

**Analyse der *cis*-regulatorischen Bereiche
und der *trans*-Faktoren
des *RBCS2* Promotors aus Tomate
(*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

KATJA BAUM

aus Warburg

Hamburg 1998

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 1995 bis Dezember 1998 am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie und am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. C.-W. Vogel
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Wienand

Tag der mündlichen Prüfung: 21.1.1999

Meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Fruchtentwicklung von Tomate	2
1.2 Die <i>RBCS</i> Genfamilie aus Tomate	3
1.2.1 Die differentielle Expression der <i>RBCS</i> Gene in Tomate	4
1.2.2 Die Promotoren der <i>RBCS</i> Gene der Tomate	6
1.2.3 Beschreibung des <i>RBCS2</i> Promotors	8
1.2.3.1 Die Boxen des <i>RBCS2</i> Promotors	8
1.2.3.2 Die DNA-Bindefaktoren des <i>RBCS2</i> Promotors	9
1.2.3.2.1 Die G-Box Bindefaktoren aus Tomate: GBF4, GBF9 und GBF12	11
1.2.3.2.2 Die I-Box Bindefaktoren aus Tomate: IBF-1a, IBF-1b, IBF-2a und IBF-2b	14
1.3 Zielsetzung der Arbeit	15
2. EXPERIMENTELLER TEIL	17
2.1 Material	17
2.1.1 Pflanzenmaterial	17
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	17
2.1.3 Mikroorganismen	18
2.1.4 Nukleinsäuren	19
2.1.4.1 Oligonukleotide	19
2.1.4.2 Plasmide und Konstrukte	21
2.1.5 Sicherheit und Entsorgung	23
2.2 Methoden	26
2.2.1 Klonierungstechniken	26
2.2.1.1 Bakterienkulturen	26
2.2.1.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation	27
2.2.1.2.1 CaCl_2 -Methode und Standardtransformation	27
2.2.1.2.2 Elektrotransformation	27
2.2.1.3 Reinigung von DNA	28
2.2.1.4 Restriktion von DNA	28
2.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	29
2.2.1.6 Auffüllen von überhängenden Enden	29
2.2.1.7 Ligation von DNA	29
2.2.2 DNA-Isolierung	30
2.2.2.1 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	30

2.2.2.2	Plasmidpräparation aus Hefe	31
2.2.2.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	31
2.2.3	Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.4	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	32
2.2.4.1	Sequenzierung	32
2.2.4.2	Software für die Sequenzanalyse	33
2.2.5	RNA-Isolierung	33
2.2.5.1	RNase-Inaktivierung	33
2.2.5.2	Gesamt-RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial	33
2.2.6	Analyse von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese und Blotting	34
2.2.6.1	DNA-Auftrennung in Agarose-Gelen	34
2.2.6.2	RNA-Auftrennung in Formaldehyd-Gelen	34
2.2.6.3	Southern-Blotting	35
2.2.6.4	Northern-Blotting	35
2.2.6.5	Herstellung von Sonden für die molekulare Hybridisierung	35
2.2.6.5.1	RBCS-Sonde	35
2.2.6.5.2	GBF-Sonden	36
2.2.6.5.3	25S rRNA-Sonde	36
2.2.6.6	Molekulare Hybridisierung von Nukleinsäuren	36
2.2.7	Digoxigenin-Detektion	37
2.2.8	Proteinisolierung	37
2.2.8.1	Kernproteinisolierung aus Pflanzenmaterial	37
2.2.8.2	Gesamtproteinisolierung aus Pflanzenmaterial	37
2.2.8.2.1	Isolierung von nativem, pflanzlichen Gesamtprotein	37
2.2.8.2.2	Isolierung von denaturiertem, pflanzlichen Gesamtprotein	38
2.2.8.3	Gesamtproteinisolierung aus E. coli	38
2.2.8.3.1	Proteinexpression in E. coli	38
2.2.8.3.2	Isolierung von nativem Gesamtprotein aus E. coli	39
2.2.8.3.3	Isolierung von denaturiertem Gesamtprotein aus E. coli	39
2.2.8.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	39
2.2.9	Analyse von Proteinen durch Gelelektrophorese und Blotting	40
2.2.9.1	SDS-PAGE	40
2.2.9.2	Western-Blotting	40
2.2.9.3	Immunodetektion	41
2.2.10	Modifikation von Proteinen	41
2.2.10.1	Phosphorylierung	42
2.2.10.2	Dephosphorylierung	42
2.2.11	Gelretardierungsexperiment	43
2.2.12	Ballistische transiente Transformation von Pflanzenmaterial	43
2.2.12.1	Vorbehandlung von Fruchtmaterial	43
2.2.12.2	Transformation mit der Partikelkanone	44

2.2.12.3	Luziferase- und GUS-Assay	44
2.2.12.4	Optimierter GUS-Assay	45
2.2.13	One-Hybrid-System	45
2.2.13.1	Amplifikation einer cDNA/AD-Fusionsbibliothek	45
2.2.13.2	Herstellung der Hefereportergerstämme YMFM8HISi und YMFM8HISi-1	46
2.2.13.3	Hefetransformation und 3-AT-Selektion	46
2.2.13.4	Galaktosidase-Assays	46
3.	ERGEBNISSE	47
3.1	Strukturanalyse des <i>RBCS2</i> Promotors	47
3.1.1	Etablierung eines transienten Transformationssystems für Blätter und Früchte der Tomate	47
3.1.2	Deletionsanalyse des <i>RBCS2</i> Promotors	50
3.1.3	Die Boxen I und G	52
3.2	<i>RBCS2</i> Promotoraktivität während der Fruchtentwicklung	55
3.2.1	Ein Modellsystem für die Fruchtentwicklung der Tomate	56
3.2.2	Etablierung der Methode der transienten Transformation in den späten Fruchtstadien	57
3.2.3	Die Aktivität des <i>RBCS2</i> Promotors während der Fruchtentwicklung	61
3.2.4	G-Box abhängige und G-Box unabhängige <i>RBCS2</i> Promotoraktivität	62
3.3	Charakterisierung von G-Box Bindefaktoren (GBF) während der Fruchtentwicklung	65
3.3.1	G-Box Bindefaktoren (GBF)	65
3.3.1.1	GBF in Kernproteinextrakt aus Früchten	66
3.3.1.2	GBF in Gesamtproteinextrakt aus Früchten	69
3.3.2	Expression von GBF während der Fruchtentwicklung	71
3.3.2.1	Expression auf RNA-Ebene	72
3.3.2.2	Expression auf Proteinebene	74
3.3.2.3	Supershift in Kernextrakten	78
3.3.3	Modifikation von GBF während der Fruchtentwicklung	82
3.3.3.1	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von GBF12	83
3.3.3.2	Phosphorylierung von Kernproteinextrakten	88
3.3.3.3	Dephosphorylierung von Kernproteinextrakten	89
3.4	Versuche zur Klonierung eines I-Box-Bindefaktors mit Hilfe des One-Hybrid-Systems	92
3.4.1	Das One-Hybrid-System aus Hefe	92
3.4.2	Ergebnisse des One-Hybrid-Screens	94
3.4.2.1	Optimierung der Screen-Bedingungen	95
3.4.2.2	Erhaltene Klone des Screens	96

4. DISKUSSION	102
4.1 Die ballistische transiente Transformation - eine effiziente Methode zur Untersuchung von Promotoraktivitäten in Tomatenorganen	102
4.2 Der <i>RBCS2</i> Promotor besitzt zwei dominante <i>cis</i>-Elemente	105
4.2.1 Die Rolle der I-Box	106
4.2.2 Die Rolle der G-Box	108
4.3 Regulation der G-Box abhängigen <i>RBCS2</i> Promotoraktivität während der Fruchtentwicklung	110
4.3.1 Wirken GBFs aus Tomate als Transkriptionsaktivatoren?	110
4.3.2 Das Expressionsmuster der GBFs aus Tomate	112
4.3.3 Wie werden die GBFs während der Fruchtentwicklung desaktiviert?	113
4.3.3.1 Modifikation von GBFs	114
4.3.3.2 Die Rolle von GF14, einem weiteren Protein des Fruchtextraktes	116
4.4 Analyse DNA-bindender Faktoren im One-Hybrid-System	117
4.5 Resümee und Ausblick	119
5. ZUSAMMENFASSUNG	122
6. SUMMARY	124
7. LITERATURVERZEICHNIS	126
8. ANHANG	135
8.1 Sequenzdaten von GBF4	135
8.2 Sequenzdaten von GBF9	136
8.3 Sequenzdaten von GBF12	137

Danksagung

Lebenslauf

Veröffentlichungen

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AD	Aktivierungsdomäne
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
3-AT	3-Aminotriazol
BD	Bindedomäne
ca.	circa
Cab	Chlorophyll a/b Bindeprotein
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	complementary DNA
CK	Casein Kinase II
CPW12	osmotische Lösung, siehe Experimenteller Teil
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleotid acid
DNA-BP	DNA-Bindeprotein
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL	Extraktionspuffer für GUS und LUC
FBF	F-Box Bindefaktor
GF14	G-Box Factor 14-3-3 homolog
GBF	G-Box Bindefaktor
GCB	GBF-conserved box
GUS	β -Glucuronidase
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IBF	I-Box Bindefaktor
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
LeGF14T3/4	Lycopersicon esculentum G-Box Factor 14-3-3 homolog
LRE	Light-responsive Element
LUC	Luziferase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

MybLe1	Myb Lycopersicon esculentum 1
mRNA	messenger RNA
Nia	Nitratreduktase-Apoprotein
NKD	Nukleosid-diphosphat-Kinase
NOS	Nopalin-Synthase
Nr.	Nummer
pSK	pBlueskript
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymeraseketten-Reaktion)
PL	Polylinker
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
RBCS	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase, Small Subunit
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RP	Reverse Sequencing Primer
rRNA	ribosomale RNA
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UP	Universal Sequencing Primer
UV	Ultraviolettes Licht
vergl.	vergleiche
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-2-indolyl- β -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

Einheiten

µg	Mikrogramm	ml	Milliliter
µl	Mikroliter	mm	Millimeter
µm	Mikrometer	mM	millimolar
AS	Aminosäure(n)	mol	Mol
bp	Basenpaare	ng	Nanogramm
cm	Zentimeter	nm	Nanometer
g	Gramm	nM	nanomolar
h	Stunde(n)	OD	optische Dichte
kb	Kilobasen	sec	Sekunde(n)
kDa	Kilodalton	U	Units (Enzymeinheiten)
l	Liter	U/min	Umdrehungen pro Minute
M	Molar	V	Volt
mg	Milligramm	v/v	volume per volume
min	Minute(n)	w/v	weight per volume

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Nukleotide

A	Adenosin	dI	Desoxyinosin
C	Cytidin	dC	Desoxycytidin
G	Guanosin		
T	Thymidin		

1. EINLEITUNG

Fruchtentwicklung und Fruchtreifung beruhen auf einer komplexen Abfolge von Zellteilungs-, Zellwachstums- und Differenzierungsprozessen. Veränderungen innerhalb dieser Prozesse können einen entscheidenden Einfluß sowohl auf die Qualität als auch auf den Ertrag von Früchten haben (Ho und Hewitt, 1986). Neben klassischer Züchtung wird hier in der Zukunft die gezielte Veränderung einzelner Merkmale durch die Expression eingeführter Gene eine wesentliche Rolle spielen (Gray *et al.*, 1992). Um solche Eingriffe vornehmen zu können, ist es notwendig, Grundlagen zur gezielten Expression der eingeführten Gene zu erarbeiten. So wäre zum Beispiel die Expression eines Resistenzgens nur in den Teilen der Pflanze wünschenswert, die später nicht zum Verzehr bestimmt sind. In diesem Fall würde man einen vor das Gen geschalteten Promotor benötigen, der nur in den gewünschten Pflanzenorganen aktiv ist und dort die Expression des Gens vermitteln würde. Die genaue Kenntnis der *cis*-Elemente und *trans*-Faktoren, die für die Regulation eines Promotors zuständig sind, sind daher unabdingbare Voraussetzung für seinen Einsatz. Analysen des CaMV 35S Promotors in transgenen Tabak-pflanzen haben gezeigt, daß jeweils bestimmte Elemente dieses in fast allen Pflanzenorganen stark aktiven Promotors für die Expression in einzelnen Organen verantwortlich sind (Benfey und Chua, 1990). Dieser virale Promotor scheint demnach eine Kombination von *cis*-Elementen zu besitzen, die von pflanzlichen Faktoren in verschiedenen Organen erkannt werden, und die in der Summe die Expression in allen Teilen der Pflanze ermöglichen. Entscheidend ist dabei, daß diese Elemente getrennt werden können und dann einzeln zur organspezifischen Aktivität des Promotors führen. Es sollte daher in analoger Weise möglich sein, bei genauer Kenntnis pflanzlicher Promotoren deren funktionale *cis*-Elemente zu isolieren und sie für die Konstruktion von neuen Promotoren zu benutzen.

1.1 Die Fruchtentwicklung von Tomate

Das Wachstum der Tomatenfrucht lässt sich in zwei Phasen einteilen: in der ersten (sieben bis zehn Tagen nach der Pollination) wächst die Frucht durch aktive Zellteilung, danach findet nur noch Zellexpansion statt (Piechulla *et al.*, 1986). Anschließend kommt es zur eigentlichen Reifung der Frucht von einem unreifen, grünen Zustand zur roten, weichen Frucht. Reifung beinhaltet damit die Veränderung in Farbe, Geschmack, Zusammensetzung und Aroma der Tomate. Die Fruchtentwicklung ist ein molekular auf der Ebene der Genexpression kontrollierter Vorgang und wird ebenfalls durch Umwelteinflüsse und Phytohormone beeinflusst (Gray *et al.*, 1992). Durch die gezielte Steuerung der Reifung werden die unreifen Samen der Pflanze so lange geschützt, bis sie ausreichend entwickelt sind. Dann wird durch den Verzehr der reifen Frucht der Samen verteilt (Fray und Gierson, 1993).

Im Verlauf der Fruchtreifung finden viele biochemische und physiologische Veränderungen statt. Dazu zählen ein Anstieg der Ethylenbiosyntheserate und Respiration, Chlorophylldegradierung, Pigmentansammlung, stoffliche Veränderung wie das Weichwerden der Frucht, Veränderungen der Mengen an Zucker und organischen Säuren sowie Produktion von flüchtigen Aromastoffen (Brady, 1987). Viele dieser reifungsbedingten Veränderungen resultieren aus der Induktion neuer Enzymaktivitäten, bedingt durch Veränderungen bzw. Aktivierung von Genexpressionen (Montgomery *et al.*, 1993a). Die molekulare Analyse der Fruchtreifung hat z. B. zur Isolierung von mehreren cDNAs geführt, deren mRNAs erst vermehrt in der reifen Frucht gebildet werden (Review von Gray *et al.*, 1992). Weniger gut untersucht sind Gene, die während der Fruchtreifung inaktiviert werden. Eine Genfamilie, die während der ersten Periode der Fruchtentwicklung abgeschaltet wird, stellen die *RBCS* Gene (Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase, Small Subunit) dar.

1.2 Die *RBCS* Genfamilie aus Tomate

Die Analyse der *RBCS* Gene begann mit der Entdeckung des Enzyms Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase, EC.4.1.1.39) 1947 durch Wildmann und Bonner. Sie beobachteten ein Hauptprotein in grünen Blättern von Spinat und nannten es zunächst „Fraktion 1 Protein“ (Wildmann und Bonner, 1947). 1956 wurde das Enzym von Weissbach (Weissbach *et al.*, 1956) gereinigt und seine Funktion aufgeklärt. Rubisco katalysiert den ersten Schritt der Kohlendioxidfixierung (an Ribulose-1,5-bisphosphat) und stellt so eines der Schlüsselenzyme der Photosynthese dar. Das Enzym kann bis zu 50% des löslichen Blattproteins grüner Pflanzen ausmachen und ist damit das am häufigsten vorkommende Protein in der Natur (Jensen und Bahr, 1977).

Das Chloroplastenenzym Rubisco ist auf der Oberfläche der Stromaseite der Thylakoidmembranen lokalisiert. Es besteht aus 16 Untereinheiten, die sich aus acht großen Untereinheiten (mit einem Molekulargewicht von ungefähr 55000) und acht kleinen Untereinheiten (mit einem Molekulargewicht von ungefähr 14000) zusammensetzen. Die große Untereinheit (RBCL) enthält das katalytische Zentrum. Die Funktion der kleinen Untereinheit (RBCS) ist unklar (Stryer, 1991). Die cytoplasmatischen Ribosomen produzieren sie als größeres Vorläuferprotein, das beim Transport in den Chloroplasten zum reifen Protein gespalten wird und sich im Chloroplasten dann mit der großen Untereinheit zum Holoenzym zusammensetzt (Manzara und Gruissem, 1988).

Seine große Häufigkeit hat dazu beigetragen, daß die für Rubisco kodierenden Gene zu den ersten Chloroplasten- und Kerngenen gehörten, die aus höheren Pflanzen kloniert wurden (Dean *et al.*, 1989). Ursprünglich waren die *RBCS* Gene Komponenten des Chloroplastengenoms, wurden aber dann ins Kerngenom transferiert und gingen dem Chloroplastengenom verloren (Clegg *et al.*, 1997). Die kleine Untereinheit RBCS wird vom Zellkern in den meisten höheren Pflanzen als eine kleine Multigenfamilie aus 5-15 Mitgliedern kodiert. In Tomate (*Lycopersicon esculentum*) besteht die *RBCS*-Genfamilie aus fünf Mitgliedern, die an drei verschiedenen Loci im Kerngenom zu finden sind: *RBCS1* auf Chromosom 2, *RBCS2* auf Chromosom 3 und die Gene *RBCS3A*, *RBCS3B* und *RBCS3C* in Tandemfolge innerhalb eines ungefähr 10 kb großen Bereiches auf Chromosom 2

(Sugita *et al.*, 1987, Manzara und Gruissem, 1988). Damit sind die fünf *RBCS* Gene auf zwei der insgesamt zwölf Chromosomen der Tomate lokalisiert.

Aus Sequenzanalysen läßt sich ableiten, daß die fünf *RBCS* Gene für vier verschiedene Vorläuferproteine und drei unterschiedliche reife *RBCS*-Proteine mit stark konservierter Aminosäuresequenz kodieren. Die Gene der *RBCS3*-Gruppe bilden identische reife Proteine, während sich die durch *RBCS1* und *RBCS2* kodierten Proteine in maximal vier Aminosäuren von den anderen unterscheiden (Manzara und Gruissem, 1988, Dean *et al.*, 1989). Es sind keine funktionalen Unterschiede mit den kleinen Unterschieden der reifen Proteine verbunden, so daß alle Genprodukte als funktional gleichwertig betrachtet werden. Ursächlich für das Auftreten der verschiedenen Loci und Genprodukte sind Veränderungen während der Evolution (Clegg *et al.*, 1997).

1.2.1 Die differentielle Expression der *RBCS* Gene in Tomate

Die *RBCS* Gene von Tomate werden in erster Linie auf transkriptioneller Ebene kontrolliert. Posttranskriptionelle Regulation tritt ebenfalls auf (so ist die mRNA von *RBCS2* in sich entwickelnder Frucht stabiler als die von *RBCS1*), spielt aber eine untergeordnete Rolle (Wanner und Gruissem, 1991). Die Mitglieder der *RBCS* Genfamilie werden unterschiedlich reguliert und exprimiert. Sie unterliegen organspezifischer, entwicklungsabhängiger und lichtabhängiger differentieller Regulation (Sugita und Gruissem, 1987, Wanner und Gruissem, 1991, Manzara *et al.*, 1993). Abbildung 1 stellt die Expressionsunterschiede als Folge der entwicklungs- und organspezifischen Regulation bildlich dar.

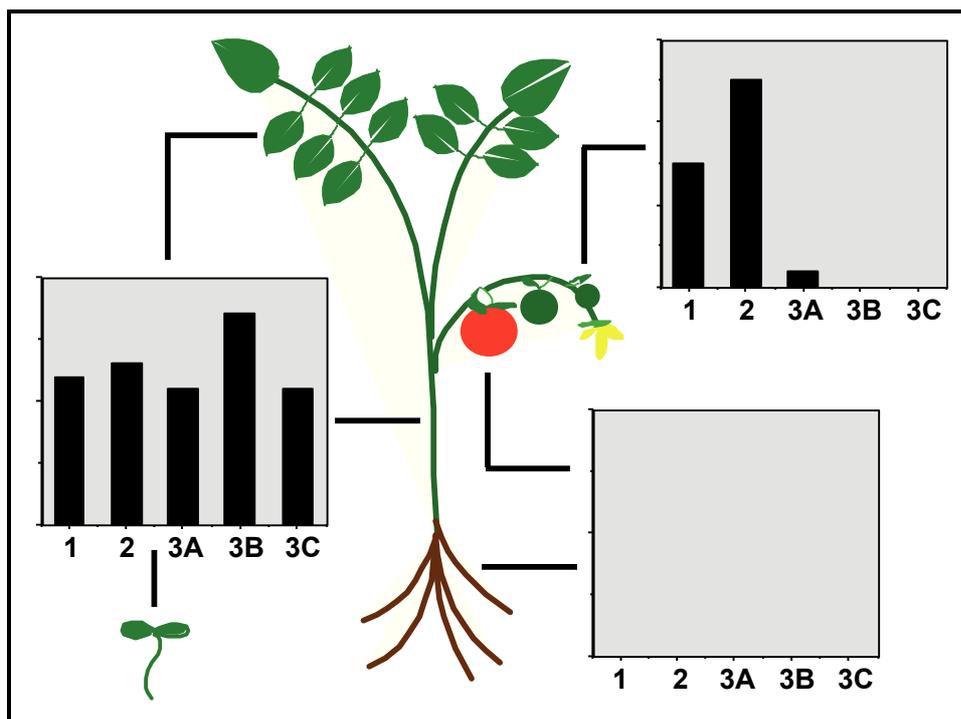


Abb. 1: Entwicklungs- und organspezifische Expression der *RBCS* Gene der Tomate

Basierend auf in Run-on Transcription Assays gewonnenen Daten (nach Wanner und Grissem, 1991) sind die Expressionsraten der Gene *RBCS1* (1), *RBCS2* (2), *RBCS3A* (3A), *RBCS3B* (3B) und *RBCS3C* (3C) durch Balkendiagramme dargestellt. Die maximale Transkriptionsrate in jungen Früchten liegt bei ungefähr 20% der Transkriptionsrate in Blättern.

Im folgenden werden die einzelnen Regulationsaspekte näher erläutert:

1. Organspezifische Regulation

In photosynthetisch hoch aktiven Pflanzenteilen der Tomate sind auch hohe Expressionsraten der *RBCS* Gene zu finden. Damit liegt in Blättern die stärkste *RBCS* Expression vor, gefolgt von etwas schwächerer Expression in Kotyledonen und jungen Früchten. In Wurzeln und reifen Früchten kann keine *RBCS* Expression detektiert werden. Die Expression in junger Frucht ist zudem gewebespezifisch, sie findet nur im lokularen Gewebe statt und nicht im äußeren Perikarp.

2. Entwicklungsabhängige Regulation

Diese Art der Regulation ist in Blättern und Früchten zu finden. Besonders deutlich zeigt sie sich in Früchten: die Transkriptionsaktivität ist hoch in jungen Früchten und sinkt bis zur reifen Frucht ab.

3. *Differentielle Regulation*

In jungen Früchten von Tomaten sind *RBCS1* und *RBCS2* vergleichsweise stark aktiv, *RBCS3A* ist nur sehr wenig aktiv und *RBCS3B* und *RBCS3C* sind nicht aktiv.

4. *Lichtabhängige Regulation*

Die Expression der *RBCS* Gene wird in Blättern und Kotyledonen unterschiedlich von Licht beeinflusst: alle *RBCS* Gene werden z. B. in mit Licht behandelten Blättern exprimiert, bei Ausschluß von Licht werden nur noch *RBCS2* und *RBCS3A* konstitutiv exprimiert, die Expression der anderen *RBCS* Gene sinkt ab. Im Dunkeln findet man in Kotyledonen ebenfalls keine Expression von *RBCS3B* und *RBCS3C*.

Außerdem zeigt die Regulation der *RBCS* Gene in jungen Früchten und Keimlingen eine Abhängigkeit von der *circadianen Uhr* (Piechulla und Grissem, 1987, Giuliano *et al.*, 1988a). Die Expressionsrate von *RBCS* oszilliert zwischen einem Minimum um vier Uhr morgens und einem dreifach höheren Maximum um acht Uhr morgens. Werden die Pflanzen in die Dunkelheit transferiert, bleibt dieser Rhythmus erhalten (Giuliano *et al.*, 1988a). Neuerdings wird auch diskutiert, daß für die korrekte Regulation der *RBCS* Gene ihre *Position im Chromatin* von Bedeutung ist, da in den Promotoren der *RBCS* Gene Kernmatrix-assoziierte Bereiche vorhanden sind und sie damit in bestimmten Chromatinschleifen vorliegen (Meier *et al.*, 1997).

1.2.2 Die Promotoren der *RBCS* Gene der Tomate

In transgenen Pflanzen, die *RBCS*-Promotor- β -Glucuronidase Fusionsgene exprimierten, waren Promotorfragmente von 0.6 kb (*RBCS2*), 1.0 kb (*RBCS3A*) und 3.0 kb (*RBCS1*) Länge ausreichend, um die temporären, organspezifischen und differentiellen Expressionsmuster der jeweiligen *RBCS* Gene zu gewährleisten (Meier *et al.*, 1995). In diesen Bereichen sollten demnach alle funktionalen Sequenzelemente liegen, die für eine korrekte Regulation der *RBCS* Gene notwendig sind. Ein Vergleich der fünf Promotoren zeigt, daß sie in Bezug auf Sequenz und Anordnung innerhalb der Promotoren viele konservierte Sequenzelemente gemeinsam haben (Manzara *et al.*, 1991) (Abb. 2).

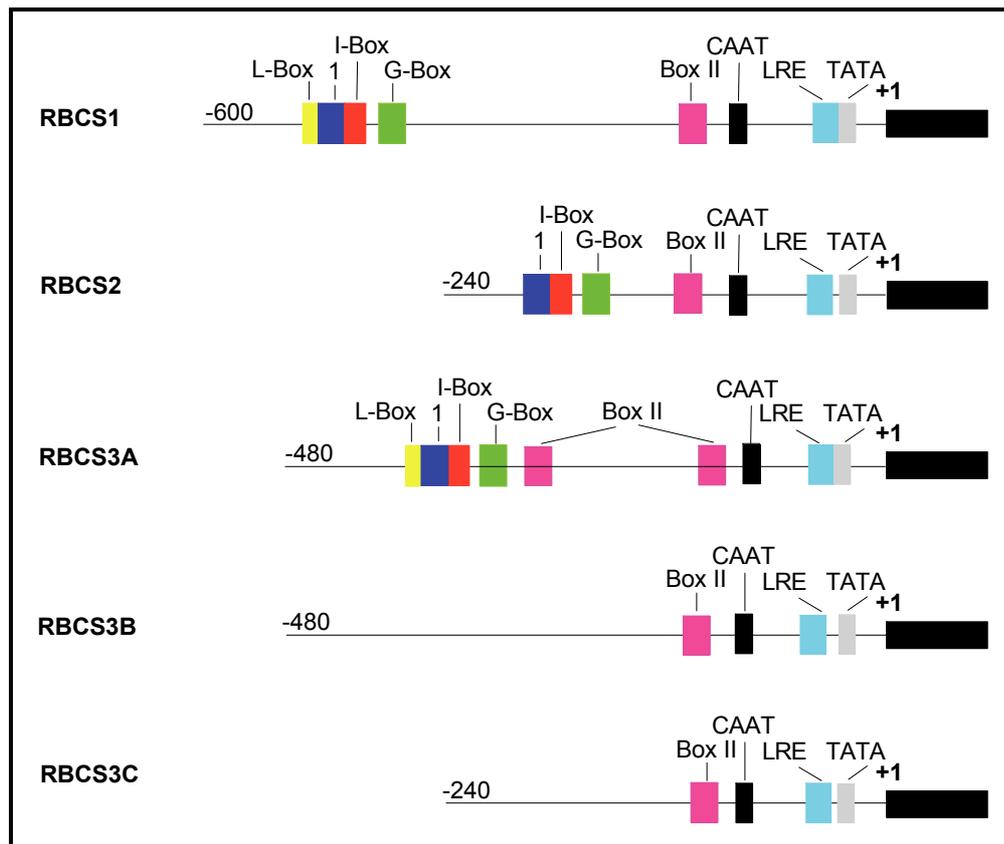


Abb. 2: Schematische Darstellung der fünf RBCS Promotoren

Die konservierten Sequenzelemente der Promotoren sind durch farbige Boxen dargestellt (die schwarze Box rechts entspricht dem Genbereich mit Transkriptionsstart bei +1). Die Bezeichnung der Boxen erfolgte nach Manzara und Gruissem, 1988 (Box 1), Ueda *et al.*, 1989 (L-, I-, G-Box), Fluhr *et al.*, 1986 (Box II) und Grob und Stüber, 1987 (LRE = Light-responsive element).

Aufgrund der verschiedenen konservierten Sequenzelemente (auf die im folgenden Kapitel noch näher eingegangen wird) innerhalb der fünf RBCS Promotoren können diese in zwei Gruppen eingeteilt werden: die erste Gruppe umfaßt *RBCS1*, *RBCS2* und *RBCS3A*, die ein I-Box und ein G-Box Motiv enthalten, die nur durch wenige Nukleotide getrennt sind und nicht in den Promotoren der zweiten Gruppe (*RBCS3B* und *RBCS3C*) zu finden sind (Manzara und Gruissem, 1988). Interessanterweise stimmt diese Gruppeneinteilung der Promotoren auch mit der differentiellen Expression der entsprechenden Gene überein, denn die Gene *RBCS3B* und *RBCS3C* der zweiten Gruppe werden im Gegensatz zu den Genen der ersten Gruppe nicht in jungen Tomatenfrüchten, sowie im Dunkeln in Keimlingen exprimiert (Wanner und Gruissem, 1991).

1.2.3 Beschreibung des *RBCS2* Promotors

Anhand des *RBCS2* Promotors sollen nun die konservierten Sequenzbereiche (Abb. 2) näher beschrieben werden. Da die Regulation der *RBCS* Expression in erster Linie auf transkriptioneller Ebene stattfindet, kommt diesen Elementen eine besondere Bedeutung zu, ebenso wie putativen DNA-Bindeproteinen, die an sie binden könnten. Auf beide Aspekte wird in den nächsten Abschnitten eingegangen.

1.2.3.1 Die Boxen des *RBCS2* Promotors

Abbildung 3 gibt die Elemente des *RBCS2* Promotors und ihre Sequenzen wieder.

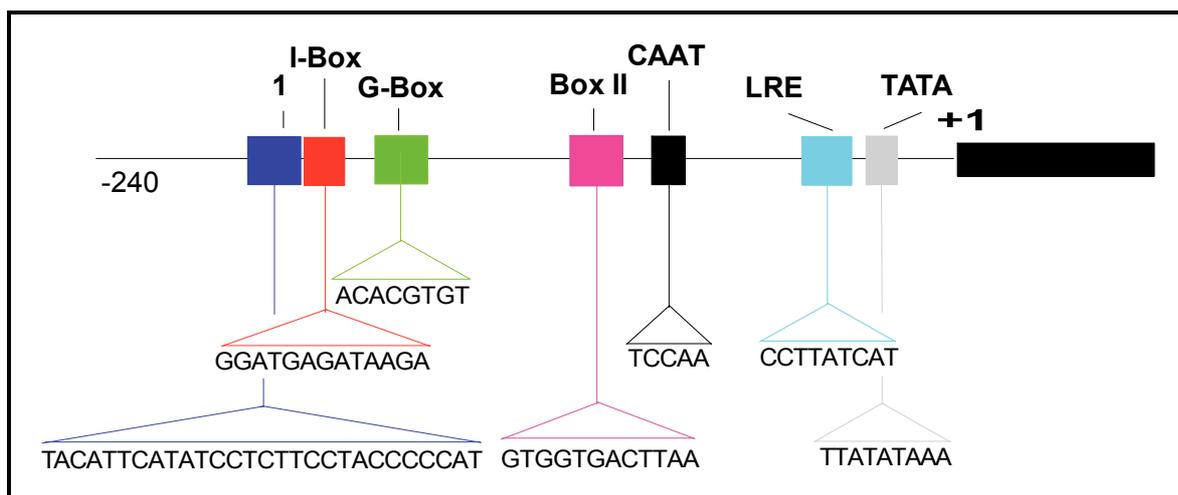


Abb. 3: Konservierte Sequenzen der Boxen des *RBCS2* Promotors

Die konservierten Sequenzelemente der *RBCS2* Promotors sind wie in Abb. 2 durch farbige Boxen dargestellt (die schwarze Box rechts entspricht dem Genbereich mit Transkriptionsstart bei +1). Unterhalb der Boxen sind die konservierten Sequenzen angegeben (nach Manzara und Grissem, 1988 (Box 1), Ueda *et al.*, 1989 (L-, I-, G-Box), Fluhr *et al.*, 1986 (Box II) und Grob und Stüber, 1987 (LRE = Light-responsive element)).

Box 1 (Abb. 3) zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Pyrimidinen aus, die Funktion der Box ist allerdings noch unbekannt (Manzara *et al.*, 1991). Dagegen sind die Box II und das Element LRE bereits besser charakterisiert. Die Box II

(Benennung nach Fluhr *et al.*, 1986) spielt eine Rolle bei der Lichtregulation (Lam und Chua, 1990). Von der Box LRE (Light-responsive element, Grob und Stüber, 1987) wird vermutet, daß sie an der Lichterkennung beteiligt ist, da sie im Promotorbereich von vielen lichtregulierten Genen vorkommt (Kuhlemeier *et al.*, 1989, Manzara *et al.*, 1993). Die Elemente I-Box und G-Box, die nur durch wenige Nukleotide getrennt auf dem *RBCS2* Promotor (sowie auf den Promotoren *RBCS1* und *RBCS3A*) vorliegen, sind hoch konserviert unter den *RBCS* Promotoren verschiedener Spezies (Manzara und Gruissem, 1988).

Die I-Box wird auch in den Promotoren anderer pflanzlicher Gene (wie *cab*; kodiert für Chlorophyll a/b Bindeprotein und *nia*; kodiert für Nitratreduktase-Apoprotein) gefunden, deren Transkription durch Licht und die circadiane Uhr reguliert wird (Borello *et al.*, 1993). In den *RBCS* Promotoren der Tomate enthält die I-Box die Sequenz 5'-GGATGAGATAAGA-3'. Das am stärksten konservierte Kernmotiv ist die Sequenz 5'-GATAAG-3' (Manzara und Gruissem, 1988, Donald und Cashmore, 1990). Das der I-Box verwandte GATA-Motiv ist notwendig für hohe Promotoraktivität bei Licht (Gilmartin *et al.*, 1990, Puente *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß die I-Box als *cis*-Element wirken kann (Donald und Cashmore, 1990).

Die G-Box findet sich als *cis*-agierendes Element in verschiedenen, durch Umwelteinflüsse induzierbaren Promotoren, wo sie oft von einem zweiten, *cis*-Element flankiert vorgefunden wird (de Vetten und Ferl, 1994). Das G-Box Kernmotiv 5'-CACGTG-3' kommt auch in Tieren und Pilzen als funktionelles Promotorelement vor (Waldmüller und Link, 1995). Die Promotoren *RBCS1*, *RBCS2* und *RBCS3A* enthalten das G-Box Motiv 5'-ACACGTGT/G-3'.

1.2.3.2 Die DNA-Bindefaktoren des *RBCS2* Promotors

DNase-Schutzexperimente des *RBCS2* Promotorfragmentes haben verschiedene Bereiche aufgezeigt, die durch Proteine der zugegebenen Kernproteinextrakte vor dem Verdau durch DNase geschützt waren (Manzara *et al.*, 1991). Dabei zeigten sich aber innerhalb der Kernproteinextrakte der verschiedenen Organe von Tomate Unterschiede, die in Abbildung 4 wiedergegeben sind.

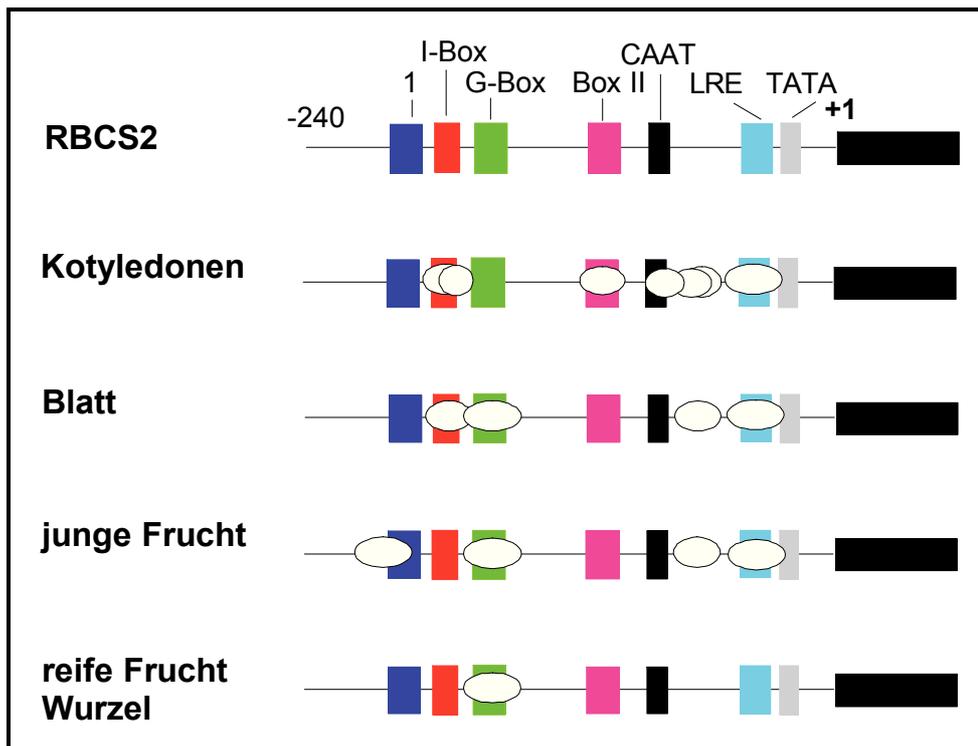


Abb. 4: Schematische Darstellung der durch Bindeproteine geschützten Bereiche des *RBCS2* Promotors im DNase-Schutzexperiment

Die obere Zeile zeigt die konservierten Bereiche des *RBCS2* Promotors als farbige Boxen bis zur Position -240 bezogen auf den Transkriptionsstart des *RBCS2* Gens (+1). Die Ovale der unteren Zeilen stellen geschützte Bereiche durch Proteine der verschiedenen Kernproteinextrakte dar (Kotyledonen, Blatt, junge Frucht, reife Frucht oder Wurzel) (nach Manzara *et al.*, 1991).

Die DNase Schutzexperimente zeigen, daß die LRE Sequenz mit Protein(en) aus Kernproteinextrakten aus Organen interagiert, die *RBCS2* transkribieren. Allerdings werden auch *RBCS3A*, *RBCS3B* und *RBCS3C* in diesem Bereich durch Kernproteinextrakt aus junger Frucht geschützt, obwohl sie kaum bzw. nicht in diesem Organ exprimiert werden. Sollte die LRE-Box also für eine Lichtregulation benötigt werden, könnte dies über eine Modifikation des LRE Bindeproteins oder durch Interaktion mit anderen Proteinen stattfinden (Manzara *et al.*, 1991), sofern die Ergebnisse des Schutzexperimentes tatsächlich auch die *in vivo*-Bedingungen wiedergeben.

Das G-Box Element wird durch alle Kernproteinextrakte mit Ausnahme des Extraktes aus Kotyledonen geschützt. Viele G-Box Bindefaktoren (GBFs) verschiedener Spezies sind bereits kloniert worden wie TAF-1 aus Tabak (Oeda *et al.*, 1991),

GBF1, GBF2 und GBF3 (Schindler *et al.*, 1992a) und GBF4 (Menkens und Cashmore, 1994) aus Arabidopsis, SGBF-1 und SGBF-2 aus Sojabohne (Hong *et al.*, 1995), BnGBF1a, BnGBF1b und BnGBF2a aus Raps (Waldmüller und Link, 1995). Auch aus Tomate sind drei GBFs isoliert worden: GBF4, GBF9 und GBF12 (Meier und Gruissem, 1994).

Die I-Box des *RBCS2* Promotors wird nur durch Kernproteinextrakt der Tomate aus Kotyledonen und Blättern geschützt. In Extrakten aus Früchten und Wurzeln findet keine Proteinbindung an die I-Box statt. Es gibt einige indirekte Hinweise auf die Natur von IBF (Borello *et al.*, 1993), auf die in Abschnitt 1.2.3.2.2 noch näher eingegangen wird, tatsächlich wurde aber erst ein IBF kloniert (Rose, 1998).

1.2.3.2.1 Die G-Box Bindefaktoren aus Tomate: GBF4, GBF9 und GBF12

Die klonierten G-Box Bindefaktoren GBF4, GBF9 und GBF12 gehören wie alle anderen bisher klonierten GBFs zu einer Familie von bZIP Proteinen, die eine basische DNA-Bindedomäne und ein Leucin-Zipper-Motiv für Protein-Protein Interaktionen enthalten (Ellenberger *et al.*, 1992, Vinson *et al.*, 1989). GBF4 und GBF9 aus Tomate besitzen wie die meisten bekannten GBFs eine prolinreiche N-terminale Region, der aktivierende Eigenschaften zugeschrieben werden (Schindler *et al.*, 1992b). Der Aufbau der GBFs führt zu der Vermutung, daß sie als Transkriptionsaktivatoren wirken.

Anhand eines Vergleichs der Aminosäuresequenzen von GBFs aus Tomate mit anderen GBFs verschiedener Spezies konnten in dem Bereich zwischen der prolinreichen Region und der bZIP Domäne sieben Peptidmotive bestehend aus sieben bis 35 Aminosäuren identifiziert werden, die mindestens zwischen zwei verschiedenen GBFs hoch konserviert waren. Aufgrund des Vorhandenseins dieser konservierten Bereiche konnten zehn der zwölf verglichenen GBFs in drei Klassen eingeteilt werden (Meier und Gruissem, 1994). Nach dieser Einteilung gehören GBF4 und GBF12 aus Tomate in dieselbe Klasse (Abb. 5).

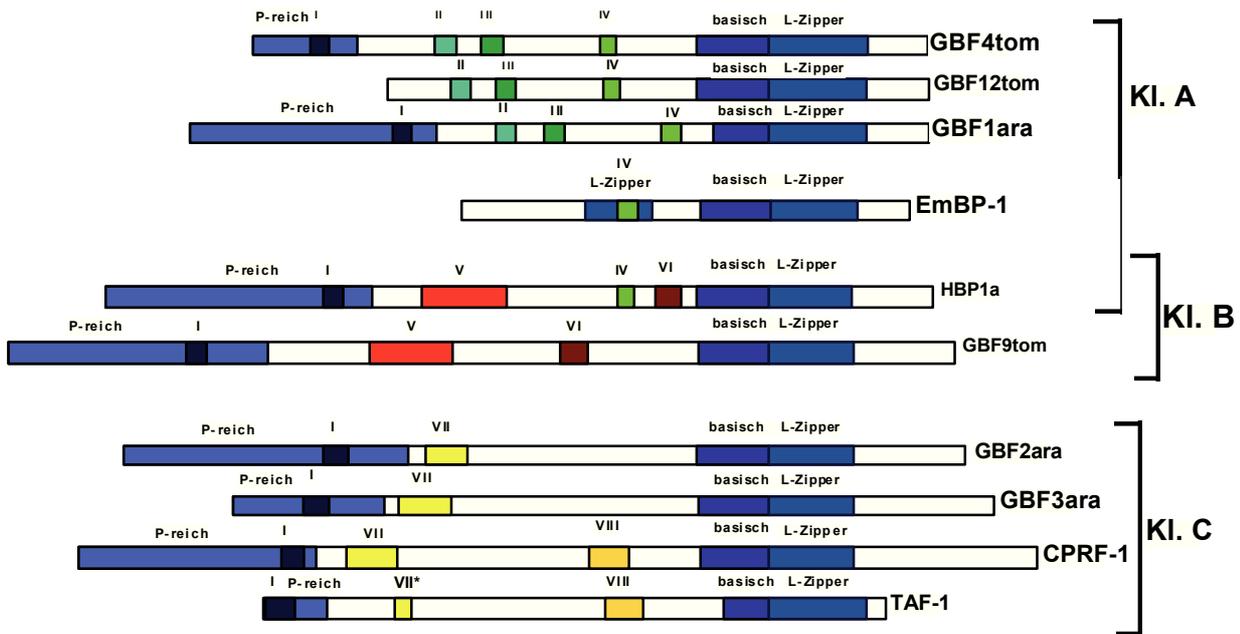


Abb. 5: Einteilung von GBFs in verschiedene Klassen

(aus Meier und Gruissem, 1994, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Meier)

Gezeigt sind die Positionen der konservierten Peptidsequenzen I bis VII zwischen dem prolinreichen N-Terminus („P-reich“) (fehlt bei GBF12 aus Tomate und EmBP-1 aus Weizen) und dem bZIP-Motiv (basische DNA-Bindedomäne: „basisch“ und Leucin-Zipper: „L-Zipper“). Durch die eckigen Klammern wird die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Klassen angedeutet: Klasse A („KI. A“), Klasse B („KI. B“) und Klasse C („KI. C“). Verglichen wurden GBF4, GBF9 und GBF12 aus Tomate (GBFtom, Meier und Gruissem, 1994), GBF1, GBF2 und GBF3 aus Arabidopsis (GBFara, Schindler *et al.*, 1992a), TAF-1 aus Tabak (Oeda *et al.*, 1991), CPRF-1, CPRF-2 und CPRF-3 aus Petersilie (Weisshaar *et al.*, 1991), HBP-1b aus Weizen (Tabata *et al.*, 1989) und EmBP-1 aus Weizen (Guiltinan *et al.*, 1990).

Die Möglichkeit der Einteilung der GBFs in verschiedene Klassen führt zu der Überlegung, ob jede Klasse für sich bestimmte Funktionen innerhalb der Rolle als Signalüberträger der Genaktivierung übernimmt. Außerdem könnten den konservierten Peptidsequenzen funktionelle Aufgaben zukommen, da sie sich zum Teil auf exponierten Oberflächen der Proteine befinden, wie z. B. Bereich II und III in GBF4 und GBF12 und Bereich V in GBF9 von Tomate (Meier und Gruissem, 1994).

Die Bindung der GBFs an die G-Box erfolgt aufgrund ihres basischen Leucin-Zipper-Motivs als Dimer. GBF1, GBF2 und GBF3 aus Arabidopsis bilden dabei sowohl Homodimere als auch Heterodimere (Schindler *et al.*, 1992a). Die Fähigkeit zur Bildung der Dimere wird entscheidend durch die Verteilung der geladenen Aminosäuren innerhalb des Leucin-Zippers beeinflusst (Menkens und Cashmore,

1994). Vermutlich positioniert die Dimerisierung zweier GBF Leucin-Zipper die angrenzenden basischen Domänen in die Hälften des palindromischen G-Box Motivs (Ellenberger *et al.*, 1992). Dort binden die GBFs speziell an das in der G-Box enthaltene ACGT-Motiv, die flankierenden Sequenzen beeinflussen aber Bindspezifität und Affinität der GBF-Interaktionen (Williams *et al.*, 1992, Izawa *et al.*, 1993). Durch Phosphorylierung läßt sich die DNA-Bindeaktivität von GBF1 aus Arabidopsis erhöhen (Klimczak *et al.*, 1992, 1995). Die DNA-Bindeaktivität von GBFs in cytosolischen Fraktionen aus Petersilie konnte durch Licht und Phosphorylierung reguliert werden und wurde von einem durch Licht vermittelten Transport der GBFs zum Kern begleitet (Harter *et al.*, 1994). Auch GBF2 aus Arabidopsis wird in Antwort auf Licht in den Kern importiert und es wird vermutet, daß die begrenzte Verfügbarkeit der GBFs im Kern und ihr Import eine wichtige Kontrolle der GBF Aktivität darstellen (Terzaghi *et al.*, 1997). Zu den GBFs aus Tomate liegen jedoch hierzu keine Daten vor, allerdings teilen alle drei bekannten GBFs aus Tomate ein Motiv aus basischen Aminosäuren in der Nähe ihres N-Terminus, das den Erkennungsequenzen für den Kernimport ähnelt (Meier und Gruissem, 1994).

Die Gene von GBF4, GBF9 und GBF12 zeigen ein ähnliches Expressionsmuster auf RNA-Ebene: die stärkste Expression von mRNA wird in jungen Früchten und reifen Samen gefunden, eine mittelstarke Expression in Wurzeln und die schwächste Expression in Blättern (Meier und Gruissem, 1994). Insgesamt wird mRNA von GBF9 etwas stärker als diejenige von GBF4 und GBF12 exprimiert. Da die G-Box auf den Promotoren von *RBCS1*, *RBCS2* und *RBCS3A* durch Kernproteinextrakt aus jungen Früchten und aus Blättern in DNase-Schutzexperimenten gleichermaßen geschützt wird (Manzara *et al.*, 1993), ist aufgrund der schwachen GBF-Expression in Blättern zu vermuten, daß es noch nicht identifizierte GBFs in Blättern gibt. Diese würden auch erklären, warum in Gelretardierungsexperimenten mit Blattkernproteinextrakt ein größerer Komplex als in analogen Experimenten mit Fruchtextrakt beobachtet wird (Meier und Gruissem, 1994).

1.2.3.2.2 Die I-Box Bindefaktoren aus Tomate: IBF-1a, IBF-1b, IBF-2a und IBF-2b

Die meisten Daten über IBFs liegen nur als indirekte Nachweise in Form von DNA-Bindestudien vor, da erst kürzlich der erste IBF kloniert werden konnte (Rose, 1998). Es wurden aber in verschiedenen Pflanzenarten IBFs nachgewiesen, darunter auch IBFs aus Tomate, die an die I-Box der *RBCS* Promotoren binden (Manzara *et al.*, 1991, Borello *et al.*, 1993). Für die I-Box des *RBCS3A*-Promotors von Tomate (die konserviert ebenso in den Promotoren von *RBCS1* und *RBCS2* vorliegt) konnten zwei Bindefaktoren gezeigt werden, die mit IBF-1a und IBF-1b benannt wurden (Borello *et al.*, 1993). Beide unterscheiden sich in ihrer Bindespezifität: IBF-1a interagiert sowohl mit der I-Box als auch mit der G-Box, während IBF-1b mit anderer Bindespezifität als IBF-1a nur an die I-Box bindet. Außerdem unterscheiden sich beide Faktoren in ihren biochemischen Eigenschaften: IBF-1a reagiert auf Erhitzen oder Zugabe von Chelatbildnern mit einer Aktivitätsabnahme, während IBF-1b von diesen Behandlungen nicht beeinflusst wird. Die Sensitivität von IBF-1a gegenüber Chelatbildnern könnte ein Hinweis darauf sein, daß das Protein für seine Aktivität Metallionen benötigt und vielleicht Zinkfinger-Motive damit als DNA-Bindedomäne in Frage kommen (Borello *et al.*, 1993). Das kürzlich aus Tomate klonierte MybLe1 (Myb Lycopersicon esculentum 1) zeigt in seinen Eigenschaften starke Ähnlichkeiten zu dem beschriebenen IBF-1b (Rose, 1998). Aus anderen Pflanzen konnten bereits Proteine über ihre cDNA kloniert und charakterisiert werden, die an I-Box verwandte DNA-Sequenzen wie das GATA-Motiv binden und tatsächlich eine Zinkfinger-Domäne als DNA-Bindemotiv besitzen (Daniel-Vedele und Caboche, 1993, Teakle und Kay, 1995).

Die zu einer zweiten Gruppe von I-Box-Bindefaktoren gehörenden IBFs IBF-2a und IBF-2b, die in Tomaten nachgewiesen werden konnten, binden an die I-Box der Cab und Nia Promotoren der Tomate (Borello *et al.*, 1993). Da sich die verschiedenen I-Boxen außerhalb der konservierten Kernsequenz GATAAG deutlich unterscheiden, weisen die Faktoren der zweiten IBF-Gruppe entsprechend andere Bindespezifitäten auf. Insgesamt gibt es damit mindestens vier verschiedene I-Box-Bindefaktoren in Tomate.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Während eine Reihe von Untersuchungen über die an der Reifung von Tomate beteiligten Prozesse vorliegen (Gray *et al.*, 1992), ist speziell über die frühe Phase der Fruchtentwicklung und die daran beteiligten Gene relativ wenig bekannt. Daher sind kaum Daten über fruchtspezifische Promotoren, die nur im frühen Stadium der Fruchtentwicklung aktiv sind, verfügbar. Ebenso wurde bisher erst ein Promotorelement identifiziert, das möglicherweise an der fruchtspezifischen Genrepression beteiligt ist (Meier *et al.*, 1995). Ein Ansatzpunkt, um fruchtspezifische und entwicklungspezifische Promotorelemente zu finden, stellen die fünf *RBCS* Gene aus Tomate dar. Ihre Transkriptionsaktivität in den verschiedenen Organen der Tomate ist gut charakterisiert. In Früchten werden die *RBCS* Gene entwicklungsabhängig (ihre Aktivität sinkt im Verlauf der Fruchtentwicklung) und gewebespezifisch differentiell reguliert.

In dieser Arbeit wird der *RBCS2* Promotor des *RBCS2* Gens aus dieser Genfamilie herausgegriffen und stellvertretend für die anderen *RBCS* Genfamilienmitglieder hinsichtlich seiner *cis*-agierenden Elemente und seiner entwicklungsabhängigen Regulation während der Fruchtentwicklung untersucht. Der *RBCS2* Promotor zeigt eine vergleichsweise hohe Aktivität in jungen Früchten (Abb. 1). Bereits ein sehr kurzer Promotorabschnitt von 0.6 kb ist in der Lage, das spezifische Expressionsmuster des *RBCS2* Gens zu vermitteln, dadurch vereinfacht sich die Analyse. Gleichzeitig sollten die Ergebnisse auch auf den *RBCS1* Promotor übertragbar sein, da die Promotoren sich im Aufbau sehr ähnlich sind. Dies gilt prinzipiell ebenfalls für den *RBCS3A* Promotor, jedoch fällt seine Aktivität in jungen Früchten vergleichsweise niedrig aus, was aber vermutlich auf die Wirkung eines fruchtspezifischen Repressorproteins zurückzuführen ist, welches nur an den *RBCS3A* Promotor bindet (Meier *et al.*, 1995).

Für die Untersuchung der Aktivität des *RBCS2* Promotors sollte ein Transformationssystem auf Basis der transienten ballistischen Transformation, das für Blätter von Tomate bereits etabliert ist, auch für seine Anwendung in Früchten von Tomate optimiert werden. Bisher veröffentlichte Protokolle zur transienten ballistischen Transformation in Tomatenfrüchten lieferten nur sehr geringe Aktivitäten eines *RBCS2*-Luziferase Reportergenkonstruktes (Manzara *et al.*, 1994

und Montgomery *et al.*, 1993b). Damit ergeben sich folgende Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit:

- Entwicklung und Etablierung eines transienten ballistischen Transformations-system, das die Bestimmung von Promotoraktivitäten in verschiedenen Organen der Tomate erlaubt.
- Charakterisierung des *RBCS2* Promotors aus Tomate bezüglich seiner *cis*-agierenden Elemente.
- Überprüfung der *cis*-Elemente auf Organspezifität.
- Untersuchungen der entwicklungspezifischen Aktivität des *RBCS2* Promotors in Tomatenfrüchten.
- Indirekte (durch DNA-Bindestudien) und direkte Suche (durch Klonierung) nach *trans*-Faktoren, die die *RBCS2* Promotoraktivität beeinflussen.
- Charakterisierung des regulativen Einflusses der *trans*-Faktoren.

Durch die genaue Charakterisierung der Regulation der *RBCS2* Promotoraktivität sollen Ansätze aufgezeigt werden, mit deren Hilfe ein Promotor konstruierbar sein könnte, der es ermöglicht, Gene in Früchten bzw. in einzelnen Geweben der Frucht gezielt an- oder abzuschalten. Die Konstruktion von Hybrid-Promotoren stellt eine Möglichkeit dar, um nützliche und erwünschte Eigenschaften durch die Zusammenführung von Elementen verschiedener Promotoren zu kombinieren. So konnten bereits erfolgreich neuartige pflanzliche Promotoren mit veränderten Eigenschaften kreiert werden (Comai *et al.*, 1990).

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial dienten Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum*) der Kultursorte VFNT Cherry LA1221, die unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus angezogen wurden. Pflanzenmaterial für die Präparation von DNA, RNA oder Proteinen wurde zerkleinert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -70°C gelagert.

Das Material für transiente Transformationen wurde direkt nach dem Ernten verwendet. Für diese Experimente wurden junge Blätter ca. 10 cm langer Triebspitzen mit einem Durchmesser von fünf bis acht Millimeter ausgesucht. Transformationsexperimente mit Früchten verwenden bei vergleichenden Versuchen mit Blättern junge Früchte mit einem Durchmesser von 5-8 mm. In Untersuchungen der Fruchtentwicklung wurden Früchte der Durchmesser 5 mm, 25 mm und 40 mm (ausgewachsene unreife Früchte) und orange farbene Früchte verwendet. Das Fruchtstadium der Größe 5 mm ist ungefähr sechs Tage nach der Bestäubung erreicht, anschließend benötigt die Frucht etwa vier Wochen bis zur orangen Verfärbung.

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien für Lösungen und Puffer stammten von den Firmen Duchefa (Niederlande), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva/Boehringer Ingelheim (Heidelberg) und Sigma (München) und entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“. Feinchemikalien und Substanzen für Bakterien- und Hefekulturmedien stammten von den Firmen Biomol (Hamburg), Difco (Michigan, USA), Life Technologies/Gibco BRL (Eggenstein), Pharmacia Biotech (Freiburg) und Sigma. Lösungen, Standardpuffer und -medien, wie LB-Medium, SSC-, TAE-, TBE- und TE-Puffer, wurden nach Sambrook *et al.* (1989) mit deionisiertem Wasser aus der

Ionenaustauscheranlage Milli-Q_{PLUS} der Firma Millipore (Eschborn) angesetzt. Zur Sterilisation der Lösungen wurde entweder 20 min bei 121°C (1.2 bar) im Varioklav Typ 500 der Firma H+P Labortechnik (München) oder im Sanoclav der Firma Wolf (Geislingen) autoklaviert oder mit 0.2 µm-Syringe oder Bottle Top Filtern der Firma Nalgene (Rochester, USA) sterilfiltriert. Die Enzyme, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, wurden von den Firmen AGS (Heidelberg), Biozym (Oldenburg), Boehringer Mannheim (Mannheim), Life Technologies/Gibco BRL, MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia Biotech, Serva/Boehringer Ingelheim, und Sigma (München) bezogen. Filterpapiere wurden von den Firmen Schleicher und Schuell (Dassel) und Whatman (Springfield Mill, UK) erhalten, Nitrocellulosemembranen (Hybond-C), Nylonmembranen (Hybond-NX) und Röntgenfilme (HyperfilmTM-MP, HyperfilmTM-ECL) von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig). Für die ballistische transiente Transformation mit der Partikelkanone wurden Goldpartikel von der Firma Heraeus (Karlsruhe) mit einem Durchmesser von 0.4-1.2 µm (Micron) verwendet. Die Berstscheiben (Berstdruck 1550 psi und 1800 psi) stammten von Bio-Rad (München).

2.1.3 Mikroorganismen

Die Bakterienstämme wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen. Der Hefestamm YM4271 wurde von Clontech (Heidelberg) erhalten, alle weiteren Hefestämme wurden von Frau A. Rose (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die nachfolgenden Tabellen (Tab. 1 und Tab. 2) geben einen Überblick über die verwendeten Stämme.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Firma/Referenz
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^f</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Bullock <i>et al.</i> (1987)
XL0LR	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^f</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)] Su ⁻ (nonsuppressing) λ ^R (lambda resistant)	Stratagene, Jerpseth <i>et al.</i> (1992)

Tab. 2: Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Firma/Referenz
YM4271	<i>MATa ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 ade5 trp1-901 leu2-3 112 tyr1-501 gal4Δ gal80Δ ade5::hisG</i>	Clontech, Liu et al. (1993)
YMF8Blue	<i>MATa his3-200 lys2-801 ade2-101 ade5 trp1-901 leu2-3 112 tyr1-501 gal4Δ gal80Δ ade5::hisG URA3::UAF_{FM8-4}-TATA_{CYC1}-lacZ</i>	Rose (1998)
YM53HIS	<i>MATa lys2-801 ade2-101 ade5 trp1-901 leu2-3 112 tyr1-501 gal4Δ gal80Δ ade5::hisG URA3::UAF_{53m}-TATA_{CYC1}-lacZ HIS3:: UAF_{53m}-TATA_{HIS3}-his3</i>	Rose (1998)
YMICHIS	<i>MATa lys2-801 ade2-101 ade5 trp1-901 leu2-3 112 tyr1-501 gal4Δ gal80Δ ade5::hisG URA3::UAF_{PL(pIC2OH)}-TATA_{CYC1}-lacZ HIS3:: UAF_{PL(pIC2OH)}-TATA_{HIS3}-his3</i>	Rose (1998)
YMFHIS	<i>MATa lys2-801 ade2-101 ade5 trp1-901 leu2-3 112 tyr1-501 gal4Δ gal80Δ ade5::hisG URA3::UAF_{F-4}-TATA_{CYC1}-lacZ HIS3:: UAF_{F-4}-TATA_{HIS3}-his3</i>	Rose (1998)
YMF6HIS	<i>MATa lys2-801 ade2-101 ade5 trp1-901 leu2-3 112 tyr1-501 gal4Δ gal80Δ ade5::hisG URA3::UAF_{FM6-4}-TATA_{CYC1}-lacZ HIS3:: UAF_{FM6-4}-TATA_{HIS3}-his3</i>	Rose (1998)

2.1.4 Nukleinsäuren

2.1.4.1 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide G und GM sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Oligonukleotide wurden von Dr. I. Meier (DuPont, USA) zur Verfügung gestellt.

GATCTATTCTCATTCTGACACGTGGCACCCTTTCTTG ATAAGAGTAAGACTGTGCACCGTGGGAAAGAACCTAG	G
GATCTATTCTCATTCTGATCTAGAGCACCCTTTCTTG ATAAGAGTAAGACTAGATCTCGTGGGAAAGAACCTAG	GM

Abb. 6: Sequenzen der Oligonukleotide G und GM

Die farbigen Boxen umrahmen den konservierten Bereich der G-Box, der in GM verändert wurde.

In Standard-Sequenzierungen von pBluescript- und pIC20H-Konstrukten wurden markierte Primer (Dye Primer -21M13, M13Rev.) von der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) eingesetzt. Für weitere Sequenzierungen wurden nicht markierte Primer verwendet, die von den Firmen Eurogentec (Belgien) und Life Technologies/Gibco BRL (Eggenstein) stammten. Die Sequenzen der pAD-3'- und 5'-Primer wurden von F. Gindullis (DuPont, USA) übermittelt. Abbildung 7 zeigt die Sequenzen der verwendeten Sequenzierprimer.

-21M13/UP (Universal sequencing Primer)	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13Rev./RP (Reverse sequencing Primer)	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'
Exo	5'-CCA ACA GTA CCG GAA TGG GG-3'
LRE	5'-CTC TTC CTA CCC CCA TCT TG-3'
A2-4	5'-TTT GGA AGA GGA TAT GAA TGT ATG ATT GAG GTT GGT-3'
GBF4	5'-GAG TGT GAA GAG CTA CAA C-3'
GBF4rev.	5'-GTT GTA GCT CTT CAC ACT C-3'
GBF9	5'-GAA GCA GGC AGA GTG CGA T-3'
GBF4rev.	5'-ATC GCA CTC TGC CTG CTT C-3'
pAD 3'-Primer	5'-GCA CAG TTG AAG TGA ACT TGC-3'
pAD 5'-Primer 1	5'-AGG GAT GTT AAT ACC ACT AC-3'
pAD 5'-Primer 2	5'-GCG TTT GGA ATC ACT ACA GGG-3'

Abb. 7: Verwendete Sequenzierprimer

Die Primer Exo, LRE und A2-4 wurden für die Sequenzierung von RBCS2-LUC Deletionskonstrukten eingesetzt. Alle Primer GBF dienten der Sequenzierung von GBF-Klonen. Die pAD-Primer wurden für die Sequenzierung von Klonen des One-Hybrid Screens verwendet.

2.1.4.2 Plasmide und Konstrukte

Plasmidvektoren wurden von den Firmen Clontech, Invitrogen (Leek, Niederlande) und Stratagene bezogen. Ein Teil der Vektoren wurde von A. Rose (Universität Hamburg) und von Dr. I. Meier (DuPont, USA) zur Verfügung gestellt. Die für Klonierungen, Fragmentisolierungen und Transformationen verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Plasmid	Selektionsmarker	Firma/Referenz	Verwendung
pLUC	Amp ^R	Montgomery <i>et al.</i> (1993b)	PB*-Konstrukt
RBCS2-LUC	Amp ^R	Meier	Klonierungen PB*-Konstrukt
MutI-LUC	Amp ^R	Meier	PB*-Konstrukt
MutG-LUC	Amp ^R	Meier	PB*-Konstrukt
MutI/G-LUC	Amp ^R	Meier	PB*-Konstrukt
35S-GUS	Amp ^R	Meier	PB*-Konstrukt
pRTL2-GUS	Amp ^R	Carrington <i>et al.</i> (1991)	PB*-Konstrukt
pTSS1-91(#2)-IBI	Amp ^R	Pichersky <i>et al.</i> (1986)	RBCS-Sonde
pBS SKII ⁺	Amp ^R	Stratagene	Sequenzierung
pBS SKII ⁺ /GBF4	Amp ^R	Meier und Gruissem (1994)	GBF4-Sonde
pBS SKII ⁺ /GBF9	Amp ^R	Meier und Gruissem (1994)	GBF9-Sonde
pBS SKII ⁺ /GBF12	Amp ^R	Meier und Gruissem (1994)	GBF12-Sonde
pGAD424	Amp ^R , LEU2	Clontech	One-Hybrid System
pGAD53m	Amp ^R , LEU2	Clontech	One-Hybrid System
pAD16.1	Amp ^R , LEU2	Rose (1998)	One-Hybrid System
pHISi	Amp ^R , HIS3, URA3	Clontech	Klonierungen
pHISi-1	Amp ^R , HIS3	Clontech	Klonierungen
pIC20H	Amp ^R	Marsh <i>et al.</i> (1984)	Klonierungen
pFM8-4	Amp ^R	Rose (1998)	Klonierungen

Tab. 3: Verwendete Plasmide

PB = Particle Bombardment (Konstrukte für die ballistische transiente Transformation)

Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte.

Konstrukt	Vektor	Insert	Klonierung	Verwendung
-429	RBCS2-LUC	RBCS2 (-687)	1. <i>Hind</i> III	PB*-Konstrukt
-378		(5'-Ende wurde	2. Schutz durch thio-dNTPs	
-316		verkürzt)	3. <i>Sal</i> I	
-283			4. Exonuklease III-Verdau	
-200				
-181				
-144				
-70				
-40				
pFM8HIS	pHISi	FM8-4	<i>Sma</i> I/ <i>Bgl</i> II u. <i>Hind</i> III	One-Hybrid System
pFM8HIS1	pHISi-1	FM8-4	<i>Sma</i> I/ <i>Bgl</i> II u. <i>Hind</i> III	One-Hybrid System
pG	pIC20H	G	<i>Eco</i> RV	Gelretardierungsex.
pGM	pIC20H	GM	<i>Eco</i> RV	Gelretardierungsex.

Tab. 4: Hergestellte Konstrukte

In der Spalte Klonierung sind die Klonierungsstellen der Konstrukte aufgelistet: Fusion verschiedener Schnittstellen jeweils blunt end. Links steht die Schnittstelle des Vektors, rechts die des Inserts. G und GM lagen als Oligonukleotide vor (vergl. Abb. 6). PB = Particle Bombardment (Konstrukte für die ballistische transiente Transformation).

2.1.5 Sicherheit und Entsorgung

Biologisches Material wurde durch Autoklavieren oder durch Behandlung mit 70%igen Ethanol inaktiviert. Beim Umgang mit Gefahrstoffen und bei ihrer Entsorgung wurden die Sicherheitsratschläge des jeweiligen Herstellers befolgt (Tab. 5 auf der nächsten Seite). Nicht aufgelistet wurden ungefährliche und unschädliche Reagenzien. Die Gefahrstoffe wurden ordnungsgemäß getrennt gesammelt und entsprechend Tabelle 5 entsorgt.

Tab. 5: Gefahrstoffe und Sicherheitsratschläge

Chemikalie	besondere Gefahren	Sicherheitsratschläge	MAK	Entsorgung
Acrylamid	R45-46	S53-45	-	AC
3-Aminotriazol (3-AT)	R40-48/20	S36/37	-	AT
i-Amylalkohol	R10-20	S24/25	100 ml/m ³	A
Borsäure	R21/22-36/37/38	S26-36/37	-	D
Calciumchlorid	R36	S22-24	-	D
Chloroform	R20/22-38-40-48	S36/37	10 ml/m ³	B
Diethylpyrocarbonat	R20/22-36/37/38	S26-36	-	K
Digoxigenin	R20/22	S7-13	-	D
Dimethylformamid (DMF)	R61-20/21-36	S53-45	10 ml/m ³	A
1,4-Dithiothreit (DTT)	R22-36/38	-	-	A
Essigsäure (Eisessig)	R10-35	S23-26-45	10 ml/m ³	N
Ethanol	R11	S7-16	1000 ml/m ³	A
Ethidiumbromid	R22-26-36/37/38-40	S26-28.2-36/37-45	-	E
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	R22	-	-	A
Formaldehyd (37%ige Lsg.)	R23/24/25/34/40/43	S26-36/37/39-45	200 ml/m ³	F
Formamid	R61	S53-24/25-37-45	-	A
Guanidiniumthiocyanat	R20/21/22-32	S13	-	A/B
Kaliumkakodylat	R21-23/25	S1/2-20/21-28-45	-	A/B
Kaliumnitrat	R8	S16-41	-	D
Kupfersulfat	R22-36/38	S22	-	-
Lithiumchlorid	R22-36/38	-	-	-
Maleinsäure	R22-36/37/38	S26-28.1-37	-	D

Tab. 5: Gefahrstoffe und Sicherheitsratschläge (Fortsetzung)

Chemikalie	besondere Gefahren	Sicherheitsratschläge	MAK	Entsorgung
2-Mercaptoethanol	R22-23/24-34-51/53	S26-36/37 S39-45-61	Umweltgefährlich	A/B
Methanol	R11-23/25	S7-16-24-45	200 ml/m ³	A
3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	R36/37/38	S26-36	-	-
Natriumcarbonat	R36	S22-36	-	D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	R22-36/38	-	-	-
Natriumhydroxid	R35	S26-37/39-45	-	-
Natriumhypochlorit	R31-34	S26-28.1-36/37 S39-45	-	-
Nonidet-P-40	R36/38	S26-36	-	-
Phenol	R24/25-34	S28.6-45	5 ml/m ³	B
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	R34	S26-36/37/39-45	-	-
ortho-Phosphorsäure	R34	S26-36/37/39-45	-	-
2-Propanol	R11	S7-16	200 ml/m ³	A
Spermidin	R34	S26-36/37/39-45	-	-
Spermin	R34	S26-36/37/39-45	-	-
Sulfosalicylsäure	R36/38	S26	-	D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	R36/38	-	-	D
Triton X-100	R22-41	S24-26-39	-	-
Wasserstoffperoxid 30%	R34	S3-26-36/39-45	1 ml/m ³	D
Zinksulfat	R36/38	S22-25	-	-

Legende:

Entsorgung: getrennte Sammlung in Behältern für....

- A: Halogenfreie organische Lösungsmittel und Lösungen organischer Substanzen
- B: Halogenhaltige organische Lösungsmittel und Lösungen halogenhaltiger organischer Substanzen
- D: Salzlösungen, pH-Wert 6-8 einstellen
- E: Ethidiumbromidhaltige Rückstände
- F: Formaldehydhaltige Lösungen
- K: Entgiftung durch Autoklavieren
- N: unter Eiskühlung neutralisieren
- AC: Acrylamidhaltige Rückstände
- AT: 3-Aminotriazolhaltige Rückstände

R-Sätze:

R8: Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
 R10: Entzündlich
 R11: Leichtentzündlich
 R20: Gesundheitsschädlich beim Einatmen
 R21: Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
 R22: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
 R23: Giftig beim Einatmen
 R24: Giftig bei Berührung mit der Haut
 R25: Giftig beim Verschlucken
 R26: Sehr giftig beim Einatmen
 R31: Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase
 R32: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
 R34: Verursacht Verätzungen
 R35: Verursacht schwere Verätzungen
 R36: Reizt die Augen
 R38: Reizt die Haut
 R40: Irreversibler Schaden möglich
 R41: Gefahr ernster Augenschäden
 R43: Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
 R45: Kann Krebs erzeugen
 R46: Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen

R48: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition
 R61: Kann das Kind im Mutterleib schädigen
 R20/21: Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
 R20/22: Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
 R20/21/22: Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
 R R21/22: Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
 R23/24: Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
 R23/25: Giftig beim Einatmen und Verschlucken
 R24/25: Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
 R36/38: Reizt die Augen und die Haut
 R36/37/38: Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
 R48/22: Gesundheitsschädlich. Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken
 R51/53: Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

S-Sätze:

S3: Kühl aufbewahren
 S7: Behälter dicht geschlossen halten
 S13: Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
 S16: Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
 S22: Staub nicht einatmen

S23: Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen
 S24: Berührung mit der Haut vermeiden
 S25: Berührung mit den Augen vermeiden
 S26: Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren

S28: Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen	S1/2: Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren
S36: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen	S20/21: Bei der Arbeit nicht essen, trinken, rauchen
S37: Geeignete Schutzhandschuhe tragen	S24/25: Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
S39: Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen	S36/37: Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
S41: Explosions- und Brandgase nicht einatmen	S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen
S45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen	S37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
S53: Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisung einholen	
S61: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen	

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierungstechniken

2.2.1.1 Bakterienkulturen

Bakterien wurden in LB-Medium nach Sambrook *et al.* (1989) angezogen. Zur Plasmidselektion wurden 80 µg/ml Ampicillin zum Medium gegeben. Die Bestimmung der optischen Dichte von Flüssigkulturen wurde mit Hilfe des Spektralphotometers Uvikon 922 der Firma Kontron Instruments (Hamburg) durchgeführt. Festmedien enthielten 1.5% (w/v) Agar. Für die Indikation der *lacZ*-Komplementation wurden dem Medium zusätzlich 40 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) und 0.2 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) zugefügt.

Die langfristige Lagerung von Bakterienkulturen erfolgte in 15% Glycerin nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -70 bis -80°C.

2.2.1.2 Herstellung kompetenter E. coli-Zellen und Transformation

2.2.1.2.1 CaCl₂-Methode und Standardtransformation

Kompetente E. coli XL1-Blue-Zellen wurden nach dem CaCl₂-Verfahren hergestellt. Die Bakterienzellen einer 100 ml-Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0.3 bis 0.5 wurden nach 5 min Zentrifugation bei 4°C und 3.000 U/min in der Varifuge 3.0R der Firma Heraeus in 50 ml eisgekühlten Transformationspuffer (100 mM CaCl₂; 70 mM MnCl₂ und 40 mM NaAc; pH 5.5) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension der Zellen in 5 ml des Puffers wurden 700 µl 80%iges Glycerin untergemischt und die Suspension in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so präparierten Zellen wurden bei -70 bis -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die E. coli-Zellen auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA in einem Volumen von maximal 20 µl zugemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 2 min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und nach Abkühlung auf Eis in je 1 ml LB-Medium für 30 bis 60 min bei 37°C geschüttelt und anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert.

2.2.1.2.2 Elektrotransformation

Für die Transformation aus Hefe isolierter Plasmide in E. coli XL1-Blue wurde das Verfahren der Elektroporation angewendet, da sich die herkömmliche Methode als ineffizient erwies. Für die Vorbereitung hocheffizienter Zellen wurden 400 ml einer Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 0.5 bis 0.8 nach 30 min Inkubation auf Eis 15 min bei 4°C und 5.000 U/min in der Sorvall[®]-Zentrifuge RC24 der Firma DuPont (Bad Homburg) im GSA-Rotor zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 200 ml kaltem H₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension in 4 ml kaltem 10%igem Glycerin wurde die Zellsuspension im SS-34-Rotor 15 min bei 4°C und 5.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Endvolumen von 1 ml 10%igem Glycerin aufgenommen und in 40 µl-Aliquots wie bei der CaCl₂-Methode eingefroren. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zugemischten DNA, die zuvor in einer Sephadex/H₂O-Säule (siehe 2.2.1.3)

gereinigt worden war, einige Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Überführen der Zellsuspension auf den Boden einer vorgekühlten Spezialküvette wurde diese in das Elektrotransformations-gerät Easyject Basic p21-12 der Firma Eurogentec eingesetzt und ein Elektropuls appliziert. Danach wurden die Zellen mit 960 µl LB-Medium aus der Küvette gespült und wie im Abschnitt 2.2.1.2.1 beschrieben bei 37°C inkubiert und ausplattiert.

2.2.1.3 Reinigung von DNA

Als Standardmethode zur Reinigung von DNA wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion und die Fällung mit 0.3 M Natriumacetat (pH 4.8 oder 5.2) und 2.5 fachem Volumen Ethanol nach Sambrook *et al.* (1989) angewendet. Die Zentrifugationsschritte fanden in den Tischzentrifugen 112, 201m und 2K15 der Firma Sigma statt. Eine weitere Methode war die Aufreinigung der Plasmide oder DNA-Fragmente über Sephadex-Minisäulen. Dazu wurde eine 250 µl- oder 1 ml-Pipettenspitze mit Baumwolle verstopft und mit sterilem in H₂O oder 1xTE resuspendiertem Sephadex G-25 Superfine der Firma Pharmacia Biotech gefüllt. Diese Säule wurde in den durchlochenden Deckel eines Eppendorfgefäßes eingesetzt und in einem 15 ml-Falconröhrchen durch 2 min Zentrifugation bei 3.000 U/min in der Varifuge 3.0R der Firma Heraeus getrocknet. Danach wurde die trockene Säule auf eine neue Eppendorftube gesetzt, die DNA-Lösung auf die Säule gebracht und erneut zentrifugiert.

2.2.1.4 Restriktion von DNA

Die Durchführung von enzymatischen Verdauen von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte mit dem jeweils für die Enzyme empfohlenen Restriktionspuffer der Firmen Boehringer Mannheim oder MBI Fermentas. Dabei wurden 2 bis 10 Enzymeinheiten pro µg DNA eingesetzt und der Ansatz bei 37°C (*Sma*I 30°C) für 1 bis 4 h inkubiert. Ansätzen mit DNA aus Mini-Plasmidpräparationen wurde je 1 µg RNase zugesetzt, sofern die DNA nicht als Template für *in vitro*-Transkriptionen dienen sollte. 5'-Deletionskonstrukte wurden durch Exonuklease III-Verdau nach Henikoff (1984) erhalten.

2.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde zum einen durch elektrophoretischen Transfer auf Ionenaustauscherpapier (DE-81) durchgeführt. Dazu wurde zurechtgeschnittenes DE-81-Papier in 1 M NaCl/1xTE und anschließend in 1xTAE eingeweicht, getrocknet und in das Agarosegel direkt unterhalb der zu isolierenden Bande eingesetzt. Nach 15 min Elektrophorese wurde das Papier entnommen, getrocknet und die am Papier haftende DNA durch Elution mit 1 M NaCl/1xTE in einem Volumen bis zu 30 μ l in Lösung gebracht. Vor der weiteren Verwendung wurde diese Lösung über eine Sephadex-Minisäule gereinigt. DNA-Fragmente wurden außerdem aus Agarosegelen mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) nach den Anweisungen der Firma im „QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol“ im „QIAEX II Handbook“ von 1997 eluiert. Als Elutionspuffer wurde dabei in Abweichung zum Protokoll 10 mM Tris-HCl; pH 8.0 verwendet.

2.2.1.6 Auffüllen von überhängenden Enden

Überhängende Enden wurden in einer Klenow-Polymerase-Reaktion „blunt end“ aufgefüllt. Die Reaktionen fanden in dem empfohlenen Puffer und bei einer dNTP-Konzentration von 2 mM für 20 bis 30 min bei Raumtemperatur statt. Zur Abtrennung der Nukleotide wurde der Ansatz abschließend über eine Sephadex-Säule gereinigt. Zum Schutz von 5'-Enden vor einem ExonukleaseIII-Verdau wurden diese mit thio-dNTPs (α -Phosphoro-thioat-dNTP-Mix von Promega/Boehringer Ingelheim, Heidelberg) nach Jasin *et al.* (1983) aufgefüllt.

2.2.1.7 Ligation von DNA

Ligationen wurden mit der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 durchgeführt. Die zu ligierende DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit dem empfohlenen Ligase-Puffer und einer Enzymeinheit T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. Dabei wurde das zu ligierende Fragment je nach Reaktion im Überschuß zugesetzt.

Unkomplizierte Ligationen („sticky end“ oder Religation des Vektors ohne Einbringen eines Inserts) erfolgten für 30 min bei Raumtemperatur. Die Ligationsansätze wurden anschließend direkt für eine Transformation verwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.2 DNA-Isolierung

2.2.2.1 Plasmidpräparation aus E. coli

Plasmide aus E. coli wurden im kleinen Maßstab nach der „Boiling“-Methode von Holmes und Quigley (1981) isoliert. Für DNA in Sequenzierqualität wurde eine von F. Buck (Institut für Zellbiochemie, UKE Hamburg) modifizierte Variante des Protokolls durchgeführt. Das Bakterienpellet aus 1.5 ml Übernachtskultur wurde in 250 µl TELT-Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl; 62.5 mM EDTA; 2.5 M LiCl; 0.4% Triton X-100; pH 7.5) mit 12.5 µl Lysozymlösung (20 mg/ml) resuspendiert und nach 5 min Inkubation auf Eis für 2 min aufgekocht. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde die Suspension 10 min bei 4°C und 15.300 U/min in der Tischzentrifuge 2K15 der Firma Sigma zentrifugiert und das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde einer Phenol/Chloroform-Extraktion nach den Angaben von Sambrook *et al.* (1989) unterzogen und aus der wässrigen Phase abschließend die Plasmid-DNA ohne weitere Salzzugabe bei Raumtemperatur mit einem einfachen Volumen Isopropanol gefällt und 20 min zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl sterilem deionisiertem Wasser aufgenommen.

Besonders hochwertige DNA wurde durch die Verwendung des „Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System“-Kit der Firma Promega/Boehringer Ingelheim (Heidelberg) erhalten.

Mittelgroße Mengen DNA wurden nach dem sogenannten Midi-Verfahren isoliert. Die Zentrifugationen fanden in der Varifuge 3.0R der Firma Heraeus statt. 100 ml Übernachtskultur wurden 5 min bei 4°C und 5000 U/min in zwei 50 ml Falcons pelletiert. Beide Pellets werden durch Vortexen nach Zugabe von je 2 ml einer Lysozymlösung (100 mg Lysozym auf 4 ml einer Lösung 1 mit 50 mM Glucose, 25 mM TRIS; pH 8.0 und 10 mM EDTA; pH 8.0) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die vereinigten Suspensionen wurden vorsichtig mit 8 ml Lösung 2 (0.2 M

NaOH, 1% SDS) gemischt. Nach Zugabe von 6 ml Lösung 3 (3 M Kaliumacetat; pH 4.8) wurde die Probe geschwenkt und 15 min bei 4°C und 5000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat des Überstandes wurde mit einem Volumen Isopropanol versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 4°C und 5000 U/min wurde das Pellet in 5ml 1xTE gelöst. Durch Zugabe von 5 ml 5 mM LiCl in 50 mM TRIS; pH 8.0 und anschließender 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde die enthaltene RNA gefällt. Danach wurde 10 min bei 4°C und 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Falconröhrchen mit einem 2.5 fachen Volumen Ethanol gefällt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde das Röhrchen für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach 10 min bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml 1xTE mit 60 µg RNase gelöst und in einem frischen 15 ml-Falconröhrchen 30 min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde einer Phenol/Chlorofom-Extraktion nach den Angaben von Sambrook *et al.* (1989) unterzogen und aus der wäßrigen Phase abschließend die Plasmid-DNA durch Zugabe von einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetatlösung; pH 5.2 und 2 Volumen Ethanol 10 min bei Raumtemperatur gefällt und 20 min bei 4°C und 5000 U/min zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 250-500 µl 1xTE aufgenommen. Für die Präparation sehr großer Mengen Plasmid-DNA wurde der „Wizard™ Plus Maxipreps DNA Purification System“-Kit der Firma Promega/Boehringer Ingelheim (Heidelberg) verwendet und nach Protokoll des Herstellers verfahren.

2.2.2.2 Plasmidpräparation aus Hefe

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe erfolgte nach den auf Hoffman und Winsten (1987) und Kaiser und Auser (1993) basierenden Angaben im Protokollheft „MATCHMAKER One-Hybrid System Protocol“ von 1995, Nr. PT1031-1, Version PR58486 der Firma Clontech.

2.2.2.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren erfolgte auf photometrischen Wege mit Hilfe des GeneQuant-Spektralphotometers DNA/RNA Calculator der Firma

Pharmacia Biotech nach Sambrook *et al.* (1989) oder durch Vergleich der Intensität ethidiumbromid-gefärbter DNA-Banden mit einem Standard nach Auftrennung im Agarosegel mit dem Computerprogramm E.A.S.Y. plus Rev 3.24.

2.2.3 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation der in Gelretardierungsexperimenten eingesetzten Kompetitor-Fragmente (G und GM mit Polylinkersequenz, vergl. Abb. 19 in 3.3.1) fand die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) Anwendung. Es wurden die Taq-Polymerase sowie Reaktionspuffer und MgCl₂-Lösung von der Firma Life Technologies/Gibco BRL verwendet, die Nukleotide stammten von der Firma Pharmacia Biotech.

Die Reaktionen enthielten in 1xReaktionspuffer ca. 20 ng Template-DNA, je 100 ng der Primer UP und RP (siehe 2.1.4.1), 330 nmol dNTPs, 4 mmol MgCl₂ und 5 Enzymeinheiten Taq-Polymerase. Die PCR wurde im TRIO-Thermoblock der Firma Biometra (Göttingen) mit folgendem Programm durchgeführt: 4 min 94°C; (45 sec 94°C; 45 sec 50°C; 2 min 72°C)x29; 10 min 72°C; 4°C.

2.2.4 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

2.2.4.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde durch enzymatische Synthese nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977) in Form einer PCR im DNA Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer/Applied Biosystems (Weiterstadt) oder im TRIO-Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt. Dabei wurden markierte Primer (ABI PRISM™ Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit FS) oder markierte Didesoxynukleotide (ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits FS und BigDye) verwendet. Die genannten Kits wurden von der Firma Perkin Elmer/Applied Biosystems bezogen. Die Durchführung der Sequenzreaktionen erfolgte nach den Angaben in den Protokollheften des Herstellers, teilweise mit leichter Abänderung des Protokolls. So wurde nur die Hälfte der empfohlenen Menge an

DNA und Ready Reaction Mix eingesetzt. Die Sequenzierungsprodukte wurden auf dem DNA-Sequenzierer 377 der Firma Perkin Elmer/Applied Biosystems analysiert.

2.2.4.2 Software für die Sequenzanalyse

Für die Analyse und den Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen wurden die Programme Seqman und MegAlign (DNASTAR 3.5 Inc., USA) und MacVector™ 4.1.4 (Scientific Imaging Systems, USA) für Apple Macintosh Computer verwendet. Homologievergleiche fanden über die Programme BLASTX, BLASTN und BLASTP (Altschul *et al.*, 1990; blast@ncbi.nlm.nih.gov) und BLITZ (BLITZ@ebi.ac.uk) mit der GenBank- und EMBL-Datenbank statt.

2.2.5 RNA-Isolierung

2.2.5.1 RNase-Inaktivierung

Alle Lösungen für Arbeiten mit RNA wurden entweder direkt mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt oder mit DEPC-behandeltem deionisiertem Wasser angesetzt, falls die Lösungen selber beim Autoklavieren (zur Entgiftung des DEPCs) degradiert wären. Die DEPC-Behandlung erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Alle benutzten Geräte wie Elektrophoresekammern und Hybridisierungsröhren wurden vor ihrer Verwendung mit Seifenwasser und Ethanol gereingt.

2.2.5.2 Gesamt-RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung von RNA in größeren Mengen aus Pflanzengewebe erfolgte nach Piechulla *et al.* (1986).

2.2.6 Analyse von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese und Blotting

2.2.6.1 DNA-Auftrennung in Agarose-Gelen

DNA wurde in Agarosegelen der Konzentrationen 0,7% bis 1,5% SeaKem®-Agarose der Firma FMC Bioproducts (Rockland, USA) in 1xTAE-Puffer mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen Beladungspuffer (50% 1xTAE; 0.25% Bromphenolblau (BPB); 0.25% Xylencyanol (XC); 50% Glycerin) versetzt. Zum Größenvergleich und zur Mengenabschätzung einzelner Banden wurden die DNA-Längenstandards λ -DNA, *EcoRI*+*HindIII* und 1 Kb DNA-Ladder der Firma Life Technologies/Gibco BRL aufgetragen. Die Durchführung der Elektrophoresen erfolgte bei einer Spannung von 30 bis 120 Volt in Mini-Gelkammern der Firmen AGS (Heidelberg) und MWG Biotech (Ebersberg) mit den Spannungsgeräten Power-Pac 300 der Firma Bio-Rad (München) und LKB-GPS 200/40 der Firma Pharmacia Biotech. Nach der Auftrennung konnten die Nukleinsäurebanden über das in den Gelen enthaltene Ethidiumbromid mit UV-Bestrahlung detektiert werden. Die Dokumentation der resultierenden Bandenmuster erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Wellenlänge 304 nm) und einer Videokamera mit angeschlossenem Videoprinter der Firma Herolab (Wiesloch).

2.2.6.2 RNA-Auftrennung in Formaldehyd-Gelen

RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in 1.5 bis 2%igen Agarose-Gelen mit Formaldehyd (Endkonzentration: 6% Formaldehyd) in 1xMOPS-Puffer (200 mM MOPS; 50 mM NaAc; 10 mM EDTA; pH 8.0) aufgetrennt. Als Längenstandard für die RNA-Elektrophorese wurde 0.24-9.5 Kb RNA Ladder der Firma Life Technologies/Gibco BRL verwendet. Die RNA-Proben (5 bis 20 µg RNA) wurden mit einem dreifachen Volumen des RNA-Probenpuffers (65% Formamid; 8% Formaldehyd; 1xMOPS; pH 8.0) versetzt, 5 min auf 65°C erhitzt und nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) je 10 µl Probenvolumen sofort aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in Mini-Gelkammern bei 4 V/cm mit 1xMOPS; pH 7.0 als Laufpuffer ausgeführt. Die Dokumentation wurde wie bei DNA-Gelen durchgeführt.

2.2.6.3 Southern-Blotting

Der Transfer von aufgetrennter DNA aus dem Gel auf eine Membran erfolgte mit Hilfe der Kapillarblottechnik (Southern, 1975) nach Sambrook *et al.* (1989) mit 20xSSC als Transferpuffer. Die DNA-Fragmente wurden auf der Nylonmembran Hybond-NX (RPN 303B) immobilisiert. Um die Bindung der DNA auf der Hybridisierungsmembran zu fixieren, wurde mit UV-Licht (120 mJoules/cm²) im UV-Crosslinker UVC 1000 der Firma Hoefer (San Francisco, USA) bestrahlt.

2.2.6.4 Northern-Blotting

Die im Formaldehydgel aufgetrennten RNA-Fragmente wurden aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybond-NX) übertragen. Der Transfer erfolgte wie beim Southern-Blot als Kapillarblot nach Sambrook *et al.* (1989) mit 20xSSC als Transferpuffer. Anschließend wurde die RNA wie beim Southern-Blot durch Bestrahlung mit UV-Licht auf der Membran fixiert.

2.2.6.5 Herstellung von Sonden für die molekulare Hybridisierung

2.2.6.5.1 RBCS-Sonde

Als Sonde für die *RBCS*-Gene wurde ein *EcoRI-HindIII*-Fragment aus dem Plasmid pTSS1-91(#2)-IBI verwendet. Es enthält die komplette kodierende Region und Teile der untranslatierten Regionen des *RBCS2*-Gens. Das Fragment wurde mit dem „DIG DNA Labeling Kit“ der Firma Boehringer Mannheim nach dem im Beipackzettel beschriebenen Protokoll im Random Primed-Verfahren markiert, die Konzentration im Dot-Blot getestet und anschließend als Sonde eingesetzt.

2.2.6.5.2 GBF-Sonden

Die cDNAs der GBF4, GBF9 und GBF12 aus Tomate (von Dr. Meier, DuPont, zur Verfügung gestellt) wurden für die *in vitro*-Transkription einer RNA-Sonde mit dem „DIG RNA Labeling Kit“ der Firma Boehringer Mannheim eingesetzt. Als Template wurden die Plasmide pSK/GBF4, pSK/GBF9 und pSK/GBF12 durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* in Transkriptionsrichtung hinter dem Insert am ursprünglichen 5'-Ende der klonierten mRNA linearisiert und durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung gereinigt. Die *in vitro*-Transkriptionsreaktion wurde nach Angaben des Herstellers im Beipackzettel des Kits mit der T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Es entstand das Antisense-Produkt der klonierten cDNAs. Die Konzentrationen der Sonden wurden mit Hilfe eines Dot-Blots bestimmt.

2.2.6.5.3 25S rRNA-Sonde

Die Sonde für den Nachweis der 25S rRNA auf Northern-Blots wurde freundlicherweise von Dr. F. Hartung aus der Arbeitsgruppe Prof. Mühlbach, Universität Hamburg, zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um eine DIG-markierte DNA-Sonde aus einer PCR-Reaktion. Sie enthält das Fragment von Nukleotid 3089 bis 3334 der 25S rDNA der Tomatensorte Rutgers (Mühlbach, H.-P., 1995).

2.2.6.6 Molekulare Hybridisierung von Nukleinsäuren

Für die molekulare Hybridisierung der DIG-markierten Sonden an Southern- oder Northernmembranen wurde das Protokoll im Beipackzettel zum „DIG DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive“ der Firma Boehringer Mannheim abgeändert. Vor der Hybridisierung wurden die Membranen 1 bis 2 Stunden bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur in Glasröhren mit Prähybridisierungslösung (100 µg/ml Heringssperma-DNA in 5xSSC; 2% (w/v) Blocking-Reagenz; 0.1% (w/v) N-Laurylsarkosin; 0.02% SDS; 50% (v/v) Formamid) im Mini-Hybridisierungsofen (Mini Hybridisation Oven) der Firma Appligene (Heidelberg) inkubiert. Die Hybridisierung selber wurde über Nacht (mindestens 16 Stunden) mit DIG-markierter Hybridi-

sierungssonde in einer Konzentration von 5 bis 20 ng/ml im genannten Puffer durchgeführt. Vor ihrer Zugabe zur Hybridisierungslösung wurden die Sonden mit 100 µl deionisiertem Wasser verdünnt und zur Denaturierung 3 min bei 100°C aufgeköcht. DNA-RNA-Hybridisierungen fanden bei 50°C statt, RNA-RNA-Hybridisierungen bei 68°C. Für die Stringenz wurden die Membranen nach der Hybridisierung zweimal 5 min bei Raumtemperatur in 2xSSC/0.1% SDS und zweimal 20 min bei 68°C in 0.1xSSC/0.1% SDS gewaschen. Bei Hybridisierung mit den GBF-Sonden wurde die Stringenz der zweiten Waschlösung durch Verwendung von 0.0075xSSC/0.1% SDS erhöht.

2.2.7 Digoxigenin-Detektion

Die Detektion der Digoxigenin-Markierungen erfolgte mit dem „DIG Lumineszenz Detection Kit“ der Firma Boehringer Mannheim nach den Angaben im Beipackzettel des Herstellers. Zur Dokumentation wurden Röntgenfilme (Hyperfilm™-ECL), die mit Hilfe einer Entwicklermaschine der Firma Protec (Hamburg) entwickelt wurden, verwendet.

2.2.8 Proteinisolierung

2.2.8.1 Kernproteinisolierung aus Pflanzenmaterial

Kernproteinextrakte wurden nach Manzara *et al.* (1991) aus jungen Tomatenfrüchten der Stadien „5 mm“, „15 mm“, „25 mm“, „40 mm“, „orange“ und „rot“ isoliert.

2.2.8.2 Gesamtproteinisolierung aus Pflanzenmaterial

2.2.8.2.1 Isolierung von nativem, pflanzlichen Gesamtprotein

Gesamtproteinextrakte wurden unter nicht denaturierenden Bedingungen wie in Abschnitt 2.2.12.3 beschrieben isoliert. Es wurden für Gelretardierungsexperimente

Proteinextrakte der Fruchtstadien „5 mm“, „25 mm“, „40 mm“, und „orange“ hergestellt.

2.2.8.2.2 Isolierung von denaturiertem, pflanzlichen Gesamtprotein

Zur Herstellung von nicht nativem Gesamtproteinextrakt der Fruchtstadien „5 mm“, „25 mm“, „40 mm“, und „orange“ wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend gemörsert. Danach wurde das Material in SDS-Puffer (50 mM Tris-HCl; 2% SDS; 30% Glycerin; 100 mM DTT; pH 6.8) aufgenommen (2 ml Puffer/1.0 g Pflanzenmaterial) und 5-10 min aufgekocht. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 12.000 U/min in der Tischzentrifuge 2K15 der Firma Sigma wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und bei -70°C gelagert. Die Extrakte wurden in Western-Experimenten eingesetzt.

2.2.8.3 Gesamtproteinisolierung aus *E. coli*

2.2.8.3.1 Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression von GBF4, GBF9 und GBF12 sowie einer Kontrolle (pSK) wurde IPTG-induziert im *E. coli*-Stamm XL1 Blue durchgeführt. Für die Induktion der Proteinsynthese in den Bakterienkulturen wurde bei einer OD_{600} von 0.6 0.1 M IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Um Proteinabbau vorzubeugen, wurde gleichzeitig der Proteinase-Inhibitor PMSF als 0.1 molare Lösung in Ethanol in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Anschließend wurden die Zellen 2 Stunden bei 37°C kultiviert. Die Ernte der Bakterien erfolgte nach Aliquotierung durch Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 4.000 U/min in der Varifuge 3.0R der Firma Heraeus oder für 1 Minute bei 12.000 U/min in der Tischzentrifuge 2K15 der Firma Sigma. Bis zu ihrer weiteren Verarbeitung wurden die Pellets bei -20°C eingefroren.

2.2.8.3.2 Isolierung von nativem Gesamtprotein aus E. coli

Die Pellets der pSK-, GBF4-, GBF9- und GBF12-Expression aus 45 ml Kultur wurden auf Eis aufgetaut und mit je 5 ml Sonifikationspuffer (50 mM Na-PO₄-Puffer; pH 8.0 und 300 mM NaCl) versetzt, in ein Oakridgeröhrchen überführt und über Nacht bei -20°C wieder eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eiswasser wurden die Bakterienzellen durch Ultraschallimpulse (4x15 s, 2x1 min, dazwischen jeweils Pausen von 30 s) unter Eiskühlung mit dem Sonifikator Model 250/450 Sonifier® der Firma Branson (Danbury, USA) sonifiziert. Nach 20 min Zentrifugation bei 4°C und 7820 U/min in einem SS-24-Rotor der Sorvall®-Zentrifuge RC24 der Firma DuPont wurde der Überstand durch Zugabe von Glycerin und 1 M DTT auf einen Glyceringehalt von 20% und eine DTT-Konzentration von 0.01 M gebracht. Das so gewonnene Protein wurde bei -70°C gelagert und in Gelretardierungsexperimenten eingesetzt.

2.2.8.3.3 Isolierung von denaturiertem Gesamtprotein aus E. coli

Die Pellets der pSK-, GBF4-, GBF9- und GBF12-Expression aus 1 ml Kultur wurden auf Eis aufgetaut und in je 100 µl SDS-Puffer (50 mM Tris-HCl; 2% SDS; 30% Glycerin; 100 mM DTT; pH 6.8) aufgenommen und 10 min aufgekocht. Nach 10 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und 12.000 U/min in der Tischzentrifuge 2K15 der Firma Sigma wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und anschließend bei -20°C gelagert. Die Extrakte wurden in Western-Experimenten eingesetzt.

2.2.8.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) mit dem Protein Assay Dye Reagent der Firma Bio-Rad nach den Empfehlungen des Herstellers im Beipackzettel bestimmt.

2.2.9 Analyse von Proteinen durch Gelelektrophorese und Blotting

Zur Analyse von Proteinen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) und Western-Blots durchgeführt.

2.2.9.1 SDS-PAGE

SDS-Polyacrylamidgele nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese wurden nach Sambrook *et al.* (1989) mit Acrylamid rotiphorese[®] Gel30 der Firma Roth im Mini Protean-Gießstand der Firma Bio-Rad präpariert. Es wurden Trenngelkonzentrationen von 10-15% Acrylamid und eine Sammelgelkonzentration von 5% verwendet. Vor dem Auftragen wurde zu den Proteinlösungen $\frac{1}{4}$ Volumen Protein-Probenpuffer (0.19 M Tris-HCl; 7% SDS; 15% β -Mercaptoethanol; 30% Glycerin; 0.25% Brom-phenolblau; pH 6.8) gegeben und kurz aufgeköcht. Als Längenstandard diente der Color Marker Wide Range der Firma Sigma. Für die Elektrophorese wurde Tris-Glycin-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl; 200 mM Glycin; 0.1% SDS; pH 8.8) verwendet. Die Elektrophorese wurde in der Mini Protean-Gelkammer der Firma Bio-Rad bei 80-120 V durchgeführt.

Die Coomassie-Färbungen der Gele folgten den Beschreibungen von Sambrook *et al.* (1989). Anschließend wurden die gefärbten Gele nach dreistündiger Inkubation bei 4°C in 5% Glycerin zwischen angefeuchtete Einmachhaut gespannt und luftgetrocknet.

2.2.9.2 Western-Blotting

Die Proteine wurden für Western-Analysen aus dem Gel nach Sambrook *et al.* (1989) durch Elektroblot auf die Nitrocellulosemembran Hybond-C (RPN2020W) transferiert. Der Transfer erfolgte 40-60 min bei 15 V in der Blotting-Apparatur Trans-Blot[®] SD der Firma Bio-Rad mit Hilfe des Spannungsgeräts GPS-3030 D der Firma Phase (Lübeck). Die Vollständigkeit des Transfers der Proteine auf die Membran wurde vor der Immunodetektion durch Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau S nach Sambrook *et al.* (1989) kontrolliert.

2.2.9.3 Immunodetektion

Die auf die Membran übertragenen Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper in einer ECL-Detektion nachgewiesen. Als Primärantikörper wurden die polyklonalen Antikörper gegen GBF9 in Tomate (Antikörper 580-9, Verdünnung 1:1000 in TBST Puffer (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20; pH 8.0)), GBF12 in Tomate (583-12, Verdünnung 1:1000 in TBST) und gegen GBF1 aus Arabidopsis (anti-GBF1, Verdünnung 1:500 in TBST) verwendet. 580-9 und 583-12 wurden von Dr. I. Meier (DuPont) zur Verfügung gestellt, anti-GBF1 von Prof. Dr. A. Batschauer (Universität Marburg). Als Sekundärantikörper diente Anti-Kaninchen IgG (aus Ziege) Peroxidase-Konjugat der Firma Biogenes (Berlin) (Verdünnung 1:10000 in TBST).

Vor der Antikörperbindung wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in 4% Magermilchpulver der Marke „Glücksklee“ in TBST geschüttelt, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Nach dem zweimaligen Abspülen der Membranen mit Puffer wurden sie einmal 15 min und zweimal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Nach einer Stunde Schütteln in Primärantikörper-Lösung wurden diese Waschschriffe wiederholt und die Membranen danach 40 min in Sekundärantikörper-Lösung geschüttelt. Abschließend wurden wieder die Waschschriffe wiederholt und dabei um zwei 5 min-Waschschriffe verlängert. Direkt nach dem letzten Waschschriff wird die Detektion des Sekundärantikörpers über die gekoppelte Peroxidase durchgeführt.

Für die Peroxidase-Reaktion wurden gleiche Volumina der Detektionslösungen 1 (0.1 M Tris-HCl; 2.5 mM Luminol (3-Aminophthalhydrazid); 400 µM *p*-Coumarsiure; pH 8.5) und 2 (0.1 M Tris-HCl; 5.4 mM H₂O₂) gemischt, auf glattgezogene Frischhaltefolie über einer Glasplatte pipettiert und die Membranen mit der Proteinseite nach unten 1 Minute in dem Lösungsgemisch inkubiert. Die Dokumentation erfolgte wie bei der Digoxigenin-Detektion auf Röntgenfilmen (Hyperfilm™-ECL).

2.2.10 Modifikation von Proteinen

Für Gelretardierungsexperimente wurden Kernproteinextrakte und in *E.coli* exprimiertes, natives GBF12 phosphoryliert oder dephosphoryliert.

2.2.10.1 Phosphorylierung

12 µg GBF12 bzw. je 17 µg Kernproteinextrakt der Fruchtstadien „5 mm“, „25 mm“ und „40 mm“ wurden in 1xCasein-Kinase-Reaktionspuffer von Biolabs (20 mM TRIS; pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂) mit 20 mM ATP (Calbiochem, Bad Soden) und 500 Einheiten Casein Kinase II (Biolabs) eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Kontrollreaktionen wurden mit Casein Kinase II angesetzt, die 10 min bei 75°C erhitzt und dadurch inaktiviert worden war. Anschließend wurden die Proben direkt in Gelretardierungsexperimenten eingesetzt (2.5 µg der phosphorylierten Kernproteinextrakte und 0.25-0.5 µg GBF12) oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.10.2 Dephosphorylierung

Vor der Dephosphorylierung wurde phosphoryliertes GBF12 aus 2.2.10.1 dialysiert. Der Reaktionsansatz aus 2.2.10.1 wurde dazu auf einen semipermeablen Membranfilter 0.025 µm von der Firma Millipore (Eschborn) aufpipettiert, der auf der Oberfläche von 30 ml Dialysepuffer (20 mM Hepes; 40 mM NaCl; 0.2 mM EDTA; 20% Glycerol; 1 mM DTT; pH 7.6) in einer Petrischale schwamm. Die Dialyse wurde bei 4°C für 30 min durchgeführt und anschließend das Dialysat vorsichtig mit einer Pipette von der Membran wieder abgezogen und direkt für Reaktionen eingesetzt.

2 µg phosphoryliertes und dialysiertes GBF12 bzw. 4 µg „5 mm“ Kernproteinextrakt und je 10 µg Kernproteinextrakt der späteren Fruchtstadien wurden in 1 µM MgCl₂ und 10 mM TRIS; pH 8.5 in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit einer Einheit immobilisierter alkalischer Phosphatase (Sigma) 30 min bei leichtem Schütteln und 30°C inkubiert. Vor ihrer Verwendung wurde die immobilisierte alkalische Phosphatase fünfmal durch Abzentrifugation, Abnahme des Überstandes und anschließende Aufnahme in deionisiertem H₂O gewaschen. Nach der Phosphorylierungsreaktion wurde das Immobilisat abzentrifugiert und 10 µl des Überstandes direkt für Gelretardierungsexperimente eingesetzt.

2.2.11 Gelretardierungsexperiment

Für die Gelretardierungsexperimente wurde der „DIG Gel Shift Kit“ der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Die Markierung des durch Polylinkersequenz verlängerten G-Box-Oligonukleotides (vergl. Abschnitt 3.3.1) fand nach den Angaben des Herstellers im Protokollheft zum „DIG Gel Shift Kit“ statt, für die weiteren Schritte wurde das vorgeschlagene Protokoll verändert. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 13 µl angesetzt und 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 0.8 ng DIG-markiertes Fragment, 1.2 µg poly-(dIdC) und variierende Mengen Protein eingesetzt. Die Volumina wurden durch Zugabe von Dialysepuffer (20 mM Hepes; 40 mM NaCl; 0.2 mM EDTA; 20% Glycerol; 1 mM DTT; pH 7.6) ausgeglichen. Für Supershift-Experimente wurden zusätzlich 200 µg der Antikörperseren 580-9 oder 583-12 bzw. 125 µg anti-GBF1 zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in einem 5%igen Polyacrylamidgel in 0.5xTBE (Acrylamid rotiphorese®Gel40 von der Firma Roth) und in 0.5xTBE als Laufpuffer. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und 100 bis 180 V in der Apparatur der Firma Biotec Fischer durchgeführt. Für die DIG-Detektion wurden die Proben anschließend im Elektroblot-Verfahren mit 0.5xTBE als Transferpuffer 30 min bei 12 V auf Hybond-NX-Membranen übertragen.

2.2.12 Ballistische transiente Transformation von Pflanzenmaterial

Die Oberflächen des geernteten Frucht- und Blattmaterial wurden vor der Transformation sterilisiert wie bei Montgomery *et al.* (1993b) beschrieben. Die Lagerung der Blätter erfolgte auf 0.8%-igen Agar (in Wasser). Früchte erfahren, sofern nicht anders erwähnt, eine Sonderbehandlung vor der Transformation.

2.2.12.1 Vorbehandlung von Fruchtmaterial

Früchte wurden in 0.5 bis 1.0 mm dicke dünne Scheiben geschnitten und für 5 min in CPW-12 (CPW-Salze (Power und Chapman, 1985) mit Zusatz von 12% (w/v) Mannitol und 20 mM 2-(N-Morpholino)-ethan-sulfonische Säure, pH 6.0 (Tan *et al.*,

1987) inkubiert. Auf 0.8%-igen Agar (in CPW-12, außer anders erwähnt) wurden drei Scheiben von Früchten des Durchmessers 5 mm, eine halbierte Scheibe von Früchten des Durchmessers 25 mm oder ein Drittel einer Scheibe von ausgewachsenen Früchten plaziert.

2.2.12.2 Transformation mit der Partikelkanone

2 mg Goldpartikel wurden mit 2.75 µg Reporterplasmid oder einer 1:1 Mischung aus Reporterplasmid und Referenzplasmid (2.75 µg je Plasmid) beschichtet wie von Montgomery *et al.* (1993b) beschrieben. Das Pflanzenmaterial wurde mit 5 µl (167µg) DNA-beschichteten Goldpartikeln mit Hilfe einer Helium-betriebenen Partikelkanone („Biolistic PDS 1000 System“) von Bio-Rad Laboratories (Hercules CA) bei einem Vakuum von 27 mm Quecksilbersäule beschossen. Der Abstand zwischen der Berstscheibe und dem Macrocarrier betrug 4.5 cm (Ebene 2), der Abstand zwischen Macrocarrier und der Probe belief sich auf 4.0 cm (Ebene 4). Es wurden Berstscheiben mit einem Berstdruck von 1550 psi für Blätter und 1800 psi für Früchte verwendet. Die Fruchtscheiben wurden nach dem ersten Beschuß gewendet und noch ein zweites Mal beschossen, falls nicht anders erwähnt. Das transformierte Gewebe wurde für 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.12.3 Luziferase- und GUS-Assay

Das Pflanzenmaterial wurde gewogen, in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Mörser pulverisiert. Anschließend wurde das Material in Extraktionspuffer EGL (0.1M (bei Früchten 0.3 M) K-PO₄; 1 mM EDTA; 5% Glycerin; 10 mM DTT; pH 7.8) mit einem Polytron („PT Polytron 1200“ von Kinematica, Schweiz) homogenisiert, wobei 1 ml EGL auf 1 mg Fruchtmaterial, bzw. 2 ml EGL auf 1 mg Blattmaterial verwendet wurde. Der Extrakt wurde von Gewebeteilen durch zweimalige Zentrifugation (bei 2°C, 15 000 U/min für 10 min) getrennt. Die Aktivität der Luziferase wurde mit Hilfe des Promega Luciferase Assay System Kits (Promega, Madison, WI) bestimmt. Dabei wurde die Lichtemission für eine Minute in einem Lumat LB 9501 Luminometer (Berthold, Wildbach) gemessen. Die GUS-Assays wurden wie bei

Montgomery *et al.* (1993b) beschrieben durchgeführt. Ausnahme waren die GUS-Bestimmungen für Fruchtscheiben mit einem Durchmesser von 5 mm, die in Versuchen zur Fruchtentwicklung nach einem optimierten Verfahren durchgeführt wurden (siehe nächsten Abschnitt).

2.2.12.4 Optimierter GUS-Assay

Im Standard-GUS-Assay werden 60 µl Proteinextrakt und 80µl EGL verwendet. Im optimierten GUS-Assay werden anstelle von 60 µl Extrakt 40 µl „5 mm“ Fruchtextrakt eingesetzt und zu 20 µl EGL und 80 µl Fruchtextrakt aus orangen (und nicht transformierten) Früchten gegeben. Die Enzymreaktion wurde anschließend wie bei Montgomery *et al.* (1993b) beschrieben durch Zugabe von 20 µl Substrat gestartet und durchgeführt. Der veränderte Assay wurde nur für Extrakte aus Fruchtscheiben mit einem Durchmesser von 5 mm eingesetzt, die aus Versuchen zur Fruchtentwicklung stammten.

2.2.13 One-Hybrid-System

2.2.13.1 Amplifikation einer cDNA/AD-Fusionsbibliothek

Von Herrn F. Gindullis wurde eine Phagenbank mit enthaltener cDNA/AD-Fusionsbibliothek aus jungen Tomatenblättern zur Verfügung gestellt. Herr Gindullis hatte die cDNA-Bank mit Hilfe des „ZAP-cDNA[®] Synthesis Kits“ der Firma Stratagene nach den Anweisungen des Herstellers im Handbuch zum Kit hergestellt: Die doppelsträngige cDNA wurde gerichtet in den Phagenvektor λHybriZAP[™] kloniert (HybriZAP[™] Two-Hybrid Predigested Vector Kit), der den Vektor pAD-Gal4 mit der Aktivierungsdomäne (AD) des Transkriptionsfaktors Gal4 enthält und mit Hilfe des „Gigapack[®] III Gold Packaging Extracts“ in Phagenpartikel verpackt. Die Amplifikation und die Excision des Plasmidvektors wurden nach den Angaben des Herstellers im Protokollheft zum „HybriZAP[™] Two-Hybrid Predigested Vector Kit“ durchgeführt.

2.2.13.2 Herstellung der Hefereportergermstämme YMF8HISi und YMF8HISi-1

Das Konstrukt FM8-4 wurde *BglII/HindIII* aus dem Vektor pFM8-4 (von Frau A. Rose, Universität Hamburg) isoliert und „blunt end“ aufgefüllt in die *SmaI* restringierten Vektoren pHISi und pHISi-1 von der Firma Clontech kloniert. Die Vektoren pHISi und pHISi-1 unterscheiden sich nur durch die Deletion des in pHISi vorhandenen Selektionsmarkers *URA3*, wodurch die Aktivität des *HIS3*-Reportergens beider Plasmide unterschiedlich beeinflusst wird. Über homologe Rekombination wurden die Konstrukte in das *his*-Gen stabil in den Hefestamm YMF8Blue integriert (Abschnitt 2.2.13.3). Durch die Integration wurde das zuvor nicht funktionelle Gen wiederhergestellt. Keiner der Vektoren kann in Hefe autonom repliziert werden, so daß Wachstum unter Selektionsbedingungen nur bei stabiler Integration des Konstruktes möglich ist.

2.2.13.3 Hefetransformation und 3-AT Selektion

Die Herstellung kompetenter Hefezellen und deren Transformation mit Plasmiden zur homologen Rekombination ins Hefegenom erfolgte, wie auch die Transformation der cDNA/AD-Fusionsbibliothek und die Selektion der transformierten Hefen auf 3-AT-haltigem Medium, nach den Anleitungen im Protokollheft „MATCHMAKER One-Hybrid System Protocol“ von 1995, Nr. PT1031-1, Version PR58486 der Firma Clontech. Die Testtransformationen einzelner cDNA/AD-Plasmide in verschiedene Hefestämme wurden nach Dohmen *et al.* (1991) durchgeführt.

2.2.13.4 β -Galaktosidase-Assays

Die Detektion der β -Galaktosidaseaktivität mit dem X-Gal-Filterassay wurde nach dem entsprechenden Protokoll im „MATCHMAKER One-Hybrid System Protocol“-Heft der Firma Clontech durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Strukturanalyse des *RBCS2* Promotors

Die Struktur des *RBCS2* Promotors sollte in Hinblick auf *cis*-agierende Elemente und organspezifische Unterschiede der Promotoraktivität in Blättern und jungen Früchten von Tomate untersucht werden. Als Untersuchungsmethode sollte ein transientes Transformationssystem auf der Basis der ballistischen Transformation entwickelt werden.

3.1.1 Etablierung eines transienten Transformationssystems für Blätter und Früchte der Tomate

Tomaten können mit Hilfe von Agrobakterien stabil transformiert werden. Für die transiente Transformation dagegen wird verstärkt eine neue Methode eingesetzt: die ballistische Transformation. Bei dieser Methode wird ein Reporter-genkonstrukt mit hohem Druck mittels einer Partikelkanone in die Zellen des Pflanzenmaterials geschossen. Das Reporter-genkonstrukt besitzt einen vorgeschalteten Promotor, der zur Expression des Reportergens in der transformierten Zelle führt. Für die Untersuchung des *RBCS2* Promotors wurde ein 687 Basenpaare großes *RBCS2* Promotorfragment, das für die organspezifische Expression in transgenen Pflanzen ausreichend gewesen war (Meier *et al.*, 1995), vor das Luziferase-Gen (*luc*) (Ow *et al.*, 1986) kloniert (*RBCS2-LUC*).

Die Aktivität des Promotors wurde durch die Aktivität der exprimierten Luziferase (LUC) in dem transformierten Gewebe ermittelt (mehr zur Methode später in Abb. 9). Dabei zeigte sich jedoch, daß Früchte von Tomate im Gegensatz zu Blättern vergleichsweise schwer transformierbar waren: während Protokolle für die ballistische transiente Transformation von Früchten der Tomate (Manzara *et al.*, 1994; Montgomery *et al.*, 1993b) zu beständigen hohen LUC Aktivitäten (je µg Protein) aufgrund der *RBCS2* Promotoraktivität in Tomatenblättern führten, lag die erreichte Aktivität in Scheiben von jungen Tomatenfrüchten nur 4-5 fach über dem Hintergrund nicht transformierter Früchte (Abb. 8).

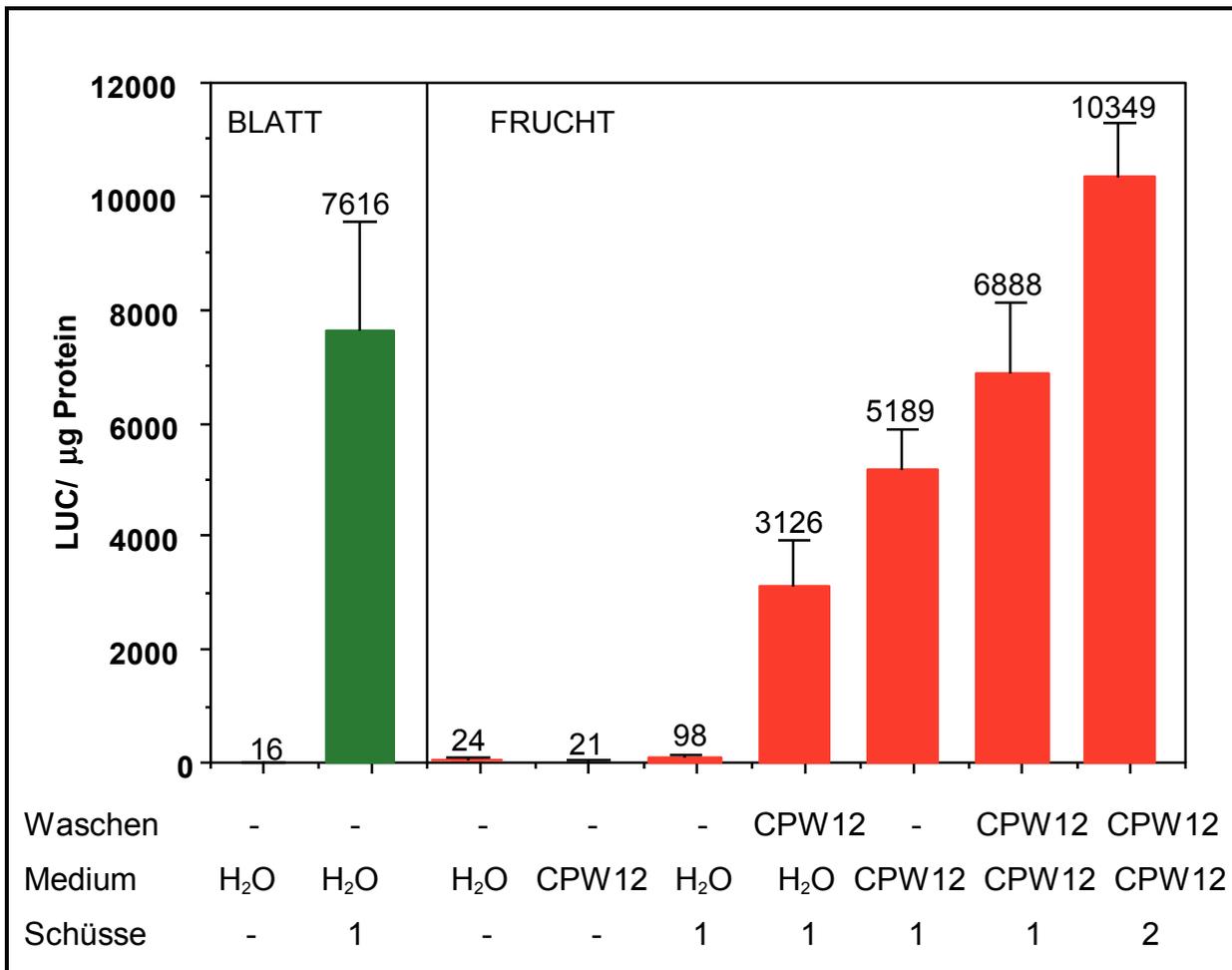


Abb. 8: Optimierung der Transformation

Fruchtscheiben von jungen, 5 mm großen Früchten wurden teilweise osmotisch mit einer isotonischen Lösung (CPW-12: CPW-Salze (Power und Chapman, 1985) mit Zusatz von 12% (w/v) Mannitol und 20 mM 2-(N-Morpholino)-ethan-sulfonsäure, pH 6.0 (Tan *et al.*, 1987)) vorbehandelt und erst dann mit RBCS2-LUC Konstrukt transformiert. Durch das Beschießen beider Seiten der Fruchtscheibe mit dem RBCS2-LUC Konstrukt konnte die Effizienz noch weiter gesteigert werden. Ebenfalls in der Darstellung sind die Vergleichswerte in Blatt (Transformationen nach Standardprotokoll) zu sehen. Die Ergebnisse der Transformationen sind in LUC Einheiten bezogen auf die Proteinmenge des aufgearbeiteten Extraktes dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichung von sechs unabhängigen Transformationen.

Die Transformationsausbeuten in Früchten konnten aber durch Vorbehandlung des Gewebes mit einer isotonischen Lösung gesteigert werden. Bei dieser Lösung handelte es sich um CPW-12 (CPW-Salze (Power und Chapman, 1985) mit Zusatz von 12% (w/v) Mannitol und 20 mM 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure, pH 6.0 (Tan *et al.*, 1987)). Das fünf Minuten lange Waschen der Fruchtscheiben mit CPW-12 vor

der Transformation führte zu einer 30-fachen Erhöhung der *RBCS2* Promotor erzeugten LUC Aktivität. Eine Inkubation der Fruchtscheiben vor und nach der Transformation auf Agar mit CPW-12 erhöhte die LUC Aktivität ungefähr 50-fach. Durch die Kombination von Waschen vor der Transformation und anschließender Inkubation auf CPW-12 haltigem Agar wurde schließlich eine 70-fache Steigerung der LUC Aktivität erreicht. Eine weitere Anhebung der LUC Aktivität um 30 % wurde durch das beidseitige Beschießen der Fruchtscheiben erzielt. Insgesamt wurde die *RBCS2* Promotor vermittelte LUC Aktivität durch das beschriebene Verfahren auf 500-fach über den Hintergrund angehoben und war damit den in Blättern erhaltenen Aktivitäten vergleichbar (Abb.8). Die Inkubation von Blättern auf CPW-12 haltigem Agar führte zu einem leichten Abfall der *RBCS2* Promotor erzeugten LUC Aktivität auf 70 %, bezogen auf Vergleichswerte von nicht auf CPW-12 haltigem Agar gelagerten Blättern.

Nach erfolgreicher Optimierung und Angleichung *RBCS2*-Promotor-vermittelter LUC Aktivität hinsichtlich seiner Aktivität in Frucht an Blatt wurde das System für vergleichende Messungen der *RBCS2* Promotoraktivität in beiden Organen um einen internen Standard erweitert: Als Kontrolle der Transformationseffizienz diente das β -Glucuronidasegen (*gus*) unter Kontrolle des viralen 35S Promotors. Die LUC Aktivitäten (je μ g Protein) wurden auf die erhaltenen GUS Aktivitäten (je μ g Protein) bezogen. So konnten auch unterschiedlich effiziente Transformationen korreliert werden. Die folgende Abbildung (Abb. 9) gibt einen Überblick über eine ballistische transiente Transformation. Junge Blätter aus den Spitzen von ca. 10 cm langen Tomatentrieben und in dünne Scheiben geschnittene, 5 mm große Tomatenfrüchte wurden mit einer Mischung der Reporterengenkonstrukte transformiert und nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden aufgearbeitet. Entsprechend der Reporterengenaktivitäten wurden die Reporterenzyme Luziferase und β -Glucuronidase exprimiert und konnten im Proteinextrakt des aufgearbeiteten Pflanzenmaterials mit spezifischen Enzymassays bestimmt werden. Die Ergebnisse in LUC/GUS Einheiten gaben Aufschluß über die Promotoraktivitäten.

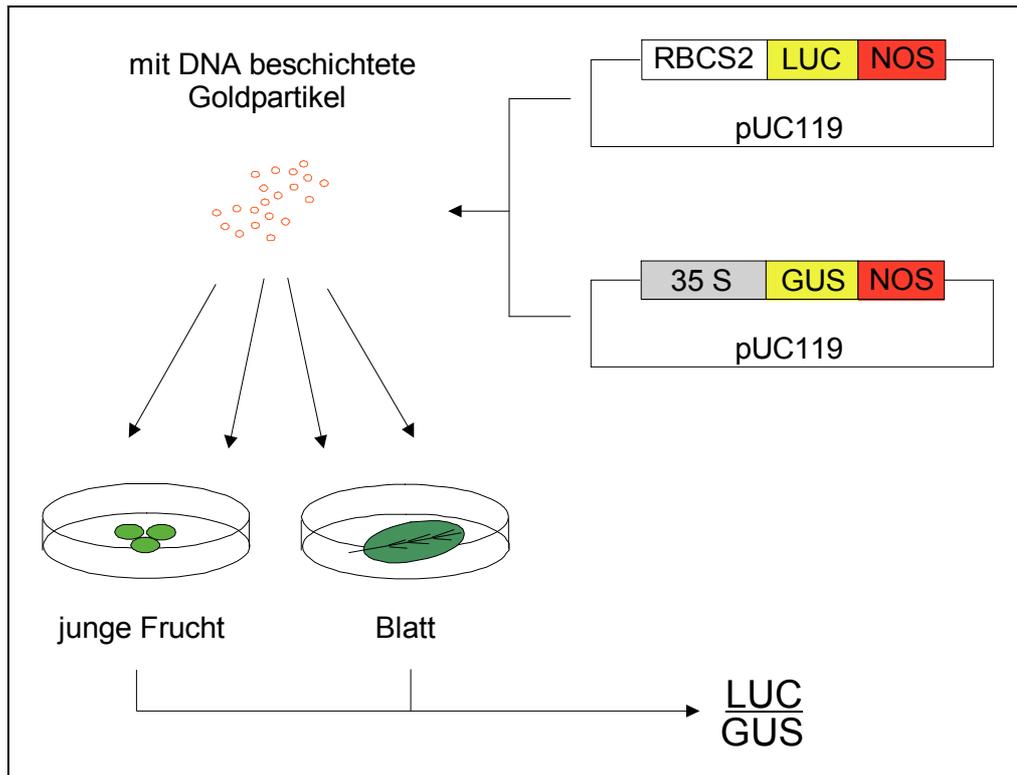


Abb. 9: Die Methode der ballistischen transienten Transformation

Goldpartikel werden mit einer Mischung der Reportergenkonstrukte beschichtet und mit der Partikelkanone in das vorbereitete Pflanzenmaterial geschossen. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden werden die löslichen Proteine aus dem Material extrahiert und die Luciferase- und β -Glucuronidaseaktivitäten bestimmt. Die Ergebnisse der Transformation werden in LUC/GUS Einheiten ausgedrückt.

3.1.2 Deletionsanalyse des *RBCS2* Promotors

Mit Hilfe einer 5'-Deletionsanalyse sollte der *RBCS2* Promotor systematisch untersucht werden. Durch einen Exonuklease III Verdau des *RBCS2*-Luciferase Konstruktes *RBCS2*-LUC (Kapitel 3.1.1) wurden verkürzte Promotorfragmente erhalten und im transienten Assay eingesetzt. Insgesamt wurden acht Deletionskonstrukte (-492, -378, -316, -283, -200, -181, -144 und -70) mit dem vollständigen *RBCS2* Konstrukt (-687) verglichen. Abbildung 10 zeigt die Aktivität der Deletionskonstrukte in jungen Blättern und Früchten.

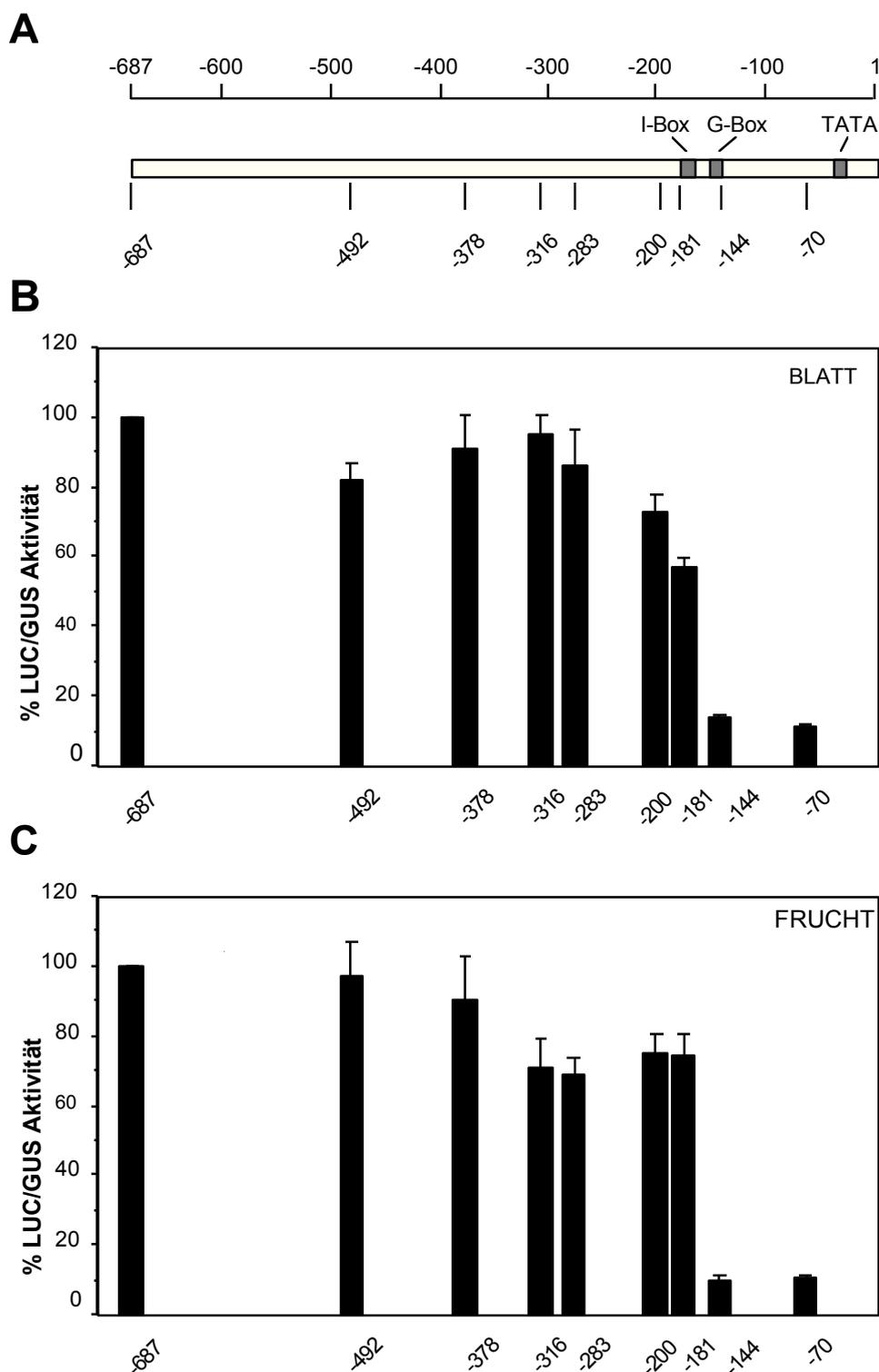


Abb. 10: 5'-Deletionsanalyse des *RBCS2* Promotors

A) Schematische Darstellung des 687 bp langen *RBCS2* Promotorfragmentes. Die Skala zeigt die Position in Basenpaaren bezogen auf den Transkriptionsstart. I-Box, G-Box und TATA-Box sind als schwarze Kästen dargestellt. Die Endpunkte der Exonuklease III Deletionskonstrukte sind durch vertikale Striche angezeigt.

B) Erhaltene LUC/GUS Aktivität in Blättern für die verschiedenen Deletionskonstrukte aus Teil A)
C) Erhaltene LUC/GUS Aktivität in jungen Früchten für die verschiedenen Deletionskonstrukte aus A)
Die Aktivitäten in B) und C) sind prozentual auf die Aktivität des -687 *RBCS2* Promotorkonstruktes bezogen. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens sechs unabhängigen Transformationen gezeigt.

Eine Deletion bis zur Position -200 senkte die Aktivität in beiden Organen nur um 20% ab. Weitere Deletionen bis zur Position -181 hatten keinen Einfluß auf die Aktivität in Früchten, reduzierten sie aber in Blättern auf 60%. Eine Deletion der nächsten 37 Basenpaare bis zur Position -144 verminderte die Aktivität auf restliche 15% in beiden Organen. Weitere Deletionen bis zur Position -70 führten nicht zu einem weiteren Abfall der Aktivität. Demnach befinden sich die wesentlichen *cis*-agierenden Elemente, die für die *RBCS2* Promotoraktivität sowohl in Blättern als auch in jungen Früchten verantwortlich sind, auf einem kleinen 37 bp Fragment zwischen Position -181 und -144. Auf diesem Fragment liegen ein I-Box und ein G-Box Element.

3.1.3 Die Boxen I und G

In Abschnitt 3.1.2 wurde gezeigt, daß nur ein kleines Fragment für die Aktivität des *RBCS2* Promotors von Bedeutung ist. Auf diesem 37 bp Fragment liegen ein I-Box (5'-GATAAG-3') und ein G-Box (5'-CACGTG-3') Element. Beide Sequenzelemente sind hoch konserviert in den *RBCS* Promotoren verschiedener Spezies (Manzara und Grissem, 1988) und als positive *cis*-Elemente (eines *Arabidopsis RBCS* Promotors) in Tabakblättern beschrieben (Donald und Cashmore, 1990).

Zur Klärung der Frage, ob beide Elemente für die Aktivität des *RBCS2* Promotors in Blättern und Früchten der Tomate von funktioneller Bedeutung sind, wurden *RBCS2* Promotorkonstrukte mit mutierten Boxen (Mut I, Mut G und Doppelmutante Mut I/G) eingesetzt (Abb. 11). In Blättern führte eine Mutation des I-Box Motivs zu einer Abnahme der LUC/GUS Aktivität auf 45%. Eine Mutation der G-Box verursachte eine Reduktion auf 32% und Mutation beider Elemente reduzierte die LUC/GUS Aktivität auf 17%. Demnach fungierten beide Motive in Blättern als *cis*-Elemente.

Im Gegensatz dazu führte in Früchten eine Mutation der I-Box nur zu einer geringfügigen Schwächung der *RBCS2* Promotoraktivität. Andererseits reduzierte

der eingeführten 6 bp Blockmutationen sind unterhalb der *RBCS2* Sequenz gezeigt. Eine durchgezogene Linie entspricht der Wildtypsequenz. Die Namen der Promotorkonstrukte befinden sich auf der rechten Seite.

B) Erhaltene LUC/GUS Aktivitäten in Blättern und jungen Früchten nach der transienten Transformation der in A) gezeigten Konstrukte.

Es handelt sich um die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs (Blätter) und neun (Früchte) unabhängigen Transformationen. Die Aktivitäten sind prozentual auf die Aktivität des -687 *RBCS2* Promotorkonstruktes bezogen.

Zusammenfassung

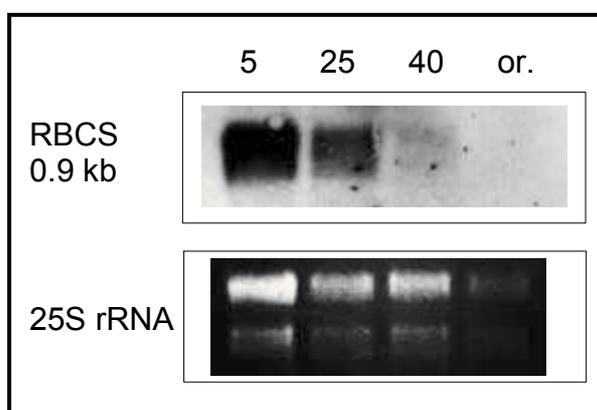
Zur Untersuchung der RBCS2 Promotoraktivität in Blättern und jungen Früchten von Tomate konnte ein transientes Transformationssystem auf Basis der ballistischen Transformation etabliert werden. Für die Aktivität des RBCS2 Promotors in Blättern und Früchten von Tomate ist eine kleine 37 bp lange Sequenz wichtig. Innerhalb dieses Fragmentes befinden sich die beiden Elemente G-Box und I-Box. Durch gerichtete Mutagenese des RBCS2 Promotors wurde gezeigt, daß in Blättern beide Elemente zu etwa gleichen Teilen an der Promotoraktivität beteiligt sind. Im Gegensatz dazu wird diese in Früchten hauptsächlich durch die G-Box bestimmt, während die I-Box kaum Einfluß hat.

3.2 *RBCS2* Promotoraktivität während der Fruchtentwicklung

Die Strukturanalyse des *RBCS2* Promotors (Kapitel 3.1) hatte ergeben, daß in jungen Tomatenfrüchten im Gegensatz zu Blättern nur ein Element für über vier Fünftel der Gesamtaktivität des Promotors verantwortlich ist. Damit kommt diesem Element, der G-Box, eine zentrale Stellung bei Betrachtungen der *RBCS2* Promotoraktivität in Früchten zu. Aus „run-on transcription“-Experimenten (Wanner und Grissem, 1991) ist bekannt, daß die *RBCS2* Promotoraktivität in jungen Früchten hoch ist und während der Fruchtentwicklung stark abfällt. In ausgewachsenen, unreifen grünen Früchten ist keine *RBCS2* Promotoraktivität mehr nachweisbar.

Dieses Bild spiegelt sich auch bei der Untersuchung der Gesamtexpression aller *RBCS*-Gene wider. In einem Northern Experiment wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Fruchtstadien auf die Expression von *RBCS*-RNA untersucht. Für den Nachweis der Transkripte wurde eine *RBCS*-cDNA-Sonde, die alle fünf *RBCS*-Gene aus Tomate erkennt, eingesetzt. In Abb. 12 ist erkennbar, daß die Menge der *RBCS*-Transkripte im Verlauf der Fruchtentwicklung abnahm. In orange farbigen Früchten konnte kein *RBCS*-Transkript mehr nachgewiesen werden. Die Transkription der *RBCS* Gene, einschließlich des *RBCS2* Gens, wurde also während der Fruchtentwicklung herunterreguliert.

Abb. 12: Northern Experiment zur Transkription von *RBCS*-RNA



10 µg Gesamt-RNA aus vier verschiedenen Fruchtstadien wurden in einem 1.5%igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Membran mit einer Sonde, die alle fünf *RBCS* Gene aus Tomate erkennt, hybridisiert. Als Ladungskontrolle sind die Ethidiumbromid gefärbten Banden der ribosomalen RNA (rRNA) im Gel gezeigt. (5: 5 mm Fruchtdurchmesser; entsprechend 25: 25 mm; 40: 40 mm und or: orange Frucht).

In diesem Kapitel sollte nun die Frage geklärt werden, ob die Abnahme der *RBCS2* Promotoraktivität auch im transienten Assay bestätigt werden kann und welche Rolle der G-Box in diesem Zusammenhang zukommt.

3.2.1 Ein Modellsystem für die Fruchtentwicklung der Tomate

Eine junge Tomatenfrucht, wie sie für organspezifische Untersuchungen (vgl. Kapitel 3.1) eingesetzt wurde, wächst im Verlauf von ungefähr drei Wochen auf vollen Umfang an und verfärbt sich anschließend innerhalb einer Woche orange. Für Untersuchungen der Fruchtentwicklung wurden die vier verschiedenen Fruchtstadien aus Abb. 12 nun repräsentativ ausgewählt: das Anfangsstadium „5 mm“ (die Bezeichnung bezieht sich wie bei den beiden folgenden Stadien auf den Durchmesser der Frucht), das zweite Stadium „25 mm“, das dritte Stadium „40 mm“ (die Früchte sind nun voll ausgewachsen und beginnen sich zu verfärben) und als viertes Stadium „orange“ Früchte (Abb. 13).

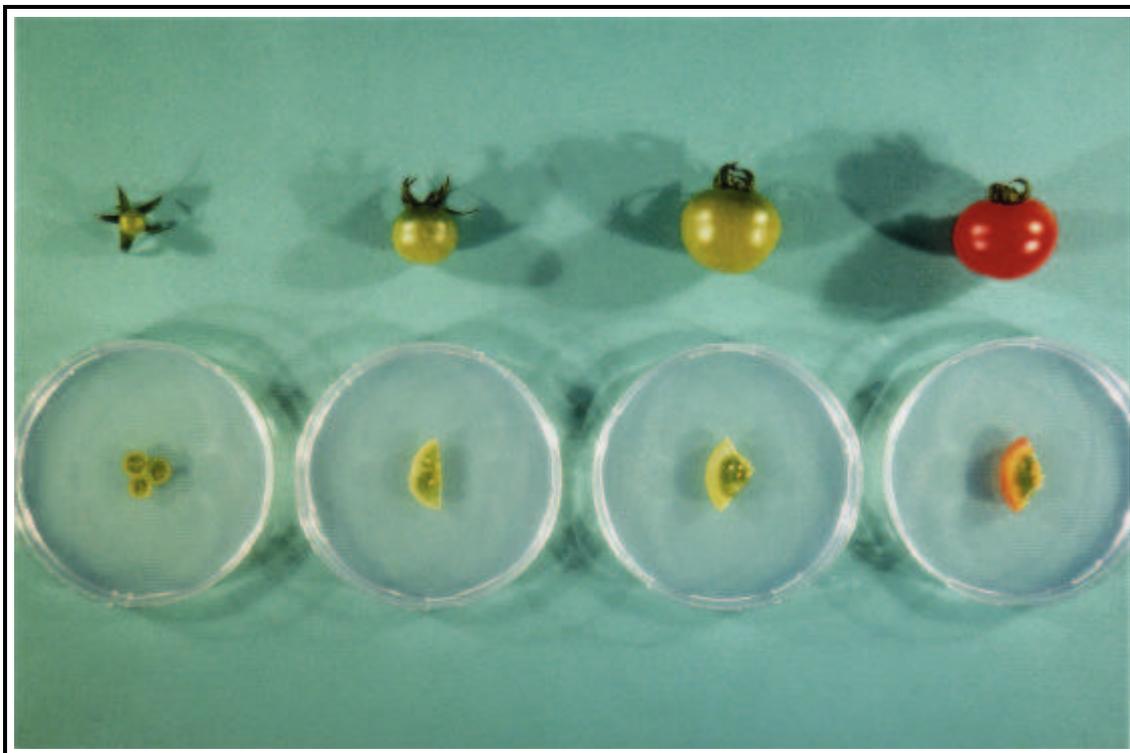


Abb. 13: Modellsystem für Fruchtentwicklung bei Tomate

Vier Fruchtstadien repräsentieren die Entwicklung einer Tomatenfrucht (von links nach rechts): „5 mm“, „25 mm“, „40 mm“ (Fruchtdurchmesser) und „orange“. Vom Anfangs- zum Endstadium benötigt die Frucht vier Wochen. Gezeigt sind ganze Früchte und Fruchtscheiben, die im ballistischen Experiment eingesetzt wurden.

3.2.2 Etablierung der Methode der ballistischen Transformation in späten Fruchtstadien

Die Methode der transienten Transformation auf Basis der ballistischen Transformation (siehe Abschnitt 3.1.1) sollte zur Untersuchung der *RBCS2* Promotoraktivität während der Fruchtentwicklung eingesetzt werden. Es mußte zunächst sichergestellt werden, daß das System in allen vier Fruchtstadien („5 mm“, „25 mm“, „40 mm“ und „orange“) angewendet werden konnte und dort zu reproduzierbaren Ergebnissen führt. Versuche mit einer Mischung aus Luziferase(*luc*)- und β -Glucuronidase(*gus*)-Reportergenkonstrukten, die beide vom viralen 35S Promotor aktiviert wurden, zeigten, daß die erhaltenen Werte keineswegs zwischen den verschiedenen Fruchtstadien zu vergleichen waren. Eine Mischung aus zwei Reportergenen (*luc* und *gus*) sollte zu einem konstanten LUC/GUS Wert führen, wenn beide Gene durch den gleichen Promotor (hier 35S) aktiviert werden. Tatsächlich lag der LUC/GUS Wert im ersten Stadium „5 mm“ wesentlich höher als in den späteren Fruchtstadien (Abb. 14). Die Ursache des zu hohen LUC/GUS Wertes konnte entweder in einem zu hohen LUC oder zu niedrigem GUS Wert liegen. Endogene β -Glucuronidase- oder Luziferase-Aktivitäten konnten in keinem Extrakt nachgewiesen werden.

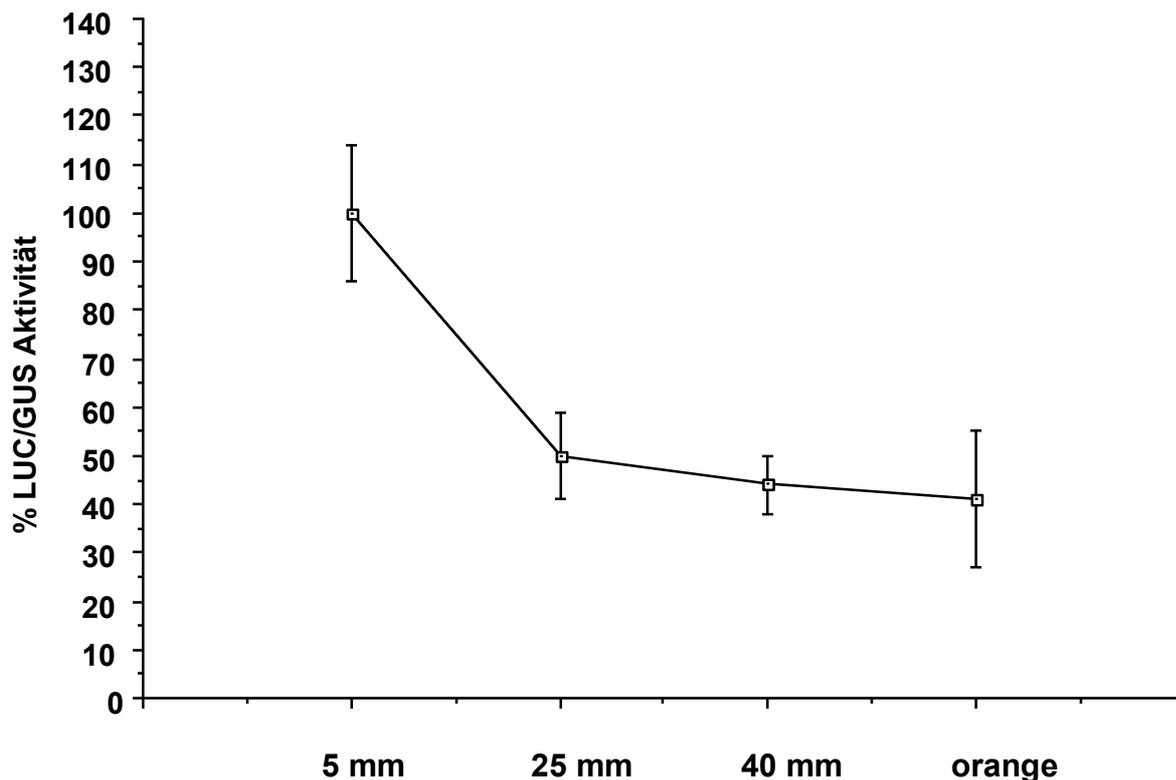


Abb. 14: 35S-LUC/35S-GUS in verschiedenen Fruchtstadien

Fruchtmaterial der vier Fruchtstadien wurde mit einer Mischung aus 35S-LUC und 35S-GUS Reportergenkonstrukten transformiert. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Transformationen, prozentual auf den höchsten Wert bezogen.

Vergleichende Untersuchungen zur Aktivität des Enzyms Luziferase in den Extrakten aus dem „5 mm“ und dem „orangen“ Fruchtstadium lieferten keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch den Extrakt. In analogen Experimenten mit dem Enzym β -Glucuronidase stellte sich jedoch heraus, daß die Abnahme des LUC/GUS Wertes auf der Erniedrigung der Aktivität des Enzyms β -Glucuronidase in Extrakten des Stadiums „5 mm“ im Vergleich zu Extrakten späterer Stadien beruhte. Die Ursache dieses Phänomens konnte nicht geklärt werden, wurde aber bei Zugabe von β -Glucuronidase zu verschiedenen Fruchtextrakten beobachtet (Abb. 15). Innerhalb eines Extraktes wachsen die Umsatzraten zwar konstant mit der zugegebenen Enzymmenge an, die Werte liegen im Extrakt des Stadiums „5 mm“ jedoch insgesamt um ein Drittel niedriger als in „orangenem“ Extrakt.

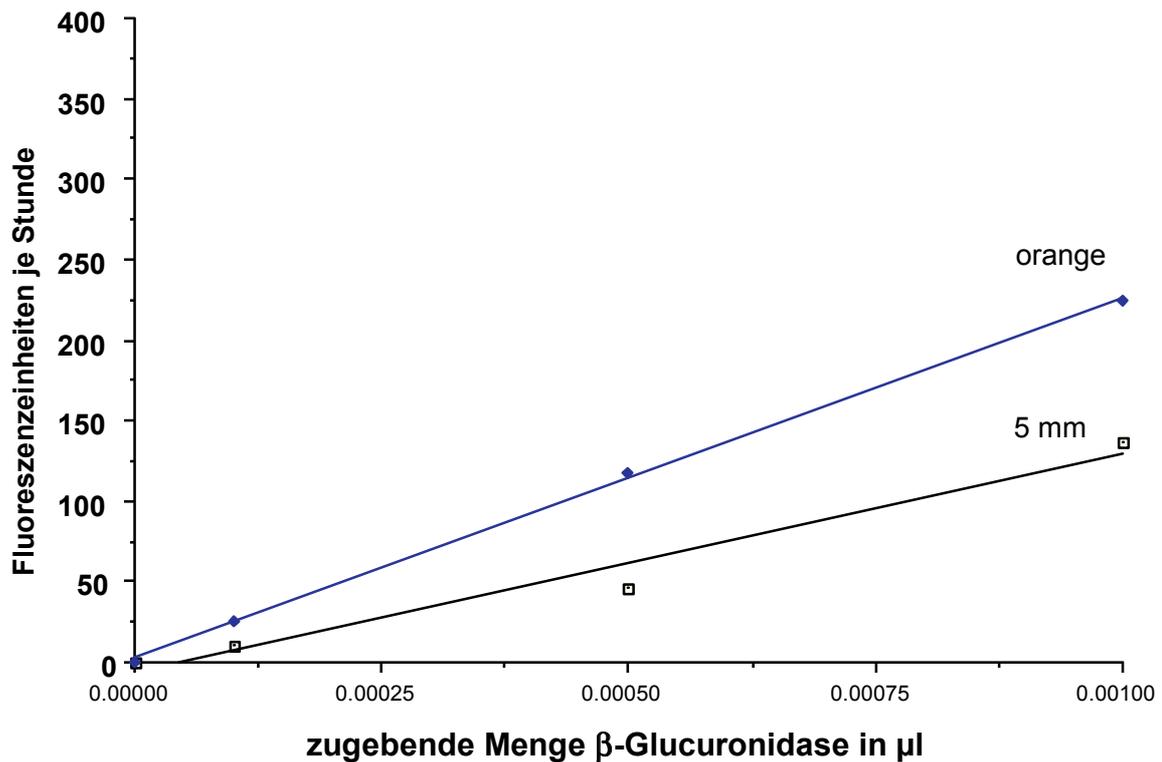


Abb. 15: Beeinflussung der β -Glucuronidase Aktivität durch den Fruchtextrakt

Zu Extrakten der Stadien „5 mm“ und „orange“ wurden die gleichen Mengen β -Glucuronidase gegeben und die Umsatzraten des Enzyms gemessen (in Fluoreszenzeinheiten FE pro Stunde).

Durch Zugabe von Extrakt des Stadiums „orange“ zu einer verringerten Menge Extrakt des Stadiums „5 mm“ konnten die Aktivitäten des Enzyms β -Glucuronidase in den verschiedenen Extrakten angeglichen werden (optimierter GUS-Assay; siehe hierzu auch Abschnitt 2.2.12.4). Als nur zwei Drittel des im GUS-Assay üblichen Extraktvolumens von „5 mm“ Extrakt eingesetzt und Puffer und das fehlende Volumen durch Extrakt des Stadiums „orange“ (ohne GUS Aktivität) ersetzt wurden, glichen sich die Umsatzraten der β -Glucuronidase in Extrakt aus dem „5 mm“ Stadium denen des Stadiums „orange“ an (Abb. 16).

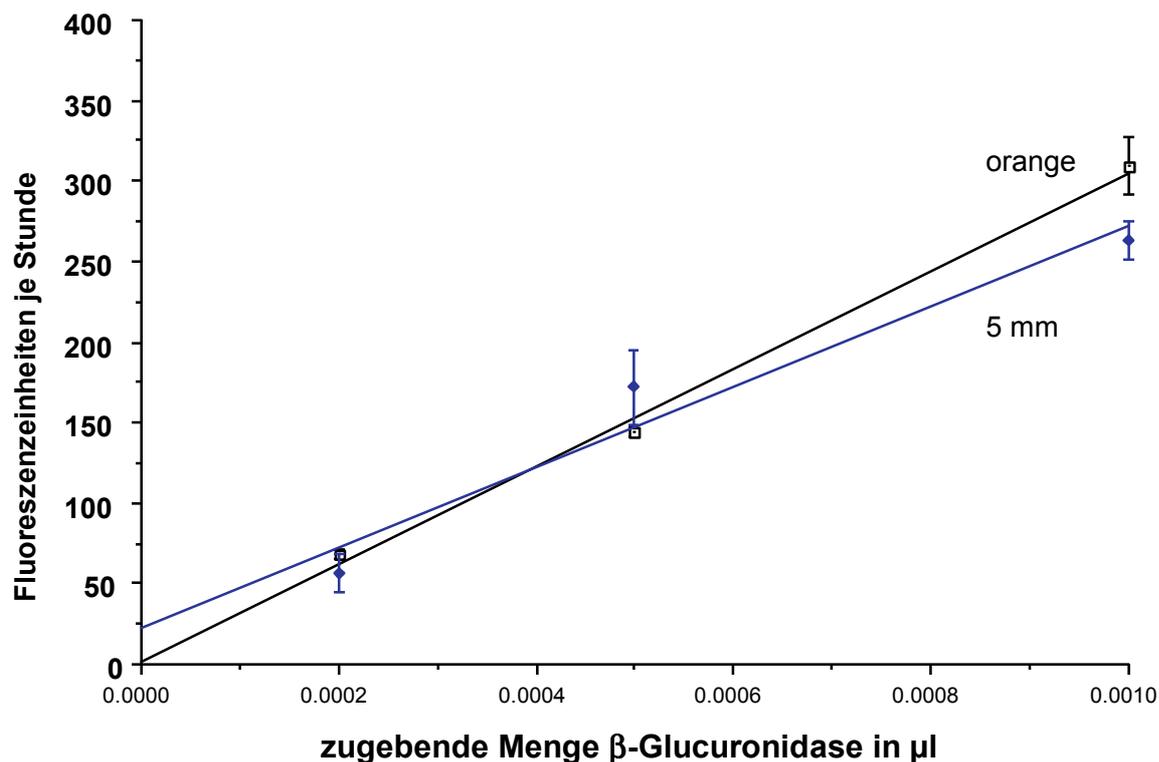


Abb. 16: Optimierung des GUS-Assays

Zu Extrakten der Stadien „5 mm“ und „orange“ wurden die gleichen Mengen β -Glucuronidase gegeben und die Umsatzraten des Enzyms gemessen (in Fluoreszenzeinheiten FE pro Stunde). Dabei wurde für den Extrakt des „5 mm“ Stadiums der optimierte GUS-Assay angewendet: d. h. es wurden nur zwei Drittel des im GUS-Assay üblichen Extraktvolumens von „5 mm“ Extrakt eingesetzt und Puffer und das fehlende Volumen durch „orange“ Extrakt (ohne GUS Aktivität) ausgeglichen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen je Meßpunkt.

Der optimierte GUS-Assay wurde in allen nun folgenden Versuchen mit transienter Transformation bei Extrakten des Stadiums „5 mm“ angewendet. Die erreichte Stabilität des internen ^{35}S -GUS Standards zeigte sich in der Wiederholung des Experimentes aus Abb. 14: die Transformation aller vier Fruchtstadien mit einer Mischung von ^{35}S -LUC und ^{35}S -GUS Reporter genkonstrukten führte nun bei Anwendung des optimierten GUS-Assays zu vergleichbaren LUC/GUS Werten in den Fruchtstadien (Tab. 6).

Tab. 6: 35S-LUC/35S-GUS in verschiedenen Fruchtstadien nach Optimierung des GUS-Assays für Extrakte des Stadiums „5 mm“

Stadium	% LUC/GUS
5 mm	100
25 mm	104 +/-11
40 mm	85 +/- 9
orange	83 +/- 2

Fruchtmaterial der vier Fruchtstadien wurde mit einer Mischung aus 35S-LUC und 35S-GUS Reportergenkonstrukten transformiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von sechs unabhängigen Transformationen, prozentual auf den Wert des ersten Stadiums „5 mm“ bezogen.

3.2.3 Die Aktivität des *RBCS2* Promotors während der Fruchtentwicklung

Die Aktivität des *RBCS2* Promotors während der Fruchtentwicklung wurde mit Hilfe eines *RBCS2*-Luziferasereportergen Konstruktes (*RBCS2*-LUC) im transienten Assay untersucht. Als interne Kontrolle der Transformationseffizienz diente das β -Glucuronidasereportergen fusioniert an den viralen 35S Promotor (35S-GUS). Für die GUS-Messung der Extrakte des Fruchtstadiums „5 mm“ wurde der in Abschnitt 3.2.2 beschriebene optimierte GUS-Assay durchgeführt.

In Abb. 17 ist zu sehen, daß die Aktivität des *RBCS2* Promotors während der Fruchtentwicklung abnahm und dieses besonders zwischen den ersten beiden Stadien: In 25 mm Früchten liegt bereits weniger als die Hälfte der in 5 mm Früchten vorhandenen Aktivität vor (40%). Von 25 mm hin zu orangenen Früchten nimmt die Aktivität um weitere 10% auf 30% ab. Eine Kontrolle mit einer Mischung beider Reportergene fusioniert an den gleichen Promotor (35S) lieferte in allen Stadien einen konstanten Wert. Damit konnte gezeigt werden, daß die Abnahme der *RBCS2* Promotoraktivität nicht auf einem Artefakt des verwendeten Systems beruhte.

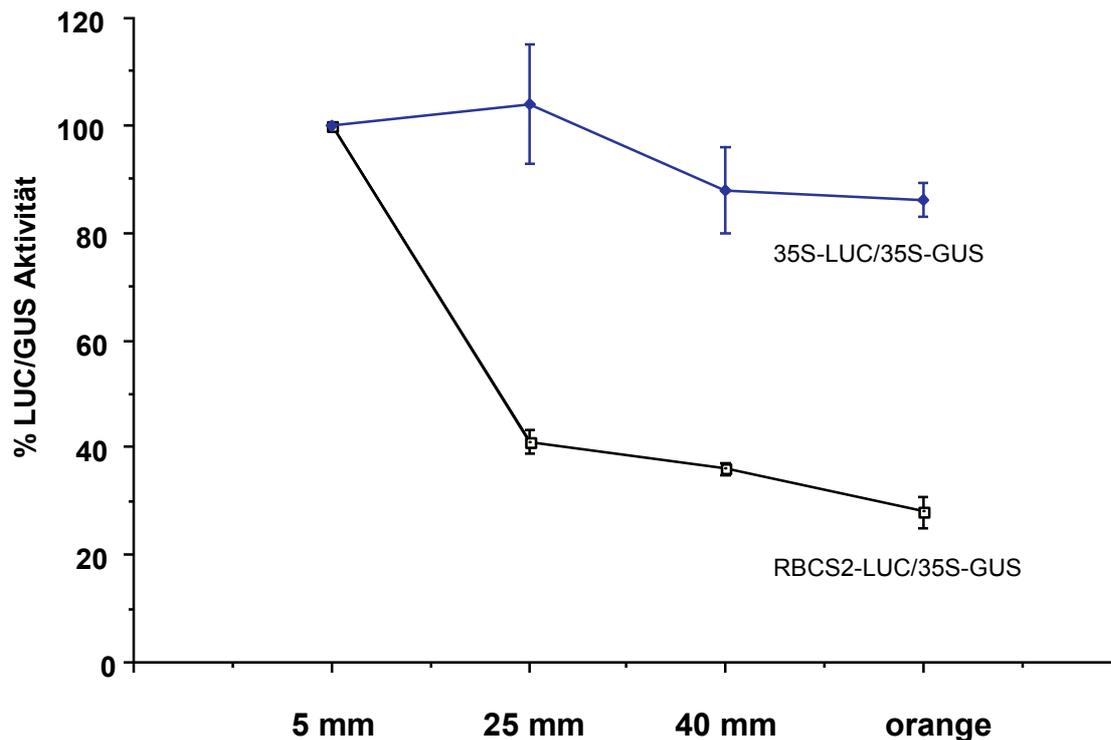


Abb. 17: Aktivität des *RBCS2* Promotors während der Fruchtentwicklung

Fruchtmaterial der vier Fruchtstadien wurde mit einer Mischung *RBCS2-LUC/35S-GUS*, bzw. *35S-LUC/35S-GUS* Reporter genkonstrukten transformiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Transformationen und ihre Standardabweichungen. Sie sind prozentual auf 100% Aktivität des Stadiums „5 mm“ bezogen.

3.2.4 G-Box abhängige und G-Box unabhängige *RBCS2* Promotoraktivität

Untersuchungen in Kapitel 3.1 haben ergeben, daß bereits ein 200 Basenpaare langes Fragment für die volle Aktivität des *RBCS2* Promotors in Früchten des Stadiums „5 mm“ ausreichend war. Auf diesem Fragment befinden sich zwei Boxen, I-Box und G-Box, bei deren Ausschaltung die *RBCS2* Promotoraktivität in jungen Früchten auf ein Minimum von ungefähr 20 % reduziert wird. Um einen detaillierteren Einblick in die Abnahme der *RBCS2* Promotoraktivität im Verlauf der Fruchtentwicklung zu erhalten, wurden ausgewählte Deletionskonstrukte des Promotors (-200, -144 und -40) und ein Konstrukt mit mutierter G-Box (Mut G) im transienten Assay in den vier verschiedenen Fruchtstadien untersucht (Abb. 18).

Das 200 Basenpaare lange Promotorfragment (-200) enthält die G-Box und zeigte eine Abnahme der Aktivität ähnlich dem Verlauf des *RBCS2* Wildtyppromotors. Dagegen verhielten sich die Konstrukte mit mutierter G-Box (Mut G) und die verkürzten Promotorkonstrukte ohne G-Box (-144 und -40) in allen Fruchtstadien annähernd gleich: Mut G hatte in allen Stadien eine Aktivität von 20%, die Aktivität von -144 und -40 lag bei gleichbleibend 10%. Damit lieferten Konstrukte mit deletierter oder mutierter G-Box eine annähernd konstante Aktivität in allen Fruchtstadien. Das promotorlose LUC Konstrukt zeigte den zu vernachlässigenden Hintergrund der Messung.

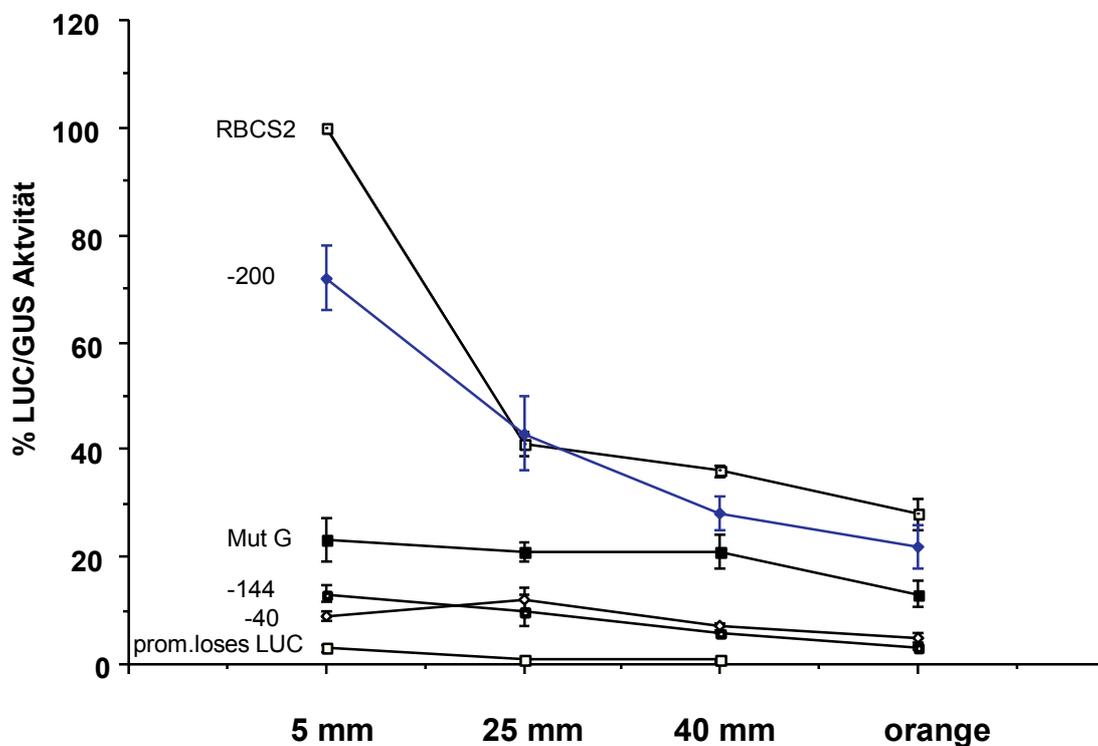


Abb. 18: *RBCS2* Promotor und Deletionskonstrukte während der Fruchtentwicklung

RBCS2-LUC, Mut G (*RBCS2*-LUC mit mutierter G-Box) und Deletionskonstrukte (der Minimalpromotor -200 und Fragmente ohne G-Box: -144 und -40) wurden im transienten Assay in den vier verschiedenen Fruchtstadien untersucht. Es sind Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Transformationen (promotorloses LUC: drei) dargestellt.

Damit konnte die *RBCS2* Promotoraktivität in zwei Aktivitäten unterteilt werden: eine G-Box unabhängige Aktivität (Mut G, -144 und -40), die unabhängig vom Stadium der Früchte stets gleich hoch vorliegt, und eine G-Box abhängige Aktivität (*RBCS2* und Minimalpromotor -200), die während der Fruchtentwicklung abnimmt.

Das nur noch 40 Basenpaare lange *RBCS2* Fragment -40 wies dieselbe Aktivität wie das längere Fragment -144 auf. Auf dem kurzen -40 Fragment sollten daher die aktiven Elemente der G-Box unabhängigen *RBCS2* Promotoraktivität zu finden sein.

Die G-Box abhängige *RBCS2* Promotoraktivität umfaßt in jungen Früchten (Stadium „5 mm“) vier Fünftel der Gesamtaktivität des Promotors. Diese 80 % sinken im Verlauf der Fruchtentwicklung auf 20 % in orangenen Früchten. Eine einzige Box steuert diese entwicklungspezifische Abnahme.

Zusammenfassung

*Die Entwicklung der Tomatenfrucht wurde in vier verschiedene Reifungsstadien repräsentativ eingeteilt: „5 mm“, „25 mm“, „40 mm“ (nach Größe des Frucht-durchmessers) und „orange“ (Farbe). Die Transkription aller fünf Tomaten *RBCS* Gene nimmt im Verlauf dieser vier Stadien zu orangen Früchten hin ab. Nach der Optimierung des transienten ballistischen Transformationssystems konnte für den *RBCS2* Promotor gezeigt werden, daß seine Aktivität während der Fruchtentwicklung abnimmt. Dabei setzt sich seine Aktivität aus einer G-Box abhängigen und einer G-Box unabhängigen Aktivität zusammen. Während der Fruchtentwicklung bleibt die G-Box unabhängige Aktivität konstant, die G-Box abhängige Aktivität durchläuft dagegen den beschriebenen Aktivitätsverlust.*

3.3 Charakterisierung von G-Box Bindefaktoren (GBF) während der Fruchtentwicklung

3.3.1 G-Box Bindefaktoren (GBF)

Die Abnahme der G-Box abhängigen *RBCS2* Promotoraktivität während der Fruchtentwicklung von Tomate muß über einen oder mehrere Mechanismen vermittelt werden, deren Ziel die Regulation der *RBCS2* Aktivität über die G-Box ist. Eine Möglichkeit stellen G-Box-Bindefaktoren (GBFs) dar, die in Kernproteinextrakten aus Tomate nachgewiesen werden konnten (Manzara *et al.*, 1991). Um ihr Verhalten während der Fruchtentwicklung zu überprüfen, wurden Kernproteinextrakte und Gesamtproteinextrakte verschiedener Fruchtstadien in Gelretardierungsexperimenten untersucht. In diesen Experimenten wird ein Oligonukleotid mit dem interessierenden Sequenzelement mit Proteinextrakt inkubiert und anschließend auf einem Gel aufgetrennt. Die Bindung eines Proteins an das Oligonukleotid führt zur Bildung eines Protein-DNA-Komplexes, der sich langsamer im Gel bewegt als das freie Oligonukleotid. Dies ist an der Entstehung einer neuen, verschobenen Bande (Shift) oberhalb der Bande des freien Oligonukleotides zu sehen.

In den Experimenten wurde ein G-Box Oligonukleotid verwendet, dessen ursprüngliche Länge von 41 Basenpaaren durch Klonierung in die Polylinkersequenz des Vektors pIC2OH und anschließendes Herausschneiden mit Polylinkersequenz auf 126 Basenpaare verlängert wurde (Abb. 19). Die Verlängerung des Oligonukleotides führte zu stabileren Protein-DNA-Wechselwirkungen, wodurch wiederum die Qualität der Gelretardierungsexperimente verbessert wurde. Für Konkurrenzexperimente wurde Polylinker-G-Box Oligonukleotid mit Hilfe einer PCR hergestellt (Abb. 19). Als Template wurde ein ungefähr 400 Basenpaar großes Fragment des Vektors (mit einklonierter G-Box) verwendet und mit Universal und Reverse Primern vervielfältigt. Die Länge der so erhaltenen Kompetitor DNA betrug 180 Basenpaare.

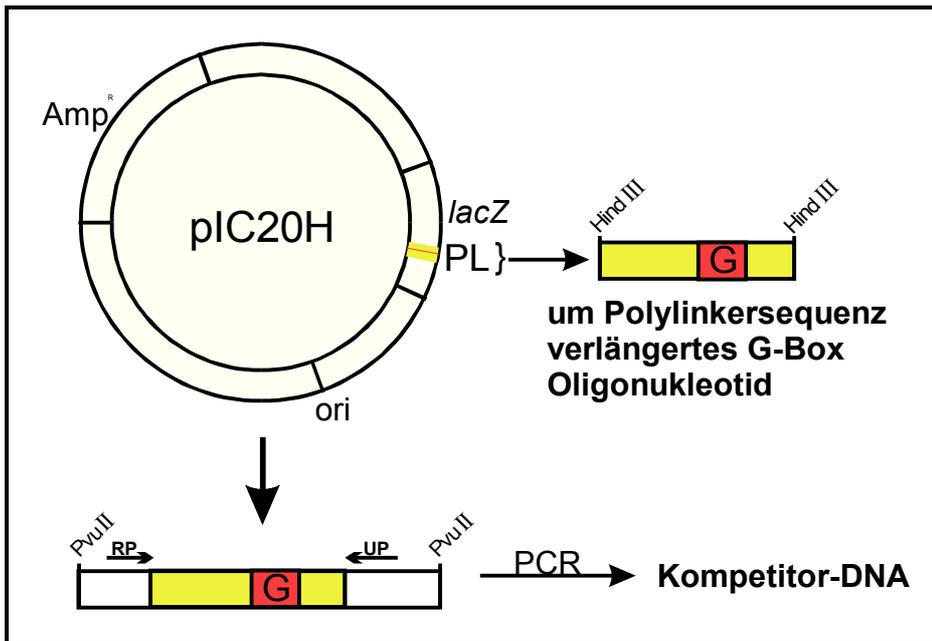


Abb.19: Herstellung von verlängertem G-Box Oligonukleotid und Kompetitoren

Das ursprüngliche G-Box Oligonukleotid wurde zum stumpfen Ende aufgefüllt und in die Polylinkersequenz des Vektors pIC20H (2.1.4.2) über eine *EcoRV* Schnittstelle inkliniert. Das verlängerte Oligonukleotid wurde durch *HindIII* Restriktion erhalten. Kompetitor DNA wurde mit Hilfe der PCR Technik erhalten, wobei *PvuII* geschnittener Vektor (mit inkliniertem G-Box Oligonukleotid) als Template und Universal und Reverse Primer verwendet wurden. (G: inkliniertes G-Box Oligonukleotid; PL: Polylinkerbereich; RP: Reverse Primer; UP: Universal Primer).

3.3.1.1 GBF in Kernproteinextrakt aus Früchten

Zum Nachweis der GBFs in Kernproteinextrakten wurden 2.5 µg Kernproteinextrakt mit G-Box Oligonukleotid inkubiert und anschließend in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Palette der Fruchtstadien wurde für einen detaillierteren Einblick um Kernproteinextrakt des Stadiums 15 mm und Kernproteinextrakt aus roten Früchten erweitert. Durch die Zugabe von Kernproteinextrakt jedes Fruchtstadiums entstanden zwei verschobene Banden (Shifts, S1 und S2), deren Signalstärke im Verlauf der Fruchtentwicklung stark nachließ (Abb. 20). Die Lage der Bande S2 verschob sich in späteren Fruchtstadien leicht nach oben, was auf eine Veränderung der GBF-Komplexe schließen lässt.

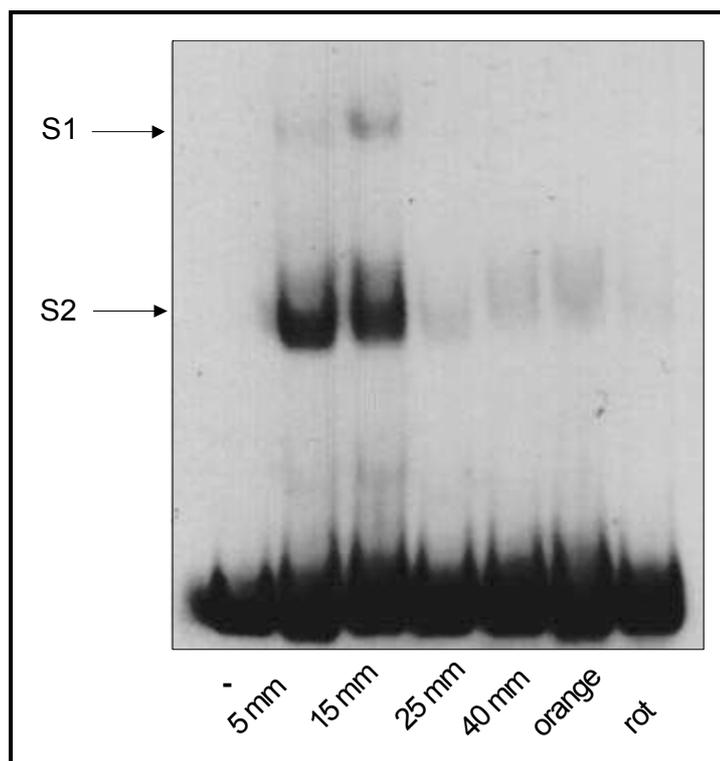


Abb. 20 : Gelretardierungsexperiment mit Kernproteinextrakt

0.8 ng Dig markiertes G-Box Oligonukleotid wurde mit 2.5 µg Kernproteinextrakt je Fruchtstadium inkubiert und anschließend auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Es wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Bildung der beiden Shifts (S1 und S2) tatsächlich auf der Bindung eines Proteins an die G-Box und nicht an Polylinkersequenz beruhte. Zu dem markierten G-Box Oligonukleotid wurde ein Überschuß nicht markiertes Oligonukleotid gegeben. Dabei wurden zwei verschiedene Kompetitoren verwendet: zum einen dasselbe G-Box Oligonukleotid wie im ursprünglichen Experiment und zum anderen ein entsprechendes Oligonukleotid, in dem allerdings das G-Box Motiv durch eine sechs Basenpaar Blockmutation zerstört wurde. Die Blockmutation entspricht der in Abb. 11 (Abschnitt 3.1.3) gezeigten Mutation in Mut G. Wenn die Entstehung einer verschobenen Bande im Gelretardierungsexperiment auf der Bindung eines G-Box Binfaktors (GBF) beruht, so kann der Shift durch einen Überschuß nicht markierten Oligonukleotides mit intakter G-Box kompetiert werden, nicht aber durch ein Oligonukleotid mit mutierter G-Box (GM).

Das Konkurrenzexperiment wurde mit einem fünfzigfachen Überschuß nicht markierten Oligonukleotids und mit variierenden Mengen Kernproteinextrakt (zur Angleichung der Signalstärken der geshifteten Banden) durchgeführt. Durch einen Überschuß nicht markierten G-Box Oligonukleotides konnten beide Shifts kompetiert werden; dies war aber nicht mit einem Überschuß Oligonukleotides mit mutierter G-Box (GM) möglich (Abb. 21). Das Experiment spezifizierte damit beide durch Kernproteinextraktzugabe erzeugten Banden als G-Box Bindeaktivität.

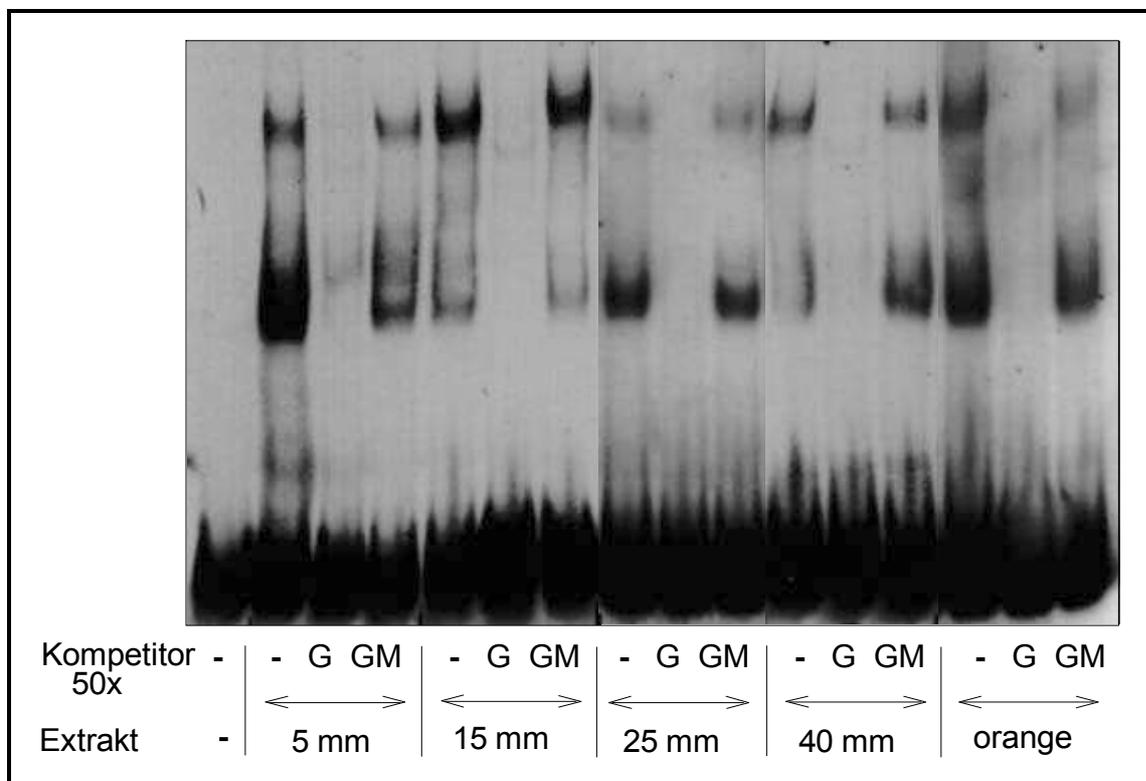


Abb. 21: Konkurrenzexperiment mit Kernproteinextrakt

1.25 µg „5 mm“ Extrakt, 2.5 µg „15 mm“ Extrakt und je 5.0 µg der Kernproteinextrakte späterer Fruchtstadien wurden ohne oder mit einem fünfzigfachen Überschuß nicht markierten Oligonukleotids mit intakter (G) oder mit mutierter G-Box (GM) und mit 0.8 ng Dig markierten G-Box Oligonukleotids inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Auftrennung in einem 5%igen Polyacrylamidgel.

3.3.1.2 GBF in Gesamtproteinextrakt aus Früchten

GBFs aus Tomate sind bereits in Kernproteinextrakten nachgewiesen worden (Manzara *et al.*, 1991). Daten über GBFs in Proteinextrakten aus der gesamten Frucht lagen dagegen nicht vor. Zur Klärung dieses Aspektes wurde Gesamtproteinextrakt aus Früchten durch Aufarbeitung mit EGL-Extraktionspuffer - analog der Aufarbeitung in transienten Assays - hergestellt. Im Gelretardierungsexperiment, in dem gleiche Mengen der Extrakte der vier Fruchtstadien mit dem markierten G-Box Oligonukleotid inkubiert und anschließend auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, konnten zwei verschobene Banden (S1 und S2) je Extrakt beobachtet werden. Zu späteren Fruchtstadien hin nahm die Signalstärke der Banden ab und die untere Bande S2 verschob sich in ihrer Lage nach oben, was auf eine Veränderung des GBF-Komplexes schließen lässt (Abb. 22).

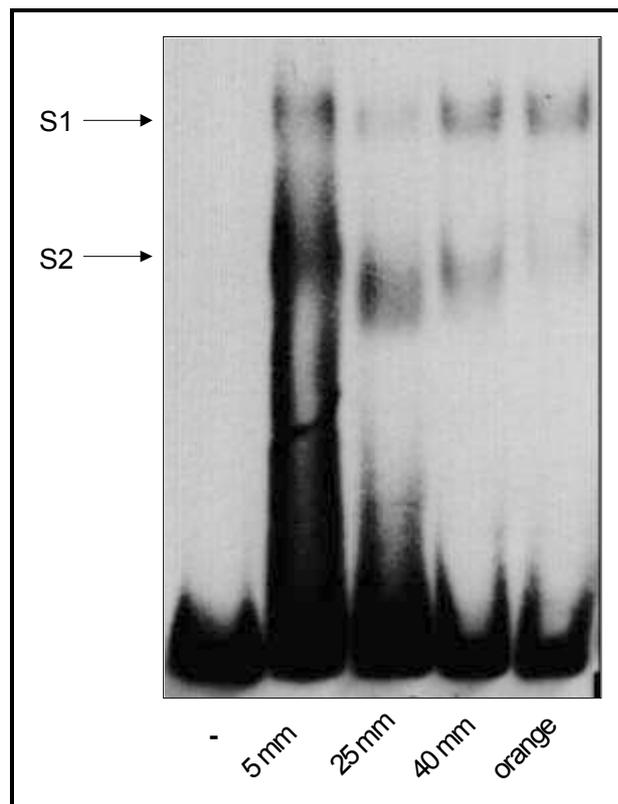


Abb. 22: Gelretardierungsexperiment mit Gesamtproteinextrakt

0.8 ng Dig markiertes G-Box Oligonukleotid wurde mit 7.5 µg Gesamtfruchtextrakt je Fruchtstadium inkubiert und anschließend auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Zur Spezifizierung der durch Gesamtprotein aus Früchten erzeugten Banden (S1 und S2) wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Durch einen zwanzigfachen Überschuß Oligonukleotides mit intakter G-Box (G) wurden die verschobenen Banden kompetiert, nicht aber durch einen Überschuß Oligonukleotides mit mutierter G-Box (GM) (Abb. 23).

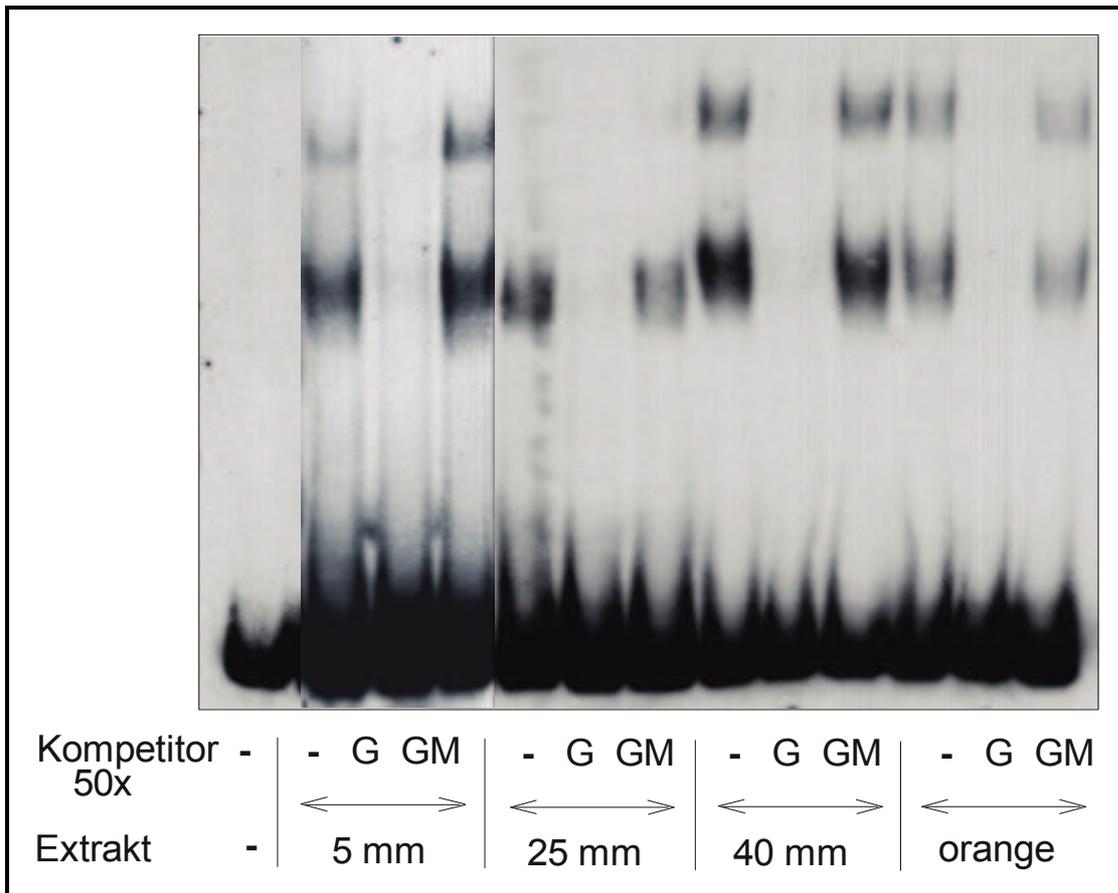


Abb. 23: Konkurrenzexperiment mit Gesamtproteinextrakt

3.8 µg „5 mm“ Extrakt, bzw. je 7.5 µg der Extrakte späterer Fruchtstadien wurden ohne oder mit einem zwanzigfachen Überschuß nicht markierten Oligonukleotid mit intakter (G) oder mit mutierter G-Box (GM) und mit 0.8 ng Dig markierten G-Box Oligonukleotid inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Auftrennung in einem 5%igen Polyacrylamidgel.

Im Vergleich zu Kernproteinextrakt mußte eine größere Menge Gesamtproteinextrakt (7.5 statt 2.5 µg) eingesetzt werden, um G-Box Bindeaktivität nachzuweisen. Zur Konkurrenz der Banden mußte bei Kernproteinextrakt ein größerer Überschuß

Oligonukleotid eingesetzt werden als bei Gesamtproteinextrakt (z. B. fünfzigfach bei 1.25 µg Kernproteinextrakt des Stadiums „5 mm“ und nur zwanzigfach bei 3.8 µg Gesamtproteinextrakt des gleichen Fruchtstadiums). Wenn man die Höhen der Banden von GBF-Komplexen in Kernproteinextrakt mit denen in Gesamtproteinextrakt vergleicht, so liegen die Banden aus Gesamtproteinextrakt etwas höher als diejenigen von Kernproteinextrakt. In Gelretardierungsexperimenten mit gleichen Proteinmengen der verschiedenen Extrakte verschob sich die Bande S2 zu späteren Fruchtstadien hin nach oben, was eigentlich auf eine Veränderung der GBF-Komplexe hinweist (Abb. 20 und 22). Als jedoch die Proteinmengen der Extrakte späterer Fruchtstadien vergrößert wurden (wie in den Konkurrenzexperimenten, Abb. 21 und 23, geschehen), trat dieser Effekt nicht mehr auf. Insgesamt konnte gezeigt werden, daß sich die GBF-Bindeaktivitäten im Verlauf der Fruchtentwicklung nicht nur im Kern, sondern in der gesamten Zelle verändern.

3.3.2 Expression von GBF während der Fruchtentwicklung

Die Regulation der G-Box abhängigen *RBCS2* Promotoraktivität in Früchten könnte über eine Regulation der G-Box-Bindefaktoren (GBF) stattfinden. Der vorhergehende Abschnitt hatte gezeigt, daß in Kern- und Gesamtproteinextrakten von Früchten eine G-Box Bindeaktivität vorhanden war, die während der Fruchtentwicklung abnahm. Die Abnahme der G-Box Bindeaktivität korrelierte also mit der Abnahme der *RBCS2* Promotoraktivität. Als Ursache einer Abnahme der G-Box Bindeaktivität in späteren Fruchtstadien könnte z. B. eine Abnahme der Menge der vorhandenen GBF in Frage kommen, eine Modifikation des Proteins oder eine Kombination beider Prozesse.

Die Expression von drei ausgewählten GBFs wurde daher auf Transkriptions- und Translationsebene in den vier repräsentativen Fruchtstadien untersucht. Die cDNA-Klone dieser GBFs (GBF4, GBF9 und GBF12) wurden zur Verfügung gestellt (Meier und Gruissem, 1994). Die cDNAs der GBFs waren nicht vollständig und lagen über *EcoRI/XhoI* in einen pBlueskript Vektor (pSK) einkloniert vor. Die Länge der GBF4-cDNA und GBF9-cDNA betrug 1.2 kb, die cDNA von GBF12 war 1.0 kb groß. Da die

RNA-Transkripte dieser GBF Größen von 1.8 kb (GBF4), 2.0 kb (GBF9) und 1.5 kb (GBF12) ergaben, kodierten die cDNAs für maximal 67 % der vollständigen Proteine (GBF9: 60 %). Die Sequenzen der cDNAs und die der translatierten Proteine sind im Anhang wiedergegeben.

3.3.2.1 Expression auf RNA-Ebene

Durch *in vitro* Transkription wurden RNA-GBF-Sonden von den cDNAs der drei GBFs hergestellt. Die Sonden wurden auf ihre Spezifität in einem Southern Experiment überprüft. Dafür wurden die pBlueskript Vektoren mit den einklonierten GBF-cDNAs *EcoRI/XhoI* restringiert, in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Die so fixierte DNA wurde mit den verschiedenen *in vitro* transkribierten RNA-GBF-Sonden hybridisiert. Jede der Sonden detektierte neben Vektorsequenz (Bandengröße 3 kb) spezifisch die cDNA nur eines GBFs (GBF4: 1.0 kb, GBF9: 1.2 kb und GBF12: 0.95 kb) (Abb. 24). Die Erkennung von Vektorsequenz ist auf die Herstellungsprozedur der Sonden zurückzuführen (2.2.6.5.2): Vor der *in vitro* Transkription wird das Ausgangsplasmid so linearisiert, daß bei der *in vitro* Transkription nur das Antisense-Produkt der klonierten cDNA entstehen sollte. Falls Spuren nicht linearisierten Plasmides vorhanden sein sollten, wird auch Vektorsequenz transkribiert.

Im Versuch entsprach die Größe der GBF4-cDNA (1.0 kb) nicht der erwarteten Größe von 1.2 kb. Dies ist mit einer internen *EcoRI* Schnittstelle zu erklären, die die cDNA in der *EcoRI/XhoI*-Restriktion in ein Fragment von 1.0 kb (*EcoRI/XhoI*) und 0.17 kb (*EcoRI/EcoRI*) Länge aufteilte.

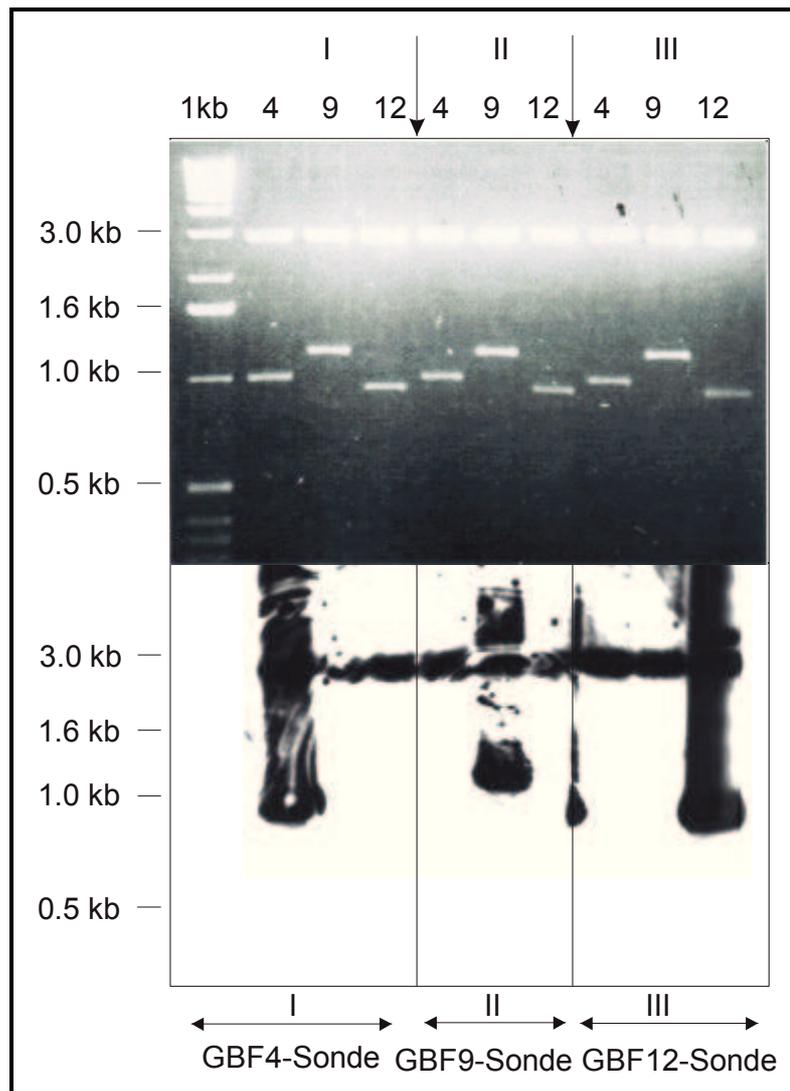


Abb. 24: Spezifität der RNA-GBF-Sonden

Oberer Teil der Abbildung: pSKII mit einklonierter GBF-cDNA (pSK/GBF4, pSK/GBF9 und pSK/GBF12) wurden mit *EcoRI* und *XhoI* restringiert. 250 ng des jeweiligen restringierten Plasmids wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Spuren von links nach rechts: 1 kb Leiter, Spaltung pSK/GBF4 (4), Spaltung pSK/GBF9 (9), Spaltung pSK/GBF12 (12), danach wieder die Folge der genannten Restriktionen.

Unterer Teil der Abbildung: Nach dem Transfer der DNA auf eine Membran wurde die Membran in drei Teile geschnitten (I, II und III; Schnittstellen durch die vertikalen Pfeile markiert) und jeweils mit einer der drei RNA-GBF-Sonden (I: GBF4-Sonde, II: GBF9-Sonde oder III: GBF12-Sonde) hybridisiert.

Anschließend wurde Gesamt-RNA der vier verschiedenen Fruchtstadien hinsichtlich der Transkription der drei GBFs untersucht. Aus allen vier Fruchtstadien wurde Gesamt-RNA isoliert und in einem Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt. Nach dem

Übertrag auf eine Membran wurde mit den jeweiligen RNA-GBF-Sonden hybridisiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA-Mengen wurde danach eine Hybridisierung mit einer DNA-Sonde, die 25S-rRNA-Sequenz erkennt, durchgeführt. Es zeigte sich, daß in allen Stadien GBF4, GBF9 und GBF12 gleichmäßig exprimiert wurden, wenn auch sehr schwach (Abb. 25). Die Größen der Transkripte lagen bei 1.8 kb (GBF4), 2.0 kb (GBF9) und 1.5 kb (GBF12).

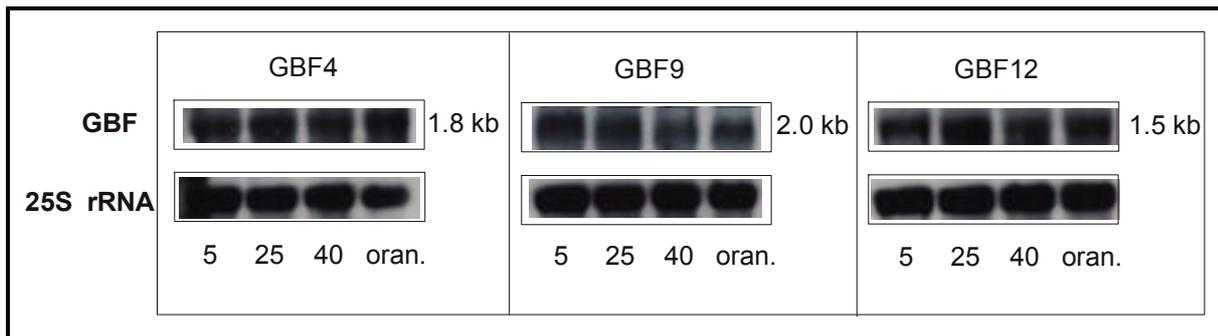


Abb. 25: Transkription von GBF 4, 9 und 12 in den Fruchtstadien

10 µg Gesamt-RNA je Fruchtstadium (5: „5 mm“; 25: „25 mm“, 40: „40 mm“ und oran.: „orange“) wurden in einem 1.5%igen Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran wurde mit den verschiedenen RNA-GBF-Sonden hybridisiert. Die Ladungskontrolle erfolgte über eine Hybridisierung mit einer für 25S-rRNA spezifischen Sonde.

3.3.2.2 Expression auf Proteinebene

Nachdem sich die Expression von GBF4, GBF9 und GBF12 im Verlauf der Fruchtentwicklung auf RNA-Ebene als konstant herausgestellt hatte, sollte geprüft werden, ob diese GBFs auch auf Proteinebene in gleichen Mengen vorhanden sind. Aus Arbeiten von Dr. Meier standen Antikörper gegen GBF9 und gegen GBF12 zur Verfügung. Antikörper 580-9 erkannte GBF9, 583-12 dagegen GBF12. Außerdem konnte noch Antiserum gegen GBF1 aus Arabidopsis eingesetzt werden. Zunächst wurde die Spezifität der drei Antikörper gegen in E.coli exprimiertes GBF Protein getestet. Dazu wurde E. coli mit den einzelnen pSK/GBF Vektoren transformiert. Die Expression der GBF wurde in E. coli über den *lacZ*-Promotor des pBlueskriptvektors

durch Zugabe von IPTG bei einer Zelldichte von 0.6-0.8 induziert. Die Zellen wurden zwei Stunden nach der Induktion geerntet und aufgearbeitet. Das gewonnene Protein wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-membran transferiert und mit den verschiedenen Antikörpern detektiert. 580-9 und 583-12 wiesen sehr spezifisch GBF9 (40 und 38 kDa), bzw. GBF12 (35 und 30 kDa) nach. Anti-GBF1 war in der Lage GBF4 (40kDa), GBF9 (40 und 38 kDa) und GBF12 (35 und 30 kDa) zu detektieren und hatte damit eine wesentlich größere Bandbreite (Abb. 26). Die Doppelbanden sind vermutlich auf Abbauprodukte der jeweiligen GBF zurückzuführen. Das Auftreten eines veränderten Bandenmusters detektierter Proteine durch die Präseren von GBF1 und 583-12 konnte nicht geklärt werden. Antikörperseren und dazugehörige Präseren wurden in gleicher Verdünnung eingesetzt.

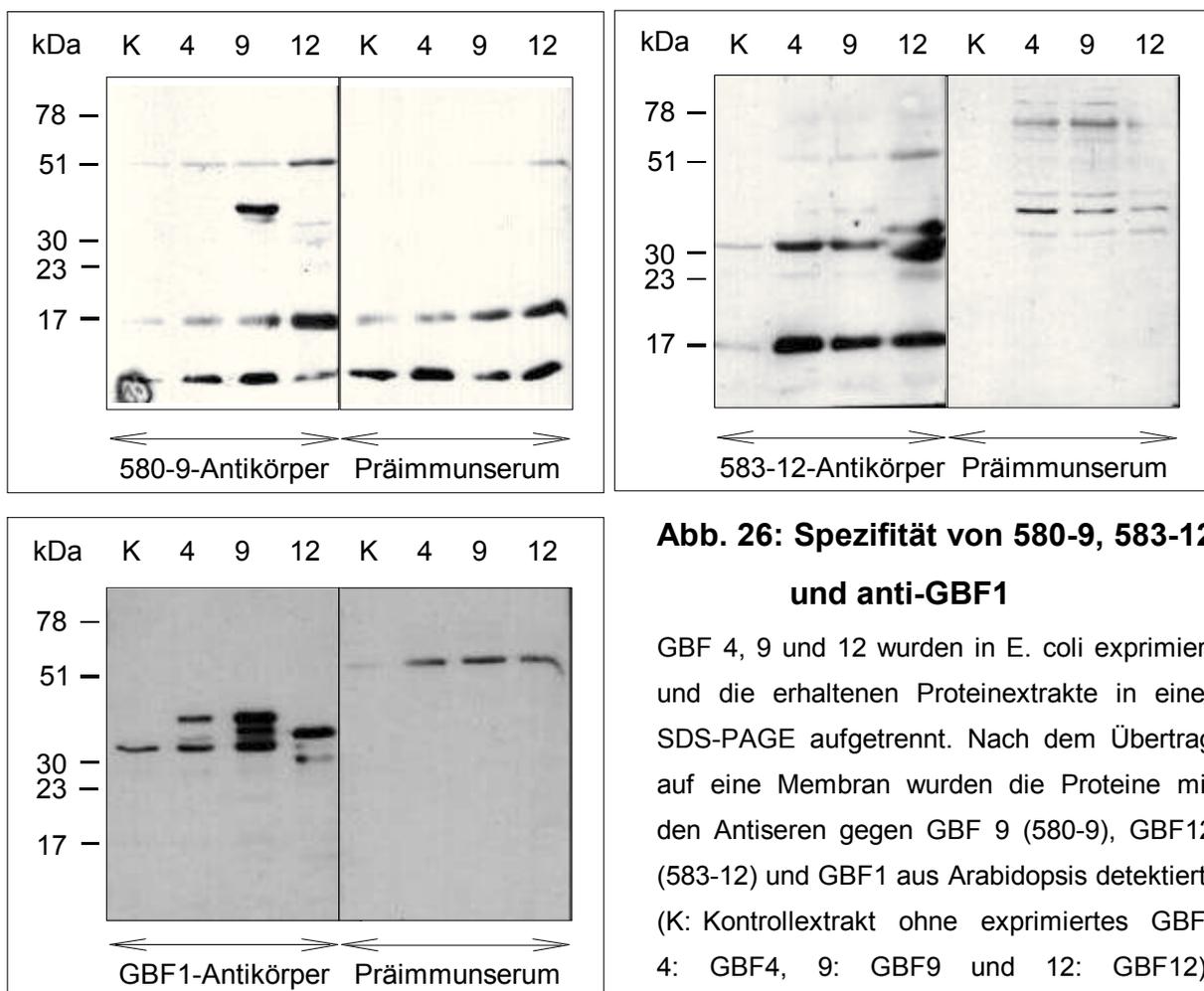


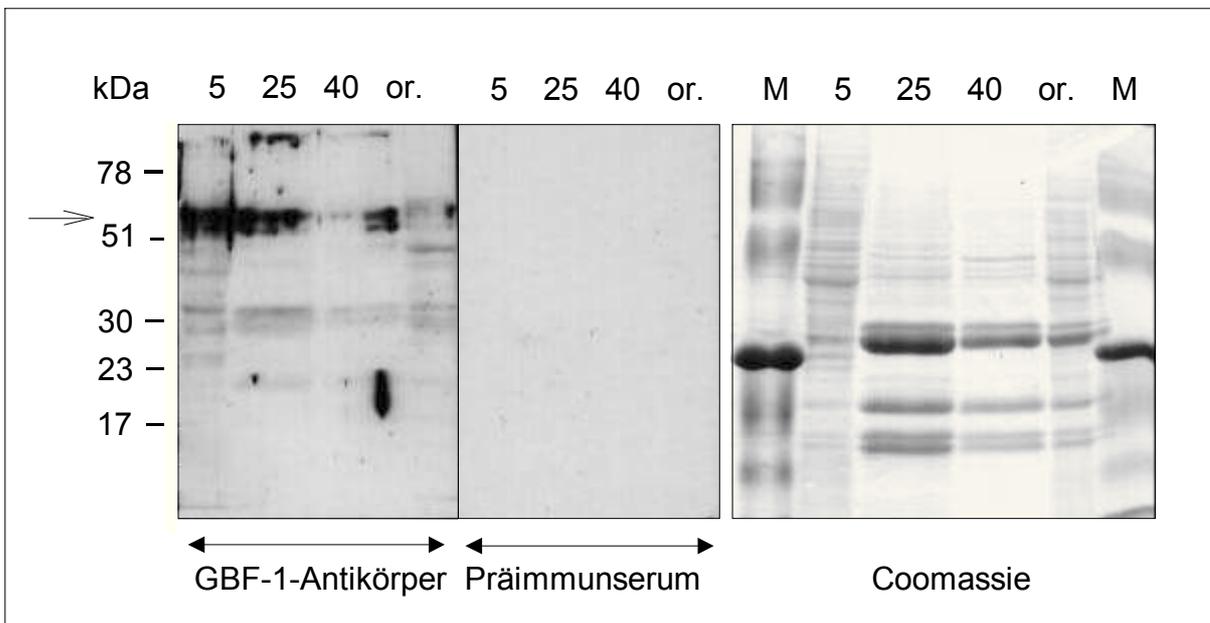
Abb. 26: Spezifität von 580-9, 583-12 und anti-GBF1

GBF 4, 9 und 12 wurden in *E. coli* exprimiert und die erhaltenen Proteinextrakte in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Übertrag auf eine Membran wurden die Proteine mit den Antiseren gegen GBF 9 (580-9), GBF12 (583-12) und GBF1 aus *Arabidopsis* detektiert. (K: Kontrolleextrakt ohne exprimiertes GBF, 4: GBF4, 9: GBF9 und 12: GBF12).

Die aus den cDNAs der drei GBFs erwarteten Proteingrößen lagen bei 34 kDa (GBF4 und GBF9) und 28 kDa (GBF12) und waren damit geringer als die im Experiment gefundenen. Ähnliche Diskrepanzen zwischen vorhergesagten und gefundenen Proteingrößen sind auch von anderen GBFs berichtet worden und wurden dort auf den hohen Prolin-Gehalt der GBFs zurückgeführt (de Vetten und Ferl, 1995).

Die Expression von GBF sollte mit allen genannten Antiseren in Kernproteinextrakt und Gesamtproteinextrakt während der Fruchtentwicklung verfolgt werden. Gesamtproteinextrakte wurden durch Aufschließen des gemörserten Pflanzenmaterials in SDS-Probenpuffer erhalten. Kern- und Gesamtproteinextrakte der vier verschiedenen Fruchtstadien wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit den verschiedenen Antiseren detektiert. Weder 580-9 noch 583-12 waren in der Lage, ein GBF-spezifisches Signal in Kern- oder Gesamtproteinextrakt der verschiedenen Fruchtstadien zu erzeugen. Anti-GBF1 hingegen, der das größere Spektrum von GBFs erkannte, detektierte GBFs (Größe 60 kDa) in Kern- und Gesamtproteinextrakt. Als Ladungskontrolle diente ein zweites Gel, in dem die Proteine durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht worden waren (Abb. 27). Aus den Transkriptgrößen von GBF4, GBF9 und GBF12 ließ sich abschätzen, daß die Größe der korrespondierenden Proteine bei 50 bis 66 kDa liegen sollte, so daß das detektierte Signal im erwarteten Größenbereich lag. Insgesamt blieb die Expression der nachgewiesenen GBFs in Kernproteinextrakt konstant (Abb. 27 A). Das Signal in Kernproteinextrakt schien rein optisch zu späteren Stadien hin abzunehmen, dies war aber auf die abnehmenden geladenen Proteinmengen zurückzuführen. Ebenso konnte in Gesamtproteinextrakten (Abb. 27 B) eine konstante GBF-Expression nachgewiesen werden (der Extrakt des Stadiums „orange“ war in geringerer Menge geladen worden, daher ist das Signal hier schwächer). Das Auftreten der Signale oberhalb von 60 kDa war vermutlich auf eine unvollständige Denaturierung der GBF-Komplexe zurückzuführen.

A)



B)

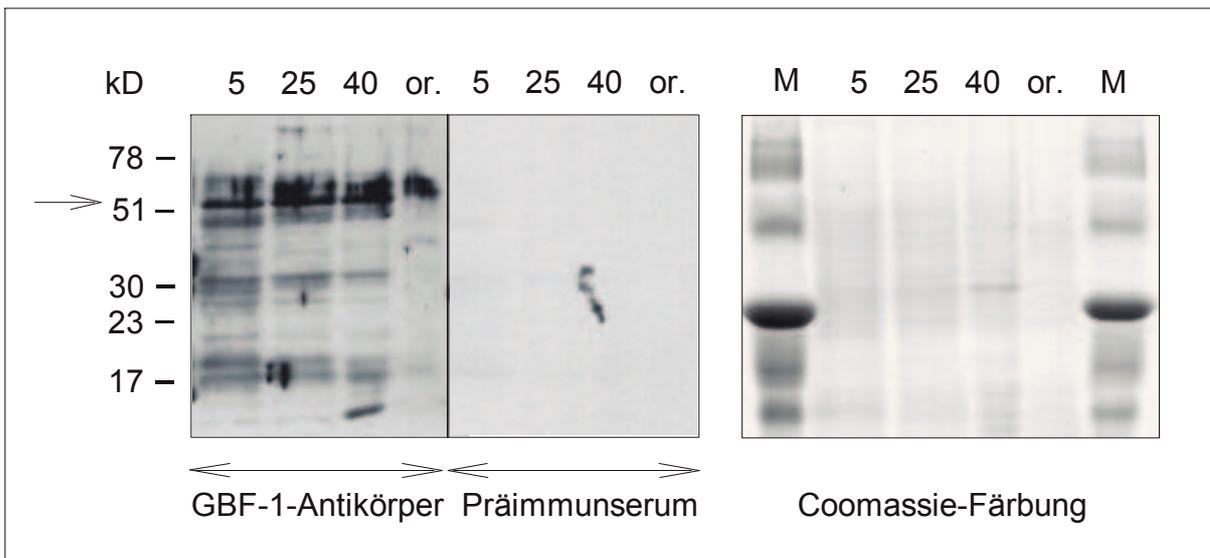


Abb. 27: Expression von GBFs in Kern- und Gesamtproteinextrakt

15 µg Kernproteinextrakt (A) und 10 µg Gesamtproteinextrakt (B) je Fruchtstadium wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. GBFs wurden im Western-Blot-Verfahren mit anti-GBF1 nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurden in einem zweiten Gel die enthaltenen Proteine mit Coomassie gefärbt.

3.3.2.3 Supershift in Kernproteinextrakten

In Abschnitt 3.3.1 wurde in Gelretardierungsexperimenten gezeigt, daß in Proteinextrakten der verschiedenen Fruchtstadien GBFs vorhanden sind, die zur Bildung zweier verschiedenener Komplexe mit einem G-Box Oligonukleotid führen. Dabei war aber keine Aussage möglich, welche GBFs jeweils in welchem Komplex zu finden sind. Dies kann in sogenannten Supershift-Experimenten durch Zugabe spezifischer Antikörper untersucht werden. Der Antikörper erkennt den jeweiligen Protein-DNA-Komplex und erzeugt einen zusätzlichen Shift, den Supershift.

Für ein Supershift-Experiment wurde das markierte G-Box Oligonukleotid mit Kernproteinextrakt und Antiserum inkubiert und danach in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Vor der Erzeugung des Supershifts wurden die Extraktmengen von Kernproteinextrakt so variiert, daß sie annähernd gleich starke Shiftsignale in allen Stadien erzeugten. Anschließend wurde beobachtet, welcher Anteil dieses Shifts durch Zugabe gleicher Mengen Antikörper „supergeshiftet“ wurde. Die Supershiftexperimente wurden mit den Antiseren 580-9, 583-12 und anti-GBF1 durchgeführt. Mit allen genannten Antiseren konnten Supershifts erzeugt werden, dabei wurde in jedem Fruchtstadium jeweils der gleiche Anteil der Banden verschoben (Abb. 28 und Abb. 29). Die zusätzlichen Banden wurden analog zu den vor der Zugabe Antikörper bereits vorhandenen Banden (S1 und S2) S1_{neu} und S2_{neu} genannt. Eine dritte zusätzliche Bande entstand auch durch Zugabe der Präseren, sie erhielt den Namen S3.

Das Antiserum 580-9 konnte für beide schon ursprünglich vorhandenen Banden S1 und S2 (durch Wechselwirkung von G-Box mit GBF) jeweils eine definierte neue verschobene Bande (S1_{neu} und S2_{neu}) erzeugen (Abb. 28). Auch mit anti-GBF1 war dies der Fall (Abb. 29). Das Gel-Retardierungsexperiment mit anti-GBF1 zeigte außerdem eine gewisse Auflösung der Banden durch eine Verschmierung über die Spuren, da der Antikörper mit einem größeren Pool an GBF in Wechselwirkung trat. In Supershiftexperimenten mit 583-12 Antiserum trat nur die oberste Bande S1_{neu} auf, in vergleichbarer Höhe wie bei 580-9 (Abb. 28). GBF12 scheint demnach hauptsächlich in den höher molekularen GBF-Komplexen von S1 vorzukommen, GBF9 dagegen in beiden. Der dritte zusätzliche Shift S3 war unspezifisch, da er auch bei Zugabe der Präseren entstand.

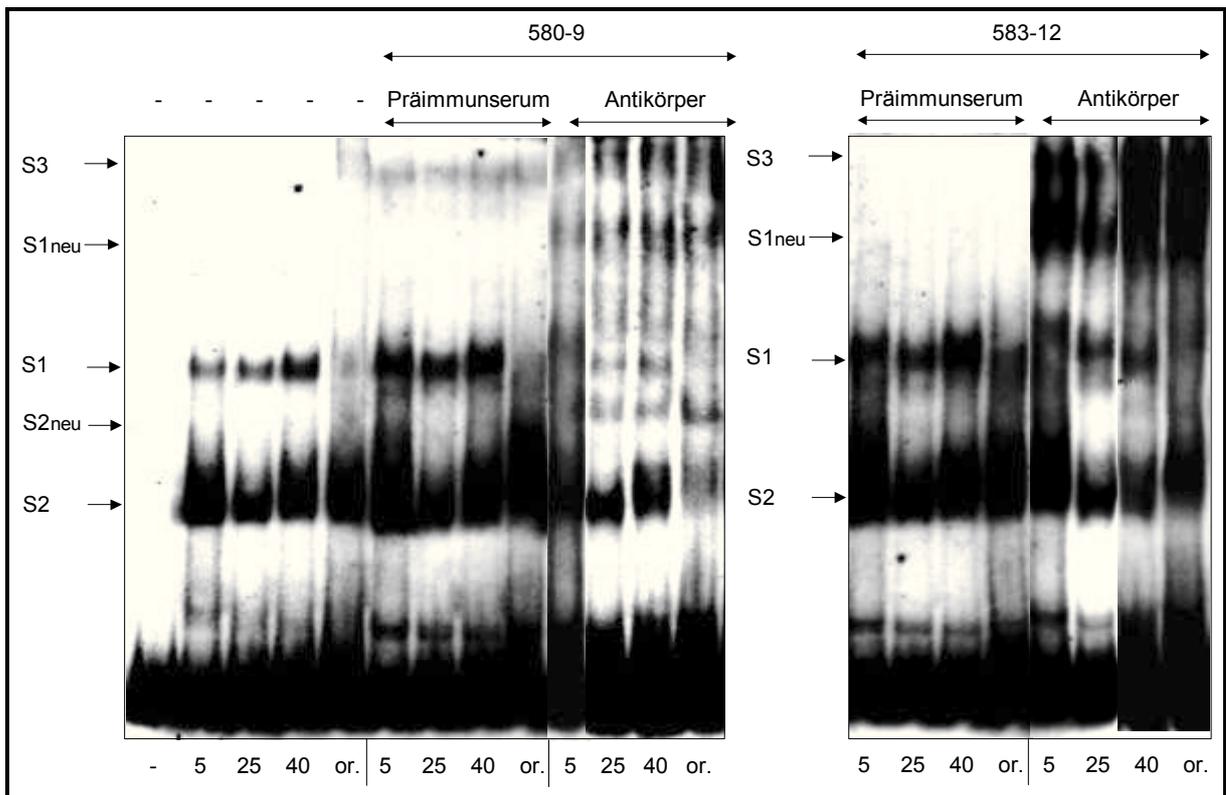


Abb. 28: Supershift in Kernproteinextrakt durch 580-9 und 583-12

1.25 μg 5 mm Kernproteinextrakt und je 5.0 μg Kernproteinextrakt der restlichen Stadien wurden mit 200 μg des Antiserums 580-9, bzw. 583-12 und 0.8 ng markierten G-Box-Oligonukleotid inkubiert und danach in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

(Zugegebene Extrakte: 5: „5 mm“, 25: „25 mm“, 40: „40 mm“ und or.: „orange“.)

S1 und S2: durch Zugabe von Kernextrakt erzeugte Banden.

S1neu, S2neu und S3: durch Zugabe von Kernextrakt und Serum erzeugte Banden.)

Anteilig an der Bindeaktivität waren also gleiche Mengen GBF9 und GBF12 vorhanden. GBF9 war in der oberen und unteren Bande vorhanden, die Wechselwirkung mit dem Antikörper sollte nur zu einer neuen Bande führen (bestehend aus Antikörper, GBF9 und Oligonukleotid), es entstanden aber zwei. Es müsste also noch ein modifiziertes GBF9 geben oder eine Wechselwirkung mit einem anderen Faktor stattfinden.

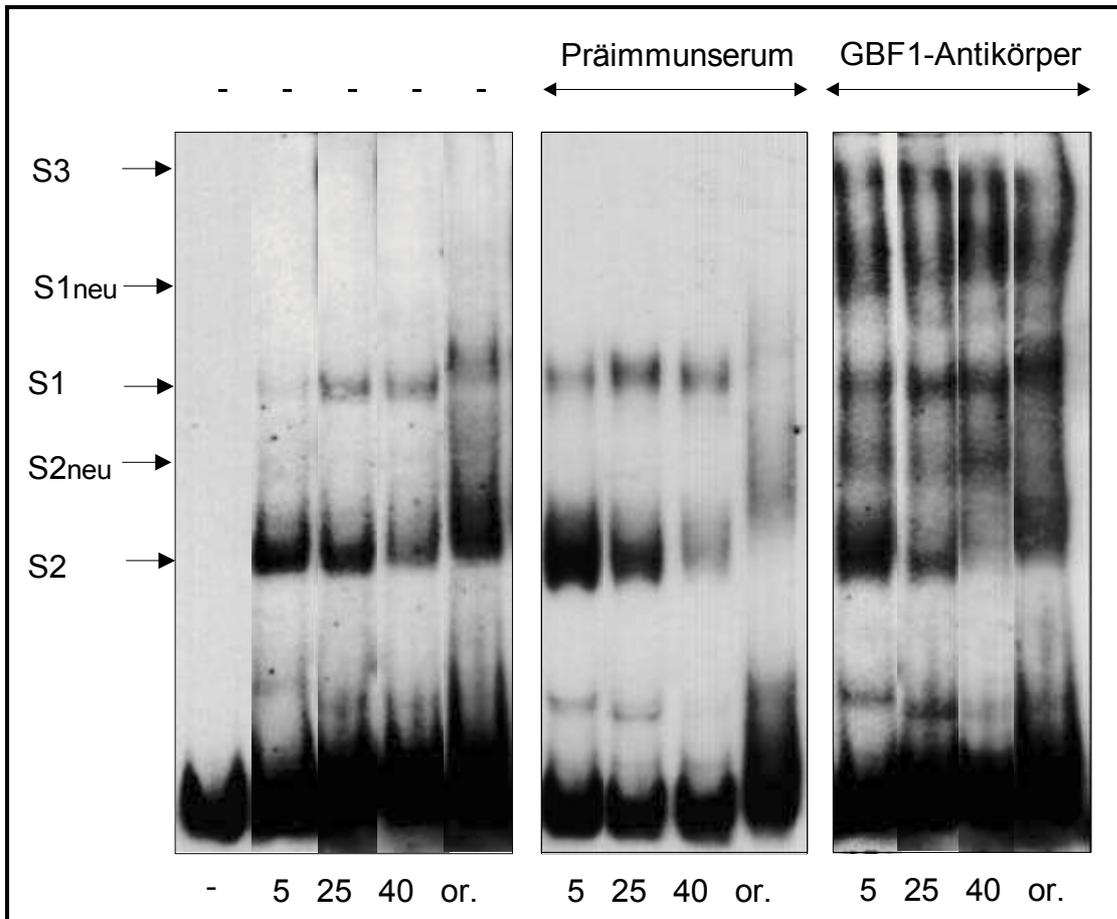


Abb. 29: Supershift in Kernproteinextrakt durch anti-GBF1

1.25 µg 5 mm Kernproteinextrakt und je 5.0 µg Kernproteinextrakt der restlichen Stadien wurden mit 125 µg des Serums anti-GBF1 und 0.8 ng markierten G-Box-Oligonukleotid inkubiert und danach in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

(Zugegebene Extrakte: 5: „5 mm“, 25: „25 mm“, 40: „40 mm“ und or.: „orange“.

S1 und S2: durch Zugabe von Kernextrakt erzeugte Banden.

S1_{neu}, S2_{neu} und S3: durch Zugabe von Kernextrakt und Serum erzeugte Banden.)

Das Experiment mit Anti-GBF1 zeigte ebenfalls, daß anteilig an der Bindeaktivität gleiche Mengen eines GBF-Pools in den verschiedenen Fruchtstadien vorhanden waren. Auch hier deutet die Entstehung zweier Banden auf mögliche Wechselwirkungen mit einem weiteren Faktor oder Veränderungen von GBFs hin.

Zusammenfassung

Spezifische G-Box Bindefaktoren (GBFs) liegen nicht nur in Zellkernen, sondern auch in der gesamten Zelle vor. GBFs der Gesamtproteinextrakte besitzen eine schwächere DNA-Bindeaktivität als die der Kernproteinextrakte. Im Verlauf der Fruchtentwicklung nimmt die Signalstärke der GBF-Komplexe in beiden untersuchten Extraktarten in Gelretardierungsexperimenten korrespondierend zur G-Box abhängigen RBCS2 Promotoraktivität ab. GBF4, GBF9 und GBF12, drei bekannte Tomaten GBF, wurden aber konstant in allen untersuchten Fruchtstadien transkribiert. Ebenso nahm die Menge der GBFs weder in Kernproteinextrakt noch in Gesamtproteinextrakt während der Fruchtentwicklung ab. Supershiftexperimente zeigten anteilig an der Bindeaktivität gleiche Mengen der detektierten GBFs in den Komplexen im Verlauf der Fruchtentwicklung. Dabei konnte GBF9 zum Beispiel in beiden ursprünglichen Komplexen nachgewiesen werden, führte aber nicht zu erwartungsgemäß einer neuen Bande durch Wechselwirkung mit dem Antikörper, sondern zu zwei.

3.3.3 Modifikation von GBF während der Fruchtentwicklung

Das vorhergehende Kapitel hat gezeigt, daß die Menge der exprimierten (und nachweisbaren) GBFs im Verlauf der Fruchtentwicklung konstant blieb. Nichtsdestotrotz konnte in Gelretardierungsexperimenten (Abschnitt 3.3.1) eine Abnahme der Signalstärke der GBF-spezifischen Banden beobachtet werden. Da eine abnehmende GBF-Menge als Ursache nun nicht mehr in Frage kam, stellte sich die Frage, ob eine Veränderung der DNA-Bindeaktivität der GBFs zu den schwächeren Signalen führte. DNA-Bindeaktivitäten können durch Überführung eines Bindefaktors in eine aktivere oder weniger aktive Form reguliert werden. Eine solche Modifikation kann unter anderem über Phosphorylierung und Dephosphorylierung stattfinden. So läßt sich z. B. durch Phosphorylierung die DNA-Bindeaktivität von GBF1 aus *Arabidopsis* erhöhen (Klimczak *et al.*, 1992, Klimczak *et al.*, 1995). Die Proteinstruktur von GBF4, GBF9 und GBF12 weist potentielle Phosphorylierungsstellen auf (Beispiel Erkennungsstellen von Casein Kinase II auf GBF12 in Abb. 30).

NSARADGKDQ	NTSKKLGCS	G GKAGESGKA	AS	SGNDGGA	40	
TRSAE	SGSEG	SSDEN	DENDN	HEFSADKNRS	F DLMLANGAN	80
AQTNPATGNP	VAMPAPNLNI	GMDLWNAPSG	GPGMIKMRSN	120		
QSGVSPAPGM	GREWI	QDERE	LKRQKRK	QSN	RESARRSRLR	160
KQAECEELQH	KVETLSNENH	GLKEELRKVS	EECEKLTSEN	200		
NSIKDELTRL	YGPEAV	SKLE	SNANAMRL	QS	NVEEAKS	237

Abb. 30: Erkennungssequenzen für Casein Kinase II auf GBF12

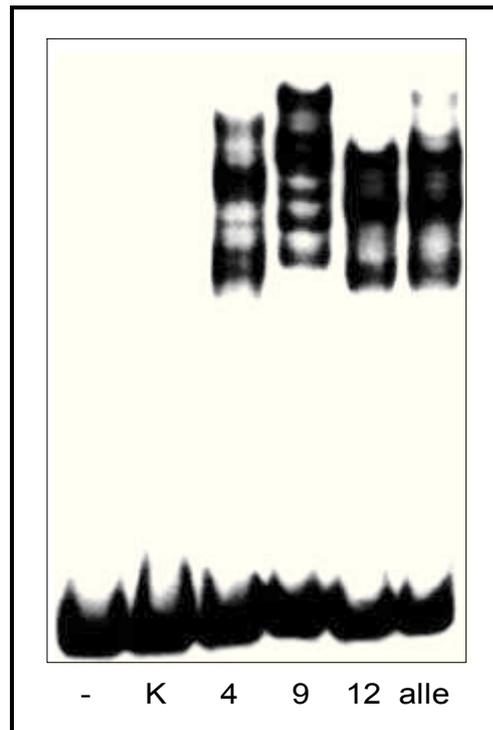
Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von GBF12. Die blau markierten Aminosäuren gehören der basischen Domäne von GBF12 an, die grün markierten dem Leucin-Zipper. In Rot dargestellt sind die potentiell phosphorylierbaren Serine, die innerhalb der Erkennungssequenz (X-S/T-XX-D/E-X) der Casein Kinase II liegen (Kästen). Schwarze Kästen symbolisieren starke Phosphorylierungsstellen, rote schwache (enthalten basische Aminosäuren).

Eine Regulation der GBF-Bindeaktivität während der Fruchtentwicklung über Phosphorylierung oder Dephosphorylierung wäre demnach denkbar. Die Auswirkung einer Phosphorylierung (und anschließender Dephosphorylierung) auf die DNA-Bindeaktivität von GBFs wurde zunächst mit in *E. coli* exprimierten GBF12 in Gelretardierungsexperimenten untersucht und anschließend die Untersuchung auf Kernproteinextrakte der verschiedenen Fruchtstadien ausgeweitet.

3.3.3.1 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von GBF12

Sequenzvergleiche verschiedener GBFs haben gezeigt, daß GBF4 und GBF12 aus Tomate mit dem bereits erwähnten GBF1 aus Arabidopsis in eine gemeinsame Klasse einzuordnen sind (Meier und Gruissem, 1994). Da die Bindeaktivität von GBF1 aus Arabidopsis durch Phosphorylierung reguliert wird, sollte dieser Effekt am leichtesten auch bei den strukturell ähnlichen GBF4 und GBF12 zu demonstrieren sein. Damit war es naheliegend, einen dieser beiden GBFs für Phosphorylierungsversuche auszuwählen.

In einem Gelretardierungsexperiment mit in *E. coli* exprimierten GBF, das unter nativen Bedingungen aufgearbeitet worden war, wurden durch GBF12 drei verschiedene Komplexe gebildet. GBF4 und GBF9 bildeten bis zu sechs Komplexe (Abb. 31).

**Abb. 31: Gelretardierungsexperiment mit GBF4, GBF9 und GBF12**

1.0 µg Protein (K: Kontrollextrakt aus *E. coli* ohne exprimiertes GBF, 4: GBF4, 9: GBF9, 12: GBF12 und alle: je 0.33 µg der drei genannten GBFs) wurden mit 0.8 ng Dig markiertem G-Box Oligonukleotid inkubiert und anschließend in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Die Höhen der Banden korrespondieren im Mittel mit den Größenverhältnissen der GBFs zueinander: GBF4 und GBF9 sind größer als GBF12, ihre Komplexe sind daher größer und laufen langsamer als diejenigen von GBF12. Wenn alle GBFs zusammen mit dem G-Box Oligonukleotid inkubiert wurden (Spur „alle“ in Abb. 31), wurden keine neuen Komplexe gebildet, sondern das erhaltene Bandenmuster ähnelte eher dem von GBF12. Obwohl in den Spuren 4, 9 und 12 nur ein GBF vorlag und Kontrollextrakt (Spur K) keine G-Box-Bindeaktivitäten aufwies, wurden mehrere Komplexe gebildet. Dieser Effekt ist auch schon bei anderen in *E. coli* exprimierten GBFs beobachtet worden (Hong *et al.*, 1995). Alle durch Zugabe von GBF entstandenen Banden beruhten tatsächlich auf einer GBF-G-Box-Wechselwirkung, wie in einem Konkurrenzexperiment spezifiziert werden konnte. In diesen Experimenten wurde ein 125-facher Überschuß Kompetitor und 1.0 µg GBF-Protein eingesetzt (Daten für GBF12 in Abb. 33, Seite 87, zu sehen).

GBF12 wurde aufgrund seiner - gegenüber GBF4 - weniger zahlreichen Komplexe für Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsexperimente ausgewählt. In *E. coli* exprimiertes, natives GBF12 wurde durch Behandlung mit Casein Kinase II phosphoryliert. Als Kontrolle diente durch Hitzebehandlung inaktivierte Casein Kinase II. Die Zugabe gleicher Mengen Enzym (aktiv oder inaktiv) zu den Extrakten war unerlässlich, um die Proteinmengen anzugleichen. Allein durch die Zugabe von Protein können bereits Protein-DNA-Wechselwirkungen so stabilisiert werden, daß ein Effekt in Form einer Signalverstärkung erzielt werden kann. Das phosphorylierte GBF12 wurde anschließend durch Behandlung mit immobilisierter alkalischer Phosphatase wieder dephosphoryliert.

Nach der Behandlung mit aktiver Casein Kinase wurde von ursprünglich drei Banden nur eine Hauptbande in Höhe des obersten Komplexes von unphosphoryliertem GBF12 beobachtet (Abb. 32 A). Das Verschieben der drei Banden unbehandelten GBF12s durch Phosphorylierung zur obersten Bande, könnte ein Indiz sein, daß GBF12 bereits teilweise phosphoryliert vorlag, da hier die oberste Bande auch bereits auftrat. Tatsächlich führte Dephosphorylierung von GBF12 aus *E. coli* zu nur noch einer sehr schwachen, einzigen unteren Bande (nicht in der Abbildung gezeigt).

Durch die Behandlung von phosphorylierten GBF12 mit alkalischer Phosphatase verlor GBF12 klar an Signalstärke (Abb. 32 B). Eine Abschwächung der DNA-Bindeaktivität durch Dephosphorylierung schien demnach möglich zu sein.

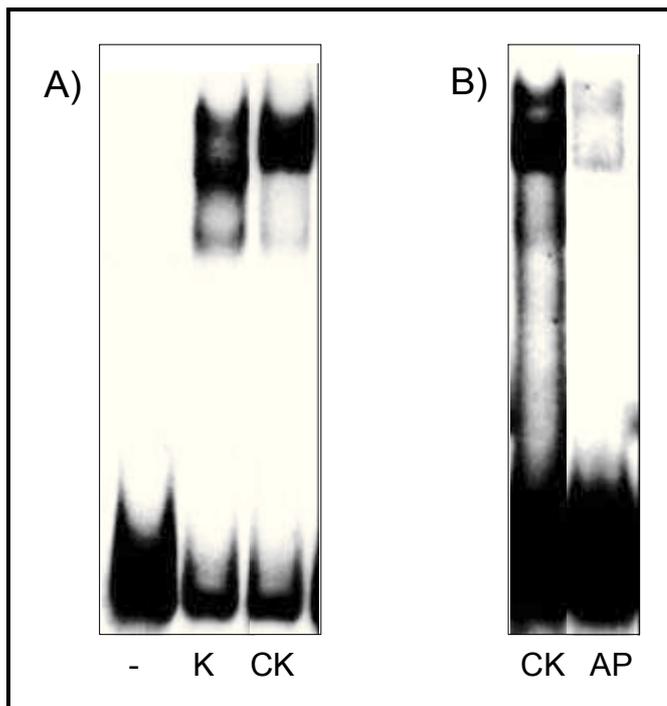


Abb. 32: Modifikation von GBF12 durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung

A) 0.25 µg phosphoryliertes GBF12 (Spur CK) bzw. mit inaktivierter Casein Kinase II behandeltes und damit unphosphoryliertes GBF als Kontrolle (Spur K) wurden mit 0.8 ng Dig markiertem G-Box Oligonukleotid inkubiert und anschließend in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

B) 0.5 µg phosphoryliertes GBF12 (Spur CK) und 0.5 µg durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase wieder dephosphoryliertes GBF12 (Spur AP) wurden mit 0.8 ng Dig markiertem G-Box Oligonukleotid inkubiert und anschließend in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Obwohl die DNA-Bindeaktivität von phosphoryliertem GBF12 durch Dephosphorylierung klar abgeschwächt wurde (Abb. 32 B), konnte die Umkehrung dieser Beobachtung (Stärkung der DNA-Bindeaktivität durch Phosphorylierung von GBF12) im Versuch in Abb. 32 A nicht eindeutig gezeigt werden. Zwar wirkte das Signal des phosphorylierten GBF12 stärker, in der Summe könnten die Signale des unphosphorylierten GBF12 aber ebenfalls eine vergleichbare Signalstärke ergeben. Zur Klärung der Frage, welchen meßbaren Einfluß die Phosphorylierung von GBF12 in Abb. 32 A auf seine DNA-Bindeaktivität hatte, wurde ein Konkurrenzexperiment mit phosphoryliertem GBF12 und unphosphoryliertem GBF12 durchgeführt (Abb. 33).

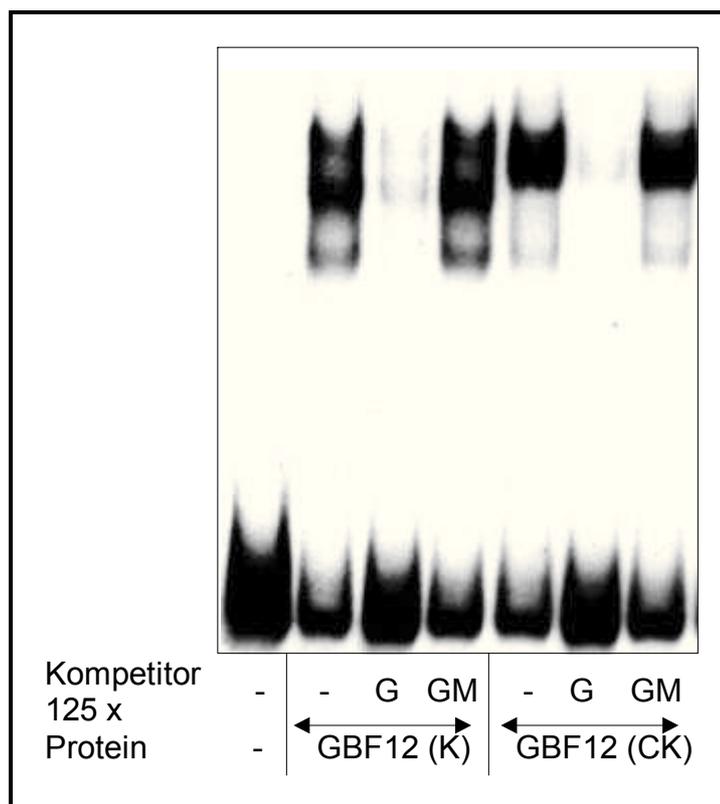


Abb. 33: Wettbewerbsexperiment mit phosphoryliertem GBF12

1.0 µg mit deaktivierter Casein Kinase II behandeltes GBF12 (GBF12 (K)) und 1.0 µg mit aktiver Casein Kinase II behandeltes GBF12 (GBF12 (CK)) wurden mit 0.8 ng Dig markiertem G-Box Oligonukleotid und einem 125-fachen Überschuß Kompetitor (G: nicht markiertes G-Box Oligonukleotid, GM: nicht markiertes Oligonukleotid mit mutierter G-Box) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung in einem 5%igen Polyacrylamidgel.

Es zeigte sich, daß die Komplexe von nicht phosphoryliertem und phosphoryliertem GBF12 durch gleiche Mengen Kompetitor kompetiert wurden. Da aber vermutet werden konnte, daß GBF12 eventuell bereits teilweise phosphoryliert vorlag, könnte dies einen Einfluß auf das Ergebnis des Experimentes gehabt haben, zumal in Abb. 32 B ein Einfluß durch Dephosphorylierung zu beobachten gewesen war.

3.3.3.2 Phosphorylierung von Kernproteinextrakten

Kernproteinextrakte der Fruchtstadien „5 mm“, „25 mm“ und „40 mm“ wurden durch Behandlung mit Casein Kinase II phosphoryliert. Als Kontrolle dienten mit inaktivierter Casein Kinase II behandelte Extrakte. Abb. 34 zeigt, daß die Phosphorylierung der Extrakte weder einen Einfluß auf die Lage und Anordnung der Banden noch auf die Signalstärke der Banden hatte.

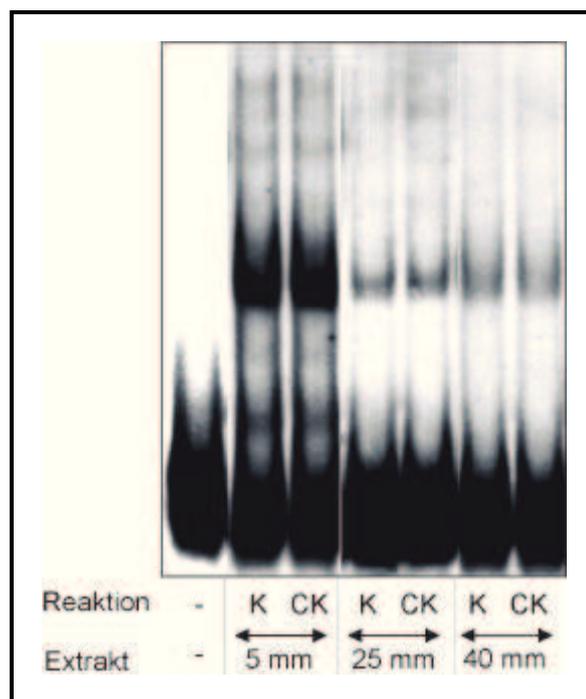


Abb. 34: Phosphorylierung von Kernproteinextrakt

Je 2.5 µg Kontrolleextrakt (Spuren „K“; Zugabe von desaktivierter Casein Kinase) bzw. phosphorylierter Extrakt (Spuren „CK“; Zugabe von aktiver Casein Kinase) der verschiedenen Kernproteinextrakte der Stadien „5 mm“, „25 mm“ und „40 mm“ wurden mit 0.8 ng Dig markiertem G-Box Oligonukleotid inkubiert und anschließend in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Es traten durch die Behandlung in keinem Extrakt eines Fruchtstadiums sichtbare Veränderungen auf. Das kann zum einen bedeuten, daß alle GBFs bereits phosphoryliert vorlagen. Es kann aber auch auf der anderen Seite nicht ausgeschlossen werden, daß im Fruchtextrakt eventuell enthaltene Phosphataseaktivitäten eine Phosphorylierung verhindert haben, da keine Inhibitoren bei der Reaktion verwendet worden waren.

3.3.3.3 Dephosphorylierung von Kernproteinextrakten

Da eine Phosphorylierung der Kernproteinextrakte keinen Einfluß auf die GBF-Komplexe hatte, sollte überprüft werden, ob die in Kernproteinextrakt enthaltenen GBF vielleicht bereits phosphoryliert vorlagen und daher kein Effekt zu sehen war. Für die Dephosphorylierung von Kernproteinextrakt wurde immobilisierte alkalische Phosphatase eingesetzt. Die immobilisierte Phosphatase wurde vor der Inkubation mit Oligonukleotid aus dem Reaktionsansatz mit Kernextrakt durch Abzentrifugation entfernt. Durch die Abzentrifugation wurden der Reaktion keine Proteine entzogen (Tab. 7). In der Tabelle sind die Proteingehalte Phosphatase behandelte Extrakte und unbehandelter Kontrollen gegenübergestellt. Die Proteingehalte wurden nach Bradford bestimmt.

P	AP	K
1	5.0	5.2
2	2.6	2.6
3	3.9	4.9
4	3.3	3.5

Tab 7: Kontrolle zur Bindung von Protein an immobilisierte Phosphatase

Unterschiedliche Mengen Kernproteinextrakt (Proben 1 bis 4 in linker Spalte, P) wurden mit immobilisierter alkalischer Phosphatase behandelt. Nach Abzentrifugation des Immobilisates wurde der Proteingehalt des Überstandes (mittlere Spalte, AP) mit denen der unbehandelten Kontrollen (rechte Spalte, K) verglichen. Alle Angaben beziehen sich auf die Einheit μg . Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford Methode.

Vor der Dephosphorylierung von Kernextrakt durch alkalische Phosphatase wurden die Signalstärken der durch Kernextrakt erzeugten geshifteten Banden durch Variation der Proteinmengen einander angeglichen. Nach der Dephosphorylierung durch die Phosphatase zeigten alle Kernproteinextrakte bis auf denjenigen des Stadiums „5 mm“ eine Umverteilung der Signalstärke der unteren Bande S2 hin zur oberen Bande S1 (Abb. 35). Die obere Bande S1 schien auf Kosten der unteren Bande gestärkt zu werden. Dagegen wurden die Signale beider Banden in Extrakt des Stadiums „5 mm“ abgeschwächt. Die Lage der Banden änderte sich nicht.

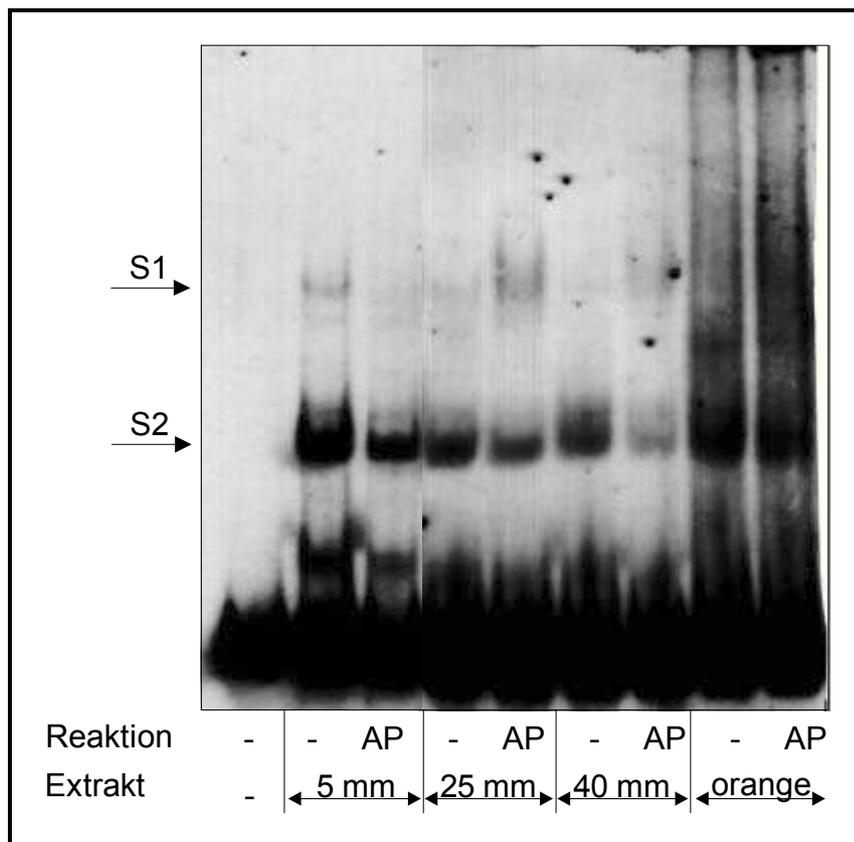


Abb. 35: Dephosphorylierung von Kernextrakten

2.0 µg Kernproteinextrakt des Stadiums „5 mm“ und je 5.0 µg Kernproteinextrakt der späteren Stadien wurden nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase (Spuren AP) mit 0.8 ng markiertem G-Box Oligonukleotid inkubiert und anschließend in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Da die Dephosphorylierung zu den beschriebenen Veränderungen führte, konnte davon ausgegangen werden, daß im Kernextrakt zumindest ein Teil des GBFs phosphoryliert vorlag. Das Umverteilen der Signalstärken deutet darauf hin, daß durch Dephosphorylierung von GBF ein Umschichten der wechselwirkenden GBFs zwischen den Komplexen von Bande S1 und S2 möglich ist oder die DNA-Bindeaktivität des GBF-Komplexes der unteren Bande S2 erhöht bzw. von S1 erniedrigt wird. Der Proteinextrakt des Stadiums „5 mm“ unterschied sich von den Extrakten der späteren Stadien durch die Abschwächung beider Banden. Es muß auch berücksichtigt werden, daß von den Extrakten der späteren Stadien eine wesentlich größere Proteinmenge eingesetzt werden mußte (2.5 fache Menge) und

damit auch eine größere Menge GBFs, um einen Effekt zu sehen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache liegen die GBFs in „5 mm“-Extrakt wesentlich phosphorylierter vor als in den späteren Stadien. Hier könnte der Schlüssel zum drastischen Abfall der *RBCS2* Promotoraktivität gerade zwischen den ersten beiden Stadien zu suchen sein.

Zusammenfassung

Während der Fruchtentwicklung schwächt sich die Signalstärke der GBFs in Gelretardierungsexperimenten ab, obwohl die GBF-Menge konstant bleibt. Es wurden daher Untersuchungen bezüglich einer Veränderung der DNA-Bindeaktivität von GBFs durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung durchgeführt, die die Abschwächung der Signale während der Fruchtentwicklung erklären könnten. GBF12 änderte durch Phosphorylierung sein Komplexbildungsverhalten (Verlagerung von drei ursprünglichen Komplexen zur Bildung von nur noch einem Hauptkomplex), ein meßbarer Einfluß auf die DNA-Bindeaktivität der Komplexe konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Dagegen führte die Dephosphorylierung von phosphoryliertem GBF12 klar zu einer Abnahme der DNA-Bindeaktivität. Die Phosphorylierung von Kernproteinextrakt verschiedener Stadien führte zu keiner Veränderung. Dephosphorylierung von Kernproteinextrakt resultierte dagegen in einer Umverteilung der Signalstärken zwischen den beiden vorhandenen GBF-Komplexen (S1 und S2) in den Extrakten späterer Stadien. Insgesamt lagen die GBFs in Extrakt des Stadiums „5 mm“ wesentlich phosphorylierter vor als in späteren Stadien, so daß dies die Ursache für die Abnahme der DNA-Bindeaktivität während der Fruchtentwicklung sein könnte.

3.4 Versuche zur Klonierung eines I-Box-Bindefaktors mit Hilfe des One-Hybrid-Systems

Im Gegensatz zu Früchten wurde die volle *RBCS2* Promotoraktivität in Blättern durch die additive Wirkung von G-Box und I-Box bewirkt. Konform hiermit konnte nur in Kernproteinextrakten von Blättern und nicht von Früchten eine I-Box Bindeaktivität gefunden werden (Manzara *et al.*, 1991). Obwohl I-Box Bindefaktoren (IBF) in verschiedenen Pflanzenspezies beschrieben wurden, konnte erst kürzlich der erste IBF kloniert werden (Rose, 1998). Mit Hilfe des "One-Hybrid-Systems" aus Hefe wurde versucht, die cDNA eines weiteren IBFs zu klonieren.

3.4.1 Das One-Hybrid-System aus Hefe

Das One-Hybrid-System besteht aus zwei Komponenten: eine cDNA-Bibliothek als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne (AD) des Transkriptionsfaktors GAL4 und ein Hefestamm, der ein Reporterogen unter Kontrolle der zu analysierenden DNA-Bindebox besitzt. Der Hefe-Reporterstamm wird mit der cDNA/AD-Fusionsbibliothek transformiert. Eine Bindung des durch die cDNA kodierten Proteins an die eingeführte DNA-Bindebox führt durch die fusionierte Aktivierungsdomäne zu einer Aktivierung des Reportergens. Anhand der Reportergenaktivität können die DNA-bindenden Klone nachgewiesen werden (Abb. 36). Es wurden die Reportergene *lacZ* und *his3* verwendet.

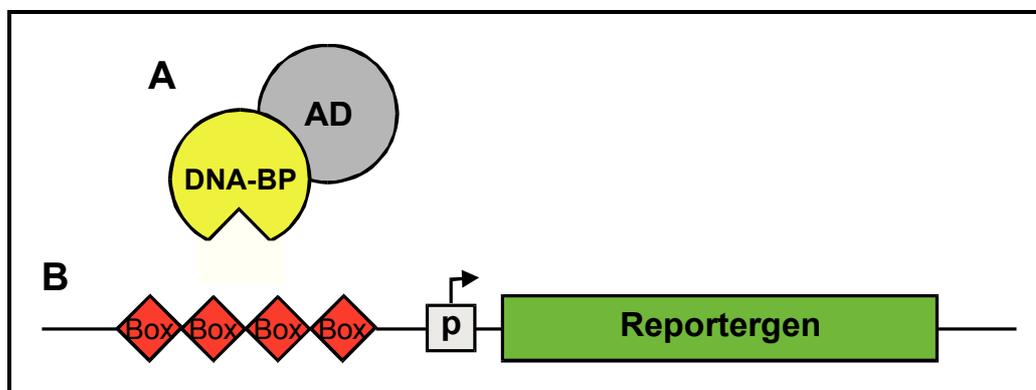


Abb. 36: Schema des One-Hybrid-Systems aus Hefe

Eine cDNA-Bibliothek als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne (AD) des Transkriptionsfaktors GAL4 wird in einem Hefestamm exprimiert, der ein Reporterogen unter der Kontrolle der entsprechenden Bindebox enthält. DNA-bindende Klone werden durch Reportergenaktivität (*lacZ* oder *his3*) detektiert. AD: Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4; DNA-BP: DNA-Bindeprotein (durch cDNA codiert); Box: zu analysierende DNA-Bindebox; P: Minimalpromoter (*CYC1*-Minimalpromotor im Fall des *lacZ*-Reportergens und *HIS3*-Minimalpromotors im Fall des *his3*-Reportergens).

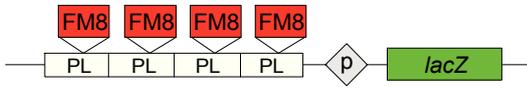
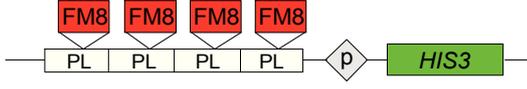
Zur Klonierung eines IBFs aus Tomate wurde eine cDNA/AD-Fusionsbibliothek aus jungen Blättern verwendet. Als DNA Element für das Screening wurde ein Tetramer der I-Box des *RBCS3A* Promotors (FM8-4) stromaufwärts vor einen Hefeminimalpromotor und ein Reportergen integriert. Der *RBCS3A* Promoter enthält wie die Promotoren von *RBCS1* und *RBCS2* die I-Box als konserviertes Element, deren Sequenz in Abbildung 37 zu sehen ist.



Abb. 37: Oligonukleotid für die Tetramerisierung der I-Box

Das I-Box Element liegt auf den Promotoren der Gene *RBCS1*, *RBCS2* und *RBCS3A* konserviert vor. Die Abbildung zeigt dem *RBCS3A* Promotor angelehnte Sequenz des Oligonukleotides, das für die Tetramerisierung der I-Box eingesetzt wurde.

Für den Screen wurde der Hefestamm YMFM8HISi (Tab. 8) verwendet, der zwei verschiedene Reporterplasmide gleichzeitig stabil integriert enthielt: zum einen den Vektor pLacZi/FM8 (enthält das *lacZ*-Reportergen unter der Kontrolle des *CYC1*-Minimalpromotors) und zum anderen den Vektor pHISi-1/FM8 (enthält das *his3*-Reportergen unter Kontrolle des *HIS3*-Minimalpromotors). Stromaufwärts der Promotoren lag jeweils das einklonierte I-Box Tetramer FM8-4.

Ausgangsstamm	Vektor	Bindebox	Skizze des Konstruktes
YM4271 ←	pLacZi/FM8	FM8-4	
	pHISi-1/FM8	FM8-4	

Tab. 8: Der Hefestamm YMF8HISi-1

Der Hefestamm YMF8HISi-1 enthält die Vektoren pLacZi/FM8 und pHISi-1/FM8 über homologe Rekombination ins Hefegenom integriert, was durch die Pfeile angedeutet ist. FM8: I-Box Element (vergl. Abb. 37); PL: Polylinkersequenz des Vektors pIC2OH; P: Minimalpromotor (*CYC1*-Minimalpromotor im Fall des *lacZ*-Reportergens und *HIS3*-Minimalpromotors im Fall des *his3*-Reportergens).

3.4.2 Ergebnisse des One-Hybrid-Screens

Der Hefe-Reporterstamm YMF8HISi-1 kann nach der Transformation mit der Fusionsbibliothek auf zwei Reportergenaktivitäten hin untersucht werden: zum einen auf die Aktivität des *LacZ*-Reportergens und zum anderen auf die Aktivität des *HIS3*-Reportergens. Im ersten Fall werden Hefekolonien bei Zugabe von X-Gal durch eine β -Galaktosidaseaktivität blau, im zweiten Fall wird ein Histidin-freies Medium für die Kultivierung der transformierten Hefen verwendet. Der Hefestamm alleine ist nicht in der Lage, auf Medium ohne Histidin zu wachsen, weil er keine Histidin-Synthase besitzt. Allerdings weist der Minimalpromoter (P_{minHIS3}) stromaufwärts der Reportergene eine schwache Grundaktivität auf. Bei Verwendung des *HIS3*-Reportergens wird daher ein Inhibitor der Histidin-Synthase, 3-Aminotriazol (3-AT), dem Medium zugefügt, der die geringe Menge der gebildeten Histidin-Synthase blockiert. Die optimale Konzentration des Inhibitors muß vor jedem Screen ausgetestet werden.

3.4.2.1 Optimierung der Screen-Bedingungen

Zur Optimierung der Konzentration des Enzyminhibitors 3-Aminotriazol (3-AT) wurden verschiedene Hefe-Reporterstämme mit Kontrollplasmiden transformiert und das Wachstum der Transformanten auf steigenden Konzentrationen 3-AT verfolgt (Tab. 9). Als Hintergrundkontrolle wurde mit dem Plasmid pGAD424 transformiert, das nur die Aktivierungsdomäne AD des GAL4-Faktors enthält. Als Funktionskontrolle des One-Hybrid-Systems wurde der Stamm YM53HIS, der ein Trimer der Box p53 enthält, mit dem Plasmid pGAD53m (enthält die p53-cDNA in Fusion zur Aktivierungsdomäne) transformiert. Bei einer 3-AT Konzentration von 10 mM war kaum noch Wachstum der mit pGAD424 transformierten Hefe des Stammes YMFM8HISi-1 vorhanden. Die Hintergrundaktivität der Histidin-Synthase wurde durch den Inhibitor 3-AT unterdrückt. Die Kontrolltransformanten, YM53HIS mit pGAD53m transformiert (Funktionskontrolle), wuchs dagegen sogar noch auf 60 mM 3-AT. Für den Screen wurde eine 3-AT Konzentration von 45 mM 3-AT ausgewählt.

Hefestamm	Plasmid	3-AT-Konzentration (mM)		
		10	45	60
YM53HIS	pGAD53m	+	+	+
YM53HIS	pGAD424	-	-	-
YMFM8HISi-1	pGAD424	(-)	-	-

Tab. 9: Hefeselektion mit 3-Aminotriazol

Für die Selektion des Hefestammes YMFM8HISi-1 über das *HIS3*-Reportergen ist es notwendig, die Aktivität des *his3*-Promotors durch Zugabe des Enzyminhibitors 3-Aminotriazol (3-AT) auszugleichen. Die Tabelle zeigt das Wachstumsverhalten verschiedener Transformanten der Stämme YM53HIS und YMFM8HISi-1 auf Histidin-freiem Medium bei steigenden 3-AT Konzentrationen. Es wurden folgende Kontrollplasmide transformiert: pGAD424 (enthält nur die Aktivierungsdomäne AD des GAL4-Faktors) und pGAD53m (Fusion der Aktivierungsdomäne AD mit p53).

3.4.2.2 Erhaltene Klone des Screens

Für den IBF-Screen wurde eine cDNA/AD-Fusionsbibliothek aus jungen Blättern auf den Hefestamm YMFM8HISi-1 transformiert und die Transformanten auf Histidin-freiem Medium mit 45 mM 3-AT kultiviert. 2.6 Millionen Transformanten ergaben sechs positive Klone. Die Klone wurden vereinzelt, ihr Plasmid isoliert, dieses zur Kontrolle auf den Selektionsstamm retransformiert und die Sequenz des cDNA-Inserts ermittelt.

Nach der Retransformation zeigten alle Klone weiterhin Wachstum auf 3-AT. Dagegen unterschieden sich die nach der Retransformation erhaltenen β -Galactosidaseaktivitäten der Klone: im Gegensatz zu einer Positivkontrolle YMFM8HISi-1/MybLE1 (MybLE1 ist ein Klon aus Arbeiten von A. Rose (1998), der nachweislich mit FM8 interagiert), die bereits nach eineinhalb Stunden blau gefärbt war, färbten sich Kolonien der Retransformanten von den Klonen 3, 5 und 6 nach zweieinhalb Stunden blau und diejenigen der Klone 1, 2 und 4 nach vier Stunden, einschließlich der Hintergrundkontrolle YMFM8HISi-1/pGAD424. Abkömmlinge von Klon 6 zeigten etwas schwächere β -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zu denen der Klone 3 und 5 (Abb. 38).

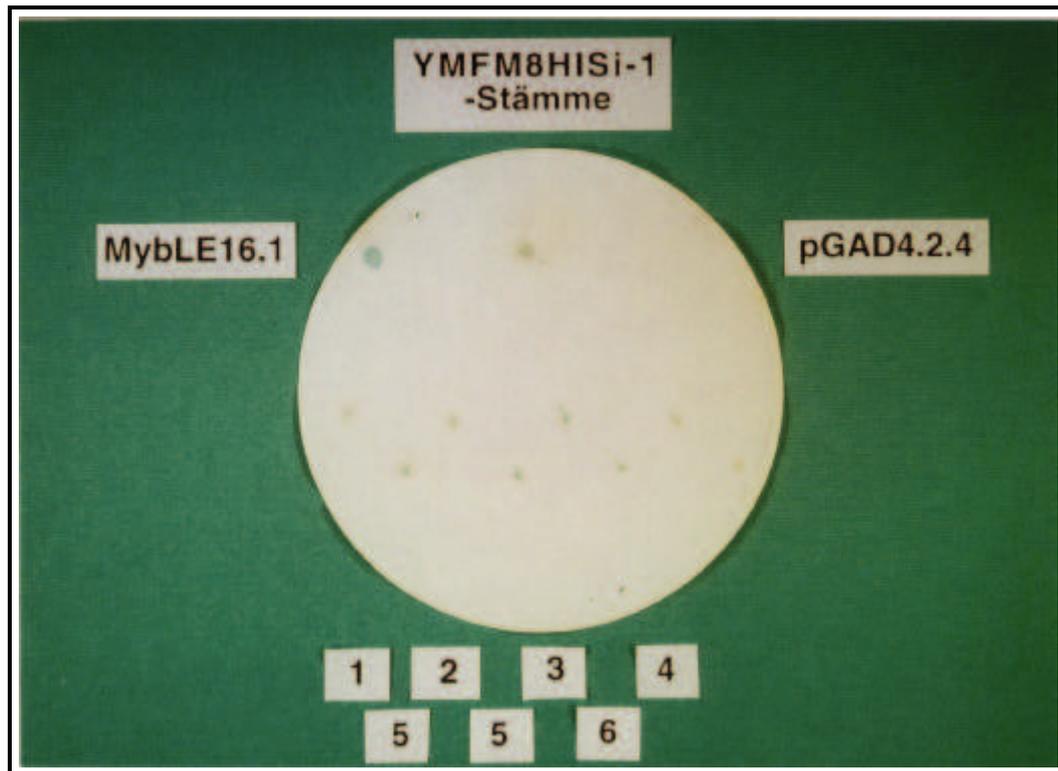


Abb. 38: *LacZ*-Reportergenaktivierung der isolierten Klone des One-Hybrid-Screens nach ihrer Retransformation

Für den Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität wurden retransformierte Hefekolonien des Stammes YMFM8HISi-1 und Kontrolltransformatanten (Positivkontrolle: YMFM8HISi-1/MybLE1, Negativkontrolle: YMFM8HISi-1/pGAD424) von Platten auf Filter abgezogen und mit X-Gal gefärbt. Nach eineinhalb Stunden färbte sich die Positivkontrolle, nach zweieinhalb Stunden waren auch die Klone 3 und 5 blau und Klon 6 etwas schwächer blau, nach vier Stunden hatten sich alle untersuchten Kolonien einschließlich der Negativkontrollen verfärbt.

Bei der Isolierung der cDNA-Inserts stellte sich heraus, daß in Klon 4 kein cDNA-Insert vorhanden war, es handelte sich nur um leeren pGAD424 Vektor. Die cDNA-Inserts der übrigen fünf Klone wurden ansequenziert und ihre Sequenzen mit Datenbanken verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, daß keine der gefundenen cDNA-Inserts in korrekter Fusion zum Leseraster der Aktivierungsdomäne vorlag. Die cDNA des Klons 1 codierte für Chlorophyll a/b Bindeprotein (Cab) aus Tomate (M14444), die cDNA von Klon 2 für eine Nucleosid-diphosphat-Kinase (NDK) der Tomate (P47921) und diejenige von Klon 6 für RBCS2 der Tomate (X05983). Die Homologien lagen bei 94-98 % für die untersuchten Bereiche auf DNA-Ebene.

Die cDNA des Klons 3 wies eine 67% Homologie zu einer decoy mRNA aus Arabidopsis (U87586) und die cDNA des Klons 5 65% Homologie auf Proteinebene zu einem Kupfertransportprotein aus Maus (AF004591) auf (Tab.10).

Klon	β -GAL-Assay	Insertgröße	Sequenzhomologie
1	-	1 kb	Chlorophyll a/b bindendes Protein aus Tomate (98%)
2	-	600 bp	Nukleosid-diphosphat-Kinase aus Tomate (94 %)
3	+	487 bp	decoy mRNA aus Arabidopsis (67 %)
4	-	-	- (kein Insert vorhanden)
5	+	454 bp	Kupfertransportprotein aus Maus (Homologie auf Proteinebene: 65%)
6	(+)	700 bp	RBCS2 aus Tomate (98%)

Tab. 10: Isolierte Klone aus dem One-Hybrid-Screen

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die mit dem One-Hybrid-System erhaltenen Klone. Alle zeigten nach der Retransformation des Plasmides noch Wachstum auf 45mM 3-AT, unterschieden sich aber im β -Gal-Assay (Klone, die nach der Retransformation dieselbe β -Galaktosidaseaktivität aufwiesen wie die Hintergrundkontrolle YMFM8HISi-1/pGAD424, sind mit einem „+“ gekennzeichnet). Klon 4 enthielt kein cDNA-Insert.

Aufgrund der Ergebnisse des β -Gal-Assays wurden die Plasmide der Klone 3, 5 und 6 zusätzlich in anderen Hefestämmen untersucht: Der Stamm YMFHIS enthält einen Vektor mit dem Tetramer des interessierenden Bereiches der Wildtypsequenz von RBCS3A, von der auch YMFM8HIS abgeleitet wurde. Im Gegensatz zu FM8 ist bei F jedoch eine weitere Box vorhanden, die F-Box. Diese Box ist nur auf RBCS3A zu finden und liegt auf FM8 mutiert vor. Der ebenfalls verwendete Hefestamm YMFM6HIS enthält einen Vektor mit dem Tetramer des interessierenden Bereich mit mutierter I-Box und intakter F-Box (Abb. 37). YMICHIS enthält nur Polylinker-

sequenzen, die bei der Klonierung der Plasmide verwendet wurden und vom Vektor pIC2OH stammen.

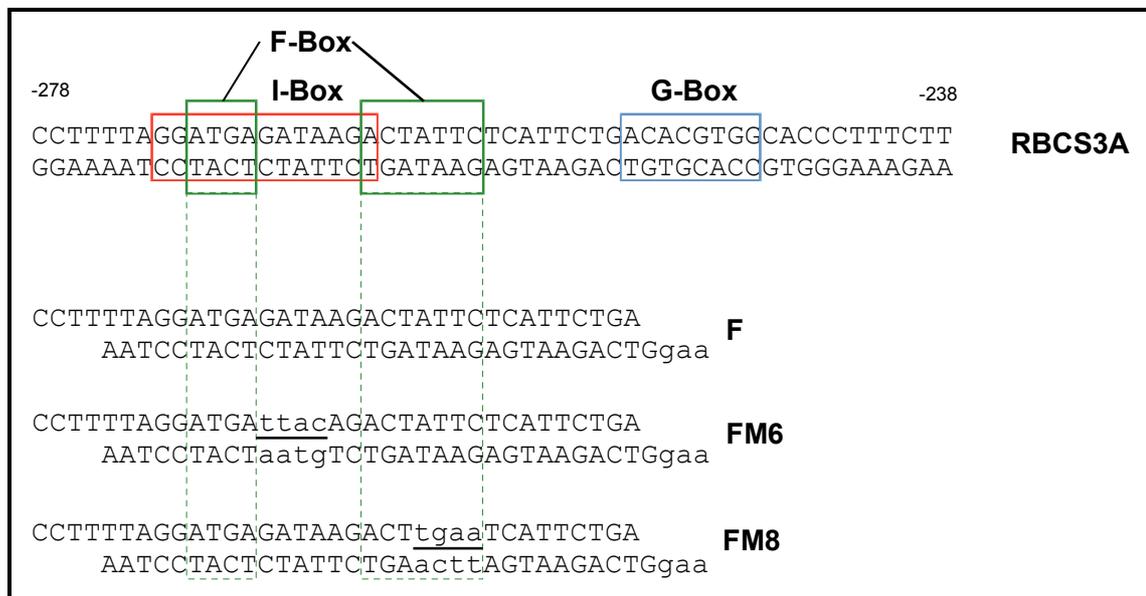


Abb. 39: Sequenzen von F, FM6 und FM8

YMFHIS enthält auf seinem integrierten Vektor als Bindebox ein Tetramer mit intakter RBCS3A Sequenz (F), YMF6HIS FM6 (Vektoren enthalten Tetramer mit mutierter I-Box, aber intakter F-Box) und YMF8HIS FM8 (Tetramer mit intakter I-Box, aber mutierter F-Box).

In Abbildung 40 auf der nächsten Seite ist zu sehen, daß zwar alle der auf YMF8HIS transformierten Plasmide (aus Klonen 3, 5 und 6) hier zu einer Reporteragenaktivierung führten, jedoch eine Aktivierung bei YMFHIS, welcher auch eine intakte I-Box enthält, nur mit dem Plasmid aus Klon 3 stattfand. Die Transformanten der Plasmide der Klone 3, 5 und 6 mit dem Hefestamm YMICHIS zeigten wesentlich mehr Hintergrundaktivität als die Transformanten des Stammes YMF6HIS. Aufgrund der höheren Hintergrundaktivität des YMF8HISi-1 Stammes waren dessen Transformanten zum Zeitpunkt des Abstoppens des Assays bereits alle blau gefärbt (unterer Teil des Filters in Abb. 40). Als Kontrolle wurden YMHIS53/pGAD53m, YMHIS53/pGAD424 und YMF8HIS/pGAD424 verwendet.

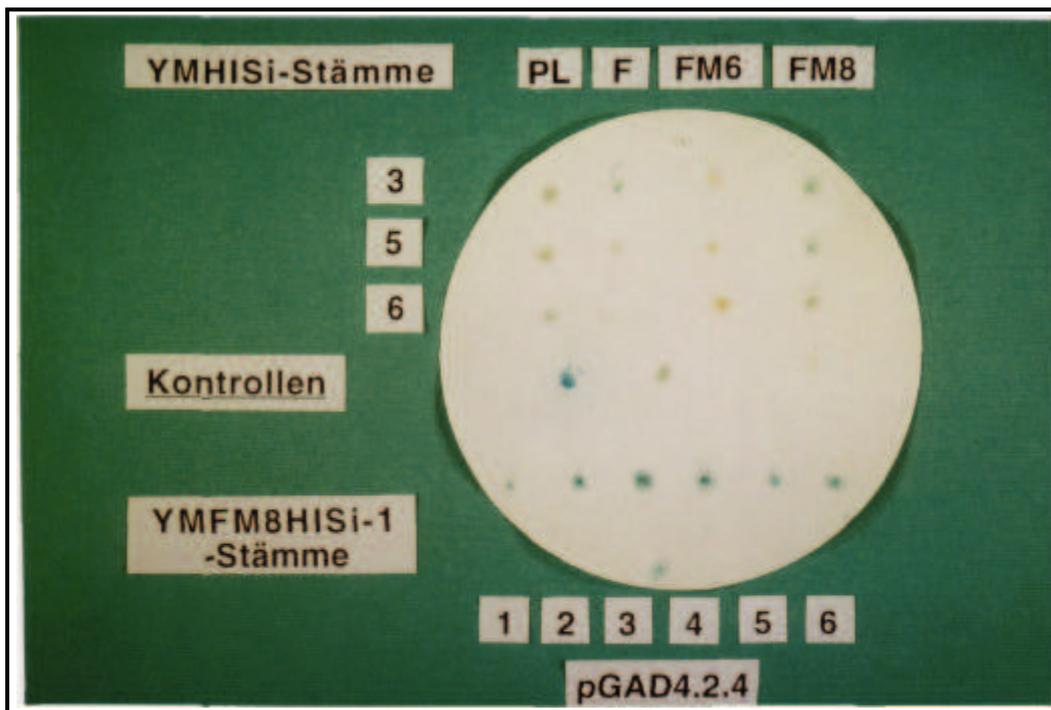


Abb 40: Isolierte Klone 3, 5 und 6 transformiert auf Kontrollstämmen

Plasmide der im Screen isolierten Klone 3, 5 und 6 wurden auf die folgenden Hefereportergermstämmen transformiert und die Transformanten auf ihre Reportergergenaktivitäten untersucht: YMHIS: Polylinkersequenz des Vektors pIC2OH; YMFHIS: intakte I-Box und F-Box; YMF6HIS1: zerstörte I-Box und intakte F-Box und YMF8HIS: intakte I-Box und zerstörte F-Box. Kontrollen von links nach rechts: YMHIS53/pGAD53m, YMHIS53/pGAD424 und YMF8HIS/pGAD424. Der untere Teil des Filters zeigt die Transformanten der Plasmide der Klone 1 bis 6 und des Plasmids pGAD424 mit dem Stamm YMF8HISi-1.

Der Screen reduzierte sich damit auf den Klon 3, da sein Plasmid auch in der Lage war im Hefestamm YMFHIS zu einer Reportergergenaktivierung zu führen. Die cDNA von Klon 3 (homolog zu decoy mRNA aus Arabidopsis) lag, wie bereits erwähnt, nicht in korrekter Fusion zum Leseraster der Aktivierungsdomäne. Translation der gegebenen Sequenz im vorliegenden Raster (und damit im korrekten Leseraster der Aktivierungsdomäne) führte zu einem nur neun Aminosäuren langen putativen DNA-Bindeprotein, welches keine Homologien zu bekannten Proteinen besaß. Ein internes Startsignal im Leseraster der decoy cDNA konnte nicht gefunden werden. Die decoy mRNA aus Arabidopsis selbst ähnelt dem mitochondrialen L30 Vorläufer des 60S ribosomalen Proteins (Zhang und Somerville, 1997).

Insgesamt konnte damit keine cDNA eines Klons mit Homologien zu einem DNA-Bindeprotein gefunden werden. Die isolierten Klone waren auch bezüglich ihrer Fähigkeit, die Reportergene zu aktivieren, nicht überzeugend genug. Erschwerend kommt hinzu, daß keine cDNA in korrekten Leseraster zur Aktivierungsdomäne vorlag, trotzdem aber cDNAs von Cab, NDK und RBCS2 gefunden wurden.

Zusammenfassung

Mit Hilfe des One-Hybrid-Systems wurde versucht, die cDNA eines I-Box-Bindefaktors aus Tomate zu klonieren. Dazu wurde eine cDNA Expressionsbank aus jungen Blättern, bei der es zu einer Proteinfusion zwischen cDNA und der GAL4 Aktivierungsdomäne kommt, verwendet. Als DNA Element für das Screening wurden ein I-Box Tetramer stromaufwärts vor einen Hefeminimalpromotor und ein Reportergen kloniert und in einen Hefestamm eingebracht. Die Transformation des Hefestamms mit der Bank ergab 2.6 Millionen Transformanten, von denen sechs Reportergenaktivitäten zeigten und daher selektiert wurden. Keiner dieser Klone lieferte jedoch die cDNA eines IBFs.

4. DISKUSSION

4.1 Die ballistische transiente Transformation - eine effiziente Methode zur Untersuchung von Promotoraktivitäten in Tomatenorganen

Viele fruchtspezifische Gene aus Tomate, die während der Fruchtreifung aktiv sind, sind bereits kloniert und charakterisiert worden (Review von Gray *et al.*, 1992), aber nur sehr wenige Gene sind verfügbar, die zugleich fruchtspezifisch und aktiv in frühen Stadien der Fruchtentwicklung sind (Narita und Gruissem, 1989, Van-Haaren und Houck, 1991, Wang *et al.*, 1994). Ihre Promotoren wären von größtem Interesse für Strategien, deren Ziel die Veränderung des Fruchstoffwechsels mit Hilfe gentechnischer Methoden ist. Die Analyse von *cis*-Elementen, die an der Aktivität dieser Promotoren beteiligt sind, ist Voraussetzung für die Konstruktion eines optimalen Promotors und stellte bisher eine umfangreiche Aufgabe dar, die die Untersuchung einer großen Anzahl transgener Pflanzen umfaßte (Van-Haaren und Houck, 1991 und 1993). Die Methode der ballistischen transienten Transformation könnte die Suche nach fruchtspezifischen *cis*-Elementen in frühen Entwicklungsstadien und die Analyse fruchtspezifischer Promotoren mit schwachen Aktivitäten wesentlich vereinfachen und erleichtern.

In dieser Arbeit sollte daher ein bereits beschriebenes Protokoll zur ballistischen transienten Transformation von Tomatenorganen verwendet und optimiert werden (Montgomery *et al.*, 1993b). Mit Hilfe eines Luziferase-Reportergenkonstruktes (*luc*) sollte der *RBCS2* Promotor aus Tomate untersucht werden. Während die Transformation nach genanntem Protokoll in Blättern von Tomate zu stabilen hohen LUC-Aktivitäten des *RBCS2-LUC* Konstruktes führte, war die Anwendung in jungen Früchten der Pflanze weniger erfolgreich. Es konnten nur sehr schwache Luziferaseaktivitäten des Reportergens knapp über dem Hintergrund des Systems gemessen werden (Abschnitt 3.1.1, Abb. 8). Dies kann zum einen damit erklärt werden, daß der *RBCS2* Promotor ein gewebespezifisches Expressionsmuster in jungen Tomatenfrüchten besitzt, indem er hauptsächlich in den Zellen des lokularen Gewebes (Abb. 41) aktiv ist (Meier *et al.*, 1995). Diese Gewebespezifität reduziert

drastisch die Anzahl der Zellen, die nach der Transformation zur hohen Reporterogenaktivität beitragen könnten.

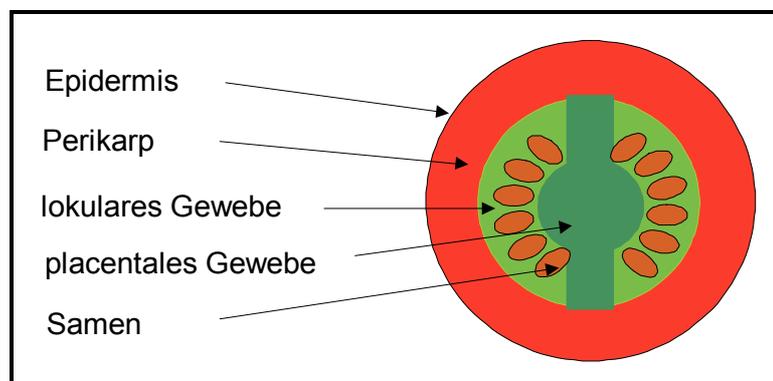


Abb. 41: Schematischer Querschnitt durch eine Tomatenfrucht

Der Querschnitt zeigt in rot das Perikarp unterhalb der Epidermis der Frucht. Unter dem Perikarp befindet sich das lokulare Gewebe (in hellgrün), in das der Samen (braun) verbunden mit dem placentalen Gewebe (dunkelgrün) eingebettet ist.

Hinzu kommt, daß der *RBCS2* Promotor kein sonderlich starker Promotor in jungen Früchten ist. Basierend auf Daten aus Run-on Transcription Assays liegt seine Aktivität in diesem Organ nur bei 10-15 % seiner Aktivität in Blättern (Wanner und Gruissem, 1991).

Die ballistische transiente und stabile Transformation von Maisembryonen Suspensionskulturen konnte durch osmotische Behandlung um ein 3- bis 7-faches verbessert werden (Vain *et al.*, 1993). Der Effekt wurde der partiellen Plasmolyse der Zellen durch die osmotische Behandlung zugeschrieben, die zu einer eingeschränkten Beschädigung der Zellen beim Partikeltransfer während des Bombardments führen könnte (Hunold *et al.*, 1994, Vain *et al.*, 1993). Das Verfahren der osmotischen Behandlung konnte mit Erfolg auch bei der ballistischen Transformation von Tomatenfrüchten angewendet werden. Die Kombination von Behandlung der Fruchtscheiben vor und während des Bombardments mit einer osmotischen Lösung resultierte in einem 70-fachen Anstieg der *RBCS2* Promotor vermittelten Luziferaseaktivität (Abschnitt 3.1.1, Abb. 8). In Analogie zu den Ergebnissen der kultivierten Maiszellen (Vain *et al.*, 1993) könnte auch hier die Anwendung der osmotischen Lösung das Aufweichen der Zellen an der

Schnittoberfläche der Fruchtscheibe bewirkt haben, so daß nur wenige der durch Goldpartikel getroffenen Zellen beim Beschuß platzten und ausliefen.

Schließlich konnte durch die Kombination von osmotischer Behandlung und verbesserten Bombardmentbedingungen eine *RBCS2* Promotor vermittelte Luziferaseaktivität 500-fach über der Hintergrundaktivität erreicht werden. Selbst die Transformation von Scheiben späterer Fruchtstadien war möglich, so daß Untersuchungen zur *RBCS2* Promotoraktivität auch während der Fruchtentwicklung durchgeführt werden konnten. Als problematisch erwies sich hier allerdings zunächst die Beeinflussung der Aktivität des zweiten Reporterenzym, β -Glucuronidase (GUS), vermutlich durch die Veränderung der Zusammensetzung der Extraktinhaltsstoffe während der Fruchtentwicklung. Dadurch lagen die gemessenen Enzymaktivitäten in Extrakten späterer Fruchtstadien höher als im Extrakt der ganz jungen Früchte (Abschnitt 3.2.3, Abb. 15). Endogene β -Glucuronidaseaktivitäten, wie sie bereits in Tomatenfrüchten berichtet worden sind (Hu *et al.*, 1990), konnten als Ursache nicht festgestellt werden. Auch eine Eigenfluoreszenz des Fruchtmaterials konnte nicht beobachtet werden. Die lineare Kinetik der gemessenen Aktivitäten wies eher auf einen Effekt hin, der die exogene Enzymaktivität selber betraf, z. B. eine Inhibition der Aktivität der β -Glucuronidase durch Inhaltsstoffe des Extraktes aus jungen Früchten oder eine Aktivierung in Extrakten späterer Stadien. So kann zum Beispiel durch die Präsenz von thiolischen Reduktionsmitteln die Aktivität des Enzyms gesteigert werden (Jefferson, 1987). Ein weiterer Faktor könnten hohe Proteinkonzentrationen sein, die gerade in Extrakten früherer Fruchtstadien vorkommen und zu Dämpfungseffekten führen können (Bronstein *et al.*, 1994). Es lag der Schluß nahe, daß durch Substitution des „aktivierenden“ Extraktes zu einem verringerten Volumen des „inhibierenden“ Extraktes die Enzymaktivitäten wieder angeglichen werden könnten („optimierter GUS-Assay“, 2.2.12.4). Dies war in der Tat der Fall, so daß die GUS-Aktivitäten der verschiedenen Fruchtextrakte durch die Optimierung des GUS-Assays angeglichen werden konnten. Die genaue Ursache der Inhibition oder Aktivierung wurde nicht weiter untersucht.

4.2 Der *RBCS2* Promotor besitzt zwei dominante *cis*-Elemente

In transgenen Pflanzen war ein 687 kb langes Fragment des *RBCS2* Promotors in der Lage, das differentielle Expressionsmuster des *RBCS2*-Gens (in Fusion mit einem β -Glucuronidase-Reportergen) zu vermitteln (Meier *et al.*, 1995). Mit Hilfe der ballistischen transienten Transformation wurde dieses Fragment nun in Blättern und Früchten von Tomate untersucht. Eine 5'-Deletionsanalyse des *RBCS2*-Promotor-Fragmentes (fusioniert an ein Luziferase-Reportergen, *luc*) zeigte, daß sowohl in Blättern als auch in jungen Früchten von Tomate nur ein 37 Basenpaare großer Bereich für eine hohe Promotoraktivität notwendig war. Die Deletion dieses Bereiches führte in beiden Organen zu einem drastischen Abfall der LUC vermittelten Promotoraktivität auf ungefähr 15 % (Abb. 10, Abschnitt 3.1.2). Innerhalb des Bereiches befanden sich ein I-Box und ein G-Box Element (Abb. 42).

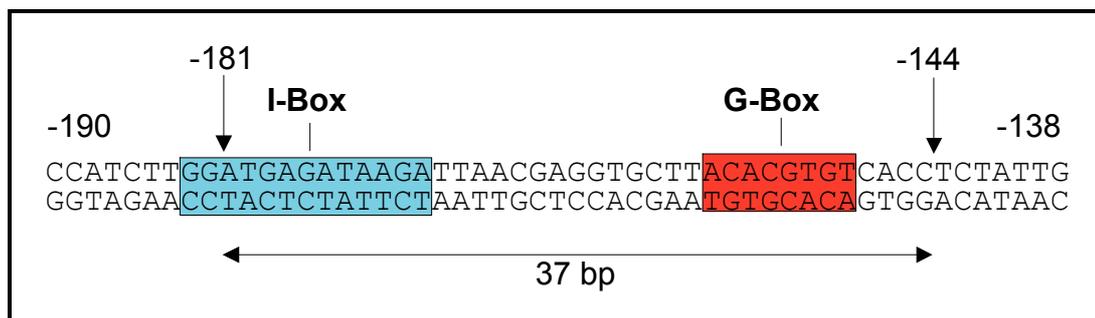


Abb. 42: I-Box und G-Box auf dem *RBCS2* Promotor

I-Box und G-Box liegen, durch nur wenige Basenpaare getrennt, innerhalb eines kleinen *RBCS2* Promotorbereiches. Deletion der Basenpaare von Position -181 auf Position -144 (durch vertikale Pfeile gezeigt) führte zu einem drastischen Abfall der Promotoraktivität.

Beide Elemente sind hoch konserviert unter den *RBCS* Promotoren verschiedener Spezies (Manzara und Grissem, 1988). Während die G-Box bereits gut charakterisiert ist, liegen noch nicht sehr viele Daten über die I-Box vor. Die G-Box kommt als *cis*-Element in vielen durch verschiedene Umwelteinflüsse induzierbaren Promotoren vor (de Vetten und Ferl, 1994), die I-Box wird in den Promotoren von

pflanzlichen Genen gefunden, deren Transkription durch Licht und die circadiane Uhr reguliert wird (Borello *et al.*, 1993).

Zur Charakterisierung der Funktion beider Boxen im Gesamtzusammenhang des *RBCS2* Promotors, wurde die Aktivität des Wildtyppromotors mit der Aktivität von mutierten *RBCS2* Promotoren verglichen, bei denen G-Box, I-Box oder beide Boxen durch Blockmutationen verändert worden waren. Dabei zeigten G- und I-Box je nach Organ (Blatt oder junge Früchte) Unterschiede in ihrer Funktion: während in Blättern G-Box und I-Box gemeinsam für über 80% der Aktivität des *RBCS2* Promotors verantwortlich waren, war in jungen Früchten allein die G-Box ursächlich für hohe Promotoraktivität (Abb. 11, Abschnitt 3.1.3). Damit kann die Hauptaktivität des *RBCS2* Promotors auf das Wirken von nur zwei Boxen (Blätter) bzw. nur einer Box (Früchte) zurückgeführt werden, so daß der Promotor insgesamt gesehen eine sehr einfache Architektur besitzt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Mutationsanalyse der Boxen I und G können Aktivitätsunterschiede des Deletionskonstruktes -181 (Abb. 10, Abschnitt 3.1.2) in Blättern und Früchten der Tomate erklärt werden: das Konstrukt -200 vermittelte in beiden Organen der Pflanze noch eine Promotoraktivität von ungefähr 80 %. Die Deletion der nächsten Basenpaare bis zur Position -181 führte in Früchten zu keinem Abfall der Aktivität, in Blättern dagegen sank die Aktivität um noch weitere 20 % ab. In Abbildung 42 ist erkennbar, daß im Konstrukt -181 zwei Basenpaare der I-Box fehlen. Die Deletion dieser anscheinend funktionellen Basenpaare der I-Box hat in Blättern eine Reduktion der Promotoraktivität zu Folge, da in diesem Organ die I-Box (zusammen mit der G-Box) *cis*-agierend wirkt. In jungen Früchten übt die I-Box dagegen keine *cis*-Funktion aus, in der Konsequenz besitzen die Konstrukte -200 und -181 dieselbe Promotoraktivität.

4.2.1 Die Rolle der I-Box

Faktoren, die an die I-Box oder ein verwandtes Motiv der lichtregulierten *CAB* Gene, die sogenannte GATA-Box, binden, sind in einer Reihe von Kernproteinextrakten verschiedener Spezies gefunden worden. So wurden in Kernproteinextrakten aus Blättern und Kotyledonen in Tabak und Tomate I-Box-Bindefaktoren (IBFs)

identifiziert (Giuliano *et al.*, 1988b, Manzara *et al.*, 1991, Schindler und Cashmore, 1990). Es wurde daher auf eine Funktion der I-Box bei der lichtregulierten und/oder blattspezifischen Expression photosynthetischer Gene geschlossen (Manzara *et al.*, 1991). Der Nachweis der I-Box als *cis*-Element im Promotorkontext wurde bisher erst einmal berichtet (Donald und Cashmore, 1990). Damit konnte in dieser Arbeit zum zweiten Mal gezeigt werden, daß die I-Box eine *cis*-agierende Wirkung hat.

Die organspezifische Aktion der I-Box in Blättern korreliert mit den Daten aus DNase-Schutzexperimenten: Nur in Kernproteinextrakten von Blättern und Kotyledonen aus Tomate wurde der I-Box Bereich des *RBCS2* Promotors durch Proteinbindung vor dem Verdau durch DNase I geschützt (Abb. 4, Abschnitt 1.2.3.2). In Früchten dagegen, in denen die I-Box nicht *cis*-agierend wirkt, konnte keine Proteinbindung gezeigt werden (Manzara *et al.*, 1991). Trotzdem werden in jungen Früchten von Tomate die Gene, die in die Photosynthese involviert sind, exprimiert (Piechulla *et al.*, 1987). I-Box Bindeaktoren könnten damit für eine Art der transkriptionellen Regulation notwendig sein, die auf *RBCS* und vermutlich auch andere photosynthetische Gene nur in Keimlingen und Blättern wirkt, nicht aber in Früchten. Dies könnte zum Beispiel die Beteiligung von IBFs an der Regulation von Genaktivitäten in circadianen Rhythmen sein. So fluktuieren die *RBCS* mRNA Levels in Blättern von Tomate im diurnalen Zyklus (Sugita und Gruissem, 1987) und in Keimlingen oszilliert die transkriptionelle Aktivität von *RBCS* unter diurnalen und circadianen Bedingungen (Giuliano *et al.*, 1988a). In jungen Früchten von Tomate hingegen konnte kein Abfall des *RBCS* mRNA Levels während der Nacht eines diurnalen Zykluses gefunden werden (Piechulla und Gruissem, 1987). Die damit zumindest diurnale Kontrolle der *RBCS* Gene in Keimlingen und Blättern, nicht aber in jungen Früchten, korreliert also mit dem Vorhandensein von I-Box Bindeaktivitäten. Interessanterweise konnte von einem I-Box Bindefaktor in Blattkernproteinextrakt aus Tomate gezeigt werden, daß er selber unter diurnaler Kontrolle steht (Borello *et al.*, 1993). Die Unabhängigkeit des *RBCS2* Promotors von der I-Box und von einer diurnalen Kontrolle in jungen Früchten von Tomate deutet auf die mögliche Beteiligung der I-Box an der diurnalen und vermutlich auch circadianen Kontrolle lichtregulierter Gene hin.

4.2.2 Die Rolle der G-Box

Für die G-Box sind *cis*-regulatorische Funktionen aus einigen Promotoren anderer Pflanzen, Tiere sowie Pilze bereits beschrieben (Waldmüller und Link, 1995). Überraschend im Fall des *RBCS2* Promotors aus Tomate ist jedoch die dominante Wirkung der G-Box über einen Großteil der Aktivität des Promotors in jungen Früchten der Tomate. In den meisten beschriebenen Fällen wird die G-Box auf dem Promotor von einem zweiten *cis*-Element in naher Nachbarschaft flankiert, das ebenfalls zur Promotoraktivität beiträgt (de Vetten und Ferl, 1994). Dies würde der Situation in Blättern, in denen die I-Box ebenfalls als *cis*-Element fungiert, nicht aber derjenigen in jungen Früchten der Tomate entsprechen. Korrelierend mit der *cis*-Funktion der G-Box in beiden Organen, kommen G-Box Bindefaktoren (GBFs) sowohl in Kernproteinextrakten von Blättern als auch von jungen Früchten vor (Abb. 4, Abschnitt 1.2.3.2) (Manzara *et al.*, 1991). Auch in Kernproteinextrakten von reifen Früchten können GBFs nachgewiesen werden. Damit eröffnet sich die interessante Frage, wie während der Fruchtentwicklung die *RBCS* Gene inaktiviert werden, da sie in reifen Früchten nicht mehr exprimiert werden (Wanner und Gruissem, 1991). Das Fehlen von GBFs kommt als Ursache nicht in Frage.

Bei der Untersuchung verschiedener Deletionskonstrukte und Mutanten des *RBCS2* Promotors im ballistischen transienten Assay in verschiedenen Fruchtstadien (Abschnitt 3.2.4) stellte sich heraus, daß die Aktivität des *RBCS2* Promotors in zwei unterschiedliche Aktivitäten aufgeteilt werden konnte: zum einen in eine konstant bleibende Aktivität von ungefähr 20 % bezüglich der anfänglichen *RBCS2* Promotoraktivität in jungen Früchten und zum anderen in eine anfangs sehr hohe Aktivität von 80 %, die während der Fruchtentwicklung drastisch abfiel und den beobachteten Gesamtabfall der Aktivität ausmachte. Interessanterweise erwies sich der konstante Anteil der *RBCS2* Promotoraktivität als unabhängig von der G-Box, der abfallende Anteil hing dagegen von der G-Box ab (Abb. 43).

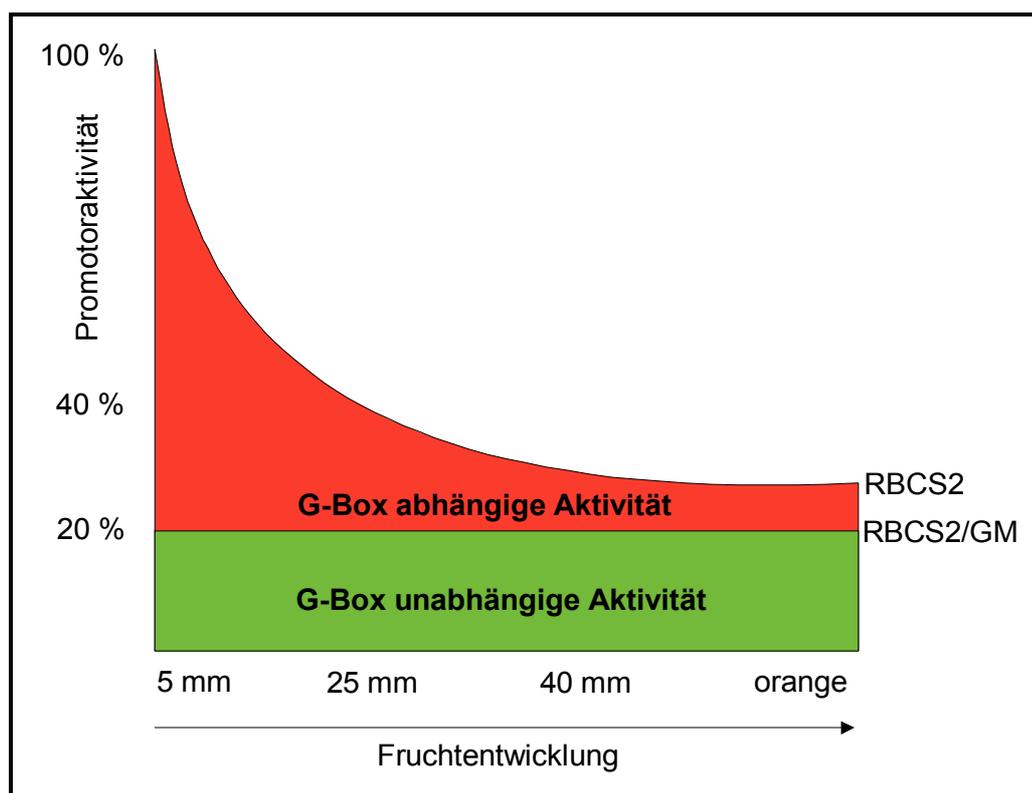


Abb. 43: G-Box abhängige und G-Box unabhängige *RBCS2* Promotoraktivität

Die Grafik zeigt schematisch vereinfacht die Einteilung der *RBCS2* Promotoraktivität in einen G-Box abhängigen Anteil (rot dargestellt) und einen G-Box unabhängigen Anteil (grün). Im Anfangsstadium „5 mm“ beträgt die Summe beider Aktivitäten 100 % und fällt im Verlauf der Fruchtentwicklung zum Stadium „orange“ auf ungefähr 30 % ab (Kurve *RBCS2*). Der G-Box unabhängige Anteil (begrenzt durch *RBCS2/GM*; GM = mutierte G-Box) beläuft sich konstant auf 20 %.

Die konstante Grundaktivität des *RBCS2* Promotors wurde auch durch ein sehr kurzes Deletionskonstrukt (-40) gewährleistet (Abb. 18, Abschnitt 3.2.4). Dieses Promotorfragment enthielt als einzigen konservierten Bereich die TATA-Box. Daher liegt der Schluß nahe, daß dieses Element für die gleichmäßige Grundaktivität des Promotors verantwortlich sein könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Untersuchung, in der die TATA-Box ebenfalls auf einem sehr kurzen Promotorfragment in der Lage war, die basale Transkription eines Reportergens zu initiieren (Zhu *et al.*, 1995).

4.3 Regulation der G-Box abhängigen RBCS2 Promotoraktivität während der Fruchtentwicklung

Da die G-Box durch GBFs sowohl in jungen als auch in reifen Früchten geschützt wird, muß es einen Mechanismus geben, der über die GBFs die G-Box abhängige RBCS2 Promotoraktivität während der Fruchtentwicklung reduziert. Damit verschiebt sich der Blickwinkel vom *cis*-Element (G-Box) hin zum *trans*-Faktor (GBF). Wie greifen diese Faktoren in das Geschehen während der Fruchtentwicklung ein? Werden sie selber reguliert, interagieren sie noch mit anderen Faktoren und sind sie überhaupt in der Lage, den Promotor zu aktivieren?

4.3.1 Wirken GBFs aus Tomate als Transkriptionsaktivatoren?

Aus jungen Früchten von Tomate sind bisher drei GBFs kloniert worden: GBF4, GBF9 und GBF12 (Meier und Gruissem, 1994). Ihre DNA- und Proteinsequenzen sind im Anhang wiedergegeben. Wie klonierte GBFs anderer Spezies besitzen sie eine basische DNA-Bindedomäne und einen Leucin-Zipper für Protein-Protein-Interaktionen. Von besonderem Interesse ist eine prolinreiche Domäne am N-Terminus von GBF4 und GBF9 aus Tomate: Diese Domäne kommt auch in anderen GBFs verschiedener Spezies vor und besitzt nachweislich transkriptionsaktivierende Eigenschaften (Schindler *et al.*, 1992b). Aufgrund der genannten Strukturdaten ist vermutet worden, daß GBFs als Transkriptionsaktivatoren wirken (DeLisle und Ferl, 1990). Im Fall von GBF4, GBF9 und GBF12 aus Tomate kann noch ein weiteres Element angeführt werden, das daraufhin deutet, daß diese GBFs transkriptionsaktivierende Eigenschaften besitzen: Innerhalb der Region zwischen N-terminaler prolinreicher Domäne und C-terminalem basischen Leucin-Zipper konnten durch Sequenzvergleiche verschiedener GBFs unterschiedlicher Spezies konservierte Bereiche von 7 bis 35 Aminosäuren gefunden werden (Meier und Gruissem, 1994, siehe auch Abb. 5 in Abschnitt 1.3.3.2). Das Motiv GCB („GBF-conserved box“) mit der Sequenz NLNIGMDXW kommt neben anderen bZIP Proteinen auf GBF4, GBF9 und GBF12 aus Tomate vor (Abb. 44). Die Sequenz war in der Lage, die Expression

eines Reportergens zu aktivieren, wenn es an eine GAL4 Bindedomäne fusioniert wurde (Okanami *et al.*, 1996).

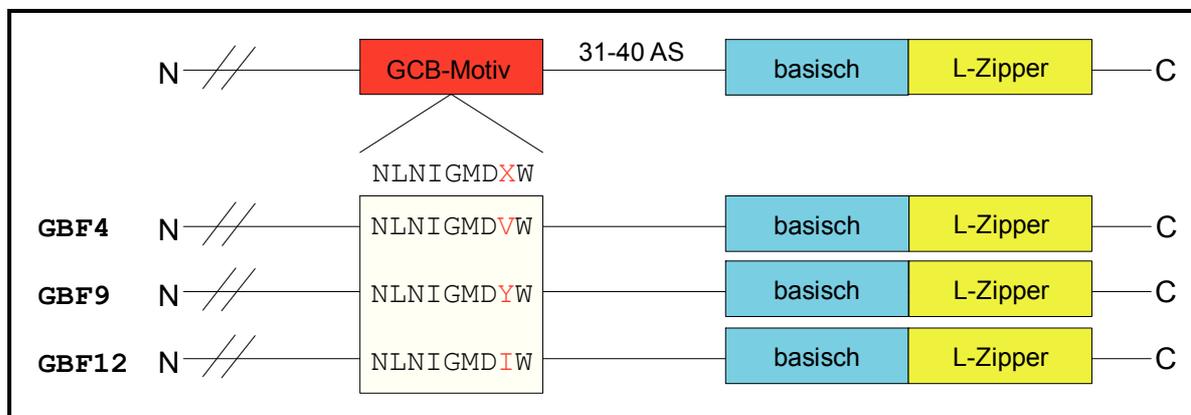


Abb. 44: GCB-Motiv in GBF4, GBF9 und GBF12 aus Tomate

Das GCB-Motiv (GBF-conserved box) liegt 31-40 Aminosäuren entfernt von der basischen Leucin-Zipper Domäne der GBFs. Es besteht aus acht konservierten und einer variablen Aminosäure (variable rot dargestellt).

Es liegt der Schluß nahe, daß die GBFs aus Tomate aufgrund der angeführten Domänen als Transkriptionsaktivatoren wirken und der Schlüssel für die Regulation der G-Box abhängigen *RBCS2* Promotoraktivität sind. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß in Gelretardierungsexperimenten mit Gesamtproteinextrakt und Kernproteinextrakt aus vier verschiedenen Fruchtstadien übereinstimmend zwei verschobene Banden nachgewiesen wurden, die auf einer spezifischen Protein-G-Box-Wechselwirkung beruhten (Abschnitt 3.3.1). Auffälligerweise nahm die Signalstärke dieser Banden im Verlauf der Fruchtentwicklung ab, ganz entsprechend dem Abfall der *RBCS2* Promotoraktivität. Besonders drastisch änderten sich die Signalstärken zwischen den ersten beiden Fruchtstadien „5 mm“ und „25 mm“. Dies korreliert auch mit dem starken Abfall der *RBCS2* Promotoraktivität gerade zwischen diesen beiden Stadien von 100 % auf 40 % (Abb. 44). Ursache beider Phänomene könnte eine Abnahme der G-Box Bindefaktoren (GBFs) während der Fruchtentwicklung sein. DNase-Schutzexperimente zeigten auch in reifen Früchten eine G-Box Bindung von Protein (Manzara *et al.*, 1991). Es ist jedoch offen, ob in Extrakten

junger und reifer Früchte gleich viel GBFs vorhanden sind. Da GBFs vermutlich als Transkriptionsaktivatoren wirken, würde eine Abnahme der Faktoren eine einfache Erklärung für den Verlust der G-Box abhängigen *RBCS2* Promotoraktivität anbieten.

4.3.2 Das Expressionsmuster der GBFs aus Tomate

GBF4, GBF9 und GBF12 aus Tomate werden in jungen Früchten und in reifen Samen stärker als in Wurzeln und Blättern von Tomate transkribiert. Dabei wurde die schwächste Expression von mRNA in Blättern gefunden (Meier und Grissem, 1994). Trotzdem wird die G-Box der Promotoren *RBCS1*, *RBCS2* und *RBCS3A* von Kernproteinextrakten aus Blättern und aus jungen Früchten gleichermaßen in DNase-Schutzexperimenten geschützt (Manzara *et al.*, 1993). Zusätzlich wird in Gelretardierungsexperimenten mit Kernproteinextrakt aus Blättern ein größerer Komplex als mit Kernproteinextrakt aus Früchten beobachtet (Meier und Grissem, 1994). Daraus wurde geschlossen, daß es noch nicht identifizierte GBFs in Blättern gibt. Auch die Komplexe von Gesamtfuchtextrakt sind größer als die von Kernproteinextrakt. Allerdings könnte das Auftreten der verschiedenen Komplexgrößen zwischen Blatt- und Fruchtextrakt, Gesamtfucht- und Kernproteinextrakt in Früchten auch auf eine Wechselwirkung mit einem weiteren Faktor, der zwar nicht an die G-Box, aber an die GBFs bindet, zurückzuführen sein. Solche Faktoren sind bereits in der Literatur beschrieben worden (Lu *et al.*, 1992).

Da unklar war, ob und wie viele GBFs neben GBF4, GBF9 und GBF12 noch in Fruchtextrakt existierten, wurde die Expression der GBFs während der Fruchtentwicklung auf Proteinebene mit einem Antikörper bestimmt, der einen großen Pool an GBFs erkannte, anti-GBF1. Anti-GBF1 wurde ursprünglich in Versuchen mit GBF1 aus *Arabidopsis* gewonnen, erkennt aber auch GBF2 und GBF3 aus *Arabidopsis* (Terzaghi *et al.*, 1997). Ebenso war er in der Lage GBF4, GBF9 und GBF12 aus Tomate zu detektieren (Abschnitt 3.3.2.2). In Supershiftexperimenten wurden durch Zugabe von anti-GBF1 zu Fruchtkernproteinextrakt beide GBF-Komplexe in ihrer Gesamtheit erkannt (Abschnitt 3.3.2.3). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß in Westernexperimenten mit anti-GBF1 ein möglichst vollständiges Bild der GBF-Expression erhalten werden konnte.

Diese Experimente zeigten sowohl mit Kernproteinextrakt als auch mit Gesamfruchtextrakt der verschiedenen Fruchtstadien eine konstantbleibende GBF-Expression während der Fruchtentwicklung (Abschnitt 3.3.2.2, Abb. 27). In beiden Extraktarten wurde übereinstimmend nur ein Signal bei 60 kDa detektiert, dessen Größe gut mit der aus den Transkriptgrößen von GBF4, GBF9 und GBF12 abgeleiteten von 50-66 kDa übereinstimmte. Auch die Expression von GBF4, GBF9 und GBF12 auf RNA-Ebene blieb entsprechend konstant während der Fruchtentwicklung (Abschnitt 3.3.2.1, Abb. 25). Eine Abnahme der GBF-Menge im Verlauf der Fruchtentwicklung kam damit nicht als Ursache des Abfalls der *RBCS2* Promotoraktivität in Frage. Warum nahmen dann aber in den Gelretardierungsexperimenten mit gleichen Mengen Proteinextrakt die GBF-Aktivitäten korrelierend mit der *RBCS2* Promotoraktivität während der Fruchtentwicklung ab? Es mußte einen Mechanismus geben, der die DNA-Bindeaktivität der vorhandenen GBFs während der Fruchtentwicklung veränderte.

4.3.3 Wie werden die GBFs während der Fruchtentwicklung desaktiviert?

In Gelretardierungsexperimenten zeigten GBF4, GBF9 und GBF12, die in *E. coli* exprimiert worden waren, drei bis sechs verschiedene Komplexe (Abb. 31, Abschnitt 3.3.3.1). Auch durch Mischen der drei in *E. coli* exprimierten GBFs konnte das Bandenmuster nicht auf zwei Komplexe reduziert werden, die in Experimenten mit pflanzlichen GBFs beobachtet wurden. Zwar stellen die GBFs aus *E. coli* nur 60 bis 67 % des vollständigen Proteins dar, da die zugrunde liegenden cDNA-Klone unvollständig waren, sie enthalten aber alle den für die gegenseitige Interaktion notwendigen Leucin-Zipper. Unterschiedliche Komplexbildungen von in *E. coli* exprimierten GBFs und GBFs aus Kernproteinextrakt sind bereits beschrieben worden (Hong *et al.*, 1995). Ob als Ursache der vielen Komplexe auch unterschiedlich große Translationsprodukte in Frage kommen, ist noch nicht nachgewiesen worden. Spezifische Antikörper konnten zumindest neben einem Hauptprodukt von GBF9 und GBF12 noch ein weiteres, kleineres Produkt detektieren (Abb. 26, Abschnitt 3.3.1). Dies war jedoch nicht für GBF4 der Fall, das aber auch sechs Komplexe bildet.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit in *E. coli* exprimierten GBFs erhalten worden waren, wurden in allen Gelretardierungsexperimenten mit pflanzlichem Proteinextrakt nur zwei spezifische Komplexe erhalten. Die Größe der nachgewiesenen GBFs in Proteinextrakten aus Tomatenfrüchten lag einheitlich bei 60 kDa, unterschiedliche große Komplexe können also hier nur durch Modifikation der GBFs oder durch einen weiteren Faktor zustande kommen.

4.3.3.1 Modifikation von GBFs

Phosphorylierungen sind im Zusammenhang mit GBFs bereits beschrieben worden, so wird z. B. die DNA-Bindeaktivität von GBF1 aus *Arabidopsis* durch Phosphorylierung erhöht und der GBF-G-Box-Komplex im Gel verlangsamt (Klimczak *et al.*, 1992). Phosphorylierung zur Regulation von Transkription von Genen ist ein gut untersuchter Mechanismus (Hunter und Karin, 1992) und es wäre durchaus denkbar, daß dieser Mechanismus auch der Schlüssel zur Regulation von *RBCS2* während der Fruchtentwicklung ist. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß die DNA-Bindeaktivität von phosphoryliertem GBF12 durch Behandlung mit Phosphatase auf ein Minimum reduziert wird (Abschnitt 3.3.3.1, Abb. 32 B).

Zwar zeigten unbehandelter und phosphorylierter GBF12-Extrakt aus *E. coli* keinen Unterschied ihrer DNA-Bindestärke in Konkurrenzexperimenten, der Grund hierfür könnte aber in einem eventuell schon vorhandenen Anteil phosphorylierter GBFs durch *E. coli* liegen. So verlor in *E. coli* exprimiertes GBF12 durch Behandlung mit Phosphatase an Bindestärke (und war demnach dephosphorylierbar). Eine Phosphorylierung der exprimierten GBFs durch eine noch nicht identifizierte prokaryotische Proteinkinase in *E. coli* ist nach neueren Erkenntnissen nicht auszuschließen (Langelier *et al.*, 1998). Durch Phosphorylierung ließen sich die drei Komplexe von GBF12 in die oberste Komplexbande überführen (Abb. 32 A, Abschnitt 3.3.3.1). Die drei unterschiedlichen Komplexe von GBF12 aus *E. coli* könnten demnach auf der Bildung unterschiedlich stark phosphorylierter GBF-Dimere beruhen.

Der Nachweis von GBF9 aus Kernproteinextrakt in beiden Komplexbanden in Supershiftexperimenten zeigt, daß GBF9 in zwei zu unterscheidenden Komplexen vorliegen muß. Auch hier könnte das Unterscheidungsmerkmal auf einer

Phosphorylierung von GBF9 beruhen. Zusammen mit der nachweisbaren Abnahme der DNA-Bindestärke von GBF12 durch Dephosphorylierung könnte die Abnahme der DNA-Bindeaktivität der GBFs während der Fruchtentwicklung also auf eine zunehmende Dephosphorylierung der GBFs zurückzuführen sein. Dephosphorylierung von Kernproteinextrakt des Stadiums „5 mm“ (Abschnitt 3.3.3.3, Abb. 35) führte in der Tat im Experiment zu einer Abschwächung der vorhandenen Signale. Die Dephosphorylierung von Kernextrakt der späteren Stadien lieferte im Experiment dagegen nicht wie im „5 mm“-Extrakt eine Abschwächung der Signale S1 und S2. Nur im Fall des unteren Signals konnte eine Abschwächung beobachtet werden, die obere Bande S2 verstärkte sich dagegen leicht, allerdings wurden im Vergleich zum „5 mm“ Extrakt die 2.5-fache Menge Protein eingesetzt (Abschnitt 3.3.3.3, Abb. 35). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache liegen die GBFs des „5 mm“-Extraktes phosphorylierter als diejenigen der späteren Stadien vor. Bei der leichten Verstärkung der Bande S2 ist eventuell ist noch eine weitere Komponente im Modell der Fruchtentwicklungsregulation zu berücksichtigen - ein zusätzlicher Faktor im Fruchtextrakt, der mit GBF interagieren kann, seine Bindeaktivität beeinflusst und der erst in späteren Stadien der Fruchtentwicklung zum Tragen kommt. Solche Faktoren, GF14 (G-Box Factor 14-3-3 homolog), sind bereits in Fruchtexttrakten der Tomate gefunden worden und werden im nächsten Kapitel besprochen. In diesem Kapitel wurde diskutiert, daß die Phosphorylierung der GBFs vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Komplexbildung und bei der Regulation der DNA-Bindeaktivität der GBFs während der Fruchtentwicklung spielt. Dabei ist zunächst bewußt nicht berücksichtigt worden, daß die Phosphorylierung von Kernproteinextrakten der verschiedenen Stadien im Experiment keinen Effekt ergeben hatte (Abschnitt 3.3.3.2, Abb. 34). Wenn der Phosphorylierungsgrad während der Fruchtentwicklung abnähme, hätten die Extrakte der späteren Stadien durch Phosphorylierung veränderbar sein sollen. Dies war nicht der Fall. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß in den Extrakten Phosphataseaktivitäten vorhanden sind, die zur Dephosphorylierung der Extrakte während der Fruchtentwicklung führen konnten. Daher wäre es möglich, daß diese Aktivitäten die der zugegebenen Kinase im Experiment ausgeglichen haben, so daß im Endeffekt keine Veränderung zu beobachten war. Eine Wiederholung des Versuchs mit Phosphatase-Inhibitoren könnte hierüber Aufschluß geben.

4.3.3.2 Die Rolle von GF14, einem weiteren Protein des Fruchtextraktes

Die GF14-Proteine wurden zuerst in Arabidopsis entdeckt, als Teil eines G-Box Komplexes (Lu *et al.*, 1992). Mittlerweile sind zahlreiche Proteine aus Pflanzen bekannt, die zu dieser Proteinfamilie gehören (Wu *et al.*, 1997), auch aus Tomate sind zwei kloniert worden (Laughner *et al.*, 1994). Die GF14-Proteine weisen hohe Homologien auf Aminosäureebene zu der Familie der 14-3-3 Proteine von Säugern auf, daher auch der Name GF14 („G-Box Factor 14-3-3 homolog“). 14-3-3 Proteine sind Regulatorproteine des Gehirns von Säugern, sie aktivieren Tyrosin- und Tryptophanhydroxylasen und inhibieren Protein Kinase C (de Vetten *et al.*, 1992). 14-3-3 Isoformen aus Arabidopsis konnten ebenfalls diese Funktionen ausüben (Wu *et al.*, 1997). Neuerdings wird auch vermutet, daß pflanzliche GF14s in die Regulation der Aktivität der H(+)-ATPase der Plasmamembran beteiligt sind (Jahn *et al.*, 1997).

GF14s können selber nicht an DNA binden, da ihnen eine basische DNA-Bindedomäne fehlt. Sie verfügen aber über eine Region, die einem Leucin-Zipper ähnelt und sie zu Protein-Protein-Interaktionen befähigt (Lu *et al.*, 1994). Außerdem besitzen sie saure Domänen ähnlich der Domänen verschiedener Transkriptionsfaktoren wie GAL4 und FOS (Lu *et al.*, 1992). Die exakte Funktion der GF14s ist noch nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, daß sie Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, die an kinase-regulierten Aktionen von Signalwegen und Enzymfunktionen beteiligt sind (Schultz *et al.*, 1998).

Die Transkripte der bekannten GF14s aus Tomate, LeGF14T3 und LeGF14T4 (Lycopersicon esculentum G-box Factor 14-3-3 homolog), werden stark in Früchten exprimiert, nicht aber in Blättern. Während der Fruchtentwicklung akkumuliert die mRNA von LeGF14T4. Dies ist auch der Fall bei LeGF14T3, allerdings fällt in roten Früchten hier die Menge wieder ab. Auf Proteinebene können verschiedene Isoformen mit einem Antikörper gegen GF14 detektiert werden (Größe 30 kDa), deren Mengen während der Fruchtentwicklung variieren (Laughner *et al.*, 1995). Aufgrund des unterschiedlichen Expressionsmusters und dem Potential für die regulatorischen Aktivitäten von Kinasen ist vorgeschlagen worden, daß die GF14s in Tomate zusammen mit Pflanzenhormonen in die regulatorische Kontrolle der Fruchtentwicklung involviert sind (Laughner *et al.*, 1995). Die Assoziation von GF14

mit GBF-Komplexen in Fruchtextrakten könnte die Beobachtung von unterschiedlichen Komplexen in Frucht- und Blattextrakten in Gelretardierungsexperimenten erklären, da in Blattextrakten zumindest LeGF14T3 und LeGF14T4 nicht vorkommen. Ebenso könnten die GF14s die Ursache der Zunahme der Signalstärken bei Dephosphorylierung von Kernproteinextrakten der späteren Fruchtstadien sein: eventuell haben bestimmte Isoformen der GF14s eine besondere Affinität zu unphosphorylierten GBFs (da GF14 ja Kinaseaktivitäten vermitteln) und bilden mit diesen GBFs Komplexe. Ein weiteres Argument, daß für GF14 im Komplex spricht, ist die Beobachtung, daß bei Verwendung von gleichen Mengen Proteinextrakt die obere Komplexbande sich während der Fruchtentwicklung im Gel verlangsamt und nach oben verschiebt (Abschnitt 3.3.1). Der Grund könnte die Zunahme eines GF14-Faktors sein, der mit den GBFs assoziiert ist.

Es wäre sehr interessant, in Supershiftexperimenten mit einem GF14-Antikörper zu überprüfen, ob die postulierte Interaktion zwischen GBF und dem Faktor GF14 tatsächlich wie vorhergesagt stattfindet. Auch wäre es lohnenswert, mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems Wechselwirkungen zwischen spezifischen GBFs (z. B. GBF4, GBF9 oder GBF12) und den bekannten GF14s aus Tomate zu testen. Ebenso könnte die Klonierung neuer interagierender Partner mit dem Two-Hybrid-System erfolgen, wobei allerdings auch GBF-GBF-Wechselwirkungen detektiert werden würden. Zusammen mit den Phosphorylierungsdaten sollte diese Ergebnisse letzte Gewißheit über die Regulation des *RBCS2* Promotors während der Fruchtentwicklung liefern.

4.4 Analyse DNA-bindender Faktoren im One-Hybrid-System

In dieser Arbeit wurde versucht, mit Hilfe des One-Hybrid-Systems einen I-Box-Bindefaktor (IBF) zu klonieren. Der Versuch schlug fehl - keiner der erhaltenen sechs Klone erfüllte das Kriterium eines DNA-Bindeproteins. Stattdessen wurden unter anderem Proteine aus Tomate detektiert, die sehr häufig vorkommen, wie Cab und *RBCS2*. Interessanterweise lagen ihre cDNAs genauso wie die cDNAs der anderen Klone nicht in der richtigen Fusion zum Leseraster der GAL4-

Aktivierungsdomäne. Es stellt sich also die Frage, wie es zur Detektion dieser „falsch“ Positiven kommen konnte.

Der Nachweis der Klone erfolgte über die Verwendung des *HIS3*-Reportergens. Da der vorgeschaltete *his3*-Promotor eine leichte Hintergrundaktivität besitzt, wird durch Zugabe des Histidinsynthese-Inhibitors 3-Aminotriazol (3-AT) die Aktivität des unerwünscht gebildeten Enzyms unterdrückt. Ist der Enzyminhibitor 3-AT ungleichmäßig in den Platten verteilt, entstehen Bereiche mit kleineren 3-AT Konzentrationen und der Selektionsdruck wird in diesen lokalen Bereichen geringer. Dann sollten nach dem Vereinzeln auf frischen Platten diese Klone nicht mehr wachsen können. Aber auch nach erneutem Ausstreichen wuchsen alle im Screen erhaltenen Klone auf neuen 3-AT Platten. Nach der Retransformation überstanden zwei Drittel die Überprüfung der Aktivierung des zweiten Reporter gens (*lacZ*) nicht mehr. Es könnte demnach so sein, daß die klonierten Proteine in den Hefestoffwechsel eingreifen, so daß sie den Mangel der Histidinsynthese ausgleichen können und die Hefezelle am Ende in der Lage ist, auf Selektionsmedium zu wachsen.

Aber wie konnten überhaupt ihre cDNAs abgelesen werden, die nicht in der richtigen Fusion zum Leseraster der GAL4-Aktivierungsdomäne lagen? Die Firma Clontech, die das System vertreibt, erklärt hierzu, daß bei der Expression in Hefe durchaus Stopcodons überlesen werden können, so daß auch trotz unterbrochener Leseraster Fusionsproteine entstehen können. Außerdem sind Hefezellen in der Lage, neben dem Start-ATG der Aktivierungsdomäne auch andere Startcodons, die sich in der cDNA-Sequenz befinden, zu akzeptieren. Dadurch können Proteine anderer Leseraster und ohne Aktivierungsdomäne entstehen. Selbst Leseraster, die sich auf dem Antisensestrang befinden, können abgelesen werden, da der bei der Herstellung des Expressionsvektors verwendete *ADH1*-Terminator einen kryptischen Promotor enthält (Chien *et al.*, 1991).

Damit liefert das One-Hybrid-System nicht immer verlässliche Daten. Es scheint empfehlenswert zu sein, die Verwendung des *lacZ*-Reporter gens der des *HIS3*-Reporter gens vorzuziehen. So können zumindest ein Teil der falsch positiven Signale von Anfang an ausgeschlossen und die Arbeit durch eine verminderte Anzahl von Klonen reduziert werden.

4.5 Resümee und Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein Protokoll zur ballistischen transienten Transformation erarbeitet werden, das die Suche nach fruchtspezifischen *cis*-Elementen in frühen Entwicklungsstadien der Tomate und die Analyse fruchtspezifischer Promotoren mit schwachen Aktivitäten oder mit gewebespezifischen Expressionsmustern wesentlich vereinfacht und erleichtert. Mit Hilfe des optimierten Protokolls gelang es nicht nur, die *cis*-agierenden Elemente des *RBCS2* Promotors aus Tomate zu definieren, sondern auch ihre Organspezifität zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, daß in Blättern zwei Elemente, und davon nur eines in Früchten, für den Hauptteil der *RBCS2* Promotoraktivität verantwortlich waren. Beide Elemente, G- und I-Box, sind hoch konserviert unter den *RBCS* Promotoren verschiedener Spezies (Giuliano *et al.*, 1988b, Manzara und Gruissem, 1988), so daß eine Ausweitung der gefundenen Daten eventuell auch auf andere Spezies möglich wäre. Der *RBCS2* Promotor ist hauptsächlich in jungen Früchten aktiv und wird während der Fruchtentwicklung zunehmend inaktiviert. Die Untersuchungen haben ergeben, daß der Großteil der *RBCS2* Promotoraktivität in Früchten über die G-Box gesteuert wird und nur dieser Anteil tatsächlich in der Reifungsphase herunterreguliert wird. Die Nutzung der G-Box als dominantes *cis*-Element während der Fruchtentwicklung von Tomate, eröffnet neue Möglichkeiten bezüglich der Konstruktion eines fruchtspezifischen Promotors, der in der frühen Phase der Fruchtreifung aktiv ist. Es wäre sicherlich interessant zu sehen, ob die G-Box, herausgegriffen aus dem Promotorkontext, als einzelnes Element oder als Tetramer die Expression von dahinter geschalteten Genen vermitteln und so weiterhin zur Abschaltung dieses Gens in späteren Phasen Fruchtentwicklung führen kann. Dabei ist zu berücksichtigen, daß diese Konstrukte auch in Blättern exprimiert werden würden, wenn auch schwächer als in Kombination mit einem zweiten Element wie der I-Box. Ebenso wäre es lohnenswert, die blattspezifische Aktion der I-Box auszunutzen - mit ihrer Hilfe könnte es möglich sein, Gene gezielt nur in Blättern zu exprimieren und die Frucht von diesen Genprodukten auszuschließen. Die Untersuchungen sollten bei ermutigenden Ergebnissen auf die Herstellung transgener Pflanzen ausgeweitet werden, um sicherzustellen, daß die auf transientem Wege gewonnenen Daten auch die „in vivo“-Situation widerspiegeln.

Ausgehend von Erkenntnissen der *cis*-Analyse des *RBCS2* Promotors wurden Studien zu den *trans*-Faktoren, IBF (I-Box Bindefaktoren) und GBF (G-Box Bindefaktoren), durchgeführt. Die Klonierung eines IBFs mit Hilfe des One-Hybrid-Systems mißlang. Dies liegt zum einen an den Unzulänglichkeiten des Systems (vorheriges Kapitel), es gibt aber auch zu denken, daß bisher erst ein einziger IBF kloniert worden ist (Rose, 1998). Vielleicht sind zusätzliche Komponenten notwendig, die zusammen mit IBF an die I-Box binden, so daß das Hefesystem keine optimale Wahl darstellt.

Die Regulation der G-Box abhängigen *RBCS2* Promotoraktivität beruht auf der Abnahme der DNA-Bindeaktivität von GBFs, die konstant während der Fruchtentwicklung exprimiert werden. Untersuchungen hierzu haben ergeben, daß diese Desaktivierung über eine Dephosphorylierung der GBFs im Verlauf der Fruchtentwicklung erfolgen könnte. Aber auch ein Zusammenhang mit einem weiteren Faktor, der mit GBF-Komplexen assoziiert ist, GF14 (G-Box Factor 14-3-3 homolog), ist nicht auszuschließen. GF14s besitzen ein Potential für die regulatorischen Aktivitäten von Kinasen und werden unterschiedlich in verschiedenen Geweben und Organen exprimiert. Es ist bereits vermutet worden, daß z. B. die GF14s in Tomate zusammen mit Pflanzenhormonen in die regulatorische Kontrolle der Fruchtentwicklung involviert sind (Laughner *et al.*, 1995). Zur Klärung dieses Sachverhaltes wäre es zunächst sinnvoll, die in Gelretardierungsexperimenten detektierten GBF-Komplexe auf das Vorhandensein von GF14s mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers zu prüfen (Supershift). Außerdem böte sich die Suche nach Faktoren an, die an GBF4, GBF9 und GBF12 aus Tomate binden. Das Two-Hybrid-System könnte durch Nachweis von GBF-GF14- und GBF-GBF-Interaktionen zur Klonierung bekannter und neuer GBFs und von GF14-Proteinen führen. Die gewonnenen Daten sollten das Bild der Regulation GBF-Desaktivierung abrunden und komplettieren. Die folgende Abbildung auf der nächsten Seite faßt das vorgeschlagene Modell zur Regulation der *RBCS2* Promotoraktivität unter Berücksichtigung vorhandener DNA-Bindefaktoren noch einmal bildlich zusammen (Abb. 45).

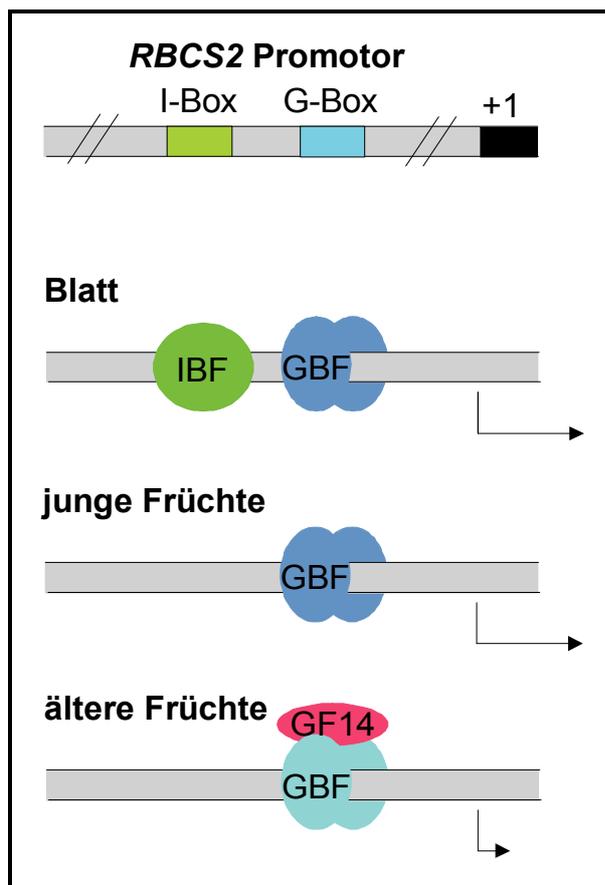


Abb. 45: Analyse der *RBCS2* Promotoraktivität

Die Hauptaktivität des *RBCS2* Promotors beruht auf der Aktion zweier *cis*-Elemente: I-Box und G-Box (im oberen Teil der Abbildung gezeigt) (Transkriptionsstart des Gens bei +1). In Blättern agieren beide Boxen und werden durch spezifische Bindeproteine gebunden (GBF und IBF) (Transkription durch Pfeil angezeigt). In jungen Früchten sind ungefähr 80 % der Gesamtaktivität des Promotors allein auf die G-Box zurückzuführen, in Analogie hierzu werden nur GBFs in Fruchtextrakt gefunden. Aufgrund der abnehmenden DNA-Bindeaktivität der GBFs nimmt während der Fruchtentwicklung die *RBCS2* Promotoraktivität ab. Vermutlich spielt auch noch ein weiterer Faktor, GF14, hierbei eine Rolle.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Neben der klassischen Züchtung werden nun auch vermehrt gentechnische Ansätze gewählt, um die Qualität und den Ertrag von Tomaten zu verbessern. Eine Voraussetzung zur fruchtspezifischen Expression von Genen ist die Charakterisierung von Promotorelementen. Ein Ansatzpunkt, um frucht- und entwicklungsspezifische Promotorelemente zu finden, stellen die fünf *RBCS* Gene (Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase, Small Subunit) aus Tomate dar, die entwicklungsabhängig und gewebespezifisch differentiell reguliert werden. Aus der Gruppe dieser Gene wurde das *RBCS2* Gen herausgegriffen und sein Promotor bezüglich seiner *cis*-Elemente und *trans*-Faktoren analysiert.

Für die Analyse der *cis*-Elemente des *RBCS2* Promotors in Blättern und jungen Früchten von Tomate konnte ein Transformationssystem auf Basis der ballistischen transienten Transformation etabliert werden. Zur Untersuchung der *RBCS2* Promotoraktivität wurde ein funktionelles Promotorfragment an das Reporterogen Luziferase (*luc*) fusioniert und als interner Standard der Transformationseffizienz ein β -Glucuronidase-Reporterogen (*gus*) in Fusion mit dem viralen 35S Promotor verwendet. Eine Deletionsanalyse des *RBCS2* Promotors in beiden Organen der Tomate zeigte, daß ein nur 37 Basenpaare großes Fragment für den Hauptteil der Promotoraktivität verantwortlich war. Auf diesem kleinen Bereich lagen ein I-Box (5'-GATAAG-3') und ein G-Box (5'-CACGTG-3') Element. Beide Elemente sind hoch konserviert in den *RBCS* Promotoren verschiedener Spezies. Gerichtete Mutationsanalysen ergaben, daß es im Fall der Blätter zu einem Zusammenspiel beider Elemente kommt - sie agieren als *cis*-Elemente und sind so gemeinsam für den Großteil der *RBCS2* Promotoraktivität verantwortlich. Auf der anderen Seite übt die I-Box in jungen Früchten diese Funktion nicht mehr aus. Hier stellt allein die G-Box die treibende Kraft der *RBCS2* Promotoraktivität dar. Konform mit der organspezifischen Aktivität beider Boxen werden I-Box und G-Box Bindeproteine (IBF und GBF) in Kernproteinextrakten von Blättern berichtet, in Fruchtextrakt dagegen nur GBFs.

In Studien mit Früchten aus verschiedenen Fruchtstadien wurde gezeigt, daß die *RBCS2* Promotoraktivität im Verlauf der Fruchtentwicklung drastisch abnimmt. Bei genauerer Betrachtung mit Hilfe von Promotorkonstrukten mit deletierter oder

mutierter G-Box konnte neben dem G-Box abhängigen noch ein G-Box unabhängiger Anteil nachgewiesen werden. Zu Beginn der Fruchtentwicklung macht der G-Box abhängige Anteil ungefähr 80 % der Gesamtaktivität des Promotors aus und fällt dann im Verlauf der Fruchtentwicklung ab. Im Gegensatz dazu bleibt der G-Box unabhängige Anteil (20 %) von der Fruchtentwicklung unbeeinflusst. Vermutlich ist die TATA-Box des Promotors für diese basale Grundaktivität verantwortlich.

Gelretardierungsexperimente zeigten, daß die Abnahme der G-Box abhängigen *RBCS2* Promotoraktivität über einen Verlust der DNA-Bindeaktivität der G-Box Binfaktoren (GBF) geregelt wird. Da diese Faktoren während der Fruchtentwicklung konstant exprimiert werden, wie in Northern- und Western-Experimenten nachgewiesen werden konnte, schienen post-translationale Veränderungen oder Protein-Protein-Interaktionen als Ursache der Abnahme ihrer DNA-Bindeaktivität wahrscheinlich. Es ist bereits berichtet worden, daß die DNA-Bindeaktivität von GBFs durch Phosphorylierung beeinflusst werden kann. In dieser Arbeit konnte in Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden, daß phosphoryliertes GBF12, ein bereits klonierter GBF aus Tomate, durch Dephosphorylierung an DNA-Bindeaktivität verliert. In Kernproteinextrakten aus Früchten konnte dieses Verhalten nicht explicit nachvollzogen werden, was zu der Annahme führte, daß noch ein weiterer Faktor in die Fruchtentwicklung eingreift. Als Kandidat wurde hierfür das GBF-Bindeprotein GF14 (G-Box Factor homolog 14-3-3) vorgeschlagen. Dieses Protein ist mit GBF-Komplexen assoziiert und kommt in unterschiedlichen Expressionsmustern in Tomatenfrüchten vor.

6. SUMMARY

Apart from breeding the quality and yield of tomato fruits has recently been improved in several cases with the help of genetic engineering. One requirement for the fruit-specific expression of genes is the characterization of promoter elements required for such expression patterns. One approach to define developmentally regulated and fruit-specific promoter elements is based on the analysis of the five *RBCS* genes (Ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygenase, small subunit) in tomato which are differentially regulated in a developmental and tissue-specific fashion. Among this group of genes the *RBCS2* gene was selected and its promoter investigated concerning *cis*-elements and *trans*-factors.

In order to define the *cis*-acting elements of the *RBCS2* promoter in leaves and young fruits of tomato, a transformation system based on the method of ballistic transient transformation was established. For the analysis of *RBCS2* promoter activity a functional promoter fragment was fused to the luciferase reporter gene (*luc*) and as an internal control for transformation efficiency the β -glucuronidase reporter gene (*gus*), fused to the viral 35S promoter, was used. A deletion analysis of the *RBCS2* promoter showed that a small 37 basepairs fragment is responsible for high promoter activity in both organs of tomato. This fragment contains an I-box (5'-GATAAG-3') and a G-box (5'-CACGTG-3') element. Both elements are highly conserved among the *RBCS* promoters of different species. Mutation analysis showed that both boxes are *cis*-acting elements in leaves. In contrast, the G-box is the dominant *cis*-acting element responsible for most of the promoter activity in fruits. In agreement with the organ-specific activity of both elements, I-box and G-box binding factors (IBF and GBF) are found in nuclear protein extracts of leaves but only GBFs in extracts of fruits.

The analysis of different fruit stages showed that *RBCS2* promoter activity is high in young fruits and drops dramatically during fruit development. This developmental regulation was investigated further with the help of promoter constructs with deleted or mutated G-box. Besides the G-box dependent *RBCS2* promoter activity a G-box independent part was found. At early stages of fruit development the G-box dependent part accounts for close to 80 % of total promoter activity and it decreases during fruit development. In contrast, the G-box independent part (20 %) is not

influenced by fruit development. Most likely this basal promoter activity is due to the TATA box. These data indicate that the drop in *RBCS2* expression during fruit development is caused by reduced activity of G-box binding factors.

Gelretardation experiments showed that the G-box binding activity in fruit total and nuclear extracts is gradually lost during fruit development. In contrast, northern- and western-experiments showed that the tomato G-box binding factors are constitutively expressed during fruit development, indicating that post-translational modifications or protein-protein interactions are responsible for the decrease of binding activity.

It has been shown previously that the DNA-binding activity of GBFs can be influenced by phosphorylation. Here, gelretardation experiments showed that the DNA-binding activity of phosphorylated GBF12, a cloned GBF of tomato, is reduced by dephosphorylation. However, nuclear protein extracts of different fruit stages did not show this behavior in detail indicating a factor different from phosphorylation might be involved in the gradual inactivation of GBFs during fruit development. As a candidate the GBF-binding protein GF14 (G-box Factor homolog 14-3-3) was proposed. This factor is associated with GBF complexes and is differentially expressed in tomato fruits.

8. ANHANG

8.1 Sequenzdaten von GBF4

Nukleotidsequenz

```

GAATTCGGCA CGAGCTCTTA TGCCTCCTTA TGGGACTCCA GTTCCATATC
CAGCTTTATA TCCTCCTGCC GGAGTTTATG CTCATCCTAA CATTGCCACG
CCGGCTCCAA ATTCTGTGCC GGCAAATCCT GAAGCAGATG GGAAGGGGCC
TGAAGGAAAG GATCGGAATT CAAGTAAAAA GTTAAAGGTC TGTTCTGGTG
GTAAGGCAGG CGACAATGGG AAAGTTACTT CAGGTTCCGG AAATGATGGT
GCCACACAAA GTGATGAAAG CAGAAGTGAA GTTACATCAG ATACAAATGA
TGAAAATGAT AACAAATGAAT TTGCTGCAAA CAAGAAGGGA AGCTTTGATC
AAATGCTTGC AGATGGAGCC AGTGCACAGA ATAATCCTGC GAAAGAGAAT
CACCCGACTT CTATACATGG AAATCCTGTC ACCATGCCTG CAACTAACCT
AAATATTGGA ATGGACGTGT GGAATGCATC AGCTGCCGGT CCTGGAGCGA
TCAAATACA GCAAAATGCA ACTGGTCCAG TTATAGGACA TGAAGGAAGG
ATGAATGATC AGTGGATTCA GGAGGAACGT GAACTTAAAA GGCAAAAGAG
AAAGCAATCT AATAGGGAGT CAGCTAGGAG GTCGAGGCTC CGCAAGCAGG
CAGAGTGTGA AGAGCTACAA CGTAGAGTAG AAGCTTTGAG CCATGAGAAT
CATTCACTCA AAGATGAGCT CCAACGGCTC TCTGAGGAAT GTGAGAAGCT
TACCTCGGAG AATAATTTAA TTAAGGAAGA GTTAACGCTA CTTTGTGGAC
CAGACGTTGT GTCTAAGCTG GAGAGAAACG ATAATGTCAC ACGTATTCAA
TCTAATGTTG AAGAAGCTAG TTAAGGAGAA GTGGAAAAGC CAGGACTGAG
TAGGTGATTT TTGTTACAAA GTGCTCACAG ATCATTGCCT TTTTGGTGCA
GTGTTTGTG TCCTACTAAC CTATACCCTC CTTTAACTCC CTTTCTGAGT
ATGACTGTAA CATATATTTT TTATGATTCT AACCCAGTG TTAAAAGAGT
CTTGAGTCTG TTTAACTTAG TCTTTAAATT AACTTCAGTA GCTCAGAAAG
TCTTCAAGTG AATGTTAACG AGGCACCCAA CCACATGGGT TGTGGTACCC
TGGTGGAATT GCTTTAGCTT TAAAAA AAAA

```

Proteinsequenz

```

NSARALMPY GTPVPYPALY PPAGVYHPN IATPAPNSVP ANPEADGKGP
EGKDRNSSKK LKVCSGGKAG DNGKVTSGSG NDGATQSDS RSEGTSDTND
ENDNNEFAAN KKG SFDQMLA DGASAQNNPA KENHPTSIHG NPVTMPATNL
NIGMDVWNAS AAGPGAIIKI QNATGPVIGH EGRMNDQWIIQ EERELKRQKR
KQSNRESARR SRLRKQAECE ELQRRVEALS HENHSLKDEL QRLSECEKEL
TSENNLIKEE LTL LCGPDVV SKLERNDNVT RIQSNVEEAS

```

8.2 Sequenzdaten von GBF9

Nukleotidsequenz

```
GAATTCGGCA CGAGCCTCTA GCAATACTGA GTTAGATGGT AAATCATCTG
AGGTAAAGGA GAAATTGCC CTTAAAAGAT CTAAAGGAAG CTTGGGTAGT
TTGAATATGA TTACAGGCAA GAACACCGAG CTTGGTAAAA CGTCTGGAGC
ATCTGCAAAC GGAGTCTACT CTAAAAGTGC CGAGAGTGGA AGTGAAGGCT
CAAGCGAAGG AAGTGATGCA AATTCTCAA ATGAGTCACC AATGAAGTCA
GCAGGAAGGC AAGATTCAGC TGAAGAAGCA TCTCAAATG GCAATTCTGC
TCATAGTTCT CAGAATGGAG GAACTAGTGC TCCTCATTCA CTGGTCAACC
AAACTATGGC AATCATGCCA ATGTCAGCTG TGGGTGCTGG CGGTATTCTT
GGCCCCACAA CCAACTTGAA TATTGGTATG GACTACTGGA ATGCCGCTGC
TTCGCCGAAT ATTCCTGCAA TCCATGGGAA GGTACCGTCT GCTTCAGTTG
CTGGAGGAAT AGTTAATGCT GGATCAAGGG ATATTGTCCA ATCACAAATG
TGGATTCAGG ATGAAAGGGA GCTCAAGAGG CAGAGAAGAA AGCAGTCCAA
CAGGGAATCT GCACGTAGGT CTAGGCTACG GAAGCAGGCA GAGTGCGATG
AACTAGCACA GCGTGCTGAA GTTCTAAAGG AAGAAAATGC CTCTCTTAGA
GCAGAACTGA GTCGTCTAAG GAGTGAGCAT GACCAACTTG CTTCTCAGAA
TGCTTCTCTT AAGGAGAGAC TTGGCGAAGT TTCAGGCCGA GATGATCCAA
GACCTAGTAG AAATGACATA CATCTAAACA AAGATACCCA GCATTCATCA
CAAACAGAGC CCAAACAGGG TGGTCAGTGA AGTTCTGGCT AGATTATCGT
GGATTGAAAA ATAGGCTTAA CCTAACAAAC TTAGTAGTAA GAGTCTTTAA
TTTGCATATT TATGTAGTTT AACAATCTAT GGAAATGTGA GGCTTTTTTG
TATCAGGATT CGTTGTCCTA TGTTGTCCAT TGTTTCTCAG TTTGGACCGA
TCTTTTATGG TCGAGAAACC TGGATAATAT GTAGAGTATG TGACCGATGA
CTCGTGATAG TTTTGTGCCT AATAGGTGGT GTCTCTGTTT GCTCAAATTT
GTATGTACTG ATGAAATAGT TGATGAGTCT GCTCTTAGAA CTAAAAAAAA
AAAAAAAAAA
```

Proteinsequenz

```
NSARASSNTE LDGKSSEVKE KLPIKRSKGS LGSLNMITGK NTELGKTSGA
SANGVYSKSA ESGSEGSSEG SDANSQNESE MKSAGRQDSA EEASQNGNSA
HSSQNGGTS PHSLVNQTMA IMPMSAVGAG GIPGPTTNLN IGMDYWNAAA
SPNIPAIHGK VPSASVAGGI VNAGSRDIVQ SQMWIQDERE LKRQRRKQSN
RESARRSRLR KQAECDELAQ RAEVLKEENA SLRAELSLRL SEHDQLASQN
ASLKERLGEV SGRDDPRPSR NDIHLNKDTQ HSSQTEPKQG GQ
```

8.3 Sequenzdaten von GBF12

Nukleotidsequenz

```

GAATTCGGCA CGAGCAGATG GTAAGGACCA GAATACAAGC AAAAAATTGA
AGGGATGTTT AGGTGGCAAG GCAGGAGAAA GTGGGAAAGC GGCCTCAGGT
TCTGGAAATG ATGGTGGTGC CACAAGAAGT GCTGAAAGCG GAAGTGAAGG
TTCATCAGAC GAAAATGATG AAAATGATAA CCATGAATTT TCTGCTGACA
AAAATAGAAG CTTTGATCTA ATGCTTGCTA ATGGAGCCAA TGCTCAGACC
AATCCTGCAA CAGGGAATCC AGTCGCTATG CCCGCACCTA ATCTGAATAT
TGGGATGGAT TTGTGGAACG CACCTTCTGG CGGTCCC GGA ATGATCAAAA
TGCGATCAAA TCAATCTGGT GTCTCGCCAG CTCCTGGGAT GGGACGTGAA
TGGATTCAGG ATGAACGTGA ACTTAAAAGG CAAAAGAGAA AGCAGTCTAA
TAGAGAATCA GCTCGGAGGT CGAGATTACG CAAGCAGGCT GAGTGTGAAG
AGCTACAACA TAAGGTAGAG ACATTGAGCA ATGAGAATCA TGGACTCAAA
GAGGAGTTGC GAAAGGTCTC TGAGGAATGT GAGAAGCTTA CCTCGGAGAA
TAATTC AATA AAGGATGAGT TGACGAGGTT GTATGGGCCA GAGGCTGTGT
CCAAGCTAGA GAGTAATGCC AACGCCATGC GTCTTCAGTC CAATGTTGAG
GAAGCTAAGA GTTGAGGACA AGCCATGACA GAGTAACTTA TTTTGGTTAA
AATGCTCAAA AATCTCTTAC TGCCCGTGGG AAATCTATAG CTTTTACCGT
GCGTTAGAAG TAGAAATCTC TGCTTTTCTA CTAATTTATG TCCTTTTTTAA
CCCTTTTGAG TGAAATTTAT AACATTAATT CTTGGATTTT TAACCCAGGT
TTGAATCTTA ATCTATGACA ACAACTGAAT AGCTTGATCT TAAAAAAAAA
AAAAAAAAA

```

Proteinsequenz

```

NSARADGKDQ NTSKCLKGCS GKGAGESGKA ASGSGNDGGA TRSAESGSEG
SSDENDENDN HEFSADKNRS FDLMLANGAN AQTNPATGNP VAMPAPNLNI
GMDLWNAPSG GPGMIKMRSN QSGVSPAPGM GREWIQDERE LKRQKRKQSN
RESARRSRLR KQAECEELQH KVETLSNENH GLKEELRKVS EECEKLTSN
NSIKDELTRL YGPEAVSKLE SNANAMRLQS NVEEAKS

```

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wienand und Frau Dr. habil. Meier für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute Betreuung während der gesamten Zeit dieser Arbeit. Herr Prof. Dr. Vogel hat diese Arbeit vom Fachbereich Chemie aus betreut und ich danke ihm sehr herzlich für sein Engagement.

Herrn Prof. Dr. Wienand und Frau Dr. habil. Meier möchte ich auch für die Kreativität und Phantasie danken, die sie in der Zeit entwickelt haben, in der Frau Dr. Meier zu DuPont (Wilmington, USA) gewechselt ist. Frau Dr. Meiers exzellente Fernanalysen und Herrn Prof. Dr. Wienands Einsatz „vor Ort“ waren beeindruckend.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen Frau Annkatrin Rose, Herrn Frank Gindullis und Frau Dagmar Schneider für ihre stete Hilfsbereitschaft und die vielen Diskussionen, die wir geführt haben und auch das gute Klima in unserer Laborgemeinschaft. Frau Annkatrin Roses pädagogische Fähigkeiten und ihre erfreulicherweise immer gut bestückte Keksdose möchte ich besonders hervorheben. Mein Dank gilt auch der ganzen Arbeitsgruppe AMPI, deren gute Atmosphäre mir stets in guter Erinnerung bleiben wird, so daß ich bestimmt oft und gern an diese Zeit zurückdenken werde.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit meines Studiums nach Kräften unterstützt haben. Sie haben mir jeden Freiraum gewährt, der notwendig war und standen mir in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Auch meinem Bruder möchte ich für sein Interesse, seine humorvolle Unterstützung und seine Hilfsbereitschaft (unvergessen der „Fonds notleidender Schwestern“!) besonders herzlich danken.

Mein großer Dank gilt auch besonders meinem Freund Guenther Warnke, dessen Geduld und Fürsorge für mich (und den Computer!) die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht haben. Er hat mir stets liebevoll den „Rücken frei gehalten“ und mich bei der Durchführung dieser Arbeit in guten und schlechten Zeiten bestärkt.

Bedanken möchte ich mich auch bei den vielen Freunden und Verwandten, die hier noch nicht namentlich erwähnt wurden, wie zum Beispiel meine Freundin Daniela Flik und meine Patentanten. Sie haben alle kräftig die Daumen für diese Arbeit gedrückt und mich immer wieder aufgemuntert.