

Aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie

**Molekulare Untersuchungen zum Stärkeabbau in vegetativen
Pflanzenteilen**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Molekulare Pflanzenphysiologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

Andreas Scheidig

aus Frankfurt am Main

Köln, im Juni 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Jens Koßmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Steup
3. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Sonnewald

Tag der Disputation: 14.11.2006

„Es gibt Wunder, die müssen
im Dunklen geschehen“

Prof. Dr. Abdul Nachtigaller

Aus „Rumo und die Wunder im Dunkeln“

Meinem Sohn Finn gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	I
	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	VIII
I	Einleitung	1
I.1	Stärke.....	1
I.1.1	Stärkestruktur.....	2
I.2	Stärkemetabolismus.....	2
I.2.1	Stärkesynthese.....	2
I.2.2	Stärkeabbau.....	4
I.2.2.1	Enzyme, welche dem Stärkeabbau zugeordnet werden.....	4
I.2.2.1.1	Amylasen.....	4
I.2.2.1.2	Entzweigungsenzym (engl. debranching enzyme; DBE).....	7
I.2.2.1.3	Disproportionierungsenzym (DPE).....	8
I.2.2.1.4	α -Glucosidase.....	9
I.2.2.1.5	α -1,4-Glucan-Lyasen.....	10
I.2.2.1.6	α -1,4-Glucan-Phosphorylase.....	11
I.2.2.2	Der Abbau der transitorischen Stärke.....	12
I.2.2.3	Stärkeabbau in Speicherorganen.....	14
I.2.2.4	Regulation des Stärkeabbaus.....	15
I.3	Zielsetzung der Arbeit.....	17
II	Material	18
II.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial.....	18
II.2	Bakterienstämme, Plasmide, Phagen und Vektoren.....	19
II.3	cDNA-Bibliotheken.....	19
II.4	Synthetische Oligonukleotideprimer.....	19
II.5	Medien.....	20
II.6	Pflanzen.....	20
III	Methoden	21
III.1	Molekularbiologische Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	21
III.1.1	Klonierung und Sequenzierung.....	21
III.1.2	PCR-Amplifikation.....	21
III.1.3	Radioaktive Markierung von DNA.....	21

III.1.4	Radioaktive Markierung von RNA.....	21
III.1.5	Konstruktion pflanzlicher cDNA-Bibliotheken.....	22
III.1.6	Funktionelles Durchmustern von cDNA-Bibliotheken.....	22
III.1.7	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	23
III.1.8	Isolation rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	23
III.1.9	Durchmustern einer cDNA-Bibliothek mittels homologer Sonden.....	24
III.1.10	Isolation von RNA.....	24
III.1.11	RNA-Analysen.....	24
III.1.11.1	Northern-Blot.....	24
III.11.2	Bestimmung von mRNA-Transkriptmengen mittels RT-PCR.....	25
III.1.12	Transformation.....	26
III.1.12.1	Transformation von Bakterien.....	26
III.1.12.2	Transformation von <i>Solanum tuberosum</i> L.....	26
III.2	Kultivierung von Pflanzen.....	26
III.3	Pflanzenphysiologische und biochemische Methoden.....	27
III.3.1	Bestimmung des Gehaltes von Stärke und den löslichen Zuckern Glucose, Fructose und Saccharose.....	27
III.3.2	Bestimmung der β -Amylase-, α -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität.....	28
III.3.3	Bestimmung der Stärkephosphorylase-Aktivität.....	29
III.3.4	Bestimmung der D-Enzym-Aktivität.....	29
III.3.5	Bestimmung der Pullulanase-Aktivität.....	30
III.3.6	Bestimmung von Proteinmengen.....	30
III.3.7	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE).....	30
III.3.8	Bestimmung hydrolytischer Abbauprodukte mittels Dünnschichtchromatographie.....	30
III.3.9	Präparation von Chloroplasten aus Erbsenkeimlingen.....	31
III.3.10	<i>In vitro</i> Transkription und Translation.....	31
III.3.11	Import von ^{35}S -markierten <i>in vitro</i> transkribierten und translatierten Proteinen in isolierte Erbsenchloroplasten.....	32
III.3.12	Stärkeisolierung aus Kartoffelknollen.....	32
III.3.13	Stärkeisolierung aus Kartoffelblättern.....	32
III.3.14	Bestimmung der Dichte von Kartoffelknollen.....	33
III.3.15	Analyse der Stärkekorngröße.....	33
IV	Ergebnisse	34
IV.1.1	Herstellung von cDNA-Bibliotheken zur Isolation von cDNAs, die für stärkeabbauende Enzyme kodieren.....	34

IV.1.2	Isolation von cDNAs, welche für unbekannte stärkeabbauende Enzyme kodieren.....	34
IV.2	Weiterführende Untersuchungen zu den isolierten cDNAs.....	36
IV.2.1	Charakterisierung von <i>dsd7</i>	37
IV.2.1.1	Sequenzanalyse der <i>dsd7</i> cDNA aus Kartoffel.....	37
IV.2.1.2	Sequenzvergleich der <i>dsd7</i> cDNA aus Kartoffel mit Genen aus anderen Organismen.....	39
IV.2.1.3	Analyse der hydrolytischen Aktivität des rekombinanten PCT-BMYI Proteins.....	40
IV.2.1.4	Das rekombinante HIS-BMYI Protein greift native Kartoffelstärkegranula an.....	42
IV.2.1.5	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von PCT-BMYI.....	43
IV.2.1.6	Untersuchungen zur <i>pct-bmyI</i> Transkriptmenge in Kartoffelgeweben.....	44
IV.2.1.7	Funktionelle Analyse der plastidär lokalisierten β -Amylase PCT-BMYI aus Kartoffel in transgenen Pflanzen.....	46
IV.2.1.7.1	Erzeugung und Selektion von transgenen α - <i>pct-bmyI</i> Pflanzen mit reduzierter PCT-BMYI-Aktivität.....	47
IV.2.1.7.2	Die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität in Kartoffel führt zu einem Hochstärke-Phänotyp und zu einem Anstieg der Trockenmasse in den Blättern.....	49
IV.2.1.7.3	Die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität hat keinen Einfluss auf den Stärkestoffwechsel in Kartoffelknollen.....	54
IV.2.1.7.4	Erzeugung und Analyse von Kartoffelpflanzen mit erhöhter CT-BMYI-Aktivität.....	57
IV.2.2	Charakterisierung von <i>dsd10</i>	59
IV.2.2.1	Sequenzanalyse von <i>dsd10</i> cDNA aus Kartoffel.....	59
IV.2.2.2	Sequenzvergleich der <i>sgeI</i> cDNA aus Kartoffel mit Genen aus anderen Organismen.....	61
IV.2.2.3	Analyse der hydrolytischen Aktivität des rekombinanten SGEI Proteins.....	62
IV.2.2.4	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von SGEI.....	66
IV.2.2.5	Untersuchungen zur <i>sgeI</i> Transkriptmenge in verschiedenen Geweben der Kartoffel.....	68
IV.2.2.6	Funktionelle Analyse von SGEI aus Kartoffel mit Hilfe transgener Pflanzen.....	69
IV.2.2.6.1	Erzeugung und Selektion von transgenen α - <i>sgeI</i> Pflanzen.....	70
IV.2.2.6.2	Untersuchung von Enzymaktivitäten in transgenen α - <i>sgeI</i> Pflanzen.....	72

IV.2.2.6.3	Die Reduktion von SGEI in Kartoffeln führt zu einem Hochstärke-Phänotyp und zu einem Anstieg der Trockenmasse in den Blättern.....	74
IV.2.2.6.4	Die Reduktion von SGEI hat keinen Einfluss auf den Stärkestoffwechsel in Kartoffelknollen.....	81
V	Diskussion.....	84
V.1	Das funktionelle Durchmustern von cDNA-Bibliotheken führte zur Isolation von neuen, bisher nicht charakterisierten cDNAs die für stärkeabbauende Enzyme kodieren.....	84
V.2	PCT-BMYI, eine neue β -Amylase aus Kartoffel.....	85
V.2.1	PCT-BMYI ist in Chloroplasten lokalisiert.....	86
V.2.2	Die <i>pct-bmyI</i> Expression variiert im Tagesgang und wird durch Kälte induziert.....	87
V.2.3	Die antisense Inhibierung des <i>pct-bmyI</i> Gens führt zu einem Hochstärke-Phänotyp in Blättern und zum Anstieg des Trockengewichts.....	88
V.2.4	Die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität hat keinen Einfluss auf das kälteinduzierte Süßwerden von Kartoffelknollen.....	91
V.3	SGEI, eine neue α -Amylase aus Kartoffel?.....	92
V.3.1	Importexperimente deuten auf die plastidäre Lokalisation des SGEI Proteins hin.....	93
V.3.2	Northern-Blot Experimente weisen auf die Existenz unterschiedlich großer SGEI Transkripte hin.....	94
V.3.3	Die antisense Inhibierung des <i>sgel</i> Gens führt zu einem Hochstärke-Phänotyp in Blättern und damit zu einem Anstieg des Trockengewichts.....	95
V.3.4	Die »antisense« Inhibierung des <i>sgel</i> Gens beeinflusst die α - und auch die β -Amylase-Aktivität in Blättern.....	96
V.3.5	Der Hochstärke-Phänotyp der Blätter ist auf die Akkumulation der Stärke über die Vegetationsperiode hinweg zurückzuführen.....	98
V.3.6	Die Reduktion der SGEI-Aktivität hat scheinbar keinen Einfluss auf den Stärkeumsatz in kaltgelagerten oder keimenden Kartoffelknollen.....	99
V.3.7	Abschließende Betrachtung.....	100
VI	Zusammenfassung.....	101
VII	Literaturverzeichnis.....	105

Publikationen und Patente.....	113
Danksagung.....	114
Lebenslauf.....	115
Erklärung.....	116

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABA	Abscisicacid, Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AGPase	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase
Amp	Ampecilin
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaar
BSA	»bovine serum albumin«, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CaMV 35S	35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
cfu	»colony forming unit«, koloniebildende Einheit
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
DBE	»debranching enzym«, Entzweigungsenzym
D-Enzym	Disproportionierungsenzym
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	»expressed sequenz taq«
FG	Frischgewicht
G	Guanosin
g	Gramm
GBSS	Granula-gebundene Stärkesynthase
GFP	»green fluorescent protein«, grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HEPES	N-(-2-Hydroxyethyl-)piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
HIS-tag	6 X Histidin-tag
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
M	molar
MCS	»multiple cloning side«, multiple Klonierungsstelle
Mes	N-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
m	Milli
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Amino
n	Nano
NAD (NADH)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid oxidiert (reduziert)
NADP (NADPH)	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat oxidiert (reduziert)
n.d.	nicht detektiert
OD	optische Dichte
p	Plasmid
PCR	»polymerase chain reaction«, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol

pfu	»plaque forming unit«, plaquebildende Einheit
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
3-PGA	3-Phosphoglycerat
PGM	Phosphoglucomutase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNPG5	<i>p</i> -Nitrophenyl-Maltopentaose
PNPG7	<i>p</i> -Nitrophenyl-Maltoheptaose
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
rpm	round per minute, Umdrehungen pro Minute
SBE	Verzweigungsenzym
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sex	»starch excess«, Hochstärke
SS	Stärkesynthase
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	»Unit«, Einheit
ü.N	über Nacht
WT	Wildtyp

Aminosäuren:

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

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 1	Pipettierschema der einzelnen RT-PCR Reaktionen.....	25
Tab. 2	Verwendetes RT-PCR Programm.....	26
Tab. 3	Daten zu den hergestellten cDNA-Bibliotheken.....	34
Tab. 4	Klone, die durch die funktionelle Durchmusterung der hergestellten cDNA-Bibliotheken isoliert wurden.....	35
Tab. 5	Ähnlichkeiten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher β -Amylasen.....	39
Tab. 6	Bestimmung von Enzymaktivitäten in α - <i>pct-bmyI</i> Linien.....	49
Tab. 7	Bestimmung des Stärkegehaltes in Blättern der α - <i>pct-bmyI</i> Linien.....	53
Tab. 8	Sequenzvergleich zwischen SGEI, ASGEI und von ESTs abgeleiteten Proteinsequenzen mit unbekannter Funktion.....	62
Tab. 9	Enzymaktivitäten in selektierten α - <i>sgeI</i> Linien.....	73
Tab. 10	Der Stärkegehalt in »source« Blättern 6 Wochen alter α - <i>sgeI</i> Linien am Ende der Licht- und Dunkelperiode.....	77
Tab. 11	Der Stärkegehalt in »source« Blättern 11 Wochen alter α - <i>sgeI</i> Linien am Ende der Licht- und Dunkelperiode.....	77
Tab. 12	Stärkegehalt in »source« Blättern unterschiedlich kultivierter α - <i>sgeI</i> Linien.....	78
Tab. 13	Enzymatische Bestimmung der Menge an Stärke, Glucose, Fructose und Saccharose in Knollen der α - <i>sgeI</i> Linien.....	83
Abb. 1	Expression der <i>dsd7</i> cDNA in <i>E. coli</i> KV832.....	37
Abb. 2	Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des <i>dsd7</i> Vollängenklons.....	37
Abb. 3	Nachweis der rekombinanten β -Amylase-Aktivität in <i>E. coli</i> BL21(DE3) Zellen.....	41
Abb. 4	Nachweis der hydrolytischen Aktivität des rekombinanten HIS-BMYI Proteins durch native PAGE.....	41
Abb. 5	Nachweis der β -Amylase-Aktivität mittels Dünnschichtchromatographie.....	42
Abb. 6	PCT-BMYI wird <i>in vitro</i> in isolierte Erbsenchloroplasten importiert.....	44
Abb. 7	Northern-Blot Analyse der <i>pct-bmyI</i> Transkriptmenge in Blättern und Blüten der Kartoffel.....	45
Abb. 8	Northern-Blot Analyse der <i>pct-bmyI</i> Transkriptmenge in »source« Blättern im Tagesverlauf.	45
Abb. 9	Northern-Blot Analyse der <i>pct-bmyI</i> Transkriptmenge in Kartoffelknollen.....	46
Abb. 10	Beschreibung des 35S <i>pct-bmyI</i> antisense Konstrukts α - <i>pct-bmyI</i>	47
Abb. 11	Northern-Blot Analyse der α - <i>pct-bmyI</i> Linien.	48

Abb. 12	Die Inhibierung des <i>pct-bmyI</i> Gens führt zu einem Hochstärke-Phänotyp.....	50
Abb. 13	Bestimmung der Trockenmasse in »source« Blättern zwölf Wochen alter <i>α-pct-bmyI</i> Linien.....	50
Abb. 14	Bestimmung des Stärkegehaltes in Blättern der <i>α-pct-bmyI</i> Linien.....	52
Abb. 15	Messung des Gehalts an Glucose, Fructose und Saccharose in »source« Blättern neun Wochen alter <i>α-pct-bmyI</i> Linien.....	54
Abb. 16	Messungen der β-Amylase-, α-Amylase- und α-Glucosidase-Aktivität in Knollen der <i>α-pct-bmyI</i> Linien.....	55
Abb. 17	Analyse von Ernteparametern der <i>α-pct-bmyI</i> Linien.....	56
Abb. 18	Messung des Gehalts an Stärke, Glucose, Fructose und Saccharose in Knollen der <i>α-pct-bmyI</i> Linien.....	57
Abb. 19	Beschreibung des 35S <i>sense-ct-bmy</i> Konstruktes.....	57
Abb. 20	Messung des Stärkegehalts in Blättern der 35S <i>sense-ct-bmy</i> Linien.....	58
Abb. 21	Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz der <i>sgel</i> Vollängen-cDNA.....	59
Abb. 22	Nachweis der hydrolytischen Aktivität des rekombinanten DSD10 Proteins mittels nativer PAGE.....	63
Abb. 23	Messung der hydrolytischer Aktivitäten von SGEI, DSD10 und ASGEI.....	64
Abb. 24	Rekombinantes DSD10 Protein zeigte α-Amylase-Aktivität.....	65
Abb. 25	Bestimmung der rekombinanten SGEI Enzymaktivitäten in <i>E. coli</i> DH5α Zellen.....	66
Abb. 26	<i>In vitro</i> Import des chimären SGEI/GFP-Proteins in isolierte Erbsenchloroplasten...	67
Abb. 27	Northern-Blot Analyse der <i>sgel</i> Transkriptmenge in Blättern und Blüten der Kartoffel.....	68
Abb. 28	Northern-Blot Analyse der <i>sgel</i> Transkriptmenge in Tomaten-Keimlingen und Kartoffelknollen.....	69
Abb. 29	Darstellung des 35S <i>sgel</i> »antisense« Konstruktes <i>α-sgel</i>	70
Abb. 30	Die Inhibierung des <i>sgel</i> Gens führte zu einem Hochstärke-Phänotyp in »source« Blättern.....	71
Abb. 31	RT-PCR Analyse der selektierten <i>α-sgel</i> Linien.....	72
Abb. 32	Northern-Blot Analyse der <i>α-sgel</i> Pflanzen zur Expression von <i>pct-bmyI</i> und <i>cf-beta</i>	74
Abb. 33	Messung des Stärkegehaltes in »source« Blättern der selektierten <i>α-sgel</i> Linien.....	75
Abb. 34	Messung des Stärkegehaltes in »source« Blättern unterschiedlich alter <i>α-sgel</i> Linien und der R1 »antisense« Linie #11.....	76
Abb. 35	Messung des Glucose, Fructose und Saccharose Gehaltes in »source« Blättern zehn Wochen alter <i>α-sgel</i> Linien.....	78

Abb. 36	Drei α - <i>sgeI</i> Linien zeigten ein erhöhtes Trockengewicht gegenüber der untransformierten Kontrolle.....	79
Abb. 37	Stärkekorngößenverteilung in Blättern der α - <i>sgeI</i> Linie #58 und der untransformierten Kontrolle.....	80
Abb. 38	Abgedunkelte »source« Blätter von α - <i>sgeI</i> Linien zeigten eine erhöhte Vitalität.....	81
Abb. 39	Analyse von Ernteparametern der α - <i>sgeI</i> Linien.....	82
Abb. 40	Messung des Glucose-, Fructose- und Saccharose-Gehaltes in kaltgelagerten Knollen der α - <i>sgeI</i> Linien.....	83

I Einleitung

I.1 Stärke

Das Leben beginnt dort, wo es am feindlichsten ist: auf der Sonne. Die Sonne stellt die Energiequelle da, von deren Existenz das gesamte Leben des Planeten Erde abhängt. Durch die Fusion von Wasserstoffatomen zu Helium im Zentrum der Sonne entsteht unter anderem die Lichtenergie, welche Pflanzen in die Lage versetzt, mittels Photosynthese Kohlendioxid in chemisch gebundene Energie zu überführen. Pflanzen nutzen die gebundene Energie anschließend zum Aufbau organischer Moleküle, wie Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten, von deren Existenz wiederum das Leben der heterotrophen Organismen, also auch des Menschen, abhängt.

In vielen höheren Pflanzen dient Stärke als die wichtigste Speicherform von Kohlenhydraten. Sie kann bis zu 80 % des Trockengewichtes in Speichergeweben erreichen. Stärke wird in Form von semikristallinen Partikeln, den Stärkekörnern, die erstmals 1716 von van Leeuwenhoek beschrieben wurden, abgelagert. Sie dient nicht nur der menschlichen Ernährung als Rohstoff, sondern stellt auch ein wichtiges Ausgangsprodukt für industrielle Anwendungen da. Stärke wird zum Beispiel in der Papierindustrie, der Textilindustrie und in der Produktion von Klebstoffen, Chemikalien und Pharmazeutika eingesetzt. Die gewonnene Menge an Stärke aus Weizen, Reis, Mais und Kartoffel beträgt ungefähr 10^9 Tonnen pro Jahr, von denen ungefähr 2×10^7 Tonnen pro Jahr der Industrie zugeführt werden.

In Pflanzen unterscheidet man u.a. zwei Arten von Stärke, die transitorische Stärke und die Speicherstärke oder Reservestärke. Die transitorische Stärke wird in den Chloroplasten der Blätter, sowie in geringerem Maße auch in anderen grünen Geweben (z.B. Stängel), synthetisiert. Neben Saccharose stellt die Stärke das Hauptzwischenprodukt der Photosynthese da, da im Licht bis zu 30 % des fixierten CO_2 in Stärke inkorporiert werden. Die transitorische Stärke wird in der folgenden Dunkelperiode mobilisiert und kann in Saccharose für den Export umgewandelt werden. Die Reservestärke wird in den Amyloplasten von sich entwickelnden Samen oder vegetativen Speicherorganen synthetisiert und dort für längere Zeiträume deponiert. Die Reservestärke wird dann mit Beginn der Keimung des Überdauerungsorgans mobilisiert und versorgt den Keimling mit der nötigen Energie.

I.1.1 Stärkestruktur

Vor über einhundert Jahren machte Mayer (1895) die Beobachtung, dass Stärke aus zwei unterschiedlichen Makromolekülen besteht, die er damals als α - und β -Amylose bezeichnete. Marquenne und Roux (1903) prägten dann die heute geläufigen Begriffe Amylose und Amylopektin. Beide Polymere bestehen aus α -D-Glucose Untereinheiten, welche hauptsächlich α -1,4-glycosidisch miteinander verbunden sind. Amylose wird klassischerweise als ein lineares Polymer beschrieben, welches nur α -1,4-glycosidische Bindungen enthält. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass Amylose zu einem geringen Anteil (weniger als 0.1 %) α -1,6-glycosidische Verzweigungen enthält (Ball et al., 1998; Hizukuri und Takagi, 1984; Takeda et al., 1984; 1986). Im Gegensatz zur Amylose besitzt Amylopektin einen höheren Verzweigungsgrad. Dieses Polymer besitzt ca. 4-6 % α -1,6-glycosidische Verzweigungen, welche zu einer sehr komplexen Struktur des Glucosepolymers führen (Preiss 1991). Der Polymerisationsgrad von Amylose wird mit 10^2 bis 10^3 Glucosemolekülen angegeben, der von Amylopektin mit 10^3 bis 10^4 . Das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin zeigt art- und organspezifische Schwankungen und liegt bei 15-35 % Amylose und 65-85 % Amylopektin (Ball et al., 1998).

Stärkekörner unterscheiden sich in ihrer Größe, in ihrem Aussehen und in ihren Eigenschaften je nach Pflanzenspezies, dem Gewebe und dem jeweiligen Entwicklungszustand der Pflanze. Die Größe der Stärkekörner reicht von 1 μm (Pollenstärkekörner), bis zu 100 μm (Stärkekörner der Kartoffelknollen). Stärkekörner aus Blättern sind in der Regel deutlich kleiner als solche aus Speicherorganen, wie z.B. Knollen (Martin und Smith, 1995).

I.2 Stärkemetabolismus

I.2.1 Stärkesynthese

ADP-Glucose stellt das Substrat der Synthese von Amylose und Amylopektin da. ADP-Glucose entsteht aus Glucose-1-Phosphat und ATP durch das Enzym ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) (Kossmann und Lloyd, 2000). Da die Reaktion frei reversibel ist, wird das Gleichgewicht der Reaktion wahrscheinlich durch die Aktivität einer plastidären Pyrophosphatase (Weiner et al., 1987; Schulze et al., 2004), welche das entstehende Pyrophosphat in anorganisches Phosphat spaltet, in Richtung der ADP-Glucose-Synthese verschoben (Gross und ap Rees 1986). Die AGPase-Aktivität unterliegt der allosterischen Regulation, wobei 3-PGA als Effektor und anorganisches Phosphat als Inhibitor wirken (Preiss, 1991). Die Reaktion der AGPase auf 3-PGA und anorganisches Phosphat stellt einen wichtigen Faktor der Regulation der Stärkesynthese in Chloroplasten dar (Preiss, 1991).

Die AGPase ist ein tetrameres Enzym, wobei die pflanzliche Form, abweichend von der bakteriellen, aus jeweils zwei großen und kleinen Untereinheiten besteht. Alle Untereinheiten werden zur vollen Funktionalität benötigt, wobei die beiden kleineren offenbar für die katalytische Aktivität verantwortlich sind (Ballicora et al., 1995) und die großen für die Modulation der Sensitivität gegenüber Effektoren (Smith et al., 1997). Die herausragende Bedeutung der AGPase in Bezug auf die Stärkesynthese konnte anhand transgener Pflanzen und Mutanten gezeigt werden. Die antisense Inhibierung der kleinen Untereinheit der AGPase führt zu einer dramatischen Reduktion des Stärkegehaltes in Kartoffelknollen (Müller-Röber et al., 1992). Lin et al. (1988) konnten eine stärkefreie Arabidopsis Mutante isolieren (*adg1*), die keine nachweisbare AGPase-Aktivität mehr aufwies.

Ausgehend von ADP-Glucose erfolgt die Übertragung des Glycosylrestes auf das nicht-reduzierende Ende einer bereits existierenden Polysaccharidkette durch die Stärkesynthasen. Aus Kartoffelpflanzen konnten bis heute drei Isoformen isoliert werden, die Stärkesynthasen (SS) I, II und III (Edwards et al., 1995; Abel et al., 1996; Kossmann et al., 1999). Zur Gesamtaktivität der Stärkesynthasen in Kartoffelknollen trägt SS I ca. 5-10 %, SS II ca. 15 % und SS III ca. 80 % bei (Kossmann und Lloyd, 2000). Resultate mit Pflanzen, in denen die Isoformen SS II und SS III mittels antisense Technik inhibiert wurden, deuten auf eine Interaktion der beiden Isoformen bei der Amylopektinsynthese hin (Edwards et al., 1999; Lloyd et al., 1999). Neuere Untersuchungen lassen auf die Regulation von SS III durch eine plastidäre 14-3-3 Isoform in Arabidopsis schließen, da die antisense Inhibierung dieses Proteins zu einem 2-4 fachen Anstieg der Stärkemenge und zu einer Erhöhung des Amylopektin gehaltes führt (Sehnke et al., 2001). Die Bedeutung der SS I Isoform in Bezug auf die Stärkesynthese ist nicht klar, da die Inhibierung von SS I in Kartoffel zu keiner Änderung in der Stärkemenge und -qualität gegenüber der Kontrolle führte (Kossmann et al., 1999).

Die Synthese von Amylose geht von der granulagebundenen Stärkesynthase I aus (GBSS I). GBSS I Mutanten verschiedener Pflanzenspezies synthetisieren amylosefreie Stärke. Das gleiche Ergebnis konnte auch für Pflanzen gezeigt werden, in denen die GBSSI-Aktivität mittels antisense Technik inhibiert wurde (Kossmann und Lloyd, 2000). Obwohl GBSSI essentiell für die Synthese von Amylose ist, scheint sie auch an der Synthese von Amylopektin beteiligt zu sein (Baba et al., 1987; Denyer et al., 1996). Van de Wal et al. (1998) zeigten, dass Amylopektin *in vitro* als Primer der Amylosesynthese durch GBSS dient.

Das Verzweigungsenzym (englisch: starch branching enzyme SBE) fügt die α -1,6-Verzweigungen in die Amylopektinfraktion der Stärke ein. In allen bis heute untersuchten Pflanzenspezies konnten mehrere Isoformen identifiziert werden, die sich in die Klassen SBEA und SBEB unterteilen lassen (Burton et al., 1995). Die Mutation von SBEA führt zu einer Akkumulation

großer Mengen Amylose gegenüber dem Wildtyp, sowie zu einer Abnahme der Stärkemenge (Kossmann und Lloyd, 2000). Die antisense Inhibierung von SBEB in Kartoffeln führt zu keiner Änderung des Amylosegehaltes oder der Stärkemenge gegenüber der untransformierten Kontrolle. Weitere Untersuchungen zeigten aber, dass die strukturellen Eigenschaften dieser Stärken verändert waren. Das Amylopektin aus diesen Pflanzen enthielt einen größeren Anteil an längeren, wie auch kürzeren Glucoseketten, des weiteren war die Phosphorylierung der Stärke um 80 % erhöht (Kossmann und Lloyd, 2000).

Neben den hier beschriebenen Enzymen des Stärkeaufbaus sind auch Enzyme, welche ursprünglich dem Stärkeabbau zugeordnet wurden, für die Festlegung der Feinstruktur der Stärke verantwortlich (siehe I.2.2.1.2 und I.2.2.1.5).

I.2.2 Stärkeabbau

Die eigentliche Rolle der Stärke im Pflanzenmetabolismus ist die Pufferung der Versorgung der Pflanze mit Energie. Um diesem Zweck zu dienen, muss die Stärke umgesetzt werden. Bei dem Abbau der Stärke werden Polysaccharide in Produkte mit einem niedrigeren Polymerisationsgrad umgewandelt. Im Gegensatz zur Stärkesynthese sind die dem Stärkeabbau zu Grunde liegenden Mechanismen weniger verstanden. Dies betrifft sowohl die beteiligten Enzyme als auch die Regulation des Abbaus, auch wenn in den letzten Jahren wesentliche Erkenntnisse dazu gewonnen wurden (Übersichten in Zeeman et al., 2004; Lloyd et al., 2005; Smith et al., 2005). Eine Ausnahme in diesem Zusammenhang stellt der Abbau der Speicherstärke in Getreidesamen dar.

Im folgenden sollen bekannte stärkeabbauende Enzyme beschrieben werden und näher auf den Abbau der transitorischen Stärke sowie der Speicherstärke eingegangen werden. Auch mögliche Regulationsmechanismen des Stärkeabbaus werden beschrieben. In diesem Kontext sollen auch die bis heute offenen Fragen zum Abbau der Stärke, mit besonderem Augenmerk auf die transitorische Stärke, dargelegt werden.

I.2.2.1 Enzyme, welche dem Stärkeabbau zugeordnet werden

I.2.2.1.1 Amylasen

Amylasen hydrolysieren ein α -1,4-glucosidisch verknüpftes Oligo- oder Polyglucan durch die Übertragung eines Glucosylrestes auf H_2O . Amylasen werden aufgrund ihres Angriffspunkts, sowie der Stereochemie ihres Reaktionsproduktes, in verschiedene Klassen eingeteilt.

α -Amylase

α -Amylasen (Endoamylasen) spalten interne α -1,4-Bindungen linearer oder verzweigter Glucane und werden deshalb als Endoamylasen bezeichnet. Bei den entstehenden Reaktionsprodukten befindet sich anschließend die neu entstandene reduzierende Gruppe in α -Position. α -Amylasen sind im Pflanzenreich weit verbreitet und spielen beim Abbau der Speicherstärke im Getreideendosperm eine Schlüsselrolle (Beck und Ziegler, 1989).

α -Amylasen werden häufig, neben α -Glucosidasen, als die einzigen Enzyme beschrieben, welche in der Lage sind, den Stärkeabbau an nativen Stärkekörnern zu initiieren (Steup et al., 1983, Steup, 1988; Witt et al., 1995; Witt und Sauter, 1996). Die Beteiligung einer α -Amylase am Abbau der transitorischen Stärke wurde durch Zeeman et al. (1998b) vermutet. Das Fehlen einer plastidär lokalisierten α -Amylase wurde in der Arabidopsis *sex4* Mutante mit einem Hochstärke-Phänotyp der Blätter korreliert. Diese Pflanzen werden als sogenannte Hochstärkemutanten (engl. *starch excess*; *sex*) bezeichnet, da sie einen höheren Stärkegehalt in Blättern gegenüber dem Wildtyp aufweisen. In weiteren Arbeiten, in denen sämtliche α -Amylasen durch Insertionsmutagenese ausgeschaltet wurden, konnte jedoch gezeigt werden, dass α -Amylasen für den Abbau transitorischer Stärke in Arabidopsis nicht benötigt werden (Yu et al., 2005), und dass es sich bei dem in der *sex4* Mutante beeinflussten Genprodukt um eine Protein Phosphatase handelt, die wahrscheinlich eine Reihe von Enzymen des Stärkestoffwechsels reguliert (Niittylä et al., 2006).

Aus Kartoffelknollen konnte eine α -Amylase isoliert werden, welche in der Lage ist, native Kartoffelstärke *in vitro* abzubauen. Da das Enzym in frisch isolierter Knollenstärke an die Stärkekörner gebunden vorlag, kann davon ausgegangen werden, dass es zumindest teilweise plastidär lokalisiert vorliegt. Dieses Ergebnis deutet auf die mögliche Beteiligung von α -Amylasen am Stärkeabbau in Knollen hin (Witt und Sauter, 1996).

Die meisten der bis heute beschriebenen α -Amylasen sind extraplastidär lokalisiert (Beck und Ziegler, 1989) und die physiologische Bedeutung dieser α -Amylasen ist unbekannt. Die antisense Inhibierung zweier α -Amylase Isoformen aus Kartoffel (Amy21 und Amy23; Gausing und Kreiberg, 1989) führte, im Vergleich zur untransformierten Kontrolle, zu keiner Reduktion des Stärkeabbaus in Knolle oder Blatt (Frohberg, pers. Mitteilung). Hierbei bleibt anzumerken, dass, wie für viele bis heute untersuchten α -Amylasesequenzen, nach computergestützter Voraussage beide Isoformen kein plastidäres Transitpeptid besitzen. Nach neueren Untersuchungen in Arabidopsis, Reis und Tabak muss dies nicht notwendigerweise ausschließen, dass ein Protein in Plastiden lokalisiert ist. Anhand der karbonischen Anhydrase aus Arabidopsis wurde ein neuer Importmechanismus für Glykoproteine in Chloroplasten beschrieben (Villarejo et al., 2005; Faye und Daniell, 2006), der über einen unbekanntenen Mechanismus das zelluläre sekretorische System mit einbezieht. Diese Ergebnisse

erklären auch, warum zwei verschiedene α -Amylasen in Reis, α -Amylase I-1 (Asatsuma et al., 2005) und α -Amy3 (Chen et al., 2004), gleichzeitig in Plastiden und in der Zellwand gefunden wurden.

β -Amylase

β -Amylasen (Exoamylasen) katalysieren die Freisetzung von Maltose vom nichtreduzierenden Ende eines α -1,4-Glucans. Bei der entstehenden Maltose befindet sich die neu entstandene reduzierende Gruppe anschließend in β -Position.

Im Gegensatz zu α -Amylasen kommen β -Amylasen nur in Pflanzen und Mikroorganismen vor (Steup, 1988). Neben der Hydrolyse eines α -1,4-Glucans durch β -Amylasen konnte für das Enzym aus Süßkartoffel eine nicht hydrolytische Aktivität gezeigt werden, welche zum Aufbau neuer α -1,4-Bindungen führte (Hehre et al., 1969; 1979). Beim Abbau von Stärke oder Amylopektin durch β -Amylasen entsteht neben Maltose ein so genanntes β -Grenzdextrin, da das Enzym nicht in der Lage ist, über die α -1,6-Verzweigungen hinaus den Abbau zu katalysieren (Baba and Kainuma, 1987).

β -Amylase-Aktivität konnte in photosynthetisch aktiven Organen, wie z.B. Blättern, als auch in Speicherorganen, wie z.B. Knollen, nachgewiesen werden. Die physiologische Rolle der β -Amylase in Pflanzen ist bis heute unklar. Die Mehrzahl der *in vitro* Studien zeigen, dass das Enzym scheinbar nicht in der Lage ist, native Stärkekörner anzugreifen (Beck and Ziegler, 1989). Im Gegensatz dazu konnten Baba und Kainuma (1987) zeigen, dass β -Amylasen aus Süßkartoffel in der Lage sind, rohe Süßkartoffelstärke anzugreifen. Dieses Resultat konnte von Sarikaya et al. (2000) bestätigt werden. Zusätzlich zeigten die Autoren dieser Studie, dass β -Amylasen aus *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus* und Sojabohne in der Lage sind, rohe Stärke aus Kartoffel, Süßkartoffel, Weizen, Reis und Mais anzugreifen, wenn auch nur in geringem Maße.

β -Amylase Mutanten in Roggen (Daussant et al., 1981), Sojabohne (Hildebrand und Hymowitz, 1981) und Reis (Yamaguchi et al., 1999), welche keine oder nur geringe β -Amylase-Aktivität aufwiesen, zeigten eine normale Entwicklung und unverändertes Wachstum. Ebenso zeigten Arabidopsis Mutanten mit verringerter oder erhöhter β -Amylase-Aktivität keinen Effekt auf den Stärkeabbau, die Entwicklung oder das Wachstum (Mita et al., 1997 a; b; Laby et al., 2001).

Studien bezüglich der Lokalisation der β -Amylase-Aktivität in der Pflanzenzelle zeigten in Gerste, Weizen, Sojabohne, Gartenbohne und Erbse, dass der größte Teil der β -Amylase-Aktivität außerhalb der Chloroplasten vorliegt (Ziegler und Beck, 1986; Nakamura et al., 1991). Für Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass ca. 80 % der Aktivität extraplastidär lokalisiert ist (Lin et al., 1988) und eine Isoform mit dem Phloem assoziiert vorliegt (Wang et al., 1995). Zusätzlich zu diesen Daten scheinen die meisten der bis heute isolierten cDNAs und genomischen Sequenzen nicht für β -

Amylasen mit einem plastidären Transitpeptid zu kodieren. Es existieren zwei Studien (Kakefuda et al., 1986; Lao et al., 1999), welche auf die Existenz einer plastidär lokalisierten β -Amylase hindeuten. Keine der beiden Studien weist jedoch der plastidär lokalisierten β -Amylase eine physiologische Rolle in Pflanzen zu.

In Kartoffelknollen konnte die Induktion der β -Amylase-Aktivität durch Lagerung bei 4°C nachgewiesen werden (Hill et al., 1996; Nielsen et al., 1997). Dieses Resultat führte zur Vermutung, dass diese β -Amylase-Aktivität am kalteinduziertem Süßwerden (engl. cold-sweetening) der Knollen beteiligt ist, da Enzymexpression und Stärkeabbau zeitlich miteinander korrelieren. Untersuchungen an transgenen Kartoffelpflanzen, die eine Reduktion dieser β -Amylase-Aktivität aufwiesen, konnten diese Hypothese jedoch nicht bestätigen (Scheidig, 1997).

Eine weitere β -Amylase wurde von Viksø-Nielsen et al. (1997) in Kartoffelblättern beschrieben. Dieses Protein liegt als Homodimer vor, wobei das Monomer eine Größe von 56 kD aufweist. Die physiologische Bedeutung dieser β -Amylaseform im Stärkemetabolismus ist nicht bekannt.

I.2.2.1.2 Entzweigungsenzym (engl. debranching enzyme; DBE)

Zwei unterschiedliche DBE-Aktivitäten konnten in Pflanzen nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Proteinsequenz, sowie ihrer Substratspezifität zu bakteriellen Proteinen, werden sie als Isoamylase oder Pullulanase bezeichnet. Der Pullulanasetyp zeigt eine höhere Affinität zu Pullulan, einem Polysaccharid aus Pilzen, bestehend aus 1,6-verbundenen α -Maltotrioseeinheiten (Nakamura et al., 1996), während der Isoamylasetyp eine höhere Affinität zu Glycogen, einem wasserlöslichen, hoch 1,6-verzweigtem Polyglucan aus Bakterien und Säugern, aufweist (Doehlert und Knutson, 1991).

Trotz des Nachweises der DBE-Aktivität in Blättern, Samen und Knollen war die Beteiligung des Enzyms am Stärkeabbau lange unklar (Kossmann und Lloyd, 2000). Für zwei unabhängige Arabidopsis Isoamylase Mutanten (*Atisa1* und *Atisa2*) konnte gezeigt werden, dass neben Amylopektin als verzweigtes Polyglucan ein höher verzweigtes, wasserlösliches Polyglucan akkumuliert, das so genannte Phytoglycogen. Die Menge an synthetisierter Stärke war gegenüber dem Wildtypen stark reduziert, was wahrscheinlich bedeutet, dass diese Isoamylasen eher dem Stärkeaufbau zugeordnet werden müssen (Zeeman et al., 1998a, Bustos et al., 2004, Delatte et al., 2005). Erst kürzlich wurde ein drittes Isozym der Isoamylasen in Arabidopsis beschrieben (*ISA3*), das primär am Stärkeabbau beteiligt ist. Eine entsprechende Mutante (*Atisa3*) zeigt einen abgeschwächten Hochstärke-Phänotyp (Delatte et al., 2006). In derselben Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass

auch die Pullulanase am Stärkeabbau in Arabidopsis beteiligt sein kann. Eine entsprechende Mutante (*Atlda*) zeigte keinen Unterschied zum Wildtypen, in Kombination mit der Mutante *Atisa3* wurde jedoch der Hochstärke-Phänotyp von *Atisa3* noch deutlicher.

1.2.2.1.3 Disproportionierungsenzym (DPE)

Das Disproportionierungsenzym (DPE) ist eine 1,4- α -D-Glucan:1,4- α -D-Glucan, 4- α -D-Glucantransferase. Die Aktivität wurde erstmals 1956 in Kartoffelextrakten beschrieben (Peat et al., 1956). Bis heute konnte das Enzym in verschiedenen stärkehaltigen Organen von Pflanzen nachgewiesen werden (Kakefuda et al., 1986; Lin et al., 1988; Takaha et al., 1993). Das DPE rearrangiert α -1,4-Bindungen von stärkeähnlichen Oligo- und Polymeren und disproportioniert sie damit. Zwei verschiedene DPEs, DPE1 und DPE2, die sich nach ihrer Substratspezifität, d.h. ihrer bevorzugten Donor- und Akzeptormoleküle, unterscheiden, sind bisher in Arabidopsis und Kartoffel beschrieben worden (Lloyd et al., 2005).

Das bevorzugte Substrat von DPE1 *in vitro* sind Maltooligosaccharide, wobei eine Maltosyleinheit eines 1,4- α -D-Glucans auf ein anderes übertragen wird. Als kleinste Donoreinheit kann Maltotriose fungieren, während als kleinste Akzeptoreinheit auch Glucose dienen kann (Takaha und Smith, 1999). Da die Disproportionierungsreaktion zu keiner Änderung der absoluten Menge an α -1,4-Bindungen führt, ist dieses Enzym nicht quantitativ am Abbau von Glucanpolymeren beteiligt. Da das Enzym aber in der Lage ist, die Größe von Maltooligosacchariden zu verändern, könnte es dazu beitragen, geeignete Substrate für andere stärkeabbauende Enzyme, z.B. α -Amylasen, β -Amylasen oder Glucan-Phosphorylasen bereitzustellen. Aus diesem Grund wurde das Enzym primär dem Stärkeabbau zugeordnet (Kakefuda und Duke, 1989; Lin und Preiss, 1988).

Die Inhibierung der DPE1-Aktivität in Kartoffel um 98 % führte zu keinem Unterschied in der Menge und der Struktur der synthetisierten Stärke in Knollen, jedoch zu einer, gegenüber der untransformierten Kontrolle, verspäteten Keimung der Knollen und geringerem Wachstum der neu entstehenden Pflanze (Takaha et al., 1998). Diese Ergebnisse deuten auf eine ineffiziente Mobilisierung der Stärke hin und somit auf eine Beteiligung von DPE1 am Stärkeabbau (Takaha et al., 1998). Die Isolation einer Arabidopsis DPE1 Mutante (*dpe1-1*) durch Critchley et al. (2001) bestätigt diese Annahme. Diese Mutante zeigt einen schwachen Hochstärke-Phänotyp in Blättern und während des Stärkeabbaus ist ein Anstieg des Gehalts an Maltooligosacchariden, und zwar hauptsächlich von Maltotriosen, zu beobachten (Critchley et al. 2001).

DPE1 kann keine Maltose als Glucosyldonor verwerten, während Maltose eines der Hauptprodukte des transitorischen Stärkeabbaus in Blättern ist. Dies ergab sich aus Studien mit

isolierten stärkehaltigen Spinat-Chloroplasten, die überwiegend Maltose in das Medium freisetzen (Weise et al., 2004), sowie der Charakterisierung der Hochstärke-Arabidopsismutante *mex1*. *Mex1*, die eine Mutation in einem Gen besitzt, welches für ein Maltose-Transport-Protein aus der Plastidenmembran kodiert, und neben Stärke auch Maltose akkumuliert (Niittylä et al., 2004).

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass Maltose durch α -Glucosidasen (Maltasen) in Pflanzen hydrolysiert wird, jedoch gibt es keine funktionellen Studien, die dieses belegen (siehe I.2.2.1.4). In drei unabhängigen Arbeiten wurde ein neues Enzym beschrieben, das Maltose abbauen kann und wichtig für den Stärkeabbau in Blättern ist. Die Proteinsequenz ähnelt der von DPE1, weshalb das neue Protein DPE2 benannt wurde. Zwei der Studien beschreiben Arabidopsis-Insertionsmutanten im *DPE2* Gen (Chia et al., 2004; Lu und Sharkey, 2004), während sich die dritte Arbeit mit transgenen Kartoffelpflanzen, in denen die Expression des DPE2 Proteins mit Hilfe von RNA Interferenz reprimiert wurde (Lloyd et al., 2004), befasst. In allen drei Studien wurde gezeigt, dass die Inhibierung von DPE2 zu einem Hochstärke-Phänotyp führt und dass diese Pflanzen Maltose in ihren Blättern akkumulieren. DPE2 ist wie DPE1 eine Transglucosidase, die jedoch Maltose als Glucosyldonor verwendet, um ein Glucosemolekül auf ein Polysaccharid zu übertragen und das andere Glucosemolekül freizusetzen.

Ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von DPE2 wurde jedoch zwischen Kartoffel und Arabidopsis nachgewiesen. Mit DPE2 spezifischen Antikörpern wurde das Protein in Chloroplastenpräparationen von Kartoffelblättern gefunden (Lloyd et al., 2004), während es in Arabidopsis im Zytosol nachgewiesen wurde (Chia et al., 2004). Für Arabidopsis muss daher ein zytosolisch lokalisiertes Polysaccharid angenommen werden, das als Glucosylakzeptor dienen kann. Ein solches Polysaccharid, bestehend aus Arabinose, Galactose und Glucose, ist unter anderem auch in Arabidopsis beschrieben worden (Fettke et al., 2005a), und es konnte gezeigt werden, dass es als Glucosylakzeptor für DPE2 dient (Fettke et al., 2006). Es wird angenommen, dass die Glucose aus dem Heteroglycan anschließend durch die Aktivität der zytosolischen Glucan-Phosphorylase als Glucose-1-Phosphat freigesetzt und der Saccharosesynthese zugeführt wird (siehe auch I.2.2.1.6; Fettke et al., 2005b).

I.2.2.1.4 α -Glucosidase

Pflanzliche α -Glucosidasen umfassen eine Gruppe von Enzymen, welche die sukzessive Hydrolyse von terminalen α -D-Glucoseresten vom nicht reduzierenden Ende eines α -verknüpften Glucans katalysieren (Chiba, 1988; Frandsen und Svensson, 1998). Die Substrate für α -Glucosidasen umfassen Di-, Oligo- und Polysaccharide, wie auch Glycoproteine. α -Glucosidasen zeichnen sich ebenfalls durch die Hydrolyse eines weiten Spektrums an verschiedenen glucosidischen Bindungen aus, darunter α -1,1-, α -1,2-, α -1,3-, α -1,4- und α -1,6-Bindungen (Sun und Henson, 1990). Es wird

angenommen, dass α -Glucosidasen eine wichtige Rolle im Stärkeabbau spielen, obwohl dies bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Konishi et al. (1994) zeigten eine Verminderung der Stärkeabbaurate in Weizensamen, welche mit einem α -Glucosidase-Inhibitor behandelt wurden. Sun und Henson (1990, 1991) wiesen nach, dass native Stärke *in vitro* von α -Glucosidasen angegriffen wird, und zwar mit derselben Effizienz wie durch α -Amylasen, wobei die gleichzeitige Einwirkung beider Enzyme zu einer synergistischen Verstärkung der Hydrolyse führte. Für Erbsen konnte die spezifische Lokalisation einer α -Glucosidase in Chloroplasten nachgewiesen werden. Das entsprechende Gen wurde jedoch noch nicht identifiziert (Sun et al., 1995).

Sequenzdaten für α -Glucosidasen wurden für verschiedene Pflanzenarten publiziert (Matsui et al., 1997; Monroe et al., 1997; Sugimoto et al., 1997), darunter auch zwei α -Glucosidase Sequenzen aus Kartoffel (MAL1 und MAL2; Taylor et al., 1998; Taylor et al., 2001). α -Glucosidase-Aktivität konnte in Pflanzen im Apoplasten (Monroe et al., 1999) und auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) nachgewiesen werden (Kaushal et al., 1993). Die Funktion der apoplastischen Form ist unbekannt, die im ER lokalisierte α -Glucosidase scheint eine Rolle in der Glycoproteinsynthese zu spielen. Die Reduktion dieser α -Glucosidase-Aktivität (MAL1) in Kartoffel mittels antisense Technik hatte keinen Einfluss auf den Stärkemetabolismus, die Pflanzen zeigten jedoch ein abnormales Wachstum gegenüber den untransformierten Kontrollpflanzen. Das Gen, kodierend für diese α -Glucosidase, zeigte eine höhere Ähnlichkeit zu den Glycoprotein prozessierenden α -Glucosidasen aus Säugern und Hefe, als zu anderen α -Glucosidase Genen aus Pflanzen (Taylor et al., 2000). Die Rolle von MAL2, der zweiten α -Glucosidase in Kartoffel, ist nicht geklärt. Die Inhibierung mittels der antisense Technik führte zwar zu einer Reduktion der entsprechenden mRNA, es konnte jedoch keine Verminderung der Enzymaktivität nachgewiesen werden, außerdem wurde auch kein Einfluss auf den Stärkestoffwechsel festgestellt (Taylor et al., 2001). Dass α -Glucosidasen eine Rolle im Stärkeabbau spielen, ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen worden.

1.2.2.1.5 α -1,4-Glucan-Lyasen

α -1,4-Glucan-Lyasen stellen eine neue Klasse stärkeabbauender Enzyme dar (Yu et al., 1993). Diese Exolyasen spalten α -1,4-Glucane, wie Maltose, Maltooligosaccharide, Stärke und Glycogen. Auch native Stärke stellt für das Enzym ein Substrat dar. Als Produkt des Abbaus entsteht 1,5-Anhydrofructose. Das Enzym konnte erstmals in Rotalgen beschrieben werden, in welchen es im Stroma der Chloroplasten lokalisiert wurde (Yu et al., 1993; Yu und Pedersen, 1993), obwohl die Stärkekörner in Rotalgen, im Gegensatz zu höheren Pflanzen, im Zytoplasma lokalisiert sind (Pueschel, 1990). α -1,4-Glucan-Lyase-Aktivität konnte bis heute ebenfalls in Pilzen (Yu et al., 1997) und der Rattenleber (Kametani et al., 1996) nachgewiesen werden.

Die genomische α -1,4-Glucan-Lyase Sequenz für zwei verschiedenen *Morchella* Arten sowie unterschiedliche genomische oder cDNA Sequenzen des Enzyms der Rotalge *Gracilariopsis lemaneiformis* wurden veröffentlicht (Bojsen et al., 1999 a, b). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der α -1,4-Glucan-Lyasen aus *Gracilariopsis lemaneiformis* besitzen nach computergestützter Voraussage plastidäre Transitpeptide. In höheren Pflanzen konnte bis heute keine α -1,4-Glucan-Lyase-Aktivität nachgewiesen werden, jedoch zeigen die charakterisierten Lyasen Homologien zu pflanzlichen α -Glucosidasen (Kossmann und Lloyd, 2000). In keimenden Amaranthsamensamen und reifenden Bananenfrüchten, beides Gewebe, in denen Stärkeabbau stattfindet, wurden geringe Mengen an 1,5-Anhydroglucitol nachgewiesen, ebenso wie das Enzym 1,5-Anhydrofructose-Reductase, das 1,5-Anhydrofructose in 1,5-Anhydroglucitol überführt (Konishi et al., 2000). Es besteht also weiterhin die Möglichkeit, dass geringe Mengen an Stärke durch die α -1,4-Glucan-Lyase in pflanzlichen Geweben abgebaut werden.

1.2.2.1.6 α -1,4-Glucan-Phosphorylase

Im Gegensatz zu Amylasen, welche den Glucosylrest auf H_2O übertragen, spalten α -1,4-Glucan-Phosphorylasen α -1,4-glucosidische Bindungen durch die Übertragung eines Glucosylrestes auf anorganisches Phosphat, wobei Glucose-1-Phosphat entsteht. Wie für β -Amylasen beschrieben, erfolgt auch hier der Angriff vom nichtreduzierenden Ende her.

α -1,4-Glucan-Phosphorylasen konnten in allen Organismen, welche Kohlenhydratpolymere in Form von Stärke oder Glykogen speichern, nachgewiesen werden. Da die Reaktion frei reversibel ist, in Abhängigkeit der Konzentration von anorganischem Phosphat und Glucose-1-Phosphat, könnten α -1,4-Glucan-Phosphorylasen am Abbau von Glucanen, wie auch an deren Aufbau, beteiligt sein. In Plastiden ist nur eine geringe Menge an Glucose-1-Phosphat vorhanden, daher wurde angenommen, dass Stärke-Phosphorylasen eher am Stärkeabbau beteiligt sind (Steup, 1988). In Pflanzen konnten plastidäre, wie auch zytosolische Formen des Enzyms beschrieben werden. In Kartoffeln wurden zwei plastidäre Formen (Pho1a und Pho1b) und eine zytosolische Form (Pho2) nachgewiesen (Nakano und Fukui et al., 1986; Mori et al., 1991; Sonnewald et al., 1995).

Die Reduktion der Aktivität beider plastidärer Phosphorylaseformen in Kartoffeln führte zu keiner Veränderung in der Stärkesynthese oder des Stärkeabbaus in Knollen, jedoch zu einer modifizierten Stärke, in welcher das Amylopektin aus kürzeren Glucanketten besteht (Duwenig, 1996). Dieses Ergebnis deutet eher auf die Beteiligung der Stärkephosphorylasen an der Festlegung der Stärkestruktur hin, als auf eine Beteiligung am Stärkeabbau. Weitere Hinweise lieferte die Beobachtung des Anstiegs der Transkriptmengen für plastidäre Phosphorylasen durch das Angebot exogener Zucker, eine Induktion, wie sie für Enzyme der Stärkebiosynthese typisch ist (Duwenig et

al., 1997). Außerdem ließ sich ein nahezu paralleler Verlauf der Phosphorylase-Aktivität und der Stärkeakkumulation in Kartoffelblättern während des Tagesgangs beobachten (Albrecht, 1998). Auch im Zusammenhang mit dem Abbau der transitorischen Stärke in Blättern über Nacht scheint der phosphorylytische Weg des Stärkeabbaus nicht der dominierende. Schleucher et al. (1998) zeigten, dass 75 % des Kohlenstoffs die Chloroplasten während der Nacht als Hexosen verlassen und nicht als Triosephosphat, was neben anderen diskutierten Beobachtungen auf die Hydrolyse und nicht auf die Phosphorylyse als den dominierenden Weg des Stärkeabbaus hindeutet. Unterstützend dazu sind auch neuere Ergebnisse, die anhand von Arabidopsis Insertionsmutanten im Gen für die plastidäre Phosphorylase gewonnen wurden. Diese zeigten keine Veränderungen im transitorischen Stärkeabbau, sondern waren lediglich empfindlicher für abiotischen Stress (Zeeman et al., 2004).

Wie bereits unter I.2.2.1.3 im Zusammenhang der Funktion der verschiedenen Disproportionierungsenzyme beschrieben, spielt unter Umständen das zytosolische Isozym der Phosphorylase in einigen Pflanzen eine besondere Rolle. Dessen subzelluläre Lokalisation schien lange rätselhaft, da es im Zytosol kein geeignetes Glucan, das als Substrat oder Produkt für/von der Phosphorylase angesehen werden konnte, vorliegt. Ein potentiell Substrat, ein Heteroglucan, das sich aus Arabinose, Galactose und Glucose zusammensetzt, wurde erstmalig in Erbsenblättern beschrieben (Yang und Steup, 1990) und ebenfalls in Arabidopsis- und Kartoffelblättern gefunden (Fettke et al., 2005 a, b). Dieses Heteroglucan scheint in Arabidopsis als Glucosylakzeptor für die zytosolisch lokalisierte Transglucosidase DPE2 aus der Maltosehydrolyse zu dienen (Fettke et al., 2006) und lässt vermuten, dass die Glucose durch die zytosolische Phosphorylase als Glucose-1-Phosphat wieder freigesetzt wird. Inwieweit dieser Mechanismus in allen Pflanzenarten vorherrscht, ist fraglich. Zumindest in Kartoffelblättern scheint das Heteroglucan als Intermediat des transitorischen Stärkeabbaus keine übergeordnete Rolle zu spielen. Kartoffelblätter, in denen die Expression der zytosolischen Phosphorylase weitgehend unterdrückt wurde, zeigen zwar eine Veränderung in der Zusammensetzung des Heteroglucans (Fettke et al., 2005b), sind jedoch unvermindert in der Lage, ihre im Tagesgang akkumulierte Stärke zu mobilisieren (Duwenig et al., 1997). Außerdem ist auch die subzelluläre Lokalisation von DPE2 in Kartoffel anders als in Arabidopsis. In Kartoffelblättern ist das Enzym im Chloroplasten lokalisiert (Lloyd et al., 2004). Weiterhin ist auch unklar, ob das Maltose-Transport-Protein eine ähnlich wichtige Rolle in der Stärkemobilisierung in Kartoffelblättern spielt, wie in Arabidopsis.

I.2.2.2 Der Abbau der transitorischen Stärke

Ein charakteristisches Merkmal des transitorischen Stärkemetabolismus ist der Wechsel zwischen Netto-Synthese am Tag und dem Stärkeabbau in der Nacht (Beck und Ziegler, 1989). Einerseits dient die transitorische Stärke als Kohlenstoffreservoir für den Saccharose-Metabolismus,

andererseits stellt sie eine Art Puffer dar, um einer Inhibierung der Photosynthese durch Phosphatlimitierung vorzubeugen (Stitt, 1984). Im Gegensatz zum Abbau der Speicherstärke im Endosperm, muss beim Abbau der transitorischen Stärke die zelluläre Integrität der Membranen gewährleistet bleiben. Dies bedeutet zwangsläufig, dass viele am Abbau der transitorischen Stärke beteiligte Enzyme in den Chloroplasten vorliegen müssen, was bis heute für die wenigsten nachgewiesen werden konnte und zeigt wie wenig der Abbau der transitorischen Stärke verstanden ist.

Bis vor wenigen Jahren wurde davon ausgegangen, dass Phosphorylasen eine entscheidende Rolle im Abbau der transitorischen Stärke spielen und die entstehenden Kohlenhydrate die Chloroplasten mittels des Triose-Phosphat-Translokators verlassen (Stitt, 1990). Neuere Ergebnisse legen jedoch die Vermutung nahe, dass der Abbau der transitorischen Stärke hauptsächlich hydrolytisch erfolgt. Darauf deuten die Ergebnisse von Duwenig (1996), Schleucher et al. (1998), Zeeman et al. (1998b), Lao et al. (1999) und Weise et al. (2004) hin. Sollte Maltose, wie in Arabidopsis beschrieben, das Produkt des Stärkeabbaus im Plastiden sein, wird es durch das Maltose-Transport-Protein über die Chloroplastenmembran in das Zytosol exportiert (Niittylä et al., 2004). Ist Glucose das Abbauprodukt, wie es wahrscheinlich in Kartoffelblättern der Fall ist, so wird wahrscheinlich die Glucose exportiert und anschließend durch Hexokinase phosphoryliert (Wiese et al., 1999). Weber et al. (2000) konnten die Existenz eines plastidären Glucosetransporters in Arabidopsis nachweisen, die Beschreibung der physiologischen Bedeutung dieses Transporters steht jedoch noch aus, genauso wie die Isolierung und funktionale Analyse eines entsprechenden Transporters aus Kartoffel.

Bis heute konnten mehrere mutagenisierte Arabidopsis Pflanzen isoliert werden, welche eine reduzierte Abbaurrate der transitorischen Stärke aufweisen und einen Hochstärke-Phänotyp zeigen. Der erhöhte Stärkegehalt in Blättern lässt sich durch die Netto-Akkumulation der Stärke von Tag zu Tag, aufgrund der reduzierten Mobilisierungsrate über Nacht, erklären. Der Hochstärke-Phänotyp der *sex1* Mutante wurde ursprünglich auf das Fehlen des plastidären Glucosetransporters zurückgeführt (Caspar et al., 1991; Trethewey und ap Rees, 1994 a, b). Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass die Mutation der *sex1* Mutante das *RI* Gen betrifft. Diese Gen kodiert für ein Protein, welches an der Phosphorylierung von Stärke beteiligt ist (Yu et al., 2001). Das *RI* Gen wurde ursprünglich aus Kartoffel isoliert. Kartoffelpflanzen, die durch antisense Inhibierung in der *RI* Expression reprimiert sind, zeigen ebenfalls einen Hochstärke-Phänotyp der Blätter (Lorberth et al., 1998), jedoch bleibt der Zusammenhang zwischen der verminderten Phosphorylierung der Stärke und dem beobachteten Phänotypen bis heute unklar. Die *sex4* Mutante (Zeeman et al., 1998 b) wurde im Zusammenhang mit verminderter α -Amylase-Aktivität beschrieben, ist aber in einem regulatorischen Protein mutiert, das wahrscheinlich mehrere Enzyme des Stärkeabbaus beeinflusst (siehe I.2.2.1.1). Die Mutanten *sex2* und *sex3* sind bis heute nicht näher charakterisiert worden (Caspar et al., 1991). Wie beschrieben,

fürte das Fehlen von DPE1 und DPE2 in entsprechenden Arabidopsis Mutanten ebenfalls zu einer Reduktion der Stärkeabbaurate in Blättern (Critchley et al. 2001; Chia et al., 2004), genauso wie Mutationen in einem Gen für eine der Isoamylase Isozyme (Delatte et al., 2005).

Bis auf die Beteiligung des DPE1 und der Isoamylase ISA3 am Abbau der transitorischen Stärke in Arabidopsisplastiden ist der Vorgang der transitorischen Stärkehydrolyse bis heute unverstanden. Da alle beschriebenen Hochstärke-Mutanten im Tagesgang einen signifikanten Teil ihrer Stärke umsetzen, muss davon ausgegangen werden, dass weitere bis heute unbekannte Enzyme zum Abbau der Stärke beitragen.

I.2.2.3 Stärkeabbau in Speicherorganen

Der Abbau der Speicherstärke unterscheidet sich in mehreren Punkten deutlich vom Abbau der transitorischen Stärke in Blättern. In Getreidekörnern wird die Reservestärke im Endosperm gespeichert. Während der Reife der Getreidesamen kommt es zur Desintegration des Endospermgewebes, wodurch die Stärke während der Keimung für stärkeabbauende Enzyme, die eigentlich extraplastidär lokalisiert sind, zugänglich wird (Steup, 1988). Der Abbau der Speicherstärke im nicht lebenden Endosperm erfolgt hydrolytisch durch α -Amylasen, welche im Aleuron und Scutellum synthetisiert und in das Endosperm sezerniert werden (Halmer und Bewley, 1982). Leguminosen speichern die Reservestärke in den Kotyledonen. Im Gegensatz zum Endosperm der Getreidesamen handelt es sich bei Kotyledonen um lebendes Gewebe. Während der Reifung der Samen kommt es zur Auflösung der Amyloplastenmembran, wodurch extraplastidäre stärkeabbauende Enzyme Zugang zur Stärke erlangen (Halmer und Bewley, 1982). In Kartoffeln wird die Reservestärke in den Enden der stärkepeichernden Rhizomausläufer, den Knollen, synthetisiert. Die Knollen dienen der Pflanze zur vegetativen Vermehrung. Während des Keimungsvorgangs der Knollen kommt es zur fortschreitenden Desintegration der Amyloplastenmembran (Isherwood, 1976; Kumar und Knowles, 1993), wodurch extraplastidäre stärkeabbauende Enzyme Zugang zur Stärke haben und an deren Abbau beteiligt sein könnten (Ohad et al., 1971).

Für Speichergewebe gilt generell, dass der Stärkeabbau irreversibel ist und so lange abläuft, bis die gespeicherte Stärke verstoffwechselt ist. Eine Ausnahme stellt das kälteinduzierte Süßwerden (engl. cold-sweetening) von Kartoffelknollen dar. Während der Kaltlagerung von Knollen kommt es zum reversiblen Abbau der Stärke und zu einer Akkumulation von reduzierenden Zuckern (Müller-Thurgau, 1882). Während dieses Vorgangs findet keine Auflösung der Amyloplastenmembran statt, so dass Enzyme, welche am Abbau der Stärke beteiligt sind, im Amyloplasten vorliegen müssen. Bis heute ist der Stärkeabbau, sowohl während der Keimung als auch während des kälteinduzierten Süßwerdens, in Knollen vollkommen unverstanden.

I.2.2.4 Regulation des Stärkeabbaus

Mit Ausnahme der hormonellen Kontrolle des Stärkeabbaus in Getreidesamen (Akazawa und Hara-Nishimura, 1985) ist die Regulation des Stärkeabbaus nicht verstanden. Dies gilt sowohl für die Speicherstärke, als auch die transitorische Stärke.

Während der Netto-Synthese der transitorischen Stärke über Tag wird ebenfalls Stärke mobilisiert, was darauf hindeutet, dass Licht keine unmittelbare Kontrolle ausübt (Stitt und Held 1981). Jedoch scheinen einige stärkeabbauende Enzyme einer diurnalen Regulation zu unterliegen. Kakefuda und Preiss (1997) konnten in *Arabidopsis* eine α -Amylase-Aktivität, die zu Beginn der Dunkelphase exprimiert wird, nachweisen. Dieses Enzym ist jedoch nicht während der gesamten Dunkelperiode hinweg aktiv und scheint strikt reguliert. Die Kontrollmechanismen sind jedoch unbekannt. Möglicherweise spielt diese α -Amylase die Rolle des Initiators des Stärkeabbaus, indem es das Stärkekorn für andere stärkeabbauende Enzyme zugänglich macht. Eine voraussetzende plastidäre Lokalisation dieses Enzyms wurde jedoch nicht nachgewiesen. Einem circadianen Rhythmus unterliegt die Expression einer plastidär lokalisierten β -Amylase in *Arabidopsis* (Harmer et al., 2000). Inwieweit diese durch den Tagesgang regulierten Enzyme am Abbau der transitorischen Stärke beteiligt sind, ist unklar.

Während der Licht- und Dunkelperiode treten in Chloroplasten unterschiedliche pH-Werte und Phosphatkonzentrationen auf, welche einen regulatorischen Einfluss auf den Stärkeabbau haben könnten (Stitt, 1984). Denkbar wäre ebenfalls die Regulation des Stärkeabbaus durch die Veränderung der Stärkestruktur zu Beginn der Dunkelperiode, wodurch abbauende Enzyme in die Lage versetzt werden, das Stärkekorn effizient anzugreifen. In diesem Zusammenhang sollte das R1 Protein erwähnt werden, welches in verdunkelten Blättern verstärkt mit den Stärkekörnern assoziiert vorliegt (Ritte et al., 2000). Einen ersten experimentellen Ansatz zum molekularen Verständnis der Regulation des Stärkeabbaus in Blättern könnte die kürzlich identifizierte Protein Phosphatase liefern, die in der *Arabidopsis sex4*-Mutante nach Ausschaltung zum Hochstärke-Phänotyp führt. Es wird spekuliert, dass dieses Protein mehrere Enzyme des Stärkestoffwechsels durch Dephosphorylierung aktiviert oder inhibiert und somit den Netto-Stärkeabbau mit initiiert (Niittylä et al., 2006).

Während der Keimung von Kartoffelknollen kommt es zum Abbau der Speicherstärke. Für Kartoffeln wird angenommen, dass der Zeitpunkt der Keimung und die Länge der Ruhephase, und somit der Abbau der Speicherstärke, der hormonellen Kontrolle unterliegt (Hemberg, 1985; Suttle, 1995). Inwieweit dies auch für den Abbau der Speicherstärke in kaltgelagerten Knollen gilt, ist unklar. Chen et al. (1983) zeigten einen Anstieg der ABA-Konzentration in Kartoffeln während der

Kälteadaptation. Wie in anderen Pflanzenspezies unterliegen auch in Kartoffeln einzelne kälteinduzierte Gene der Kontrolle durch ABA (Kirch et al., 1997; Schneider et al., 1997).

I.3 Zielsetzung der Arbeit

Trotz weit reichender Untersuchungen ist der Abbau der transitorischen Stärke bis heute weitgehend unverstanden (siehe I.2.2.2). Neueste Ergebnisse deuten auf die Beteiligung einer plastidären Isoamylase (Delatte et al., 2005) und des D-Enzyms (Critchley et al. 2001) am Abbau der transitorischen Stärke hin. Ebenfalls unverstanden ist der Abbau der Speicherstärke in Kartoffelknollen während der Keimung, sowie bei niedrigen Temperaturen, dem sog. kälteinduzierten Süßwerden (siehe I.2.2.3). Dieser reversible Prozess führt zum Anstieg an reduzierenden Zuckern, welche sich bei der Verarbeitung der Knollen negativ auf die Qualität der Produkte auswirken können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten unbekannte cDNAs isoliert werden, welche für stärkeabbauende Enzyme in Kartoffel kodieren. Die Isolation der cDNAs sollte durch funktionelle Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken erfolgen. Entsprechende cDNA-Bibliotheken wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Zum einen wurde eine blattspezifische cDNA-Bibliothek aus mRNA von Blättern während des Übergangs von der Licht- zur Dunkelperiode hergestellt, zum anderen eine knollenspezifische cDNA-Bibliothek aus mRNA von Knollen, welche für 10 Tage bei 4°C gelagert wurden.

Die funktionelle Durchmusterung sollte in Zellen des *E. coli* Stamms KV832, der sich dadurch auszeichnet große Mengen an linearen Glucanen zu akkumulieren, erfolgen. Die Glucane ließen sich durch Jod Bedampfung der Kolonien nachweisen. Durch die Expression von cDNAs, kodierend für stärkeabbauende Enzyme, sollten die akkumulierten Glucane abgebaut werden, was zu einem verändertem Färbeverhalten führte.

Anschließend sollten die rekombinanten Enzyme in Bezug auf ihre Aktivität und ihre Substratspezifität, sowie auf ihre Lokalisation innerhalb der Zelle hin charakterisiert werden. Mittels transgener Pflanzen, welche in ihrer endogenen Aktivität für diese Proteine erniedrigt oder erhöht waren, sollte die physiologische Bedeutung dieser Proteine in Bezug auf den Stärkeabbau untersucht werden.

II Material

II.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Bio-Rad, Richmond, CA, USA: Acrylamid, N.N'-Methylen-bis-Acrylamid, Tetramethylenamid (TEMED), SDS, Bradford-Reagenz, »Gene Pulser«, Mini Protean II Gelkammern

Braun, München: Entsafter »Multipress Automatic MP80«

Clontech, Palo Alto, CA, USA: *Arabidopsis thaliana* L. Ecotyp Columbia; blattspezifische cDNA-Bibliothek

Eppendorf, Hamburg: Reaktionsgefäße

Fluka, Buchs, Schweiz: Formamid, β -Mercaptoethanol

FMC, Rockland, USA: SeaKem LE Agarose

Gibco Lifetech, Karlsruhe: Taq-Polymerase, SuperscriptII Reverse Transkriptase

Greiner, Nürtingen: Zentrifugengefäße (15 ml und 50 ml), Petrischalen

Kodak Eastman, Rochester, USA: X-OMAT-AR Filme

Marchary und Nagel, Düren: Nylonmembran Porablot NY amp, Rundfilter

Megazyme, Warriewood, Sydney, Australien: PNPG5, PNPG7, Red-Pullulan

Milipore, Bedford MA, USA: 0.45 μ m Filter

Novagen, Darmstadt : pET System.

Pharmacia, Freiburg: Percoll

Promega, Madison, USA: Riboprobe[®] *in vitro* Transcription System, TNT Reticulocyte Lysate System

Qiagen, Hilden: Oligotex-dT mRNA Kit, Plasmid Maxi Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, DNeasy Plant Maxi Kit

Roche, Mannheim: Alkalische Phosphatase, ATP, X-Gal, DNA-PolymeraseI, DNaseI Heringssperma-DNA, IPTG, λ -DNA, NAD, NADH, NADP, NADPH, Glucose-6-P-DH, PGM, Restriktionsendonukleasen, Hexokinase, Invertase, RNaseA, Stärkebestimmungskit, »High Prime Kit«, DTT, PMSF, EDTA, EGTA, Imidazol, Kanamycin

Roth, Karlsruhe: Polyethylenglykol, Phenol/Chloroform, Isoamylalkohol (25:24:1)

Serva, Heidelberg: Triton X-100, SDS, HEPES, Bromphenolblau

Schleicher und Schuell, Dassel: Blottingpapier, Faltenfilter

Stratagene, La Jolla, CA, USA: *PfuTurbo*[®] DNA Polymerase, λ -ZAPII-cDNA Synthese-Kit, ProSTAR[™] HF Single-Tube RT-PCR System (High Fidelity), Ligation Kit, Gigapack[®] III Gold Verpackungsextrakt

TIB MolBiol, Berlin: Oligonukleotidprimer

Whatman, Maidstone, England: 3MM-Papier

Alle weiteren Chemikalien wurden von **Merck** (Darmstadt) und **Sigma Chem. Co.** (St. Louis, MO, USA) bezogen.

II.2 Bakterienstämme, Plasmide, Phagen und Vektoren

Bakterienstämme:

Escherichia coli

DH5 α	(Bethesda Research Laboratories)
XL1-Blue, MRF \prime	(Bullock et al., 1987)
SOLR $^{\text{TM}}$	(Hay und Short 1992)
KV832	(Kiel et al., 1987)
BL21-CodonPlus $^{\text{TM}}$ (DE3)-RIL	(Stratagene, La Jolla, CA, USA)
PGM $^-$	(Lu, M., and N. Kleckner, 1994)
λ ZAP II	(Stratagene, La Jolla, CA, USA)
Helfer-Phage ExAssist	(Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Agrobacterium tumefaciens

Stamm C58C1 mit Plasmid GV2260 (Deblaere et al., 1985)

Vektoren und Plasmide

pBin19	(Bevan 1984)
pBinAR	(Höfgen und Willmitzer, 1990)
pBinL700	(Stockhaus et al., 1987)
pBluescript SK	(Stratagene, La Jolla, CA, USA)
pET28a	(Novagen, Darmstadt)
λ Uni-Zap $^{\circledR}$ XR Vektor	(Stratagene, La Jolla, CA, USA)
smGFP	(Davies und Vierstra, 1996)

II.3 cDNA-Bibliotheken

Arabidopsis thaliana L. Ökotyp Columbia; blattspezifische cDNA-Bibliothek (Clontech)

Arabidopsis thaliana L. Ökotyp Columbia; keimlingspezifische cDNA-Bibliothek (von Ursula Uwer zur Verfügung gestellt)

II.4 Synthetische Oligonukleotideprimer

T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAggg-3'
T7	5'-gTAATACgACTCACTATAgggC-3'
OCS-Terminator Primer	5'-ACCggCggTAAggATCTgAg-3'
35S-Promotor Primer	5'-CCCgTAAAgACTggCgAACAgT-3'
5' ASGE	5'-CgCggATCCATggCATCAgCTACTAgTTC -3'
3' ASGE	5'-gTgCTCCTCgAgTAgAgAAgCTTgCTTgTCC -3'
5' ASGE Genom	5'-CCCggTACCggTgAgTgAgAAggAAgAggA-3'
3' ASGE Genom	5'-ATACCgTCgACCCAATgAAATgAAATgCAA-3'
3' SGE-GFP100	5'-TCCTTggATCCAATTAATCAgACTTgTCgg-3'
5' His-DSD10	5'-gTCCgCggATCCCTAAgATCTAATgAgCTTAA-3'
5' RT-PCR SGE	5'-CTCTTCAAgAgAgATgTTgCAC-3'
3' RT-PCR SGE	5'-gATCgTCAAgATCTgCAATCAA-3'
5' RT-PCR β -Tubulin	5'-TCggTTCCAAATTCTgggAAgT-3'

3' RT-PCR β -Tubulin	5'-TTCAACA g CCAATTTCTCA g gT-3'
5'smGFP	5'- g TCC g C g gATCCTAAAT g AgTAAAg g AgAA g AACT-3'
3'GFP/5'SGEIAS763-790	5'-ACCC g TTCCACCACCTCATCTTT g TATA g TTCATCCAT g C-3'
5'SGEIAS763-790/3'GFP	5'-ACCC g TTCCACCACCTCATCTTT g TATA g TTCATCCAT g C-3'
3' PCT-BMYI-GFP100	5'-TCCTT g gATCCCCACCAATCCCCACCA g CAT-3'
5' CT-BMY	5'-C g g g ATCCC g TAT g gAATT g ACACT g AATT-3'
3' CT-BMY	5'- g g g gTACCCCTTACACTAAAgC g gCCTC-3'
5' His-PCT-BMYI	5'- g TCC g C g gATCCAT g ACTTTAACACTTCAATC-3'

II.5 Medien

Bakterienmedien:

E. coli Zellen wurden in YT nach Sambrook et al. (1989) angezogen. Zur Anzucht des *E. coli* Stamms KV832 enthielt das Medium 1 % (w/v) Glucose, zur Anzucht des Stamms PGM⁻ 1 % (w/v) Maltose. *Agrobacterium tumefaciens* Zellen wurden in YEB-Medium (Vervliet et al., 1975) angezogen.

Pflanzenmedien:

Für die sterile Anzucht von Pflanzen in Gewebekultur wurde 2MS Medium (Murashige und Skoog, 1962; modifiziert nach Dietze et al., 1995) mit 2 % Saccharose und 0.7 % BiTek-Agar (w/v) verwendet. Zum Abtöten von *A. tumefaciens* Zellen nach der Transformation wurde das Antibiotikum β -Bactyl in einer Konzentration von 125 mg/ml zugefügt.

II.6 Pflanzen

Für die gentechnischen Arbeiten an Pflanzen und die anschließende Analyse wurde *Solanum tuberosum* L. c.v. Désirée (tetraploid), Saatzucht Fritz Lang KG, Bad Schwartau, verwendet.

III Methoden

III.1 Molekularbiologische Arbeiten mit Nukleinsäuren

III.1.1 Klonierung und Sequenzierung

Plasmidpräparationen, Restriktionsspaltungen, Gelelektrophoresen, Klonierungen, Hybridisierungen von Nukleinsäuren und Proteinen auf Membranfilter wurden als Standardmethoden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma AGOWA GmbH in Berlin durchgeführt.

III.1.2 PCR-Amplifikation

Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten, sowie die Einführung von neuen Restriktionsschnittstellen, wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Zur Isolation von positiven Klonen nach der Transformation (Kolonie-PCR) oder zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertgröße der hergestellten cDNA Bibliotheken (Plaque-PCR) wurde Taq-Polymerase (Gibco Lifetech, Karlsruhe) verwendet. Als Template dienten Bakterienkolonien oder aus dem Agar ausgestochene Phagenplaques. Die PCR wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, die Temperaturen und die Dauer der einzelnen Schritte (Denaturierung, Hybridisierung, Synthese) variierten zwischen verschiedenen PCR-Reaktionen. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR, welche in späteren Experimenten funktionell exprimiert werden sollten, erfolgte durch *Pfu*-Polymerase, welche über einen Fehlerkorrekturmechanismus verfügt (*PfuTurbo*® DNA Polymerase, Stratagene, La Jolla, CA, USA).

III.1.3 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von Nukleinsäuren erfolgte mit α -³²P-CTP, nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983), durch das »High Prime Kit« der Firma Roche. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine Sephadex G-50 Säule abgetrennt (Sambrook et al., 1989).

III.1.4 Radioaktive Markierung von RNA

Die Synthese und radioaktive Markierung von RNA-Proben wurde mit 1 μ g linearisierter Vektor-DNA und 50 μ Ci α -³²P-UTP durch das Riboprobe® *in vitro* Transkription System (Promega, Madison) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine Sephadex G-50 Säule abgetrennt (Sambrook et al., 1989).

III.1.5 Konstruktion pflanzlicher cDNA-Bibliotheken

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Stratagene λ -ZAPII-cDNA Synthese-Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) nach Angaben des Herstellers. Zur Konstruktion der gerichteten *EcoRI/XhoI* cDNA-Bibliotheken wurden 5 μ g mRNA eingesetzt. Die entstandenen cDNAs wurde in λ -ZAPII-Arme (*EcoRI/XhoI*) kloniert. Die Verpackung der DNA in λ -Phagenhüllen wurde mittels Gigapack® III Gold Verpackungsextrakt (Stratagene, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Anschließend wurde die Primärbibliothek nach Angaben des Herstellers amplifiziert, die Phagensuspension unter Zusatz von 7 % DMSO aliquotiert und anschließend bei -80°C gelagert. Die mittlere Insertgröße der hergestellten cDNA-Bibliotheken wurde mittels PCR bestimmt. Hierzu wurde die Insertion von 48 zufällig ausgewählten Phagen mittels der T3 und T7 Primer amplifiziert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

III.1.6 Funktionelles Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken

Zur funktionellen Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken wurden die Phagen-Bibliotheken mittels »Massen *in vivo* Excision«, nach Angaben des Herstellers (Stratagene, La Jolla, CA, USA), in Plasmid-Bibliotheken überführt.

Die funktionelle Durchmusterung der Plasmid-Bibliotheken erfolgte im *E. coli* Stamm KV832, welcher durch eine Mutation des *glgB* Gens keine Verzweigungsenzym-Aktivität mehr besitzt. Dieser Stamm wurde mit dem Plasmid pACYC184 (New England Biolabs) transformiert, welcher das *E.coli* Gen *glgC16* beinhaltet. Dieses Gen kodiert für eine unregulierte Form der AGPase (Creuzat-Sigal et al., 1972). Das Plasmid besitzt die Bezeichnung pACAG und wurde in Kossmann et al. (1999) beschrieben. Wird *glgC16* nun in KV832 exprimiert, so akkumulieren die Zellen, welche auf YT-Medium mit 1 % Glucose wachsen, große Mengen an linearen Glucanen. Die Kolonien können nun mit Jod bedampft werden und zeigen anschließend eine dunkelblaue Färbung. Wird in den Zellen zusätzlich eine cDNA exprimiert, welche für ein stärkeabbauendes Enzyme kodiert, so sollte keine oder eine geringere Akkumulation linearer Glucane stattfinden. Dies führt zu einer veränderten Färbung der Kolonien.

E. coli KV832 Zellen wurden mit den hergestellten Plasmid-Bibliotheken transformiert und auf YT-Medium, welches 1 % (w/v) Glucose, 1 mM IPTG und die entsprechenden Antibiotika enthielt, bei 37°C über Nacht kultiviert. 35000 cfu wurden nach 24 h mit Jod bedampft und solche Kolonien isoliert, welche ein von der Mehrzahl der Kolonien abweichendes Verhalten in der Färbung zeigten. Aus diesen Kolonien wurde anschließend Plasmid-DNA isoliert und in *E. coli* KV832 Zellen retransformiert, um den beobachteten Phänotypen der Kolonien zu bestätigen. Die auf diese Art

gewonnenen Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau in verschiedene Klassen eingeteilt. Anschließend wurde der *E. coli* Stamm PGM⁻ mit den Plasmiden jeder Klasse transformiert.

PGM⁻ besitzt eine Mutation in der Phosphoglucomutase und kann deshalb kein Glucose-6-phosphat in Glucose-1-phosphat umwandeln. Wächst dieser Stamm auf einem Medium mit 1 % Maltose, so wird die Maltose über die Amylomaltase, kodiert durch das *malQ* Gen, in lineare Glucane überführt. Der Abbau der linearen Glucane erfolgt über eine Phosphorylase, kodiert durch das *malP* Gen, zu Glucose-1-Phosphat. Da durch die Mutation der PGM das entstehende Glucose-1-Phosphat nicht in Glucose-6-phosphat überführt werden kann, kommt es zur Akkumulation der linearen Glucane und die Kolonien lassen sich, wie für *E. coli* KV832 beschrieben, mit Joddampf anfärben. Die Transformationen in PGM⁻ stellten eine weitere Kontrolle dar, da die beiden verwendeten Stämme unterschiedliche Synthesewege zur Bildung der Glucane verwenden. Fällt das Resultat in beiden Stämmen positiv aus, so deutet dies darauf hin, dass nicht die Synthese der Glucane durch die Expression einer cDNA inhibiert wird. Fiel das Resultat für beide Stämme positiv aus, so wurde je ein Plasmid pro Klasse ansequenziert.

III.1.7 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Expression von pSK-Derivaten

In dem *E. coli* Stamm DH5 α wurden Insertionen in pSK-Plamide zur Expression gebracht. YT-Amp Medium (37°C) wurde mit einem Zwanzigstel einer ü.N. Kultur angeimpft. Nach 45 min Wachstum bei 37°C (OD 0.4-0.6) wurden die Zellen mit IPTG induziert (Endkonzentration 1 mM). Anschließend wurden die Zellen für weiter 4-5 h bei 37°C inkubiert.

Expression von pET-Derivaten

In dem *E. coli* Stamm BL21-CodonPlusTM (DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, CA, USA), in dieser Arbeit mit BL21 (DE3) bezeichnet, wurden Insertionen in pET-Plamiden zur Expression gebracht. YT-Kan/Cm Medium (37°C) wurde mit einem Zwanzigstel einer ü.N. Kultur angeimpft. Weitere Schritte wurde, wie für pSK-Derivate beschrieben, durchgeführt.

III.1.8 Isolation rekombinanter Proteine aus *E. coli*

E. coli Zellen einer 100 ml Zellkultur wurden bei 4°C für 15 min bei 5000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 30 ml H₂O dest. zum Waschen resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C für 15 min und 5000 g. Anschließend wurde das Pellet in 500 μ l Puffer (50 mM MOPS-KOH, pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) β -Mercaptoethanol und 0.1 % (v/v) Nonidet-20) resuspendiert. Ungefähr 500 μ L Glaskugeln (0.25-0.5 mm Durchmesser) wurden

zugefügt. Es folgten vier Vortex-Schritte für je 30 sec. Zwischen jedem Schritt wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 15 min und 20000 g. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und auf Eis bis zur Verwendung verwahrt.

III.1.9 Durchmustern einer cDNA-Bibliothek mittels homologer Sonden

Ungefähr 5×10^5 rekombinante λ -Phagen wurden zur Durchmusterung mit einer ^{32}P -markierten Sonde ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde nach einem Standardprotokoll (Sambrook et al., 1989) auf Filter (Marchary und Nagel, Düren) übertragen, fixiert und ü.N. bei 60°C, nach einem zweistündigem Prähybridisierungsschritt, mit der markierten Sonde in Natrium-Phosphat Puffer (0.25 M Na-Phosphat pH 7.2, 7 % SDS, 1 mM EDTA, 1 % BSA) hybridisiert. Die Filter wurden sukzessive in 2xSSC mit 0.1 % SDS (w/v), 1xSSC mit 0.1 % SDS (w/v), 0.5xSSC mit 0.1 % SDS (w/v) und 0.1xSSC mit 0.1 % SDS (w/v) bei 60°C gewaschen. Das Auffinden der Hybridisierungssignale erfolgte durch Autoradiographie ü.N. bei -70°C. Das Vereinzeln der Phagenplaques erfolgte in zwei weiteren Durchgängen. Nach der Vereinzelnung der hybridisierenden Plaques wurden diese nach Angaben des Herstellers (Statagene, La Jolla, CA, USA) durch »*in vivo* Excision« in pBluescript Derivate überführt. Die Plasmid-DNA der rekombinanten *E. coli* Klone wurde isoliert und die cDNA-Insertionen mittels Restriktion- und Sequenzanalysen charakterisiert.

III.1.10 Isolation von RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte nach der REB-Methode (Wadsworth *et al.*, 1988). mRNA wurde mit Hilfe des Oligotex-dT mRNA Kits nach Angaben des Herstellers isoliert (Qiagen, Hilden).

III.1.11 RNA-Analysen

III.1.11.1 Northern-Blot

20-40 μg Gesamt-RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in 1.5 %igen Agarosegelen mit Formaldehyd elektrophoretisch aufgetrennt (Lehrach et al., 1977). Die aufgetrennte RNA wurde anschließend durch Kapillartransfer in 10xSSC (1.5 M NaCl, 0.15 M Na-Citrat) auf Nylonmembranen (Macherey und Nagel, Düren) ü.N. übertragen. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung.

Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die Prähybridisierung der Membranen erfolgte für mindestens 2 h bei 65°C in Natrium-Phosphat Puffer (250 mM NaPO₄, pH 7.2, 7 % SDS (w/v), 1 % BSA (w/v), 1 mM EDTA). Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten erfolgte über Nacht in Natrium-Phosphat Puffer bei 65°C. Zur Entfernung unspezifisch gebundener radioaktiver DNA-Sonden von der Membran wurde einmal ca. 20 min mit 2xSSC mit 0.1 % SDS (w/v) und einmal ca. 10 min mit 0.2xSSC mit 0.1 % SDS (w/v) bei 65°C gewaschen.

Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA-Sonden

Die Membran wurde für mindestens 2 h bei 55°C in Hybridisierungspuffer (250 mM NaPO₄, pH 7.2, 7 % SDS (w/v), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 % Formamid (v/v)) prähybridisiert, bevor die Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA-Sonden über Nacht erfolgte. Anschließend wurde die Membran in folgenden Puffern gewaschen:

- 1 x 5 min bei RT in 2xSSC
- 2 x 30 min bei 65°C in PSE (250 mM NaPO₄, pH 7.2, 2 % SDS (w/v), 1 mM EDTA)
- 2 x 30 min bei 65°C in PES (40 mM NaPO₄, pH 7.2, 1 % SDS (w/v), 1 mM EDTA)
- 3 x 5 min bei RT in 2xSSC
- 1 x 15 min bei RT in 2xSSC mit RNaseA (1 µg/ml)
- 1 x 30 min bei 55°C in 0.1xSSC mit 0.1 % SDS (w/v)

Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte mittels Autoradiographie bei -80°C

III.1.11.2 Bestimmung von mRNA-Transkriptmengen mittels RT-PCR

Semiquantitative RT-PCR wurde mittels des ProSTAR™ HF Single-Tube RT-PCR Systems (Stratgene, La Jolla, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Gesamt RNA wurde wie unter III.1.10 beschrieben isoliert. Um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, folgte die Inkubation der RNA-Präparationen mit DNaseI. Nach der Fällung der RNA wurden 100 ng RNA pro Reaktion eingesetzt. Tab. 1 zeigt das Pipettierschema der einzelnen RT-PCR Reaktionen, Tab. 2 das verwendete PCR-Programm.

Tab. 1 Pipettierschema der einzelnen RT-PCR Reaktionen

Komponenten	Volumen
H ₂ O RNase frei	39.5 µl
10xHF RT-PCR Puffer	5.0 µl
5' Primer (100 ng)	1.0 µl
3' Primer (100 ng)	1.0 µl
dNTP Mix (40 mM)	1.0 µl
gesamt RNA	1.0 µl (100 ng)
MMLV-RT	1.0 µl (0.8 U)
Taq Polymerase	0.5 µl (2.5U)

Tab. 2 Verwendetes RT-PCR Programm

PCR-Zyklen	Temperatur	Dauer
1	37°C	15 min
1	95°C	1 min
50	95°C	30 sec
	60°C	30 sec
	68°C	2 min
1	68°C	10 min

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurden nach 30, 40 und 50 Zyklen je 10 μ l PCR-Ansatz entnommen und die entstandenen Produkte in einem 1.5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden die RT-PCR Reaktionen ohne Reverse-Transkriptase durchgeführt.

III.1.12 Transformation

III.1.12.1 Transformation von Bakterien

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Hitzeschock-Methode (Hanahan, 1983) oder durch Elektroporation mittels eines Pulsgenerators (GenePulser, Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Kompetente Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* wurden mittels Elektroporation transformiert.

III.1.12.2 Transformation von *Solanum tuberosum* L.

Für die Transformation von *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée wurde eine Variation der Methode von Rocha-Sosa et al. (1989) angewandt (Dietze et al., 1995). Regenerierte Pflanzen wurden mittels Northern-Blot oder semiquantitativer RT-PCR überprüft. Positive Pflanzen aus der Gewebekultur wurden durch Stecklingsvermehrung amplifiziert und im Gewächshaus kultiviert.

III.2 Kultivierung von Pflanzen

Pflanzen wurden in steriler Gewebekultur, im Phytotron und im Gewächshaus kultiviert.

Gewebekultur:

Haltung:	Klimakammern, 2MS-Medium, steril
Luftfeuchtigkeit:	50 %
Temperatur:	22°C
Lichtintensität:	23 μ mol * s ⁻¹ * m ⁻²
Licht/Dunkelrhythmus:	16h/8h

Phytotron:

Haltung:	Topferde mit Sand (3:1)
Luftfeuchtigkeit:	60 % 16 h, 75 % 8 h
Temperatur:	22°C 16 h, 16°C 8 h
Lichtintensität:	ca. 100 $\mu\text{mol} * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$
Licht/Dunkelrhythmus:	16h/8h

Hochlichtphytotron:

Haltung:	Topferde mit Sand (3:1)
Luftfeuchtigkeit:	60 % 24 h
Temperatur:	22°C 16 h, 16°C 8 h
Lichtintensität und Dauer der Beleuchtung:	100 % 13 bis 15 Uhr ca. 1000 $\mu\text{mol} * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$ 75 % 10 bis 13 Uhr und 15 bis 18 Uhr 50 % 9 bis 10 Uhr und 18 bis 20 Uhr 25 % 6 bis 9 Uhr 0 % 20 bis 6 Uhr

Gewächshaus:

Haltung:	Topferde mit Sand (3:1)
Luftfeuchtigkeit:	60 %
Temperatur:	22°C 16 h, 15°C 8 h
Lichtintensität:	Abhängig von der Kammer und Jahreszeit
Licht/Dunkelrhythmus:	16h/8h aber auch abhängig von der Jahreszeit

Foliengewächshaus:

Haltung:	Topferde mit Sand (3:1)
Luftfeuchtigkeit:	Abhängig von der Witterung
Temperatur:	Abhängig von der Witterung
Lichtintensität:	Abhängig von der Witterung
Licht/Dunkelrhythmus:	Abhängig von der Tageslänge

III.3 Pflanzenphysiologische und biochemische Methoden**III.3.1 Bestimmung des Gehaltes von Stärke und den löslichen Zuckern Glucose, Fructose und Saccharose**

Für die Bestimmung des Gehaltes an Stärke und den löslichen Zuckern Glucose, Fructose und Saccharose wurden Gewebestücke (Blätter 0.48 cm², Knollen 20-40 mg FG) einmal für 60 min in 1 ml 80 % Ethanol bei 80°C extrahiert. Dieser Überstand wurde für die Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose verwendet. Es erfolgte eine zweite Extraktion für 30 min in 1 ml 80 % Ethanol bei 80°C. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Gewebeproben einmal mit 1 ml 80 % Ethanol gewaschen.

Die Bestimmung der Zuckermenge erfolgte enzymatisch (Stitt et al., 1989). Dazu befanden sich im Messansatz 265 μl Puffer (100 mM Imidazol, pH 6.9, 5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 2 mM NADP, 0.3 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (aus Hefe) und 20 μl des zuckerhaltigen Ethanolextraktes. Die Bestimmung erfolgte als eine enzymatisch-gekoppelte spektralphotometrisch messbare Reaktion in einem Endvolumen von ungefähr 300 μl in Mikrotiterplatten. Die Bestimmung der Menge von Glucose, Fructose und Saccharose erfolgte durch die sequentielle Zugabe von 0.5 U Hexokinase (aus Kaninchenmuskel), 3 U Phosphoglucosomerase (aus Hefe) und ca. 20 U Invertase (aus Hefe) über die Reduktion von NADP zu NADPH bei 340 nm.

Zur Bestimmung der Stärkemenge wurden die Gewebestücke nach der Ethanolextraktion in 400 μl 0.2 M KOH homogenisiert und anschließend für 1 h bei 95°C inkubiert. Durch Zugabe von 70 μl 1 M Essigsäure wurden die Proben neutralisiert und anschließend zentrifugiert. Aliquots wurden verwandt, um den Stärkegehalt mit Hilfe des »Starch Determination Kit« (Roche, Mannheim) zu bestimmen. Nach einem Amyloglucosidase-Verdau der Stärke wurde die freigesetzte Glucose in einem an die Reduktion von NADP zu NADPH gekoppelten Assay mit Hilfe der Hexokinase (aus Hefe) und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (aus Hefe) spektralphotometrisch bei 340 nm gemessen.

III.3.2 Bestimmung der β -Amylase-, α -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität

Die Bestimmung der β -Amylase-, α -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität erfolgte wie bei Nielsen et al. (1997) beschrieben. Blattmaterial oder Knollenmaterial wurden in gefrorenem Zustand homogenisiert und mit 300 μl Extraktionspuffer (50 mM MOPS-KOH, pH 6.2, 20 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 30 g L^{-1} PEG-8000 und 20 g L^{-1} Polyvinylpyrrolidone) versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand zur Messung der Enzymaktivitäten verwendet. β -Amylase- und α -Amylase-Aktivitäten wurden durch den Abbau von Maltooligosacchariden, welche mit einer *p*-Nitrophenyl-Gruppe am reduzierenden Ende verbunden sind, mittels eines Kits der Firma Megazyme (Sydney, Australien), bestimmt. Als α -Amylase Substrat wurde *p*-Nitrophenyl-Maltoheptaose verwendet, welches am nichtreduzierenden Ende chemisch blockiert ist (PNPG7), um den Abbau durch Exoamylasen zu verhindern. Als β -Amylase Substrat wurde nicht blockiertes *p*-Nitrophenyl-Maltopentaose verwendet (PNPG5), welches zu kurz für einen signifikanten Abbau durch Endoamylasen ist.

47,5 mg PNPG5 und 100 U α -Glucosidase wurden in 10 ml H_2O dest. gelöst. 50 μl des Enzymextraktes wurden mit 225 μl Puffer (100 mM Mes-KOH, pH 6.2, 1 mM EDTA und 0.1 % (v/v)

β -Mercaptoethanol) versetzt. Die Messung wurde durch die Zugabe von 25 μ l des Substrates (finale Konzentration von 0.4 mM PNPG5 und 2.5 U α -Glucosidase) gestartet.

54.5 mg PNPG7, 100 U Glucoamylase und 100 U α -Glucosidase wurden in 10 ml H₂O dest. gelöst. 50 μ l des Enzymextraktes wurden mit 225 μ l Puffer versetzt. Die Messung wurde durch die Zugabe von 25 μ l des Substrates (finale Konzentration von 0.4 mM PNPG7, 2.5 U α -Glucosidase und 2.5 U Glucoamylase) gestartet.

Die Ansätze wurden für 10 min bei 40°C inkubiert und anschließend mit 750 μ l 10 g L⁻¹ Trizma-Base gestoppt. Die Aktivität wurde spectrophotometrisch durch das Entstehen von *p*-Nitrophenol bei 405 nm bestimmt. Ein Unit β -Amylase- und α -Amylase-Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym, welche benötigt wird, um 1 μ mol *p*-Nitrophenyl min⁻¹ freizusetzen.

α -Glucosidase-Aktivität wurde auf dem gleichen Weg, durch die Zugabe von *p*-Nitrophenylglucosid (5 mM) als Substrat, bestimmt.

III.3.3 Bestimmung der Stärkephosphorylase-Aktivität

Pflanzenmaterial wurde in einem Extraktionspuffer bestehend aus 5 mM MgCl₂, 50 mM HEPES KOH (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 2 mM Benzamidine, 2 mM ϵ -Aminocapronsäure, 0.5 mM PMSF, 0.1 % Triton X-100 und 10 % Glycerol aufgeschlossen (Geigenberger und Stitt, 1993). Der Reaktionspuffer zur Bestimmung der Stärkephosphorylase-Aktivität bestand aus 20 mM MOPS (pH 7.0), 20 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 3.4 mM NAD, 1 U Phosphoglucomutase (aus Kaninchenmuskel), 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (aus *Leuconostoc mesenteroides*), 4 μ M Glucose-1.6-Phosphat und 2.5 mg/ml Amylopektin. Die Bestimmung der Stärkephosphorylase-Aktivität erfolgte nach Steup (1990).

III.3.4 Bestimmung der D-Enzym-Aktivität

Pflanzenmaterial wurde in einem Extraktionspuffer nach Geigenberger und Stitt (1993) aufgeschlossen. Der Reaktionspuffer bestand aus 50 mM MOPS (pH 6,8) und 60 mM Maltotriose (Takaha et al., 1993). 50 μ l Proteinextrakt wurden mit 450 μ l Puffer versetzt und für 20 min bei RT belassen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 5 min bei 95°C inkubiert. Die D-Enzym-Aktivität wurde über die Menge an freigesetzter Glucose bestimmt.

III.3.5 Bestimmung der Pullulanase-Aktivität

Pflanzenmaterial wurde in einem Extraktionspuffer nach Geigenberger und Stitt (1993) aufgeschlossen. Die Bestimmung der Pullulanase-Aktivität erfolgte durch native PAGE. Das Sammelgel bestand aus 3.75 % (w/v) Acrylamide und 63 mM Tris, pH 6.8, während das Sammelgel aus 8.0 % (w/v) Acrylamid, 1 % (w/v) rotem Pullulan (Megazyme) und 375 mM Tris, pH 8.8 bestand. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Gele wurden diese zweimal in 50 ml Puffer für 15 min gewaschen (100 mM Tris (pH 7.0), 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT), dann ü.N. in diesem Puffer bei RT inkubiert. Pullulanase-Aktivität war durch den Verlust der roten Färbung des Gels gekennzeichnet.

III.3.6 Bestimmung von Proteinmengen

Proteine wurden in den jeweils angegebenen Puffern extrahiert und die Proteinkonzentration der Extrakte wurden nach Bradford (1976) bestimmt, wobei BSA als Proteinstandard verwendet wurde.

III.3.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die hydrolytische Aktivität von Proteinen kann in nativen Polyacrylamidgelen, welche Amylopektin oder lösliche Stärke als Substrat enthalten, durch Negativfärbung mit Lugol'scher Lsg. nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden Proteine in einem 7.5 %igem (w/v) nativen Polyacrylamidgel nach Hill et al. (1996), aufgetrennt. Die Gele bestanden aus (7.5 % (w/v) Acrylamid, (30:0.8 Acrylamid:Bisacrylamid), 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % Amylopektin). Das Sammelgel enthielt 3 % (w/v) Acrylamid und 63 mM Tris-HCL (pH 6.8). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine fand für 2 h bei 4°C statt. Anschließend wurden die Gele zweimal in 50 ml Puffer für 15 min gewaschen (100 mM Tris (pH 7.0), 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT) und dann ü.N. in diesem Puffer bei RT inkubiert. Die Färbung der Gele erfolgte am nächsten Tag durch Lugol'scher Lsg.

III.3.8 Bestimmung hydrolytischer Abbauprodukte mittels Dünnschicht-chromatographie

50 µl der löslichen Proteinfraction aus *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden mit 50 µl löslicher oder roher Stärke (finale Konzentration von 10 g L⁻¹ in 100 mM Mes-KOH, pH 6.2, 1 mM EDTA und 0.1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT auf einem Schwenkschüttler inkubiert. Die Abbauprodukte wurden über Dünnschicht-Chromatographie (Silicagel F60, Merck) aufgetrennt. Das verwendete Laufmittel bestand aus

Isopropanol:Butanol:Wasser (12:3:4). Anschließend wurden die Platten nach der Methode von Bernfeld (1955) mit 10 %iger H₂SO₄ in Ethanol besprüht und bei 120°C entwickelt.

III.3.9 Präparation von Chloroplasten aus Erbsenkeimlingen

Zur Isolation intakter Chloroplasten wurden 8–10 Tage alte Erbsenkeimlinge verwendet. Alle Schritte der Chloroplastenpräparation wurden mit vorgekühlten Lösungen und Geräten (4°C) und unter ständiger Kühlung durch Eis durchgeführt.

Etwa 10 g Blattmaterial wurden in 100 ml Saccharose-Isolationspuffer (SIM: 350 mM Saccharose, 25 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 2 mM EDTA) mit einem UltraTurrax homogenisiert. Das Homogenat wurde durch zwei Lagen Miracloth-Gaze filtriert und für 2 min bei 4000 rpm zentrifugiert (Beckman, Rotor JA-10 oder JA-14). Das Pellet wurde vorsichtig mit einem Pinsel in 4 ml 1 x Sorbitol-Reisolationspuffer (5 x SRM: 1.65 M Sorbitol, 250 mM HEPES-KOH, pH 8.0) resuspendiert und auf ein 35 %iges Percoll-Kissen geladen. Während der Zentrifugation bei 4000 rpm für 7.5 min (Beckman, Rotor JA-20) sedimentierten zum überwiegenden Teil intakte Chloroplasten. Das Pellet wurde in 4 ml 1 x SRM Puffer mit dem Pinsel resuspendiert und erneut bei 4000 rpm für 2 min zentrifugiert (Beckman, Rotor JA-20). Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt, um das Percoll vollständig zu entfernen. Die pelletierten Chloroplasten wurden zum Schluss in 1 ml 1 x SRM Puffer resuspendiert und waren für mehrere Stunden auf Eis haltbar. Die relative Menge an Chloroplasten wurde photometrisch über den Chlorophyllgehalt der Suspension bestimmt. Dazu wurde die Extinktion einer 1:100 Verdünnung der Chloroplastensuspension in 80 %igem Ethanol bei 645 nm und 663 nm gemessen. Der Chlorophyllgehalt berechnet sich nach folgender Formel (Arnon, 1949).

$$\text{Chlorophyllkonzentration } (\mu\text{g/ml}) = (20.2 \times \text{OD}_{645} + 8.02 \times \text{OD}_{663}) \times 100$$

III.3.10 *In vitro* Transkription und Translation

In vitro Transkription und Translation wurde nach Angaben des Herstellers (Promega, Madison) mit Hilfe des TNT-gekoppelten Reticulocyten Lysates durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung der Proteine wurde ³⁵S-Methionin (Amersham, Braunschweig) verwendet.

III.3.11 Import von ³⁵S-markierten *in vitro* transkribierten und translatierten Proteinen in isolierte Erbsenchloroplasten

Für die Import-Experimente wurden jeweils 20 µg Chloroplasten und 9 µl *in vitro* Translationsprodukt des 50 µl TNT-Ansatzes eingesetzt. Die Reaktion wurde im Wesentlichen wie bei Waegemann und Soll (1995) beschrieben durchgeführt.

Es wurden insgesamt drei Importansätze in Gegenwart von 2 mM ATP durchgeführt. Ein Ansatz wurde nach dem Import mit Thermolysin behandelt. Die Behandlung mit der Calcium-abhängigen Protease Thermolysin wurde durchgeführt, um nicht importiertes Protein, welches an der Plastidenmembran haftete, zu verdauen. Das importierte Protein wurde durch die Plastidenmembran vor dem Abbau geschützt. Als Kontrolle wurde ein zweiter Ansatz nicht mit Thermolysin behandelt. Der dritte Ansatz enthielt zusätzlich zu der Protease Thermolysin 1 % Triton X-100. Triton X-100 zerstört die Plastidenmembran und macht das importierte Protein für den proteolytischen Abbau durch Thermolysin zugänglich. Nach der Importreaktion und dem Waschen der Chloroplasten wurden diese in 40 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS (w/v), 20 % Glycerin (v/v), 5 % β-Mercaptoethanol (v/v), 0.01 % Bromphenolblau (w/v) resuspendiert und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Als Kontrolle wurde 1/10 des für die jeweilige Import-Reaktion eingesetzten *in vitro* Translationsproduktes auf das Gel aufgetragen. Die Detektion der radioaktiv markierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie.

III.3.12 Stärkeisolierung aus Kartoffelknollen

Kartoffelknollen wurden mit Hilfe einer Saftpresse zerkleinert. Durch Zentrifugation wurde die Stärke vom Saft der Knollen getrennt. Die Stärke wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

III.3.13 Stärkeisolierung aus Kartoffelblättern

Blattmaterial (40 g) wurde in Flüssigstickstoff gefroren und mit Hilfe eines Waring-Blenders homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend durch mehrere Lagen Miracloth filtriert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser wurde die Stärke einmal mit Aceton gewaschen und dann getrocknet. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurden die Stärkekörner durch Zentrifugation sedimentiert.

III.3.14 Bestimmung der Dichte von Kartoffelknollen

Von mindestens 0.5 kg gewaschenen Kartoffelknollen wurde das Gewicht sowohl über Wasser (W_{Luft}) als auch unter Wasser (W_{Wasser}) bestimmt. Mit Hilfe folgender Formel wurde die spezifische Dichte berechnet: $\rho = W_{\text{Luft}} / (W_{\text{Luft}} - W_{\text{Wasser}})$.

Die Stärke- und Trockensubstanzgehalte (TG) von Kartoffelknollen stehen in folgenden Relationen zur spezifischen Dichte (von Schéele et al., 1937):

$$\% \text{ TG} = (\rho - 1.0988) \times 211.04 + 24.182$$

$$\% \text{ Stärke} = (\rho - 1.0988) \times 199.07 + 17.546$$

III.3.15 Analyse der Stärkekorngröße

Die Stärkekorngröße wurde mit Hilfe eines Sedimentations-Analysegerätes (Lumosed, Retsch) ermittelt.

IV Ergebnisse

IV.1.1 Herstellung von cDNA-Bibliotheken zur Isolation von cDNAs, die für stärkeabbauende Enzyme kodieren.

In Rahmen dieser Arbeit sollten cDNAs isoliert und charakterisiert werden, welche für stärkeabbauende Enzyme kodieren. Als Modellorganismus wurde Kartoffel (*Solanum tuberosum*) gewählt, da in dieser Pflanze nicht nur die transitorische Blattstärke dem Abbau unterliegt, sondern auch die Speicherstärke in den Knollen. In Knollengewebe sollte wiederum der Abbau der Speicherstärke unter den Bedingungen der Kaltlagerung, dem sog. »cold-sweetening«, untersucht werden. Zur Isolation unbekannter cDNAs, kodierend für stärkeabbauende Enzyme, wurden zwei cDNA-Bibliotheken hergestellt. Eine Bibliothek aus Blattmaterial während des Übergangs der Licht- zur Dunkelperiode (Probennahme alle 30 min, zwei Stunden vor dem Ende der Lichtperiode bis zwei Stunden nach dem Ende der Lichtperiode), die zweite Bibliothek aus Knollenmaterial, welches für zehn Tage bei 4°C gelagert wurde. Da diese Bibliotheken zur funktionellen Expression in *E. coli* gebracht werden sollten, wurden die ursprünglichen Phagen-Bibliotheken mittels »in vivo mass Excision« in Plasmid-Bibliotheken überführt. Die wichtigsten Daten zu den beschriebenen Bibliotheken sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3 Daten zu den hergestellten cDNA-Bibliotheken

	Titer vor ⁽¹⁾ / nach ⁽²⁾ Amplifikation	Durchschnittliche Insertgröße	Prozent an rekombinanten Phagen	Titer der Plasmid- Bibliothek
Blatt-Bibliothek	2.1 * 10 ⁶ pfu ⁽¹⁾ 1.5 * 10 ⁵ pfu ⁽²⁾	1.3 kb	97 %	5.0 * 10 ⁸ cfu
Knollen-Bibliothek	2.8 * 10 ⁶ pfu ⁽¹⁾ 6.5 * 10 ⁵ pfu ⁽²⁾	1.0 kb	99 %	3.8 * 10 ⁸ cfu

IV.1.2 Isolation von cDNAs, welche für unbekannte stärkeabbauende Enzyme kodieren

Zur Isolation von DNA-Sequenzen, welche für stärkeabbauende Enzyme kodieren, wurde ein funktionelles Durchmusterungssystem verwendet. Details zu diesem Durchmusterungsverfahren finden sich im Methodenteil dieser Arbeit. Es wurden zwei *E. coli* Stämme verwendet, welche lineare Glucane akkumulieren und sich deshalb nach der Bedampfung mit Jod blau färbten. Bei den *E. coli* Stämmen handelte es sich zum einen um den Stamm KV832, mit dem die primäre Durchmusterung

der cDNA-Bibliotheken durchgeführt wurde, sowie den Stamm PGM⁻, welcher zur Verifizierung der Resultate, gewonnen aus der primären Durchmusterung, verwendet wurde (Details im Methodenteil).

Nach der Expression der Blatt und Knollen Plasmid-Bibliotheken in *E. coli* KV832 wurden nach Bedampfen mit Jod solche Kolonien isoliert, welche sich nicht mehr oder anders färbten, als der überwiegende Teil der Kolonien. Zur Verifizierung der Resultate erfolgte die Retransformation in *E. coli* KV832. Anschließend wurde der *E. coli* Stamm PGM⁻ mit den isolierten Plasmiden transformiert. Dies war nötig, um auszuschließen, dass die exprimierten cDNAs in *E. coli* KV832 nicht die Synthese der linearen Glucane inhibieren und sich aus diesem Grund die Kolonien nicht mehr oder anders färbten (Details im Methodenteil). Es wurden nur solche cDNA-Insertionen eingehender untersucht, welche nach ihrer Expression in beiden *E. coli* Stämme zum gleichen Ergebnis führten. Die isolierten Plasmide wurden anschließend durch Restriktionsverdau miteinander verglichen und nach ihrem Restriktionsmuster gruppiert. In Tab. 4 sind die isolierten Plasmide aufgelistet. DSD steht für „diurnal starch degradation“ und bezeichnet Plasmide, welche aus der Blatt-Bibliothek isoliert wurden. CSD steht für „cold starch degradation“ und bezeichnet Plasmide die aus der Knollen-Bibliothek isoliert wurden. Die Insertionen der in Tab. 4 angegebenen Plasmide wurden vom 5' und 3' Ende ansequenziert. Die Sequenzen der isolierten cDNAs wurden mittels des BLASTX Algorithmus zum Auffinden verwandter Gene mit den Einträgen in der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) verglichen. In Tab. 4 sind ebenfalls die Ergebnisse der Sequenzvergleiche aufgelistet.

Wie in Tab. 4 zu erkennen, konnten durch die funktionelle Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken in *E. coli* KV832 Insertionen isoliert werden, welche für β -Amylasen kodieren (*dsd1* und *dsd7*). Damit konnte gezeigt werden, dass das gewählte System einen erfolgsversprechenden Weg zur Isolierung von cDNAs, kodierend für stärkeabbauende Enzyme, darstellt. Neben den für β -Amylasen kodierende cDNAs wurden auch cDNAs isoliert, welche möglicherweise für unbekannte stärkeabbauende Enzyme kodieren. Dabei handelte es sich um Klone, die nur Homologien zu bisher funktionell nicht charakterisierten Genen aufwiesen.

Tab. 4 Klone, die durch die funktionelle Durchmusterung der hergestellten cDNA-Bibliotheken isoliert wurden.

Aufgelistet ist das Verhalten der *E. coli* Stämme nach Expression der betreffenden cDNAs und Bedampfen der Kolonien mit Jod. Die Insertgröße wurde durch Restriktionsverdau bestimmt. Homologie zu bekannten Genen wurden durch den BLASTX Algorithmus ermittelt.

<u>Klonname</u>	<u><i>E. coli</i> KV832</u>	<u><i>E. coli</i> PGM⁻</u>	<u>Insertgröße</u>	<u>Homologie</u>
dsd1	weiß	weiß	ca. 2 kb	β -Amylase
dsd2	rot	n. U.	ca. 3.3 kb	Branching Enzyme
dsd7	weiß	weiß	ca. 2.2 kb	β -Amylase

Tab. 4 (Fortsetzung)

<u>Klonname</u>	<u><i>E. coli</i> KV832</u>	<u><i>E. coli</i> PGM⁻</u>	<u>Insertgröße</u>	<u>Homologie</u>
<i>dsd6</i>	weiß	rötlich	ca. 1.3 kb	Unbekanntes Protein aus <i>Arabidopsis</i>
<i>dsd9</i>	hellblau	hellblau	ca. 800 bp	Unbekanntes Protein aus <i>Arabidopsis</i>
<i>dsd10</i>	weiß	weiß	ca. 1.3 kb	Unbekanntes Protein aus <i>Arabidopsis</i>
<i>dsd13</i>	weiß	blau	ca. 1.3 kb	MtN3 aus <i>Medicago truncatula</i>
<i>dsd6</i>	weiß	rötlich	ca. 1.3 kb	Unbekanntes Protein aus <i>Arabidopsis</i>
<i>csd21</i>	weiß	weiß	ca. 1.2 kb	Keine Homologie
<i>csd23</i>	weiß	weiß	ca. 1.2 kb	Unbekanntes Protein aus <i>Arabidopsis</i>

IV.2 Weiterführende Untersuchungen zu den isolierten cDNAs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die isolierten cDNAs *dsd7* und *dsd10* detailliert charakterisiert. Die Auswahl dieser beiden Klone erfolgte einerseits aufgrund der Homologie zu bekannten Genen, wie bei *dsd7*, andererseits aufgrund des Verhaltens der *E. coli* Stämme KV832 und PGM⁻ nach Anfärbung durch Jod, wie bei *dsd10*. Die Klone *dsd1* sowie *dsd2* wurden nicht weiter verfolgt, da für diese cDNAs schon Ergebnisse vorlagen (Scheidig, 1997; Froberg und Kossmann, pers. Mitteilung). Zur Veranschaulichung der Selektionsmethode ist in Abb. 1 der *E. coli* Stamm KV832, welcher die cDNA *dsd7* exprimierte, nach Bedampfen mit Jod gezeigt. Als Kontrolle dienten Zellen, die den leeren Vektor pSK enthielten. Wie zu erkennen, führte die Expression der *dsd7* cDNA dazu, dass sich die Zellen nach der Bedampfung mit Jod, im Gegensatz zur Kontrolle, nicht blau färben.

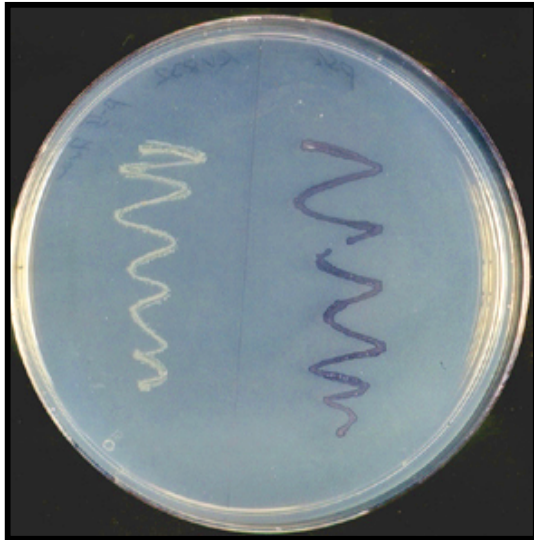


Abb. 1 Expression der *dsd7* cDNA in *E. coli* KV832.

E. coli KV832 wurde mit der *dsd7* cDNA transformiert und auf YT-Medium mit 1 % Glucose, 1 mM IPTG und dem entsprechenden Antibiotika ausgestrichen (links). Als Kontrolle dienten *E. coli* KV832 Zellen, welche mit dem leeren Vektor pSK transformiert wurden (rechts). Nach dem Wachstum der Zellen bei 37°C ü.N. wurden diese mit Jod bedampft.

IV.2.1 Charakterisierung von *dsd7*

IV.2.1.1 Sequenzanalyse der *dsd7* cDNA aus Kartoffel

Die cDNA-Insertion des Klons *dsd7* wurde durchgehend sequenziert. Die erhaltene cDNA-Sequenz, sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz, sind in Abb. 2 dargestellt. Die *dsd7* cDNA-Insertion hatte eine Länge von 2089 bp. Zwischen den Positionen 58 und 1693 konnte ein offenes Leseraster von 1635 bp identifiziert werden. Das entsprechende Protein hatte eine molekulare Masse von ca. 61 kDa. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der isolierten cDNA um den Vollängenklon handelte, da unmittelbar vor dem putativen Startcodon das offene Leseraster durch ein Stopcodon (grün) im 5' untranslatierten Bereich unterbrochen war. Im 3' untranslatierten Bereich befand sich ein für Pflanzengene typisches Polyadenylierungssignal (Joshi, 1987; O'Neil et al., 1990).

1	CAA	AAA	AAT	ACA	CAT	TCT	GTT	TAT	ATA	TTT	TCT	ATT	ATC	AAA	AAA	CAG	AAA	TAA	GAA	ATG
4	ACT	TTA	ACA	CTT	CAA	TCA	TCA	GCT	TCT	TTT	ATC	AAT	TTC	AAA	GAA	ACC	AAA	GGT	GTT	AAA
	T	L	T	L	Q	S	S	A	S	F	I	N	F	K	E	T	K	G	V	K
64	GCA	CCT	GAT	GAG	TTC	TTA	GGA	ATG	GTT	TCT	TTT	GCA	CAA	GCC	AAG	CCA	TCA	TGC	CGG	CTA
	A	P	D	E	F	L	G	M	V	S	F	A	Q	A	K	P	S	C	R	L
124	GTC	GCG	AAA	AGT	TCG	ATG	CAA	GAA	GCT	CAA	CTC	TCC	CAT	GAG	AGA	ATC	ATG	GAA	GTG	AAG
	V	A	K	S	S	M	Q	E	A	Q	L	S	H	E	R	I	M	E	V	K
184	AAA	ATT	GAG	AAA	AGA	GAG	AAG	CTA	CAT	GAG	TTA	CCA	GCT	AAT	CAC	AGC	AAT	AGA	AGT	ACA
	K	I	E	K	R	E	K	L	H	E	L	P	A	N	H	S	N	R	S	T
244	AGG	GTA	CCT	GTT	TTT	GTG	ATG	CTT	CCA	CTT	GAC	ACC	ATG	ACT	ATG	GGA	GGG	AAC	TTG	AAC
	R	V	P	V	F	V	M	L	P	L	D	T	M	T	M	G	G	N	L	N
304	AGG	CCA	CGA	GCG	ATG	AAT	GCG	AGT	TTG	ATG	GCG	TTG	AAA	AGT	TCT	GGA	GCT	GAA	GGG	GTG
	R	P	R	A	M	N	A	S	L	M	A	L	K	S	S	G	A	E	G	V

Abb. 2

Abb. 2 (Fortsetzung)

364	ATG	GTG	GAT	GCT	TGG	TGG	GGA	TTG	GTG	GAG	AAA	GAT	GGA	CCT	TTG	AAG	TAT	AAT	TGG	GAA
	M	V	D	A	W	W	G	L	V	E	K	D	G	P	L	K	Y	N	W	E
424	GGA	TAT	GCT	GAG	CTT	GTA	AAG	ATG	TGT	CAA	GAA	CAT	GGA	TTG	AAG	CTT	CAA	GTT	GTC	ATG
	G	Y	A	E	L	V	K	M	C	Q	E	H	G	L	K	L	Q	V	V	M
484	TCT	TTT	CAT	CAG	TGT	GGA	GGA	AAT	GTT	GGA	GAT	TCT	TGC	AGT	ATT	CCT	CTA	CCT	CCA	TGG
	S	F	H	Q	C	G	G	N	V	G	D	S	C	S	I	P	L	P	P	W
544	GTA	CTT	GAA	GAA	ATC	AGC	AAG	AAT	CCT	GAC	CTT	GTC	TAC	ACA	GAT	AGA	TCA	GGC	CGG	AGA
	V	L	E	E	I	S	K	N	P	D	L	V	Y	T	D	R	S	G	R	R
604	AAT	CCT	GAG	TAT	CTA	TCC	TTA	GGT	TGT	GAT	ATG	TTA	CCA	GTA	CTC	AAA	GGA	AGA	ACA	CCA
	N	P	E	Y	L	S	L	G	C	D	M	L	P	V	L	K	G	R	T	P
664	ATT	CAA	GTA	TAC	ACC	GAC	TAT	ATG	AGG	AGC	TTC	AGA	GAA	AGA	TTC	AAC	GAA	TAC	TTG	GGA
	I	Q	V	Y	T	D	Y	M	R	S	F	R	E	R	F	N	E	Y	L	G
724	AAC	GTC	ATA	GTG	GAA	ATC	CAA	GTG	GGA	ATG	GGT	CCT	TGT	GGA	GAG	CTA	AGA	TAT	CCA	GCC
	N	V	I	V	E	I	Q	V	G	M	G	P	C	G	E	L	R	Y	P	A
784	TAT	CCA	GAA	AGC	AAT	GGT	ACA	TGG	AGG	TTT	CCT	GGA	ATT	GGA	GAA	TTC	CAA	TGC	TAT	GAC
	Y	P	E	S	N	G	T	W	R	F	P	G	I	G	E	F	Q	C	Y	D
844	AAG	TAC	ATG	GGA	GCT	TCA	TTG	GCA	GCA	GTG	GCC	AAG	GCA	GCT	GGA	AAG	GAT	GAC	TGG	GGC
	K	Y	M	G	A	S	L	A	A	V	A	K	A	A	G	K	D	D	W	G
904	CAG	GGA	GGG	CCT	CAT	GAT	TCT	GGG	AAG	TAC	AAC	CAG	TTT	CCT	GAG	GAT	ACT	GGA	TTT	TTC
	Q	G	G	P	H	D	S	G	K	Y	N	Q	F	P	E	D	T	G	F	F
964	CAG	AGG	GAT	GGA	ACA	TGG	AAC	AGT	GAA	TAT	GGA	CAG	TTC	TTC	CTA	GAG	TGG	TAT	TCA	GGA
	Q	R	D	G	T	W	N	S	E	Y	G	Q	F	F	L	E	W	Y	S	G
1024	AAG	CTA	CTG	GAA	CAT	GGT	GAC	AGA	ATA	CTA	GCA	GCA	GGA	GAA	AGT	ATA	TAC	CAA	GGA	ACT
	K	L	L	E	H	G	D	R	I	L	A	A	G	E	S	I	Y	Q	G	T
1084	GGG	GCT	AAA	CTA	TCT	GGA	AAG	GTA	GCT	GGG	ATT	CAT	TGG	CAT	TAC	AAT	ACT	AGA	TCA	CAT
	G	A	K	L	S	G	K	V	A	G	I	H	W	H	Y	N	T	R	S	H
1144	GCT	GCA	GAG	TTA	ACT	TCA	GGA	TAT	TAT	AAT	ACA	AGA	CAC	AGA	GAT	GGT	TAT	CTA	CCT	ATA
	A	A	E	L	T	S	G	Y	Y	N	T	R	H	R	D	G	Y	L	P	I
1204	GCA	CGT	ATG	TTA	GCG	AAA	CAT	GGT	GCT	GTA	CTT	AAC	TTT	ACA	TGT	ATG	GAA	ATG	AGG	GAT
	A	R	M	L	A	K	H	G	A	V	L	N	F	T	C	M	E	M	R	D
1264	GGT	GAA	CAG	CCC	CAG	AGT	GCA	AAC	TGT	TCA	CCA	GAA	GGC	TTA	GTT	CGA	CAA	GTT	AAA	ACT
	G	E	Q	P	Q	S	A	N	C	S	P	E	G	L	V	R	Q	V	K	T
1324	GCA	GCT	AGA	ACT	GCT	GAA	GTA	GAA	CTT	GCT	GGA	GAA	AAT	GCT	CTA	GAA	AGG	TAT	GAT	GGA
	A	A	R	T	A	E	V	E	L	A	G	E	N	A	L	E	R	Y	D	G
1384	GGA	GCA	TTT	TCT	CAA	GTT	TTG	GCA	ACA	AGC	ATG	TCA	GAT	TCT	GGA	AAT	GGA	TTG	AGT	GCA
	G	A	F	S	Q	V	L	A	T	S	M	S	D	S	G	N	G	L	S	A
1444	TTT	ACA	TTC	TTG	CGA	ATG	AAC	AAA	CGG	TTG	TTT	GAG	CCA	GAA	AAT	TGG	CGG	AAT	CTA	GTG
	F	T	F	L	R	M	N	K	R	L	F	E	P	E	N	W	R	N	L	V
1504	CAA	TTT	GTG	AAG	AGC	ATG	TCT	GAA	GGA	GGT	CGA	AAT	GCT	AGC	CTT	CCA	GAG	TGT	GAC	TCA
	Q	F	V	K	S	M	S	E	G	G	R	N	A	S	L	P	E	C	D	S
1564	AGC	AGG	ACA	GAC	CTC	TAT	GTA	AGA	TTT	ATC	AAA	GAG	AGT	CAT	TCT	AAG	AAA	GCT	ACA	GAG
	S	R	T	D	L	V	R	F	I	K	E	S	H	S	K	K	A	T	E	G
1624	GTT	GCA	GTA	GTG	<u>TAA</u>	AGA	TAC	GGA	ACT	GTA	TAC	ATG	TAA	TAT	AGC	TAT	CCC	ATT	GTA	GGT
	V	A	V	V	*															
	TAG	CAA	AGA	AAA	GTG	GCA	CAT	AGA	GTA	CTA	AAG	TGT	CAT	ACT	CAT	AGC	ACC	TAG	AAG	AGT
	CCA	CAA	GAA	TTT	GAG	CCT	GTG	TCT	GAA	ATT	AAA	CTA	TAG	AAG	ACA	AGA	AAA	AGA	AGC	TAA
	GTA	CGC	CAA	TCT	TTG	CCA	CCC	TGG	TTC	AGA	GGT	TGT	GAA	GCT	CTG	GGT	CAT	TGG	GAC	AGT
	GAG	AAC	AAT	GAG	ACA	GTA	TCA	TAC	AAA	GAT	TTG	GAT	AAG	CAT	ATT	CTT	TTC	ATT	GTA	CAA
	AAA	TTT	TAA	AAA	AAA	TCT	GCC	TTC	CAC	ATT	TAT	TAT	TGA	AGA	ATA	AAG	GAG	CTA	ATA	ATA
	TTG	CTT	CCT	ACA	GAG	GCA	TTT	TCC	TGT	TAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	A

Abb. 2 Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des *dsd7* Vollängenklons.
Die Nummerierung bezieht sich auf die Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens. Der rot markierte Bereiche, zeigt das für Pflanzen typische Polyadenylierungssignal.

IV.2.1.2 Sequenzvergleich der *dsd7* cDNA aus Kartoffel mit Genen aus anderen Organismen

Die *dsd7* cDNA aus Kartoffel weist in weiten Bereichen eine hohe Homologie zu anderen pflanzlichen β -Amylasen auf. Wie in Tab. 5 zu erkennen, zeigt die *dsd7* cDNA aus Kartoffel die höchste Homologie zu einer plastidär lokalisierten β -Amylase (CT-BMY) aus Arabidopsis (Lao et al., 1999) und einer β -Amylase aus Reis (PCT-BMY). Gegenüber den meisten β -Amylasen besitzen DSD7, CT-BMY, PCT-BMYI aus Reis und eine weitere β -Amylase (CF-BMY) aus Kartoffel (Scheidig, 1997) eine N-terminale Extension. Für *ct-bmy* konnte gezeigt werden, dass diese N-terminale Extension für ein plastidäres Transitpeptid kodiert (Lao et al., 1999). Wie in Tab. 5 zu erkennen, weisen die β -Amylasen, welche eine N-terminale Extension besitzen, untereinander eine höhere Homologie auf, als solche ohne Extension. Wegen der hohen Homologie von DSD7 zu CT-BMY und des Vorhandenseins einer N-terminale Extension wird DSD7 im folgenden als PCT-BMYI (für **potato-chloroplast-targeted-Beta-AmylaseI**) bezeichnet (Genbank-Zugangsnummer AF393849).

Wie alle β -Amylasen besitzt auch PCT-BMYI zwei konservierte Sequenzmotive, welche mittels des Programms PROSITE bestimmt wurden. Für die Sequenzmotive konnte gezeigt werden, dass sie jeweils eine essentielle Aminosäure für die katalytische Aktivität beinhalten (Totsuka et al., 1994).

Tab. 5 Ähnlichkeiten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher β -Amylasen.

Ähnlichkeit von PCT-BMYI (AF393849, diese Arbeit), CT-BMY (CAB58423 plastidär lokalisierte β -Amylase aus Arabidopsis), CF-BETA (β -Amylase aus Kartoffel), PCT-BMY β -Amylase aus Reis (AAG60205), BMYI (BAA07842 β -Amylase Isoform aus Arabidopsis), β -Amylase aus Mais (AAD15902), β -Amylase aus Soja (AAA33941)

	PCT-BMYI Kartoffel	CT-BMY Arabidopsis	CF-BETA Kartoffel	PCT-BMYI REIS	BMYI Arabidopsis	β -Amylase Mais	β -Amylase Soya
PCT-BMYI	100 %	81 %	71 %	77 %	66 %	66 %	65 %
CT-BMY	81 %	100 %	71 %	75 %	68 %	66 %	67 %
CF-BETA	71 %	71 %	100 %	71 %	68 %	65 %	66 %
PCT-BMYI	77 %	75 %	71 %	100 %	68 %	65 %	66 %
BMYI	66 %	68 %	68 %	68 %	100 %	78 %	82 %
β-Amylase							
Mais	66 %	66 %	65 %	65 %	78 %	100 %	81 %
β-Amylase							
Soya	65 %	67 %	66 %	66 %	82 %	81 %	100 %

IV.2.1.3 Analyse der hydrolytischen Aktivität des rekombinanten PCT-BMYI Proteins

Zum Nachweis, dass es sich bei PCT-BMYI um eine aktive β -Amylase handelte, wurde die *dsd7* cDNA in den Expressions-Vektor pET28a kloniert. Dadurch erhielt die *pct-bmyI* cDNA zusätzlich am 5'-Ende die Sequenz für einen Histidin-Tag (pHIS-BMYI). Dies wurde im Hinblick auf eine eventuelle Aufreinigung des Proteins über Ni^{2+} -Affinitätssäulen, sowie der Möglichkeit, große Mengen des Proteins in *E. coli* BL21(DE3) Zellen herzustellen, durchgeführt.

Nach Induktion der Expression von HIS-BMYI in *E. coli* BL21(DE3) Zellen folgte die Isolation der löslichen Proteinfraction. Als Kontrolle wurde die lösliche Proteinfraction von *E. coli* BL21(DE3) Zellen verwendet, welche mit dem leeren Vektor pET28a transformiert worden waren. β -Amylase-Aktivität wurde über den Abbau eines Maltooligosaccharids bestimmt, welches mit einer p-Nitrophenylgruppe über eine glycosidische Bindung am reduzierenden Ende gekoppelt war. Dieses für β -Amylasen spezifische Substrat ist eine nicht blockierte p-Nitrophenyl-Maltopentaose (PNPG5) und wurde ursprünglich zur Bestimmung der β -Amylase-Aktivität in Cerealien entwickelt.

Proteinextrakte aus Zellen, welche das HIS-BMYI Protein exprimierten, wiesen β -Amylase-Aktivität auf, wohingegen die Proteinextrakte aus Zellen, welche den leeren Vektor enthielten, kein p-Nitrophenol mit PNPG5 als Substrat freisetzten (Abb. 3). Zur weiteren Charakterisierung der Spezifität von HIS-BMYI wurde PNPG7 sowie p-Nitrophenyl- α -Glucosid verwendet. PNPG7 ist eine p-Nitrophenyl-Maltoheptaose, welche chemisch am nicht reduzierenden Ende blockiert ist. Dieses Substrat wird zur Bestimmung der α -Amylase-Aktivität verwendet. Das Substrat p-Nitrophenyl-Glucosid wird hingegen zur Bestimmung der α -Glucosidase-Aktivität benutzt. Wie in Abb. 3 zu erkennen, konnte kein Unterschied in der Freisetzung von p-Nitrophenol aus PNPG7 oder p-Nitrophenyl-Glucosid durch die verschiedenen Proteinfractionen beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass das rekombinante HIS-BMYI Protein keine α -Amylase- oder α -Glucosidase-Aktivität aufwies und deuteten darauf hin, dass es sich bei PCT-BMYI um eine β -Amylase handelte. Die hydrolytische Aktivität des rekombinanten HIS-BMYI Proteins konnte auch in nativen Polyacrylamidgelen nachgewiesen werden, welche Amylopektin als Substrat enthielten. Die hydrolytische Aktivität des rekombinanten Proteins war nach Anfärbung des Gels mit Lugol'scher Lösung durch den Abbau des Amylopektins zu erkennen (Abb. 4).

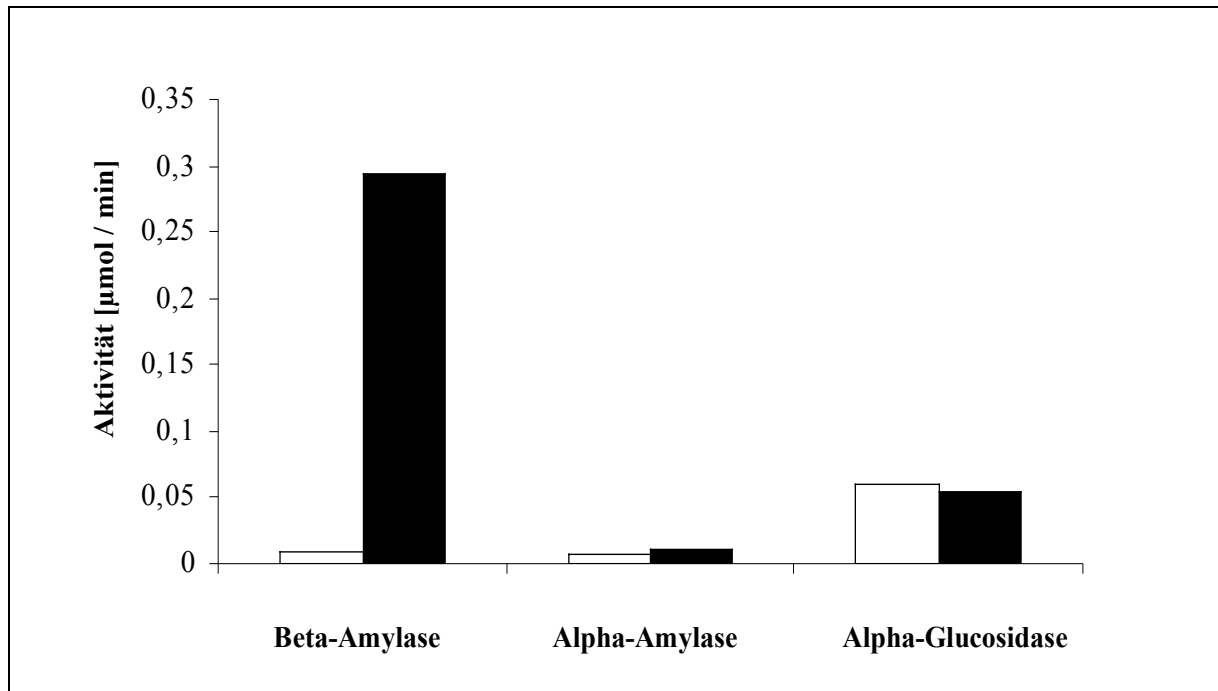


Abb. 3 Nachweis der rekombinanten β -Amylase-Aktivität in *E. coli* BL21(DE3) Zellen.

Hydrolytische Aktivität der löslichen Proteinfraction aus *E. coli* BL21(DE3) Zellen, welche das HIS-BMYI Protein exprimierten (geschlossene Balken). Als Kontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus *E. coli* BL21(DE3) Zellen, welche mit dem leeren Vektor pET28a transformiert wurden (offene Balken).

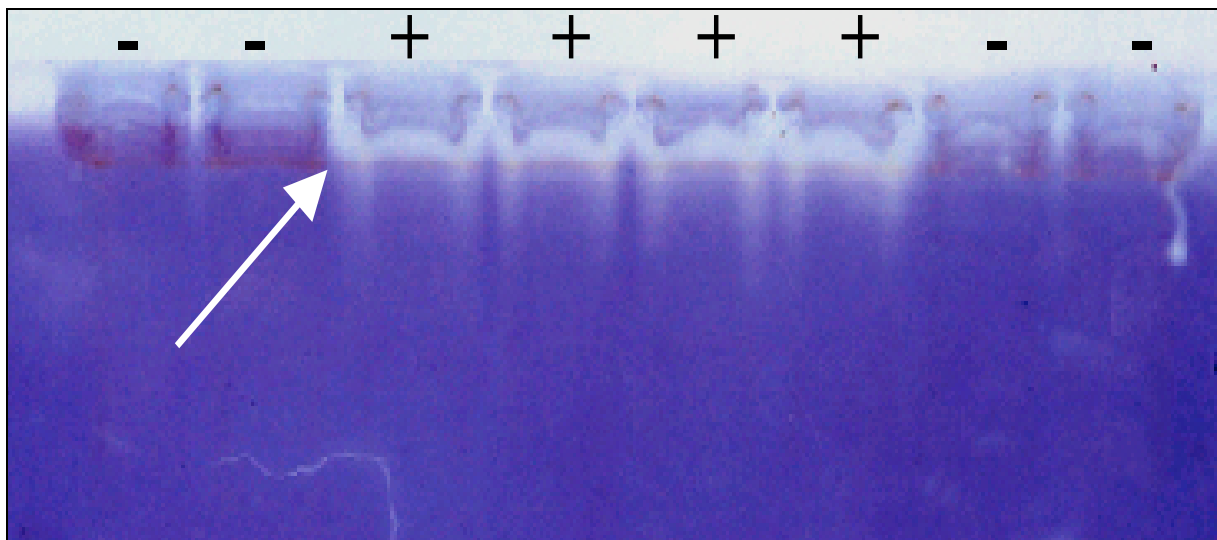


Abb. 4 Nachweis der hydrolytischen Aktivität des rekombinanten HIS-BMYI Proteins durch native PAGE.

Proteinextrakte aus *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, welche das HIS-BMYI Protein exprimierten, wurden elektrophoretisch in einem nativen, Amylopektin enthaltenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Inkubation ü.N. wurde das Gel mit Lugol'scher Lsg. angefärbt. Die hydrolytische Aktivität des HIS-BMYI Proteins war durch die negative Färbung zu erkennen und ist mit einem Pfeil markiert. Als Negativkontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, transformiert mit dem leeren Vektor pET28a (mit Minus gekennzeichnet).

IV.2.1.4 Das rekombinante HIS-BMYI Protein greift native Kartoffelstärkegranula an

Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass das rekombinante HIS-BMYI Protein β -Amylase-Aktivität aufwies und Amylopektin in nativen Gelen hydrolysieren konnte. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das rekombinante Protein in der Lage war, neben gelöster Stärke auch native Kartoffelstärkegranula anzugreifen. Zu diesem Zweck wurde die lösliche Proteinfraction HIS-BMYI exprimierender *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, welche das HIS-BMYI Protein exprimierten, mit gelöster Stärke oder nativen Kartoffelstärkegranula aus Knollen (Sigma, Deisenhofen) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die entstehenden Produkte mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt und durch H_2SO_4 sichtbar angefärbt. Als Negativkontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, transformiert mit dem leeren Vektor pET28a.

Wie in Abb. 5 zu erkennen, war das rekombinante HIS-BMYI Protein in der Lage, neben gelöster Kartoffelstärke auch native Kartoffelstärkegranula anzugreifen. Als Hauptprodukt der hydrolytischen Aktivität entstand Maltose. Geringe Mengen an Maltotriose und Maltotetraose waren ebenfalls nachweisbar. Für die Negativkontrollen konnten keine Abbauprodukte detektiert werden.

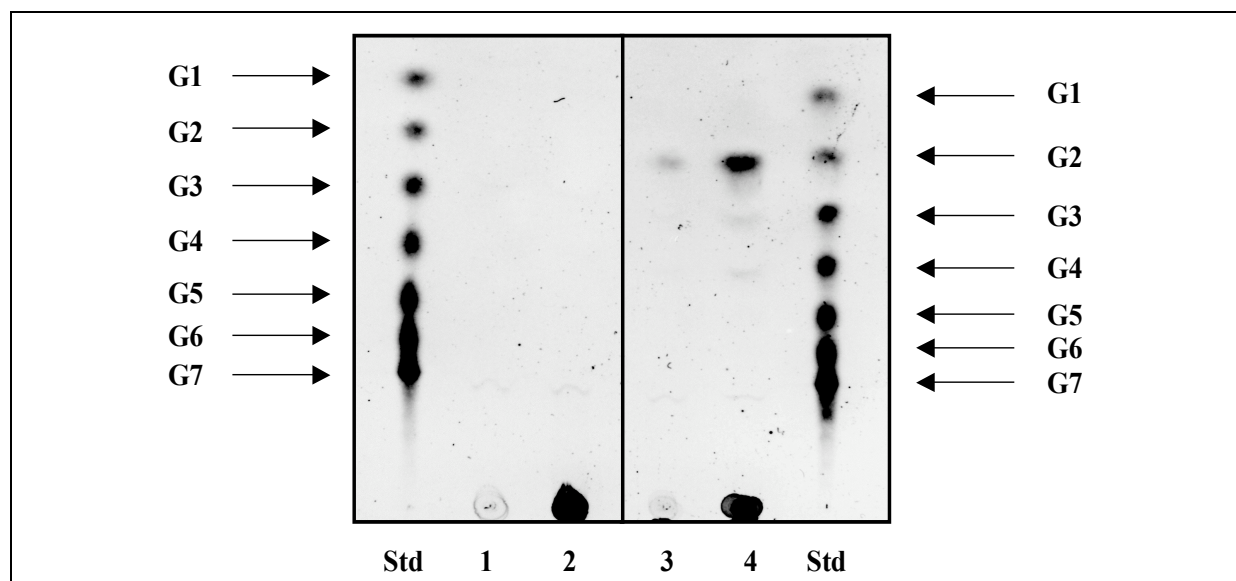


Abb. 5 Nachweis der β -Amylase-Aktivität mittels Dünnschichtchromatographie.

Proteinextrakt aus HIS-BMYI Protein exprimierenden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurde mit löslicher oder roher Kartoffelstärke aus Knollen für 24 h inkubiert. Die durch die HIS-BMYI-Aktivität entstandenen Produkte wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, transformiert mit dem leeren Vektor pET28a. Bahn 1: Negativkontrolle plus rohe Stärke, Bahn 2: Negativkontrolle plus lösliche Stärke; Bahn 3: HIS-BMYI plus rohe Stärke; Bahn 4: HIS-BMYI plus lösliche Stärke; Std = Standard; G1 = Glucose; G2 = Maltose; G3 – G7 = Maltooligosaccharide

Dieses Ergebnis zeigte, dass das rekombinante HIS-BMYI Protein *in vitro* in der Lage war, native Kartoffelstärkegranula aus Knollen anzugreifen. Um auszuschließen, dass dieses Experiment durch die Vorbehandlung der kommerziell erhaltenen Stärke beeinflusst wurde, wurden die Untersuchungen mit Stärke aus Blättern und Knollen wiederholt. Die entsprechenden Pflanzen waren im Gewächshaus herangezogen worden. Auch hier konnte gezeigt werden, dass das rekombinante HIS-BMYI Protein *in vitro* in der Lage war, native Kartoffelstärkegranula anzugreifen (Daten nicht gezeigt).

IV.2.1.5 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von PCT-BMYI

Zur weiteren Charakterisierung von PCT-BMYI sollte untersucht werden, ob das Protein, wie das homologe Protein CT-BMY aus Arabidopsis, eine plastidäre Lokalisation aufweist. Hierzu wurden die ersten 150 Aminosäuren von PCT-BMYI mittels des „chloroplast-transit-prediction“ Algorithmus ChloroP v1.1 untersucht (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>; Emanuelsson et al., 1999). Dieser Algorithmus wurde auf der Basis bekannter Transitpeptide plastidär lokalisierter Proteine von Arabidopsis entwickelt, um plastidäre Transitpeptide und die mögliche Spaltstelle zwischen dem Transitpeptid und dem importierten, reifen Protein *in silico* zu bestimmen. Die Voraussage für PCT-BMYI in Bezug auf das Vorhandensein eines plastidären Transitpeptids war negativ. Der angegebene Wert für PCT-BMYI lag bei 0.48. Ab einem Wert von 0.5 wird die Voraussage für ein Transitpeptid positiv bewertet. Im Gegensatz zur negativen Bewertung für PCT-BMYI war die Voraussage für CT-BMY mit einem Wert von 0.52 positiv. Das vorausgesagte Transitpeptid umfasst die ersten 49 N-terminalen Aminosäuren.

Trotz der negativen Voraussage durch ChloroP v1.1 zur Lokalisation von PCT-BMYI in Chloroplasten wurden *in vitro* Importexperimente mit isolierten Chloroplasten aus Erbsen durchgeführt. Hierfür wurde die *pct-bmyI* cDNA mittels eines gekoppelten Reticulocyten-Systems, unter Verwendung von ³⁵S-Methionin, *in vitro* transkribiert und translatiert. Das unprozessierte, markierte Protein wurde mit isolierten Chloroplasten inkubiert, um den Import und die Prozessierung nachzuweisen. Das ³⁵S markierte PCT-BMYI Protein zeigte nach der Auftrennung durch SDS-PAGE die vorhergesagte Masse von 61 kDa (Abb. 6 A, Reihe 1). Nach der Inkubation des Proteins mit isolierten, intakten Chloroplasten aus Erbse zeigte sich, dass fast das gesamte Protein in die Chloroplasten importiert und effizient in ein Protein von ungefähr 55 kDa prozessiert wurde (Abb. 6 A, Reihe 2). Die Zugabe der Protease Thermolysin zur Importreaktion führte zum Abbau der Proteine, welche nicht in die Chloroplasten importiert wurden, wohingegen die Chloroplastenmembran die importierten Proteine vor dem Abbau durch Thermolysin schützte (Abb. 6 A, Reihe 3). Nach Zugabe eines Detergenz, welches die Chloroplastenmembran zerstörte und somit das importierte Protein für die Protease zugänglich machte, wurde das gesamte importierte Protein abgebaut (Abb. 6 A, Reihe 4). Zur weiteren Untersuchung des Imports von PCT-BMYI in

isolierte Chloroplasten wurde ein chimäres Protein verwendet, bestehend aus den 100 N-terminalen Aminosäuren von PCT-BMYI und dem »green fluorescent protein« (PCT-BMYI/GFP). Ähnlich wie für PCT-BMYI gezeigt, nur nicht mit gleicher Effizienz, was Prozessierung und Import betrifft, wurde auch das chimäre PCT-BMYI/GFP Protein in isolierte Chloroplasten importiert (Abb. 6 B).

Diese Daten zeigten, dass es sich bei PCT-BMYI um ein Präprotein handelt, welches ein Transitpeptid für den Import in Chloroplasten enthält. Die ersten 100 N-terminalen Aminosäuren von PCT-BMYI reichten für diesen Import aus. Neben CT-BMYI, der ersten beschriebenen plastidär lokalisierten β -Amylase (Lao et al., 1999), konnte somit auch für PCT-BMYI eine plastidäre Lokalisation nachgewiesen werden.

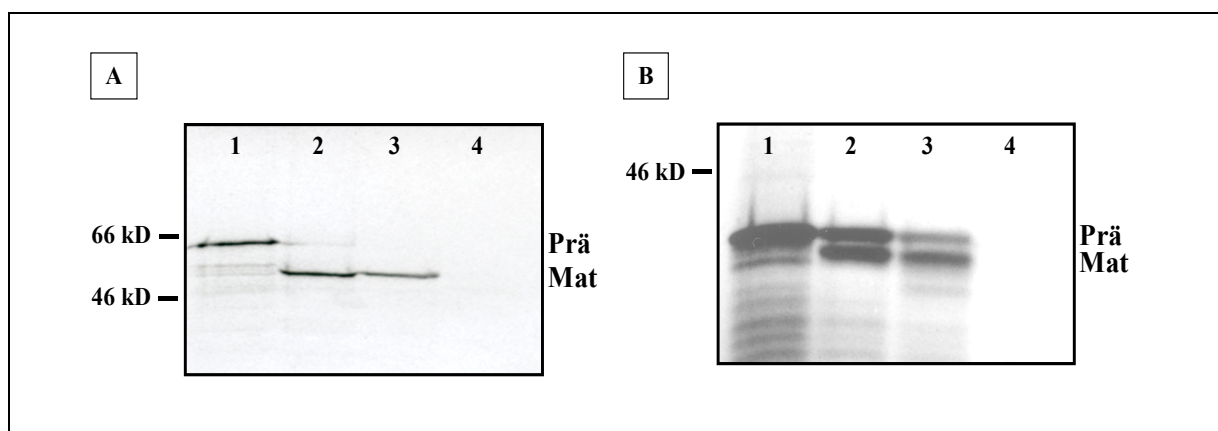


Abb. 6 PCT-BMYI wird *in vitro* in isolierte Erbsenchloroplasten importiert.

- A.** Isolierte Chloroplasten aus Erbsenblättern wurden mit dem ^{35}S -markiertem PCT-BMYI Protein inkubiert. Spur 1 zeigt das *in vitro* translatierte PCT-BMYI Protein, welches für das Importexperiment eingesetzt wurde. Spur 2 zeigt das in die Chloroplasten importierte Protein. Spur 3 zeigt das in die Chloroplasten importierte Protein nach der Behandlung der Chloroplasten mit Thermolysin. Spur 4 zeigt Chloroplasten, welche nach dem Import mit Thermolysin und Triton X-100 behandelt wurden.
- B.** Isolierte Chloroplasten aus Erbsenblättern wurden mit dem ^{35}S -markiertem chimärem Protein, bestehend aus den 100 N-terminalen AS des PCT-BMYI Proteins und dem GFP Protein, inkubiert. Spur 1 zeigt das *in vitro* translatierte chimäre Protein, welches für das Importexperiment verwendet wurde. Spuren 2 bis 4 wie bei A. (Prä = Präprotein, Mat = Mature protein (reifes Protein)).

IV.2.1.6 Untersuchungen zur *pct-bmyI* Transkriptmenge in Kartoffelgeweben

Um Hinweise zu erlangen, in welchen Geweben und unter welchen Bedingungen das *pct-bmyI* Transkript nachzuweisen war, wurden Northern-Blot-Experimente durchgeführt. Dies geschah auch im Hinblick darauf, ob etwaige Schlüsse auf die Beteiligung von PCT-BMYI am Stärkeabbau gezogen werden können. Die größte Menge an *pct-bmyI* Transkript konnte in Blüten, »source« Blättern, welche für einen Tag bei 4°C gehalten wurden, und »source« Blättern am Ende der Lichtperiode nachgewiesen werden. Kein *pct-bmyI* Transkript konnte in »source« Blättern, welche sechs Stunden nach Beginn der Lichtperiode geerntet wurden, und in »sink« Blättern am Ende der Lichtperiode nachgewiesen werden (Abb. 7).

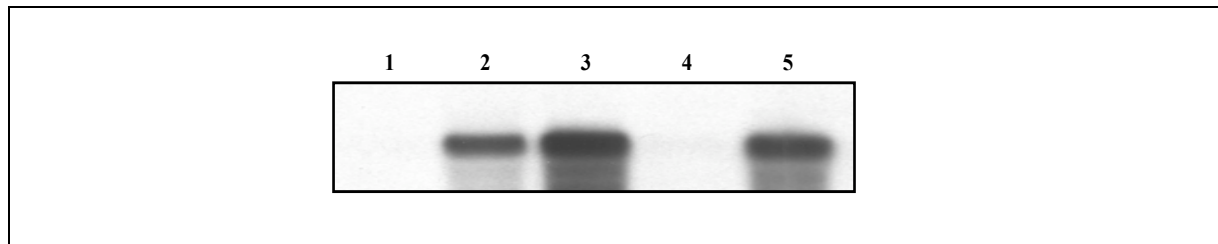


Abb. 7 Northern-Blot Analyse der *pct-bmyI* Transkriptmenge in Blättern und Blüten der Kartoffel.

Je Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetrennt. Zur Hybridisierung wurde die »random P^{32} markierte« *pct-bmyI* cDNA verwendet. Spur 1: »source« Blätter nach sechs Stunden Belichtung; Spur 2: »source« Blätter am Ende der Lichtperiode; Spur 3: »source« Blätter welche für 24 h bei 4°C gehalten wurden; Spur 4: »sink« Blätter am Ende der Lichtperiode; Spur 5: Blüten von Pflanzen, die sechs Stunden belichtet wurden.

Da in »source« Blättern am Ende der Lichtperiode, im Gegensatz zu Blättern nach sechs Stunden Belichtung, das *pct-bmyI* Transkript nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob ein Anstieg der Transkriptmenge während des Tag/Nacht Übergangs zu beobachten war. Ein starker Anstieg der *pct-bmyI* mRNA Menge konnte vor dem Ende der Lichtperiode gezeigt werden. Eine Stunde nach Beginn der Dunkelperiode folgte dann ein Rückgang der *pct-bmyI* Transkriptmenge (Abb. 8).

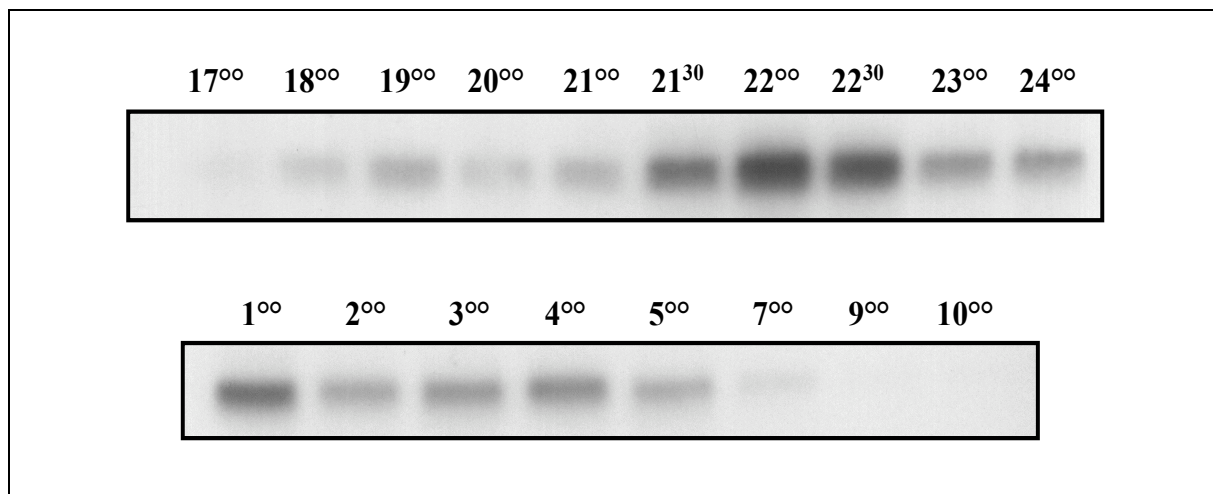


Abb. 8 Northern-Blot Analyse der *pct-bmyI* Transkriptmenge in »source« Blättern im Tagesverlauf.

Beginn der Dunkelperiode 22°, Beginn der Lichtperiode 6°. Je Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetrennt. Zur Hybridisierung wurde die »random P^{32} markierte« *pct-bmyI* cDNA verwendet.

Wie gezeigt, führten Temperaturen von 4°C zu einem Anstieg der *pct-bmyI* mRNA Menge in »source« Blättern. In einem weiteren Northern-Blot-Experiment sollte untersucht werden, ob dieser kälteinduzierte Anstieg auch in Knollen zu beobachten war. Dies geschah auch im Hinblick auf das kälteinduzierte Süßwerden von Kartoffelknollen. Wie für »source« Blätter, konnte auch für Knollen

gezeigt werden, dass Temperaturen von 4°C zu einem Anstieg der *pct-bmyI* Transkriptmenge führten (Abb. 9). Kein *pct-bmyI* Transkript konnte hingegen in keimenden Knollen nachgewiesen werden.

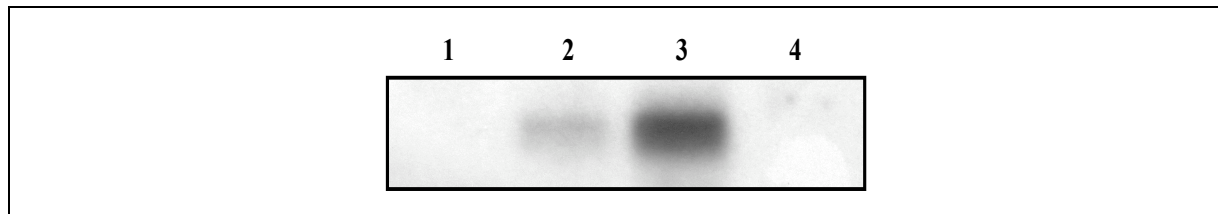


Abb. 9 Northern-Blot Analyse der *pct-bmyI* Transkriptmenge in Kartoffelknollen.

Je Spur wurden 40 µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Zur Hybridisierung wurde »random P³² markierte« *pct-bmyI* cDNA verwendet. Spur 1: 14 Tage bei RT gelagerte Knollen; Spur 2: neun Tage bei 4°C gelagerte Knollen; Spur 3: 14 Tage bei 4°C gelagerte Knollen; Spur 4: keimende Knollen

Die beschriebenen Daten zur Aktivität von PCT-BMYI, die Lokalisation des Proteins in Plastiden, der Abbau von nativen Kartoffelstärkegranula durch das rekombinante Protein, sowie der Anstieg der Transkriptmenge zu Beginn der Dunkelperiode und bei niedrigen Temperaturen deuteten sowohl auf eine mögliche Beteiligung von PCT-BMYI am Abbau der transitorischen Blattstärke, als auch auf eine Beteiligung am kälteinduzierten Süßwerden der Knollen hin.

IV.2.1.7 Funktionelle Analyse der plastidär lokalisierten β-Amylase PCT-BMYI aus Kartoffel in transgenen Pflanzen

Um die physiologische Funktion der plastidär lokalisierten β-Amylase *in vivo* zu untersuchen, sollten transgene Kartoffelpflanzen mit Hilfe der antisense-Technik hergestellt werden, in denen die endogenen PCT-BMYI-Aktivität reduziert war. Es sollten auch solche Pflanzen untersucht werden, die gegenüber dem Wildtyp in ihrer PCT-BMYI-Aktivität erhöht waren. Diese Pflanzen überexprimierten das PCT-BMYI Homolog aus Arabidopsis, CT-BMY (Lao et al., 1999). Für diese Pflanzen liegen erste Ergebnisse vor, welche im Rahmen dieser Arbeit kurz beschrieben werden. Des Weiteren wurden transgene Pflanzen hergestellt, welche in der Aktivität von PCT-BMYI, sowie in einer zweiten β-Amylase Isoform (CF-BETA) aus Kartoffel (Scheidig, 1997), reduziert waren. Auf diese Linien wird in dieser Arbeit nicht tiefer eingegangen.

IV.2.1.7.1 Erzeugung und Selektion von transgenen α -*pct-bmyI* Pflanzen mit reduzierter PCT-BMYI-Aktivität

Die »antisense«-Inhibierung des *pct-bmyI* Gens in Kartoffelpflanzen erfolgte unter der Kontrolle des Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotors (CaMV 35S-Promotor, Franck et al., 1980), der die konstitutive Expression der nachfolgenden Nukleinsäuresequenz vermittelt. Zur Herstellung des »antisense-Konstruktes« wurde ein *Bam*HI/*Xho*I Fragment, welches die gesamte *pct-bmyI* cDNA umfasste, isoliert und anschließend die 5'-Überhänge mit Hilfe der T4-DNA Polymerase aufgefüllt. Dieses Fragment wurde in reverser Orientierung (in Bezug auf den Promotor) in die *Sma*I-Schnittstelle des binären Vektors pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990) kloniert (siehe Abb. 10). Die Orientierung der *pct-bmyI* cDNA konnte durch Restriktionsverdau und PCR-Analyse verifiziert werden. Das erhaltene Konstrukt α -*pct-bmyI* wurde über Agrobakterium vermittelte Transformation stabil in das Genom von Kartoffelpflanzen integriert.

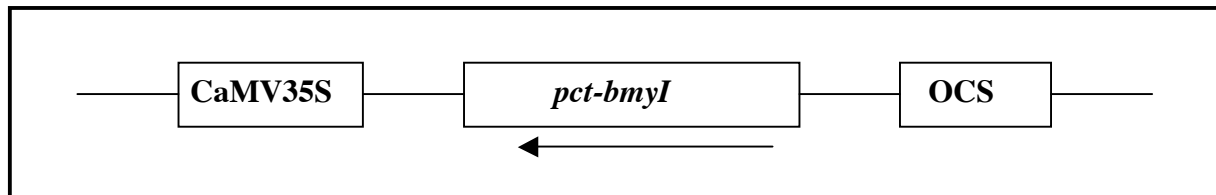


Abb. 10 Beschreibung des 35S *pct-bmyI* antisense Konstrukts α -*pct-bmyI*.

Der Weg der Klonierung ist im Text beschrieben. Der Pfeil gibt die reverse Orientierung der 2.1 kb großen *pct-bmyI* cDNA in Bezug auf den Promotor an. OCS bezeichnet die Terminationssequenz des *Agrobacterium tumefaciens* Octopinsynthasegens (Gielen et al., 1984).

Nach Regeneration der transformierten Kartoffelpflanzen wurden 70 Pflanzen im Gewächshaus herangezogen. Die Pflanzen wurden auf eine Reduktion der *pct-bmyI* spezifischen mRNA mittels eines Northern-Blot-Experimentes untersucht. Da das *pct-bmyI* Transkript in 4°C gehaltenen »source« Blättern deutlich nachzuweisen war (siehe Abb. 7), wurden Blätter jeder Pflanze für 24 h bei dieser Temperatur verwahrt und anschließend RNA isoliert. Wie Abb. 11 zeigt, konnten drei Linien (#8, #10, #11) identifiziert werden, die eine deutliche Reduktion in der Menge an *pct-bmyI* Transkript, im Vergleich zur untransformierten Kontrolle, aufwiesen. Die hier exemplarisch gezeigten Linien #27 und #28 verhielten sich wie die untransformierte Kontrolle. Die Linien #8, #10, #11 und #28 wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

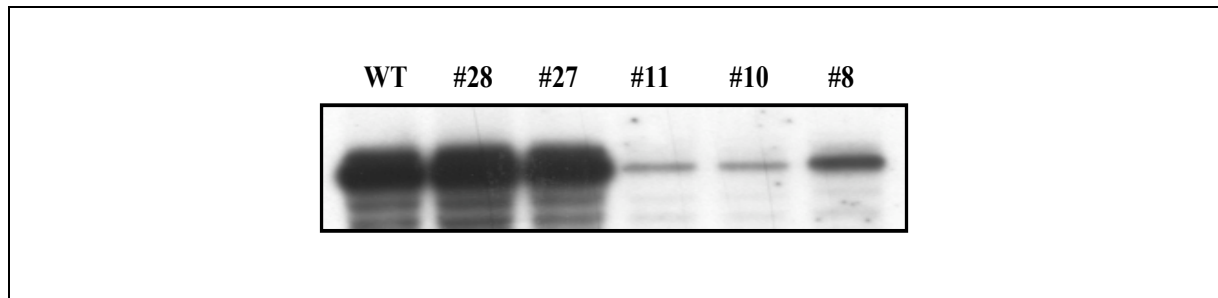


Abb. 11 Northern-Blot Analyse der α -*pct-bmyI* Linien.

Je Spur wurden 20 μ g Gesamt-RNA aus »source« Blättern, welche für 24 h bei 4°C gehalten wurden, aufgetrennt. Zur Hybridisierung wurde die P³² markierte *pct-bmyI* cDNA verwendet.

Nach der Auswahl der α -*pct-bmyI* Linien sollte untersucht werden, ob die »antisense« Inhibierung des *pct-bmyI* Gens zu einer Reduktion der β -Amylase-Aktivität in »source« Blättern führte. Da nicht auszuschließen war, dass eine mögliche Reduktion der β -Amylase-Aktivität einen Einfluss auf andere hydrolytische Aktivitäten ausübte, wurden ebenfalls die α -Amylase-, α -Glucosidase-, Stärkephosphorylase-, D-Enzym- und Pullulanase-Aktivität ermittelt.

Die hydrolytischen Aktivitäten wurden in »source« Blättern bestimmt, welche zwei Stunden nach Beginn der Dunkelperiode geerntet wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass die β -Amylase-Aktivität der Linie #8 um ca. 13 %, die der Linie #10 um ca. 25 % und die der Linie #11 um ca. 20 %, gegenüber der untransformierten Kontrolle reduziert war (Tab. 6). Linie #28 zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied in der β -Amylase-Aktivität zur Kontrolle. Wie in Tab. 8 außerdem zu erkennen, hatte die Reduktion der β -Amylase-Aktivität keinen Einfluss auf die α -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität. Es konnte zwar für die Linien #8 und #11 ein signifikanter Anstieg in der α -Amylase-Aktivitäten festgestellt werden, dies trifft aber auch auf die Linie #28 zu, welche sich weder in der *pct-bmyI* Transkriptmenge, noch in der β -Amylase-Aktivität von der untransformierten Kontrolle unterschied.

Im Gegensatz zu den Resultaten von Viksø-Nielsen et al. (1997) konnte für die hier verwendete Kartoffelvarietät Désirée α -Amylase-Aktivität in Blättern nachgewiesen werden. Diese Aktivität ist ca. um den Faktor 10 niedriger, als die gemessene β -Amylase-Aktivität. Es konnte keine α -Glucosidase-Aktivität detektiert werden, was die Ergebnisse von Viksø-Nielsen et al. (1997) bestätigte. Ebenfalls unbeeinflusst zeigten sich die Stärkephosphorylase- und D-Enzym-Aktivität in den selektierten Linien. Zwar konnte für Linie #10 eine signifikante Erhöhung der Stärkephosphorylase-Aktivität gemessen werden, dies konnte aber nicht für die Linien #8 und #11, welche ebenfalls in ihrer β -Amylase-Aktivität reduziert waren, bestätigt werden. Pullulanase-Aktivität konnte in Blättern mittels nativer PAGE nachgewiesen werden. Für alle untersuchten Linien konnten zwei Aktivitätsbanden detektiert werden, die sich in ihrer Intensität nicht zwischen den transgenen Linien und der untransformierten Kontrolle unterschieden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 6 Bestimmung von Enzymaktivitäten in α -*pct-bmyI* Linien.

A. Messung der β -Amylase-, α -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität in »source« Blättern sechs Wochen alter α -*pct-bmyI* Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die Bestimmung der β -Amylase-Aktivität erfolgte mit PNPG5, der α -Amylase-Aktivität mit PNPG7 und der α -Glucosidase-Aktivität mit *p*-Nitrophenyl-Glucosid.

B. Messung der Stärkephosphorylase- und D-Enzym-Aktivität in »source« Blättern sechs Wochen alter α -*pct-bmyI* Pflanzen aus dem Gewächshaus. Pro Linie wurden fünf Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#8, #10, #11 und #28) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

A.

	β -Amylase [mU min ⁻¹ gFG ⁻¹]	%	α -Amylase [mU min ⁻¹ gFG ⁻¹]	%	α -Glucosidase [mU min ⁻¹ gFG ⁻¹]
WT	487.2 ± 8.6	100	53.1 ± 2.9	100	n.d.
#8	420.0 ± 3.8*	86.7 ± 3.3	92.4 ± 4.2*	177.5 ± 15.1	n.d.
#10	366.4 ± 18.8*	75.5 ± 3.5	101.1 ± 7.8*	194.2 ± 20.3	n.d.
#11	392.4 ± 12.9*	80.2 ± 2.4	69.1 ± 7.2	129.1 ± 9.1	n.d.
#28	512.3 ± 15.6	105.4 ± 4.4	98.4 ± 10.7*	189.4 ± 23.7	n.d.

B.

	Stärke- phosphorylase [nmol min ⁻¹ gFG ⁻¹]	%	D-Enzym [nmol min ⁻¹ gFG ⁻¹]	%
WT	129 ± 13	100	1711 ± 157	100
#8	158 ± 4	122	1820 ± 92	106
#10	165 ± 5*	127	1602 ± 201	93
#11	125 ± 4	96	1500 ± 150	87
#28	107 ± 5	82	1347 ± 285	78

IV.2.1.7.2 Die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität in Kartoffel führte zu einem Hochstärke-Phänotyp und zu einem Anstieg der Trockenmasse in den Blättern

Es sollte untersucht werden, ob die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität in Blättern der selektierten α -*pct-bmyI* Linien #8, #10 und #11 zu einem Hochstärke-Phänotyp führt. »Source« Blätter 15 Wochen alter Pflanzen der Linien #8, #10 und #11, sowie der Linie #28 und der untransformierten Kontrolle, wurden mit Aluminiumfolie verdunkelt und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Ethanol entfärbt. Der anschließende Nachweis der Stärke erfolgte mit Lugol'scher Lösung. In »source« Blättern der untransformierten Kontrolle und der Linie #28 war nach einer Dunkelperiode von 36 h keine Stärke mehr nachzuweisen, wohingegen Blätter der Linien #8, #10 und #11 Stärke enthielten. Auch nach einer Dunkelperiode von 72 h war in den Linien #8, #10, #11 transitorische Stärke nachzuweisen (Abb. 12). Dieses Ergebnis korrelierte mit dem Trocken-

substanzgehalt der Blätter. Für die am stärksten inhibierten Linien #10 und #11 ließ sich ein signifikant erhöhtes Trockengewicht gegenüber der untransformierten Kontrolle ermitteln (Abb. 13). Die transgenen Linien zeigten jedoch in Bezug auf Wuchs und Entwicklung der Pflanzen keinen Unterschied gegenüber der untransformierten Kontrolle. Diese Resultate zeigten, dass die plastidär lokalisierte β -Amylase ein wichtiger Bestandteil des Stärkeabbaus in Kartoffelblättern ist.



Abb. 12 Die Inhibierung des *pct-bmyI* Gens führte zu einem Hochstärke-Phänotyp.

»Source« Blätter 15 Wochen alter α -*pct-bmyI* Pflanzen der Linien #8, #10, #11 und #28, sowie der untransformierten Kontrolle, wurden am Ende der Lichtperiode für 72 h verdunkelt. Anschließend wurden die Blätter mit Ethanol entfärbt, der Nachweis der Stärke erfolgte mit Lugol'scher Lösung.

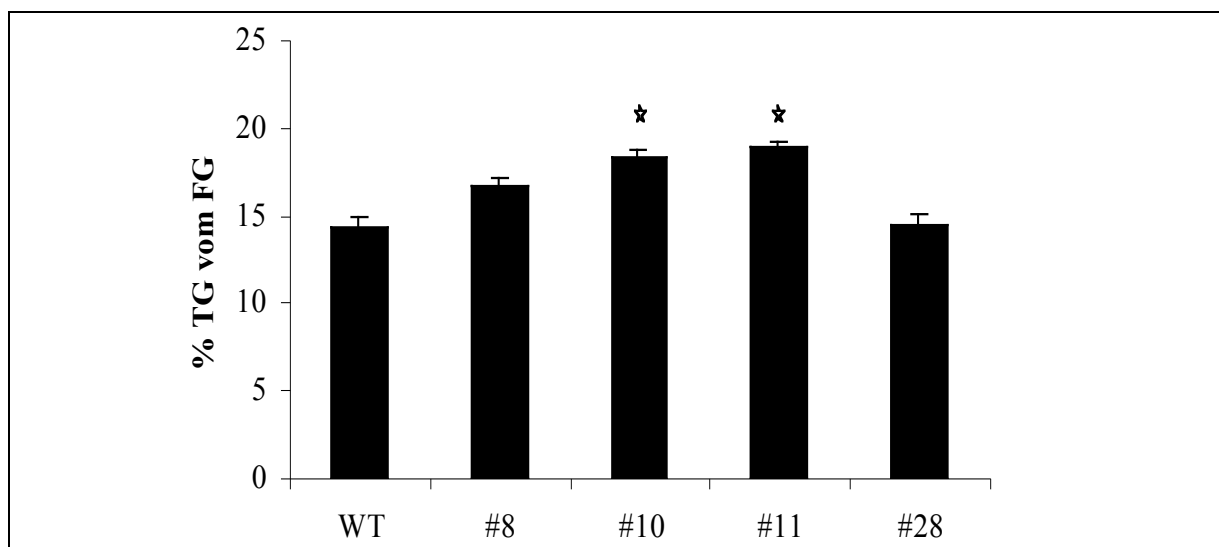


Abb. 13 Bestimmung der Trockenmasse in »source« Blättern zwölf Wochen alter α -*pct-bmyI* Linien.

Die Angaben beziehen sich auf den prozentualen Anteil des Trockengewichts vom Frischgewicht. Pro Linie wurden vier Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#8, #10, #11 und #28) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

Um nähere Informationen zu dem beobachteten Hochstärke-Phänotyp der Linien #8, #10 und #11 zu erlangen, besonders im Hinblick darauf, ob eine Reduktion der Stärkeabbaurate im Vergleich zur untransformierten Kontrolle zu beobachten war, wurde der Stärkegehalt in Blättern enzymatisch bestimmt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob der Stärkegehalt in »source« Blättern mit dem Alter der Pflanzen zunahm, der beobachtete Phänotyp der Linien #8, #10 und #11 somit einen kumulativen Effekt darstellte. Diesen kumulativen Effekt konnten Zeeman et al. (1998b) für die *sex4* Mutante in *Arabidopsis* zeigen. Der Stärkegehalt in »source« Blättern wurde deshalb am Ende der Lichtperiode und am Ende der Dunkelperiode in 9 und 15 Wochen alten Pflanzen bestimmt.

Der Stärkegehalt in »source« Blättern neun Wochen alter Pflanzen der Linien #10 und #11 war gegenüber der untransformierten Kontrolle und der Linie #28 signifikant erhöht. Dies galt sowohl für die Messung am Ende der Lichtperiode, als auch für die Messung am Ende der Dunkelperiode. Für die Linie #8 war ein signifikanter Unterschied in der Stärkemenge nur am Ende der Dunkelperiode nachweisbar (Abb. 14A). Am Ende der Dunkelperiode lag der Stärkegehalt in Blättern der Linie #8 um ca. 68 %, in Blättern der Linie #10 um ca. 180 % und in Blättern der Linie #11 um ca. 191% über der Stärkemenge in Blättern von untransformierten Kontrollpflanzen. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für 15 Wochen alte Pflanzen. Der Stärkegehalt in »source« Blättern war in allen drei Linien am Ende der Licht- und der Dunkelperiode gegenüber der untransformierten Kontrolle und der Linie #28 signifikant erhöht (Abb. 14 B). Am Ende der Dunkelperiode lag der Stärkegehalt in »source« Blättern der Linie #8 um ca. 177 %, der Linie #10 um ca. 241 % und der Linie #11 um ca. 243 % über der Stärkemenge der untransformierten Kontrolle. Diese Resultate konnten auch mit Pflanzen bestätigt werden, welche im Foliengewächshaus angezogen wurden. Hier lag der Stärkegehalt in »source« Blättern 15 Wochen alter Pflanzen am Ende der Dunkelperiode für Linie #8 um ca. 578 %, für Linie #10 um ca. 533 % und für Linie #11 um ca. 756 % über der Stärkemenge der untransformierten Kontrollpflanzen (Tab. 7).

Verglich man den Stärkegehalt in »source« Blättern am Ende der Lichtperiode zwischen 9 und 15 Wochen alten Pflanzen, so zeigte sich, dass die untransformierte Kontrolle 2 mal, die Linie #8 4.4 mal, die Linie #10 3.6 mal und die Linie #11 3.7 mal mehr Stärke in ihren »source« Blättern enthielt. Dieses Ergebnis zeigte, dass zwar auch in der untransformierten Kontrolle eine Akkumulation der Stärkemenge zwischen den beiden Zeitpunkten zu beobachten war, dass diese Akkumulation aber um mindestens den Faktor 1.6 unter der Akkumulation der Linien #8, #10 und #11 lag (Abb. 14 A und B).

Ein signifikanter Unterschied in der Stärkeabbaurate zwischen der untransformierten Kontrolle und den Linien #8, #10 und #11 ließ sich in 9 Wochen alten Pflanzen nachweisen. Wie in Abb. 14 E zu erkennen, bauten Pflanzen dieser Linien während der Dunkelperiode signifikant weniger

Stärke ab, als die untransformierten Kontrollpflanzen. Dieser Unterschied ließ sich jedoch nicht für Linie #28 nachweisen. Die Blätter von 15 Wochen alten Pflanzen zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied in der Menge der abgebauten Stärke während der Dunkelperiode (Abb. 14 F).

Einen deutlichen Unterschied zeigten die Linien #8, #10 und #11 gegenüber der untransformierten Kontrolle und der Linie #28, wenn man die Menge an Stärke, welche über die Dunkelperiode in »source« Blättern abgebaut wurde, mit der Gesamtmenge der Stärke in diesen Blättern verglich. Während »source« Blätter 9 Wochen alter Pflanzen der untransformierten Kontrolle und der Linie #28 zwischen 41 % und 58 % der transitorischen Stärke mobilisierten, bauten Pflanzen der Linie #8 ca. 13 %, der Linie #10 ca. 10 % und der Linie #11 ca. 15 % der transitorischen Stärke ab (Abb. 14 C). Diese Beobachtung konnte auch für Blätter 15 Wochen alter Pflanzen gezeigt werden (Abb. 14 D).

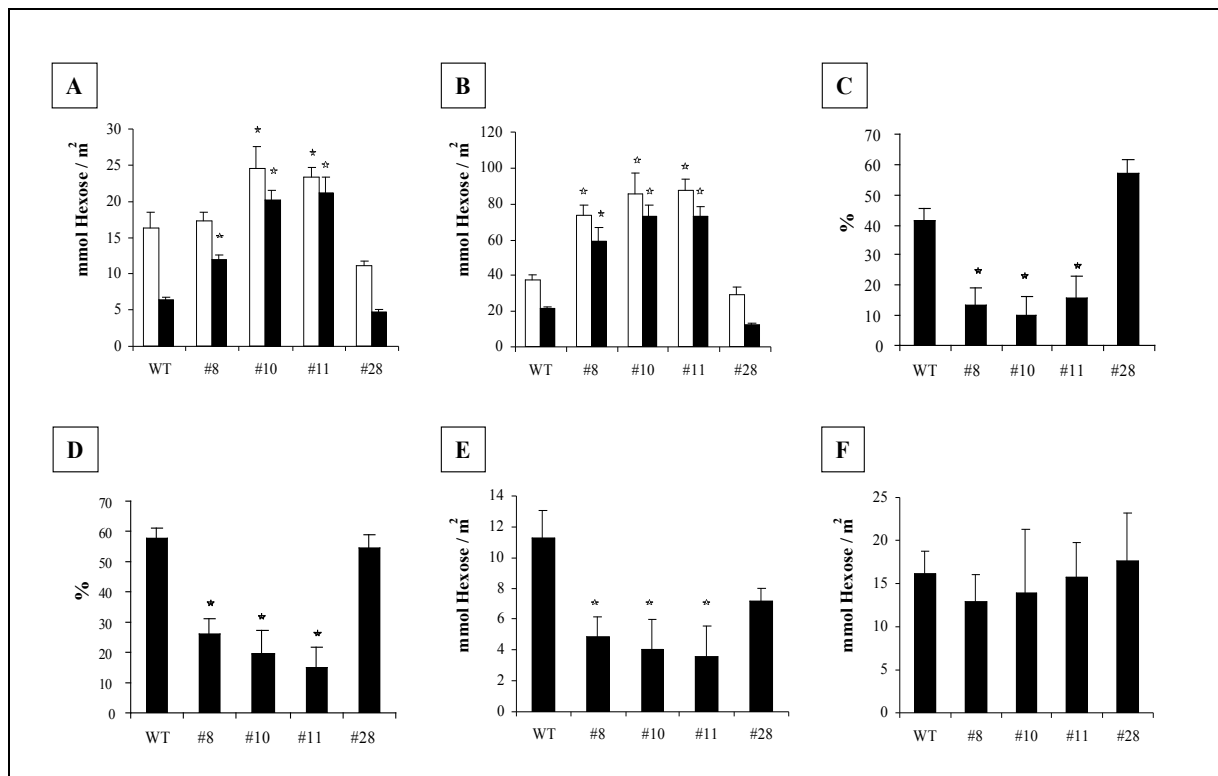


Abb. 14 Bestimmung des Stärkegehaltes in Blättern der α -*pct-bmyI* Linien.

Messung des Stärkegehaltes in »source« Blättern von neun (A, C und E) und fünfzehn (B, D und F) Wochen alten Pflanzen. A und B zeigen den Stärkegehalt am Ende der Lichtperiode (offene Balken) und am Ende der Dunkelperiode (schwarze Balken). C und D zeigen die Stärkemenge, welche über die Dunkelperiode von der Gesamtmenge an Stärke abgebaut wurde (in Prozent), während E und F die Menge an Stärke darstellen, welche über den gleichen Zeitraum abgebaut wurde. Pro Linie wurden mindestens 10 Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#8, #10, #11 und #28) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

Tab. 7 Bestimmung des Stärkegehaltes in Blättern der α -*pct-bmyI* Linien.

Der Stärkegehalt in »source« Blättern 15 Wochen alter Kartoffelpflanzen am Ende der Lichtperiode (**A**) und am Ende der Dunkelperiode (**B**) ist aufgelistet. Stärkemenge in Prozent gegenüber der Kontrolle (die Stärkemenge in »source« Blätter der Kontrolle ist gleich 100 %). Die Pflanzen wurden im Foliengewächshaus kultiviert. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#8, #10, #11 und #28) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

	A. Stärke [mmol Hexose/m ²]	Stärke in %	B. Stärke [mmol Hexose/m ²]	Stärke in %
Kontrolle	11.6 ± 0.5	100	4.5 ± 0.6	100
#8	31.7 ± 4.9*	277 ± 52*	25.0 ± 2.5*	678 ± 124*
#10	35.7 ± 3.7*	289 ± 25*	26.9 ± 1.4*	633 ± 66*
#11	39.0 ± 1.6*	321 ± 19*	34.1 ± 2.1*	856 ± 124*
#28	12.7 ± 1.6	122 ± 20	6.1 ± 0.4	123 ± 17

Wie gezeigt, führte die »antisense« Inhibierung des *pct-bmyI* Gens zu einem Hochstärke-Phänotyp der Blätter. Des weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Akkumulation der Stärke auf den Gehalt der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose in »source« Blättern auswirkte. Diese Frage schien besonders interessant, da der Hochstärke-Phänotyp der R1 »antisense« Linien zu keinem Unterschied in der Menge der genannten Zucker zwischen den antisense Linien und der untransformierten Kontrolle führte (Lorberth et al., 1996).

Die Probennahme zur Bestimmung des Gehaltes an Glucose, Fructose und Saccharose erfolgte am Ende der Licht- bzw. Dunkelperiode an neun Wochen alten Pflanzen in »source« Blättern. Wie in Abb. 15 zu erkennen ist, konnte kein Unterschied in der Menge der löslichen Kohlenhydrate zwischen den Linien #8, #10, #11, #28 und der untransformierten Kontrolle festgestellt werden. Dies traf sowohl auf die Werte am Ende der Lichtperiode, als auch auf die Werte am Ende der Dunkelperiode zu. Auch für 15 Wochen alte Pflanzen konnte kein signifikanter Unterschied in der Menge der gemessenen löslichen Kohlenhydrate festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Abb. 15 (folgende Seite) Messung des Gehaltes an Glucose, Fructose und Saccharose in »source« Blättern neun Wochen alter α -*pct-bmyI* Linien.

A zeigt den Gehalt an Glucose, **B** den Gehalt an Fructose und **C** den Gehalt an Saccharose am Ende der Lichtperiode (offene Balken) und am Ende der Dunkelperiode (schwarze Balken). Pro Linie wurden mindestens 10 Bestimmungen durchgeführt.

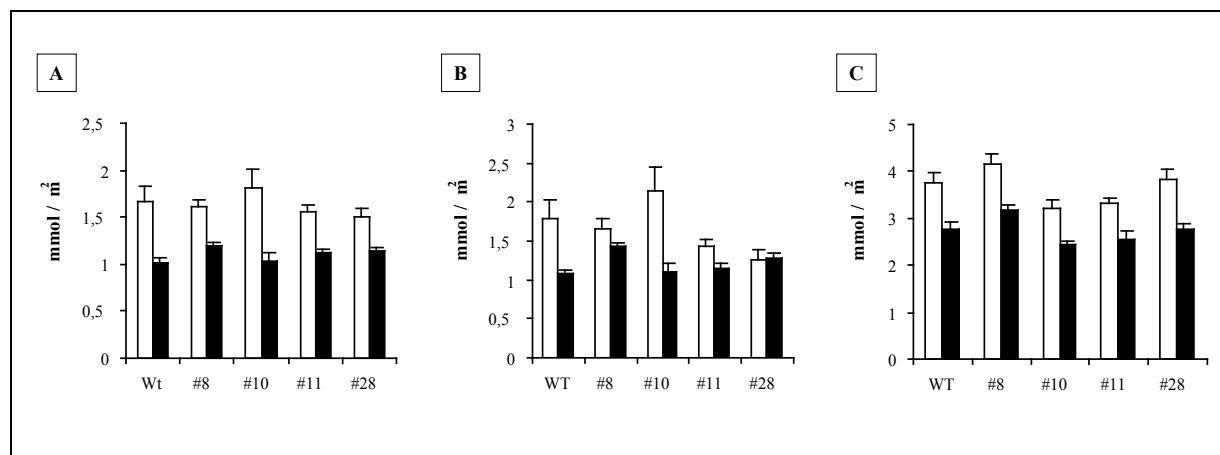


Abb. 15 (Beschreibung vorherige Seite)

IV.2.1.7.3 Die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität hat keinen Einfluss auf den Stärkestoffwechsel in Kartoffelknollen

Da für »source« Blätter der selektierten α -*pct-bmyI* Linien #8, #10 und #11 eine Reduktion der β -Amylase-Aktivität festgestellt wurde, sollte nun untersucht werden, ob diese Reduktion auch in Knollen nachweisbar war. Zur Bestimmung der β -Amylase-Aktivität wurden Knollen verwendet, welche für zwei Wochen bei RT oder 4°C gelagert wurden. Die Untersuchung in kaltgelagerten Knollen geschah aus zwei Gründen. Erstens war in vorangegangenen Experimenten ein Anstieg der *pct-bmyI* Transkriptmenge in kaltgelagerten Knollen zu beobachten (siehe Abb. 9) und zweitens bestand die Möglichkeit, dass das PCT-BMYI Protein am kälteinduzierten Abbau der Knollenstärke beteiligt sein könnte. Es wurden dieselben Substrate wie für die Bestimmung der hydrolytischen Aktivitäten in »source« Blättern verwendet (siehe Tab. 8). Wie in Abb. 16 zu erkennen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den gemessenen hydrolytischen Aktivitäten zwischen den α -*pct-bmyI* Linien und der untransformierten Kontrolle. Dieses traf auf Probensätze, genommen bei 4°C und RT, zu. Wie bei Nielsen et al. (1997) beschrieben, ließ sich ein Anstieg der β -Amylase-Aktivität in kaltgelagerten Knollen nachweisen, diese β -Amylase-Aktivität war aber auf eine zweite Isoform (CF-BMY) zurückzuführen (Scheidig, 1997). Zur exakten Bestimmung der kälteinduzierten β -Amylase-Aktivität in Knollen wurde die α -Amylase-Aktivität von der β -Amylase-Aktivität subtrahiert (Nielsen et al. 1997).

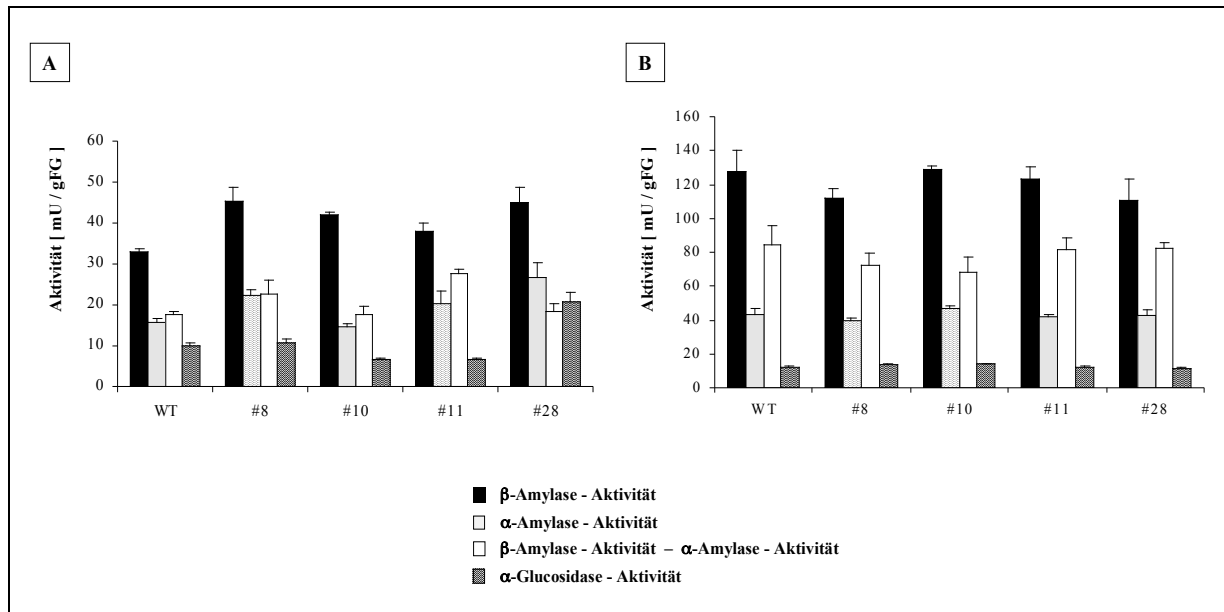


Abb. 16 Messungen der β -Amylase-, α -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität in Knollen der α -*pct-bmyI* Linien.

Knollen von zwei Wochen bei RT (A) oder 4°C (B) gelagerten α -*pct-bmyI* Linien. Die Werte für beta – alpha stellen die durch Kälte induzierbare β -Amylase-Aktivität dar. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens fünf unabhängigen Enzymextrakten.

Mit diesen Ergebnissen ließ sich bereits ausschließen, dass in diesen transgenen Pflanzen eine starke Veränderung des Stärkestoffwechsels in Knollen zu erwarten war. Der Einfluss der Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität im Blatt auf den Knollenertrag wurde in 15 Wochen alten Pflanzen untersucht. Analysiert wurden die Parameter Frisch- und Trockengewicht von Knollen, Knollenzahl und der Stärkegehalt der Knollen (Abb. 17). Zur Analyse wurden jeweils vier bis sechs Pflanzen pro Linie herangezogen. Wie aus Abb. 17 zu entnehmen, hatte die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität im Blatt, und der damit verbundene Hochstärke-Phänotyp, keinen signifikanten Einfluss auf die hier erhobenen Ernteparameter. Genauso wurden Stärke-, Glucose-, Fructose- und Saccharosegehalte in frisch geernteten und für sechs Wochen bei 4 Grad Celsius gelagerten Kartoffelknollen gemessen. Auch hier wurden keine signifikanten Auswirkungen durch die Reduktion von PCT-BMYI festgestellt (Abb. 18). Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass PCT-BMYI keine bedeutende Rolle beim kälteinduzierten Süßwerden der Kartoffelknollen spielt.

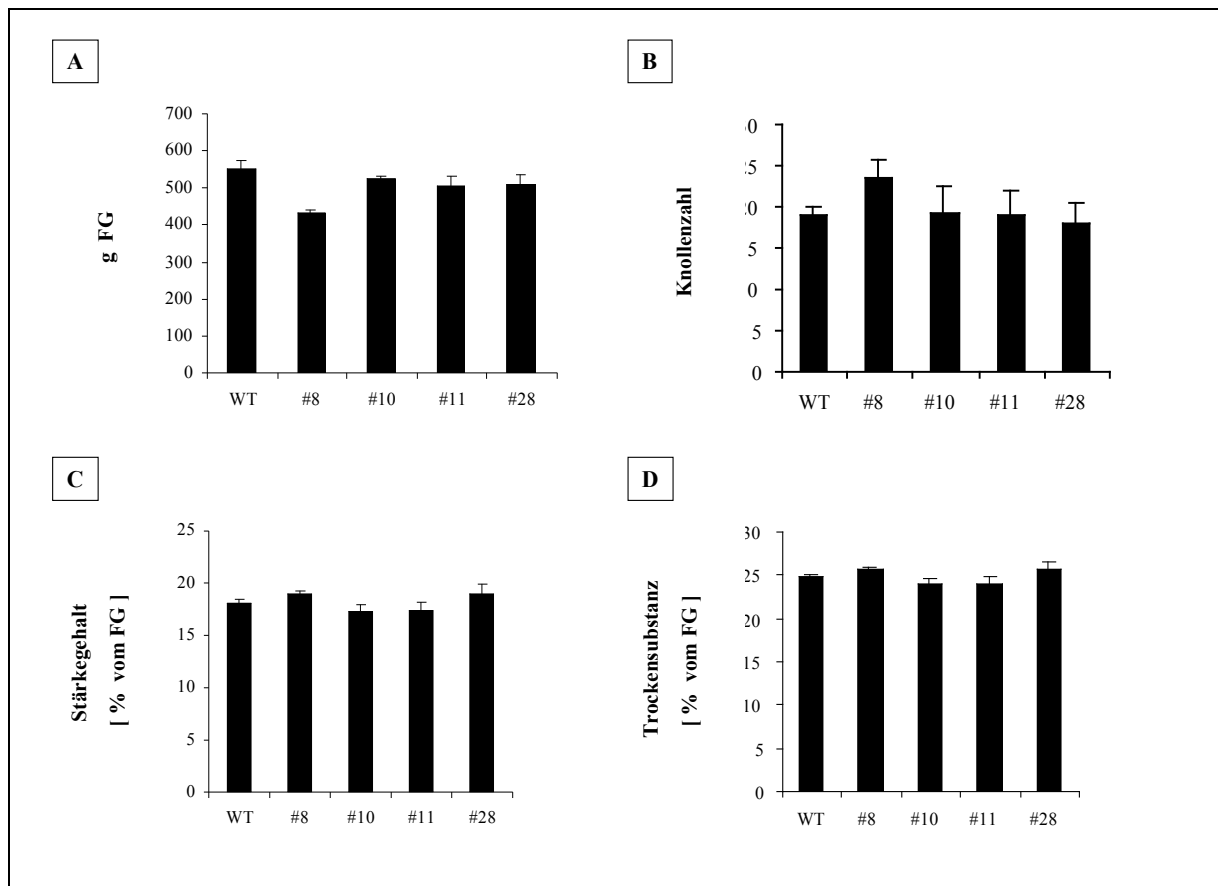


Abb. 17 Analyse von Ernteparametern der α -pct-bmyI Linien.

Analyse des geernteten Knollenfrischgewichtes pro Pflanze (A), der Knollenzahl pro Pflanze (B), des Stärkegehaltes (C) und der Trockensubstanz (D) 15 Wochen alter α -pct-bmyI Linien und der untransformierten Kontrolle. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von Messungen mit fünf Pflanzen pro Linie.

Abb. 18 (folgende Seite) Messung des Gehaltes an Stärke, Glucose, Fructose und Saccharose in Knollen der α -pct-bmyI Linien.

Messung des Gehaltes an Stärke, Glucose, Fructose und Saccharose in Knollen der untransformierten Kontrolle und der α -pct-bmyI Linien. A zeigt den Gehalt an Stärke, B den Gehalt an Glucose, C den Gehalt an Fructose und D den Gehalt an Saccharose. Die schwarzen Balken zeigen die Werte in frischen Knollen, die offenen Balken die Werte nach sechs Wochen Lagerung bei 4°C. Pro Linie wurden mindestens sechs Bestimmungen durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

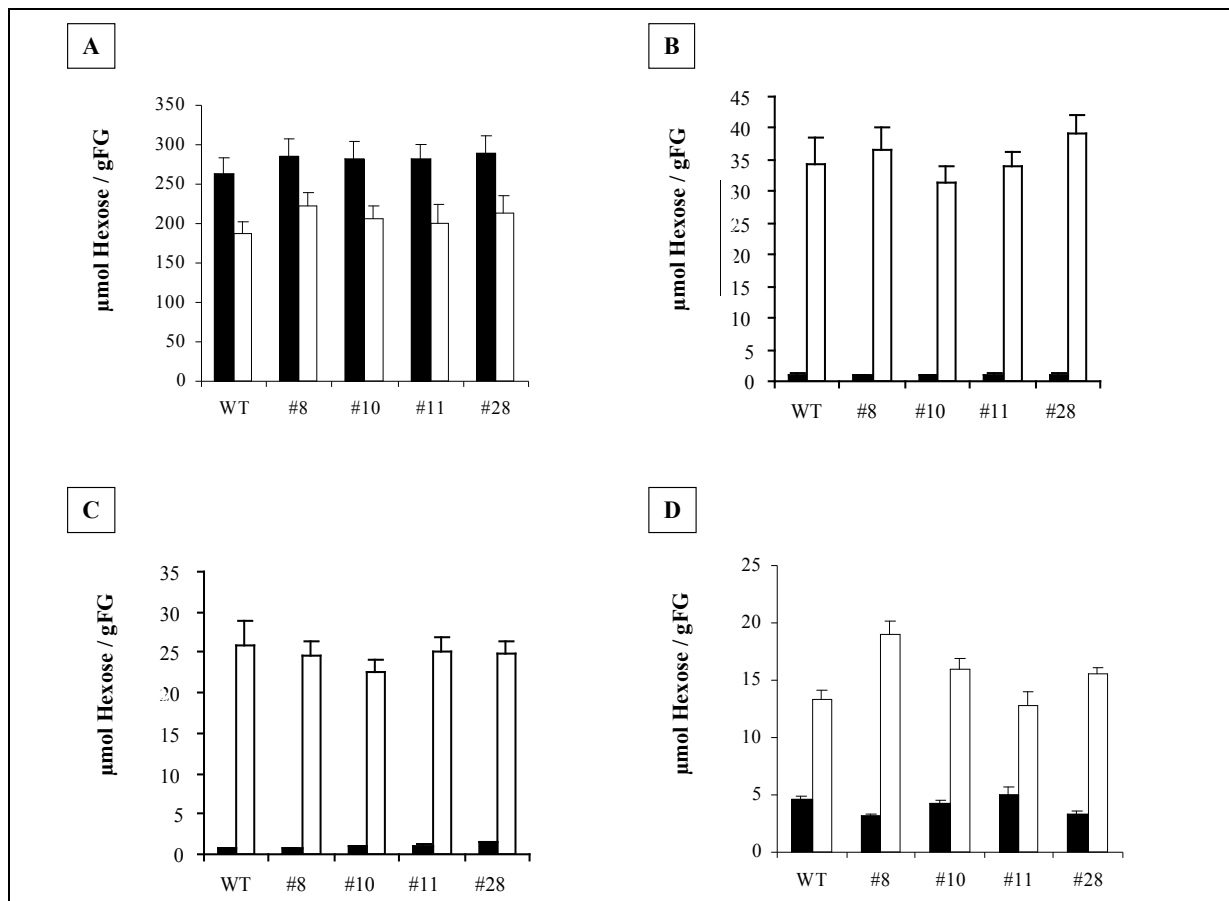
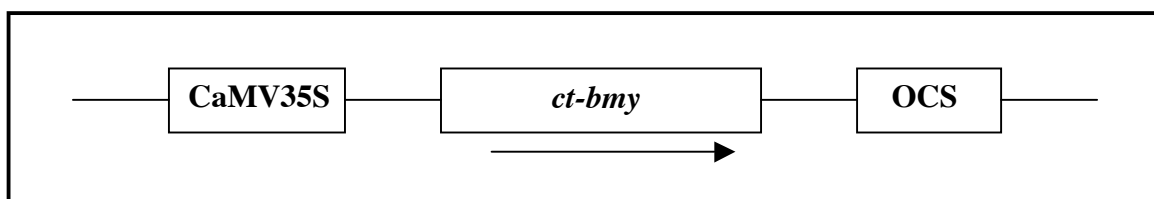


Abb. 18 (Beschreibung vorherige Seite)

IV.2.1.7.4 Erzeugung und Analyse von Kartoffelpflanzen mit erhöhter CT-BMY-Aktivität

Die *ct-bmy* cDNA wurde mittels PCR aus einer Arabidopsis-Keimling cDNA-Bibliothek amplifiziert (von Ursula Uwer freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Die erhaltene cDNA wurde anschließend in *E. coli* KV832 exprimiert, um zu gewährleisten, dass es sich bei der amplifizierten cDNA um das funktionelle Gen handelte (nicht gezeigt). Anschließend wurde die funktionelle cDNA in sense Orientierung, in Bezug auf den Promotor, über *Asp718/BamHI* in den binären Vektor pBinAR kloniert (siehe Abb. 19). Das erhaltene Konstrukt *sense-ct-bmy* wurde über Agrobakterium vermittelte Transformation stabil in das Genom von Kartoffelpflanzen integriert.

Abb.19 Beschreibung des 35S *sense-ct-bmy* Konstruktes.

Die Klonierungsstrategie ist im Text beschrieben. Der Pfeil gibt die Orientierung der 2.1 kb großen *ct-bmy* cDNA in Bezug auf den Promotor an. OCS bezeichnet die Terminationssequenz des *Agrobacterium tumefaciens* Octopinsynthasegens (Gielen et al., 1984).

Wie gezeigt, führte die antisense Inhibierung des *pct-bmyI* Gens in Kartoffeln zu einem Hochstärke-Phänotyp der »source« Blätter. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die konstitutive Expression des Arabidopsis-Homologs in Kartoffeln zu einer Reduktion des Stärkegehaltes in »source« Blättern im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen führte. Von 70 Primärtransformanten konnten mittels Northern-Blot Experimenten drei Linien selektiert werden, welche das *pct-bmyI* Homolog aus Arabidopsis exprimierten (Daten nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob die konstitutive Expression des *ct-bmy* Gens auch zu einer Reduktion des Stärkegehaltes in Blättern führte, wurden am Ende der Lichtperiode Blätter geerntet, mit Lugol'scher Lösung angefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt. »Source« Blätter der Linien #16, #20 und #25 entfärbten sich deutlich schneller als Blätter der untransformierten Kontrollpflanzen (nicht gezeigt). Die enzymatische Bestimmung des Stärkegehaltes bestätigte diese Beobachtung. Wie in Abb. 20 zu erkennen, enthielten die selektierten Linien bis zu 40% weniger Stärke in ihren »source« Blättern, als entsprechende Blätter der untransformierten Kontrollpflanzen. Es bleibt anzumerken, dass es sich hierbei um erste Ergebnisse handelte, die einer weiteren Untersuchung bedürfen. Diese ersten Resultate deuteten jedoch darauf hin, dass sich das *ct-bmy* Gen in Kartoffelpflanzen funktional exprimieren ließ und dass diese Expression zu einer Reduktion des Stärkegehaltes in Blättern führte.

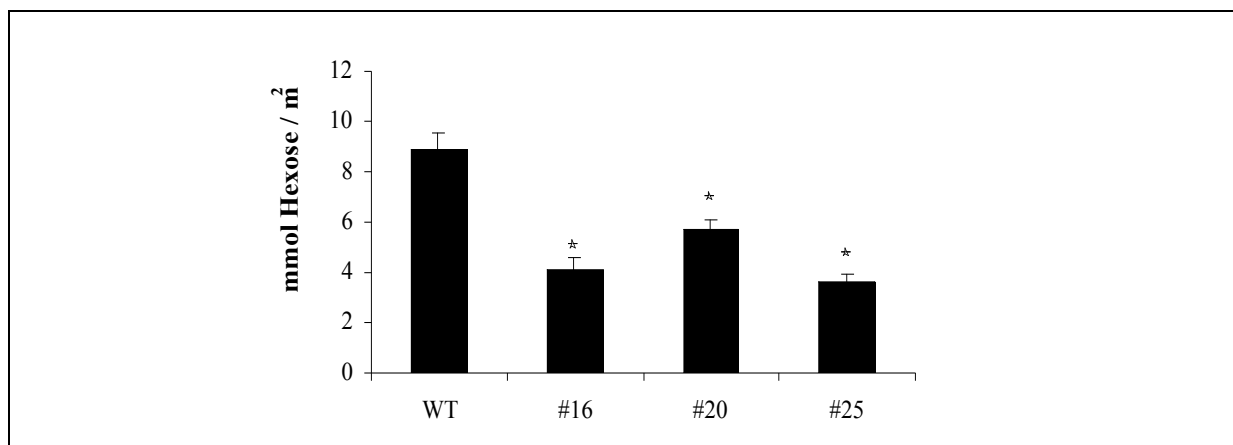


Abb. 20 Messung des Stärkegehaltes in Blättern der 35S sense-*ct-bmy* Linien.

Messung des Stärkegehaltes am Ende der Lichtperiode in »source« Blättern 12 Wochen alter Pflanzen. Pro Linie wurden mindestens 10 Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#16, #20 und #25) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

IV.2.2 Charakterisierung von *dsd10*

IV.2.2.1 Sequenzanalyse der *dsd10* cDNA aus Kartoffel

Die cDNA-Insertion des Plasmids *dsd10* wurde vollständig sequenziert (AGOWA, Berlin). Die erhaltene cDNA-Sequenz, sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz, ist in Abb. 21 in blau dargestellt. Die *dsd10* cDNA hat eine Länge von 1230 bp und enthält ein offenes Leseraster von 747 bp. Da das offene Leseraster der cDNA ohne ein Stopcodon vor dem ersten N-terminalen Methionin (in Abb. 21 rot unterstrichen) in die MCS des Vektors pSK übergang, war es fraglich, ob die isolierte cDNA die gesamte kodierende Sequenz des Gens repräsentierte. Zur Isolation der Vollängen-cDNA wurde die vorliegende *dsd10* Sequenz als Sonde zur Durchmusterung der in Abschnitt IV.1.1 beschriebenen Blatt cDNA-Bibliothek verwendet. Bei der Durchmusterung von ca. $5 \cdot 10^5$ Phagen war es möglich, vier Klone zu isolieren, welche mit der *dsd10* Sequenz hybridisierten. Nach *in vivo* Excision und folgender Ansequenzierung der Insertionen zeigte sich, dass zwei dieser Klone im 3' Bereich homolog zur cDNA des Klons *dsd10* waren, sich im 5' Sequenzbereich aber von der vorliegenden Sequenz unterschieden. Es konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den isolierten cDNAs um die vollständige kodierende Sequenz des Gens handelte, da sich unmittelbar vor dem möglichen Startcodon (schwarz hervorgehoben in Abb. 21 dargestellt) zwei Stopcodons (kursiv in Abb. 21 dargestellt) im 5' untranslatierten Bereich befanden. Zur Unterscheidung der Vollängen-cDNA von der des Klons *dsd10* wird diese im Folgenden als *sgel* bezeichnet (vorläufige Arbeitsbezeichnung für starch granule erosion I). Die *sgel* Insertion in pSK hat eine Länge von 2912 bp, davon entfallen auf das offene Leseraster 2370 bp. Die davon abgeleitete Aminosäuresequenz ergibt ein Protein mit einer molekularen Masse von 86.6 kDa. Bei einem Sequenzvergleich zwischen *sgel* und *dsd10* fiel auf, dass sich beide Sequenzen in einem Bereich von 7 bp unterschieden (grün dargestellt). Dieser Unterschied fiel nicht in den Bereich der MCS des Vektors pSK und könnte möglicherweise auf verschiedenen gespleißte Formen des *sgel* Gens hinweisen. Aufschluss hierüber wird der Vergleich beider cDNAs mit der genomischen Sequenz liefern. Im 3' untranslatierten Bereich befindet sich (blau und hervorgehoben in Abb. 21) ein für Pflanzengene typisches Polyadenylierungssignal (Joshi, 1987; O'Neil et al., 1990).

	C	GGC	ACG	AGA	TTT	TTA	GGG	TTT	TTG	GAT	GAG	GAT	TTA	AGA	GGA	AAG	ATT	TGA	TTT	TTT	TGA	GGA
1	TTT	TGG	ATG	GCG	TCA	GCT	CAG	GTA	CTA	AAA	AAG	CAA	GAG	CAT	TTG	CAA	GCT	GGG	AAA	AAG	AAG	CTA
			M	A	S	A	Q	V	L	K	K	Q	E	H	L	Q	A	G	K	K	K	L
61	GAG	GAA	TTT	CGT	AAG	AAG	AGA	GCA	GCA	GAG	AAG	GCT	AAA	AAG	ACA	ACT	TCA	AAT	AGT	CAA	CAG	CTT
	E	E	F	R	K	K	R	A	A	E	K	A	K	K	T	T	S	N	S	Q	Q	L
127	GCC	TCT	GAT	GGA	GGC	GTT	GAT	AAT	CAA	CAT	TCA	GGA	AAT	GAA	CAC	ACT	AGA	ACT	AAG	GAC	TCC	AGT
	A	S	D	G	G	V	D	N	Q	H	S	G	N	E	H	T	R	T	K	D	S	S

193 GGA GCT GCT ACA TCT GAT GCT GTT GGC AGA TCT GTT CTA AAG CCA TCT GAA GTA CAT GCT AAG CAT
G A A T S D A V G R S V L K P S E V H A K H

259 GAT TTT GCG AAG CCT GAT CTT ACC CAG AAG TCT GAT TTA ATT TTT CCT AGT GAT GCT AGT GCT GGT
D F A K P D L T Q K S D L I F P S D A S A G

325 GCT ACG CCT AGT TTG CAC AAA TAC TAT GAT GAT GCT GTT GTT AAA GCC AAC AGT TAT GAT TTT GGC
A T P S L H K Y Y D D A V V K A N S Y D F G

391 TCT TCC ATC TCA GCA TTG TCT CGT TTA GAA AAT AAA GGG TCT AGA AGT GAT GAG AAT CTT AAG GTT
S S I S A L S R L E N K G S R S D E N L K V

457 TCT CAA ACA GTA AGT GAT ACT TAT GAC AAC ACT GGG AAG AGG GAG AGT GAT GGG GCC TTA GAA AGT
S Q T V S D T Y D N T G K R E S D G A L E S

523 GTT CCA TTT GGG TTT GCG ACT AAC CAC TCT ACA GCC ACT TTT CCT CCA TTC CTC AAT AAT GAC AGA
V P F G F A T N H S T A T F P P F L N N D R

589 ACT TCC AGT CAT TTC ACT TAT GAT GAT ATG GGT AAA CGC ATA TCG GAG GAG AGC CAT GCA AAG GAT
T S S H F T Y D D M G K R I S E E S H A K D

655 CTT TCT GTA ACT AAT GAT GGT ACT TCT CAT GCT TTT CCG GCT AAT GTA TCA CCT TCA AAT CCA TTC
L S V T N D G T S H A F P A N V S P S N P F

721 GGG TCT CGT GAC GAC AAA CCA CGT TAT ACA GAT CGC TGG GCT AGT GAC ATG ACT TCC GCT TCA TAT
G S R D D K P R Y T D R W A S D M T S A S Y

787 GGT GAT TAT GTT CCC GGT GCT ACC ACG GAC CCA CAA TTT TAT CCT GAA GTT GGG AGA AAT GTT GCT
G D Y V P G A T T D P Q F Y P E V G R N V A

853 GGT GTG GGA TCT AAT AAT TTT GTA GTG CCT GAT AAA GGA TAC ATC CAG TTA AAC AGC TCT GGT CTT
G V G S N N F V V P D K G Y I Q L N S S G L

919 CAC TCA ACT AAA ACT TCT TCT TGG ACA TCG GAC TCC AAG TAT GAT GGT TTT AGT TTT GAT GCT AGA
H S T K T S S W T S D S K Y D G F S F D A R

985 AGT TCT TCT AGT TAC TCA CAG ATG TCT ACA CTC ACA GCT GGG GCG ACT GGG AGG AGA ACT CCA TCT
S S S S Y S Q M S T L T A G A T G R R T P S

1051 TTC CTT GAT TCC ATC AAC ATT TCA AAA GTC TCT GCT GTA TCC CCT CCC TCA ATA GGA TCA GTT ACT
F L D S I N I S K V S A V S P P S I G S V T

1117 ACA GAC ACA TAT GAC TCA ATG GCT TAC CCT AGG GAC ACT CTG GGT TTA TCA AAT TCT GAG AAC TTG
T D T Y D S M A Y P R D T L G L S N S E N L

1183 ACA AAT TCT TCA AAA TTT TCT GGT AAT GGG TCA GAT CTG TAC AAG CAT GCT GTT GAG AAA GAT ATG
T N S S K F S G N G S D L Y K H A V E K D M

1249 GGC AAC TTG GAC AAC AGA CAT CCA TTT TAT TCA CAG AAG CAA AAT GAA GAT TTT GCT GCA TTA GAA
G N L D N R H P F Y S Q K Q N E D F A A L E

1315 CAG CAT ATT GAA GAT TTA ACA CAA GAG AAG TTC TCT CTA CAA CGT GCT CTT GAG GCT TCG CGA ACT
Q H I E D L T Q E K F S L Q R A L E A S R T

1381 CTA GCA GAG TCT CTA GCT GCT GAA AAT TCA ACT CTG ACA GAT AGT TAT AAT CAA CAG GGA AGT TTT
L A E S L A A E N S T L T D S Y N Q Q G S F

1447 GTT GGC CAA CTA AAA GCT GAG ATG GAG AGG TTG CAA GAG GAG ATT AAA GCC CAT CTG GGT GAG CTT
V G Q L K A E M E R L Q E E I K A H L G E L

1513 GAA GCT GTG AAA ATG GAA TAT GCA AAT GTA CAA TTG GAA TGT AAT GCT GCT GAT GAG CGT GCC AAG
E A V K M E Y A N V Q L E C N A A D E R A K

1579 TTA TTG GCT TCT GAA GTG ATT GGC TTG GAA GAG AAG GCA CTT CGT CTA AGA TCT AAT GAG CTT AAA
L L A S E V I G L E E K A L R L R S N E L K

1645 CTG GAG AAA GAA TTG GAG AAG TCA CAA GCT GAA ATG TCT TCT TAC AAG AAG AAA ATT GCT AGC CTT
L E K E L E K S Q A E M S S Y K K K I A S L

1711 GAA AAA GAT CGT CAA GAT CTG CAA TCA ACA ATC GAT GCT TTA AAG GAA GAA AAG AAG CTC TTG CAA
E K D R Q D L Q S T I D A L K E E K K L L Q

1777 TCC AAA TTC CTA AAA GCT TCT GCT AAT GGA AAG TCA GTT GAT CCT AGC AGG AAT ATG CCT ACA AAA
S K F L K A S A N G K S V D P S R N M P T K

1843 ATA GAT GTA TCA ACT TCT ACA GAG GAT CTT CGT GAA GAT AAT ATC GCA AGT GGT ACC ATA AAT GAC
I D V S T S T E D L R E D N I A S G T I N D

1909	ACT AAT ATG GTT GGT ATT GAT GGC CCC ACC ACC TCT TCC CTA CCC GAT TTT GGG CAG TTT AGT CTC
	T N M V G I D G P T T S S L P D F G Q F S L
1975	GGA AGT TTG TCA CCG GCC ATT CCT CCA GAT CAG ATT AGG ATG ATC CAA AAC ATT AAT ACA TTA ATT
	G S L S P A I P P D Q I R M I Q N I N T L I
2041	TCT GAG TTA GCC TTG GAG AAA GAC GAA TTA ACA AAA GCC CTG TCA GTT GAA TCA TCT CAG CGC TCT
	S E L A L E K D E L T K A L S V E S S Q R S
2107	ACA TTG AAG GAG TTA AAC AGC GAC TTA ACT CGG AAG CTT GAA GTT CAA ACA CAA AGA TTG GAG CTT
	T L K E L N S D L T R K L E V Q T Q R L E L
2173	TTA ACT GCT CAA AGC ATG GCA AAT GAA AAC AGC CAA GCA AGA CAA CCA GAT GCA GTG TCT GTA CAT
	L T A Q S M A N E N S Q A R Q P D A V S V H
2239	GAC AAT ATG CCA TAT GCT GAT GAC AAT ATG CAA TAT GCT GAT GAA GGA GAT GAG GTG GTG GAA CGG
	D N M P Y A D D N M Q Y A D E G D E V V E R
2305	GTA TTG GGA TGG ATC ATG AAA CTA TTT CCT GGA GGG CCA TCA AGA CGA CGA ACC AGC AAG CTT CTT
	V L G W I M K L F P G G P S R R R T S K L L
2371	TAA TCT CCA TGG CAA GAG TAC AAT GAT GAG TTA TTT CTG CGA AAA GCT GGT CTT TTT CTC CTC TCC
	*
	AGC CCT GCA TTT TTG GTA GCC AAA CGG AGT CCG GAT TTT GTA TAT TAT CCA TGG TTT ATA CAC ACA
	CAT TGC ATT CTT TTC CCC CAG AAG AAG CAA ATT GTA TCT AAG AGG CAT TTT GGA AGA TGG AAT TAG
	CTG TTC TCG ACA GTT TTG GCA ATA AAA CAT GAC CGT GTT GTT TAC AAG AGA ATC CAT TTA TCA AAC
	GTT GTA ATG AAG ATC AGA TGT GTT TAG TTG TCA ATC ATG AGA GAA AAA AAA CTT CAA ATG TTT CTT
	ACT TTT CAT GTG GAA ATG ATG TTT AGA TCT TTT GAC ATT GTA TTC GTT ATG TTG TAT TTG TTG AAA
	GCT GGG GCT TAA GAA AAG CCC AAT ATA TCA AAA AGA TGA TTT TGG CCG TCC TTT GTA AAA AAA AAA
	AAA AAA AAA A

Abb. 21 Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz der *sgel* volllängen cDNA.

Die Nummerierung bezieht sich auf den offenen Leserahmen. Farbige Markierungen und Hervorhebungen, siehe Text.

IV.2.2.2 Sequenzvergleich der *sgel* cDNA aus Kartoffel mit Genen aus anderen Organismen

Im Zuge der Sequenzierung des Arabidopsis-Genoms wurde Ende 2000 die Sequenz eines unbekanntes Proteins veröffentlicht (BAB03016), welches Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz von SGEI zeigte. Ein Sequenzvergleich auf Proteinebene zwischen SGEI und dem unbekanntes Protein aus Arabidopsis wies 63 % ähnliche und 47 % identische Aminosäuren auf (Tab. 10). Das unbekanntes Protein aus Arabidopsis wurde im Folgenden als ASGEI bezeichnet. Die größte Homologie wiesen die beiden Proteine in der C-terminalen Hälfte auf (SGEI ab Aminosäure 363, ASGEI ab Aminosäure 437). In diesem Bereich beträgt die Anzahl der ähnlichen Aminosäuren 78 %, die der identischen Aminosäuren 64 %. Zusätzlich zu dem beschriebenen unbekanntes Protein aus Arabidopsis konnten verschiedene ESTs aus einer Reihe unterschiedlicher Spezies und Gattungen höherer Pflanzen identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu SGEI zeigten (Tab. 8). Besonders auffällig war die Ähnlichkeit auf Proteinebene zwischen SGEI und ASGEI, sowie den Sequenzen aus Espe und Mais, im Bereich der 32 C-terminalen Aminosäuren. Hier zeigte sich eine Identität in der Aminosäurenabfolge von 99 %.

SGEI zeigte keine Ähnlichkeit zu bekannten stärkeabbauenden Enzymen. Um einen Hinweis auf die Funktion des SGEI Proteins zu erlangen, wurde die Proteinsequenz auf Sequenzmotive mit Hilfe des Programms PROSCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html) untersucht. Die Sequenz zwischen Aminosäure 761 und 771 wies dabei eine 50 %ige Ähnlichkeit zu dem katalytischen Bereichen von Glucoamylasen auf (Abb. 21; hervorgehoben und kursiv). Dieses Motiv ist zwischen SGEI und ASGEI, sowie den Sequenzen aus Espe und Mais, identisch. Glucoamylasen katalysieren den Abbau von Stärke oder anderer Oligo- oder Polysaccharide vom nichtreduzierenden Ende her. Das Produkt des Abbaus ist D-Glucose. Glucoamylasen kommen in Pilzen, Hefen und Bakterien vor (Sierks et al., 1990; Ohnishi et al., 1992). Durch PFSCAN (http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html) konnte im N-terminalen Bereich außerdem eine signifikante Ähnlichkeit zu einem Kernlokalisierungssignal gezeigt werden (Abb. 21; AS 18-35; rot gekennzeichnet). Ebenfalls durch PROSCAN zeigte sich eine signifikante Ähnlichkeit zu zwei Leuzinzipper-Motiven zwischen den AS 528-549 und AS 570-591 (Abb. 21; orange dargestellt). Da diese Sequenzmotive recht häufig bei computergestützten Analysen von Proteinsequenzen auftreten, konnten keine Rückschlüsse auf die Relevanz im SGEI Protein gezogen werden. Die beschriebenen Motive konnten auch in ASGEI lokalisiert werden.

Tab. 8 Sequenzvergleich zwischen SGEI, ASGEI und von ESTs abgeleiteten Proteinsequenzen mit unbekannter Funktion.

Ähnlichkeiten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen in Prozent. 1 bis 6: Abgeleitete Proteinsequenz pflanzlicher ESTs. 1, Tomate (AW093761); 2, Tomate (AW928571); 3, Baumwolle (AW727818); 4, Mais (AW566133); 5, Soja (AI988543); 6, Espe (AI164445)

	SGEI 790AS	ASGEI 715AS	1 178AS	2 181AS	3 256 AS	4 167 AS	5 164 AS	6 83AS
SGEI	100%	63%	98%	93%	57%	71%	71%	85%
ASGEI	63%	100%	74%	52%	58%	66%	69%	81%
1	98%	74%	100%	37%	43%	42%	66%	31%
2	93%	52%	37%	100%	47%	32%	41%	38%
3	57%	58%	43%	47%	100%	39%	42%	39%
4	71%	66%	42%	32%	39%	100%	62%	82%
5	71%	69%	66%	41%	42%	62%	100%	85%
6	85%	81%	31%	38%	39%	82%	85%	100%

IV.2.2.3 Analyse der hydrolytischen Aktivität des rekombinanten SGEI Proteins

Aufgrund der nicht vorhandenen Homologie zu bekannten stärkeabbauenden Proteinen konnten keine Rückschlüsse auf die Aktivität von SGEI gezogen werden. Sie wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene *sgel* Konstrukte

hergestellt und in *E. coli* zur Expression gebracht. Zum einen wurden *sgel* und *dsd10* in pSK getestet, zum anderen wurden *sgel* und *dsd10* in den Expressions-Vektor pET28a kloniert. Dadurch erhielten die cDNAs zusätzlich am 5'-Ende im Leseraster einen Histidin-Tag (pHIS-SGE und pHIS-DSD10). Zusätzlich zu diesen Klonen wurde ebenfalls das Arabidopsis Homolog *asgeI* in *E. coli* zur Expression gebracht. Die *asgeI* cDNA wurde mittels PCR aus einer blattspezifischen *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bibliothek (Clontech) amplifiziert und in den Vektor pSK ligiert.

Der lösliche Proteinextrakt aus *E. coli* DH5 α Zellen, welche das DSD10 Protein exprimierten, wurde elektrophoretisch in einem nativen Polyacrylamidgel mit Amylopektin als Substrat aufgetrennt (Abb. 22). Nach Inkubation ü.N. wurde das Gel mit Lugol'scher Lösung angefärbt. Die hydrolytische Aktivität des rekombinanten DSD10 Proteins ist durch die negative Färbung zu erkennen und mit einem Pfeil markiert (oberer Pfeil). Als Positivkontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus *E. coli* DH5 α Zellen, welche das CF-BETA Protein (Scheidig, 1997) exprimierten. Die hydrolytische Aktivität des rekombinanten CF-BETA Proteins ist durch den unteren Pfeil markiert. Als Negativkontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus Zellen, welche mit dem leeren Vektor pSK transformiert worden waren (mit Minus gekennzeichnet).

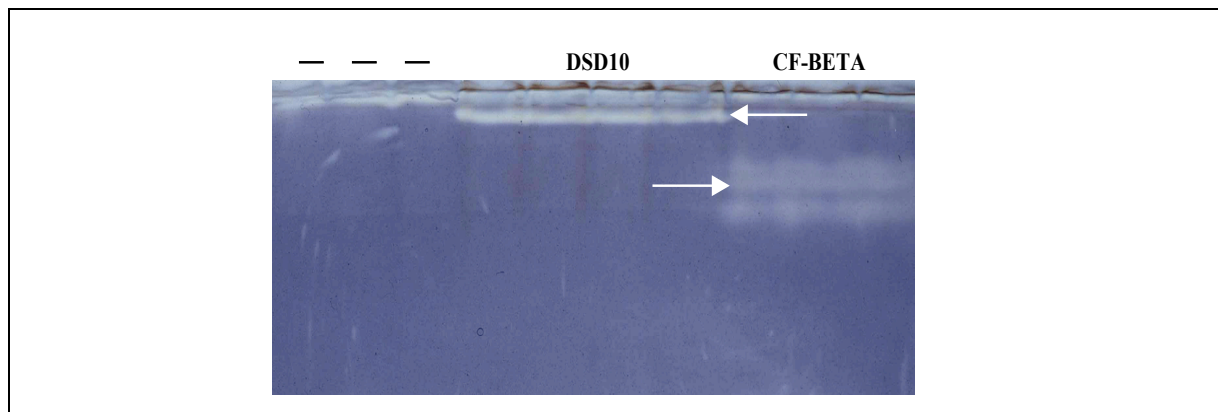


Abb. 22 Nachweis der hydrolytischen Aktivität des rekombinanten DSD10 Proteins mittels nativer PAGE.

Das lösliche Proteinextrakt aus DSD10 exprimierenden *E. coli* DH5 α Zellen wurde elektrophoretisch in einem nativen, Amylopektin enthaltenden, Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Inkubation ü.N. wurde das Gel mit Lugol'scher Lösung angefärbt. Die hydrolytische Aktivität des rekombinanten DSD10 Proteins war durch die negative Färbung zu erkennen und ist mit einem Pfeil markiert (oberer Pfeil). Als Positivkontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus CF-BETA exprimierenden *E. coli* DH5 α Zellen. Die hydrolytische Aktivität des rekombinanten CF-BETA Proteins ist durch den unteren Pfeil markiert. Als Negativkontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus Zellen, welche mit dem leeren Vektor pSK transformiert worden waren (mit Minus gekennzeichnet).

Zur näheren Bestimmung der hydrolytischen Aktivität wurde vorgegangen, wie unter IV.2.1.3 beschrieben. Es wurden die löslichen Proteinextrakte induzierter *E. coli* DH5 α Zellen verwendet, welche die Proteine SGEI, DSD10 oder ASGEI exprimierten. Auch hier diente die lösliche Proteinfraction von induzierten *E. coli* DH5 α Zellen, transformiert mit dem leeren Vektor pSK, als

Negativkontrolle. Wie in Abb. 23 zu erkennen, hydrolysierten die Proteinextrakte von *E. coli* Zellen, welche SGEI, DSD10 oder ASGEI exprimierten, das α -Amylase Substrat PNPG7, wohingegen das Proteinextrakt der Negativkontrolle eine deutlich geringere α -Amylase-Aktivität aufwies. Kein Aktivitätsunterschied konnte zwischen den verschiedenen Extrakten für das β -Amylase Substrat PNPG5 und das α -Glucosidase Substrat p-Nitrophenyl-Glucosid beobachtet werden. Dieses Resultat zeigte, dass SGEI, sowie die verkürzte Variante DSD10 und das Arabidopsis Homolog ASGEI, α -Amylase-Aktivität besitzt.

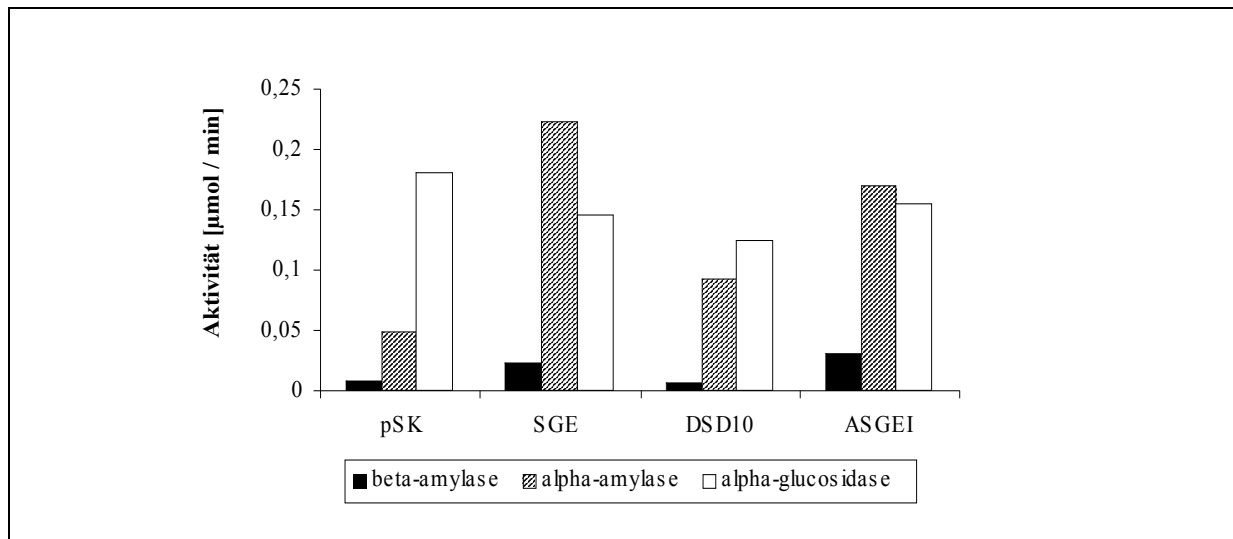


Abb. 23 Messung der hydrolytischen Aktivität von SGEI, DSD10 und ASGEI.

Hydrolytische Aktivität der löslichen Proteinfraction aus *E. coli* DH5 α Zellen, welche SGEI, DSD10 oder ASGEI exprimierten. Als Kontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus *E. coli* DH5 α Zellen, welche den leeren Vektor pSK enthielten.

Dass es sich bei der SGEI-Aktivität um α -Amylase-Aktivität handelte, konnte auch bei der Analyse der Abbauprodukte nach Inkubation des Proteins mit löslicher Stärke gezeigt werden. Hierzu wurde die lösliche Proteinfraction aus HIS-DSD10 exprimierenden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen verwendet. Als Negativkontrolle diente die lösliche Proteinfraction von *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, welche den leeren Vektor pET28a enthielten. Als Positivkontrolle wurde die lösliche Proteinfraction von HIS-CF-BETA exprimierenden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen genutzt. Die Proteinfractionen wurden mit löslicher Stärke inkubiert, anschließend erfolgte die Auftrennung der entstandenen Produkte mittels Dünnschicht-Chromatographie. Wie in Abb. 24 zu erkennen, entstanden nach Inkubation von Extrakten aus HIS-DSD10 exprimierender *E. coli* Zellen mit löslicher Stärke verschieden lange Maltooligosaccharide. Diese Abbauprodukte sind charakteristisch für α -Amylase-Aktivität. Während die Positivkontrolle Maltose produzierte (β -Amylase-Aktivität), konnten keine Produkte des hydrolytischen Abbaus für die Negativkontrolle nachgewiesen werden.

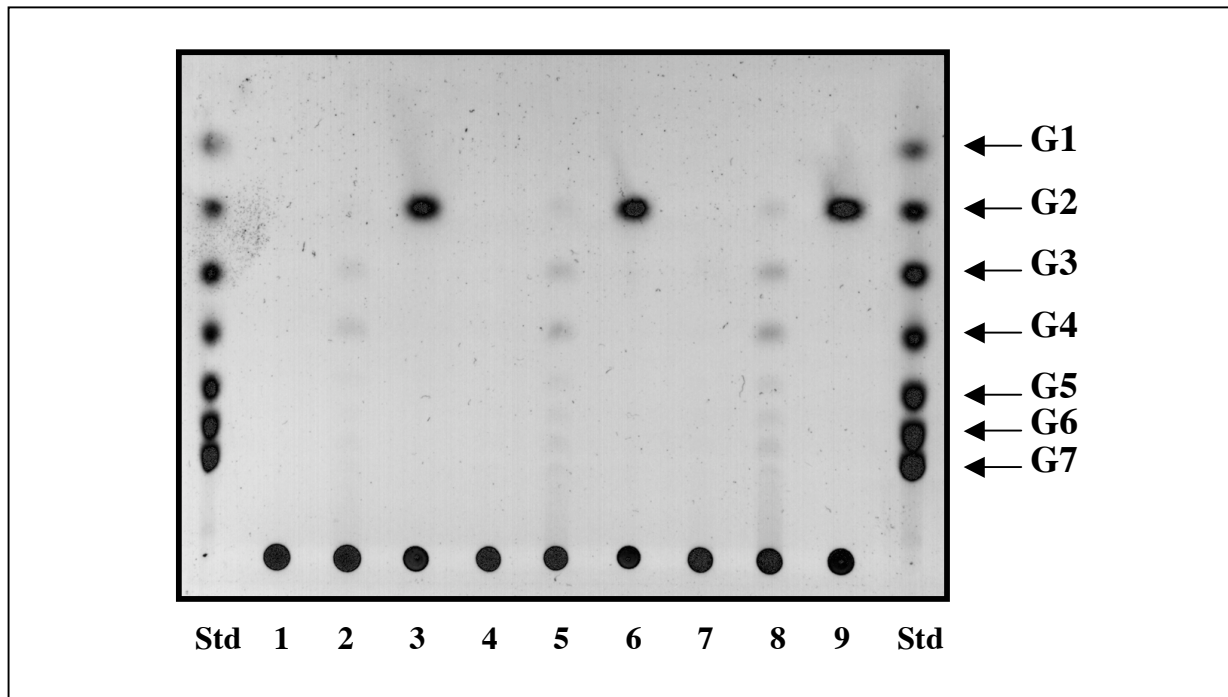


Abb. 24 Rekombinantes DSD10 Protein zeigte α -Amylase-Aktivität.

Proteinextrakt aus HIS-DSD10 exprimierenden *E. coli* BL21 Zellen wurde mit löslicher Kartoffelstärke aus Knollen inkubiert. Nach zwei, vier und acht Stunden wurden Aliquots entnommen und die durch die DSD10-Aktivität entstandenen Produkte mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Spur 2, 5 und 8). Als Positivkontrolle dienten Extrakte aus *E. coli* BL21 Zellen, welche das HIS-CF-BETA Protein exprimierten (Spur 3, 6 und 9). Als Negativkontrolle diente die lösliche Proteinfraction aus *E. coli* BL21 Zellen, transformiert mit dem leeren Vektor pET28a (Spur 1, 4 und 7).

Std = Standard (Maltooligosaccharidmischung), G1 = Glucose, G2 = Maltose, G3 – G7 = Maltooligosaccharide

Die dargestellten Resultate sprachen dafür, dass es sich bei SGEI um eine α -Amylase und nicht um eine Glucoamylase, wie durch das in SGEI enthaltene Sequenzmotiv (AS 763 – 790) angedeutet, handelte. Durch die Aktivität von Glucoamylasen entsteht D-Glucose, welches kein Abbauprodukt von löslicher Stärke durch SGEI exprimierende *E. coli* BL21 (DE3) Zellen ist (siehe Abb. 24). Um zu untersuchen, ob das Glucoamylasemotiv an der katalytischen Aktivität von SGEI beteiligt war, wurde mittels PCR ein Konstrukt hergestellt, welchem die Sequenzinformation für dieses Motiv fehlte. Das Protein wurde als SGEI-GAS bezeichnet und umfasste die AS 1 bis 760. SGEI-GAS wurde in *E. coli* DH5 α Zellen exprimiert und entsprechende Proteinextrakte zur Bestimmung der α -Amylase-, β -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität verwendet. Als Negativkontrolle dienten wiederum Extrakte aus *E. coli* DH5 α Zellen, welche den leeren Vektor pSK enthielten. Wie in Abb. 25 zu erkennen, führte die Deletion des Glucoamylasemotivs zum Verlust der α -Amylase-Aktivität.

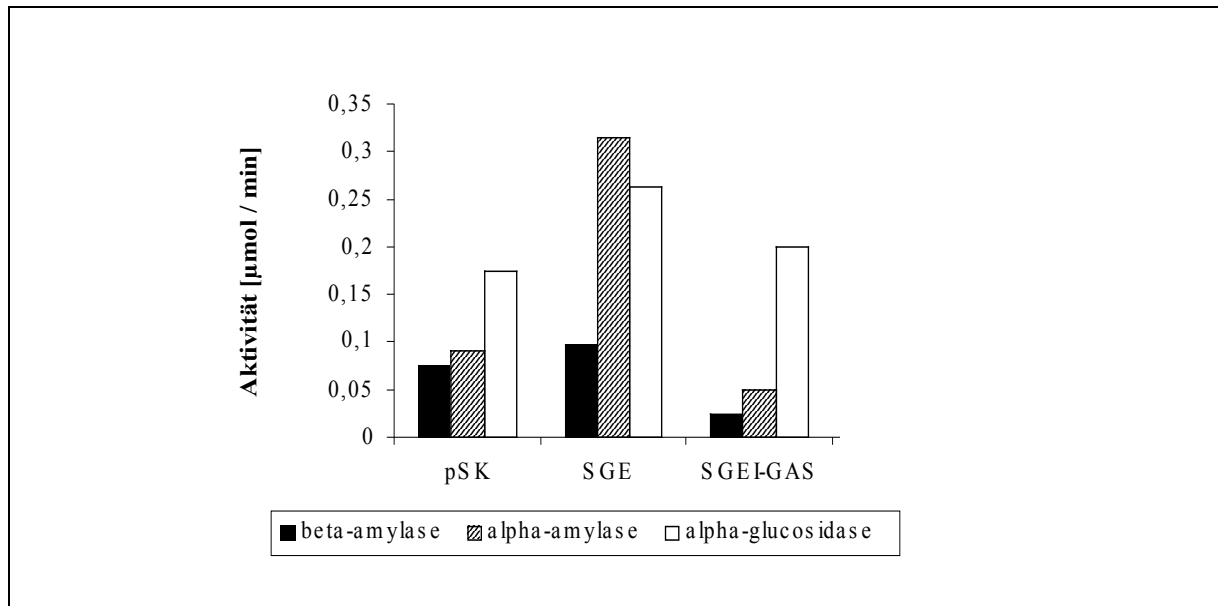


Abb. 25 Bestimmung der rekombinanten SGEI Enzymaktivitäten in *E. coli* DH5 α Zellen.

Hydrolytische Aktivität von Proteinextrakten aus *E. coli* DH5 α Zellen, welche das SGEI Protein oder das SGEI-GAS Protein exprimierten. Als Negativkontrolle diente die lösliche Proteinfraktion aus *E. coli* DH5 α Zellen, welche den leeren Vektor pSK enthielten.

IV.2.2.4 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von SGEI

Das rekombinante SGEI Protein zeigte α -Amylase-Aktivität. Sollte SGEI *in vivo* am Abbau der Stärke beteiligt sein, wäre eine plastidäre Lokalisation vorauszusetzen. Aus diesem Grund folgten Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins in der Zelle. Die ersten 150 Aminosäuren von SGEI wurden mit Hilfe des chloroplast-transit-prediction Programms ChloroP v1.1 auf das Vorhandensein eines Transitpeptids untersucht (siehe IV.2.1.5). Die Voraussage für SGEI in Bezug auf das Vorhandensein eines plastidären Transitpeptids war negativ. Der errechnete Wert für SGEI lag mit 0.45 unter dem erforderlichen Schwellenwert von 0.5. Die aminoterminalen 100 AS des SGEI Proteins zeigen jedoch typische Charakteristika eines Transitpeptids. Diese haben einen hohen Gehalt an Serin (11% in SGEI) und Threonin (6% in SGEI), eine positive Nettoladung (pI von 9.7 für SGEI) und oft folgt auf das Startmethionin ein Alanin (von Heijne et al., 1989; Gavel und von Heijne et al., 1990).

Trotz der negativen Voraussage durch ChloroP v1.1 wurden, wie für PCT-BMYI beschrieben, *in vitro* Importexperimente durchgeführt, um die plastidäre Lokalisation von SGEI nachzuweisen. Da sich das gesamte SGEI Protein, wahrscheinlich wegen seiner Größe, nicht *in vitro* transkribieren und translatieren lässt, und somit für Importexperimente nicht zur Verfügung stand, wurde ein anderer Weg gewählt. Hierzu wurde ein Konstrukt hergestellt, das für ein chimäres Protein kodierte, welches aus den ersten 100 N-terminalen Aminosäuren von SGEI und dem GFP-Protein (Davis und Vistera, 1996) bestand.

Die *in vitro* Transkription und Translation dieses chimären Gens führte zu einem ^{35}S markierten Protein von ca. 40 kDa (Abb. 26, Spur 1). Nach der Inkubation des ^{35}S markierten Fusionsproteins mit isolierten, intakten Chloroplasten aus Erbsen, unter Anwesenheit von ATP und den geeigneten Importbedingungen, zeigte sich, dass das chimäre Protein wahrscheinlich importiert wurde (Abb. 26, Spur 2). Im Gegensatz zum Import des PCT-BMYI Präproteins in Chloroplasten (siehe IV.2.1.5), konnte für das chimäre Protein keine Prozessierung gezeigt werden, da zwischen dem Translationsprodukt und der importierten Form kein Größenunterschied beobachtet werden konnte. Dies liegt möglicherweise an der Struktur des chimären Proteins, bestehend aus SGEI und GFP. Da nach der Zugabe der Protease Thermolysin das ^{35}S markierte Protein weiterhin zu detektieren war, konnte davon ausgegangen werden, dass das Protein durch die Chloroplastenmembran vor dem proteolytischen Abbau geschützt wurde (Abb. 26, Spur 3). Die relativ geringe Menge an importiertem chimären Protein deutete auf eine niedrige Effizienz der Importreaktion hin, was ebenfalls mit der artifiziellen Natur des chimären Proteins im Zusammenhang stehen kann. Nach Zugabe eines Detergenz, welches die Chloroplastenmembran zerstörte und somit das importierte Protein für die Protease zugänglich machte, wurde das gesamte importierte Protein abgebaut (Abb. 26, Spur 4).

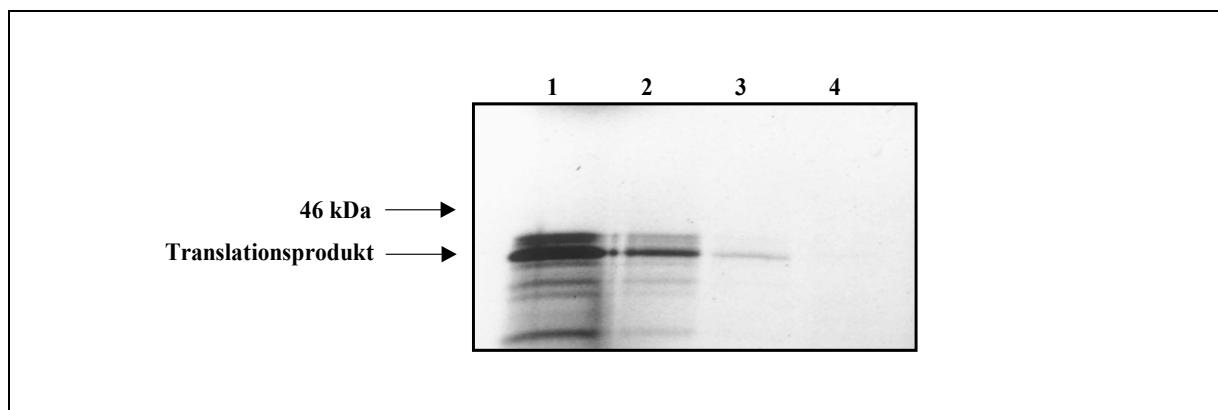


Abb. 26 *In vitro* Import des chimären SGEI/GFP-Proteins in isolierte Erbsenchloroplasten.

Isolierte Chloroplasten aus Erbsenblätter wurden mit dem ^{35}S -markiertem chimären Protein, bestehend aus den ersten 100 N-terminalen AS des SGEI-Proteins und dem GFP-Protein, inkubiert. Spur 1 zeigt das *in vitro* translatierte chimäre Protein, welches für das Importexperiment verwendet wurde. Spur 2 zeigt das in die Chloroplasten importierte Protein. Spur 3 zeigt das in die Chloroplasten importierte Protein nach der Behandlung der Chloroplasten mit Thermolysin. Spur 4 zeigt Chloroplasten, welche nach dem Import mit Thermolysin und Triton X-100 behandelt wurden.

IV.2.2.5 Untersuchungen zur *sgel* Transkriptmenge in verschiedenen Geweben der Kartoffel

Um Hinweise zu erlangen, in welchen Geweben und unter welchen Bedingungen das *sgel* Transkript nachzuweisen war, wurden verschiedene Northern-Blot Experimente durchgeführt. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte hierbei mit ^{32}P markierter *dsd10* »antisense« RNA, zur Detektion des *sgel* »sense« Transkriptes. Dies war nötig, da es mittels der konventionellen »random prime« Methode nicht möglich war, das *sgel* Transkript zu detektieren. Durch Verwendung von ^{32}P markierter RNA, sowie der anschließenden Behandlung der Membranen mit RNase A, ließ sich die Sensitivität deutlich steigern. Dass das *sgel* Transkript nicht durch konventionelle Hybridisierung mit zufällig ^{32}P markierter *sgel* cDNA nachzuweisen war und dass die *sgel* cDNA in der hergestellten Blattbibliothek nur gering repräsentiert war (siehe IV.2.2.1), deutete auf eine niedrige Expressionsrate des *sgel* Gens hin.

Nach Hybridisierung der Membran mit ^{32}P markierter *dsd10* »antisense« RNA konnten drei Transkripte unterschiedlicher Größe detektiert werden. Ein Transkript mit der Größe von ca. 1.6 kb konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden, wobei die Transkriptmenge in Blattgewebe deutlich höher war, als in Blüten (Abb. 27). Zwischen den verschiedenen Blattproben konnte kein deutlicher Unterschied in Bezug auf die Transkriptmenge des 1.6 kb großen Transkripts festgestellt werden. Zwei zusätzliche Transkripte mit einer Größe von ca. 3.1 kb und ca. 3.5 kb ließen sich in »source« Blätter nach sechs Stunden Belichtung, »source« Blättern welche für 24 h bei 4°C gehalten wurden und »sink« Blätter am Ende der Lichtperiode nachweisen. Diese beiden Transkripte waren in »source« Blätter nach sechs Stunden Belichtung nur sehr schwach zu detektieren, wohingegen für »source« Blätter welche für 24 h bei 4°C gehalten wurden, das 3.1 kb große Transkript deutlich stärker vertreten war als das 3.5 kb große. Eine unspezifische Bindung der ^{32}P markierter *dsd10* »antisense« RNA war unwahrscheinlich, da die Membran nach der Hybridisierung mit RNaseA behandelt wurde.

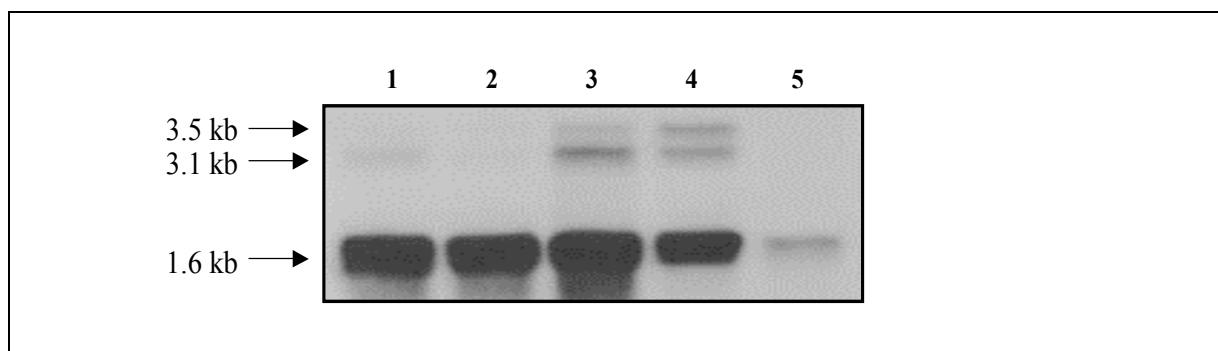


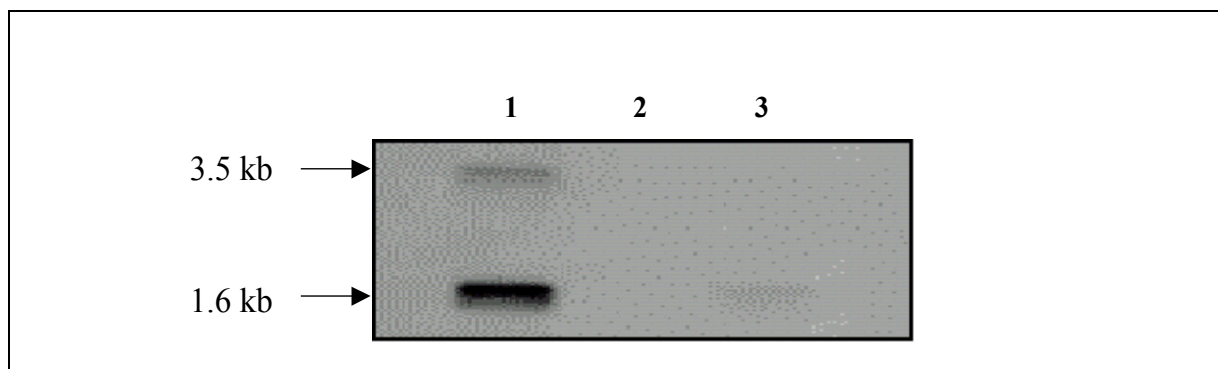
Abb. 27 (Beschreibung nächste Seite)

Abb. 27 (vorherige Seite) Northern-Blot Analyse der *sgel* Transkriptmenge in Blättern und Blüten der Kartoffel.

Je Spur wurden 40 µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Zur Hybridisierung wurde die P³² markierte *dsd10* »antisense« RNA verwendet.

1. »Source« Blätter nach sechs Stunden Belichtung.
2. »Source« Blätter am Ende der Lichtperiode.
3. »Source« Blätter, welche für 24 h bei 4°C gehalten wurden.
4. »Sink« Blätter am Ende der Lichtperiode.
5. Blüten

In einem zweiten Northern-Blot Experiment wurde Gesamt-RNA aus frisch geernteten Knollen, Knollen, welche für zwölf Tage bei 4°C gelagert wurden und RNA aus Tomatenkeimlingen mit ³²P markierter *dsd10* »antisense« RNA hybridisiert (Abb. 28). RNA aus Tomatenkeimlingen wurde deshalb verwendet, da beide Arten eng miteinander verwandt sind und die RNA aus Tomatenkeimlingen leichter zu erhalten war, als RNA aus Kartoffelkeimlingen. In Tomatenkeimlingen konnten die ca. 1.6 kb und 3.5 kb großen Transkripte nachgewiesen werden, wohingegen sich in kaltgelagerten Knollen nur das 1.6 kb große Transkript sehr schwach detektieren ließ. In frisch geernteten Knollen konnte kein *sgel* Transkript nachgewiesen werden.

**Abb. 28 Northern-Blot Analyse der *sgel* Transkriptmenge in Tomaten-Keimlingen und Kartoffelknollen.**

Je Spur wurden 40 µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Zur Hybridisierung wurde die P³² markierte *dsd10* »antisense« RNA verwendet.

1. Fünf Tage alte Tomatenkeimlinge.
2. Frisch geerntete Knollen.
3. Zwölf Tage bei 4°C gelagerte Knollen.

IV.2.2.6 Funktionelle Analyse von SGEI aus Kartoffel mit Hilfe transgener Pflanzen

Die bereits erhaltenen Daten zur α -Amylase-Aktivität und der möglichen Lokalisation des SGEI Proteins in Chloroplasten deuteten auf eine Beteiligung von SGEI am Abbau der transitorischen Blattstärke hin. Um die physiologische Funktion von SGEI *in vivo* zu untersuchen, wurden transgene Kartoffelpflanzen, welche in ihrer endogenen SGEI-Aktivität reduziert werden sollten, mit Hilfe der »antisense«-Technik hergestellt. Die »antisense«-Inhibierung des *sgel* Gens erfolgte unter der

Kontrolle des Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotors (CaMV 35S-Promotor, Franck et al., 1980), welcher die konstitutive Expression der nachfolgenden Nukleinsäuresequenz in der Pflanze bewirkte.

IV.2.2.6.1 Erzeugung und Selektion von transgenen α -*sgel* Pflanzen

Zur Herstellung des »antisense«-Konstruktes wurde ein Fragment verwendet, welches die Basenpaare 1694 bis 2816 (*dsd10* Sequenz) des *sgel* Gens umfasste. Diese Sequenz wurde als *Bam*HI/*Xho*I Fragment aus dem Vektor pSK isoliert, anschließend erfolgte das Auffüllen der 5'-Überhänge mit Hilfe der T4-DNA Polymerase. Darauf folgte die Klonierung des Fragments (in reverser Orientierung in Bezug auf den Promotor) in die *Sma*I-Schnittstelle des binären Vektors pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990); (Abb. 29). Die reverse Orientierung des *sgel* Fragments, wurde durch Restriktionsanalyse verifiziert. Das erhaltene Konstrukt α -*sgel* wurde über Agrobakterium-vermittelte Transformation stabil in das Genom von Kartoffelpflanzen integriert.

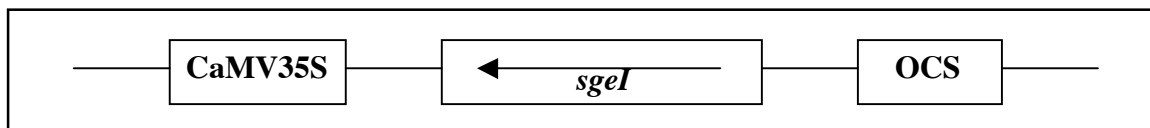


Abb. 29 Darstellung des 35S *sgel* »antisense« Konstrukt α -*sgel*.

Der Weg der Klonierung ist im Text beschrieben. Der Pfeil gibt die reverse Orientierung des 1,1 kb großen *sgel* cDNA-Fragments in Bezug auf den Promotor an. OCS bezeichnet die Terminationssequenz des *Agrobacterium tumefaciens* Octopinsynthasegens (Gielen et al., 1984).

Sollte, wie vermutet, das SGEI Protein am Abbau der transitorischen Stärke in Blättern beteiligt sein, so könnten transgene Pflanzen, welche in ihrer SGEI Expression inhibiert sind, einen Hochstärke-Phänotyp zeigen. Um dies zu untersuchen, wurden Blätter von 70 α -*sgel* Primärtransformanten, wie für die α -*pct-bmyI* Pflanzen beschrieben, am Ende der Lichtperiode mit Aluminiumfolie abgedunkelt und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Ethanol entfärbt. Der anschließende Nachweis der Stärke erfolgte mit Lugol'scher Lösung. Mit dieser Methode ließen sich drei Linien identifizieren (#51, #56 und #58), welche im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen nachweisbar Stärke in ihren Blättern enthielten. Abb. 30 zeigt mit Jod gefärbte »source« Blätter 12 Wochen alter Pflanzen der Linien #51, #56 und #58, sowie von untransformierten Kontrollpflanzen und der Linie #46 als weiterer Kontrolle, nach einer 64-stündigen Dunkelperiode.

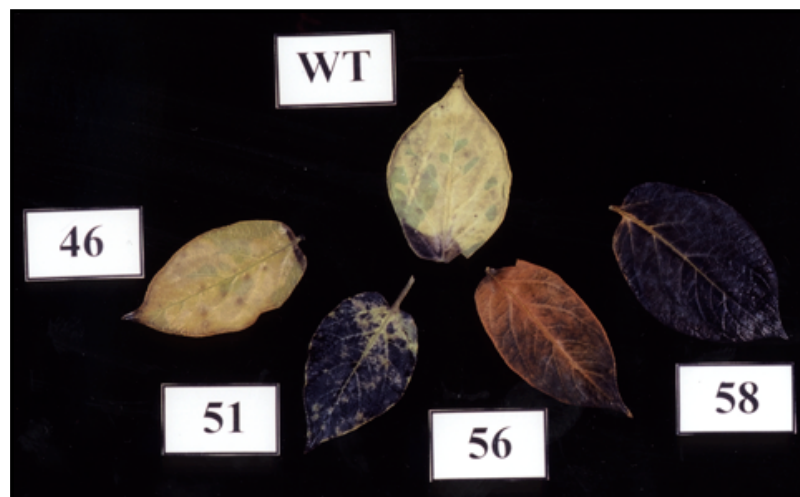


Abb. 30 Die Inhibierung des *sgel* Gens führte zu einem Hochstärke-Phänotyp in »source« Blättern.

»Source« Blätter zwölf Wochen alter Pflanzen der SGEI »antisense« Linien #46, #51, #56 und #58, sowie der untransformierte Kontrolle, wurden am Ende der Lichtperiode für 64 h verdunkelt. Anschließend wurden die Blätter mit Ethanol entfärbt, der Nachweis der Stärke erfolgte mit Lugol'scher Lösung.

Mittels verschiedener Northern-Blot Verfahren, wie z.B. PolyA⁺ RNA Northern oder Hybridisierung der Membranen mit radioaktiv markierter *sgel* »antisense« RNA, war es nicht möglich, eine eindeutige Reduktion des *sgel* Transkriptes in den selektierten Linien, im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen, zu zeigen. Dies könnte mit der geringen Transkriptmenge von *sgel* im Wildtyp im Zusammenhang stehen. Um zu untersuchen, ob die selektierten Linien in ihrer *sgel* Transkriptmenge gegenüber der untransformierten Kontrolle und der Linie #46 reduziert waren, wurden semiquantitative RT-PCR Experimente durchgeführt.

Die semiquantitative RT-PCR Methode wurde mittels des ProSTAR™ HF Single-Tube RT-PCR Systems (High Fidelity, Stratgene, La Jolla, USA) durchgeführt. Gesamt RNA aus Blättern acht Wochen alter Pflanzen, geerntet zu Beginn der Dunkelperiode, wurde mit DNaseI verdaut, um auszuschließen, dass die Anwesenheit genomischer DNA zu einer unspezifischen Amplifikation führte. Die RT-PCR Reaktion wurde einmal ohne Reverse-Transkriptase durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine genomische DNA in den RNA Präparationen vorhanden war (nicht gezeigt). Pro Reaktion wurden 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Die Oligonukleotidprimer für *sgel* lagen außerhalb des zur Herstellung transgener Pflanzen verwendeten *sgel* Fragments, um die Amplifikation der »antisense« RNA auszuschließen. Zur Kontrolle wurde die RT-PCR auch mit Oligonukleotidprimern, die spezifisch für *β-tubulin* waren, durchgeführt (Taylor et al., 1998). Wie in Abb. 31 zu erkennen, führte die RT-PCR zu den erwarteten Produkten von 1.1 kb für *sgel* und 0.7 kb für *β-tubulin*. Die Menge an *sgel* PCR-Produkt nach 50 Zyklen war in den Linien #51 und #58 deutlich geringer als in der untransformierten Kontrolle und der Linie #46, wohingegen kein Unterschied in der Menge an *β-tubulin* PCR-Produkt nach 40 Zyklen zwischen den einzelnen Linien zu beobachten war. Das *β-tubulin* PCR-Produkt konnte auch nach 30 Zyklen detektiert werden, wobei ebenfalls kein Unterschied zwischen den Linien nachweisbar war (nicht gezeigt).

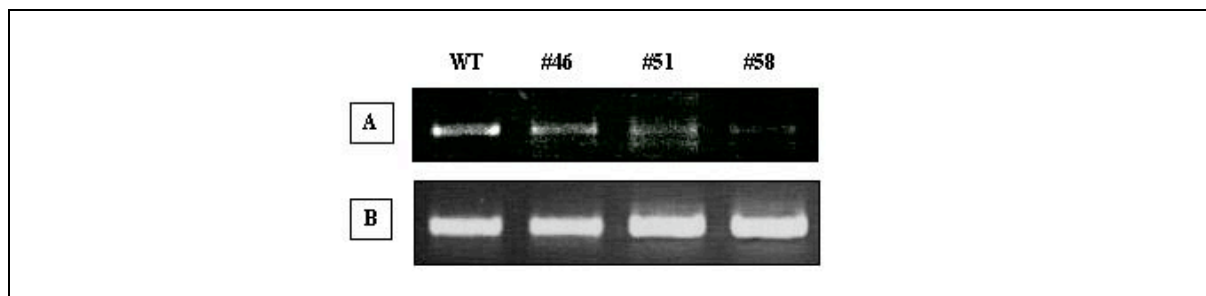


Abb. 31 RT-PCR Analyse der selektierten α -*sge1* Linien.

RT-PCR wurde mit Hilfe des ProSTAR™ HF Single-Tube RT-PCR Systems (High Fidelity, Stratgene, La Jolla, USA) durchgeführt. Pro Reaktion wurden 100 ng DNaseI behandelte Gesamt-RNA aus »source« Blättern der entsprechenden Linien eingesetzt. **A** zeigt die Mengen an entstandenem spezifischem *sge1* PCR-Produkt der jeweiligen Linien nach 50 PCR-Zyklen. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 1.1 kb. **B** zeigt die Mengen an entstandenem spezifischem β -*tubulin* PCR-Produkt der jeweiligen Linien nach 40 PCR-Zyklen. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 0.7 kb.

Die durchgeführte semiquantitative RT-PCR deutete darauf hin, dass die antisense Inhibierung von *sge1* in den Linien #51 und #58 zu einer deutlichen Reduktion in der *sge1* Transkriptmenge führte.

IV.2.2.6.2 Untersuchung von Enzymaktivitäten in transgenen α -*sge1* Pflanzen

Wie unter IV.2.2.3 beschrieben, zeigte das SGEI Protein α -Amylase-Aktivität. Es sollte nun untersucht werden, ob eine Reduktion in der Menge an *sge1* Transkript zu einer Änderung der α -Amylase oder anderer stärkeabbauender Aktivitäten führte.

Wie für die α -*pct-bmy1* Linien beschrieben, wurde die β -Amylase-, α -Amylase-, α -Glucosidase-, Stärkephosphorylase- und D-Enzym-Aktivität in »source« Blättern zu Beginn der Dunkelperiode bestimmt. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Probennahme ca. 6 Wochen alt. Wie in Tab. 9 A angegeben, konnte für die Linie #58 eine signifikante Reduktion der α -Amylase-Aktivität beobachtet werden. Nicht signifikant, aber ebenfalls in dieser Aktivität reduziert, waren die Linien #51 und #56. Bei den Messungen zur β -Amylase-Aktivität zeigte sich für die Linien #51 und #58 ebenfalls eine signifikante Reduktion. Besonders dramatisch war die Reduktion der β -Amylase-Aktivität in »source« Blättern der Linie #58, die nur noch drei Prozent der Aktivität von untransformierten Kontrollpflanzen aufwies. Eine nicht signifikante Reduktion war für die Linie #56 zu beobachten. Wie schon für andere in dieser Arbeit beschriebenen Pflanzen, konnte auch hier keine α -Glucosidase-Aktivität in »source« Blättern detektiert werden. Für die Stärkephosphorylase-Aktivität zeigte sich ein uneinheitliches Bild (Tab. 9 B). Die Aktivität in der Linie #51 war signifikant erhöht, wohingegen die Aktivität in der Linie #56 signifikant erniedrigt war. Die Aktivitäten in den Linien #46 und #58 unterschieden sich nicht signifikant von den untransformierten Kontrollen. Die D-Enzym-Aktivität

war in allen untersuchten Linien gegenüber der untransformierten Kontrolle erhöht, in den Linien #51, #56 und #58 signifikant.

Tab. 9 Enzymaktivitäten in selektierten α -*sgeI* Linien.

A. Messung der β -Amylase-, α -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität in »source« Blättern sechs Wochen alter Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die Bestimmung der β -Amylase-Aktivität erfolgte mit PNPG5, der α -Amylase-Aktivität mit PNPG7 und der α -Glucosidase-Aktivität mit *p*-Nitrophenyl-Glucosid.

B. Messung der Stärkephosphorylase- und D-Enzym-Aktivität in »source« Blättern sechs Wochen alter Pflanzen aus dem Gewächshaus. Pro Linie wurden drei Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#46, #51, #56 und #58) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

A.

	β-Amylase [mU min ⁻¹ gFG ⁻¹]	%	α-Amylase [mU min ⁻¹ gFG ⁻¹]	%	α-Glucosidase [mU min ⁻¹ gFG ⁻¹]
WT	447.3 ± 17.9	100	66.4 ± 2.8	100	n.d.
#46	465.3 ± 21.7	104	87.7 ± 13.2	132	n.d.
#51	319.7 ± 26.3*	71*	59.3 ± 19.7	89	n.d.
#56	398.5 ± 14.1	89	54.7 ± 10.8	82	n.d.
#58	16.75 ± 4.6*	3*	34.2 ± 5.2*	51*	n.d.

B.

	Stärke- phosphorylase [nmol min ⁻¹ gFG ⁻¹]	%	D-Enzym [nmol min ⁻¹ gFG ⁻¹]	%
WT	399 ± 69	100	160 ± 21	100
#46	346 ± 34	86	262 ± 72	163
#51	1115 ± 37*	279*	611 ± 121*	381*
#56	173 ± 16*	43*	327 ± 54*	204*
#58	459 ± 16	115	347 ± 50*	216*

Aufgrund der beobachteten Reduktion der β -Amylase-Aktivität in »source« Blättern der α -*sgeI* Linien #51, #56 und #58 sollte untersucht werden, ob in diesen Linien ebenfalls eine Reduktion der *cf-beta* und *pct-bmyI* Transkriptmenge nachgewiesen werden konnte. Hierzu wurden Northern-Blot Experimente mit Gesamt-RNA aus »source« Blättern von Pflanzen, welche für einen Tag bei 4°C gehalten wurden, durchgeführt. In Abb. 32 sind die entsprechenden Ergebnisse dargestellt. Eine deutliche Reduktion der *cf-beta* Transkriptmenge konnte nur für die Linie #58 nachgewiesen werden (Abb. 32 A). Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Reduktion für das *pct-bmyI* Transkript in den Linien #51 und #58 gezeigt werden, die Linie #56 zeigte hingegen nur eine leicht Reduktion der

pct-bmyI Transkriptmenge. Die beobachtete Reduktion der β -Amylase-Aktivität in »source« Blättern der α -*sgeI* Linien war somit wahrscheinlich auf die Reduktion der *cf-beta* und *pct-bmyI* Transkriptmengen zurückzuführen.

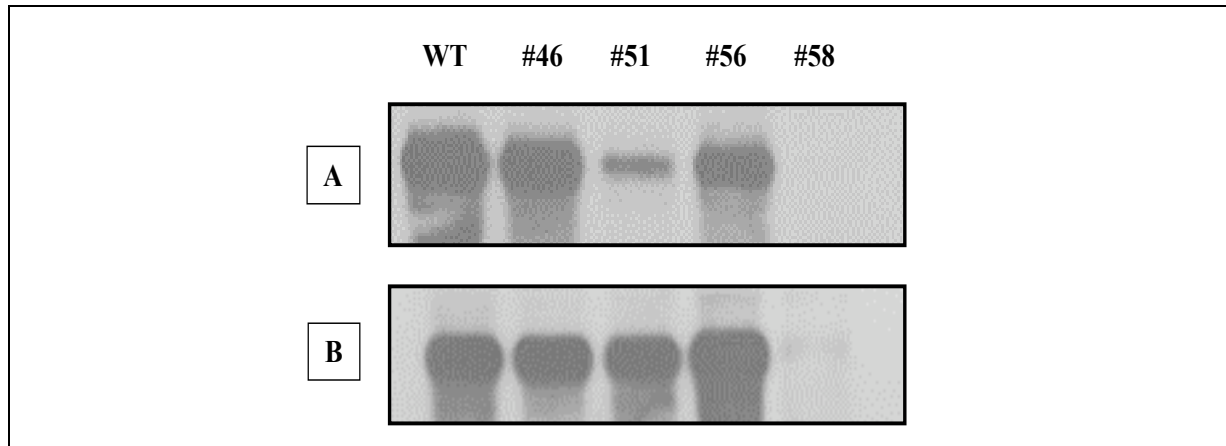


Abb. 32 Northern-Blot Analyse der α -*sgeI* Pflanzen zur Expression von *pct-bmyI* und *cf-beta*.

Je Spur wurden 20 μ g Gesamt-RNA aus »source« Blättern, welche für 24h bei 4°C gehalten wurden, aufgetrennt.

A.) Zur Hybridisierung wurde die random P³² markierte *pct-bmyI* cDNA verwendet.

B.) Zur Hybridisierung wurde die random P³² markierte *cf-beta* cDNA verwendet.

IV.2.2.6.3 Die Reduktion von SGEI in Kartoffeln führt zu einem Hochstärke-Phänotyp und zu einem Anstieg der Trockenmasse in den Blättern

Wie für die α -*pct-bmyI* Linien beschrieben, sollte auch bei den α -*sgeI* Linien der beobachtete Hochstärke-Phänotyp weitergehend charakterisiert werden. Hierfür wurde der Stärkegehalt in »source« Blättern 6 und 11 Wochen alter Pflanzen am Ende der Licht- bzw. der Dunkelperiode gemessen. Zusätzlich zu den selektierten α -*sgeI* Linien wurde der Stärkegehalt in »source« Blättern der Linie #11 der R1 »antisense« Pflanzen (Lorberth et al., 1998) bestimmt.

Wie in Abb. 33 A und B zu erkennen ist, lag der Stärkegehalt in »source« Blättern von 6 und 11 Wochen alten Pflanzen der selektierten α -*sgeI* Linien am Ende der Licht- und Dunkelperiode signifikant über dem Stärkegehalt von Blättern der untransformierten Kontrollpflanzen, sowie der Linie #46, die keinen Hochstärke-Phänotypen ausprägte. Eine signifikante Erhöhung des Stärkegehaltes der Linie R1#11 im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen war jeweils nur am Ende der Dunkelperiode zu beobachten. Wie in Tab. 10 und 11 zu erkennen, lag der Stärkegehalt der α -*sgeI* Linien am Ende der Dunkelperiode in 6 Wochen alten Pflanzen zwischen 79 % und 841 %, und in 11 Wochen alten Pflanzen zwischen 517 % und 2352 % über dem Stärkegehalt der untransformierten Kontrollpflanzen. Der Stärkegehalt der Linie R1#11 war um 53 % bzw. 424 % gegenüber den untransformierten Kontrollpflanzen erhöht.

Einen signifikanten Unterschied in der Menge an Stärke, welche über die Dunkelperiode mobilisiert wurde, konnte für die Linie #58 in 6 und 11 Wochen alten Pflanzen gezeigt werden. Für die Linie #51 war dies nur für 11 Wochen alte Pflanzen möglich. Wie für Pflanzen der Linie R1 #11 beschrieben (Lorberth et al., 1998), konnte für diesen Parameter kein signifikanter Unterschied zu untransformierten Kontrollpflanzen beobachtet werden (Abb. 33 C und D).

Die untransformierten Kontrollpflanzen und die Linie #46 mobilisierten während der Dunkelperiode mehr als 80 % der während der Lichtperiode aufgebauten Stärke (Abb. 33 E und F). Für 6 Wochen alte Pflanzen zeigte sich, dass Pflanzen der Linien #56, #58 und der Linie R1#11 signifikant weniger Stärke von der Gesamtmenge an Stärke abbauten (Abb. 33 E). Für 11 Wochen alte Pflanzen konnte dies auch zusätzlich für die Linie #51 nachgewiesen werden (Abb. 33 F).

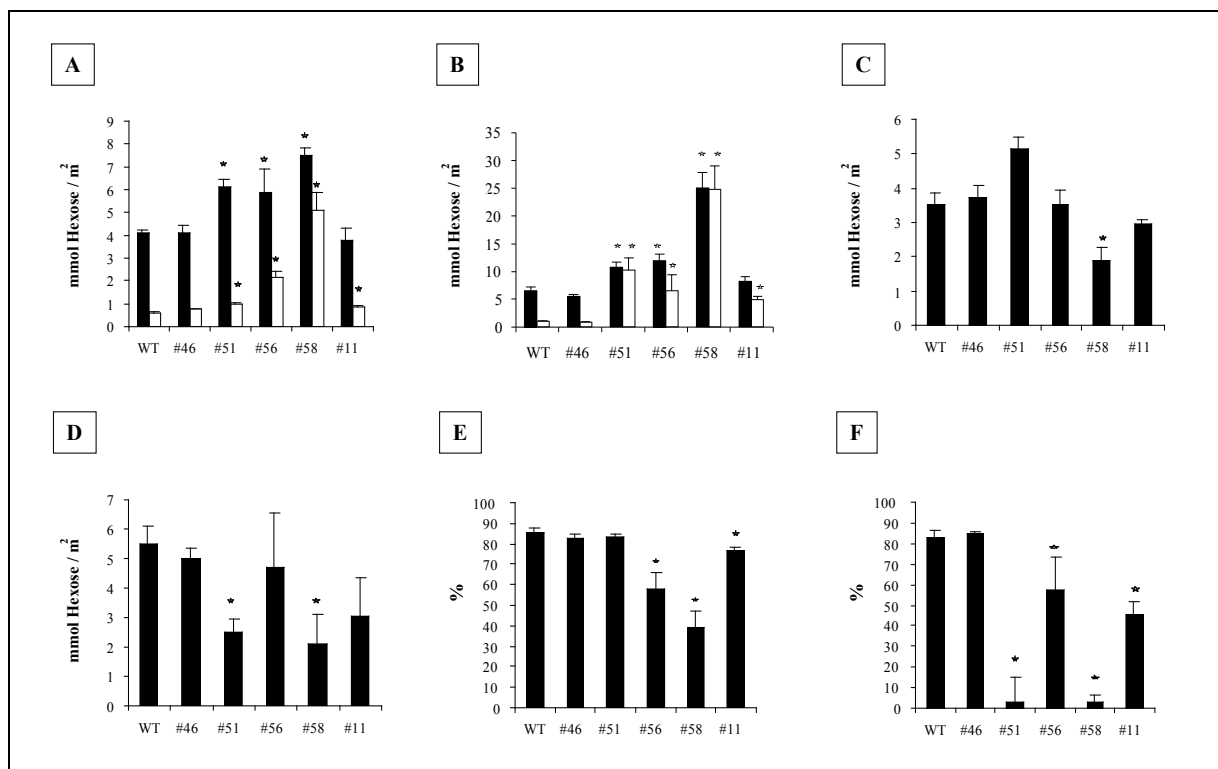


Abb. 33 Messung des Stärkegehaltes in »source« Blättern der selektierten α -*sgeI* Linien.

Messung des Stärkegehaltes in »source« Blättern von sechs (A, C und E) und elf (B, D und F) Wochen alten Pflanzen. A und B zeigt den Stärkegehalt am Ende der Lichtperiode (offene Balken) und am Ende der Dunkelperiode (schwarze Balken). C und D zeigt die absolute Stärkemenge, die über die Dunkelperiode mobilisiert wurde, während E und F die relative Menge an Stärke darstellt, welche über die Dunkelperiode mobilisiert wurde. Pro Linie wurden mindestens 10 Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien von der untransformierten Kontrolle (Students t-test). #46, #51, #56 und #58 sind α -*sgeI* Linien, #11 ist eine R1 »antisense« Linie.

Vergleicht man den Stärkegehalt in »source« Blättern am Ende der Lichtperiode zwischen 6 und 11 Wochen alten Pflanzen, so zeigte sich, dass die untransformierten Kontrollpflanzen 1.4 mal, die Linie #51 2.1 mal, die Linie #56 2.5 mal und die Linie #58 4.0 mal mehr Stärke in den Blättern 11

Wochen alter Pflanzen enthielten (Tab. 10 und 11). Der Faktor für die Linie R1 #11 lag bei 2.3 und der für die Linie #46 bei 1.2, vergleichbar mit dem der untransformierten Kontrollpflanzen. Deutlicher wird diese entwicklungsabhängige Akkumulation der Stärke durch Abb. 34. In diesem Experiment wurden die Stärkegehalte in »source« Blättern am Ende der Dunkelperiode in 5, 6, 8, 9 und 11 Wochen alten Pflanzen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass es auch in »source« Blättern der *α-sgeI* Linien, wie für die *α-pct-bmyI* Linien und die *sex4* Mutante (Zeeman et al., 1998b) beschrieben, zu einer Akkumulation der Stärke kommt.

Der erhöhte Stärkegehalt in »source« Blättern der Linien #51, #56 und #58 gegenüber den untransformierten Kontrollpflanzen und der Linie #46 ließ sich auch unter verschiedenen Kulturbedingungen zeigen (Tab. 12). Am Ende der Lichtperiode war der Stärkegehalt in »source« Blättern der Linien #51, #56 und #58 von 12 Wochen alten Pflanzen, welche unter Hochlichtbedingungen angezogen wurden, zwischen 384 % und 2481 % gegenüber dem Stärkegehalt der untransformierten Kontrolle angestiegen. Dies ließ sich auch für 12 Wochen alte Pflanzen zeigen, welche im Foliengewächshaus kultiviert wurden. Hier lagen die Werte zwischen 91 % und 1062 % über denen der untransformierten Kontrollpflanzen.

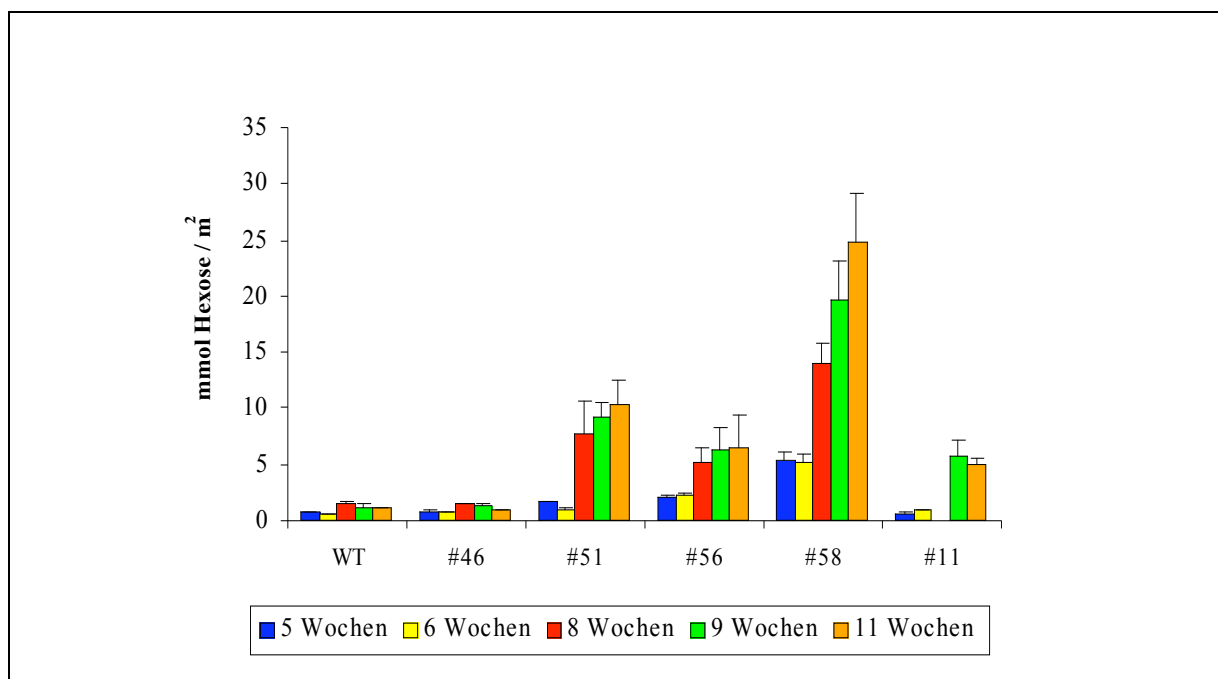


Abb. 34 Messung des Stärkegehaltes in »source« Blättern unterschiedlich alter *α-sgeI* Linien und der R1 »antisense« Linie #11.

Messung des Stärkegehaltes in »source« Blättern von fünf, sechs, acht, neun und elf Wochen alten Pflanzen am Ende der Dunkelperiode. Pro Linie wurden mindestens 10 Bestimmungen durchgeführt.

Tab. 10 Der Stärkegehalt in »source« Blättern 6 Wochen alter α -sgeI Linien am Ende der Licht- (A) und Dunkelperiode (B).

Stärkemenge in Prozent gegenüber der Kontrolle. Die Stärkemengen in »source« Blättern der Kontrolle ist gleich 100 %. Pro Linie wurden mindestens 8 Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#46, #51, #56, #58 und R1 #11) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

	A. Stärke [mmol Hexose/m ²]	Stärke in %	B. Stärke [mmol Hexose/m ²]	Stärke in %
Kontrolle	4.6 ± 0.87	100	0.58 ± 0.05	100
#46	4.2 ± 0.31	93 ± 15	0.65 ± 0.02	106 ± 21
#51	6.6 ± 0.34*	131 ± 15	0.98 ± 0.05*	179 ± 21*
#56	6.5 ± 0.49*	125 ± 14	2.12 ± 0.3*	387 ± 29*
#58	6.48 ± 0.51*	126 ± 17	5.1 ± 0.75*	941 ± 68*
R1 #11	4.6 ± 0.15	95 ± 15	0.86 ± 0.05*	153 ± 19*

Tab. 11 Der Stärkegehalt in »source« Blättern 11 Wochen alter α -sgeI Linien am Ende der Licht- (A) und Dunkelperiode (B).

Stärkemenge in Prozent gegenüber der Kontrolle. Die Stärkemenge in »source« Blättern der Kontrolle ist gleich 100 %. Unter Akkumulation ist der Unterschied in der Stärkemenge von »source« Blättern 6 und 11 Wochen alter Kartoffelpflanzen am Ende der Lichtperiode zu verstehen. Pro Linie wurden mindestens 8 Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#46, #51, #56, #58 und R1 #11) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

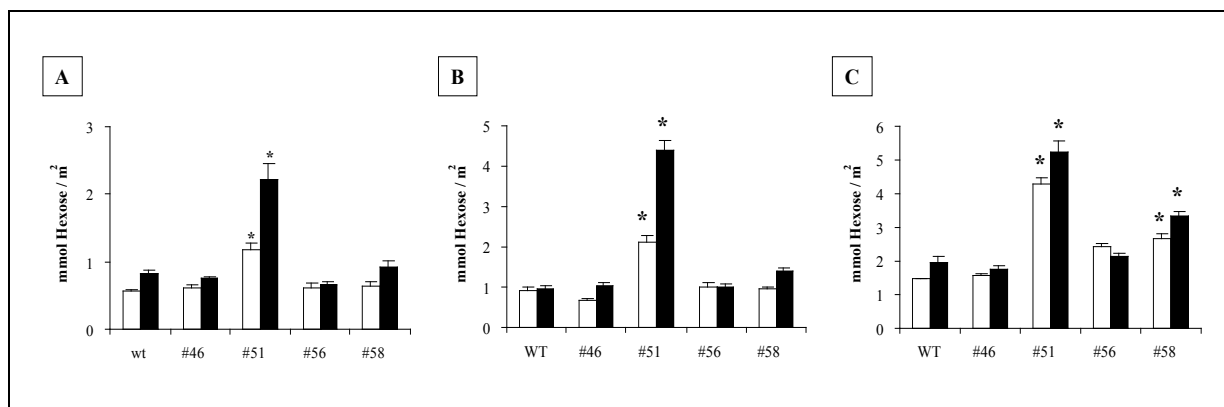
	A. Stärke [mmol Hexose/m ²]	Stärke in %	B. Stärke [mmol Hexose/m ²]	Stärke in %	Akkumulation (6 – 11 Wochen)
Kontrolle	6.5 ± 0.6	100	1.05 ± 0.07	100	1.4 ± 0.12
#46	5.5 ± 0.4	111 ± 16	0.83 ± 0.04	82 ± 6	1.2 ± 0.05
#51	10.7 ± 0.9*	198 ± 29	10.21 ± 2.25*	1101 ± 211*	2.1 ± 0.26
#56	11.9 ± 1.2*	222 ± 33	6.44 ± 2.93*	617 ± 279*	2.5 ± 0.27
#58	25.0 ± 2.8*	507 ± 70	24.72 ± 4.3*	2452 ± 421*	4 ± 0.56
R1 #11	8.1 ± 0.8	171 ± 25	4.87 ± 0.62*	524 ± 116*	2.3 ± 0.25

Tab. 12 Stärkegehalt in »source« Blättern unterschiedlich kultivierter α -sgel Linien.

(A) Stärkegehalt in »source« Blättern 11 Wochen alter Kartoffelpflanzen am Ende der Dunkelperiode, welche im Gewächshaus kultiviert wurden. (B) Stärkegehalt in »source« Blättern 12 Wochen alter Kartoffelpflanzen am Ende der Dunkelperiode, welche im Hochlichtphytotron kultiviert wurden. (C) Stärkegehalt in »source« Blättern 12 Wochen alter Kartoffelpflanzen am Ende der Dunkelperiode, welche im Foliengewächshaus kultiviert wurden. Stärkemenge in Prozent gegenüber der Kontrolle. Die Stärkemenge in »source« Blättern der Kontrolle ist gleich 100 %. Pro Linie wurden mindestens 8 Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#46, #51, #56, #58 und R1 #11) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

	A. Stärke [mmol Hexose / m ²]	Stärke in %	B. Stärke [mmol Hexose / m ²]	Stärke in %	C. Stärke [mmol Hexose / m ²]	Stärke in %
Kontrolle	1.05 ± 0.07	100	6.8 ± 1.2	100	21.1 ± 1.0	100
#46	0.83 ± 0.04	82 ± 6	8.1 ± 0.8	120 ± 38	26.1 ± 2.1	125 ± 11
#51	10.21 ± 2.25*	1101 ± 211	22.3 ± 2.1*	484 ± 115	57.5 ± 7.7*	279 ± 45
#56	6.44 ± 2.93*	617 ± 279	26.6 ± 5.5*	550 ± 158	39.4 ± 5.1*	191 ± 29
#58	24.72 ± 4.32*	2452 ± 421	135.7 ± 16.6*	2581 ± 538	239.7 ± 9.4*	1162 ± 46
R1 #11	4.87 ± 0.62*	542 ± 116	--	--	--	--

Weiterhin wurde untersucht, ob der Hochstärke-Phänotyp zu einer Veränderung der Konzentrationen von löslichen Kohlenhydraten in Blättern führte. Die Bestimmung der Mengen von Glucose, Fructose und Saccharose erfolgte am Ende der Licht- und der Dunkelperiode in zehn Wochen alten Pflanzen. Wie in Abb. 35 dargestellt, wies die Linie #51 eine signifikante Erhöhung in der Menge aller drei gemessenen Zucker, zu jeweils beiden Messzeitpunkten, gegenüber der untransformierten Kontrolle auf. Die Linie #58 zeigte hingegen nur eine signifikante Erhöhung in der Menge an Saccharose.

**Abb. 35 Messung des Glucose, Fructose und Saccharose Gehaltes in »source« Blättern zehn Wochen alter α -sgel Linien.**

A zeigt den Gehalt an Glucose, B den Gehalt an Fructose und C den Gehalt an Saccharose am Ende der Lichtperiode (offene Balken) und am Ende der Dunkelperiode (schwarze Balken). Pro Linie wurden mindestens 10 Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#46, #51, #56, #58) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

Wie schon für die α -*pct-bmyI* Linien zu beobachten, führte auch in den selektierten α -*sgel* Linien der erhöhte Stärkegehalt der Linien #51, #56 und #58 zu einem signifikanten Anstieg der Trockenmasse in Blättern (Abb. 36). Besonders deutlich war der Anstieg des Trockengewichtes in der Linie #58. Das Trockengewicht der Linie #58 betrug hier ca. 190 %, das der Linien #51 und #56 ca. 133 % im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. In Bezug auf die Entwicklung und das Wachstum der Pflanzen zeigte nur die Linie #51 einen Unterschied zu den untransformierten Kontrollpflanzen. Die Pflanzen dieser Linie waren wesentlich kleiner als die Kontrollpflanzen. Zusätzlich starben die Blätter dieser Linie früher ab. Da dies nur für die Linie #51 zu beobachten war, scheint kein ursächlicher Zusammenhang mit der Reduktion der *sgel* Transkriptmenge gegeben zu sein. Dieser beobachtete Phänotyp der Linie #51 ist möglicherweise auf somaklonale Variation zurückzuführen.

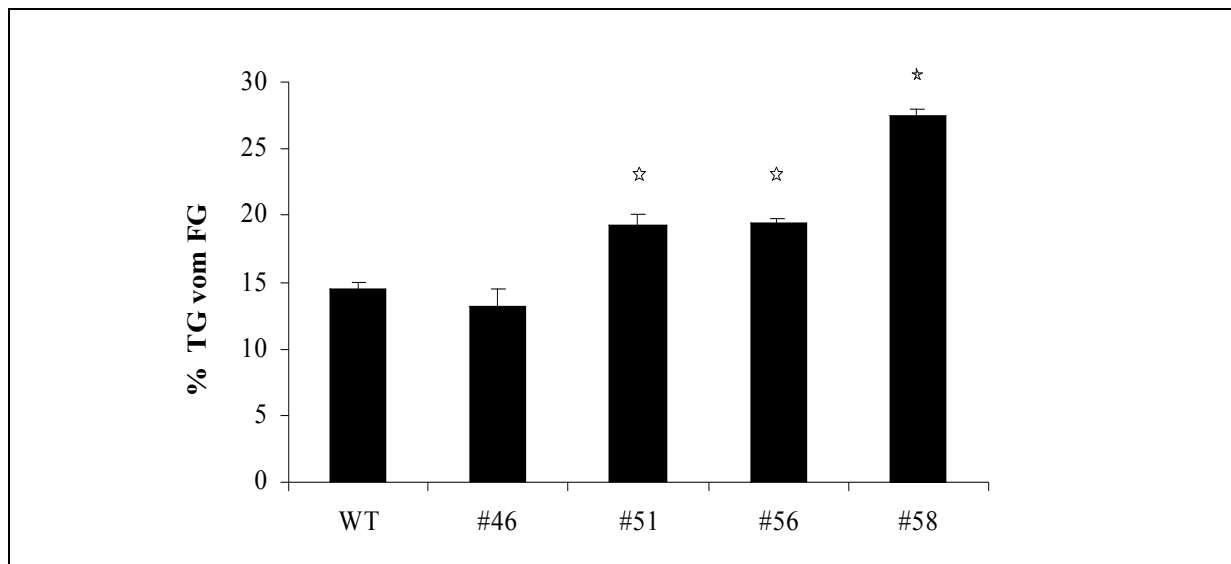


Abb. 36 Drei α -*sgel* Linien zeigten ein erhöhtes Trockengewicht gegenüber der untransformierten Kontrolle.

Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes von »source« Blättern 12 Wochen alter Pflanzen, welche im Gewächshaus kultiviert wurden. Die Angaben beziehen sich auf den Anteil des Trockengewichtes vom Frischgewicht in Prozent. Pro Linie wurden vier Bestimmungen durchgeführt. * bezeichnet signifikante Unterschiede der transgenen Linien (#46, #51, #56, #58) von der untransformierten Kontrolle (Students t-test).

Aufgrund der stark erhöhten Stärkemenge in den »source« Blättern der selektierten α -*sgel* Linien sollte untersucht werden, ob sich die Stärkekörner aus Blättern dieser Linien in ihrer Größe von denen der Kontrollpflanzen unterschieden. Die Probennahme erfolgte am Ende der Lichtperiode in zwölf Wochen alten Pflanzen. Die Bestimmung der Stärkekorngröße erfolgte durch eine Sedimentationsmethode. Wie in Abb. 37 dargestellt, konnte ein Unterschied in der Größe der Stärkekörner im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen nur für die Linie #58 beobachtet werden. Die Menge an Stärkekörnern mit einer Größe zwischen 0 – 5 μ m war gegenüber den untransformierten Kontrollpflanzen erniedrigt, wohingegen die Menge an Stärkekörnern über 5 μ m deutlich gegenüber der untransformierten Kontrolle erhöht war. Der durchschnittliche Durchmesser

der Stärkekörner aus untransformierten Kontrollpflanzen betrug $2.88 \mu\text{m}$, der der Linie #58 lag bei $5.44 \mu\text{m}$.

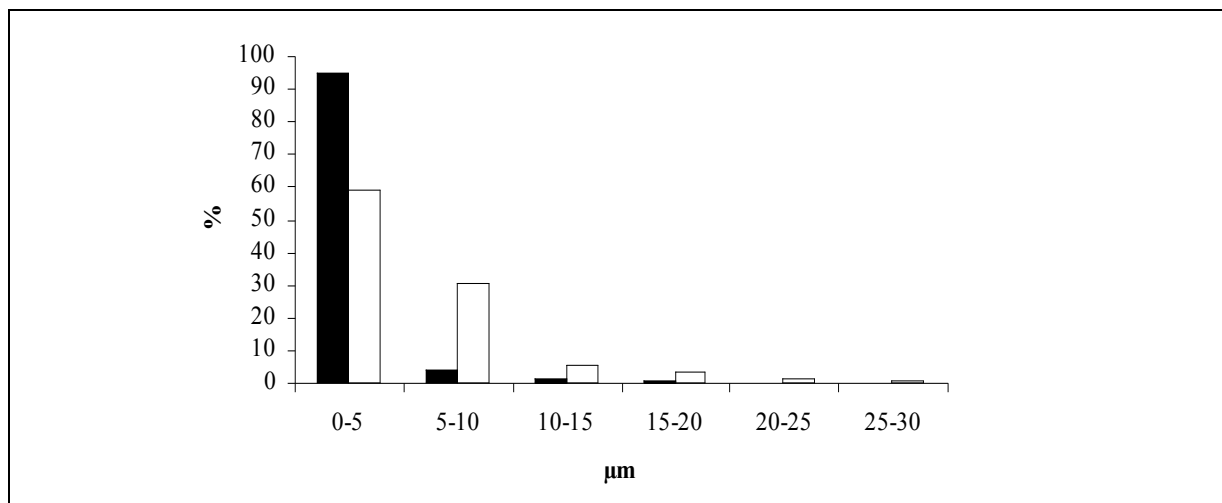


Abb. 37 Stärkekorngrößenverteilung in Blättern der α -sgeI Linie #58 und der untransformierten Kontrolle

Die Stärkekorngrößenverteilung von Stärkekörnern aus »source« Blättern von untransformierten Kontrollpflanzen (geschlossener Balken) und der α -sgeI Linie #58 (offener Balken) wurde mit der Sedimentationsmethode bestimmt. Die Probennahme erfolgte am Ende der Lichtperiode in zwölf Wochen alten Pflanzen.

Während der Durchführung der Abdunklungsversuche zum Abbau der transitorischen Stärke in den α -sgeI Pflanzen konnte man beobachten, dass die transgenen Pflanzen eine erhöhte Vitalität aufwiesen. Dabei zeigte sich, dass »source« Blätter der untransformierten Kontrolle nach 14 Tagen Dunkelheit abgestorben waren, wohingegen Blätter der α -sgeI Linien #51, #56 und #58 noch grün waren und weitgehend vital schienen (Abb. 38). Besonders drastisch war der Unterschied zwischen Blättern von Kontrollpflanzen und der Linie #58. Während das Blatt von Kontrollpflanzen nach 14 Tagen Dunkelheit abgestorben war, schien das Blatt der Linie #58 von der Dunkelperiode unberührt. Diese an Einzelblättern gemachte Beobachtung ließ sich auch auf die gesamte Pflanze übertragen, wenn diese für längere Zeit abgedunkelt wurde. (Daten nicht gezeigt).

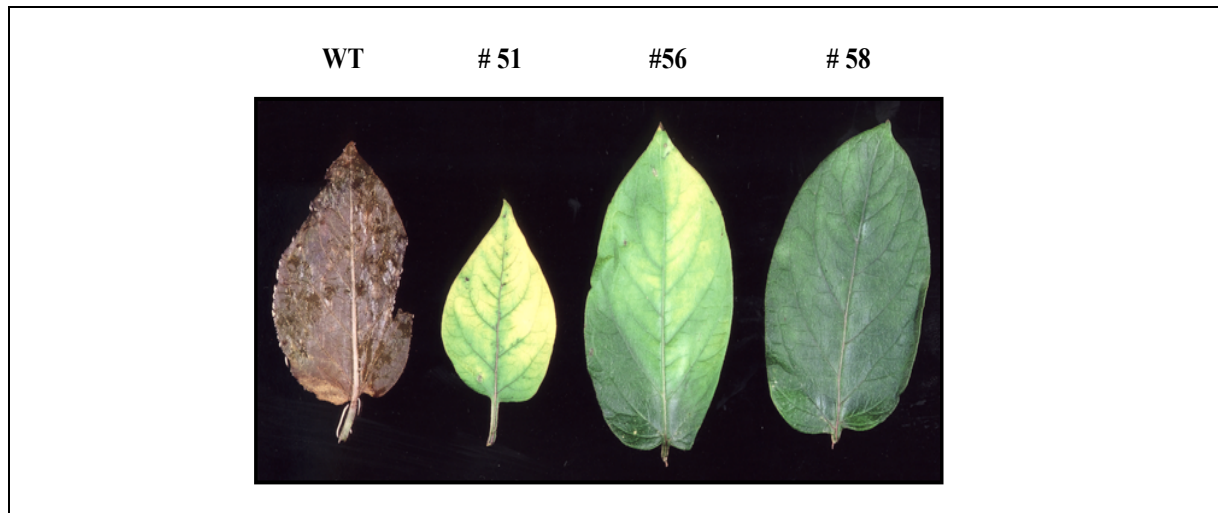


Abb. 38 Abgedunkelte »source« Blätter von α -*sgel* Linien zeigten eine erhöhte Vitalität.

»Source« Blätter fünfzehn Wochen alter Pflanzen der SGEI »antisense« Linien #51, #56 und #58, sowie der untransformierten Kontrolle, wurden am Ende der Lichtperiode für vierzehn Tage mit Aluminiumfolie abgedunkelt. Der Zustand der Blätter nach der Dunkelperiode wurde anschließend fotografisch dokumentiert.

IV.2.2.6.4 Die Reduktion von SGEI hat keinen Einfluss auf den Stärkestoffwechsel in Kartoffelknollen

Um zu analysieren, ob SGEI auch eine wichtige Rolle im Stärkestoffwechsel der Kartoffelknolle spielt, wurden die α -*sgel* Pflanzen daraufhin untersucht, ob die Reduktion von SGEI zu einer Veränderung des Stärkestoffwechsels führte. Dies wurde sowohl unter Bedingungen der Stärkenettoakkumulation, als auch unter Bedingungen, die den Stärkeabbau begünstigten, getestet. Es wurden sowohl frisch geerntete Knollen, als auch für zehn Tage bei 4°C gelagerte Knollen zur Analyse herangezogen.

Der Einfluss der Reduktion der SGEI-Aktivität auf verschiedene Parameter des Knollenertrages und des Kohlenhydratstoffwechsels wurde an 12 Wochen im Gewächshaus herangezogenen Pflanzen untersucht. Analysiert wurden die Parameter Knollenfrischgewicht, Knollenzahl, Trockengewicht der Knollen, sowie der Stärkegehalt der Knollen (Abb. 39). Wie in Abb. 39 A zu erkennen ist, zeigte sich, dass die Linie #51 eine signifikante Reduktion des Gesamt-Knollenfrischgewichtes aufwies, was einher ging mit einer Reduktion des Stärkegehaltes. Diese korrelierte mit dem beobachteten Wuchsphänotyp dieser Linie. Auch hier könnte das Ergebnis auf eine somaklonale Variation in dieser Linie zurückgeführt werden. Die Linien #56 und #58 unterschieden sich in diesen Parametern nicht signifikant von der untransformierten Kontrolle. Die Linie #56 zeigte eine signifikante Erhöhung in Bezug auf den Parameter Knollenzahl. Dieses Ergebnis konnte bei mehreren Ernten beobachtet werden. Da diese Änderungen jedoch nicht konsistent in allen Linien mit signifikanter Reduktion von SGEI auftraten, ist davon auszugehen, dass SGEI keine signifikante Rolle während der Stärkeakkumulation in der Kartoffelknolle spielt.

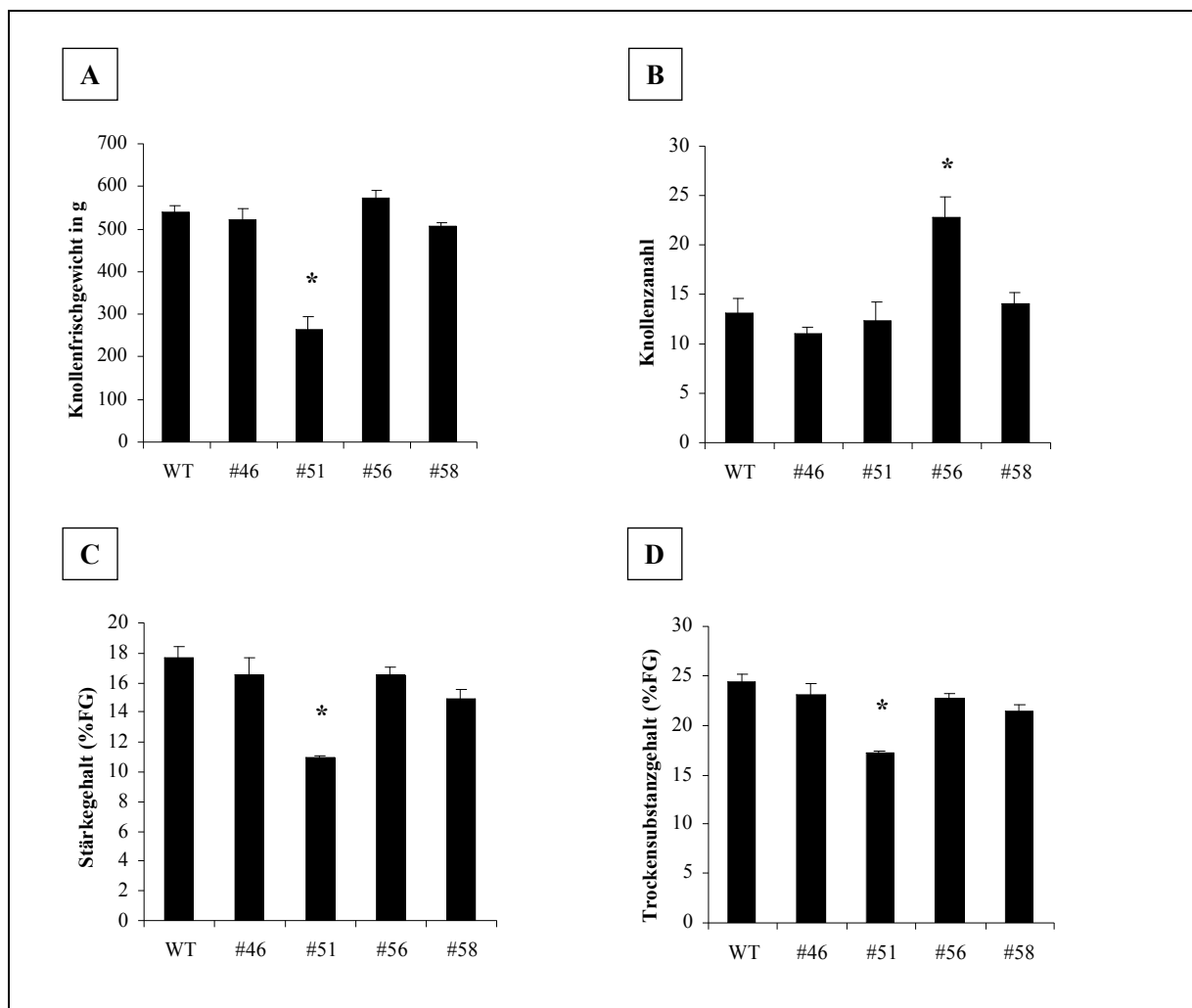


Abb. 39 Analyse von Ernteparametern der α -*sge1* Linien.

Analyse des Knollenfrischgewichtes (A), der Knollenzahl (B), des Stärkegehaltes (C) und der Trockensubstanz (D) 12 Wochen alter α -*sge1* Linien und der untransformierten Kontrolle. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus kultiviert. Es sind Mittelwerte und Standardfehler aus vier unabhängigen Messungen je Linie dargestellt. * bezeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen (Students t-test).

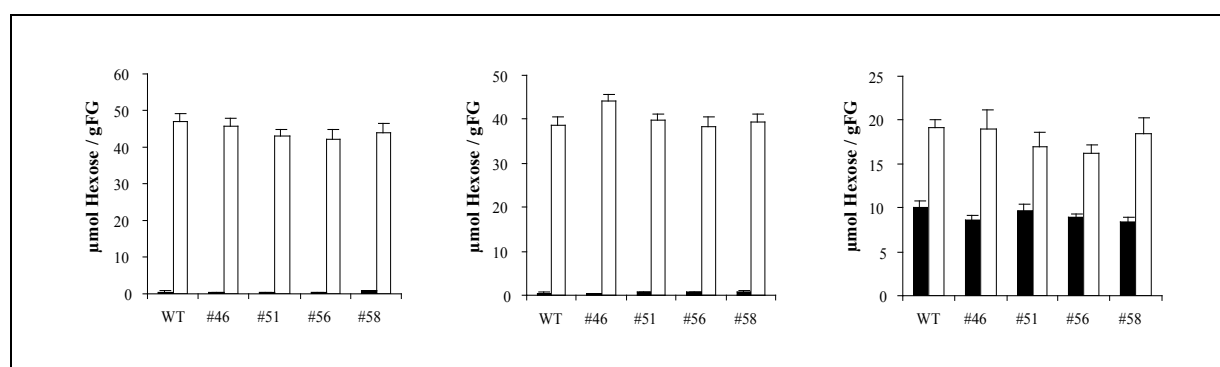
Der Gehalt an Stärke und den Zuckern Glucose, Fructose und Saccharose wurde in frisch geernteten Knollen ebenfalls enzymatisch bestimmt (Tab. 13). Die Menge an Stärke in Knollen der Linie #51 war gegenüber der untransformierten Kontrolle signifikant erniedrigt, die in der Linie #58 hingegen signifikant erhöht. Die gemessenen Mengen der untersuchten Zucker unterschieden sich in keiner der Linien signifikant von der Kontrolle. Deshalb war auch anhand dieser Messungen davon auszugehen, dass SGEI keine entscheidende Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel wachsender Kartoffelknollen spielt.

Tab. 13 Enzymatische Bestimmung der Menge an Stärke, Glucose, Fructose und Saccharose in Knollen der α -*sgeI* Linien.

Enzymatische Bestimmung der Menge an Stärke, Glucose, Fructose und Saccharose in frisch geernteten Knollen der Linien #46, #51 #56 und #58 und von Kontrollpflanzen. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 10 unabhängigen Messungen. * bezeichnet signifikante Unterschiede im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen (Students t-test).

	Stärke [$\mu\text{mol/gFG}$]	Glucose [$\mu\text{mol/gFG}$]	Fructose [$\mu\text{mol/gFG}$]	Saccharose [$\mu\text{mol/gFG}$]
WT	246 \pm 19.8	0.56 \pm 0.1	0.53 \pm 0.09	10.0 \pm 0.7
#46	211 \pm 36.5	0.34 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03	8.64 \pm 0.47
#51	122 \pm 3.7*	0.29 \pm 0.02	0.59 \pm 0.05	9.68 \pm 0.78
#56	214 \pm 10.6	0.44 \pm 0.04	0.75 \pm 0.08	8.96 \pm 0.43
#58	317 \pm 16.9*	0.76 \pm 0.1	0.85 \pm 0.07	8.44 \pm 0.44

Wie schon für die in dieser Arbeit beschriebenen transgenen Linien mit reduzierter PCT-BMYI-Aktivität, sollte auch für die selektierten α -*sgeI* Pflanzen untersucht werden, ob die Reduktion der *sgeI* Transkriptmenge, und der damit verbundenen Hochstärke-Phänotyp, zu einer Veränderung im kälteinduziertem Süßwerden der Knollen führte. Knollen der α -*sgeI* Linien und der untransformierten Kontrolle wurden für zehn Tage bei 4°C oder RT gelagert und anschließend die Menge an Glucose, Fructose und Saccharose bestimmt. Wie in Abb. 40 zu erkennen, führte auch die antisense Inhibierung von SGEI zu keiner Änderung des kälteinduziertem Süßwerdens. Damit kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass SGEI am Stärkeabbau in Kartoffelknollen während der Kaltlagerung beteiligt ist.

**Abb. 40 Messung des Glucose-, Fructose- und Saccharose-Gehaltes in kaltgelagerten Knollen der α -*sgeI* Linien.**

Glucose-, Fructose- und Saccharose-Gehalt in kalt- und bei Raumtemperatur gelagerten Knollen von Kontroll- und α -*sgeI* Pflanzen. **A** zeigt den Gehalt an Glucose, **B** den Gehalt an Fructose und **C** den Gehalt an Saccharose. Die schwarzen Balken zeigen die Gehalte in Knollen, die zehn Tage bei RT gelagert wurden, die offenen Balken die Werte nach zehn Tagen Lagerung bei 4°C. Pro Linie wurden mindestens 16 Bestimmungen durchgeführt

V. Diskussion

Das Ziel der Arbeit bestand darin, zu einem besseren Verständnis des Abbaus der transitorischen Stärke in Blättern und des Abbaus der Speicherstärke in Knollen, speziell bei niedrigen Temperaturen, beizutragen. Zunächst sollten neue cDNAs, kodierend für stärkeabbauende Enzyme, durch die funktionelle Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken isoliert werden, um dann ihre Bedeutung für den Stärkeumsatz unter Verwendung reverser genetischer Methoden zu analysieren.

V.1 Das funktionelle Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken führte zur Isolation von neuen, bisher nicht charakterisierten cDNAs, die für stärkeabbauende Enzyme kodieren.

Mit Hilfe eines Systems zum funktionellen Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken war es möglich, bis dahin unbekannte cDNAs, kodierend für stärkeabbauende Enzyme aus Kartoffel, zu isolieren (siehe III.1.6, IV.1.1 und IV.1.2). Dieses System basiert auf den *E. coli* Stämmen KV832 und PGM⁻, welche lineare Glucane akkumulieren. Kolonien dieser Stämme lassen sich mit Joddampf blau bis schwarz anfärben. Wird in diesen Mutanten ein Protein exprimiert, das den Abbau dieser Glucane katalysiert, so lassen sich entsprechende Kolonien leicht durch Jodbedampfung identifizieren.

Um die Möglichkeit der Isolation falsch positiver Klone zu reduzieren, wurden die in dem Stamm KV832 identifizierten cDNAs in der *E. coli* PGM⁻ Mutante überprüft. Beide *E. coli* Stämme verwenden unterschiedliche Stoffwechselwege zur Synthese der linearen Glucane. Der Stamm KV832 trägt eine Mutation im Gen für das Verzweigungsenzym (*glgB*) und akkumuliert lineare Glucane über den klassischen Glycogenbiosyntheseweg, während der Stamm PGM⁻ eine Mutation in der Phosphoglucomutase trägt. Dies bewirkt, dass er bei Wachstum auf maltosehaltigem Vollmedium lineare α -1,4-Glucane über das Enzym Amylomaltase synthetisiert, diese aber nicht weiter verwerten kann, da das fehlende Enzym Phosphoglucomutase dafür essentiell ist.

Falsch positive Resultate können z.B. dann auftreten, wenn die exprimierte cDNA die Synthese der linearen Glucane inhibiert, etwa dadurch, dass sie mit der Expression der dafür notwendigen Enzyme interferiert. Ein Beispiel für die Expression einer cDNA, welche zu unterschiedlichen Ergebnissen in den beiden verwendeten Stämmen führte, war die Expression der cDNA *dsd13*. Diese cDNA kodiert für ein Gen mit Homologie zu *MtN3* aus *Medicago truncatula*.

Das hier benutzte System stellt eine hervorragende Methode zur Isolation von cDNAs, welche für stärkeabbauende Enzyme kodieren, dar. Ein weiterer Vorteil besteht in der vielseitigen

Anwendbarkeit der Methode, da sie auf alle Pflanzen und deren verschiedenen Organe angewendet werden kann.

cDNAs, kodierend für stärkeabbauende Enzyme, welche möglicherweise in ihrer Aktivität abhängig von der komplexen Struktur des Stärkekorns sind, als Heterodimere vorliegen müssen oder durch andere Enzyme aktiviert werden, können mit dieser Methode allerdings nicht erfasst werden. Genauso wenig wie plastidär lokalisierte Enzyme, die in ihrer Aktivität davon abhängig sind, dass das Transitpeptid entfernt wurde, also nur als reife Proteine Aktivität zeigen. Dies konnte kürzlich für eine plastidär lokalisierte β -Amylase aus Arabidopsis (BMY7) gezeigt werden (Sparla et al., 2006).

V.2 PCT-BMYI, eine neue β -Amylase aus Kartoffel

Mit Hilfe der hier beschriebenen Methode konnte eine bisher unbekannte cDNA, kodierend für eine β -Amylase aus Kartoffel, isoliert werden. Zum Zeitpunkt der Isolation unterschied sich diese β -Amylase cDNA von den meisten anderen pflanzlichen β -Amylase cDNAs oder Genen durch das Vorhandensein einer Sequenz, welche für eine N-terminale Extension kodiert. Aus Kartoffel konnte eine weitere β -Amylase isoliert werden, CF-BETA, welche ebenfalls solch eine Extension besitzt (Scheidig, 1997). Im Laufe dieser Arbeit wurde von Lao et al. (1999) die Sequenz des Arabidopsis-Homologs zu der hier beschriebenen β -Amylase aus Kartoffel publiziert, CT-BMY.

Aufgrund der hohen Homologie zu CT-BMY (80.7% auf Aminosäureebene) erhielt die β -Amylase aus Kartoffel die Bezeichnung PCT-BMYI (**p**otato-**c**hloroplast-**t**argeted-**B**eta-**A**mylase**I**). 2001 wurde die Sequenz für eine β -Amylase aus Reis bekannt (PCT-BMYI), welche ebenfalls über eine N-terminale Extension verfügt (AAG60205), seit 2006 ist auch eine β -Amylase Sequenz aus Soja bekannt (CAI39244). Diese beiden β -Amylase stellen Homologe zu PCT-BMYI dar.

Das rekombinante PCT-BMYI Protein reagierte mit dem β -Amylase spezifischen Substrat PNPG5 und hydrolysierte Amylopektin in nativen Gelen. Mittels Dünnschichtchromatographie konnte gezeigt werden, dass das rekombinante PCT-BMYI Protein nicht nur lösliche Stärke, sondern auch native Stärkegranula angriff und Maltose aus diesen Substraten freisetzte. Durch dieses Verhalten unterschied sich PCT-BMYI von den meisten pflanzlichen β -Amylasen, welche nicht in der Lage sind, native Stärke anzugreifen (Beck und Ziegler, 1989). Untersuchungen für die entsprechenden Enzyme aus Arabidopsis, Reis und Soja wurden bisher nicht durchgeführt.

Baba und Kainuma (1987) zeigten, dass eine β -Amylase aus Süßkartoffel in der Lage ist, native Stärke anzugreifen. Sarikaya et al. (2000) bestätigten dieses Ergebnis. Die Hydrolyse der nativen Stärke zu Maltose findet aber nur in geringem Maße statt. Möglicherweise reicht aber diese

geringe Hydrolyse aus, um das Stärkekorn für andere stärkeabbauende Enzyme angreifbar zu machen. Neben Maltose als Abbauprodukt der PCT-BMYI-Aktivität konnten ebenfalls geringe Mengen an Maltotriose und Maltotetraose detektiert werden. Hehre et al. (1969, 1986) konnten ebenfalls die Produktion von kurzkettigen Maltooligosacchariden aus Maltose durch eine β -Amylase-Aktivität nachweisen.

Es bleibt anzumerken, dass das hier hergestellte rekombinante PCT-BMYI Protein mit seinem Transitpeptid exprimiert wurde, da die Spaltstelle nicht bekannt war. Das rekombinante Präprotein zeigte β -Amylase-Aktivität, obwohl das Transitpeptid nicht abgespalten wurde. Möglicherweise zeigt das reife Protein deutlich mehr β -Amylase-Aktivität als das Präprotein und zeichnet sich durch veränderte Eigenschaften aus, wie z.B. höhere Aktivität gegenüber nativer Stärke. Die Abhängigkeit der Aktivität vom Entfernen des Transitpeptids wurde für BMY7 aus Arabidopsis gezeigt (Sparla et al., 2006).

V.2.1 PCT-BMYI ist in Chloroplasten lokalisiert

Eine plastidäre Lokalisation ist Voraussetzung für Proteine, welche am Abbau der transitorischen Stärke in Blättern oder dem Abbau von Speicherstärke in vegetativen Organen, wie z.B. der Kartoffelknolle bei niedrigen Temperaturen, beteiligt sind.

Für Arabidopsis sind 9 β -Amylasen, BMY1 bis BMY9, beschrieben. Für zwei dieser β -Amylasen, BMY7 und BMY8, wurde die plastidäre Lokalisation experimentell nachgewiesen. BMY8 ist das beschriebene CT-BMY Protein, dessen N-terminale Extension für ein Transitpeptid kodiert (Lao et al., 1999). Die Lokalisation von BMY7 in Plastiden konnte von Sparla et al. (2006) nachgewiesen werden. BMY6 und BMY9 besitzen nach computergestützter Vorhersage ebenfalls Transitpeptide, die plastidäre Lokalisation wurde aber experimentell nicht bewiesen. Vorläufige Resultate deuten ebenfalls auf die Lokalisation von BMY6 im Chloroplasten hin, da Arabidopsis knockout-Mutanten die transitorische Stärke nicht in gleichen Raten abbauen wie der Wildtyp (Smith et al., 2004).

Die Analyse der N-terminalen Extension des PCT-BMYI Proteins durch das Programm ChloroP v1.1 (Emanuelsson et al., 1999) führte zu einer negativen Vorhersage in Bezug auf das Vorhandensein eines plastidären Transitpeptides. Mit Hilfe von Importexperimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass PCT-BMYI in isolierte, intakte Chloroplasten aus Erbse importiert wird und dass die ersten 100 N-terminalen Aminosäuren ausreichend sind, um den Transport zu gewährleisten. Die negative Vorhersage durch ChloroP v1.1 ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das

Programm mit Hilfe bekannter plastidärer Transitpeptide aus Arabidopsis erstellt wurde und sich Transitpeptide anderer Pflanzenspezies von diesen hinreichend genug unterscheiden können.

Der Größenunterschied zwischen dem PCT-BMYI Präprotein und der reifen, importierten Form beträgt ca. 6 kDa. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Spaltstelle zwischen dem Transitpeptid und dem reifen Protein im Bereich der 55 N-terminalen AS liegt. Für CT-BMY berechnete ChloroP v1.1 die Spaltstelle zwischen den AS 49 und AS 50. Viksø-Nielsen et al. (1997) isolierten eine β -Amylase aus Kartoffelblättern und zeigten, dass diese β -Amylase als Homodimer, mit einer molekularen Masse von 56 kDa für das Monomer, vorliegt. Die molekulare Masse dieser β -Amylase ähnelt der vorausgesagten molekularen Masse für das reife PCT-BMYI Protein von ca. 55 kDa. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die *pct-bmyI* cDNA möglicherweise für die β -Amylase kodiert, welche Viksø-Nielsen et al. (1997) isolierten.

V.2.2 Die *pct-bmyI* Expression variiert im Tagesgang und wird durch Kälte induziert

Mittels Northern-Blot Experimenten konnte gezeigt werden, dass die *pct-bmyI* Transkriptmenge während des Tag/Nacht Übergangs in Blättern stark zunahm und nach Beginn der Lichtperiode nicht mehr zu detektieren war. Diese Beobachtung konnte auch für das Arabidopsis Homolog *ct-bmy* gemacht werden. Harmer et al. (2000) untersuchten mit Hilfe von Arabidopsis cDNA-Microarrays, welche Gene durch den circadianen Rhythmus reguliert werden. Diese Untersuchungen zeigten, dass der Anstieg der *ct-bmy* Transkriptmenge kurz vor Beginn der Dunkelperiode zu beobachten war, ähnlich dem Anstieg der *pct-bmyI* Transkriptmenge in Blättern (siehe IV.2.1.6). Diese Beobachtung deutet auf eine mögliche Regulation der PCT-BMYI-Aktivität auf transkriptioneller Ebene hin. Smith et al. (2004) konnten hingegen bei Ihren Untersuchungen keine Abhängigkeit der Transkription vom Tagesgang für *ct-bmy* und die weiteren drei β -Amylasen, welche möglicherweise plastidär lokalisiert sind, feststellen.

Der Anstieg der *pct-bmyI* Transkriptmenge unterliegt in Blättern nicht nur dem Tagesgang, sondern wird auch durch niedrige Temperaturen induziert. Diese Beobachtung konnte auch für das β -Amylase Homolog *ct-bmy* aus Arabidopsis gezeigt werden (Seki et al., 2001, Kaplan und Guy, 2004). Ein Anstieg der Transkriptmenge durch niedrige Temperatur in Blättern konnte ebenfalls für *cf-beta* nachgewiesen werden (Scheidig, 1997). Die Induktion von CT-BMY durch Kälte und die damit einhergehenden Akkumulation von Maltose könnte im Zusammenhang mit dem Schutz von Proteinen, Membranen und Membran-assoziierten Prozessen, wie der Elektronentransportkette, stehen (Kaplan und Guy, 2004). Kaplan et al. (2005) konnten für Arabidopsis *ct-bmy* RNAi Pflanzen zeigen, dass diese bei Kältestress weniger Maltose und andere Zucker akkumulieren als der Wildtyp. Damit

einhergeht die erhöhte Sensitivität der Elektronentransportkette des PSII gegenüber Kältestress (Kaplan und Guy, 2005; 2006).

Nielsen et al. (1997) zeigten für Kartoffelknollen die Induktion einer kälteinduzierbaren β -Amylase-Aktivität durch Temperaturen von 4°C. Diese Aktivität ist auf das CF-BETA Protein zurückzuführen, welches durch Kälte induziert wird. Die antisense Inhibierung des *cf-beta* Gens führt zu einer drastischen Reduktion der β -Amylase-Aktivität in kalt gelagerten Kartoffelknollen (Scheidig, 1997). Wie für *cf-beta* gezeigt, führten Temperaturen von 4°C auch zum Anstieg der *pct-bmyI* Transkriptmenge in Kartoffelknollen. Der Anstieg der *pct-bmyI* Transkriptmenge könnte mit dem kälteinduzierten Süßwerden der Knollen, durch den Abbau der Speicherstärke, im Zusammenhang stehen. Die Akkumulation von osmotisch aktiven Zuckern, wie Maltose, Glucose, Fructose und Saccharose, dient möglicherweise als eine Art »Frostschutz«, in dem diese als Osmotikum wirken, um den Gefrierpunkt des Zytosols zu erniedrigen (Guy, 1990; Crow et al., 1993). Wie schon diskutiert, könnte Maltose auch hier zum Schutz von Proteinen und Membranen beitragen.

Kein *pct-bmyI* Transkript konnte in keimenden Knollen nachgewiesen werden, was dahingehend interpretiert werden kann, dass PCT-BMYI nicht am Abbau der Speicherstärke während der Keimung beteiligt ist. Dies wurde auch durch Knollen von Pflanzen, welche in ihrer PCT-BMYI-Aktivität reduziert waren, bestätigt. Knollen dieser Pflanzen zeigten gegenüber der untransformierten Kontrolle keinen Unterschied im Keimverhalten.

V.2.3 Die antisense Inhibierung des *pct-bmyI* Gens führt zu einem Hochstärke-Phänotyp in Blättern und zum Anstieg des Trockengewichtes

Die vorliegenden Ergebnisse zur plastidären Lokalisation des PCT-BMYI Proteins, der *in vitro* Aktivität, sowie der Anstieg der Transkriptmenge während des Tag/Nacht Wechsels, deuten auf eine Beteiligung der plastidären β -Amylase am Abbau der transitorischen Stärke hin. Die Ergebnisse von Lao et al. (1999) und Harmer et al. (2000) legten diese Vermutung ebenfalls für das Arabidopsis-Homologs CT-BMYI nahe.

Transgene Kartoffelpflanzen, die eine Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität aufwiesen, zeigten einen Hochstärke-Phänotyp in Blättern. In diesen Pflanzen gelang es zum ersten Mal, über die »antisense« Inhibierung eines am Stärkeabbau beteiligten Gens einen solchen Phänotyp zu bewirken. Die Inhibierung des R1 Gens führt zwar ebenfalls zu einem Hochstärke-Phänotyp, jedoch ist das R1 Protein kein primär stärkeabbauendes Enzym, sondern an der Phosphorylierung der Stärke beteiligt, so dass wahrscheinlich die Veränderung der Stärkestruktur diesen Phänotyp bedingt (Lorberth et al., 1998).

Die Bedeutung der β -Amylase für den Abbau der transitorischen Stärke konnte kürzlich auch für Arabidopsis nachgewiesen werden. Kaplan und Guy (2005) inhibierten mittels RNAi Technik die Aktivität des Arabidopsis Homologs zu *pct-bmyI*, *ct-bmy* (*bmy8*). Diese Pflanzen zeigten wie die *α -pct-bmyI* Pflanzen einen Hochstärke-Phänotyp der Blätter. Eine weitere β -Amylase Isoform in Arabidopsis soll ebenfalls für den Abbau der transitorischen Stärke nötig sein. So konnte durch Arabidopsis *bmy6* knockout-Mutanten gezeigt werden, dass diese die Stärke nicht im gleichen Maße mobilisieren, wie der Wildtyp (Smith et al., 2004). Nach computergestützter Voraussage besitzt das BMY6 Protein zwar ein Transitpeptid für den Transfer in Plastiden, dies wurde experimentell jedoch noch nicht bewiesen. Es bleibt auch anzuführen, dass die Ergebnisse von Smith et al. (2004) noch nicht als eigenständige Publikation veröffentlicht wurden.

Die »antisense« Inhibierung des *pct-bmyI* Gens führte in den entsprechenden Pflanzen zu einer Reduktion der β -Amylase-Aktivität zwischen 13 % und 25 %. Dieses Resultat korreliert mit den Ergebnissen von Lin et al. (1988), welche zeigten, dass ca. 20 % der gesamten β -Amylase-Aktivität in Blättern von Arabidopsis plastidär lokalisiert ist. Ein weiterer Hinweis, dass die beobachtete Reduktion der β -Amylase-Aktivität auf die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität zurückzuführen war, konnte durch die Inhibierung des *cf-beta* Gens in Kartoffelpflanzen erbracht werden. Diese Pflanzen wiesen eine bis zu 75 %ige Reduktion der β -Amylase-Aktivität auf, zeigten jedoch keinen Hochstärke-Phänotypen (Scheidig; noch nicht publiziert). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass CF-BETA extraplastidär lokalisiert ist oder nicht primär am Abbau der transitorischen Stärke beteiligt ist. Eine eindeutige Lokalisation dieses β -Amylase Isozyms aus Kartoffel konnte jedoch noch nicht gezeigt werden. Das Arabidopsis Homolog zu CF-BETA, BMY7, zeigt eine plastidäre Lokalisation (Sparla et al., 2006). Knockout-Mutanten ohne BMY7-Aktivität zeigen jedoch keinen Hochstärke-Phänotyp (Kaplan und Guy, 2005).

Andere stärkeabbauende Aktivitäten sind von der Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität nicht betroffen. Zwar konnte für zwei Linien ein signifikanter Anstieg der α -Amylase-Aktivität gegenüber den untransformierten Kontrollpflanzen nachgewiesen werden, dies trifft aber auch auf die Kontrolllinie #28, die keine Reduktion in der β -Amylase-Aktivität aufweist, zu. Ein signifikanter Anstieg der Stärkephosphorylase-Aktivität war nur für eine Linie zu beobachten und steht daher in keinem eindeutigen Zusammenhang mit der Reduktion der β -Amylase-Aktivität.

Die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität führte, wie beschrieben, in »source« Blättern zu einem Hochstärke-Phänotyp und damit zu einer deutlichen Erhöhung der Stärkemenge. In »source« Blätter von *α -pct-bmyI* Pflanzen, welche im Foliengewächshaus kultiviert wurden, konnte die achtfache Menge an Stärke, verglichen mit untransformierten Kontrollpflanzen, nachgewiesen werden. Mit der Erhöhung des Stärkegehaltes in den beschriebenen *α -pct-bmyI* Linien ging die

Erhöhung des Trockengewichtes einher. Dies konnte für Blätter 12 Wochen alter Pflanzen der entsprechenden Linien gezeigt werden.

Untersuchungen an unterschiedlich alten *α-pct-bmyI* Pflanzen zeigten, dass der beobachtete Hochstärke-Phänotyp der Blätter auf eine Akkumulation der Stärke während der Vegetationsperiode zurückzuführen war. Ein solch kumulativer Effekt konnte auch für die *sex4* Mutante beobachtet werden (Zeeman et al., 1998b). Eine verringerte Stärkemobilisierung während der Dunkelperiode in »source« Blättern konnte für neun Wochen alte PCT-BMYI »antisense« Pflanzen gezeigt werden. Für fünfzehn Wochen alte Pflanzen zeigte sich dieser Unterschied nicht. Möglicherweise wird die fehlende PCT-BMYI-Aktivität in älteren Pflanzen durch andere stärkeabbauende Aktivitäten kompensiert oder der Unterschied in der mobilisierten Stärkemenge zwischen den einzelnen Linien wird so klein, dass signifikante Unterschiede in der Menge an mobilisierter Stärke nicht mehr nachzuweisen sind. Für Pflanzen, die in ihrer R1-Aktivität reduziert waren und auch einen Hochstärke-Phänotypen der Blätter zeigten, konnte ebenfalls kein Unterschied in der Menge an Stärke, welche über die Dunkelperiode mobilisiert wird, festgestellt werden (Lorberth et al., 1998).

Vergleicht man jedoch den Anteil an Stärke, welcher während der Dunkelperiode von der Gesamtmenge der Blattstärke abgebaut wird, so mobilisieren die PCT-BMYI »antisense« Pflanzen deutlich weniger Stärke in ihren Blättern, als die entsprechenden Kontrollpflanzen. Diese Beobachtung wurde auch für R1 »antisense« Pflanzen gemacht (Lorberth et al., 1998).

Erste Ergebnisse mit transgenen Kartoffelpflanzen, welche das Arabidopsis Homolog *ct-bmy* unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, wiesen ebenfalls auf die Bedeutung der plastidär lokalisierten β -Amylase für den Abbau der transitorischen Stärke hin. Die zusätzlich konstitutiv exprimierte β -Amylase-Aktivität führte zu einem geringeren Stärkegehalt der »source« Blätter, im Vergleich zur untransformierten Kontrolle. Dieses Ergebnis zeigte, dass das Arabidopsis Homolog in der Lage war, Stärke in Kartoffelblättern abzubauen und dass das Transitpeptid von CT-BMY, welches für den Import in Arabidopsis Chloroplasten kodiert, diese Funktion ebenfalls in Kartoffel erfüllt.

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen konnte erstmals die physiologische Bedeutung einer β -Amylase am Abbau transitorischer Stärke nachgewiesen werden. Weiterhin stehen diese Ergebnisse im Einklang mit erst kürzlich in Arabidopsisblättern gemachten Beobachtungen, dass Maltose das primäre und überwiegende Abbauprodukt von transitorisch akkumulierter Stärke ist (Lloyd et al., 2005; siehe I.2.2.1.3 und I.2.2.1.6) und dass der Verlust des Maltose-Transport-Proteins in Arabidopsis Chloroplasten ebenfalls zu einem Hochstärke-Phänotyp der Blätter führt (Niittylä et al., 2004).

V.2.4 Die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität hat keinen Einfluss auf das kälteinduzierte Süßwerden von Kartoffelknollen

Im Gegensatz zur Reduktion des Stärkeabbaus in »source« Blättern durch die Inhibierung des *pct-bmyI* Gens konnte für Knollen der entsprechenden Pflanzen kein Unterschied im Abbau der Reservestärke während der Kaltlagerung beobachtet werden. Auch zeigten die Knollen der entsprechenden Linien gegenüber der untransformierten Kontrolle keinen Unterschied in der Keimung oder der Entwicklung der neuen Pflanze. Dies spricht dafür, dass die Stärke in ausreichendem Maße abgebaut wurde.

In Knollen, die entweder bei RT oder bei 4°C gelagert worden waren, konnte keine signifikante Reduktion der β -Amylase-Aktivität der *α -pct-bmyI* Linien beobachtet werden. Dies war nicht verwunderlich, da der größte Anteil an der β -Amylase-Aktivität auf CF-BETA zurückgeht (Scheidig, 1997) und die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität möglicherweise von der CF-BETA-Aktivität überdeckt wird. Vielleicht reichte auch der Grad der »antisense« Inhibierung von PCT-BMYI in den vorliegenden *α -pct-bmyI* Linien nicht aus, um einen Effekt auf den Abbau der Speicherstärke zu beobachten.

Natürlich muss grundsätzlich auch in Betracht gezogen werden, dass andere, unbekannte Enzyme für den Abbau der Speicherstärke in Kartoffelknollen verantwortlich sind. Ob während des Stärkeabbaus unter den Bedingungen der Keimung und dem kälteinduzierten Süßwerden die gleichen Enzyme benutzt werden, oder ob der Vorgang von nur einem Enzym katalysiert wird, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Grundsätzlich muss bedacht werden, dass man zwei unterschiedliche Systeme betrachtet, wenn man den Abbau der transitorischen Stärke und den der Speicherstärke vergleicht. Der Auf- und Abbau der transitorischen Stärke erfolgt periodisch. Am Tage erfolgt die Nettoakkumulation, in der Nacht der Nettoabbau. Der beobachtete Hochstärke-Phänotyp ist auf die Akkumulation der Stärke in Blättern, durch die Reduktion in der Mobilisierung der Stärke, gegenüber der untransformierten Kontrolle, zurückzuführen. Diese Reduktion kann so klein sein, dass ein signifikanter Unterschied nicht messbar ist. In Knollen findet ein solch periodischer Wechsel nicht statt, zum Abbau kommt es erst unter den Bedingungen der Kaltlagerung oder während der Keimung. Würde man in Blättern älterer Pflanzen nur die Menge an Stärke betrachten, welche über die Dunkelperiode abgebaut wird, so würde man wahrscheinlich keinen signifikanten Unterschied zwischen den PCT-BMYI »antisense« Pflanzen und der Kontrolle beobachten, da, wie beschrieben, die Unterschiede zu gering sind. Genau diese Bedingung liegt aber z.B. in kaltgelagerten Knollen vor, wo nur die Menge an Stärke betrachtet wird, welche während des Abbaus mobilisiert wird. Sollten die Unterschiede in der Menge an

mobilisierter Stärke gering ausfallen, so ist der Einfluss des PCT-BMYI Proteins auf den Abbau der Speicherstärke in Knollen nicht zu erkennen. Kaltgelagerte Knollen von transgenen Pflanzen, welche eine 70 %ige Reduktion der β -Amylase-Aktivität durch die Inhibierung des *cf-beta* Gens aufwiesen, zeigten, verglichen mit den Kontrollen, ebenfalls keinen Unterschied in der Mobilisierung der Speicherstärke (Scheidig, 1997).

V.3 SGEI, eine neue α -Amylase aus Kartoffel?

Die funktionelle Durchmusterung der Kartoffelblatt-Bibliothek führte zur Isolation einer bis dahin unbekanntes cDNA, die möglicherweise für eine neue Klasse von α -Amylasen kodiert. Die Expression dieser cDNA in den *E. coli* Stämmen KV832 und PGM⁻ führte dazu, dass sich die Kolonien nach Bedampfung mit Jod nicht mehr färbten. Da für beide *E. coli* Stämme das gleiche Ergebnis erzielt werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass die Isolation nicht aufgrund der Inhibierung der Synthese der linearen Glukane zustande kam, sondern auf den Abbau derselben zurückzuführen war.

Die isolierte cDNA erhielt die Bezeichnung *dsd10*. Es zeigte sich aber, dass diese Sequenz nicht für die vollständige Sequenz des Gens kodiert. Mit Hilfe der *dsd10* cDNA wurde eine cDNA isoliert, welche den gesamten kodierenden Bereich umfasste. Diese cDNA wurde mit *sgel* bezeichnet, stehend für starch granule erosion I. Das abgeleitete SGEI Protein zeigte Homologie zu verschiedenen abgeleiteten Aminosäuresequenzen pflanzlichen ESTs, zu einem unbekanntes Protein aus Arabidopsis (BAB03016), welches 2000 beschrieben wurde und zu einem unbekanntes Protein aus Reis (NP_914782), welches 2004 annotiert wurde. SGEI weist keine Homologie zu bekannten stärkeabbauenden Enzymen auf. Aufgrund der Homologie des unbekanntes Enzyms aus Arabidopsis zu SGEI wurde dieses Protein ASGEI genannt.

Die computergestützte Analyse des SGEI Proteins deutete auf das mögliche Vorhandensein einer Kernlokalisierungs-Sequenz und zweier Leucin-Zipper-Motiven hin. Ein anderer Bereich des Proteins zeigt eine 50 %ige Ähnlichkeit zu den katalytischen Bereichen von Glucoamylasen. Das Arabidopsis-Homolog ASGEI weist diese Bereiche ebenfalls auf. Auffällig ist auch die hohe Homologie zwischen den Proteinen aus Kartoffel, Arabidopsis und Reis im C-terminalen Bereich, welche ebenfalls die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von ESTs aus Espe und Mais aufweisen. In diesem Bereich von 32 Aminosäuren besteht zwischen den verschiedenen Sequenzen eine Identität von 99%. Diese hohe Konservierung der Aminosäureabfolge zwischen den Proteinen der monocotylen und dicotylen Pflanzen ist möglicherweise ein Hinweis auf die Bedeutung dieses Bereiches für die katalytische Aktivität der Proteine. In diesem Sequenzbereich befindet sich auch das konservierte Glucoamylase-Motiv.

Das in *E. coli* exprimierte DSD10 Protein, wie auch das rekombinante SGEI Protein, zeigt α -Amylase-Aktivität, ohne dabei erkennbare Homologien zu bekannten α -Amylasen zu besitzen. Die α -Amylase-Aktivität der Proteine konnte durch ein spezifisches α -Amylase-Substrat und die Analyse der Abbauprodukte, nach Inkubation des rekombinanten DSD10 Proteins mit löslicher Stärke, nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob das Glucoamylase-Motiv möglicherweise an der α -Amylase-Aktivität beteiligt ist, wurde dieses Motiv aus dem SGEI Proteins entfernt. Die Entfernung des Glucoamylase-Motivs führte zum Verlust der α -Amylase-Aktivität des SGEI Proteins. Dieses Ergebnis kann dahingehend gewertet werden, dass dieses Motiv für die katalytische Aktivität des Proteins wichtig ist oder dass durch das Entfernen dieses Bereiches die Konformation des Proteins so verändert wurde, dass es seine katalytische Aktivität verlor.

Als Produkt einer Glucoamylase-Aktivität entsteht Glucose. Für das rekombinante DSD10 Protein konnte jedoch gezeigt werden, dass als Produkt des Abbaus von löslicher Stärke verschieden lange Maltooligosaccharide entstehen. Wenn man annimmt, dass das Glucoamylase-Motiv für die hydrolytische Aktivität des Proteins notwendig ist, so bewirkt es in DSD10 die Freisetzung von Maltooligosacchariden aus löslicher Stärke und nicht von Glucose, wie für Glucoamylasen beschrieben.

V.3.1 Importexperimente deuten auf die plastidäre Lokalisation des SGEI Proteins hin

Für die Beteiligung des SGEI Proteins am Abbau der Stärke in Zellen, die subzelluläre Integrität aufweisen, ist eine plastidäre Lokalisation notwendig. SGEI besitzt nach computergestützter Voraussage kein plastidäres Transitpeptid. Zur Feststellung der subzellulären Lokalisation von SGEI wurden *in vitro* Importexperimente mit isolierten Erbsenchloroplasten durchgeführt. Für diese Experimente wurde ein radioaktiv markiertes chimäres Protein, bestehend aus den 100 N-terminalen Aminosäuren des SGEI Proteins und dem GFP Protein, verwendet. Dies war notwendig, da die erzielte Menge an radioaktiv markiertem *in vitro* transkribiertem und translatiertem SGEI Protein zu gering ausfiel, um Importexperimente durchführen zu können. Die geringe Ausbeute an *in vitro* hergestelltem Protein ist wahrscheinlich auf die Größe des Proteins von ca. 87 kDa zurückzuführen.

Die mit dem chimären Protein durchgeführten Importexperimente wiesen auf eine mögliche plastidäre Lokalisation hin, da nach Thermolysin Behandlung der Plastiden weiterhin das radioaktiv markierte Produkt zu detektieren war und erst nach Zerstörung der Plastiden das chimäre Protein abgebaut wurde. Es konnte kein Größenunterschied zwischen dem Translationsprodukt und der importierten Form beobachtet werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die 100 N-terminalen

Aminosäuren des SGEI Proteins zwar für ein Transitpeptid kodieren, die Schnittstelle zwischen Transitpeptid und dem reifen Protein jedoch nicht in diesem Bereich enthalten ist. Es könnte auch der Fall sein, dass das chimäre Protein eine Konformation einnimmt, in der der Schnitt nicht erfolgen kann.

Für plastidär lokalisierte Proteine konnte gezeigt werden, dass, relativ zur Schnittstelle zwischen Transitpeptid und dem reifen Protein, in Position -3 häufig ein Isoleucin oder Valin anzutreffen ist, und in Position -6 bis -10 gewöhnlich ein Arginin zu finden ist (von Heijne et al., 1989; Gavel und von Heijne, 1990). Eine weitere Analyse der SGEI Proteinsequenz ergab, dass die Schnittstelle zwischen Transitpeptid und der reifen Form des SGEI Proteins möglicherweise zwischen den Aminosäuren 145 und 155 lokalisiert sein könnte. An Position -3 zur möglichen Schnittstelle befindet sich ein Valin, an Position -10 ein Arginin. Zusätzliche Importexperimente sollen mit den 200 N-terminalen Aminosäuren des SGEI Proteins erfolgen. Zusätzlich soll die Lokalisation *in vivo* durch chimäre GFP Proteine gezeigt werden, die aus dem SGEI Protein und dem GFP Protein bestehen. Wie unter I.2.2.1.1 angeführt, ist ein neuer Importmechanismus für Glykoproteine in Chloroplasten beschrieben worden (Villarejo et al., 2005; Faye und Daniell, 2006). Möglicherweise wird SGEI über diesen Weg in Chloroplasten transportiert. Weitere Experimente hierzu sollten darüber Aufschluss geben.

V.3.2 Northern-Blot Experimente weisen auf die Existenz unterschiedlich großer SGEI Transkripte hin

Aufgrund der geringen Mengen an *sgel* Transkript gestalteten sich Northern-Blot Experimente zur Bestimmung der *sgel* Transkriptmenge in verschiedenen Organen der Kartoffelpflanze als sehr schwierig. Nur mittels radioaktiv markierter *sgel* »antisense« RNA, dem Entfernen unspezifisch gebundener RNA mittels RNase und langen Expositionszeiten konnten diese Experimente durchgeführt werden. Als Ergebnis zeigte sich, dass nicht nur ein *sgel* Transkript detektiert werden konnte, sondern, abhängig vom untersuchten Gewebe und den äußeren Einflüssen, bis zu drei unterschiedlich große Transkripte. Die detektierten Transkripte wiesen Größen von ca. 3.5 kb, 3.1 kb und 1.6 kb auf. Da unter sehr stringenten Bedingungen gearbeitet wurde, schließen sich unspezifische Bindungen der radioaktiv markierten *sgel* »antisense« RNA aus.

Dieses Resultat deutet auf die Möglichkeit hin, dass das *sgel* Gen für drei unterschiedlich lange Transkripte kodiert. Der Vergleich der *sgel* und *dsd10* cDNA zeigte, dass sich die *dsd10* cDNA im 5' Bereich von der *sgel* cDNA in sieben Basenpaaren unterschied. Möglicherweise entsteht das 1.6 kb große Transkript durch differentielles Spleißen. Differentiell gespleißte mRNAs besitzen immer dieselben 5'-Enden. Die *dsd10* und *sgel* cDNA's unterscheiden sich jedoch in ihrem 5'-Ende

voneinander. Möglicherweise umfasst die *dsd10* cDNA nicht die Vollängen-Sequenz der möglichen Spleißvariante. Durch differenzielles Spleißen könnte auch das 3.1 kb große Transkript entstanden sein. Weitere, noch durchzuführende Experimente sollten hierüber Aufschluss geben. Eine interessante Fragestellung ist auch, welche physiologische Bedeutung dieser Vorgang haben könnte. Aufgrund der nahezu identischen Sequenz der *dsd10* und *sgel* cDNAs ist es unwahrscheinlich, dass verschiedene Gene für diese cDNAs kodieren.

V.3.3 Die antisense Inhibierung des *sgel* Gens führt zu einem Hochstärke-Phänotyp in Blättern und damit zu einem Anstieg des Trockengewichts.

Zur funktionellen Analyse des SGEI Proteins wurden Pflanzen erzeugt, die eine verminderte Expression des SGEI Proteins aufweisen sollten. Die generierten SGEI »antisense« Pflanzen wurden zunächst auf das Vorhandensein eines Hochstärke-Phänotyps hin durchmustert, da sich wie unter V.3.2 beschrieben, die Northern-Blot Analyse aufgrund der niedrigen Transkriptmenge von *sgel* schwierig gestaltete.

Nach der Durchmusterung der α -*sgel* Primärtransformanten konnten drei Linien isoliert werden, welche einen Hochstärke-Phänotyp zeigten. Die »antisense« Inhibierung des *sgel* Gens erfolgte in diesen Pflanzen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. Zur antisense Inhibierung wurden die Basenpaare 1694 bis 2792 der *sgel* cDNA verwendet, welche der *dsd10* cDNA entsprechen. Auch Tabakpflanzen, welche mit demselben Konstrukt transformiert wurden, wie für Kartoffel verwandt, zeigten einen Hochstärke-Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Ebenso Kartoffelpflanzen, welche mit einem *sgel* »antisense« Konstrukt transformiert wurden, welches unter der Kontrolle des blattspezifischen L700 Promotors stand (Daten nicht gezeigt).

Die auf Grund ihres Hochstärke-Phänotyps selektierten Linien wurden mittels semiquantitativer RT-PCR auf die Reduktion der *sgel* Transkriptmenge untersucht. Jene Linien, welche einen Hochstärke-Phänotypen aufwiesen, zeigten ebenfalls eine Reduktion der *sgel* Transkriptmenge. Die Isolation von transgenen Pflanzen aufgrund eines Hochstärke-Phänotyps wurde auch in transgenen Tomatenpflanzen durchgeführt, die in ihrer R1-Aktivität inhibiert sein sollten. Die Pflanzen, welche einen Hochstärke-Phänotyp aufwiesen, zeigten ebenfalls eine Reduktion der R1 Transkript- und Proteinmenge (James R. Lloyd, persönliche Mitteilung).

Wie für die α -*pct-bmyI* Linien gezeigt, führte auch der Hochstärke-Phänotyp der α -*sgel* Linien zu einer Erhöhung des Trockengewichts der Blätter. Dies konnte für Blätter 12 Wochen alter Pflanzen gezeigt werden. Die Erhöhung des Trockengewichts fiel in diesen Linien noch deutlicher aus, als in den entsprechenden α -*pct-bmyI* Linien, was mit dem deutlich höheren Gehalt an Stärke in diesen

Linien korrelierte. Allerdings muss angefügt werden, dass beide Linien nicht gleichzeitig unter identischen Kulturbedingungen wuchsen, was einen Einfluss auf die Menge der gebildeten Stärke ausüben konnte.

V.3.4 Die »antisense« Inhibierung des *sgel* Gens beeinflusst die α - und auch die β -Amylase-Aktivität in Blättern

Die »antisense« Inhibierung des *sgel* Gens führte zu einer Reduktion sowohl der α -Amylase-, wie auch der β -Amylase-Aktivität. Eine signifikante Reduktion der α -Amylase-Aktivität konnte nur für die *α -sgel* Linie #58 beobachtet werden, die anderen beiden Linien #51 und #56 zeigen eine nicht signifikante Reduktion dieser Aktivität. Dieses Ergebnis wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Linie #58 auch in der semiquantitativen RT-PCR Analyse die stärkste Reduktion in der *sgel* Transkriptmenge zeigte. Die verbleibende α -Amylase-Aktivität in den *α -sgel* Linien deutet auf das Vorhandensein weitere Gene hin, welche für α -Amylasen kodieren. Dabei könnte es sich um die von Gausing und Kreiberg (1989) beschriebenen α -Amylasen handeln.

Unerwarteter Weise führte die Inhibierung des *sgel* Gens ebenfalls zu einer Reduktion der β -Amylase-Aktivität. Für zwei *α -sgel* Linien, #51 und #58, konnte eine signifikante Reduktion dieser Aktivität nachgewiesen werden. Besonders drastisch stellte sich die Reduktion der β -Amylase-Aktivität für die Linie #58 dar, welche gegenüber der Kontrolle nur noch eine β -Amylase-Aktivität von 3% aufwies. Northern-Blot Experimente bestätigten diese Ergebnisse und zeigten für die Linie #58 das Fehlen der *pct-bmyI* und *cf-beta* Transkripte, wohingegen für die Linie #51 nur eine Reduktion der *pct-bmyI* Transkriptmenge zu beobachten war. Eine Linie, in denen beide β -Amylase-Aktivitäten mittels »antisense« Technik reprimiert wurde, zeigte eine β -Amylase-Aktivität von ca. 8% und wies einen Hochstärke-Phänotyp auf (Daten nicht gezeigt). Die Reduktion der CF-BETA-Aktivität führte nicht zu einem Hochstärke-Phänotyp, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der beobachtete Hochstärke-Phänotyp allein auf die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt).

Da die Inhibierung des PCT-BMYI Proteins schon allein zu einem Hochstärke-Phänotyp führt, könnte die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität zu dem beobachteten Phänotyp der Pflanzen führen. Aufgrund dieser Beobachtungen bleibt die Interpretation der Rolle von SGEI in der Mobilisierung der transitorischen Stärke in Blättern schwierig.

Vergleicht man die Ergebnisse, die mit den *α -pct-bmyI* Linien und den *α -sgel* Linien gewonnen wurden, so zeigt sich, dass die Pflanzen der *α -sgel* Linien einen stärker ausgeprägten Hochstärke-Phänotyp aufwiesen, als Pflanzen, in denen nur alleine die β -Amylase-Aktivität reduziert

war. Zu den Ergebnissen zählt die Menge an akkumulierter Stärke, die Beobachtung der vergrößerten Stärkekörner der α -*sgeI* Linie #58, die nur in dieser beobachtet werden konnte, und ein höheres Trockengewicht der α -*sgeI* Linien gegenüber den α -*pct-bmyI* Linien. Die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität trägt sicher zu dem beobachteten Hochstärke-Phänotyp der α -*sgeI* Linien bei, lässt sich aber nicht nur alleine durch die Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität erklären.

Arabidopsis Mutanten, welche einen Hochstärke-Phänotypen zeigen, weisen eine erhöhte β -Amylase-Aktivität auf (Caspar et al., 1989; Zeeman et al., 1998b; Critchley et al., 2001) um möglicherweise das Fehlen stärkeabbauender Aktivitäten zu kompensieren. Umgekehrt zeigen transgene Kartoffelpflanzen, die eine Reduktion der β -Amylase-Aktivität aufweisen, keine Veränderung in der α -Amylase-Aktivität. Unklar bleibt, wie die Inhibierung der SGEI-Aktivität zu einer Reduktion der β -Amylase-Aktivität führte. Möglicherweise besitzt das SGEI Protein neben seiner α -Amylase-Aktivität auch noch regulatorische Eigenschaften, welche die Expression von Genen, kodierend für stärkeabbauende Enzyme, beeinflussen. Ausgeschlossen werden kann eine »antisense« Reprimierung der β -Amylase-Aktivität aufgrund einer Homologie der verwendeten *dsd10* cDNA zu β -Amylase Sequenzen.

Von einem Positionseffekt durch die in das Genom eingeführte *dsd10* »antisense« DNA ist ebenfalls nicht auszugehen, da die Reduktion der β -Amylase-Aktivität in zwei verschiedenen Linien beobachtet werden konnte und die Reduktion in beiden Linien für beide β -Amylase Isoformen unterschiedlich ausfiel. Letztlich bleibt anzumerken, dass auch die α -*sgeI* Linie #56 einen Hochstärke-Phänotyp zeigte, jedoch nicht signifikant in ihrer β -Amylase-Aktivität inhibiert war. Dieses Ergebnis deutet ebenfalls daraufhin, dass nicht nur die Reduktion der β -Amylase-Aktivität zu dem beobachteten Hochstärke-Phänotyp führte.

Für die SGEI »antisense« Linien, welche einen Hochstärke-Phänotyp zeigten, konnte eine signifikante Erhöhung der D-Enzym-Aktivität gemessen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen zur *sex4* Mutante. Auch diese Pflanzen zeigten einen Hochstärke-Phänotyp und wiesen eine signifikante Erhöhung der D-Enzym-Aktivität auf (Zeeman et al., 1998b). Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass durch die Erhöhung der D-Enzym-Aktivität der Reduktion anderer stärkeabbauender Aktivitäten entgegengewirkt werden soll.

V.3.5 Der Hochstärke-Phänotyp der Blätter ist auf die Akkumulation der Stärke über die Vegetationsperiode hinweg zurückzuführen

Wie für transgenen Kartoffelpflanzen beschrieben, die eine Reduktion der PCT-BMYI-Aktivität aufwiesen, führte auch die Inhibierung des *sgel* Gens in Kartoffelpflanzen zu einer Akkumulation der transitorischen Stärke über die Vegetationsperiode und somit zu einem Hochstärke-Phänotyp.

Für die α -*sgel* Linien #51 und #58 konnte nachgewiesen werden, dass sie während der Dunkelperiode weniger Stärke mobilisieren als die untransformierte Kontrolle. Für die Linie #51 war dies nur in Blättern 11 Wochen alter Pflanzen zu beobachten, für die Linie #58 konnte dies auch für Blätter 6 Wochen alter Pflanzen gezeigt werden. Für die α -*sgel* Linie #56, welche auch einen Hochstärke-Phänotyp zeigte, konnte genauso wie für die Linie #11 der R1 »antisense« Pflanzen kein signifikanter Unterschied in der Menge an mobilisierter Stärke nachgewiesen werden. Das Resultat zu den R1 »antisense« Pflanzen bestätigt das Ergebnis von Lorberth et al. (1996) und macht noch einmal deutlich, dass der beobachtete Hochstärke-Phänotyp auch durch nur geringe, nicht signifikante Unterschiede in der Menge an mobilisierter Stärke über die Dunkelperiode zustande kommen kann.

Die Inhibierung des *sgel* Gens in transgenen Kartoffelpflanzen führte zu einer bis zu 24-fachen Erhöhung des Stärkegehaltes in »source« Blättern gegenüber der untransformierten Kontrolle. Die drastische Erhöhung der Stärkemenge konnte unter verschiedenen Kulturbedingungen nachgewiesen werden. Obwohl α -*sgel* und α -*pct-bmyI* Linien nie nebeneinander unter denselben Bedingungen kultiviert wurden, zeigen die Ergebnisse, dass die 24fache Menge an transitorischer Stärke in Blättern der SGEI »antisense« Linien, gegenüber der untransformierten Kontrolle, wohl nicht nur auf die Reduktion der β -Amylase-Aktivität zurückzuführen war. Die Inhibierung des *rI* Gens führte zu einer fünffachen Erhöhung des Stärkegehaltes in »source« Blättern. Damit konnten die Ergebnisse von Lorberth (1996) bestätigt werden.

Vergleicht man auch hier den Anteil an Stärke, welcher während der Dunkelperiode von der Gesamtmenge der Blattstärke abgebaut wird, so mobilisieren α -*sgel* Linien deutlich weniger Stärke in ihren Blättern, als die entsprechenden Kontrollpflanzen. Dies wurde besonders deutlich in 11 Wochen alten α -*sgel* Linien. Blätter der α -*sgel* Linie #58 mobilisierten nur ca. 4 % ihrer transitorischen Stärke. Diese Beobachtung konnte auch für R1-»antisense« Pflanzen gemacht werden, welche nur 20 – 40 % ihrer Stärke umsetzten (Lorberth, 1996).

Für die α -*sgel* Linie #58 konnte auch gezeigt werden, dass die durchschnittliche Korngröße der Stärkekörner doppelt so groß war, wie bei der untransformierten Kontrolle. Anscheinend führte

der ausgeprägte Hochstärke-Phänotyp dieser Linie zu einer Vergrößerung der Stärkekörner, weil nur noch ein geringer Teil mobilisiert wurde. Dieser geringe Teil an mobilisierter Stärke reichte aber immer noch aus, um eine normale Entwicklung der Pflanze zu gewährleisten. Die beobachtete Vergrößerung der Stärkekörner in Blättern konnte auch für R1 »antisense« Linien (Lorberth, 1996) und für die *sex4* Mutante aus *Arabidopsis* (Zeeman et al., 2002) gezeigt werden.

Neben der beobachteten Akkumulation von Stärke in Blättern der *α-sgeI* Linien konnte gezeigt werden, dass für 14 Tage abgedunkelte Blätter dieser Pflanzen, im Gegensatz zur untransformierten Kontrolle, vital blieben. Dieses Phänomen konnte auch für ganze Pflanzen beobachtet werden. Die beobachtete erhöhte Vitalität der untersuchten SGEI »antisense« Linien beruhte wahrscheinlich auf der erhöhten Verfügbarkeit von Stärke. Da diese Linien weiterhin in der Lage waren, die akkumulierte transitorische Stärke zu mobilisieren, stand ihnen genug Energie zur Verfügung, um ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Interessanterweise führten die 14 Tage Dunkelheit nicht zum Abbau des Chlorophylls und damit wohl auch nicht zum Abbau des Photosyntheseapparates. Dies zeigt, dass der Abbau des Chlorophylls nicht lichtabhängig erfolgt, sondern abhängig vom Energiestatus der Zelle ist.

V.3.6 Die Reduktion der SGEI-Aktivität hat scheinbar keinen Einfluss auf den Stärkeumsatz in kaltgelagerten oder keimenden Kartoffelknollen

Die »antisense« Inhibierung von PCT-BMYI hatte keinen Einfluss auf das kälteinduzierte Süßwerden von Kartoffelknollen. Das gleiche Ergebnis zeigte sich für die untersuchten *α-sgeI* Linien. Knollen der *α-sgeI* Linien zeigten auch kein verändertes Keimverhalten gegenüber den Knollen der untransformierten Kontrolle. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Speicherstärke der Knollen für das kälteinduzierte Süßwerden oder die Keimung in ausreichendem Maße mobilisiert werden kann. Möglicherweise sind weder die beiden beschriebenen β -Amylasen und α -Amylasen (Gausung und Kreiberg, 1989), noch SGEI am Abbau der Speicherstärke beteiligt oder die Verminderung in diesen Aktivitäten wird durch andere Enzyme kompensiert. Vorstellbar ist auch, dass der erreichte Inhibierungsgrad nicht ausreichend war, um einen Effekt beobachten zu können. Ansonsten treffen auch hier die Argumente zu, die schon für das PCT-BMYI Protein diskutiert wurden (siehe V.2.4).

Unter Betrachtung dieser Ergebnisse bleibt der Abbau von Stärke in Kartoffelknollen weiterhin unverstanden. Dies gilt sowohl für den Abbau der Stärke während der Kaltlagerung, als auch während der Keimung. Als Kandidaten für den Stärkeabbau während der Kaltlagerung verbleiben die Enzyme, die von den cDNAs kodiert werden, die im Rahmen dieser Arbeit zwar isoliert, aber nicht näher charakterisiert worden sind (CSD 12, 21 und 23; siehe Tab.4).

V.3.7 Abschließende Betrachtung

In den letzten Jahren konnten deutliche Fortschritte im Verständnis des Abbaus der transitorischen Blattstärke gemacht werden. Zum Verständnis trugen revers-genetische Ansätze, wie in dieser Arbeit beschrieben, oder Arabidopsis-Mutanten bei, welche einen Hochstärke-Phänotyp zeigen. Nach dem momentanen Stand der Forschung wird diskutiert, dass sowohl β -Amylasen (diese Arbeit), als auch Isoamylasen (Delatte et al., 2005) die Stärkekörner direkt angreifen können. Als primäres Produkt des Stärkeabbaus entsteht Maltose (Lloyd et al., 2005). Wenn Maltose nicht über die Chloroplastenmembran transportiert werden kann, führt auch dies zu einem Hochstärke-Phänotyp in Arabidopsis (Niittylä et al., 2004). Für Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass der dreifache knock-out der α -Amylase Gene AtAMY1, AtAMY2 und AtAMY3 zu keiner Änderung in der Abbaurate von transitorischer Stärke führte (Yu et al., 2005).

Die durch den Abbau der Stärke, vermittelt durch die plastidär lokalisierte β -Amylase, entstehende Maltose wird in Arabidopsis nach dem Transport über die Chloroplastenmembran im Zytosol weiterverarbeitet. Dabei spielt DPE2 eine entscheidende Rolle, wie die Untersuchungen von Chia et al. (2004) und Lu und Sharkey (2004) zeigten. Maltose dient DPE2 als Glucosyldonor. DPE2 überträgt dabei ein Glucosemolekül auf wasserlösliche Heteroglucane, welche im Zytosol vorliegen, das andere Molekül Glucose wird freigesetzt (Fettke et al., 2005a, 2006). Arabidopsis DPE2 Mutanten akkumulieren dementsprechend Maltose in Ihren Blättern und zeigen einen Hochstärke-Phänotyp. Für Kartoffel wurde gezeigt, dass DPE2 in Chloroplasten vorliegt. Auch hier führte die Reprimierung der Aktivität zu einem Hochstärke-Phänotyp und zur Akkumulation von Stärke in den Blättern (Lloyd et al., 2004). Diese Beobachtung führt zur Frage der Relevanz des Maltosetransporters in Kartoffel. Außerdem wäre zu klären welches Substrat in Chloroplasten als Akzeptor des Glucosemoleküls dient. Denkbar wären z.B. Stärke und deren Abbauprodukte. Das freigesetzte zweite Glucosemolekül könnte über den Glucosetransporter in das Zytosol transportiert werden (Lloyd et al., 2005). Momentan sieht es so aus, als würden in Arabidopsis und Kartoffeln zwei verschiedene Abbauwege vorliegen, wobei die plastidär lokalisierte β -Amylase in beiden Systemen eine bedeutende Stellung einnimmt.

Welche Rolle SGEI in diesem Zusammenhang spielt, muss die weitere Forschung zeigen. Möglicherweise ist SGEI am Angriff auf die Stärkekörner direkt beteiligt und macht diese für andere beteiligte Enzyme besser zugänglich. Vielleicht besitzt SGEI auch noch regulatorische Eigenschaften und beeinflusst damit den Stärkeabbau. Abschließend bleibt anzumerken, dass trotz der Fortschritte der letzten Jahre noch viele Fragen bezüglich des Abbaus von Stärke zu beantworten sind.

VI Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden cDNAs, kodierend für bisher unbekannte stärkeabbauende Enzyme, aus Kartoffel isoliert und funktionell analysiert. Die Isolation der cDNAs erfolgte mit Hilfe eines Systems, welches sich der funktionellen Expression von cDNA-Bibliotheken in *E. coli* bediente. Die mit diesem System zur Expression gebrachten cDNA-Bibliotheken wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Zum einen handelte es sich um eine blattspezifische Phagen-cDNA-Bibliothek (Proben wurden während des Tag/Nacht Übergangs genommen), zum anderen um eine knollenspezifische cDNA-Bibliothek aus kaltgelagerten Knollen. Nach der Überführung der Phagen-Bibliotheken in Plasmid-Bibliotheken wurden diese funktionell in dem *E. coli* Stamm KV832 exprimiert. Der Stamm KV832 wurde aufgrund seiner Fähigkeit, lineare Glucane zu akkumulieren, ausgewählt. Werden Glucan akkumulierende KV832 Kolonien mit Jod bedampft, so zeigen diese eine typische Blaufärbung. Nach der Expression der Plasmid-Bibliotheken in KV832 wurden solche Kolonien weiter untersucht, welche in ihrer Färbung von den blauen Kolonien abwichen. Mittels eines zweiten *E. coli* Stamms, PGM⁻, welcher ebenfalls in der Lage ist, lineare Glucane zu akkumulieren, wurden die Ergebnisse für KV832 bestätigt.

Die funktionelle Expression der Bibliotheken führte zur Isolation einer Reihe von unbekanntem cDNAs. Zwei dieser cDNAs wurden im Rahmen dieser Arbeit weiterführend untersucht. Zum einen handelte es sich um eine cDNA, die für eine bis dahin unbekannte β -Amylase aus Kartoffel kodierte und deren Homolog aus Arabidopsis (CT-BMY) im Laufe dieser Arbeit von Lao et al. (1999) veröffentlicht wurde, zum anderen um eine cDNA, die für ein unbekanntes Enzym kodierte (DSD10). Das Arabidopsis Homolog zu DSD10 wurde im Zuge der Arabidopsis Genominitiative Ende 2000 publiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die isolierte β -Amylase cDNA für eine funktionelle β -Amylase kodiert und dieses Enzym in der Lage ist, neben löslicher auch rohe Stärke anzugreifen. Lokalisationsexperimente zeigten, dass das Enzym in isolierte Erbsenchloroplasten importiert wurde und dass die 100 N-terminalen Aminosäuren für den Import in die Plastiden ausreichen. Die β -Amylase wurde als PCT-BMYI bezeichnet. Die »antisense«-Inhibierung von PCT-BMYI führte zu einem Hochstärke-Phänotyp der Blätter, sowie zu einem Anstieg der Trockenmasse. Der Hochstärke-Phänotyp ist auf eine Reduktion der Stärkemobilisierung und die daraus folgende Akkumulation der Stärke während der Vegetationsperiode zurückzuführen. Damit konnte erstmals die physiologische Bedeutung einer β -Amylase für den Abbau der transitorischen Stärke gezeigt werden. Kein Einfluss zeigte die »antisense« Inhibierung von PCT-BMYI auf den kälteinduzierten Abbau der Speicherstärke in Knollen. Es konnte auch kein Unterschied im Keimverhalten oder der Entwicklung der neuen Pflanze beobachtet werden.

Ein Teil der Ergebnisse zu PCT-BMYI wurde bereits publiziert (Scheidig et al., 2002).

Die isolierten cDNAs *dsd10*, *sgel* (die Vollängen cDNA zu *dsd10*) und das Arabidopsis Homolog *asgel* kodieren für Enzyme, welche α -Amylase-Aktivität besitzen, aber keine Homologie zu bekannten α -Amylasen aufweisen. Ein mögliches Glucoamylase Motiv erwies sich für die Aktivität des Proteins als essentiell. Lokalisationsexperimente deuteten auf den Import des SGEI Proteins in isolierte Erbsenchloroplasten hin. Die »antisense«-Inhibierung von *sgel* führte in den entsprechenden Linien zu einem Hochstärke-Phänotyp in Blättern, einem Anstieg der Trockenmasse in Blättern, sowie zu größeren Stärkekörnern in einer der untersuchten Linien. Ein nicht erwarteter Effekt zeigte sich in Blättern der entsprechenden Linien, welche für längere Zeit dunkel gehalten wurden. Die Blätter der untransformierten Kontrolle waren abgestorben, wohingegen die Blätter der SGEI »antisense« Linien grün und vital erschienen. Die α - und β -Amylase-Aktivität war in Blättern der SGEI »antisense« Linien reduziert, weshalb eine genaue Zuordnung der Funktion von SGEI nicht möglich war. Die vorliegenden Ergebnisse zu den SGEI »antisense« Linien deuten aber darauf hin, dass der beobachtete Hochstärke-Phänotyp nicht alleine auf die Reduktion der β -Amylase-Aktivität zurückzuführen ist. Ein Einfluss von SGEI auf den kälteinduzierten Abbau der Speicherstärke konnte nicht beobachtet werden. Es konnte auch hier kein Unterschied im Keimverhalten oder der Entwicklung der neuen Pflanze beobachtet werden.

VI Summary

In the presented work, previously unidentified starch metabolic genes from potato were isolated and functionally characterized. Gene isolation proceeded using a cDNA library system that allows the functional expression of potato genes in *E. coli*. The generated libraries included 1) a phage vector-based, leaf-specific cDNA library generated from mRNA isolated during the day/night transition and 2) a phage vector-based, tuber-specific cDNA library generated from mRNA isolated from potato tubers after cold storage. After *in vivo* mass excision of the phage library, the resulting plasmid libraries were functionally expressed in *E. coli* strain, KV832. This strain was selected for its ability to accumulate linear glucans. Reaction with iodine vapour in glucan-producing KV832 colonies results in a characteristic blue hue. The expression library was thus screened for colonies in which the blue hue was diminished, a potential indicator of the expression of starch degrading enzymes. Library clones from the selected colonies were reconfirmed in PGM⁻, an alternative *E. coli* that also accumulates linear glucans.

The above expression and screening program allowed isolation of a series of previously uncharacterized cDNA clones. Two such clones were investigated in depth in the remainder of the presented work. The first of these cDNA clones comprised a gene for a hitherto unidentified β -amylase function. The second encoded a functional truncation of a previously unknown enzyme, and was designated DSD10. The full length version of this gene was isolated and designated *sgel*. Homologs of both full-length genes have since been identified in Arabidopsis: the former was published as CT-BMY by Lao et al. (1999), while the latter was published in the course of the Arabidopsis Genome Initiative at the end of 2000.

Demonstrated in the course of this work is that the first of these isolated amylase cDNAs encodes a functional β -amylase enzyme that hydrolyses raw as well as soluble starch. Enzyme localization experiments showed that the 100 N-terminal amino acids are sufficient to effect import into isolated pea chloroplasts, which is supportive of plastid-targeted localization in potato. This novel β -amylase was designated as PCT-BMYI. Whole-plant antisense inhibition of PCT-BMYI in the potato plant resulted in a high-starch phenotype in the leaf, as well as to an increase in leaf dry weight. The high-starch phenotype was caused by a reduction in starch mobilization and the resulting accumulation of starch during the vegetative phase. This represents the first demonstration of the physiological role of a β -amylase in the metabolism of transitory starch deposits. In contrast to its role in the leaf, antisense inhibition of PCT-BMY1 resulted in no observable alteration in cold-induced metabolism of storage starch in the potato tuber. Additionally, inhibition of PCT-BMY1 resulted in no observable alteration in tuber sprouting, nor in the development of the potato plants.

A portion of the results regarding PCT-BMYI have been published (Scheidig et al., 2002).

The second isolated gene, *sgeI*, and its Arabidopsis homolog, *asgeI*, encode enzymes with α -amylase activity, but neither show homology to known α -amylases. A putative glucoamylase motif, however, was found to be essential for activity of the *sgeI* gene product, SGEI. As was the case for PCT-BMY1, localization experiments demonstrated import of SGEI into isolated pea chloroplasts, again suggesting plastid localization in potato. Antisense inhibition of *sgeI* in potato lead to a high-starch phenotype in the leaf and an increase in the leaf dry weight, but also to an increase in starch granule size in one of the studied potato lines. Longer term storage of such lines in the absence of light resulted in an unexpected phenomenon. While the wild type control leaves withered and died within days, the *sgeI* antisense lines appeared green and healthy for over two weeks. The reason for this may be the metabolism of the stored, hyper-accumulated starch, both due to and despite the initial antisense suppression of *sgeI*. The exact roll of SGEI in these experiments was complicated by the observed simultaneous suppression of both α - und β -amylase activity in the *sgeI* antisense lines. The clear quantitative differences in the observed high-starch phenotypes of the *sgeI* and PCT-BMY1 lines, however, suggest that these phenotypic differences were not due to suppression of β -amylase activity alone. SGEI suppression resulted in no observed differences in sprouting, development of potato plants, or in the metabolism of storage starch in the potato tuber.

VII. Literaturverzeichnis

- Abel, G.J.W., Springer, F., Willmitzer, L. und Kossmann, J.** (1996). Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) Plant J. **10**, 981-991.
- Akazawa, T. und Hara-Nishimura, I.** (1985). Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plant cells. Ann. Rev. Plant. Physiol. **36**, 441-472.
- Albrecht, T.** (1998). Quatärstruktur, Funktion und Lokalisation der Pho1-Phosphorylasen aus *Solanum tuberosum* L., Doktorarbeit, Universität Potsdam.
- Asatsuma, S., Sawada, C., Itoh, K., Okito, M., Kitajima, A und Mitsui, T.** (2005) Involvement of alpha-amylase I-1 in starch degradation in rice chloroplasts. Plant Cell Physiol., **46**, 858-869
- Baba, T. und Kainuma, K.** (1987). Partial hydrolysis of sweet-potato starch with β -amylase. Agri. Biol. Chem. **51**, 1365-1371.
- Ball, S.G., van der Wall, M.H.B.J. und Visser, R.G.F.** (1998). Progress in understanding the biosynthesis of amylose Trends in Plant Science **3**. 462-467.
- Ballicora, M.A., Laughlin, M.J., Fu, Y., Okita, T.W., Barry, G. und Preiss, J.** (1995). Adenosine-5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase from potato tuber. Plant Physiol. **109**, 245-251.
- Beck, E. und Ziegler, P.** (1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **40**, 95-117.
- Bernfeld, P.** (1955). Amylases, α and β . Methods Enzymol. **1**, 149-158.
- Bevan, M.** (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucleic Acids Res. **12**, 8711-8721.
- Bojsen, K., Yu, S., Kragh, K.M. und Marcussen, J.** (1999a). A group of alpha-1,4-glucan lyases and their genes from the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: purification, cloning, and heterologous expression. Biochim. Biophys. Acta **1430**, 396-402.
- Bojsen, K., Yu, S. und Marcussen, J.** (1999b). A group of alpha-1,4-glucan lyase genes from the fungi *Morchella costata*, *M. vulgaris* and *Peziza ostracoderma*. Cloning, complete sequencing and heterologous expression. Plant Mol. Biol. **40**, 445-454.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming rec A *Escherichia coli* strain with β -Galactosidase selection. BioTechniques **5**, 376-378.
- Burton, R.A., Bewley, J.D., Smith, A.M., Bhattacharyya, M.K., Tatge, H., Ring, S., Bull, V., Hamilton, W.D.P., and Martin, C.** (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. Plant J. **7**, 3-15.
- Bustos, R., Fahy, B., Hylton, C.M., Seale, R., Nebane, N.M., Edwards, A., Martin, C. und Smith, A.M.** (2004). Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. Proc Natl Acad Sci U S A **101** 2215-2220.
- Caspar, T., Lin, T.-P., Monroe, J., Bernhard, W., Spilatro, S., Preiss, J. und Sommerville, C.** (1989). Altered regulation of β -amylase activity in mutants of *Arabidopsis thaliana* with lesions in starch metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 5830-5833.
- Caspar, T., Lin, T.-P., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J. und Somerville, C.R.** (1991). Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. Plant Physiol. **95**, 1181-1188.
- Chen, H.H. und Gusta, L.V.** (1983). Abscisic acid induced freezing resistance in cultured plant cells. Plant Physiol. **72**, 245-252.
- Chen, M.H., Huang, L.F., Li, H.M., Chen, Y.R. und Yu, S.M.** (2004) Signal peptide-dependent targeting of a rice α -amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells. Plant Physiol., **135**, 1367-1377
- Chia, T., Thorneycroft, D., Zeeman S.C., Smith, S.M. und Smith, A.M.** (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. Plant J **37**, 853-863
- Chiba, S.** (1988). α -Glucosidase. In Handbook of Amylases and Related Enzymes, Hrsg. Amylase Research Society of Japan, Oxford, Pergamon Press, pp. 104-116.
- Creuzat-Sigal, N., Latil-Damotte, M., Cattaneo, J. und Puig, J.** (1972) Genetic analysis and biochemical characterization of mutants impairing glycogen metabolism. In: Biochemistry of the glycoside linkage, Hrsg. Piras, R. und Pontis, H.G., Academic Press New York, USA, pp. 647-680.
- Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M. und Smith, S.M.** (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. Plant J. **26**, 89-100.
- Crow, J.M., Crowe, L.M., Leslie, S.B., Fick, E.** (1993). Mechanisms of stabilisation of dry biomolecules in anhydrobiotic organisms. In: Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress. Current Topics in Plant Physiology, Vol. 10, Hrsg. Close, T.J. und Bray, E.A., American Society of Plant Physiologists.

- Daussant, J., Zbaszyniak, B., Sadowski, J. und Wiatroszak, I.** (1981). Cereal β -amylase: immunochemical study on two enzyme-deficient inbred lines in rye. *Planta* **151**, 176-179.
- Davis, S.J. und Vierstra, R.** (1996). Soluble derivatives of green fluorescent protein (GFP) for use in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **36**, 521-528.
- Deblaere, R., Bytebier, B., de Greve, H., Debroeck, F., Schell, J., van Montagu, M. und Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors of Agrobacterium mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4777-4788.
- Delatte T, Trevisan M, Parker ML, Zeeman SC** (2005) Arabidopsis mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J.*, **41**, 815-830.
- Delatte T, Umhang M, Trevisan M, Eicke S, Thorneycroft D, Smith SM, Zeeman SC** (2006) Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *J. Biol. Chem.*, **281**, 12050-12059.
- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H. und Smith, A.M.** (1996b). The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J.*, **10**, 1135-1143.
- Dietze, J., Blau, A. und Willmitzer, L.** (1995). Agrobacterium-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) In: Gene transfer to plants. Hrsg. Potrykus, I. and Spangenberg G., Springer-Verlag, Berlin. pp 24-29.
- Doehlert, D.C. und Knutson, C.A.** (1991). Two classes of starch debranching enzymes from developing maize kernels. *Plant Physiol.* **13**, 566-572.
- Duwenig, E.** (1996). Untersuchungen zur Funktion von α -1,4-Glucan Phosphorylasen in höheren Pflanzen. Doktorarbeit, Universität Potsdam
- Duwenig, E., Steup, M., Willmitzer, L. und Kossmann, J.** (1997). Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *Plant J.*, **12**, 323-333.
- Edwards, A., Marshall, J., Denyer, K., Sidebottom, C., Visser, R.G.F., Martin, C. und Smith, A.** (1995). Biochemical and molecular characterisation of a novel starch synthase from potato tubers. *Plant J.* **8**, 283-294.
- Edwards, A., Fulton, D.C., Hylton, C.M., Jobling, S.A., Gidley, M., Rössner, U., Martin, C. und Smith, A.M.** (1999). A combined reduction in activity of starch synthase II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J.* **17**, 251-261.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und von Heijne, G.** (1999). ChloroP, a neutral network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* **8**, 978-984.
- Faye, L. und Daniell, H** (2006) Novel pathways for glycoprotein import into chloroplasts. *Plant Biotechnol. J.*, **4**, 275-279
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Fettke J., Eckermann, N., Poeste, S., Pauly, M. und Steup, M.** (2004) The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization. *Plant J.*, **39**, 933-946
- Fettke, J., Eckermann, N., Tiessen, A., Geigenberger, P. und Steup, M.** (2005a) Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. *Plant J.*, **43**, 568-585.
- Fettke, J., Poeste, S., Eckermann, N., Tiessen, A., Pauly, M., Geigenberger, P. und Steup, M.** (2005b) Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme. *Plant Cell Physiol.*, **46**, 1987-2004
- Fettke, J., Chia, T., Eckermann, N., Smith, A. und Steup M** (2006) A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J.*, **46**, 668-684
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. und Hirth, L.** (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, **21**, 285-294.
- Frandsen, T.P. und Svensson, B.** (1998). Plant α -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Mol. Biol.* **37**; 1-13.
- Gausing, K. und Kreiberg, J.** (1989). Potato α -amylase genes. International Patent application WO 90/12876.
- Gavel, I. und von Heijne, G.** (1990). A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett.* **261**, 455-458.
- Geigenberger, P. und Stitt, M.** (1993). Sucrose synthase catalyses a readily reaction *in-vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* **189**, 329-339.
- Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, L., Debroeck, H., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M., und Schell, J.** (1984) The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* **3**, 835-846.

- Gross, P. und ap Rees, T.** (1986). Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta*, **167**, 140-145.
- Guy, C.L.** (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 187-223.
- Halmer, P. und Bewley, J.D.** (1982). Control of external and internal factors over the mobilization of reserve carbohydrates in higher plants. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 13 A, Hrsg. Loevus. F.A. und Tanner. W., Springer verlag, Berlin. pp. 784-793.
- Halmer, P.** (1985). The mobilization of carbohydrates in germinated seeds. *Physiol. Veg.* **23**, 107-125.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A. und Kay, S.A.** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**, 2110-2113.
- Hanahan, D.** (1983). Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-580.
- Hay, B. und Short, J.M.** (1992). *Strategies* **5(1)**, 16-18.
- Hehre, E.J., Okada, G. und Genghof, D.S.** (1969). Configurational specificity: Unappreciated key to understanding enzymic reversions and *de novo* glycosidic bond synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **135**, 75-89.
- Hehre, E.J., Brewer, C.F. und Genghof, D.S.** (1979). Scope and mechanism of carbohydrase action. Hydrolytic and nonhydrolytic actions of beta-amylase on alpha- and beta-maltosyl fluoride. *J Biol Chem.* **254**, 5942-50
- Hehre, E.J., Kitahata, S. und Brewer, C.F.** (1986). Catalytic flexibility of glycohydrolases: The hydration of maltal by β -amylase to form 2-deoxymaltose. *J. Biol. Chem.* **261**, 2147-2153.
- Hemberg, T. (1985). **Potato rest. In: Potato physiology. Hrsg. Li, P.H., Academic Press, London, UK. pp. 353-388.**
- Hildebrand, D.F. und Hymowitz, T.** (1981). Role of β -amylase in starch metabolism during soybean seed development and germination. *Plant J.* **16**, 429-434.
- Hill, L.M., Reimholz, R., Schroeder, R., Nielsen, T.H. und Stitt, M.** (1996). The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose-phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. *Plant Cell Environ.* **19**, 1223-1237.
- Hizukuri, S. und Takagi, T.** (1984). Estimation of the distribution of molecular weight for amylose by the low-angle laser-light-scattering technique combined with high-performance gel chromatography. *Carbohydr. Res.* **134**, 1-10.
- Höfgen, R. und Willmitzer, L.** (1990). Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci.* **66**, 221-230.
- Isherwood, F.A.** (1976). Mechanism of starch-sugar conversion in *Solanum tuberosum* L. *Phytochem.* **15**, 33-41.
- Joshi, C.P.** (1987). Putative polaadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucleic Acids Res.* **15**, 9627-9640.
- Kakefuda, G., Duke, S.H. und Hostak, M.H.** (1986). Chloroplast and extrachloroplastidic starch-degrading enzymes in *Pisum sativum* L. *Planta* **168**, 175-182.
- Kakefuda, G. und Duke S.H.** (1989). Characterization of Pea Chloroplast D-Enzyme (4-alpha-d-Glucanotransferase). *Plant Physiol.* **91**, 136-143.
- Kakefuda, G. und Preiss, J.** (1997). Partial purification and charecterization of a diurnally fluctuating novel endoamylase from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **35**, 907-913.
- Kametani, S., Shiga, Y. und Akanuma, H.** (1996). Hepatic production of 1,5-anhydrofructose and 1,5-anhydroglucitol by the third glycogenolytic pathway. *Eur. J. Biochem.* **242**, 832-838.
- Kaplan, F. und Guy, C.L.** (2004). β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiol.* **135**, 1674-1684.
- Kaplan, F. und Guy, C.L.** (2005). *Arabidopsis* beta-amylase8 RNAi lines have impaired maltose accumulation upon cold shock and exhibits increased sensitivity of photosynthetic electron transport chain to freezing stress. *Plant J.* **44**, 730-743.
- Kaplan, F., Sung, D.Y. und Guy, C.L.** (2006). Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiol Plant.* **126**, 120-128.
- Kaushal, G.P., Zeng, Y. und Elbein, A.D.** (1993). Biosynthesis of glucosidase II in suspension-cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 14536-14542.
- Kiel, J.A.K.W., Vossen, J.P.M.J. und Venema, G.** (1987). A general method for the construction of *Escherichia coli* mutants by homologous recombination and plasmid segregation. *Mol. Gen. Genet.* **207**, 294-301.
- Kirch, H.H., van Berkel, J., Glaczinski, H., Salamini, F. und Gebhardt, C.** (1997). Structural organization, expression and promoter activity of a cold-stress-inducible gene of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Mol. Biol.* **33**, 897-909.
- Konishi, G.P., Okamoto, A., Takahashi, J., Aitani, M. und Nakatani, N.** (1994). Effects of Bay m 1099, an alpha-glucosidase inhibitor, on starch metabolism in germinating wheat seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 135-139.
- Konishi, Y., Hashima, K. und Kishida, K.** (2000) Increases in 1,5-anhydroglucitol levels in germinating amaranth seeds and in ripening banana. *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2462-2465.

- Kossmann, J., Abel, G.J.W., Springer, F., Lloyd, J.R. und Willmitzer, L.** (1999). Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue. *Planta* **208**, 503-511.
- Kossmann, J. und Lloyd, J.R.** (2000). Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**, 171-226.
- Kumar, G.N.M. und Knowles, N.R.** (1993). Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum* L.) seed-tubers. *Plant Physiol.* **102**, 115-124.
- Laby, R.J., Kim, D., und Gibson, S.I.** (2001) The ram1 mutant of *Arabidopsis* exhibits severely decreased beta-amylase activity. *Plant Physiol.*, **127**, 1798-1807.
- Lao, N.T., Schoneveld, O., Mould, R.M., Hibberd, J.M., Gray, J.C. und Kavanagh, T.A.** (1999). An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase. *Plant J.* **20**, 519-527.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. und Boedtke, H.** (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem.* **16**, 4743-3751.
- Lin, T-P. und Preiss, J.** (1988). Characterisation of D-enzyme (4- α -glucanotransferase) in *Arabidopsis* leaf. *Plant Physiol.*, **86**, 260-265.
- Lin, T-P., Spilatro, S. und Preiss, J.** (1988). Subcellular localisation and characterisation of amylases in *Arabidopsis* leaf. *Plant Physiol.* **86**, 251-259.
- Lloyd, J.R., Springer, F., Buléon, A., Müller-Röber, B., Willmitzer, L. und Kossmann, J.** (1999). The influence of alterations in ADP-glucose pyrophosphorylase activities on starch structure and composition in potato tubers. *Planta* **209**, 230-238.
- Lloyd, J.R., Blennow, A., Burhenne, K. und Kossmann, J.** (2004) Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDPE2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiol.*, **134**, 1347-1354
- Lloyd, J.R., Kossmann, J. und Ritte, G.** (2005) Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci.*, **10**, 130-137
- Lorberth, R.** (1996). Charakterisierung von RL1: ein neues Enzym des Stärkemetabolismus. Doktorarbeit, Freie Universität Berlin.
- Lorberth, R., Ritte, G., Willmitzer, L. und Kossmann, J.** (1998). Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nature Biotech.* **16**, 473-477.
- Lu, M. und Kleckner, N.** (1994) Molecular cloning and characterization of the *pgm* gene encoding Phosphoglucomutase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**. 5847-5851
- Lu, Y. und Sharkey, T.D.** (2004) The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta*, **218**, 466-473
- Martin, C. und Smith, A.M.** (1995). Starch Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 971-985.
- Matsui, H., Iwanami, S., Ito, H., Mori, H., Honma, M. und Ciba, S.** (1997). Cloning and sequencing of a cDNA encoding alpha-glucosidase from sugar beet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 875-880.
- Mayer, A.** (1895). Untersuchungen über die Stärkekörner, Jena.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M. und Nakamura, K.** (1997a). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J.* **11**, 841-851.
- Mita, S., Hirano, H. und Nakamura, K.** (1997b). Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**. 575-582
- Monroe, J.D., Hall, B.D., Gough, C.M. und Stephen, A.L.** (1997). Nucleotide sequence of an alpha-glucosidase gene (accession no. AF014806) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**, 863.
- Monroe, J.D., Gough, C.M., Chandler, L.E., Loch, C.M., Ferrante, J.E. und Wright, P.W.** (1999). Structure, properties, and tissue localization of apoplasmic α -glucosidase in crucifers. *Plant Physiol.* **119**, 385-397.
- Mori, H., Tanizawa, K. und Fukui, T.** (1991). Potato tuber type H phosphorylase isozyme: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the full-length cDNA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 18446-18453.
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U. und Willmitzer, L.** (1992). Inhibition of the ADP-glucose-pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**, 1229-1238.
- Müller-Thurgau, H.** (1882). Über Zuckerrücklage in Pflanzentheilen in Folge niedrigerer Temperatur. *Landw. Jahrb. Schweiz* **11**, 751-828.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.

- Nakamura, K., Otho, M., Yoshida, N. und Nakamura, K.** (1991). Sucrose-induced accumulation of β -amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato. *Plant Physiol.* **96**, 902-909.
- Nakamura, Y., Umemoto, T., Takahata, Y., Komae, K., Amano, E. und Satoh, H.** (1996). Changes in the structure of starch and enzyme activities affected by *sugary* mutations in developing rice endosperm. Possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin biosynthesis. *Physiol. Plant.* **97**, 491-498.
- Nakano, K. und Fukui, T.** (1986). The complete amino acid sequence of a potato α -glucan phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **261**, 8230-8236.
- Nielsen, T.M., Deiting, U. und Stitt, M.** (1997). A β -amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiol.* **113**, 503-510.
- Niittyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M. und Zeeman SC** (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves, *Science*, **303**, 87-89.
- Niittyla, T., Comparot-Moss, S., Lue, W.L., Messerli, G., Trevisan, M., Seymour, M.D.J., Gatehouse, J.A., Villadsen, D., Smith, S.M., Chen, J.C., Zeeman, S.C. und Smith, A.M.** (2006) Similar protein phosphatases control starch metabolism in plants and glycogen metabolism in mammals. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11815-11818.
- Ohad, I., Friedberg, I., Nèeman, Z. und Schramm, M.** (1971). Biogenesis and degradation of starch. I. The fate of the amyloplast membranes during maturation and storage of potato tubers. *Plant Physiol.* **47**, 465-477.
- Okita, T.W., Greenberg, E., Kuhn, D.N. und Preiss, J.** (1979). Subcellular localization of the starch degradative and biosynthetic enzymes of spinach leaves. *Plant Physiol.* **64**, 187-192.
- Ohnishi, H., Kitamura, H., Minowa, T., Sakai, H. und Ohta, T.** (1992). Molecular cloning of a glucoamylase gene from a thermophilic Clostridium and kinetics of the cloned enzyme. *Eur J Biochem.* **207**, 413-418.
- O'Neill, S.D., Kumagai, M.H., Majumdar, A., Huand, N. und Sutliff, T.D.** (1990). The alpha-amylase genes in *Oryza sativa*: Characterization of cDNA clones and mRNA expression during seed germination. *Mol. Gen. Genet.* **221**, 235-244.
- Peat, S., Whelan, W.J. und Rees, W.R.** (1956). The enzymic synthesis and degradation of starch, part 20, The disproportionating enzyme of potato. *J. Chem. Soc.*, pp. 44-53.
- Preiss, J.** (1991). Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, **7**, 59-114.
- Pueschel, C.M.** (1990). Cell structure. In: *Biology of the red algae*. Hrsg. Cole, K.M. und Sheath, R.G.; Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp 7-41.
- Ritte, G., Lorberth, R. und Steup, M.** (2000). Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules. *Plant Journal.* **21**, 387-91.
- Rocha-Sosa, M., Sonnwald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1989). Both developmental and metabolic signals activate the promoter of the class I patatin gene. *EMBO J.* **66**, 23-29.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.**, (1989). *Molecular cloning: A laboratory course manual*. 2. Ed., Cold spring Harbour Press, NY, USA.
- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M. und Mikami, B.** (2000). Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochem.* **35**, 711-715.
- Scheidig, A.** (1997) Molekulare Analyse des "Cold-Sweetening" von Kartoffelknollen unter Zuhilfenahme transgener Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.). Diplomarbeit eingereicht an der Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Scheidig, A., Fröhlich, A., Schulze, S., Lloyd, J. R. und Kossmann, J.** (2002). Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotyp in leaves. *Plant J.* **30**, 581-591.
- Schleucher, J., Vanderveer, P.J. und Sharkey, T.D.** (1998). Export of carbon from chloroplasts at night. *Plant Physiol.* **118**, 1439-1445.
- Schneider, A., Salamini, F. und Gebhardt, C.** (1997). Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene *ci2IA* of potato. *Plant Physiol.* **113**, 335-345.
- Schulze, S., Mant, A., Kossmann, J. und Lloyd, J.R.** (2004). Identification of an Arabidopsis inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplasts. *FEBS Lett.* **565**, 101-105
- Sehnke, P.C., Chung, H.J., Wu, K. und Ferl, R.J.** (2001). Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 765-770.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y. und Shinozaki, K.** (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**, 61-72.
- Sierks, M.R., Ford, C., Reilly, P.J. und Svensson, B.** (1990). Catalytic mechanism of fungal glucoamylase as defined by mutagenesis of Asp176, Glu179 and Glu180 in the enzyme from *Aspergillus awamori*. *Protein Engin.* **3**, 193-8.
- Smith, A.M., Denyer, K. und Martin, C.** (1997). The synthesis of the starch granule. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.*, **48**, 67-87.

- Smith, A.M., Zeeman, S.C., Smith, S.M.** (2005) Starch degradation. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **56**, 73-98.
- Smith, S.M., Fulton, D.C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeemann, S.C. und Smith, A.M.** (2004) Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **136**, 2687-2699.
- Sonnwald, U., Basner, A., Greve, B. und Steup, M.** (1995). A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: Cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol.Biol.* **27**, 567-576.
- Sparla, F., Costa, A., Lo Schiavo, F., Pupillo, P. und Trost, P.** (2006). Redox regulation of a novel plastid-targeted beta-amylase of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **141**, 840-50.
- Steup, M., Robenek, H. und Melkonian, M.** (1983). In-vitro degradation of granules isolated from spinach chloroplasts. *Planta* **158**, 428-436.
- Steup, M.** (1988). Starch degradation. In: *The biochemistry of plants Vol 14*. San Diego: Academic press. pp 255-295.
- Stitt, M. und Held, H.W.** (1981) Simultaneous synthesis and degradation of starch in spinach chloroplasts in the light. *Biochem. Biophys. Acts* **638**, 1-11.
- Stitt, M.** (1984). Degradation of starch in chloroplasts: a buffer to sucrose metabolism. In: *Storage carbohydrates in vascular plants*, Hrsg. Lewis, H., Cambridge University Press: 205-229.
- Stitt, M., McLilley, R., Gerhardt, R. und Heldt, H.W.** (1989). Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. In: *Methods in Enzymology*, Hrsg. Fleischer, S. and Fleischer, B. Academic Press Ltd., London, UK, pp. 518-552.
- Stitt, M.** (1990). The flux of carbon between the chloroplast and cytoplasm. In: *Plant physiology, biochemistry and molecular biology*, Hrsg. Dennis, D.T. und Turpin, D.H., Longman Scientific and Technical, Harlow, pp. 309-326.
- Stockhaus, J., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1989). Correlation of the expression of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1 with the presence of chloroplasts. *EMBO J.* **8**, 2445-2451.
- Sugimoto, M., Furui, S. und Suzuki, Y.** (1997). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding alpha-glucosidase from spinach. *Plant Mol. Biol.* **33**, 765-768.
- Sun, Z. und Henson, C.A.** (1990). Degradation of native starch granules by barley α -glucosidases. *Plant Physiol.* **94**, 320-327.
- Sun, Z. und Henson, C.A.** (1991). A quantitative assessment of the importance of barley seed alpha-amylase, beta-amylase, debranching enzyme, and alpha-glucosidase in starch degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 298-305.
- Sun, Z., Duke, S.H. und Henson, C.A.** (1995) The role of pea chloroplast α -glucosidase in transitory starch degradation. *Plant Physiol.* **108**, 211-217.
- Suttle, J.C.** (1995). Postharvest changes in endogenous ABA levels and ABA metabolism in relation to dormancy in potato tubers. *Physiol. Plant.* **95**, 233-240.
- Takaha, T., Yanase, M., Okada, S. und Smith, S.M.** (1993). Disproportionating enzyme (4- α -glucanotransferase; EC 2.4.1.25) of potato. Purification, molecular cloning, and potential role in starch metabolism. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1391-1396.
- Takaha, T., Critchley, J., Okada, S. und Smith, S.M.** (1998). Normal starch content and composition in tubers of antisense potato plants lacking D-enzyme (4- α -glucanotransferase). *Planta* **205**, 445-451.
- Takaha, T. und Smith, S.M.** (1999). The function of 4- α -glucanotransferases and their use for the production of cyclic glucans. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* **16**, 257-279.
- Takeda, Y., Shirasaka, K. und Hizukuri, S.** (1984). Examination of the purity and structure of amylose by gel-permeation chromatography. *Carbohydr. Res.* **132**, 83-92.
- Takeda, Y., Hizukuri, S. und Juliano, B.O.** (1986). Purification and structure of amylose from rice starch. *Carbohydr. Res.* **148**, 299-308.
- Taylor, M.A., George, L.A., Ross, H.A. und Davies, H.V.** (1998). cDNA cloning and characterization of an alpha-glucosidase gene from potato (*Solanum tuberosum* L.) *Plant J.* **13**, 419-425.
- Taylor, M.A., Ross, H.A., McRea, D., Stewart, D., Roberts, I., Duncan, G., Wright, F., Millam, S. und Davies, H.V.** (2000). A potato α -glucosidase gene encodes a glycoprotein-processing α -glucosidase II-like activity. Demonstration of enzyme activity and effects of down-regulation in transgenic plants. *Plant J.* **24**, 305-316.
- Taylor, M.A., Ross, H.A., McRae, D., Wright, F., Viola, R. und Davies, H.V.** (2001) Copy-DNA cloning and characterisation of a potato alpha-glucosidase: expression in *Escherichia coli* and effects of down-regulation in transgenic potato. *Planta*, **213**, 258-264
- Totsuka, A., Nong, V.H., Kadokawa, H., Kim, C.-S., Itho, V. und Fukazawa, C.** (1994). Residues essential for catalytic activity of soybean β -amylase. *Eur. J. Biochem.* **221**, 649-654.
- Trethewey, R.N. und ap Rees, T.** (1994a). A mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking the ability to transport glucose across the chloroplast envelope. *Biochem. J.*, **301**, 449-454.
- Trethewey, R.N. und ap Rees, T.** (1994b). The role of the hexose transporter in the chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L. *Planta*, **195**, 168-174.

- Uwer, U., Willmitzer, L. und Altmann, T. (1998). Inactivation of a glycyl-tRNA synthetase leads to an arrest in plant embryo development. *Plant Cell* **10**, 1277-1294.
- Van De Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.P., Buleon, A., Visser, R. und Ball, S. (1998). Amylose is synthesized *in vitro* by extension of and cleavage from amylopectin. *J. Biol. Chem.* **273**, 22232-22240.
- Vervliet, P., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M. und Schull, J. (1975). Characterisation of different plaque-forming and defective temperent phages in *Agrobacterium* strains. *J. Gen. Virol.* **26**, 33-48.
- Villarejo, A., Buren, S., Larsson, S., Dejardin, A., Monne, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rollands, N., von Heijne, G., Grebe, M., Bako, L. und Samuelsson, G. (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nature Cell Biol.*, **7**, 1124-1131
- Vikso-Nielsen, A., Christensen, T.M.I.E., Bojko, M. und Marcussen, J. (1997). Purification and characterization of β -amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol Plant.* **99**, 190-196.
- von Heijne, G., Steppuhn, J. und Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.*, **180**, 535-545.
- von Schéele, C., Swensson, G. und Rassmunso, J. (1937). Die Bestimmung des Stärkegehaltes und der Trockensubstanz der Kartoffel mit Hilfe des spezifischen Gewichts. *Landw. Vers. Sta.* **127**, 67-96.
- Wadsworth, G. J., Redinbaugh, M. G. und Scandalios, J.G. (1988). A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. *Anal Biochem.* **172**, 279-283
- Waegemann, K. und Soll, J. (1995). Characterization and isolation of the chloroplast protein import machinery. *Methods in Cell Biol.* **50**, 255-67.
- Wang, Q., Monroe, J. und Syolund, R.D. (1995). Identification and characterisation of phloem-specific β -amylase. *Plant Physiol.* **109**, 743-750.
- Weber, A., Servaites, J.C., Geiger, D.R., Kofler, H., Hille, D., Gröner, F., Hebbeker, U. und Flügge, U.I. (2000). Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* **12**, 787-801.
- Weiner, H., Stitt, M. und Held, H.W. (1987). Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochem. Biophys. Acta* **893**, 13-21.
- Weise, S.E., Weber, A.P. und Sharkey, T.D. (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta*. **218**, 474-482.
- Wiese, A., Groner, F., Sonnewald, U., Deppner, H., Lerchl, J., Hebbeker, U., Flugge, U.I. und Weber, A. (1999). Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. *FEBS Lett.* **461**, 13-18.
- Witt, W., Buchholz, A. und Sauter, J.J. (1995). Binding of endoamylase to native starch grains from poplar wood. *J. Exp. Bot.*, **46**, 1761-1769.
- Witt, W., Sauter, J.J. (1996). Purification and properties of a starch granule-degrading α -amylase from potato tubers. *J. Exp. Bot.* **47**, 1789-1795
- Yang, Y., und Steup, M. (1990) Polysaccharide fraction from higher plants, which strongly interacts with the cytosolic phosphorylase isozyme. 1. Isolation and characterization. *Plant Physiol.*, **94**, 960-969
- Yamaguchi, J., Itho, S., Saitoh, T., Ikeda, A., Tashiro, T. und Nagato, Y. (1999). Characterization of β -amylase and its deficiency in various rice cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **98**, 32-38.
- Yu, S., Kenne, L. und Pedersen, M. (1993). Alpha-1,4-glucan-lyase, a new class of starch-glycogen degrading enzyme I. Efficient purification and characterization from red seaweeds. *Biochim. Biophys. Acta* **1156**, 313-320.
- Yu, S. und Pedersen, M. (1993). Alpha-1,4-glucan-lyase, a new class of starch-glycogen-degrading enzyme II. Subcellular localisation and partial amino acid sequence. *Planta* **191**, 137-142.
- Yu, S., Christensen, T.M.I.E., Kragh, K., Bojso, K. und Marcussen, J. (1997). Efficient purification and partial amino acid sequencing of two α -1,4- glucan-lyases from fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **1339**, 311-320.
- Yu, T-S., Kofler, H., Häusler, R.E., Hille, D., Flügge, U-I., Zeeman, S.C., Smith, A.M., Kossmann, J., Lloyd, J., Ritte, G., Steup, M., Lue, W-L., Chen, J. und Weber, A. (2001). The Arabidopsis *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell*, **10**, 1699-1711.
- Yu, T-S., Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Fulton, D.C., Dunstan, H., Lue, W.L., Hegemann, B., Tung, S.Y., Umemoto, T., Chapple, A., Tsai, D.L., Wang, S.M., Smith, A.M., Chen, J. und Smith, S.M. (2005) alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. *J. Biol. Chem.*, **280**, 9773-9779.
- Zeeman, S. C., Umemoto, T., Lue, W. -L., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A. M. und Chen, J. (1998a). A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* **10**, 1699-1711.
- Zeeman, S.C., Northrop, F., Smith, A.M. und ap Rees, T. (1998b). A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastidic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J.* **15**, 357-365.
- Zeeman, S. C., Tiessen, A., Pilling, E., Kato, L., Donald, A., T. und Smith, A. M. (2002). Starch synthesis in Arabidopsis. Granule Synthesis, composition, and structure. *Plant Physiol.*, **129**, 516-529.

Zeeman, S.C., Thorneycroft D, Schupp N, Chapple A, Weck M, Dunstan H, Haldimann P, Bechtold N, Smith AM, Smith SM (2004) Plastidial alpha-glucan phosphorylase is not required for starch degradation in arabidopsis leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant Physiol.*, **135**, 849-858.

Ziegler, P. und Beck, E. (1986). Exoamylase activity in vacuoles isolated from pea and wheat leaf protoplasts. *Plant Physiol.* **82**, 1119-1121.

Publikationen und Patente

Publikationen:

Scheidig, Andreas; Fröhlich, Anja; Schulze, Silke; Lloyd, James R. & Kossmann, Jens (2002)
Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves.
The Plant Journal **30** (5), 581-591.

Patente:

NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING STARCH DEGRADING ENZYMES
WO 02086112

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

Herrn Professor Dr. Jens Kossmann für die wunderbare Idee nach stärkeabbauenden Enzymen zu suchen und sie zu finden. Für die gemeinsame Zeit am MPI, im Labor und beim Tischfußball. Für die Tritte und die Beharrlichkeit mich zum Fertigstellen dieser Arbeit zu treiben. Die Wahrheit liegt auf dem Platz.

Herrn Professor Dr. Lothar Willmitzer für das Bereitstellen der großartigen Infrastruktur am Max-Planck-Institut und für viele wertvolle Diskussionen. Die Zeit am MPI war großartig und ich denke immer wieder gerne an sie zurück.

Herrn Prof. Dr. Martin Steup für die Betreuung der Arbeit seitens der Universität Potsdam, den wertvollen Diskussionen während der gemeinsamen Seminare und der Hilfe beim Einreichen der Arbeit.

allen Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes, die diese Infrastruktur am Laufen halten und zu der tollen Atmosphäre im Großen und Kleinen beitragen.

den Gärtnern und den helfenden Händen in der Gewebekultur ohne die nichts gehen würde. Besonders dir Romy, möchte ich hier ausdrücklich Danken.

der ganzen ehemaligen Gruppe Kossmann die immer füreinander da war und diese Zeit zu einer sehr schönen machte.

besonders Anja Fröhlich für ihre großartige Hilfe mit all den Pflanzen die da so wuchsen und analysiert werden wollten, Ole 1 bis unendlich. Für das Badminton spielen, für die Geburtstagskuchen, für das Fotoalbum, für die wunderbare Zeit.

Silke Schulze für die Hilfe beim Messen der vielen Stärke und Zucker. Für all die Literatur die ich in letzter Zeit brauchte.

Dr. Klaus Pellengahr ohne den ich wohl das Schreiben dieser Arbeit, nach der langen Zeit, dran gegeben hätte. Vielen tausend Dank für deine Hilfe und Beharrlichkeit mich immer wieder dran zu erinnern die Arbeit fertig zu stellen. Ohne dich wäre es nicht gegangen.

Annja die es überhaupt erst ermöglichte diese Arbeit am MPI machen zu können und dafür einiges auf sich nahm. Für deine Hilfe, Liebe und großartige Freundschaft seit nun über 20 Jahren und natürlich für den 11.12.1996.

Finn der mir täglich zeigt, wie wichtig doch andere Dinge im Leben sein können. Ohne dich wäre einfach alles nix.

Stephan, Martijn, Christian, Wayne, Oliver, Ralf, Jörg, Katja, Jochen, Ulla, Anne, Antje, Andrea und den Kindern, dem Hort, meiner Mutter, meinem Vater, meiner Schwester, meinem Bruder, Heidi, Denise, Gabi, Lutz, der Gruppe Molekularbiologie bei der Direvo Biotech AG, Eintracht Frankfurt (SGE), Apple.

Nina die mich immer wieder ermutigte diese Arbeit fertig zu stellen. Dafür dass du mir den Rücken in der heißen Phase freihieltest und für jeden Tag den ich mit dir verbringen darf. Für deine Liebe und Aufrichtigkeit. Wir haben noch viel vor!

Lebenslauf

Name: Andreas Scheidig
Geburtstag, -ort: 08.12.1967 in Frankfurt am Main
Familienstand: ledig
Kinder: Ein Sohn; Finn Luka Tom; 10 Jahre

Schulischer Werdegang

1974 – 1978 Engelbert Humperdinck Grundschule in Frankfurt/M
1978 – 1979 Martin Buber Grundschule in Frankfurt/M
1979 – 1988 Schiller Gymnasium in Frankfurt/M
1988 Abitur

1988 – 1990 Zivildienst

1990 – 1991 Auslandsaufenthalt in Italien

Studium

1991 – 1997 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

12.1996 Mündliche Diplomprüfung im Hauptfach Botanik und den Nebenfächern Biochemie und Mikrobiologie, sowie dem Zusatzfach Pharmazeutische Biologie.

03.1997 – 12.1997 Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Dr. J. Kossmann, betreut durch Prof. Dr. L. Nover und Prof. Dr. L. Willmitzer zum Thema: Molekulare Analyse des »Cold-Sweetenings« von Kartoffelknollen unter Zuhilfenahme transgener Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.)

03.1998 – 06.1998 Mitarbeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung bei Prof. Dr. H. Rohrer

06.1998 – 06.2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie bei Prof. Dr. J. Kossmann. Betreuer am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie Prof. Dr. L. Willmitzer, Betreuer am Institut für Biochemie und Molekulare Pflanzenphysiologie der Universität Potsdam Prof. Dr. M. Steup.

10.2001 – 10.2006 Wissenschaftler in der Abteilung Molekularbiologie bei der DIREVO Biotech AG in Köln

10.2006 – Gruppenleiter der Abteilung Molekularbiologie bei der DIREVO Biotech AG in Köln

Erklärung

Köln, den 30.06.2006

Hiermit erkläre ich, Andreas Scheidig, dass diese Arbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht worden ist sowie selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Mitteln angefertigt wurde.

Andreas Scheidig