

Blütenspezifische Modifikation der Carotinoidbiosynthese in *Tagetes erecta*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Martin Klebsattel

geb. am 09.11.1975 in Offenbach am Main

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Uwe Sonnewald, IPK Gatersleben
2. Prof. Dr. Klaus Humbeck, Universität Halle
3. Prof. Dr. Gerhard Sandmann, Universität Frankfurt

Halle (Saale), 8.7.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007091

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007091>]

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	2
2.1	Biosynthese der Carotinoide	3
2.2	Carotinoide in der pflanzlichen Biotechnologie	6
2.3	Tagetes: Modell zur biotechnologischen Optimierung der Carotinoidbiosynthese	8
2.4	Transpososon-Mutanten: Werkzeuge zur Identifikation gewebespezifischer Promotoren	11
2.5	Ziele der Arbeit	14
3.	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
	<i>Chemikalien, Enzyme</i>	16
	<i>Medien, Lösungen und Puffer</i>	16
	<i>Bakterienstämme und DNA-Vektoren</i>	18
	<i>Oligonukleotide für präparative Zwecke</i>	19
	<i>Oligonukleotide für real time PCR</i>	20
	<i>Oligonukleotide für TAIL PCR</i>	21
3.2	Methoden	21
	<i>Restriktionsendonukleasespaltung von DNA</i>	21
	<i>Isolation von DNA-Fragmenten</i>	21
	<i>Ligation</i>	22
	<i>Herstellung RbCl₂-kompetenter Bakterien</i>	22
	<i>Transformation von Bakterien</i>	22
	<i>Plasmid–Minipräparation</i>	22
	<i>Plasmid–Maxipräparation</i>	23
	<i>RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial</i>	23
	<i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i>	24
	<i>Präparation genomischer DNA aus Arabidopsis thaliana</i>	24

<i>TAIL-PCR für die Amplifikation Insert-flankierender DNA</i>	25
<i>DNase Behandlung von RNA-Präparationen</i>	27
<i>cDNA Synthese</i>	28
<i>PCR</i>	28
<i>Quantitative real time PCR</i>	28
<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	30
<i>Dünnschichtchromatographie</i>	30
<i>Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)</i>	31
<i>Pflanzenanzucht</i>	32
<i>Genetische Transformation von Arabidopsis thaliana</i>	32
<i>Genetische Transformation von Tagetes erecta</i>	33
<i>GUS-Färbung</i>	34
<i>Entfärbung der Gewebe</i>	34
<i>Proteinbestimmung</i>	34
<i>GUS-Enzymaktivitätsmessung</i>	35

4. Ergebnisse

4.1 Identifikation blütenspezifischer Promotoren	36
4.1.2. Feststellung der Transposon-Insertionsorte	36
4.1.3 Die Expressionsmuster der Transposon-markierten Gene	39
4.2 Isolation und Analyse der Promotoren	41
4.2.1 Isolation der Promotorfragmente	41
4.2.2 Analyse der Promotorsequenzen	43
4.3 Expressionsmuster der Promotorfragmente in Arabidopsis	45
4.3.1 Räumliche Auflösung der Promotoraktivität	45
4.3.2 Zeitliche Auflösung der Promotoraktivität	52
4.4. Charakterisierung des Promotors P76S in Tagetes	55
4.4.1 Räumliche Auflösung der P76S Promotoraktivität in Tagetes	55
4.4.2 Zeitliche Auflösung der P76S Promotoraktivität in Tagetes	58

4.5	Erhöhung des β -Carotinoidgehaltes der Tagetesblüte	60
4.5.1	Expression einer Lycopin- β -Cyclase in der Blüte von Tagetes	61
4.5.2	Carotinoidanalyse der Blüten und Blätter	63
4.5.3	Analyse der Carotinoidakkumulation während der Blütenentwicklung	67
4.5.4	Expressionsanalyse der Carotinoidbiosynthesegene	69
5.	Diskussion	71
5.1	Identifikation blütenspezifischer Promotoren	71
5.2	Räumliche Auflösung der Promotoraktivität	74
5.3	Zeitliche Auflösung der Promotoraktivität	75
5.4	Promotoraktivität von P76S in Tagetes	77
5.5	Carotinoidgehalt P76S:: <i>CycB</i> transgener Tagetes Pflanzen	80
5.6	Expressionsniveaus der Carotinoidbiosynthesegene in P76S:: <i>CycB</i> transgenen Tagetespflanzen	81
5.7	Hinweise auf carotinogene Enzymkomplexe	83
5.8	Ausblick	85
6.	Abkürzungsverzeichnis	86
7.	Literatur	87

1. Zusammenfassung

Um einen blütenspezifischen Eingriff in die Carotinoidbiosynthese von *Tagetes erecta* durchführen zu können, wurden mittels Transposon-markierten Arabidopsis Linien blütenspezifische Promotoren identifiziert. DNA-Fragmente der Promotoren wurden als translationale Fusion mit dem GUS-Reportergen in Arabidopsis transformiert. Die histochemische Visualisierung der GUS-Aktivität in den transgenen Pflanzen zeigte für alle Promotoren eine spezifische Aktivität in der Blüte. Untersuchungen mit quantitativer *real time* PCR zeigten, dass kurze Promotorfragmente (1kb) spezifischer für die Blüte sind als lange Promotorfragmente (2kb) der gleichen Promotorregion. Die 2kb Promotorfragmente ermöglichten jedoch höhere absolute Expressionsniveaus in der Blüte als die 1kb Fragmente. Ebenfalls mit quantitativer *real time* PCR wurde die Regulation der Promotoraktivitäten während der Blütenentwicklung von Arabidopsis untersucht. Ein Promotor, P76S, wurde aufgrund eines geeigneten Aktivitätsprofils während der Blütenentwicklung und zusätzlich hoher Blütenspezifität für Experimente in *Tagetes erecta* ausgewählt. Die detaillierte Charakterisierung des Promotors P76S in *T. erecta* zeigte ein zu Arabidopsis zeitlich und räumlich analoges Expressionsmuster.

Mit dem Ziel einen Großteil des Metabolitenflusses in Richtung der β -Carotinoide umzulenken, wurde eine chromoplastenspezifische Lycopin- β -Cyclase (CycB) aus Tomate unter Kontrolle von P76S in der Blüte von *T. erecta* exprimiert. Die Carotinoidgehalte wurden mit hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert und zeigten bei drei P76S::CycB transgenen Pflanzen ein stark verändertes Carotinoidprofil im Vergleich zu Kontrollpflanzen: Erhöhung des β -Carotinoidgehaltes in der Blüte um 225%, Reduktion des α -Carotinoidgehaltes um 80% und Reduktion des Gesamtcarotinoidgehaltes um 55%. Aus einer qualitativ und quantitativ unveränderten Carotinoidzusammensetzung der Blätter konnte geschlossen werden, dass der vorgenommene Eingriff in die Carotinoidbiosynthese spezifisch für die Blüte ist. Studien zur Carotinoidakkumulation während der Blütenentwicklung belegen, dass der verminderte Gesamtcarotinoidgehalt in den P76S::CycB-Pflanzen ausschließlich auf eine Reduktion des Luteingehaltes während mit starker Biomassezunahme einhergehender Phasen der Blütenentwicklung zurückzuführen ist.

Expressionsanalysen mit quantitativer *real time* PCR zeigten, dass in den P76S::CycB-Pflanzen keine transkriptionelle Repression von Carotinoidbiosynthesegenen zu erkennen ist, welche die verringerten Carotinoidmengen erklären könnten. Die meisten untersuchten Gene zeigten ein unverändertes oder sogar leicht erhöhtes Expressionsniveau gegenüber Kontrollpflanzen. Die stärkste Erhöhung des Expressionsniveaus wurde bei der Zetacarotindesaturase (ZDS) festgestellt. Die ZDS synthetisiert das Substrat Lycopin der ektopisch exprimierten Lycopin- β -Cyclase.

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die ektopische Expression der Lycopin- β -Cyclase die Stöchiometrie von carotinogenen Multienzymkomplexen in den Chromoplasten der Blüte stört und dadurch zu einer verminderten Lutein-Biosynthesekapazität führt.

2. Einleitung

Carotinoide sind mit über 600 natürlich vorkommenden Vertretern die größte Gruppe natürlicher Pigmente.

Carotinoide gelten im allgemeinen als pflanzliche Pigmente. Sie werden aber auch von phototrophen und nicht-phototrophen Bakterien sowie Pilzen und Hefen synthetisiert, die den Carotinoiden ihre gelbe, orange oder rote Farbe verdanken.

Tiere sind nicht in der Lage, Carotinoide *de novo* zu synthetisieren. Viele Tiere akkumulieren jedoch Carotinoide aus der Nahrung, wie z.B. die durch Carotinoide rötlich gefärbten Federn von Flamingos oder einige Fische wie Lachs und Goldfisch, deren Muskelfleisch durch die Akkumulation des Carotinoids Astaxanthin rosa bis rötlich gefärbt ist. Die Färbung mariner Invertebraten ist oft auf Carotinoprotein-Komplexe zurückzuführen. In diesen Komplexen wird die orange-rote Farbe der Carotinoide durch Komplexbildung mit einem Protein zu blau, grün oder purpur verschoben (Cianci et al. 2002).

In einigen Geweben des Menschen und anderer Säugetiere sind Carotinoide in so hoher Konzentration vorhanden, dass sich dies im Name der Gewebe widerspiegelt. Diese Gewebe sind der *Corpus luteum* in den Ovarien und die *Macula lutea* im Auge, aber auch die Haut und das Fettgewebe (Schweigert, 1998).

Viele biologische Funktionen der Carotinoide in Tieren und Pflanzen hängen mit der Lichtabsorption ihres Polyen-Chromophors zusammen. Zeaxanthin beispielsweise ist eines der Hauptpigmente in der Macula des menschlichen Auges. Es schützt durch sein spezielles Lichtabsorptionsspektrum die empfindlichen Sehzellen. Durch die Lichteinstrahlung wird Zeaxanthin kontinuierlich degradiert und muss mit der Nahrung wieder zugeführt werden, um einen effizienten Schutz der Macula zu gewährleisten und Langzeitschäden, wie die altersbedingte Maculadegeneration, zu vermeiden (Landrum et al. 2001).

In der Photosynthese haben Carotinoide wichtige Funktionen. Als Antennenmoleküle in den Lichtsammelkomplexen verbreitern sie das Wirkungsspektrum der Photosynthese, schützen die Photosysteme vor Photooxidation und stabilisieren die Thylakoidmembranen (Havaux et al. 1999).

2.1 Biosynthese der Carotinoide

Fast alle Carotinoide sind C₄₀ Isoprenoide, bestehend aus 8 Isopreneinheiten. Die Polyen-Kette kann bis zu 15 konjugierte Doppelbindungen enthalten, was den Carotinoiden ihre besonderen photochemischen Eigenschaften verleiht. Die konjugierten Doppelbindungen ermöglichen cis-trans Isomerie an verschiedenen Positionen im Molekül. Der absolute Hauptanteil der Carotinoide liegt zwar in *all-trans* Konfiguration vor, jedoch existieren in sehr geringen Mengen auch verschiedene *cis* Isomere (Isaacson et al. 2002).

Wie alle plastidären Isoprenoide werden Carotinoide aus Isopreneinheiten aus dem Deoxyxylulose-Phosphat Weg synthetisiert (Lichtenthaler et al. 1997). Die Carotinoidbiosynthese beginnt mit der Kondensation zweier Moleküle Geranylgeranyl-Diphosphat (GGDP) zu Phytoen, katalysiert durch die Phytoensynthase (PSY). Durch zwei Desaturasen, die Phytoendesaturase (PDS) und die ζ -Carotin-Desaturase (ZDS), werden vier konjugierte Doppelbindungen eingeführt. Dadurch wird aus dem farblosen Phytoen über das blassgelbe ζ -Carotin das rote Lycopin gebildet (Abb.1).

Lycopin stellt den Scheidepunkt der Carotinoidbiosynthese dar, da nun durch zwei unterschiedliche Cyclisierungsreaktionen entweder ein ϵ -Ionon oder ein β -Ionon Ring in das lineare Lycopin eingeführt wird. In einer zweiten Cyclisierungsreaktion wird das andere Ende des Moleküls im allgemeinen in einen β -Ionon Ring überführt. Dieses β,ϵ -Carotin wird auch α -Carotin genannt. Alle Carotinoide mit dieser Ringkonfiguration gehören daher zu den α -Carotinoiden. β,β -Carotin ist auch als Provitamin A bekannt und namensgebend für Carotinoide mit zwei β -Ionon Ringen, den β -Carotinoiden.

Die Gene der Carotinoidbiosynthese aus Arabidopsis und Tomate sind bis auf die Lycopin- ϵ -Hydroxylase seit längerem bekannt (Hirschberg et al. 2001). Die ϵ -Hydroxylase war lange Zeit nur genetisch als die *lut1* Mutation in Arabidopsis charakterisiert. Kürzlich ist es gelungen, das LUT1 Gen zu identifizieren und der Familie der P450 Oxygenasen zuzuordnen (Tian et al. 2004).

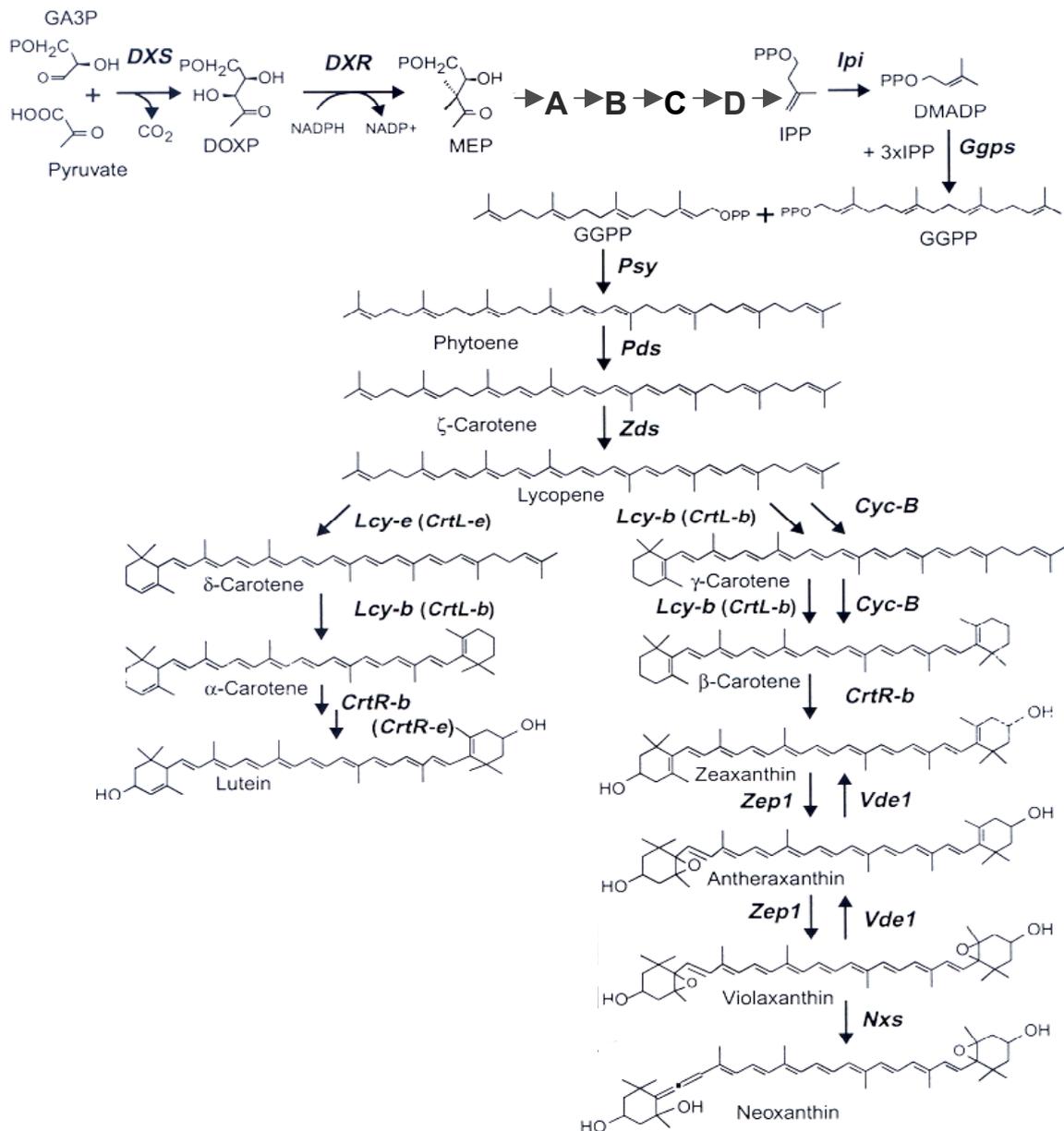


Abb.1 Die Carotinoid-Biosynthese in Tomate. Die Enzyme sind nach den Bezeichnungen ihrer Gene benannt. DOXP, 1-Deoxyxylulose 5-Phosphat; DXS, DOXP Synthase, DXR, DOXP Reduktoisomerase; **A**, 4-(Cytidin 5'-phospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol; **B**, 2Phospho-4-(Cytidin 5' phospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol; **C**, 2-C-Methyl-D-Erythritol 2,4 cyclodiphosphat; **D**, Hydroxymethylbutenyl-4-diphosphat; DMAPP, Dimethylallyldiphosphat, IPP, Isopentenylidiphosphat; IPPI, IPP Isomerase; Ggps, Geranygeranyldiphosphatsynthase; Psy, Phytoensynthase, Pds, Phytoendesaturase; Zds, Zetacarotindesaturase; Lcy-e, Lycopin ε-Cyclase; CrtR-e, ε-Ring Hydroxylase; Lcy-b, Lycopin-β-Cyclase; Cyc-B, alternative Lycopin-β-Cyclase; CrtR-b, β-Ring Hydroxylase; Zep1, Zeaxanthin-epoxidase; Vde, Violaxanthindeepoxidase; Nxs, Neoxanthinepoxidase. Weitere Erläuterungen siehe Text. Verändert nach Hirschberg et al. 2001.

Von den vielen hundert bekannten Carotinoiden sind die Xanthophylle am weitesten verbreitet. Xanthophylle tragen Sauerstofffunktionen in Form von Hydroxy-, Keto- und Epoxy-Gruppen an den Ionon-Ringen. Die häufigste Sauerstofffunktion ist die Hydroxygruppe am C3 der Iononringe. Die 3,3'-Dihydroxy-Derivate von α -Carotin und β -Carotin sind Lutein bzw. Zeaxanthin. Carotinoide mit Ketogruppen an den C(4) und C(4') Positionen werden hauptsächlich von Algen, beispielsweise von *Haematococcus pluvialis* synthetisiert (Goodwin et al. 1954). Die einzige höhere Pflanze, die das C(4),C(4')-Keto C(3),C(3')-Dihydroxy-Carotinoid Astaxanthin in der Blüte akkumuliert ist das Adonisröschen (*adonis* spp.; Seybold et al. 1959). Hydroxycarotinoide kommen fast ausschließlich als Ester oder Glucoside vor. In den Chromoplasten von Früchten und Blüten sind Xanthophylle weitestgehend mit verschiedenen langkettigen Fettsäuren verestert. In Bakterien wie *Erwinia herbicola* und Cyanobakterien sowie einigen Pilzen liegen Hydroxycarotinoide als 3,3' Diglucoside vor. Während Lutein die am höchsten oxidierte Form von α -Carotin darstellt, ist Zeaxanthin Substrat für Epoxidierungen und damit Vorstufe von Antheraxanthin und Violaxanthin. Das Phänomen der Epoxidierung von Zeaxanthin in der Dunkelheit durch die Zeaxanthinepoxidase (Zep1) und der Deepoxidierung von Violaxanthin durch die Violaxanthindeepoxidase (Vde1) im Licht ist als der Xanthophyll Zyklus bekannt (Havaux et al. 1999). Er dient der Anpassung der Pflanze an unterschiedliche Lichtverhältnisse. Von zentraler Bedeutung ist Violaxanthin zudem als Substrat für die Synthese von Abscissinsäure über das Intermediat Neoxanthin, katalysiert durch die Neoxanthinsynthase (Nxs).

Die Bildung von Iononringen wird in Pflanzen durch Lycopin- β -Cyclasen (Lcy-b) und Lycopin- ϵ -Cyclasen (Lcy-e) katalysiert. Ein Modell der Evolution von Lycopincyclasen geht davon aus, dass sich völlig unabhängig voneinander zwei Lycopin- β -Cyclasen in Bakterien entwickelt haben (Krubasik und Sandmann 2000). In Gram-positiven Bakterien dominieren die heterodimeren β -Cyclasen. Aus den zwei Genen der bakteriellen, heterodimeren β -Cyclase könnte sich die bifunktionelle Klasse von Lycopin- β -Cyclasen/Phytoensynthasen in Pilzen entwickelt haben (Arrach et al. 2001).

Eine unabhängig davon existierende monomere β -Cyclase wurde als erstes in Gram-negativen Bakterien gefunden. Hieraus könnten sich die β -Cyclasen der Cyanobakterien und Prochlorophyten entwickelt haben. Von dieser β -Cyclase der

Gram-negativen Bakterien kann die Evolutionslinie zu den β -Cyclasen der Chlorophyten und höheren Pflanzen gezogen werden.

Die Capsanthin-Capsorubin-Synthase (Ccs) aus *Capsicum annuum* ist ein weiterer Verwandter aus dieser Enzymfamilie. Die CCS katalysiert die Reaktion von Antheraxanthin und Violaxanthin zu Capsanthin bzw. Capsorubin. Der Mechanismus dieser Reaktion ist dem der Cyclisierung von Lycopin ähnlich und daher überrascht es nicht, dass die CCS auch in der Lage ist, Lycopin in β -Carotin zu überführen.

Die Gene der pflanzlichen Lycopin- ϵ -Cyclasen und der CCS sind stark homolog zu den Genen der β -Cyclasen und könnten sich daher durch Genduplikation entwickelt haben. (Krubasik und Sandmann, 2000).

In der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) koexistieren zwei Lycopin- β -Cyclasen Lcy-b und Cyc-B (Abb. 1). Die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der Cyc-B mit der CCS ist mit 86% viel größer als mit der Lcy-b mit nur 53%. Unter Berücksichtigung der β -Cyclaseaktivität der CCS, sowie den Tatsachen, dass beide Gene spezifisch in Chromoplasten enthaltenden Geweben exprimiert sind, keine Introns enthalten und ähnliche Positionen auf der genetischen Karte der beiden Solanaceen *Capsicum annuum* bzw. *Lycopersicon esculentum* haben, lässt dies die Vermutung zu, dass sich die Ccs und die Cyc-B in den Solanaceen aus einem gemeinsamen Vorläufer durch Genduplikation entwickelt haben. Dies geschah vor der Trennung der Entwicklungslinien von *Lycopersicon* und *Capsicum* (Ronen et al. 2000).

2.2 Carotinoide in der pflanzlichen Biotechnologie

Viele Verbindungen aus der Stoffgruppe der Carotinoide sind von hohem wirtschaftlichen Interesse, da sie in ihrer Eigenschaft als Pigmente und Antioxidantien als Nahrungsmittelzusätze, Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Futtermittel und Nahrungsergänzungsmittel genutzt werden.

Die biotechnologische Optimierung der Carotinoidbiosynthese von Pflanzen zielt meist auf eine Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehalts und eine qualitative Veränderung der Carotinoidzusammensetzung ab. Ziel ist meist ein erhöhter Gehalt an β -Carotinoiden.

Die Phytoensynthese als erster Schritt der Carotinoidbiosynthese ist eines der bevorzugten Ziele genetischer Manipulation um den Gesamtcarotinoidgehalt zu erhöhen.

Die samenspezifische Überexpression der Phytoensynthese (PSY) aus *Erwinia sp.* in Raps (*Brassica napus*) führte beispielsweise zu einer bis zu 50 fachen Erhöhung des α - und β -Carotinoidgehaltes in den Samen (Shewmaker et al. 1999). Im Gegensatz dazu führte die alleinige Überexpression einer PSY in Reis (*Oryza sativa*) nur zur Akkumulation von Phytoen (Ye et al. 2000). Dieser Unterschied wurde dadurch erklärt, dass in Rapssamen eine Limitierung in der PSY-Aktivität aufgehoben wurde, wohingegen im Endosperm von Reis der gesamte Biosyntheseweg nicht vorhanden ist. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PSY und Phytoendesaturase (PDS) ausreichend waren, um cyclische Carotinoide wie Lutein, β -Carotin und Zeaxanthin im Endosperm von Reis zu akkumulieren (Ye et al. 2000). Dies deutete darauf hin, dass im Endosperm von Reis die Gene für Lycopincyclasen und Carotinhydroxylasen entweder konstitutiv exprimiert sind oder durch die Synthese von Lycopin induziert werden.

Pflanze	Gen	Promotor	Gewebe	Gesamt	β -Carotinoide	Referenz
O. sativa	Psy E. uredovora	Rice Glutelin	Endosperm	+	+	Ye et al. 2000
	Pds E. uredovora	CaMV 35S	Endosperm		1,6 μ g/g DW	Ye et al. 2000
B. napus	Psy E. uredovora	Brassica Napin	Embryo	1,5mg/g FW	1mg/g FW	Shewmaker et al. 1999
S. tuberosum	Zep1 antisense	Solanum Patatin	Knolle	+570%	40 μ g/g DW	Römer et al. 2002
A. thaliana	Psy A. thaliana	Brassica Napin	Samen	+600%	260 μ g/g FW	Lindgren et al. 2003
N. tabacum	Pds E. uredovora	CaMV 35S	Blatt	k.A.	+	Misawa et al. 1994
L. esculentum	Psy E. uredovora	PG Tomate	Frucht	+160%	820 μ g/g DW	Fraser et al. 2002
L. esculentum	Lcy-b Arabidopsis	PDS Tomate	Frucht	+40%	57 μ g/g FW	Rosati et al. 2000
L. esculentum	Psy E. uredovora	PG Tomate	Frucht	+100%	n.d.	Fraser et al. 2001
L. esculentum	CycB L. esculentum	CycB Tomate	Frucht		43 μ g/g FW	Ronen et al. 2000
L. esculentum	Pds E. uredovora	CaMV 35S	Frucht	-50%	520 μ g/g DW	Römer et al. 2000
L. esculentum	Lcy-b Arabidopsis	PDS Tomate	Frucht	+70%	57 μ g/g FW	Dharmapuri et al. 2002
L. esculentum	Lcy-b + CrtR-b C.annuum	PDS Tomate	Frucht	+50%	63 μ g/g FW	Dharmapuri et al.2002
L. esculentum	Psy L. esculentum	CaMV 35S	Frucht	+	+	Fray et al. 1995

Tab.1 Übersicht: Biotechnologische Optimierung des β -Carotinoid-Gehaltes in transgenen Pflanzen. CaMV35S, Blumenkohlmosaikvirus 35S Promotor; PG, Polygalakturonidase Promotor; +, Erhöhung; Gesamt, Gesamtcarotinoidgehalt; DW, Trockengewicht; FW, Frischgewicht; k.A., keine Angaben.

Reis ist eine der wichtigen Nahrungspflanzen in Asien, Afrika und Süd-Amerika. In diesen Ländern stellt Vitamin A Mangel ein zunehmendes Problem dar. Der sog.

Golden Rice mit seinem Gehalt an β -Carotinoiden könnte dieses Problem mindern (Beyer et al. 2002).

Die qualitative Veränderung des Carotinoidgehaltes in Pflanzenorganen mit bereits hohem Carotinoid Gehalt zielt meist auf die selektive Steigerung der β -Carotinoid Gehalte ab, da β -Carotin neben seiner Wirkung als Provitamin A auch Substrat für die Synthese von kommerziell interessanten Carotinoiden wie z.B. dem β -Keto-Carotinoid Astaxanthin ist. Astaxanthin wird unter anderem in der Fischzucht eingesetzt, um Lachs oder Forelle ihre natürlich rote Farbe auch unter Zuchtbedingungen zu verleihen (Mann et al. 2000).

In der Tomate (*L. esculentum*) wurde der β -Carotinoid Gehalt durch verschiedene gentechnische Manipulationen erhöht. Ein Beispiel ist die Überexpression der endogenen alternativen β -Zyclase (CycB) in Tomate. Durch diese Überexpression wurde die Situation in der Tomaten-Mutante *Beta* nachgestellt, in der durch eine Mutation in der Promotorsequenz die Expression der CycB im Gegensatz zum Wildtyp während der Fruchtreife nicht reduziert wird und dadurch hohe Mengen β -Carotin in der Frucht akkumulieren (Ronen et al. 2000).

2.3 Tagetes: Modell zur biotechnologischen Optimierung der Carotinoidbiosynthese

Obwohl *Tagetes erecta* für die kommerzielle Produktion von Carotinoiden genutzt wird, gelangte Tagetes bisher kaum in den Focus der biotechnologischen Optimierung der Carotinoidbiosynthese.

Die Xanthophylle aus der Blüte von Tagetes werden in Form von Blütenpulver oder als Hexanextrakte hauptsächlich dem Futter von Geflügel zugesetzt, um dem Fleisch und dem Eidotter der Tiere die typisch gelbe Farbe zu verleihen (Delgado-Vargas et al. 1997). Die Blütenblätter einiger Tagetesvarietäten synthetisieren und akkumulieren Carotinoide in Konzentrationen, die mehr als das 20-fache der Konzentration in Tomatenfrüchten betragen. Die starke Pigmentierung der Blüten ist auf eine Akkumulation von Lutein während der 7 bis 10 Tage dauernden Blütenentwicklung zurückzuführen. Die Carotinoidkonzentration in den Blütenblättern von Tagetes kann hierbei je nach Spezies bis zu 10mg/g Frischgewicht erreichen (Rivas 1989).

Das Hauptpigment der Tagetesblüten ist das Xanthophyll Lutein, das verestert als Myristat und Palmitat in den globulären Chromoplasten der Blüte vorliegt (Rivas 1989). Die Morphologie der Petalen von Tagetes ist in Abb. 3 gezeigt. Die obere Epidermis besteht aus konischen Zellen, die mit Chromoplasten gefüllt sind.

Der Anteil von Lutein am Xanthophyllgehalt beträgt über 85%. Der Rest verteilt sich auf verschiedene β -Carotinoide, hauptsächlich Violaxanthin. Um das α -Carotinoid Lutein in β -Carotinoide umzuwandeln wurden chemische Verfahren entwickelt, die jedoch recht aufwändig sind (Khachik 2003).



Abb. 2: *Tagetes erecta*; ca. 4 Monate alte Pflanze. Die Abbildung zeigt die Varietät „Orangenprinz“ (TAG 72).

Die meisten Carotinoidbiosynthesegene aus *Tagetes* wurden bereits isoliert und deren Expression in den Blüten verschiedener *Tagetes*varietäten untersucht. Hierbei zeigten sich zwischen *Tagetes*varietäten mit höheren und niedrigeren Carotinoidgehalten in den Blütenblättern zum Teil starke Unterschiede in den Expressionsniveaus der Biosynthesegene. Diese Unterschiede in den Expressionsniveaus wirkten sich nicht auf die Carotinoidgehalte grüner Gewebe aus (Moehs et al. 2001). Dies und die Tatsache, dass in Tomate chromoplastenspezifische Gene für PSY, Lcy-b und CrtR-b gefunden wurden (Ronen et al. 2000), können als Hinweise gewertet werden, dass zumindest teilweise chromoplastenspezifische Biosynthesewege für Carotinoide existieren.

Eine der Herausforderungen bei der genetischen Optimierung der Carotinoidbiosynthese ist, hierbei nicht in andere Biosynthesewege oder die Photosynthese einzugreifen um die Fitness der Pflanzen nicht negativ zu beeinflussen.

Ein Beispiel hierfür ist die konstitutive Überexpression einer Phytoensynthase in transgenen Tomaten, die nicht nur zu einer Erhöhung des Carotinoidgehaltes in den Früchten sondern auch zu Zwergwuchs der Pflanzen führte, da GGDP von der Gibberellinbiosynthese in die Carotinoidbiosynthese umgeleitet wurde (Fray et al. 1995).

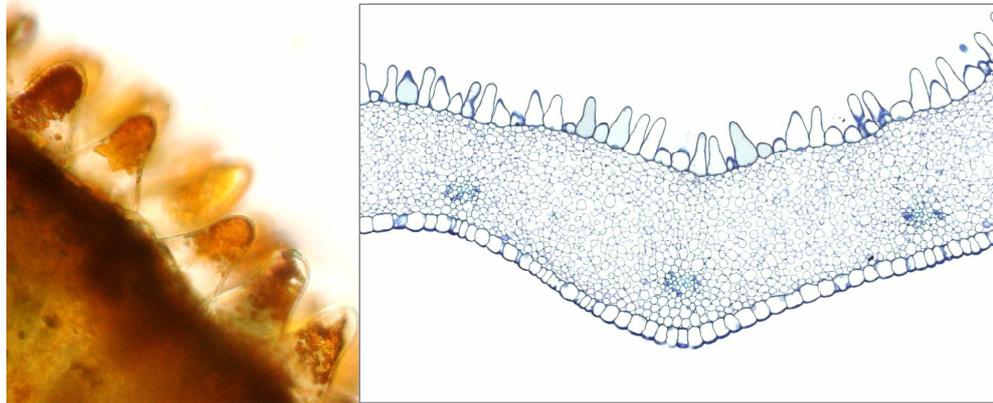


Abb.3 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch Petalen von Tagetes (TAG72). Links, obere Epidermis (40x); Rechts Querschnitt Petale gefärbt mit Methylenblau (10x)

Dieses Beispiel zeigt, dass gentechnische Manipulationen der Carotinoidbiosynthese spezifisch in Organen, die Chromoplasten enthalten, wie Blüten oder Früchten, ausgeführt werden sollten. Nur so können Nebeneffekte auf die Fitness der Pflanzen vermieden werden.

Zur genetischen Optimierung der Carotinoidbiosynthese in der Blüte von Tagetes sind daher Promotoren mit einer Spezifität für die Blüte zu bevorzugen.

Zudem sollten die verwendeten Promotoren möglichst spezifisch in den Blütenentwicklungsstadien Transkripte des Transgens zur Verfügung zu stellen, in denen die Carotinoidakkumulation stattfindet.

Bekannte blütenspezifische Promotoren wie der AP3 Promotor aus Arabidopsis (Hill et al. 1998) der EPSPS-Promotor aus Petunie (Benfey et al. 1990) und der PDS Promotor aus Tomate (Corona et al. 1996) erfüllen diese spezifischen Anforderungen an das räumliche Expressionsmuster nur eingeschränkt. Zudem ist die Regulation dieser Promotoren während der Blütenentwicklung mittels Promotor::GUS Fusionsgenen und GUS-Färbetechniken charakterisiert worden. Diese Methoden sind aber aufgrund der Akkumulation des GUS-Proteins zur zeitlichen Auflösung der Promotoraktivität nur eingeschränkt aussagekräftig.

2.4 Transpososon-Mutanten: Werkzeuge zur Identifikation gewebespezifischer Promotoren

Zur Identifikation und Isolation gewebespezifischer Promotoren sind Informationen über die Expressionsmuster von Genen und Sequenzinformationen notwendig. Von allen Pflanzen ist *Arabidopsis thaliana* die Pflanze mit der höchsten verfügbaren Datenmenge bezüglich Expression und Sequenz von Genen und nicht-kodierenden Sequenzen.

Das Genom von *Arabidopsis* ist vollständig bekannt (Yamada et al. 2003) und die Expressionsmuster vieler Gene sind mittels Microarray Experimenten (z.B. Kim et al. 2003) und anderen Methoden wie *Massively Parallel Signature Sequencing* (MPSS; Brenner et al. 2000) oder *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE; Lash et al. 2000) im großen Maßstab untersucht worden. Nachteil dieser Methoden ist, dass nur relativ grob festgestellt werden kann, in welchen Geweben Gene exprimiert sind. Eine feinere histologische Auflösung der Expression ist mit diesen Methoden kaum möglich.

Eine sehr gute räumliche Auflösung von Promotoraktivitäten im größeren Maßstab können Transposon-Mutanten liefern, deren Transposons ein Reporter gen enthalten. Bei Insertion des Transposons 3' einer Promotorsequenz kann die Promotoraktivität in den entsprechenden Geweben, beispielsweise durch histochemische Färbungen visualisiert werden. Eine solche Kollektion von Transposon Mutanten wurde beispielsweise durch die Cold Spring Harbor Laboratories (CSHL) erstellt (Martienssen 1998). Die CSHL-Mutantenkollektion ist mit etwa 30000 Linien eine der umfangreichsten Sammlungen von transposonmarkierten *Arabidopsis*linien.

*Screening*programme zur Visualisierung der Promotoraktivitäten wurden durchgeführt und ermöglichen es, in Datenbanken nach den gewünschten Gewebespezifitäten zu suchen.

Die CSHL Mutantenkollektion umfasst *Arabidopsis*linien mit zwei unterschiedlichen Transposons. Die sog. *Enhancer Trap* Linien (ET) enthalten ein Transposon, dessen Reporter gen mit dem Minimalpromotor des CaMV 35S Promotors ausgestattet ist. Der Minimalpromotor allein ermöglicht keine Expression des β -Glucuronidase Reporter gens (GUS; Hull et al. 1995), sondern ist auf die Mitwirkung eines Enhancer Elementes angewiesen, um GUS-Expression hervorzurufen.

Bei den Gene Trap Linien (GT) ist dieser Minimalpromotor nicht vorhanden (Abb.5). Eine Expression des GUS-Reporters ist daher nur zu beobachten, wenn das Transposon und damit das Reportergen 3' einer Promotorregion mit eigenem Transkriptionsstart inseriert ist. Die CSHL Arabidopsis Mutantenkollektion wurde mit den *Activation/Desintegration*-Elementen (*Ac/Ds*) aus Mais hergestellt (Wessler 1989). Dazu wurden mit *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Transformation Ausgangslinien (Parentallinien) hergestellt, die entweder das *Ac*-Element oder das *Ds*-Element enthielten. Für die Parentallinien wurde die Arabidopsis-Varietät '*Landsberg erecta*' verwendet.



Abb. 4: T-DNA-Konstrukt mit immobilierender *Ac*-Transposase zur Herstellung der *Ac*-Parentallinie.

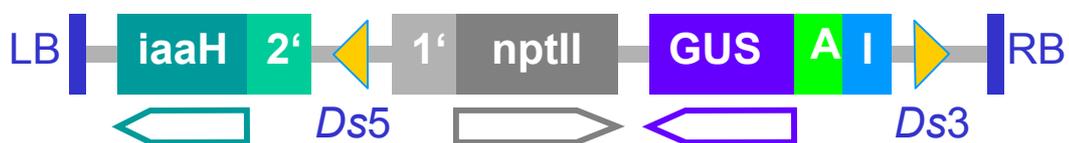


Abb. 5: T-DNA-Konstrukt mit mobilisierbarem *Ds*-Transposon zur Herstellung der *Ds*-Parentallinie von GT-Linien. Die gelben Dreiecke stehen für die Ränder des transponierbaren Abschnitts.

TATA: Transkriptionsstart (Minimalpromotor); I: Intron aus Arabidopsis;
A: Spleißsequenzen; GUS: β -Glucuronidase; 1'; 2': Mas Promotor;
KanR: Kanamycinresistenz. TATA: CaMV 35S Minimalpromotor

Die Transposition des *Ds*-Elementes wurde durch Kreuzen homozygoter *Ac*- und *Ds*-Pflanzen initiiert. In der F1 Nachkommenschaft wurden die *Ds*-Elemente im Laufe der Entwicklung in neue Genorte transponiert. Um stabile, vererbare Transposon-Mutationen zu erhalten, wurde die F2 Generation auf Anwesenheit des *Ds*-Elementes und Abwesenheit des *Ac*-Elementes selektioniert. In Pflanzen, welche die Transposase *Ac* durch Segregation verloren haben, sind weitere Transpositionen des *Ds*-Elementes ausgeschlossen (Abb. 6)

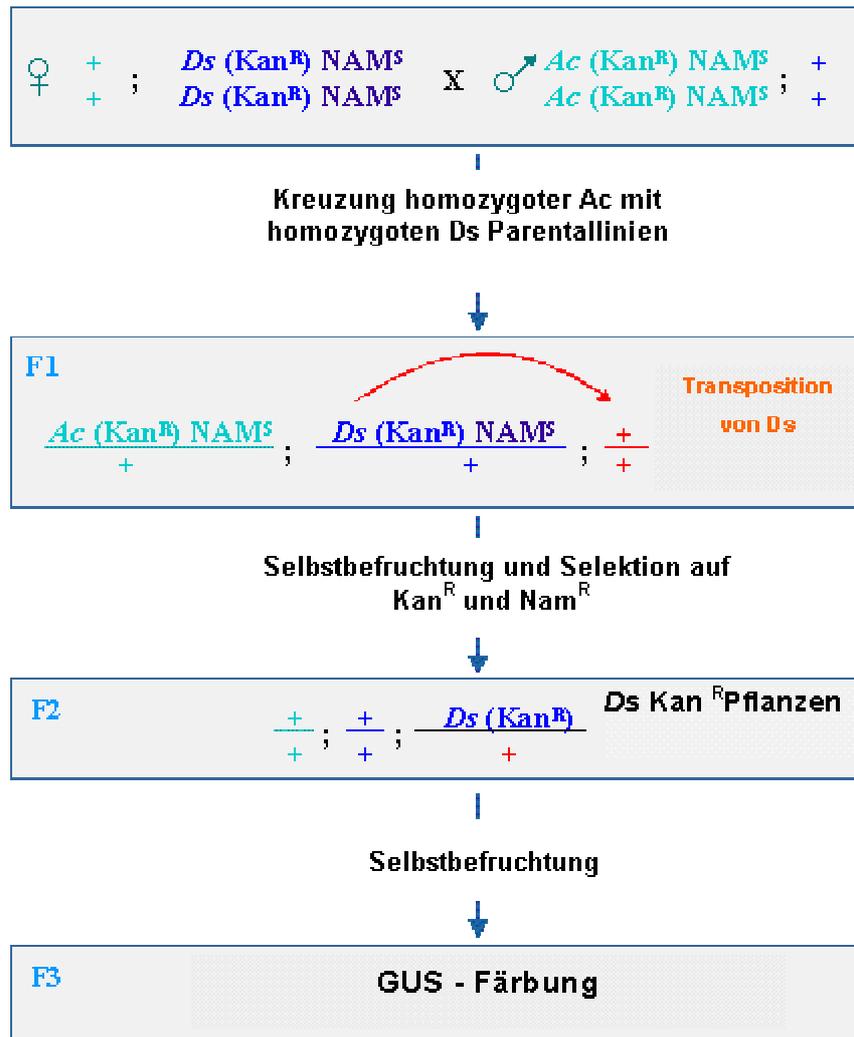


Abb. 6: Schematischer Überblick über das Protokoll zur Herstellung von Arabidopsis-Linien mit stabil transponierten *Ds*-Elementen durch Selektion von Transpositionsereignissen, bei denen das Transposon an einem Genort inseriert ist, der unabhängig vom Ausgangsort vererbt wird. *NAM^S*, Naphtalenacetamid-Sensitivität; *Kan^R*, Kanamycin-Resistenz.

Um eine Selektion gegen die Anwesenheit der Transposase zu ermöglichen, trägt die T-DNA des *Ac*-Elementes einen negativen Selektionsmarker, der Sensibilität gegenüber dem Herbizidanalogen Naphtalen Acetamid (NAM) verleiht (Abb. 4). Die Selektion beruht auf dem *iaaH* Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*, das für eine Indolacetamid Hydrolase kodiert, die NAM zu Naphtalen-Essigsäure (NAA) hydrolysiert. NAA hat eine auxinähnliche Wirkung, so dass *iaaH*-positive Pflanzen in Gegenwart von NAM durch unkontrolliertes Längenwachstum absterben.

Zusätzlich trägt auch die T-DNA des *Ds*-Elementes außerhalb des transponierbaren *Ds*-Elementes diesen negativen Selektionsmarker (Abb. 5). Das Transposon selbst trägt neben dem Reporter gen auch einen positiven Selektionsmarker für Kanamycinresistenz. Bei Transposition werden Kanamycinresistenz und NAM Sensibilität räumlich von einander getrennt und können getrennt vererbt werden.

Mit diesem System von positiver und negativer Selektion lässt sich auf drei für eine stabile Mutagenese notwendige Eigenschaften der Pflanzen selektionieren.

Anwesenheit des *Ds*-Elementes führt zu Kanamycinresistenz, Abwesenheit des *Ac*-Elementes und Transposition von *Ds* führen zu Unempfindlichkeit gegen NAM.

Pflanzen, die auf NAM und Kanamycin wachsen können enthalten keine vollständigen T-DNAs der Parentallinien mehr. Sie sind damit stabile Transposon-Mutanten.

Die Insertionsorte der Transposons können durch PCR-basierende Techniken identifiziert werden. Hierdurch ist ein Promotor zwar ungefähr lokalisiert; die Isolation eines funktionellen Promotors mit minimaler Größe ist jedoch nach wie vor kaum rational möglich sondern eher ein iterativer Prozess.

2.5 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist einen Großteil der hohen Carotinoid-Biosynthesekapazität in der Lutein-akkumulierenden Tagetesblüte durch Expression einer Lycopin- β -Cyclase zur Synthese von β -Carotinoiden zu nutzen. Dabei soll ein Promotor zum Einsatz kommen, dessen zeitliches und räumliches Expressionsmuster geeignet ist, die Expression eines Transgens möglichst stringent in die carotinoidakkumulierenden Gewebe der Blüte und die Phasen der Blütenentwicklung mit hoher Carotinoidakkumulation zu dirigieren. Bekannte Promotoren erfüllen diese Anforderungen an das zeitliche und räumliche Expressionsmuster nicht.

Ein erstes Ziel der Arbeit ist daher, geeignete Promotoren bereitzustellen. Zur Identifizierung solcher Promotoren sollen Transposon-Insertions-Mutanten verwendet werden. Verschiedene Fragmente geeigneter Promotorregionen sollen isoliert und deren zeitliches und räumliches Expressionsmuster mittels GUS-Fusionsgenen in transgenen Arabidopsis und Tagetes Pflanzen charakterisiert werden.

Um den Metabolitenfluß in der Blüte von Tagetes von den α -Carotinoiden (bicyklische Carotinoide mit einem ϵ - und einem β -Iononring) in Richtung der β -Carotinoide (Carotinoide mit zwei β -Iononringen) umzuleiten, soll eine geeignete Lycopin- β -Cyclase ausgewählt und unter Kontrolle eines geeigneten Promotors blütenspezifisch exprimiert werden.

Transgene Tagetes Pflanzen sollen detailliert hinsichtlich der Carotinoidgehalte in Blüten und Blättern analysiert werden. Expressionsanalysen sollen zudem klären, ob die Expressionsniveaus von Carotinoidbiosynthesegenen in den transgenen Pflanzen verändert sind.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Chemikalien, Enzyme

Die verwendeten Laborchemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Deisenhoven) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von den Firmen Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Riedel de Haen (Hannover), Chemikalien für Kulturmedien wurden von GibcoBRL (Eggenstein), Difco Lab. (Rochester, USA) bezogen.

Enzyme für die Molekularbiologie (Polymerasen, Ligasen, RNAse, DNAse, Reverse Transkriptase) sowie DNA-Größenstandards stammten von Boehringer (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein) und New England Biolabs (New England, USA).

Medien, Lösungen und Puffer

Zur Herstellung wurde doppelt deionisiertes Millipore Wasser verwendet.

LB - Medium (per Liter) :

10g Bacto –Trypton

5g Hefe-Extrakt

10g NaCl

Ampicillinstammlösung: 100 mg/ml, in Wasser

Kanamycinstammlösung: 70 mg/ml, in Wasser

Spectinomycinstammlösung: 300mg/ml, in Wasser

Rifampizinstammlösung: 100mg/ml, in Wasser

Gentamycinstammlösung: 40mg/ml, in Wasser

LB - Agar:

15g Agar / l LB – Medium

YEB:

0,1% Hefeextrakt, 0,5% Fleischextrakt, 0,5% Pepton,
0,5% Saccharose, 0,49 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Tris/HCl (per Liter):

121,1g Tris - Base
mit HCL auf den jeweiligen pH titriert

10 x TE (per Liter):

0,1M Tris/HCl pH 7,5
0,02M EDTA

50 x TAE (per Liter):

242g Tris
57,1 ml Eisessig
100ml 0,5M EDTA

10 x MOPS-Puffer:

0,4 M MOPS
0,01 M EDTA
0,1 M Natriumacetat

10 x DNA-Probenpuffer:

0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylenyanol
50 % Glycerin
0,1 M EDTA

RNA-Probenpuffer (per ml):

500 μl deionisiertes Formamid
170 μl Formaldehyd
100 μl MOPS -Puffer
220 μl Wasser

TfBI	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat pH 5.8 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin
TfBII	10 mM MOPS pH8.0 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin
Lysis-Puffer (200ml)	11.7g NaCl 160 ml H ₂ O 0.40g MgCl ₂ 8.21g Na-acetate 40mL EtOH 6.0g SDS

Bakterienstämme und DNA-Vektoren

E.coli Stamm	Referenz
DH5 α	Hannahan, 1983
Top10	Invitrogen

Agrobacterium tumefaciens Stamm

C58C1pMP90	Clough et al.1998
EHA105	Hood et al. 1996

Plasmid

pSUN3	Heim et al. 2001
pSUN5	Heim et al. 2001

pCR2.1 TOPO Invitrogen

pCR4Blunt-TOPO Invitrogen

Oligonukleotide für präparative Zwecke

#	Name	Nukleotidsequenz	Annealingtemperatur
1	Bgenefor:	5'- ATGGAAGCTCTTCTCAAG -3'	
2	Bgenerev:	5'- CATTCAAAGGCTCTCTAT -3'	50 °C
3	P60asSmaI	5'-CCCGGGTATAGAGATGGCGTTAAGC-3'	
4	P60ssSall	5'-GTCGACTACATGTGATCGTGATGA-3'	
5	P60slSall	5'-GTCGACCAGGCAGTTACAACCTTACA-3'	48 °C
6	P76sSmaI	5'-CCCGGGTGCCAAAGTAACTCTTTAT-3'	
7	P76assSall	5'-GTCGACAGGTGCATGACCAAGTAAC-3'	
8	76aslSall	5'-GTCGACTATCCTCTGCGCAATGAAT-3'	45°C
9	P84sSmaI	5'-CCCGGGAAATCGAGAAAGATAGGTA-3'	
10	P84assSall	5'-GTCGACAAAGGGTTATAGGAGACTG-3'	
11	P84aslSall	5'-GTCGACCATGTTTCAGAGGATATGT-3'	53°C

Oligonukleotide für real time PCR

#	Name	Nukleotidsequenz
12	DXPS for	5'-TTACCCGCCCCGCTGAA-3'
13	DXPS rev	5'-TGTTTGCCGGTTTGAGTATCAA-3'
14	CrtR-b for	5'-GGCCATTGCGTTGCTTAGTT-3'
15	CrtR-b rev	5'-GTCCCGCCCCAAAACAA-3'
16	FTSZ for	5'-TCAACAGGGTTTCTCAGGTGGTA-3'
17	FTSZ rev	5'-ACCACTGCCCGAATATAATGT-3'
18	GGDPS for	5'-CGGCCGGTGTTATGTATCG-3'
19	GGDPS rev	5'-CCGGCATGGCGGTAAA-3'

20	IPPI for	5'-CTGAAGATGTTCCCGTTGATCA-3'
21	IPPI rev	5'-TTTCCATCAGATGGAGCCTTGT-3'
22	MinD for	5'-ACCCAAAGCCACCACCAAT-3'
23	MinD rev	5'-CCGGCGAGCTCTGGTTT-3'
24	ZDS for	5'-TGCTGCCGGAGCTCGTA-3'
25	ZDS rev	5'-TTGACGACTCCGGCGATAG-3'
26	Tubulin for	5'- GACCCTGTCCCACCTCCAA -3'
27	Tubulin rev	5'- TGAGAACTGCGATTGTTTGCA -3'
28	PDS for	5'- TAGATGGTAGTCCACCTGAAAGACTTT -3'
29	PDS rev	5'- GACTTGGCCACCTAGTGATTCAA -3'
30	Lcy-e for	5'- TCCAAAGTGGAACGGATTACTG -3'
31	Lcy-e rev	5'- AGTAGCAAGCCTGCATGGAATT-3'
32	Lcy-b for	5'- TCCCTTTGTCTCCTTCTTTCAATAG -3'
33	Lcy-b rev	5'- CGACGTCACCGGAGATGAT -3'
34	Psy for	5'- TAACACCCAAAGCGCTGGAT -3'
35	Psy rev	5'- GCGGCATCAAGCATGTCA -3'
36	Pds for	5'-TAGATGGTAGTCCACCTGAAAGACTTT-3'
37	Pds rev	5'-GACTTGGCCACCTAGTGATTCAA-3'
38	Lcy-b for	5'-TCCCTTTGTCTCCTTCTTTCAATAG-3'
39	Lcy-b rev	5'-CGACGTCACCGGAGATGAT-3'
40	At2g46720 for:	5'-CTGGCTTACGTGGAGGCTAAA-3'
41	At2g46720 rev:	5'-CGACCCAAACGCCAACTG-3'
42	At3g01980 for:	5'-CGGAGAGAGGGCGCTTTAC-3'
43	At3g01980 rev:	5'-GGTGAATAGCGGCAGAAGTTG-3'
44	At1g63140 for:	5'-CAACCAAGCCCACCAATCC-3'
45	At1g63140 rev:	5'-TGAGTGGCTGGCTAACAAAAGTAG-3'
46	UbiCon for	5'-ATCAAGTTCACCCGAAAAGCA-3'
47	UbiCon rev	5'-AGACCTCCCGTTCTTGCAATT-3'
48	18Sfor	5'-CGTCCCTGCCCTTTGTACAC-3'
49	18Srev	5'-AACACTTCACCGGACCATTCA-3'
50	GUSfor	5'-ATCAGGAAGTGATGGAGCATCA-3'
51	GUSrev	5'-CAGTTTTCCCGGCAATAACATAC-3'

Oligonukleotide für TAIL PCR

Degenerierte Primer:

tAD1: 5'-NTCGA(G/C)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT-3'

tAD2: 5'-NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA-3'

tAD5: 5'-(A/T)CAGNTG(A/T)TNGTNCTG-3'

Ds-Element-spezifische Primer:

tDs3-1: 5'-ACCCGACCGGATCGTATCGGT-3'

tDs3-2: 5'-CGATTACCGTATTTATCCCGTTC-3'

tDs3-3: 5'-GTATTTATCCCGTTCGTTTTTCGT-3'

tDs3-4: 5'-CCGTCCCGCAAGTTAAATATG-3'

tDs5-1: 5'-ACGGTCGGGAAACTAGCTCTAC-3'

tDs5-2: 5'-CCGTTTTGTATATCCCGTTTCCGT-3'

tDs5-3: 5'-TACCTCGGGTTCGAAATCGAT-3'

tDs5-4: 5'-TACGATAACGGTTCGGTACGG-3'

3.2 Methoden

Restriktionsendonukleasespaltung von DNA

Die hydrolytische Spaltung von Vektor-DNA wurde nach Angaben der Hersteller mit den den Enzymen entsprechenden Puffern durchgeführt.

Isolation von DNA-Fragmenten

Von PCR-Reaktionen oder Restriktionsendonukleasespaltungen stammende DNA-Fragmente wurden durch Elution aus Agarosegelen (Sambrook et al. 2001) gereinigt und isoliert.

Ligation

Die Ligation von DNA wurde mit T4 DNA Ligase (Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Dazu wurden 50-100 ng Vektor-DNA mit dem jeweiligen DNA-Fragment in molaren Verhältnissen von 1:3 bis 3:1, dem entsprechenden Puffer und 2 bis 5 U T4 Ligase in 20 µl Reaktionsvolumen über Nacht bei 15 °C inkubiert.

Herstellung RbCl₂-kompetenter Bakterien

100 ml LB-Medium wurden mit 1ml einer Übernachtskultur des jeweils verwendeten *E.coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD von 0,6 inkubiert. Nach Sedimentation (3000 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in 7,5 ml TfbI unter ständiger Kühlung resuspendiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert.

Nach erneuter Sedimentation (3000 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in 4ml TfbII aufgenommen. 50 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation von Bakterien

Transformationen erfolgten in Anlehnung an die sog. *Hitzeschock Methode* (Dagert et al. 1998).

Ein Aliquot der transformationskompetenten Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und 30 min mit 3 µl eines Ligationsansatzes bzw. 1 µl einer Plasmidpräparation inkubiert. Der Ansatz wurde 1 min auf 37 °C erwärmt, 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 1ml LB-Medium 1h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch kurze Zentrifugation sedimentiert, in 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar Nährböden mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

Plasmid-Minipräparation

Die Isolierung von *high-copy* Plasmiden erfolgte aus 5-10 ml Übernachtskultur mit dem entsprechenden Kit nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden).

Plasmid–Maxipräparation

Low-copy Plasmide wurden aus 100 ml Übernachtskultur mit einem geeigneten Kit nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) isoliert.

RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial (Logemann et al 1987)

Alle Geräte wurden zuvor auf -80°C gekühlt. Das Pflanzenmaterial war nach der Ernte sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert worden. Kleinere Mengen Gesamt-RNA wurden mit dem entsprechenden Kit nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Ausbeute betrug dabei bis zu $75\ \mu\text{g}$ aus 100 mg Pflanzenmaterial.

Für größere Mengen wurden 5 - 10 g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zu sehr feinem Pulver gemörsert, anschließend mit 10 ml Lysispuffer, 10 ml Phenol und $100\ \mu\text{l}$ Mercaptoethanol versetzt und 20 min mit dem Überkopfschüttler durchmischt. Nach Zugabe von 5ml Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) wurde weitere 20 min auf dem Überkopfschüttler gemischt und danach durch Zentrifugation die Phasen getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen.

Die Phenol-Chloroform Extraktion wurde so oft wiederholt, bis kaum mehr eine Interphase erkennbar war.

Die wässrige Phase wurde in ein eisgekühltes Gefäß überführt, mit 1/10 des Volumens 3 M NaAc pH 5,2 und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt. Nach Inkubation bei -80°C für 30 min wurden die Nucleinsäuren durch Zentrifugation (30min, 3000 g) sedimentiert und das Sediment in 5 ml sterilem Wasser resuspendiert.

Zur selektiven Fällung der RNA wurden 5 ml 4 M LiCl zugegeben und über Nacht bei 3°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die RNA sedimentiert (30min, 3000 g), in 1,8 ml Wasser resuspendiert und nochmals mit 3M NaAc pH 5,2 und Ethanol 96% (v/v) gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment noch zweimal mit eiskaltem 70%Vol. Ethanol gewaschen.

Das Verhältnis OD_{260} / OD_{280} sollte danach unter 2 liegen, da sonst zu starke Verunreinigungen vorliegen.

Quantifizierung von Nukleinsäuren

DNA und RNA wurden photometrisch (Eppendorf, DNAquant) durch die Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ DNA bzw. 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ RNA. Es wurden jeweils Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen gebildet.

Präparation genomischer DNA aus Arabidopsis thaliana (Fulton et al.)

In einem Eppendorfgefäß wurden drei Jungpflänzchen aus der Sterilanzucht in flüssigem Stickstoff gefroren, im gefrorenen Zustand gemörsert und anschließend mit 700 μl Harnstoff-Extraktionspuffer versetzt und kurz gevortext. Nach Zugabe von 700 μl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1) wurde für 15min bei heftigem Schütteln inkubiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (5min, 12.000rpm, Raumtemperatur) sedimentiert.

Die wässrige Phase wurde abgenommen und in einem frischen Eppendorfgefäß mit 10 μl 3M Na-Acetat (pH 5.2) versetzt. Nach einigen Sekunden (nachdem sich die Farbe der Lösung verändert hat) wurde ein 0.7-faches Volumen Isopropanol zugegeben. Durch Zentrifugation (5min, 12.000rpm, Raumtemperatur) wurde die DNA sedimentiert.

Nach Entfernen des Überstandes wurde das Sediment in 500 μl TE Puffer resuspendiert, mit 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH 5.2) vermischt und dann mit dem zweifachen Volumen 96%igem Ethanol versetzt.

Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Sediment getrocknet und in 50 μl TE-Puffer resuspendiert.

1 μl dieser DNA Präparation ergab das Ausgangsmaterial für die im folgenden beschriebene TAIL-PCR.

TAIL-PCR für die Amplifikation Insert-flankierender DNA

adaptiert nach Liu et al. 1995,

1.) Reaktionsmischung:

- 11µl steriles A. bidest
- 2µl Ds3-1 Primer-Stammlösung (2µM)
- 3µl AD2 Primer-Stammlösung (20µM)
- 2µl 10x-PCR-Puffer(1,5mM MgCl₂)
- 2µl 10xdNTP (2mM)
- 0.2µl Taq Polymerase

2.) 19µl der Reaktionsmischung wurden in einem PCR-Gefäß zu 1µl genomischer-DNA (siehe oben) hinzupipettiert und durch Pipettieren gut gemischt. Die primäre PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	94°C	1min	
2	94°C	10s	
3	62°C	1min	x4
4	72°C	2.30min	
5	94°C	10s	
6	25°C	3min	
7	0.2°C/s bis 72°C		
8	72°C	2.3min	
9	94°C	10s	
10	69°C	1min	
11	72°C	2.30min	
12	94°C	10s	
13	68°C	1min	
14	72°C	2.30 min	x14
15	94°C	10s	
16	44°C	1min	
17	72°C	2.30min	
18	72°C	5min	
19	4°C (unendlich)		

3.) Das Produkt der vorhergehenden Reaktion wurde 1:50 verdünnt und je 1µl jeder verdünnten Probe wird für eine zweite PCR-Reaktion (sekundäre PCR) verwendet.

Reaktionsmischung:

12µl steriles A. bidest
 2µl 10x-PCR-Puffer (1.5 mM MgCl₂)
 2µl 10xdNTP
 2µl Ds3-2 Primer-Stammlösung (2µM)
 2µl AD2 Primer-Stammlösung (20µM)
 0.2µl Taq Polymerase

4.) Je 20.2µl der zweiten Reaktionsmischung wurden zu je 1µl des 1:50 verdünnten primären PCR-Produktes gegeben. Die sekundäre PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	94°C	10s	
2	64°C	1min	
3	72°C	2.30min	
4	94°C	10s	
5	64°C	1min	x11
6	72°C	2.3min	
7	94°C	10s	
8	44°C	1min	
9	72°C	2.30min	
10	72°C	5min	
11	4°C	unendlich	

5.) Das Produkt der vorhergehenden Reaktion wurde 1:10 verdünnt. 1µl jeder verdünnten Probe wurde für eine dritte PCR-Reaktion (tertiäre PCR) verwendet.

Reaktionsmischung

18µl steriles A. bidest
 3µl 10x-PCR-Puffer (1.5 mM MgCl₂)
 3µl 10xdNTP

3µl Ds3-4 Primer-Stammlösung (2µM)

3µl AD2 Primer-Stammlösung (20µM)

0.5µl Taq Polymerase

6.) Je 30.3µl der zweiten Reaktionsmischung wurden zu je 1µl des 1:10 verdünnten sekundären PCR-Produktes gegeben. Die tertiäre PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	94°C	15s	
2	44°C	1min	x19
3	72°C	2.30min	
4	72°C	5min	
5	4°C	unendlich	

7.) Von den Produkten 1, 2 und 3 jeder Probe wurden je 5µl auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Diejenigen PCR-Produkte, die wegen der versetzten spezifischen Primer die erwartete Größenverringering aufweisen, wurden bei Bedarf aus dem Gel gereinigt und mit dem zuletzt verwendeten Primerpaar erneut amplifiziert und zur Sequenzierung gegeben.

Wurde kein PCR-Produkt erhalten, wurde das gesamte Protokoll mit der Ds5-Primerserie anstelle der Ds3-Primer wiederholt, oder der degenerierte Zufallsprimer ausgetauscht, oder die Primerkombination innerhalb einer Primerserie verändert, so dass die erste PCR mit dem DS3-2 anstelle des Ds3-1 Primers durchgeführt wird, und Ds3-3 anstelle von Ds3-2 in der zweiten PCR verwendet wird. Dasselbe kann ebenso für die Ds5-Primerserie getestet werden.

Oft entstanden ganze Bandenpopulationen, die dann in ihrer Gesamtheit in pCR2.1 Vektoren kloniert und zur Überprüfung der Sequenzidentität sequenziert wurden.

DNase Behandlung von RNA-Präparationen

Um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen, wurden 20 µg RNA mit 10 µl Mg²⁺-haltigem und RNase-freiem Puffer (Gibco 5 x RT Puffer) und 2µl DNase (Boehringer) in einem Gesamtvolumen von 50µl 1 h bei 37 °C inkubiert.

cDNA Synthese

cDNA Synthesen wurde mit *random hexamer* (p(dN)₆) Oligonukleotiden und Moloney-Murine-Leukemia-Virus Reverse-Transkriptase (RT) (M-MuLV, Gibco, *Superskript*) durchgeführt. Dazu wurde mRNA aus 2µg gesamt-RNA mit 2,5 µl p(dN)₆ (100ng/µl) gemischt und durch Erhitzen auf 70°C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis (3 min) wurde 7 µl 5x RT-Puffer (Gibco), 3 µl DTT und 1,5 µl 10 mM dNTP's zugegeben und zum *annealing* der Primer 10 min auf 25°C erwärmt. Vor der Zugabe von 1 µl *Superskript* wurden 5 µl als Kontrolle auf Kontaminationen mit genomischer DNA für die nachfolgende PCR abgenommen. Der fertige Ansatz wurde 1 h bei 42 °C inkubiert.

PCR

Für die Überprüfung von Klonierungen wurden als Template Teile einzelner Kolonien und vektorspezifische Primer verwendet.

Die Ansätze enthielten:

Template: Bakterien

je 1 µl *sense* und *antisense* Primer (Endkonzentration je 0,5µM)

2,0 µl 10 x Puffer

2,5 µl dNTP's (Endkonzentration je 2,5nM)

0,2 µl Taq DNA-Polymerase (10 U/µl)

ad 20µl

Quantitative real time PCR

Real time PCR Reaktionen wurden mit den *real time* PCR-Geräten GeneAmp 5700 und GeneAmp 7000 (PE Applied Biosystems) durchgeführt.

Bei der *real time* PCR wird dem PCR-Ansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugesetzt, der mit Doppelstrang-DNA einen charakteristisch fluoreszierenden Komplex eingeht. Somit lässt sich bei jedem Temperaturzyklus der PCR der Anstieg der Fluoreszenz als Maß für die Produktentstehung verfolgen (daher „Echtzeit“-PCR). Zudem kann am Ende der Reaktion eine Schmelzkurve des Produktes aufgenommen werden. Dadurch ist überprüfbar, ob mehrere Produkte entstanden

sind. Von großem Wert ist, dass dies auch bei gleichgroßen Produkten an einer starken Verbreiterung der Schmelzkurve erkennbar ist.

Die Daten über den Anstieg der Fluoreszenz bei der PCR-Reaktion lässt auf die Ausgangsmenge der amplifizierten Sequenz schließen. Dazu wird die Anzahl der Temperaturzyklen (C_t -Wert) bestimmt, ab der die Fluoreszenz einen fixen Wert innerhalb der exponentiellen Phase der Reaktion erreicht (Gibson et al. 1996).

Je höherer der C_t -Wert beispielsweise ist, je mehr Zyklen also notwendig sind, um den einer bestimmten Produktmenge entsprechende Fluoreszenzwert zu erreichen desto geringer war die Ausgangsmenge der amplifizierten DNA.

Um die unterschiedlichen Mengen verschiedener cDNAs vergleichend quantifizieren zu können, muss die Effizienz der Reaktionen mit den unterschiedlichen Primerpaaren identisch sein.

Ein Störfaktor ist die nicht direkt messbare Effizienz der vorangegangenen cDNA-Synthese. Um hier ein einheitliches Maß zu bekommen, wurden die C_t -Werte auf interne Standards bezogen. Dieser Standard muss ein stabiles Expressionsniveau in den zu untersuchenden Geweben oder Zuständen zeigen.

Das Verhältnis zweier cDNA Mengen ist: $2^{-(\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2)}$

ΔCt_1 : Differenz des C_t -Wertes der Referenz cDNA und des C_t -Wertes für den internen Standard

ΔCt_2 : Differenz des C_t -Wertes der zu bestimmenden cDNA und des C_t -Wertes für den internen Standard dieser c-DNA

Die Reaktionen wurden in 96-well Multititerplatten in einem Gesamtvolumen von 25µl durchgeführt. Für Arabidopsis wurden die internen Standards 18S RNA (Oligonukleotide 48 und 49) und Ubc18 (Oligonukleotide 46 und 47). Für Tagetes wurde Tubulin verwendet (Oligonukleotide 26 und 27).

Temperaturprogramm:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	50°C	2min	
2	95°C	10min	
3	95°C	15s	
4	60°C	1min	x40
5	4°C	unendlich	

Die Reaktionsansätze enthielten:

c-DNA von 50 ng gesamt RNA	5,0 µl
Primer 10mM (Endkonzentration je 300nm) je	1,5 µl
SYBR-Green PCR Mastermix (Applied Biosystems):	14,0 µl
ad	25 µl

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifikation bzw. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Restriktionsenzymspaltungen oder PCR-Ansätzen wurden je nach Größe der Fragmente Agarosegele mit 1-2,2 % (w/v) Agarose verwendet.

Den Gelen wurden 0,3 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und in 1xTAE horizontal mit Feldstärken zwischen 2 und 6 V/cm verwendet.

Zur Auftrennung von RNA wurden formaldehydhaltige Gele mit 1,2 % (w/v) Agarose und 0,3 µg/ml Ethidiumbromid verwendet.

Dazu wurde 218 ml Wasser mit 3,6 g Agarose und 30 ml 10 x MOPS aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 65°C wurden 52 ml Formalin (2,3 M) zugegeben und nach kurzem Rühren sofort in die Gelträger gegossen.

Pro Bahn wurde die RNA, die zuvor im Probenpuffer für 10 min auf 70°C erhitzt worden war, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 0,5 V/cm für 12 h.

Dünnschichtchromatographie

100mg Pflanzenmaterial wurde dreimal mit etwa 750µl Aceton extrahiert. Dieser Lösungsmittlextrakt wurde im Vakuum zur Trockne einrotiert (erhöhte Temperaturen von 40-50°C sind tolerabel). Danach erfolgte Zugabe von 300µl Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) und gute Durchmischung. Schwebstoffe wurden durch Zentrifugation (1-2 Minuten) sedimentiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der verbleibende Rest wurde erneut mit 200µl Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) extrahiert und Schwebstoffe durch Zentrifugation sedimentiert. Die beiden Extrakte wurden zusammengeführt (Volumen 500µl) und die Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wurde in 30µl Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) resuspendiert und auf eine Dünnschichtplatte (Silica-Gel 60, Merck) aufgetragen. Falls mehr als eine Auftragung für präparativ-analytische Zwecke erforderlich war,

wurden mehrere Aliquots von jeweils 50-100 mg Pflanzenmaterial in der beschriebenen Weise für die dünnschichtchromatographische Trennung aufbereitet. Die Dünnschichtplatte wurde in Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) entwickelt.

Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

50-100mg Pflanzenmaterial wurde dreimal mit etwa 750µl Aceton extrahiert. Dieser Acetonextrakt wurde im Vakuum zur Trockne einrotiert (erhöhte Temperaturen von 40-50°C sind tolerabel). Die Carotinoide wurden in 180µl Aceton aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung homogenisiert. Zur Verseifung der Carotinoidester wurden 20µl 10% KOH in Methanol zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde 10min bei 10000g zentrifugiert. Die gelösten Carotinoide im klaren Überstand wurden mittels HPLC (Waters) unter Verwendung einer C30-Säule getrennt und anhand von synthetischen Referenzsubstanzen quantifiziert werden.

Folgende Bedingungen wurden verwendet.

Trennsäule: Prontosil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg, Germany)

Flussrate: 1.0 ml/min

Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol

Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether

Gradientenprofil:

Zeit (min)	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
1.00	1.0	95.0	5.0	0
12.00	1.0	95.0	5.0	0
12.10	1.0	80.0	5.0	15.0
22.00	1.0	76.0	5.0	19.0
22.10	1.0	66.5	5.0	28.5
38.00	1.0	15.0	5.0	80.0
45.00	1.0	95.0	5.0	0
46.0	1.0	95.0	5.0	0

Detektion: 300-530 nm

Die Spektren wurden direkt aus den Peaks unter Verwendung eines Photodiodenarraydetektors (PDA) bestimmt. Die isolierten Substanzen wurden über ihre Absorptionsspektren und ihre Retentionszeiten im Vergleich zu Standardproben sowie die spezifischen Molekülmassen identifiziert.

Pflanzenanzucht

Tagetes erecta wurde im Gewächshaus bei 18-22°C, 16h Licht (90-110µE) und einer Luftfeuchtigkeit von 70% kultiviert.

Arabidopsis thaliana

Kurztag: 8h Licht, 70% relative Luftfeuchte, Temperatur 18-20°C.

Langtag: 6h Licht (120-140µE), Temperatur 18-20°C, relative Luftfeuchte 70%.

Genetische Transformation von Arabidopsis thaliana

Für die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation wurde der Agrobakterienstamm C58C1pMP90 (Clough et al.1998) verwendet. *Arabidopsis Col 0* wurde nach der *floral dip* Methode (Clough et al. 1998) transformiert.

Die Agrobakterien mit den zu transformierenden Binärkonstrukten wurden über Nacht bei 28°C in 50ml YEB Medium mit den Antibiotika Rifampizin, Spectinomycin und Gentamycin angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 7000 Upm sedimentiert und das Sediment im gleichen Volumen 0,5% Saccharoselösung + 0,05% Silwet L-77 (Lehle Seeds) suspendiert.

Die 10 Tage alten *Arabidopsis* Pflanzen wurden für etwa 10s in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend für einen Tag abgedeckt um Verdunstung zu minimieren. Die Pflanzen wurden im Langtag zur Reife gebracht.

Das Saatgut dieser Pflanzen wurde mit Ethanol/Hypochlorit Lösung (ein Teil 4%ige Hypochlorit-Lösung + vier Teile Ethanol (96%); Endkonzentration 0.8% Hypochlorit). sterilisiert. Die zu sterilisierenden Samen wurden in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml Ethanol/Hypochlorit Lösung inkubiert. Für größere Saatgutmengen erfolgte die Inkubation in einem 15 ml Falcon-Röhrchen mit entsprechend größerem Flüssigkeitsvolumen von 5-8 ml. Die Inkubationszeit beträgt max. 10 min, da längere Inkubationszeiten zur Beschädigung des Saatgutes führen können. Anschließend

wurde drei Mal mit 1ml Ethanol (96%Vol.) gewaschen. Die Samen wurden bei geöffnetem Deckel im Luftstrom unter der Sterilbank getrocknet.

Die so sterilisierten Samen wurden auf MS Agar ohne Saccharose mit Kanamycin (50 mg/l) angezogen.

Genetische Transformation von Tagetes erecta

Zur genetischen Transformation von *Tagetes erecta* wurde der Agrobakterienstamm EHA105 (Hood et al. 1996) verwendet. Die zur Transformation verwendete Sorte war Zitronenprinz (IPK Genbank Sortiment Nummer: TAG76, Zierpflanzensammlung Erfurt: Sortimentsnummer: 8184,00). Die Methode ist in Kunze et al. 2001 publiziert.

In Kürze: Blätter von etwa 6 Wochen alten, steril angezogenen *Tagetes* Pflanzen wurden in ca. 0,5 cm² große Stücke geschnitten. Die Blattstücke werden für 20 min mit einer Agrobaktériensuspension in MS Medium (EHA 105, OD₆₀₀=0,1) bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Kokultivierung fand auf MS Agar mit 2% Saccharose, 1mg/l IAA (Duchefa), 3 mg/l BA (Duchefa) pH 5,8 für 6d bei 21°C, 16h Licht statt.

Zur Selektion wurden die Blattstücke auf Selektionsmedium mit MS Sigma M 5519 500 mg/l MES, 2 % Saccharose, pH 5.8, 0.7 % Plant Agar (Duchefa P1001), 3 mg/l BA (Duchefa), 1 mg/l IAA (Duchefa), 250 mg/ml Timentin (Duchefa), 1 mg/ml Phosphinotricin (PPT, Duchefa) transferiert und für 10-14d bei 21°C und 16h Licht inkubiert.

Die Regeneration fand auf MS Medium mit MS Sigma M 5519, 500 mg/l MES, 2 % Saccharose, pH 5.8, 0.7 % Plant Agar (Duchefa P1001), 0.5 mg/l IBA, 0.5 mg/l GA₃, 250 mg/ml Timentin (Duchefa) und 1 mg/ml PPT (Duchefa) statt. Regenerierte Sprosse wurden auf Bewurzelungsmedium transferiert (wie Regenerationsmedium aber ohne GA₃).

GUS-Färbung (Martin et al. 1987)

X-Gluc Stammlösung: 40mg/ml in Dimethylformamid (DMF)

(X-Gluc von Duchefa [X1405] 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-Glucuronid)

Färbungspuffer:

100mM NaH ₂ PO ₄	14g
10mM Na ₂ EDTA	3.7g
0.5mM K-Ferrocyanid (MW422.4 g/mol)	210mg
0.5mM K-Ferricyanid (MW 329.3 g/mol)	170mg
Triton x-100	1ml
	ad 1000ml, pH 7,0

Die gebrauchsfertige Färbelösung wurde durch Zusetzen von 100µl X-Gluc-Stammlösung zu 8ml Färbepuffer hergestellt. Die Färbelösung ist nicht langfristig haltbar, deshalb wurde immer nur der Tagesbedarf angesetzt und bis zur Verwendung kühl gelagert (auf Eis oder im Kühlschrank).

Die Färbelösung wurde per Unterdruck im Exsikkator in die Pflanzengewebe infiltriert, bis in der Lösung Luftbläschen aufstiegen.

Danach wurden die verschlossenen Schalen bei 37°C für 48h inkubiert.

Entfärbung der Gewebe (Martin et al.1987)

Die Entfärbung der Gewebe erfolgte durch ethanolische Extraktion des Chlorophylls bei Raumtemperatur.

Im Anschluß an die 37°C-Inkubation zur Färbung wurde die Färbelösung abgenommen. Das Chlorophyll wurde aus dem Pflanzenmaterial extrahiert, indem sukzessive für 30 min in 30% (v/v) Ethanol, für eine Stunde in 70% (v/v) Ethanol und bis zur kompletten Entfärbung in 96% (v/v) Ethanol inkubiert wurde.

Nach vollständiger Entfärbung wurde eine absteigende ethanolische Reihe mit je 30 bis 60 min Inkubationszeit bei 70% Ethanol und dann 30% Ethanol vorgenommen. Anschließend wurden die Proben ca. 15 min in A. bidest (steril) inkubiert und dann in 10% Glycerin gelagert.

Proteinbestimmung (Bradford 1976)

Der Proteingehalt von Extrakten aus Pflanzengewebe wurde nach Bradford mit dem Biorad Proteinassay bestimmt. Die Eichkurve wurde mit BSA als Standard angefertigt.

GUS-Enzymaktivitätsmessung (Jefferson 1987)

Zur Messung der GUS Enzymaktivität wurden 25 mg Pflanzengewebe gemörsert und mit Extraktionspuffer (50mM Na Phosphat, pH 7; 10mM Mecaptoethanol; 10mM EDTA; 0,1% Triton) gemischt. Das unlösliche Pflanzenmaterial wurde durch Zentrifugation (10000g; 10min) sedimentiert. Je 10 μ l des Überstandes wurden in Multititerplatten zur Messung der GUS-Enzymaktivität vorgelegt. Nach der Zugabe von 90 μ l Reaktionspuffer (Extraktionspuffer + 2mM Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid) wurde die Entstehung von Methylumbelliferon (MU) pro Minute fluorimetrisch (Anregungswellenlänge: 320nm; Emissionswellenlänge: 405nm) im Bezug zu einer Eichreihe von 10 bis 5000 pmol MU bestimmt. Die Werte wurden auf die nach Bradford bestimmte Proteinmenge bezogen.

4. Ergebnisse

4.1 Identifikation blütenspezifischer Promotoren

Zur Identifikation von blütenspezifischen Promotoren, die zur Expression einer Lycopin- β -Cyclase in der Blüte von *Tagetes* verwendet werden sollten, wurden Expressionsdaten der Cold Spring Harbor Laboratories (CSHL) Arabidopsis Transposon-Mutanten-Kollektion genutzt (Martienssen et al. 1998).

Die CSHL Mutantenkollektion umfasst Arabidopsis-Linien mit zwei unterschiedlichen Transposons. Die sog. *Enhancer Trap* Linien (ET) enthalten ein Transposon, dessen Reporter gen mit dem Minimalpromotor des CaMV 35S Promotors ausgestattet ist. Der Minimalpromotor allein ermöglicht jedoch keine Expression des β -Glucuronidase Reportergens (Hull et al. 1995), sondern ist auf die Mitwirkung eines Enhancer Elementes angewiesen, um GUS-Expression hervorzurufen.

Bei den Gene Trap Linien (GT) ist dieser Minimalpromotor nicht vorhanden. Eine Expression des GUS-Reporters ist daher nur zu beobachten, wenn das Transposon und damit das Reporter gen 3' einer Promotorregion mit eigenem Transkriptionsstart insertiert ist. Da vollständige Promotoren mit eigenem Transkriptionsstart identifiziert und isoliert werden sollten, wurden nur Expressionsmuster von GT-Linien berücksichtigt.

In dem bei der SunGene GmbH & Co. KGaA durchgeführten Screening von Linien aus der CSHL-Kollektion wurden unter 10000 GT Linien 15 Linien gefunden, bei denen die GUS-Expression weitgehend auf die Blüte beschränkt war. Aufgrund der Stringenz und der Stärke der GUS-Expression in der Blüte wurden die Linien GT6057, GT7638 und GT8400 ausgewählt (Abb. 7), deren weitere Analyse im Folgenden beschrieben ist.

4.1.2. Feststellung der Transposon-Insertionsorte

Prinzipiell stehen mehrere Methoden zur Feststellung der Transposon-Insertionsorte durch Amplifikation der Transposon-flankierenden chromosomalen Sequenzen zur Verfügung. Die beiden am häufigsten genutzten PCR-Verfahren sind inverse PCR

(iPCR; Raponi et al. 2000) und *Thermal Asymmetric Interlaced PCR* (TAIL PCR; Liu et al. 1995). Für die Amplifikation Transposon-flankierender Sequenzen mittels iPCR wird genomische DNA mit einem Restriktionsenzym komplett verdaut. Anschließend werden die einzelnen Fragmente mit sich selbst ligiert, also mit sich selbst zu ringförmigen Molekülen verbunden. In der Vielzahl dieser ringförmigen DNA-Moleküle befinden sich auch solche, die das Transposon enthalten. Da dessen Sequenz bekannt ist, kann das Transposon-tragende, ringförmige Molekül mittels PCR amplifiziert werden, indem ein Primerpaar verwendet wird, bei dem sich beide Primer an das Transposon anlagern können.

TAIL-PCR beruht auf der Verwendung von einem Satz spezifischer, überlappend versetzter (*nested*) Primer, die sich an die bekannte Transposonsequenz anlagern, und einem Satz kürzerer, degenerierter Primer mit niedrigerer Schmelztemperatur.

Die Anlagerung der Primer an die zu amplifizierende DNA kann mit einer solchen Primerkombination so gestaltet werden, dass eine spezifische Amplifikation der gewünschten Zielsequenz möglich wird.



Abb.7 Vergleich der GUS-Expressionsmuster in den GT Linien 6057, 7638 und 8400. Die Pflanzen wurden identischen Färbeprotokollen unterzogen

Mit TAIL-PCR waren die Transposon-flankierenden Sequenzen der GT-Linie 6057 bereits durch die CSHL amplifiziert und sequenziert worden und in einer über das Internet zugänglichen Datenbank veröffentlicht worden (<http://genetrap.cshl.org>).

Die Sequenzen, die mit Primerkombinationen für den 3' und 5' Bereich des Transposons amplifiziert worden waren, wurden durch eine BLAST-Suche (Altschul et al. 1990) zwei weit auseinander liegenden Orten auf dem Chromosom 2 zugeordnet. Daraus war zu schließen, dass hier einer der seltenen Fälle vorlag, in denen eine Pflanze zwei Transposons enthielt. Nach Informationen aus den CSHL sollen über 90% der Linien nur ein Transposon enthalten.

Ein Transposon der GT-Linie 6057 war in Exon 1 einer putativen 3-Ketoacyl-CoA Synthase (At2g46720; Abb.8) inseriert. Das zweite Transposon war in Exon 1 einer putativen Protease (At2g36670) inseriert. Um den Transposon-Insertionsort, der die GUS Expression in der Blüte hervorrief einzugrenzen, wurden weitere veröffentlichte Expressionsdaten der Transposon-markierten Gene zu Rate gezogen.

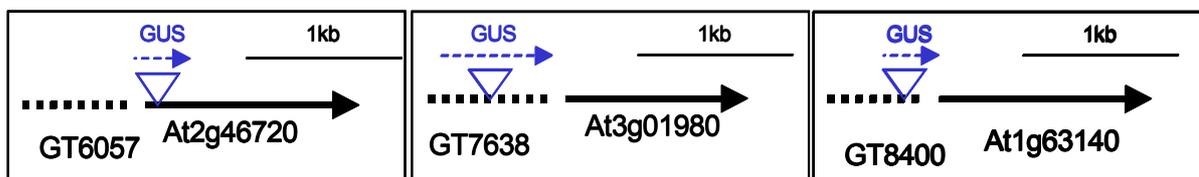


Abb. 8 Schematische Darstellung der Transposon-Insertionsorte in den Linien GT6057, GT7638 und GT8400

Ein Transposon der GT-Linie 6057 war in Exon 1 einer putativen 3-Ketoacyl-CoA Synthase (At2g46720; Abb.8) inseriert. Das zweite Transposon war in Exon 1 einer putativen Protease (At2g36670) inseriert. Um den Transposon-Insertionsort, der die GUS Expression in der Blüte hervorrief einzugrenzen, wurden weitere, veröffentlichte Expressionsdaten der Transposon-markierten Gene zu Rate gezogen.

Gen	GT Linie	Kallus	Blüte	Spross	Wurzel	Schote
At2g46720	6057	0	16	0	0	0
At3g01980	7638	9	235	41	40	106
At1g63140	8400	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

Tab. 2: MPSS Daten der Transposon-markierten Gene der GT Linien 6057, 7638 und 8400. Angaben in ppm. <http://mpss.dbi.udel.edu>; k.A.: keine Angaben

Hinweise auf eine blütenspezifische Expression der 3-Ketoacyl-CoA Synthase ergaben sich aus Expressionsdaten aus *Massively Parallel Signature Sequencing* Experimenten (MPSS; Brenner et al. 2000), die an der University of California, Davis (UC Davis) an verschiedenen Geweben von Arabidopsis durchgeführt wurden und deren Ergebnisse im Internet veröffentlicht sind (Tab.2; <http://mpss.dbi.udel.edu>).

Aus diesen Daten konnte indirekt geschlossen werden, dass der Transposon-Insertionsort im Leseraster, 139 Basen 3' des Startkodons der putativen 3-Ketoacyl-CoA Synthase, die Reporter-gen-Expression in der Blüte hervorrief.

Die Transposon-flankierenden Sequenzen der GT Linie 7638 waren ebenfalls durch die CSHL amplifiziert und sequenziert worden (<http://genetrap.cshl.org>). Sowohl der 5'- als auch der 3'-Bereich deuteten auf den selben Insertionsort hin. Das Transposon war demnach 616 Basen 5' des Startkodons einer putativen Dehydrogenase (At3g01980; Abb.8) inseriert. Die Orientierung des GUS-Leserasters war analog zu dem der Dehydrogenase. Für die Dehydrogenase wurde mit Daten aus MPSS- Experimenten eine nicht streng blütenspezifische Expression festgestellt (Tab.2; <http://mpss.dbi.udel.edu>).

Zur Identifikation des Insertionsortes im Genom der GT Linie 8400 zeigten die Ergebnisse der TAIL-PCR eine Transposon-Insertion 309 Basen 5' des Startkodons einer putativen Koffeinsäure-O-Methyltransferase (At1g63140; Abb.8) an. Es lagen keine MPSS-Expressionsdaten zu diesem Gen vor.

4.1.3 Die Expressionsmuster der Transposon-markierten Gene

GUS-Expression war bei den Linien GT6057, GT7638 und GT8400 ausschließlich in der Blüte zu beobachten, wobei die Expression aufgrund der Intensität der histochemischen Färbung nicht in allen Geweben der Blüte gleichmäßig stark zu sein schien.

In der Linie GT6057 wurde der Reporter GUS hauptsächlich in den Petalen, Antheren und Sepalen exprimiert. Bei GT7638 war die histochemische Färbung auf die Petalen und Sepalen beschränkt. GT8400 zeigte nur in den Petalen eine detektierbare GUS-Expression.

Daten aus MPSS-Experimenten, in denen die relativen Expressionsniveaus in verschiedenen Geweben gemessen wurden, bestätigten eine blütenspezifische Expression des in GT6057 Transposon-markierten Gens (Tab.2). Für das Gen der putativen Dehydrogenase, in welches das Transposon bei GT7638 inseriert ist, ergab sich aus den MPSS-Expressionsdaten eine nicht streng blütenspezifische Expression, die sich in der durch histochemische Färbung visualisierten GUS-Expression der Transposon-Mutante nicht widerspiegelte (Tab. 2).

Für das Gen der putativen Koffeinsäure-O-Methyltransferase, das in GT8400 mit einem Transposon markiert war, waren keine MPSS-Daten in der Datenbank der UC Davis vorhanden.

Zur Ergänzung der Expressionsdaten aus der histochemischen Färbung von GT6057, GT7638, GT8400 und den MPSS-Daten zu den entsprechenden Transposon-markierten Genen wurden die Verhältnisse der Expressionsniveaus der Transposon-markierten Gene in den verschiedenen Pflanzengeweben im Wildtyp relativ zur Expression in der Blüte mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt. Die Werte wurden auf das Expressionsniveau des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms 18 (Ubc18, At5g42990) als internen Standard bezogen.

Um sicherzustellen, dass die Expressionsniveaus des Referenzgens Ubc18 in den untersuchten Geweben identisch sind, wurden die C_t Werte für Ubc18 und die C_t Werte für die 18S RNA bestimmt.

Die Differenz zwischen den C_t -Werten (ΔC_t) für Ubc18 und für 18S RNA variierte zwischen den Geweben um maximal 0,15 C_t Werte. Ubc18 konnte somit aufgrund eines stabilen Expressionsniveaus in den untersuchten Geweben als interner Standard herangezogen werden (Tab.3).

	Blüte	Blatt	Stängel	Schote
C_t Ubc	23,34 +/- 0,11	23,70 +/- 0,10	23,62 +/- 0,04	23,61 +/- 0,04
C_t 18SRNA	14,32 +/- 0,06	14,59 +/- 0,03	14,47 +/- 0,04	14,59 +/- 0,03
ΔC_t	9,03 +/- 0,12	9,11 +/- 0,10	9,15 +/- 0,06	9,02 +/- 0,04

Tab. 3: Differenz der C_t -Werte von Ubc18 und 18S RNA in 4 Geweben von *Arabidopsis thaliana* Columbia 0. Es wurden die Oligonukleotide 46/47 (Ubc18) und 48/49 (18S RNA) sowie cDNA aus 100ng gesamt-RNA verwendet.

Die *real time* PCR Messungen der Expressionsniveaus in den Geweben Blüte, Blatt, Stängel und Schote zeigten, dass keines der untersuchten Gene ausschließlich in der Blüte exprimiert ist (Abb. 9). Ein relativ hohes Expressionsniveau in der Blüte konnte jedoch für alle drei Gene bestätigt werden.

Die MPSS-Expressionsdaten der putativen Dehydrogenase, in deren Gensequenz bei GT7638 ein Transposon insertiert ist, wurden durch die Ergebnisse der *real time* PCR Messungen bestätigt.

Bei GT6057 widersprachen sich die Ergebnisse aus MPSS und *real time* PCR. Die Daten der MPSS Experimente zeigten eine hohe Spezifität für die Blüte, die sich mit den *real time* PCR Experimenten nicht bestätigen ließ. Die sehr geringe absolute

mRNA-Menge (16ppm) der in GT6057 Transposon-markierten putativen 3-Ketoacyl-CoA Synthase, die mit MPSS gemessen wurde, könnte jedoch auch auf einen Messfehler hindeuten.

Die GUS-Expressionsmuster entsprachen bei GT6057, GT7638 und BT8400 nicht in vollem Umfang dem mit *real time* PCR festgestellten Expressionsmuster der Transposon-markierten Gene im Wildtyp.

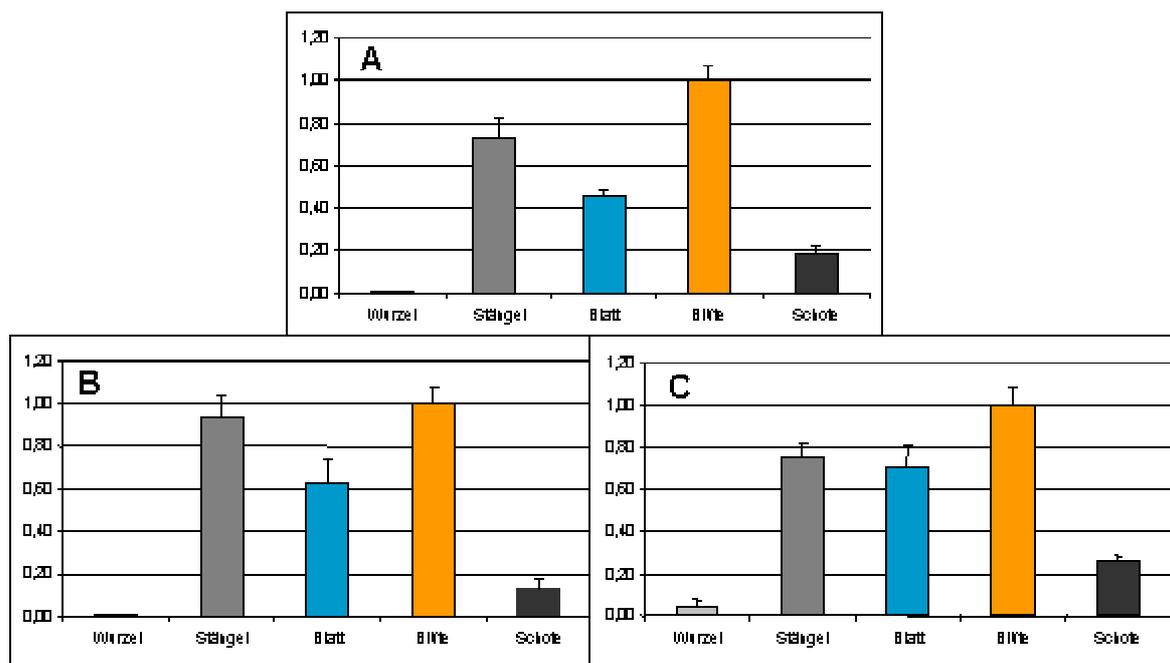


Abb.9 Expressionsniveaus der Transposon-markierten Gene in **A**: At2g46720 (GT6057), **B**: At3g01980 (GT7638) und **C**: At1g63140 (GT8400) relativ zur Blüte (Blüte=1,00) im Wildtyp. Ermittelt mit quantitativer *real time* PCR. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von 9 Einzelmessungen pro Gen und Gewebe.

4.2 Isolation und Analyse der Promotoren

4.2.1 Isolation der Promotorfragmente

Durch die Identifikation der Transposon-Insertionsorte im Genom von GT6057, Gt7638 und GT8400 waren die Promotorregionen mit den zuvor beschriebenen Eigenschaften lokalisiert.

Zur Isolation funktioneller Promotorfragmente war nun zu entscheiden, wie viele Nukleotide die isolierten Promotorfragmente umfassen sollen und ob die Startpunkte

der Promotorfragmente durch die Insertionsorte der Transposons bestimmt werden oder bis an das Startkodon des nächstgelegenen Leserasters reichen sollen (Abb.10).

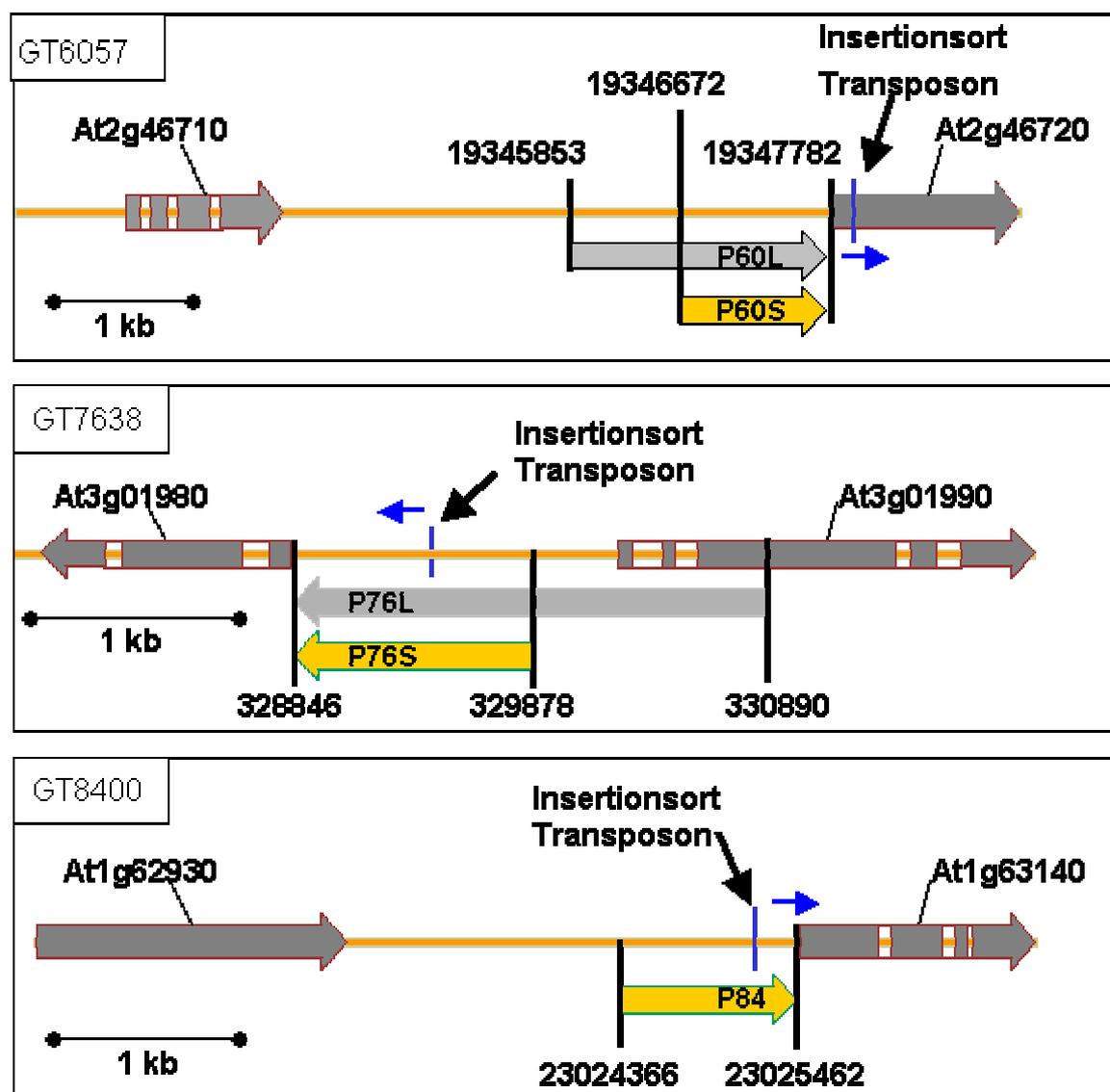


Abb. 10 Schematische Übersicht der Insertionsorte der Transposons und der Koordinaten der isolierten Promotorfragmente auf den entsprechenden Chromosomen. L = 2kb; S = 1kb. Kodierende Sequenzen mit angedeuteten Intronbereichen. Blauer Pfeil: Leserichtung des auf dem Transposon kodierten GUS-Gens.

Zur Isolation der Promotoren mittels PCR wurden die 3'-terminalen Primer so gewählt, dass die Promotorfragmente möglichst nahe an das Startkodon des nächstgelegenen Leserasters reichten. Dadurch sollte erreicht werden, dass bei der Herstellung von Fusions-Genen mit den isolierten Promotorfragmenten Gene entstehen, deren untranslatierte Bereiche (UTR) den UTRs natürlicher Gene entsprechen. Hierdurch sollten negative Einflüsse auf die mRNA-Stabilität und die

Initiation der Transkription vermieden werden. Im denkbaren Fall von unerwünschten Unterschieden im Expressionsmuster zwischen den isolierten Promotorfragmenten und den GUS-Expressionsmustern in den GT-Linien wären dann in einem zweiten Schritt eine gezielte Optimierungen hinsichtlich der Spezifität der Promotorfragmente möglich.

Die Promotorfragmente wurden mit ca. 1kb Länge so gewählt, dass sie zur Herstellung von Gen-Fusionen gut handhabbar waren. Zusätzlich wurden für die Promotoren der Gene At2g46720 und At3g01980 auch ca. 2kb lange Fragmente isoliert.

Die Promotorfragmente wurden analog der GT-Linie, mit der sie als blütenspezifisch identifiziert worden waren und der Länge des isolierten Fragmentes benannt. Sie wurden mittels PCR mit genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* Col-0 als Matrize und den entsprechenden Primerpaaren (Oligonukleotide 3 bis 11) isoliert. Die Primersequenzen enthielten für alle Promotorfragmente die Restriktionsschnittstellen Sall am 5'-terminalen Ende des Promotors und SmaI am 3'-terminalen Ende des Promotors.

4.2.2 Analyse der Promotorsequenzen

Die Genexpression wird durch spezifische Kombinationen von cis-aktiven Elementen sowie die Verfügbarkeit und Aktivität der an sie bindenden Transkriptionsfaktoren (trans-aktiven Elementen) reguliert. Die meisten bisher charakterisierten pflanzlichen Transkriptionsfaktorbindestellen (TBS) umfassen Core Sequenzen von vier bis sechs Basen, die in eine Matrix von bis zu 20 Basen eingebunden sind. In der Datenbank der *Matinspector* Promotoranalyse Software (Genomatix GmbH, München) waren zum Zeitpunkt der Arbeit 101 Bindestellen von 50 Transkriptionsfaktor-Familien verzeichnet.

Die Promotoren P60S, P76S und P84 wurden mit der Software *Matinspector* (Genomatix GmbH, München) auf die Anwesenheit von bekannten cis-aktiven Elementen untersucht. Bei Verwendung von Standardparametern (*matrix similarity threshold: optimized; core similarity threshold: 0,75*) fanden sich in der Sequenz von P60S 49, in P76S 62 und in P84 61 potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen in den Promotorsequenzen.

Eine Einschränkung auf potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen, die in den 1kb langen Fragmenten aller drei blütenspezifischen Promotoren vorkommen, ergab 19 potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen (Tab.4).

Transfac ID	Familie	Optimierter Matrix-Ähnlichkeitswert	Länge	Referenz	P60S	P76S	P84S
P\$AGL2.01	Agamous like factors	0.82	21 bp	Huang H. et al 1996	1	1	2
P\$ATHB1.01	Arabidopsis homeobox protein	0.87	13 bp	Sessa G. et al. 1993	6	5	5
P\$ATHB5.01	Arabidopsis homeobox protein	0.89	13 bp	Johannesson H. et al. 2001	6	4	4
P\$ATHB9.01	Arabidopsis homeobox protein	0.77	13 bp	Sessa G. et al. 1998	1	1	1
P\$CCA1.01	Circadian control factors	0.85	15 bp	Wang Z.Y. et al. 1997	1	1	2
P\$DOF1.01	Arabidopsis homeobox protein	0.98	11 bp	Yanagisawa S. et al. 1999	1	2	1
P\$DOF3.01	Arabidopsis homeobox protein	0.99	11 bp	Yanagisawa S. et al. 1999	1	1	1
P\$GATA.01	Plant I-Box sites	0.93	17 bp	Gidoni D. et al. 1989	2	2	1
P\$LEGB.01	Legumin Box family	0.59	27 bp	Baumlein H. et al. 1986	1	1	1
P\$MADSA.01	Floral determination	0.81	17 bp	Riechmann J.L. et al. 1996	1	1	4
P\$MSA.01	M-phase-specific activators	0.80	15 bp	Ito M. et al. 1998	1	3	2
P\$MYBPH3.01	Myb-like protein of Petunia hybrida	0.80	13 bp	Solano R. et al. 1995	3	1	3
P\$MYBPH3.02	Myb-like protein of Petunia hybrida	0.76	13 bp	Solano R. et al. 1995	2	2	5
P\$PBF.01	Arabidopsis homeobox protein	0.97	11 bp	Yanagisawa S. et al. 1999	3	1	2
P\$PBOX.01	Plant P-Box binding sites	0.75	17 bp	Vicente-Carbajosa J. et al. 1997	1	1	2
P\$P_ACT.01	MYB IIG-type binding sites	0.93	15 bp	Grotewold E. et al. 1994	1	1	1
P\$SBF1.01	GT-box elements	0.88	17 bp	Lawton M. A. et al. 1991	5	2	6
P\$SF1.01	GT-box elements	0.79	17 bp	Zhou D.X. et al. 1992	3	2	1
P\$TATA.02	Plant TATA box	0.90	15 bp	Shahmuradov I.A. et al. 2003	1	4	5

Tab.4: Potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen, die in den Sequenzen der Promotoren P60S, P76S und P84 vorkommen sowie deren Anzahl in den einzelnen Promotoren. Die Analysen wurden mit der Matinspector Software (Quandt et al. 2001)) mit folgenden Parametern durchgeführt: *core similarity threshold: 0,75; matrix similarity threshold: siehe Tabelle.*

4.3 Expressionsmuster der Promotorfragmente

4.3.1 Räumliche Auflösung der Promotoraktivität

Die PCR-Fragmente der Promotoren wurden in pCR2.1 TOPO Zero Blunt Vektoren (Invitrogen) kloniert und zur Überprüfung der Sequenzidentität mit dem Primerpaar M13F und M13R sequenziert. Anschließend wurden die Promotorfragmente mit den Restriktionsschnittstellen *Sma*I und *Sal*I aus den TOPO-Vektoren isoliert und in den ebenfalls mit *Sma*I, *Sal*I geöffneten Binärvektor pSUN3 (Heim et al. 2001) ligiert. Der Vektor enthielt 3' der *Sma*I-Schnittstelle die kodierende Sequenz des GUS-Reportergens. Hierdurch entstanden Genfusionen aus den Promotorfragmenten (Abb. 11) und dem GUS-Gen (Abb. 12).

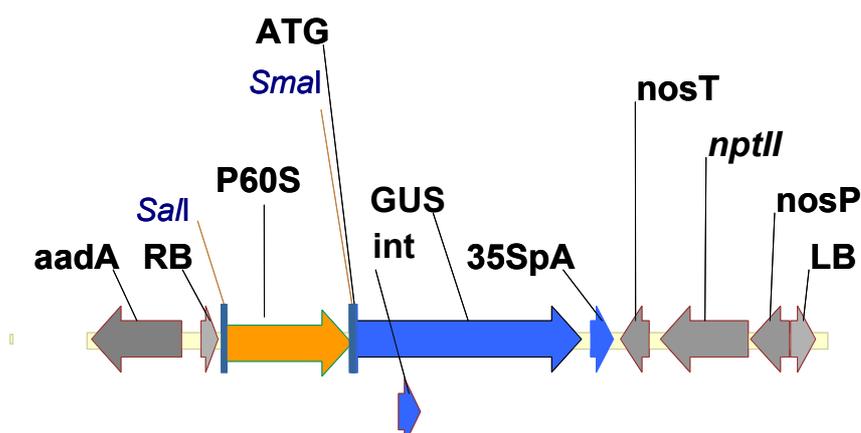


Abb. 11 Schematische Darstellung der T-DNA des Vektors MK1. RB, Rechte T-DNA Grenze, P60S, Promotor P60S; *gus*, β -Glucuronidase; int: Intron (Vancanneyt et al. 1990); 35SpA, 35S Terminator; nosT, nos Terminator; *NptII*, Kanamycinresistenz; nosP, nos Promotor; LB, Linke T-DNA Grenze. *aadA*: Spectinomycin Resistenz

Exemplarisch ist die T-DNA des Vektors MK1 mit dem Promotorfragment P60S in Abb. 11 gezeigt. Die T-DNAs mit den Promotor::GUS Fusionsgenen wurden *Agrobacterium tumefaciens* vermittelt in das Genom von *A. thaliana* Columbia transformiert.

Nach der Selektion transgener Pflanzen auf Kanamycin-haltigem Selektivmedium wurden je 50 Pflanzen pro Promotor::GUS Konstrukt zur Blüte gebracht und der histochemischen Färbung zum gewebespezifischen Nachweis von GUS-Aktivität unterzogen (Abb. 12 bis 17 und Tab. 5).

Die überwiegende Anzahl der Kanamycin-resistenten Pflanzen zeigte durch Blaufärbung der Blüte, dass sie erfolgreich transformiert worden waren. Bei den GUS-Fusionskonstrukten mit den 1kb und 2kb Fragmenten von P76 und P60 war die Anzahl der Pflanzen ohne signifikante GUS-Färbung mit 12 bis 14% gering, während bei fast 50% der P84::GUS Pflanzen keine GUS-Aktivität detektierbar war (Tab. 4). Die aufgrund der Kanamycin-Resistenz vermutete Transgenität der Pflanzen ohne detektierbare GUS-Aktivität konnte jedoch mittels PCR zum Nachweis des GUS-Gens im Genom der entsprechenden Pflanzen bestätigt werden. In diesen Pflanzen waren demnach der Insertionsort der T-DNA mit den Promotor::GUS Fusionen oder andere mit der Transformation zusammenhängende Ereignisse ursächlich für die Inaktivität der Promotor::GUS Fusionskonstrukte in diesen Pflanzen.

Promotor	keine GUS-Färbung	abweichendes Färbemuster
60S	7 (14%)	10 (20%)
60L	6 (12%)	14 (28%)
76S	7 (14%)	10 (20%)
76L	7 (14%)	18 (38%)
84S	23 (46%)	0

Tab. 5: Variation der GUS Expression in 50 Pflanzen pro Promotor::GUS Fusionsgen. Es wurde die Anzahl von Pflanzen bestimmt, die keine signifikante GUS-Expression zeigten bzw. von den entsprechenden, in Abb. 12 bis 17 gezeigten Expressionsmustern abwichen

Die Färbung der Blüten der transgenen Pflanzen war trotz identischem Färbeprotokoll deutlich intensiver als die der entsprechenden GT-Linien.

Die GUS-Expressionsmuster in den Promotor::GUS transgenen Arabidopsis Pflanzen zeigten eine hohe Spezifität der Promotoren für die Blüte (Abb. 16 bis 21). Nebenaktivitäten fanden sich bei der P76S::GUS Fusion in den Hydatoden der Blätter und bei dem längeren Fragment P76L im gesamten Blatt und einigen Blütenstängeln (Abb. 14, Tab.6). Die starke Blaufärbung von jungen Knospenstadien der Blüte bei den P60S::GUS und P60L::GUS-transgenen Pflanzen (Abb. 12), deutete darauf hin, dass diese Promotoren bereits sehr früh in der Blütenentwicklung aktiv werden. Bei P76S::GUS, (Abb. 14) und P84::GUS (Abb.16) war dies nicht der Fall.

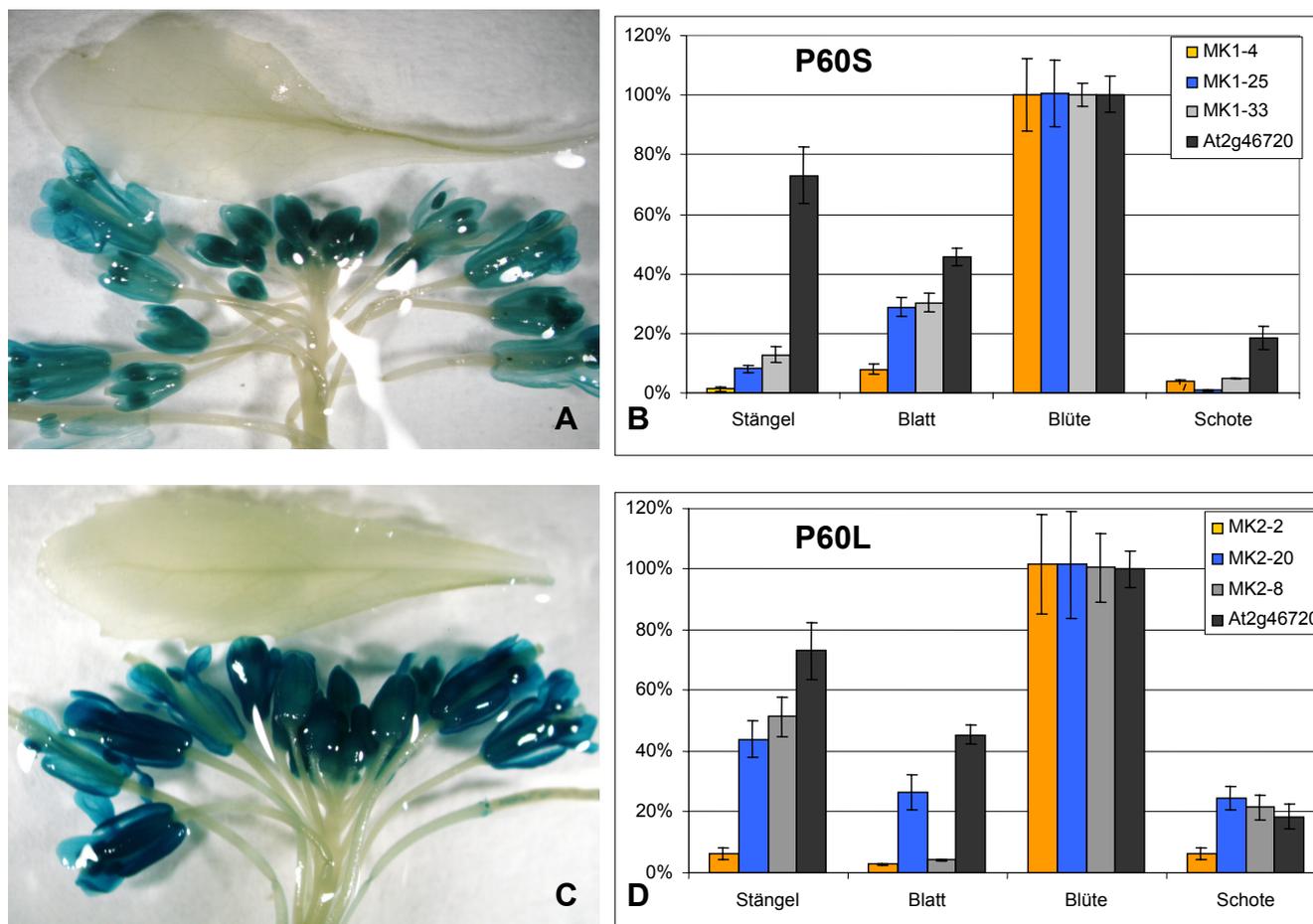


Abb.12: **Links:** Histochemische Färbung zur Visualisierung der GUS-Aktivität. **A:** P60S::GUS; **C:** P60L::GUS transgene Pflanzen. **Rechts:** Vergleich der Verhältnisse der Expressionsniveaus der mRNA von At2g46720 mit den GUS-Expressionsniveaus von je drei transgenen Linien in den Geweben Blüte (=100%), Blatt, Stängel und Schote. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von je drei *real time* PCR Messungen. **B:** P60S::GUS; **D:** P60L::GUS

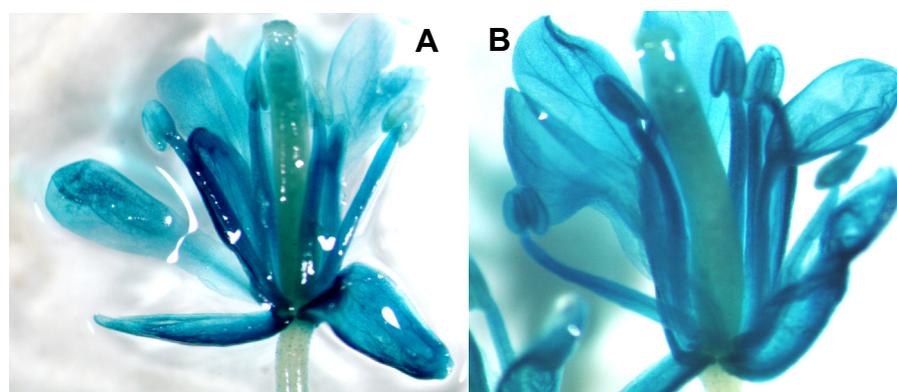


Abb.13: Detailaufnahmen der Blüten der transgenen Pflanzen aus Abb.12.
A: P60S::GUS
B: P60L::GUS

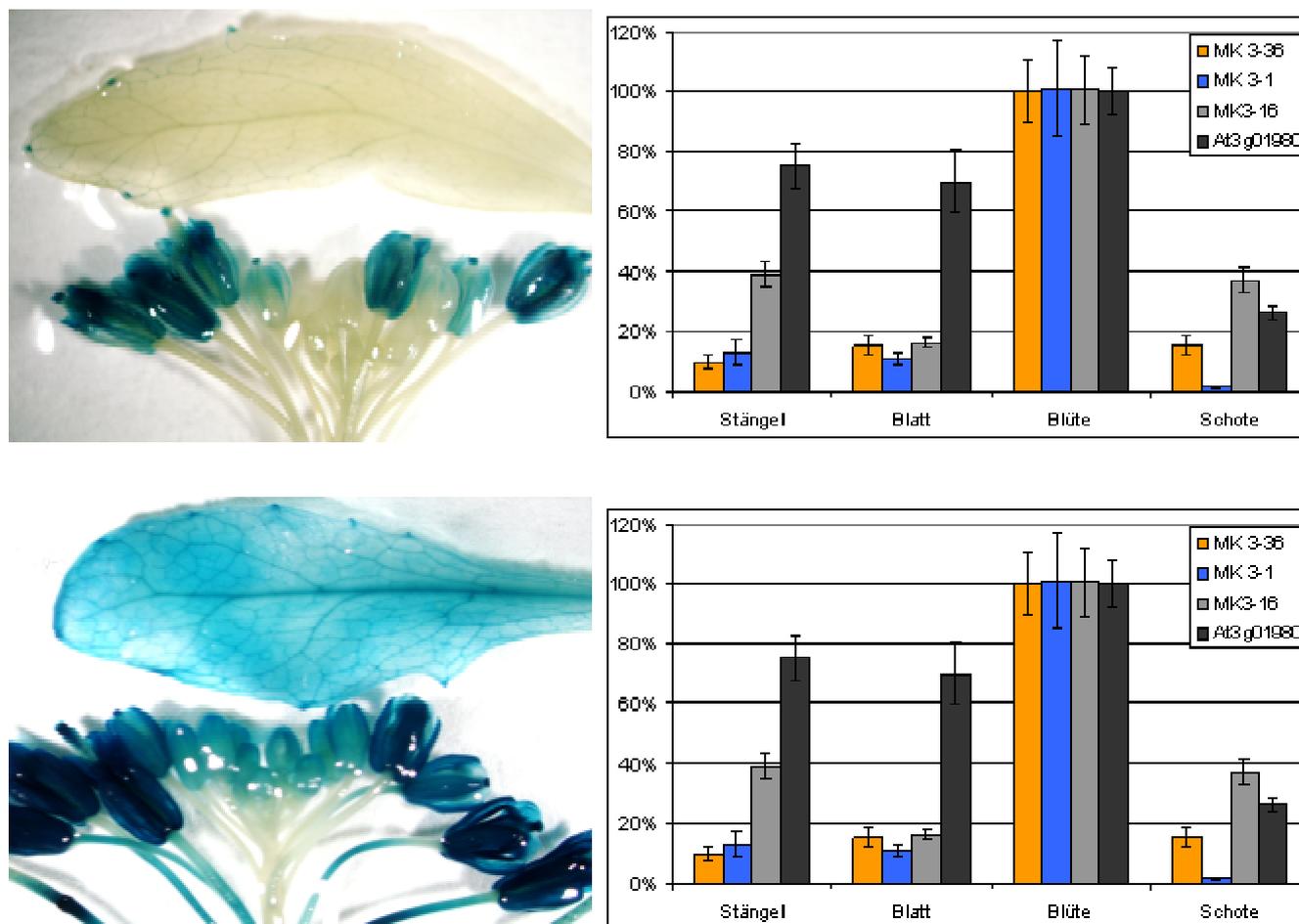


Abb.14: **Links:** Histochemische Färbung zur Visualisierung der GUS-Aktivität. **A:** P76S::GUS; **C:** P76L::GUS transgene Pflanzen.
Rechts: Vergleich der Verhältnisse der Expressionsniveaus der mRNA von At3g01980 mit den GUS-Expressionsniveaus von je drei transgenen Linien in den Geweben Blüte (=100%), Blatt, Stängel und Schote. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von je drei *real time* PCR Messungen. **B:** P76S::GUS; **D:** P76L::GUS

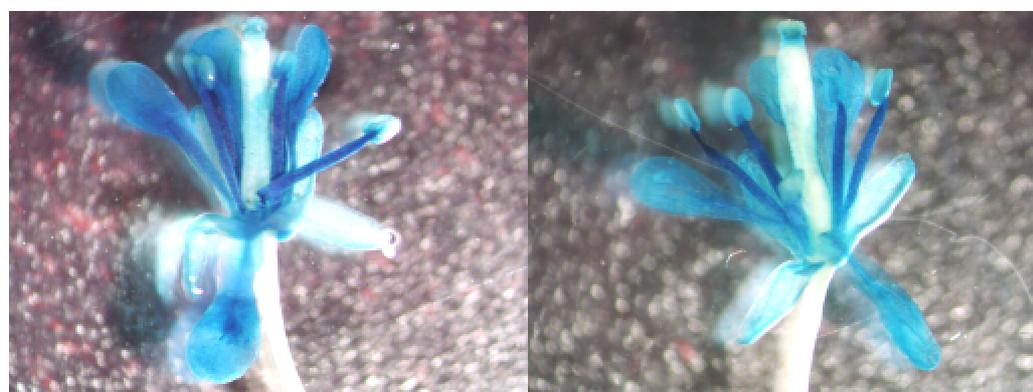


Abb.15: Detailaufnahmen der Blüten der transgenen Pflanzen aus Abb.15
A: P76S::GUS
B: P76L::GUS

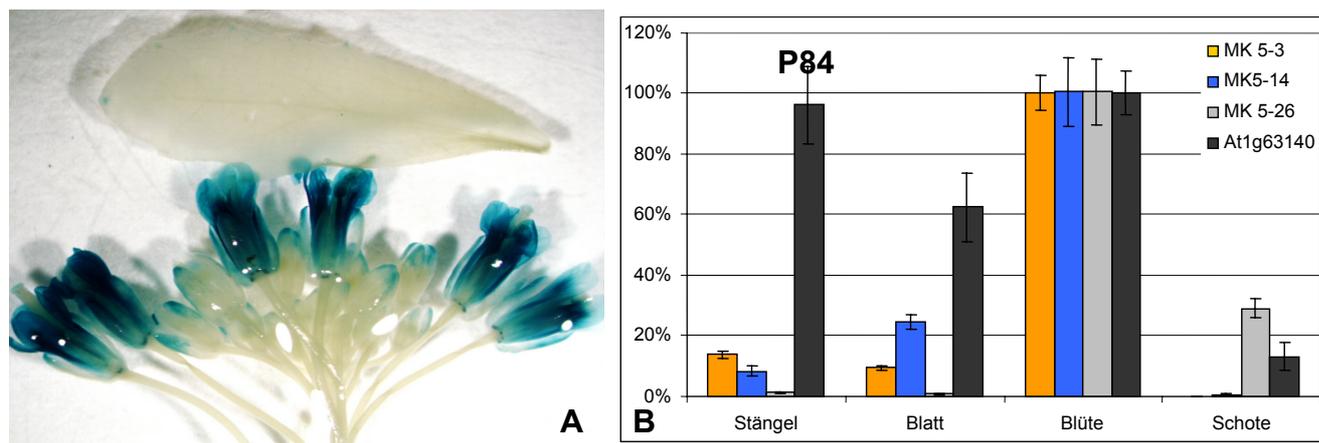


Abb.16: **A:** Histochemische Färbung zur Visualisierung der GUS-Aktivität in transgenen P84::GUS Pflanzen.
B: Vergleich der Verhältnisse der Expressionsniveaus der mRNA von At1g63140 mit den GUS-Expressionsniveaus von drei P84:GUS transgenen Linien in den Geweben Blüte (=100%), Blatt, Stängel und Schote. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von drei Messungen.

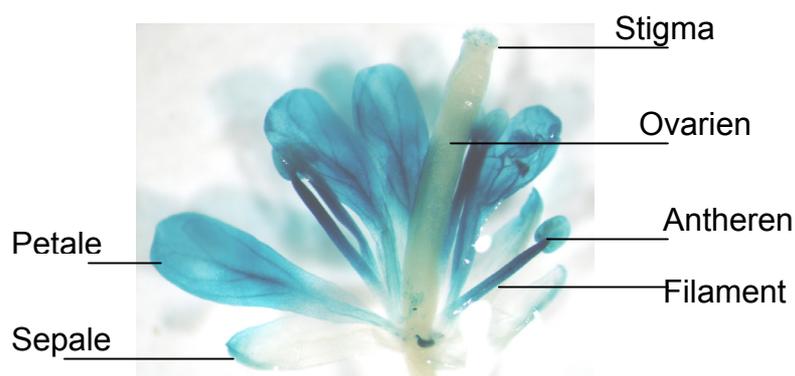


Abb.17 Detailaufnahme einer Blüte einer P84::GUS transgenen Pflanze aus Abb.17

Bei den Promotoren P60S und P60L (Abb. 12) war GUS-Aktivität in allen Blütengeweben außer den Ovarien zu finden. Bei Promotor P76S und P76L waren zusätzlich die Antheren und Sepalen von der Promotoraktivität ausgenommen (Abb. 14). Promotor P84 zeigte Aktivität in allen Blütengeweben außer den Ovarien und den Sepalen (Abb. 16).

Die Antheren der transgenen Pflanzen wurden zur Untersuchung der Pollen geöffnet. Hierbei zeigte sich, dass keiner der Promotoren eine detektierbare GUS-Expression in den Pollen hervorrief (nicht gezeigt).

Die Quantifizierung der GUS-Expressionsniveaus mit *real time* PCR bestätigte weitgehend die Ergebnisse der histochemischen Färbungen. Es konnte jedoch auch GUS-mRNA in Blättern, Stängeln und Schoten nachgewiesen werden (Abb. 12, 14, 16). Die relativen Expressionsniveaus in Blatt, Stängel und Schote der Promotor::GUS-Fusionen waren jedoch geringer als die der entsprechenden endogenen Gene.

Die kürzeren 1kb-Fragmente P60S und P76S zeigten eine Verminderung der relativen Expressionsniveaus in Blatt, Stängel und Schote im Vergleich zu den fast doppelt so langen P60L- und P76L-Fragmenten. Dies ist bei P76L auch an der histochemischen GUS-Färbung des Blattes zu beobachten, die bei den P76S::GUS transgenen Pflanzen nicht zu beobachten war.

	P60S	P60L	P76S	P76L	P84
Petalen	++	+++	++	+++	++
Sepalen	++	++	-	+	+
Filament	++	++	++	++	++
Stigma	-	-	+	+	-
Ovarien	-	-	-	-	-
Antheren	-	+	-	+	+
Pollen	-	-	-	-	-
Samen	-	+	-	+	+
Blatt	-	-	+	++	-
Stängel	-	+	-	+	-
Wurzel	-	-	-	-	-

Tab.6: Zusammenfassung der Expressionsmuster der Promotor::GUS Fusionen. Intensität der histochemischen Färbung: +++, hoch; ++, moderat; +, gering; -, keine Färbung sichtbar. Wurzel von Keimlingen.

Zur Messung der absoluten Expressionsniveaus wurden Blütenstände von je 10 transgenen Pflanzen der T1 Generation vereinigt, die RNA isoliert und die GUS-Expressionsniveaus mit quantitativer *real time* PCR bestimmt. Die Werte wurden zur Standardisierung auf das Expressionsniveau von Ubc18 und der 18S rRNA bezogen. Zusätzlich wurde die GUS-Enzymaktivität in den Blüten bestimmt. Um einen Vergleichswert für die Stärke der Promotoren zu bekommen, wurden alle Werte in Relation zu Werten gesetzt, die mit Blütenproben CaMV35S::GUS transgener Pflanzen (=100 %) gemessen wurden (Abb.18).

Die Expressionsniveaus, die im Bezug auf die beiden internen Standards 18S RNA und Ubc18 bei den *real time* PCR Experimenten bestimmt wurden, sind fast

identisch. Da eine Kooszillation der Expressionsniveaus der beiden Referenz-mRNAs 18S und Ubc18 auszuschließen ist, zeigt dies, dass die Expressionsniveaus beider Gene unter diesen Bedingungen stabil sind.

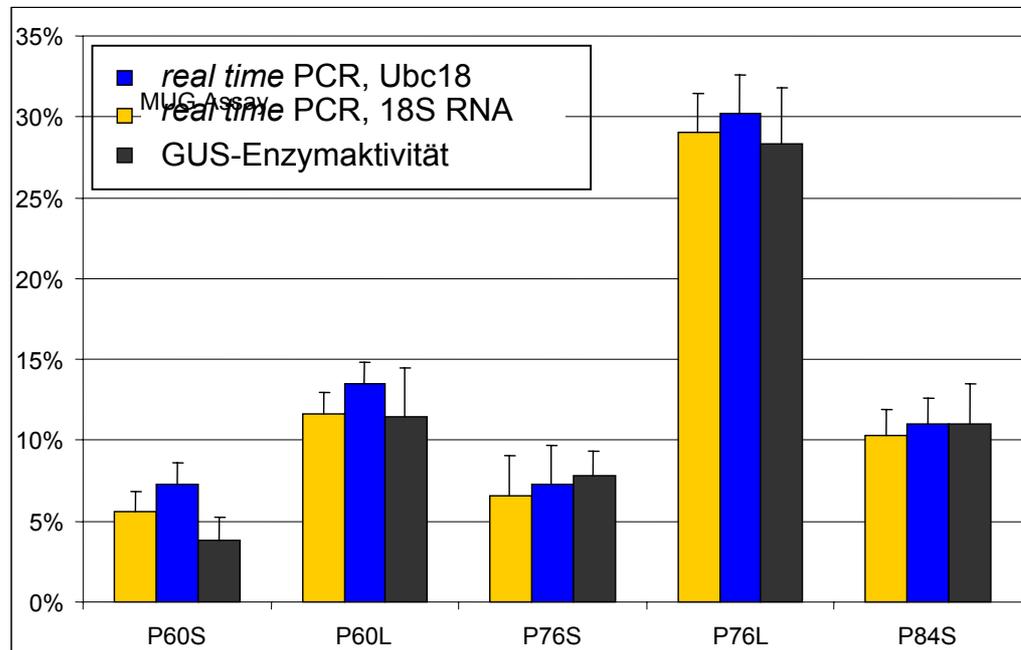


Abb.18: Promotoraktivität von P60S, P60L, P76S, P76L und P84 in Prozent der Aktivität des CaMV 35S Promotors in der Blüte von Arabidopsis. Die GUS-Expressionsniveaus in Blütengewebe von P60S::GUS, P60L::GUS, P76S::GUS, P76L::GUS und P84::GUS transgener Arabidopsis Pflanzen wurden mit *real time* PCR in Relation zu CaMV35S::GUS Pflanzen mit Ubc18 und 18S RNA als internen Standard bestimmt. Zum Vergleich wurde die GUS-Enzymaktivität in den Blüten bestimmt und ebenfalls in Relation zur GUS-Aktivität in der Blüte CaMV35S::GUS transgener Pflanzen gesetzt (100%= 42081 pmol MU/min/mg Protein) Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von je 3 Einzelmessungen.

Es zeigte sich zudem, dass sich die Stärke der Promotoraktivität auf die GUS-mRNA Menge und die GUS-Enzymaktivität fast identisch auswirken (Abb.18)

Unter der Kontrolle der Promotorfragmente P60S, P60L, P76S, P76L und P84 werden Expressionsniveaus in der Blüte erreicht, die im Bereich zwischen 5 und 35 % der Expressionsniveaus liegen, die vom starken, konstitutiven CaMV35S Promotor hervorgerufen werden.

Die von den 2kb Promotorfragmenten hervorgerufenen GUS-Expressionsniveaus waren bei P60L um den Faktor 2 und bei P76L sogar um den Faktor 5 höher als die der korrespondierenden nur 1kb langen Fragmente P60S bzw. P76S.

4.3.2 Zeitliche Auflösung der Promotoraktivität

Um die Regulation der Promotoraktivitäten während der Blütenentwicklung von *A. thaliana* zu untersuchen wurden Pflanzen der T2 Generation von drei transgenen Linien pro Promotor::GUS Fusionsgen bis zur Blüte kultiviert. Die Blütenstände von je 10 Pflanzen pro Linie wurden geerntet, die Einzelblüten von den Blütenständen getrennt und nach der Größe fraktioniert (Tab. 7). Die Stadien P5 und P6 wurden aufgrund der Morphologie getrennt

Stadium	Äquivalent Smyth et al.	Größe der Blüte in μm	morphologische Beschreibung
P1	5+6	>100	Sepalen umschließen die Knospe
P2	7+8	100 - 200	geschlossene Knospe
P3	9+10	200 - 400	Blüte beginnt sich zu öffnen
P4	11+12	400 - 800	Blüte teilweise geöffnet
P5	13+14	< 800	vollständig geöffnete Blüte
P6	15+16	< 800	Beginn der Seneszenz

Tab. 7: Definition der verwendeten Blütenstadien von Arabidopsis im Vergleich mit Smyth et al. 1990.

Die GUS-Expressionsniveaus in den 6 Blütenstadien der transgenen Arabidopsis Pflanzen wurde für jeden Promotor mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt.

Um die Stabilität des Expressionsniveaus des internen Standards während der Blütenentwicklung zu überprüfen, wurden die C_t Werte von Ubc18 und 18S RNA in den einzelnen Blütenstadien bestimmt. Die ΔC_t Werte variierten um maximal 0,18 (Tab. 8). Es konnte daher von einem stabilen Expressionsniveau von Ubc18 und 18S RNA während der Blütenentwicklung ausgegangen werden.

Um die Expressionsniveaus zwischen den Promotoren vergleichen zu können wurden alle Messungen auf das Expressionsniveau des Promotors P76S im Stadium P4 (=1,0) kalibriert.

Bei P60L::GUS (Abb.19) ist das GUS-Expressionsniveau in den Stadien 1-3 im Vergleich der 5 untersuchten Promotorfragmente am höchsten. Ab dem Stadium P4 lässt sie, sowohl bei P60S als auch P60L, stark nach und erreicht im Stadium 6 etwa

nur noch ein Sechstel derer im Stadium P1. Die relativ starke GUS-Färbung der Blüten der Entwicklungsstadien P4 bis P6 ist daher nicht auf eine hohe Promotoraktivität in diesen Entwicklungsstadien zurückzuführen, sondern wird hauptsächlich durch die in den Stadien P1 bis P3 akkumulierte GUS-Aktivität verursacht.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Ubc18	23,45 +/-0,09	23,81 +/-0,07	22,42 +/-0,06	24,01 +/-0,06	24,22 +/-0,04	24,25 +/-0,06
18S RNA	14,44 +/-0,12	14,98 +/-0,08	13,47 +/-0,16	15,09 +/-0,08	15,24+/- 0,04	15,35 +/-0,13
ΔC_t	9,01 +/-0,15	8,83 +/-0,11	8,95 +/-0,17	8,92 +/-0,10	8,98 +/-0,06	8,90 +/-0,15

Tab. 8: Differenz der C_t -Werte von Ubc18 und 18S RNA in 6 Blütenentwicklungsstadien von Arabidopsis. Für die Reaktionen wurden die Oligonukleotide 46/47 (Ubc18) und 48/49 (18S RNA) sowie cDNA aus 100ng gesamt-RNA verwendet.

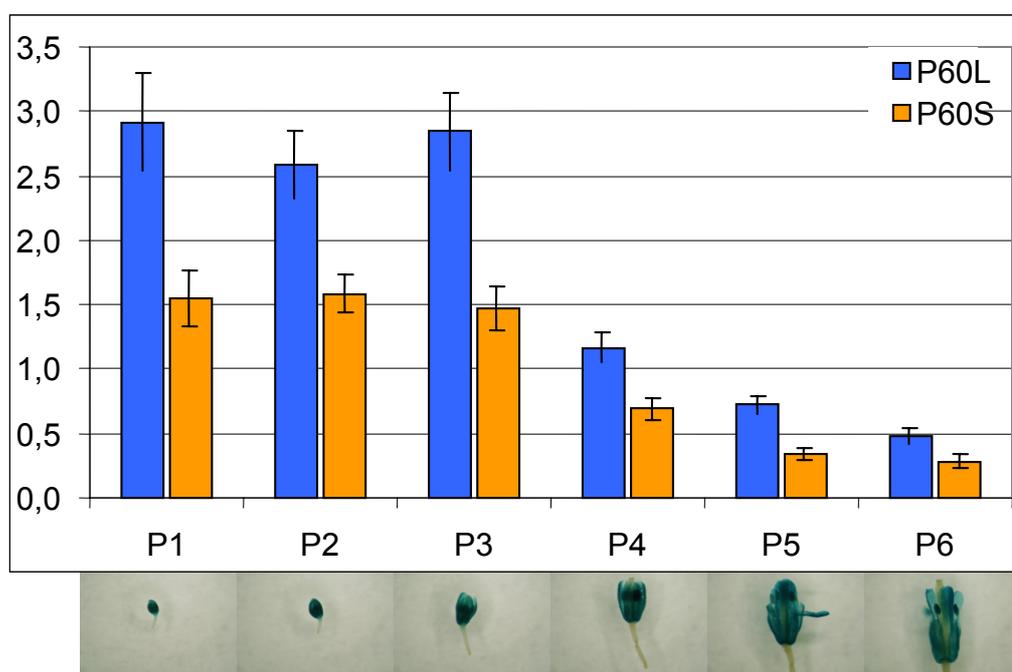


Abb. 19 GUS-Expressionsniveaus in 6 Stadien der Blütenentwicklung der P60S::GUS Arabidopsis Linien MK1-33, MK1-42, MK1-25 (rot) und der P60L::GUS transgenen Linien MK2-2, MK2-20, MK2-8 (blau) (P76S::GUS P4 =1,0).. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von 9 Einzelmessungen. Unterer Teil: histochemisch gefärbte Einzelblüten der entsprechenden Entwicklungsstadien der Linie MK1-33.

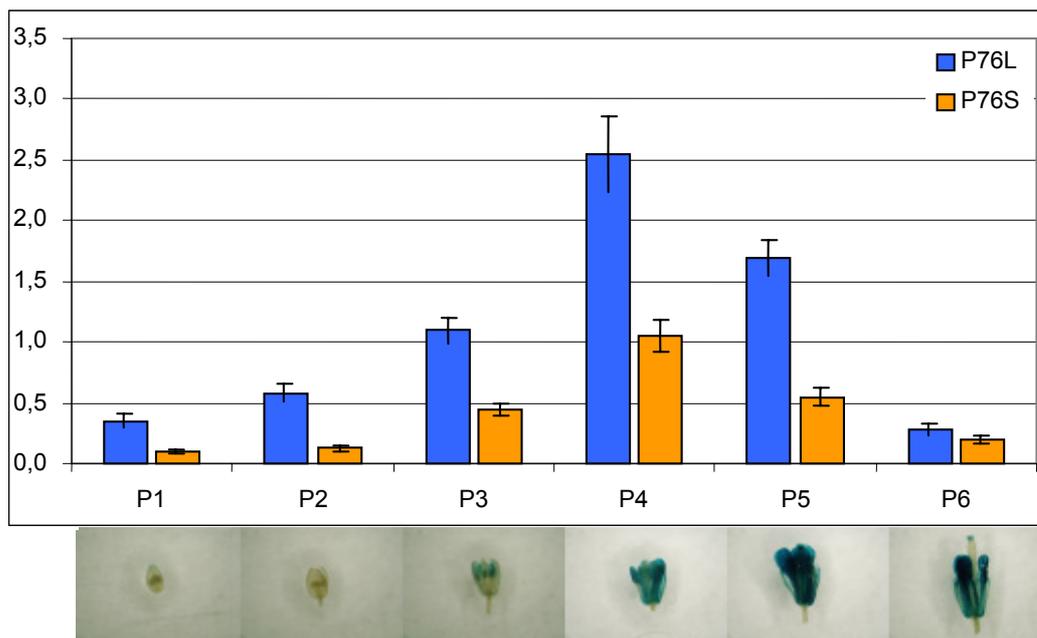


Abb. 20 GUS-Expressionsniveaus in 6 Stadien der Blütenentwicklung der P76S::GUS Arabidopsis Linien MK3-1, MK3-2, MK3-3 (rot) und der P76L::GUS transgenen Linien MK4-1, MK4-6, MK4-30 (blau) (P76S::GUS P4 = 1,0). Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von 9 Einzelmessungen. Unterer Teil: histochemisch gefärbte Einzelblüten der entsprechenden Entwicklungsstadien der Linie MK3-1.

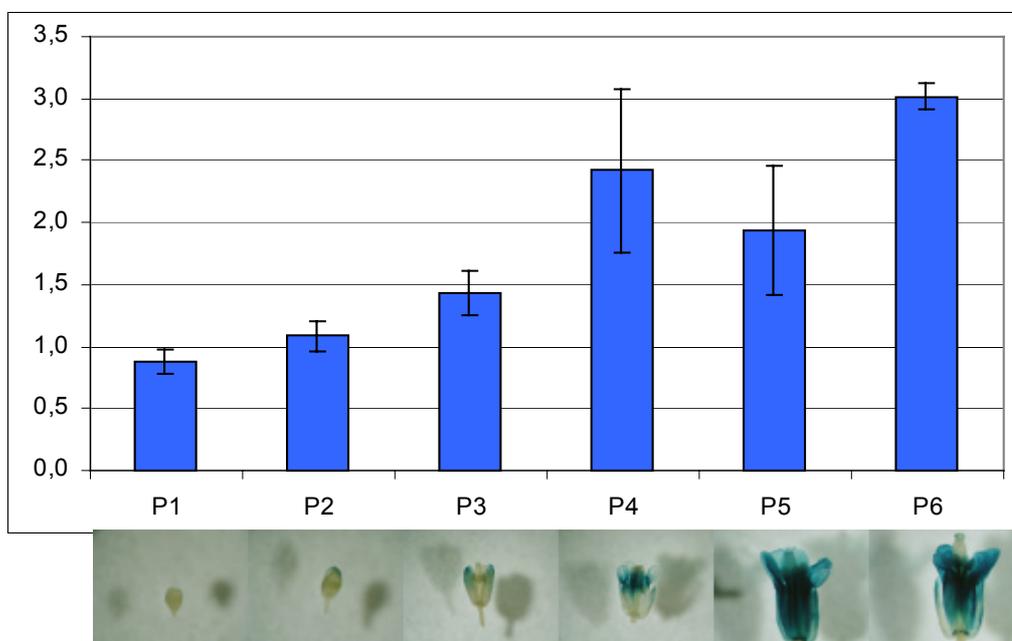


Abb. 21 GUS-Expressionsniveaus in 6 Stadien der Blütenentwicklung der P84::GUS Arabidopsis Linien MK5-3, MK5-14, MK5-26 (P76S::GUS P4 = 1,0).. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von 9 Einzelmessungen. Zum Vergleich sind darunter histochemisch gefärbte Einzelblüten der entsprechenden Entwicklungsstadien der Linie MK5-26 gezeigt.

Die Promotoren P76S und P76L zeigten eine vergleichsweise geringe Promotoraktivität in den Stadien P1 und P2. Dies war auch an der geringen GUS-Färbung der Blütenknospen in diesen Stadien zu erkennen. Die Stadien P3, P4 und P5 waren die Entwicklungsstadien mit der höchsten Promotoraktivität. Ab dem Stadium P4 äußerte sich dies auch in der Akkumulation von GUS-Aktivität in einer Menge, die mit histochemischen Färbungen detektierbar war (Abb.20). Die 2kb-Promotorfragmente P60L und P76L zeigten über den gesamten untersuchten Ausschnitt der Blütenentwicklung deutlich höhere Expressionsniveaus als die korrespondierenden 1kb-Promotorfragmente P60S und P76S. Dies bestätigte die Messungen der absoluten Expressionsniveaus anhand der GUS Enzymaktivität (Abb.18).

Beim Promotor P84 wurde ein über die Blütenentwicklung ansteigendes GUS-Expressionsniveau festgestellt, das ab P4 ein Plateau erreichte. Dem entsprechend wurde die intensivste Färbung bei Blüten aus den Stadien P5 und P6 beobachtet.

4.4. Charakterisierung des Promotors P76S in *Tagetes erecta*

4.4.1 Räumliche Auflösung der P76S Promotoraktivität in *Tagetes*

Die Blütenentwicklung von *T. erecta* ist in Abb. 22 dargestellt. Neben einer verstärkten Akkumulation von Carotinoiden ab dem mit P3 bezeichneten Entwicklungsstadium, beginnt ab dem Entwicklungsstadium P4 eine ausgeprägte Biomassezunahme der Petalen.

Für einen effektiven Eingriff in die Carotinoidbiosynthese in der Blüte von *Tagetes* sind daher Promotoren geeignet, die mit dem Beginn der Carotinoidakkumulation und der Biomassezunahme, Transkripte einer Transgens zur Verfügung stellen.

Zur effektiven Expression eines Transgens in *Tagetes* schieden P60S und P60L aufgrund der geringen Promotoraktivität in den entscheidenden Entwicklungsstadien

der Blüte P4 bis P6 aus. P76L war nicht optimal, da dieser Promotor in Blatt und Stängel hohe Nebenaktivitäten zeigte.

Ein weiteres Kriterium war die Anzahl der transgenen Pflanzen, die das Transgen tatsächlich exprimierten. Da nur etwa 50% der P84::GUS transgenen Arabidopsis Pflanzen eine nachweisbare GUS-Expression zeigten, wurde auch P84 als suboptimal eingestuft. Für eine gezielte Manipulation der Carotinoidbiosynthese in der Blüte von *Tagetes* erschien daher der Promotor P76S am geeignetsten.

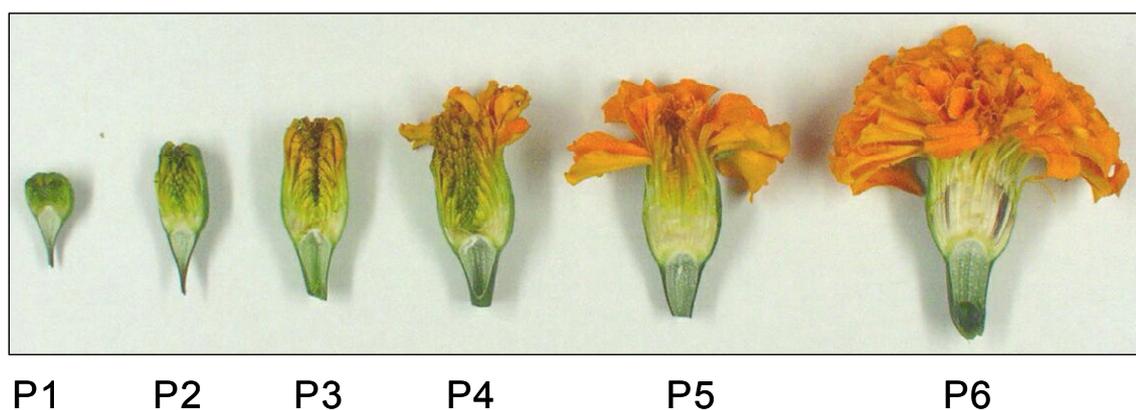


Abb. 22 Blütenentwicklung von *Tagetes erecta* (TAG76). Die Blütenstadien wurden in Anlehnung an Moehs et al. 2001 gewählt. Länge der Blütenblätter der Zungenblüten: P1, 2-4mm; P2, 5-7mm; P3, 8-10mm; P4, 10-14mm; P5, teilweise geöffnete Blüte; P6, vollständig geöffnete Blüte.

Um der entscheidenden Frage nachzugehen, ob blütenspezifische Promotoren aus der Familie der *Brassicaceae* wie *Arabidopsis* auch in den Blüten einer *Asteraceae* wie *Tagetes* die Genexpression spezifisch und effektiv steuern können, wurde das Konstrukt MK6 (vgl. Abb.11) für Promotorstudien in *Tagetes* hergestellt. Dieses Konstrukt war bis auf den Selektionsmarker identisch mit dem P76S::GUS Konstrukt für die Promotorstudien in *Arabidopsis*: der eukaryotische Selektionsmarker für Kanamycinresistenz (Neomycin-Phosphotransferase) wurde gegen die Phosphinotricinresistenz (Phosphinotricin-Aminotransferase) ausgetauscht.

Tagetes wurde *A. tumefaciens*-vermittelt transformiert. Während der Regeneration auf phosphinotricinhaltigem Selektivmedium wurden 8 resistente Pflanzen selektioniert. Innerhalb von etwa 5 Monaten wurden daraus adulte, blühende

Pflanzen kultiviert, von denen Blüten geerntet und histochemisch auf GUS-Aktivität angefärbt wurden.

Nur bei der Pflanze MK6-6 konnte mit dieser Methode GUS-Aktivität in der Blüte gezeigt werden (Abb. 23). Die GUS-Färbung war weitgehend auf den nicht-carotinoidhaltigen basalen Teil der Blüten beschränkt. Der durch Carotinoide gelb gefärbte, obere Teil war fast frei von GUS-Färbung.

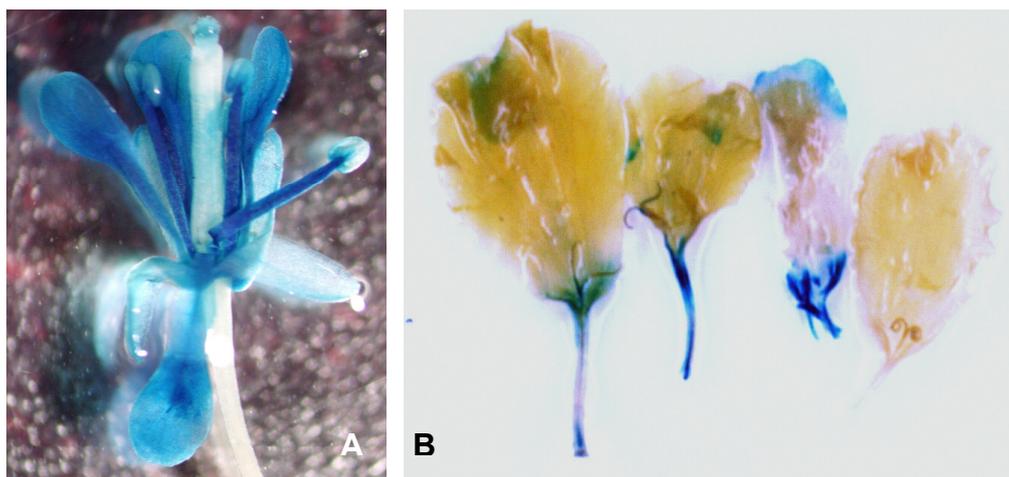


Abb. 23 Vergleich der GUS-Färbung der Blüten von **A**: P76::GUS transgenen *Arabidopsis thaliana* und **B**: P76S::GUS transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen.

Um zu klären, ob die Promotoraktivität auf den basalen Teil der Blüte beschränkt war oder der stark carotinoidhaltige, gelbe Teil der Blüte aus anderen Gründen nicht histochemisch angefärbt werden konnte, wurden Proteinextrakte aus dem oberen und unteren Teil der Blüte hergestellt und die GUS-Enzymaktivität gemessen.

Die fluorimetrischen GUS-Aktivitätsmessungen zeigten, dass GUS-Enzymaktivität sowohl in den oberen als auch den unteren Bereichen der Zungenblüten vorhanden war. Zudem konnte auch in Blüten von vier weiteren Pflanzen, die den Transformationsprozess durchlaufen hatten, GUS Aktivität festgestellt werden. In MK6-6 war die GUS-Aktivität mit bis zu 3500 pmol Methylumbelliferon (MU) min^{-1} mg Gesamtprotein $^{-1}$ ca. 3-4 mal höher als in den übrigen Pflanzen, die GUS-Enzymaktivität in einem Bereich von 800 bis 1500 pmol MU min^{-1} mg Protein $^{-1}$ aufwiesen. Die gemessene GUS Enzymaktivität war in *Tagetes* etwa um den Faktor 10 geringer als die in *Arabidopsis* Blüten.

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob die geringe GUS-Aktivität und die eingeschränkte histochemische Anfärbbarkeit der Blütengewebe auf besondere Eigenschaften der Tagetesblüten zurückzuführen sind.

Für diese Experimente wurde die GUS-Enzymaktivität einer reinen GUS-Protein Lösung mit und ohne Zugabe von Tagetesblütenextrakt bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass der Extrakt aus Tagetesblüten stark mit der Messung interferierte (Daten nicht gezeigt).

Dies wurde darauf zurückgeführt, dass der Extrakt aus Tagetesblüte hohe Carotinoidmengen enthält, die Licht in einem Bereich absorbieren, in dem sowohl die Anregungs- als auch die Emissionswellenlänge der fluorimetrischen GUS-Aktivitätsmessung liegen. Zusätzliche Faktoren, die zudem die Anfärbbarkeit des Blütengewebes direkt beeinflussen könnten sind der Gehalt an phenolischen Substanzen und eventuell die Zugänglichkeit des Gewebes für die Färbelösung.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die geringe GUS-Enzymaktivität und die eingeschränkt aussagekräftigen histochemischen Analyseergebnisse der Blüten von Tagetes auf besondere Eigenschaften von Tagetes und vermutlich nicht auf eine geringere oder auf Teile der Blüte beschränkte Promotoraktivität von P76S zurückzuführen war.

4.4.2 Zeitliche Auflösung der P76S Promotoraktivität in Tagetes

Zur Analyse der zeitlichen Regulation von P76S in Tagetes wurden Blüten der in Abb.22 gezeigten sechs Entwicklungsstadien der P76S::GUS transgenen Pflanze MK6-6 geerntet und die GUS-Aktivität fluorimetrisch bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass GUS-Aktivität ab dem Stadium P3 detektierbar, aber erst ab dem Entwicklungsstadium P4 in signifikanter Höhe messbar war. Die GUS-Aktivität erreichte im Stadium P5 ihren Höhepunkt und sank im Stadium P6 wieder leicht ab (Abb. 24).

Das Auftreten des GUS-Aktivitätsmaximums im Entwicklungsstadium P4 könnte auf ein zu Arabidopsis analoges zeitliches Expressionsmuster von P76S::GUS in Tagetes hindeuten (vgl. Abb.20). Um dies zu überprüfen, wurden die GUS-Expressionsniveaus in den Blütenentwicklungsstadien von Tagetes MK6-6 mit quantitativer *real time* PCR bestimmt.

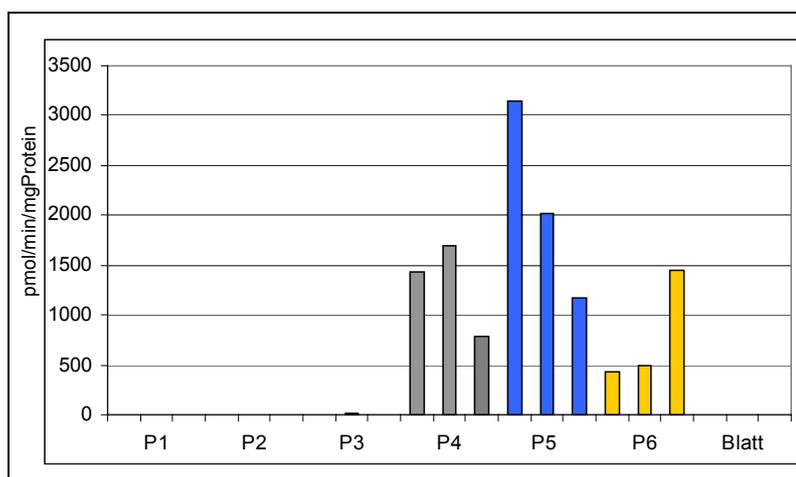


Abb. 24 GUS Enzymaktivität in 6 Entwicklungsstadien von *T. erecta* MK6-6. Gezeigt sind die Werte für drei Blüten pro Stadium in $\text{pmol MU min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$.

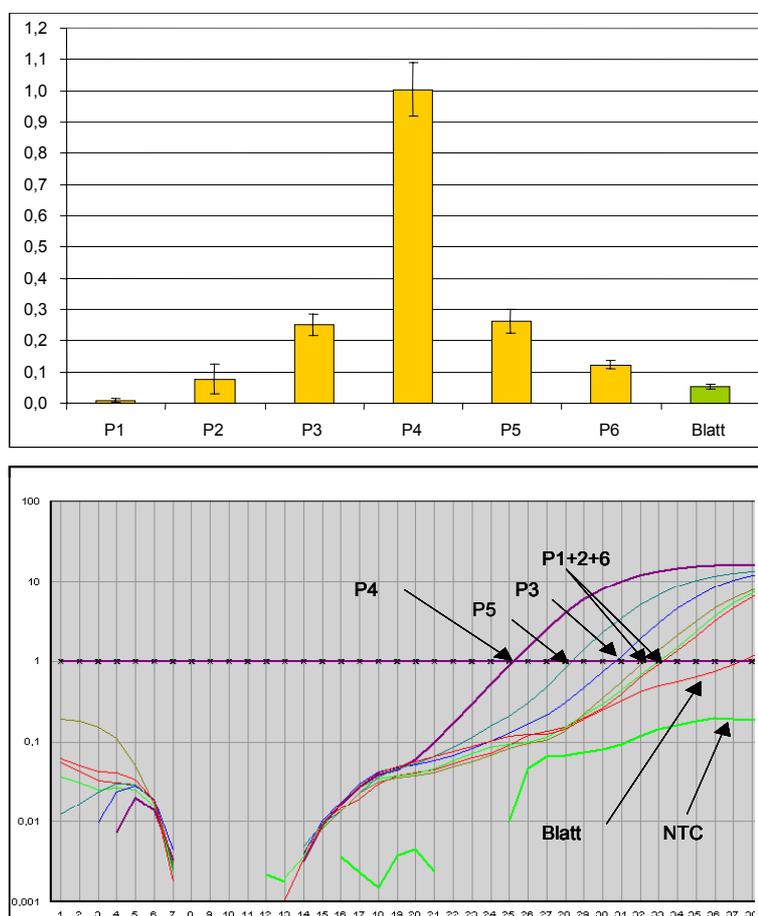


Abb. 25 **A:** GUS Expressionsniveau in 6 Entwicklungsstadien P1-P6 der Blüte von MK6-6. Entwicklungsstadium P4 (=1,0).
B: Halblogarithmische Darstellung der Fluoreszenz (y-Achse) gegenüber der Zyklenzahl (x-Achse) bei der Amplifikation eines Sequenzabschnittes der GUS-cDNA aus 6 Entwicklungsstadien der Blüte der 76S::GUS transgenen Linie MK6-6 bei Verwendung von cDNA aus 100ng gesamt RNA.
 NTC: Kontrolle ohne Zugabe von reverse Transkriptase.

Das Expressionsmaximum in P4 ist in *Tagetes* deutlich stärker ausgeprägt als dies in *Arabidopsis* der Fall ist. Der Anstieg der mRNA Menge ist so ausgeprägt, dass dies leicht an den Kurvenverläufen der *real time* PCR Messungen erkennbar ist (Abb.25B).

4.5 Erhöhung des β -Carotinoidgehaltes der *Tagetes*blüte

Um die hohe Carotinoid-Biosynthesekapazität in der Blüte von *T. erecta* für die Synthese von β -Carotinoiden nutzbar zu machen, soll der Metabolitenfluß von den α -Carotinoiden (bicyklischen Carotinoiden mit einem ϵ - und einem β -Iononring) in Richtung der β -Carotinoide (Carotinoiden mit zwei β -Iononringen) umgeleitet werden. Denkbare Ansätze dazu sind eine Verminderung der Biosynthesekapazität für α -Carotinoide durch Reduktion der ϵ -Cyclaseaktivität und eine Erhöhung der β -Cyclaseaktivität, um in eine größere Menge von Lycopin zwei β -Iononringe einzuführen. Die posttranskriptionelle Repression der Lycopin- ϵ -Cyclase (Lcy-e), z.B. mit Doppelstrang-RNA-Interferenz (dsRNAi; Horser et al. 2002) oder Antisense Strategien (Baulcombe 1996), sind Möglichkeiten, um die Lcy-e Aktivität in der Blüte zu reduzieren. Hierbei würde die endogen vorhandene β -Cyclase zwei Cyclisierungsreaktionen pro Molekül ausführen müssen, um β -Carotinoide zu bilden. Es ist daher denkbar, dass die Zyklisierungskapazität der endogenen β -Cyclase limitierend werden kann.

Der hier gewählte Ansatz ist die ektopische Überexpression einer zusätzlichen β -Cyclase in der Blüte von *Tagetes* um einen größeren Anteil des Metabolitenflusses in Richtung der β,β -Carotinoide zu lenken. Hierzu stehen eine recht große Anzahl bekannter Lycopin- β -Cyclasen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen zur Verfügung.

4.5.1 Expression einer Lycopin- β -Cyclase in der Blüte von *Tagetes erecta*

Zur ektopischen Expression in der Blüte von *Tagetes* schieden bakterielle β -Cyclasen aus, da sie kein eigenes Transitpeptid zur Translokation in die Plastiden tragen. Die Herstellung von Fusionsproteinen mit heterologen Transitpeptiden ist

zwar wissenschaftlicher Standard, erschien aber aufgrund der großen Auswahl pflanzlicher β -Cyclasen mit eigenem Transitpeptid unnötig.

Unter den bekannten pflanzlichen Lycopin- β -Cyclasen hat die CycB aus Tomate die geringste Sequenzähnlichkeit zur endogenen β -Cyclase (CrtR-b) aus Tagetes. Neben dem technischen Vorteil, dass aufgrund der geringeren Sequenzähnlichkeit die heterologe CycB von der endogenen CrtR-b z.B. bei Expressionsstudien unterschieden werden kann, sind Effekte wie Kosuppression (Smyth, 1997) unwahrscheinlicher. Zudem konnte in Tomate bereits gezeigt werden, dass der β -Carotiningehalt in Früchten durch Überexpression der CycB erhöht werden kann (Ronen et al. 2000). Daher wurde die CycB zur blütenspezifischen Expression in Tagetes verwendet (Abb.26).

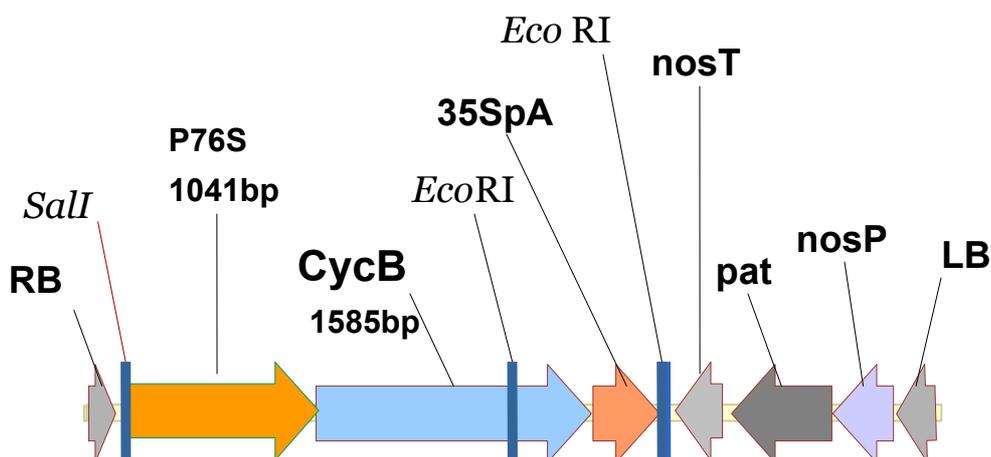


Abb.26 Schematische Darstellung der T-DNA des Vektors MK14 mit den für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen. RB, Rechte TDNA Grenze; P60S: Promotor P60S; Int: Intron (Vancanneyt et al. 1990); 35SpA: Terminator des CaMV 35S Gens; nosT: nos Terminator; nosP: nos Promotor; LB: Linke TDNA Grenze; Pat: Phosphinotricinaminotransferase; CycB: Cyclase B (Acc. No. AF254793).

Aufgrund des Fehlens von Introns in der kodierenden Sequenz der CycB konnte die Isolation der CycB mittels PCR mit genomischer DNA von Tomate als Matrize durchgeführt werden. Dazu wurden die Oligonukleotide Nr.1 und Nr. 2, die an den 5' Termini Phosphatüberhänge trugen, als Primer verwendet. Die kodierende

Sequenz der CycB wurde direkt in den mit SmaI und NruI geschnittenen Vektor MK6 kloniert. Der Vektor MK6 war zum Studium des Promotors P76S mit der kodierenden Sequenz des GUS-Reportergens hergestellt worden. Durch Verdau mit SmaI und NruI wurde das GUS-Gen aus dem Vektor entfernt, wobei der Promotor P76S am 5' Terminus und der Terminator des CaMV35S-Gens am 3' Terminus erhalten blieben. Durch die Klonierung der CycB entstand der Binärvektor MK14, der die T-DNA mit dem Fusionsgen P76S::CycB und die Phosphinotricinaminotransferase unter Kontrolle des Nos-Promotors als Selektionsmarker enthielt (Abb.26). Die korrekte Orientierung der CycB wurde durch Verdau mit EcoRI überprüft.

Die T-DNA des Binärvektors MK14 wurde *A. tumefaciens* vermittelt in *Tagetes* transformiert. Sieben Phosphinotricin-resistente Pflanzen wurden selektioniert und bis zur Blüte kultiviert.

Die Pflanzen MK14-1, MK14-3, MK14-5, MK14-7; MK14-14, MK14-16 und MK14-23 wurden mit RT-PCR auf die Anwesenheit von Transkripten der CycB in Petalen untersucht (Primerpaar Nr.1 und Nr. 2).

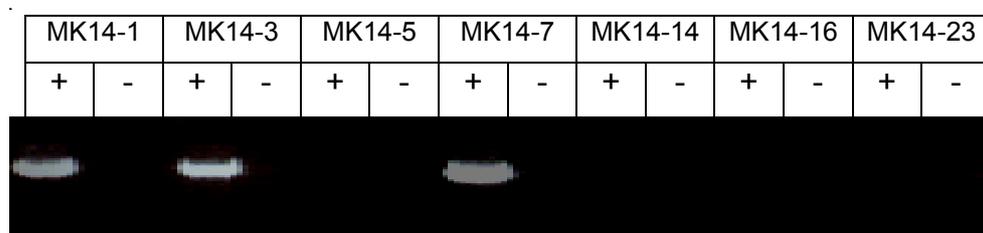


Abb. 27 Gelelektrophoretische Auftrennung von RT-PCR Produkten zum Nachweis von CycB mRNA. Es wurden 100 µg Gesamt-RNA aus Petalen (P5) der Pflanzen MK14-1 bis MK14-23 eingesetzt. Gezeigt sind Reaktionen mit (+) und ohne (-) reverse Transkriptase in der Reaktionsmischung nach 20 Reaktionszyklen.

Im Blütengewebe der Pflanzen MK14-1, MK14-3 und MK14-7 waren Transkripte der CycB nachweisbar. Negativkontrollen ohne reverse Transkriptase in der Reaktionsmischung zeigten, dass die verwendeten RNA-Präparationen frei von genomischer DNA waren. Im Blütengewebe der Pflanzen MK14-5, MK14-14, MK14-16 und MK14-23 konnte keine CycB mRNA nachgewiesen werden (Abb.27).

4.5.2 Carotinoidanalyse der Blüten und Blätter

Die Carotinoidester vom P5-Blütenstadium der sieben MK14 Pflanzen wurden mit Aceton extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Abb. 28).

Hierbei zeigte sich bei den Pflanzen MK14-1, MK14-3 und MK14-7 eine Abweichung in der Intensität einer Bande gegenüber den übrigen Pflanzen und dem Wildtyp (Abb.28).

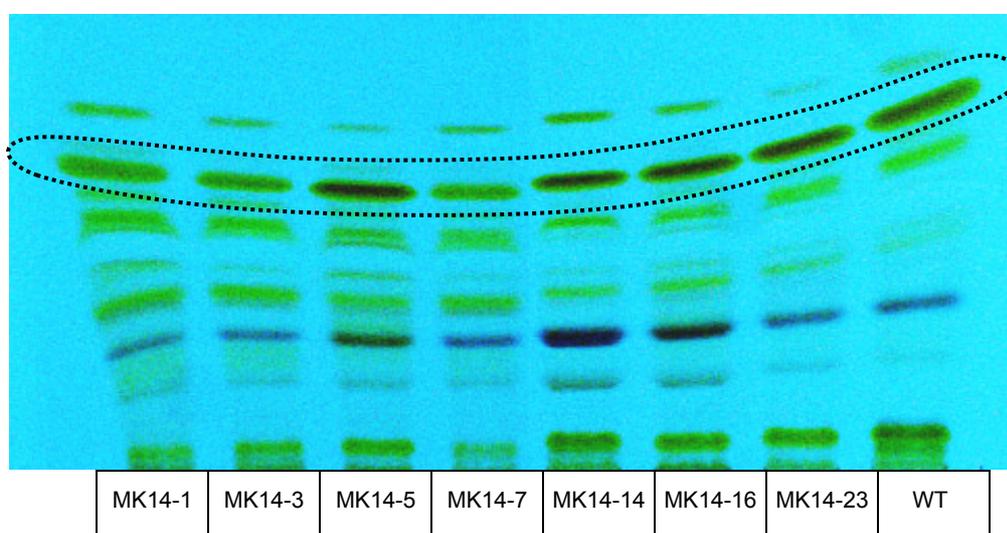


Abb.28 Aufnahme einer dünnschichtchromatographischen Trennung von Acetonextrakten aus 100mg Petalenmaterial (P5). Die Pflanzen MK14-1, MK14-3 und MK14-7 zeigen eine deutliche Abschwächung der markierten Bande gegenüber den übrigen Pflanzen und dem Wildtyp (WT).

Da die Carotinoidester bei der Dünnschichtchromatographie aufgrund ihrer Fettsäurereste aufgetrennt werden, besteht eine Bande aus einer Mischung verschiedener Carotinoide. Der beobachtete Intensitätsunterschied einer Bande deutete auf eine Veränderung in der Carotinoidgehalt in den Blüten der Pflanzen MK14-1, MK14-3 und MK14-7 gegenüber den übrigen MK14 Pflanzen und dem Wildtyp hin.

Dieser biochemische Phänotyp korrelierte mit dem Nachweis von Transkripten der CycB in den Pflanzen MK14-1, MK14-3 und MK14-7 (Abb.27).

Um ein detaillierteres Bild der qualitativen und quantitativen Carotinoidzusammensetzung der Blüten von MK14-1, MK14-3 und MK14-7 zu erhalten, wurden die Carotinoide des Blütenstadiums P5 mit Aceton extrahiert und durch Behandlung mit Kaliumhydroxid verseift. Die im Aceton gelösten freien Carotinoide wurden mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt (Abb. 29).

Die Identifikation der einzelnen Carotinoide war u.a. durch Massenspektroskopie, spezifische Retentionszeiten im Vergleich mit synthetischen und natürlichen Standards und charakteristischen Absorptionsspektren möglich (Tab. 9). Berechnungsbasis für die quantitative Bestimmung der Carotinoide waren Eichgeraden mit synthetischen und natürlichen Standards.

Carotinoid	Retentionszeit	Masse kDa	Absorptionsmaxima nm
Lutein	19,5 min	568,3	421; 445,3; 472,9
Violaxanthin	12,5 min	600,5	415,2; 439,3; 469,5
Antheraxanthin	17,5 min	584,1	421,3; 445,3; 472,9
Zeaxanthin	21,7 min	568,3	427; 451,3; 477,8
β -Cryptoxanthin	28,7 min	552,3	452,5; 479,2
β -Carotin	32,8 min	536,3	426; 452,5; 479

Tab.9: Übersicht der Carotinoidparameter. Angegeben sind die mit Standards gemessenen Werte.

Im Wildtyp zeigte sich eine für *T. erecta* typische Carotinoidzusammensetzung der Blüte mit etwa 85% Lutein und 15% β -Carotinoiden, wobei Violaxanthin den weitaus größten Anteil der β -Carotinoide ausmachte.

In den Blüten der CycB-exprimierenden Pflanzen MK14-1, MK14-3 und MK14-7 war das Verhältnis α - zu β -Carotinoide stark verändert: etwa 40% α - und 60% β -Carotinoide (Tab. 10). Wie im Wildtyp lag der Hauptteil der β -Carotinoide als Violaxanthin vor. Analysen der Carotinoidzusammensetzung im Blatt zeigten keine qualitativen und quantitativen Veränderung in den MK14 Pflanzen (Tab.11). Es wurde festgestellt, dass der Gesamtcarotinoidgehalt der Blätter Schwankungen unterliegt, wohingegen die prozentuale Carotinoidzusammensetzung stabil war.

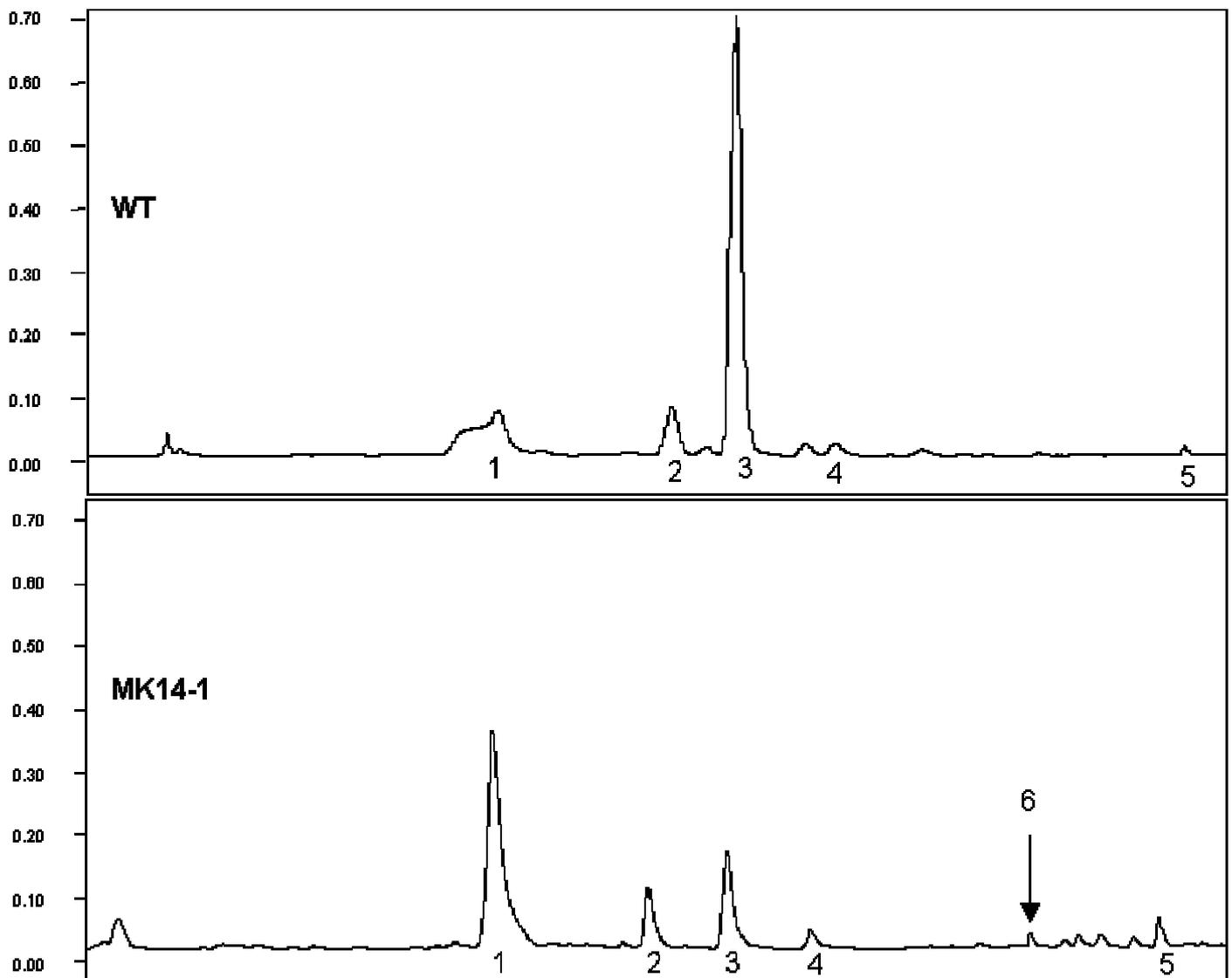


Abb.29 HPLC-Chromatogramm von Carotinoideextrakten aus *Tagetes erecta* Wildtyp (WT) und MK14-1 Blüten des Stadiums P5. C30 *reversed phase* Chromatographie, Detektion: 470nm. Identifikation der Carotinoide vgl. Tab.7: 1, Violaxanthin, 2, Antheraxanthin; 3, Lutein; 4, Zeaxanthin; 5, β -Carotin; 6, β -Cryptoxanthin.

In den Blüten der CycB-exprimierenden Pflanzen verdoppelte sich der β -Carotinoidgehalt von etwa 75 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht im Wildtyp auf bis zu 170 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht. Eine ausgeprägte Reduktion des Luteingehaltes von über 450 μg im Wildtyp auf unter 90 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht führte zu einer Reduktion des Gesamtcarotinoidgehaltes um 40 bis 60 % in den P5 Blütenstadien der Pflanzen MK14-1, MK14-3 und MK14-7 (Tab. 10).

	MK14-1			MK14-3			MK14-7			WT		
	µg/g	+/-	%	µg/g	+/-	%	µg/g	+/-	%	WT	+/-	%
Lutein	87,7	8,6	35,2	92,5	9,0	39,4	148,3	7,0	46,6	457,5	8,8	85,3
Violaxanthin	114,8	19,5	46,0	97,9	5,0	41,7	125,1	4,1	39,3	68,9	1,4	12,8
Antheraxanthin	22,5	15,0	9,0	27,8	1,0	11,8	27,3	15,7	8,6	1,0	0,0	0,2
β-Cryptoxanthin	0,7	0,7	0,3	2,3	0,6	1,0	2,3	2,3	0,7	0,0	0,0	0,0
β-Carotin	10,7	4,3	4,3	3,4	0,4	1,4	3,7	0,9	1,2	0,5	0,2	0,1
Zeaxanthin	13,0	2,9	5,2	10,9	0,2	4,6	11,8	2,2	3,7	4,8	0,1	0,9
Gesamtcarotinoide	249,4	2,0	100,0	234,8	3,4	100,0	318,4	24,4	100,0	536,4	10,4	100,0
Gesamt-β-Carotinoide	161,7	42,4	64,8	142,3	7,2	60,5	170,2	25,2	53,5	75,2	1,7	14,0

Tab.10 Carotinoidgehalt (µg/g Frischgewicht) und prozentuale (%) Carotinoidzusammensetzung von Blüten des Entwicklungsstadiums P5 (vgl Abb 29). Mittelwerte von 3 Blüten. Standardabweichung von drei Messungen (+/-).

		Lutein	Violaxanthin	Antheraxanthin	β-Cryptoxanthin	β-Carotin	Zeaxanthin	Gesamt
MK14-1A	µg/g	763,5	64,6	21,8	0,7	204,7	2,4	1057,7
	%	72,2	6,1	2,1	0,1	19,4	0,2	100,0
MK14-1B	µg/g	516,9	35,1	16,7	0,6	142,4	2,9	714,6
	%	72,3	4,9	2,3	0,1	19,9	0,4	100,0
MK14-3 A	µg/g	803,1	67,9	22,9	0,8	215,3	2,5	1112,6
	%	72,2	6,1	2,1	0,1	19,4	0,2	100,0
MK14-3 B	µg/g	544,5	41,1	18,2	0,6	154,4	2,1	760,7
	%	71,6	5,4	2,4	0,1	20,3	0,3	100,0
MK14-7 A	µg/g	547,6	37,2	17,7	0,6	150,9	3,1	757,1
	%	72,3	4,9	2,3	0,1	19,9	0,4	100,0
MK14-7 B	µg/g	457,7	30,2	16,0	0,5	131,0	1,6	636,9
	%	71,9	4,7	2,5	0,1	20,6	0,3	100,0
WT A	µg/g	591,5	23,2	15,7	0,5	159,5	1,3	791,6
	%	74,7	2,9	2,0	0,1	20,1	0,2	100,0
WT B	µg/g	502,6	22,7	18,9	0,4	126,6	2,6	686,0
	%	73,3	3,3	2,8	0,1	18,5	0,4	100,0

Tab.11 Carotinoidgehalt (µg/g Frischgewicht) und prozentuale Carotinoidzusammensetzung (%) von je zwei Blättern (A, B) der Pflanzen MK14-1, MK14-3, MK14-7 und Wildtyp (WT).

4.5.3 Analyse der Carotinoidakkumulation während der Blütenentwicklung

In der Blüte von *Tagetes* findet die stärkste Akkumulation von Carotinoiden zwischen den Entwicklungsstadien P3 und P4 statt (Moehs et al. 2001). Um den Einfluß der ektopischen Expression der CycB unter Kontrolle des Promotors P76S auf die Carotinoidakkumulation während der Blütenentwicklung zu untersuchen, wurden die Carotinoidgehalte in 6 Blütenentwicklungsstadien (Abb.22) des *Tagetes* Wildtyps und der Pflanzen MK14-3 und MK14-7 mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie untersucht. Dazu wurden Carotinoidextrakte der Petalen der Stadien P2 bis P6 hergestellt und durch Behandlung mit KOH verseift. Beim Stadium P1 wurden aufgrund der geringen Größe der Petalen in diesem Stadium vollständige Blütenknospen verwendet.

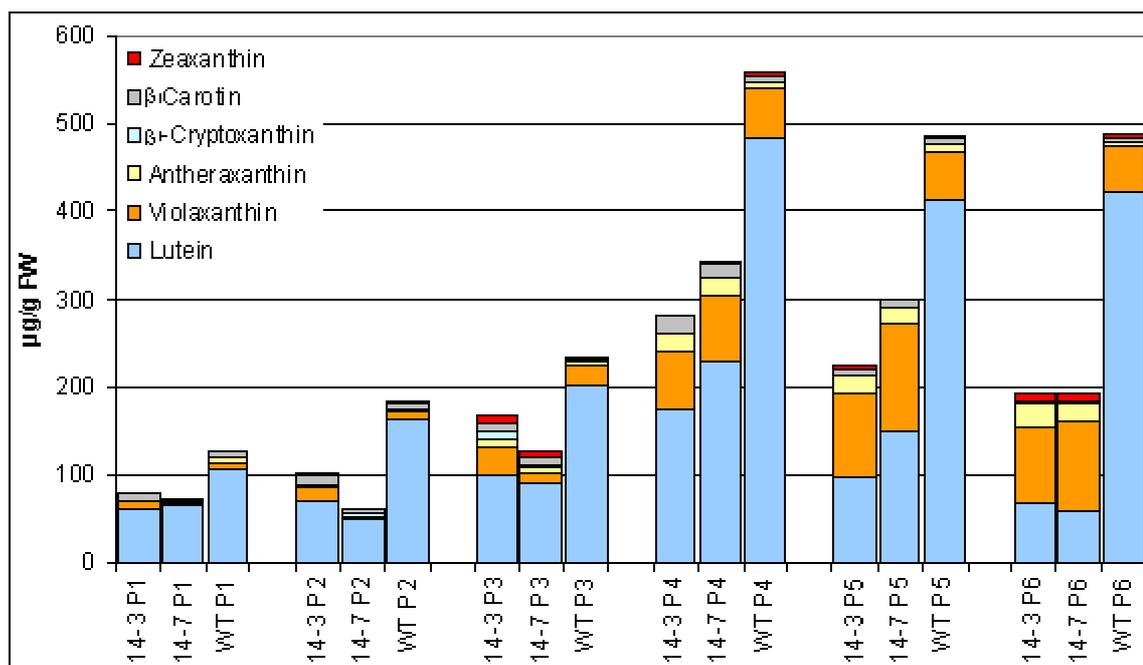


Abb.29 Carotinoidgehalt der Petalen der Pflanzen MK14-3, MK14-7 und Wildtyp (WT) in 6 Stadien der Blütenentwicklung. Angaben in µg/g Frischgewicht (FW). P1 vollständige Blütenknospen.

Im Wildtyp war das Verhältnis α - zu β -Carotinoide von etwa 85% α - und 15% β -Carotinoide war in den untersuchten Stadien der Blütenentwicklung in etwa stabil. Die stärkste Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehaltes ist im Wildtyp zwischen P3 und P4 zu beobachten. Der Gesamtcarotinoidgehalt erhöhte sich von 233 µg/g

Frischgewicht in P3 auf 558 µg/g Frischgewicht in P4. Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung sank der Gesamtcarotinoidgehalt dann bis auf 485 µg/g Frischgewicht in P6 ab.

In den P76S::CycB transgenen Pflanzen MK14-3 und MK14-7 war ab dem Entwicklungsstadium P3 außer einer Erhöhung des Gesamtcarotinoidgehaltes auch eine qualitative Veränderung der Carotinoidzusammensetzung der Blüte zu beobachten.

Mit dem Einsetzen der P76S Promotoraktivität im Stadium P3 (vgl. Abb. 24+25) nahm der β-Carotinoidgehalt zu. Wie im Wildtyp verdoppelte sich auch in den P76S::CycB transgenen Pflanzen die Gesamtcarotinoidmenge zwischen P3 und P4, jedoch bereits auf einem deutlich geringeren Niveau als im Wildtyp. Im Entwicklungsstadium P4 waren in der Blüte von MK14-3 und MK14-7 etwa ein Drittel der Carotinoide β-Carotinoide, hauptsächlich Violaxanthin, Antheraxanthin und β-Carotin. Im Entwicklungsstadium P5, welches bereits für die vorangegangenen Studien verwendet worden war, zeigte sich in den Pflanzen MK14-3 und 14-7 nun das bereits bekannte Bild mit 50-60% β-Carotinoiden und dem um 40-50% reduzierten Gesamtcarotinoidgehalt.

Im Stadium P3 konnte in den Pflanzen MK14-3 und MK14-7 ein breites Spektrum von β-Carotinoiden detektiert werden: Von β-Carotin über β-Cryptoxanthin (Monohydroxy-β-Carotinoid) und Zeaxanthin (Dihydroxy-β-Carotinoid) bis zu den Epoxycarotinoiden Antheraxanthin und Violaxanthin.

In den späteren Stadien verschob sich dieses Carotinoidprofil von den unsubstituierten und Hydroxycarotinoiden zunehmend zu den Epoxycarotinoiden, vor allem zum Diepoxycarotinoid Violaxanthin, so dass ab P4 etwa 45% der Carotinoide in der Blüte als Violaxanthin vorlagen.

4.5.4 Expressionsanalyse der Carotinoidbiosynthesegene

Die Expressionsniveaus der bekannten Carotinoidbiosynthesegene von *Tagetes* (Moehs et al. 2001), wurden mit quantitativer *real time* PCR bestimmt.

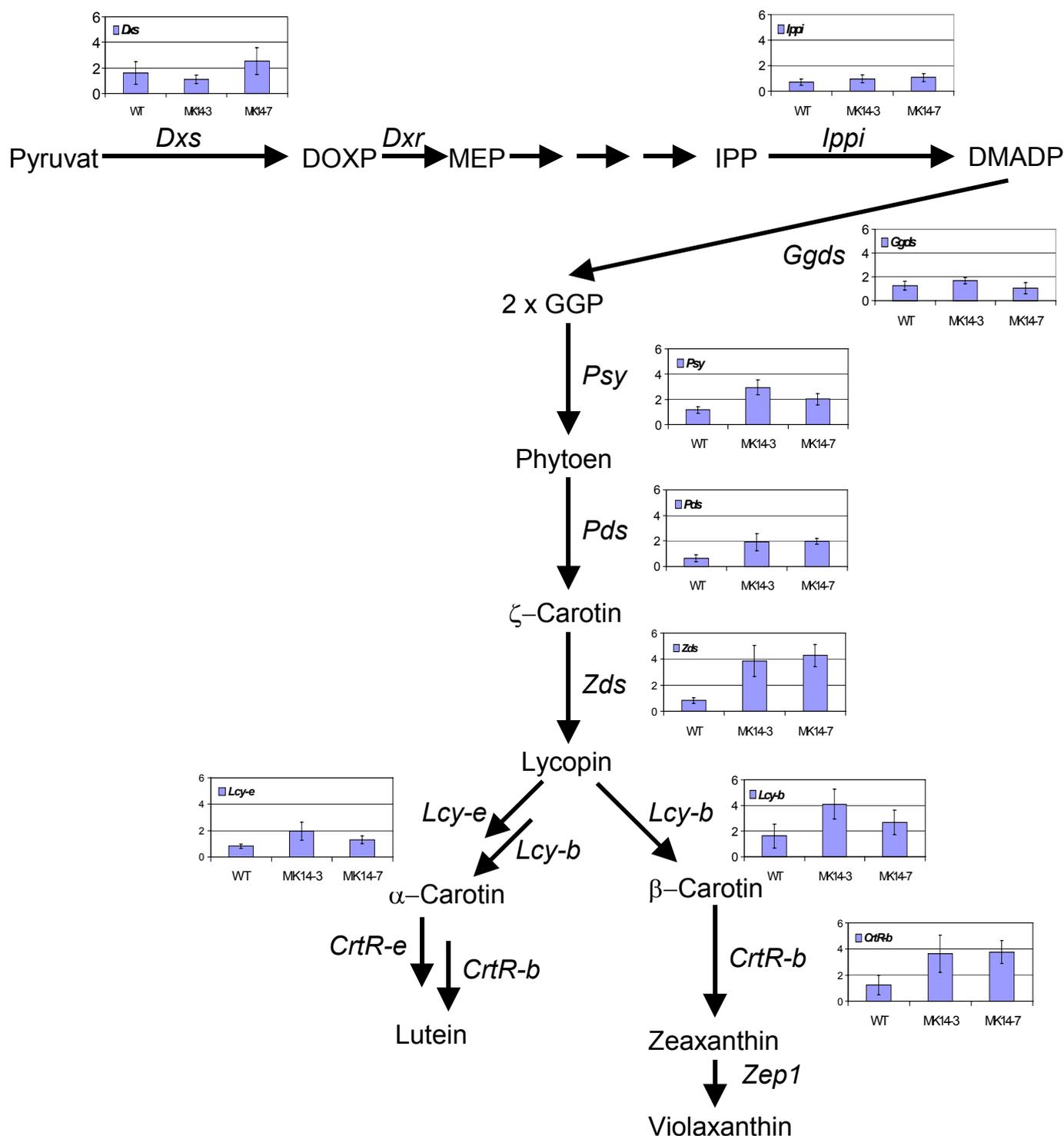


Abb. 30: Relative Expressionsniveaus der Carotinoidbiosynthesegene in Tagetes Wildtyp (WT), MK14-3 und MK14-7. Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils 9 Messungen. DOXP, 1-Deoxyxylulose 5-Phosphat; DXS, DOXP Synthase, DXR, DOXP Reduktoisomerase; DMAPP, Dimethylallyldiphosphat, IPP, Isopentenylidiphosphat; IPPI, IPP Isomerase; GGP, Geranylgeranyl-diphosphat; Ggds GGDP-Synthase; Psy, Phytoensynthese, Pds, Phytoendesaturase; Zds, Zetacarotindesaturase; Lcy-e, Lycopin- ϵ -Cyclase; CrtR-e, ϵ -Ring Hydroxylase; Lcy-b, Lycopin- β -Cyclase; CrtR-b, β -Ring Hydroxylase; Zep1, Zeaxanthinepoxidase.

Für die Messungen wurde RNA aus je drei Blüten des Wildtyps und den transgenen Pflanzen MK14-3 und MK14-7 verwendet. Es wurden Blüten des Stadiums P5 untersucht. Als interner Standard wurde Tubulin verwendet.

Im Durchschnitt aller Messungen waren die Expressionsniveaus der Dxs, Ippi, Ggds und Lcy-e weitgehend unverändert. Die Expressionsniveaus der meisten übrigen Biosynthesegene waren in den P76S::CycB transgenen Pflanzen gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht. Die stärkste Erhöhung zeigten die Zds mit einer durchschnittlich 3,8- bzw. 4,3-fachen Erhöhung und die CrtR-b mit einer durchschnittlich 3,76 bzw. 3,65-fachen Erhöhung gegenüber dem Wildtyp.

5. Diskussion

Um die hohe Carotinoid-Biosynthesekapazität in der Blüte von *T. erecta* für die Synthese von β -Carotinoiden nutzbar zu machen wurde der Metabolitenfluß eine Lycopin- β -Cyclase aus Tomate in der Blüte von *Tagetes* exprimiert.

Eine der Anforderungen dabei war, negative Auswirkungen auf die Fitness der Pflanzen durch Verwendung eines blütenspezifischen Promotors zu vermeiden. Zudem sollte der verwendete Promotor in der Lage sein, Transkripte der Lycopin- β -Cyclase in den Phasen der Blütenentwicklung zur Verfügung zu stellen, in denen die Carotinoidakkumulation stattfindet.

Bekannte blütenspezifische Promotoren wie beispielsweise der AP3 Promotor aus *Arabidopsis* (Hill et al. 1998) der EPSPS-Promotor aus Petunie (Benfey et al. 1990) und der PDS Promotor aus Tomate (Corona et al. 1996) erfüllen diese spezifischen Anforderungen an das räumliche Expressionsmuster nur eingeschränkt. Zudem ist die Regulation der Aktivität dieser Promotoren während der Blütenentwicklung nur eingeschränkt untersucht worden.

Ein Schwerpunkt der Arbeit war daher blütenspezifische Promotoren zu identifizieren und zu isolieren, welche die Anforderungen an das räumliche Expressionsmuster erfüllen und das zeitliche Expressionsmuster dieser Promotoren detailliert zu analysieren

Aufgrund der hohen räumlichen Auflösung der Promotoraktivität, die Transposon-Mutanten bieten, deren Transposons Reportergene tragen, wurden Expressionsdaten, die durch GUS-Färbung von Linien der Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) Transposon-Mutanten Kollektion (Martienssen 1998) erstellt worden waren, zur Identifikation von geeigneten Promotoren genutzt.

5.1 Identifikation blütenspezifischer Promotoren

Von 10000 bis zum Beginn der Arbeit mittels histochemischem Nachweis der GUS-Aktivität untersuchten *Gene Trap*-Linien der CSHL Transposon-Mutanten Kollektion wurde in 15 Linien eine weitgehend auf die Blüte beschränkte GUS-Expression gefunden. Aufgrund der Stringenz und der Stärke der

GUS-Expression in der Blüte wurden die Linien GT6057, GT7638 und GT8400 zur weiteren Analyse ausgewählt.

Nach Feststellung der Transposon-Insertionsorte wurde untersucht inwieweit das Expressionsmuster des Transposon-kodierten GUS-Gens in den Linien GT6057, GT7638 und GT8400 das Expressionsmuster der Transposon-markierten Gene im Wildtyp widerspiegelt. Expressionsstudien mit *real time* PCR zeigten, dass die Gene im Wildtyp eine weitaus ubiquitärere Expression aufweisen können, als dies aus dem Expressionsmuster des GUS-Reportergens in den entsprechenden GT-Linien zu folgern wäre. Diese Beobachtung konnte für das Transposon-markierte Gen in GT7638 auch mit Daten aus MPSS-Experimenten bestätigt werden (Brenner et al. 2000).

Bei den Linien GT7638 und GT8400 könnten diese Unterschiede auf die Insertionsorte der Transposons mehrere 100bp 5' der Startkodons der markierten Gene zurückgeführt werden. Hierdurch können cis-aktive Elemente 3' des Reportergens zu liegen kommen und können daher keinen oder einen anderen Einfluss auf die Expression des Reportergens als auf die Expression der nächstgelegenen kodierenden Sequenz haben. Der Vergleich der Expression des GUS-Reportergens in GT6057 mit dem Expressionsmuster des entsprechenden Transposon-markierten Gens At46720 im Wildtyp zeigte, dass auch bei einem Insertionsort des Transposons innerhalb der kodierenden Sequenz das Expressionsmuster des Reportergens nicht vollständig mit dem des Transposon-markierten Gens übereinstimmen muss.

Die Färbemuster der CSHL-Linien wurden daher nur als Hinweise auf die Expressionsmuster der Promotoren angesehen und die Isolation der Promotorfragmente wurde nicht nach den Transposon-Insertionsorten ausgerichtet. Stattdessen wurden die Promotorfragmente so gewählt, dass sie die 5'untranslatierten Bereiche der entsprechenden Gene einschlossen.

Die Sequenzen der Promotoren wurden auf potentielle Bindestellen bekannter Transkriptionsfaktoren untersucht. In der Datenbank der Matinspektor Software (Quandt et al. 1995) waren zum Zeitpunkt der Arbeit 101 Sequenz-Matrizen von Transkriptionsfaktorbindestellen (TBS) verzeichnet, von denen in den 1kb langen Promotoren P60S, P76S und P84 zwischen 49 und 62 Matrizen gefunden wurden. Diese Anzahl entspricht weitgehend der Anzahl, die in 1kb beliebiger DNA gefunden

wird, wie sich bei der Analyse verschiedener DNA Abschnitte mit der Matinspektor Software zeigte (Daten nicht gezeigt).

Eine Einschränkung der Suche auf potentielle TBS, die in allen drei blütenspezifischen Promotoren vorkommen, reduzierte die Anzahl auf 19 Elemente. Unter diesen Elementen waren unter anderem potentielle Bindestellen für die homeotischen MADS-box Proteine APETALA1 (AP1; Mandel et al. 1992) und AGAMOUS (Yanofski et al. 1990), für die Funktionen in der Blütenentwicklung beschrieben sind. Ebenfalls in allen drei Promotorsequenzen kam eine potentielle Bindestelle für den in der Epidermis der Petalen exprimierten *Petunia hybrida*-Transkriptionsfaktor MYB.Ph.3 vor (Solano et al. 1995). Diese potentiellen TBS bestätigten die an dieser Stelle der Arbeit vermutete Aktivität der Promotoren in der Blüte.

Regulatorische Elemente, welche die Genexpression in die Blüte dirigieren, können durch die Promotorfragmente P60S, P76S und P84 auf 1kb eingegrenzt werden. Durch den Insertionsort des Transposons in GT7638 616bp 5' des Startkodons von At3g01980 lassen sich diese Elemente weiter auf einen ca. 400bp umfassenden Bereich der Promotorregion eingrenzen. Ähnliches ist für die Promotorregion, die durch den Transposon-Insertionsort in GT8400 identifiziert wurde, möglich. Hier kann der Bereich, der Promotoraktivität in der Blüte hervorruft, durch das 1kb Promotorfragment und den Transposon-Insertionsort auf ca. 800bp eingegrenzt werden. Versuche innerhalb dieser Promotorbereiche gemeinsame Beziehungen hinsichtlich Anordnung und Abstände der TBSs zu finden waren nicht erfolgreich. Wie später bei der Analyse der zeitlichen Expressionsmuster festgestellt wurde, konnte dies auch nicht zwingend erwartet werden, da die untersuchten Promotoren zwar in der Blüte koexprimiert aber während der Blütenentwicklung nicht koreguliert werden.

Das Ergebnis der *in silico* Analyse der Promotorsequenzen zeigt auch, dass das Verständnis vom Zusammenspiel regulatorischer Promotorelemente vermutlich noch nicht ausreichend ist um synthetische Promotoren mit komplexen Expressionsmustern wie einer Blütenspezifität aus definierten regulatorischen Elementen herzustellen. Synthetische Promotoren mit weniger komplexen Expressionsmustern wie Pathogen-responsive (Rushton et al. 2002) und

Licht-responsive Promotoren (Puente et al. 1996) konnten aber bereits erfolgreich hergestellt werden.

5.2 Räumliche Auflösung der Promotoraktivität

Detaillierteren Aufschluss über die Promotoraktivität lieferten besonders die isolierten Promotorfragmente und deren Studium mittels Promotor::Reporter Gen Konstrukten in transgenen Arabidopsis Pflanzen.

Mit der histochemischen Visualisierung der GUS-Enzymaktivität konnte für alle isolierten Promotorfragmente die aufgrund des GUS-Expressionsmusters in den korrespondierenden GT-Linien vermutete Promotoraktivität in der Blüte bestätigt werden.

Ausgeprägte Unterschiede im räumlichen Expressionsmuster zwischen 1kb und 2kb Fragmenten der gleichen Promotorregion konnten nur zwischen P76S und P76L gefunden werden. Das 2kb Fragment P76L dirigierte eine viel ausgeprägtere GUS-Expression in Blätter und einige Sprossachsen als das 1kb Fragment P76S.

Messungen der GUS-Expressionsniveaus in den Organen Blüte, Sproßachse, Blatt, Schote und Wurzel bestätigten, dass die Promotorfragmente P76S und P76L GUS-Expression in den untersuchten oberirdischen Pflanzenorganen hervorrufen. In geringerem Umfang wurden mit *real time* PCR histochemisch nicht nachweisbare Nebenaktivitäten auch bei den Promotoren P60S, P60L und P84 festgestellt.

Die hohe Sensitivität der quantitativen Detektion von mRNA mit *real time* PCR hat sich somit als eine vorteilhafte und zur histochemischen Visualisierung der GUS-Aktivität komplementäre Informationsquelle gezeigt. Vorteil der histochemischen Methoden ist jedoch die hohe räumliche Auflösung der Promotoraktivität, die mit RNA basierenden Methoden wie *real time* PCR kaum zu bewerkstelligen ist.

Mit den histochemischen Färbungen wurde festgestellt, dass keiner der Promotoren in den Ovarien oder Pollen aktiv ist. Die Promotoraktivitäten sind in der Hauptsache auf die Petalen und die Filamente der Antheren beschränkt. Die Promotoren P60S und P60L dirigieren GUS Expression zudem in die Sepalen. Dies unterscheidet die Promotoren P60, P76 und P84 von bekannten blütenspezifischen Promotoren, die oft

in den Ovarien oder Pollen aktiv sind. Verschiedene Deletionsfragmente des AP3 Promotors zeigen beispielsweise eine hohe Promotoraktivität in den Ovarien (Hill et al. 1998). Beim PDS Promotor aus Tomate konnte Expression sowohl in den Pollen als auch den Ovarien gezeigt werden (Corona et al. 1996). Der EPSPS Promotor wurde diesbezüglich nicht untersucht (Benfey et al. 1990).

Die Spezifität, gemessen am Verhältnis der Expressionsniveaus in den untersuchten Pflanzenorganen, war bei den 1kb Fragmenten P60S und P76S größer als bei den 2kb Fragmenten P60L und P76L. Zog man zusätzlich die Verhältnisse der Expressionsniveaus der korrespondierenden endogenen mRNAs in den untersuchten Geweben hinzu, zeichnete sich für alle drei Promotorregionen ab, dass die Verkürzung der Promotorsequenzen sukzessive die Spezifität der Promotoraktivität in der Blüte erhöhte. Messungen der absoluten Expressionsniveaus zeigten jedoch auch, dass durch Verkürzung der Promotoren P60L und P76L um 1kb nicht nur deren Spezifität erhöht, sondern auch die Stärke der Promotoren teilweise stark vermindert wurde. Es ist daher anzunehmen, dass die Elemente zur Verstärkung der Transkription in den 5' terminalen Bereichen der untersuchten Promotorregionen zu finden sind, und dass diese Elemente nicht nur die Transkription verstärken, sondern auch die Spezifität der Promotoren vermindern. Auch bei Deletionsstudien des AP3 Promotors wurde festgestellt, dass das räumliche Expressionsmuster weitgehend in einem ca. 700bp umfassenden Bereich der Promotorsequenz konserviert ist. Für hohe Expressionsniveaus wurden jedoch bis zu 1,7kb der AP3 Promotorregion benötigt. Dieses 1,7kb Promotorfragment dirigierte die Genexpression jedoch auch in Gewebe der Blüte, die beim 700bp Fragment frei von Promotoraktivität waren (Hill et al. 1998).

5.3 Zeitliche Auflösung der Promotoraktivität

Bei Messungen der GUS-Expressionsniveaus in einem sechs Stadien umfassenden Ausschnitt der Blütenentwicklung von Arabidopsis zeigte sich ein weiterer Vorzug der Detektion von GUS-mRNA mit quantitativer *real time* PCR gegenüber der Detektion von GUS-Enzymaktivität.

Die Intensität der histochemischen Färbung der Blüten P60S::GUS und P60L::GUS transgener Pflanzen reflektierte augenscheinlich die Anwesenheit von GUS-Aktivität in vergleichbarer Menge über den gesamten, untersuchten Ausschnitt der Blütenentwicklung. Die Messungen der GUS-Expressionsniveaus mit *real time* PCR zeigten jedoch, dass in frühen Entwicklungsstadien der Blüte durch P60S und P60L relativ viel mRNA gebildet wird, die Promotoraktivität jedoch in den späteren Entwicklungsstadien stark nachlässt, so dass das GUS-Expressionsniveau am Ende der untersuchten Entwicklungsreihe nur noch ca. 15% des Expressionsniveaus beträgt, das im jüngsten untersuchten Stadium gemessen wurde.

Beim Vergleich der GUS-Färbung mit den Expressionsniveaus in den Entwicklungsstadien der Blüte der P76S::GUS und P76L::GUS transgenen Pflanzen konnten ebenfalls Unterschiede zwischen GUS-Färbung und den *real time* PCR Ergebnissen beobachtet werden. Hier reflektierte die Intensität der GUS-Färbung der Blüte bis Stadium P4 zwar weitgehend die mit *real time* PCR bestimmten Expressionsniveaus. Das ausgeprägte Aktivitätsmaximum im Entwicklungsstadium P4, das P76S sowohl in Arabidopsis als auch später in Tagetes zeigte, war an der Intensität der GUS-Färbung jedoch nicht zu erkennen.

Nur bei P84, der ein kontinuierlich ansteigendes GUS-Expressionsniveau über den untersuchten Ausschnitt der Blütenentwicklung vermittelte, war die Intensität der GUS-Färbung bezüglich der zeitlichen Regulation der Promotoraktivität von P84 aussagekräftig.

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der GUS-Färbung und den *real time* PCR Experimenten sind vermutlich auf die bekanntermaßen hohe Stabilität des GUS-Proteins zurückzuführen (z.B. Kusnadi et al. 1998). Dadurch kann in frühen Entwicklungsstadien gebildete GUS-Aktivität noch in späteren Stadien detektiert werden. Die GUS-Aktivität in einem Blütenentwicklungsstadium ist daher als Summe der vorangegangenen Stadien anzusehen und reflektiert die momentane Promotoraktivität nur in einem sehr viel geringeren Maße als die instabilere GUS-mRNA.

Das zeitliche Expressionsmuster der untersuchten 1kb und 2kb Promotorfragmente und das der entsprechenden endogenen mRNAs (Daten nicht gezeigt) verliefen in allen drei Fällen parallel. Weder die Isolation der Promotorfragmente aus ihrem genetischen Kontext noch die Verkürzung derselben auf 1kb führte demnach zu

einer Veränderung des zeitlichen Expressionsmusters. Auch die Grundcharakteristika der räumlichen Expressionsmuster waren in den 1kb Fragmenten konserviert.

Bisher beschriebene blütenspezifische Promotoren sind hinsichtlich ihrer Regulation während der Blütenentwicklung kaum charakterisiert. Wenn eine derartige Charakterisierung durchgeführt wurde, dann oft, wie beim PDS Promotor (Corona et al. 1996), anhand der GUS-Enzymaktivität, die jedoch aufgrund der Akkumulation des GUS-Proteins wenig aussagekräftig ist.

5.4 Analyse der Promotoraktivität von P76S in Tagetes

Die Wahl eines Promotors zur effektiven Expression einer Lycopin- β -Cyclase in der Blüte von Tagetes wurde vor allem auf die zeitlichen Expressionsmuster der Promotoren gestützt, da die Akkumulation von Carotinoiden in der Hauptsache ab der Öffnung der Tagetesblüte stattfindet. Zudem beginnt ab dem Blütenentwicklungsstadium P4 eine ausgeprägte Biomassezunahme der Petalen.

Hinsichtlich ihres zeitlichen Expressionsmusters sind P60S und P60L ungeeignet, da die Promotoraktivitäten in den Entwicklungsstadien ab P4 deutlich reduziert sind. P76L ist aufgrund der ausgeprägten Nebenaktivitäten in Geweben außerhalb der Blüte nicht optimal. Auch P84 wurde trotz eines geeigneten zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters nicht verwendet, da nur 50% der P84::GUS transgenen Pflanzen, GUS-Expression zeigten. Die hohe Zahl P84::GUS transgener Pflanzen ohne detektierbare GUS-Aktivität lässt vermuten, dass die Aktivität dieses Promotors stärker vom Insertionsort der T-DNA abhängig ist oder stärker durch andere mit der Transformation zusammenhängende Einflüsse beeinflusst wird als dies bei den übrigen untersuchten Promotoren der Fall ist. Der Promotor P76S war somit aufgrund seines zeitlichen als auch seines räumlichen Expressionsmusters Promotor der Wahl für weitere Studien in Tagetes.

Die Transformation von Tagetes (Kunze et al 2001) ist eine relativ junge Methode und im Vergleich mit der Transformation von Arabidopsis (Clough et al. 1998) oder

Tabak (Rosahl et al 1987) aufwändig und zeitintensiv. Es konnten daher im Laufe der Arbeit nur relativ wenige transgene Tagetespflanzen untersucht werden.

Eine histochemische Visualisierung der GUS-Aktivität in P76S::GUS transgenen Tagetes Pflanzen war nur eingeschränkt möglich. GUS-Expression konnte mit dieser Methode nur in der Blüte einer Pflanze gezeigt werden. Mit sensitiveren, fluorimetrischen Messungen der GUS-Aktivität, konnte schließlich GUS-Aktivität auch in Blütengewebe weiterer MK6 Pflanzen detektiert werden. Die Höhe der GUS-Aktivität war jedoch im Vergleich zu den in Arabidopsis gemessenen Werten gering. Zudem zeigten die Messwerte eine vergleichsweise hohe Schwankungsbreite.

Diese Beobachtungen konnten mit Messungen an gereinigtem GUS-Protein mit und ohne Zugabe von Tagetesblütenextrakt auf eine negative Interferenz des Tagetesblütenextraktes mit den Messungen zurückgeführt werden. Dies erklärt möglicherweise auch die limitierte histochemische Anfärbbarkeit der Tagetesblüten.

Eine eingeschränkte Anfärbbarkeit von carotinoidhaltigen Geweben ist auch von Tomatenblüten bekannt. Bei den Studien des PDS Promotors in Tomate wurde in den Petalen zwar hohe GUS-Aktivität aber nur eingeschränkte histochemische Färbbarkeit festgestellt (Corona et al. 1996).

Zur Analyse des zeitlichen Expressionsmusters von P76S in Tagetes wurde zunächst die GUS-Aktivität in 6 Entwicklungsstadien der Blüte bestimmt. Hierbei konnte erste GUS-Aktivität im Blütenentwicklungsstadium P3 detektiert werden. Die GUS-Aktivität erhöhte sich bis Stadium P5 und wurde im Stadium P6 wieder etwas geringer. Dieses GUS-Aktivitätsprofil während der Blütenentwicklung wurde als ein Hinweis auf eine Analogie des zeitlichen Expressionsmusters von P76S in Tagetes und Arabidopsis gewertet. Zudem konnte die Blütenspezifität von P76S auch in Tagetes durch Abwesenheit von GUS-Aktivität im Blatt bestätigt werden.

Expressionsstudien in den 6 Entwicklungsstadien dieser Pflanze zeigten schließlich, dass das GUS-Expressionsniveau unter Kontrolle von P76S im Entwicklungsstadium P4, analog zu Arabidopsis, ein Maximum erreicht. Zudem konnte nochmals die Spezifität von P76S für die Blüte bestätigt werden, da nur geringe Mengen GUS-mRNA in Blättern detektierbar waren.

5.5 Carotinoidgehalt P76S::CycB transgener Tagetespflanzen

Obwohl Tagetes für die kommerzielle Produktion von Lutein genutzt wird, wurde der Carotinoidgehalt in Tagetes bislang ausschließlich mit züchterischen Mitteln optimiert (Sreekala et al. 2003). Transgene Tagetespflanzen sind bislang weder zu wissenschaftlichen noch zu biotechnologischen Zwecken beschrieben.

Um einen größeren Teil des Metabolitenflusses der Carotinoïdbiosynthese in Richtung der β -Carotinoide umzulenken, wurde ein Konstrukt zur Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin- β -Cyclase aus *Lycopersicon esculentum* (CycB, Ronen et al. 2000) in Tagetes transformiert. Zur effektiven Expression der CycB in der Blüte wurde der Promotor P76S aufgrund seines spezifischen zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters verwendet. Die Expression des Transgens wurde mittels RT-PCR für die Pflanzen MK14-1, MK14-3 und MK14-7 nachgewiesen.

Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der Carotinoïdester aus den Blüten der Pflanzen MK14-1, MK14-3 und MK14-7 zeigte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen eine abweichende Intensität bei einer Bande. Dies deutete darauf hin, dass die Expression der CycB eine Veränderung der Carotinoïdzusammensetzung in der Blüte hervorruft.

Mit hochauflösender Flüssigkeitschromatographie konnte schließlich gezeigt werden, dass die Expression der CycB zu einem qualitativ und quantitativ stark veränderten Carotinoïdgehalt in der Blüte führt. Im Blütenstadium P5 war der Gehalt an α -Carotinoïden in Form von Lutein von 85% im Wildtyp auf 30 bis 40% des Gesamtcarotinoïdgesamtes in den MK14 Pflanzen reduziert. Der Anteil an β -Carotinoïden war von höchstens 15% im Wildtyp auf 60 bis 70% des Gesamtcarotinoïdgesamtes erhöht. Wie im Wildtyp lag der Hauptteil der β -Carotinoïde als Violaxanthin vor. Der Gesamtcarotinoïdgehalt wurde durch die starke Reduktion des Luteingehaltes um 40 bis 60% reduziert. Der Gehalt an β -Carotinoïden der MK14 Pflanzen betrug bis zu 170 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht.

Der Anstieg des Monoepoxycarotinoïds Antheraxanthin von 1 μg auf bis zu 28 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht zeigt, dass vermutlich die Zeaxanthinepoxidaseaktivität bei Expression der CycB limitierend wird. Der viel geringere Faktor um den Zeaxanthin (4,8 auf

13µg/g Frischgewicht) in den MK14 Pflanzen ansteigt deutet an, dass die β -Hydroxylaseaktivität vermutlich weniger limitierend ist als die Zeaxanthinepoxidase. Zur biotechnologischen Optimierung der Carotinoidbiosynthese sind bislang meist gewebespezifische Promotoren aus dem Zielorganismus (z.B. Fraser et al. 2002) oder der konstitutive CaMV 35S Promotor (z.B. Fray et al. 1995) verwendet worden (vgl. Tab.1). Eines der wenigen Beispiele für den erfolgreichen Einsatz eines heterologen Promotors zur Modifikation der Carotinoidbiosynthese ist die Produktion von Ketocarotinoiden in den Ovarien von Tabak durch Expression einer β -Carotin-Ketolase unter Kontrolle des PDS Promotor aus Tomate (Mann et al. 2000).

In der Blüte von *Tagetes* findet die stärkste Akkumulation von Carotinoiden zwischen den Entwicklungsstadien P3 und P4 statt (Moehs et al. 2001). Analysen der Carotinoidgehalte in den sechs Blütenentwicklungsstadien P1 bis P6 zeigten, dass in den P76S::CycB transgenen Pflanzen MK14-3 und MK14-7 der Carotinoidgehalt während der gesamten Blütenentwicklung geringer ist als im Wildtyp, der Hauptunterschied aber erst ab Stadium P4 entsteht.

Beginnend mit dem Stadium P3 sind im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Mengen von β -Carotin und Zeaxanthin vorhanden. Das Monohydroxy- β -Carotinoid β -Cryptoxanthin, das in der Wildtypblüte nicht vorhanden war, wurde in diesem Stadium in einer transgenen Pflanze detektiert. Diese Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp sind wahrscheinlich auf eine beginnende Expression der CycB durch die bereits beobachtete Aktivierung des Promotors P76S in P3 zurückzuführen.

Im Stadium P4 wurde der Gehalt an β -Carotinoiden in den transgenen Pflanzen größer, wobei der Anteil an β -Carotin und Zeaxanthin zugunsten der Epoxycarotinoide Antheraxanthin und Violaxanthin abnahm. Der Gesamtcarotinoidgehalt war in diesem Stadium gegenüber dem Wildtyp um etwa 40% reduziert. Die Petalen im Stadium P5 zeigten die bereits festgestellte Reduktion des Gesamtcarotinoidgehaltes um 50 bis 60% gegenüber den Blütenblättern des Wildtyps. Diese Tendenz setzte sich in P6 fort, wo der Gesamtcarotinoidgehalt der Blüten von MK14-3 und MK14-7 nur noch ca. 40% des Wildtyps betrug. Interessanterweise war für diese Reduktion ausschließlich ein gesunkener

Luteingehalt verantwortlich. Im Gegensatz dazu nahm der Gehalt an β -Carotinoiden zwischen Stadium P4 und P5 sogar leicht zu und blieb im Stadium P6 in etwa stabil. Da zwischen P4 und P6 eine starke Biomassezunahme der Blüte stattfindet, kann der sinkende Luteingehalt in den MK14 Pflanzen mit einer nicht mit der Biomassezunahme schritthaltenden Biosyntheserate für Lutein interpretiert werden.

5.6 Expressionsniveaus der Carotinoidbiosynthesegene in P76S::CycB transgenen Tagetespflanzen

Reduzierte Gesamtcarotinoidgehalte im Zusammenhang mit der ektopischen Expression von Carotinoidbiosynthesegenen wurde auch bei transgenen Tomatenpflanzen beschrieben (Römer et al. 2000). Durch die konstitutive Überexpression einer bakteriellen Phytoendesaturase in der Tomatenfrucht wurde der β -Carotingehalt verdreifacht, während der Gesamtcarotinoidgehalt in den Tomatenfrüchten halbiert wurde. Diese Reduktion korrelierte mit einem reduzierten Phytoensynthase (PSY)-Expressionsniveau und, im Vergleich zum Wildtyp, reduzierter PSY-Enzymaktivität in den transgenen Früchten. Daraus wurde geschlossen, dass möglicherweise β -Carotin als ein Inhibitor in der Carotinoidbiosynthese wirkt und der erhöhte β -Carotingehalt in den Früchten über eine transkriptionelle Repression der PSY zu der beobachteten Reduktion des Gesamtcarotinoidgehaltes führt (Römer et al. 2000).

In der Kartoffelknolle wurde festgestellt, dass eine Reduktion des Violaxanthingehaltes durch eine transkriptionelle Repression der Zeaxanthinepoxidase zu erhöhten PSY Expressionsniveaus und erhöhten Gesamtcarotinoidgehalten führt (Römer et al. 2002). Eine negative Wirkung von Violaxanthin über transkriptionelle Regulationsmechanismen ist daher möglich.

Bei den P76S::CycB transgenen Tagetes Pflanzen konnte jedoch keine transkriptionelle Repression der PSY festgestellt werden.

Das Transkriptionsprofil der bekannten Carotinoidbiosynthesegene zeigte für keines der untersuchten Gene eine Reduktion des Expressionsniveaus. Im Durchschnitt aller Messungen waren die Expressionsniveaus der DXS, IPPI, GGDS und Lcy-e

gegenüber dem Wildtyp unverändert. Die übrigen untersuchten Carotinoidbiosynthesegene zeigten etwa 1,5- bis 2-fach erhöhte Expressionsniveaus gegenüber dem Wildtyp. Die Zetacarotindesaturase, welche das Substrat Lycopin für die ektopische exprimierte β -Cyclase synthetisiert, zeigte mit einem durchschnittlich 4-fach erhöhten Expressionsniveau den größten Anstieg gegenüber dem Wildtyp. Eine transkriptionelle Repression eines der bekannten Carotinoidbiosynthesegene in den P76S::CycB Pflanzen kommt demnach nicht als Ursache für die reduzierten Gesamtcarotinoidgehalte in Frage.

Im Gegensatz zur konstitutiven Expression der bakteriellen Phytoensynthese in Tomate führte die ektopische Expression einer Lycopin- β -Cyclase aus Arabidopsis unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors in Tomate zu erhöhten β -Carotingehalten und zusätzlich erhöhten Gesamtcarotinoidgehalten (Rosati et al. 2000). Auch durch die Überexpression der CycB in Tomate wurde der β -Carotingehalt der Frucht ohne negative Auswirkungen auf den Gesamtcarotinoidgehalt erhöht (Ronen et al. 2000)

Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen der ektopischen Expression der CycB in Tagetes, die zu erhöhten β -Carotinoidgehalten aber reduzierten Gesamtcarotinoidgehalten führt.

Vermutlich ist das darauf zurückzuführen, dass in der Tomatenfrucht keine β -Hydroxylase-Aktivität und keine Zeaxanthinepoxidase-Aktivität vorhanden ist. Dadurch akkumuliert in der transgenen Tomatenfrucht hauptsächlich β -Carotin, während in den P76S::CycB transgenen Tagetesblüten hauptsächlich Violaxanthin akkumuliert. Eine denkbare Ursache für die reduzierten Gesamtcarotinoidgehalte ist daher, dass der Metabolitenfluß in der Blütenentwicklung zwar ab P4 quantitativ in Richtung der β -Carotinoide gelenkt wird, Violaxanthin aber als Endprodukt einer höheren Degradation durch Licht oder enzymatische Prozesse unterworfen ist und daher nicht in der selben Menge wie Lutein akkumulieren kann. Derartig unterschiedliche Degradationsraten zwischen den Carotinoiden sind bisher jedoch weder festgestellt noch untersucht worden.

Eine weitere Ursache für diesen Unterschied zwischen Tomate und Tagetes könnte auch sein, dass in der Tomatenfrucht keine Lycopin- ϵ -Cyclase (Lcy-e) und nur wenig Lycopin- β -Cyclase (Lcy-b) Aktivität vorhanden ist. In der Tagetesblüte hingegen sind Lcy-e und Lcy-b Aktivitäten vorhanden. Durch das Einbringen einer zusätzlichen

Lycopin- β -Cyclase könnte in *Tagetes* somit eine Konkurrenzsituation zwischen den Lycopincyclasen entstehen, die zu verminderten Gesamtcarotinoidgehalten führt.

5.7 Hinweise auf carotinogene Enzymkomplexe

Alle Produkte, die in der Carotinoidbiosynthese ausgehend von Phytoen gebildet werden, sind wasserunlöslich. Die Reaktionen müssen daher in oder zumindest in der Nähe von Membranen ablaufen.

Ein Phytoensynthase Komplex, bestehend aus IDP Isomerase, GGDP Synthase und Phytoensynthase wurde aus den Chromoplasten höherer Pflanzen isoliert (Fraser et al. 2000). Da das Produkt dieses Multienzymkomplexes, Phytoen, wasserunlöslich ist und zudem Detergenzien benötigt wurden um den Enzymkomplex zu isolieren wurde gefolgert, dass der Komplex vermutlich membranassoziiert ist (Fraser et al. 2000). Aus der Beobachtung, dass in der Carotinoidbiosynthese zwischen Phytoen und den zyklischen Carotinoiden generell keine oder kaum Intermediate gefunden werden, kann zudem geschlossen werden, dass hier ein weiterer, membranständiger Enzymkomplex, bestehend aus Phytoendesaturasen (PDS), ζ Carotindesaturasen (ZDS) und den Lycopincyclasen, existiert (Abb. 31). Die postulierte Stöchiometrie dieses Komplexes leitet sich aus der Carotinoidzusammensetzung in Plastiden ab (Cunningham et al. 1998).

Abgesehen von *Lactuca spp.*, in der das ϵ,ϵ -Carotinoid, Lactucaxanthin vorkommt, finden sich in höheren Pflanzen ausschließlich β,β - oder β,ϵ -Carotinoide. Dies kann mit einem asymmetrischen Multienzymkomplex erklärt werden, der zur Synthese von α -Carotin aus je zwei Molekülen PDS und ZDS besteht und je ein Molekül der beiden Cyclasen enthält. Diesem Modell folgend ist nur die ϵ -Cyclase aus *Lactuca* in der Lage einen symmetrischen Multienzymkomplex mit zwei ϵ -Cyclasen auszubilden. Aufgrund dieser Hypothese ist für die Synthese von β -Carotin ein symmetrischer Komplex, bestehend aus den Desaturasen und zwei β -Cyclasen zu postulieren.

Auch in *Tagetes* wurden weder im Wildtyp noch in den P76S::CycB Pflanzen Intermediate der Carotinoidbiosynthese gefunden. Besonders im Hinblick auf die erhöhten Expressionsniveaus der meisten Carotinoidbiosynthesegene bei

gleichzeitig reduziertem Gesamtcarotinoidgehalt ist bemerkenswert, dass auch in den P76S::CycB transgenen Tagetespflanzen Intermediate wie Lycopin nicht akkumulieren. Möglicherweise ist dies als ein Hinweis auf die Existenz der beschriebenen carotinogenen Enzymkomplexe in der Tagetesblüte zu werten, die Intermediate wie beispielsweise Lycopin nicht freisetzen können.

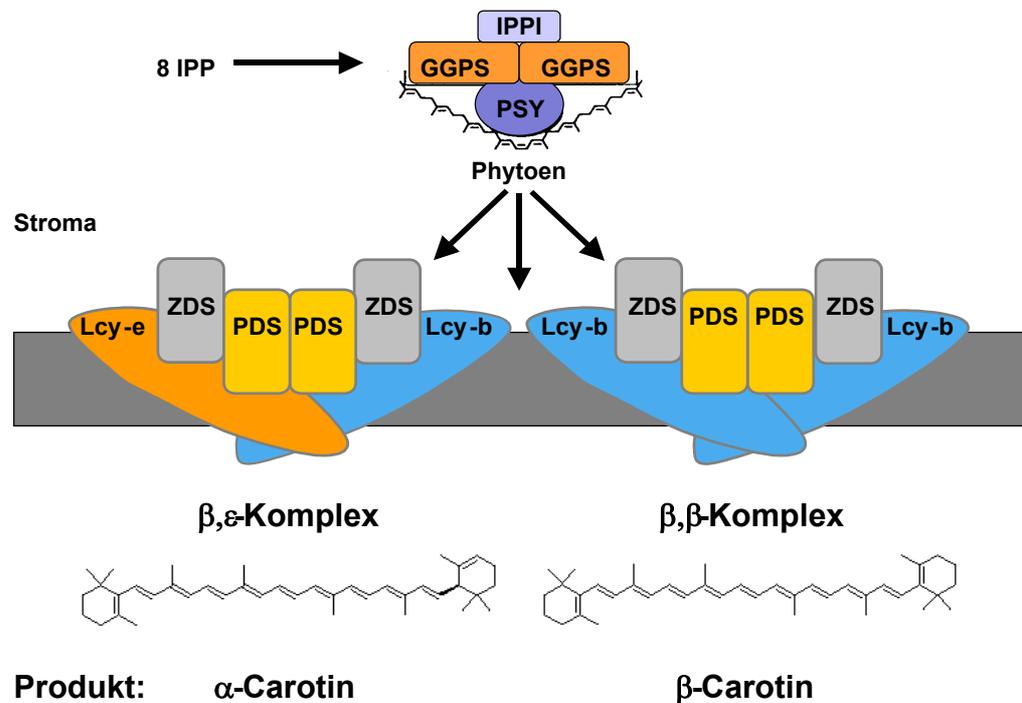


Abb. 31 Schematische Darstellung hypothetischer carotinogener Multienzymkomplexe in den Thylakoidmembranen von Algen und höheren Pflanzen. Verändert nach Cunningham et al. 1998.

Vor diesem Hintergrund ist eine denkbare Ursache für die reduzierten Gesamtcarotinoidgehalte, dass durch die Expression der CycB eine Ausbildung solcher carotinogener Enzymkomplexe gestört wird. Möglicherweise wird dies durch eine Konkurrenz der CycB mit der endogenen ϵ -Cyclase um die Position im membranständigen Enzymkomplex oder durch die Ausbildung von nicht funktionellen Komplexen mit einer ϵ -Cyclase und einer CycB verursacht. Durch eine verstärkte Ausbildung von solchen nicht funktionellen Komplexen ab dem Blütenentwicklungsstadium P4, dem Stadium, in dem der verwendete Promotor P76S die höchste Aktivität zeigt, kann die Carotinoïdbiosynthese nicht weiter mit der Biomassezunahme der Petalen schritthalten und führt so zur beobachteten, selektiven Reduktion des Luteingehaltes ab dem Blütenentwicklungsstadium P4.

5.8 Ausblick

Der β -Carotinoidgehalt der Tagetesblüte konnte durch ektopische Expression einer chromoplastenspezifischen Lycopin- β -Cyclase aus Tomate (CycB) unter Kontrolle des Promotors P76S mehr als verdoppelt werden. Durch die gleichzeitige Reduktion des Luteingehalts um etwa 80% wurde der Gesamtcarotinoidgehalt um etwa 50% vermindert.

Um den Gesamtcarotinoidgehalt wieder zu erhöhen sind verschiedene Ansätze denkbar.

Besonders interessante Ergebnisse könnte die mit der CycB-Expression kombinierte Repression der endogenen ϵ -Cyclase ergeben. Dadurch könnte die vermutete Konkurrenzsituation zwischen der endogenen ϵ -Cyclase und der ektopisch exprimierten β -Cyclase um die Position im membranständigen carotinogenen Multienzymkomplex aufgehoben werden und der Gesamtcarotinoidgehalt wieder auf Wildtypniveau ansteigen. Möglicherweise gelänge es dadurch auch den β -Carotinoidgehalt weiter zu erhöhen, da weniger Lutein gebildet wird und somit mehr Lycopin als Substrat für die Lycopin- β -Cyclase zur Verfügung steht.

Aus den Ergebnissen der Expression der CycB ergeben sich zudem verschiedene Möglichkeiten, gezielt β -Carotinoide zu produzieren.

In Kombination mit der ektopischen Expression der CycB könnte beispielsweise durch gezielte Repression der Zeaxanthinepoxidase eine vermehrte Akkumulation von Zeaxanthin versucht werden. Eine posttranskriptionelle Repression der Zeaxanthinepoxidase in der Kartoffelknolle wurde bereits durchgeführt und resultierte in einer Steigerung der Zeaxanthin- und Gesamtcarotinoidgehalte (Römer et al. 2002). In ähnlicher Weise könnte durch zusätzliche Repression der β -Hydroxylase eine verstärkte Akkumulation von β -Carotin angestrebt werden.

Die hohen β -Carotinoidgehalte in den Blüten der P76S::CycB Pflanzen könnten zudem dazu genutzt werden, durch die kombinierte Expression einer β -Carotin-Ketolase Ketocarotinoide zu synthetisieren. Durch Expression einer Ketolase konnten bereits in den Nektarien von Tabak und den Samen von Arabidopsis signifikante Mengen verschiedener Ketocarotinoide akkumuliert werden (Mann et al. 2000; Stålberg et al 2003).

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	<i>Activation-Element</i>
AS	Aminosäure(n), Aminosäurerest(e)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CSHL	Cold Spring Harbor Laboratory
C _t	<i>threshold Cycle</i> (siehe S. 29)
DNA	Desoxiribonukleinsäure
Dnase	Desoxiribonuklease
Ds	<i>Desintegration-Element</i>
dNTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ET	<i>Enhancer Trap</i>
FG	Frischgewicht
GT	<i>Gene Trap</i>
GUS	β-Glucuronidase
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
kb	Kilobasenpaare
LB	<i>left border</i> ; linke T-DNA Grenze
min	Minute
MOPS	Morpholinpropan-sulfonsäure
mRNA	Boten-ribonukleinsäure
MS	Murashige Scoog
NAA	Naphtalen-Essigsäure
NAM	Naphtalen Acetamid
nos	Nopalinsynthase
npt	Neomycin-Phosphotransferase
ocs	Octopinsynthase
OD	optische Dichte
pat	Phosphinotricin-Phosphotransferase
PCR	Polymerasekettenreaktion
RB	<i>right border</i> ; rechte T-DNA Grenze
RbcS	<i>Rubisco small subunit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription; reverse Transkriptase
TAIL-PCR	<i>Thermal asymmetric interlaced PCR</i>
T-DNA	Transfer DNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
T _x	Tochtergeneration bei transgenen Linien
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp

7. Literatur

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990)

Basic local alignment search tool."

J. Mol. Biol. 215:403-410.

Arrach N, Fernandez-Martin R, Cerda-Olmedo E, Avalos

A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 13;98(4):1687-92. Epub 2001 Feb 06

Baulcombe DC

RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants.

Plant Mol Biol. 1996 Oct;32(1-2):79-88. Review

Bäumlein H., Wobus U., Pustell J., Kafatos F.C.

The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element.

Nucleic Acids Res. 14:2707-2720 (1986).

Bendich A.

Beta-carotene and the immune response.

Proc Nutr Soc. 1991 Aug;50(2):263-74. Review.

Benfey PN, Takatsuji H, Ren L, Shah DM, Chua NH.

Sequence Requirements of the 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase 5[prime]-Upstream Region for Tissue-Specific Expression in Flowers and Seedlings.

Plant Cell. 1990 Sep;2(9):849-856.

Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I.

Golden Rice: introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency.

J Nutr. 2002 Mar;132(3):506S-510S. Review.

Bradford, M.M.

Rapid and quantitative method for quantification of micrograms quantities on protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 1978; 72; 248-252

Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D.H., Johnson, D., Luo, S., McCurdy, S., Foy, M., Ewan, M., Roth, R., George, D., Eletr, S., Albrecht, G., Vermaas, E., Williams, S.R., Moon, K., Burcham, T., Pallas, M., DuBridge, R.B., Kirchner, J., Fearon, K., Mao, J., and K. Corcoran.

Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. Nat. Biotechnol. (2000a) 18:630-634.

Cianci M, Rizkallah PJ, Olczak A, Raftery J, Chayen NE, Zagalsky PF, Helliwell JR.

The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: beta-crustacyanin at 3.2-Å resolution.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jul 23;99(15):9795-800.

Clough, S.J., and Bent, A.F

Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.

Plant J. 1998,16, 735–743.

Corona V, Aracri B, Kosturkova G, Bartley GE, Pitto L, Giorgetti L, Scolnik PA, Giuliano G.

Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development.

Plant J. 1996 Apr;9(4):505-12

Cunningham FX, Gantt E.

Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants

Annu. Rev. Plant Mol.Biol. 1998. 49:557-83

Dagert M, Schmidt R, Willmitzer L.

Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells.

1998; Gene 6: 23-28

de Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI.

A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in E. coli.

Cell. 1989 Feb 24;56(4):641-9

Delgado-Vargas F, Paredes-Lopez O, Avila-Gonzalez E.

Effects of Sunlight Illumination of Marigold Flower Meals on Egg Yolk Pigmentation.

J Agric Food Chem. 1998 Feb 16;46(2):698-706

Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, Aquilani R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G.

Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits.

FEBS Lett. 2002 May 22;519(1-3):30-4.

Edes TE, Thornton W Jr, Shah J

Beta-carotene and aryl hydrocarbon hydroxylase in the rat: an effect of beta-carotene independent of vitamin A activity.

J Nutr. 1989 May;119(5):796-9.

Fraser PD, Schuch W, Bramley PM

Phytoene synthase from tomato (Lycopersicon esculentum) chloroplasts: partial purification and biochemical properties.

Planta. 2000 Aug;211(3):361-9.

Fraser PD, Römer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM.

Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jan 22;99(2):1092-7

Fraser PD, Römer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM.

Elevation of carotenoids in tomato by genetic manipulation.

J Sci Food Agriv 2001 81: 822-827

Fray RF, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, Grierson D.

Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway

Plant J. 1995 Nov; 8(4): 693-701

Fulton TM, Chunwongse L, Tanksley SD

Microprep protocol for isolation of DNA from tomato and other herbaceous plants.

Plant Mol. Bio. Rep. 1995;

Gerster H.

Potential role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease.

Int J Vitam Nutr Res. 1991;61(4):277-91. Review.

Gibson UEM, Heid CA, Williams PM

A novel method for real time quantitative RT-PCR.

1996; Genome Research 6: 995-1001

Gidoni D., Brosio P., Bond-Nutter D., Bedbrook J., Dunsmuir P.

Novel cis-acting elements in Petunia Cab gene promoters.

Mol. Gen. Genet. 215:337-344 (1989).

GOODWIN TW, JAMIKORN M.

Studies in carotenogenesis. 11. Carotenoid synthesis in the alga Haematococcus pluvialis.

Biochem J. 1954 Jul;57(3):376-81

Grotewold E., Drummond B. J., Bowen B., Peterson T.

The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset

Cell 76:543-553 (1994).

Havaux M, Niyogi KK.

The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jul 20;96(15):8762-7

Heim, U; Herbers, K; Kunze, I

Binary Vectors for improved transformation of plant systems.

WO 02-00900; 2001

Hill TA, Day CD, Zondlo SC, Thackeray AG, Irish VF.

Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA3.

Development. 1998 May;125(9):1711-21

Hirschberg J.

Carotenoid biosynthesis in flowering plants.

Curr Opin Plant Biol. 2001 Jun;4(3):210-8. Review

Hirschberg, J. Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis

JOURNAL (in) Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. (Eds.);

CAROTENOIDS VOL 3 BIOSYNTHESIS AND METABOLISM: 149-194;

Birkhaeuser Verlag, Basel, Boston, Berlin (1998)

Hood, E.E., S.B. Gelvin, L.S. Melchers, and A. Hoekema.

New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants.

Trans. Res. 1996, 2:208-218.

Horser C, Abbott D, Wesley V, Smith N, Waterhouse P

Gene silencing-principles and application.

Genet Eng (N Y). 2002;24:239-56. Review.

Huang H., Tudor M., Su T., Zhang Y., Hu Y., Ma H.

DNA binding properties of two Arabidopsis MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation.

Plant Cell 8: 81-94(1996).

Huijser, P, Klein, J, Lönig, W-E, Meijer, H, Saedler, H, Sommer, H

Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene squamosa in Antirrhinum majus

EMBO J 11: 1239-1249 (1992)

Hull GA, Devic M.

The beta-glucuronidase (gus) reporter gene system. Gene fusions; spectrophotometric, fluorometric, and histochemical detection.

Methods Mol Biol. 1995; 49: 125-41.

Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J.

Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants.

Plant Cell. 2002 Feb;14(2):333-42.

Ito M., Iwase M., Kodama H., Lavis P., Komamine A., Nishihama R., Machida Y., Watanabe A.

A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription.

Plant Cell. 10:331-341 (1998).

Jefferson RA

Assaying chimeric genes in plants: The GUS fusion system.

Plant Mol.Biol.Rep. 1987; 5, 387-405

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW.

GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.

EMBO J. 1987 Dec 20;6(13):3901-7.

Johannesson H., Wang Y., Engstrom P.

DNA-binding and dimerization preferences of Arabidopsis homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro.

Plant. Mol. Biol. 45:63-73 (2001).

Khachik F.

An efficient conversion of (3R,3'R,6'R)-lutein to (3R,3'S,6'R)-lutein (3'-epilutein) and (3R,3'R)-zeaxanthin.

J Nat Prod. 2003 Jan;66(1):67-72.

Kim H, Snesrud EC, Haas B, Cheung F, Town CD, Quackenbush J.

Gene expression analyses of Arabidopsis chromosome 2 using a genomic DNA amplicon microarray.

Genome Res. 2003 Mar;13(3):327-40

Krubasik P, Sandmann G.

Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups.

Biochem Soc Trans. 2000 Dec; 28(6): 806-10

Kunze I, Herbers, Karin, Heim, Ute

Herstellung transgener Pflanzen der Gattung Tagetes

WO01/46445 A2, 2001

Kusnadi AR, Hood EE, Witcher DR, Howard JA, Nikolov ZL.

Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn.

Biotechnol Prog. 1998 Jan-Feb;14(1):149-55.

Lash, A. E., Tolstoshev, C. M., Wagner, L., Schuler, G. D., Strausberg, R. L., Riggins, G. J., and S. F. Altschul. (2000).

SAGEmap: a public gene expression resource. Genome Res. 10:1051-1060.

Landrum JT, Bone RA.

Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment.

Arch Biochem Biophys. 2001 Jan 1;385(1):28-40. Review.

Lawton M. A., Dean S. M., Dron M., Kooter J. M., Kragh, D. M., Harrison M. J., Yu L., Tanguay L., Dixon R. A., Lamb C. J.

Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor, SBF-1, closely related to GT-1

Plant Mol. Biol. 16:235-249 (1991).

Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M.

Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway.

FEBS Lett. 1997 Jan 6;400(3):271-4.

Lindgren LO, Stalberg KG, Hoglund AS.

Seed-specific overexpression of an endogenous Arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid.

Plant Physiol. 2003 Jun;132(2):779-85. Epub 2003 Apr 17

Liu Y-G, Whittier RF. (1995)

Thermal asymmetric Interlaced PCR: Automable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. Plant J. 8(3): 457-463.

Logemann J, Schell J, Willmitzer L.

Improved method for the isolation of RNA from plant tissues

Anal. Biochem. 1987; 163, 21-26

Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J.

Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers.

Nat Biotechnol. 2000 Aug;18(8):888-92

Mandel, MA, Gustafson-Brown, C, Savidge, B, Yanofsky MF

Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1

Nature 360: 273-277 (1992)

Martin T, Wühner RV, Hummel S, Willmitzer L, Frommer WB.

The GUS reporter system as a tool to study plant gene expression.

In: Gallagher (Hrsg.): GUS Protocols: Using GUS gene as a reporter of gene expression.

Academic Press, 23-43

Martienssen RA. (1998)

Functional genomics: Probing plant gene function and expression with transposons.

PNAS 95(5):2021-6.

Misawa N, Yamano S, Linden H, de Felipe MR, Lucas M, Ikenaga H, Sandmann G.

Functional expression of the Erwinia uredovora carotenoid biosynthesis gene crtI in transgenic plants showing an increase of beta-carotene biosynthesis activity and resistance to the bleaching herbicide norflurazon.

Plant J. 1993 Nov;4(5):833-40. Erratum in: Plant J 1994 Feb;5(2):309.

Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, Dellapenna D.

Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development.

Plant Mol Biol. 2001 Feb;45(3):281-93.

Puente P, Wei N, Deng XW.

Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in Arabidopsis.

EMBO J. 1996 Jul 15;15(14):3732-43.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T.

MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data.

Nucleic Acids Res. 1995 Dec 11;23(23):4878-84.

Raponi M, Dawes IW, Arndt GM.

Characterization of flanking sequences using long inverse PCR.

Biotechniques. 2000 May; 28(5): 838-40, 842, 844.

Riechmann J.L., Wang M., Meyerowitz E.M.

DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS

Nucleic Acids Res. 24:3134-3141 (1996).

Rivas JD.

Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder.

J Chromatogr. 1989 Mar 3;464(2):442-7.

Römer S, Fraser PD, Kiano JW, Shipton CA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM.

Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants.

Nat Biotechnol. 2000 Jun;18(6):666-9

Römer S, Lubeck J, Kauder F, Steiger S, Adomat C, Sandmann G.

Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation.

Metab Eng. 2002 Oct;4(4):263-72.

Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J.

An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20):11102-7.

Rosahl, S., Schell, J., Willmitzer, L. (1987)

Expression of a tuber specific storage protein in transgenic tobacco plants; demonstration of an esterase activity.

EMBO J. 6, 1155-1159

Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G.

Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit.

Plant J. 2000 Nov;24(3):413-9.

Sambrook J, Russel DW.

Molecular Cloning a Laboratory Manual 3rd Edition

2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schweigert S.J. Metabolism of Carotenoids in Mammals
 JOURNAL (in) Britton,G., Liaaen-Jensen,S. and Pfander,H. (Eds.);
 CAROTENOIDS VOL 3 BIOSYNTHESIS AND METABOLISM: 149-194;
 Birkhaeuser Verlag, Basel, Boston, Berlin (1998)

Sessa G., Morelli G., Ruberti I.

The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities
 EMBO J. 12:3507-3517 (1993).

Sessa G., Steindler C., Morelli G., Ruberti I.

The Arabidopsis Athb-8, -9 and -14 genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins.
 Plant Mol. Biol. 38:609-622 (1998).

SEYBOLD A, GOODWIN TW.

Occurrence of astaxanthin in the flower petals of *Adonis annua* L.
 Nature. 1959 Nov 28;184 (Suppl 22):1714-5.

Shahmuradov I.A., Gammerman A.J., Hancock J.M., Bramley P.M., Solovyev V.V.

PlantProm: a database of plant promoter sequences.
 Nucleic Acids Res. 31:114-117 (2003).

Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY.

Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects
 Plant J. 1999 Nov;20(4):401-412X.

Smyth DR.

Gene silencing: cosuppression at a distance.
 Curr Biol. 1997 Dec 1;7(12):R793-5. Review.
 Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM
 Early flower development in Arabidopsis.
 Plant Cell. 1990 Aug;2(8):755-67

Solano R., Nieto C., Avila J., Canas L., Diaz I., Paz-Ares J.

Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*
 EMBO J. 14:1773-1784 (1995).

Sreekala C., Raghava SP.

Exploitation of heterosis for carotenoid content in African marigold (*Tagetes erecta* L.) and its correlation with esterase polymorphism.
 Theor Appl Genet. 2003 Feb; 106(4): 771-6

Stalberg K, Lindgren O, Ek B, Hoglund AS.

Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*.
 Plant J. 2003 Dec;36(6):771-9

Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M
Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation.

Mol Gen Genet. 1990 Jan;220(2):245-50

Vicente-Carbajosa J., Moose S.P., Parsons R.L., Schmidt R.J.

A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:7685-7690 (1997).

Wang Z.Y., Kenigsbuch D., Sun L., Harel E., Ong M.S., Tobin E.M.

A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene.

Plant Cell 9:491-507 (1997).

Wessler SR.

The splicing of maize transposable elements from pre-mRNA: a minireview.

Gene. 1989 Oct 15; 82(1): 127-33. Review

West KP Jr, Katz J, Khatry SK, LeClerq SC, Pradhan EK, Shrestha SR, Connor PB, Dali SM, Christian P, Pokhrel RP, Sommer A.

Double blind, cluster randomised trial of low dose supplementation with vitamin A or beta carotene on mortality related to pregnancy in Nepal. The NNIPS-2 Study Group.

BMJ. 1999 Feb 27;318(7183):570-5.

Wu K, Hu M, Martin T, Wang C, Li XQ, Tian L, Brown D, Miki B.

The cryptic enhancer elements of the tCUP promoter.

Plant Mol Biol. 2003 Feb;51(3):351-62

Yanagisawa S., Schmidt R.J.

Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors
Plant J. 17:209-214 (1999).

Yanofsky, MF, Ma, H, Bowman, JL, Drews, GN, Feldman, KA, Meyerowitz, EM

The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors

Nature 346 (1990) 35-39

Yamada K, Lim J, Dale JM, Chen H, Shinn P, Palm CJ, Southwick AM, Wu HC, Kim C, Nguyen M, Pham P, Cheuk R, Karlin-Newmann G, Liu SX, Lam B, Sakano H, Wu T, Yu G, Miranda M, Quach HL, Tripp M, Chang CH, Lee JM, Toriumi M, Chan MM, Tang CC, Onodera CS, Deng JM, Akiyama K, Ansari Y, Arakawa T, Banh J, Banno F, Bowser L, Brooks S, Carninci P, Chao Q, Choy N, Enju A, Goldsmith AD, Gurjal M, Hansen NF, Hayashizaki Y, Johnson-Hopson C, Hsuan VW, Iida K, Karnes M, Khan S, Koesema E, Ishida J, Jiang PX, Jones T, Kawai J, Kamiya A, Meyers C, Nakajima M, Narusaka M, Seki M, Sakurai T, Satou M, Tamse R, Vaysberg M, Wallender EK, Wong C, Yamamura Y, Yuan S, Shinozaki K, Davis RW, Theologis A, Ecker JR.

Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome.

Science. 2003 Oct 31;302(5646):842-6.

Ye X, Al-Babili S, Kloti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I.

Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm.

Science. 2000 Jan 14;287(5451):303-5.

Zhou D.X., Li Y.F., Rocipon M., Mache R.

Sequence-specific interaction between S1F, a spinach nuclear factor, and a negative cis-element conserved in plastid-related genes.

J. Biol. Chem. 267:13515-23519 (1992).

Publikationsliste

Patentanmeldungen:

- WO2004022765 Method for hydrolysing carotenoid esters
R. Flachmann, M. Klebsattel, M. Sauer, C. Schopfer
- WO2004018688 Method for production of β -Carotenoids
M. Klebsattel, R. Flachmann, M. Sauer, C. Schopfer
- WO2004018385 Method for the production of zeaxanthin and/or biosynthetic intermediates and/or subsequent products thereof
C. Schopfer, R. Flachmann, K. Herbers, I. Kunze, M. Sauer, M. Klebsattel
- WO2004017749 Use of Astaxanthin-containing parts of plants of the genus Tagetes as animal feed
R. Flachmann, M. Sauer, C. Schopfer, M. Klebsattel, A.-M. Pfeiffer, T. Luck, D. Voeste
- WO2004027070 Transgenic expression cassette for expressing nucleic acids in non-reproductive flower tissues of plants
M. Klebsattel, U. Keetman, K. Herbers, C. Schopfer, R. Flachmann, M. Sauer
- WO2004018695 Method for the production of Ketocarotenoids in plant fruit
C. Schopfer, R. Flachmann, K. Herbers, I. Kunze, M. Sauer, M. Klebsattel
- WO2004018694 Method for producing Ketocarotenoids in genetically modified organisms
M. Sauer, R. Flachmann, M. Klebsattel, C. Schopfer
- WO2004018693 Method for the production of Ketocarotenoids in flower petals of plants
C. Schopfer, R. Flachmann, K. Herbers, I. Kunze, M. Sauer, M. Klebsattel

Poster:

16. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen

Posterbeitrag: Novel flower specific promoters
M. Klebsattel, K. Herbers, U. Keetman

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uwe Sonnewald für die Betreuung und das stete Interesse am Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klösgen danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Herrn Dr. Ulrich Keetman danke ich für die Erstellung der in der Arbeit verwendeten Färbemuster-Datenbank der CSHL Transposon-Mutantenkollektion.

Frau Dr. Irene Kunze, Frau Dr. Hannia Bridg-Giannakopoulos, Annette Reiche sowie Helga Berthold gebührt besonderer Dank für die Transformation der Tagetespflanzen.

Herrn Dr. Ralf Flachmann, Herrn Dr. Matt Sauer, Frau Dr. Christel Schopfer und Frau Dr. Karin Herbers möchte ich für konstruktive Kritik sowie Diskussionsbereitschaft danken.

Lebenslauf

Name: Martin Klebsattel

Geburtstag: 9.11.1975

Geburtsort: Offenbach

1986-1994 Gymnasium Neuenbürg

Juli 1994 Abitur

1994 -1999 Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe

Fachkombination: Botanik, Mikrobiologie, Biochemie und Chemie

Oktober 2000 Diplom

Feb. - Okt. 2000 Diplomarbeit in der Abteilung Biochemie des Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln

Titel: Analyse von Metallbindeeigenschaften eines CMPG-Proteins und Expressionsanalyse der CMPG-Multigenfamilie in *Arabidopsis thaliana*

Seit Mai 2001 Anfertigung der Dissertation bei der Firma SunGene GmbH & Co. KGaA in Gatersleben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ferner erkläre ich, dass ich den Doktorgrad nicht besitze und mich auch früher nicht um den Doktorgrad beworben habe

Quedlinburg im März 2004