion	[mOD / min]							
	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	RohEx.
Kontr. _{frisch}	1,8	1,8	1,8	1,0	0,7	0,4	1,4	4,5
Kontr. _{gefroren}	1,4	1,6	1,8	1,5	0,9	-0,3	1,9	3,1
frisch	14,4	957,2	1520,6	550,8	193,4	89,6	39,2	787,4
gefroren	17,6	1005,8	1458,6	615,0	177,2	75,4		636,6
frisch	12,6	955,4	1518,8	549,8	192,7	89,2	37,8	782,9
gefroren	16,2	1004,2	1456,8	613,5	176,3	75,7		633,5

Tabelle 3.4.: Vergleich der gefrosteten mit den frischen Eluaten. Die Kontrolle zeigt das Ergebnis der Messung ohne Zusatz von Substrat. Zur Abschätzung der Meßgenauigkeit wurden alle Proben als Duplikate aufgetragen.

keine signifikante Beeinträchtigung der Enzymaktivität mit sich bringt. Anhand der Ergebnisse wurden die Fraktionen mit der höchsten Aktivität E4, E5 und E6 vereinigt, in Portionen à 100 µl aliquotiert, in N₂ (l) gefrostet und bei -80°C gelagert. Somit konnten die Frost-Tau Zyklen beim Gebrauch der Enzymlösung auf ein Minimum reduziert werden.

3.2.3. Fluorimetrische Detektion

Versuche mit Proben aus Wildtyp-Kartoffelpflanzen und pyrCAntisense Transformanten zeigten, daß die oben beschriebene Meßmethode nicht sensitiv genug ist, um die offensichtlich geringen DHOase-Aktivitäten in pflanzlichem Gewebe zuverlässig zu messen. Eine Aktivität war im Wildtypen prinzipiell messbar, jedoch hatten Störfaktoren einen zu großen Einfluß auf die Ergebnisse, so daß diese nicht zuverlässig quantifiziert werden konnten.

Unter Verwendung der gereinigten und hochaktiven DHODH konnte ein indirekter DHOase-Assay konzipiert werden. Das Substrat Carbamoyl-Aspartat wird von der DHOase zu Dihydroorotat umgesetzt. DHODH oxidiert das von der DHOase gebildete Dihydroorotat zu Orotat unter Freisetzung von H_2O_2 . Der Nachweis beruht auf der durch Peroxidase katalysierten Oxidation von AmplexRed (Molecular Probes) durch H_2O_2 zum Fluoreszenzfarbstoff Resorufin. Bei dieser Reaktion ist das stöchiometri-

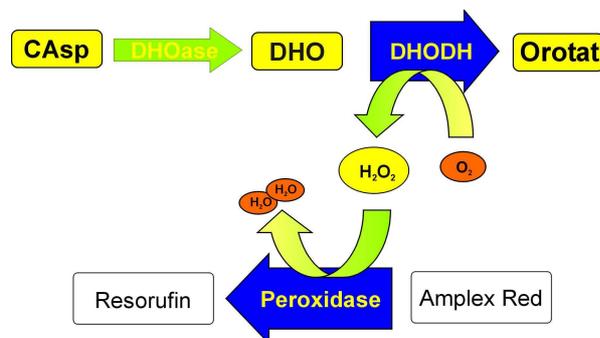


Abbildung 3.2.: Funktionsprinzip des fluorimetrischen DHOase-Assays: DHOase vollzieht den Ringschluß von Carbamoyl-Aspartat (CAsp) zu Dihydroorotat (DHO). Dihydroorotat Dehydrogenase (DHODH) oxidiert DHO zu Orotat unter Bildung von H_2O_2 . Peroxidase wandelt AmplexRed unter Verbrauch von H_2O_2 in den fluoreszenten Farbstoff Resorufin um. Anregung bei 560 nm führt zur Fluoreszenz bei 590 nm. Blau markierte Enzyme werden im Überschuß zugegeben.

sche Verhältnis von verbrauchtem Carbamoyl-Aspartat zu gebildetem Resorufin 1:1. Die gemessene molare Zunahme an Resorufin entspricht also dem molaren Umsatz von CAsp zu DHO [Abb. 3.2]. Das Fluorimeter wurde auf 2 nmol (= 100%) Resorufin pro Küvettenvolumen³ [$1 \frac{nmol}{ml}$] geeicht. Die gemessene Fluoreszenz wurde in Prozent des Eichwertes angegeben. Damit das Substrat CAsp und die Hilfsenzyme DHODH und Peroxidase nicht limitierend wirken, wurden diese der Reaktion im Überschuß zugelegt.

³Volumen der Fluorimeter-Küvette: 2 ml

3.3. Charakterisierung der pflanzlichen Dihydroorotase

3.3.1. Aktivität der DHOase aus *S.tuberosum* läßt sich in *E.coli* bestimmen

Die *pyrC Knockout*-Mutante CS101-2U5 wurde mit St5 in pBluescript SK transformiert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,63 angezogen. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:5 (g/v) in Extraktionspuffer sonifiziert. Das Fehlen der *E.coli* eigenen DHOase dieser Mutante stellt sicher, daß nur die Charakteristika der pflanzlichen DHOase gemessen werden. Der Assay wurde wie in Abschnitt 2.5.10.2 [S.37] beschrieben durchgeführt. Zur Ver-

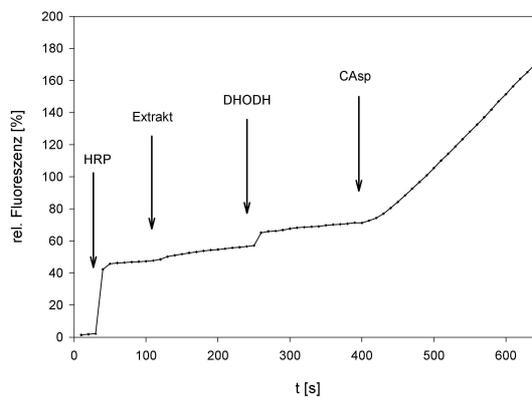


Abbildung 3.3.: Zeitlicher Verlauf des fluorimetrischen DHOase Assays. Pfeile deuten auf Zugabezeitpunkte. **HRP:** *Horseradish Peroxidase*; **Extrakt:** Sonifizierter *E.coli* Extrakt der *pyrC Knockout* Mutante CS101-2U5 mit DHOase aus Kartoffel (St5 in pBluescript); **DHODH:** gereinigte Enzympräparation; **CAasp:** Start des Assays durch Zugabe von Carbamoyl-Aspartat. Angabe in relativer Fluoreszenz bezüglich Eichwert (100%).

deutlichung der Auswirkung jeder zugegebenen Komponente wurde in Abb. 3.3 mit der Aufzeichnung früher begonnen. Erst nach Zugabe des CAasp ist eine deutliche und konstante Zunahme der Fluoreszenz meßbar.

3.3.2. Abhängigkeit der DHOase aus *S.tuberosum* vom pH Wert

Der DHOase Aktivitäts-Assay wurde mit unterschiedlichen Puffern bei pH Werten von 5 bis 9 durchgeführt. Werden alle sonstigen Parameter konstant gehalten, läßt sich so der für pflanzliche DHOase optimale pH Bereich bestimmen. Zur Vermeidung verminderter Aktivität aufgrund nicht optimaler pH Werte für DHODH und Peroxidase wurden diese Enzyme dem Ansatz in hohem Überschuß zugegeben.

Pro Assay wurden 20 μl Extrakt von CS101-2U5 mit St5 eingesetzt [Extraktion 1:5 (g/v), entspricht 4 mg Bakterien-Frischgewicht]. Die Regressionskurve durch alle Werte entspricht einer Gauß Funktion mit einem Aktivitätsmaximum beim empirisch ermittelten pH Optimum. Abb. 3.4 zeigt, daß DHOase aus *S.tuberosum* ein pH-Optimum zwischen 6,5 und 7 hat.

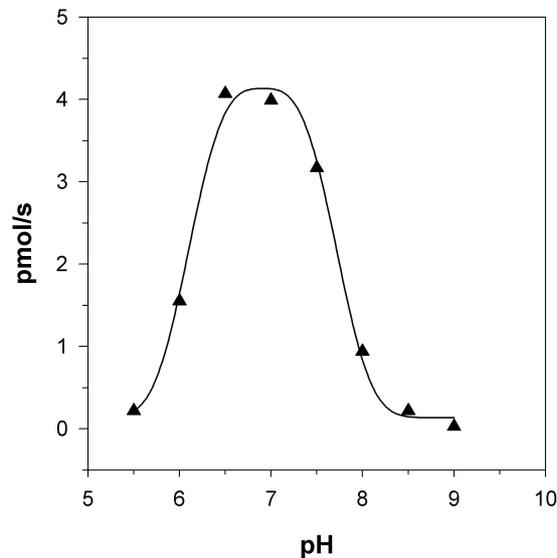


Abbildung 3.4.: Qualitative Analyse der Abhängigkeit der Kartoffel-DHOase vom pH-Wert. Regressionskurve nach Gauß. Alle Messungen wurden mit 20 μl Bakterienextrakt [CS101-2U5 mit St5; Extraktion 1:5 (g/v)] durchgeführt. Pufferbereich pH 5-6: MES/KOH; Pufferbereich pH 6,5-7,5: HEPES/KOH; Pufferbereich pH 8-9: Tricin/KOH. Pufferkonzentration jeweils 50 mM.

3.3.3. Enzymkinetik pflanzlicher Dihydroorotase

Zur Bestimmung der Kinetik pflanzlicher DHOase wurde der Assay bei 25°C, konstantem pH 6,8 [50 mM HEPES, 5 mM MgCl_2 , 5 μM Zn^{2+}] und variablen Substratkonzentrationen durchgeführt. Wie in den zuvor beschriebenen Versuchen wurden je 20 μl Bakterienextrakt aus CS101-2U5 mit St5 in pBluescript [Extraktion 1:5 (g/v), entspricht 4 mg Bakterien-Frischgewicht] eingesetzt. Die Hilfsenzyme Peroxidase und DHODH wurden im Überschuß eingesetzt.

3.3.3.1. Bestimmung von v_{\max}

In mehreren Ansätzen wurde die Reaktionsgeschwindigkeit $[v]$ in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[S]$ ermittelt. Die Kinetik der Reaktion ist in Abb. 3.5(a) [S.54] dargestellt. Die Interpolation von v_{\max} aus den Kinetikdaten der Reaktion durch nichtlineare Regression ist meist schwierig und ungenau. Man bedient sich daher der doppelt reziproken Regression nach Lineweaver & Burk (1934) [Abb. 3.5(b), S.54].

Nach Michaelis & Menten (1913) ist die Geschwindigkeit v einer Reaktion definiert durch Gleichung 3.1.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (3.1)$$

Die doppelt reziproke Form der Gleichung 3.1 beschreibt die lineare Funktion in Abb. 3.5(b). Die Steigung m ist definiert durch $\frac{K_m}{v_{\max}}$. Die Maximalgeschwindigkeit v_{\max} ergibt sich aus dem reziproken y-Achsenabschnitt.

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} &= \frac{[S] + K_m}{v_{\max} \cdot [S]} \\ &= \frac{K_m}{v_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{v_{\max} \cdot [S]} \\ &= \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \end{aligned} \quad (3.2)$$

Ausgehend von Gleichung 3.2 sind in Tabelle 3.5 die Werte für v_{\max} , sowie die Steigung und das Bestimmtheitsmaß R^2 der Regressionsgeraden wiedergegeben.

Steigung	=	0,077	
$1/v_{\max}$	=	0,105	[s/pmol]
v_{\max}	=	9,480	[pmol/s]
R^2	=	0,9997	

Tabelle 3.5.: Ergebnis der Berechnung von v_{\max} der *S.tuberosum* DHOase. R^2 : Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden.

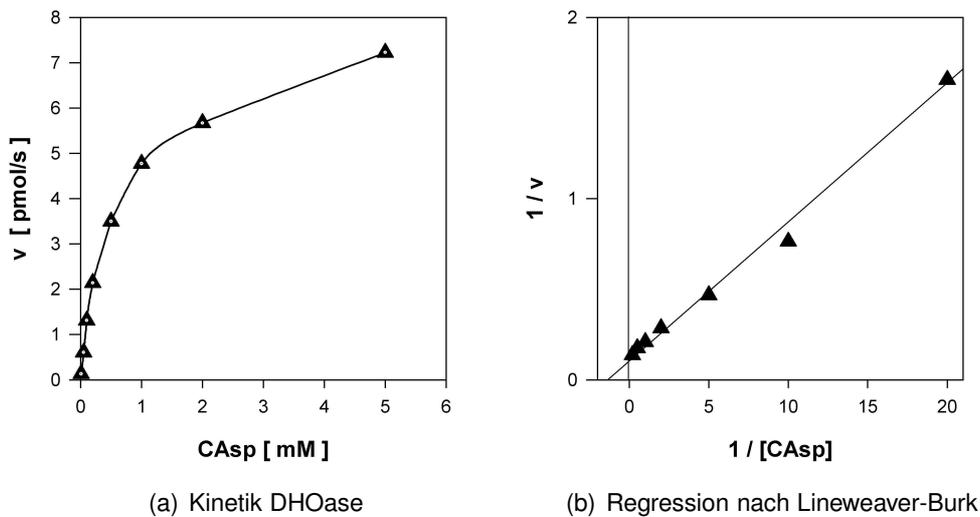


Abbildung 3.5.: Fluorimetrische Detektion der Enzymkinetik der DHOase aus *S.tuberosum* bei konstant 25°C und pH 6,8. Konstrukt St5 in pBluescript wurde in CS101-2U5 exprimiert. **(a):** Substratkonzentration aufgetragen gegen Reaktionsgeschwindigkeit $v[\frac{\text{pmol}}{\text{s}}]$. **(b):** Doppelt reziproke Regression nach *Lineweaver-Burk* (Ausschnitt). Letzter Wert $\frac{1}{v} = f(100)$ ist nicht dargestellt, geht jedoch in die Berechnung ein.

3.3.3.2. Michaelis-Menten Konstante

Die Michaelis-Menten Konstante K_m einer Reaktion bezeichnet die Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit v die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit v_{max} annimmt. Für $[CAsp] = K_m$ gilt also $v = \frac{1}{2}v_{max}$.

Nach Lineweaver & Burk (1934) [Gleichung 3.2] errechnet sich K_m aus der Steigung m und der Maximalgeschwindigkeit v_{max} .

$$m = \frac{K_m}{v_{max}} \Leftrightarrow K_m = m \cdot v_{max} \quad (3.3)$$

Im Falle der DHOase aus *S.tuberosum* ergibt sich ein K_m Wert von 0,73 mM.

3.3.3.3. Mögliche allosterische Effekte

Zur qualitativen Überprüfung, ob Folgeprodukte der Pyrimidin *de novo* Synthese oder andere Nukleotide einen Effekt auf die Reaktion haben, wurde dem Assay [10 mM CAsp, pH 6,8] nach Einstellen einer konstanten Reaktionsgeschwindigkeit 0,2 mM UMP, 0,5 mM Uridin und 0,5 mM AMP zugegeben. Es konnte in keinem der Ansätze eine Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit v registriert werden.

3.3.4. Aktivität der DHOase aus *S.tuberosum* läßt sich in pflanzlichem Gewebe bestimmen.

Die Übertragung des Assays auf pflanzliche Extrakte gestaltete sich aufgrund zahlreicher Pflanzeninhaltsstoffe schwierig. Reduktionsmittel wie DTT schützen zwar den Extrakt vor unkontrollierbaren oxidativen Prozessen, sie wirken sich jedoch negativ auf die Reaktion aus. Die DTT-Menge mußte daher so gewählt werden, daß der Schutz des Extraktes gewährleistet war, aber die DTT-Konzentration bei der Messung einen kritischen Wert nicht überschritt. Zu diesem Zweck wurde der Extrakt vor der Messung 1:10 mit Assaypuffer verdünnt.

Sink Blätter von Kartoffel Wildtyp wurden wie in Abschnitt 2.5.10.1 [S.37] beschrieben extrahiert, verdünnt und 10 µl davon zur Analyse eingesetzt. Das Ergebnis des ersten qualitativen Aktivitäts-Assays ist in Tabelle 3.6 [S.55] dargestellt.

Tabelle 3.6.: DHOase-Aktivität in pflanzlichem *sink*-Gewebe (Kartoffel Wildtyp). Der Wert ist umgerechnet auf mg Frischgewicht.

Aktivität [nmol·s ⁻¹ ·mg ⁻¹]	
WT Desireé	2,8

Der Wildtyp zeigt schwache, aber dennoch gut meßbare DHOase-Aktivität. Hierbei handelte es sich um Einzelmessungen, da hier nur die prinzipielle Durchführbarkeit des Assays mit pflanzlichen Extrakten gezeigt werden sollte.

3.4. Subzelluläre Lokalisation

3.4.1. Die Sequenz von St5 zeigt keine typischen Targetmuster

Die Sequenz des Kartoffel-Klons St5, des Arabidopsis-Klons At11 und die Sequenz des von Zhou *et al.* (1997) klonierten Arabidopsis-Klons wurde auf mögliche plastidäre Transitsequenzen untersucht. Alle durchgeführten Musterkennungsalgorithmen (vgl. Tabelle 1.2, S.13) identifizierten keine der drei Sequenzen als plastidär.

	1				50
St5	akMELSITQP	DDWHLHLRDG
At11ekvktra	vrMELTITQP	DDWHLHLRDG
AthZhou	MIKTLVSPYS	GFGSQKLKFD	RSSEKVKTRA	VRMELTITQP	DDWHLHLRDG

Abbildung 3.6.: Vergleich der C-Termini unterschiedlicher DHOase Translationen, beginnend mit dem ersten ATG; **AthZhou:** Translation der Arabidopsis Sequenz (EMBL:AF000146) von Zhou *et al.* (1997); **St5** (EMBL:AX093580) und **At11:** Translation der beiden cDNA Klone. Ab dem ersten ATG werden die Aminosäuren in großen Lettern dargestellt.

Die Sequenz des Arabidopsis-Klons At11 ist auf der Ebene der Aminosäuren identisch mit der von Zhou *et al.* (1997) gefundenen Sequenz. Obwohl die Sequenz „AthZhou“ im 5'-Bereich länger ist als die von At11 und St5 [vgl. Abb. 3.6], war es fraglich, ob diese dem vollständigen mRNA Transkript entspricht und ob es dort Abweichungen in der AS Sequenz zwischen *Arabidopsis* und Kartoffel gibt. Zur Klärung mußte die vollständige Sequenz des Transkripts im 5'-Bereich ermittelt werden.

3.4.1.1. Vollständige 5'-Sequenz der Kartoffel DHOase

Mit Hilfe der RACE⁴ Technik konnte die vollständige Sequenz des Transkripts am 5'-Ende der Kartoffel-DHOase ermittelt werden. Die besondere Konzeption des *GeneRacer* Protokolls stellt sicher, daß nur ungekürzte mRNA in voller Länge amplifiziert wird (Invitrogen, 2000).

Sechs unterschiedliche PCR-Produkte wurden sequenziert und auf Homologie im amplifizierten Bereich untersucht. Vier der sechs Sequenzierungsprodukte konnten erfolgreich ausgewertet werden und sind auf DNA-Ebene identisch. Es wurden 264 Basenpaare vor dem ursprünglich angenommenen St5 Startcodon identifiziert mit einem möglichen Transkriptionsstart 90 Basen vor dem bekannten ATG. Die Translation

⁴*Rapid amplification of cDNA ends*

der DNA-Sequenz im Leseraster von St5 ergab somit weitere 30 Aminosäuren vor dem ursprünglichen Startmethionin von St5.

1	>	50	
St5xl	.MRTLFS	PK ISHIPVV	SFG RKRS.LKIYS AKMELSITQP DDWHLHLRDG
AthZhou	MIKTLVSPYS	GFGSQKLF	RSSEKVKTRA VRMELTITQP DDWHLHLRDG

Abbildung 3.7.: Der C-terminal um 30 AS verlängerte Kartoffel-Klon St5xl im Vergleich mit „AthZhou“. Translatierte Sequenz ab dem ersten ATG dargestellt (komplette Sequenz ab AS 51 nicht dargestellt). Die ursprünglich als Translationsstart angenommene Position ist mit $\boxed{\triangleright}$ markiert. Abweichungen durch zusätzliche AS in einer Sequenz sind der Übersichtlichkeit wegen durch Punkte ausgeglichen.

Der Sequenzvergleich auf Proteinebene mit der von Zhou *et al.* (1997) identifizierte Sequenz zeigt nur minimale Übereinstimmung mit der verlängerten St5-Sequenz (St5xl) am N-Terminus. Dies ändert sich drastisch ab dem zweiten (ursprünglich identifizierten) Methionin.

Das Ergebnis einer computergestützten Analyse der N-terminalen Peptidsequenz von St5xl im Vergleich zu AthZhou ist in Abb. 3.7 [S.57] dargestellt.

Algor.	Zuverlässigkeits-Faktor (St5xl)					Zuverlässigkeits-Faktor (AthZhou)				
	Mito.	Plastid	Nucl.	Sekret.	Ergebnis	Mito.	Plastid	Nucl.	Sekret.	Ergebnis
SignalP	-	-	-	-	kein Sign.	-	-	-	-	kein Sign.
TargetP	0,560	0,130	-	0,050	Mito.	0,221	0,19	-	0,068	-
ChloroP	-	0,453	-	-	negativ	-	0,46	-	-	negativ
PCLR	-	0,115	-	-	negativ	-	0,022	-	-	negativ
PSORT	0,478	0,253(thy) 0,552(stro)	0,910	-	-	0,1	0,1	0,76	-	-
Mitoprot	0,9129	-	-	-	-	0,3538	-	-	-	-
Predotar	0,824	0,006	-	-	Mito.	0,971	0,001	-	-	Mito.

Tabelle 3.7.: Lokalisationsvorhersage St5 mit Peptidsequenz translatiert aus RACE-PCR und Peptidsequenz AthZhou von Zhou *et al.* (1997). Beide Sequenzen wurden von erstem M bis zum Stop an die Datenbanken geschickt. Die ausgegebenen Werte bezeichnen keine Wahrscheinlichkeit, sondern einen Zuverlässigkeitsfaktor (vgl. Beschreibung im WWW; Tab.: 1.2, S.13).

Der Algorithmus SignalP erkannte in keiner der beiden Sequenzen ein Muster, welches auf ein Signalpeptid hindeuten könnte. TargetP meldete einen leichten Hinweis auf ein mitochondriales Targetsignal der St5xl-Sequenz, nicht jedoch der AthZhou-Sequenz. Die auf Plastiden spezialisierten Algorithmen ChloroP und PCLR konnten in keiner der beiden Sequenzen plastidäre Muster erkennen. PSORT dagegen fand Anhaltspunkte für nukleäre Lokalisationssignale, kam jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis. Der auf Mitochondrien spezialisierte Mitoprot-Algorithmus fand keine entsprechenden Signale.

Predotar, der plastidäre und mitochondriale Targetsequenzen erkennen soll, schloß in beiden Fällen eine plastidäre Lokalisation aus und zog eine mitochondriale Lokalisation in Erwägung.

Fünf der sieben Algorithmen kamen zu keinem Ergebnis in Bezug auf eine Targetsequenz. Nur in zwei Fällen wurde für St5xl und einem für AthZhou ein tendenziell mitochondriales Signal erkannt. Somit ließ sich aus den Ergebnissen der Signalerkennungsalgorithmen keine fundierte Aussage zur Lokalisation ableiten. Zuverlässigere Hinweise wurden daher durch Beobachtungen *in vivo* gesucht.

3.4.2. Herstellung zweier DHOase:GFP-Fusionsproteine

Zur Lokalisierung des Enzyms DHOase *in vivo* wurden GFP-Fusionen erstellt. Diese ermöglichen eine Detektion der Fusionsproteine *in vivo*. Dazu sollten zwei unterschiedliche Strategien zum Zuge kommen: Die Fusion der möglichen Targetsequenz mit GFP im gleichen Leseraster und die Fusion der vollständigen DHOase mit GFP. Beide Konstrukte sollen das GFP C-terminal tragen.

In beiden Konstrukten kam das verbesserte EGFP aus dem Vektor pEGFP-C1 (Clontech, Acc# U55763) zum Einsatz. Dieses wurde mit Hilfe der modifizierten Oligonukleotide EGFP-fw und EGFP-rv [Tabelle A.2, S.125] mittels PCR (Pfu Polymerase) aus dem Vektor isoliert. Durch die modifizierten Oligonukleotide verfügt das Produkt über eine *XbaI* Schnittstelle am 5'-Ende und eine *SalI* Schnittstelle am 3'-Ende. Es wurde ein Stopcodon (TGA) hinter der letzten im Wildtyp-GFP vorkommenden AS integriert. Damit umfaßt das modifizierte EGFP 239 Aminosäuren.

Das EGFP (*XbaI/SalI*) Fragment wurde in einen pUC18 Vektor ligiert, dessen MCS durch die (*EcoRI/HindIII*) Kasette des Vektors pBinAR (Höfgen & Willmitzer, 1992) ersetzt wurde. Der modifizierte pUC18 Vektor wird fortan mit **pUC18/244** bezeichnet. Das Konstrukt in Abbildung 3.8 [S.59] wurde zur Klonierung beider Fusionsproteine eingesetzt.

3.4.2.1. Putative DHOase Transitsequenz fusioniert mit GFP

Durch RACE-PCR wurden 267 bp vor dem ursprünglich angenommenen Transkriptionsstart von St5 ermittelt, mit einem ATG 90 bp vor dem ATG des St5 Klons. Die 90 Basenpaare werden fortan als **ini** bezeichnet. Das Fragment **ini** wurde durch PCR (Pfu Polymerase) aus dem RACE Klon mit den Oligonukleotiden St5ini-fw und St5ini-rv [Tab. A.2, S.125] amplifiziert. Die beiden Oligonukleotide sind so konzipiert, daß

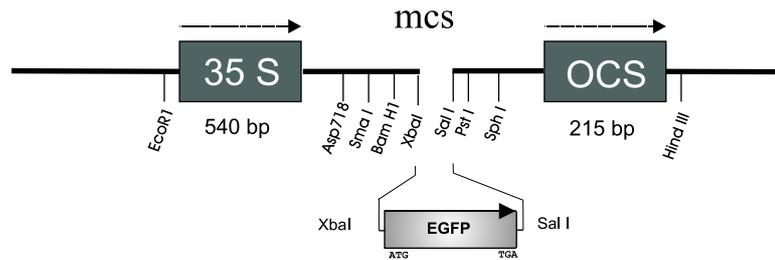


Abbildung 3.8.: Orientierung von EGFP (*XbaI/SalI*) in Vektor pUC18 mit der (*EcoRI/HindIII*) Kasette aus pBinAR (Höfgen & Willmitzer, 1992).

am 5'-Ende des PCR-Produktes eine *BamHI* Schnittstelle und am 3'-Ende eine *SacI* und *XbaI* Schnittstelle entsteht. Am 3'-Ende werden die ersten 14 Basen des St5 Klon übernommen und danach die *XbaI* Stelle angefügt. Die daraus resultierenden 30 AS wurden als mögliche Transitsequenz vor das EGFP-Protein fusioniert. Dazu wurden die 90 bp *BamHI/XbaI* im gleichen Leseraster vor die EGFP Sequenz im Vektor pUC18/244 [Abb. 3.8] ligiert. Das Konstrukt iniEGFP im Vektor pUC18/244 trägt fortan die Bezeichnung STCG1. Das Insert iniEGFP umfaßt von *BamHI* bis *SalI* 837 Basenpaare und 276 AS von ATG bis TGA [Abb. 3.9].

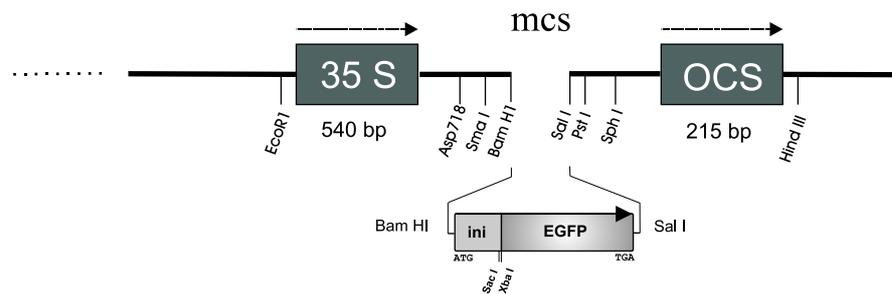


Abbildung 3.9.: STCG1: Mögliche 5'-Targetregion (ini) von *pyrC* aus *S.tuberosum*, gekoppelt mit EGFP im Vektor pUC18/244.

3.4.2.2. Vollständige St5-Sequenz fusioniert mit GFP

Zunächst wurde die *pyrC*-Sequenz des Klons St5 (pBluescript SK) mit der ini-Sequenz des Klons1 der RACE-PCR (pCR 4Blunt-TOPO) fusioniert. Klon1 und St5 haben eine gemeinsame Überlappungssequenz mit einer *SacI* Restriktionsstelle. Das *SacI/NotI* geschnittene St5-Fragment aus dem Vektor pBluescript SK wurde in den Vektor pCR4-Blunt-TOPO subkloniert [Abb. 3.10, S.60].

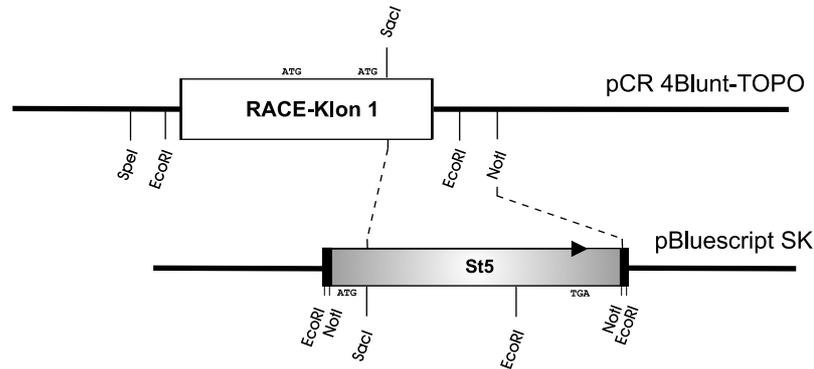


Abbildung 3.10.: Subklonierung und Fusion von St5 *SacI/NotI* in pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) mit der möglichen Targetsequenz ini im Klon1 der RACE-PCR.

Durch PCR mit den Oligonukleotiden St5ini-fw und St5xl-rv konnte das Konstrukt St5xl aus dem Vektor amplifiziert werden. Die Oligonukleotide sind derart konzipiert, daß am 5'-Ende eine *BamHI* Schnittstelle und am 3'-Ende eine *XbaI* Schnittstelle eingefügt wird. Dies ermöglichte die Fusion mit EGFP im Vektor pUC18/244 [Abb. 3.11 S.60].

Somit stehen zwei EGFP-Fusionen zur Verfügung. Die putative Targetsequenz (*ini*) fusioniert mit EGFP im Vektor pUC18/244 (STCG1) [Abb. 3.9 S. 59] und die komplette Sequenz aus *ini* + **St5** (St5xl) fusioniert mit EGFP im Vektor pUC18/244 (STCG2) [Abb. 3.11 S. 60].

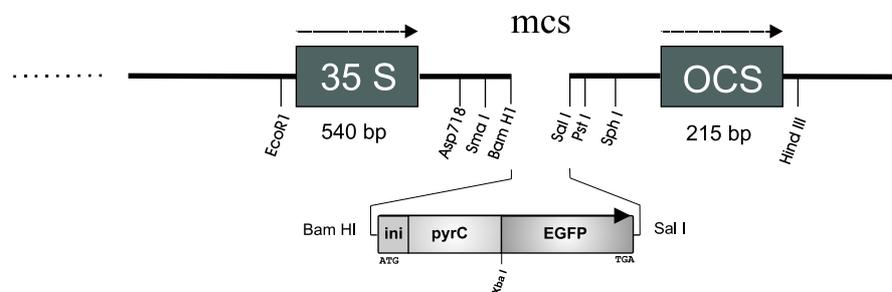


Abbildung 3.11.: STCG2: Volle Länge pyrC inklusive möglicher 5'-Targetregion (*ini*) aus *S.tuberosum* gekoppelt mit EGFP im Vektor pUC18/244.

3.4.3. Transiente Expression der GFP-Fusionen durch ballistische Transformation

Die EGFP-Fusionskonstrukte aus Sektion 3.4.2 verfügen über den starken Promoter CaMV 35S des Blumenkohlmosaikvirus (Franck *et al.*, 1980), der eine gute Expression in allen pflanzlichen Geweben ermöglicht und außerdem das Polyadenylierungssignal (OCS) des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen *et al.*, 1984) enthält.

Mittels ballistischer Transformation wurden beide Konstrukte zur transienten Expression in Blätter von *Arabidopsis thaliana* (Columbia 0) transformiert. Die Detektion der Genexpression erfolgte 20 Stunden nach Transformation mittels CLSM.

3.4.3.1. Kontrolleexperimente

Zur Deutung der Ergebnisse aus der Lokalisationsanalyse müssen Konstrukte herangezogen werden, deren Lokalisation bekannt ist.

ER: Das Konstrukt **KDEL-GFP** (Scott *et al.*, 1999) enthält mGFP5 mit dem H(K)DEL ER-Retentionssignal im pUCAP⁵ Vektor unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors [Abb. 3.12].

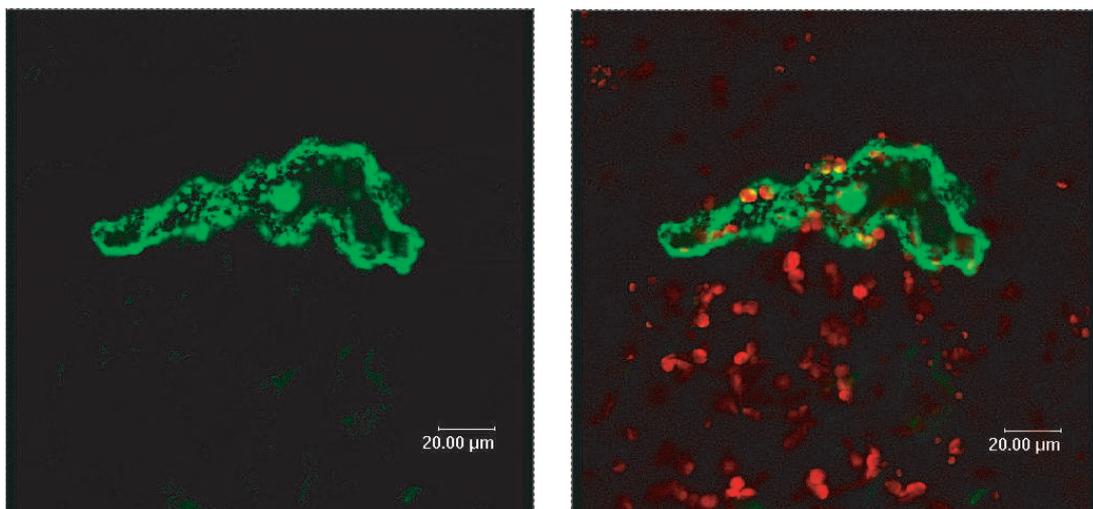


Abbildung 3.12.: Kontrollplasmid KDEL-GFP in einer *Arabidopsis thaliana* Epidermiszelle. Rechts: Gleiche Aufnahme mit Chlorophyllfluoreszenz. Beide Aufnahmen entstanden aus der Projektion einer Z-Serie.

⁵ein Derivat des pUC19 Vektors

Mitochondrium: Das Konstrukt **pre-101** enthält die Targetsequenz der β -Untereinheit (pre- β) der mitochondrialen ATPase aus *Nicotiana plumbaginifolia* vor GFP (S65-T) im Vektor pRT101 (pUC18/19 Derivat) [Abb. 3.13, S.63].

Cytosol: Das Konstrukt **pA7-GFP** enthält GFP (S65-T) im Vektor pA7 (pUC19 Derivat) [Abb. 3.14, S.63].

Chloroplasten: Die Visualisierung der Plastiden erfolgte mit Hilfe der leicht erkennbaren roten Chlorophyllfluoreszenz bei 690 nm und 740 nm in grünem Gewebe.

3.4.3.2. Expression der GFP-Fusionsproteine in *Arabidopsis thaliana*

Die Plasmide STCG1 [Abb. 3.9, S.59] und STCG2 [Abb. 3.11, S.60] wurden unter gleichen Bedingungen in *A.thaliana* Epidermiszellen transformiert wie die Kontrollplasmide KDEL-GFP, pre101 und pA7-GFP.

Transformierte Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop gesucht und anschließend davon Z-Serien am CLSM aufgenommen. Mit Hilfe mathematischer Projektion der Z-Serie kann eine pseudo-3D Ansicht der Zelle generiert werden.

In den Abbildungen 3.15 [S.64], 3.16 [S.64] und 3.17 [S.65] ist deutlich zu erkennen, daß die GFP-Fluoreszenz nicht im Bereich der Plastiden liegt (rote Chlorophyllfluoreszenz, jeweils rechte Aufnahme). Darüber hinaus zeigt Abbildung 3.16 die mit DAPI markierten Zellkerne (blau). Die DAPI-Fluoreszenz deckt sich nicht mit der GFP-Fluoreszenz. Vergleicht man die mit STCG1 und STCG2 transformierten Zellen in Abb. 3.15, 3.16 und 3.17 mit den Kontrolltransformationen KDEL-GFP [Abb. 3.12, S.61], pre-101 [Abb. 3.13, S.63] und pA7-GFP [Abb. 3.14, S.63], so fällt eine große Ähnlichkeit mit dem cytosolischen Kontrollkonstrukt pA7-GFP auf. In Mitochondrien lokalisierte GFP-Produkte zeichnen sich durch sehr viele kleine Punkte aus, die vorwiegend entlang der Zellmembran aufgereiht erscheinen [Abb. 3.13, S.63]. Dies trifft auf die STCG1 und STCG2 Transformationen nicht zu. Das Signal des Kontrollkonstruktes KDEL-GFP zeigt nur mäßige Ähnlichkeit zu den STCG Signalen.

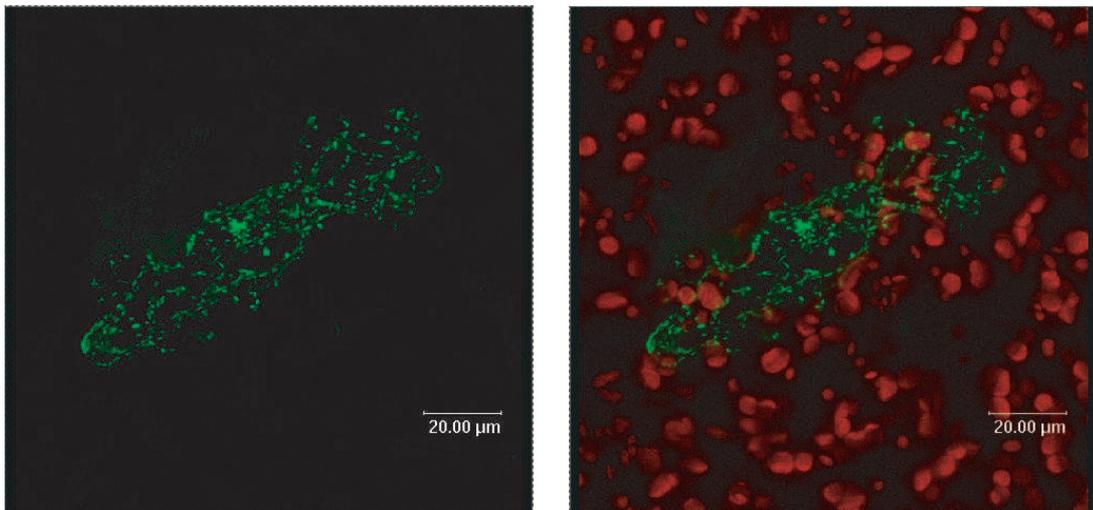


Abbildung 3.13.: Kontrollplasmid pre101 in einer *Arabidopsis thaliana* Epidermiszelle. Rechts: Gleiche Aufnahme mit Chlorophyllfluoreszenz. Beide Aufnahmen entstanden aus der Projektion einer Z-Serie.

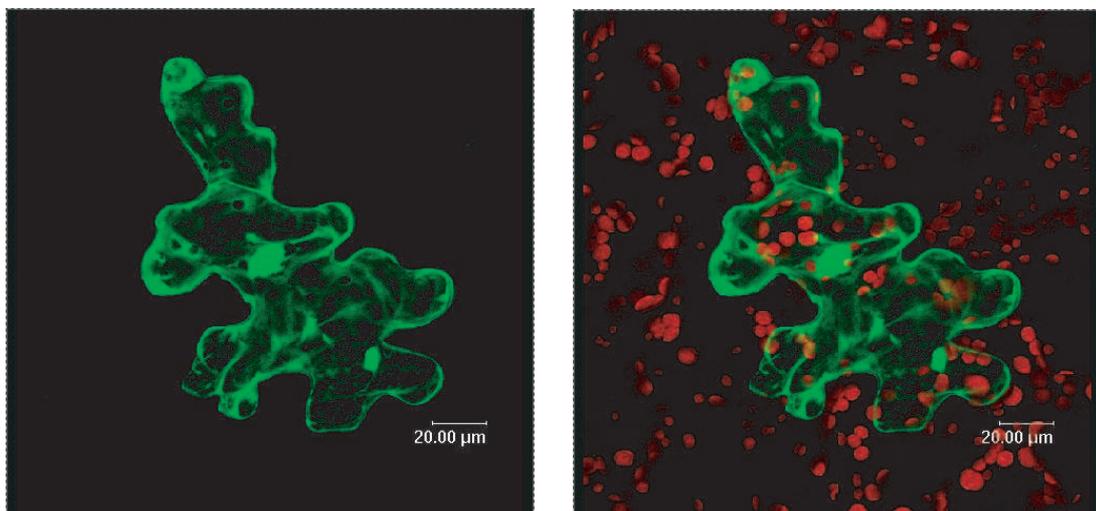


Abbildung 3.14.: Kontrollplasmid pA7Bi35S-GFP in einer *Arabidopsis thaliana* Epidermiszelle. Rechts: Gleiche Aufnahme mit Chlorophyllfluoreszenz. Beide Aufnahmen entstanden aus der Projektion einer Z-Serie.

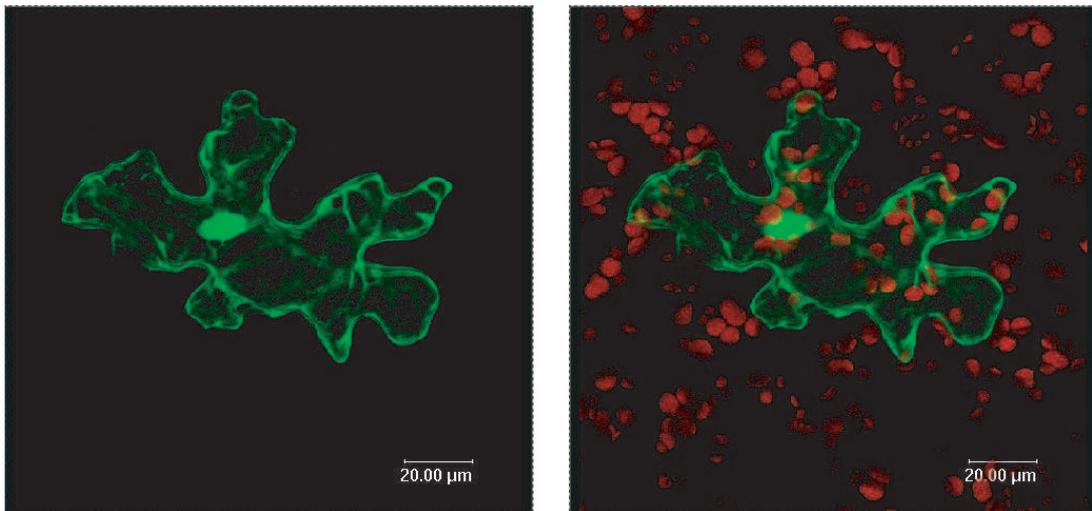


Abbildung 3.15.: GFP Fluoreszenz einer *Arabidopsis thaliana* Epidermiszelle nach Transformation mit Plasmid STCG1. Rechts: Gleiche Aufnahme mit Chlorophyllfluoreszenz. Beide Aufnahmen entstanden aus der Projektion einer Z-Serie.

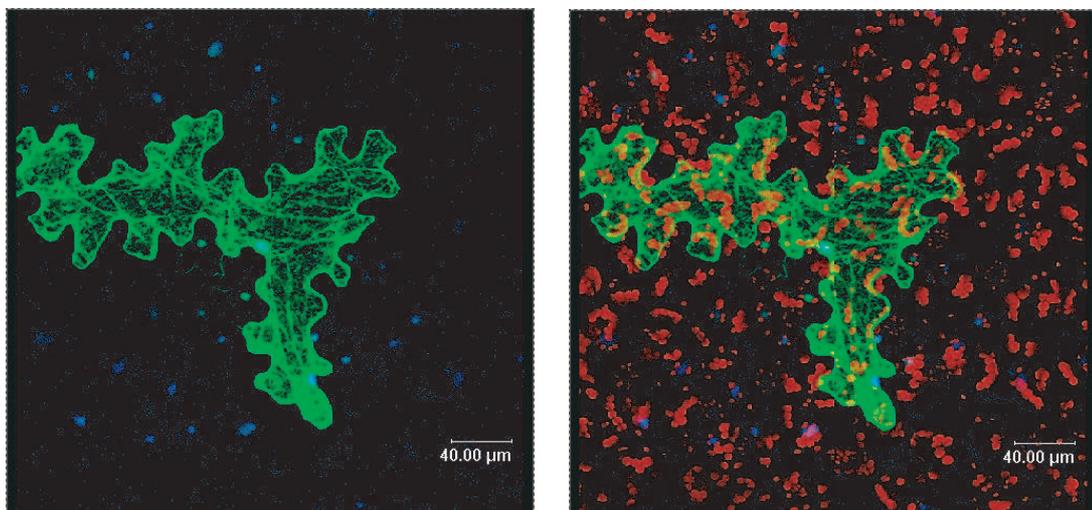


Abbildung 3.16.: GFP-Fluoreszenz (grün) einer *Arabidopsis thaliana* Epidermiszelle nach Transformation mit Plasmid STCG1. Markierung der Nukleinsäuren mit DAPI (blau). Rechts: Gleiche Aufnahme mit Chlorophyllfluoreszenz (rot). Beide Aufnahmen entstanden aus der Projektion einer Z-Serie.

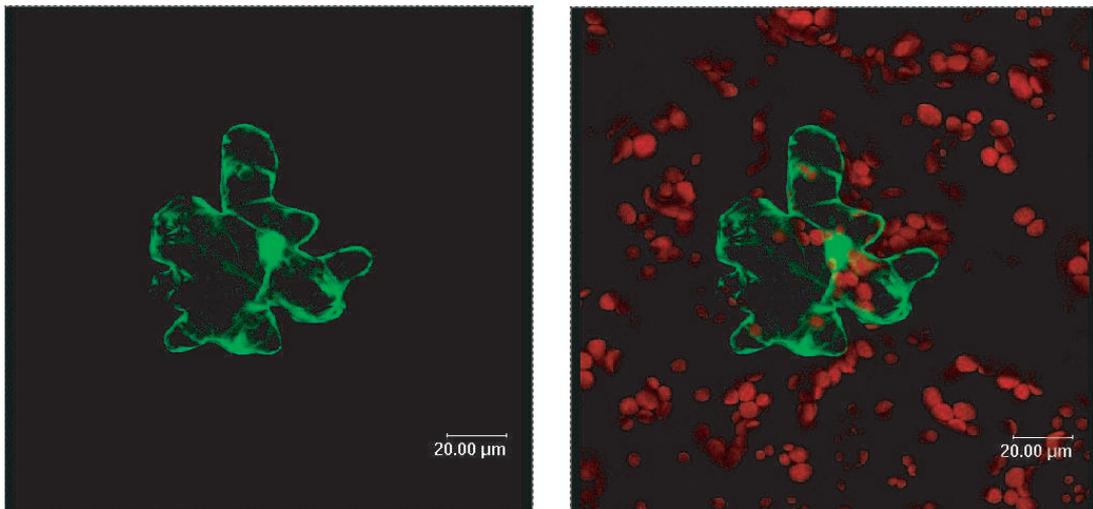


Abbildung 3.17.: GFP-Fluoreszenz (grün) einer *Arabidopsis thaliana* Epidermiszelle nach Transformation mit Plasmid STCG2. Rechts: Gleiche Aufnahme mit Chlorophyllfluoreszenz (rot). Beide Aufnahmen entstanden aus der Projektion einer Z-Serie. Im linken Bild sind deutlich mehrere Ausbuchtungen im GFP-Signal zu erkennen, verursacht durch Chloroplasten. Im rechten Bild kann man an den entsprechenden Stellen Chloroplasten mit roter Chlorophyllfluoreszenz erkennen.

3.5. Transgene Pflanzen mit reduzierter DHOase-Expression

Eine wirksame Methode zur abgestuften Reduktion der Genexpression ist die Herstellung von *Antisense*-Transformanten [vgl. Abschnitt 1.4.2, S.17].

3.5.1. Transformation von *S.tuberosum* mit St5 Antisense-DNA

Zur Herstellung transgener Pflanzen mit reduzierter DHOase-Expression wurde die für DHOase codierende *pyrC*-Sequenz aus Kartoffel (*St5*) in *antisense*-Orientierung in den binären Vektor pBinAR (Höfgen & Willmitzer, 1992) ligiert.

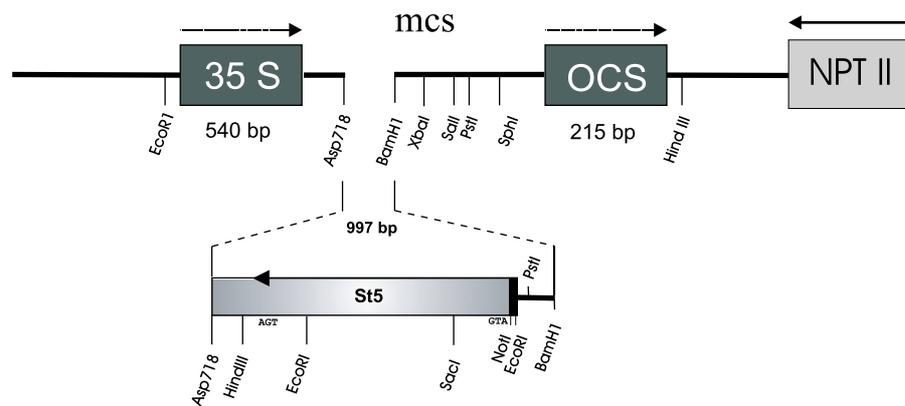


Abbildung 3.18.: DHOase-Klon *St5* in *antisense*-Orientierung im Vektor pBinAR unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. **OCS:** Polyadenylierungssignal der Octopine Synthase aus pTiACH5 (Gielen *et al.*, 1984). **NPT II:** Neomycin Phosphotransferase (vermittelt Kanamycin-Resistenz). Ligation *Asp718/BamHI* mit partieller MCS von pBluescript SK und *EcoRI-NotI* Linker der cDNA-Bank am 3'-Ende (bzw. 5'-Ende bezüglich *St5* in *sense*-Orientierung).

Die Transformation der Kartoffelpflanzen (cv. Solara) mittels *Agrobacterium tumefaciens* wurden am IPK Gatersleben⁶ durchgeführt. Positive Transformanten konnten durch Selektion auf Kanamycin-Resistenz isoliert werden, welche durch das *nptII*-Gen auf pBinAR vermittelt wird. Es wurden 42 kanamycin-resistente Pflanzen mit der Bezeichnung **ROSa** auf ihre DHOase-Expression untersucht.

⁶Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben; www.ipk-gatersleben.de

3.5.2. Transformierte Pflanzen zeigen unterschiedlich starke Reduktion im DHOase-Gehalt.

Zur Detektion der Kartoffel-DHOase wurde ein Peptidantikörper (Kaninchen anti DHOase) gegen die exponierte Sequenz 245-LGTD⁵SAPHDRRRKEC verwendet, der über die C-terminale SH-Gruppe an das Protein KLH⁷ gekoppelt ist.

Stellvertretend für verschiedene Abstufung des DHOase-Gehaltes wurden nach einer ersten Durchmusterung aus den 42 Transformanten exemplarisch die sechs Pflanzen ROSa 3, 9, 19, 20, 34 und 40 ausgewählt und einer eingehenderen Analyse unterzogen. Zur besseren Überschaubarkeit wurde die Zahl der Transformanten auf vier reduziert und alle folgenden Experimente an ROSa 19, 20, 34 und 40 durchgeführt.

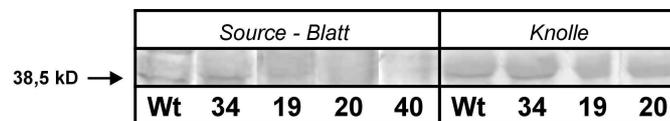


Abbildung 3.19.: Westernblot-Analyse der St5 *Antisense*-Transformanten und des Wildtyps. Immunologische Detektion von Dihydroorotase in *Source*-Blättern und Knollen mit Kartoffel-DHOase Peptidantikörper. Farbpräzipitat durch alkalische Phosphatase.

⁷ *Keyhole Limpet Hemocyanin* aus *Megathura crenulata* (Gastropoda, Prosobranchia)

3.5.3. Verminderter DHOase-Gehalt beeinflusst das Wachstum.

Einige der ausgewählten Transformanten wurden von Sterilkultur auf Erdkultur überführt, um eventuelle phänotypische Merkmale in Größe, Biomasse, Wurzelwachstum, Blattfläche oder Zelldichte zu erkennen.

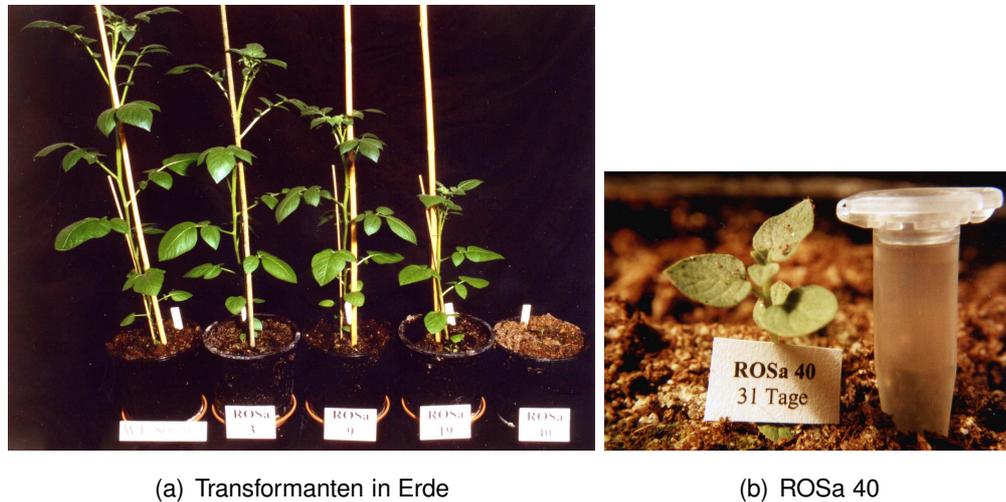


Abbildung 3.20.: (a) Kartoffeltransformanten **ROSa** mit St5 Antisense, 31 Tage nach Überführung in Erdkultur. v.l.n.r: Wildtyp Solara, ROSa3, ROSa9, ROSa19, ROSa40. (b) Detailaufnahme des rechten Kulturgefäßes aus Abb.(a).

In Sterilkultur zeigt keine der Transformanten ein auffällig verändertes Wachstumsverhalten der Sproßachse. Jedoch schon wenige Tage nach Überführung der Setzlinge in Erde oder Sandkultur zeigen sich deutliche Wachstumsunterschiede [Abb. 3.20]. Besonders das Wurzelwachstum ist beeinträchtigt [Abb. 3.21], indem sich die Wurzeln im Gegensatz zum Wildtyp deutlich weniger oder überhaupt nicht weiterentwickeln. Besonders deutlich tritt der Unterschied bei ROSa40 zu Tage, deren Wachstum zum Erliegen kommt. Abbildung 3.20(b) zeigt eine vergrößerte Aufnahme einer 31 Tage alten Pflanze.

Abbildung 3.21.: Transformante ROSa 40 nach der Entnahme aus Gewebekultur. Die Wurzel ausläufer sind nur rudimentär zu erkennen.



3.5.3.1. Beeinflussung des Wurzelwachstums

Zur detaillierten Untersuchung des Wurzelwachstums wurden ROSa Pflanzen und Wildtypen auf vertikale Agarplatten (M&S, 2% Saccharose) kultiviert, deren Unterseite sich in einem abgedunkelten Kasten befand. Die Anzahl der Wurzelstränge je Pflanze und deren Zuwachs wurde täglich erfaßt und die Meßpunkte mit Folienschreiber auf der Rückseite der Platte markiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.22 [S. 69] dargestellt.

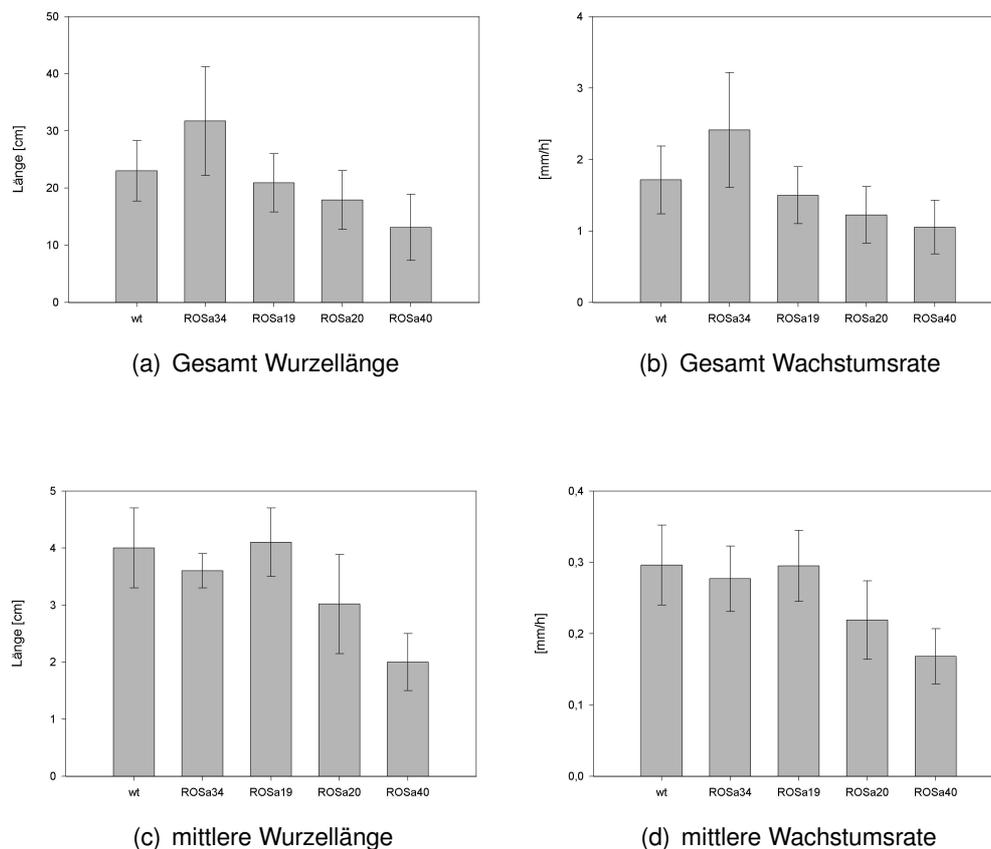


Abbildung 3.22.: Wurzelwachstum der Transformanten ROSa 19, 20, 34 und 40 in Relation zum Wildtyp (wt). Anzucht auf vertikalen Agarplatten (1% M&S-Agar mit 2% Saccharose) mit abgedunkelter Wurzelzone. Sechs Replikate je Transformante und Wildtyp. Alle Werte gemittelt über alle Replikate. Lichtperiode: 12h bei 80-100 μ Es, 20°C, 60% rel. Luftfeuchte.

(a) Gesamtwurzellänge je Pflanze (b) Wachstumsrate je Pflanze (c) mittl. Länge der Wurzelaufläufer (d) mittl. Wachstumsrate der Wurzelaufläufer.

Abbildung 3.22 zeigt, daß das Wurzelwachstum mit abnehmender Expression von pflanzeneigener DHOase reduziert ist. Wurzellänge und Wachstumsrate nehmen ab.

Dies wird besonders deutlich bei der Transformante ROSa 19, die nur geringe Reduktion der DHOase-Expression aufweist, bis hin zu den Transformanten ROSa 20 und ROSa 40, die stark bzw. sehr stark in der DHOase-Expression reduziert sind. Die mit dem Wildtyp vergleichbare Transformante ROSa 34 bricht aus diesem Schema etwas aus, indem sie die Wachstumsrate und die Wurzellänge des Wildtyps sogar übertrifft.

3.5.3.2. Beeinflussung der Biomasse

Gleichgroße und gleichalte Wildtyp- und ROSa-Stecklinge wurden aus Sterilkultur (1% M&S-Agar mit 2% Saccharose) auf Sandboden übersetzt und mit 6N-Ara Lösung [2.2, S.24] ernährt. Nach 19 Tagen wurden Frisch- und Trockengewicht der Wurzel und des Sprosses bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.23 [S.70] dargestellt.

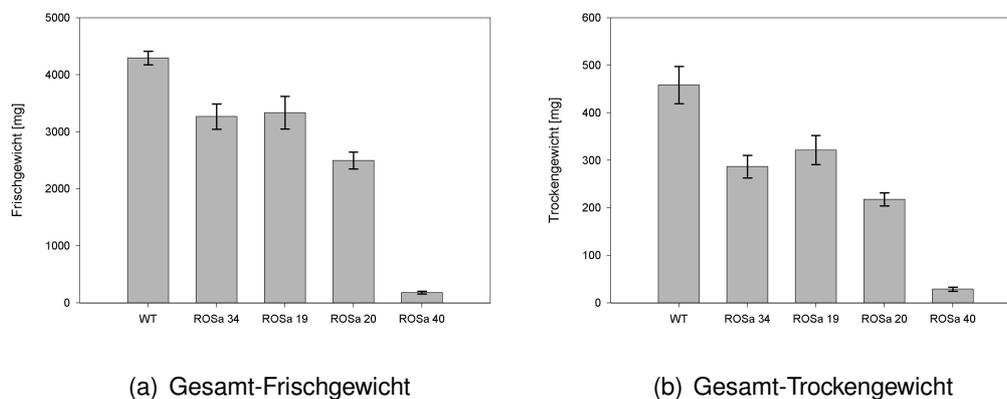


Abbildung 3.23.: Mittleres Frischgewicht und Trockengewicht der ROSa-Transformanten und des Wildtyps. Alter: 19 Tage. Nach dem Transfer auf Sand Ernährung mit Medium 6N-Ara [6 mM NO_3^-]. 14 Stunden Lichtperiode bei 80-100 μEs . (a): Mittleres Gesamt-Frischgewicht mit Standardabweichung (n=8). (b): Mittleres Gesamttrockengewicht mit Standardabweichung (n=8).

Vergleichbar mit den Ergebnissen des Wurzelwachstums zeigt sich auch hier, daß mit abnehmender DHOase-Expression das Wachstum, und somit Frisch- und Trockengewicht, sinkt.

Ein schlechtes Sproßwachstum kann durch ein schlechtes Wurzelwachstum begründet sein. Daher wurde von jeder Pflanze das Sproß zu Wurzel Verhältnis bestimmt und über alle Replikate gemittelt. Eine Betrachtung der Sproß:Wurzel Relationen in Bezug auf Frisch- und Trockengewicht findet sich in Abb. 3.24 [S.71]. Der Sproß:Wurzel Quotient der Trockengewichts Analyse bleibt bis hin zur stark vermin-

derten DHOase-Expression (ROSa 20) konstant, steigt bei sehr stark verminderter DHOase-Expression (ROSa 40) jedoch deutlich an.

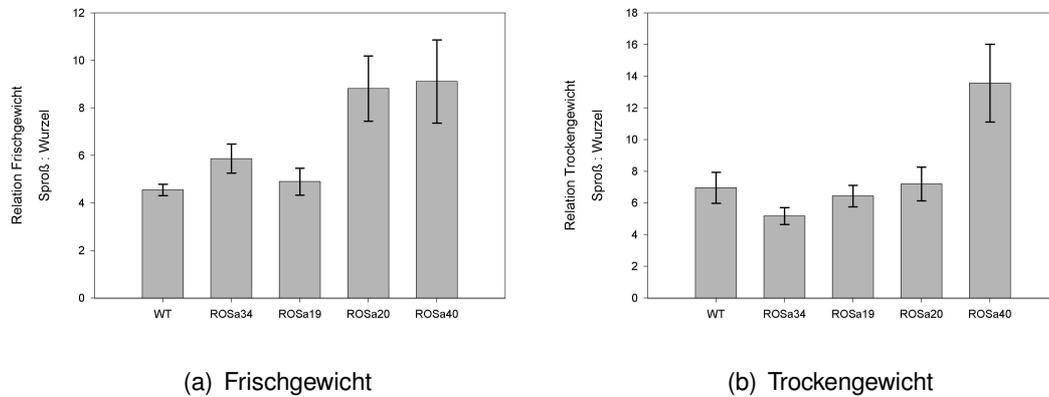


Abbildung 3.24.: Relation Sproß:Wurzel bezüglich Frischgewicht (a) und Trockengewicht (b). Anzuchtbedingungen siehe S.70, Abb. 3.23.

Das Wachstum der Pflanzen äußert sich ebenfalls in einer reduzierten Blattfläche bei gleichem Entwicklungsstadium des Blattes. Dazu wurde allen Pflanzen das fünfte Folgeblatt nach der Knospe entnommen. Alle Blätter wurden gemeinsam bei 300 dpi und einem Bit Farbtiefe (schwarzweiß) gescannt. Aus dem resultierenden TIFF-File konnte mit digitaler Bildanalyse die genaue Fläche aller Blätter bestimmt werden. Abb 3.25 [S.72] zeigt die mittleren relativen Blattflächen in Bezug auf den Wildtyp.

Die relativen Flächen von Blättern gleicher Blattfolge am Sproß⁸ nehmen mit der Stärke der Antisense-Inhibierung der DHOase ab. In der besonders stark inhibierten Transformante ROSa 40 ist ein starker Abfall der Blattfläche in Relation zum WT zu verzeichnen.

⁸fünftes Folgeblatt nach der Knospe

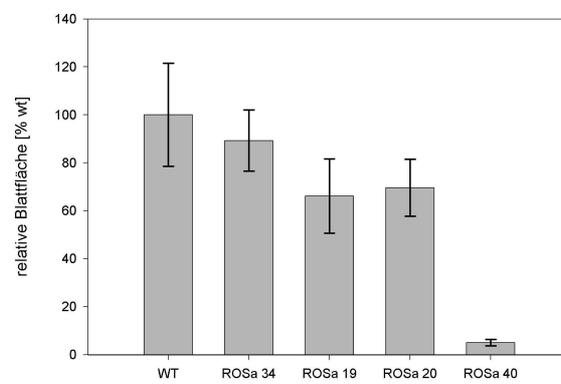


Abbildung 3.25.: Relative Blattflächen der ROSa-Transformatanten in Bezug auf WT Solara (100%). Fünftes Folgeblatt der Knospe. Mittelwerte (n=5) mit Standardabweichung. Anzuchtbedingungen siehe S.70, Abb. 3.23.

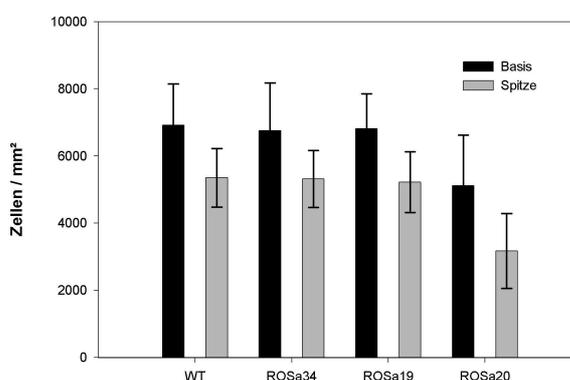
3.5.3.3. Einfluß auf die Zelldichte

In Anbetracht der beobachteten Unterschiede in Biomasse und Blattfläche stellte sich die Frage, ob die Transformanten gleichviele, aber kleinere oder insgesamt weniger Zellen bilden als der Wildtyp. Zu diesem Zweck wurden je 20 Setzlinge der Linien ROSa 19, 20, 34 und 40, sowie des Wildtyps aus Sterilkultur auf Sandboden überführt und mit 6N-Ara Lösung [6 mM NO_3^-] ernährt (12 h Licht, 80-100 μEs , 60% Luftfeuchte). Nach 22 Tagen wurden am 4. Folgeblatt der Knospe Blattscheiben ($d=4$ mm) ausgestochen. Jedem Blatt wurde eine Probe nahe der Blattspitze und an der lateralen Blattbasis entnommen. Durch die differenzierte Betrachtung der apikalen und der basalen Blattscheiben konnten zwei Wachstumszonen am selben Blatt untersucht werden. Nach Entfärbung der Blätter und Markierung der Kerne mit DAPI wurden Fokusserien des Gewebes aufgenommen und die Helligkeitsmaxima (Kerne) mittels digitaler Bildanalyse gezählt.

Transformante ROSa 40 konnten nicht mit in die Analyse einbezogen werden, da diese wiederholt nach Überführung auf Sandkultur das Wachstum einstellte. Ein viertes Folgeblatt der Knospe war nicht existent und die Länge der vorhandenen Blattspreiten lag unter 5 mm.

Abb. 3.26 [S.73] läßt sowohl im basalen, als auch im apikalen Bereich der Blattspreite eine Abnahme der Zellzahl bei ROSa 20 erkennen, deren DHOase-Expression nach ROSa 40 am stärksten inhibiert ist.

Abbildung 3.26.: Ergebnis der mit digitaler Bildverarbeitung ermittelten Zelldichte der Transformanten ROSa34, ROSa19, ROSa20 und des Wildtyps. Mittelwerte und Standardabweichung ($n=20$) normiert auf 1 mm^2 . Messfeld 150 μm x 200 μm (0,03 mm^2). Probennahme 22 Tage nach Überführung aus Sterilkultur. Anzuchtbedingungen siehe S.70, Abb. 3.23.



Zwischen den schwach inhibierten Transformanten ROSa 34 und 19 und dem WT gibt es weder an der Blattbasis, noch an der Blattspitze signifikante Unterschiede in der Zelldichte. Erst bei Betrachtung der stärker inhibierten Transformante ROSa 20 ist

eine deutlich geringere Zelldichte erkennbar. Weniger Zellen pro μm^2 bedeutet, die einzelnen Zellen müssen im Mittel größer sein als die des Wildtyps. Bei gleichzeitig geringerer Blattfläche [vgl. Abb. 3.25, S.72] bedeutet dies, daß die Zellzahl in Blättern gleicher Entwicklungsstufe geringer sein muß.

3.5.4. Einfluss der DHOase-Expression auf die Kohlehydrat-Akkumulation

Stecklinge der Transformanten ROSa 19, 20, 34 und 40, sowie des Wildtyps wurden von Sterilkultur auf Sandkultur [Ernährung: 6N-Ara, Licht: 14h 80-100 μEs , Feuchte: 60%] ausgebracht und nach 20 Tagen geerntet. Es wurden jeweils Proben zu Ende der Lichtperiode (14 Stunden) und zu Ende der Dunkelperiode (10 Stunden) genommen. Es sollte untersucht werden, ob die Transformanten im Blatt- und Wurzelgewebe Unterschiede im Hexose-, Saccharose-, oder Stärkegehalt im Vergleich zum WT zeigen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.27 [S.75] dargestellt. Die Wurzelbildung von ROSa 40 war zu gering, um daraus Extrakte herstellen zu können. Daher läßt sich über die Zucker- und Stärke-Konzentration im Wurzelgewebe von ROSa 40 keine Aussage machen.

Bei Betrachtung der Hexosen Fructose und Glucose [Abb. 3.27 a+b] läßt sich keine Tendenz der Zu- oder Abnahme in Abhängigkeit von der DHOase-Expression erkennen. Dies gilt sowohl für *Source*-Blätter und Wurzelgewebe, als auch für die Unterscheidung zwischen Beginn und Ende der Lichtperiode.

Transformanten mit stark reduzierter DHOase-Expression zeigen einen erhöhten Saccharosegehalt in *Source*-Blättern, der weitgehend unabhängig vom Zeitpunkt der Probennahme ist [Abb. 3.27 c]. Auch in Wurzelgewebe ist bei ROSa 20 eine Erhöhung der Saccharose Konzentration zu erkennen [Abb. 3.27 d].

Der Stärkegehalt in *Source*-Blättern aller Transformanten ist am Ende der Lichtperiode erhöht. Insbesondere bei ROSa40, bei der auch der Stärkegehalt am Ende der Dunkelperiode stark erhöht ist [Abb. 3.27 e]. In Wurzelgewebe läßt sich über den Stärkegehalt keine allgemeine Tendenz ableiten. Jedoch fällt auch hier wieder die stark inhibierte Transformante ROSa20 auf, deren Stärkegehalt am Ende der Dunkelperiode im Vergleich zum WT deutlich reduziert ist [Abb. 3.27 e].

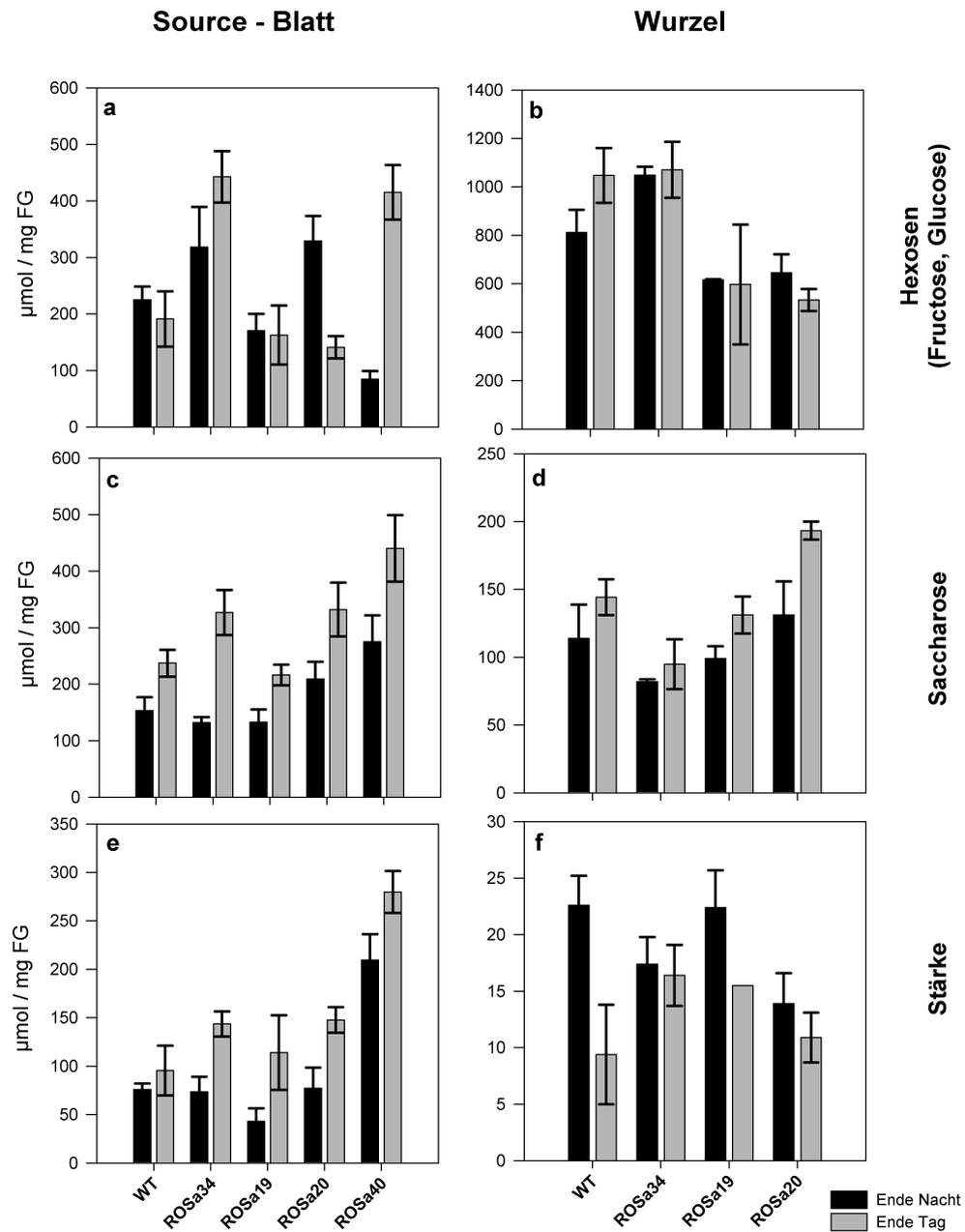


Abbildung 3.27.: Kohlehydratverteilung in DHOase Antisense-Transformanten ROSa und Wildtyp. Anzuchtbedingungen siehe S.70, Abb. 3.23. Ergebnisse sind Mittelwerte (n=4) mit Standardabw. in [$\mu\text{mol} / \text{mg}$ Frischgewicht]. Die Stärke wird in μmol Glucose-Einheiten pro mg FG dargestellt. Links: (a, c, e) Source Blatt (4. Folgeblatt der Knospe). Rechts: (b, d, f) Wurzelgewebe ohne ROSa 40.

3.5.5. Verminderte DHOase-Expression hat nur geringe Auswirkung auf den Nukleotidhaushalt.

Zur Bestimmung ausgewählter Nukleotide und Nukleotid-Zucker wurden Gewebeproben der Pflanzen aus Abschnitt 3.5.4 mittels TCA-Extraktion aufgeschlossen und über HPLC getrennt.

Das Experiment soll zeigen, ob die Transformanten mit verminderter DHOase-Expression eine vom Wildtypen abweichende Nukleotidkonzentration aufweisen. Besonderes Augenmerk sollte auf Uridin-Nukleotide fallen, die primären Produkte der Pyrimidin *de-novo* Synthese. Auch der Gehalt an Nukleotid-Zuckern wie UDP-Glucose wurde untersucht. Aufgrund der verwendeten Säulen- und Gradientenkonfiguration eluiert UDP-Glucose nahezu zeitgleich mit UDP-Galactose. Die Extinktionen stellen somit die Summe der beiden UDP-Zucker dar. In grünem Gewebe ist die Menge an UDP-Galactose in Relation zu UDP-Glucose jedoch gering, so daß sie hier vernachlässigt werden kann. Nicht jedoch in Wurzelgewebe, in dem das Verhältnis UDP-Glc zu UDP-Gal etwa 4:1 beträgt (Giermann, 2002). In den Tabellen 3.8 und 3.9 [S.77] sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Die Betrachtung des Wildtyps und der Transformanten in Bezug auf die Konzentration der Uridin Di- und Triphosphate, sowie UDP-Glucose zeigt keine signifikante Veränderung bei reduzierter DHOase-Expression [Abb. 3.8, S.77].

Auch unter den untersuchten Purin-Nukleotiden ADP, ATP, GDP und GTP ist keine signifikante Verschiebung der Konzentration in Relation zur DHOase-Expression zu beobachten [Abb. 3.9, S.77].

src-früh	UDP		UTP		Σ_{UNP}	UTP:UDP		UDPGlc		UDPGlc:UDP	
WT Solara	9,3	0,5	16,2	2,5	25,4	1,74	0,24	60,7	8,2	6,53	0,58
ROSa 34	8,1	1,8	16,2	5,1	24,3	2,21	0,47	58,9	5,7	7,53	1,07
ROSa 19	7,9	0,3	16,7	2,8	24,6	2,12	0,38	59,1	7,7	7,52	1,15
ROSa 20	8,3	1,1	18,4	1,4	26,8	2,51	0,32	77,2	13,7	8,57	0,50
src-spät	UDP		UTP		Σ_{UNP}	UTP:UDP		UDPGlc		UDPGlc:UDP	
WT Solara	8,1	1,0	13,3	0,8	21,4	1,67	0,15	72,2	1,2	9,07	1,15
ROSa 34	9,8	1,4	12,5	3,1	22,3	1,30	0,34	77,1	5,0	8,04	1,21
ROSa 19	8,8	1,1	14,0	2,7	22,7	1,58	0,12	85,2	13,1	9,70	0,67
ROSa 20	9,7	0,5	15,2	3,2	24,9	1,71	0,32	87,6	14,7	9,77	0,90
wrz-früh	UDP		UTP		Σ_{UNP}	UTP:UDP		UDPGlc		UDPGlc:UDP	
WT Solara	4,4	0,2	22,1	6,2	26,6	5,55	1,08	55,0	14,5	13,5	1,3
ROSa 34	4,1	0,9	23,8	3,2	27,9	6,06	1,10	61,9	4,5	12,2	7,6
ROSa 19	3,4	1,3	19,5	6,2	22,9	4,78	0,86	55,4	19,7	13,2	1,5
ROSa 20	3,6	0,2	23,5	1,7	27,1	5,77	1,56	63,6	2,0	15,5	3,9
wrz-spät	UDP		UTP		Σ_{UNP}	UTP:UDP		UDPGlc		UDPGlc:UDP	
WT Solara	5,3	0,7	20,7	3,6	26,0	3,93	0,29	61,9	13,4	11,7	1,2
ROSa 34	4,4	1,8	23,0	1,6	27,4	4,87	1,30	60,4	12,2	15,7	5,0
ROSa 19	5,7	1,6	25,2	6,9	31,0	4,52	0,76	58,8	1,1	12,6	2,9
ROSa 20	5,9	2,3	25,6	5,7	31,5	4,65	0,79	68,0	19,0	14,8	3,0

Tabelle 3.8.: Uridin-Nukleotidkonzentration in *source* Blättern (src) und Wurzeln (wrz) der *pyrC* Antisense Pflanzen ROSa in [nmol/g Frischgewicht]. Mittelwerte und Standardabweichung mit n=4. Ernte jeweils zu Beginn (früh) und zu Ende (spät) der Lichtperiode. Σ_{UNP} ist die Summe aus UDP und UTP.

src-früh	ADP		ATP		ATP:ADP		GDP		GTP	
WT Solara	109,9	25,6	55,0	8,8	0,51	0,06	5,5	0,7	11,8	1,8
ROSa 34	113,8	0,9	49,1	7,2	0,46	0,04	5,9	0,5	10,9	1,4
ROSa 19	73,9	6,5	49,4	4,5	0,68	0,11	6,4	0,7	12,0	1,5
ROSa 20	98,7	37,0	61,6	11,0	0,67	0,15	4,3	1,5	14,3	2,4
src-spät	ADP		ATP		ATP:ADP		GDP		GTP	
WT Solara	69,2	12,2	36,8	2,4	0,55	0,08	6,6	0,7	9,9	0,5
ROSa 34	99,8	26,3	34,6	1,8	0,32	0,05	5,2	1,8	10,1	0,6
ROSa 19	68,4	7,7	44,1	6,8	0,65	0,12	6,6	0,9	12,7	2,3
ROSa 20	65,0	16,7	49,2	8,1	0,79	0,16	7,7	1,3	14,0	3,0
Wrz-früh	ADP		ATP		ATP:ADP		GDP		GTP	
WT Solara	13,1	2,1	44,9	11,8	3,4	0,3	1,8	0,3	7,8	1,7
ROSa 34	13,4	1,4	46,9	6,1	3,3	0,3	2,2	0,3	8,3	0,9
ROSa 19	14,1	5,1	33,6	7,6	2,5	0,2	2,2	1,0	6,7	1,9
ROSa 20	14,7	2,4	42,7	8,8	3,0	0,9	2,0	0,2	7,5	1,2
Wrz-spät	ADP		ATP		ATP:ADP		GDP		GTP	
WT Solara	12,0	2,1	28,6	2,5	2,6	0,1	2,2	0,3	5,7	0,1
ROSa 34	13,7	3,8	40,4	7,7	3,3	1,1	2,7	0,9	6,8	1,2
ROSa 19	13,6	0,8	42,2	9,2	2,8	0,5	2,8	1,3	7,0	0,5
ROSa 20	16,2	1,7	35,7	8,5	2,5	0,2	2,3	0,7	7,1	1,8

Tabelle 3.9.: Purin-Nukleotidkonzentration in *source* Blättern und Wurzeln der *pyrC* Antisense Pflanzen ROSa in [nmol/g Frischgewicht]. Mittelwerte und Standardabweichung mit n=4. Ernte jeweils zu Beginn und zu Ende der Lichtperiode.

3.6. Herstellung und Durchmusterung transgener Pflanzen mit erhöhter DHOase-Expression.

Der Einfluß einer reduzierten Expression der Dihydroorotase in Pflanzen wurde in Abschnitt 3.5 [S.66 ff.] gezeigt. Anhand dieser Erkenntnisse sollte der Einfluß einer erhöhten DHOase-Menge auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Pflanze untersucht werden.

Zur Vermeidung der Co-Suppression sollte das artfremde DHOase-Gen aus *E.coli* (ECpyrC, Acc.No: X04469) in *Solanum tuberosum* und *Nicotiana tabacum* transformiert werden. *E.coli*-Orotase soll in Pflanzen auf zwei unterschiedliche Arten exprimiert werden:

- Globale Expression unter Kontrolle des starken CaMV 35S-Promotors (Franck *et al.*, 1980).
- Gewebespezifische Expression in Kartoffelknollen unter Kontrolle des Patatin B33 Promotors.

Das *E.coli* pyrC-Gen kodiert kein Transitpeptid, das für die Kompartimentierung in eukaryontischen Zellen notwendig ist. Daher wurde das Konstrukt ECpyrC am N-Terminus mit dem Transitpeptid der plastidären⁹ Transketolase (Henkes *et al.*, 2001) aus *Nicotiana tabacum* fusioniert.

3.6.1. Klonierung der *E.coli* DHOase für die Überexpression in Pflanzen

Aus lysierten Zellen des *E.coli* Stammes XL1 blue wurde mit PCR (*Pwo* Polymerase, Oligonukleotide ECpyrC-fw und ECpyrC-rv) die Basen 881 (ATG) bis 1927 (Stop) des pyrC-Gens amplifiziert. Am 5'-Ende wurde durch das Oligonukleotid ECpyrC-fw eine *Sall* Restriktionsstelle hinzugefügt. Das PCR-Produkt wurde zunächst in pBluescript SK subkloniert. Zur Überprüfung der Enzymaktivität wurde die pyrC-Mangelmutante CS101-2U5 damit komplementiert und auf M9 Medium selektioniert. Nach 48 Stunden konnten zahlreiche erfolgreich komplementierte Kolonien auf dem Minimalmedium gezählt werden.

⁹Zum Zeitpunkt der Klonierung bestand kein Anlaß zum Zweifel an der Literaturmeinung, Dihydroorotase sei in Plastiden lokalisiert. Die Erkenntnisse aus den Untersuchungen aus Abschnitt 3.4 [S.56 ff.] sind wesentlich später entstanden.

3.6.1.1. Konstrukt ECC1 für die DHOase-Überexpression in allen Geweben.

Nach Aktivitätskontrolle wurde ECpyrC mit einem *SalI* Schnitt aus dem Vektor pBlue-script SK isoliert und *SalI/SalI* in den Vektor pBinAR-TkTp9 ligiert [Abb. 3.28]. Die korrekte Orientierung wurde mit Restriktionsschnitten überprüft. Das Produkt erhält die Bezeichnung **ECC1**.

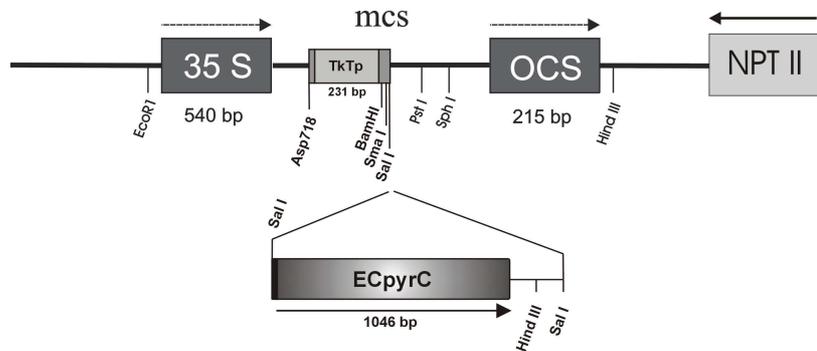


Abbildung 3.28.: Konstrukt **ECC1**. **ECpyrC**: DHOase-Gen aus *E. coli* wurde im gleichen Leseraster von TkTp in Vektor pBinARTkTp9 ligiert. Das Transitpeptid **TkTp** aus *N. tabacum* wurde *Asp718/SalI* in Vektor pBinAR ligiert. Der *SalI*-Linker am 5'-Ende von ECpyrC wurde vermittelt durch PCR mit dem Oligonukleotid ECpyrC-fw. Der Polylinker am 3'-Ende von ECpyrC stammt aus der MCS des Vektors pBluescript SK. **35S**: CaMV 35S-Promotor. **OCS**: Polyadenylierungssignal der Octopin Synthase. **NPT II**: Neomycin Phosphotransferase (vermittelt Kanamycin-Resistenz).

3.6.1.2. Konstrukt ECC2 für die knollenspezifische DHOase-Expression.

Das Konstrukt ECC1 enthält den 35S-Promotor, der in allen Geweben Expression vermittelt. Dieser wurde im Konstrukt **ECC2** [Abb. 3.29] durch den Promotor B33 ersetzt, der durch Saccharose induzierbar ist und daher die Expression in Knollen begünstigt.

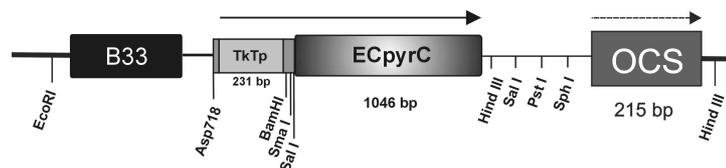


Abbildung 3.29.: Konstrukt **ECC2**. Derivat von Konstrukt ECC1 durch Austausch (*EcoRI/Asp718*) des CaMV 35S-Promotors gegen den B33 Patatin Promotor.

CaMV 35S wurde *EcoRI/Asp718* aus ECC1 entfernt. B33 wurde *EcoRI/Asp718* aus dem Vektor pBinB33 isoliert und anstelle des CaMV 35S-Promotors in den Expressi-

onsvektor ligiert. Das resultierende Produkt mit B33:TkTp:ECpyrC im Vektor pBinAR erhält die Bezeichnung **ECC2**.

3.6.2. Die Transformante RMECs exprimiert DHOase aus *E.coli* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors.

Kartoffelpflanzen cv. Desireé wurden, vermittelt durch *Agrobacterium tumefaciens*, mit dem Konstrukt ECC1 [Abb. 3.28, S.79] am IPK Gatersleben transformiert. Die Durchmusterung auf erworbene Kanamycinresistenz brachte 51 positive Kartoffel Transformanten hervor. Alle Pflanzen dieser Transformation wurden mit der Bezeichnung **RMECs** benannt.

3.6.2.1. Peptidantikörper gegen Kartoffel-Orotase detektiert keine *E.coli*-Orotase.

Zur Beurteilung der Stärke der Protein-Expression, wurden Proteinextrakte aller Transformanten über PAGE getrennt und mit Western-Transfer an eine Membran gebunden. Die anschließende Detektion mit Hilfe des Peptidantikörpers gegen die Aminosäuren 245 bis 259 der Kartoffel-DHOase zeigte ein einheitliches Signal in allen Proben aus Transformanten. Dieses Signal ist der pflanzeigenen Dihydroorotase zuzuordnen. Die entsprechende Region 248 bis 261 der *E.coli*-DHOase zeigt keine immunologische Reaktion mit dem Antikörper. Die Homologie der zu erkennenden *E.coli*-

<i>S.tuberosum</i>	245	LG	T	S	A	P	H	D	R	R	R	K	E	C
<i>E.coli</i>	248	LG	T	S	A	P	H	A	R	M	R	K	E	S

Abbildung 3.30.: Erkennungssequenz des Peptidantikörpers gegen Kartoffel-DHOase (oben) und der entsprechenden Region der Dihydroorotase aus *E.coli* (unten).

Peptidsequenz beträgt 80% zur Kartoffel-DHOase [vgl. Sequenz 3.30, S.80]. Die Spezifität ist jedoch zu gering, um damit Aussagen über die Stärke der Expression pflanzenfremder DHOase in den RMECs Transformanten zu treffen.

3.6.2.2. RMECs Transformanten haben unterschiedliche Transkriptmengen der ECpyrC mRNA.

Zur Durchmusterung der 51 RMECs Pflanzen auf mRNA-Ebene wurden diese im Gewächshaus kultiviert und mit 6N-Ara Lösung ernährt (weitere Anzuchtbedingungen vgl.

Abschnitt 2.2, S.24). Nach 50 Tagen wurde das 3. Folgeblatt der Knospe mit Nebenfiedern zur RNA-Isolation geerntet. Von allen 51 Transformanten wurden stellvertretend vier ausgewählt, die im Northern Blot schwache, mittlere und starke Banden der ECpyrC mRNA zeigten. Diese sind in Abb. 3.31 mit zunehmender Transkriptmenge des ECC1-Konstrukts von links nach rechts dargestellt.

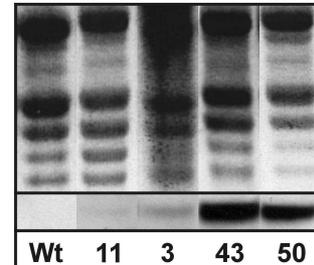


Abbildung 3.31.: Northern Blot Analyse der vier ausgewählten **RMECs** Transformanten und des Wildtyps. Oben: Agarosegel mit ribosomaler RNA; Mitte: DIG-markierte Sonde gegen ECpyrC mRNA in *Source*-Blättern.

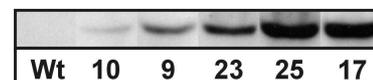
3.6.3. Kartoffeltransformante D-RMBECs exprimiert DHOase aus *E.coli* unter Kontrolle des B33 Patatin-Promotors.

Kartoffelpflanzen cv. Desireé wurden, vermittelt durch *Agrobacterium tumefaciens*, mit dem Konstrukt ECC2 [Abb. 3.29, S.79] am IPK Gatersleben transformiert. Die Durchmusterung auf erworbene Kanamycin-Resistenz brachte 38 positive Transformanten hervor. Alle Pflanzen dieser Transformation wurden mit der Bezeichnung **D-RMBECs**¹⁰ benannt.

3.6.3.1. D-RMBECs Transformanten haben unterschiedlich starke Transkriptmengen der ECpyrC mRNA.

Setzlinge der D-RMBECs Pflanzen wurden auf Sandboden kultiviert und nach 43 Tagen die Knollen geerntet. Aus Knollengewebe der 38 Transformanten wurde RNA isoliert und mittels Northernblot Analyse auf ihren Gehalt an ECpyrC-mRNA untersucht.

Abbildung 3.32.: Northern Blot Analyse der ausgewählten **RM-BECs** Transformanten und des Wildtyps. Signal der DIG markierten Sonde gegen ECpyrC mRNA aus Knollengewebe. Alter der Pflanzen: 43 Tage.



Analog zu den RMECs Pflanzen wurden hier fünf Transformanten stellvertretend für schwache, mittlere und starke Transkriptmengen ausgewählt. In Abb. 3.32 sind die ausgewählten Pflanzen mit steigender Transkriptmenge an ECpyrC-mRNA dargestellt.

¹⁰D bezeichnet die Sorte „Desireé“ und wird gelegentlich nicht ausdrücklich erwähnt

3.7. Charakterisierung der transgenen Pflanzen mit DHOase-Expression in allen Geweben.

Durch Northern Blot Analyse wurden vier transgene Pflanzen als representative Vertreter der RMECs-Transformanten anhand ihrer Transkriptmenge an ECpyrC-mRNA ausgewählt. Die Transformanten RMECs 50 und 43 sind die Pflanzen mit der höchsten Transkription an ECpyrC-mRNA, während RMECs 11 die geringste Menge aufweist. Dazwischen befindet sich RMECs 3 mit vergleichsweise mittlerer Transkriptmenge [Abb. 3.31, S.81].

Die ausgewählten Pflanzen werden im folgenden Teil auf Unterschiede zum Wildtyp in Wachstum, Biomasse, Gehalt an Protein und Stärke, sowie in Enzymaktivität der *E.coli*-DHOase untersucht. Zum Vergleich der Ergebnisse in Abhängigkeit vom Alter der Pflanze wurden die Hälfte der Pflanzen nach 49 Tagen und der Rest nach 78 Tagen geerntet.

3.7.1. Wachstum und Phänotyp

Die RMECs-Transformanten 3, 11 und 43 haben keine erkennbaren phänotypischen Merkmale, die sie vom Wildtyp unterscheiden. Die Pflanzen zeigen im frühen Stadium ihrer Entwicklung auch keine signifikante Änderung im Frischgewicht mit zunehmender Menge der ECpyrC-mRNA [Abb.3.33, S.83]. Eine Ausnahme hierbei stellt RMECs 50 dar. Diese fällt nicht nur durch abnormes Blattwachstum [Abb.3.34, S.83] auf, sondern auch durch eine deutliche Retardierung in der Entwicklung. Zum ersten Erntezeitpunkt war nur eine minimale Knollenbildung zu beobachten. Zum späteren Erntezeitpunkt traten nur noch mäßige Blattanomalien bei RMECs 50 auf. Auch im Frischgewicht zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mehr.

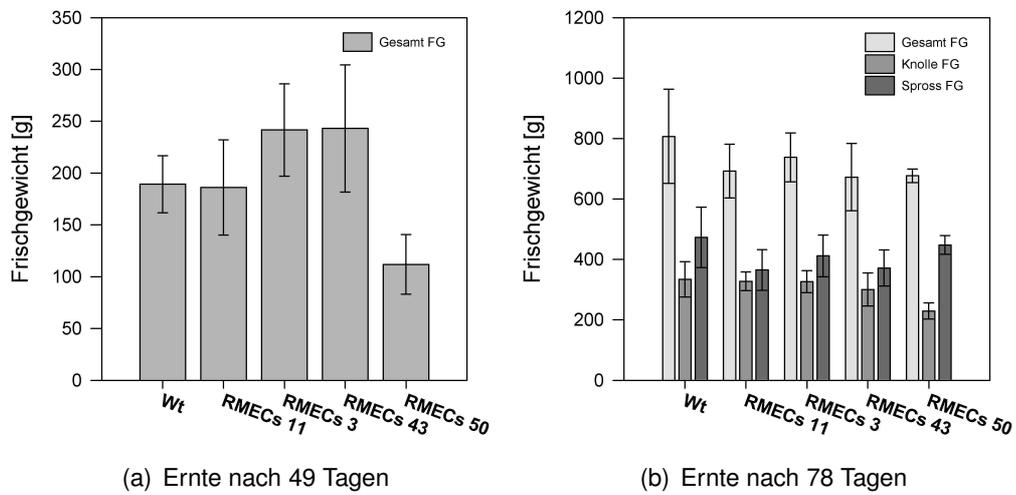


Abbildung 3.33.: Frischgewichte der RMECs 49 Tage (a) bzw. 78 Tage (b) nach Überführung von Gewebekultur ins Gewächshaus (Anzuchtbedingungen: Abschnitt 2.2, S.24). Mittelwerte mit Standardabweichung (n=5). Das Gesamt-Frischgewicht (Gesamt FG) ist die gemittelte Summe aus Knollengewicht und Sproßgewicht ohne Wurzel.

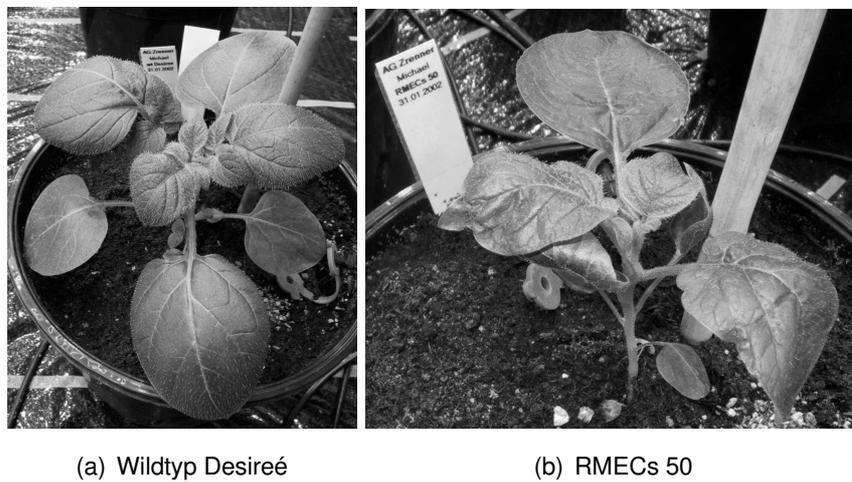


Abbildung 3.34.: Wildtyp Desireé (a) und Transformante RMECs 50 (b). 28 Tage nach Überführung aus Gewebekultur. Abnormes Blattwachstum der Transformante RMECs 50.

3.7.2. Enzym-Aktivität

Mit der in Abschnitt 2.5.10 [S.36] beschriebenen Methode steht ein enzymatischer Nachweis zur Verfügung, der die notwendige Sensitivität hat, um DHOase Aktivität in pflanzlichem Gewebe zu bestimmen.

Sink-Gewebe 78 Tage alter¹¹ RMECs-Pflanzen [vgl. Abb. 3.33, S.83] wurde auf seine DHOase-Aktivität untersucht. Abbildung 3.35 zeigt die gemessenen Aktivitäten in nmol pro Sekunde und Milligramm Frischgewicht. Wegen der großen Unterschiede zum Wildtyp (Faktor > 100) wurde eine logarithmische Skalierung gewählt.

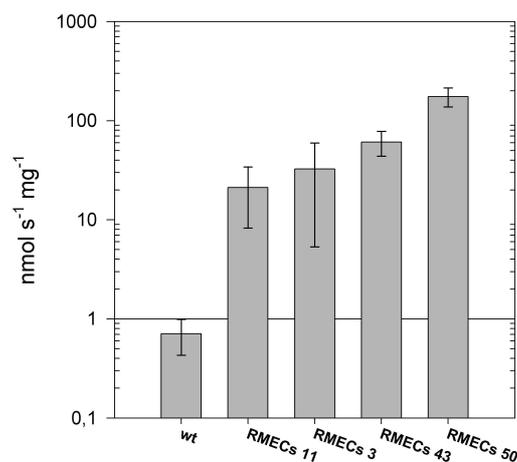


Abbildung 3.35.: Mittelwerte (n=5) der Dihydroorotase Aktivität in Extrakten aus RMECs *sink*-Blättern mit Standardabweichung. Logarithmische Skalierung in nmol umgesetztes Carbamoyl-Aspartat pro Sekunde pro Milligramm Frischgewicht. Skalierung: $m \cdot 10^n$.

3.7.3. Kohlehydrat- und Protein-Akkumulation

Kartoffel RMECs-Transformanten wurden im Alter von 49 und 78 Tagen geerntet (Anzuchtbedingungen: Abschnitt 2.2, S.24). Zu beiden Zeitpunkten wurden Proben von *source*-Blättern entnommen. Zum zweiten Zeitpunkt konnten sowohl Blatt- als auch Knollenproben entnommen werden. Das Gewebe wurde gemäß Abschnitt 2.5.11 [S.37] analysiert. Tabelle 3.36 [S.85] zeigt das Ergebnis der Saccharose- und Stärkeanalyse, Tabelle 3.37 [S.86] gibt die Menge an Protein im jeweiligen Gewebe wieder.

3.7.3.1. Saccharose & Stärke

Bei den Transformanten ist nach 49 Tagen eine Steigerung der Akkumulation von Saccharose und Stärke in *source*-Blättern zu sehen. Zum Zeitpunkt nach 78 Tagen, zu dem die Knollenbildung bei allen Pflanzen weit fortgeschritten war, zeigt sich noch

¹¹bzgl. Überführung von Gewebekultur

immer eine Steigerung der Saccharose in *source*-Blättern. Der Stärkegehalt ist zum diesem späteren Zeitpunkt uneinheitlich.

In den Knollen der Transformanten mit höherer DHOase-Aktivität (RMECs 3, 43 und 50) liegen die Saccharose-Werte unter dem des Wildtyps. Auch der Stärkegehalt ist in allen Transformanten geringer als im Wildtyp. Es läßt sich jedoch keine Korrelation zwischen DHOase-Aktivität und Erniedrigung des Stärkegehalts erkennen.

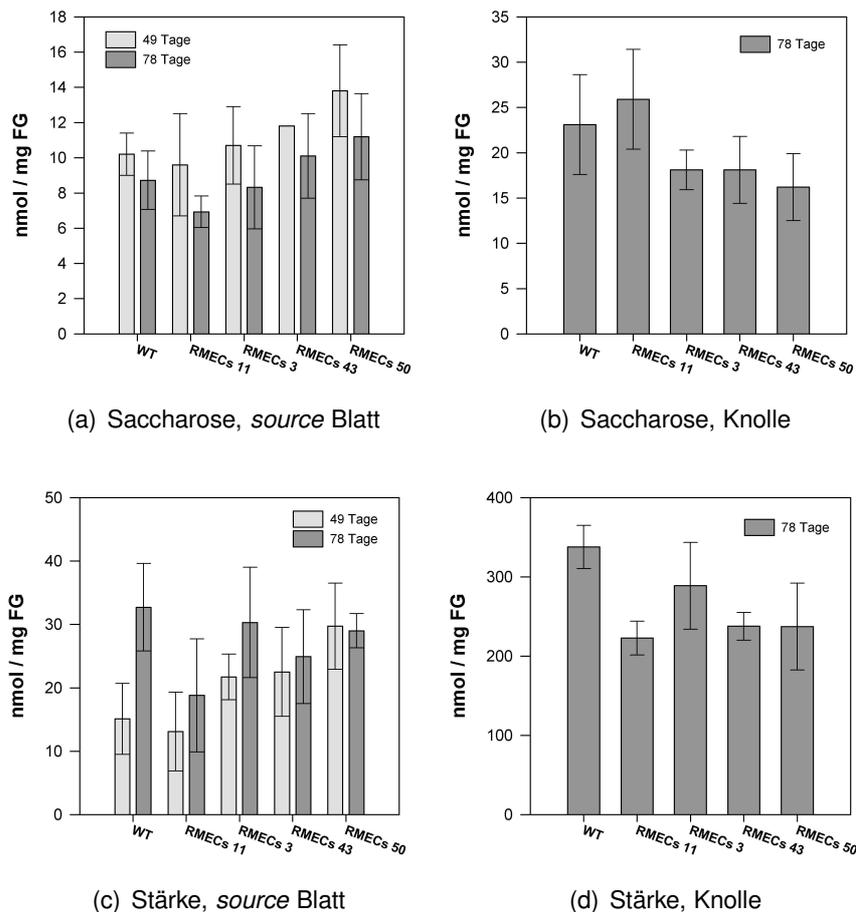


Abbildung 3.36.: Ergebnis der Saccharose- und Stärkeanalyse in *source*-Blättern (links a, c) und Knollen (rechts b, d) von RMECs-Transformanten und Wildtyp. Mittelwerte ($n=5$) mit Standardabweichung. Die Stärkewerte (unten c, d) sind angegeben in nmol Glucose Einheiten pro mg Frischgewicht (FG). Die *source*-Daten sind unterteilt in zwei Erntezeitpunkte nach 49 und 78 Tagen. Daten bzgl. der Knollen liegen nur zum 2. Erntezeitpunkt (78 Tage) vor.

3.7.3.2. Proteine

Zum ersten und zum zweiten Erntezeitpunkt ist in *source*-Blättern keine signifikante Veränderung (ungepaarter t-Test; $P > 5\%$) der Gesamt-Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen [Abb.3.37 a]. Der Proteingehalt in Knollengewebe [Abb.3.37 b] ist bei RMECs 11 und 50 signifikant niedriger als der des Wildtyps (ungepaarter t-Test; $P < 5\%$). RMECs 3 und 43 zeigen keine signifikante Erniedrigung der Proteinmenge in Knollen ($P > 5\%$).

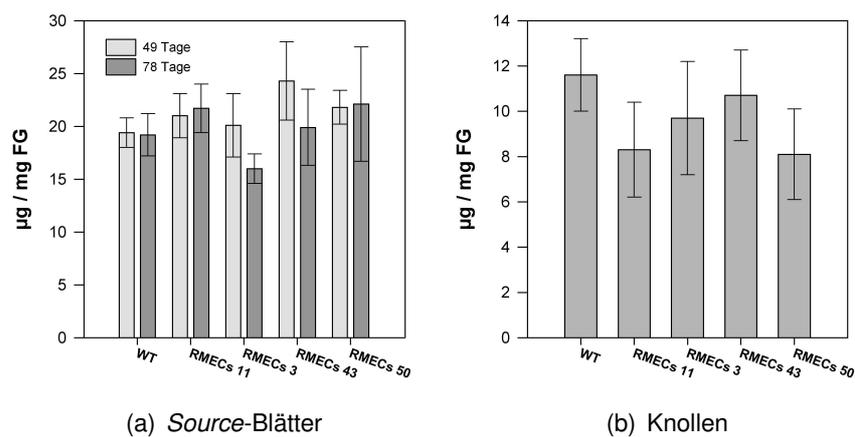


Abbildung 3.37.: Gesamtprotein Gehalt der RMECs Kartoffel Transformanten in µg pro mg Frischgewicht. Anzucht und Ernte wie unter Abb. 3.33 [S.83] (Anzuchtbedingungen: Abschnitt 2.2, S.24). Mittelwerte mit Standardabweichung (n=5).

3.8. Charakterisierung transgener Pflanzen mit DHOase-Expression unter Kontrolle des B33 Promotors.

Analog zum Auswahlverfahren der RMECs-Transformanten [Abschnitt 3.7, S.82] wurden anhand einer Northern Blot Analyse [Abb.3.32, S.81] fünf D-RMBECs Transformanten für nähere Untersuchungen ausgewählt.

3.8.1. Wachstum und Phänotyp

Transformante RMBECs 25, die eine hohe Transkriptmenge an ECpyrC-mRNA aufweist [3.32, S.81], zeigt ein abnormes Blattwachstum im Vergleich zum Wildtyp. Der Effekt tritt jedoch mit zunehmendem Alter der Pflanze in den Hintergrund. Alle anderen RMBECs Transformanten zeigen vor der Blütenbildung keine sichtbaren phänotypischen Unterschiede.

Eine außergewöhnliche Blütenbildung ist bei RMBECs 10 zu beobachten. Diese Transformante mit der geringsten Transkriptmenge aller ausgewählten RMBECs Pflanzen bietet eine für die Gattung *Solanum* ungewöhnliche Infloreszenz. Die Kronblätter sind verwachsen, an der Basis weiß und an ihrem apikalen Ende grün. Die Tragblätter stehen in gestauchten 5er-Rosetten unmittelbar unter den Kronblättern. Angesichts der schwach erhöhten DHOase-Expression und der gravierenden Veränderungen der Infloreszenz, die sich in keiner anderen Transformante wieder findet, muß davon ausgegangen werden, daß bei der Transformation durch *Agrobacterium* die T-DNA ein für die Blütenentwicklung wichtiges Strukturgen ausgeschaltet hat. In Abbildung 3.38 sind auffällige Wachstums-Unterschiede der Transformanten RMBECs 25 und 10 zum Wildtyp dargestellt.



(a) Wildtyp Desireé

(b) RMBECs 25



(c) RMBECs 10

Abbildung 3.38.: Wildtyp Desireé (a) und Transformante RMBECs 25 (b). 28 Tage nach Überführung aus Gewebekultur. Transformante RMBECs 25 zeigt ein abnormes Blattwachstum. RMBECs 10 (c) hat eine vom Wt stark abweichende Infloreszenz mit gestauchten Blattrosetten und verwachsenen Kronblättern (Foto c: Josef Bergstein, MPIMP).

Die Gesamt-Frischgewichte der Transformanten geben zur ersten Ernte ein uneinheitliches Bild [Abb. 3.39 a]. Läßt man RMBECs 10 wegen ihres abnormen Phänotyps [Abb. 3.38, S.88] bei dieser Betrachtung aussen vor, so ist eine Frischgewichtserhöhung mit zunehmender DHOase-Expression bis RMBECs 23 erkennbar. Die Frischgewichte von RMBECs 9 und 17 sind zwar nicht signifikant höher als der Wildtyp (ungepaarter t-Test; $P > 5\%$), jedoch ist ein Trend erkennbar. RMBECs 25 mit der stärksten Expression hat ein deutlich verringertes Frischgewicht, einhergehend mit retardiertem Wachstum.

Zum zweiten Erntezeitpunkt nach 78 Tagen [Abb. 3.39 b] sind die Gesamt Frischgewichte aller Transformanten signifikant geringer als das des Wildtyps. Zwischen den Gesamt-Frischgewichten der Transformanten gibt es jedoch keine signifikanten Unterschiede (ungepaarter t-Test; $P > 5\%$).

Mit Ausnahme von RMBECs 25, die eine sehr starke DHOase-Expression und eine deutlich reduzierte Knollenmasse hat, gibt es keine signifikanten Unterschiede im Knollen-Frischgewicht der Transformanten zum Wildtyp.

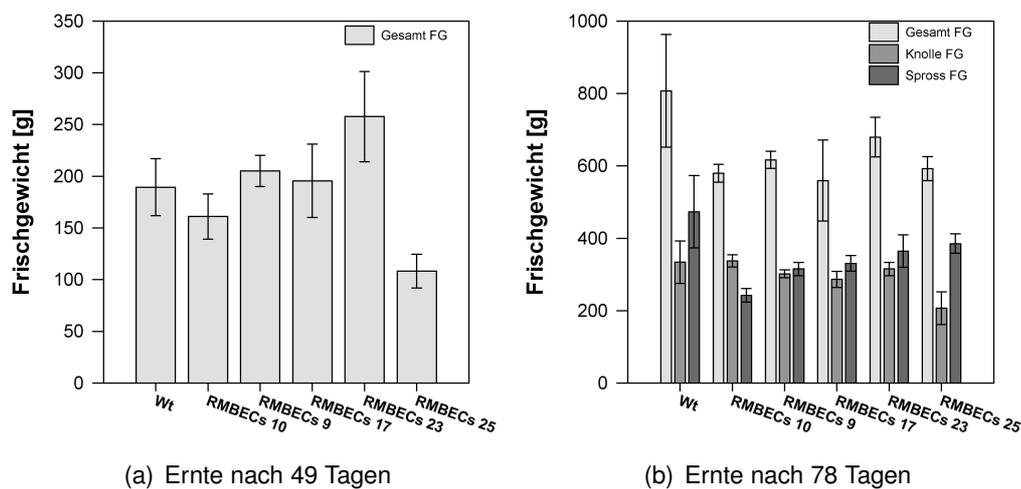


Abbildung 3.39.: Frischgewichte der RMBECs 49 Tage (a) bzw. 78 Tage (b) nach Überführung von Gewebekultur ins Gewächshaus. Anzuchtbedingungen vgl. Abb. 3.33 [S.83]. Alle Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($n=5$). Das Gesamt-Frischgewicht (Gesamt FG) ist die gemittelte Summe aus Knollengewicht und Sproßgewicht ohne Wurzel.

3.8.2. Enzym-Aktivität

Die Transformanten D-RMBECs exprimieren *E.coli* DHOase unter Kontrolle des B33-Promotors, der besonders in Knollengewebe aktiv ist. Er ist jedoch dafür nicht spezifisch, da er durch Saccharose induzierbar ist. Daher wurden Enzym-Aktivitäten aus-

schließlich in Knollengewebe bestimmt. Aufgrund der starken Aktivitätsunterschiede zum Wildtyp, mußten die Ergebnisse auch hier logarithmisch aufgetragen werden.

Die RBMECs Transformanten zeigen eine stetige Zunahme der DHOase-Aktivität mit steigender Expression an ECpyrC-mRNA. Lediglich RBMECs 17, mit der im Northern Blot höchsten Transkriptmenge, erreichte nur eine ähnliche Aktivität wie RBMECs 23. Die höchste DHOase-Aktivität findet sich in RBMECs 25, die um Faktor 100 höher ist als die des Wildtyps [Abb. 3.40].

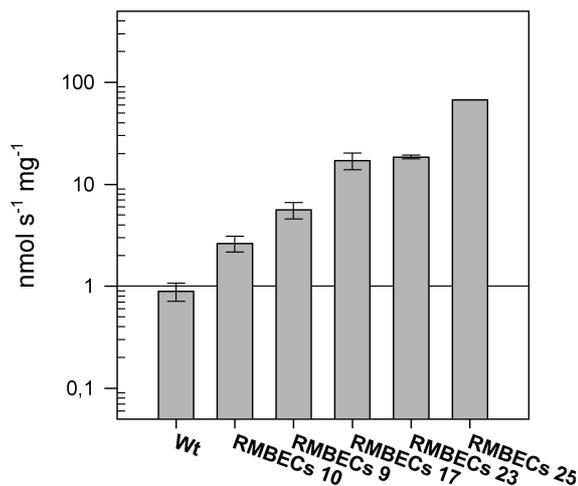


Abbildung 3.40.: Mittelwerte (n=5) der Dihydroorotase Aktivität in Extrakten aus RBMECs Knollen mit Standardabweichung. Logarithmische Skalierung in nmol umgesetztes Carbamoyl-Aspartat pro Sekunde pro Milligramm Frischgewicht. Skalierung: $m \cdot 10^n$

3.8.3. Kohlehydrat- und Protein-Akkumulation

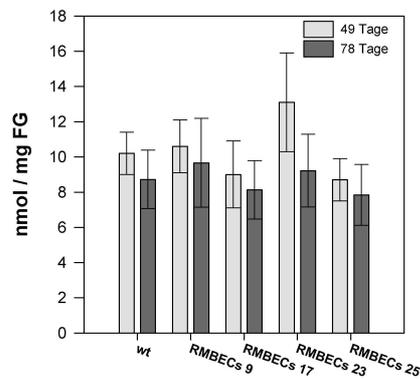
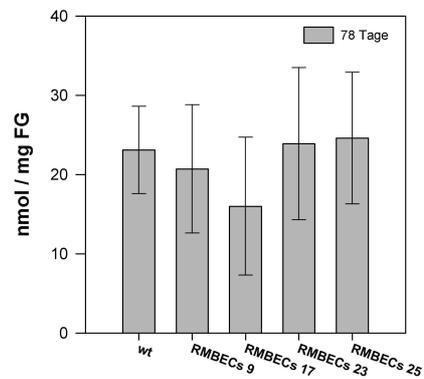
Die RBECs Transformanten wurden im Alter von 49 und 78 Tagen geerntet (Anzuchtbedingung vgl. Abb. 3.33, S.83). Zu beiden Zeitpunkten wurden Proben von *source* Blättern entnommen. Knollendaten liegen auch hier nur zum zweiten Erntezeitpunkt vor. Das Gewebe wurde gemäß Abschnitt 2.5.11 [S.37] analysiert. Tabelle 3.41 [S.92] zeigt das Ergebnis der Saccharose- und Stärkeanalyse, Tabelle 3.42 [S.93] gibt die Menge an Protein im jeweiligen Gewebe wieder.

3.8.3.1. Saccharose & Stärke

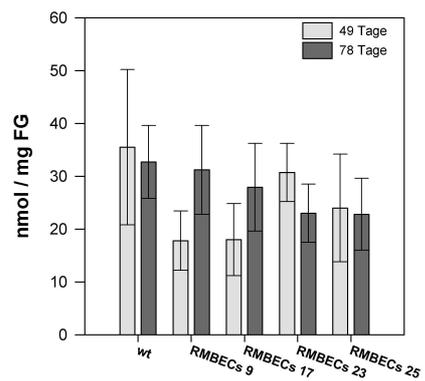
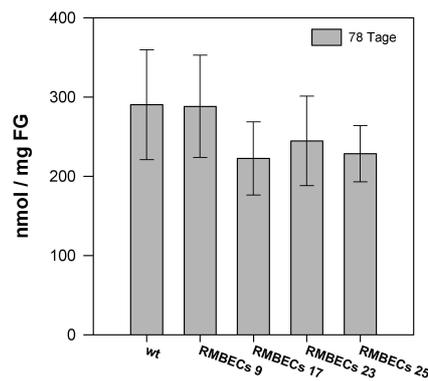
Alle Transformanten zeigen in *source*-Blättern zu beiden Zeitpunkten eine ähnliche Saccharosemenge wie der Wildtyp. Der Saccharose-Gehalt in Knollen aller Transformanten ist gemäß t-Test [Abschnitt 2.9.2, S.44] nicht signifikant verschieden zu dem des Wildtyps.

Der Stärkegehalt in *source*-Blättern der Transformanten ist zum Zeitpunkt der frühen Ernte uneinheitlich. Zum zweiten Erntezeitpunkt läßt sich eine stetige Abnahme der Stärke-Konzentration mit zunehmender DHOase-Expression erkennen. Dennoch muß die Abnahme nach den Kriterien aus Abschnitt 2.9.2 als nicht signifikant bewertet werden. Der Stärkegehalt in den Knollen der Transformanten ist ebenfalls nicht signifikant geringer als im Wildtyp. Eine Tendenz zur Abnahme bei erhöhter DHOase-Expression ist jedoch zu erkennen.

Die Transformante RBECs 10 hat deutlich erhöhte Saccharosewerte in *source*-Blättern und Knollengewebe, sowie erhöhte Stärkewerte in *source*-Gewebe zu beiden Erntezeitpunkten. Aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 3.8.1 [S.87] und Abb. 3.38 [S.88] wird RBECs 10 hier nicht weiter berücksichtigt.

(a) Saccharose, *source* Blatt

(b) Saccharose, Knolle

(c) Stärke, *source* Blatt

(d) Stärke, Knolle

Abbildung 3.41.: Ergebnis der Saccharose- und Stärkeanalyse in *source* Blättern (links a,c) und Knollen (rechts b,d) von D-RMBECs Transformanten und Wildtyp. Mittelwerte (n=5) mit Standardabweichung. Die Stärkewerte (unten c,d) sind angegeben in nmol Glucose Einheiten pro mg Frischgewicht (FG). Die *source* Daten sind unterteilt in zwei Erntezeitpunkte nach 49 und 78 Tagen. Daten bzgl. der Knollen liegen nur zum 2. Erntezeitpunkt (78 Tage) vor.

3.8.3.2. Proteine

In *source* Blättern zeigen RMBECS Transformanten nach 49 Tagen und nach 78 Tagen keine signifikante Veränderung der Gesamtproteinmenge [Abb. 3.42 a] im Vergleich zum Wildtyp.

Im Knollengewebe des Wildtyps finden sich höhere Proteinmengen im Vergleich zu Knollengewebe der Transformanten, deren Proteingehalt zwar uneinheitlich, jedoch nicht signifikant voneinander verschieden ist [Abb. 3.42 b].

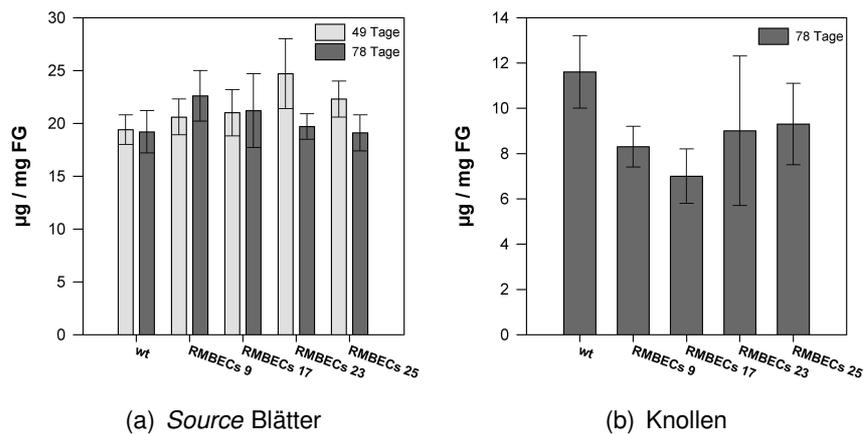


Abbildung 3.42.: Gesamtprotein Gehalt der D-RMBECs Kartoffel Transformanten in µg pro mg Frischgewicht (FG). (a) *source* Blätter, unterteilt in zwei Erntezeitpunkte (49 und 78 Tage). (b) Knollengewebe zum zweiten Erntezeitpunkt.

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der pflanzlichen Pyrimidin-Nukleotid *de-novo* Synthese unter besonderer Berücksichtigung des Enzyms Dihydroorotase (DHOase). Durch heterologe Komplementation wurde das DHOase-Gen *pyrC* einerseits aus *Solanum tuberosum* und andererseits aus *Arabidopsis thaliana* kloniert. Anhand vollständiger Sequenzdaten und transgener Pflanzen mit GFP als Reporter gen konnten Vorhersagen zur möglichen Lokalisation des Enzyms *in vivo* gemacht werden. Durch Entwicklung eines sensitiven, nicht-radioaktiven, fluorimetrischen Enzymassays steht nun ein System zur Verfügung, mit welchem die Aktivität der DHOase in Bakterienextrakten und in pflanzlichem Gewebe gemessen werden kann.

Durch Herstellung transgener Pflanzen mit sowohl reduzierter, als auch erhöhter DHOase-Expression konnten Auswirkungen der DHOase auf den Metabolismus und das Wachstum der Pflanze studiert werden.

4.1. Charakterisierung der pflanzlichen Dihydroorotase

Das Enzym Dihydroorotase (EC 3.5.2.3) gehört zur Familie der Amidohydrolasen, deren Eigenheit es ist, zyklische Amide zu bilden. Es zählt zu den wenigen Enzymen, die in der Lage sind eine Amidbindung zu schließen, ohne daß daran als treibende Kraft eine direkte Energie-liefernde Reaktion wie z.B. ATP-Hydrolyse gekoppelt ist. Der intramolekulare Ringschluß ist im Vergleich zur intermolekularen Amidbindung von der Entropie begünstigt (Brown & Collins, 1991).

Obwohl in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche Untersuchungen am Enzym Dihydroorotase (DHOase) in Bakterien (Lieberman & Kornberg, 1954; O'Donovan & Neuhard, 1970), niederen Eukaryonten (Lacroute, 1968; Denis-Duphil, 1989) und Säugern (Jones, 1980) gemacht wurden, ist das Wissen über die pflanzliche DHOase noch immer gering. Frühe Untersuchungen zur pflanzlichen Dihydroorotase gehen zurück auf Mazus & Buchowicz (1966, 1968*a,b*) und basieren auf der Untersuchung von fraktionierten Gewebehomogenaten.

4.1.1. Klonierung des pflanzlichen DHOase-Gens

Durch die Klonierung einer cDNA aus *Arabidopsis thaliana*, codierend für DHOase-Aktivität [3.1.2, S.46], konnten die Ergebnisse von Zhou *et al.* (1997) bestätigt werden. Darüber hinaus wurde durch Klonierung einer entsprechenden cDNA aus *Solanum tuberosum* [3.1.1, S.45] ein Homologievergleich zwischen den Familien der *Brassicaceae* und der *Solanaceae* in Bezug auf DHOase möglich [vgl. Abb. 4.1, S.96]. Die Verwendung des PAUP Algorithmus (Swofford, 1993) ermöglichte einen phylogenetischen Vergleich der beiden klonierten DHOasen mit denen anderer Spezies [Abb. 4.2, S.97].

4.1.1.1. Homologie der DHOasen aus *A.thaliana* und *S.tuberosum*

Sequenzvergleiche der beiden Klone At11 und St5¹ liefern eine Homologie von 73% auf DNA-Ebene und 84,6% auf Protein-Ebene [Abb. 4.1, S.96]. Die Peptidsequenz wurde aus den offenen Leserastern der DHOase-Klone translatiert. Der prozentuale Wert der Homologie beschreibt die absolute Übereinstimmung der beiden Sequenzen. Betrachtet man jedoch die abweichenden Aminosäuren, so fällt auf, daß häufig ein konservierter Austausch statt fand. So ist *Isoleucin* häufig durch *Leucin* oder *Valin* substituiert. Alle drei Aminosäuren sind chemisch ähnlich mit aliphatischen, unpolaren Seitenketten von vergleichbarer Länge. Daneben ist *Aspartat* mehrfach durch *Glutamat* substituiert. Beide haben eine negativ geladene Seitenkette.

Die Peptidsequenz von At11 ist ab dem möglichen Startcodon (Met 12) identisch mit der von Zhou *et al.* (1997) klonierten DHOase. Diese ist jedoch länger und verfügt über ein weiteres Methionin am N-Terminus. Die translatierten Peptidsequenzen zwischen dem ersten und zweiten möglichen Startcodon der Kartoffel- und Arabidopsis-DHOase weichen stark voneinander ab und weisen lediglich eine Homologie von 24% auf.

¹In Abb. 4.1 ist der am 5'-Ende vervollständigte Klon St5xl dargestellt.

<i>St5xl</i>	~ M R T L F S P C K	I S H I P V V S F G	R K R S . L K I Y S	A K M E L S I T Q P	38
<i>At11</i>	~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~	~ A R E K V K T R A	V R M E L T I T O P	19
<i>AthZhou</i>	M I K T L V S P Y S	G F G S Q K L K F D	R S S E K V K T R A	V R M E L T I T O P	40
<i>St5xl</i>	D D W H L H L R D G	D V L K A V V S H S	A H H F G R A I V M	P N L K P P I T T T	78
<i>At11</i>	D D W H L H L R D G	D L L H A V V P H S	A S N F K R A I V M	P N L K P P V T S T	59
<i>AthZhou</i>	D D W H L H L R D G	D L L H A V V P H S	A S N F K R A I V M	P N L K P P V T S T	80
<i>St5xl</i>	A A A V A Y R E A I	L K S L P V D S D F	N P L M T L Y L T D	T T S P M E I K L A	118
<i>At11</i>	A A A I I Y R K F I	M K A L P S E S S F	D P L M T L Y L T D	K T L P E E I R L A	99
<i>AthZhou</i>	A A A I I Y R K F I	M K A L P S E S S F	D P L M T L Y L T D	K T L P E E I R L A	120
<i>St5xl</i>	R E S Q V V F G V K	L Y P A G A T T N S	Q D G V T D L F G K	C L P V L Q E M V E	158
<i>At11</i>	R E S G V V Y A V K	L Y P A G A T T N S	Q D G V T D L F G K	C L P V L E E M V K	139
<i>AthZhou</i>	R E S G V V Y A V K	L Y P A G A T T N S	Q D G V T D L F G K	C L P V L E E M V K	160
<i>St5xl</i>	H N M P L L V H G E	V T N P E V D M F D	R E K V F I E T V L	R P L V Q K F P Q L	198
<i>At11</i>	Q N M P L L V H G E	V T D P S I D V F D	R E K I F I E T V L	Q P L I Q R L P Q L	179
<i>AthZhou</i>	Q N M P L L V H G E	V T D P S I D V F D	R E K I F I E T V L	Q P L I Q R L P Q L	200
<i>St5xl</i>	K V V M E H V T T I	D A V K F V E S C T	E G F V A A T V T P	Q H L V L N R N S L	238
<i>At11</i>	K V V M E H I T T M	D A V N F V E S C K	E G S V G A T V T P	Q H L L L N R N A L	219
<i>AthZhou</i>	K V V M E H I T T M	D A V N F V E S C K	E G S V G A T V T P	Q H L L L N R N A L	240
<i>St5xl</i>	F Q G G L O P H N Y	C L P V L K R E I H	R E A L V S A V T S	G S K R F F L G T D	278
<i>At11</i>	F Q G G L O P H N Y	C L P V L K R E I H	R E A I V K A V T S	G S K K F F L G T D	259
<i>AthZhou</i>	F Q G G L O P H N Y	C L P V L K R E I H	R E A I V K A V T S	G S K K F F L G T D	280
<i>St5xl</i>	S A P H D R R R K E	C S C G C A G I Y N	A P V A L S V Y A K	V F E K E N A L D K	318
<i>At11</i>	S A P H E R S R K E	S S C G C A G I Y S	A P I A L S L Y A K	V F D E A G A L D K	299
<i>AthZhou</i>	S A P H E R S R K E	S S C G C A G I Y S	A P I A L S L Y A K	V F D E A G A L D K	320
<i>St5xl</i>	L E A F T S F N G P	D F Y G L P R N N S	K I K L S K T P W K	V P E S F S Y A S G	358
<i>At11</i>	L E A F T S F N G P	D F Y G L P R N S S	K I T L K K S P W K	V P D V F N F P F G	339
<i>AthZhou</i>	L E A F T S F N G P	D F Y G L P R N S S	K I T L K K S P W K	V P D V F N F P F G	360
<i>St5xl</i>	D I I P M F A G E M	L D W L P A P L	* ~ 376		
<i>At11</i>	E I V P M F A G E T	L Q W Q P L K	* ~ 356		
<i>AthZhou</i>	E I V P M F A G E T	L Q W Q P L K	* ~ 377		

Abbildung 4.1.: Translation der drei bisher bekannten, für DHOase codierenden pflanzlichen cDNA-Klone. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt. Schattierungen symbolisieren einen konservierten Austausch. *St5xl*: DHOase aus *S.tuberosum* (Klon *St5* mit möglicher Targetregion); *At11*: DHOase aus *A.thaliana* (Klon *At11*); *AthZhou*: DHOase aus *A.thaliana* (Acc.No. AF000146), kloniert von Zhou *et al.* (1997).

4.1.1.2. Phylogenetischer Vergleich der DHOase in verschiedenen Spezies

Einige der durch Datenbank-Recherche gefundenen pyrC-Sequenzen bzw. pyrC ähnlichen ESTs² wurden in Aminosäure-Sequenzen translatiert und mit Hilfe des PAUP Algorithmus (Swofford, 1993) auf phylogenetische Ähnlichkeiten untersucht. Das Ergebnis ist als Baumdiagramm in Abb. 4.2 dargestellt.

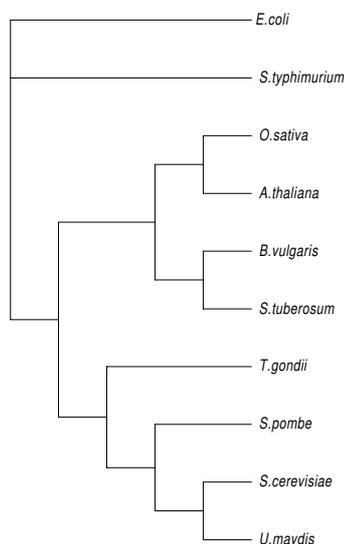


Abbildung 4.2.: Phylogenetischer Vergleich der DHOase Proteinsequenzen. Erstellt mit dem von Swofford (1993) entwickelten PAUP Algorithmus. Gattungsnamen von oben nach unten: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Beta vulgaris*, *Solanum tuberosum*, *Toxoplasma gondii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago maydis* (Gattungsnamen vgl. Tab. A.2, S.124; Acc.No. vgl. Abb. 4.3, S.98).

Anhand der aus der Peptidsequenz ermittelten Ähnlichkeitsmuster steht die DHOase aus *Arabidopsis thaliana*³ phylogenetisch näher zur DHOase aus *Oryza sativa*⁴ als zu den beiden anderen pflanzlichen DHOasen aus *Beta vulgaris*⁵ und *Solanum tuberosum*⁶.

² *expressed sequence tags*

³ Dicotyledonae, Dilleniidae, Capparales, Brassicaceae

⁴ Monocotyledonae, Commelinidae, Cyperales, Poaceae

⁵ Dicotyledonae, Caryophyllidae, Caryophyllales, Chenopodiaceae

⁶ Dicotyledonae, Asteridae, Solanales, Solanaceae

4.1.1.3. Die Peptidsequenz der DHOase enthält hochkonservierte Domänen

Untersucht man Dihydroorotasen unterschiedlicher Spezies, so findet man drei charakteristische Domänen [Abb. 4.3], die möglicherweise für die Funktion des Enzyms essentiell und daher unveränderbar sind (Guyonvarch *et al.*, 1988). Diese konservierten Bereiche werden als Teil des aktiven Zentrums angesehen (Zimmermann *et al.*, 1995), welches in *E.coli* und Säugern ein fest assoziiertes Zn^{2+} Ion in jeder der beiden Untereinheiten enthält (Washabaugh & Collins, 1984, 1986; Simmer *et al.*, 1990). Als mögliche Koordinationspunkte für das Zink-Ion werden drei konservierte Histidine angesehen, die sich in direkter Nachbarschaft zu drei konservierten sauren Aminosäuren in den Domänen A und C befinden.

Die aus *A.thaliana* (At11) und *S.tuberosum* (St5) klonierte DHOase verfügt über die gleichen oben genannten Merkmale. Auch die als „putative DHOase“ bezeichnete Sequenz aus *Oryza sativa* und die als „DHOase precursor“ bezeichnete Sequenz aus *Beta vulgaris* weisen die für DHOase typischen Merkmale auf.

Die aus Reis und Zuckerrübe stammenden DHOase-Sequenzen sind nur als Datenbankeintrag veröffentlicht. In beiden Fällen geben die Autoren die Identität als „putative“ DHOase an. Aus den Sequenzvergleichen geht jedoch hervor, daß es sich bei beiden um vollständige Sequenzen handelt.

	Acc.No.	* ↓ ↓ *		* ↓
<i>E. coli</i>	X04469	15 DWHLHLRDGDM	40 AIVMPNLAPPVTT	247 FLGTDSAPHARHRK
<i>S. typhimurium</i>	X03928	15 DWHVHLRDGDM	40 AIVMPNLASPITT	247 FLGTDSAPHSRHRK
<i>O. sativa</i>	AP003076	20 DWHLHLREGDV	45 AIVMPNLKPPVTT	254 FLGTDSAPHDKRRK
<i>A. thaliana</i>	AF000146	42 DWHLHLRDGDL	67 AIVMPNLKPPVTS	276 FLGTDSAPHERSRK
<i>B. vulgaris</i>	AJ251897	10 DWHLHLRDGDL	35 AIVMPNLRPPVTT	244 FLGTDSAPHERRRK
<i>S. tuberosum</i>	AX093580	10 DWHLHLRDGDV	35 AIVMPNLKPPITT	244 FLGTDSAPHDRRRK
<i>T. gondii</i>	AF305877	33 DMHTHLRQDEM	59 VLVMPNTIPPVTT	280 FLGSDSAPHRLAK
<i>S. pombe</i>	NC003424	10 DMHVHLRQDNM	36 AYVMPNLIPPITT	236 FFGSDSAPHPRSSK
<i>S. cerevisiae</i>	NC001144	12 DMHVHVREGAM	38 AYIMPNLQPPITT	254 FFGSDSAPHVPQNK
<i>U. maydis</i>	X63181	13 DFHVHLRQGM	39 AYVMPNLVPPITS	241 FLGSDSAPHPLANK
		Domäne A	Domäne B	Domäne C

Abbildung 4.3.: Dihydroorotasen unterschiedlicher Organismen haben mindestens drei charakteristische Domänen mit hochkonserviertem Aminosäuremuster (blaue Markierung). Konservierte Histidine sind mit ↓, Bereiche mit sauren Aminosäuren mit * markiert. Die Zahl am linken Rand der Kästen bezeichnet die Nummer der jeweils ersten wiedergegebenen Aminosäure im Protein (Gattungsnamen vgl. Tab. A.2, S.124).

4.1.1.4. Zu Dihydroorotase homologe Sequenzen in anderen pflanzlichen Systemen.

Dank engagierter Sequenzierungsprojekte gibt es zu den prominentesten Pflanzenarten EST-Datenbanken, welche mittels BLAST Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) nach Homologien mit einer vorgegebenen Sequenz durchmustert werden können. So lieferte eine Suche nach EST Sequenzen mit starker Homologie zum Arabidopsis At11 Klon 57 Ergebnisse aus dem Bereich der Magnoliophyta. Darunter *Arabidopsis thaliana* (10), *Lycopersicon esculentum* (14), *Glycine max* (9), *Solanum tuberosum* (7), *Lactuca sativa* (2), *Populus tremula* (1) und *Helianthus annuus* (1). Unter den *Monocotyledonae* fanden sich ESTs aus *Zea mays* (6), *Triticum aestivum* (4), *Sorghum bicolor* (2) und *Oryza sativa* (1). Die Zahlen in Klammern geben den *Status quo* der gefundenen ESTs von Oktober 2002 wieder, werden aber sicherlich in Folge verbesserter Technologie und steigendem Interesse innerhalb des kommenden Jahres deutlich zunehmen.

4.1.2. Entwicklung von Nachweissystemen zur Meßung der DHOase-Aktivität

Der direkte spektroskopische Nachweis der DHOase-Aktivität beruht auf der Änderung der Absorption bei 280 nm durch Bildung von Orotat. Diese Methode funktioniert in Bakterienextrakten, die eigene oder pflanzliche DHOase exprimieren. Pflanzliche Extrakte enthalten in der Regel viele aromatische und heterozyklische Substanzen mit ähnlichen Absorptionsmaxima wie Orotat, die den Nachweis verfälschen oder empfindlich stören. Eine Anwendung dieser Detektionsmethode auf pflanzliches Gewebe war daher nicht möglich und es mußten Alternativen gefunden werden.

Mit der gekoppelt fluorimetrischen Bestimmung der DHOase-Aktivität wurde ein System entwickelt, das gegenüber herkömmlichen Verfahren zahlreiche Vorzüge hat: Die nicht-radioaktive Meßmethode der Resorufin-Fluoreszenz erleichtert die Handhabung der Reagenzien und die Entsorgung der Produkte. Durch die sehr sensible Meßmethode läßt sich die Aktivität von Enzymen mit generell, temporär oder gewebespezifisch niedriger Expression wie z.B. Dihydroorotase bestimmen. Durch Verdünnung des Extraktes kann die Konzentration störender, jedoch für die Extraktion notwendiger, Reduktionsmittel unter einen Grenzwert gesenkt werden. Aufgrund der sensiblen Detektion bleibt die DHOase-Aktivität dennoch meßbar. Störungen durch Absorption aromatischer Gruppen pflanzlicher Inhaltsstoffe wurden durch die Wahl der fluorimetrisch aktiven Komponente mit Verschiebung des Emissionsspektrums in das langwelligere

Grünspektrum minimiert. Somit ist es möglich, die Enzymaktivität direkt im pflanzlichen Extrakt zu bestimmen. Eine Entsalzung ist dabei optional. Beim exemplarischen Vergleich von entsalzten und nicht-entsalzten Extrakten konnten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität festgestellt werden.

Geht es darum, die Funktionalität eines Enzyms in einer transgenen Pflanze nachzuweisen, so ist ein enzymatischer Aktivitäts-Assay von Vorteil. Während durch Northern Blot Analyse die Transkriptmenge und durch Western Blot Analyse die Proteinmenge bestimmt werden können, gibt ein enzymatischer Aktivitäts-Assay Auskunft über die tatsächliche Aktivität des reifen Proteins.

Die im Ergebnisteil aufgeführten Resultate gründen auf Messungen mit maximal 5 Replikaten, welche jeweils als Einzelmessung in einer Küvette durchgeführt wurden. Mit einem Zeitaufwand von etwa 10 Minuten je Messung ist ein hoher Durchsatz an Meßdaten mit dem Einzelfluorimeter SFM25 nicht praktikabel. Da aber im Rahmen dieser Arbeit die prinzipielle Durchführbarkeit des Assays gezeigt werden konnte und die dafür notwendigen Voraussetzungen geschaffen wurden, läßt sich das System in Zukunft für den Hochdurchsatz im Mikromaßstab optimieren. Denkbar ist eine Übertragung des Assays auf ELISA Mikrotiterplatten. Diese lassen sich mit Hilfe eines Roboters automatisch, schnell und hochpräzise pipettieren und anschließend in einem dafür geeigneten Fluorimeter messen.

4.1.2.1. Eigenschaften der pflanzlichen DHOase

Die klonierten DHOasen aus *A.thaliana* und *S.tuberosum* kodieren für 345 (At11) bzw. 346 (St5) Aminosäuren. Anhand der Aminosäuren-Komposition hat die DHOase aus Arabidopsis eine relative Masse (M_r) von 38,3 kD und ihren Isoelektrischen Punkt (pI) bei pH 6,56. Die Dihydroorotase aus Kartoffel hat eine berechnete M_r von 38,4 kD und einen pI von 6,18. Die berechneten relativen Molekülmassen sind in Einklang mit den in PAA-Gelen beobachteten Laufweiten der pflanzlichen DHOase. In *E.coli* wird DHOase als dimeres Polypeptid von jeweils 38,4 ($\pm 2,6$) kD beschrieben (Washabaugh & Collins, 1984). Die berechnete M_r der von Bäckström *et al.* (1986) klonierten DHOase aus *E.coli* beträgt 38,8 kD bei 348 AS. In Säugern ist DHOase Teil des CAD Multienzymkomplexes, der die Aktivitäten von CPSase, ATCase und DHOase in sich vereint. Dieser liegt als Homo-Hexamer mit jeweils 242 kD vor. Die daraus isolierte DHOase-Domäne hat eine M_r von ≈ 44 kD und liegt in Lösung als Dimer vor (Zimmermann *et al.*, 1995).

Das im fluorimetrischen Assay ermittelte pH-Optimum für DHOase aus *S.tuberosum*

liegt bei $\text{pH } 6,8 \pm 0,2$ [Abb. 3.4, S.52]. In *Pisum sativum* Blättern ermittelten Mazus & Buchowicz (1966) für die Bildung von Dihydroorotat ein Optimum von etwa pH 6 in 0,1 M Citrat-Phosphat Puffer. Die Bildung des Dihydroorotats wurde spektroskopisch bei 230 nm gemessen. Eine mögliche Erklärung der Abweichung von 0,6 bis einer pH-Einheit liegt in der Natur vieler aromatischer Substanzen, deren Absorptionsmaximum im UV-Spektrum liegt und deren Vorkommen in pflanzlichem Gewebe einen solchen Assay stören könnte.

Der mit Konzentrationsreihen im fluorimetrischen Assay bestimmte K_m Wert für Carbamoyl-Aspartat beträgt 0,73 mM bei pH 6,8 und 25°C [Abschnitt 3.3.3.2, S.54]. Ein vergleichbares Ergebnis für *E.coli* DHOase erzielten Sander *et al.* (1965) mit 0,8 mM (pH 5,5) bzw. Washabaugh & Collins (1984) mit 1,07 mM (pH 5,8). Für Hamster DHOase, welche aus dem CAD-Komplex proteolytisch isoliert wurde, ermittelten Kelly *et al.* (1986) einen K_m von 0,63 mM. Im Gegensatz dazu ermittelten Mazus & Buchowicz (1968a) für die DHOase in *Pisum sativum* einen erheblich höheren K_m Wert von 6,2 mM bei pH 6. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

1. *Das Enzym wurde kompetitiv gehemmt.* Ein kompetitiver Inhibitor besetzt das aktive Zentrum und kann nur durch erhöhte Substratkonzentrationen statistisch verdrängt werden. Bei gleichem v_{max} ist eine wesentlich höhere Substratkonzentration $[S]$ notwendig, um $\frac{1}{2} \cdot v_{max}$ zu erreichen. Berücksichtigt man die Tatsache, daß für *E.coli* DHOase bisher noch keine effektiven Inhibitoren bekannt wurden (Brown & Collins, 1991) und die pflanzliche DHOase eine hohe Homologie in drei als wichtig angesehenen Domänen mit der bakteriellen DHOase hat, so erscheint dies als wenig wahrscheinlich.
2. *Das Enzym arbeitete abseits seines pH-Optimums.* Das ermittelte pH-Optimum für Kartoffel DHOase liegt bei pH 6,8. Die Aktivität der *Pisum*-DHOase wurde bei pH 6 gemessen (Mazus & Buchowicz, 1968a). In dieser Umgebung zeigte die Kartoffel-DHOase in eigenen Versuchen nur etwa 40% Aktivität [Abb. 3.4, S.52] im Vergleich zum Optimum bei gleicher CAsp Konzentration.
3. *Das Enzym hatte möglicherweise einen Teil seiner Aktivität durch Beschädigung verloren.* Mazus & Buchowicz (1968a) beschreiben, daß das von ihnen verwendete Enzym bei der Aufreinigung drei Minuten auf 70°C erhitzt wurde. Es wäre möglich, daß hierdurch ein Teil der Enzymaktivität zerstört wurde.
4. *Die Abweichung ist systemisch bedingt durch die Meßmethode.* Die Detektion des DHOase-Umsatzes durch Meßung der Absorptionsänderung bei $\lambda = 230 \text{ nm}$

ist störanfällig und etwa um den Faktor 1000 weniger sensitiv⁷ als der in Abschnitt 3.2.3 [S. 50] beschriebene fluorimetrische Assay. Die Kinetikmessung einer Reaktion mit Substratkonzentrationen unterhalb des K_m ist problematisch und bedarf einer sensitiven Meßmethode. Der Umsatz wurde von Mazus & Buchowicz (1968a) durch Inkubation bei 37 °C und Abbruch nach genau einer Stunde mit 0,3 N HClO₄ bestimmt. Die Dauer des einzelnen Assays von einer Stunde ist vergleichsweise lang und kann daher zum teilweisen Verlust von Aktivität führen.

Angesichts der zuvor aufgeführten Überlegungen muß der von Mazus & Buchowicz (1968a) ermittelte K_m Wert für pflanzliche DHOase unter Vorbehalt betrachtet werden. Gestützt durch die Ergebnisse von Kelly *et al.* (1986), Sander *et al.* (1965) sowie Washabaugh & Collins (1984) kann der in eigenen Experimenten ermittelte Wert von 0,73 mM als zuverlässig angesehen werden.

Unter der Annahme, DHOase in *S.tuberosum* würde mit mindestens der Hälfte ihrer maximalen Umsatzgeschwindigkeit arbeiten, so müßte die Carbamoyl-Aspartat (CAsp) Konzentration im Cytosol mindestens 0,73 mM betragen ($730 \frac{\text{nmol}}{\text{ml}}$). Bei einem Anteil des Cytosols am gesamten Zellvolumen von etwa 10% (Lüttge *et al.*, 1994) ergäbe dies eine Konzentration von rund $73 \frac{\text{nmol}}{\text{gFG}}$. Durch leichte Modifikation des fluorimetrischen DHOase Assays sollte es möglich sein, anstatt der DHOase-Aktivität, die Carbamoyl-Aspartat Konzentration im Extrakt zu bestimmen. Da für einen schnellen Umsatz die Menge der pflanzeigenen DHOase unter Umständen nicht ausreichen könnte, müßte hierfür beispielsweise DHOase aus *E.coli* überexprimiert und gereinigt werden.

4.1.3. Subzelluläre Lokalisation der DHOase

Wie bereits in Abschnitt 1.3 [S.11] erläutert wurde, ist nach bisherigem Kenntnisstand die Lokalisation der pflanzlichen DHOase umstritten.

Die Aktivitäten der kompletten Pyrimidin *de-novo* Synthese wurden von Lovatt *et al.* (1979) in Chloroplasten-freiem Gewebe von *Cucurbita pepo* nachgewiesen. Dagegen berichten Doremus & Jagendorf (1985) die Aktivitäten der Enzyme ATCase, DHOase, OPRTase und ODCase ausschließlich in Chloroplasten. Sie konnten zeigen, daß in der Chloroplasten-Fraktion ihres Zellhomogenats im Vergleich zum Rohextrakt nur geringe Aktivitäten der Markerenzyme aus Cytosol, Mitochondrien und Peroxysomen zu finden waren. Sie folgerten daraus, daß die in der Chloroplasten-Fraktion gemesse-

⁷Yves Gibon (MPI Golm), pers. Mitteilung

nen Aktivitäten also nicht durch Verunreinigungen bei der Fraktionierung hervorgerufen wurden. Die Aktivitäten der oben genannten Enzyme wurden jedoch laut Angaben nur in der Chloroplasten Fraktion bestimmt. Lediglich im Fall der ATCase wurde eine Gegenprobe durchgeführt, indem Protoplasten aufgebrochen und über einen Saccharosegradienten getrennt wurden. Es ist also nicht auszuschließen, daß sich meßbare DHOase Aktivitäten auch in Fraktionen anderer Kompartimente wiederfinden.

Indizien gegen eine chloroplastidäre Lokalisation der pflanzlichen DHOase lieferten die Ergebnisse der Mustererkennungs-Algorithmen [Tab. 3.7, S.57]. Untersucht wurde die Translation des mittels RACE-PCR ermittelten 5'-Vollängenklons **St5xl** aus *S.tuberosum* und die von Zhou *et al.* (1997) veröffentlichte Peptidsequenz der DHOase aus *A.thaliana*. Keiner der auf Erkennung plastidärer Targetsequenzen spezialisierten Algorithmen konnte in der Aminosäuresequenz beider DHOasen ein Signal erkennen, welches auf eine Lokalisation in Plastiden hindeuten könnte. Einige der neuronalen Netzwerke erkannten ein tendenziell mitochondriales Signal (Predotar, TargetP). Dies wurde jedoch von dem auf mitochondriale Signale spezialisierten Algorithmus Mitoprot nicht bestätigt. Die Mehrzahl der Algorithmen konnte für die eingegebenen Sequenzen keine Prognose erstellen. Folglich lassen diese Ergebnisse zwei mögliche Folgerungen zu: Entweder es handelt sich um eine bisher unbekannte Transitsequenz, die daher von den Rechenmodellen nicht erkannt werden konnte, oder DHOase verfügt über kein Transitsignal. Letztere Möglichkeit würde bedeuten, daß das reife Protein im Cytoplasma verbliebe. Dafür spräche auch das für pflanzliche DHOase ermittelte pH-Optimum von 6,5 bis 7 [Abb. 3.4, S.52], welches nahe am pH-Wert des Cytoplasmas (pH 7) liegt. Die Bedingungen des Chloroplastenstroma (pH 8) und des Thylakoidlumens (pH 5) lägen dagegen außerhalb des ermittelten Wirkungsoptimums der DHOase. Bei pH 8 hat DHOase aus Kartoffel nur noch 20% und bei pH 5,5 nur noch 10% ihrer maximalen Aktivität.

Einen weiteren Anhaltspunkt brachte die Untersuchung der GFP-Fusionsproteine hervor [Abschnitt 3.4.3.2, S.62]. Es ist hier ganz deutlich zu erkennen, daß sich das EGFP-Signal der Konstrukte STCG1 und STCG2 räumlich von der Chlorophyllfluoreszenz der Chloroplasten unterscheidet [Abb. 3.15, 3.16, 3.17, S.64 & S.65]. Die Aufnahmen der GFP-Fusionen aus STCG1 und STCG2 haben hohe Ähnlichkeiten miteinander [Abb. 3.15, S.64 & Abb. 3.17, S.65]. Dies bedeutet, daß die mögliche Transitsequenz **ini** in ihrer Funktion unabhängig vom Rest des Proteins ist. Hätte die **ini** Sequenz jedoch keinerlei translokatorische Relevanz, so wäre ein Verbleib des Proteins im Cytosol wahrscheinlich. Vergleicht man die Aufnahmen der mit Kontrollkonstrukten transformierten Zellen mit denen der DHOase:GFP-Fusionen, so fällt die hohe Ähn-

lichkeit mit der cytosolischen Kontrolle pA7-GFP auf [Abb. 3.14, S.63].

Anhand der vorangegangenen Indizien muß die von Doremus & Jagendorf (1985) postulierte These der chloroplastidären Lokalisation der pflanzlichen Dihydroorotase in Frage gestellt werden. Eine cytosolische Lokalisation erscheint dagegen plausibler. Wobei ein prinzipielles, nicht jedoch exklusives Vorkommen in Plastiden durchaus denkbar wäre. Tatsächlich wurden aber bisher noch keinerlei Isoformen der DHOase isoliert, welche auf eine parallele Existenz einer plastidären und einer cytosolischen DHOase schließen lassen könnte.

4.1.4. Resumée des Abschnitts 4.1

- ☛ DHOase wurde erfolgreich aus *S.tuberosum* und *A.thaliana* kloniert. Beide Proteinsequenzen weisen die für DHOase typischen, hochkonservierten Domänen auf.
- ☛ Durch die Entwicklung eines hochsensitiven Enzymassays auf fluorimetrischer Basis konnten Aktivität, Enzymkinetik und pH-Optimum der pflanzlichen DHOase bestimmt werden.
- ☛ Das ermittelte pH-Optimum der pflanzlichen DHOase liegt bei $\text{pH } 6,8 \pm 0,2$.
- ☛ Die Michaelis & Menten (1913) Konstante K_m der Kartoffel-DHOase für Carbamoyl-Aspartat bei pH 6,8 beträgt 0,73 mM.
- ☛ Die ausschließlich plastidäre Lokalisation der pflanzlichen DHOase (Doremus & Jagendorf, 1985) muß in Frage gestellt werden. Eigene Resultate legen eine cytosolische Lokalisation nahe.

4.2. Einfluß reduzierter DHOase-Expression auf Wachstum und Metabolismus

Das Enzym Dihydroorotase ist ein wichtiges Glied in der Kette der Pyrimidin *de-novo* Synthese. Ist diese vermindert oder fällt gar ganz aus, so ist mit einer Beeinträchtigung aller Prozesse zu rechnen, welche auf Pyrimidin-Nukleotide angewiesen sind. Durch den „*Salvage-Pathway*“ [Abschnitt 1.1.2, S.5] kann nur der Bestand an Pyrimidin-Nukleotiden durch Wiederverwertung neu verteilt werden. Der Aufbau erfolgt einzig über die *de-novo* Synthese und somit auch über die DHOase.

4.2.1. Reduzierte DHOase-Expression beeinflusst das Wachstum

In Abschnitt 3.5.3 [S.68] konnte gezeigt werden, daß eine verminderte Expression der DHOase zu einer negativen Beeinträchtigung des Wachstums führt. Bei geringfügiger Reduktion der DHOase-Expression zeigen sich zunächst noch keine phänotypischen Merkmale. Erst mit stärkerer Reduktion der Expression treten deutliche Unterschiede in Wurzelwachstum, Biomasse und Zelldichte hervor.

4.2.1.1. Verringerte DHOase-Expression hemmt das Wurzelwachstum

Die Wurzelspitze ist ein Gewebe mit einem außerordentlich hohen Maß an Biosynthese und Zellteilung. In ihr befindet sich der Vegetationspunkt, der von der Wurzelhaube (*Kalyptra*) geschützt wird. Die randständigen Zellen sondern permanent Schleim ab und lösen sich schließlich aus dem Zellverband. Durch ständige Zellteilung wird der Verlust der Kalyptrazellen kompensiert und das Wurzelwachstum vorangetrieben.

Durch Beobachtung von Kartoffel-Transformanten auf vertikalen Agarplatten konnte gezeigt werden, daß eine verminderte DHOase-Expression einen negativen Einfluß auf das Wurzelwachstum hat [Abb. 3.22, S.69]. Dabei nimmt sowohl die mittlere Summe der Wurzellängen pro Pflanze, als auch die mittlere Wurzellänge jedes Wurzelaufläufers ab. Daher ist es nicht verwunderlich, daß einhergehend mit diesem Phänomen auch die Wachstumsrate pro Pflanze bzw. pro Wurzelstrang mit verminderter DHOase-Expression abnimmt.

Betrachtet man die mittlere Wurzellänge [Abb. 3.22 c] und die mittlere Wachstumsrate [Abb. 3.22 d], so fällt auch hier auf, daß der Effekt sich erst bei der stark inhibierten Transformante ROSa 20 und der sehr stark inhibierten Transformante ROSa 40 bemerkbar macht. Möglicherweise kann der hohe Bedarf an Nukleotiden für die Zellteilung nicht mehr ausreichend gedeckt, und auch nicht mehr kompensiert werden.

4.2.1.2. Verringerte DHOase-Expression bewirkt eine Reduktion in der Biomasse

Analog zu den Beobachtungen des Wurzelwachstums ist auch in Bezug auf die Gesamtbiomasse ein deutlicher Rückgang in Frisch- und Trockengewicht bei geringerer DHOase-Expression erkennbar [Abb. 3.23, S.70]. Im Gegensatz zum Wurzelwachstum, bei dem ein Rückgang erst bei stark reduzierter DHOase-Expression eintritt, ist bei allen Transformanten eine verminderte Biomasse im Vergleich zum WT erkennbar. Dabei muß man die Transformanten jedoch wieder in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe mit verhältnismäßig geringer DHOase-Reduktion (ROSa 34 und ROSa 19) und eine zweite Gruppe mit starker bis sehr starker DHOase-Reduktion (ROSa 20 und ROSa 40). Im Fall der ersten Gruppe verhält sich der Rückgang des Gesamtfrischgewichtes proportional zum Rückgang der Wurzelbiomasse [Abb. 3.24 a, S.71]. Bei der zweiten Gruppe hat das Wurzel-Frischgewicht einen geringeren Anteil am Gesamt-Frischgewicht, was sich in der deutlich erhöhten Sproß/Wurzel-Relation äußert.

Die Sproß/Wurzel-Relation des Trockengewichtes bleibt mit Ausnahme von ROSa 40 bei allen Transformanten konstant [Abb. 3.24 b]. D.h. ein vermindertes Wurzelwachstum geht einher mit einem verminderten Sproßwachstum. Zieht man in Betracht, daß Nährstoffe und Spurenelemente durch das Wurzelgewebe aufgenommen und in den Sproß transportiert werden, so erscheint dies plausibel. Das Wurzelgewebe, insbesondere die Wurzelspitze, ist als sehr teilungsaktives und somit *sink*-Gewebe angewiesen auf eine Mindestverfügbarkeit an Nukleotiden für Zellteilung und Transkription. Für die außerordentlich stark betroffene Transformante ROSa 40 könnte dies bedeuten, daß ihr Wurzelzuwachs außerhalb der Gewebekultur nahezu vollständig eingestellt ist und daher auch nicht mehr ausreichend Nährstoffe für einen Ausbau der Biomasse bereitgestellt werden könnten.

Andererseits könnte aber auch der Aufbau von Biomasse generell und unabhängig vom Gewebetyp gehemmt sein. D.h. die Zelle erhält ihren Stoffwechsel aufrecht, kann sich aber bedingt durch Nukleotid-Mangel nur mit geringerer Rate teilen.

4.2.1.3. Verringerte DHOase-Expression vermindert die Zellteilung

Da sich die relativen Blattflächen der Transformanten ROSa 34, 19 und 20 zum WT in Analogie zum Frischgewicht verhalten, stellte sich die Frage, ob es Unterschiede in Bezug auf die Zellgröße gibt. In Abb. 3.26 [S.73] ist deutlich zu erkennen, daß es unter der Transformantengruppe mit schwach reduzierter DHOase-Expression (ROSa 34

und 19) in Blättern keinen signifikanten Unterschied in der Zelldichte zum WT gibt. Als einzige Pflanze mit stark reduzierter DHOase-Expression konnte ROSa 20 untersucht werden. Sie zeigte im Vergleich zum Wildtyp und den anderen Transformanten eine deutlich geringere Zelldichte. Bei gleicher Position der untersuchten Blätter am Sproß und geringerer Blattfläche [Abb. 3.25] müssen die Zellen im Mittel größer sein als die des Wildtyps. Aufgrund der sehr starken Wachstumseffekte der Transformante ROSa 40 erreichten deren Blätter nicht die für einen Vergleich notwendige Mindestgröße und konnte daher nicht in die Beobachtungen mit einbezogen werden.

Es ist durchaus denkbar, daß Transformanten mit stark reduzierter DHOase-Expression nicht mehr fähig sind, ihre Zellteilung im notwendigen Maße aufrecht zu erhalten. Eine leichte bis mittlere Reduktion, wie sie in den Transformanten ROSa 34 und 19 zu beobachten ist, kann womöglich durch Umverteilung der Pyrimidin-Nukleotide kompensiert werden. Oder aber die DHOase-Kapazität im WT ist deutlich höher als der tatsächliche Bedarf neuer Pyrimidin-Nukleotide, so daß eine geringe Reduktion der Expression ohne merkbare Folgen bleiben würde. Sinkt jedoch die Expression unter einen bestimmten Schwellenwert, zeigen sich phänotypische Auswirkungen.

4.2.1.4. Starke Reduktion der DHOase-Expression ist für die Pflanze letal.

Am Beispiel der Transformante ROSa 40 läßt sich erkennen, welche Auswirkungen eine sehr stark reduzierte DHOase-Expression auf die Pflanze hat. Es ist anzunehmen, daß hierdurch die komplette Pyrimidin *de-novo* Synthese stark eingeschränkt wird. Überführt man den Sproß von Gewebekultur auf Sand oder Erde, stellt dieser das Wachstum ein [Abb. 3.20, S.68]. Die Transformante ROSa 40 hat von allen durchmusterten Pflanzen die geringste DHOase-Expression. Die Proteinmenge ist an der immunologischen Nachweisgrenze. Die Restaktivität der verbleibenden DHOase reicht offensichtlich aus, um die Lebensfunktionen aufrecht zu erhalten, aber Wachstum, Knollen- oder Blütenbildung sind ausgeschlossen. Es ist wenig wahrscheinlich, in Zukunft eine Transformante mit noch geringerer Expression der DHOase zu finden, da ein Verlust dieser Enzym-Aktivität zum Tod der Pflanze führen würde. Erst kürzlich wurde am *Salk Institute for Biological Studies* eine Arabidopsis T-DNA Insertionsmutante verfügbar (SIGnAL⁸ No.: SALK_062860). Die Insertion verursacht eine Verschiebung des Leserasters am 3'-Ende des *pyrC*-Gens. Die hat zur Folge, daß der mutierten DHOase am C-Terminus 70 der ursprünglichen 345 Aminosäuren fehlen, bzw. durch falsche ersetzt wurden. Die Mutation liegt jedoch jenseits der als wichtig erachteten

⁸Salk Institute Genomic Analysis Laboratory; <http://signal.salk.edu>

Domänen A, B und C [Abb. 4.3, S.98]. Eine katalytische Aktivität könnte also dennoch vorhanden sein. Die Mutante wird in dieser Hinsicht untersucht werden⁹.

4.2.2. Auswirkungen reduzierter DHOase-Expression auf den Metabolismus.

Neben den mehr oder weniger offensichtlichen Auswirkungen auf das Wachstum mußte ein Blick auf die metabolischen Vorgänge in den transformierten Pflanzen geworfen werden. Das Wachstum der Pflanze ist neben externen Faktoren wie Licht, Temperatur, Feuchtigkeit und Ernährung auch von internen Parametern wie Verfügbarkeit von Kohlehydraten, Nukleotiden und deren Vor- bzw. Zwischenprodukten abhängig.

4.2.2.1. Stark reduzierte DHOase-Expression beeinflusst den Kohlehydrat Metabolismus in bestimmten Geweben.

Ein Mangel an Dihydroorotase hat in Wurzel- und *Source*-Gewebe offensichtlich keine klar zu Tage tretenden Auswirkungen auf den Hexosespiegel¹⁰. Die Transformanten verhalten sich in dieser Hinsicht sehr unterschiedlich, jedoch keiner Tendenz folgend, die sich mit dem Maß an reduzierter DHOase-Expression in Korrelation bringen ließe.

In Wurzelgewebe ist weder für Stärke, noch für Saccharose eine signifikante Korrelation mit der DHOase-Expression erkennbar. In *Source*-Blättern dagegen nimmt sowohl die Stärkemeenge, als auch die Saccharose-Konzentration mit abnehmender DHOase-Expression zu. Dieser Anstieg der Speichersaccharide Stärke und Saccharose mit zunehmender Inhibierung der DHOase-Expression ist gegenläufig zur Biomasse. Möglicherweise ist die Kohlenstoff-Fixierung durch die Reduktion der DHOase-Expression nicht, oder nur geringfügig beeinträchtigt. Gleichzeitig ist jedoch die Zellteilung und das Wachstum vermindert. Somit könnte dieser C-Überschuss die Folge eines verringerten Bedarfs an Kohlehydraten sein.

4.2.2.2. Verringerte DHOase-Expression bewirkt keine erkennbare Verschiebung des Nukleotid-Stoffwechsels.

Das Ergebnis der Nukleotid-Analyse der Transformanten mit reduzierter DHOase-Expression und des WT [Abschn. 3.5.5, S.76] zeigt ein überraschendes Bild. Anhand der z.T. stark beeinträchtigten DHOase-Expression und der einhergehenden Wachstumseffekte wäre ein Mangel an Dihydroorotat zu erwarten und als Folge eventuell

⁹R. Zrenner, pers. Mitteilung

¹⁰bezüglich Fructose und Glucose

ein Mangel an Pyrimidin-Nukleotiden. Statt dessen unterscheidet sich der Gehalt an UDP, UTP und UDP-Glucose nicht signifikant von dem des Wildtyps [Tab. 3.8, S.77]. Obwohl beispielsweise Transformante ROSa 20 eine starke Reduktion in der DHOase-Expression und somit der Pyrimidin *de-novo* Synthese erfährt, scheint dies das Gleichgewicht der gelösten Uridin-Nukleotide nicht zu stören. Es ist denkbar, daß DHOase in Bezug auf Reduktion der Enzymmenge einen weiten Toleranzbereich hat und daher bis zu einem kritischen Schwellenwert das Gleichgewicht der Pyrimidin Nukleotide aufrecht erhalten kann. Offensichtlich ist die Pflanze bemüht, bei einer verminderten *de-novo* Synthese das Gleichgewicht der gelösten Nukleotide durch Gegenregulation anderer Prozesse zu stützen. So zum Beispiel durch eine verminderte Zellteilungsrate. Schließlich verbraucht die Replikation des Chromosomensatzes einer Zelle bei einer geschätzten Genomgröße von 10^9 Basenpaaren $2 \cdot 10^9$ Nukleotide, davon etwa 10^9 Pyrimidin-Nukleotide. Das entspricht ca. $3,3 \text{ fmol}^{11}$ pro Zelle. Das spezifische Gewicht eines Kartoffelblattes beträgt rund $45 \frac{\text{mg}}{\text{cm}^2}$. Dieser Wert ist nach Walter (2001) auf alle postemergenten Blattspreiten übertragbar, da diese eine konstante Dicke aufweisen. Bei etwa $6 \cdot 10^3$ Zellen pro mm^2 Blattfläche¹² ergibt sich ein Gewicht von etwa 75 ng pro Zelle. Der Pyrimidin-Bedarf pro Replikation beläuft sich damit auf $\frac{3,3 \text{ fmol}}{75 \text{ ng}}$, das entspricht $44 \frac{\text{nmol}}{\text{g}}$. Ein guter Mittelwert für die aus Blättern extrahierten löslichen Pyrimidine beläuft sich auf 100 nmol pro Gramm Frischgewicht. Davon entfallen etwa 80% auf UDP-Glucose. Mit anderen Worten bedeutet dies, daß für einen Replikationsschritt 44% der löslichen Pyrimidine eingesetzt werden müssen. Läßt man UDP-Glucose dabei außer Acht beläuft sich der Bedarf auf 220% der verfügbaren Ressourcen. Es wird also deutlich, daß DNA-Synthese und Zellteilung nur mit aktiver Pyrimidin *de-novo* Synthese möglich ist.

Interessant ist in diesem Zusammenhang noch die Tatsache, daß sich Pyrimidin-Nukleotide aus grünen Blättern zu etwa $100 \frac{\text{nmol}}{\text{gFG}}$ als DNA und etwa $700 \frac{\text{nmol}}{\text{gFG}}$ als RNA extrahieren lassen. Dies würde bedeuten, daß mit über 80-90% der größte Anteil der Pyrimidin-Nukleotide in gebundener Form als DNA und RNA vorliegt.

¹¹femto Mol = 10^{-15} Mol

¹²gezählt in allen Schichten unter dieser Flächeneinheit

4.2.3. Resumée des Abschnitts 4.2

- ☞ Reduzierte DHOase-Expression führt zu verringerter Zellteilungsrate. Es sind im Mittel weniger, dafür größere Zellen pro Flächeneinheit vorhanden.
- ☞ Pflanzen mit stark reduzierter DHOase-Expression zeigen deutlich geringeres Wachstum und damit auch geringere Biomasse im Vergleich zum Wildtyp.
- ☞ Meßbare Effekte in Wachstum und Teilungsrate treten erst bei starker Reduktion der Pyrimidin-Synthese auf.
- ☞ Eine komplette Inaktivierung der DHOase ist mit dem Leben der Pflanze nicht vereinbar. Starke Störung der Dihydroorotase führt zur Einstellung des Wachstums.
- ☞ Eine Beeinträchtigung der Pyrimidin *de-novo* Synthese hat keinen signifikanten Einfluß auf den Gehalt an Glucose, Fructose, Saccharose oder Stärke.
- ☞ Der Gehalt an löslichen Pyrimidin-Nukleotiden wie UDP, UTP oder UDP-Glucose ist auch bei Pflanzen mit stark reduzierter DHOase-Expression konstant zum Wildtyp.

4.3. Einfluß erhöhter DHOase-Expression auf Wachstum und Metabolismus

Wenn eine verminderte DHOase-Expression das Wachstum der Pflanze hemmt, welche Auswirkungen hat dann ein gegenüber dem Wildtyp erhöhtes Angebot an DHOase? Um dies zu untersuchen wurden zwei unterschiedliche Kartoffel-Transformationslinien hergestellt:

1. DHOase aus *E.coli* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors für die Expression in allen Geweben.
2. DHOase aus *E.coli* unter Kontrolle des B33 Patatin-Promotors (Rocha-Sosa *et al.*, 1989).

Die Pflanzen beider Transformationen wurden zeitgleich unter den selben Bedingungen kultiviert. Durch Verwendung des B33 Promotors sollte eine Knollen-spezifische Expression erzielt werden mit nur geringer Expression im restlichen Gewebe. Damit können direkte Vergleiche beider Transformationslinien angestellt werden. Während sich die DHOase-Überexpression unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in nahezu allen Geweben auswirken sollte, ist eine Expression unter der Kontrolle vom B33-Promotor nur in Knollen zu erwarten. In Gegenwart hoher Saccharose Konzentrationen kann der B33-Promotor auch in anderen Geweben wie z.B. Blättern induziert werden.

4.3.1. Auswirkung erhöhter DHOase-Expression auf den Metabolismus

4.3.1.1. Erhöhte DHOase-Expression korreliert direkt mit gesteigerter Enzym-Aktivität.

Die Erhöhung der DHOase-Expression bewirkt in *Sink*-Blättern beider Transformationslinien eine drastische Steigerung der Enzym-Aktivität um den Faktor 25-150 (CaMV 35S-Promotor, RMECs) [Abb. 3.35, S.84] bzw. Faktor 6-80 (B33-Promotor, RMBECS) [Abb. 3.40, S.90].

Die verhältnismäßig geringe Menge transkribierter mRNA der *E.coli* DHOase in der Transformante RMECs 11 [Abb. 3.31, S.81] führt bereits zu einer etwa 25-fachen Steigerung der DHOase-Aktivität im Vergleich zum WT. Analog verhält sich die B33-Transformante RMBECS 9. Auch bei ihr bewirkt eine geringe Menge mRNA eine DHOase Aktivitätssteigerung um den Faktor 6 in Relation zum WT. Da mittels Northernblot-Analyse nur eine Momentaufnahme der zum Zeitpunkt der Ernte transkribierten mRNA

angezeigt wird, können daraus keine direkten Rückschlüsse auf die daraus resultierende Proteinmenge gezogen werden. Möglicherweise hat Dihydroorotase eine große Halbwertszeit und könnte sich daher in der Zelle akkumulieren.

Nun stellt sich die Frage, weshalb auch die Transformanten mit stark erhöhter DHOase-Expression, die unter Kontrolle des B33-Promotors stehen, eine meßbare Aktivität in *Sink*-Blättern aufweisen. Denn das B33 DHOase-Konstrukt sollte im Gegensatz zum CaMV-Konstrukt nur in Geweben mit hoher Saccharose-Konzentration exprimiert werden, wie z.B. in Knollen.

Es ist möglich, daß der Promotor bereits in Gewebekultur induziert wurde. Der Nähr-Agar enthält neben M&S-Salzen auch 2% Saccharose. Nach Umsetzen der Setzlinge in Erdkultur fällt dieser Faktor jedoch weg und eine Induktion sollte nicht mehr gegeben sein. Betrachtet man zum Vergleich den Saccharosegehalt in *Source*-Blättern der B33-Transformanten [Abb. 3.41, S.92] so fällt auf, daß dieser in keiner der Transformanten gegenüber dem WT erhöht ist.

4.3.1.2. Erhöhte DHOase-Expression und Aktivität hat keine signifikante Auswirkung auf die Gesamt-Proteinmenge.

In keiner der beiden Transformationslinien konnte eine signifikante Erhöhung der Gesamt-Proteinmenge ermittelt werden. Obwohl die DHOase Aktivität in den Transformanten bis auf das hundertfache der Aktivität im Wildtyp ansteigt [Abb. 3.35, S.84 & Abb. 3.40, S.90], hat diese keine meßbaren Auswirkungen auf die Proteinmenge.

4.3.1.3. Erhöhte DHOase-Expression bewirkt keine signifikante Verschiebung der Kohlehydrat-Konzentration.

Es wurde gezeigt, daß eine deutlich verminderte DHOase-Expression zur Akkumulation von Saccharose und Stärke führt. Ein gegenteiliger Effekt in Pflanzen mit stark erhöhter DHOase-Expression ist jedoch nicht zu erkennen. Die Stärke- und Saccharose-Mengen in Transformanten unter Kontrolle des B33-Promotors zeigen keinerlei signifikante Änderung im Vergleich zum WT. Auch die Transformanten unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors lassen nur schwer eine Korrelation zwischen gesteigerter Enzymaktivität und Kohlehydratgehalt erkennen. Der sich im Schaubild [Abb. 3.36, S.85] abzeichnende Anstieg der Saccharosemenge in *Source*-Blättern ist nicht signifikant verschieden zum WT. Nur ein Anstieg des Stärkegehaltes in *Source*-Blättern zum ersten Erntezeitpunkt ist zu erkennen. Diese Tendenz wird jedoch durch eine erhöhte

Stärke-Akkumulation des WT in *Source*-Blättern zum 2. Entnahmezeitpunkt nicht aufrecht erhalten.

Somit läßt sich unter den nahezu optimalen Wachstumsbedingungen im Gewächshaus kein erkennbarer Effekt auf das Wachstum oder den Ertrag der Pflanzen nachweisen. Unter nicht optimalen Bedingungen könnte aber die erhöhte DHOase-Expression für die Pflanze von Vorteil sein.

4.3.2. Auswirkung erhöhter DHOase-Expression auf den Phänotyp

Beide Transformationen haben je eine Linie mit sehr starker DHOase-Überexpression. Nur diese zeigten ein ähnliches phänotypisches Merkmal. Die Sproßachse war gestaucht und die Blätter runzelig [Abb. 3.34, S.83 und Abb. 3.38, S.88]. Alle anderen Transformanten waren weder im Wachstum noch in der Biomasse vom Wildtyp zu unterscheiden.

Davon ausgenommen muß die Transformante RBECs 10 betrachtet werden. Sie fällt durch außergewöhnliche Veränderungen der Infloreszenz auf [Abb. 3.38 c, S.88]. Bei dieser Erscheinung handelt es sich sicherlich nicht um einen Effekt der DHOase-Expression, sondern eher um eine zufällige Insertion der T-DNA in ein Strukturgen, welches für die Blütenbildung zuständig ist. Dies erscheint die plausibelste Erklärung zu sein, da RBECs 10 unter den ausgewählten Linien noch die geringste Erhöhung der *E.coli* DHOase hat und somit dem Wildtyp am ähnlichsten sein sollte. Daher wurde diese Transformante in alle folgenden Analysen nicht mit einbezogen.

Der auffällige Phänotyp der beiden Transformanten mit jeweils höchster DHOase-Expression (RMECs 50 und RBECs 25) trat jedoch nur in der ersten Wachstumsperiode zu Tage. Schon kurze Zeit nach dem Transfer von Gewebekultur auf Erde wurden die Veränderungen der Blätter sichtbar. Zum ersten Erntezeitpunkt (49 Tage nach Transfer) hatten beide Transformanten nur etwa 50% des WT Frischgewichtes. Mit zunehmendem Alter wurde dieser Effekt jedoch ausgeglichen, so daß sie zum zweiten Erntezeitpunkt (78 Tage nach Transfer) in Größe, Frischgewicht, Knollenertrag und Aussehen nicht vom WT zu unterscheiden waren. Möglicherweise wurde dieser Effekt begünstigt durch die Verringerung des Wachstums der übrigen Pflanzen, sobald diese eine gewisse Größe erreicht hatten. Ein limitierender Faktor könnte das Kulturgefäß sein, das zwar groß dimensioniert, jedoch nur von endlicher Größe war. Folglich hätten zum späteren Zeitpunkt nicht die beiden genannten Transformanten ihr Wachstum beschleunigt, sondern alle anderen das ihre reduziert.

Alle aufgeführten Experimente wurden bei geradezu idealen Wachstumsbedingun-

gen (Licht, Feuchtigkeit, Temperatur und Ernährung) für Kartoffeln durchgeführt. Möglicherweise könnte die Erhöhung der DHOase-Expression unter Freilandbedingungen für die Pflanze von Vorteil sein.

4.3.3. Resumée des Abschnitts 4.3

- ☛ Die Enzym-Aktivität der mit *E.coli*-DHOase transformierten Pflanzen kann mit Hilfe des fluorimetrischen Assays in allen Geweben gemessen werden.
- ☛ Geringe Steigerung der DHOase-Expression bewirkt einen Anstieg der Enzym-Aktivität um ein Vielfaches der Wildtyp-Aktivität.
- ☛ Der B33-Promotor ist auch in *Sink*-Gewebe induziert.
- ☛ Die gesteigerte DHOase-Expression hat keine merkliche Auswirkung auf die Gesamt-Proteinmenge.
- ☛ Pflanzen mit DHOase Überexpression zeigen keine Veränderung in Aussehen, Wachstum und Biomasse. Nur Transformanten mit sehr hoher DHOase-Expression zeigen einen ungewöhnlichen Phänotyp.

5. AUSBLICK & ZUSAMMENFASSUNG

5.1. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse über das Enzym Dihydroorotase in höheren Pflanzen gewonnen. Die Entwicklung eines hochsensitiven Nachweises der DHOase Aktivität eröffnete neue Perspektiven der Analyse.

Eine der ersten Aufgaben sollte es sein, diese Methodik auf den Maßstab von Mikrotiterplatten zu skalieren. Somit könnten pro Messung etwa 44 Proben¹ erfaßt werden. Die dafür notwendige schnelle und zugleich präzise Verteilung der Proben und Agenzien erfordert den Einsatz eines Roboters. Eine komplette Versuchslinie könnte somit in einem Bruchteil des bisherigen Zeitaufwandes in Bezug auf DHOase Aktivität untersucht werden. Auch die Suche nach möglichen Inhibitoren der pflanzlichen DHOase ließe sich so vereinfachen.

Eine eingehende Untersuchung der seit kurzer Zeit verfügbaren Arabidopsis T-DNA Insertionsmutante in *pyrC* (SALK_062860) könnte weitere Einblicke in die Funktionalität des Enzyms und der dafür essentiellen Domänen liefern. Auch für diese Anwendung wird sich der Enzymassay als wichtiges Hilfsmittel erweisen.

Pflanzen mit Überexpression der *E.coli* DHOase zeigten unter den nahezu idealen Wachstumsbedingungen im Gewächshaus keine Ertragsteigerung in Biomasse oder Knollenbildung. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß sie unter weniger optimalen Bedingungen, wie sie beispielsweise im Freiland vorherrschen, durchaus einen Vorteil gegenüber dem Wildtyp haben. Es wäre daher interessant, diese Transformationslinien unter unterschiedlichen Bedingungen in Temperatur, Licht, Feuchtigkeit oder Nährstoffangebot zu kultivieren.

Mittel- bis langfristig wird es notwendig sein, Aktivitätsassays für alle Enzyme der Pyrimidin *de-novo* Synthese zu entwickeln. Dies wird, wie im Fall der DHODH, die Klonierung von Hilfsenzymen erfordern, sofern diese nicht käuflich zu erwerben sind. Zwar sind für einige Enzyme Verfahren zur Aktivitätsbestimmung veröffentlicht², jedoch sind diese in der Regel sehr aufwendig und daher nicht für den Hochdurchsatz geeignet.

¹44 Proben à 2 Replikate plus 4 Nullwerte plus 4 Eichwerte = 96

²CPSase (Pierson, 1980); ATCase (Prescott & Jones, 1969; Pastra-Landis *et al.*, 1981)

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Klonierungen und Überexpressionen verschiedener DHOasen und der DHODH in Kombination mit der Entwicklung des hochsensitiven Nachweises könnte in Zukunft auch dazu genutzt werden, um die Metabolite des Stoffwechselweges der Pyrimidin *de-novo* Synthese in geeigneten Extrakten (z.B. TCA) zu bestimmen. Eine Automatisierung des Prozesses ist auch hierfür durchaus denkbar.

5.2. Zusammenfassung

Die Pyrimidin *de-novo* Synthese versorgt die Zelle mit Pyrimidin-Nukleotiden, welche essentielle Bestandteile der Nukleinsäuren darstellen und als energielieferndes Cosubstrat für eine Vielzahl von Reaktionen wichtig sind. Das Enzym Dihydroorotase (DHOase) katalysiert in Pflanzen den dritten von insgesamt fünf Reaktionsschritten, die zur Bildung von UMP notwendig sind.

Durch heterologe Komplementation von *E.coli* „Knockout“-Mutanten wurde das für Dihydroorotase kodierende Gen aus *Solanum tuberosum* und *Arabidopsis thaliana* kloniert. Beide Sequenzen kodieren für das *in vivo* funktionelle Protein. Im Falle der Kartoffel DHOase wurde durch RACE-PCR die vollständige untranslatierte 5'-Region (5'-UTR) ermittelt. Mit Hilfe spezieller Suchalgorithmen wurden mit dieser Information Rückschlüsse auf die kontrovers diskutierte subzelluläre Lokalisation des Enzyms *in vivo* gezogen. Die bisherige Meinung, DHOase sei im Plastiden lokalisiert, erscheint hiernach wenig wahrscheinlich. Durch transiente Genexpression, vermittelt durch Partikelbeschuss, konnten zwei unterschiedliche DHOase:GFP Fusionsproteine mit *Confocaler Laser Scanning Mikroskopie* (CLSM) im Cytosol von Arabidopsis Epidermiszellen nachgewiesen werden. Somit muß die chloroplastidäre Lokalisation der DHOase in Frage gestellt werden und diese statt dessen als cytosolisch postuliert werden.

Die Entwicklung eines hochsensitiven fluorimetrischen Enzymassays ermöglichte die nicht-radioaktive Bestimmung der DHOase Aktivität in pflanzlichem Gewebe. Erstmals konnte somit ohne aufwendige Reinigungsprozeduren pflanzliche DHOase in Bezug auf pH-Optimum und Michaelis-Menten Konstante charakterisiert werden.

Zur Untersuchung der Bedeutung der Pyrimidin *de-novo* Synthese wurden transgene Pflanzen mit reduzierter DHOase Expression hergestellt. Vermittelt durch die *Antisense*-Technik konnten Pflanzen mit verschieden stark ausgeprägter Reduktion der DHOase Expression isoliert werden. Diese wurden in Hinblick auf Metabolismus, Wachstum, Biomasse und Zelldichte untersucht. Es zeigte sich, daß bei starker Reduktion der DHOase Expression die Zellteilung deutlich vermindert ist und in Folge des geringeren Wachstums Kohlehydrate anstauen. Folglich kann durch endogene oder exogene Inhibierung der DHOase das Wachstum der Pflanze effektiv unterbunden werden.

In zwei weiteren Ansätzen wurden Kartoffelpflanzen mit dem für DHOase kodierenden Gen aus *E.coli* transformiert, welches unter Kontrolle des CaMV 35S-, bzw. des B33-Patatin Promotors steht. In Transformanten beider Linien wurden bis zu einhundertfach erhöhte DHOase Aktivitäten gemessen. Eine Steigerung des Pflanzenwachstums oder des Knollenertrages infolge der erhöhten DHOase Expression wurde jedoch nicht beobachtet.

Mit den Resultaten dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse über die bis dato wenig erforschte pflanzliche Pyrimidin *de-novo* Synthese gewonnen. Der Diskussion zur subzellulären Lokalisation der DHOase konnten neue Impulse gegeben werden. Die Entwicklung des fluorimetrischen Enzymassays bereitete den Weg für zukünftige Analysen im Hochdurchsatz.

5.3. Summary in english

Pyrimidine *de-novo* synthesis provides nucleotides, which are cosubstrates to a multitude of enzymatic reactions and essential compounds for nucleic acids. The enzyme Dihydroorotase (DHOase) in plants catalyzes the third of five reactions, which are necessary to synthesize UMP.

The genes, coding for DHOase in *Arabidopsis thaliana* and *Solanum tuberosum*, were cloned by means of heterologous complementation of *E.coli* knockout mutants. Both sequences are coding for the functional protein *in vivo*. Furthermore the complete 5' untranslated region (5'-utr) of potato DHOase was revealed by RACE-PCR. That information, processed by special search algorithms, gave hints to the subcellular localisation of DHOase, which has been discussed controversial in the past. According to latest results the localization of DHOase in chloroplasts seems to be less likely. Two different DHOase:GFP fusions for transient gene expression were transformed into epidermal cells of *Arabidopsis* by particle bombardment. GFP signals were detected by confocal laser scanning microscopy (CLSM) in the cytosol. Thus the chloroplastidary localization of DHOase has to be reconsidered and instead postulated to be cytosolic.

Development of a highly sensitive fluorimetric enzyme assay gave way to measure DHOase activity in plant tissue by non-radioactive means. For the first time DHOase has been characterized in regard to pH-optimum and Michaelis-Menten constant without the need of extensive purification procedures.

Mediated by antisense suppression transgenic plants with reduced levels of DHOase expression were made to investigate the importance of pyrimidine *de-novo* synthesis. These plants were analyzed in regard to metabolism, growth, biomass and cell density. It was shown that a high reduction of DHOase expression led to a decrease in cell division and as a consequence of that to an accumulation of carbohydrates. Thus plant growth can be effectively blocked by endogenous or exogenous inhibition of DHOase.

In two further approaches plants were transformed with the *E.coli* DHOase coding gene under control of the CaMV 35S promoter and the B33-Patatine promoter respectively. In both sets transformants showed DHOase activities up to a hundred fold higher than the wildtype. However an increase in plant growth or tuber production was not observed.

Finally the results of this PhD thesis shed some light on the so far dimly lit knowledge on plant pyrimidine *de-novo* synthesis. The discussion about subcellular localization of DHOase in plants has been revived. The development of a fluorimetric enzyme assay paved the way for future high throughput analysis.

A. ANHANG

A.1. Abkürzungen

Es gelten die Konventionen des *Système International d'Unités* (SI-Einheiten). Die darin definierten Einheiten und Abkürzungen werden daher an dieser Stelle nicht explizit aufgeführt.

Abk.	Bedeutung
A	Adenin / Adenosin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut; für Ethanol 100%, unvergällt
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amplex Red	10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
At11	Sequenz der klonierten DHOase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> cDNA
ATCase	Aspartat-Transcarbamoylase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat
bidest	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin / Cytidin
ca.	circa
CaMV	Blumenkohl-Mosaikvirus (engl.: <i>cauliflower mosaic virus</i>)
CAsp	N-Carbamoyl-Aspartat
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
CDP	Cytidin-5'-Tiphosphat
CDPSase	Cytidin-5'-Diphosphat Synthase
CDP-Star	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor)Tri-cyclo[3.3.1.13,7]Decan}-4-yl)-1-Phenyl
CIP	Chloroform-Isoamylalkohol-Phenol (24+1+25)
CLSM	Confokale Laser Scanning Mikroskopie

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Abk.	Bedeutung
CPSase	Carbamoylphosphat Synthetase
cRNA	komplementäre RNA (engl.: <i>complementary RNA</i>)
cTP	Chloroplastidäres Transitpeptid
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
CTPsase	Cytidintriphosphat Synthetase
cv.	Kultivar
°C	Grad Celsius
d	desoxy
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyllindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin-11-dUTP
d.h.	das heißt
DHOase	Dihydroorotase
DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dpi	Punkte pro Zoll (<i>dots per inch</i>)
ds	doppelsträngig
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
e ⁻	Elektron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetra-acetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-(b-aminoethylether)N,N,N',N'-tetra-acetat
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
g	Gravitationskonstante ($= 9,81 \cdot \frac{m}{s^2}$)
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
G	Guanin / Guanosin
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Abk.	Bedeutung
g/v	Gewicht pro Volumen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	Hochdruck Flüssigchromatografie (engl.: <i>high pressure liquid chromatography</i>)
HRP	Horseradish Peroxidase
inkl.	inklusive
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (Gatersleben)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	kilo (= 10^3)
Kan	Kanamycin
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanine
λ	Wellenlänge [nm]
lacI	Gen, das den Repressor des lac-Operons codiert
lacZ	Gen, das die β -Galactosidase codiert
m	milli (= 10^{-3})
M	Molarität [$\frac{mol}{l}$]
μ	mikro (= 10^{-6})
mcs	Polylinker (<i>multiple cloning site</i>)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger ribonucleic acid)
MA11	E.coli Transformante mit At11 in pBluescript SK
MSt5	E.coli Transformante mit St5 in pBluescript SK
M&S	Murashige und Skoog Salze (Murashige & Skoog, 1962)
mTP	Mitochondriales Transitpeptid
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid
n	nano (= 10^{-9})
N	Normalität einer Lösung
NBT	Nitroblau-Tetrazolium (4'-Nitro-tetrazoliumblau)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
Nr.	Nummer
NTA	Nitrilotriessigsäure (engl.: <i>nitrilo-tri-acetic acid</i>)
NMP	Nukleosidmonophosphat
NPT II	Neomycin Phosphotransferase II; \Rightarrow Kanamycinresistenz
OCS	Octopin-Synthase
OD	Optische Dichte
ODCase	Orotidinmonophosphat Decarboxylase

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Abk.	Bedeutung
oligo-dT	ein Oligonukleotid, bestehend aus dTTP
OMP	Orotidin-5'-Monophosphat
OPRTase	Orotat-Phosphoribosyltransferase
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PGI	Phospho-Gluco Isomerase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration
P_i	anorganisches Phosphat PO_4^{3-} (engl.: <i>inorganic phosphate</i>)
PMS	Phenazin Methosulfat (N-Methylidibenzopyrazin methylsulfat)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PP	Pyrophosphat ($P_2O_7^{4-}$)
Poly(A)	Polyadenylatkette
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
psi	= 0,069 Bar (engl.: <i>pounds per square inch</i>)
PTGS	posttranslational gene silencing
PVDF	Polyvinylidifluorid
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
pyrB	Gen, codiert für Aspartat-Transcarbomylase (ATCase)
pyrC	Gen, codiert für Dihydroorotase (DHOase)
pyrD	Gen, codiert für Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH)
r	Radius
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
rcf	engl: <i>relative centrifugal force</i> $1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot n^2$ r (Radius) [cm]; n (rpm) [min^{-1}]
Rif	Rifampicin
RMECs	<i>E.coli</i> DHOase exprimierende Transformanten mit CaMV Promotor
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuklease
ROSa	<i>Solanum tuberosum</i> DHOase-Antisense Transformanten
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur 21 °C
S	Svedberg ($1 S = 10^{-13} sec.$)
s.	siehe
sec	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: <i>sodium dodecylsulfate</i>)
SP	Signalpeptid
SPS	Saccharose-Phosphat Synthase
St5	Sequenz der klonierten DHOase aus <i>Solanum tuberosum</i> cDNA

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von vorheriger Seite

Abk.	Bedeutung
T	Thymin / Thymidin
TAE	Tris-Acetat/EDTA - Elektrophorese-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEA	Triethanolamin
Thi	Thiamin
TIFF	Tagged Image File Format
Triton X-100	Polyoxyethylen(9,10)p-t-octylphenol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaureat
T ₀	Nullwert
U	Uracil / Uridin
U	μmol umgesetzt Substrat pro Minute (= 1,67 · 10 ⁻⁸ Katal)
UDP	Uridin-5'-Diphosphat
UDPkase	Uridindiphosphatkinase
UE	Untereinheit
UGPase	UDP-Glucose Pyrophosphorylase
UMP	Uridin-5'-Monophosphat
UMPkase	Uridinmonophosphatkinase
UNP	Uridin Nukleotid Phosphat (UMP, UDP, UTP)
usw.	und so weiter
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
V	Volt
VE	Voll-Entionisiert (Wasser)
vgl.	vergleiche
vlnr	von links nach rechts
v/v	Volumen pro Volumen
v.o.	von oben
VT	Volumenteile
WT	Wildtyp
x	-fach, mal (Konzentrationsfaktor)
z.B.	zum Beispiel
6xHis	Peptidsequenz sechs aufeinanderfolgender Histidine

A.2. Lateinische Bezeichnung diverser Spezies

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Ackerschmalwand
<i>Beta vulgaris</i>	Chenopodiaceae	Rübe
<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Soja
<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	Sonnenblume
<i>Lactuca sativa</i>	Asteraceae	Gartenlattich
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanaceae	Tomate
<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	Tabak
<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	Reis
<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	Erbse
<i>Populus tremula</i>	Salicaceae	Zitter-Pappel, Espe
<i>Solanum tuberosum</i>	Solanaceae	Kartoffel
<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	Mohrenhirse, Durra
<i>Triticum aestivum</i>	Poaceae	Weizen
<i>Zea mays</i>	Poaceae	Mais

A.3. Oligonukleotid Primer

Code	Nukl.	T _m	T _m	Sequenz 5' → 3'	rev.
KanRh pET28b	15	53,3		CGG GGA AAT GTG CGC	x
KanR-v pPD28b	15	56,0		GGC AGC AGC CAC TGG	
st5-race-i	24	62,7	72	TAT TGC CCT CCC AAA GTG ATG TGC	x
st5-race-a	23	64,2	72	CCC AAA TAC GAC CTG GCT CTC TC	x
st5-ini-fw	22	58,4	72	ATC TGG ATC CAT GAG GAC TTT G	
st5-ini-rv	24	57,6	71	GAT TTC TAG AAT TGA GAG CTC CAT	x
st5-xl-rv	21	57,9	72	ATT GTC TAG ACA GAG AGG AGC	x
EGFP-fw	20	57,3	71	CAC ATC TAG ACA TGG TGA GC	
EGFP-rv	22	58,4	72	GAT TGT CGA CTC ACT TGT ACA G	x
ECpyrD-fw	21	57,9	62	CTT GAC ATG TAC TAC CCC TTC	
ECpyrD-rv	21	57,9	62	GGA GGA TCC GAT ATG GGT AAC	x
ECpyrC-fw	25	81,3	65	GTC GAC ATG ACT GCA CCA TCC GAG G	
ECpyrC-rv	23	68,9	54	CGA TTT TTA TTG TTT AAC GGA CC	x

Tabelle A.2.: Zu Klonierungszwecken verwendete Oligonukleotidprimer in 5' -> 3' Orientierung. Eine Markierung in der Spalte *rev.* kennzeichnet den Primer als reverse complement.

A.4. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die mir im Laufe der Entstehung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Davon gibt es sehr viele und eigentlich kann ich hier gar nicht alle nennen, aber ich möchte dann doch die eine oder den anderen besonders hervorheben.

danke - merci - thanks
vergeltsgott
gracias - tack
go raibh maith agat
mahalo - meitaki

- 🍃 **MARK „Cheffe“ STITT**
...for a-maize-ing lectures, the spanish inquisition, flying wigwams, the record in stacking overhead transparencies before the image becomes invisible and - *of course* - for letting me be part of the team.
- 🍃 meine Chefin **RITA „Frau Doktor“ ZRENNER**
...die mich in den vergangenen sechs Jahren während Laborpraktikum, Diplomarbeit und Doktorarbeit ausgezeichnet (ja!) betreut hatte. Unvergessen ihre immer wieder neuen Ideen und Projekte, das regelmäßige „*mein Acrobat ist weg*“-Phänomen, die *taz* am Morgen, und natürlich die zahlreichen Qualitätsprüfungen seltener kaledonischer Getreide-Extrakte („handgezapft mit Zertifikat!“).
- 🍃 meine **Eltern**, die das alles bis hierher überhaupt erst möglich gemacht haben.
- 🍃 Die AG Zrenner: **DIANA SUNKEL** für die Kartoffel-Ernte und den allgemeinen Spaßfaktor. „**NOBBY**“ **GIERMANN** für mehrere Jahre Gesellschaft im Keller. **PETER LANGE** für den 8 Uhr-Gang zur Kaffee-Tränke und die Hilfe beim „Aufbau Ost“.
- 🍃 **YVES „Mr.Roboto“ GIBON**
Der mit Erfahrung („ah oui, alors!“) und vielen Ideen wesentlich zum Gelingen der Enzymassays beigetragen hat und der mit viel Tüftelei am Roboter so manch stumpfsinnige Arbeit automatisierte. Nicht zu vergessen seinen ausgeprägten Sinn für „*savoir vivre et des drôles cadeaux au Noël*“ (Rustique reift am besten bei Raumtemperatur).
- 🍃 **ULI SCHURR**
...für die sensationelle Idee, einer Handvoll Leute, die „TCP/IP“ fehlerfrei buchstabieren konnten, die Betreuung des Botanik Netzwerkes zu übertragen. Es gab in den vergangenen drei Jahren kaum eine Arbeit, die mich mehr Zeit und Nerven gekostet hätte - aber auch keine, die spannender und lehrreicher war.
- 🍃 **ACHIM WALTER**...unser Spezialist für Blattgeodäsie, der den Pflanzen beim Wachsen zuschaut. (Was machen Kartoffeln, wenn sie schlafen?) An dieser Stelle einen Gruß nach Biosphere II. **STEFAN** „Raider heisst jetzt TWIX“ **TERJUNG**, der mir mit Rat und Tat in mikroskopischen Fragen und in der Bedienung von HEURISKO zur Seite stand. **NORBERT KIRCHGESSNER** und **TOBIAS DIERIG** für die Programmierung und Optimierung von HEURISKO Workspaces zur Bestimmung der Blattflächen und der Auszählung von Zellkernen.
- 🍃 **MAREN WANDREY** und **ULRIKE SIMON-ROSEN** für den Einführungskurs an CLSM und GeneGun und der gemeinsamen Suche nach Zellen mit Leuchtreklame; Das MPIMP **Greenteam** für die „all inclusive“ Pflanzenhege. Die Net-Bugs **ECKHARD** und **WILFRIED** für jede Menge Extrawünsche (wie schön, wenn man mal nicht selbst für den Kram verantwortlich ist). **KERSTIN OTTO** für schnelle Erledigung von Formalitäten und 9 Monaten Gästehaus.
- 🍃 **MARKUS „Pinus sylvestris“** für jede Menge schrägen Spaß während des Studiums und der Laborjahre, die lustige Kuh, sowie für eine Antwort auf die Frage, was man auf Orkney essen soll. **PETRA MATT** für die angenehme Reisebegleitung im 5¹³-Sprinter. **Dr.**(soviel Zeit muß sein)**JÜRGEN DAMS** für advanced imaging. **MICHAEL MELTER** für blubbernde Exkursionen, die IT-Hotline und packende Matches. **KLAUS „LongJohnSilver“ HERDEL**, the Master of Dungeons, the Godfather of Tournaments, King of the Arena...für ausgiebige Hardwarebenchmarks im 3D Bereich und für schweisstreibende Berg- und-Tal Läufe.
- 🍃 *Last but not least at all* natürlich **RUTH**, für 200 Bindestriche und dafür, daß sie meine Launen und besonders meine geistige Abwesenheit bei der Entstehung dieser Arbeit ertragen mußte und sich deswegen nur selten beschwerte..... und überhaupt... :-)

Außerdem danke ich: der **Deutschen Bahn AG** für überteuerten und schlechten Kaffee. **Siegfried Bär** für ein amuses Buch. **The L^AT_EX-Project** und allen Paket-Schreibern für ein unvergleichliches Textsystem (Kein Absturz! - Null Datenverlust!). Meiner Kaffeemaschine für viele Tassen schwarzes Gold. **Digital Extremes** für viele Stunden Ablenkung.

Literaturverzeichnis

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Arabidopsis-Genome-Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **408**, 796–815.
- Ashihara, H. (1978). Orotate phosphoribosyl transferase and orotidin-5' - monophosphate decarboxylase of black gram (*Phaseolus mungo*) seedlings. *Z. Pflanzenphysiol.* **87**, 225–241.
- Ashihara, H., Stasolla, C., Loukanina, N. & Thorpe, T. A. (2000). Purine and pyrimidine metabolism in cultured white spruce (*Picea glauca*) cells: metabolic fate of 14 C-labeled precursors and activity of key enzymes. *Physiol. Plant.* **108** (1), 25–33.
- Bäckström, D., Sjöberg, R.-M. & Lundberg, L. (1986). Nucleotide sequence of the structural gene for dihydroorotase of *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **160**, 77–82.
- Beckwith, J. R., Pardee, A. B., Austrian, R. & Jacob, F. (1962). Coordination of the synthesis of the enzymes in the pyrimidine pathway of *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **5**, 618–634.
- Benoist, P., Feau, P., Pliss, A., Vorisek, J., Antonelli, R., Raska, I. & Denis-Duphil, M. (2000). The yeast *ura2* protein that catalyses the first two steps of pyrimidines biosynthesis accumulates not in the nucleus but in the cytoplasm, as shown by immunocytochemistry and *ura2*-green fluorescent protein mapping. *Yeast*, **16** (14), 1299–1312.
- Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* **12**, 8711–8721.
- Boldt, R. & Zrenner, R. Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. in press.
- Bosher, J. & Labouesse, M. (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nature Cell Biol.* **2** (2), E31–E36.
- Bottomley, R. H. & Lovig, C. A. (1967). Subcellular distribution of rat aspartate carbamoyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* **148** (2), 588–590.
- Bär, S. (1993). *Forschen auf Deutsch. Der Machiavelli für Forscher und solche, die es noch werden wollen*. Verlag Harri Deutsch.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brandenburg, S., Williamson, C. & Slocum, R. (1998). Characterization of a cDNA encoding the small subunit of *Arabidopsis* carbamoyl phosphate synthetase (accession no. U73175) (PGR 98-087). *Plant Physiol.* **117** (2), 717.
- Brown, D. & Collins, K. (1991). Dihydroorotase from *Escherichia coli*. substitution of Co(II) for the active site Zn(II). *J. Biol. Chem.* **266** (3), 1597–1604.
- Campbell, L. (1957). Reductive degradation of pyrimidines. III. purification and properties of dihydrouracil dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **227**, 693–700.
- Chaparian, M. & Evans, D. (1988). Intracellular location of the multidomain protein CAD in mammalian cells. *FASEB J.* **2** (14), 2982–2989.
- Chen, J. & Jones, M. (1976). The cellular location of dihydroorotate dehydrogenase: relation to de novo biosynthesis of pyrimidines. *Arch. Biochem. Biophys.* **176**, 82–90.
- Claros, M. & Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* **241** (3), 779–786.
- Cormack, B., Valdivia, R. & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173** (1), 33–38.
- Cubitt, A., Heim, R., Adams, S., Boyd, A., Gross, L. & Tsien, R. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20** (11), 448–455.
- Davidson, J., Rao, G., Niswander, L., Andreano, C., Tamer, C. & Chen, K. (1990). Organization and nucleotide sequence of the 3' end of the human CAD gene. *DNA Cell Biol.* **9** (9), 667–676.

- Denis-Duphil, M. (1989). Pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the *ura2* cluster gene, its multifunctional enzyme product, and other structural or regulatory genes involved in de novo UMP synthesis. *Biochem. Cell Biol.* **7** (9), 612–631.
- Doremus, H. (1986). Organization of the pathway of de novo pyrimidine nucleotide biosynthesis in pea (*Pisum sativum* L. cv progress No. 9) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 112–119.
- Doremus, H. & Jagendorf, A. (1985). Subcellular localization of the pathway of de novo pyrimidine nucleotide biosynthesis in pea leaves. *Plant Physiol.* **79**, 856–861.
- Doremus, H. & Jagendorf, A. (1987). Site of synthesis of the enzymes of the pyrimidine biosynthetic pathway in oat (*Avena sativa* L.) leaves. *Plant Physiol.* **83**, 657–658.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & Von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005–1016.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. & von Heijne, G. (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*, **8** (5), 978–984.
- Emanuelsson, O. & Von Heijne, G. (2001). Prediction of organellar targeting signals. *Biochim. Biophys. Acta.* **1541** (1-2), 114–119.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J., Bellini, C. & Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97** (21), 11650–11654.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S. & Mello, C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **391**, 744–745.
- Fox, B. A. & Bzik, D. J. (2002). De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature.* **415** (6874), 926–929.
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. & Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, **21**, 285–294.
- Gibon, Y. (2001). Influence of fugitive polyamines, produced by dairy products, incubated at room temperature to human olfactory system. *Ann. Rev. Dairy Res.* **1**, 266–272.
- Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M. & Schell, J. (1984). The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* **3**, 835–846.
- Giermann, N. (2002). *Untersuchungen zur genomischen Organisation und Expression der Pyrimidinnukleotid de novo Synthese-Enzyme in Tabak (Nicotiana tabacum) und Kartoffel (Solanum tuberosum)*. PhD thesis, Universität Heidelberg.
- Giermann, N., Schröder, M., Ritter, T. & Zrenner, R. (2002). Molecular analysis of de novo pyrimidine synthesis in solanaceous species. *Plant Mol. Biol.* **50** (3), 393–403.
- Grebenok, R. J., Lambert, G. M. & Galbraith, D. W. (1997). Characterization of the targeted nuclear accumulation of GFP within the cells of transgenic plants. *Plant J.* **12** (3), 685–696.
- Grenson, M. (1969). The utilization of exogenous pyrimidines and the recycling of uridine-5'-phosphate derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, as studied by means of mutants affected in pyrimidine uptake and metabolism. *Eur. J. Biochem.* **11**, 249–260.
- Guyonvarch, A., Nguyen-Juilleret, M., Hubert, J. & Lacroute, F. (1988). Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* URA4 gene encoding dihydroorotase. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 134–141.
- Hammond, D. & Gutteridge, W. (1984). Purine and pyrimidine metabolism in the trypanosomatidae. *Mol. Biochem. Parasitol.* **13** (3), 243–261.
- Hawes, C., Saint-Jore, C. M., Brandizzi, F., Zheng, H., Andreeva, A. V. & Boevink, P. (2001). Cytoplasmic illuminations: in planta targeting of fluorescent proteins to cellular organelles. *Protoplasma*, **215** (1-4), 77–88.
- Hawlitcshek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F. & Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell*, **53** (5), 795–806.
- Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R. & Stitt, M. (2001). A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* **13** (3), 535–551.
- Hernalsteens, J.-P., van Vliet, F., DeBeuckeleer, M., Depicker, A., Engler, G., Lemmers, M., Holsters, M., van Montagu, M. & Schell, J. (1980). The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature.* **287**, 654–656.

- Heyworth, P. G., Gutteridge, W. E. & Ginger, C. D. (1984). Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* **176** (1), 55–60.
- Höfgen, R. & Willmitzer, L. (1992). Transgenic potato plants depleted for the major tuber protein patatin via expression of antisense RNA. *Plant Science*. **87**, 45–54.
- Horsch, R., Fry, J., Hoffmann, N., Eichholtz, D., Rogers, S. & Fraley, R. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, **223**, 496–498.
- Invitrogen (2000). *GeneRacer Kit. For full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RLM-RACE)*. Invitrogen Corporation.
- Jones, E. J. (1980). Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 253–279.
- Jorgensen, R. A., Atkinson, R. G., Forster, R. L. S. & Lucas, W. J. (1998). An RNA-based information superhighway in plants. *Science*, **279**, 1486–1487.
- Kanamori, I., Ashihara, H. & Komamine, A. (1980). Subcellular distribution and activity of enzymes involved in uridine-5'-monophosphate synthesis in *Vinca rosea* cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **96**, 7–16.
- Kanamori-Fukuda, I., Komamine, A. & Ashihara, H. (1981). Pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Vinca rosea* cells: changes in the activity of the de novo and salvage pathways during growth in a suspension culture. *J. exp. Bot.* **32** (126), 69–78.
- Kanehisa, M. (2002). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Database. www.genome.ad.jp/kegg/.
- Katahira, R. & Ashihara, H. (2002). Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta*. **215** (5), 821–828.
- Keegstra, K. & Cline, K. (1999). Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell*. **11**, 557–570.
- Kelly, R., Mally, M. & Evans, D. (1986). The dihydroorotase domain of the multifunctional protein CAD. Subunit structure, zinc content, and kinetics. *J. Biol. Chem.* **261** (13), 6073–6083.
- Kendall, J. M. & Badminton, M. N. (1998). Aequorea victoria bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends Biotechnol.* **16** (5), 216–224.
- Kenobi, O. W. & Maul, D. (2000). Cell death induced by impact of visible laser beams on intact tissue. *J. Exp. Jd Tech.* **58**, 422–451.
- Khyse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic blotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of protein from polyacrylamide to nitrocellulose. *Biochem. Biophys. Methods*. **10**, 203–209.
- Kim, H., Kelly, R. E. & Evans, D. R. (1992). The structural organization of the hamster multifunctional protein CAD. controlled proteolysis, domains, and linkers. *J. Biol. Chem.* **267** (10), 7177–7184.
- Klein, T., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. & Sanford, J. (1988). Transfer of foreign genes into intact maize cells with high velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85** (12), 4305–4309.
- Kooter, J., Matzke, M. & Meyer, P. (1999). Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* **4** (9), 340–347.
- Krysan, P. J., Young, J. C. & Sussman, M. R. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in arabidopsis. *Plant Cell*. **11** (12), 2283–2290.
- Lacroute, F. (1968). Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **95**, 824–832.
- Ledaig, M., Alvenie, B., Bush, M. & Ellen, P. (1971). A method to extract phenolic compounds from germinating barley. *J. Cal. Dist.* **21**, 12–21.
- Leffel, S., Mabon, S. & Stewart, C. J. (1997). Applications of green fluorescent protein in plants. *Biotechniques*, **23** (5), 912–918.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. & Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*. **16** (21), 4743–4751.
- Lieberman, I. & Kornberg, A. (1954). Enzymatic synthesis and breakdown of a pyrimidine, orotic acid. *J. Biol. Chem.* **207**, 911–924.
- Lindmark, D. G. & Jarroll, E. L. (1982). Pyrimidine metabolism in *Giardia lamblia* trophozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **5** (5), 291–296.
- Lineweaver, H. & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658–666.
- Lippold, H. J. (1982). Quantitative succinic dehydrogenases EC 1.3.99.1 histochemistry a comparison of different tetrazolium salts. *Histochemistry*. **76** (3), 381–406.
- Lovatt, C. J., Albert, L. S. & Tremblay, G. C. (1979). Regulation of pyrimidine biosynthesis in intact cells of *Cucurbita pepo*. *Plant Physiol.* **64**, 562–569.

- Lüttge, U., Kluge, M. & Bauer, G. (1994). *Botanik*. 2. edition, VCH-Weinheim.
- Mazus, B. & Buchowicz, J. (1966). Dihydropyrimidinase activity in pea plants. *Acta Biochim Pol.* **13**, 267–273.
- Mazus, B. & Buchowicz, J. (1968a). Purification and properties of dihydro-oroase from pea plants. *Acta Biochim Pol.* **15** (4), 317–325.
- Mazus, B. & Buchowicz, J. (1968b). Dihydropyrimidinase of pea plants - purification and properties. *Acta Biochim Pol.* **15** (4), 327–337.
- Mazus, B. & Buchowicz, J. (1972). Activity of enzymes involved in pyrimidine metabolism in the germinating wheat grains. *Phytochem.* **11**, 77–82.
- Michaelis, L. & Menten, M. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Zeitschr.* **49**, 333–369.
- Minet, M., Dufour, M. & Lacroute, F. (1992). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* **2** (3), 417–422.
- Minic, Z., Simon, V., Penverne, B., Gaill, F. & Hervé, G. (2001). Contribution of the bacterial endosymbiont to the biosynthesis of pyrimidine nucleotides in the deep-sea tube worm *Riftia pachyptila*. *J. Biol. Chem.* **276** (26), 23777–23784.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.
- Nagy, M., Laporte, J., Penverne, B. & Herve, G. (1982). Nuclear localization of aspartate transcarbamoylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **92** (3), 790–794.
- Nagy, M., Le Gouar, M., Potier, S., Souciet, J. L. & Herve, G. (1989). The primary structure of the aspartate transcarbamylase region of the URA2 gene product in *Saccharomyces cerevisiae*. features involved in activity and nuclear localization. *J. Biol. Chem.* **264** (14), 8366–8374.
- Nakai, K. & Kanehisa, M. (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics.* **14** (4), 897–911.
- Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* **2** (4), 279–289.
- Nasr, F., Bertauche, N., Dufour, M. E., Minet, M. & Lacroute, F. (1994). Heterospecific cloning of *Arabidopsis thaliana* cDNAs by direct complementation of pyrimidine auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. cloning and sequence analysis of two cDNAs catalysing the second, fifth and sixth steps of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway. *Mol Gen Genet.* **244**, 23–32.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering,* **10**, 1–6.
- O'Donovan, G. A. & Neuhard, J. (1970). Pyrimidine metabolism in microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **34** (3), 278–343.
- Ogawa, J. & Shimizu, S. (1994). Beta-ureidopropionase with N-carbamoyl-alpha-L-amino acid amidohydrolase activity from an aerobic bacterium, *Pseudomonas putida* IFO 12996. *Eur. J. Biochem.* **223**, 625–630.
- Orlovich, D. & Ashford, A. (1993). Polyphosphate granules are an artefact of specimen preparation in the ectomycorrhizal fungus, *Psilothus tinctorum*. *Protoplasma,* **173**, 91–102.
- Palmer, L. & Cove, D. (1975). Pyrimidine biosynthesis in *Aspergillus nidulans*: isolation and preliminary characterisation of auxotrophic mutants. *Mol Gen Genet.* **138** (3), 243–255.
- Pastral-Landis, S., Foote, J. & Kantrowitz, E. (1981). An improved colorimetric assay for aspartate and ornithine transcarbamylases. *Anal. Biochem.* **118** (2), 358–363.
- Paulus, T. & Switzer, R. (1979). Synthesis and inactivation of carbamyl phosphate synthetase isozymes of *Bacillus subtilis* during growth and sporulation. *J. Bacteriol.* **140** (3), 769–773.
- Peltier, J. B., Friso, G., Kalume, D. E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I. & van Wijk, K. J. (2000). Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell.* **12** (3), 319–341.
- Pierson, D. (1980). A rapid colorimetric assay for carbamyl phosphate synthetase i. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **3** (1), 31–37.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene,* **111**, 229–233.
- Prescott, L. M. & Jones, M. E. (1969). Modified methods for the determination of carbamyl aspartate. *Anal. Biochem.* **32**, 408–419.

- Promega (1998). *pGEM-T Easy Vector Systems*. Promega.
- Qiagen (2000). *Plasmid Purification Handbook*. QIAGEN.
- Qiagen (2001). *QIAQuick Spin Handbook*. www.qiagen.de.
- Rathinasabapathi, B., Sigua, C., Ho, J. & Gage, D. A. (2000). Osmoprotectant beta-alanine betaine synthesis in the plumbaginaceae: S-adenosyl-L-methionine dependent N-methylation of beta-alanine to its betaine is via N-methyl and N,N-dimethyl beta-alanines. *Physiol. Plant.* **109** (3), 225–231.
- Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B. & Maas, C. (1996). Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 5888–5893.
- Robinson, C. & Ellis, R. (1984). Transport of proteins into chloroplasts. partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of important precursor polypeptides. *Eur. J. Biochem.* **142** (2), 337–342.
- Robinson, C., Hynds, P. J., Robinson, D. & Mant, A. (1998). Multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **38** (1-2), 209–221.
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. & Willmitzer, L. (1989). Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a patatin class I gene. *EMBO J.* **8**, 23–29.
- Sander, E. G., Wright, L. D. & McCormick, D. B. (1965). Evidence for function of a metal ion in the activity of dihydroorotase from *Zymobacterium oroticum*. *J. Biol. Chem.* **240**, 3628–3630.
- Santoso, D. & Thornburg, R. (1998). Uridine 5'-monophosphate synthase is transcriptionally regulated by pyrimidine levels in *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol.* **116** (2), 815–821.
- Schein, A. I., Kissinger, J. C. & Ungar, L. H. (2001). Chloroplast transit peptide prediction: a peek inside the black box. *Nucleic Acids Res.* **29** (16), e82.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A. & Sanger, H. (1993a). RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. I. purification and physical properties. *J. Biol. Chem.* **268** (16), 11851–11857.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A. & Sanger, H. (1993b). RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. catalytic in vitro properties. *J. Biol. Chem.* **268** (16), 11858–11867.
- Schmundt, D., Stitt, M., Jaehne, B. & Schurr, U. (1998). Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *Plant J.* **16** (4), 505–514.
- Scott, A., Wyatt, S., Tsou, P. L., Robertson, D. & Allen, N. S. (1999). Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. *BioTechniques*, **26**, 1125–1132.
- Shibata, H., Ochiai, H., Sawa, Y. & Miyoshi, S. (1986). Localization of carbamoylphosphate synthetase and aspartate carbamoyltransferase in chloroplasts. *Plant Physiol.* **80**, 126–129.
- Simmer, J., Kelly, R., Rinker, A., Zimmermann, B., Scully, J., Kim, H. & Evans, D. (1990). Mammalian dihydroorotase: nucleotide sequence, peptide sequences, and evolution of the dihydroorotase domain of the multifunctional protein CAD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87** (1), 174–178.
- Simon, V., Purcarea, C., Sun, K., Joseph, J., Frebourg, G., Lechaire, J.-P., Gaill, F. & Hervé, G. (2000). The enzymes involved in synthesis and utilization of carbamylphosphate in the deep-sea tube worm *Riftia pachyptila*. *Mar. Biol.* **136** (1), 115–127.
- Smith, N., Singh, S., Wang, M., Stoutjesdijk, P., Green, A. & Waterhouse, P. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature.* **407** (6802), 319–320.
- Spors, S. & Merker, H. (1969). Fine structural localization of aspartate carbamoyltransferase in rat liver. *Histochemie*, **17** (1), 78–82.
- Stam, M., de Bruin, R., van Blokland, R., van der Hoorn, R., Mol, J. & Kooter, J. (2000). Distinct features of post-transcriptional gene silencing by antisense transgenes in single copy and inverted t-DNA repeat loci. *Plant J.* **21** (1), 27–42.
- Stitt, M. & Sonnewald, U. (1995). Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **46**, 341–368.
- Stratagene (1999). *PCR-Script Amp Cloning Kit*. Stratagene.
- Sugiura, M. (1989). The chloroplast chromosomes in land plants. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 51–70.
- Suttle, D., Bugg, B., Winkler, J. & Kanalas, J. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85** (6), 1754–1758.

- Swofford, D. (1993). PAUP: a computer program for phylogenetic inference using maximum parsimony. *J. Gen. Phys.* **102** (6), 9A.
- Tauchen, M. O., Ambros, W. & Prokopetz, J. (1987). Der Watzmann ruft. Ein Rustikal in 8 Hörbildern.
- Thorncroft, D., Sherson, S. M. & Smith, S. M. (2001). Using gene knockouts to investigate plant metabolism. *J. exp. Bot.* **52** (361), 1593–1601.
- Tsien, R. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544.
- Turner, R. J., Bonner, E. R., Grabner, G. K. & Switzer, R. L. (1998). Purification and characterization of Bacillus subtilis PyrR, a bifunctional pyr mRNA-binding attenuation protein/uracil phosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **273** (10), 5932–5938.
- van der Krol, A., Lenting, P., Veenstra, J., van der Meer, I., Koes, R., Gerats, A., Mol, J. & Stuitje, A. (1988). An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*. **333**, 866–869.
- van der Krol, A., Mur, L., Beld, M., Mol, J. & Stuitje, A. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. **2** (4), 291–299.
- Vaucheret, H., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J., Mourrain, P., Palauqui, J. & Vernhettes, S. (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* **16** (6), 651–659.
- van Heijne, G. (1999). A day in the life of Dr K. or how I learned to stop worrying and love Lysozyme: a tragedy in six acts. *J. Mol. Biol.* **293** (2), 367–379.
- van Heijne, G., Steppuhn, J. & Herrmann, R. G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180** (3), 535–545.
- Wagner, K. G. & Backer, A. I. (1992). Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. *Int. Rev. Cytol.* **134**, 1–84.
- Walsh, T. A., Green, S. B., Larrinua, I. M. & Schmitzer, P. R. (2001). Characterization of plant beta-ureidopropionase and functional overexpression in Escherichia coli. *Plant Physiol.* **125**, 1001–1011.
- Walter, A. (2001). *Räumliche und zeitliche Wachstumsmuster in Wurzeln und Blättern dikotyler Pflanzen*. PhD thesis, Universität Heidelberg.
- Walther, R., Koch, G., Wasternak, C. & Neumann, D. (1989). Localization of carbamyl-phosphate-metabolizing enzymes in different organelles within tomato (Lycopersicon esculentum) cells. *Biochem Physiol Pflanzen*, **185**, 201–209.
- Walther, R., Wald, K., Glund, K. & Tewes, A. (1984). Evidence that a single polypeptide catalyses the two step conversion of orotate to UMP in cells from a tomato suspension culture. *J. Plant Physiol.* **116**, 301–311.
- Wang, C. C., Verham, R., Tzeng, S. F., Aldritt, S. & Cheng, H. W. (1983). Pyrimidine metabolism in Trichomonas foetus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80** (9), 2564–2568.
- Washabaugh, M. & Collins, K. (1984). Dihydroorotase from Escherichia coli. purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **259** (5), 3293–3298.
- Washabaugh, M. & Collins, K. (1986). Dihydroorotase from Escherichia coli. sulfhydryl group-metal ion interactions. *J. Biol. Chem.* **261** (13), 5920–5929.
- Wasternack, C., Krauss, G. J. & Reinbothe, H. (1977). *Plant Sci. Lett.* **10**, 121–128.
- Wasternack, C., Lippmann, G. & Reinbothe, H. (1979). Pyrimidine-degrading enzymes. purification and properties of beta-ureidopropionase of Euglena gracilis. *Biochim. Biophys. Acta.* **570**, 341–351.
- Waterhouse, P., Graham, M. & Wang, M. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95** (23), 13959–13964.
- Waterhouse, P., Smith, N. & Wang, M. (1999). Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci.* **4** (11), 452–457.
- Wesley, S., Helliwell, C., Smith, N., Wang, M., Rouse, D., Liu, Q., Gooding, P., Singh, S., Abbott, D., Stoutjesdijk, P., Robinson, S., Gleave, A., Green, A. & Waterhouse, P. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27** (6), 581–590.
- Williams, L., Bernhardt, S. & Davis, R. (1970). Copurification of pyrimidine-specific carbamyl phosphate synthetase and aspartate transcarbamylase of Neurospora crassa. *Biochemistry*. **9** (22), 4329–4335.
- Williamson, C., Lake, M. & Slocum, R. (1996). A cDNA encoding carbamoyl phosphate synthetase large subunit (carB) from Arabidopsis (accession no. u40341). *Plant Physiol.* **111** (4), 1354.

- Williamson, C. & Slocum, R. (1994). Molecular cloning and characterization of the pyrB1 and pyrB2 genes encoding aspartate transcarbamoylase in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* **105** (1), 377–384.
- Zhou, L., Lacroute, F. & Thornburg, R. (1997). Characterization of the *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding dihydroorotase (accession no. AF000146) (PGR97-115). *Plant Physiol.* **114**, 1569.
- Zhou, L., Lacroute, F. & Thornburg, R. (1998). Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of *Arabidopsis thaliana* UMP/CMP kinase. *Plant Physiol.* **117** (1), 245–254.
- Zimmermann, B., Kemling, N. & Evans, D. (1995). Function of conserved histidine residues in mammalian dihydroorotase. *Biochemistry.* **34** (21), 7038–7046.
- Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L. & Sonnewald, U. (1995). Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants. *Plant J.* **7**, 97–107.