Isolierung und Charakterisierung genomischer Sequenzen Phosphatmangel induzierbarer Gene aus Tomate (Lycopersicon esculentum Mill. cv. Lukullus)

Dissertation



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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Fachbereich Biochemie / Biotechnologie

> von Irene Stenzel geboren am 15. Juni 1969 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Dr. C. Wasternack	Institut für Pflanzenbiochemie Halle	
2. Dr. M. Ganal	AG Gen- und Genomkartierung am Institut für Pflanzen- genetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben	
3. Prof. R. R. Mendel	Botanisches Institut und Botanischer Garten der TU Braunschweig	

Halle (Saale), den 03.05.1998

1	Einleitung
2	Material
2.1	Bakterienstämme, Plasmide und Vektoren
2.2	Zellsuspensionskultur
2.3	Pflanzenanzucht
2.4	Verwendete DNA-Banken
	2.4.1 Genomische Tomaten-DNA-Bank
	2.4.2 -Pi-cDNA-Bank
2.5	Medien und Anzuchtbedingungen für die Bakterienkulturen
2.6	Geräte, Chemikalien, Enzyme, Radioisotope u.a. Materialien
2.7	Oligonukleotide
3	Methoden
3.1	DNA-Präparationsmethoden
3.1.1	Isolation genomischer DNA aus Zellsuspensionskulturen und pflanz-
	lichem Gewebe
	3.1.2 Isolation von DNA des Bakteriophagen λ
	3.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> -Stämmen
	3.1.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Agrobacterium tumefaciens
3.2	RNA-Präparationsmethoden
	3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA
	3.2.2 Isolation von mRNA
3.3	DNA-Klonierungstechniken in Escherichia coli
	3.3.1 Herstellung der DNA-Fragmente
	3.3.2 Ligation. Transformation und Selektion rekombinanter Klone
3.4	Hybridisierung von Nukleinsäuren
	3.4.1 Northern-Analyse
	3.4.2 Southern-Analyse
	3.4.3 Koloniehybridisierung
	3.4.4 Plaquehybridisierung
	3.4.5 Markierung der DNA-Sonden
	3.4.6 Hybridisjerungen
3.5	DNA-Sequenzanalyse
0.0	3.5.1 Radioaktive Sequenzierung
	3.5.2 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern
3.6	Screening genomischer DNA-Banken durch Kombination von PCR und
	Filterhybridisierung
3.7	PCR
3.8	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes
0.10	3.8.1 5'RACE-System
	3.8.2 Primerextension
3.9	Single Nukleotide Primer Extension (SNuPE)
3.10	Transiente Transformation der Tomatenzellkultur mittels Partikelkanone
3 11	Transformation von Agrobacterium tumefaciens
3.12	Stabile Transformation von Tomatenkotyledonen durch Agrobakterium-
2.12	vermittelten Gentransfer
3 1 3	Bestimmungen
5.15	3 13 1 Protein
	3 13 2 Phosphat
	citera i nospina internationalitation internationalitational

	3.13.3 Enzyme	
	3.13.3.1 Ribonuklease	
	3.13.3.2 ß-Glucuronidase	
	3.13.3.3 Luciferase	
3.14	In vivo-Exicion von Plasmid-DNA	
3.15	Computergestützte Sequenzanalyse	
4	Ergebnisse	
4.1	Expressionsstudien mittels Northernblot-Analysen	
	4.1.1 Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der Expression der	
	RNasen LE und LX sowie des Klones PSI14 in Abhängigkeit von	
	der Phosphatverfügbarkeit	
	4.1.2 Untersuchungen zur organspezifischen Expression	
	4.1.3 Untersuchung der Induzierbarkeit der RNase-Gene sowie von	
	PSI14 durch Verwundung und Pathogenbefall	
4.2	Isolierung und Charakterisierung von genomischen Klonen für die	
	RNasen LE und LX	
	4.2.1 Southern-Analyse und Chromosomenmapping	
	4.2.2 Isolierung genomischer Klone	
4.3	Analyse der genomischen Sequenz der RNase LE	
	4.3.1 Charakterisierung des genomischen Klones λ gLE-01 und Subklo-	
	nierung genomischer Sequenzen	
	4.3.2 Sequenzanalyse der Subklone	
	4.3.2.1 Der Klon pgLE 5'	
	4.3.2.2 Der Klon pgLE 3'	
4.4	Untersuchung des Promotors der RNase LE	
	4.4.1 Analyse der Phosphatinduzierbarkeit im transienten Test mittels	
	Partikelkanone	
	4.4.1.1 Herstellung der GUS-Konstrukte	
	4.4.1.2 Etablierung eines Testsystems	
	4.4.1.3 Analyse der Promotor LE-GUS-Konstrukte	
	4.4.2 Stabile Transformation von Tomatenpflanzen durch Agrobakte-	
	rium-vermittelten Gentransfer	
	4.4.2.1 Herstellung der Konstrukte und Transformation von	
	1 omatenkotyledonen	
	4.4.2.2 Erzeugung stabil transformierter Tomatenpflanzen durch	
15	Agrouakierium-verinitienen Gentransier	
4.3	4.5.1 Southern-Analyse	
	4.5.2 Klonierung und Charakterisierung eines für PSI1/1 kodierenden	
	genomischen PCR-Fragmentes	
	4.5.3 Isolierung und Charakterisierung genomischer Klone von PSI1/	
	4.5.4 Sequenzanalyse der Subklone	
	4.5.5 Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen für die beiden	
	Gene PSI14/A und PSI14/B	
	4.5.6. Expressionsanalyse der drei PSI14-Gene	
5	Diskussion	
5.1	Die Genfamilie der durch Phosphatmangel induzierbaren RNasen aus	
	Tomate	
5.2	Die PSI14-Genfamilie	

 6 Zusammenfassung 7 Literaturverzeichnis 		1	
		urverzeichnis	
8	Anhang		1
	Anhang 1: Anhang 2: Anhang 3: Anhang 4:	Genomische Sequenz der RNase LE Nukleotid-Sequenz des PCR-Fragmentes PCR14/2 Genomische Sequenz der Gene PSI14/A und PSI14/B Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei PSI14-cDNA- Klone aus <i>L. esculentum</i> Mill. cv. Lukullus mit den aus den genomischen Sequenzen g14/A bzw. g14/B aus <i>L. esculen- tum</i> cv. VFNT Cherry abgeleiteten Aminosäuresequenzen	1 12 12
	Anhang 5.	und den Aminosäuresequenzen der vier Reis-cDNA-Klone (vgl. Kap. 5.2.)	12 17
	Anhang 6: Anhang 7:	Strukturelemente in Promotor der RNase LE Strukturelemente in den Promotoren der Gene PSI14/A bzw.	1
	0	PSI14/B	1

Abkürzungen

А	Adenin
A ₂₆₀	Extinktion in Abhängigkeit von der Wellenlänge
Abb.	Abbildung
Amp ^r	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
C2	cirka
Cam ^r	Chloramphenicolresistenz
CaMV	cauliflower mossic virus" Rhumankahl Mossik Virus
	"cauffilower mosaic vilus , Biumenkom-Mosaik- vilus
CUIS	Chaleen Southeas
CHS	Chalcon-Synthase
Ci	Curie
СТР	Cytosintriphosphat
cv.	cultivar
d	Tag(e)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelstränig
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
σ	Gramm
G	Guanin
GSP	Gen-spezifischer Primer
GUS	B-Glucuronidase
HP	hypersensitive Reaktion
	Indol 3 Essigsöura
IAA	Indor-5-Essignate
h 10	Stundo
11 1-	
K Isa af	K110
kan	Kanamycinresistenz
Kap.	Kapitel
	Liter
LUC	Luciferase
m	milli; Meter
М	Mol
μ	mikro
min	Minute
MOPS	N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	"messenger RNA"
MUG	4-Methyl-Umbelliferyl- B-D-Glucuronid
MU	4-Methylumbelliferon
n	nano
Ν	Normal (Konzentration von Säuren/Basen)
NAA	α-Naphtylessigsäure
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p	pico
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektronhorese
	i organi grannagorereku opnorese

PBS	nhosnhate-huffered saline" Phosnhat genufferte Kochsalzlösung
PCP	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyathylanglycol
nfu	plaque forming unit" Plaque bildende Finheit
più Di	anorganisches Phosphat
³¹ D NMD	³¹ P Korprosonanzenaktrockonia
	r-Kerniesonanzspektroskopie
pv. DVD	Paluoval
	rapid amplification of cDNA ands" Amplifikation you cDNA Endon
RACE	"rapid amplification of CDNA ends, Amplifikation von CDNA-Enden
PCIA	Dhanol/Chloroform/Isoamulalkohol (u/u/u) = 25:24:1
PCIA	Phenol/Childronomi/isoaniyiaikonoi $(\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{2}}}} = 25.24.1$
	Physiophinoid parasilica val. nicollande phosphate storyation induced". Dhosphatmangal induziortar Klop 14
P5114	"phosphate <u>starvation induced</u> , Phosphatmanger induzierter Kion 14
PSL	
	Dihanye Lummescenz
KINA "DNA	riboornala DNA
IKINA	Disorder KINA
KINASE	Ribonukiease
RNase LE	Rivase Lycopersicon extrazellular
RNase LX	Rivase Lycopersicon intrazellular, extravakuolar
RNase LV	Rinase Lycopersicon vakuolar
KI DT DCD	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
S	Sekunde
SAR	"systemic aquired resistence"
SDS	"sodium dodecyl sulfate", Natriumdodecylsulfat
SI SN DE	Selbstinkompatibilität
SNuPE	Single Nukleotide Primer Extension
SS	einzelsträngig
Т	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
Tet	Tetracyclinresistenz
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	Uracil
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumenteile
w/v	Gewicht/Volumen
X.c.v.	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-Galactosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-Glucuronid

Einbuchstaben-Code für proteinogene Aminosäuren

Alanin	Μ	Methionin
Cystein	Ν	Asparagin
Asparaginsäure	Р	Prolin
Glutaminsäure	Q	Glutamin
Phenyalanin	R	Arginin
Glycin	S	Serin
Histidin	Т	Threonin
Isoleucin	V	Valin
Lysin	W	Tryptophan
Leucin	Y	Tyrosin
	Alanin Cystein Asparaginsäure Glutaminsäure Phenyalanin Glycin Histidin Isoleucin Lysin Leucin	AlaninMCysteinNAsparaginsäurePGlutaminsäureQPhenyalaninRGlycinSHistidinTIsoleucinVLysinWLeucinY

1. Einleitung

Phosphor ist einer der wichtigsten Makronährstoffe für das Wachstum und den Stoffwechsel der Pflanzen. Das Orthophosphatanion (Pi) ist Bestandteil einer Vielzahl von Metaboliten des Grund- und Sekundärstoffwechsels, dient als Precursor für die Biosynthese von Nukleinsäuren, Phospholipiden und Zuckerphosphaten, ist durch die Bildung energiereicher Ester an den metabolischen Energieübertragungen beteiligt und wirkt als Regulator der Aktivität von Schlüsselenzymen des Primär- und Sekundärstoffwechsels (BIELESKI und FERGUSON, 1983; MARSCHNER, 1995). Es ist ein wichtiges Kontrollsignal von Entwicklungsprozessen in den Pflanzen (AMINO et al., 1983) und über reversible Proteinphosphorylierungen ein integraler Bestandteil von Signaltransduktions- und Signalamplifikationsketten (DIETRICH et al., 1990). Phosphat wirkt als Modulator der Gentranskription (SADKA et al., 1994).

Phosphat kann von Pflanzen ausschließlich in Form anorganischer Orthophosphatanionen (LEVEBFRE et al., 1990) durch die Wurzeln aufgenommen werden. Der Makronährstoff Phosphat ist jedoch in vielen Ökosystemen einer der am wenigsten verfügbaren mineralischen Nährstoffe. Er kommt im Boden in seiner oxidierten Form vor und wird sowohl anorganisch als auch organisch gebunden. Der größte Teil des im Boden vorhandenen Phosphates ist in Form von nicht- oder nur schwerlöslichen Eisen-, Aluminium- oder Kalziumverbindungen festgelegt (MARSCHNER, 1995). Organisch gebundenes Phosphat kommt in Form von Inositolphosphat, Phospholipiden, Nukleinsäuren und vielen anderen Phosphatestern vor. In humusreichen Böden können bis zu 50 % des vorhandenen Phosphates in organischen Verbindungen immobilisiert sein (OZANNE, 1980). Die Konzentration an freiem Phosphat schwankt in Abhängigkeit von der Bodenzusammensetzung zwischen 0,5 und 2 μ M (BIELESKI und FERGUSON, 1983) und liegt damit oft weit unter den K_m-Werten für die Aufnahmesysteme (SCHMIDT et al., 1992). Daraus folgt, daß in vielen Böden das pflanzliche Wachstum durch die Pi-Verfügbarkeit limitiert wird (BIELESKI und FERGUSON; 1983). Ausgehend von der Bedeutung des Phosphats für die Zellen ist es verständlich, daß die Organismen Mechanismen zum Schutz vor bzw. zur Überwindung von Pi-Mangel-Situationen entwickelt haben.

Bei Mikroorganismen liegen detaillierte Untersuchungen über die Reaktion auf Pi-Mangel auf biochemischer, genetischer und molekularer Ebene vor. Extrazellulärer Pi-Mangel (Pi-Konzentration < 1 mM) führt bei *Escherichia coli* zur Induktion bzw. Erhöhung der Expression von 86 Genen, das sind über 3 % des Bakteriengenoms (TORRIANI et al., 1985). Zu ihnen gehören unter anderem eine Alkalische Phosphatase (phoA-Gen), ein Zellwandporen-Protein PhoE (phoE-Gen), ein hochaffines Pi-Carriersystem (pst-Operon) und ein Glycerol-3-Phosphat spezifisches Transportsystem (ugp-Operon) sowie mindestens vier regulatorische Gene (phoB, phoR, phoM, phoU). Diese Gene werden aufgrund ihrer gemeinsamen Regulation zu einem pho-Regulon zusammengefaßt (Übersicht in: MARTIN et al., 1989). Für die Gene dieses Regulons wurde eine Regulation sowohl durch den Pi-Gehalt des Mediums als auch durch das phoB-Genprodukt und verschiedene weitere regulatorische Gene, z.B. phoR und phoM, nachgewiesen (SHINAGAWA et al., 1987). In den Promotoren einiger Gene des pho-Regulons wurde eine hochkonservierte, 18 Nukleotide umfassende Sequenz [5'-CTGTCATA(A/T)A(A/T)CTGTCA(C/T)-3'] identifiziert, die als pho-Box bezeichnet wird. Es konnte gezeigt werden, daß das positiv wirkende Regulatorprotein PhoB an diese Sequenz bindet und dadurch die Transkription der Gene aktiviert (MAKINO et al., 1996 sowie dort zitierte Literatur).

In der Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae) wurde ein ähnliches psi-System charakterisiert (Übersichten in OSHIMA, 1982; YOSHIDA et al., 1989a,b; LENBURG und O'SHEA, 1996). Zu den bei Pi-Mangel aktivierten Genen zählen unter anderem ein Pi-Transportsystem (PHO84), extrazelluläre Alkalische- (PHO8) und Saure Phosphatasen (PHO5), eine vakuoläre Alkalische Phosphatase und eine an der posttranslationalen Prozessierung der vakuolären Alkalischen Phosphatase beteiligte Protease sowie regulatorische Faktoren. Die Expressionskontrolle erfolgt auf der Ebene der Transkription. Die beiden positiv wirkenden Regulatoren PHO4 und PHO2 binden an die upstream-Aktivatorsequenzen (UAS; VOGEL et al., 1989; OGAWA et al, 1995) in den Promotoren der Piabhängigen Gene und aktivieren dadurch die Expression. Die Aktivität von PHO4 wird, in Abhängigkeit vom Pi-Gehalt des Mediums, durch die Phosphorylierung des Proteins mittels eines Cyclin-CDK-Kompexes (PHO80-PHO85) reguliert. Bei hohen Pi-Konzentrationen ist das PHO4-Protein durch Phosphorylierung inaktiviert, während unter Pi-Mangelbedingungen die Phosphorylierung von PHO4 durch Inhibierung des PHO80-PHO85-Komplexes durch den Faktor PHO81, einem CDK-Inhibitor, verhindert wird (CREASY et. al., 1993; HIRST et al., 1994; CROSS, 1995; BARBARIC et al., 1996; LENBURG und O'SHEA, 1996). Als Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors PHO4 wurde ein 6 bp langes Motiv [5'-CACGT(G/T)-3'] identifiziert (HAYASHI und OSHIMA, 1991).

Auch Pflanzen haben verschiedene Anpassungsmechanismen zur Überwindung von durch Pi-Verarmung induzierten Streßsituationen entwickelt (MARSCHNER, 1995). Zu den in der umfangreichen Literatur gut charakterisierten Reaktionen auf Pi-Mangel gehören unter anderem ein erhöhtes Wurzelwachstum sowie eine verstärkte Lateralwurzelbildung (GOLDSTEIN et al., 1988a; ADALSTEINSSON und JENSEN 1989; LYNCH, 1995; BA-TES und LYNCH, 1996), die Erhöhung der Pi-Transportkapazität (HAWKESFORD und BELCHER, 1991), eine schnelle Umverteilung des Phosphates in den Pflanzenorganen von älteren zugunsten jüngerer Gewebe (BIELESKI und FERGUSON 1983; MIMURA et al., 1996), die Induktion alternativer Pathways zur Umgehung phosphat- und adenylatabhängiger Reaktionen in der Glykolyse und im mitochondrialen Elektronentransport (DUFF et al., 1989; THEODOROU und PLAXTON, 1993) sowie auf zellulärer Ebene die Mobilisierung vakuolären Phosphats zur Aufrechterhaltung der Pi-Homöostase im Cytoplasma (MIMURA et al., 1995). Durch Abgabe von Säuren und chelatierenden Agenzien in das Wurzelexudat können Pflanzen Phosphat sowie andere Nährstoffe (z.B. Eisen, Mangan) solubilisieren und damit verfügbar machen (DINKELAKER et al., 1989; JOHNSON et al., 1994). Pi-Mangel begünstigt die Mycorrhiza-Bildung. Bei dieser unter Landpflanzen weit verbreiteten symbiontischen Beziehung liefern die Pflanzen Kohlenhydrate im Austausch gegen Phosphat und andere mineralische Nährstoffe an ihren pilzlichen Partner, wobei durch die Pilzhyphen der Pflanze ein größerer Bodenbereich für die Pi-Aufnahme zur Verfügung steht (BO-LAN, 1991; SCHACHTMAN et al., 1998).

Sowohl in Zellsuspensionskulturen als auch in Pflanzen wurde die Sekretion verschiedener hydrolytischer Enzyme unter Pi-Mangel nachgewiesen, die sich in ihrer Wirkungsweise ergänzen und damit zur Freisetzung von anorganischem Phosphat aus organischen Verbindungen führen können. Bei vielen Arten wurde die Sekretion Saurer Phosphatasen in die Rhizosphäre bei Pi-Mangel nachgewiesen (GOLDSTEIN et al., 1988a; DINKELAKER und MARSCHNER, 1992; TADANO et al., 1993). Ein Ansteigen der Sauren Phosphataseaktivität wurde ebenfalls in Zellsuspensionskulturen von Tomate, Brassica und Nicotiana festgestellt (GOLDSTEIN et al., 1988a; LEFEBVRE et al., 1990; DUFF et al., 1994). Die von Wurzeln und Zellkulturen sekretierten Sauren Phosphatasen sind relativ unspezifische Enzyme, die in der Lage sind, Phosphat aus organischen Verbindungen freizusetzen (DUFF et al., 1994). In kultivierten Tomatenzellen wurden des weiteren die Sekretion einer Phosphodiesterase (AHNERT, 1990) und einer RNase-Aktivität (RNase LE; NÜRNBERGER et al., 1990) ins Kulturmedium sowie die Induktion von vier intrazellulären RNase-Isoformen (LÖFFLER et al., 1992) unter Pi-Mangelbedingungen nachgewiesen. Die Induktion von RNasen wurde ebenfalls in Pi-verarmten Arabidopsis thaliana-Keimlingen (BARIOLA et al., 1994) und Wurzeln von Nicotiana alata (DODDS et al., 1996a) gezeigt.

Von Goldstein et al. (1988a) wurde in Analogie zum pho-Regulon der Bakterien und Hefen die Induktion eines "emergency rescue system" bei Pi-Mangel in höheren Pflanzen vorgeschlagen, das die *de novo*-Synthese und Sekretion von Enzymen zur Gewinnung von externem anorganischen Phosphat sowie eine Aktivierung der Pi-Aufnahmesysteme und eine vermutliche differenzielle Genexpression einschließt (GOLDSTEIN et al., 1988a, b, 1989; GLUND und GOLDSTEIN, 1993). Zu den potentiellen Komponenten dieses Schutzsystems zählen neben einer erheblich gesteigerten Pi-Aufnahmekapazität und der Induktion von RNasen und Sauren Phosphatasen auch die vor kurzem charakterisierten, Pi-Mangel induzierbaren Phosphattransporter aus *Arabidopsis thaliana* (MUCHHAL et al., 1996; SMITH et al., 1997), *Solanum tuberosum* (LEGGEWIE et al., 1997) und *Lycopersicon esculentum* (LIU et al., 1998).

Im Gegensatz zu den umfangreichen physiologischen Untersuchungen sind die Kenntnisse zur veränderten Genexpression unter Pi-Mangelbedingungen und insbesondere zu den Signaltransduktionsprozessen bei Pflanzen eher rar.

In unserer Arbeitsgruppe werden Untersuchungen zur Lokalisation, Expression und Regulation verschiedener RNA-abbauender Enzymaktivitäten in einer Tomatenzellkultur (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus) sowie in Tomatenkeimlingen durchgeführt.

Nach Verbrauch des in der Nährlösung vorhandenen Phosphates beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase sowie bei der Kultivierung in Pi-freier Nährlösung steigen in der Zellkultur sowohl die extra- als auch die intrazellulären RNase-Aktivitäten drastisch an. Auf Proteinniveau wurden eine extrazelluläre RNase (RNase LE), drei vakuoläre RNasen (RNasen LV 1-3) sowie eine intrazellulär, aber nicht vakuolär lokalisierte RNase (RNase LX) identifiziert. Die Enzyme wurden biochemisch als Endonukleasen, die hydrolytisch einzelsträngige Ribonukleinsäuren bis zu den Mononukleotiden abbauen, charakterisiert (ABEL et al., 1989; NÜRNBERGER et al., 1990; LÖFFLER et al., 1992).

Die RNasen LE und LX wurden auf Proteinniveau vollständig sequenziert und besitzen ca. 60 % identische Aminosäuren (JOST et al., 1991; LÖFFLER et al., 1993). Die vakuolären RNase-Isoformen LV 1-3 wurden teilsequenziert. Die RNasen LE und LV3 scheinen zwar unterschiedlich lokalisierte, aber identische Proteine zu sein, während sich die RNasen LV1 und LV2 nur durch einen verkürzten C-Terminus von der RNase LX unterscheiden und deshalb vermutlich posttranslationale Prozessierungsprodukte der RNase LX sind (LÖFF-LER et al., 1993; KÖCK et al., 1995). Aus einer aus der mRNA Pi-verarmter Tomatenzellen angelegten cDNA-Expressionsbank wurden für die RNasen LE und LX je ein vollständiger cDNA-Klon isoliert, dessen DNA-Sequenz im kodierenden Bereich vollständig mit der entsprechenden Proteinsequenz übereinstimmt. Beide Klone enthalten in Übereinstimmung mit einem Transport über das sekretorische System jeweils N-terminale Signalsequenzen sowie ausgedehnte 3'-nichttranslatierte Regionen (KÖCK et. al., 1995).

Mittels Northern-Hybridisierungen wurde gezeigt, daß der unter Pi-Mangel beobachtete drastische RNase-Aktivitätsanstieg in der Zellkultur mit der Induktion und Akkumulation der Transkripte der RNasen LE und LX korreliert (KÖCK et al., 1995).

Durch die Untersuchung von 10 Tage alten, in steriler, Pi-freier Hoagland-Nährlösung angezogenen Keimlingen wurde nachgewiesen, daß sie in allen Organen (Wurzel, Hypokotyl, Keimblätter) das gleiche RNase-Aktivitätsmuster wie die Zellkultur besitzen (TSCHEUD-SCHILSUREN, 1994).

Der Anstieg der extra- und intrazellulären RNase-Aktivitäten bei Pi-Mangel wird durch den Zusatz von Transkriptionshemmern (Actinomycin D) bzw. Translationshemmern (Cycloheximid) zur Zellkultur 1 h vor dem Transfer der Zellen von +Pi in -Pi-Medium verhindert, während die Zugabe dieser Substanzen zu einer -Pi-Kultur zum Abbruch der Induktion der RNasen führt. Dies führt zu der Vermutung, daß die Induktion der RNasen durch Pi-Mangel ein transkriptionskontrollierter Prozeß ist (NÜRNBERGER, 1991; LÖFFLER; 1993). Deshalb ist die Charakterisierung der genomischen Sequenzen und insbesondere der Promotoren der RNase-Gene eine wichtige Voraussetzung und ein effektives Hilfsmittel bei der Untersuchung des Pi-Mangel-Signaltransduktionsmechanismus in der Tomate.

Erste Hinweise auf die genomische Struktur der beiden RNasen LE und LX konnten durch die Klonierung und Charakterisierung von genomischen PCR-Fragmenten gewonnen werden, die jeweils weitgehend die kodierende Sequenz, aber keine potentiellen Promotorbereiche umfassen. Die beiden ersten Introns unterbrechen die kodierenden Abschnitte jeweils nach Aminosäure 12 bzw. 64 des reifen Proteins. Für ein drittes Intron in der RNase LX, das die kodierende Sequenz nach Aminosäure 129 unterbricht, konnte keine Entsprechung in der genomischen Sequenz der RNase LE nachgewiesen werden (STENZEL, 1993; SCHUMANN, 1995).

Von NÜRNBERGER (1990) war durch Untersuchungen zur *in vivo*-Neusynthese von Proteinen unter Pi-Mangel das Auftreten weiterer induzierbarer Proteine nachgewiesen worden. Mittels subtraktiver Hybridisierung der -Pi-cDNA-Bank gegen mRNA aus Piversorgten Tomatenzellen wurde ein weiterer Pi-Mangel induzierbarer cDNA-Klon isoliert. Das Verhalten dieses Transkriptes bei Pi-Mangel ist mit dem der RNasen vergleichbar. Der als PSI14 bezeichnete cDNA-Klon kodiert für ein bisher unbekanntes Protein mit 269 Aminosäuren. Der N-terminale Bereich (Aminosäuren 1 bis 100) besitzt ca. 60 % Identität zu zwei unvollständigen cDNA-Klonen aus Reiswurzeln (ZIETHE, unveröffentlicht).

RNasen sind ubiquitäre Komponenten lebender Zellen und in pflanzlichen Geweben in einer großen Vielfalt und in hohen Aktivitäten vorhanden (FARKAS, 1982; WILSON, 1982). In Abhängigkeit von ihrer Lokalisierung und Spezifität können die RNasen sowohl in den generellen Massenabbau von RNA zum Recycling von Kohlenstoff, Phosphat und Stickstoff als auch in einen hochselektiven, differentiellen turnover individueller RNA-Species involviert sein. Posttranscriptionelle Prozesse, wie RNA-Prozessing, RNA-turnover sowie die mRNA-Stabilität spielen eine wichtige Rolle innerhalb der Kontrolle der pflanzlichen Genexpression (GREEN, 1994).

Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften (Größe, Löslichkeit, Lokalisierung, pH-Optimum, Spaltungstyp, Substrate, Sensitivität gegen EDTA) sowie anhand von Sequenzähnlichkeiten können die pflanzlichen RNasen in verschiedene Familien eingeteilt werden (Übersichten in: FARKAS, 1982; WILSON, 1982; GREEN, 1994).

Die beiden RNasen LE und LX gehören zur Gruppe der S-ähnlichen RNasen innerhalb der Superfamilie der T₂/S-RNasen (vgl. Abb.1), der am besten untersuchten pflanzlichen RNase-Familie. Ein wichtiges Kennzeichen dieser RNase-Familie ist die Existenz zweier konservierter Aminosäuremotive [IHGLWP und (K/R)HG(T/I/M)C], die als Bestandteile des aktiven Zentrums identifiziert wurden (KAWATA et al., 1990; KURRIHARA et al., 1992). Die zuerst isolierte, namensgebende RNase T₂ (KAWATA et al., 1988) ist pilzlichen Ursprungs, während die S-RNasen die gametophytische Selbstinkompatibilität in *Solanaceen* sowie einigen anderen Familien vermitteln. Die beiden konservierten Aminosäuremotive wurden in letzter Zeit auch bei bakteriellen und tierischen RNasen gefunden. Außerdem konnten Struktur-Glycoproteine von verschiedenen tierischen Pestviren aus der Familie der *Flaviviridae* als RNasen vom T₂-Typ identifiziert werden (SCHNEIDER et al., 1993; HULST et al., 1994). Die Entdeckung von Mitgliedern dieser RNase-Familie sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich und bei den Prokaryonten weist darauf hin, daß diese RNasen stark konserviert sind und in allen Organismenklassen eine bedeutende Rolle spielen sollten.

Die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb dieser RNase-Familie lassen sich aus der prozentualen Identität der Aminosäuresequenzen abschätzen und durch einen phylogenetischen Stammbaum darstellen (Abb. 1).



Abb. 1 : Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Familie der T₂/S-RNasen. Die Aminosäuresequenzen der RNasen LE und LX (ohne Signalsequenzen) wurden zusammen mit den entsprechenden Sequenzen der anderen bekannten pflanzlichen S-ähnlichen RNasen sowie pilzlichen, prokaryotischen und tierischen Vertretern dieser RNase-Familie und ausgewählten Vertretern der S-RNasen mit Hilfe des Programms Clustal (PC/GENE) entsprechend ihrer Ähnlichkeiten zu einem phylogenetischen Stammbaum angeordnet.

S-ähnliche RNasen:

RNase LE und RNase LX aus *Lycopersicon esculentum* (JOST et al., 1991; LÖFFLER et al., 1993), RNase NE aus *Nicotiana alata* (DODDS et al., 1996a), ZRNase I und II aus *Zinnia elegans* (YE and DROSTE, 1996), RNS1, RNS2 und RNS3 aus *Arabidopsis thaliana* (TAYLOR et al., 1993; BARIOLA et al., 1994), RNase Mc aus *Mormordica charanthia* (IDE et al., 1991), non-S-RNase aus *Pyrus pyrifolia* (NORIOKA et al., 1996), Aleuron-RNase aus *Hordeum vulgare* (Genbank-Association-Nummer Af000939), RNase X2 aus *Petunia inflata* (LEE et al., 1992)

S-RNasen:

Nicotiana alata S₂, S₆ (MATTON et al., 1995), Solanum tuberosum S₁, S₂ (KAUFMANN et al., 1991), Lycopersicon peruvianum S₅, S₇ (TSAI et al., 1992; ROYO et al., 1994), Petunia inflata S₁ (COLEMAN and KAO; 1992), Petunia hybrida S₃ (SWISS PROT-Datenbanknummer Q40875), Anthirrhinum hispanicum S₂, S₄ (XUE et al., 1996), Pyrus pyrifolia S₂ (NORIOKA et al., 1996), Malus x domestica S₂ (BROOTHAERTS et al., 1995)

Tierische RNasen:

DmRNase aus *Drosophila melangonaster* (HIME et al., 1995), RNase Oy aus *Crussdstrea grigus* (WATANABE et al., 1993), RNasen aus *Homo sapiens* (Klon p321-A) und *Mus musculus* (EST: W82885; TRUBIA et al., 1997)

Pilzliche RNasen:

RNase Rh aus *Rhizopus niveus* (HORIUCHI et al., 1988), RNase T₂ aus *Aspergillus oryzae* (KAWATA et al., 1988), RNase M aus *Aspergillus saitoi* (WATANABE et al., 1990), RNase Trv aus *Trichoderma viride* (INADA et al., 1991)

Bakterielle RNasen:

RNase1 aus *Escherichia coli* (MEADOR und KENNELL, 1990), RNase aus *Aeromonas hydrophila* (FAVREY et al., 1993), RNase aus *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN et al., 1995)

Die S-RNasen sind extrazelluläre Glycoproteine, die in Prozesse der gametophytischen Selbstinkompatibilität (SI) involviert sind, einem genetisch determinierten Mechanismus zur Verhinderung der Selbstbefruchtung, wobei die S-RNasen als Allel-spezifische Cytotoxine wirken und das Wachstum inkompatibler Pollenschläuche durch die Hydrolyse der PollenrRNA inhibieren (Übersichten in CLARKE und NEWBIGIN, 1993, NEWBIGIN et al., 1993; KAO und HUANG, 1994; KAO und McCUBBIN, 1997). Die SI-Reaktion wird durch einen einzigen Locus kontrolliert, der in vielen verschiedenen Allelen vorliegt. In der Familie der Solanaceae wurden die Aminosäure- und DNA-Sequenzen von S-RNasen aus selbstinkompatiblen Arten der Gattungen Lycopersicon, Petunia, Solanum und Nicotiana aufgeklärt (vgl. TSAI et al., 1992; ROYO et al., 1994; COLEMAN und KAO, 1992; KAUFMANN et al., 1991; MATTON et al., 1995). Sequenzvergleiche zeigen, daß S-RNasen von verschiedenen Arten ähnlicher sein können, als die S-RNase-Allele der gleichen Art. Die fehlende Übereinstimmung zwischen den aus den Sequenzhomologien resultierenden Verwandtschaftsbeziehungen und den taxonomischen Verwandtschaftsverhältnissen läßt vermuten, daß einige der S-Allele schon vor der Divergenz der Arten der Solanaceae existierten (IOERGER et al., 1990; NEWBIGIN, 1996). Eine Hypothese geht davon aus, daß sich die S-RNasen aus einer in den Blüten vorhandenen Ur-RNase durch Spezialisierung auf die Funktion der Erkennung und Beseitigung des eigenen Pollens entwickelten (CLARKE und NEWBIGIN, 1993; DODDS et al., 1996a, b).

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese besitzen Pflanzen eine Vielzahl weiterer RNasen, die mit den S-RNasen strukturell verwandt, aber nicht in die SI-Reaktion involviert sind. Diese als S-ähnliche RNasen bezeichneten Enzyme werden mit einer Vielzahl physiologischer Prozesse in Verbindung gebracht. Dazu zählen unter anderem die Remobilisierung von Phosphat in Pi-Mangel-Situationen und während der Seneszenz, die Pathogenabwehr, der mRNA-Abbau oder die Autolyse von Zellen während der Xylogenese (GREEN, 1994).

S-ähnliche RNasen wurden innerhalb der Familie der Solanaceen sowohl aus selbstkompatiblen als auch aus selbstinkompatiblen Arten sowie auch aus anderen Familien (*Brassicaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Rosaceae, Poaceae*; vgl. Abb. 1) isoliert. Die Idee eines gemeinsamem Vorläufergenes für beide RNase-Gruppen, aus dem sich durch Gen-Duplikation nach der Divergenz der höheren Pflanzen und Pilze sowohl die S-ähnlichen RNasen als auch die S-RNasen entwickelten, wird durch den Befund unterstützt, daß die Sähnlichen RNasen der *Solanaceen* eine höhere Ähnlichkeit zu den S-ähnlichen RNasen der anderen Familien als zu den S-RNasen der *Solanaceen* aufweisen (JOST et al., 1991; TAY-LOR et al., 1993). Diese Hypothese wurde durch die Entdeckung einer konservierten Intron-Position in den genomischen Sequenzen der S-RNasen und der S-ähnlichen RNasen NE (DODDS et al., 1996a) bzw. X2 (LEE et al., 1992) weiter erhärtet. Durch die Aufklärung der genomischen Struktur der S-ähnlichen RNasen LE und LX sollen weitere Daten zur Charakterisierung der Familie der S-ähnlichen RNasen aus Tomate gewonnen und zur Analyse der evolutionären Beziehungen innerhalb der T₂/S-RNase-Familie herangezogen werden.

Zielstellung der Arbeit

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Klonierung und Charakterisierung von 5'-upstream der RNase-Gene gelegenen Promotorsequenzen. Dazu sollten durch Screening einer genomischen Tomaten-DNA-Bank entsprechende Klone isoliert werden. Der Nachweis der Promotoraktivität sowie der Induzierbarkeit des Promotors durch Pi-Mangel sollte durch die Fusion der potentiellen Promotorsequenzen mit dem Reportergen ß-Glucuronidase (GUS) und anschließende transiente Transformation von +Pi- bzw. -Pi-Tomatenzellen mittels Partikelkanone erfolgen. Zur Eingrenzung von für die Induktion durch Pi-Mangel funktionell wichtigen Bereichen sollten anschließend Promotordeletionen hergestellt und im transienten Test zur Bestimmung der verbliebenen Aktivität eingesetzt werden. Ausgewählte Konstrukte sollten anschließend durch Agrobakterium-vermittelten Gentransfer stabil in Tomatenpflanzen transformiert und die regenerierten Pflanzen zur Untersuchung des Expressionsmusters der RNasen in der Tomatenpflanze sowie in den einzelnen Pflanzenorganen bereitgestellt werden.

Desweiteren sollten durch die Isolierung und Charakterisierung von genomischen Sequenzen des für ein bisher unbekanntes Protein kodierenden cDNA-Klons PSI14 die Promotorsequenzen eines weiteren Pi-Mangel induzierbaren Proteins identifiziert und mit den Promotorsequenzen der beiden RNasen verglichen werden, um so möglicherweise potentielle *cis*-Elemente zu identifizieren, die an der Induktion der Transkripte durch Pi-Mangel beteiligt sein könnten.

Zu Beginn der Arbeiten sollte zunächst eine detaillierte Untersuchung des Induktionsprozesses der Pi-Mangel induzierbaren Transkripte der Tomatenzellkultur mittels Northern-Hybridisierungen durchgeführt werden. In der Literatur wird eine Beteiligung der Sähnlichen RNasen an der pflanzlichen Pathogenabwehr diskutiert (LEE et al., 1992; GREEN, 1994; GALIANA et al., 1997). Deshalb sollte die Induzierbarkeit der RNase-Transkripte durch Verwundung und Pathogenbefall überprüft werden.

2. Material

2.1. Bakterienstämme, Plasmide und Vektoren

Escherichia coli-Stämme

DH 5α	supE44, lac, U169 λ^- (Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (MANIATIS et al., 1989)
INV αF'	F', endA1, recA1, hcdR17 (r_k , m_k), supE44, thi- 1, gyrA96, relA1, Φ 80lacZ Δ M 15, Δ (lacZYA-argF),U169 λ (Invitrogen)
LE 392	hsdR514, hsdM, SupE44, supF58, lacY1 or Δ (lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55 (MANIATIS et al., 1982)
XL 1-Blue	recA1,endA1,gyrA96,thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB, lac1 ^q ZΔM15, Tn10 (tet ^r)] ^c (BULLOCK et al., 1987; JERPSETH et al., 1992)
XL 1-Blue MRF' kan	Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, thi-1, recA1, gy- rA96, endA1,relA1, lac, [F, proAB, lac1 ^q Z Δ M 15, Tn 5 (kan ^r)] (BULLOCK et al., 1987; JERPSETH et al., 1992)
XLOLR	Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173, endA1, thi-1, recA1, gy- rA96, relA1, lac [F'proAB, lac ^q Z Δ M15, Tn10, (Tet ^r)] ^c (Stratagene)

Agrobacterium tumefaciens- Stamm

LBA 4404 HOEKEMA et. al., 1983

Plasmide und Vektoren

pBluescript II SK-Phagemid	Amp ^R ; Vektor zur Klonierung doppelsträngiger DNA (SHORT et al., 1988)
pCR-Script [™] Cam SK (+) - Plasmid	Cam ^R ; Vektor zur blunt-end Klonierung von PCR-Produkten (COSTA et al., 1994)
pCR [®] 2.1	Amp ^R ; Kan ^R ; Vektor zum direkten Klonieren von PCR-Produkten über A/T-Überhänge (Invitrogen)
pUC19	Amp ^R ; Vektor zur Klonierung doppelsträngiger DNA (MANIATIS et al., 1989)
pBI 121	Kan ^R ;Vektor zur stabilen Pflanzentransformation durch Agrobak- terium vermittelten Gentransfer; enthält GUS-Gen unter Kontrolle des CaMV-Promotors und CaMV-Polyadenylierungssignals (JEFFERSON, 1987)
pRT 103GUS	Amp ^R ;Vektor zur transienten Pflanzentransformation; enthält GUS- Gen unter Kontrolle des CaMV-Promotors und des CaMV-Poly- adenylierungssignals (TÖPFER et al., 1988)

pRT 101LUC	Amp ^R ;Vektor zur transienten Pflanzentransformation; enthält GUS- Gen unter Kontrolle des CaMV-Promotors und des CaMV-Poly- adenylierungssignals (SCHLEDZEWSKI und MENDEL, 1994)
pRLE	Amp ^R ; pBluescript II SK-Phagemid, enthält vollständige cDNA der RNase LE (<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I) EMBL Datenbank No.: X79337 (KÖCK et al., 1995)
pRLX	Amp ^R ; pBluescript II SK-Phagemid, enthält vollständige cDNA der RNase LX (<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I), EMBL Datenbank No.: X79338 (KÖCK et al., 1995)
pPSI14	Amp ^R ; pBluescript II SK-Phagemid, enthält vollständige cDNA des Klons PSI14 (<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I), (ZIETHE, unveröffentlicht)
pUBI3	Amp ^R ; pBluescript II SK-Phagemid, enthält vollständige cDNA des Tomaten-Ubiquitin-Gens <i>ubi</i> 3 (<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I), (ZIETHE, unveröffentlicht)
pBD18	Amp ^R ; pBR 329-Plasmid; enthält 1,7 kbp-Fragment der 18S rRNA der Tomate (<i>Eco</i> RI) (DOBROWOLSKI, 1987)

2.2. Zellsuspensionskultur

Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurde eine heterotroph wachsende Zellsuspensionskultur der Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus) verwendet. Anlage, Passagierung und Kultivationsbedingungen wurden von TEWES et al. (1984) ausführlich beschrieben. Die Anzucht erfolgte in 500 ml Standrundkolben (100 ml modifizierte MURASHIGE-SKOOG-Nährlösung) bei 28 °C im Dunkeln auf Rundschüttlern (140 U/min).

Das Kulturwachstum wurde durch den Transfer von ca. 2 x 10⁷ Zellen einer 3 d alten Zellkultur in Pi-haltiges Nährmedium initiiert. Das Wachstum der Zellkultur erfolgte dann unter sukzessivem Verbrauch des in der Nährlösung vorhandenen Phosphates (**Normalkultur**). In allen +**Pi-Kulturen** wurde die Pi-Ausgangskonzentration (2,5 mM) nahezu konstant gehalten, indem das von den Zellen aufgenommene Phosphat jeweils nach 24 h in Form von sterilem 0,2 M KH₂PO₄, pH 6,0 ergänzt wurde. Die Kultivierung unter Pi-Mangelbedingungen erfolgte in Abwesenheit von jeglichen organischen oder anorganischen Pi-Quellen in der Nährlösung (**-Pi-Kultur**). Dazu wurden die Zellen einer 3 d alten +Pi-Kultur abzentrifugiert (5 min; 700 U/min; 20 °C), zweimal mit Pi-freiem Nährmedium gewaschen und dann in 100 ml Pi-freier Nährlösung resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach TEWES et al. (1984).

2.3. Pflanzenanzucht

Die Samen der Tomatensorten *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus und *Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker sowie der Tomaten-Wildarten *L. pimpinellifolium* (Jusl) Mill.; *L. cheesmanii* Riley; *L. hirsutum* Humb. & Bonpl.; *L. parviflorum* Rick, Kesicki, Fobes & Holle; *L. chmielewskii* Rick, Kesicki, Fobes & Holle; *L. chilense* Dun. und *L. peruvianum* (L.) Mill. wurden freundlicherweise vom Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bzw. der Genbank des IPK Gatersleben zur Verfügung gestellt. Die Samen wurden durch Inkubation für 15 min in 70 %igem Ethanol und anschließend für 15 min in 6 %iger Natriumhypochloritlösung sterilisiert, dreimal mit sterilem Wasser gewaschen, auf feuchten Filterpapier zum Keimen ausgelegt und bei 28 °C im Dunkeln kultiviert. Die Keimlinge wurden dann in Erde überführt und unter Gewächshausbedingungen 6 Wochen kultiviert.

2.4. Verwendete DNA-Banken

2.4.1. Genomische Tomaten-DNA-Bank

Für die Untersuchungen wurde eine uns freundlicherweise von Dr. Ganal (IPK Gatersleben) zur Verfügung gestellte genomische Tomaten-DNA-Bank (*Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry) verwendet, die durch die Klonierung von partiell mit der Restriktionsendonuklease Sau3A gespaltener Tomaten-DNA in den Bakteriophagen λ -EMBL3 hergestellt wurde.

2.4.2. -Pi-cDNA-Bank

Zur Isolierung von cDNA-Klonen der beiden Gene PSI14/A und PSI14/B wurde eine aus der mRNA, isoliert aus 48 h in Pi-freier Nährlösung kultivierten Tomatenzellen, hergestellte cDNA-Expressionsbank verwendet. Die cDNA-Synthese sowie die Klonierung der Fragmente in den Vektor Uni ZAP XR (λ ZAP cDNA Synthesekit, Stratagene) erfolgten ent-sprechend den Angaben des Herstellers (KÖCK et al., 1995).

2.5 Medien und Anzuchtbedingungen für die Bakterienkulturen

Die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme wurden bei 37°C in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten (1,5 % Agar) angezogen. Die Kultivation der Agrobakterienstämme erfolgte bei 28°C für 2-3 Tage in YEB-Medium. Die Anzucht der *Xanthomonas campestris* - Stämme erfolgte in NYG-Medium oder auf NYG-Agarplatten (1,5 % Agar) bei 28 °C.

LB-Medium : 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; pH 7,0

YEB-Medium :	0,1 % Hefeextrakt; 0,5 % Fleischextrakt; 0,5 % Trypton;
	0,5 % Saccharose; 2 mM MgSO ₄
NYG-Medium :	0,5 % Pepton; 0,3 % Hefeextrakt; 2 % (v/v) Glycerol; pH 7,2
	(DANIELS et al., 1984)

Antibiotika wurden bei Bedarf in folgenden Konzentrationen eingesetzt :

Antibiotikum	eingesetzte Menge [in mg/l Kulturmedium]
Ampicillin	100 mg/l
Kanamycin	50 mg/l
Chloramphenicol	50 mg/l
Rifampicin	50 mg/l (Agrobakterien)
	100 mg/l (Xanthomonas-Stämme)
Spectinomycin	100 mg/l

Tab. 1 : Antibiotikakonzentrationen

Inoculation der Tomatenpflanzen mit den Xanthomonas-Stämmen

Die Bakterien wurden auf NYG-Agarplatten angezogen, von den Platten abgespült und mit einer $OD_{600 \text{ nm}} \sim 0.4$ (entspricht ca. 5 x 10^8 cfu/ml) in 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Der Transfer der Bakterien in die Tomatenblätter erfolgte mittels Vakuuminfiltration. Dazu wurden jeweils das dritte, vierte und fünfte Blatt (von der Sproßspitze gezählt) von ca. 5 Wochen alten Tomatenpflanzen der Sorte *L. esculentum* cv. *Moneymaker* verwendet. Anschließend wurden die Blätter trockengetupft, die Blattstiele in Wasser gestellt und im Klimaschrank bei 26 °C und 80 % relativer Luftfeuchte im Dauerlicht kultiviert.

2.6. Geräte, Chemikalien, Enzyme, Radioisotope u.a. Materialien

Chemikalien:

Amersham Buchler GmbH :	Nylonmembran ,,Hybond N"; $[\alpha$ - ³² P]dATP;
(Braunschweig)	$[\alpha^{-32}P]dCTP; [\alpha^{-35}S]dATP; [\gamma^{-32}P] ATP;$
Biochemie Bernd Belger	D(+)-Galaktose
(Kleinmachnow)	
Biometra :	Phenol
(Göttingen)	
Biomol :	MUG; X-Gluc
(Hamburg)	
Bio-Rad Laboratories GmbH :	Goldpartikel
(München)	
Biozym :	MetaPhor™ Agarose (FMC)
(Hameln)	-
Boehringer Mannheim GmbH :	positiv geladene Nylonmembran; dNTP-Set;
(Mannheim)	100bp-DNA-Marker
Difco Laboratories :	Bacto®-Agar; Bacto®-Tryptone; Hefe-Ex-
(Rochester, USA)	trakt; Bacto®-Beef Extract

Duchefa :	_Murashige-Skoog Vollmedium
(Brüssel, Belgien)	Festsubstanz; Plant Agar; Rifampicin; Kana-
_	mycin; Zeatin (trans-Isomer)
Fermentas :	_Lambda-DNA
(St. Leon-Rot)	
Merck AG :	_TCA; Ammoniummolybdat; Ammoniumvana-
(Darmstadt)	dat; Harnstoff; Natriumchlorid; Saccharose; Ammoniumperoxidisulfat; wasserfreies Natri- umcarbonat; 100 %iger Ethanol; Folin- Ciocalteus-Phenol-Reagenz
Roth :	_Agarose; Tris, Glycerin; Magnesiumchlorid;
(Karlsruhe)	Magnesiumsulfat; PEG 6000; Ampicillin; Kali- umacetat, Formaldehyd; Formamid; MOPS; Natriumhypochlorit; BSA; Rotiphorese Gel40
Schleicher & Schuell :	_Blotting Papier GB 002
(Dassel)	
Serva	_SDS; Triton X-100; Natriumlauroylsarcosin;
(Heidelberg)	Borsäure; BAP
Sigma Chemical Company : (St. Louis MO., USA)	_IPTG; X-Gal; MU; MUG; DEPC; Mineralöl; Ammoniumacetat; Spermidin; Kaliumferri- cyanid; Kaliumferrocyanid; NAA; D(+)-Man- nose; 2-Deoxy-D-Glukose; Manganchlorid;
	Dimethylsulfoxid
SmithKline Beecham Pharma GmbH :_	Betabactyl
(München)	
Whatman International Ltd	_Glasfaser Mikrofilterpapier
(Maidstone, England)	(Durchmesser 55 mm)
Restriktions- und DNA-modifizierende	Enzyme und Kits :
Amersham Buchler GmbH :	_DNA-Sequencing-Kit, Sequenase Version 2.0
Boehringer Mannheim GmbH :	Restriktionsenzyme. Nick-Translationskit:
(Mannheim)	DNase I: RNase A
Eurogentech :	Gold Star Tag DNA Polymerase
(Searing, Belgien)	
Fermentas :	Restriktionsenzyme; Alkalische Phosphatase;
(St. Leon-Rot)	T_4 -DNA-Ligase; T_4 -Polynukleotidkinase
Gibco BRL :	5' RACE-System; Superscript [™] II
(Caitthersburg MD, USA)	RNase H Reverse Transkriptase. RNase H
Invitrogen :	TA-Cloning [®] -Kit
(Leek Holland)	
Pharmacia :	AutoRead-Sequencing-Kit
(Freiburg)	
OIAGEN GmbH :	OIAEX II Gel-Extractionskit: OIAGEN Plas-
(Hilden)	mid-Midi-Kit: OIAGEN Plasmid-Maxi-Kit
()	OIAGEN Lambda-Maxi-Kit: DNeasy-
	Plant-DNA-Extraktion-Kit; Oligotex-mRNA- Maxi-Kit

Stratagene : _____pCR-ScriptTM Cam SK(+) Cloning Kit (Heidelberg)

Filmmaterialien :

Amersham Buchler GmbH :	_Hyperfilm TM -ßmax
(Braunschweig)	
Sigma :	Polaroid Professional 667
(Louis MO, USA)	
ORWO Fotochemische Werke GmbH :	_Röntgenfilm X-ray RETINA XBD
(Berlin)	

Geräte :

- PCR-Gerät : Gene ATAQ Controller (Pharmacia, Freiburg)
- Elektrophoresegerät : PHERO-Stab 300 (Biotec-Fischer)
- Elektrophoreseapparaturen : GE-A2, GE-B1A (Angewandte Gentechnologische

Systeme GmbH, Heidelberg)

- UV-Lichtkasten : Vilber Lourmat (Angewandte Gentechnologische Systeme GmbH, Heidelberg)
- Rundschüttler : Schüttler KS 250 und KS 500 (Janke & Kunkel IKA-Larbortechnik)
- Schüttelwasserbad : SW-20C (Julabo Larbortechnik, Seelbach/Schwarzwald)
- UNIVAPO 150 H (Uni Equip Laborgerätebau, Martinsried)
- Stratalinker®1800 (Stratagene, Heidelberg)
- HYBAID-MoV1 Mini-Hybridisierungsofen (MWG-BIOTECH, Ebersberg)
- FUJI BAS Imager (Raytest, Straubenhard)
- DNA Seq Gel System DS 91 (Biometra, Göttingen)
- A.L.F. DNA-Sequenzer (Pharmacia, Freiburg)
- Diodenarreyphotometer (Hewlett Packard)
- Helium-Druckkanone (Leiden, University Workshop)
- Ultraschall-Desintegrator Sonoplus (BANDELIN, Berlin)
- Fluoreszenzphotometer SFM 25 (Kontron AG, Zürich)
- Luminometer Lumat LB 9501 (Berthold, Bad Wildbad)
- Stereomikroskop Stemi 2000 (Carl Zeis Jena GmbH; Jena)
 - Zentrifugen : Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg) Biofuge fresco (Heraeus Instrumente, Osterode) Universal Hettich 30 RF (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) Beckmann-Zentrifuge J2-21M (Beckmann, München)

2.7. Oligonukleotide

Screening der genomischen Tomaten-DNA-Bank :

RNase LE :	LE O-04 : LE O-02as :	5 ' -ATGGCTTCTAATTCAGCC-3 ' 5 ' -AGCGTGTTGGTTTGTGAG-3 '
RNase LX :	LX O-01 : LX O-04 :	5′-CACCCACAAAGAAAATTCA-3′ 5′-GTAGTTTGGCCATAGACC-3′

Herstellung der Promotor-GUS-Konstrukte der RNase LE für den transienten Test :

Einführung einer *Nco*I-Schnittstelle am Translationsstartkodon ATG : LE-NcoI : 5′-GGCTGAATTAGAAGCCATGGTTTTCTTG-3′

3'-PCR-Primer für Konstrukt : -40 Universalprimer : pPromotor LE I : 5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3' pPromotor LE III : LE-Prom C: 5'-CTTATAGGTTATTAGCCTTG-3' pPromotor LE IV : LE-Prom B: 5'-GGTGTTTCTTCATTATTTCAGCCT-3' LE-Prom A: 5'-GTTTCCTTAAAATCAGCCCAAATCA-3' pPromotor LE V : Nachweis des RNase LE-Promotor-GUS-Konstruktes in den transgenen Tomatenpflanzen : LE-Prom C : 5'-CTTATAGGTTATTAGCCTTG-3' GUS-antisense : 5'-CCAGACTGAATGCCCACAGGCCG-3' Transkriptionsstartpunktbestimmung mittels 5'-RACE : RNase LE : LE/GSP1: 5'-GAATGTCAGCACCTTGAAG-3' LE/GSP2: 5'-TTCAGCACAAGTGCCATG-3' LE/GSP3: 5'-ATGGCTTCTAATTCAGCC-3' 5'RACE Abridged Anchor Primer (Gibco BRL) : 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' 5'RACE sense Primer : 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' Klonierung genomischer PCR-Produkte von PSI14 14 O-01 (Nukleotid 42- 59 der cDNA-Sequenz) : 5 ' - ATGGCTGGAATTGTAGTG-3 ' 14 O-02 (Nukleotid 384-402 der cDNA-Sequenz): 5'-AGGGCAGAGATTGCAACT-3' 14 O-03 (Nukleotid 887-906 der cDNA-Sequenz): 5 ′ –AGTAAACATGTCATACGTAC-3 ′ **SNuPE-Analyse** Reverse Transkription; 3'-PCR-Primer : PSI14/GSP1 5'-AGGGCAGAGATTGCAACT-3' 5'-PCR-Primer : 5' RACE Abridged Anchor Primer (Gibco BRL) 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' Gen-spezifische Primer: SNuPE 14/A: 5'-TCTTCTCTGAAAAGTTACT-3' SNuPE 14/B : 5'-GAGGTCTTCTATATTCATAAA-3' SNuPE 14/C: 5'-TCTTTTCTCGTCTCTAATTTACT-3' Transkriptionsstartpunktbestimmung mittels Primerextension: **PSI14/A1**: 5'-TTTGAGTAACTTTTCAGAGAAGAG-3' PSI14/B1: 5'-GTTTATGAATATAGAAGACCTCTG-3'

3. Methoden

3.1. DNA-Präparationsmethoden

3.1.1. Isolation genomischer DNA aus Zellsuspensionskulturen und pflanzlichem Gewebe

Die Isolation von genomischer DNA erfolgte nach der Methode von DELLAPORTA et al. (1983). Etwa 8 g Zellen einer 3-4 Tage alten Tomatenzellsuspensionskultur (oder 8 g Tomatenblätter) wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert, in 20 ml Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,5; 250 mM NaCl; 25 mM Na₂EDTA; 1 % (w/v) SDS) aufgenommen und 15 min bei 60 °C inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml PCIA (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (v/v/v) 25:24:1) und vorsichtigem Mischen wurde 15 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der wäßrige Überstand noch einmal mit PCIA extrahiert. Nach einer Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (Chloroform/Isoamylalkohol (v/v) 24:1) wurde der wäßrige Überstand mit 5 M Kaliumacetat auf eine Endkonzentration von 1,25 M eingestellt und 30 min im Eisbad inkubiert. Die ausgefallenen Polysaccharide wurden durch Zentrifugation (20 min; > 10000 U/min) abgetrennt und die Nukleinsäuren aus dem Überstand durch Zugabe von 0,54 Vol. Isopropanol ausgefällt (30 min; -20 °C), abzentrifugiert und in 15 ml TE-Puffer, pH 8,0 wieder gelöst. Nach Zugabe von 0,1 ml 10 mg/ml DNase-freier RNase A (MANIATIS et al., 1989) wurde der Ansatz 60 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte noch eine Reinigung der DNA durch zwei Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- und eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion. Die DNA wurde aus der wäßrigen Phase durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 0,54 Vol. Isopropanol ausgefällt (30 min; -20 °C), abzentrifugiert, mit 70 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1-2 ml TE-Puffer, pH 8,0 gelöst. Die Quantifizierung der DNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (1 $OD_{260 nm}$ = 50 µg DNA/ml).

Die Isolation von genomischer DNA aus den transgenen Tomatenpflanzen erfolgte mit Hilfe des DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers.

3.1.2. Isolation von DNA des Bakteriophagen λ

Die Anzucht der Plattierungsbakterien sowie das Ausplattieren und das Titern der λ -Phagen erfolgten nach Standardprotokollen (MANIATIS et al., 1989). Zur Isolation der Phagen-DNA wurde der QIAGEN Lambda Maxi Kit verwendet.

Die Gewinnung der Phagenkulturen erfolgte nach der "Infection at low multiplicity"-Methode (BLATTNER et al., 1977; MANIATIS et al., 1978). 500 ml LB-Medium, das 10 mM MgSO₄ enthielt, wurden mit 10¹⁰ Bakterien und 5 x 10⁷ pfu λ –Phagen beimpft und 16 h bei 37 °C stark geschüttelt. Durch Zugabe von 10 ml Chloroform wurden die Bakterienzellen lysiert. Im Anschluß daran wurden die Bakterien-DNA und -RNA durch Inkubation mit DNase I aus Pankreas und RNase A (je 1 mg/ml; 45 min RT) gespalten. Durch Zugabe von festem NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M erfolgte eine Ablösung der λ -Phagen von den Bakterienzellresten (Inkubation für 1 h auf Eis). Danach wurden die Bakterienzellbruchstücke abzentrifugiert (15 min; 8000 U/min), die λ -Phagen aus dem Medium durch Zugabe von 10 % (w/v) PEG 6000 ausgefällt (Inkubation für 2 h auf Eis) und abzentrifugiert (30 min; 10000 U/min; 4 °C). Die Extraktion der λ -DNA erfolgte entsprechend dem QIAGEN Lambda DNA Maxi Präparationsprotokoll.

3.1.3. Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*-Stämmen

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden in Abhängigkeit von der weiteren Verwendung verschiedene Methoden verwendet:

A: Isolation recombinanter Plasmid-DNA nach der Minipräparationsmethode

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der alkalischen Lyse-Methode von BIRNBOIM und DOLY (1979) isoliert. Je 5 ml Übernachtkultur wurden pelletiert und in 200 μ l Lysepuffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM Na₂EDTA) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 400 μ l alkalische SDS-Lösung (0,2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS) zugesetzt. Die Proteine und Zellbruchstücke wurden durch Zugabe von 300 μ l 3 M Kalium-acetatlösung, pH 5,5 ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (10 min; 14000 U/min). Der Überstand wurde einmal mit PCIA gereinigt und anschließend die DNA durch Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol gefällt und abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μ l Wasser gelöst. Der Abbau vorhandener RNA erfolgte durch Zusatz DNase-freier RNase A zu den Restriktionsansätzen.

B. Isolation hochreiner Plasmid-DNA für die Sequenzierung und zur transienten Transformation der Zellkultur

In Abhängigkeit von der benötigten Menge an Plasmid-DNA wurden der QIAGEN-Plasmid-Midi- oder QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kit für die Isolation verwendet.

3.1.4. Isolation von Plasmid-DNA aus Agrobacterium tumefaciens

Die Agrobakterien wurden in 20 ml YEB-Medium unter Selektionsdruck für 2 Tage bei 28 °C angezogen und dann abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysepuffer (50 mM

Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM Na₂EDTA) resuspendiert. Die Zellwände wurden durch Zugabe von 1 ml Lysozymlösung (10 mg / ml in TE-Puffer; frisch hergestellt) und anschließender Inkubation bei RT für 10 min angedaut. Die vollständige Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 2 ml alkalischer SDS-Lösung (0,2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS). Nach einer Inkubation bei RT für 5 min wurden Proteine und Zellbruchstücke durch Zugabe von 1,5 ml 3 M Natriumacetat, pH 5,2 ausgefällt (5 min Inkubation auf Eis) und abzentrifugiert (30 min; 4°C; 5000 U/min). Zur DNA-Reinigung erfolgte eine Extraktion mit PCIA. Aus dem klaren Überstand wurde die DNA über Nacht bei -20 °C mit 2,5 Vol. 96 % igem Ethanol gefällt und anschließend abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer, pH 8,0 gelöst.

3.2. RNA- Präparationsmethoden

Zur Schaffung RNase-freier Bedingungen wurden alle Geräte mit einer 0,1 %igen (v/v) Diethylpyrocarbonatlösung (DEPC; SIGMA) behandelt sowie Lösungen mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt bzw. mit DEPC behandeltem Wasser hergestellt und anschließend autoklaviert.

3.2.1. Isolation von Gesamt-RNA

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus der Zellsuspensionskultur wurde die Methode von REINBOTHE et al. (1992) genutzt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in ein 50 ml Falcongefäß überführt. Je Gramm Probe wurden 3 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM NaCl; 5 mM Na₂EDTA; 2 % (w/v) SDS), 3 ml Phenol und 1,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (v/v = 24:1) zugesetzt und 5 min stark gemischt. Nach 5 min Zentrifugation bei 5000 U/min und 4 °C wurde die wäßrige Phase noch 2 x mit je 0,25 Vol. PCIA und 1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol (v/v = 24:1) extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden über Nacht bei -20 °C durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Vol. 96 %igem Ethanol gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser gelöst. Die Trennung der mRNA/rRNA-Fraktion von der genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. 4 M LiCl und Inkubation über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die RNA abzentrifugiert (30 min; 5000 U/min; 4 °C), mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einer entsprechenden gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (1 OD_{260 nm} = 40 µg RNA/ml).

3.2.2. Isolation von mRNA

Die mRNA wurde aus der Gesamt-RNA mit Hilfe des QIAGEN Oligotex mRNA Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert.

3.3. DNA-Klonierungstechniken in Escherichia coli

3.3.1 Herstellung der DNA-Fragmente

Die Spaltung der DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurde entsprechend den Angaben der Hersteller in den jeweiligen Inkubationspuffern durchgeführt. Nach Beendigung der Restriktion erfolgte die Dephosphorylierung der Vektor-DNA durch Zugabe von 10 Einheiten Intestinale Alkalische Phosphatase vom Kalb (Fermentas) zum Restriktionsansatz und anschließender Inkubation bei 37 °C für 30 min. Die DNA-Fragmente wurden in 0,8 - 1,5 % igen Agarosegelen unter Benutzung von 1 x TAE (0,04 M Tris; 0,04 M Acetat; 1 mM Na₂EDTA) als Gel- und Laufpuffer (MANIATIS et al., 1989) und 0,5 µg/ml EtBr im Gel aufgetrennt. Spezifische DNA-Fragmente wurden nach dem QIAEX II-Agarosegel-Extraktionsprotokoll (QIAGEN) isoliert.

3.3.2. Ligation, Transformation und Selektion rekombinanter Klone

Bei der Klonierung von genomischen DNA-Fragmenten wurden 50 ng linearisierte, mit alkalischer Phosphatase behandelte Vektor-DNA in einem Volumen von 20 μ l mit der 5- bis 10fachen Menge des isolierten DNA-Fragmentes in 1 x Ligationspuffer mit 30 Einheiten T₄-DNA Ligase (Fermentas) gemischt und 16 h bei 12 °C inkubiert. Die Transformation in den Bakterienstamm DH5 α wurde nach dem HANAHAN-Protokoll durchgeführt (MANIATIS et al., 1989).

Zur Ligation von PCR-Fragmenten wurden 50 ng linearisierte Vektor-DNA und eine äquimolare Menge des zu klonierenden DNA-Fragmentes in einem Volumen von 10 μ l mit 1 x Ligationspuffer und 4 Einheiten T₄-DNA Ligase gemischt und 16 h bei 12 °C inkubiert (TA-Cloning-Kit; Invitrogen). Die anschließende Transformation in den Bakterienstamm INV α F' erfolgte nach dem TA-Cloning Kit-Protokoll.

Positive Klone wurden durch DNA-Minipräparationen und anschließende Restriktionsanalysen identifiziert. Alternativ wurde zu diesem Zweck auch die Methode der Kolonie-Hybridisierung eingesetzt.

3.4. Hybridisierung von Nukleinsäuren

3.4.1. Northern-Analyse

Je 25 - 30 μ g Gesamt-RNA wurden unter denaturierenden Bedingungen im Agarose-Formaldehyd-Gel (1,5 % Agarose; 1,11 % Formaldehyd) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer (20 mM 3-[N-Moropholino]-propan-sulfonsäure, pH 7,0; 5 mM Natriumacetat; 1 mM Na₂EDTA) verwendet.

Die RNA wurde durch Inkubation für 15 min bei 65 °C in folgender Lösung denaturiert :

RNA	6,0 µl
Formamid	12,5 µl
10 x MOPS-Puffer	2,5 µl
Formaldehyd	4,0 µl

Anschließend wurden 3 µl einer 50 %igen Glycerinlösung mit 0,1 % Bromphenolblau (als Farbstoff) und 0,5 µl EtBr (5 mg/ml Wasser) zugegeben.

3.4.2. Southern-Analyse (SOUTHERN, 1975)

Plasmid- oder genomische DNA wurde entsprechend den Angaben der Hersteller mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen gespalten und in einem 0,8 - 1,5 % igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel nacheinander 10 min mit 0,25 N HCl, 30 min mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und 30 min mit Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl) behandelt. Danach erfolgte der Transfer der DNA auf die Nylonmembran mittels Kapillartransfer (vgl. Kap. 3.4.6.).

3.4.3. Kolonie-Hybridisierung

Transformierte Zellen wurden geordnet auf Agarplatten ausgestrichen und die unter dem Selektionsdruck der entsprechenden Antibiotika gewachsenen Zellkolonien mit Nylonmembranen abgezogen. Die Kolonien wurden durch Inkubation auf mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) getränktem Filterpapier für 10 min lysiert. Nach der anschließenden Inkubation auf mit Neutralisierungslösung (0,5 M Tris- HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl) getränktem Filterpapier für 10 min in 2 x SSC gespült. Nach der DNA-Fixierung (vgl. Kap. 3.4.6.) wurden Bakterienreste durch Abreiben in 2 x SSC entfernt.

3.4.4. Plaque-Hybridisierung

Die Phagen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert (MANIATIS et al., 1989). Von jeder Platte wurden zwei Filter hergestellt. Eine Hybond-N-Membran (Amersham) wurde auf die Oberfläche gelegt und asymmetrisch markiert. Nach 2 min (Replikat nach 5 min) wurde die Membran entfernt. Denaturierung und Neutralisierung erfolgten wie bei der Kolonie-Hybridisierung beschrieben (vgl. Kap. 3.4.3.).

Positive Klone wurden aus den Agarplatten ausgestochen und in sterilen Eppendorfgefäßen mit 1 ml SM-Puffer (100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 2 % (w/v) Gelatine) und 50 μ l Chloroform vermischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert, wobei die Phagen aus dem Agar in den SM-Puffer diffundieren und Bakterienreste durch Chloroform lysiert werden.

3.4.5. Markierung der DNA-Sonden

Als Hybridisierungsproben wurden doppelsträngige DNA-Fragmente verwendet. Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte mit dem Nick-Translationskit (Boehringer Mannheim) und unter Verwendung von 2'-Desoxycytidin-5'-(α -³²P)-triphosphat (Amersham) nach den Angaben des Herstellers. Nicht eingebaute 2'-Desoxyribonukleotide wurden vom Reaktionsansatz getrennt, indem die markierte DNA mit 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 3,5 Vol. kaltem 96 %igem Ethanol ausgefällt, abzentrifugiert und in 100 µl Wasser wieder gelöst wurde.

3.4.6. Hybridisierungen

Northern- und Southern-Hybridisierungen wurden im wesentlichen nach Standardprotokollen durchgeführt (MANIATIS et al., 1989).

RNA- oder DNA-Fragmente wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel mittels Kapillartransfer mit 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumacetat, pH 7,0) als Transferpuffer auf positiv geladene Nylonmembranen (Boehringer Mannheim) transferiert. Die Nukleinsäuren wurden durch UV-Behandlung (UV-Stratalinker® 1800; Stratagene) im Auto-Crosslink-Modus und zweistündiges Backen bei 80 °C irreversibel an der Membran fixiert.

Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden während der Prähybridisierung durch unspezifische DNA abgesättigt. Nach 2 - 4 h Prähybridisierung bei 65 °C erfolgte die Hybridisierung der immobilisierten DNA mit den ³²P-markierten Sonden für 18 - 20 h bei 65 °C. Die Membran wurde dann je einmal in 2 x SSC/0,1 % (v/v) SDS; 1 x SSC/0,1 % (v/v) SDS; bzw. 0,1 x SSC/0,1 % (v/v) SDS für je 20 min bei 65 °C gewaschen. Anschließend wurde die noch feuchte Membran in Folie verpackt und zur Autoradiographie eingesetzt (FUJI BAS Imager, Raytest; Röntgenfilm X ray RETINA XBD, ORWO).

Die quantitative Auswertung der Signale in den Northern-Hybridisierungen erfolgte mit dem Programm TINA (Raytest). Zur Korrektur von Variationen beim Auftragen der Proben wurden die gemessenen Intensitätswerte (PSL) jeweils durch das Signal der Kontroll-Hybridisierung mit den Klonen pBD18 bzw. pUBI 3 (vgl. Kap. 2.1.) dividiert.

Hybridisierungspuffer :	5 x SSC (750 mM NaCl; 75 mM Natriumcitrat, pH 7,0)	
	5 x Denhardt's Lösung (0,1 % (w/v) Ficoll; 0,1 % (w/v) PVP;	
	0,1 % (w/v) BSA)	
	0,1 % (w/v) SDS	
	0,1 mg/ml gescherte, denaturierte Fisch-Sperma-DNA	

3.5. DNA-Sequenzanalyse

3.5.1. Radioaktive Sequenzierung

Die zu sequenzierenden DNA-Fragmente wurden zunächst in geeignete Vektoren kloniert. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide nach der Didesoxynukleotid-Methode (SANGER et al., 1977) mit dem DNA-Sequencing Kit, Sequenase Version 2.0 (Amersham) entsprechend dem dazugehörigen Protokoll. Die DNA-Fragmente der Sequenzierreaktionen wurden in einem 6 %igen denaturierenden (7 M Harnstoff) PAA-Gel unter Benutzung von 1 x TBE (0,1 M Tris; 0,1 M Natriumborat; 2 mM Na₂EDTA) als Gelund Laufpuffer aufgetrennt. Die Glasplatten wurden vor dem Zusammensetzen mit je 5 % Dichlormethylsilan (Sigmacote, SIGMA) in Chloroform beschichtet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 45 min in einer Lösung aus 10 % (v/v) Essigsäure/10 % (v/v) Methanol in Wasser fixiert, auf Filterpapier aufgezogen, getrocknet und dann zur Autoradiographie (20 h, Raumtemperatur, Hyperfilm-ßmax, Amersham) eingesetzt.

3.5.2. Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern

Die Sequenzierung der zuvor klonierten PCR-Fragmente erfolgte mit einem A.L.F. DNA-Sequenzer (Pharmacia) unter Verwendung des AutoRead[™] Sequencing-Kit (Pharmacia) nach den Protokollen des Herstellers.

3.6. Screening genomischer DNA-Banken durch Kombination von PCR und Filterhybridisierung

Für das Screening der genomischen Tomaten-DNA-Bank (vgl. Kap. 2.4.1.) nach Klonen der RNasen LE und LX wurde eine modifizierte Form des von AMARAVADI und KING

(1994) beschriebenen Protokolls genutzt. Dazu wurde die Phagenbank auf 16 Agarplatten (Durchmesser 150 mm) mit einer Dichte von 2-3 x 10^4 pfu ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert (MANIATIS et al. 1989). Anschließend wurden die Platten mit 20 ml SM-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 2 % (w/v) Gelatine) überschichtet und über Nacht bei 4 °C mit 100 U/min geschüttelt. Von jeder Agarplatte wurden 2 ml Phageneluat in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Bakterienzellen wurden durch die Zugabe von 0,3 % Chloroform und anschließende Inkubation bei 37 °C für 20 min lysiert und abzentrifugiert (10 min; 5000 U/min).

Die so erhaltenen Phagenstammlösungen wurden direkt als Template in der PCR eingesetzt. Ein Ansatz (50µl) enthielt 1 x PCR-Puffer (Eurogentech); 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP (Boehringer Mannheim); je 50 pmol der beiden Sequenz-spezifischen Primer; 5 µl Phagenlysat und 1,25 Einheiten Gold Star Taq-Polymerase (Eurogentech). Alle Reagentien mit Ausnahme der Taq-Polymerase wurden gemischt und mit Mineralöl (SIGMA) überschichtet. Anschließend wurden die Ansätze 10 min auf 98 °C erhitzt und dann 60 min bei 80 °C inkubiert, um die Phagen-DNA aus den Phagenköpfen freizusetzen. Dann wurde die Taq-Polymerase hinzugefügt. Die Amplifikation fand über 30 Zyklen statt. Ein Zyklus umfaßte 1,5 min Denaturierung bei 94 °C; 2 min Primerannealing bei 56 °C und 3 min Primerextension bei 72 °C. Nach dem letzten Zyklus wurde noch eine 10 min Primerextension bei 72 °C durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 % igen TAE-Agarosegel analysiert.

Lysate, die ein positives Signal gaben, wurden getitert und mit einer Dichte von 15000 pfu/ Agarplatte (150 mm Durchmesser) ausplattiert. Diese Platten wurden zum Screening mittels Plaque-Hybridisierung (vgl. Kap. 3.4.4.) eingesetzt. Jeder positive Plaque wurde durch mindestens zwei weitere Screening-Runden gereinigt. Anschließend wurde von diesen Phagen die DNA isoliert (vgl. Kap. 3.1.2.), mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten und mittels Southern-Hybridisierung analysiert. Fragmente, die Sequenzen der zu untersuchenden Gene enthielten, wurden isoliert, in geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert.

3.7. PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde zur Lösung verschiedener Aufgabenstellungen verwendet:

- Einführung einer NcoI-Schnittstelle am Translationsstartpunkt der RNase LE
- Herstellung von verkürzten Promotorfragmenten der RNase LE

- Überprüfung von Bakterienkolonien auf die Präsenz eines gewünschten Plasmides durch Amplifizierung eines DNA-Fragmentes definierter Größe
- Nachweis des Vorhandenseins der durch Agrobakterien in das Kerngenom von Tomatenpflanzen übertragenen Fremdgene
- Klonierung genomischer Sequenzen des Klons PSI14
- Herstellung von Hybridisierungsproben

Die Amplifizierung wurde in 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen in einem Thermocycler (Gene ATAQ Controller, Pharmacia) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz (100 μ l) enthielt 1 x Amplifizierungspuffer (Eurogentech); 1,5 mM MgCl₂; 200 μ M dNTP (Boehringer Mannheim); je 50 pmol der beiden Sequenz-spezifischen Primer und 0,1-2 μ g Template-DNA. Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl (SIGMA) überschichtet. Anschließend erfolgte eine Denaturierung der DNA durch Inkubation bei 98 °C für 10 min. Nach Zugabe von 1 Einheit *Taq* Polymerase (Gold Star Polymerase; Eurogentech) kam folgendes Temperatur-Programm zur Anwendung:

- 1. Denaturierung bei 94 °C; 1,5 min
- 2. Primerannealing; 2 min
- 3. Primerextension; 3 min

Nach 30maliger Wiederholung der Schritte 1-3 erfolgte noch eine 10 min Primerextension bei 72 °C. Die Berechnung der Annealing-Temperaturen erfolgte nach der Formel:

$Tm[^{\circ}C] = 4 \times GC + 2 \times AT$

Als Annealing-Temperatur wurde der Wert (Tm + 4 °C) für den Primer mit der niedrigeren Annealing-Temperatur gewählt.

3.8. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes

3.8.1. 5' RACE-System

Mit Hilfe der RACE-Technik können Nukleinsäuresequenzen einer mRNA zwischen einem bekannten internen Primer und ihrem unbekannten 5'- oder 3'-Ende amplifiziert werden (FROHMAN 1993).

Bei der 5'-RACE-Methode erfolgt die Erststrang-cDNA-Synthese mit Hilfe der Reversen Transkriptase unter Verwendung eines genspezifischen antisense Oligonukleotides (GSP1) als Primer. Dadurch wird nur eine spezifische mRNA oder mRNA-Familie in eine cDNA konvertiert. Nach der enzymatischen Entfernung der RNA wird an das 3'-Ende der gereinigten ss cDNA durch das Enzym Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) eine einzelsträngige homopolymere Sequenz anpolymerisiert (Tailing). Diese cDNA wird anschließend in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Dabei werden zur Erhöhung der Spezifität ein weiteres genspezifisches antisense Oligonukleotid (GSP2), das 3' von GSP1 an das Template bindet, und ein sense Primer (Anchor Primer), der komplimentär zu der durch die TdT anpolymerisierten homopolymeren Sequenz ist, eingesetzt.

Die Arbeiten wurden mit Hilfe des Kits 5'-RACE-System (Gibco BRL) in 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen in einem Thermocycler (Gene ATAQ Controller, Pharmacia) durchgeführt und erfolgten nach den Protokollen des Herstellers. Für die Reaktion wurde aus 24 h in Pi-freiem Medium inkubierten Tomatenzellen isolierte mRNA bzw. Gesamt-RNA (vgl. Kap. 3.2.) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden in einem TBE-Agarosegel (2 %ige MetaPhor[™]Agarose, Biozym) analysiert und in den Vektor pCR[®]2.1 (TA-Cloning-Kit, Invitrogen) kloniert und sequenziert.

3.8.2. Primerextension

Die Primerextension wurde in Anlehnung an das Protokoll von MYÖHÄNEN und WAHL-FORS (1993) durchgeführt. Die Markierung des Oligonukleotidprimers am 5'-Ende erfolgte mittels T₄-Polynukleotidkinase und [γ -³² P] ATP (spez. Aktivität 180 TBq; >5000 Ci/mmol; 370 MBq; 10 mCi/ml; Amersham). Zur Erzielung einer möglichst hohen spezifischen Aktivität der eingesetzten Probe wurde mit einem Überschuß an γ -³² P-ATP im Reaktionsansatz gearbeitet. Der Reaktionsansatz (20 µl) enthielt 2 µl 10 x Kinase-Puffer (Fermentas), 100 pmol Oligonukleotidprimer, 15 µl [γ -³² P] ATP und 10 Einheiten T₄-Polynukleotidkinase und wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Inkubation bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Die Abtrennung des nicht eingebauten [γ -³² P]-ATP erfolgte durch Ethanolpräzipitation (MANIATIS et al., 1989).

10 bzw. 50 µg Gesamt-RNA oder 2 µg mRNA, isoliert aus 24 h in Pi-freiem Medium inkubierten Tomatenzellen, wurden mit je 20 pmol radioaktiv markiertem Oligo-nukleotidprimer gemischt, 10 min auf 65 °C erhitzt und dann langsam im Wasserbad auf eine Temperatur < 30 °C abgekühlt. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit 50 µg Gesamt-RNA aus +Pi-Tomatenzellen mitgeführt. Die RNA-Primer-Hybride wurden durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Vol. 100 % igen Ethanol gefällt (2 h bei -80 °C), abzentrifugiert, einmal mit 80 % igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Zum Präzipitat wurden anschließend 10 µl 5 x Reverse Transkriptase Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 5 µl 10 mM dNTP, 5 µl 0,1 M DTT; 28,5 µl DEPC-Wasser und 1,5 µl Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Gibco BRL) hinzugefügt und der Reaktionsansatz 1 h bei 50 °C inkubiert. Die RNA wurde durch Inkubation für

30 min mit je 3 Einheiten RNase H (Gibco BRL) bei 37 °C abgebaut, die ss DNA durch eine Extraktion mit PCIA gereinigt und durch Zusatz von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Vol. 100 % igem Ethanol gefällt (über Nacht bei -80 °C), abzentrifugiert, einmal mit 80 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 6 µl Wasser und 4 µl Sequencing loading Puffer (Amersham) gelöst. Die Reaktionsprodukte wurden 3 min auf 90 °C erhitzt und auf einem 10 % igen denaturierenden (7 M Harnstoff) PAA-Gel unter Benutzung von 1 x TBE (0,1 M Tris; 0,1 M Natriumborat; 2 mM Na₂EDTA) als Gel- und Laufpuffer aufgetrennt. Als Marker wurde eine Sequenzierreaktion (vgl. Kap. 3.5.1.) aufgetragen, in der das radioaktiv markierte Oligonukleotid als Primer diente.

3.9. Single Nukleotide Primer Extension (SNuPE)

Mit dieser Methode ist der spezifische Nachweis der mRNA Transkripte von einzelnen Mitgliedern einer Genfamilie trotz hoher Sequenzhomologie auf Nukleotidebene möglich. Dabei wird zunächst RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in eine ss cDNA umgeschrieben und in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Anschließend erfolgt der Nachweis der Subtyp-spezifischen PCR-Produkte durch die SNuPE-Reaktion (LOMBARDO und BROWN; 1996; Abb. 2).



Abb. 2 : Schematische Darstellung der SNuPE-Reaktion am Beispiel der PSI14-Gene. Die für alle Subtypen identischen Primer für die RT-PCR sind durch graue Boxen dargestellt, während die farbigen Boxen die drei genspezifischen Primer symbolisieren.

Die für die RT-PCR eingesetzten Oligonukleotidprimer sind komplimentär zu Sequenzen, die bei allen Mitgliedern der Genfamilie vorhanden sind (graue Boxen). Dadurch entstehen für alle Subtypen gleich große PCR-Produkte. Diese PCR-Produkte werden anschließend in einer zweiten Reaktion als Template eingesetzt, in der Subtyp-spezifische Oligonukleotidprimer an ihre entsprechenden Sequenzen in den PCR-Produkten (farbige Boxen) hybridisieren und an ihrem 3'-Ende durch das Enzym *Taq*-Polymerase um ein radioaktiv markiertes Nukleotid verlängert werden. Deshalb wird als einziges Nukleotid [α -³²P] dCTP dem Reaktionsansatz hinzugesetzt und der Sequenz-spezifische Primer so gewählt, daß das TemplateNukleotid, welches unmittelbar 3' des verlängerten Primers folgt, kein weiteres Guanosin ist [in der Abb. 2 deshalb durch den IUB-Kode 'H'(= A,C,T) bezeichnet]. Da sich die einzelnen Subtyp-spezifischen Oligonukleotidprimer in ihrer Länge unterscheiden, können sie elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie nachgewiesen werden.

Die cDNA-Synthese und die RT-PCR wurden entsprechend den Protokollen des 5'-RACE-Kits (Gibco BRL) durchgeführt. Als Primer für die Reverse Transkriptase sowie als 3'-PCR-Primer wurde das Oligonukleotid PSI14/GSP1 verwendet. Als 5'-PCR-Primer diente der *Abridged Anchor Primer* aus dem Kit (vgl. Kap. 2.7 und 3.8.1.). Die PCR-Produkte wurden durch TAE-Agarosegelelektophorese von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt und aus dem 1,5 %igen Gel mit Hilfe des QIAEX II-Agarosegel-Extraktionskit (QIAGEN) isoliert.

Der Reaktionsansatz der SNuPE-Reaktion (50µ1) enthielt ca. 50 ng Template, 1 x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, 1µM jedes Sequenz-spezifischen Oligonukleotidprimers, 5 µCi [α -³²P] dCTP (25 Ci/mmol, 10 mCi/ml; Amersham) und 4 Einheiten *Taq* Polymerase (Gold Star Polymerase; Eurogentech). Es wurde ein einziger Reaktionszyklus durchgeführt: 3 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Primerannealing bei 52 °C und 1 min Primerextension bei 72 °C. Die SNuPE-Reaktionsprodukte wurden anschließend in einem 20 %igen denaturierenden PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Folie eingewickelt und zur Autoradiographie eingesetzt (FUJI BAS Imager, Raytest). Die quantitative Auswertung der Signale erfolgte mit Hilfe des Programmes Tina (Raytest).

3.10. Transiente Transformation der Tomatenzellkultur mittels Partikelkanone

Bei der transienten Expressionsanalyse der verschiedenen RNase LE- Promotorkonstrukte wurde ihre Pi-Mangel-abhängige Aktivierung im Vergleich zum konstitutiv expremierten Kontrollkonstrukt pRT103 GUS (TÖPFER et. al.; 1988) untersucht. Dabei wurden 2 Tage alte +Pi-Zellen sowie eine 2 Tage alte Normalkultur, die anschließend 24 h in Pi-freiem Kulturmedium angezogen wurde, verwendet (-Pi-Zellen). Für die Expressionsanalysen wurden die Promotor-GUS-Konstrukte (Testkonstrukte) und das Plasmid pRT101 LUC (diente als interner Standard zur Kalibrierung des Testsystems) im Verhältnis 1 : 1 eingesetzt.

Jeweils 1,5 x 10⁶ Zellen wurden mittels Vakuumfiltration auf ein Whatman Glasfaser Mikrofilterpapier (Durchmesser 55 mm) aufgetragen und auf Agarplatten (+Pi- bzw. -Pi-Zellkulturmedium mit 0,8 % Oxoid-Agar) transferiert.

28

Die Präzipitation der DNA an die Goldpartikel erfolgte nach dem CaCl₂ -Spermidin-Protokoll von KLEIN et al. (1988). 60 mg Goldpartikel (Durchmesser 1,6 μ m; Bio-Rad Laboratories) wurden in 1ml 100 % igem Ethanol resuspendiert, 3 min stark geschüttelt, 1 min bei 10000 U/min abzentrifugiert, zweimal mit je 1 ml destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 1ml destilliertem Wasser resuspendiert. 50 μ l dieser Suspension wurden unter ständigem Schütteln mit 15 μ g DNA (Konzentration 1,5 μ g/ μ l in Wasser), 50 μ l 2,5 M CaCl₂ und 20 μ l 0,1 M Spermidin (freie Base) versetzt und 3 min intensiv gemischt. Danach wurden die Goldpartikel abzentrifugiert (10 s; 10000 U/min), einmal mit 250 μ l 100 % igem Ethanol gewaschen und anschließend in 80 μ l 100 % igem Ethanol resuspendiert. Pro Schuß kamen 20 μ l dieser Suspension zum Einsatz.

Zum Beschuß der Zellkultur wurde eine Helium-Druckkanone (Leiden University Workshop) verwendet und die Transformationsbedingungen in Vorexperimenten optimiert (siehe 4.5.1.2.).

Nach dem Beschuß wurden die Zellen auf den Agarplatten für 24 h bei 27 °C im Dunkeln kultiviert und anschließend die GUS-Aktivität histochemisch gezeigt oder fluorometrisch bestimmt (vgl. 3.13.3.2.).

Die mathematische Bearbeitung der ermittelten Werte erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von SCHLEDZEWSKI und MENDEL (1994). Die GUS-Aktivität wurde als pmol 4-Methylumbelliferon (MU)/min/20 µl Zellextrakt ermittelt. Zur Kalibrierung des Testsystems wurden die gemessenen Luciferase-Werte (vgl. 3.13.3.3.) in einen Faktor, der die Transformationseffiziens beschreibt, umgewandelt. Dazu wurde die Luciferase-Aktivität jeder Probe durch den größten ermittelten Luciferase-Wert aus der jeweiligen Meßreihe (Parallelen für ein Konstrukt) dividiert. Der ermittelte Transformationseffiziensfaktor liegt im Bereich zwischen 0 und 1 und hat die Einheit [rlu]. Die Kalibrierung erfolgte dann durch die Division der **GUS-Aktivität** jeder Probe durch den jeweiligen Transformationseffiziensfaktor. Die relative GUS-Aktivität wurde als GUS-Aktivität dividiert durch die Zeit und den Transformationseffiziensfaktor [pmol MU/min · rlu] berechnet. Die Ermittlung der Pi-Mangel-Induzierbarkeit der einzelnen RNase LE-Promotorkonstrukte erfolgte dann aus dem Verhältnis der Aktivität des getesteten Promotorkonstruktes und der Aktivität des 35S-Promotorkonstruktes.

3.11. Transformation von Agrobacterium tumefaciens

Die Transformation des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes LBA 4404 erfolgte mit Hilfe der Gefrier-/Tau-Methode von HÖFGEN und WILLMITZER (1988).

3.12. Stabile Transformation von Tomatenkotyledonen durch Agrobakterium-vermittelten Gentransfer

Zur stabilen Transformation von Tomatenpflanzen wurde die Methode nach LING et. al (1998) verwendet. Die Kultivation erfolgte in einer Klimakammer bei 22 °C und 16 h Licht/ 8 h Dunkelheit pro Tag.

Tomatensamen (Lycopersicon esculentum Mill. cv. Lukullus oder Lycopersicon esculentum Mill. cv. Moneymaker) wurden durch Inkubation für 15 min in 70 % igem Ethanol und anschließend für 15 min in 6 % iger Natriumhypochloritlösung sterilisiert, dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und auf MS-Agarplatten ausgelegt. Von ca. 10 Tage alten Keimlingen wurden die Kotyledonen geschnitten (ca. 50 x 25 mm) und für 3 Tage auf Zwischenmediumplatten (MS-Medium mit 1,146 mg/l BAP und 0,1023 mg/l NAA), die 24 h vorher mit einer Tabak-Feederkultur beschichtet worden waren, kultiviert. Die Kotyledonenstückchen wurden anschließend für 30 min unter leichtem Schütteln in einer Bakteriensuspension $(OD_{600 \text{ nm}} \sim 0.3)$ inkubiert und dann für 3 Tage auf die Zwischenmediumplatten zurückgelegt (Kokultivierung der Kotyledonenstückchen mit den Agrobakterien). Danach wurden sie auf Selektionsmedium [MS-Medium mit 2 mg/l Zeatin (trans-Isomer), 50 mg/l Kanamycin und 160 mg/l Betabactyl] umgelegt und alle 3 Wochen auf frisches Selktionsmedium umgesetzt. Sich bildende Sprosse wurden von den Kalli abgeschnitten und auf Wurzelinduktionsmedium (MS-Medium mit 0,1 mg/ml IAA, 30 mg/l Kanamycin und 160 mg/l Betabactyl) überführt. Pflanzen, die in der Lage waren, unter dem Selektionsdruck von Kanamycin Wurzeln zu bilden, wurden für die weiteren Untersuchungen vermehrt. Ihre Kultivation erfolgte auf Wurzelinduktionsmedium in Magentatöpfen GA7 (SIGMA).

MS-Medium : Murashige and Skoog-Medium mit 3 % Saccharose

Alle festen Medien enthielten 0,8 % Plant-Agar. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 1 N NaOH auf pH 6,1 eingestellt.
3.13. Bestimmungen

3.13.1. Protein

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den GUS-Proben wurde die Methode nach LOWRY et al. (1951) verwendet. Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin im Bereich von 0 - 100 μ g/ μ l erstellt.

3.13.2. Phosphat

Zur Bestimmung des Phosphatgehaltes in den Kulturmedien wurde die Methode nach ZILVERSMIT et al. (1950) eingesetzt. Sie beruht auf der spektrophotometrischen Messung der Konzentration eines Phosphormolybdat/Vanadat-Komplexes bei 405 nm. Das Medium wurde durch Zentrifugation geklärt, mit 1 Vol. 20 %iger TCA versetzt und 2h auf Eis inkubiert (Deproteinisierung). Nach 10 min Zentrifugation bei 5000 U/min wurden 100 - 500 μ l des Überstandes als Probe eingesetzt. Als Phosphatstandard diente KH₂PO₄ in Pi-freier Nährlösung.

3.13.3. Enzyme

3.13.3.1. Ribonuklease

Die Quantifizierung von RNase-Aktivitäten in den Kulturmedien erfolgte in modifizierter Form (ABEL und GLUND, 1987) nach AMBELLAN und HOLLANDER (1966) durch spektrophotometrische Messung ethanollöslicher RNA-Spaltprodukte bei 260 nm nach enzymatischer Hydrolyse. Als Einheit der enzymatischen Aktivität wurde die Menge an Enzym definiert, die eine Absorptionszunahme von 1,0 Extinktionseinheiten/ml x min verursacht (WILSON, 1975) und als Wilson-Einheit (WE) bezeichnet.

3.13.3.2. ß-Glucuronidase

Herstellung der Zellextrakte

Die Zellen wurden mit 1 x PBS-Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0; 150 mM NaCl) vom Filterpapier abgespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 5000 U/min). Das Pellet wurde in 2 ml Zellkulturlysispuffer (100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,8; 1 mM Na₂EDTA; 7 mM 2-Mercaptoethanol; 10 % (v/v) Glycerol; 1 % Triton X-100; LUEHRSEN und WALBOT, 1993) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch 30 s Ultraschall (40 % Leistung; Ultraschall-Desintegrator Sonoplus HD 70; Bandelin). Anschließend wurden Zellreste abzentrifugiert (20 min, 5000 U/min, 4 °C) und der klare Überstand zur Bestimmung der GUS- bzw. Luciferase-Aktivität und des Proteingehaltes (vgl. 3.13.1.) eingesetzt.

Zur Bestimmung der GUS-Aktivität in den transgenen Tomatenpflanzen wurden Sproßstücke auf +Pi-Agar (2,85 mM Ca(NO₃)₂; 4 mM KH₂PO₄; 1 mM MgSO₄; 0,046 mM H₃BO₃; 0,018 mM FeSO₄; 0,016 mM Na₂EDTA; 0,014 mM MnCl₂; 0,007 mM ZnSO₄; 0,005 mM Na₂MoO₄; 0,003 mM CuSO₄; 0,8 % Plant-Agar; 0,1 mg/ml IAA; 30 mg/l Kanamycin und 160 mg/l Betabactyl) bzw. -Pi-Agar (KH₂PO₄ im Medium wurde durch KHSO₄ ersetzt) umgesetzt und 6 Wochen in einer Klimakammer bei 22 °C und 16 h Licht/ 8 h Dunkelheit pro Tag kultiviert. Anschließend wurden die Blätter und Wurzeln getrennt untersucht. Das Pflanzenmaterial (ca. 200 mg) wurde mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert und mit 2 ml (Wurzeln) bzw. 3 ml (Blätter) GUS-Extraktionspuffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 7,0; 10 mM Na₂EDTA; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 0,1 % (v/v) Natriumlaurylsarcosyl; 0,1 % (v/v) Triton X-100) homogenisiert. Nach Zentrifugation (15 min, 4 °C, 13000 U/min) wurde der Überstand zur Bestimmung der GUS-Aktivität und des Proteingehaltes eingesetzt.

Fluorometrischer GUS-Assay

Zur Messung der GUS-Aktivität wurde das Substrat 4-Methyl-Umbelliferyl-ß-D-Glucuronid (MUG) eingesetzt. Die Menge an fluoreszierendem 4-Methyl-Umbelliferon (MU) wurde in einem Fluorimeter (SFM 25; Kontron AG Zürich) bei 365 nm Anregungs-wellenlänge und 455 nm Emisionswellenlänge bestimmt. Dazu wurden jeweils 20 μ l Zell-extrakt und 1ml GUS-Assay-Puffer (1 mM MUG in 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,0; 10 mM Na₂EDTA; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 0,1 % (v/v) Natriumlaurylsarcosyl; 0,1 % (v/v) Triton X-100) gemischt und bei 37 °C inkubiert. In Zeitabständen von 20 min erfolgte die Entnahme von je 200 μ l aus dem Testansatz und die Überführung in ein Eppendorf-reaktionsgefäß, in dem die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 800 μ l 0,2 M Na₂CO₃ abgestoppt wurde (JEFFERSON et al., 1987).

Histochemischer GUS-Assay

Die histochemische Lokalisierung der GUS-Aktivität in Stengeln, Blattstielen und Blättern der transgenen Tomatenpflanzen erfolgte entsprechend des Protokolls von BLUME und GRIERSON (1997). Nach der Fixierung in 0,3 % Formaldehyd in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer, pH 7,0; 1 mM Na₂EDTA für 30 min und mehrmaligem Waschen mit 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer, pH 7,0; 1 mM 7,0 wurden die Hand-geschnittenen Querschnitte von Stengeln und Blattstielen in einer Färbelösung (0,5 mM X-Gluc in 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer, pH 7,0; 1 mM Na₂EDTA; 0,05 % (v/v) Triton X-100; 0,1 mM K₃[Fe(CN)₆]; 0,1 mM K₄[Fe(CN)₆]) bei 37 °C im Dunkeln über Nacht inkubiert. Blätter

wurden in einer Lösung aus 0,5 mM X-Gluc in 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer, pH 7,0; 50 mM NaCl; 1 mM Na₂EDTA; 0,2 % (v/v) Natriumlaurylsarcosyl; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 0,1 mM K₃[Fe(CN)₆]; 0,1 mM K₄[Fe(CN)₆]) gefärbt. Anschließend wurden die Proben durch Inkubation in einer Lösung aus 45 % (v/v) Ethanol; 5 % (v/v) Formamid; 5 % (v/v) Essigsäure für 6 h fixiert. Das Chlorophyll wurde durch Inkubation in 96 % igem Ethanol entfernt und die Proben anschließend bei 4 °C in 70 % igem Ethanol gelagert. Fixier-und Färbelösungen wurde jeweils zu Beginn der Inkubation für 5 min unter Vakuum infiltriert. Zum Photographieren (CCD Color Video Kamera) wurde ein Stereomikroskop (Stemi 2000) benutzt und die Gewebeschnitte auf einen Objektträger in einen Tropfen CLP-Lösung (2:1:1-Mixtur aus Chlorhydrat, Milchsäure und Phenol) gelegt.

Zur Detektion der GUS-Aktivität in den Wurzeln wurden 5 ml X-Gluc-Substratlösung (0,5 mg/ml X-Gluc in 100 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 -Puffer, pH 7,0; 0,5 mM Kaliumferricyanid; 1 % (v/v) Triton-X 100) direkt auf den Agar gegeben und die Magentatöpfe anschließend für 12 bis 24 h bei 37 °C inkubiert (CURTIS et al., 1997).

3.13.3.3. Luciferase

Die Luciferase-Aktivität wurde in einem Luminometer (LUMAT LB 9501, Berthold) mit Hilfe des *Luciferase Assay System* (Promega) bestimmt. Dazu wurden 20 µl Zellextrakt eingesetzt und das entstehende Licht 5 s nach dem Einspritzen von 100 µl *Luciferase Assay Reagens* für 10 s gemessen.

3.14. In vivo-Excision von Plasmid-DNA

Die aus der -Pi-CDNA-Bank (vgl. Kap. 2.4.2.) isolierten λ ZAP-Phagen wurden mittels Plaque-Hybridisierung gereinigt. Die pBluescript SK⁻-Phagemide mit den cDNA-Fragmenten wurden aus den Phagen entsprechend dem *in vivo*-Excisionsprotokoll des Herstellers isoliert (ZAP-cDNA[®]Synthesekit, Stratagene).

3.15. Computergestützte Sequenzanalyse

Sequenzdaten wurden mit den Programmen DNASIS (Version 6,0; Pharmacia, Uppsala, Schweden) und PC/GENE (Version 6,85; IntelliGenetics Inc., Geneva, Schweiz) analysiert. DNA- und Protein-Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen FASTA (PEARSON und LIPMAN, 1988) und BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, ALTSCHUL et al., 1990) durchgeführt (ExPASY Molecular Biology Server, http://expasy.hcuge.ch/www/expasy-top.html).

4. Ergebnisse

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung und Charakterisierung von genomischen Sequenzen, insbesondere den Promotoren, der RNasen LE und LX, die durch Pi-Mangel in der untersuchten Tomatenzellsuspensionskultur induziert und als Mitglieder eines Pi-Mobilisierungssystems für organisch gebundenes Phosphat diskutiert werden (GLUND und GOLDSTEIN 1993). Im Vorfeld dieser Arbeit wurden detaillierte Studien über die proteinchemischen und enzymatischen Eigenschaften der beiden RNasen durchgeführt sowie die cDNA-Klone isoliert (vgl. Kap. 1.). Durch die Isolierung und Charakterisierung von genomischen Sequenzen des für ein bisher unbekanntes Protein kodierenden cDNA-Klon PSI14 sollten die Promotorsequenzen eines weiteren Pi-Mangel-induzierbaren Proteins identifiziert und mit den Promotorsequenzen der beiden RNasen verglichen werden, um so möglicherweise potentielle *cis*-Elemente, die an der Induktion der Transkripte durch Pi-Mangel beteiligt sein könnten, zu identifizieren.

Zunächst sollte jedoch mit Hilfe von Northern-Analysen eine detailliertere Untersuchung des Induktionsprozesses dieser Proteine bei verschiedenen Anzuchtbedingungen der Zellen durchgeführt sowie die Induzierbarkeit der Proteine auch durch andere Faktoren (Verwundung, Pathogenbefall) untersucht werden.

4.1. Expressionsstudien mittels Northernblot-Analysen

4.1.1. Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der Expression der RNasen LE und LX sowie des Klons PSI14 in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit

Die Kultivation der Tomatenzellen erfolgte entweder unter Verbrauch des in der Nährlösung vorhandenen Phosphates (Normalkultur) oder bei konstantem extrazellulären Phosphatgehalt (+Pi-Kultur) bzw. in Abwesenheit jeglicher organischer oder anorganischer Phosphatquellen im Medium (-Pi-Kultur). Die Normalkultur wurde hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und ihres Nährstoffverbrauches ausführlich von NOVER et al. (1982) und TEWES et al. (1984) beschrieben. Die heterotroph wachsende Zellsuspensionskultur weist einen typischen biphasischen Wachstumsverlauf auf. Nach dem Beimpfen wachsen Normalkulturen ohne erkennbare lag-Phase für 3 bis 4 d logarithmisch mit einer Verdopplungszeit von 24 h. Nach einem Abschnitt verzögerten exponentiellen Wachstums (späte exponentielle Wachstumsphase, 4.-5. Kulturtag) folgt dann eine Stationärphase, die durch eine stark verminderte Zellteilungsrate gekennzeichnet ist. Dieser Wachstumsverlauf korreliert mit dem Phosphatverbrauch der Zellkultur (Abb. 3A; NÜRNBERGER, 1991; LÖFF- LER, 1993). Der Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase der Zellkultur ist durch einen starken und gleichzeitigen Anstieg der RNase-Aktivität im Medium sowie der intrazellulären RNase-Gesamt-Aktivität gekennzeichnet (ABEL, 1986; LÖFFLER, 1993). Bis zum 4. Kulturtag bleibt die intrazelluläre RNase-Aktivität der Zellkultur konstant, während sie dann innerhalb von 48 h um den Faktor 30 zunimmt. Mittels Aktivitätsfärbung nach Auftrennung von Zellextrakten in nativen PAA-Gelen wurde gezeigt, daß dieser Anstieg auf eine Induktion der beiden RNase-Isoformen LX und LV3 zurückzuführen ist, während die beiden anderen vakuolären RNase-Isoformen LV1 und LV2 nur schwer detektierbar waren (LÖFFLER, 1993). Die RNase-Aktivität im Medium (RNase LE) steigt beim Übergang in die Stationärphase um das 20fache innerhalb von 48 h an, während in +Pi-Kulturen ein Anstieg der RNase-Aktivitäten ausbleibt (NÜRNBERGER et al., 1990; LÖFFLER, 1993). Aufgrund der Übereinstimmung der Proteinsequenzen und der enzymatischen- und proteinchemischen Eigenschaften der beiden RNasen LE und LV3 wird vermutet, daß es sich bei beiden RNasen um identische Proteine handelt, die sich nur in der zellulären Lokalisation unterscheiden (LÖFFLER,1993; KÖCK et al., 1995). Mittels Northern-Hybridisierungen sollte im folgenden das Verhalten der Transkripte der beiden RNasen LE und LX sowie des Klons PSI14, der für ein noch unbekanntes, ebenfalls durch Pi-Mangel-induzierbares Protein kodiert, während des Wachstums der Zellkultur untersucht werden. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus einer 4 Tage alten Normalkultur, die als Vorkultur zum Beimpfen der Testkolben diente, sowie von 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tage alten Zellkulturen isoliert und mit den radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert (Abb. 3B). In der Vorkultur ist für alle 3 cDNA-Klone ein deutliches Signal detektierbar, das jedoch 1 d nach dem Umsetzen in neue Nährlösung nicht mehr nachweisbar ist. Zwischen dem 3. und 4. Kulturtag haben die Zellen das in der Nährlösung vorhandene Phosphat vollständig aufgenommen (Abb. 3A). Damit verbunden ist die Induktion der drei cDNA-Klone (Abb. 3B und C). Die Transkripte der RNasen LE und LX sind ab dem 4. bis 6. Kulturtag nachweisbar, wobei die mRNA der RNase LX auch noch am 7. Kulturtag detektierbar ist. Die mRNA des unbekannten Proteins PSI14 ist am 2. und 3. Kulturtag als schwaches Signal nachweisbar. Ab dem 4. bis 6. Kulturtag steigt der Transkriptlevel jedoch sehr stark an, während das Transkript am 7. Kulturtag nicht mehr nachweisbar ist. Die Northeranalyse zeigt, daß der beobachtete starke Aktivitätsanstieg der RNasen LE, LV3 und LX auf eine drastische Zunahme der entsprechenden Transkripte zurückzuführen ist.





d

Abb. 3B: Expression der RNasen LE (RLE) und LX (RLX) sowie des Klons PSI14 während des Kulturverlaufes der Zellkultur. Die Gesamt-RNA wurde nach den angegebenen Kulturtagen isoliert und mit den radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert. Der Nachweis der 18S rRNA (Klon pBD18) diente als interne Kontrolle.

Abb. 3C: Quantitative Auswertung der Signale der Northern-Hybridisierungen. Variationen beim Auftragen der Proben wurden anhand des Signals der Kontroll-Hybridisierung mit dem Klon pBD18 korrigiert. Die Angabe der relativen Transkriptmenge erfolgte als Prozent der maximal gemessenen, untergrundkorrigierten Intensität (PSL) des jeweiligen Klons (vgl. Kap. 3.4.6.)

In der -Pi-Kultur erfolgt dagegen ein sofortiger und kontinuierlicher Anstieg der RNase-Aktivitäten (NÜRNBERGER, 1991; LÖFFLER, 1993). Durch die detaillierte Untersuchung des Induktionszeitraums sollte im folgenden der frühestmögliche Zeitpunkt der Detektion der Induktion der Transkripte der RNasen LE und LX sowie des unbekannten Proteins PSI14 nach dem Umsetzen in Pi-freies Medium so genau wie möglich bestimmt werden. Dazu wurden 3 d alte +Pi-Tomatenzellkulturen in Pi-freies Kulturmedium umgesetzt und die Gesamt-RNA nach 0 h (= 3 d +Pi-Kultur), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 und 24 h isoliert. Die mRNA-Levels wurden mittels Northern-Hybridisierung analysiert, wobei die radioaktiv markierten cDNA-Fragmente als Sonde verwendet wurden. Für die RNase LE konnte 2 h nach dem Umsetzen auf -Pi-Medium ein Anstieg des mRNA-Levels detektiert werden, der sich während der nächsten 24 h kontinuierlich fortsetzte. Das Auftreten des Transkriptes der RNase LX ist jedoch erst nach 5 h Pi-Verarmung nachweisbar. Die mRNA des Klons PSI14 ist ebenfalls nach 2 h Pi-Verarmung detektierbar. Anschließend erfolgt auch bei diesen beiden Klonen ein kontinuierlicher Anstieg der Transkriptmenge (Abb. 4A und C). Aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, daß die mRNA des unbekannten Proteins PSI14 und der RNase LE nach 3 h Wachstum in Pi-freiem Nährmedium und die mRNA der RNase LX nach 8 - 10 h Pi-Verarmung nachgewiesen werden kann (ZIETHE, unveröffentlicht; KÖCK et al., 1995). Die Wahl der kürzeren Zeitabstände bei der Probennahme erlaubt eine Vorverlegung des frühestmöglichen Detektionszeitpunktes der Signale.

Bei der Untersuchung der Normalkultur konnte gezeigt werden, daß nach dem Umsetzen von 4 d alten Zellen in neue Nährlösung nach einem Tag die Transkripte der drei analysierten Klone im Northernblot nicht mehr nachweisbar sind (vgl. Abb. 3B und C). Im folgenden sollte diese Repression der Induktion nach Zufuhr von Phosphat zu Pi-verarmten Zellen genauer untersucht werden. Dazu wurden 3 d alte +Pi-Tomatenzellkulturen für 24 h in Pifreiem Nährmedium kultiviert. Anschließend wurde diesen Kulturen 2,5 mmol Phosphat in Form einer sterilen 0,2 M KH₂PO₄-Lösung, pH 6,0 zugesetzt. Diese Phosphatkonzentration entspricht der in der Normalkultur-Nährlösung vorhandenen. Nach 0 h (Zellen wurden sofort nach der Pi-Zugabe in flüssigem Stickstoff eingefroren), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und 12 h wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels Northern-Hybridisierung analysiert (Abb. 4B und D). Wie die Abb. 4B zeigt, wird durch die Zufuhr des Phosphates zu den -Pi-Zellen die Synthese der Transkripte der RNasen LE und LX sowie des Klons PSI14 gestoppt. Die Signale verschwinden und sind nach 5 h (RNase LE) bzw. 2 h (RNase LX und PSI14 nicht mehr detektierbar. Bemerkenswert ist, daß bereits 1 h nach Zugabe des Phosphates der mRNA-Level des Klons PSI14 sich um 95 % verringert hat, während die Transkripte der RNasen im gleichen Zeitraum nur um 25 % (RNase LE) bzw. 60 % (RNase LX) absinken (Abb. 4D). Die dargestellte starke Abhängigkeit der Regulation der Transkriptmengen der RNasen LE und LX sowie des unbekannten Klons PSI14 von der Pi-Verfügbarkeit führen zu der Vermutung, daß es sich um hoch regulierte Gensysteme handelt und die Gene und insbesondere die Promotoren der drei Gene wichtige Werkzeuge bei der Untersuchung der Pi-Mangel-Signaltransduktion sind.



Abb. 4A und B : Zeitlicher Verlauf der Transkript-Akkumulation der RNasen LE (RLE) und LX (RLX) sowie des unbekannten Klons PSI14 in kultivierten Tomatenzellen unter Pi-Mangel (A) sowie nach Zufuhr von Phosphat zur Nährlösung nach 24 h (= 0 h) Pi-freier Kultivierung. Pro Spur wurden 30 μ g Gesamt-RNA aufgetragen. Der Nachweis des Ubiquitin 3-Transkriptes (UBI3) diente als interne Kontrolle



Abb. 4C und D: Quantitative Auswertung der Signale der Northernblots aus Abb. 3A und 3B. Variationen beim Auftragen der Proben wurden anhand des Signals der Kontroll-Hybridisierung mit der cDNA UBI3, die für ein Ubiquitin Gen kodiert, korrigiert. Die Angabe der relativen Transkriptmenge erfolgte als Prozent der maximal gemessenen, untergrundkorrigierten Intensität (PSL) des jeweiligen Klons (vgl. Kap. 3.4.6.).

Die Induktion der Pi-Mangel-responsiven Klone findet in Abwesenheit exogener Phosphatquellen, jedoch bei hohen intrazellulären Pi-Konzentrationen, statt. Durch ³¹P-NMR-Messungen konnte gezeigt werden, daß im Induktionszeitraum der RNasen der cytosolische Pi-Pool weitgehend konstant bleibt, während bei Andauern des Pi-Mangels der vakuoläre Pi-Pool entleert wird (GLUND et al., 1990). Damit stellt sich die Frage, ob auch intrazellulärer Pi-Mangel eine Induktion der cDNA-Klone auslösen kann. Eine Methode zum kurzzeitigen Absenken des intrazellulären Pi-Spiegels ist die Zugabe bestimmter Metabolite, wie D-Mannose, 2-Deoxy-D-Glucose, Glycerol oder D-Galaktose zu Zellkulturen. Diese werden von den Zellen aufgenommen und im Cytoplasma phosphoryliert und senken dadurch den cytosolischen Pi-Spiegel ab (LOUGHMAN et al., 1989; JANG und SHEEN, 1994). Auf Proteinebene konnte die Induktion und Sekretion der extrazellulären RNase LE sowie eine Induktion der intrazellulären RNase-Aktivität nach Zugabe von 10 mM D-Galaktose, 2-Desoxy-D-Glukose, D-Mannose oder Glycerol bei hohen exogenen Pi-Konzentrationen nachgewiesen werden (THEIERL, 1991; LÖFFLER, 1993). Nach einem schnellen Anstieg blieben sowohl die intra- als auch die extrazellulären RNase-Aktivitäten konstant und ließen sich auch nach nochmaliger Zugabe der phosphorylierbaren Metabolite nicht mehr steigern. Bei Pi-freien Kulturen wurde dagegen ein kontinuierlicher Anstieg der RNase-Aktivitäten nachgewiesen (NÜRNBERGER, 1991; LÖFFLER, 1993). Im folgenden sollte das Verhalten des mRNA-Levels der RNasen LE und LX untersucht werden. Die bisher dargestellten Versuche haben gezeigt, daß der unbekannte Klon PSI14 ähnlich wie die beiden RNasen reguliert wird. Deshalb wurde er in die Untersuchungen mit einbezogen. Zellen einer 3d alten +Pi-Kultur wurden unter Zugabe von 2-Desoxy-D-Glukose, D-Mannose, D-Galaktose oder Glycerol (Endkonzentration 10 mM) in neues, Pi-haltiges Nährmedium umgesetzt und nach 0 h (= 3 d +Pi-Kultur), 2, 4, 6, 8 und 10 h die Gesamt-RNA isoliert. Die Zuckerkonzentration wurde basierend auf den Ergebnissen von THEIERL (1991) gewählt. Durch sie wurde das Wachstumsverhalten der Zellkultur nicht beeinflußt (THEIERL, 1991; LÖFF-LER, 1993). Als Kontrollen wurden eine +Pi- und eine -Pi-Kultur mitgeführt (Abb.5). Bemerkenswert ist der transiente Nachweis der mRNA's der untersuchten cDNA-Klone, der durch den kurzzeitigen Anstieg der Transkriptmenge und das Verschwinden des Signales vor Ablauf des Versuchszeitraumes charakterisiert ist. Das Transkript der RNase LE konnte 2 bis 4 h nach Zugabe von 2-Desoxy-D-Glucose, 2 bis 6 h nach Zugabe von Mannose, 4 bis 6 h nach Zugabe von Galaktose sowie 4 bis 10 h nach Zugabe von Glycerin nachgewiesen werden. Die mRNA der RNase LX war 2 bis 6 h nach der Zugabe von 2-Desoxy-D-Glucose, 2 h nach Zugabe von Mannose, 2 bis 4 h nach Zugabe von Galaktose sowie 2 h nach Zugabe von Glycerin detektierbar. Ein ähnliches Bild zeigte sich für PSI14, wobei hier die erhaltenen Signale viel schwächer sind. Bei den +Pi-Kulturen waren keine Signale detektierbar. Im Gegensatz zur transienten Induktion nach der Zuckerzugabe erfolgte in der -Pi-Kontrolle eine ständige Zunahme der Transkriptmengen bei allen 3 Klonen. Die gezeigte Induktion der cDNA-Klone nach Zugabe der phosphorylierbaren Metabolite führt zu der Schlußfolgerung, daß sich innerhalb der Zelle ein Phosphatsensor befindet, der die Aktivierung der Gene induziert und das System, das normalerweise die Transkription dieser Gene unter +Pi-Bedingungen verhindert, blockiert. Der transiente Charakter der Induktion der Pi-Mangel-responsiven Klone nach Zugabe der phosphorylierbaren Metabolite läßt sich auf die Aufnahme von exogenem Phosphat aus dem Medium zurückführen.

	RLE	RLX	PSI 14	UBI 3
+ Pi				
- Pi				6668 (Bang) ->
+ Pi + 2-Deoxy- D-Glukose	89 60 60 x 88 x	52 (1) 44 (1) 44	100 808 to c	6 4444449944
+ Pi + D-Man- nose	52 68 88 88 66 64	2-4 🖶 2-4	54	4 3
+ Pi + D-Galak- tose	55 PT 88 88 24		** **	
+ Pi + Glycerol		100 - 1	-	-
Zeit [h]	0 2 4 6 8 10	0 2 4 6 8 10	0 2 4 6 8 10	0 2 4 6 8 10

Abb. 5 : Northernblot zum Nachweis der transienten Induktion der Transkripte der RNasen LE (RLE) und LX (RLX) sowie des unbekannten Proteins PSI14 durch intrazelluläre Pi-Verarmung der Tomatenzellen durch den Zusatz von phosphorylierbaren, aber nur schwer metabolisierbaren Zuckern bei gleichbleibender exogener Pi-Versorgung. Die Zellen wurden in -Pi-, +Pi- oder +Pi-Medium mit je 10 mM 2-Desoxy-D-Glukose, D-Mannose, D-Galaktose bzw. Glycerol kultiviert. Pro Spur wurden 30 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Der Nachweis des Proteins Ubiquitin (UBI3) diente als interne Kontrolle.

4.1.2. Untersuchungen zur organspezifischen Expression

Mit der Untersuchung des örtlichen Expressionsmusters der Pi-Mangel induzierbaren cDNA-Klone in unbehandelten Tomatenpflanzen könnten erste Hinweise auf die Funktion dieser Enzyme gewonnen werden. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus Wurzeln und grünen Blättern von ca. 5 Wochen alten Gewächshauspflanzen sowie aus Blüten isoliert und mit den radioaktiv markierten cDNA-Sequenzen hybridisiert (Abb. 6). Die Transkripte der beiden RNasen LE und LX werden vor allem in den Blüten exprimiert. In den Wurzeln und Blättern ist die mRNA der RNasen LE und LX demgegenüber fast nicht nachweisbar. Das Maximum der mRNA des unbekannten Proteins PSI14 wurde ebenfalls in den Blüten detektiert. Grundlevel der mRNA konnten in den Wurzeln nachgewiesen werden, während in den Blättern keine mRNA von PSI14 detektiert wurde.



Abb. 6 : Expression der RNasen LE (RLE) und LX (RLX) sowie des unbekannten Proteins PSI14 in Tomatenpflanzen. Die Northernblots mit der RNA aus Wurzel (W); Blättern (Bl) und Blüten (B) wurden mit den radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert. Pro Spur wurden 60 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Der Nachweis der 18S rRNA (pBD18) diente als interne Kontrolle. Die quantitative Auswertung der Signale der Northern-Hybridisierungen erfolgte mit dem Programm TINA (Raytest). Variationen beim Auftragen der Proben wurden anhand des Signals der Kontroll-Hybridisierung mit dem Klon pBD18 korrigiert. Die Angabe der relativen Transkriptmenge erfolgte als Prozent der für den jeweiligen Klon maximal gemessenen, untergrundkorrigierten Intensität (PSL).

4.1.3. Untersuchung der Induzierbarkeit der RNase-Gene sowie von PSI14 durch Verwundung und Pathogenbefall

In der Literatur existieren viele Berichte über das Ansteigen von RNase-Aktivitäten in Pflanzen nach der Infektion mit Pathogenen, wobei dieser Aktivitätsanstieg nicht unbedingt eine direkte Reaktion auf den Angriff durch ein Pathogen darstellt, sondern auch ein sekundärer Effekt, der durch Verwundung oder Seneszenz ausgelöst wurde, sein könnte (WILSON, 1975; FARKAS, 1982; GREEN, 1994). Die mRNA der beiden RNasen LE und LX wurde mittels Northern-Hybridisierung in den Blüten von Tomatenpflanzen nachgewiesen (Abb. 6). Ausgehend von der Korrelation zwischen dem Nachweis hoher RNase-Aktivitäten im Pistill und der geringen Anfälligkeit dieses Gewebes gegenüber Pathogen-Infektion wurde vermutet, daß S-ähnliche RNasen an den pflanzlichen Abwehrmechanismen beteiligt sein könnten (LEE et al., 1992).

Das gram-negative Bakterium Xanthomonas campestris pv. vesicatoria verursacht bei Tomate und Paprika die sogenannte "bakterielle Fleckenkrankheit". Bei einer kompatiblen Interaktion vermehren sich die Bakterien in den Interzellular-Räumen des pflanzlichen Gewebes, während bei einer inkompatiblen Interaktion das bakterielle Wachstum inhibiert wird, oft verursacht durch eine hypersensitive Reaktion (HR). Seitens der Bakterien sind an dieser Interaktion die *hrp*-Gene, die für ein Proteinsekretionssystem kodieren, sowie spezifische Avirulenzgene beteiligt. Um resistent zu sein, muß die Pflanze ein spezifisches, dem Avirulenzgen des Bakteriums entsprechendes Resistenzgen besitzen. Das Avirulenz-Protein des Bakteriums wird mit Hilfe des durch die *hrp*-Gene kodierten Proteinsekretionssystemes in die Pflanzenzelle übertragen und anschließend in den Zellkern transportiert, wo es mit dem entsprechenden pflanzlichen Resistenzgen interagiert und dadurch die Resistenzreaktion auslöst (BONAS et al., 1989; BROWN et al., 1995). *Hrp*-Mutanten können aufgrund des fehlenden Proteinsekretionssystems keine HR induzieren. In früheren Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, daß die Infektion mit *hrp*-Mutanten ebenfalls zur Induktion von Genen führt, die möglicherweise in pflanzliche Abwehrreaktionen involviert sind, wie der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) oder Chitinasen, sowie zu Zellwandveränderungen einschließlich der Einlagerung von Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen, Phenolen oder Callose (JAKOBEK und LINDGREN, 1993; BROWN et al., 1995).

Im folgenden sollte mittels Northern-Hybridisierungen das Verhalten der Transkripte der RNasen LE und LX sowie des Klons PSI14 nach Infektion von Tomatenblättern mit drei verschiedenen *X. campestris*-Stämmen untersucht werden: dem virulenten Stamm X.c.v. 75-3, dem avirulenten Stamm X.c.v. 75-3 (pD Δ 27) sowie der *hrp*-Mutante 75X (Tab. 2). Dazu wurden Blätter von ca. 5 Wochen alten Tomatenpflanzen der Sorte *L. esculentum* cv. Moneymaker mit der entsprechenden Bakteriensuspension (ca. 5 x 10⁸ cfu/ml in 10 mM MgCl₂) infiltriert (vgl. Kap. 2.5.) und die Gesamt-RNA nach 0, 6, 12, 24 und 36 h isoliert. Zur Kontrolle der Verwundungs-Induzierbarkeit der Genexpression der cDNA-Klone wurde ein Ansatz, in dem die Tomatenblätter mit einer 10 mM MgCl₂-Lösung infiltriert wurden, mitgeführt. Die Infektion der Tomatenblätter mit dem avirulenten Stamm X.c.v. 75-3 (pD Δ 27), der ein zum Resistenzgen der Tomatenpflanze passendes Avirulenzgen überexprimiert, führte zum Absterben des infiltrierten Gewebes (HR) nach ca. 20 h, während bei den mit dem virulenten Wildtyp-Stamm X.c.v. 75-3 bzw. bei den mit der *hrp*-Mutante sowie bei den mit der MgCl₂-Lösung infiltrierten Tomatenblättern im Untersuchungszeitraum keine morphologischen Veränderungen festgestellt wurden (Ergebnis nicht dargestellt).

Stamm	Eigenschaften	Referenz
X. campestris pv. vesicatoria 75-3	Wildtyp-Stammvirulent auf Tomate, avirulent auf Paprika	MINSAVAGE et al., 1990
75-3 (pDΔ27)	 Stamm X.c.v. 75-3 mit Plasmid pDΔ27, das Avirulenzgen <i>avrBs3-2</i> überexprimiert Tomatenpflanze besitzt Resistenzgen Bs3-2; deshalb ist der Stamm avirulent und induziert HR 	BONAS et al., 1993
75X	 Insertionsmutante; <i>hrpX</i>⁻ Ω-Kassette (PRENTKI und KRISCH, 1984) wurde in das positive Regulatorgen <i>HrpXv</i>, welches den <i>hrp</i>-Locus kontrolliert, kloniert 	WENGELNIK und BONAS, 1996

Tab. 2 : Eigenschaften der verwendeten Xanthomonas campestris-Stämme

Die Ergebnisse der Northern-Analysen sind in Abb. 7 dargestellt. Verwundung führt zur transienten Induktion der RNase LE, wobei der Transkriptlevel nach 6 h ein Maximum erreicht hat und dann wieder abfällt. Im Gegensatz dazu konnte die mRNA der RNase LX sowie die mRNA des Klons PSI14 nach Verwundung nicht nachgewiesen werden (Abb.7A).

Die Akkumulation beider RNase-Transkripte, insbesondere der mRNA der RNase LE, wird durch die *hrp*-Mutante früher und stärker induziert als durch den virulenten Wildstamm (Abb. 7B und D). Im Gegensatz zu den Transkripten der beiden RNasen wird die mRNA des unbekannten Proteins PSI14 spezifisch 24 h nach der Infiltration der Tomatenblätter mit dem virulenten Wildstamm und nicht durch die *hrp*-Mutante induziert. Die Infektion von Tomatenblättern mit dem avirulenten *Xanthomonas*-Stamm führt zu einer schwachen transienten Induktion aller drei untersuchten Transkripte (Abb. 7C), deren Maximum nach 24 h mit der Ausprägung der sichtbaren Symptome der pflanzlichen Resistenzreaktion (Absterben der infiltrierten Gewebebereiche durch HR) übereinstimmt. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß sowohl die beiden RNasen als auch das unbekannte Protein PSI14 an unspezifischen Abwehrreaktionen der Tomatenpflanze auf Pathogenbefall beteiligt sind.



Abb. 7 : Northernblot zum Nachweis der Induzierbarkeit der Transkripte der RNasen LE (RLE) und LX (RLX) sowie des unbekannten Proteins PSI14 nach Verwundung (A) bzw. Pathogenbefall (B - C). 25 μ g Gesamt-RNA, isoliert aus Tomatenblättern, die mit 10 mM MgCl₂ (A), Bakterien des virulenten Stammes X.c.v. 75-3 (B), Bakterien des avirulenten Stammes X.c.v. 75-3 (pD Δ 27) (C) sowie Bakterien der *hrp*-Mutante X.c.v. 75X (D) infiltriert wurden, wurden mit den angegebenen cDNA-Sonden hybridisiert. Die quantitative Auswertung der Signale der Northern-Hybridisierungen erfolgte mit dem Programm TINA

(Raytest). Variationen beim Auftragen der Proben wurden anhand des Signals der Kontroll-Hybridisierung mit dem Klon pBD18 korrigiert. Die Angabe der relativen Transkriptmenge erfolgte als Prozent der für den jeweiligen Klon maximal gemessenen, untergrundkorrigierten Intensität (PSL).

4.2. Isolierung und Charakterisierung von genomischen Klonen für die RNasen LE und LX

4.2.1. Southern-Analyse und Chromosomenmapping

Aufgrund der Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen können die fünf durch Pi-Mangel induzierbaren RNase-Isoformen aus kultivierten Tomatenzellen in zwei Gruppen unterteilt werden: RNasen LE und LV3 bzw. RNasen LX, LV1 und LV2 (vgl. Kap.1). Mit Hilfe der Southern-Analyse sollte die genomische Struktur dieser RNase-Familie untersucht werden.

Aus der Zellkultur isolierte genomische Tomaten-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hin*dIII, *Eco*RV, *Eco*RI, *Bam*HI, *Xba*I bzw. *Bg*/II gespalten und mit den ³²Pmarkierten cDNA-Sonden hybridisiert (Abb. 8). Beide Klone erkennen ein unabhängiges Bandenmuster. Dieses Ergebnis zeigt, daß es unter den gewählten stringenten Waschbedingungen zu keiner signifikanten Kreuzhybridisierung zwischen den beiden RNasen LE und LX kommt, obwohl zwischen ihnen eine hohe Sequenzhomologie besteht (KÖCK et al., 1995). In allen Spuren konnte sowohl bei der RNase LE als auch bei der RNase LX jeweils nur eine Bande nachgewiesen werden. Die zweite Bande in der mit der cDNA der RNase LX hybridisierten *Bg*/II-gespaltenen genomischen Tomaten-DNA ist durch eine interne Schnittstelle innerhalb der cDNA-Sequenz erklärbar. Daraus folgt, daß es sich bei beiden RNasen um single copy Gene handelt. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, daß die Genfamilie der durch Pi-Mangel induzierbaren RNasen in Tomate aus den beiden RNasen LE und LX besteht und die vakuolären RNase-Isoformen LV1-3 durch posttranslationale Modifizierungen bzw. veränderten Transport aus den beiden RNasen LE und LX hervorgegangen sind (KÖCK et al., 1995).

Ein Vergleich der beiden Autoradiogramme zeigt, daß nur in der *Eco*RV- und in der *Bam*HI- gespaltenen genomischen Tomaten-DNA unterschiedliche Hybridisierungssignale detektiert wurden, während sich die Hybridisierungssignale in der *Hin*dIII-, *Eco*RI-, *Xba*I- und der *Bgl*II gespaltenen genomischen DNA an identischen Positionen befinden. Diese große Ähnlichkeit im Bandenmuster läßt vermuten, daß es für beide Gene nur einen Genlo-kus gibt.

Diese Vermutung konnte durch die chromosomale Lokalisierung der beiden RNase-Gene, die von Herrn Dr. M. Ganal am IPK Gatersleben durchgeführt wurde, bestätigt werden. Beide RNasen kartieren auf dem Tomaten-Chromosom 5 zwischen den beiden Markern TG432 und CT167 und zeigen eine perfekte Kosegregation. Einzelheiten über die Mapping-Methode sowie die RFLP-Marker wurden in TANKSLEY et al. (1992) veröffentlicht.



Abb.8: Southern-Analyse genomischer Tomaten DNA aus der Zellkultur. Je 20 µg genomische DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Hin*dIII (1), *Eco*RV (2), *Eco*RI (3), *Bam*HI (4), *Xba*I (5) bzw. *BgI*II (6) gespalten und mit den ³²P-markierten cDNA-Sonden der RNasen LE bzw. LX hybridisiert. Die Länge der Fragmente des Größenstandards (λ -DNA, die mit den Restriktionsendonukleasen *Hin*dIII und *Kpn*I hydrolysiert wurde) sind in der Mitte angegeben.

Die RNasen LE und LX bilden zusammen mit anderen RNasen die Gruppe der S-ähnlichen RNasen, die sich aufgrund von Sequenzähnlichkeiten deutlich von der zweiten großen Gruppe pflanzlicher RNasen, den S-RNasen (S-Glycoproteine), unterscheiden. Beide Gruppen werden zusammen mit den pilzlichen RNasen der T2-Familie zur Superfamilie der T₂/S-RNasen zusammengefaßt (Übersicht in GREEN, 1994; vgl. Kap. 1.). Aus dieser Tatsache ergeben sich interessante Gesichtspunkte für die evolutionäre Entwicklung der RNase-Gene.

Zur Gattung Lycopersicon gehören neben der kultivierten Art *L. esculentum* 8 weitere in Mittel- und Südamerika verbreitete Wildarten. Dazu zählen sowohl selbstkompatible als auch selbstinkompatible Arten (Tab. 3).

Genus Lycopersicon				
Subgenus Eulycopersicon:	Subgenus Eriopersicon:			
(selbstkompatible Arten)	(weitgehend selbstinkompatible Arten)			
L. esculentum Mill.	L. hirsutum Humb. and Bonpl.			
L. esculentum var. cerasiforme (Dun.) Gary	L. parviflorum Rick, Kesicki, Fobes and Holle			
L. pimpinellifolium (Jusl) Mill.	L. chmielewskii Rick, Kesicki, Fobes and Holle			
L. cheesmanii Riley	L. chilense Dun.			
	L. peruvianum (L.) Mill.			
	L. pennellii (Corr.) d'Arcy			

Tab. 3 : Klassifizierung der Lycopersicon-Arten nach RICK et al. (1990), aus LEFRANCOIS et al., 1993

Da in der Gattung *Lycopersicon* sowohl S-Glycoproteine (*L. peruvianum*; MAU et al, 1986; TSAI et al., 1992; RIVERS et al., 1993; CHUNG et al, 1994; ROYO et al., 1994) als

auch die durch Pi-Mangel induzierbaren S-ähnlichen RNasen (L. esculentum; KÖCK et al., 1995; LERS et al., 1998) nachgewiesen wurden, könnten diese aus einer gemeinsamen Ur-RNase durch Gen-Duplikation nach der Divergenz von höheren Pflanzen und Pilzen und vor der Divergenz der Arten der Solanaceen entstanden sein (JOST et al. 1991; LÖFFLER, 1993; vgl. Kap. 1). Diese Hypothese sollte durch den Nachweis der Gene der RNasen LE und LX in den einzelnen Tomatenarten überprüft werden. Dazu wurde die genomische DNA aus Blättern der selbstinkompatiblen Tomatenarten L. hirsutum, L. parviflorum, L. chmielewskii, L. chilense und L. peruvianum sowie den selbstkompatiblen Tomatenarten L. cheesmanii, L. pimpinellifolium und L. esculentum var. cerasiforme mit der Restriktionsendonuklease EcoRV gespalten und den beiden cDNA-Sonden hybridisiert. Das Enzym wurde gewählt, da sich das von den cDNA-Sonden der RNasen LE bzw. LX detektierte Bandenmuster in EcoRV- gespaltener genomischer Tomaten-DNA unterscheidet, und somit eine eindeutige Zuordnung der Signale ermöglicht wird (vgl. Abb. 8). Für die Tomatenart L. pennellii standen keine Pflanzen zur Verfügung. Die Gene der RNasen LE und LX konnten in allen untersuchten Tomatenarten nachgewiesen werden, wobei sich die Länge der hybridisierenden DNA-Fragmente bei den einzelnen Arten unterscheiden (Abb. 9).

Das Vorhandensein der Gene der S-ähnlichen RNasen auch in den selbstinkompatiblen Tomatenarten unterstützt die Hypothese, daß beide RNase-Gruppen von einer gemeinsamen Ur-RNase abstammen. Ein Vergleich des in den Southernblots detektierten Bandenmusters führt zu der Vermutung, daß die beiden RNase-Gene sowohl in den SI- als auch in den nicht SI-Arten als single copy Gene vorliegen. Zum Vergleich wurden in Spur 9 die *Eco*RV gespaltene genomische DNA der Tomatensorte *L. esculentum* Mill. cv. Lukullus aufgetragen, aus der die cDNA-Klone der RNasen LE und LX isoliert wurden (KÖCK et al., 1995).



Abb. 9: Southernblot zum Nachweis der Gene der RNasen LE und LX in den einzelnen Arten der Gattung *Lycopersicon* sowie in ausgewählten Tomatensorten. Je 20 µg genomische DNA wurden mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RV gespalten und mit den ³²P-markierten cDNA-Sonden der RNasen LE bzw. LX hybridisiert. In den einzelnen Spuren wurde die genomische DNA folgender Tomatenarten und Sorten aufgetragen : *L. hirsutum* (1), *L. parviflorum* (2), *L. chmielewskii* (3), *L. chilense* (4), *L. peruvianum* (5), *L. cheesmanii* (6), *L. pimpinellifolium* (7), *L. esculentum* var. *cerasiforme* (8), *L. esculentum* Mill. *cv.* Lukul-lus (9).

4.2.2. Isolierung genomischer Klone

Mittels Northern-Analysen wurde nachgewiesen, daß die durch Pi-Mangel ausgelöste Induktion der RNasen LE und LX mit einem Anstieg der Synthese der mRNA korreliert, während die Transkripte beider RNasen in Pi-versorgten Zellen mittels Northern-Hybridisierung nicht detektierbar sind. Die Zugabe von Phosphat zu vollinduzierten Zellen (Kultivation für 24 h in Pi-freiem Medium) führt zu einem schnellen Verschwinden der Transkripte der beiden RNasen (vgl. Kap. 4.1.1.). Für die RNase LE wurde gezeigt, daß der Induktionsprozeß spezifisch durch Pi-Mangel ausgelöst wird (NÜRNBERGER, 1991) und nicht auf den Mangel an anderen Makronährstoffen zurückzuführen ist. Der Autor konnte zeigen, daß eine Anzucht von +Pi- und -Pi - Zellen in nitratfreier Nährlösung weder zu einer Induktion der Freisetzung von RNase-Aktivität aus Pi-versorgten Zellen noch zu einer signifikanten Steigerung der Enzymsekretion bei -Pi-Zellen führte. Der Nachweis der starken Abhängigkeit der Kontrolle der Transkriptmenge der RNasen LE und LX sowie der RNaseAktivitäten von der Pi-Verfügbarkeit führt zu der Vermutung, daß es sich um ein hochreguliertes Gensystem handelt. Die Gene und insbesondere die Promotoren der beiden RNasen stellen somit ein wichtiges Hilfsmittel zur Untersuchung der Pi-Mangel-Signaltransduktion in der Tomate dar.

Zur Isolation von genomischen Klonen für die beiden RNasen wurde eine EMBL3-Phagenbank (*Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry, vgl. Kap. 2.4.1.) mittels eines kombinierten PCR/Plaque-Screening-Protokolles nach AMARAVADI und KING (1994) gescreent (vgl. Kap. 3.6.). Die Methode beruht auf dem mit Hilfe der PCR erbrachten Nachweis bestimmter DNA-Fragmente in Teilmengen der Genbank, aus denen dann mittels Plaque-Hybridisierung die entsprechenden Klone isoliert werden.

Als PCR-Primer für die RNase LE wurden die Oligonukleotide LE O-04 und LE O-02as ausgewählt, die ein 1140 bp langes Fragment umschließen, das die ersten beiden Exons und Introns sowie Teile des dritten Exons der RNase LE enthält (STENZEL 1993). Als PCR-Primer für die RNase LX dienten die Oligonukleotide LX O-01 und LX O-04 (vgl. Kap. 2.7.). Sie umschließen ein 550 bp langes Fragment, welches das erste Exon, das erste Intron und Teile des zweiten Exons der RNase LX enthält (SCHUHMANN 1995). Aliquote der 16 Phagenlysate (jeweils 2-3 x 10^4 pfu; vgl. Kap. 3.6.) wurden in der PCR als Template eingesetzt. Nach der Analyse der PCR-Produkte wurden 2 Phagengemische mit einem positiven Signal für die RNase LE und ein Phagengemisch mit einem positiven Signal für die RNase LE und ein Phagengemisch mit einem positiven Signal für die RNase LA identifiziert. Diese Phagenlysate wurden anschließend getitert und zum Screenen mittels Plaquehybridisierung eingesetzt. Als Hybridisierungssonden wurden die cDNA-Fragmente (KÖCK et. al., 1995) sowie genomische PCR-Fragmente (STENZEL 1993; SCHUHMANN 1995) verwendet.

Nach 3 Screening-Runden konnten 4 positive Phagenklone für die RNase LE gereinigt werden. Von jedem Klon wurde die λ -DNA isoliert und die Insertgröße durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *Sal*I bestimmt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem TAE-Agarosegel wurde jeweils ein 12,5 kb langes Fragment nachgewiesen, das mit der cDNA der RNase LE hybridisiert. Durch Restriktionsanalysen konnte die Identität der vier isolierten Lambda-Klone der RNase LE nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Für alle weiteren Experimente wurde der Klon λ gLE-01 verwendet.

Für die RNase LX konnte die Existenz eines Klons im entsprechenden Phagengemisch durch die Plaque-Hybridisierung nicht bestätigt werden. Deshalb wurden noch einmal ca. 2×10^6 pfu der genomischen Bank mittels Plaque-Hybridisierung nach Klonen der RNa-

se LX gescreent. Dabei konnten jedoch ebenfalls keine positiven Hybridisierungssignale nachgewiesen werden. Mögliche Gründe für das Nichtauffinden von Klonen der RNase LX in der genomischen DNA-Bank werden in Kap. 5.1. diskutiert.

4.3. Analyse der genomischen Sequenz der RNase LE

4.3.1. Charakterisierung des genomischen Klons λgLE-01 und Subklonierung genomischer Sequenzen

Mit Hilfe von Restriktionsanalysen und Southern-Hybridisierungen konnte für den Klon λ gLE-01 eine Restriktionskarte erstellt sowie die Lage der kodierenden Sequenz der RNase LE bestimmt werden. Dazu wurde die Lambda-DNA mit den Restriktionsendonukleasen SalI (Abtrennung der λ -Arme), BamHI, XbaI (je eine bekannte Schnittstelle innerhalb der Sequenz des genomischen PCR-Fragmentes; STENZEL 1993) sowie XhoI und SacI (keine bekannten Schnittstellen) einzeln oder im Doppelverdau gespalten. Durch eine Doppelspaltung mit der Restriktionsendonuklease KpnI konnte die Lage der einzelnen Fragmente hinsichtlich der beiden λ -Arme identifiziert werden, da das Enzym nur zwei Schnittstellen im linken λ -Arm besitzt. Die Southernblots wurden nacheinander mit dem *Eco*RI-Fragment aus pRLE (5'-Ende der cDNA der RNase LE), mit dem PstI/XhoI-Fragment von pRLE (vollständige cDNA der RNase LE) sowie mit der DNA von λ gLE-01 hybridisiert. Ein Teil der erhaltenen Autoradiogramme sowie die daraus abgeleitete Restriktionskarte sind in Abb. 10 und 11 dargestellt. Die Lage der für die RNase LE kodierenden Sequenzen innerhalb des 12,5 kb großen genomischen DNA-Fragmentes konnte durch das 800 bp lange, mit der cDNA der RNase LE hybridisierende, Xbal/BamHI-Fragment eindeutig identifiziert werden, da der Abstand zwischen den beiden Schnittstellen aus der Sequenz des genomischen PCR-Fragmentes bekannt war (STENZEL 1993). Das ca. 3,1 kb lange, mit dem 5'-Ende der cDNA der RNase LE hybridisierende SacI/XbaI-Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Ecl136II (Neoschizomer von SacI) und XbaI isoliert und nach dem Auffüllen der Enden mit Hilfe des Enzyms Klenow-Polymerase in die SrfI-Schnittstelle des Vektors pCR Script Cam SK⁺ kloniert (pgLE5'). Das 3'-Ende der Sequenz der RNase LE wurde in einen seperaten Klon überführt. Dazu wurde das ca. 2,8 kb lange Xbal/SalI-Fragment in den Vektor pBluescript SK⁻kloniert (**pgLE3**'; vgl. Abb. 11).



- 0,56

Abb. 10: Restriktionsanalyse und Southern-Hybridisierung des Phagenklones λgLE-01. Die Phagen-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Sal*I (S), *SalI/Xba*I (SX), *SacI/Xba*I (AX) oder *Xba*I/*Bam*HI (XB) gespalten. Die verwendeten Hybridisierungssonden sind über den einzelnen Blots angegeben.



Abb. 11: Restriktionskarte des Klons λ gLE-01. Die Lage der für die RNase LE kodierenden Sequenzen konnte durch den Abstand des Xba I- und Bam HI- Schnittortes eindeutig identifiziert werden. Die Abkürzungen bedeuten: S = SaII; B = BamHI; X = XbaI; M = XhoI; A = SacI

4.3.2. Sequenzanalyse der Subklone

4.3.2.1. Der Klon pgLE 5'

Das Insert des Plasmides pgLE 5' wurde mittels *Primer-Walking* vollständig doppelsträngig sequenziert. Die ermittelte Nukleotid-Sequenz und die im Vergleich mit der cDNA-Sequenz der RNase LE daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind im Anhang 1 dargestellt. Das Insert ist 3077 bp lang und enthält die kodierende Sequenz der RNase LE bis zur Aminosäure 64 des reifen Proteins (erstes und zweites Exon) sowie das erste Intron. Der 5'upstream des Translationsstartkodons gelegene Bereich umfaßt 2668 bp. Die genomische Struktur ist in Abb. 12 schematisch dargestellt. Durch die Sequenzanalyse wurde die Nukleotid-Sequenz der cDNA (KÖCK et al., 1995) sowie die des genomischen PCR-Fragmentes (STENZEL, 1993) bestätigt.



Abb. 12: Schematische Darstellung der Exon/Intron-Struktur in pgLE5'. Die Exons wurden als dicke Balken dargestellt. Die Numerierung wurde am Translationsstartkodon begonnen (+1). Außerdem wurden einige ausgewählte Restriktionsschnittstellen eingezeichnet.

Sequenzanalyse der 5'-upstream des Translationsstartkodons gelegenen Sequenzen und Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes

Der Transkriptionsstartpunkt der RNase LE wurde mit Hilfe der 5'-RACE-Technik ermittelt (vgl. Kap. 3.8.1.). Die Lage der verwendeten genspezifischen Oligonukleotidprimer LE/GSP1 und LE/GSP2 innerhalb der cDNA der RNase LE sind in Abb. 13 schematisch dargestellt.



Abb. 13: Übersicht über die bei der 5'-RACE-Technik verwendeten Oligonukleotidprimer. Der für die Reverse Transkription eingesetzte Primer LE/GSP1 ist komplimentär zu den Basen 457 bis 476 der cDNA-Sequenz der RNase LE. LE/GSP2 bindet an die Basen 364 bis 382. Der Primer LE/GSP3 wurde in den PCR-Reaktionen als Kontrolle eingesetzt. Er bindet an die Basen 1 bis 18 der cDNA der RNase LE (vgl. Kap. 2.7.). Die Numerierung der Basen erfolgte bezogen auf das Translationsstartkodon ATG.

Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden mittels T₄-Polynukleotidkinase und [γ -³²P]- ATP radioaktiv markiert und anschließend in einem 2 % igen MetaPhor-Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 14A). Sowohl im Ansatz mit der Gesamt-RNA als auch im Ansatz mit der mRNA war nur eine 480 bp lange Bande nachweisbar (Spuren 4 und 5 in Abb. 14A). In Spur 3 wurde der Kontrollansatz mit dem Primerpaar LE/GSP3 und LE/GSP2 aufgetragen, wobei ss cDNA aus dem Gesamt-RNA-Ansatz als Template diente. Hier ließ sich nur eine 380 bp lange Bande nachweisen, die dem Abstand der beiden Primer in der cDNA-Sequenz der RNase LE entspricht. Daraus folgt, daß der 5'-untranslatierte Bereich der RNase LE ca. 50 bp lang sein muß. Die restlichen Basen entsprechen dem 5' *RACE Abridged Anchor Primer* (36 bp) und der homopolymeren dC-Sequenz. Um eine genauere Aussage treffen zu können, wurden die RACE-Produkte in den TA-Cloning-Vektor pCR^{*}2.1 kloniert. Die Selektion der positiven Klone erfolgte mittels Koloniehybridisierung, wobei die cDNA der RNase LE als Hybridisierungssonde verwendet wurde. Von 60 positiven Kolonien wurde anschließend die DNA isoliert und die Insertgröße mittels PCR bestimmt. Als Primer dienten die Oligonukleotide LE/GSP2 und der 5' RACE sense Primer (vgl. Kap.2.7.). Die 10 größten Inserts wurden vollständig sequenziert. Die Subklone mit den 4 größten Inserts wurden zusätzlich mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI gespalten, radioaktiv markiert und auf einem 2 %igen MetaPhor-Agarose-Gel analysiert. Zum Vergleich wurde das 5'RACE-Produkt ebenfalls mit *Eco*RI gespalten und aufgetragen (Abb. 14B). Da die cDNA der RNase LE eine *Eco*RI-Schnittstelle besitzt, entstehen zwei Banden. Die Abbildung zeigt, daß die Inserts der beiden ersten aufgetragenen Subklone (Spur 2 und 3 in Abb. 14B) dem 5'RACE-Produkt aus Spur 4 und 5 von Abb. 14A entsprechen. Die geringen Größenunterschiede werden durch Basen aus dem Polylinker des Vektors verursacht. Eine den Inserts von Spur 4 und 5 der Abb. 14B entsprechende Bande konnte in den Spuren 4 und 5 von Abb. 14A nicht nachgewiesen werden.



Abb. 14 : Transkriptionsstartpunktanalyse der RNase LE.

A : Gesamt- oder mRNA, isoliert aus 24 h in Pi-freiem Medium kultivierten Tomatenzellen, wurde für die Reverse Transkriptionsreaktion mit dem Antisenseprimer LE/GSP1 eingesetzt. An die gereinigte ss cDNA wurde mit dem Enzym Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase eine homopolymerere Sequenz aus dCTP anpolymerisiert. Anschließend erfolgte eine PCR-Reaktion mit dem Antisenseprimer LE/GSP2 und dem zu der anpolymerisierten dC-Sequenz homologen 5' *RACE Abridged Anchor Primer* (vgl. Kap. 3.8.1. und Abb. 12). In den einzelnen Spuren des Gels wurden folgende, mittels T₄-Polynukleotidkinase radioaktiv markierte Reaktionsprodukte aufgetragen :

- Spur 1: 20 bp-Marker
- Spur 2: 100 bp-Marker
- Spur 3: Kontroll-PCR-Reaktion mit den Primern LE/GSP 3 und LE/GSP 2
- Spur 4: 5'RACE-Produkte aus dem Reaktionsansatz mit mRNA
- Spur 5: 5'RACE-Produkte aus dem Reaktionsansatz mit Gesamt-RNA

B: Vergleich der Inserts der Subklone mit den 5'RACE-Produkten. Die DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI gespalten und mittels T₄-Polynukleotidkinase und [γ -³²P] ATP radioaktiv markiert. In den einzelnen Spuren des Geles wurden folgende Reaktionsprodukte aufgetragen:

Spur 1 :	EcoRI gespaltene 5'RACE-Produkte
Spur 2 bis 5:	EcoRI gespaltene 5'RACE-Subklone
Spur 6 :	100 bp-Marker
Spur 7 :	20 bp-Marker

Die beiden ermittelten Transkriptionsstartpunkte befinden sich bei Position -47 bzw. -149 bezogen auf das Translationsstartkodon ATG. Zwischen den beiden Startpunkten gibt es kein ATG-Kodon. Der Transkriptionsstartpunkt I (Position -47) entspricht der in den 5'RACE-Reaktionen nachweisbaren 480 bp Bande und wird deshalb als Haupttranskriptionsstartpunkt angesehen und im folgenden als Position 1 bezeichnet. Eine TATA-Box (TATAAAT) konnte 24 bp upstream dieses Startpunktes identifiziert werden. Zwei CAAT-Boxen befinden sich 156 bp bzw. 175 bp upstream dieser TATA-Box. Der Transkriptionsstartpunkt II liegt bei Position -102. 27 bp davor befindet sich die Sequenz 5'-TAATAAT-3', die Ähnlichkeiten mit der TATA-Box-Konsensussequenz (TATAAAT; ROEDER, 1996) aufweist (Abb. 15).

-178	TATA-Box-ähnliche Sequenz <u>CAAT</u> AATTGGCATCTTAT <u>CAAT</u> TGTGTCAACATCAAAAACAC <u>TAATAAT</u> AAAGGATAC
	Start II
-120	AAAATCCAAATCATATTATTATCAAGCTCCTCAATTTCACACTTTAAAAAGTTAGA
	TATA-Box
- 62	CTTTTCACATCTTTCATTTTATTATTTTTTTTCC TATAAAT AAAACCCCCCAAAATCACTT
	Start I
- 4	▼ TATC A AATC A CTACC A ATACAAAAAAAAAATAATTTTTTTTACAAGAAAAAA ATG GCT

Abb. 15: Darstellung der Genstruktur der RNase LE im Bereich des Transkriptionsstartpunktes und der Position der 5'RACE-Produkte (fett gedruckte Buchstaben). Die beiden vermuteten Transkriptionsstartpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Das 5'-Ende des cDNA-Klons pRLE wurde doppelt unterstrichen. Zwei 19 bp bzw. 22 bp lange Sequenzabschnitte, die in der Lage sind, Stem-Loop-Strukturen zu bilden, wurden unterstrichen. Die mutmaßliche TATA-Box-Sequenz des Startpunktes I und die TATA-Box-ähnliche Sequenz vor dem Startpunkt II sowie die CAAT-Box-Sequenzen wurden fett gedruckt und unterstrichen. Die Zahlen auf der linken Seite geben die Positionen der Nukleotide in der genomischen Sequenz der RNase LE bezogen auf den Haupttranskriptionsstartpunkt an.

Die Promotorsequenz der RNase LE wurden mit Hilfe des Programms PC/GENE auf besondere Strukturmerkmale untersucht. In der 5'UTR befinden sich 2 Abschnitte von 19 bp (5'-**AAAAAAAAAAAATTTTTTTT**-3') bzw. 22 bp (5'-**ATTTTTT***TACAAG***AAAAAAT**-3'), welche die Ausbildung von Stem-Loop-Strukturen ermöglichen, wobei die zweite Sequenz sich unmittelbar upstream des Translationsstartkodons befindet (vgl. Abb. 15). Die Promotorsequenz ist mit einem A/T-Gehalt von 74,18 % A+T-reich. In ihr konnten mehrere direkte und indirekte Sequenzwiederholungen sowie symmetrische Sequenzen (Palindrome) identifiziert werden, die möglicherweise *cis*-Elemente darstellen, die an der Regulation der Transkription des Genes beteiligt sind (Ergebnis nicht dargestellt).

Die 2668 bp potentielle Promotorsequenz der RNase LE wurde mit Hilfe des Programms MatInspector (http://transfac.gbf-braunschweig.de; QUANDT et al., 1995) auf Sequenzähnlichkeiten mit pflanzlichen Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht und für eine Homologie-Suche in der PLACE-Datenbank, einer Datenbank pflanzlicher *cis*-Elemente, eingesetzt (http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/). Dabei wurden neben G-Box-ähnlichen Sequenzen auch Ähnlichkeiten zu *cis*-Elementen gefunden, die auf eine Induzierbarkeit des RNase LE-Promotors bevorzugt in Wurzeln [Rootelement (ELMAYAN und TE-PFER, 1995); RSE Element (KELLER und BAUMGARTNER, 1991)] sowie in Abhängigkeit von Umweltbedingungen [Ähnlichkeiten zur Bindestelle der Transkriptionsfaktoren ATHB1 01 (SESSA et al., 1993) und SBF1 01 (LAWTON et al., 1991)] schließen lassen. Desweiteren konnten Sequenzelemente identifiziert werden, die auf eine Expression der RNase LE in den Leitgeweben [ASL-Box, GATA-Motiv (YIN et al., 1997); AC-1Element (HATTON et al., 1995)], insbesondere im Phloem hinweisen (vgl. Kap. 5.1. und Anhang 6).

Um festzustellen, ob die 2668 bp 5'-upstream des Translationsstartkodons der RNase LE gelegenen Sequenz ein weiteres Tomatengen enthält, wurde diese DNA-Sequenz für Homologie-Suchen in der EMBL-Datenbank eingesetzt. Diese Suche ergab keine signifikanten Homologien mit bereits bekannten DNA-Sequenzen.

4.3.2.2. Der Klon pgLE 3'

Die für die RNase LE kodierenden Sequenzen im Plasmid pgLE 3' wurden mittels *Primer Walking* vollständig doppelsträngig sequenziert. Die ermittelte Nukleotid-Sequenz sowie die im Vergleich mit der cDNA der RNase LE daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Anhang 1 dargestellt. Das Insert ist ca. 2,8 kb lang. Es enthält 1019 bp kodierende Sequenz der RNase LE, 157 bp 3'- nichttranslatierte Sequenz sowie ca.1600 bp sich daran anschließende genomische Tomaten-DNA-Sequenz. Die kodierende Sequenz der RNase LE beinhaltet das zweite Intron und das dritte Exon (Aminosäure 65 bis 205 des reifen Proteins). Durch die Sequenz als genomischen PCR-Produktes (STENZEL, 1993) bestätigt. Im durch das PCR-Produkt nicht abgedeckten Bereich der genomischen Sequenz der RNase LE konnten keine weiteren Introns identifiziert werden. Die genomische Struktur ist in Abb. 16 schematisch dargestellt.



Abb. 16: Schematische Darstellung der Exon/Intron-Struktur in pgLE3'. Die Exons wurden als dicke Balken dargestellt. Die Numerierung wurde am Translationsstartkodon begonnen (+1). Das Ende des 3'nichttranslatierten Bereichs wurde durch ein Sternchen dargestellt. Außerdem wurden einige ausgewählte Restriktionsschnittstellen eingezeichnet.

Um zu überprüfen, ob die ca. 1600 bp genomische DNA-Sequenz in pgLE 3', die nicht für die RNase LE kodiert, einem anderen Tomaten-Gen zugeordnet werden kann, wurde die DNA-Sequenz der letzten 489 bp vor der *Sal*I-Schnittstelle für Homologie-Suchen in der EMBL-Datenbank eingesetzt. Diese Suche ergab keine signifikanten Homologien mit bereits bekannten DNA-Sequenzen.

4.4. Untersuchung des Promotors der RNase LE

Die Identifizierung regulatorisch wichtiger Bereiche innerhalb einer Promotorsequenz ist durch die Untersuchung von mit entsprechenden Konstrukten transformierten Pflanzen oder Zellkulturzellen möglich, da die Expressionsrate des Reportergenes darauf rückschließen läßt, welche Bereiche des Promotors für eine spezifische Aktivierung oder Reprimierung notwendig sind.

Als Reportergen wurde das uidA-Gen aus *Escherichia coli* verwendet, das für die ß-Glucuronidase (GUS; EC 3.2.1.31) kodiert, da in Tomatenpflanzen keine endogene GUS-Aktivität detektierbar ist und Pflanzen durch das Enzym nicht beeinflußt werden. Die ß-Glucuronidase katalysiert die hydrolytische Spaltung eines großen Spektrums von ß-Glucuroniden, wodurch eine Vielzahl einfacher und sensitiver Nachweismethoden verfügbar ist. Weitere Vorteile sind neben einer hohe Enzymstabilität, daß das Enzym keine Kofaktoren benötigt und keine posttranslationalen Modifizierungen notwendig sind, es viele Detergentien toleriert und ein breites pH-Optimum pH 5,2 - pH 8,0 besitzt (JEFFERSON, 1987; JEFFERSON und WILSON, 1991).

4.4.1. Analyse der Phosphatinduzierbarkeit im transienten Test mittels Partikelkanone

Durch die Northern-Analysen wurde gezeigt, daß die Transkriptmenge der RNase LE in kultivierten Tomatenzellen unter Pi-Mangelbedingungen sehr stark erhöht wird (vgl. Kap. 4.1.1.). Im folgenden sollte untersucht werden, inwieweit dieser Anstieg auf eine Aktivierung des Promotors zurückzuführen ist. Zur Eingrenzung der für die Induktion durch Pi-Mangel wichtigen Bereiche sollten anschließend Promotordeletionen hergestellt und auf ihre Pi-Mangel-Induzierbarkeit getestet werden.

4.4.1.1. Herstellung der Promotor-GUS-Konstrukte

Zur Konstruktion der Promotor-GUS-Fusionen wurde das Plasmid pRT103 GUS (TÖP-FER et al., 1988) verwendet. Das Plasmid enthält das ß-Glucuronidase-Gen unter Kontrolle des 35S (CaMV)-Promotors und des CaMV-Polyadenylierungssignals. Um den vorhandenen 35S-Promotor gegen die RNase LE-Promotorkonstrukte austauschen zu können, war es erforderlich, neben der *Nco*I-Schnittstelle eine zweite unikale Restriktionsschnittstelle (*Hin*dIII) zu schaffen. Dazu wurde die gesamte Expressionskassette mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I aus dem Plasmid pRT103 GUS herausgespalten und in den Vektor pUC 19 kloniert (Plasmid pCaMV GUS, vgl. Abb. 17).



Abb. 17: Schematische Darstellung der GUS-Expressionskassetten in den Plasmiden pRT103 GUS und pCaMV GUS unter Berücksichtigung wichtiger Restriktionsschnittstellen.

Um die RNase LE-Promotorsequenzen vor das GUS-Gen klonieren zu können, war die Einführung einer *Nco*I-Schnittstelle am Translationsstartpunkt notwendig. Dazu wurden mittels PCR die beiden Desoxyadenosine an Position -1 und -2 durch zwei Desoxycytosine ersetzt. Die PCR-Reaktion wurde mit dem RNase LE-spezifischen Primer (LE-NcoI) und dem -40 Universalprimer (vgl. Kap. 2.7.) an Plasmid-DNA von pgLE 5' durchgeführt und das PCR-Produkt anschließend in die *Srf*I-Schnittstelle des Vektor pCR Script Cam SK⁺ subkloniert (Plasmid pPromotor LE I). Das PCR-Fragment ist 2820 bp lang und enthält 2668 bp 5'-upstream-Sequenz der RNase LE, 18 bp vom 1. Exon der RNase LE sowie 137 bp Polylinkersequenz des Vektors pCR Script Cam SK⁺. Durch eine Restriktionsspaltung mit den Enzymen *Eco*RV und *Nde*I und eine sich anschließende Religation wurde der Promotor der RNase LE auf 883 bp verkürzt (Plasmid pPromotor LE II). Die RNase LE-Promotorsequenzen wurden anschließend durch Restriktionsspaltung mit den Enzymen *Hind*III und *Nco*I isoliert und in den Vektor pCaMV GUS ligiert (Plasmide pLE GUS I bzw. pLE GUS II; vgl. Abb. 18).

Plasmid pLE GUS kb I II III IV V



Abb. 18 : Southernblot zum Nachweis der Integrität der bei den transienten Transformationen verwendeten Promotor LE-GUS-Konstrukte. Die RNase LE-Promotorfragmente wurden durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Hin*dIII und *Nco*I isoliert und nach dem Transfer auf eine Nylonmembran mit dem radioaktiv markierten 316 bp-Promotorfragment der RNase LE (Nukleotid +46 bis -269) hybridisiert. Der Sonde wurden 50 ng radioaktiv markierte Marker-DNA (100 bp-Marker) hinzugefügt.

Bei der Herstellung der Plasmide pLE GUS III, pLE GUS IV und pLE GUS V wurde der Promotorbereich der RNase LE weiter verkürzt (vgl. Abb. 18). Die entsprechenden Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert, in den TA-Cloning-Vektor pCR[®]2.1 subkloniert (Plasmide pPromotor LE III bis V) und anschließend als *Hin*dIII/*Nco*I-Fragmente in den Vektor pCaMV GUS kloniert. Die Sequenzen aller Konstrukte wurde mittels Sequenzierung überprüft. In Tab. 4 wurden alle bei der transienten Transformation der Tomatenzellkultur verwendeten Promotor-GUS-Konstrukte zusammengefaßt. Die beiden Plasmide pRT103 GUS und p0 GUS wurden als Kontrollen in den einzelnen Experimenten mitgeführt.

Bezeichnung des	enthaltene Nukleotid-	Beschreibung des Konstruktes
Promotor-GUS-	Sequenz aus dem	
Konstruktes	RNase LE-Promotor	
pLE GUSI	+ 46 bis - 2621	GUS-Gen unter der Kontrolle der vollständigen Promotorse-
		quenz der RNase LE
pLE GUS II	+ 46 bis - 836	Verkürzung der Promotorsequenz
pLE GUS III	+ 46 bis - 673	Verkürzung der Promotorsequenz
pLE GUS IV	+ 46 bis - 480	Verkürzung der Promotorsequenz
pLE GUS V	+ 46 bis - 269	Verkürzung der Promotorsequenz
pRT103 GUS		GUS-Gen unter Kontrolle des 35 S Promotors
p0 GUS		GUS-Gen ohne Promotor

Tab. 4: Übersicht der bei der transienten Transformation der Tomatenzellkultur mittels Partikelkanone eingesetzten Promotor-GUS-Konstrukte. Die Numerierung der Nukleotide innerhalb des RNase LE-Promotors erfolgte bezogen auf den Haupttranskriptionsstartpunkt.

4.4.1.2. Etablierung eines Testsystems

Bei der transienten Expressionsanalyse sollte die Pi-Mangel-abhängige Aktivierung der verschiedenen RNase LE-Promotorkonstrukte im Vergleich zum konstitutiv exprimierten Kontrollkonstrukt pRT103 GUS (TÖPFER et. al., 1988) untersucht werden. Als Testzellen wurden 2 Tage alte +Pi-Zellen sowie eine 2 Tage alte Normalkultur, die anschließend 24 h in Pi-freiem Kulturmedium angezogen wurde (-Pi-Zellen), eingesetzt. Die Zellen wurden mittels Vakuumfiltration auf Filterpapier-Scheiben gesaugt und anschließend auf Agarplatten (+Pi- bzw. -Pi- Kulturmedium mit 0,8 % Oxoid-Agar) kultiviert. Die Zellkultur wurde als Testsystem gewählt, da sie das am besten charakterisierte System zur Untersuchung des Pi-Mangels ist und sich die Untersuchungsbedingungen (Vergleich von -Pi und +Pi-Bedingungen) in anderen Systemen, wie z.B. einzelne Pflanzenorgane oder Protoplasten, experimentell nicht gut handhaben lassen.

In einer Reihe von Experimenten wurden zunächst die Bedingungen zur ballistischen Transformation von Tomatenzellkulturen optimiert. Diese Transformationsmethode wurde ausgewählt, da bei ihr keine Protoplastierung der Zellen notwendig ist. Als Testkonstrukt wurde das Plasmid pRT103 GUS (TÖPFER et al., 1988) verwendet. Nacheinander wurden folgende Parameter optimiert:

- Zellzahl pro Filter
- Heliumdruck
- Abstand zwischen Zerstreuungsgitter und Petrischale
- DNA-Konzentration im Goldpartikelbeladungsansatz

Dabei wurden der in der Schußkammer angelegte Vakuumdruck, die Goldpartikelgröße und die Anzahl der Goldpartikel pro Schuß jeweils konstant gehalten (vgl. Kap. 3.10.). Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Heliumdruckabhängigkeit und zur DNA-Beladungsdichte der Goldpartikel sind in Abb. 19A und B dargestellt.



Abb. 19 : Optimierung der Bedingungen für die transiente Transformation der Tomatenzellkultur mittels Partikelkanone.

A : Optimierung des Heliumdruckes. Je 6 mit jeweils 1,5 x 10^6 +Pi-Zellen beladene Filter wurden bei den angegebenen Heliumdrücken beschossen. Der Vakuumdruck (102-105 mbar), der Abstand zwischen Zerstreuungsgitter und Petrischale (9 cm) sowie die DNA-Konzentration im Partikelbeladungsansatz (10 µg) wurden konstant gehalten. Nach dem Beschuß wurden die Zellen 24 h im Dunkeln bei 27 °C auf den Agarplatten inkubiert (vgl. Kap. 3.10.). Anschließend erfolgte der Zellaufschluß und die fluorometrische Bestimmung der GUS-Aktivität (vgl. Kap. 3.13.3.2.).

B: Optimierung der DNA-Konzentration im Partikelbeladungsansatz. Es wurden 5 verschiedene DNA-Konzentrationen getestet (2,5; 5; 10; 15 und 20 μ g). Die DNA-Endkonzentration im Partikelbeladungsansatz (130 μ l) betrug 0,019, 0,038, 0,077, 0,115 bzw. 0,154 μ g DNA/ μ l. Die beladenen Goldpartikel wurden unter den in Kap. 4.5.1.2. angegeben optimalen Bedingungen in die Tomatenzellen geschossen.

Als optimale Bedingungen für die transiente Transformation der Tomatenzellen erwiesen sich :

•	optimale Zellzahl pro Filter :	$1,5 \ge 10^6$ Zellen
•	Vakuum in der Schußkammer:	102-105 mbar
•	Heliumdruck :	4 bar
•	Abstand zwischen Zerstreuungsgitter und Petrischale :	9 cm
•	optimale DNA-Konzentration im Partikelbeladungsansatz :	15 µg

4.4.1.3. Analyse der Promotor LE-GUS-Konstrukte

Zunächst wurden die beiden Konstrukte pLE GUS I und pLE GUS II (vgl. Tab. 3) auf ihre Pi-Mangel-Induzierbarkeit getestet. In drei unabhängigen Transformationen wurden jeweils 10 mit +Pi-Zellen und 10 mit -Pi-Zellen beladene Filter unter den in Kap. 4.5.1.2. ermittelten optimalen Bedingungen mit den Promotor-Gus-Konstrukten beschossen (vgl. Kap. 3.10.). Als Kontrollen wurden das Plasmid pRT103 GUS (GUS-Gen unter Kontrolle des 35S Promotors) sowie das Plasmid p0 GUS (GUS-Gen ohne Promotor) mitgeführt. Nach dem Beschuß wurden die Zellen auf dem Filterpapier auf den Agarplatten 24 h bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß. Die GUS-Aktivität wurde fluorometrisch bestimmt (vgl. Kap. 3.13.3.2.).

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 20 dargestellt. Beide RNase-Konstrukte zeigen Promotoraktivität, während für das promotorlose GUS-Konstrukt keine Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Die GUS-Aktivität des Plasmides pRT 103GUS ist in den -Pi-Zellen gegenüber den +Pi-Zellen stark reprimiert. Bemerkenswert ist, daß im Gegensatz dazu die Promotoraktivität der beiden RNase LE-Konstrukte durch Pi-Mangel deut-

lich gesteigert wird. Die Ergebnisse zeigen, daß die unter Pi-Mangel beobachtete starke Akkumulation der Transkriptmenge der RNase LE (vgl. Kap. 4.1.1.) auf die Aktivierung des Promotors zurückzuführen und somit die Induktion der RNase LE durch Pi-Mangel ein transkriptionsregulierter Prozeß ist.



Abb. 20 : Analyse der Pi-Mangelabhängigen Promotoraktivität der beiden RNase LE-Konstrukte pLE GUS I und pLE GUS II im Vergleich zum 35 S-Promotorkonstrukt pRT103 GUS. Die GUS-Aktivität wurde als pmol 4-Methylumbelliferon (MU)/min/ μ g löslichem Protein angegeben. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 6 parallelen Ansätzen. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Abb. 20 zeigt auch, daß das 883 bp lange Promotorfragment der RNase LE für die Pi-Mangel-Induzierbarkeit ausreichend ist. Im weiteren sollte untersucht werden, ob innerhalb dieser Promotorsequenz Pi-Mangel-responsive Bereiche identifiziert werden können. Dazu wurde die GUS-Aktivität der RNase LE-Promotorkonstrukte LE GUS II bis LE GUS V (vgl. Tab. 4) in Abhängigkeit von der Pi-Versorgung der Zellen ermittelt. Zur Bestimmung der Expressionsstärke des Reportergenes GUS wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 10 mit +Pi- Zellen und 10 mit -Pi-Zellen beladene Filter mit den einzelnen PromotorGUS-Konstrukten beschossen (vgl. Kap. 3.10. und 4.5.1.2.) und die GUS-Aktivität anschließend fluorometrisch bestimmt (vgl. Kap. 3.13.3.2.). Ein großes Problem bei der Auswertung transienter Expressionsuntersuchungen ist die Variabilität der ermittelten Werte, die von Faktoren, wie der Effizienz des Beladens der Goldpartikel mit DNA, der Transformationseffizienz, unterschiedlichem Probenmaterial und dem Zellaufschluß verursacht wird. Deshalb wurde ein zweites Reportergen, die Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (Plasmid pRT101 LUC, enthält das Luciferasegen unter Kontrolle des 35S-Promotors; SCHLEDZEWSKI und MENDEL, 1994) als interner Standard eingesetzt, um das System zu kalibrieren (LANAHAN et al., 1992; SCHLEDZEWSKI und MENDEL, 1994). Die gemessenen Luciferase-Aktivitäten wurden in einen Faktor umgewandelt, der die Transformationseffizienz beschreibt (vgl. Kap. 3.10.) und die ermittelten GUS-Werte anschließend durch diesen Faktor dividiert. Zur Ermittlung der Pi-Mangel-Induzierbarkeit der RNase LE-Promotorkonstrukte wurden die relativen +Pi- bzw. -Pi-GUS-Aktivitäten der RNase-Konstrukte jeweils durch die relativen +Pi- bzw. -Pi-GUS-Aktivitäten des Plasmides pRT103 GUS dividiert (Tab. 5 und vgl. Kap. 3.10).

Konstrukt	relative GUS- Aktivität [pmol MU/ min • rlu]	Standardab- weichung [%]	Promotorakti- vität im Ver- gleich zu pRT103 GUS	Aktivierungs- faktor durch Pi-Mangel	Mittelwert	Standardab- weichung [%]
LE GUS II	13.064	7.90	0.321			
	12,242	14,48	0,626	1,95	2,27	17,18
	13,388	9,10	0,316			
	13,455	6,32	0,856	2,71		
	12,725	9,58	0,311			
	16,643	11,31	0,672	2,16		
LE GUS III	8,72	7,67	0,214			
	9,336	9,69	0,477	2,23	2,43	11,52
	7,942	9,11	0,188			
	8,093	8,61	0,515	2,75		
	7,403	12,10	0,181			
	10,331	16,16	0,417	2,31		
LE GUS IV	12,941	6,24	0,318			
	10,881	7,30	0,556	1,75	2,13	15,32
	9,803	5,58	0,232			
	8,495	10,47	0,541	2,33		
	12,633	9,27	0,309			
	17,522	4,87	0,708	2,29		
LE GUS V	7,839	11,10	0,193			
	13,897	9,84	0,711	3,69	3,50	7,38
	11,267	11,65	0,266			
	13,404	4,83	0,853	3,21		
	8,784	11,43	0,215			
	19,165	7,04	0,774	3,61		
pRT103 GUS	40,709	8,10	1,000			
	19,553	8,22	1,000			
	42,328	10,49	1,000			
	15,711	7,78	1,000			
	40,929	13,03	1,000			
1	24 758	9 4 6	1 000	1		

Tab. 5 : Analyse der Pi-Mangel-responsiven Aktivität der verschiedenen Promotorabschnitte der RNase LE in kultivierten Tomatenzellen nach der transienten Transformation mittels Partikelkanone. Den Berechnungen liegen die Daten aus 3 unabhängigen Experimenten zugrunde (n = 8). Die schwarzen Zahlen geben die Werte für die +Pi-Zellen an und die roten Zahlen die Werte für die -Pi-Zellen. Die GUS-Aktivität der Zellen wurde als pmol 4-Methylumbelliferon (MU)/min berechnet und anschließend durch Division der GUS-Werte durch den Transformationseffizienz-Faktor kalibriert. Der Transformationseffizienz-Faktor ergibt sich aus der Messung der Luciferase-Aktivität (vgl. Kap. 3.10 und 3.13.3.2.). Zur Ermittlung der Pi-Mangel-Induzierbarkeit der RNase LE-Promotorkonstrukte wurden die relativen +Pi- bzw. -Pi-GUS-Aktivitäten des Plasmides pRT103 GUS dividiert.

Die Ergebnisse zeigen, daß das 316 bp lange Promotorfragment der RNase LE (Plasmid pLE GUS V) für die Phosphatinduzierbarkeit des Promotors ausreichend ist. Die Verkürzung des RNase LE-Promotors von 883 bp (Plasmid pLE GUS II) auf 720 bp (Plasmid pLE GUS III) bzw. 527 bp (Plasmid pLE GUS IV) führt zu keiner signifikanten Veränderung bei der Phosphatinduzierbarkeit der entsprechenden Konstrukte. Eine weitere Verkürzung des Promotors um 211 bp auf 316 bp (Plasmid pLE GUS V) führt dagegen zu einer leichten Erhöhung der Phosphatinduzierbarkeit.

4.4.2. Stabile Transformation von Tomatenpflanzen durch Agrobakteriumvermittelten Gentransfer

Ausgewählte Promotor LE-GUS-Konstrukte sollten stabil in Tomatenpflanzen transformiert werden. Die regenerierten Pflanzen sind ein wichtiges Werkzeug für weitergehende Untersuchungen zur organ-, gewebe- oder entwicklungsspezifischen Expression der RNase LE in der Tomatenpflanze sowie zur Beeinflussung der Genexpression der RNase LE durch verschiedene Anzuchtbedingungen (z.B. Pi-Mangel) oder durch andere Umwelteinflüsse. Der Nachweis der RNase-Aktivität ist durch die enzymatische oder histochemische Detektion der GUS-Aktivität möglich. Aufgrund des hohen Zeitbedarfs zur Herstellung von transgenen Tomaten-Pflanzen wurden die Experimente zur transienten (vgl. Kap. 4.4.1.) und stabilen Transformation parallel durchgeführt.

4.4.2.1. Herstellung der Konstrukte und Transformation von Tomatenkotyledonen

Für die Untersuchungen wurde der Promotorbereich von Nukleotid +46 bis -836, bezogen auf den Haupttranskriptionsstartpunkt, ausgewählt, da im transienten Test gezeigt wurde, daß er für die Aktivierung der RNase LE durch Pi-Mangel ausreichend ist (vgl. Kap. 4.4.1.3.)

Das im Vektor pUC 19 vorliegende Promotor-GUS-Konstrukt (Plasmid pLE GUS II aus den transienten Expressionsuntersuchungen) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Eco*RI ausgeschnitten und in den binären Vektor pBI 121 kloniert. Dadurch wurde die vorhandene Expressionskassette (35 S Promotor, GUS-Gen, nos-Terminator) ersetzt. Der Vektor pBI 121 (JEFFERSON et al., 1987) entstand auf der Grundlage des binären Vektors BIN 19 (BEVAN, 1984). Er enthält außer dem GUS-Gen noch das Gen der Neomycin-Phosphotransferase (NPTII-Gen) unter Kontrolle des nos-Promotors, das die Selektion transformierter Zellen auf Kanamycinresistenz zuläßt. Das erhaltene Plasmid pBI LE GUS II wurde mit Hilfe der Gefriertechnik von HÖFGEN und WILLMITZER (1988) in den Agrobakteriumstamm LBA 4404 übertragen. Die erhaltenen Transformanten wurden anschließend mittels Restriktionsanalysen und anschließender Hybridisierung auf das Vorhandensein des Promotor-GUS-Konstruktes überprüft (Ergebnis nicht dargestellt).

4.4.2.2. Erzeugung stabil transformierter Tomatenpflanzen durch Agrobakterium-vermittelten Gentransfer

Zur stabilen Transformation von Tomatenpflanzen wurde die Methode nach LING et al. (1998) verwendet (vgl. Kap. 3. 12.). Dabei wurden Kotyledonenstückchen der Tomatensorte L. esculentum Mill. cv. Lukullus (diente zur Herstellung der Zellkultur, TEWES et al., 1984) und zusätzlich der Sorte L. esculentum cv. Moneymaker eingesetzt, da bisher noch keine Erfahrungen zur Transformierbarkeit der Sorte L. esculentum Mill. cv. Lukullus vorlagen. Sich aus den Kalli bildende Sprosse wurden abgeschnitten und auf Wurzelinduktionsmedium überführt. Ungefähr 26 % der umgesetzten Sprosse bildeten innerhalb von 2 bis 4 Wochen Wurzeln. Dabei wurden hinsichtlich der Transformierbarkeit und Regenerationsfähigkeit zwischen den beiden Tomatensorten keine Unterschiede festgestellt, so daß bei weiteren Transformationsansätzen nur noch die Sorte L. esculentum Mill. cv. Lukullus verwendet wurde. Die bewurzelten Pflänzchen wurden einzeln in Magenta GA7-Töpfen weiter kultiviert. Der Nachweis der Integration der T-DNA in das Pflanzengenom erfolgte mittels PCR-Analyse und Southern-Hybridisierungen. Die PCR-Reaktionen wurden mit einem RNase LE-Promotor-spezifischen sense Primer (Oligonukleotid LE-Prom C) und einem GUS-Gen-spezifischen antisense Primer (Oligonukleotid GUS-antisense; vgl. Kap. 2.7.) durchgeführt, wobei ein 800 bp langes Fragment amplifiziert wurde. Insgesamt konnten 21 Tomatenpflanzen (Linien) regeneriert werden, die das RNase LE-Promotor-GUS-Konstrukt stabil in das Genom integriert hatten (Ergebnis nicht dargestellt). In den so als positiv transformiert nachgewiesenen Pflanzen wurde die Kopienzahl des Konstruktes im Tomatengenom durch Restriktionsspaltung der genomischen DNA mit dem Enzym XbaI und anschließender Hybridisierung mit einer GUS-Gen-spezifischen Sonde bestimmt. Da das Enzym XbaI innerhalb der Sequenz des Promotor-GUS-Konstruktes keine Schnittstelle besitzt, sollte die Anzahl der hybridisierenden Banden mit der Kopienzahl übereinstimmen. Die Ergebnisse wurden in Tab. 6. zusammengefaßt.

Nummer der transgenen Tomatenpflanze	Gesamtzahl	Kopienzahl
6, 15, 26, 27, 125, 127, 128	7	1
12, 16, 24, 25, 43, 62, 78, 80, 94, 128	10	2
14, 68, 135	3	3
39	1	6

Tab. 6: Analyse der Kopienzahl des Konstruktes pBI LE II in den transgenen Tomatenpflanzen. Die Numerierung der Pflanzen erfolgte anhand der Kalli, von denen der Sproß abgeschnitten wurde.

Von allen als positiv transformiert nachgewiesenen Pflanzen wurde anschließend die GUS-Aktivität in den Wurzeln und Blättern sowohl unter +Pi- als auch unter -Pi-Bedingungen bestimmt. Dazu wurden jeweils 2 etwa gleich große Sproßspitzen der entsprechenden Tomatenpflanzen in Wurzelinduktionsmedium zur Bewurzelung überführt und nach ca. 1 Woche in neue Magentatöpfe mit Pi-haltiger (4 mM Phosphat) bzw. Pi-freier Hoagland-Nährlösung, der 0,8 % Plantagar, 100 mg/l IAA, 30 mg/l Kanamycin und 160 mg/l Betabactyl zugesetzt wurden, überführt und 7 Wochen weiter kultiviert (vgl. Kap. 3.13.3.2.). Hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und phänotypischen Erscheinungsbildes konnten zwischen den +Pi- und -Pi-Pflanzen innerhalb des Untersuchungszeitraumes keine gravierenden Unterschiede festgestellt werden. Durch eine histochemische Analyse konnte die Expression des RNase LE-Promotor-GUS-Konstruktes in den Wurzeln der -Pi-Pflanzen nachgewiesen werden, während in den Wurzeln der +Pi-Pflanzen keine GUS-Aktivität detektierbar war (Abb. 21).



Abb. 21 : Vergleich von transgenen Tomatenpflanzen nach 7 Wochen Wachstum auf Pi-haltigem (4 mM) oder Pi-freiem Nährmedium. Als Beispiel wurde die transgene Pflanze LE II-12 ausgewählt. Während des Untersuchungszeitraumes kommt es zu keinen signifikanten morphologischen Veränderungen bei den Pflanzen. Durch eine X-Gluc-Färbung der Wurzeln konnte die Aktivität des RNase LE-Promotorfragmentes in den Wurzeln der Pifrei kultivierten Pflanze nachgewiesen werden.

Zur weiteren Charakterisierung der transgenen Tomatenpflanzen erfolgte zunächst die quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität getrennt in den Wurzeln und Blättern der +Pibzw. -Pi-Pflanzen. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt.



A: Wurzeln





Abb. 22 : Darstellung der GUS-Aktivität (pmol MU/min/mg Protein) in den Wurzeln (A) und Blättern (B) der transgenen Tomatenpflanzen unter +Pi- (gelbe Säulen) und -Pi-Bedingungen (grüne Säulen). Die Numerierung der Tomatenpflanzen erfolgte nach der Nummer des Kallus, von dem der Sproß geschnitten wurde. Für die Y-Achse wurde eine logarithmische Skalierung gewählt, um alle Meßwerte in einem Diagramm darstellen zu können. Die Nummern der Pflanzen sind unter den Diagrammen angegeben.

Alle untersuchten Tomatenpflanzen exprimieren unter normalen Anzuchtbedingungen (+Pi) nur geringe GUS-Aktivitäten, die sich in den Wurzeln und Blättern nicht unterscheiden. In den Pi-verarmten Pflanzen wurde dagegen eine unterschiedlich starke Induktion in Abhängigkeit von den untersuchten Pflanzenteilen festgestellt. Der Promotor der RNase LE ist in den Wurzeln ca. 24fach aktiver als in Pi-versorgten Pflanzen, während sich die Aktivität in den Blättern nur um das 5,6fache erhöht (Tab. 7). In untersuchten nicht transformierten Kontrollpflanzen konnte keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden (Ergebnis nicht dargestellt). Damit wird die Pi-Mangel-Induzierbarkeit des RNase LE-Promotors bestätigt.

	GUS-A	Aktivierungsfaktor	durch	Pi-	
	(pmol MU / min / µg Protein)		Mangel		
	+ Phosphat	- Phosphat			
Wurzeln	0,92	21,7	23,71		
Blätter	0,98	5,51	5,64		

Tab. 7: Mittelwerte der GUS-Aktivitäten in den untersuchten Organen der transgenen Tomatenpflanzen in Abhängigkeit von der Pi-Versorgung.

Die GUS-Aktivität variiert bei den einzelnen Pflanzen sehr stark und ist unabhängig von der Kopienzahl. Die Verteilung der gemessenen GUS-Aktivitäten zwischen den Wurzeln und Blättern betrug ca. 64 % zu 36 % bei den +Pi-Pflanzen bzw. ca. 75 % zu 25 % bei den -Pi-Pflanzen. Mögliche Gründe für die hohe Variabilität können sein :

- 1. Die Variabilität könnte genabhängig sein, da einige Gene eine höhere Variabilität als andere zeigen (PEN et al., 1992).
- Durch den Einfluß von an die inserierte T-DNA angrenzenden genomischen Sequenzen kann es zu einer Veränderung oder vollständigen Unterdrückung des Expressionsniveaus kommen (Positionseffekt).
- 3. Demgegenüber scheint die Kopienzahl für die Expressionsstärke eine untergeordnete Rolle zu spielen (PEN et al., 1992).
- Tandemartige Wiederholungen der inserierten DNA innerhalb eines Chromosoms werden bei der Kopienzahlanalyse als ein Locus erfaßt.
- 5. Einzelne Gene können durch Methylierungen inaktiviert sein.
- 6. Bei den gewählten Versuchsbedingungen erfolgte die Pi-Verarmung der Pflanzen durch den Verbrauch des in den Geweben gespeicherten Phosphates während des Wachstums. Der Grad der Pi-Verarmung und damit der Induktion des RNase LE-Promotors ist damit von der Größe der verwendeten Sproßspitze und der Wachstumsrate abhängig, so daß ein Vergleich zwischen verschiedenen transgenen Pflanzen schwierig ist.

4.5. Isolierung und Charakterisierung von genomischen Klonen von PSI14

Das unbekannte Protein PSI14 ist ein weiterer Vertreter der durch Pi-Mangel hervorgerufenen Genexpressionsänderung in der Tomate, dessen Verhalten unter Pi-Mangelbedingungen vergleichbar mit dem der RNasen LE und LX ist. Seine Expression wird in starker Abhängigkeit von der Pi-Verfügbarkeit reguliert. Die Transkript-Akkumulation beginnt schon 3 h nach dem Umsetzen der Tomatenzellen in Pi-freie Nährlösung. Das Transkript ist jedoch bereits 1 h nach Zugabe von Phosphat zu vollinduzierten Zellen (Kultivierung für 24 h in Pi-freier Nährlösung) nicht mehr nachweisbar (vgl. Kap. 4.1.1.). Durch die Isolierung und Charakterisierung von genomischen Klonen sollten die Promotorsequenzen identifiziert und anschließend mit den Promotorsequenzen der RNase LE verglichen werden, um strukturelle Gemeinsamkeiten in den Promotoren der beiden Gene zu identifizieren, die möglicherweise für die Regulation bei Pi-Mangel von Bedeutung sind.

4.5.1. Southern-Analyse

Zunächst sollte mit Hilfe der Southern-Hybridisierung die Gen-Struktur von PSI14 aufgeklärt werden. Dazu wurde aus der Zellkultur isolierte genomische Tomaten-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Hin*dIII, *Eco*RV, *Eco*RI, *Bam*HI, *Xba*I bzw. *Bgl*II gespalten und mit der ³²P- markierten cDNA hybridisiert. Das Autoradiogramm ist in Abb. 23 dargestellt. In allen Bahnen sind mehrere mit der cDNA-Sequenz hybridisierende Banden nachweisbar. Daraus folgt, daß es für PSI14 im Tomatengenom mindestens 3 Gene geben muß (Spur 5 und 6 in Abb. 23) und der Klon somit ein Vertreter einer kleinen Genfamilie ist.



Abb. 23: Southern-Analyse genomischer Tomaten DNA aus der Zellkultur. Je 20 μ g genomische DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Hin*dIII (1), *Eco*RV (2), *Eco*RI (3), *Bam*HI (4), *Xba*I (5) bzw. *Bgl*II (6) gespalten und mit dem ³²P-markierten *PstI/Xho*I-Fragment von pPSI14 (cDNA-Sequenz) hybridisiert. Die Länge der Fragmente des Größenstandards (λ -DNA, die mit der Restriktionsendonuklease *Hin*dIII hydrolysiert wurde) ist an der rechten Seite angegeben.
4.5.2. Klonierung und Charakterisierung eines für PSI14 kodierenden genomischen PCR-Fragmentes

Zum Screening der genomischen Bank sollte zunächst eine Sonde hergestellt werden, die eventuell vorhandene Intronsequenzen enthält und damit gleichzeitig erste Informationen über die Genstruktur des Klons PSI14 liefert. Dazu wurden mit Hilfe der PCR genomische Sequenzen von PSI14 amplifiziert, subkloniert und anschließend sequenziert (Tab.8).

PCR- Ansatz	Primer	Länge der Fragmente in der cDNA [in bp]	Länge der Fragmente in der genomischen DNA [in bp]	Bezeichnung des genomischen PCR-Produktes
1	$14/\text{O-}01 \rightarrow 14/\text{O-}02$	350	550	PCR14/1
2	$14/\text{O-}01 \rightarrow 14/\text{O-}03$	850	1150	PCR14/2

Tab. 8 : Darstellung der in den PCR-Reaktionen erhaltenen Fragmente, die mit der cDNA von PSI14 hybridisieren. Die verwendeten Oligonukleotidprimer entsprachen der vorhandenen cDNA-Sequenz (vgl. Kap. 2.7.). Das in beiden Ansätzen als 5'-PCR-Primer eingesetzte Oligonukleotid 14/O-01 besitzt Identität zum vermuteten Translationsstartpunkt, während der Primer 14/O-03 kurz vor dem mutmaßlichen Polyadenylierungssignal an die cDNA bindet bzw. der Primer 14/O-02 aus der Mitte der Sequenz gewählt wurde. Als Template dienten in parallelen Ansätzen jeweils aus der Zellkultur isolierte genomische DNA bzw. das Plasmid pPSI14, das die vollständige cDNA-Sequenz des Klons PSI14 enthält.

Die in den cDNA-Ansätzen erhaltenen Fragmente entsprechen den aus der Sequenz erwarteten Größen. Da die beiden mit der genomischen DNA erhaltenen Fragmente größer als die entsprechenden Banden in der cDNA sind, spricht das Ergebnis für die Existenz von mindestens 2 Introns im Gen von PSI14. Die genomischen PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning-Vektor pCR[®]2.1 kloniert und mittels *Primer-Walking* vollständig sequenziert.

Das 1156 bp lange Fragment PCR14/2 beinhaltet die vollständige cDNA-Sequenz von PSI14 vom mutmaßlichen Translationsstartpunkt bis zum Nukleotid 908 (vgl. Anhang 2). Die Sequenzanalyse bestätigt die Nukleotid-Sequenz der cDNA. Das PCR-Fragment enthält 4 Exons und 3 Introns (Abb. 24). Das erste Intron ist 131 bp lang und unterbricht die cDNA-Sequenz nach der ersten Base des Tripletts von Aminosäure 47. Das zweite, 75 bp lange Intron unterbricht die cDNA-Sequenz nach der 2. Base des Tripletts von Aminosäure 154 unter-87, während das dritte, 85 bp lange Intron die cDNA-Sequenz nach Aminosäure 154 unterbricht. Alle drei Introns sind mit 62,6 %, 68 % bzw. 74,1 % A/T-Gehalt A+T-reich.

Das PCR-Fragment pCR14/1 ist 564 bp lang und stimmt in seiner Nukleotid-Sequenz (Nukleotid 1-564) mit dem Fragment PCR14/2 überein. Es wurde im folgenden als eine für das 5'-Ende von PSI14-spezifische Sonde eingesetzt.



Abb. 24 : Darstellung der Exon/Intron-Abfolge im PCR-Fragment PCR14/2. Die Exons wurden als dicke Balken dargestellt. Das Ende des PCR-Fragmentes PCR14/1 sowie ausgewählte Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet.

4.5.3. Isolierung und Charakterisierung genomischer Klone von PSI14

Zur Isolation von genomischen Klonen für PSI14 wurden ca. 2 x 10^6 Pfu der EMBL3-Phagenbank (*Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry, vgl. Kap. 2.4.1.) mit dem radioaktiv markierten PCR-Fragment PCR14/2 (vgl. Kap. 4.6.2.) gescreent. Nach drei Screening-Runden konnten zwei positive λ -Klone gereinigt werden. Von jedem Klon wurde die DNA isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Dabei wurde die Identität der beiden Lambda-Klone festgestellt (Ergebnisse nicht dargestellt). Für alle weiteren Experimente wurde der Klon λ g14-01 verwendet.

Zur Identifizierung der für den Klon PSI14 kodierenden Sequenzbereiche wurde die Lambda-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Sal*I (Abtrennung der λ -Arme), *Eco*RI und *Spe*I (je eine bekannte Schnittstelle innerhalb des genomischen PCR-Fragmentes PCR14/2) sowie *Hin*dIII (keine bekannten Schnittstellen) gespalten. Der Southernblot wurde nacheinander mit dem radioaktiv markierten PCR-Fragmenten PCR14/1 (5'-Ende der genomischen Sequenz von PSI14), PCR14/2 (vollständiges genomisches PCR-Fragment von PSI14) sowie mit der DNA des Klons λ g14-01 hybridisiert (Abb. 25). Mit der Sonde PCR14/1 wurden in der *Hin*dIII-, *Eco*RI- und auch in der *Spe*I gespaltenen λ -DNA jeweils 2 hybridisierende Fragmente nachgewiesen. Die beiden zusätzlichen Banden, die mit der Sonde PCR14/2 in der *Eco*RI- bzw. *Spe*I gespaltenen λ -DNA detektiert wurden, sind durch interne Schnittstellen erklärbar. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß der Klon λ g14-01 zwei unabhängige genomische Sequenzen des Klons PSI14 enthält.



Abb. 25 : Restriktionsanalyse und Southern-Hybridisierung des Phagenklones λ g14-01. Die Phagen-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Sal*I (S), *Hin*dIII (H), *Eco*RI (E) oder *Spe*I (Sp) gespalten. Die verwendeten Hybridisierungssonden sind über den einzelnen Blots angegeben.

Zur Subklonierung genomischer Sequenzen wurde die Lambda-DNA mit den Enzymen *Hin*dIII, *Eco*RI oder *Spe*I gespalten und die Fragmente in den TA-Cloning-Vektor pCR[®]2.1 kloniert (shot gun-Klonierung). Durch die Mehrfachklonierungen sollte nach der Sequenzierung eine Zuordnung der einzelnen Fragmente möglich sein. Positive Klone wurden durch Koloniehybridisierungen und anschließende Restriktionsanalysen selektiert.

4.5.4. Sequenzanalyse der Subklone

Die für PSI14 kodierenden Sequenzabschnitte in den einzelnen Subklonen wurden mittels *Primer-Walking* vollständig doppelsträngig sequenziert und die aus der DNA-Sequenzierung resultierenden Fragmente mit Hilfe des Programms DNASIS zusammengesetzt. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sind in Tab. 9 zusammengefaßt. Die beiden mit g14/A bzw. g14/B bezeichneten genomischen Sequenzen liegen innerhalb der genomischen Tomaten-DNA in "Kopf-an-Schwanz-Anordnung" ca. 2,8 kb voneinander entfernt (Ergebnis nicht dargestellt).

Bezeichnung des	Länge des Inserts	Beschreibung
Subklones	[in bp]	
g14 Eco 1	ca. 3700	3'-Ende g14/B
g14 Eco 2	ca. 2200	3'-Ende g14/A
g14 Eco 3	1720	5'-Ende g14/B
g14 Eco 4	1082	5'-Ende g14/A
g14 Spe 2	ca.3500	5'-Ende g14/B
g14 Spe 3	ca.2600	3'-Ende g14/B
g14 Spe 4	661	3'-Ende g14/A
g14 Hind 2	1933	vollständige Nukleotid-Sequenz von g14/A

Tab. 9 : Übersicht über die nach der shot gun-Klonierung aus λ g14-01 erhaltenen Subklone, die mit der cDNA von PSI14 hybridisieren. Die Klone wurden entsprechend ihrer Größe, beginnend mit dem jeweils größten, durchnumeriert.

Die ermittelte Nukleotid-Sequenz und die im Vergleich mit dem cDNA-Klon PSI14 daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für die beiden Gene g14/A bzw. g14/B sind im Anhang 3 dargestellt. Durch den Sequenzvergleich wurde festgestellt, daß keine der beiden genomischen Sequenzen mit der vorhandenen cDNA-Sequenz übereinstimmt. Für die Sequenz g14/A wurden 18 Aminosäureaustausche gegenüber der vorhandenen cDNA-Sequenz und für die Sequenz g14/B wurden 5 Aminosäureaustausche festgestellt (vgl. Anhang 4). Die beiden Sequenzen entsprechen vermutlich den beiden anderen in der Southern-Analyse detektierten PSI14-Genen (vgl. Abb. 23). Die Sequenz des genomischen PCR-Fragmentes PCR14/GSP4 wird deshalb im folgenden als g14/C bezeichnet.

Die Aminosäuresequenzen der drei PSI14-Gene werden an identischen Positionen durch drei Introns unterbrochen (nach der 1. Base des Tripletts von Aminosäure 47, nach der 2. Base des Tripletts von Aminosäure 87 bzw. nach Aminosäure 154). Ein Vergleich der Exon- und Intronsequenzen der drei Gene ist in Tab. 10 dargestellt.

	Länge in bp			Identität [%]				
	g14/A	g14/B	g14/C	g14/C u. g14/A	g14/C u. g14/B	g14/A u. g14/B		
Exon 1	138	138	138	92	97	94		
Intron 1	89	84	131	59	55	69		
Exon 2	122	122	122	98	98	96		
Intron 2	75	76	75	100	97	97		
Exon 3	202	202	202	96	96	98		
Intron 3	85	85	85	86	86	100		
Exon 4	348	348	348	92	98	93		

Tab. 10 : Analyse der Exon/Intron-Struktur der drei PSI14-Gene.

Die Intronsequenzen sind hoch konserviert. So stimmen die Sequenzen des zweiten Introns zwischen den beiden Genen PSI14/A und PSI14/C zu 100 % und die Sequenz des zweiten Introns des Genes PSI14/B bis auf 2 Nukleotide überein. Eine 100 % ige Übereinstimmung wurde auch zwischen den Sequenzen des dritten Introns der Gene PSI14/A und PSI14/B festgestellt. Die geringere Homologie innerhalb der Sequenzen des 1. Introns ist vor allem auf das Fehlen eines 34 bp langen Sequenzabschnittes beim Gen PSI14/A bzw. eines 51 bp langen Sequenzabschnittes beim Gen PSI14/C zurückzuführen (vgl. Anhang 5).

Vergleich der 5'-upstream des Translationsstartkodons gelegenen Sequenzen der beiden Gene PSI14/A und PSI14/B und Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte

Unmittelbar upstream des Translationsstartkodons ATG sinkt die Sequenzhomologie zwischen den drei Genen sehr stark ab (vgl. Abb. 27). Deshalb konnten in diesem Bereich genspezifische Antisense-Oligonukleotidprimer abgeleitet werden, um die Transkriptionsstartpunkte der beiden Gene PSI14/A und PSI14/B mittels Primerextension zu ermitteln. Für das Gen PSI14/A konnten keine Primerextensionsprodukte nachgewiesen werden, was durch die im Vergleich zu den beiden anderen PSI14-Genen sehr geringe mRNA-Menge erklärbar ist (vgl. Abb. 29B).

Für das Gen PSI14/B wurden Primerextensionsprodukte bei den Positionen -34, -38 und -52, bezogen auf das Translationsstartkodon ATG, identifiziert (Abb. 26 und 27). 24 bp vor dem größten Extensionsprodukt befindet sich eine TATA-Box-Sequenz, die eine hohe Übereinstimmung mit der TATA-Box-Konsensussequenz TATA(A/T)A(A/T) (ROEDER, 1996) zeigt. Deshalb wird die Position -52 als Haupttranskriptionsstartpunkt angesehen.

In Abb. 27 wurde das Alignment der 5'-upstream des Translationsstartkodons gelegenen Sequenzen der Gene PSI14/A und PSI14/B dargestellt. Die weiter 5'-upstream gelegenen Promotorbereiche zeigen keine signifikanten Homologien. Im Gegensatz dazu sind die TATA-Box-Sequenzen sowie die Sequenzen um das Translationsstartkodon stark konserviert.



Abb. 26 : Primerextensionsanalyse zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des Genes PSI14/B. Der ³²P-markierte Antisenseprimer PSI14/B1 (vgl. Abb. 28) wurde an 50 μ g Gesamt-RNA, isoliert aus +Pi-Zellen (Spur 1), sowie 10 μ g und 50 μ g Gesamt-RNA, isoliert aus 24 h in Pi-freiem Medium inkubierten Zellen (Spur 2 bzw. 3) oder 2 μ g mRNA, isoliert aus 24 h in Pi-freiem Medium inkubierten Zellen (Spur 4), hybridisiert und mittels Reverser Transkriptase verlängert. Die Reaktionsprodukte wurden zusammen mit einer Sequenzierreaktion (angefertigt mit dem Primer PSI14/B1 und Plasmid-DNA von pg14Eco3) auf einem Sequenziergel elektrophoretisch getrennt. Der vermutliche Transkriptionsstartpunkt wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet zusammen mit seiner TATA-Box.

	* **** **** * ***	*** ****	* * * * * * * *
PSI14/B	CAGAGGTCTTCTATAATTCA	TAAACAAA	AAA ATG GCT
PSI14/A	CAAACAGAGCTCTTCTTTTCTCTCTCTCT	GAAAAGTTACTCAAA	AAA ATG GCT
	****** **********	* ****	*** ******* ***
PSI14/B	CC <u>TATAAAG</u> CTCCCTCTTCATT-AGTTTG	GTGT T CACAAA	CCAAAAC A ACA A GAAA
PSI14/A	TATA-BOX CC <u>TATAAAT</u> CTCCCTCTTCATTCAAA	CCCAAATAC	CATCCCATAACAACAACAAA

Abb. 27 : Alignment der Genstruktur der beiden Gene PSI14/A und PSI14/B im Bereich des Transkriptionsstartpunktes. Die mutmaßlichen TATA-Box-Sequenzen und das Translationsstartkodon ATG wurden fett gedruckt dargestellt und unterstrichen. Der vermutete Transkriptionsstartpunkt des Genes PSI14/B wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Position der für die Primerextension eingesetzten Antisense-Oligonukleotidprimer wurde eingezeichnet (gestrichelte Linie). In den beiden Sequenzen konservierte Nukleotide wurden durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet. Zur Optimierung des Alignments eingeführte Lücken wurden durch Striche dargestellt.

Die Promotorsequenzen der beiden Gene PSI14/A und PSI14/B wurden mit Hilfe des Programms PC/GENE auf besondere Strukturmerkmale untersucht. Ein 80 bp langer Abschnitt des Promotors des Genes PSI14/A enthält eine dreimal wiederholte 16 bp lange Sequenz (5'-TATATTACATCACATA-3') sowie eine zweimal wiederholte 21 bp lange Sequenz (5'-TACATCACATAAATCTAGTTT-3'), welche die 16 bp lange Sequenz teilweise überlappt (Abb. 28). Der Promotor des Genes PSI14/B enthält keine direkten Sequenzwiederholungen. Beide Promotoren enthalten jeweils ein 14 bp langes Palindrom (5'-TATATATATATATA-3'), das sich im Promotor des Genes PSI14/A bei Position -813 und im Promotor des Genes PSI14/B bei Position -373 befindet. Beide Promotoren sind mit einem A/T-Gehalt von 73,9 % (PSI14/A) bzw. 73,5 % (PSI14/B) A+T-reich.

-480 <u>TATAA<mark>TACATCACATA</mark>AATCTAGTTT</mark>TTTC<u>TATAT</u>TACATCACATAAATCTAGTTT</u>ATCG

$-420 \ {\tt TATATTACATCACATAGATTTATTCTCCCCATGTAATTCATACAAGGATTTAGTTCAATCC}$

Abb. 28 : Darstellung des 80 bp langen Promotorbereiches von PSI14/A mit den direkten Sequenzwiederholungen. Die 16 bp lange Sequenz wurde unterstrichen und die 21 bp lange Sequenz wurde gelb hervorgehoben.

Der Promotor des Genes PSI14/B enthält zwei G-Box-ähnliche Elemente bei Position -249 und -573, die eine hohe Übereinstimmung mit der Konsensus-Bindungssequenz CANNTG verschiedener Helix-Loop-Helix Proteine zeigen (BLACKWELL und WEINTRAUB, 1990; FISHER und GODING, 1992).

Die Promotorsequenzen der beiden PSI14-Gene wurden für Homologiesuchen in der PLACE-Datenbank, einer Datenbank pflanzlicher *cis*-Elemente, eingesetzt (http://www. dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/). Ähnlich wie der Promotor der RNase LE enthalten beide Promotoren Sequenzen, die auf eine bevorzugte Expression in Wurzeln schließen lassen [Rootelement (ELMAYAN und TEPFER, 1995); vgl. Anhang 7].

4.5.5. Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen für die beiden Gene PSI14/A und PSI14/B

Innerhalb der 3'UTR des bekannten cDNA-Klons befinden sich Sequenzmotive, die Ähnlichkeiten zu dem in der 3'UTR der durch Auxin induzierbaren SAUR-Gene (small auxin-up RNA) aus Sojabohne und Arabidopsis identifizierten und charakterisierten DST-Element aufweisen, das für die Instabilität dieser Transkripte verantwortlich ist (NEWMANN et al., 1993). Ähnliche Sequenzen wurden ebenfalls in der genomischen Sequenz g14/B 173 bp downstream des Stop-Kodons identifiziert. Durch die Isolation von cDNA-Klonen sollte nachgewiesen werden, ob sich diese Sequenzen innerhalb der 3'-UTR des Transkriptes be-

findet.

Dazu wurden ca. 2000 pfu einer -Pi-cDNA-Expressionsbank der Tomate (*L. esculentum* Mill. cv. Lukullus; vgl. Kap. 2.4.2) mittels Plaque-Hybridisierung und unter Verwendung der bekannten cDNA-Sequenz als Sonde gescreent. Aufgrund der hohen Sequenzhomologien zwischen den drei Vertretern der PSI14-Genfamilie (vgl. Tab. 10) detektiert diese Sonde alle Vertreter der Genfamilie. Nach drei Screening-Runden konnten 8 positive Phagen-Klone isoliert werden. Die in den λZAP-Phagen vorliegenden pBluescript SK-Phagemide wurden mittels *in vivo*-Excision isoliert (vgl. Kap. 3.14.). Die in den pBluescript-Vektoren enthaltenen cDNA-Fragmente wurden anschließend mittels *Primer-Walking* vollständig sequenziert. Dabei konnten zwei cDNA-Klone des Genes PSI14/B identifiziert werden, während die restlichen zwei cDNA-Klone für das Gen PSI14/C kodieren und mit der bekannten cDNA-Sequenz vollständig übereinstimmen. Unterschiede zwischen den einzelnen cDNA-Klonen der Gene PSI14/A bzw. PSI14/B existieren nur hinsichtlich der Länge ihrer 3'UTR (vgl. Anhang 3). Alle cDNA-Klone enthalten eine ORF von 810 bp, die mit einem Start-Kodon beginnt und mit einem Stop-Kodon endet und für 269 Aminosäuren kodiert.

Während die 5'UTR bzw. 3'UTR der einzelnen cDNA-Klone der GENE PSI14/A bzw. PSI14/B jeweils vollständig mit den entsprechenden Abschnitten aus den beiden genomischen Sequenzen g14/A bzw. g14/B übereinstimmen, wurden innerhalb der kodierenden Sequenzen Basenaustausche festgestellt, die jeweils in den entsprechenden cDNA-Sequenzen konserviert sind (vgl. Anhang 3 und 4). Da die drei cDNA-Sequenzen aus einer cDNA-Bank der Tomatensorte *L. esculentum* Mill. cv. Lukullus isoliert wurden, während die zur Isolation der genomischen Klone verwendete Bank aus der Tomatensorte *L. esculentum* VFNT Cherry hergestellt wurde (vgl. Kap. 2.4.), scheinen für die einzelnen Mitglieder der PSI14-Genfamilie in den einzelnen Tomatensorten verschiedene Allele zu existieren.

Durch die Sequenzierung wurde nachgewiesen, daß sich die DST-Element-ähnlichen Sequenzen des Genes PSI14/B innerhalb der 3'UTR des Transkriptes befinden.

Bemerkenswert nach einem Vergleich der 5'UTR der drei Gene ist die Identifizierung eines Pyrimidin-reichen Abschnittes bei den Genen PSI14/A und PSI14/C, der Ähnlichkeiten zu einer in der 5'UTR der Kern-kodierten Chloroplasten-Gene PsaF und PetH aus Spinat identifizierten CT-Box (5'-TTCTCTCTCTCT-3') aufweist, die für die Transkription dieser Gene essentiell ist (BOLLE et al., 1994).

4.5.6. Expressions analyse der drei PSI14-Gene

Im folgenden sollte untersucht werden, welche der drei PSI14-Gene an der Antwort der Zellkulturzellen auf Pi-Mangel beteiligt sind. Aufgrund der hohen Sequenzhomologien (vgl. Tab. 10) ist bei Northern-Hybridisierungen keine spezifische Detektion der drei mRNA-Transkripte möglich. Einen Ausweg bot die Methode der Single Nukleotide Primer Extension (SNuPE, vgl. Kap.3.9.). Dazu wurde mRNA aus Pi-versorgten und aus 24 h in Pifreiem Nährmedium inkubierten Tomatenzellkulturzellen isoliert (vgl. Kap. 3.2.2.). Als Primer für die Reverse Transkriptase und als 3'-PCR-Primer diente das Oligonukleotid PSI14/GSP1 (Nukleotid 471 bis 488 der cDNA-Sequenz des Klons PSI14C), dessen Sequenz bis auf das Nukleotid 18 in allen drei Genen übereinstimmt. Als 5'-PCR-Primer wurde der 5' RACE Abrided Anchor Primer (Gibco BRL) verwendet, der homolog zu einer vorher durch das Enzym Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase an das 3'-Ende der Reverse Transkriptase-Produkte anpolymerisierten Poly-C-Sequenz ist. Die drei genspezifischen Oligonukleotidprimer konnten aufgrund der Sequenzhomologien nur aus der Sequenz unmittelbar vor dem Translationsstartkodon abgeleitet werden. Die in Kap. 2.7. aufgeführten verwendeten Oligonukleotide sind nach der PAGE im Autoradiogramm aufgrund ihrer Größenunterschiede identifizierbar. Die Spezifität der Methode wurde durch verschiedene Kontrollen überprüft. Dazu wurden die drei isolierten Subklone g14Eco4 (5'-Ende der Sequenz von g14/A), g14Eco3 (5'-Ende der Sequenz von g14/B) sowie die vorhandene cDNA-Sequenz (Sequenz von PSI14/C) in drei separaten SNuPE-Reaktionen eingesetzt. Jede dieser Reaktionen enthielt alle drei genspezifischen Primer und jeweils einen der drei Subklone als Template. Die einzelne Bande im Autoradiogramm beweist, daß nur der sequenzhomologe Primer an das entsprechende Template binden kann (Abb. 29A). In Abb. 29B sind die Reaktionsprodukte aus den beiden Ansätzen mit mRNA aus phosphatversorgten Zellen (+Pi) bzw. mRNA aus -Pi-Zellen (-Pi) aufgetragen. Für die Untersuchung wurde mRNA, die aus einer 3 d alten +Pi-Kultur (+Pi) bzw. mRNA, die aus einer 3 d alten +Pi-Kultur, die anschließend 24 h in Pi-freier Nährlösung kultiviert wurde (-Pi), eingesetzt. Das Ergebnis zeigt, daß in der Tomatenzelle alle drei Gene unter beiden Kultivierungsbedingungen transkribiert werden. In den +Pi-Zellen stellt das Transkript des Genes PSI14/C den mengenmäßig größten Anteil dar, während die mRNA der beiden Gene PSI14/A und PSI14/B nur schwach detektierbar ist. Unter -Pi-Bedingungen steigt die Transkriptmenge von PSI14/B sehr stark an. Im Gegensatz dazu erhöht sich der Transkriptlevel des Genes PSI14/C nur schwach, während die Expression von PSI14/A unter -Pi-Bedingungen sogar schwach reprimiert ist. In Tab. 11 wurde die Verteilung der Transkriptmengen der einzelnen

PSI14-Gene in den +Pi- und -Pi-Zellen dargestellt. Aus den Ergebnissen folgt, daß der in den Northern-Hybridisierungen detektierte starke Anstieg der mRNA von PSI14 unter Pi-Mangelbedingungen (vgl. Kap. 4.1.1.) im wesentlichen auf die Erhöhung des Transkriptlevels des Genes PSI14/B zurückzuführen ist. Im Vergleich mit Northern-Hybridisierungen ist die *Single Nukleotide Primer Extension* (SNuPE) eine wesentlich sensitivere Methode, da zum einen mRNA als Ausgangsmaterial eingesetzt und zum zweiten das Signal durch die PCR-Reaktion zusätzlich amplifiziert wird. Deshalb konnte in den +Pi-Zellen bei den Northern-Experimenten für PSI14 kein Signal detektiert werden.

	+ Pi-Zellen	- Pi-Zellen
PSI14/A	54,7 %	45,3 %
PSI14/B	26,5 %	73,5 %
PSI14/C	44,7 %	55,3 %

Tab. 11 : Vergleich der Verteilung der Transkriptmengen der drei PSI14-Gene in einer 3 d alten +Pi-Kultur (+Pi-Zellen) und einer 3 d alten +Pi-Kultur, die anschließend 24 h in Pi-freier Nährlösung kultiviert wurde (-Pi-Zellen). Für die Auswertung der Signale des Autoradiogrammes der SNuPE-Reaktionsprodukte (vgl. Abb. 30B) mit dem Programm TINA (Raytest) wurde die Summe der gemessenen untergrundkorrigierten Intensitäten (PSL) der +Pi- und -Pi Zellen der einzelnen Gene auf 100 % gesetzt.

Im folgenden sollte das Expressionsmuster der PSI14-Gene in der Tomatenpflanze untersucht werden. Dazu wurde die RT-PCR mit mRNA, die aus Wurzeln und Blättern ca. 5 Wochen alter Gewächshauspflanzen sowie aus Blüten isoliert wurde, durchgeführt (Abb. 29C). Das Transkript des Genes PSI14/C ist schwach in den Wurzeln und Blättern sowie deutlich in den Blüten detektierbar, während die mRNA von PSI14/B nur als schwaches Signal in den Blättern und Blüten, sowie das Transkript von PSI14/A nur in den Blüten nachgewiesen werden konnte.

Mittels Northern-Hybridisierung wurde die starke Induzierbarkeit des cDNA-Klons PSI14 36 h nach der Infiltration von Tomatenblättern (*L. esculentum* cv. Moneymaker) mit dem virulenten *Xanthomonas*-Stamm X.c.v. 75-3 nachgewiesen (vgl. Abb. 7B und Kap. 4.1.3.). Um zu untersuchen, welche der drei PSI14-Gene an dieser Pathogen-Interaktion beteiligt sind, wurden aus Gesamt-RNA, isoliert 36 h nach der Infiltration mit der Bakteriensuspension, bzw. aus Gesamt-RNA, isoliert 36 h nach der Infiltration mit einer MgCl₂-Lösung (Verwundungskontrolle) die mRNA isoliert (vgl. Kap. 3.2.2.) und als Template in der SNuPE-Reaktion eingesetzt. Zum Vergleich wurden ein Ansatz mit mRNA, isoliert aus der Gesamt-RNA von grünen Blättern 5 Wochen alter, unbehandelter Tomatenpflanzen, mitgeführt. Im Gegensatz zur Induktion bei Pi-Mangel werden alle drei PSI14-Gene schwach durch Verwundung und deutlich nach der Pathogen-Infektion induziert (Abb. 29D).

Ergebnisse



Abb. 29 : Autoradiogramm der SNuPE-Reaktionsprodukte.

- A: Spezifitätskontrolle der SNuPE-Methode. Je 50 ng der drei klonierten Subtyp-spezifischen Sequenzen wurden in drei separaten SNuPE-Reaktionen eingesetzt. Jede dieser Reaktionen enthielt alle drei genspezifischen Primer und jeweils einen der drei Subklone als Template.
- B: Analyse der Expression der drei PSI14-Gene in Pi-versorgten (+Pi) und Pi-verarmten (-Pi) Tomatenzellen. Für die Analyse wurde mRNA, isoliert aus einer 3 d alten +Pi-Tomaten-Zellkultur bzw. mRNA, isoliert aus einer 3 d alten +Pi-Kultur, die anschließend 24 h in Pi-freiem N\u00e4hrmedium kultiviert wurde, eingesetzt.
- C: Analyse der Expression der drei PSI14-Gene in Tomatenpflanzen. Die mRNA wurde aus Wurzeln (W) und Blättern (Bl) ca. 5 Wochen alter Gewächshauspflanzen sowie aus Blüten (B) isoliert.
- D: Analyse der Expression der drei PSI14-Gene in unbehandelten grünen Tomatenblättern (Bl), nach Verwundung (V) bzw. nach Infektion mit dem virulenten *Xanthomonas*-Stamm X.c.v. 75-3 (P). Die mRNA-Synthese erfolgte 36 h nach der Infiltration der Tomatenblätter mit einer 10 mM MgCl₂-Lösung (V) bzw. 36 h nach der Infiltration der Tomatenblätter mit einer Bakteriensuspension des Stammes X.c.v. 75-3 (5 x 10⁸ cfu/ml) (P).

Zum Vergleich wurden bei jedem Experiment 2 Kontrollreaktionen mitgeführt, bei denen zum einen alle drei Subtypen (alle) oder zum anderen keiner der drei Subklone (H₂O) als Template eingesetzt wurden. Die rechte Spalte der Abb. zeigt die quantitative Auswertung der erhaltenen Autoradiogramme. Die relative Transkriptmenge wurde als Prozent der gemessenen, untergrundkorrigierten Intensität (PSL) angegeben. Für die Auswertung wurde die Summe der jeweils gemessenen, untergrundkorrigierten Intensität als 100 % angesetzt (Auswertung mit dem Programm TINA, Raytest).

5. Diskussion

5.1. Die Genfamilie der durch Phosphatmangel induzierbaren Ribonukleasen der Tomate

Beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase oder bei Kultivierung in Pi-freier Nährlösung beginnen die Zellen der von uns untersuchten Tomatensuspensionskultur hohe Mengen extra- und intrazellulärer RNase-Aktivitäten zu akkumulieren. Mittels RNase-Aktivitätsfärbungen nach nativer PAA-Gelelektrophorese wurden neben einer extrazellulären RNase-Aktivität (RNase LE; Nürnberger et al., 1990) drei vakuolär lokalisierte Aktivitäten (RNasen LV1-3) und eine weitere intrazelluläre, aber extravakuoläre Aktivität (RNase LX) nachgewiesen (LÖFFLER et al., 1992). Diese RNase-Aktivitäten sind in Pi-versorgten Tomatenzellen nicht oder nur sehr schwer detektierbar, während ihre Aktivitäten nach dem Transfer von +Pi- in -Pi-Medium kontinuierlich ansteigen. Durch die Überführung von -Pi-Zellen in +Pi-Medium bzw. durch Zugabe von Phosphat zu -Pi-Zellen konnte die Reversibilität dieses Induktionsprozesses und damit die Reprimierbarkeit der RNase-Aktivitäten durch Phosphat nachgewiesen werden (NÜRNBERGER et al., 1990; LÖFFLER et al., 1992). Die Primärsequenzen der RNasen LE und LX sind bekannt (JOST et al., 1991; LÖFFLER et al., 1993). Sie stehen in Übereinstimmung mit den durch Screening einer cDNA-Expressionsbank aus mRNA Pi-verarmter Tomatenzellen isolierten cDNA-Sequenzen beider RNasen (KÖCK et al., 1995).

Southernblot-Analysen von genomischer DNA aus der Zellkultur lassen darauf schließen, daß im Tomaten-Genom für die RNasen LE und LX jeweils nur ein Gen existiert (Abb. 8). Dadurch wird die aufgrund von Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen sowie in den proteinchemischen und enzymatischen Eigenschaften aufgestellte Hypothese untermauert, daß es sich bei den beiden vakuolären RNase-Isoformen LV1 und LV2 um posttranslationale Prozessierungsprodukte der RNase LX und im Falle der RNasen LE und LV3 um zwar unterschiedlich lokalisierte, aber identische Proteine handelt (LÖFFLER, 1993; KÖCK et al., 1995). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten durch das Screenen von cDNA-Banken, auch unter weniger stringenten Bedingungen, keine zusätzlichen Gene isoliert werden (KÖCK et al., 1995; LERS et al., 1998). Hervorzuheben ist die hohe Ähnlichkeit innerhalb des von den cDNA-Sonden der RNasen LE und LX detektierten Bandenmusters, das sich nur in der mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RV und *Bam*HI gespaltenen genomischen Tomaten-DNA unterscheidet (Abb. 8). Die aufgrund dieser hohen Übereinstimmung aufgestellte Hypothese, daß es sich bei den beiden RNasen um eine geclusterte Genfamilie handeln könnte, für die nur ein Genlocus existiert, wurde durch die von Dr. M. Ganal (IPK Gatersleben) durchgeführte chromosomale Lokalisierung der beiden RNase-Gene bestätigt, da beide RNasen auf dem Chromosom 5 zwischen den beiden Markern TG432 und CT167 kartieren und eine perfekte Kosegregation zeigen.

Expressionsanalyse der RNase-Gene

Mittels Northern-Hybridisierungen wurde gezeigt, daß der beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase der Zellkultur (Abb. 3) bzw. bei der Kultivierung der Zellen in Pi-freier Nährlösung (Abb. 4) beobachtete extra- und intrazelluläre RNase-Aktivitätsanstieg mit einer starken Zunahme des mRNA-Levels der RNasen LE und LX korreliert. Für das Transkript der RNase LE konnte bereits 2 h nach dem Umsetzen der Zellen von +Pi- auf -Pi-Medium ein Anstieg des mRNA-Gehaltes detektiert werden, der sich während der nächsten 24 h kontinuierlich fortsetzt, während das Transkript der RNase LX erst nach 5 h Pi-Mangel nachweisbar ist (Abb. 4A). Damit konnten die Untersuchungen von KÖCK et al. (1995) prinzipiell bestätigt werden, wobei die Wahl von kürzeren Zeitabständen bei der Probennahme eine deutliche Vorverlegung des frühestmöglichen Zeitpunktes der Detektion der Induktion der RNase-Transkripte erlaubt. Die Akkumulation der beiden Transkripte wird durch die Zufuhr von Phosphat zu Zellen, die vorher 24 h in Pi-freiem Medium kultiviert wurden, gestoppt. Die Northernsignale verschwinden und sind nach 5 h (RNase LE) bzw. 2 h (RNase LX) nicht mehr detektierbar (Abb. 4B). Demgegenüber können in Pi-versorgten Zellen die Transkripte der RNasen nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen werden (Abb. 3B und 4A). Daraus folgt, daß ein hoch reguliertes Signalübertragungssystem existieren muß. Der Einfluß des intrazellulären Pi-Pools auf die Induktion der RNasen wurde durch die Zugabe bestimmter Zucker (2-Deoxy-D-Glukose; D-Mannose; D-Galaktose; Glycerol) zum Medium der Zellkultur untersucht. Diese Metabolite werden nach der Aufnahme in die Zelle im Cytoplasma phosphoryliert, was trotz normaler extrazellulärer Pi-Versorgung zu einem kurzzeitigen Absinken des cytosolischen Pi-Pools führt (LOUG-HMAN et al., 1989; JANG und SHEEN, 1994). Für beide Transkripte konnte eine transiente Induktion nach Zugabe der phosphorylierbaren Metabolite nachgewiesen werden (Abb. 5). Für die RNase LX wurde in den meisten Fällen der höchste mRNA-Level nach 2 h detektiert. Während der folgenden Inkubation verringerte sich das Signal bis unter die Nachweisgrenze. Das Expressionsmuster der RNase LE ist durch einen moderaten, aber ebenfalls transienten Induktionsprozeß charakterisiert. Der transiente Charakter des Induktionsprozesses kann auf die Pi-Aufnahme aus dem Medium zurückgeführt werden. Die Induktion der RNase-Transkripte nach Zugabe der phosphorylierbaren Metabolite läßt vermuten, daß sich innerhalb der Zelle ein Pi-Sensor befindet, der die Veränderungen in der Transkription auslöst und das System blockiert, das normalerweise die Transkription dieser Gene unter +Pi-Bedingungen reprimiert (KÖCK et al., 1998).

In letzter Zeit wurden in der Literatur weitere durch Pi-Mangel induzierbare Klone beschrieben, deren Expressionsmuster mit dem der RNasen LE und LX vergleichbar sind, deren Funktionen während des Pi-Mangels jedoch bisher unbekannt sind. Dazu zählen eine β -Glucosidase aus *Brassica nigra* (MALBOOBI und LEFEBVRE, 1995) bzw. *Arabidopsis thaliana* (MALBOOBI und LEFEBVRE, 1997), das Gen TPSI1 aus Tomate (LIU et al., 1997) sowie vier cDNA-Klone aus *Nicotiana tabacum* (EZAKI et al., 1995). In unserer Arbeitsgruppe wurden zwei weitere cDNA-Klone isoliert, deren Expressionsmuster bei Pi-Mangel in der Tomatenzellkultur vergleichbar mit dem der RNasen ist. Neben einem bisher unbekannten Protein (Klon PSI14, vgl. Kap. 5.2.) konnte der zweite cDNA-Klon als vermutlich cytosolisches Cyclophilin identifiziert werden (ZIETHE, unveröffentlicht).

Unter normalen Wachstumsbedingungen sind die Transkripte der RNasen LE und LX vor allem in den Blüten detektierbar, während in Wurzeln und Blättern die mRNA's nicht oder nur schwach nachweisbar sind. Dabei ist der mRNA-Level der RNase LX deutlich höher als der Level der RNase LE (Abb. 6). Unter Pi-Mangelbedingungen jedoch werden beide RNasen auch in Wurzeln exprimiert (BOSSE, persönliche Mitteilung). Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch für zwei Pi-induzierbare RNasen aus *Nicotiana alata* (RNase NE; DODDS et al., 1996a) bzw. *Arabidopsis thaliana* (RNS1; BARIOLA et al., 1994) gefunden. Beide RNasen werden unter normalen Wachstumsbedingungen in Blüten exprimiert und ihre Expression wird in Wurzeln von in Pi-freier Nährlösung angezogenen Keimlingen induziert.

Die Induktion der RNasen durch Pi-Mangel weist sie als potentielle Komponenten eines Pi-Mangel-Rettungssystems in Pflanzen aus (vgl. Kap.1). RNA ist die in pflanzlichen Zellen am meisten vorhandene Form organisch gebundenen Phosphats, besitzt aber eine vergleichsweise niedrige turnover-Rate (BIELESKI und FERGUSON, 1983). Ein Ansteigen der turnover-Rate des zellulären RNA-Pools durch die Induktion intrazellulärer RNasen könnte entscheidend zur Erhöhung der Pi-Verfügbarkeit in Pflanzen bei Pi-Mangel beitragen. Sekretierte RNasen könnten extrazelluläre RNA-Moleküle abbauen, wobei die entstehenden Nukleotide als Quelle für Pi dienen.

Auf der Suche nach seneszenzinduzierten Proteinen in Tomaten fanden LERS et al. (1998) ebenfalls die RNasen LX und LE und klonierten beide. Dabei ist die durch Seneszenz ausgelöste Induktion der extrazellulären RNase LE jedoch deutlich geringer, verglichen mit ihrer Induzierbarkeit durch Pi-Mangel oder der durch Seneszenz ausgelösten Induktion der intrazellulären RNase LX. Demgegenüber erfolgt die Induktion der RNase LE durch Pi-Mangel zeitlich eher als die der RNase LX (Abb. 4A). Eine ähnliche Differenz zwischen den durch Pi-Mangel und Seneszenz ausgelösten Effekten wurde für zwei aus Arabidopsis tha*liana* isolierte RNasen beschrieben, die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu den Tomaten-RNasen aufweisen (TAYLOR et al., 1993; BARIOLA et al., 1994). Die vermutlich in Analogie zur RNase LX intrazellulär lokalisierte RNase RNS2 wird durch Seneszenz stärker induziert als durch Pi-Mangel. Demgegenüber wird die vermutlich extrazellulär lokalisierte RNase RNSI durch Seneszenz nur schwach induziert, während ihr Transkriptlevel unter Pi-Mangelbedingungen stark ansteigt (BARIOLA et al., 1994). Diese Ähnlichkeiten zwischen Tomate und Arabidopsis lassen vermuten, daß die Benutzung desselben RNase-Enzymsystems zum Recycling von Phosphat aus Ribonukleinsäuren sowohl bei Pi-Mangel als auch bei Seneszenz bei Pflanzen weit verbreitet ist. Der Befund, daß die beiden RNasen LE und LX durch Pi-Mangel ähnlich induziert, aber während der Seneszenz differentiell exprimiert werden, weist darauf hin, daß beide Stimuli zumindest teilweise durch unterschiedliche Signaltransduktionswege reguliert werden (LERS et al., 1998). Die Beteiligung der RNase LX an Seneszenzprozessen in Pflanzen wird durch den Befund unterstützt, daß die Akkumulation ihrer mRNA in grünen Blättern durch Begasung mit Ethylen induziert werden kann, das als Regulator von Prozessen der Blattseneszenz bekannt ist. Die Expression des RNase-LE-Genes wird durch Ethylen nicht induziert. Demgegenüber scheint Abscisinsäure die Expression der RNase LE zu steigern, während dieses Hormon keinen Einfluß auf die Expression der RNase LX zeigt (LERS et al., 1998).

Neben ihrer Rolle in der Pi-Remobilisierung bei Pi-Mangel und Seneszenz sind die RNasen LE und LX an einer Reihe weiterer Prozesse in der Tomatenpflanze beteiligt.

Verwundung von grünen Blättern führt zu einer transienten Induktion der RNase LE, wobei die Transkript-Akkumulation nach 6 h ihr Maximum erreicht hat (Abb. 7A). Ein ähnliches Expressionsverhalten wurde für die RNase ZRNase II aus *Zinnia elegans* beschrieben, einem Enzym, das strukturelle Ähnlichkeiten zur RNase LE besitzt. Die mRNA dieser RNase ist in unbehandelten Blättern nicht nachweisbar, während sie 3 h nach mechanischer Verwundung bereits stark induziert ist und diese Akkumulation nach 6 h ihr Maximum erreicht (YE und DROSTE, 1996). Im Gegensatz zur RNase LE führt Verwundung zu keiner Induktion der RNase LX (Abb.7A). Dieser Befund wurde durch Arbeiten von LERS et al. (1998) bestätigt.

Beide RNase-Transkripte akkumulieren nach der Infiltration von Tomatenblättern mit verschiedenen *Xanthomonas*-Stämmen (Abb. 7). Der Befund, daß der Transkriptlevel beider RNasen, insbesondere die mRNA der RNase LE, nach der Infektion der Tomatenblätter mit der *hrp*-Mutante früher und stärker ansteigt, führt zu der Vermutung, daß beide RNasen an den allgemeinen unspezifischen Abwehrreaktionen der Pflanzen auf Bakterienbefall beteiligt sein könnten. Die verzögerte Induktion der RNase-Transkripte nach der Infektion mit dem virulenten Wildtyp-Stamm X.c.v. 75-3 unterstützt die Hypothese, daß kompatible bakterielle Pathogene Mechanismen entwickelt haben, um die pflanzlichen Abwehrreaktionen zu unterdrücken (JAKOBEK et al., 1993; BROWN et al., 1995).

Bei der Untersuchung der Mechanismen, die an der Ausprägung der SAR ("systemic aquired resistence"; Fähigkeit von Pflanzen, nach einer lokalen Infektion mit einem Pathogen gegen ein großes Spektrum von Pathogenen resistent zu werden) in Nicotiana tabacum beteiligt sind, fanden GALIANA et al. (1997) die von DODDS et al. (1996a) charakterisierte Pi-Mangel induzierbare RNase NE. Ähnlich, wie bei der RNase LE, führt Verwundung zur Induktion der Expression des RNase NE-Genes, während die Akkumulation der RNase NE-mRNA nach der Infektion mit Zoosporen des Phatogens Phytophthora parasitica var. nicotianae (Ppn) deutlich gesteigert wird. Die Induktion der Gene der RNasen LE und LX aus Tomate sowie der RNase NE aus Tabak sowohl nach Pathogen-Infektion als auch durch Pi-Mangel weisen darauf hin, daß es innerhalb beider Signaltransduktionsketten gemeinsame Glieder geben könnte. Die Induktion der Expression des RNase NE-Genes korreliert mit einem schnellen Anstieg der RNase-Aktivität und der Akkumulation von mindestens zwei RNasen im apoplasmatischen Raum der Tabakzellen. Es konnte gezeigt werden, daß ein Anstieg der RNase-Aktivität im Extrazellular-Raum ausreichend ist, um die Entwicklung von Ppn oder des Tabak-Mosaik-Viruses in Tabakblättern zu verhindern (GA-LIANA et al., 1997). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß extrazelluläre pflanzliche RNasen in die Abwehr von Pathogen-Infektionen involviert sind, wobei die beteiligten Mechanismen noch nicht aufgeklärt sind. Für die S-RNasen, die für die Selbstinkompatibilität der Gamethophyten bei den Solanaceen verantwortlich sind, wurde gezeigt, daß sie das Wachstum inkompatibler Pollenschläuche durch die Hydrolyse der Pollen-rRNA verhindern (HUANG et al., 1994; KAO und McCUBBIN, 1997). Eine Hypothese geht davon aus, daß die an der Ausbildung der SAR beteiligten RNasen das Wachstum von Pathogenen durch einen ähnlichen Mechanismus inhibieren könnten. Im Gegensatz zu den S-RNasen müßten diese RNasen jedoch eine geringe Spezifität aufweisen, da die SAR gegenüber einem breiten Spektrum von Pathogenen wirksam ist (GALIANA et al., 1997).

Bei der Untersuchung des Einflusses von Pi-Mangel auf die Entwicklung von Tomatenkeimlingen wurde neben einem starken Anstieg der RNase-Aktivitäten in den Pi-frei angezogenen Keimlingen ab dem 10. Kulturtag als Antwort auf den Pi-Mangel eine von der Pi-Versorgung der Keimlinge unabhängige Induktion der RNasen während der ersten Keimungstage nachgewiesen, wobei die Enzymaktivitäten am 4. Kulturtag ihr Maximum erreichten (BOSSE und KÖCK, 1998).

In Tab. 12 wurden die Induktionsbedingungen der RNasen LE und LX zusammengefaßt und mit denen anderer bekannter pflanzlicher S-ähnlicher RNasen verglichen, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den Tomaten-RNasen aufweisen.

	RNase	RNase NE	RNS1	ZRNaseII	RNase	RNS2	ZRNaseI
	LE				LX		
Pi-Mangel	+++ ^a	+++ ^c	+++ ^d	e	+++ ^a	$++^{d}$	e
Seneszenz	+ ^b	c	$+^{d}$	e	+++ ^b	$+++^{d}$	e
Verwundung	++	$++^{f}$		+++ ^e	-		e
Pathogenbefall	+++	$+++^{f}$			++		
Xylogenese				e			+++ ^e
Keimung	$++^{a}$				+++ ^a		
Ethylen	b				+++		
Abscisinsäure	+ ^b				b		
Jasmonsäure	b				b		
Gibberelinsäure	b				b		
Kinetin	b				b		

Tab. 12: Vergleich der Induktionsbedingungen der Tomaten-RNasen LE und LX mit denen anderer S-ähnlicher RNasen in Pflanzen.

Die Symbole bedeuten:	+++	stark induziert		nicht induziert
	++	induziert	leer	nicht untersucht
	+	schwach induziert		
Daten wurden entnomm	en aus:			
a- KÖCK et al. 1995; H	BOSSE	und KÖCK, 1998	d- BAI	RIOLA et al., 1994
b- LERS et al., 1998			e- YE	und DROSTE, 1996
c- DODDS et al., 1996	a		f- GAI	JANA et al., 1997

Zusammenfassend kann aus den dargestellten Ergebnissen geschlußfolgert werden, daß

- 1. die RNasen LE und LX neben Pi-Mangel durch weitere Umweltfaktoren induziert werden
- 2. beide RNase-Gene dadurch in mehrere, zum Teil verschiedene Signaltransduktionsketten involviert sind, und
- die RNasen funktionell an Abwehr- (Induktion nach Verwundung bzw. Pathogenbefall) sowie an Abbau- und Verwertungsprozessen (Remobilisierung von Phosphat bei Pi-Mangel bzw. während der Seneszenz) beteiligt sein könnten.

Isolierung und Charakterisierung von genomischen Klonen der RNasen LE und LX

Pi-Mangel führt zu einer schnellen Akkumulation der mRNA der RNasen LE und LX während die Zufuhr von Phosphat die Transkript-Akkumulation stoppt und zum Verschwinden der Signale führt (s.o.). Durch die Zugabe von Cycloheximid (Translationshemmer) oder Actinomycin D (Transkriptionshemmer) zur Zellkultur 1 h vor dem Transfer von +Pi- in -Pi-Medium wird die Zunahme sowohl der extrazellulären als auch der intrazellulären RNase-Aktivitäten verhindert, während die Zugabe dieser Substanzen zu einer -Pi-Kultur zum Abbruch der Induktion der RNasen führt (NÜRNBERGER, 1991; LÖFFLER, 1993). Dies führt zu der Vermutung, daß die Zunahme der Transkriptmengen auf eine transkriptionskontrollierte Aktivierung der Gene zurückzuführen sein könnte. Deshalb ist die Charakterisierung von genomischen Sequenzen und insbesondere die Analyse der Promotoren eine wichtige Voraussetzung für zukünftige Untersuchungen über die Pi-Mangel-Signaltransduktion in Tomatenpflanzen.

Mittels Plaque-Screening konnten aus einer EMBL3-Phagenbank (Lycopersicon esculentum cv. VFNT Cherry) 4 Phagen-Klone, die mit der cDNA der RNase LE hybridisieren, isoliert werden. Zur Isolation der RNase-Klone wurde eine kombinierte PCR/Plaque-Screening-Methode nach AMARAVADI und KING (1994) benutzt. Der Vorteil der Methode gegenüber dem konventionellen Plaque-Screening besteht in der Amplifikation der Signale (Anzucht der Phagenlysate, PCR), so daß auch mRNA's mit einer geringeren Abundanz nachgewiesen werden können. Ein Nachteil besteht darin, daß bei der Amplifizierung von Genbanken sich nicht alle Klone gleichmäßig vermehren und damit auch bestimmte Sequenzen verloren gehen können. Dies ist eine Erklärungsmöglichkeit für das bei der Analyse der Phagenlysate nach Klonen der RNase LX beobachtete reproduzierbare Auftreten einer schwachen Bande der richtigen Größe in einem Lysat, die auch mit der cDNA der RNase LX hybridisierte, und dem Befund, daß mittels Plaque-Hybridisierung im betreffenden Phagengemisch keine positiven Hybridisierungssignale nachgewiesen werden konnten (vgl. Kap. 4.2.2.). Deshalb wurden noch einmal ca. 2×10^6 pfu der genomischen Tomaten-DNA-Bank mittels Plaque-Hybridisierung nach Klonen der RNase LX gescreent, wobei jedoch ebenfalls keine positiven Hybridisierungssignale nachgewiesen werden konnten.

Im folgenden sollen noch einige methodische Aspekte zum Screening von Phagenbanken diskutiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, mit der sich ein bestimmtes Gen in einer DNA-Bank durch Screening wiederfinden läßt, ist abhängig von der Größe der insertierten DNA-Fragmente und der Genomgröße des zu untersuchenden Organismus. Die Anzahl der Klone einer DNA-Bank N, die gescreent werden muß, um mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit P einen positiven Klon zu isolieren, kann nach der Formel: N = ln (1-P) / ln (1-f) berechnet werden, wobei f der Quotient aus der Länge der in einen Phagen insertierten Fremd-DNA und der Gesamtgröße des zu untersuchenden Genoms ist (CLARK und CARBON, 1976). Das haploide Tomatengenom hat eine Größe von ca. 9,5 x 10^5 kbp (ARUMU-GANATHAN et al., 1991). Daraus folgt, daß bei einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 20 kbp im Vektor und einer Wahrscheinlichkeit von 99 % ca. 2,2 x 10^5 Phagen-Klone untersucht werden müssen, um einen positiven Klon zu finden. In beiden Screening-Runden wurden insgesamt ca. 2,4 x 10^6 pfu der genomischen Bank nach Klonen der RNase LX untersucht und die oben genannte Zahl damit verzehnfacht. Mögliche Gründe für das Nichtauffinden von genomischen Klonen in einer Bank können unter anderem sein:

- Bei den durch die partielle Hydrolyse der genomischen DNA entstehenden Fragmenten, die dann in einen geeigneten Vektor kloniert werden, handelt es sich um ein statistisches Gemisch, so daß ein bestimmter DNA-Abschnitt über- oder unterrepräsentiert sein oder sogar völlig fehlen kann.
- 2. Die Wiederfindungsrate von single copy Genen in einer Genbank ist erschwert.
- 3. Bei der Amplifizierung von Genbanken können bestimmte Sequenzen verlorengehen.

Mittels Restriktionsanalysen wurde die Identität der vier gereinigten RNase LE-Klone (bezeichnet als λ gLE-01) nachgewiesen.

Die Genstruktur (Exon/Intron-Struktur) der RNasen LE und LX und Vergleich mit anderen pflanzlichen RNasen

Erste Hinweise auf die genomische Struktur der RNase LE wurden durch die Untersuchung eines PCR-Klons gewonnen, der die kodierende Sequenz weitgehend umfaßt. Unter Verwendung von aus der cDNA-Sequenz (KÖCK et al., 1995) abgeleiteten Primern und genomischer Tomaten-DNA wurde ein 1323 bp langes Fragment amplifiziert, in das Plasmid pCR Script SK⁺ subkloniert und sequenziert. Es umfaßt die vollständige Nukleotid-Sequenz der RNase LE vom Translationsstartkodon ATG bis zum Nukleotid 610 und enthält zwei Introns. Das erste Intron beginnt nach Aminosäure 12 des reifen Proteins und ist 129 Nukleotide lang, während das zweite Intron nach Aminosäure 64 des reifen Proteins beginnt und 603 Nukleotide lang ist (STENZEl, 1993).

Der Klon λ gLE-01 enthält ein genomisches Insert mit einer Größe von 12,5 kbp, das mit der cDNA der RNase LE hybridisiert. Mittels Restriktionsanalysen und Southern-Hybridisierungen konnte eine Restriktionskarte erstellt und die Lage der für die RNase LE kodierenden Sequenzen innerhalb des Fragmentes bestimmt werden (Abb. 10 und 11). Das ca. 3,1 kbp große SacI/XbaI-Fragment, welches das 5'-Ende des Gens enthält, wurde in den Vektor pCR Script Cam SK⁺ kloniert (Klon pgLE 5'). Das 3'-Ende des RNase-Genes wurde als XbaI/SalI-Fragment in den Vektor pBluescript SK⁻ ligiert (Klon pgLE 3'; vgl. Abb. 11). Das Insert des Klons pgLE 5' sowie die für die RNase LE kodierenden Sequenzen des Klons pgLE 3' wurden mittels Primer-Walking doppelsträngig sequenziert. Der Klon pgLE 5' enthält die kodierende Sequenz der RNase LE bis zur Aminosäure 64 des reifen Proteins sowie das erste Intron und 2668 bp 5'-upstream des Translationsstartkodons ATG gelegene Sequenz (vgl. Anhang 1 und Abb. 12). Der Klon pgLE 3' beinhaltet 1019 bp kodierende Sequenz der RNase LE (Aminosäure 65 bis 205 des reifen Proteins sowie das zweite Intron), 157 bp 3'-nichttranslatierte Sequenz und ca. 1600 bp sich daran anschließende genomische Tomaten-DNA-Sequenz (vgl. Anhang 1 und Abb. 13). Durch die Sequenzierung wurde die Nukleotid-Sequenz der cDNA der RNase LE (KÖCK et al., 1995) sowie die Sequenz des genomischen PCR-Produktes (STENZEL, 1993) bestätigt. Im von dem genomischen PCR-Fragment nicht abgedeckten Bereich der genomischen Sequenz der RNase LE konnten keine weiteren Introns identifiziert werden.

Für die RNase LX konnte bisher kein genomischer Klon aus einer Phagenbank isoliert werden. Hinweise auf die genomische Struktur lieferte die Analyse eines genomischen PCR-Fragmentes, das unter Verwendung von aus der cDNA-Sequenz (KÖCK et al., 1995) abgeleiteten Primern und genomischer Tomaten-DNA amplifiziert und anschließend subkloniert und sequenziert wurde (SCHUMANN, 1995). Durch die Sequenzanalyse wurde die cDNA-Sequenz (KÖCK et al., 1995) bis zur Aminosäure 209 des reifen Proteins bestätigt. Die Sequenz wird von drei Introns unterschiedlicher Größe unterbrochen. Intron 1 beginnt nach Aminosäure 12 des nativen Proteins und ist 279 bp lang. Intron 2 folgt nach Aminosäure 64 des nativen Proteins und besitzt eine Länge von 1451 bp, während das dritte Intron die kodierende Sequenz nach der 1. Base des Triplett's von Aminosäure 129 unterbricht und eine Länge von 318 bp besitzt (SCHUMANN, 1995). Die Intronsequenzen der RNasen LX sind um mehr als 50 % länger als die entsprechenden Sequenzen der RNase LE. Zwischen ihnen konnten keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten nachgewiesen werden.

Bemerkenswert nach einem Vergleich der genomischen Strukturen der RNasen LE und LX ist, daß die ersten beiden Introns die kodierenden Sequenzen jeweils an identischen Positionen des reifen Proteins unterbrechen (Aminosäure 12 bzw. 64). Das dritte Intron der RNase LX hat keine Entsprechung in der genomischen Sequenz der RNase LE. Dieser Befund spricht für die enge phylogenetische Verwandtschaft der beiden RNase-Gene. Weitere Argumente zur Bestätigung der Hypothese eines gemeinsamen Vorläufergenes mit drei Introns, das im Verlauf der Evolution dupliziert wurde und aus dem sich durch Mutationsereignisse die beiden RNase-Gene entwickelten, wobei im Falle der RNase LE ein Intron verloren ging, sind :

- Die hohe Homologie zwischen den Aminosäure- und cDNA-Sequenzen. 60 % der Aminosäuren sind identisch und befinden sich an identischen Positionen (LÖFFLER, 1993).
 Die Identität zwischen den cDNA-Sequenzen beträgt 62 % (KÖCK et al., 1995).
- 2. Die hohe Übereinstimmung des in Southernblots mit genomischer Tomaten-DNA detektierten Bandenmusters (Abb. 8).
- Beide RNase-Gene wurden auf dem Tomatenchromosom 5 lokalisiert und zeigen eine perfekte Kosegregation.

Die RNase LE besitzt auf Aminosäureebene die höchsten Homologien zur RNase NE aus Nicotiana alata (DODDS et al., 1996a) sowie zur ZRNase II aus Zinnia elegans (YE und DROSTE, 1996) und zur RNase RNS1 aus Arabidopsis thaliana (BARIOLA et al., 1994), während die RNase LX am engsten mit der ZRNase I aus Zinnia elegans (YE und DRO-STE, 1996) verwandt ist, da beide, verglichen mit den anderen S-ähnlichen RNasen, einen um 9 bp verlängerten C-Terminus aufweisen. Informationen über die Genstruktur liegen nur für die RNase NE vor. Mittels Analyse von genomischen PCR-Fragmenten wurde nachgewiesen, daß die kodierende Sequenz durch ein Intron nach Nukleotid 298 der cDNA-Sequenz unterbrochen wird (DODDS et al., 1996a). Unter der Annahme, daß die Nterminale Signalsequenz der RNase NE ähnlich wie die der RNase LE abgespalten wird, entspricht diese Position der Aminosäure 64 des nativen Proteins und ist damit identisch mit der Position des 2. Introns in der genomischen Sequenz der RNasen LE und LX. Leider wurde von den Autoren speziell nur diese Intron-Position untersucht, da sie bei den S-RNasen konserviert ist (s. u.), so daß keine Informationen zu eventuellen Introns an den beiden anderen in der genomischen Sequenz der RNasen LE bzw. LX gefundenen Intron-Positionen vorliegen.

Im folgenden sollen noch einige interessante Gesichtspunkte hinsichtlich der evolutionären Entwicklung der RNase-Gene diskutiert werden. Aufgrund von Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen können die pflanzlichen RNasen in die Gruppe der S-ähnlichen RNasen und die Gruppe der S-Glycoproteine (S-RNasen) unterteilt werden (vgl. Kap. 1). Diese beiden Gruppen bilden gemeinsam mit den pilzlichen RNasen der T₂-Familie die Superfamilie der T_2 /S-RNasen (Übersicht in GREEN, 1994). Die S-Glycoproteine sind für die Selbstinkompatibilität der Gametophyten bei den Solanaceen verantwortlich, einem weitverbreiteten, genetisch determinierten Mechanismus zur Verhinderung der Selbstbefruchtung (Übersicht in: CLARKE und NEWBIGIN, 1993). Von einigen S-Glycoproteinen sind inzwischen genomische Strukturen bekannt. Dazu zählen Sequenzen aus Lycopersicon peruvianum (TSAI et al., 1992; CHUNG et al., 1995), Petunia inflata (COLEMAN und KAO, 1992), Solanum tuberosum (KAUFMANN et al, 1991), Solanum chacoense Bit. (SABA-EL-LEIL et al., 1994), Nicotiana alata (McCLURE et al., 1993; MATTON et al, 1995) und Malus x domestica (BROOTHAERTS et al., 1995). Ihnen allen gemeinsam ist es, daß die kodierende Sequenz durch ein Intron unterbrochen wird, dessen Position in allen S-RNase-Genen konserviert ist. Diese Position ist äquivalent zu der Position des zweiten Introns der RNasen LE und LX bzw. der des Introns der RNase NE (DODDS et al, 1996a). Diese Konservierung einer Intron-Position zwischen den Genen der S-ähnlichen RNasen LE, LX und NE einerseits und den S-RNase-Genen andererseits innerhalb der Familie der Solanaceen läßt vermuten, daß beide RNase-Gruppen ein gemeinsames Vorläufergen besitzen, das ebenfalls an dieser Position ein Intron besaß. Weitere Befunde, die diese Hypothese unterstützen, sind:

- 1. Die Identität der RNasen LE und LX und der S-RNasen beträgt auf Aminosäureebene ca. 30 % (JOST et al., 1991; LÖFFLER et al., 1993).
- Mittels Southern-Hybridisierung wurde gezeigt, daß die Gene der RNasen LE und LX sowohl in den selbstkompatiblen als auch in den selbstinkompatiblen *Lycopersicon*-Arten vorhanden sind (Abb. 9).
- 3. Die Expression von gut charakterisierten S-ähnlichen RNasen wurde auch in den selbstinkompatiblen Arten *Nicotiana alata* (RNase NE; DODDS et al., 1996a) und *Petunia inflata* (RNase X2; LEE et al., 1992) nachgewiesen, die daneben auch eine große Allel-Vielfalt an S-RNasen aufweisen. Die kodierende Region des RNase X2-Genes enthält ebenfalls ein einzelnes Intron, das sich an der gleichen Position wie bei den S-RNase-Genen befindet.
- 4. Das gleichzeitige Vorhandensein von S-ähnlichen RNasen und S-RNasen wurde auch bei zwei selbstinkompatiblen Vertretern aus der Familie der Rosaceaen nachgewiesen. Aus einer cDNA-Bank, die aus mRNA, isoliert aus dem Griffel von Blütenknospen von *Pyprus pyrifolia* Nakai, hergestellt wurde, konnten sowohl zwei für S-RNasen kodierende cDNA-Klone als auch ein cDNA-Klon isoliert werden, der für eine S-ähnliche RNase (non-S-RNase) kodiert (NORIOKA et al., 1996). Mittels PCR wurden aus genomischer

Apfel-DNA (*Malus x domestica*) vier DNA-Fragmente isoliert, von denen 3 für S-RNasen und das vierte für eine S-ähnliche RNase kodieren. In allen vier Fragmenten wurde die Existenz eines Introns nachgewiesen, dessen Position äquivalent zu der in den S-RNasen und S-ähnlichen RNasen aus der Familie der *Solanaceen* nachgewiesenen Intron-Position ist (BROOTHAERTS et al., 1995; JANSSENS et al., 1995).

- 5. Durch Aminosäure-Sequenzvergleiche wurde festgestellt, daß die Sequenzhomologien
- zwischen S-RNasen aus verschiedenen Arten der *Solanaceen* teilweise höher sind als innerhalb einer Art. Dieses Fehlen einer Übereinstimmung zwischen den aus Sequenzhomologien resultierenden Verwandtschaftsbeziehungen und den taxonomischen Verwandtschaftsverhältnissen führt zu der Vermutung, daß die S-RNase-Allele sehr alt sind und schon vor der Divergenz der Arten der *Solanaceen* existierten (IOERGER et al., 1990).
- 6. Während das Vorkommen der S-RNasen auf bestimmte dikotyle Pflanzenarten beschränkt ist, wurden inzwischen weitere S-ähnliche RNasen auch in monokotylen Pflanzen (Gerste) sowie in anderen Organismenklassen (Bakterien, Vieren, Molusken, Insekten, Säugetiere) identifiziert. Die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse der RNasen der T₂/S-Superfamilie können anhand der prozentualen Identität der Aminosäuresequenzen abgeschätzt und in einem phylogenetischen Stammbaum dargestellt werden. Dabei repräsentieren die prokaryotischen, pilzlichen, tierischen und pflanzlichen RNasen dieser Familie jeweils eigenständige Gruppen und innerhalb der pflanzlichen RNasen grenzen sich die S-RNasen von den S-ähnlichen RNasen ab. (vgl. Abb. 1; LÖFFLER, 1993; DODDS et al., 1996a).

Eine interessante Hypothese geht davon aus, daß sich die S-RNasen durch die Spezialisierung einer in den Blüten vorhandenen Ur-RNase auf die Funktion zur Verhinderung von Selbstbefruchtung (Erkennung und Beseitigung von eigenem Pollen) entwickelten, die ursprünglich eine andere Funktion z. B. bei der Pathogenabwehr hatte, während bei den Sähnlichen RNasen eine solche Spezialisierung ausblieb (CLARKE und NEWBIGIN, 1993; KAO und HUANG, 1994; DODDS et al., 1996a, b). Neben den oben aufgeführten Argumenten wird diese Hypothese durch die Beobachtung gestützt, daß in Tomatenpflanzen unter normalen Wachstumsbedingungen mittels Northern-Hybridisierung die Transkripte der RNasen LE und LX vor allem in den Blüten detektierbar sind (Abb. 6), wobei der genaue Expressionsort noch identifiziert werden muß. Für die RNase NE aus Tabak und die RNase X2 aus *Petunia inflata* wurde ein ähnliches Expressionsmuster nachgewiesen (DODDS et al., 1996a; LEE et al., 1992).

Der Promotor der RNase LE

Der 5'-upstream des Translationsstartpunktes der RNase LE gelegene Sequenzbereich des Klones pgLE5' umfaßt 2668 bp, die mittels *Primer-Walking* vollständig doppelsträngig sequenziert wurden. Die Sequenz um den Translationsstartpunkt der RNase LE (AAAAAA<u>ATG</u>GCT) stimmt bis auf zwei Nukleotide mit der für pflanzliche Gene ermittelten Konsensus-Sequenz (TAAACA<u>ATG</u>GCT) überein (JOSHI, 1987; LÜTCKE et al., 1987).

Mit Hilfe der 5'-RACE-Methode (vgl. Kap. 3.8.1.) wurden 2 Transkriptionsstartpunkte identifiziert, die sich in der Menge ihrer entsprechenden mRNA's deutlich unterscheiden. Der Haupttranskriptionsstartpunkt (Position +1) befindet sich 47 bp vor dem Translationsstartkodon ATG, während der zweite Startpunkt bei Position -102 identifiziert wurde (Abb. 14 und 15). Zwischen beiden Transkriptionsstartpunkten befindet sich kein Translationsstartkodon. 28 bp upstream des Haupttranskriptionsstartpunktes (Startpunkt I) liegt das Zentrum einer TATA-Box, deren Sequenz mit der TATA-Box-Konsensussequenz (TA-TA(A/T)A(A/T); ROEDER, 1996) übereinstimmt. Die Nukleotide CA, die an den Positionen -1 und +1 identifiziert wurden, entsprechen der typischen Transkriptionsstartpunkt-Sequenz eukaryotischer Gene, die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden.

Das Transkript des Startpunktes II ist nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der 5'endmarkierten RACE-Produkte nicht nachweisbar (Abb. 14A). Es wurde erst nach der Sequenzierung zweier unabhängiger Klone der in den TA-Cloning-Vektor subklonierten 5'-RACE-Fragmente identifiziert. Dies weist auf eine sehr geringe mRNA-Menge im Vergleich zu der von Startpunkt I transkribierten mRNA hin. Durch Computeranalysen (Analyse der Sequenz mit dem Programm PC/GENE; Suche in Datenbanken für Transkriptionsfaktorbindestellen (siehe unten) konnte upstream dieses Startpunktes keine TATA-Box-Sequenz identifiziert werden. 27 bp upstream befindet sich jedoch die Sequenz 5'-TAATAAT-3', die Ähnlichkeiten mit der Konsensus-TATA-Box-Sequenz (ROEDER, 1996) besitzt (Umkehr der Basenfolge an den Positionen 3 und 4; aus TA wurde AT).

3') lange Sequenzabschnitte, welche die Ausbildung von Stem-Loop-Strukturen ermöglichen und die möglicherweise an der Regulation der Transkription des RNase-Genes beteiligt sind. Außerdem enthält die 5'-untranslatierte Region bei Position -86 bis -72 eine 14 bp lange symmetrische Sequenz (AATTTCACACTTTAA).

Die Promotoren eukaryotischer Gene enthalten neben der TATA-Box, die für den korrekten Start und eine effiziente Transkription des Gens durch die RNA-Polymerase II benötigt wird, weitere spezifische Sequenzelemente (cis-Elemente), welche die Transkription gewebespezifischer oder induzierbarer Gene als Antwort auf Umweltbedingungen, extrazelluläre Stimuli sowie entwicklungsabhängige Signale regulieren. Dabei erfolgt die Transkriptionsregulation durch die spezifische Interaktion von DNA-bindenden Proteinen (Transfaktoren) mit den genspezifischen DNA-Elementen (cis-Elemente) und die anschließende Interaktion des an die DNA gebundenen Proteins mit dem Transkriptionsinitiationskomplex, was zu einer Aktivierung oder Reprimierung der Transkription des entsprechenden Genes durch die RNA-Polymerase II führt. In Genen, die in gleichen Geweben oder durch das gleiche intraoder extrazelluläre Signal exprimiert werden, sind diese cis-Elemente oft konserviert. Einzelne cis-Elemente können innerhalb einer Promotorsequenz wiederholt auftreten und somit aufgrund ihrer Häufigkeit eine Verstärkung der Transkription bewirken. Daneben bewirken andere positiv (Enhancer) oder negativ (Silencer) quantitative Elemente eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Expressionsrate eines Genes. Die Kombination verschiedener Elemente innerhalb einer Promotorsequenz kann in einem synergistischen oder antagonistischen Effekt resultieren, was schließlich zu einer Aktivierung bzw. Reprimierung der Genexpression führt (Übersicht bei MINER und YAMAMOTO, 1991), so daß eine Verallgemeinerung der Wirkung einer bestimmten Kombination von cis-Elementen auf die Transkriptionsregulation nicht möglich ist. Außerdem spielt auch die relative Lage der einzelnen cis-Elemente zueinander eine große Rolle für ihre Funktionalität.

In der Promotorsequenz der RNase LE wurden durch Datenbank- und Literaturvergleiche Sequenzelemente identifiziert, die für eine Induzierbarkeit des RNase LE Promotors bevorzugt in den Wurzeln (Rootelement, RSE-Element) sowie in Abhängigkeit von Umweltbedingungen (Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren ATHB1 bzw. SBF1) sprechen. Desweiteren konnten Sequenzelemente (ASL-Box; GATA-Motiv; AC-1 Element) identifiziert werden, die auf eine Expression der RNase LE in den Leitgeweben, insbesondere im Phloem hinweisen (Abb. 30; vgl. Anhang 6).



Abb. 30 : Schematische Darstellung potentieller cis-Elemente im Promotor der RNase LE.

Das Rootelement (ATATTATATTCCCT) wurde im Promotor des *rolD*-Genes aus *Agrobacterium rhizogenes* (ELMAYAN und TEPFER, 1995) sowie im Promotor eines Wurzelspezifischen Peroxidase-Genes aus Weizen (HERTIG et al., 1991) identifiziert und vermittelt eine 25 bis 30fach höhere Expression eines GUS-Reportergenes in Tabakwurzeln als in -blättern (ELMAYAN und TEPFER, 1995). Die Sequenz bei Position -328 bis -311 im Promotor der RNase LE weist Ähnlichkeiten zu einem RSE-Element (Root specific element) aus dem Promotor des *GRP1.8*-Genes (Glycin-reiches Protein 1.8) der Bohne auf, das für die Expression in Wurzeln verantwortlich ist (KELLER und BAUMGARTNER, 1991). Beide potentielle *cis*-Elemente befinden sich innerhalb des Sequenzbereiches -836 bis +46 des Promotors der RNase LE (Abb. 30), für den eine 24fach stärkere Expression in den Wurzeln der Pi-verarmten Tomatenpflanzen als in den Wurzeln der Pi-versorgten Pflanzen nachgewiesen wurde (vgl. Tab. 7).

Die Sequenz CAAT(A/T)ATT wurde als Bindesstelle des Transkriptionsfaktors ATHB1 aus *Arabidopsis* identifiziert. Dieser Faktor gehört zu einer ubiquitär in höheren Pflanzen verbreiteten Familie von Transkriptionsfaktoren, den HD-Zip-Proteinen, die neben einer Homeodomäne als DNA-bindende-Domäne unmittelbar 3' ein Leucin-Zipper-Strukturmotiv besitzen und für die eine Beteiligung an der Regulation pflanzlicher Entwicklungsprozesse und der durch bestimmte Umwelteinflüsse ausgelösten spezifischen Aktivierung von Genen diskutiert wird (SESSA et al., 1993).

Die Sequenz GGTTAA(A/T)(A/T)(A/T) wurde als Konsensus-Sequenz der Bindestelle des Transkriptionsfaktors SBF-1 im Chalcon-Synthase-Gen CHS15 der Bohne (LAWTON et al., 1991) sowie des Faktors GT-1 identifiziert, der an der Licht-abhängigen Expression des Genes der kleinen Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase *rbcS-3A* der Erbse beteiligt ist (GREEN et al., 1988; LAM und CHUA, 1990). Beide Faktoren sind an der Kontrolle der Organspezifität der Genexpression beteiligt, wobei die funktionalen Eigenschaften des GT-1/SBF-1 *cis*-Elementes und der korrespondierenden Faktoren stark von den umgebenden Promotorsequenzen abhängig sind sowie von der speziellen Kombination von Transkriptionsfaktoren in den Kernen der einzelnen Zelltypen. Diese kontext-abhängige Modifizierung der Funktion des GT-1/SBF-1-Elementes sowie die kombinierte Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren erlaubt es einer kleinen Zahl von *cis*-Elementen und verwandten Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl verschiedener Genexpressionsmuster festzulegen. Gleichzeitig ermöglicht dieser Mechanismus die flexible Integration der Reaktion auf verschiedene Umwelteinflüsse in ein zusammenhängendes Entwicklungsprogramm (LAWTON et al., 1991)

Der Promotor der RNase LE enthält drei G-Box-ähnliche Sequenzen. G-Box-Elemente sind essentielle funktionelle Komponenten in vielen durch externe Stimuli induzierbaren Promotoren. So wurde nachgewiesen, daß die G-Box an der Induzierbarkeit pflanzlicher Promotoren durch Licht, Anaerobiose oder Hormone, wie Absicinsäure, Ethylen und Methyljasmonat beteiligt ist, wobei für die Bindung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren neben den Sequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft weitere cis-Elemente nötig sind (MENKENS et al., 1995). In der Bäckerhefe wurde die Sequenz CACGT(G/T) als Bindestelle des Transkriptionsfaktors PHO4 identifiziert, der für die Pi-Mangel-abhängige Induktion der Gene des pho-Regulons verantwortlich ist (OGAWA et al., 1995; vgl. Kap. 1). Es existieren Hinweise, daß dieses cis-Element auch bei der Pi-Mangel-abhängigen Geninduktion in Pflanzen eine Rolle spielen könnte. So wurden im Promotor des durch Pi-Mangel induzierbaren Genes TPSI1 aus Tomate vier cis-Elemente (Position -685 bis -868 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) mit Ähnlichkeiten zu diesem Motiv identifiziert, für die eine Rolle als Transkriptions-Enhancer-Sequenzen vermutet wird (LIU et al., 1997). Die G-Box-ähnlichen Sequenzen der RNase LE haben jedoch keinen Einfluß auf die Induktion des Promotors durch Pi-Mangel, da in transienten Transformationsversuchen nachgewiesen wurde, daß der Promotorbereich von Nukleotid -269 bis +46 für die Induktion durch Pi-Mangel ausreichend ist und die längeren Promotorkonstrukte zu keiner signifikanten Steigerung der Promotoraktivität führen (vgl. Kap. 4.4.1.3.).

Der Promotor der RNase LE enthält viele kurze A/T-reiche Sequenzabschnitte. Der längste besteht aus 42 bp (Position -442 bis -400 bezogen auf den Haupttranskriptionsstartpunkt). In vitro konnte gezeigt werden, daß poly(dA.dT)-Abschnitte mit einer Länge von \geq 20 bp

die Nukleosomen-Bildung stark inhibieren und deshalb die Aktivierung der Transkription fördern können, indem sie den Zugang für andere Transkriptionsfaktoren erleichtern (STRUHL 1985; FORDE, 1994).

A/T-reiche Sequenzen wurden in den Promotoren vieler pflanzlicher und tierischer Gene identifiziert und für einige von ihnen konnte gezeigt werden, daß sie mit spezifischen Transkriptionsfaktoren [HMG-Proteine, AT-bindende Proteine (ATBPs)] interagieren (PEDER-SEN et al., 1991; FORDE, 1994; GASSER, 1995). HMG-Proteine sind kleine (< 30 kDa) nicht-Histon-Proteine, die vom Chromatin mit 0,35 M NaCl extrahiert werden können und einen hohen Gehalt an basischen und sauren Aminosäuren sowie Prolin aufweisen (GAS-SER, 1995). HMG-Proteine sind in eukaryotischen Zellen weit verbreitet und werden unter anderem als wichtige strukturelle Komponenten, welche die Konformation und Funktion des Chromatins beeinflussen und dadurch im Zusammenwirken mit weiteren Transkriptionsfaktoren als Aktivatoren der Genexpression wirken, diskutiert (BUSTIN et al., 1990; GASSER, 1995; BUSTIN und REEVES, 1996). ATBF-Faktoren besitzen ein höheres Molekulargewicht (40-69 kDa) als die HMG-Proteine. Sie werden ebenfalls als Aktivatoren der Genexpression in Pflanzen diskutiert, wobei sie mit weiteren Transkriptionsfaktoren zusammenwirken (FORDE, 1994).

Von YIN et al. (1997) wurden bei der Expressionsanalyse des RTBV (Reis-Tungro-Bacilliform-Virus)-Promotors in transgenen Reispflanzen drei cis-Elemente identifiziert, die für die Phloem-spezifische Expression verantwortlich sind (Box II, ASL-Box, GATA-Motiv) und an die spezielle Transkriptionsfaktoren binden. Dabei wirken das Box II-Element und die ASL-Box synergistisch, während das GATA-Motiv einen additiven Effekt auf die Box II/ASL-Box-Region hat. Alle drei Elemente weisen Ähnlichkeiten zu anderen bereits charakterisierten cis-Elementen auf, für die eine Beteiligung an der Leitgewebebzw. Phloem-spezifischen Expression der betreffenden Gene nachgewiesen wurde. Dabei scheint insbesondere die ASL-Box ein wichtiges cis-Element für die Phloem-spezifische Genexpression zu sein, da bisher keine ähnlichen Sequenzen aus Xylem-spezifischen Promotoren bekannt sind (YIN et al., 1997). Das GATA-Motiv des RTBV-Promotors besitzt Ähnlichkeiten zum as-2-Element des 35S-Promotors, das sowohl an der Leitgewebespezifischen Genexpression als auch an der Expression in anderen Gewebetypen beteiligt ist (LAM und CHUA, 1989). Ähnliche Sequenzelemente wurden auch in den Phloemspezifischen Promotoren der Gene GS3A (Glutamin-Synthetase 3A, BREARS et al., 1991) und AHA3 (Arabidopsis H⁺-ATPase-Isoform 3, DEWITT et al., 1991) gefunden. Dies läßt vermuten, daß das GATA-Motiv in die Phloem-spezifische Genexpression involviert ist (YIN et al., 1997). Ein wichtiges Strukturmerkmal des Box II-Elements ist die Existenz eines CCA/TTG-Repeats, der für die Transkriptionsfaktor-Bindung essentiell ist (YIN et al., 1997). Dieses Sequenzmotiv wurde bereits als Bestandteil von cis-Elementen nachgewiesen, die für die Leitgewebe-spezifische Genexpression essentiell sind. Dazu zählen die AC-I und AC-II Elemente des Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Gen 2 (PAL2)-Promotors, die in Kombination mit weiteren cis-Elementen in die Phloem- und Xylem-spezifische Genexpression involviert sind, wobei für die Leitgewebe-spezifische Expression wenigstens eins der beiden Elemente vorhanden sein muß (HATTON et al., 1995). Beide Elemente zusammen bewirken eine starke Expression im Xylem, während Mutationen in einem der beiden Elemente zur Verringerung der Xylem-Expression und zu einem Ansteigen der Expression im Phloem führen. Ähnliche Sequenzmotive wurden ebenfalls in den Promotoren der Xylemspezifischen Gene 4CL (4-Coumarat:Coenzym A-Ligase, HAUFFE et al., 1993) und GRP1.8 (Glycin-reiches Protein 1.8 der Bohne, TORRES-SCHUMANN et al., 1996) sowie in den Phloem-spezifischen Genen Sh1 (Mais-Sucrose-Synthease 1, YANG und RUSSEL, 1990) und AHA3 (DEWITT et al., 1991) identifiziert. Dies läßt vermuten, daß eine Vielzahl von Sequenzelementen, die das CCA/TGG-Motiv enthalten, wichtige cis-Elemente für die Leitgewebe-spezifische Genexpression sind (YIN et al., 1997).

Im Promotor der RNase LE konnten Sequenzmotive mit Ähnlichkeiten zur ASL-Box (Position -169 bis -144, bezogen auf den Haupttranskriptionsstartpunkt) und dem GATA-Motiv (Position -569 bis -561 und -309 bis -301) des RTBV-Promotors sowie zum AC-I Element des PAL2-Promotors (Position -321 bis -311; vgl. Anhang 6) identifiziert werden, die aufgrund der oben aufgeführten Argumente als potentielle cis-Elemente für eine Phloemspezifische Expression betrachtet werden können.

Die Phloem-spezifische Expression der RNase LE konnte durch die histochemische Lokalisierung der GUS-Aktivität im Sproß ausgewählter, ca. 6 Wochen alter transgener Tomatenpflanzen bestätigt werden, die das GUS-Gen unter Kontrolle des RNase LE-Promotors hoch exprimieren (Abb. 31). In Stengelquerschnitten ist die GUS-Aktivität im inneren und äußeren Phloem lokalisiert sowie auf einem geringeren Level in der Epidermis (Abb. 31A). Auch in Querschnitten von Blattstielen ist das Phloem stark angefärbt (Abb. 31B), während sich die GUS-Färbung in den Blättern auf die Blattnerven beschränkt (Abb. 31C). Zur Aufklärung der Funktion der RNase LE in den Phloemzellen sind weitere Untersuchungen nötig. Dazu zählt neben einer Analyse der F1-Generation auch die histochemische Lokalisierung der GUS-Expression unter Induktionsbedingungen (Pi-Mangel). Inwieweit der Promotorbereich von +46 bis -836 auch für eine Expression nach Verwundung oder durch Pathogenbefall bzw. während der Keimung ausreichend ist, muß in weiteren Experimenten geprüft werden. Dazu wäre gegebenenfalls auch eine stabile Transformation des Konstruktes LE GUS I (Promotorbereich +46 bis -2621) in Tomatenpflanzen hilfreich. Durch immunocytochemische Untersuchungen mit einem seit kurzem in der Arbeitsgruppe vorhandenen RNase LE-spezifischen Antikörper könnte die zelluläre Lokalisierung der RNase LE in den Geweben der Tomatenpflanze nachgewiesen werden.



Abb. 31: Histochemische Lokalisierung der GUS-Aktivität in Sproßteilen der transgenen Tomatenpflanzen. A : Stengelquerschnitt

- B: Querschnitt durch einen Blattstiel
- C: GUS-Expression im Tomatenblatt

Analyse der Induzierbarkeit des RNase LE-Promotors durch Phosphatmangel

Die Pi-Mangel-abhängige Induzierbarkeit des Promotors der RNase LE wurde sowohl im transienten Expressionssystem (Transformation von kultivierten Tomatenzellen mittels Partikelkanone) als auch in stabil transformierten Tomatenpflanzen nachgewiesen.

Der Vorteil des transienten Systems gegenüber einer stabilen Transformation liegt vor allem in einem geringeren Zeitbedarf, so daß die Analyse einer großen Anzahl von Proben möglich ist. Durch die Nutzung von homologem Gewebe als Target sollten alle anderen für die Expression benötigten Faktoren in einem optimalen Verhältnis vorliegen. Ein großer Nachteil ist jedoch, daß die DNA nicht stabil in das Genom eingebaut wird, sondern temporär dazu existiert. Um exprimiert werden zu können, müssen die DNA-Konstrukte erst in den Zellkern transportiert werden, was nur einem Bruchteil der eingesetzten DNA gelingt. Darüber hinaus führen technische Parameter, die auf der verwendeten Transformationsmethode beruhen, sowie unterschiedliches Probenmaterial zu großen Schwankungen der Ergebnisse. Dies kann durch zahlreiche Wiederholungen des Experimentes, die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben sowie den Einsatz eines zweiten Reportergenes unter Kontrolle eines konstitutiv exprimierten Promotors (z.B. 35S-Promotor) als internen Standard ausgeglichen werden (LANAHAN et al., 1992; SCHLEDZEWSKI und MEN-DEL, 1994). Als Transformationsmethode wurde das Partikelbombardement ausgewählt, da bei dieser Methode keine Protoplastierung der Zellen nötig ist.

Zur Analyse der Pi-Mangel-Induzierbarkeit des RNase LE-Promotors wurde die phosphatabhängige GUS-Aktivität der verschiedenen RNase LE-Promotor-Konstrukte (vgl. Kap. 4.4.1.1.) in 2 Tage alten +Pi-Zellen sowie in 2 Tage alten +Pi-Zellen, die anschließend 24 h in Pi-freier Nährlösung kultiviert wurden, im Vergleich zum 35S-Promotor-GUS-Konstrukt pRT103 GUS untersucht. Dabei zeigten alle untersuchten RNase-Konstrukte Promotoraktivität, die in den -Pi-Zellen gegenüber der Aktivität in den +Pi-Zellen erhöht ist. Im Gegensatz dazu ist die Promotoraktivität des 35S-Promotor-GUS-Konstruktes pRT103 GUS in den -Pi-Zellen stark reprimiert, wobei dieser Aktivitätsverlust auf eine Reduzierung des Zellstoffwechsels bei Pi-Mangel zurückgeführt werden kann, während für das promotorlose GUS-Konstrukt keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 20 und Tab. 5). Durch die Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die Induktion der RNase LE durch Pi-Mangel ein transkriptionskontrollierter Prozeß ist. Dabei ist der Promotorbereich von Nukleotid -269 bis +46 für die Pi-Mangel-Induzierbarkeit ausreichend, da die längeren Promotorkonstrukte zu keiner signifikanten Steigerung der Pi-Mangel-Induzierbarkeit führen (vgl. Tab. 5) und für das promotorlose Konstrukt p0 GUS keine Aktivität nachweisbar war. Zur Identifizierung der für die Pi-Mangel-Induktion verantwortlichen Bereiche im RNase LE-Promotor sind weitere Untersuchungen nötig. Dazu zählen eine weitere Verkürzung der Promotorsequenzen und die anschließende Testung der entsprechenden Konstrukte im transienten Testsystem. Mit Hilfe von Gelshift-Assays und Footprint-Analysen könnten die beteiligten cis-Elemente identifiziert und der Nachweis der Interaktion mit Pi-Mangelspezifischen Proteinen erbracht werden. Durch das Screening von cDNA-Expressionsbanken aus Tomate mittels der Southwestern-Technik könnten anschließend die interagierenden Proteine isoliert werden.

Die Induzierbarkeit des RNase LE-Promotors konnte anschließend auch in stabil transformierten Tomatenpflanzen bestätigt werden. Der Vorteil des transgenen Systems liegt in der stabilen Integration des Testkonstruktes in das Pflanzengenom und der damit ermöglichten Untersuchung von sich normal entwickelnden ganzen Pflanzen. Aber auch in diesem System führen als Positionseffekte bezeichnete, im Detail bisher weitgehend unbekannte Vorgänge zu starken Schwankungen der Reportergen-Expression in den einzelnen Pflanzen, so daß für die Bestimmung verläßlicher Expressionswerte ebenfalls die Analyse zahlreicher individueller Pflanzen nötig ist.

Für die Untersuchungen wurde zunächst der Promotorbereich von Nukleotid -836 bis +46 ausgewählt, dessen Pi-Mangel-Induzierbarkeit im transienten Expressionssystem nachgewiesen worden war (Abb.20). Alle 21 regenerierten Pflanzen zeigen GUS-Aktivität, die sowohl in den Wurzeln als auch in den Blättern unter Pi-Mangel erhöht ist (Abb. 22), während in nicht transformierten Kontrollpflanzen keine GUS-Aktivität nachweisbar war. Dabei konnten hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und phänotypischen Erscheinungsbildes keine Unterschiede zwischen den in Pi-haltigem (4 mM Phosphat) bzw. in Pi-freiem Medium angezogenen Pflanzen nachgewiesen werden (Abb.21).

Der Promotor der RNase LE wird bevorzugt in den Wurzeln exprimiert. Die Induktion durch Pi-Mangel ist in den Wurzeln um das sechsfache stärker als in den Blättern (Tab.7).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung der RNase-Aktivitäten in Tomatenkeimlingen erhalten. In Pi-frei angezogenen Sämlingen steigt die RNase-Aktivität parallel zur Abnahme des intrazellulären Pi-Gehaltes in allen Pflanzenteilen stark an, am meisten jedoch in den Wurzeln (BOSSE und KÖCK, 1998). Inwieweit die innerhalb des Promotors identifizierten Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu den Rootelementen (s. o. und Anhang 6) daran beteiligt sind, muß in weiteren Experimenten untersucht werden.

Bisher konnten nur Untersuchungen an den Primärtransformanten durchgeführt werden, so daß die Ergebnisse durch die Analyse der F1-Generation noch bestätigt werden müssen.

Die hier dargestellten Untersuchungen führten zur Aufklärung der ersten vollständigen genomischen Struktur einer pflanzlichen S-ähnlichen RNase. Der Promotor der RNase LE sowie die transgenen Tomatenpflanzen stehen nun sowohl als Hilfsmittel für die Untersuchung der Pi-Mangel-vermittelten Signaltransduktion (Isolierung regulatorischer Proteine) als auch zur Untersuchung der organ- und gewebespezifischen bzw. entwicklungsabhängigen Expression der RNase LE in Tomatenpflanzen zur Verfügung.

5.2. Die PSI14-Genfamilie

Das Auftreten weiterer durch Pi-Mangel induzierbarer Proteine in der Tomatensuspensionskultur konnte von NÜRNBERGER (1990) durch Untersuchungen zur *in vivo*-Neusynthese von Proteinen nachgewiesen werden. Mittels subtraktiver Hybridisierung der -Pi-cDNA-Bank (vgl. Kap. 2.4.2.) gegen mRNA aus Pi-versorgten Zellen wurde nach weiteren differentiell exprimierten Klonen gesucht, die potentielle Komponenten der Signalübertragungskette sein könnten. Dabei wurde der cDNA-Klon PSI14 isoliert, der für kein bisher bekanntes Protein kodiert. Der Klon enthält einen ORF von 810 bp, der mit einem Start-Kodon beginnt und mit einem Stopkodon endet und für 269 Aminosäuren kodiert. Das Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa und besitzt keine bekannten Signalsequenzen oder Transitpeptide (ZIETHE, unveröffentlicht).

Die Homologie-Suche mit der Proteinsequenz in der SWISS-PROT- und der PIR-Datenbank ergab keine signifikanten Homologien mit bereits bekannten Proteinen (Stand April/1998). Auf DNA-Ebene konnten vier unvollständige Reis-cDNA-Klone identifiziert werden, die 61% - 65 % Identität zum 5'-Ende der cDNA-Sequenz aufweisen (Tab. 13, vgl. Anhang 4) und über die keine weiteren Informationen vorliegen. Das N-terminale Ende des cDNA-Klons PSI14 besitzt 63 % Identität zu den Nukleotiden 520 bis 660 eines genomischen Klons aus *Arabidopsis thaliana* (1252 bp; EMBL-Datenbank-Nummer B12185).

Datenbank-	Beschreibung	bp	Identität	Amino-	Identität
Nummer			[%]	säuren	[%]
D24646	partieller cDNA-Klon aus Reiswurzeln	210	65,7	N 70	67,1
D39141	partieller cDNA-Klon aus Reiswurzeln	327	61,7	N 109	66,0
C73042	partieller cDNA-Klon aus Reisblüten	294	63,3	N 98	61,2
C74865	partieller cDNA-Klon aus jungen Reisblättern	312	62,6	N 104	48,1
	(einschließlich des apikalen Meristems)				

Tab. 13: Ergebnis der Homologie-Suche mit der cDNA-Sequenz des Klons PSI14. Angegeben wurden die DNA-Sequenzen mit den höchsten Homologien, ihre EMBL-Datenbank-Accession-Nummer und Kurzcharakteristik, die Länge der überlappenden Sequenzen sowie die Anzahl der aus den Sequenzen abgeleiteten Aminosäuren (N = N-terminal; Numerierung bezogen auf das Translationsstartkodon ATG = 1). Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm PC/GENE durchgeführt.

Die Expressionsanalyse zeigt, daß das Transkript des cDNA-Klons PSI14 analog den Transkripten der RNasen in starker Abhängigkeit von der Pi-Verfügbarkeit reguliert wird. Die Transkript-Akkumulation beginnt 2 h nach dem Umsetzen der Tomatenzellen von +Pi in -Pi-Medium (Abb. 4A). Bereits 1 h nach der Zugabe von Phosphat zu -Pi-Zellen hat sich der im Northernblot detektierbare mRNA-Level um 95 % verringert, während die Transkriptlevel der RNasen LE und LX im gleichen Zeitraum nur um 25 % bzw. 60 % abnehmen (Abb. 4B und D). Ein Vergleich des Northernblots von PSI14 mit dem der RNasen LE und LX zeigt, daß das Transkript des unbekannten Proteins zusammen mit der RNase LE induziert, aber wesentlich stärker akkumuliert und nach Zufuhr von Phosphat zu den -Pi-Zellen am schnellsten abgebaut wird.

Ähnlich wie bei den RNasen nachgewiesen, wird PSI14 durch die Zufuhr bestimmter Zucker (2-Deoxy-D-Glukose; D-Mannose; D-Galaktose; Glycerol), die im Cytoplasma phosphoryliert werden und damit zu einem Absinken des intrazellulären Pi-Spiegels führen (LOUGHMAN et al., 1989; JANG und SHEEN, 1994), transient nach 2 h induziert trotz normaler extrazellulärer Pi-Versorgung (Abb. 5). Die Gemeinsamkeiten in der Regulation der Expression des Transkriptes PSI14 und der RNasen LE und LX lassen vermuten, daß alle drei Proteine durch die gleiche Signaltransduktionskette reguliert werden.

In Tomatenpflanzen wurde die mRNA des Klons PSI14 unter normalen Wachstumsbedingungen analog wie die der beiden RNasen nur in Blüten detektiert (Abb. 6). Unter Pi-Mangelbedingungen konnte die Induktion des Transkriptes vor allem in Wurzeln, aber auch auf einem niedrigeren Level in Kotyledonen und im Sproß 14 Tage alter, Pi-frei angezogener Tomatenkeimlinge nachgewiesen werden (BOSSE, persönliche Mitteilung).

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen die strenge Abhängigkeit der Regulation der Transkriptmenge des Proteins PSI14 von der Pi-Verfügbarkeit. Die funktionelle Bedeutung des Proteins für die Zelle und die Abwehr oder Vermeidung des Pi-Mangels bleibt jedoch offen. Die starke Pi-Mangel-abhängige Genexpression, insbesondere der schnelle Abbau der Transkripte nach Phosphatzugabe zu Pi-verarmten Tomatenzellen, lassen eine Beteiligung an der Pi-Mangel-Erkennung oder der Signalwandlung vermuten. Durch die Charakterisierung von genomischen Klonen sollte vor allem die Promotorsequenz eines weiteren Pi-Mangel-induzierbaren Proteins isoliert und diese anschließend mit der Promotorsequenz der RNase LE verglichen werden, um so möglicherweise potentielle *cis*-Elemente zu identifizieren, die an der Induktion der Transkripte durch Pi-Mangel beteiligt sein könnten.

Erste Untersuchungen weisen darauf hin, daß das unbekannte Protein PSI14, ähnlich wie die beiden RNasen LE und LX, außer an der Reaktion auf Pi-Mangel auch an unspezifischen Abwehrreaktionen der Pflanze auf Pathogenbefall beteiligt sein könnte. Das Transkript des Klons PSI14 wird durch Verwundung nicht induziert (Abb. 7A), akkumuliert aber spezifisch nach der Infiltration von Tomatenblättern mit dem virulenten *Xanthomonas*-Stamm X.c.v. 75-3 (Abb. 7). Im Gegensatz zu den RNasen wird die mRNA des Klons PSI14 jedoch nicht durch die Infektion mit der *hrp*-Mutante induziert.

Mittels Southern-Analyse wurde der Klon PSI14 als Vertreter eine kleinen Genfamilie, die aus drei verschiedenen Mitgliedern besteht, identifiziert (Abb. 23). Durch die Isolierung von drei verschiedenen genomischen Sequenzen für PSI14 (s.u.) besteht die Möglichkeit, genspezifische Proben herzustellen und anschließend die chromosomale Lokalisierung der einzelnen PSI14-Gene zu bestimmen. Die Analyse des Lambda-Klons λ g14-01 zeigte, daß die beiden Gene PSI14/A und PSI14/B gekoppelt sind und im Tomatengenom in "Kopf-Schwanz-Anordnung" mit einem Abstand von ca. 2,8 kb vorliegen. Ähnliche Befunde wurden z.B. für die beiden Gene *APT1* und *APT2*, die für Mitglieder einer Phosphat-Transporter-Familie aus *Arabidopsis thaliana* kodieren, beschrieben. Die beiden Gene liegen innerhalb eines 6 kbp großen *Hin*dIII-Fragmentes der genomischen *Arabidopsis*-DNA (SMITH et al., 1997).

Für alle drei Mitglieder der Genfamilie wurden sowohl cDNA-Klone als auch genomische Sequenzen isoliert und charakterisiert (Tab. 14).

	PSI14/C	PSI14/B	PSI14/A		
cDNA-Klon	kodiert für 269 Aminosäu-	kodiert für 269 Aminosäu-	kodiert für 269 Aminosäu-		
	ren	ren;	ren;		
		6 Austausche im Vergleich	15 Austausche im Ver-		
		zu PSI14/C	gleich zu PSI14/C		
Molekulargewicht	30 627 Da	30 680 Da	30 424 Da		
genomischer Klon	PCR-Fragment, das die	Klon λg14-01; Gen ist	Klon λg14-01; Gen ist		
	gesamte kodierende Regi-	gekoppelt mit Gen	gekoppelt mit Gen		
	on umfaßt	PSI14/A	PSI14/B		
Promotor	nicht vorhanden	ca. 2,8 kbp vorhanden	ca. 2,6 kbp vorhanden		
		990 bp sequenziert	839 bp sequenziert		
Vergleich der	kein Austausch	2 Basenaustausche im Ko-	4 Basenaustausche in den		
cDNA-Sequenzen		don der Aminosäure 214;	Kodons der Aminosäuren		
mit den genomi-		5 Aminosäureaustausche	101, 181, 187 bzw. 222;		
schen Sequenzen		im Vergleich zu g14/C	18 Aminosäureaustausche		
			im Vergleich zu g14/C		
Induzierbarkeit	schwach	stark	schwach reprimiert		
durch Pi-Mangel					
Expression in	schwach in Wurzeln und	schwach in Blüten	schwach in Blüten		
5 Wochen alten	Blättern, stark in Blüten				
Tomatenpflanzen					
Induzierbarkeit	Induzierbarkeit Transkripte aller drei Gene werden schwach durch Verwundung induziert; mRNA				
durch Verwundung Level steigt nach Pathogen-Infektion stark an					
bzw. Pathogenbefall					

Tab. 14 : Vergleich der Mitglieder der PSI14-Genfamilie aus Tomate

Unter Verwendung von aus der cDNA-Sequenz des Genes PSI14/C (ZIETHE unveröffentlicht) abgeleiteten Primern und genomischer Tomaten-DNA (*L. esculentum* Mill. cv. Lukullus) wurde ein 1156 bp langes Fragment amplifiziert, in den TA-Cloning-Vektor pCR[®]2.1. kloniert und sequenziert, das die vollständige Nukleotid-Sequenz der cDNA vom mutmaßlichen Translationsstartkodon ATG bis zum Nukleotid 908 (kodierende Sequenz + 55 bp aus dem 3'-untranslatierten Bereich) umfaßt und dessen Sequenzierung die vorhandene cDNA-Sequenz bestätigt.

Mittels Restriktionsanalysen und Southern-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, daß der aus der EMBL3-Phagenbank (*Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry; vgl. Kap.2.4.1) isolierte Klon λ g14-01 zwei unabhängige genomische Sequenzen des Klons PSI14 (bezeichnet als g14/A bzw. g14/B) enthält (Abb. 25 und Tab. 8). Beide genomischen Sequenzen stimmen nicht mit der Sequenz des genomischen PCR-Fragmentes überein und repräsentieren vermutlich die beiden anderen in der Southern-Analyse detektierten Vertreter der Genfamilie (vgl. Abb. 23). Die Sequenz des genomischen PCR-Fragmentes (s.o.) wurde deshalb als g14/C bezeichnet.

Aus einer -Pi-cDNA-Expressionsbank der Tomatensorte *L. esculentum* Mill. cv. Lukullus (vgl. Kap. 2.4.2.) wurden mittels Plaque-Screening 8 cDNA-Klone isoliert, von denen je zwei für das Gen PSI14/A bzw.PSI14/C und vier für das GenPSI14/B kodieren. Alle cDNA-Klone enthalten eine ORF von 810 bp, die mit einem Start-Kodon ATG beginnt und mit einem Stop-Kodon endet und für 269 Aminosäuren kodiert. Innerhalb der kodierenden Bereiche der Gene PSI14/A und PSI14/B wurden nach einem Vergleich der cDNA-Sequenzen (isoliert aus der Tomatensorte *L. esculentum* Mill. cv. Lukullus) mit den entsprechenden genomischen Sequenzen (isoliert aus der Tomatensorte *L. esculentum* VFNT Cherry) Basenaustausche festgestellt, während die 5'UTR und die 3'UTR der einzelnen cDNA-Klone jeweils vollständig mit den entsprechenden Abschnitten der genomischen Sequenzen übereinstimmen (vgl. Tab. 14 sowie Anhang 3 und 4). Dies weist darauf hin, daß die PSI14-Gene in den einzelnen Tomatensorten als unterschiedliche Allele vorliegen.

Die 3'UTR der Gene PSI14/B und PSI14/C enthält DST-Element-ähnliche Sequenzen 173 bp bzw. 8 bp downstream des Stop-Kodons (Abb. 32). Das DST-Element wurde als mögliche mRNA-Destabilisierungssequenz in Pflanzen identifiziert (NEWMAN et al., 1993). Es ist ca. 40 bp lang und besteht aus drei hoch konservierten Regionen, die durch zwei variable Sequenzen voneinander getrennt werden.

Konsensus:	C G Ag – c	a.5 bp – cA TAGAT ta – ca	. 6 bp – (i	A/C)	(T/A)(A/T)	Ttt GTA (1	C/C)
PSI14/B	CGTC -	4 bp - САТАGАТТТ -	8 bp –	A	Т	A	TTTGGG	A
PSI14/C	GG*C -	2 bp – CA*AGATTA –	8 bp -	Т	G	Т	TTTGTA	С

Abb. 32: DST-Element-ähnliche Sequenzen in der 3'-UTR der beiden Gene PSI14/B (173 bp downstream des Stop-Kodon) und PSI14/C (8 bp downstream des Stop-Kodon). Invariante Nukleotide innerhalb der Konsensus-Sequenz wurden fett gedruckt (Daten nach NEWMAN et al., 1993). In die Sequenz des Genes PSI14/C wurden zur Optimierung des Alignments zwei Lücken (dargestellt durch Sternchen) eingefügt.

Zusätzlich enthält die 3'UTR des Genes PSI14/B 23 bp downstream der DST-Elementähnlichen Sequenz noch das Motiv ATTTA. Viele instabile Transkripte aus Säugerzellen enthalten in ihrer 3'UTR eine oder mehrere Kopien des *cis*-Elementes AUUUA und es konnte gezeigt werden, daß dieses Element als Instabilitätsdeterminante sowohl in Säuger-(GREENBERG und BELASCO, 1993) als auch in Pflanzenzellen (OHME-TAKAGI et al., 1993) wirkt. In der 3'UTR des Genes PSI14/A konnten keine DST-Element-ähnlichen Sequenzen identifiziert werden. Obwohl die Bedeutung dieser Sequenzen für die Stabilität der PSI14-Transkripte noch nachgewiesen werden muß, weisen Northern-Analysen auf einen schnellen Abbau der PSI14-mRNA hin, da schon 1 h nach Zufuhr von Phosphat zu 24 h in Pi-freiem Nährmedium kultivierten Tomatenzellen 95 % des Transkriptes nicht mehr nachweisbar sind (Abb. 4B und D).

Alle drei genomischen Sequenzen werden an identischen Positionen (nach der ersten Base des Tripletts von Aminosäure 47, nach der zweiten Base des Tripletts von Aminosäure 87 bzw. nach Aminosäure 154) von Intronsequenzen unterbrochen (Tab. 10 und Anhang 2 und 3). Die Exon/Intron-Übergänge entsprechen den in höheren Pflanzen gefundenen Konsensus-Sequenzen (Exon 1 ... AG : GTAAGT ... Intron ... AACAG : GA ... Exon 2; SIMPSON und FILIPOWICS, 1996).

Der Transkriptionsstartpunkt des Genes PSI14/B wurde mittels Primerextension bei Position -52, bezogen auf das Translationsstartkodon ATG, identifiziert (vgl. Kap. 4.5.4.). 24 bp upstream befindet sich eine TATA-Box-Sequenz. Primerextensionsprodukte konnten für das Gen PSI14/A nicht nachgewiesen werden, was auf den sehr geringen mRNA-Level dieses Genes im Vergleich zu den anderen beiden Transkripten (vgl. Abb. 29B) zurückgeführt werden kann. 92 bp upstream des Translationsstartkodons wurde eine TATA-Box-Sequenz identifiziert, die mit der von ROEDER (1996) veröffentlichten Konsensus-Sequenz übereinstimmt.

Ein Vergleich der beiden Promotorsequenzen zeigt keine signifikanten Homologien. Lediglich die Sequenzen um die beiden mutmaßlichen TATA-Boxen und um das Translations-
startkodon sind hoch konserviert (Abb. 27). Beide Promotorsequenzen wurden mit Hilfe des Programmes PC/GENE auf besondere Strukturmerkmale untersucht. Der Promotor des Genes PSI14/A enthält eine 80 bp lange Sequenz, innerhalb der ein 16 bp langes Sequenzmotiv dreimal sowie ein 21 bp langes Motiv, welches das 16 bp-Motiv teilweise überlappt, zweimal wiederholt werden (Abb. 28). Im Promotor des Genes PSI14/B wurden zwei G-Box ähnliche Sequenzen identifiziert (vgl. Anhang 7).

Durch Sequenzvergleiche wurden in der 5'UTR der Gene PSI14/A und PSI14/C Pyrimidinreiche Abschnitte identifiziert, die Homologien zu einer in der 5'UTR der Kern-kodierten Chloroplasten-Gene PsaF und PetH aus Spinat (BOLLE et al., 1994) gefundenen CT-Box zeigen. Dieses *cis*-Element hat einen positiven Effekt auf die Transkription eines Glucuronidase-Reportergenes in transgenen Pflanzen. Ähnliche Sequenzen wurden auch in der 5'UTR der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A Reduktase Gene HMG1, HMG2 und HMG3 aus Tomate gefunden. Mittels Footprint- und DNA-Fragment-Gelretentions-Analysen konnte nachgewiesen werden, daß Proteine spezifisch diese Pyrimidin-reiche Tomaten-DNA-Sequenz erkennen und daran binden (DARASELIA et al., 1996).

Beide Promotorsequenzen wurden für Homologie-Suchen in Datenbanken für pflanzliche Transkriptionsfaktorbindestellen eingesetzt. Dabei wurden in beiden Promotoren, wie auch im Promotor der RNase LE, Sequenzen mit Ähnlichkeiten zum Rootelement des *rolD*-Promotors aus *Agrobacterium rhizogenes* (ELMAYAN und TEPFER, 1995) identifiziert, das für eine bevorzugte Expression in Wurzeln verantwortlich ist (vgl. Kap. 5.2.4. und Anhang 7). Der Einfluß dieser potentiellen *cis*-Elemente auf die Transkription der PSI14-Gene muß in weiteren Experimenten überprüft werden. Bisher konnten keine signifikanten Sequenzhomologien zwischen den Promotoren der beiden PSI14-Gene und dem Promotor der RNase LE identifiziert werden.

Die differentielle Expression der drei PSI14-Gene unter Pi-Mangelbedingungen in kultivierten Tomatenzellen, in den einzelnen Organen von unbehandelten Tomatenpflanzen sowie nach Verwundung bzw. Pathogenbefall wurde mit Hilfe der "Single Nukleotide Primer Extension"- Methode (SNuPE) untersucht (vgl. Kap. 3.9. und 4.5.6.).

Pi-Mangel führt zu einer starken Induktion des Transkriptes des Gens PSI14/B, das in den +Pi-Zellen nur schwach nachweisbar ist, während das Transkript des Gens PSI14/A durch Pi-Mangel reprimiert wird. Das Transkript des Gens PSI14/C nimmt eine Zwischenstellung ein. Es wird durch Pi-Mangel induziert, in den +Pi-Zellen ist aber schon ein hoher mRNA-Gehalt nachweisbar (Abb. 29B).

In den Wurzeln und Blättern unbehandelter, 5 Wochen alter Tomatenpflanzen ist nur das Transkript von PSI14/C schwach nachweisbar, während in den Tomatenblüten alle drei Transkripte, insbesondere jedoch die mRNA von PSI14/C, exprimiert werden (Abb. 29C). Im Gegensatz zur differentiellen Expression der drei PSI14-Gene unter Pi-Mangelbedingungen werden alle drei PSI14-Transkripte schwach durch Verwundung induziert, während der Transkriptlevel nach der Infektion von Tomatenblättern mit dem virulenten *Xanthomonas*-Stamm X.c.v. 75-3 stark ansteigt (Abb. 29D).

Durch Sequenzvergleiche zwischen den Promotoren der RNase LE und des Genes PSI14/B konnten bisher keine potentielle an der Pi-Mangel-Induzierbarkeit beteiligte *cis*-Elemente identifiziert werden, so daß weitere Untersuchungen nötig sind. Dazu zählen neben den in Kap. 5.1. für den Promotor der RNase LE getroffenen Aussagen auch die Isolierung und Charakterisierung der Promotoren weiterer Pi-Mangel-induzierbarer Tomatengene (RNase LX; Gen PSI14/C).

Die PSI14-Genfamilie weist im Datenbankvergleich keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen auf. Vorraussetzung für weitere Untersuchungen zur Funktion dieser Proteine insgesamt und innerhalb der Pi-Mangel-Signaltransduktionskette ist die Lokalisierung der Proteine sowohl in Zellkulturzellen als auch in der Tomatenpflanze. Dies könnte durch immunocytochemische Lokalisierungsexperimente nach der Herstellung eines polyklonalen Antikörpers erreicht werden. Für eine hoch-auflösende gewebespezifische sowie entwicklungsabhängige Analyse der Expression der einzelnen PSI14-Gene ist die Konstruktion von Promotor-GUS-Fusionen und anschließende Untersuchung transgener Tomatenpflanzen nötig.

6. Zusammenfassung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in der Isolierung und Charakterisierung von genomischen Sequenzen der beiden S-ähnlichen RNasen LE und LX aus Tomate, die sowohl in der Zellsuspensionskultur als auch in Tomatenkeimlingen unter Pi-Mangelbedingungen induziert werden (NÜRNBERGER et al., 1990; LÖFFLER et al., 1992; KÖCK et al., 1995; BOSSE und KÖCK, 1998) sowie für den ebenfalls durch Pi-Mangel induzierbaren cDNA-Klon PSI14, der für ein bisher unbekanntes Protein kodiert.

Mit Hilfe von Northern-Hybridisierungen wurde eine detaillierte Untersuchung des Induktionsprozesses dieser Transkripte unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Alle drei Transkripte werden in der Zellkultur in starker Abhängigkeit von der Pi-Verfügbarkeit reguliert. Pi-Mangel führt zur Induktion der mRNA's, die mittels Northernblots in Pi-versorgten Zellen nicht nachweisbar sind, während die Zufuhr von Phosphat zu -Pi-Zellen die mRNA-Synthese stoppt und zu einem Verschwinden der Signale führt.

Eine transiente Induktion aller drei Transkripte konnte trotz normaler extrazellulärer Pi-Versorgung bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit phosphorylierbaren, aber nicht metabolisierbaren Zuckern (2-Deoxy-D-Glukose, D-Mannose, D-Galaktose, Glycerol) nachgewiesen werden. Dies läßt eine intrazelluläre Signalperzeption vermuten (KÖCK et al., 1998).

In unbehandelten Tomatenpflanzen wurden alle drei Transkripte vor allem in den Blüten nachgewiesen, während in Wurzeln und Blättern die mRNA's nicht oder nur sehr schwer detektierbar sind. Die RNase LE wird transient nach Verwundung induziert. Die Infiltration von Tomatenblättern mit dem Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* führt zur Akkumulation sowohl der RNase-Transkripte als auch des unbekannten Proteins PSI14. Dies führt zu der Vermutung, daß alle drei Proteine an der unspezifischen Abwehrreaktion der Pflanzen auf Pathogenbefall beteiligt sein könnten.

Die beiden RNasen LE und LX liegen im Tomatengenom als single coppy-Gene vor. Für die **RNase LE** wurde aus einer genomischen Tomaten-DNA-Bank (*L. esculentum* VFNT Cherry) ein positiver Klon isoliert, die für die RNase LE kodierenden Sequenzen einschließlich des 2668 bp langen 5'-upstream des Translationsstartkodons gelegenen potentiellen Promotorbereiches subkloniert und mit der Sequenz eines genomischen PCR-Fragmentes der RNase LX (SCHUMANN, 1995), das die kodierende Region weitgehend umfaßt, verglichen. Das Gen der RNase LE enthält zwei Introns, die sich an identischen Positionen des reifen Proteins wie bei der RNase LX befinden, während ein drittes Intron der RNase LX keine Entsprechung in der genomischen Sequenz der RNase LE besitzt. Die hohen Homologien zwischen den Aminosäure- und cDNA-Sequenzen (LÖFFLER et al., 1993; KÖCK et al., 1995), die konservierten Intron-Positionen sowie der Nachweis der gemeinsamen Chromosomenlokalisation (Tomaten-Chromosom 5) machen es sehr wahrscheinlich, daß beide RNase-Gene durch Genduplikation aus einer gemeinsamen Ur-RNase hervorgegangen sind.

Mit Hilfe der 5'RACE-Technik wurden für die RNase LE zwei Transkriptionsstartpunkte kartiert. Durch Literaturvergleiche konnten im Promotor der RNase LE neben G-Boxähnlichen Sequenzen auch Strukturelemente identifiziert werden, die für eine verstärkte Induzierbarkeit des Promotors besonders in Wurzeln sowie in Abhängigkeit von Umweltbedingungen sprechen. Der Promotor der RNase LE wird in den Phloemzellen von Blättern, Blattstielen und Stengeln exprimiert. In Übereinstimmung mit dieser Lokalisierung konnten potentielle *cis*-Elemente für eine Phloem-spezifische Expression identifiziert werden.

Zur Analyse der Induzierbarkeit des RNase LE-Promotors durch Pi-Mangel wurden verschiedene Promotor-GUS-Konstrukte hergestellt und sowohl im transienten Test mittels Partikelkanone als auch in stabil transformierten Tomatenpflanzen getestet. Alle untersuchten RNase LE-GUS-Konstrukte zeigten im transienten Test Promotoraktivität, die in -Pi-Zellen im Vergleich zu +Pi-Zellen deutlich erhöht ist. Im Gegensatz dazu ist die Promotoraktivität des 35S-Promotor-GUS-Kontroll-Konstruktes in den -Pi-Zellen stark reprimiert, und für ein promotorloses GUS-Konstrukt konnte keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Damit wurde die Transkriptionskontrolle der Expression der RNase LE nachgewiesen, wobei für die Induktion der RNase LE durch Pi-Mangel der Promotorbereich von Nukleotid -269 bis +46, bezogen auf den Haupttranskriptionsstartpunkt, ausreichend ist.

Die Induzierbarkeit des RNase LE-Promotors wurde auch in transgenen Tomatenpflanzen bestätigt. Während in Pi-versorgten Pflanzen nur geringe GUS-Aktivitäten nachgewiesen werden konnten, die sich in Wurzeln und Blättern nicht unterscheiden, ist in den Pi-verarmten Pflanzen die Induktion in den Wurzeln um das sechsfache stärker als in den Blättern.

Der cDNA-Klon **PSI14** kodiert für ein Gen aus einer kleinen Genfamilie mit drei Mitgliedern, die im Datenbankvergleich keine Homologien zu bekannten Proteinen aufweist. Für alle drei Gene wurden die genomischen Sequenzen isoliert und sequenziert. Die beiden Gene PSI14/A und PSI14/B liegen im Tomatengenom in Kopf-Schwanz-Anordnung mit einem Abstand von ca.2,8 kbp vor. Für das Gen PSI14/C (entspricht dem cDNA-Klon PSI14) wurde ein genomisches PCR-Fragment kloniert. Die kodierende Sequenz aller drei PSI14-Gene wird durch drei Introns an identischen Positionen unterbrochen. Der Transkriptionsstartpunkt des Genes PSI14/B konnte mittels Primerextension ermittelt werden. In der 3'UTR der Gene PSI14/B und PSI14/C wurden DST-Element-ähnliche Sequenzen identifiziert. Dieses *cis*-Element wurde als mRNA-Instabilitätsdeterminante in Pflanzen identifiziert (NEWMAN et al., 1993). Die differentielle Expression der drei Gene wurde mit Hilfe der "Single Nukleotide Primer Extension"- Methode (SNuPE) untersucht. Pi-Mangel führt zu einer starken Induktion des Genes PSI14/B, das in Pi-versorgten Zellen nur schwach nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu wird das Transkript PSI14/A durch Pi-Mangel reprimiert, während das Transkript des Genes PSI14/C eine Zwischenstellung einnimmt. Es wird durch Pi-Mangel induziert, aber auch in Pi-versorgten Zellen ist schon ein hoher mRNA-Gehalt nachweisbar. Die Transkripte aller drei Gene, insbesondere jedoch PSI14/C, werden in Blüten exprimiert, während in den Wurzeln und Blättern unbehandelter Tomatenpflanzen nur das Transkript von PSI14/C schwach nachweisbar ist. Im Gegensatz zur differentiellen Expression bei Pi-Mangel werden alle drei Transkripte schwach durch Blattverwundung induziert. Der Transkriptevel aller drei Gene steigt nach der Infektion von Tomatenblättern mit dem Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* stark an.

Ähnlich wie der Promotor der RNase LE enthalten die Promotoren der beiden Gene PSI14/A und PSI14/B Strukturelemente, die auf eine bevorzugte Induzierbarkeit besonders in Wurzeln hinweisen. Darüber hinaus konnten bisher keine signifikanten Homologien zwischen den Promotoren identifiziert werden.

- Abel, S. and Glund, K. (1986) Localization of RNA-degrading enzyme activity within vacuoles of cultured tomato cells. Physiol. Plant. 66, 79-86.
- Abel, S. and Glund, K. (1987) Ribonucleases in plant vacuoles: purification and molecular properties of the enzyme from cultured tomato cells. Planta 172, 71-78.
- Abel, S., Krauß, G., and Glund, K. (1989) Ribonuclease in tomato vakuoles: high-performance liquid chromatographic analysis of ribonucleolytic activities and base specificity. Biochim. Biophys. Acta 998, 145-150.
- Adalsteinsson, S. and Jensen, P. (1989) Modifications of root geometry in winter wheat by phosphorus deprivation. J. Plant Physiol. 135, 513-517.
- Ahnert, V. (1990) Reinigung und Charakterisierung einer Phosphat-abhänigen 2',3'-zyklischen Nukleotid-Phosphodiesterase aus Zellsuspensionskulturen von Tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 6) Amaravadi, L. and King, M.W. (1994) A rapid and efficient, nonradioactive method for screening recombinant DNA libraries. Biotechniques 16, 98-103.
- 7) Ambellan, V. and Hollander, V.P. (1966) A simplified assay for RNase activity in crude tissue extracts. Anal. Biochem. 17, 474-484.
- 8) Amino, S., Fujimura, T. and Komamime, A. (1983) Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of Catharanthus roseus. Physiol. Plant. **59**, 393-396.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- 10) Arumuganathan, K. and Earle, E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol. Biol. Rep. 9, 208-218.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1990). Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience
- 12) **Barbaric, S., Münsterkötter, M., Svaran, J. and Hörz, W.** (1996) The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast *PHO5* promoter. Nucl. Acids Res. **24**, 4479-4486.
- 13) **Bariola, P.A., Howard, C.J., Taylor, C.B., Verburg, M.T., Jaglan, V.D. and Green, P.J.** (1994) The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. Plant J. **6**, 673-685.
- 14) Bates, T.R. and Lynch, J.P. (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorous availability. Plant Cell Envir. **19**, 529-538.
- 15) **Bevan, M.** (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nuc. Acids Res. **12**, 8711-8721.
- 16) Bieleski, R.L. and Ferguson, J.B. (1983) The physiology and metabolism of phosphate and ist compounds. In: Laeuchli, A., Bieleski, R.L. (eds.) Inorganic plant nutrition encyclopedia of plant physiology. New Series 15A, 422-449, Springer Verlag Berlin.
- 17) Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraktion procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523
- 18) Blackwell, T.K. and Weintraub, H. (1990) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revaled by binding site selection. Science 250, 1104-1110.
- Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl., A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.-A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L. and Smithies, O. (1977) Charon phages: safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. Science 196, 161.
- Blume, B. and Grierson, D. (1997) Expression of ACC oxidase promotor-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. Plant J. 12, 731-746.

- 21) **Bolan, N.S.** (1991) Critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. Plant Soil **134**, 189-207.
- 22) Bolle, C., Sopory, S., Lübberstedt, T., Herrmann, R.G. and Oelmüller, R. (1994) Segments encoding 5'-untranslated leaders of genes for thylakoid proteins contain *cis*-elements essential for transcription. Plant J. 6, 513-523.
- Bonas, U., Stall, R.E. and Staskawicz, B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. Mol. Gen. Genet. 218, 127-136.
- 24) Bonas, U., Conrads-Strauch, J. and Balbo, I. (1993) Resistance in tomato to Xanthomonas campestris pv. vesicatoria is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene avrBs3. Mol. Gen. Genet. 238, 261-269.
- 25) Bosse, D. and Köck, M. (1998) Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. Plant Cell Envir., im Druck.
- 26) Brears, T., Walker, E.L. and Coruzzi, G.M. (1991) A promoter sequence involved in cell-specific expression of the pea glutamine synthase GS3A gene in organs of transgenic tobacco and alfalfa. Plant J. 1, 235-244.
- 27) Broothaerts, W., Janssens, G.A., Proost, P. and Broekaert, W.F. (1995) cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. Plant Mol. Biol. 27, 499-511.
- Brown, I., Mansfield, J. and Bonas, U. (1995) hrp genes in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria determine ability to suppress papilla deposition in pepper mesophyll cells. MPMI 8, 825-836.
- 29) Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency transforming recA⁻ *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selektion. Biotechniques **5**, 376-379
- 30) Bustin, M., Lehn, D.A. and Landsman, D. (1990) Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. Biochim. Biophys. Acta 1049, 231-243.
- 31) Bustin, M. and Reeves, R. (1996) High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 54, 35-100.
- 32) Chung, I.-K., Ito, T., Tanaka, H., Ohta, A., Nam, H.G. and Takagi, M. (1994) Molecular diversity of three *S*-allele cDNAs associated with gametophytic self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. Plant Mol. Biol. **26**, 757-762.
- 33) Chung, I.-K., Lee, S.Y., Ito, T., Tanaka, H., Nam, H.G. and Takagi, M. (1995) The 5'flanking sequences of two *S* alleles in *Lycopersicon peruvianum* are highly heterologous but contain short blocks of homologous sequences. Plant Cell Physiol. **36**, 1621-1627.
- Clarke, L. and Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids repressentative of the entire E. coli genome. Cell 9, 91-99.
- 35) Clarke, A.E. and Newbigin, E. (1993) Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. Annu. Rev. Genet. 27, 257-279.
- 36) Coleman, C.E. and Kao, T.-h. (1992) The flanking regions of two *Petunia inflata S* alleles are heterogeneous and contain repetitive sequences. Plant Mol. Biol. 18, 725-737.
- 37) Costa, G.L., Sanchez, T.R. and Weiner, M.P. (1994) New chloramphenicol-resistant version of the pCR-Script[™] vector. Strategies **7**, 52.
- Creasy, C.L., Madden, S.L. and Bergmann, L.W. (1993) Molecular analysis of the PHO81 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl. Acids Res. 21, 1975-1982.
- 39) Cross, F. (1995) Transcriptional regulation by a Cyclin-cdk. Trends Genet. 11, 209-211.
- 40) Curtis, M.D., Rae, A.L., Rusu, A.G., Harrison, S.J. and Manners, J.M. (1997) A peroxidase gene promoter induced by phytopathogens and methyl jasmonate in transgenic plants. MPMI 10, 326-338.
- 41) Daniels, M.J., Barber, C.E., Turner, P.C., Sawczyc, M.K., Byrde, R.J.W. and Fielding, A.H. (1984) Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. campestris using the broad host range cosmid pLAFR1. EMBO J. **3**, 3323-3328.

- 42) **Daraselia, N.D., Tarchevskaya, S. and Narita, J.O.** (1996) The promoter for tomato 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reductase Gene 2 has unusual regulatory elements that direct high-level expression. Plant Physiol. **112**, 727-733.
- 43) **Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1983) A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. **1**, 19-21
- 44) **DeWitt, N.D., Harper, J.F. and Sussman, M.R.** (1991) Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. Plant J. **1**, 121-128.
- 45) Dietrich, A., Mayer, J.E. and Hahlbrock, K. (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. J. Biol. Chem. 265, 6360-6368.
- 46) **Dietz, K.H.** (1989) Leaf and chloroplast development in relation to nutrient availability. J. Plant Physiol. **134**, 544-550.
- 47) **Dinkelaker, B., Römheld, V. and Marschner, H.** (1989) Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). Plant Cell Envir. **12**, 285-292.
- 48) **Dinkelaker, B. and Marschner, H** (1992) *In vivo* demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. Plant Soil **144**, 199-205.
- 49) **Dobrowolski, B.** (1987) Molekulare Klonierung und Charakterisierung genomischer ribosomaler DNA einer Zellsuspensionskultur von *Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus. Dissertation A. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 50) **Dodds, P.N., Clarke, A.E. and Newbigin, E.** (1996a) Molecular characterisation of an S-like RNase of *Nicotiana alata* that is induced by phosphate starvation. Plant Mol. Biol. **31**, 227-238.
- 51) Dodds, P.N., Clarke, A.E. and Newbigin, E. (1996b) A molecular perspective on pollination in flowering plants. Cell 85, 141-144.
- 52) **Duff, S.M.G., Moorhead, G.B.G., Lefebvre, D.D. and Plaxton, W.C.** (1989) Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. Plant Physiol. **90**, 1275-1278.
- Duff, S.M.G., Sarath, G. and Plaxton, W.C. (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. Physiol. Plant. 90, 791-800.
- 54) Elmayan, T. and Tepfer, M. (1995) Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rolD* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S² promoter. Transgenic Res. 4, 388-396.
- 55) Ezaki, B., Yamamoto, Y. and Matsumoto, H. (1995) Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminium treatment and P_i starvation in cultured tobacco cells. Physiol. Plant. 93, 11-18.
- 56) Farkas, G.L. (1982) Ribonucleases and ribonucleic acid breakdown. In: Parthier, B., Boulter, D. (eds.) Encyclopedia of Plant Physiology. New Series 14B, 224-262, Springer Verlag Berlin.
- 57) **Favrey, D., Ngai, P.K. and Timmis, K.N.** (1993) Relatedness of a periplasmatic, broad-specificity RNase from *Aeromonas hydrophila* to RNase I of *Escherichia coli* and to a family of eukaryotic RNases. J. Bacteriol. **175**, 3710-3722.
- 58) Fisher, F. and Goding, C.R. (1992) Single amino acid substitutions alter helix-loop-helix protein specificity for base flanking the core CANNTG motif. EMBO J. 11, 4103-4109.
- 59) Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C.A., Gocayne, J.D., Scott, J.D., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. and Venter, L.C. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269, 496-512.
- 60) **Forde, B.G.** (1994) AT-rich elements (ATREs) in the promoter region of nodulin and other higher plant genes: a novel class of *cis*-acting regulatory element? In: Nover, L. (ed.) Plant promoters and transcription factors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- 61) Frohman, M. A. (1993) Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of fulllength complementary DNAs: Thermal RACE. Methods in Enzymology 218, 340-356.
- 62) Galiana, E., Bonnet, P., Conrod, S., Keller, H., Panabieres, F., Ponchet, M., Poupet, A. and Ricci, P. (1997) RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitin. Plant Physiol. 115, 1557-1567.
- 63) Gasser, K.D. (1995) Plant chromosomal high mobility group (HMG) proteins. Plant J. 7, 185-192.
- 64) Glund, K., Nürnberger, T., Abel, S., Jost, W., Preisser, J. and Komor, E. (1990) Intracellular Pi compartimentation during phosphate starvation-tiggered induction of an extracellular ribonuclease in tomato cell culture. In: Nijkamp, H.J.J., van der Plas, L.W.H., van Aartrijk, J. (eds.) Progress in plant cellular and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Boston, 338-342.
- 65) **Glund, K. and Goldstein, A.H.** (1993) Regulation, synthesis and excretion of a phosphate starvation inducible RNase by cultured tomato cells. In: Verma, D. P. S., (ed) Controll of the plant gene expression. CRC press, Boca Raton, 311-323.
- 66) Goldstein A.H., Baertlein, D.A. and McDaniel, R.G. (1988a) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. I. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension-cultured cells. Plant Physiol. 87, 711-715
- 67) Goldstein, A.H., Danon, A., Baertlein, D.A. and McDaniel, R.G. (1988b) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. II. Characterization of the phosphate starvation inducible-excreted acid hosphatase. Plant Physiol. 87, 716-720
- 68) Goldstein, A.H., Baertlein, D.A. and Danon, A. (1989) Phosphate starvation stress as an experimental system for molecular analysis. Plant Mol. Biol. Rep. 7, 7-16
- 69) Green, P.J., Young, M.-H., Cuozzo, M., Kano-Murakami, Y., Silverstein, P. and Chua, N.-H. (1988) Binding site requirements for pea nuclear protein factor GT-1 correlate with sequences required for light-dependent transcriptional activation of the *rbcS-3A* gene. EMBO J. 7, 4035-4044.
- 70) Green, P.J. (1994) The ribonucleases of higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Biol. 45, 421-445.
- 71) **Greenberg, M.E. and Belasco, J.G.** (1993) Control of the decay of labile protooncogene and cytokine mRNAs. In: Belasco, J.G., Brawerman, G. (eds.) Control of messenger RNA stability. Academic, New York, pp. 199-218.
- 72) Hatton, D., Sablowski, R., Yung, M.-H., Smith, C., Schuch, W. and Bevan, M. (1995) Two classes of *cis* sequences contribute to tissue-specific expression of a *PAL*2 promoter in transgenic tobacco. Plant J. **7**, 859-876.
- 73) Haufe, K.D., Lee, S.P., Subramaniam, R. and Douglas, C.J. (1993) Combitorial interactions between positive and negative cis-acting elements control spatial pattern of 4CL-1 expression in transgenic tobacco. Plant J. 4, 235-253.
- 74) Hawkesford, M. J. and Blecher, A. R. (1991) Differential protein synthesis in response to sulphate and phosphate deprivation: Identification of possible components of plasmamembrane transport systems in cultured tomato roots. Planta 185. 323-329
- 75) Hayashi, N. and Oshima, Y. (1991) Specific cis-acting sequences for PHO8 expression interacts with Pho4 protein, a positiv regulatory factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **11**, 785-794.
- 76) Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J., Mauch, F. and Dudler, R. (1991) Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Mol. Biol. 16, 171-174.
- 77) **Hime, G., Prior, L. and Saint, R.** (1995) The *Drosophila melanogaster* genome contains a member of the Rh/T₂/S-glycoprotein family of ribonuclease-encoding genes. Gene **158**, 203-207.
- 78) Hirst, K., Fisher, F., McAndrew, P.C. and Goding, C.R. (1994) The transcription factor, the Cdk, ist cyclin and their regulator: directing the transcriptional response to a nutritional signal. EMBO J. 13, 5410-5420.
- 79) Höfgen, R. and Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucl. Acids Res. 16, 9877

- 80) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoot, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303, 179-180.
- 81) Horiuchi, H., Yanai, K., Tagaki, M., Yano, K., Wakabayashi, E., Sanda, A., Mine, S., Ohgi, K. and Irie, M. (1988) Primary structure of a base non-specific ribonuclease from *Rhizopus niveus*. J. Biochem. 103, 408-418.
- 82) Huang, S., Lee, H.-S., Karunanandaa, B. and Kao, T.-h. (1994) Ribonuclease activity of *petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. Plant Cell 6, 1021-1028.
- 83) Hulst, M.M., Himes, G., Newbigin, E. and Moormann, R.J.M. (1994) Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: Expression in insect cells and identification as a ribonuclease. Virology 200, 558-565.
- 84) Ide, H., Kimura, M., Arai, M. and Funatsu, G. (1991) The complete amino acid sequence of ribonuclease from the seeds of bitter gourd (*Momordica charantia*). FEBS Lett. 284, 161-164.
- 85) Inada, Y., Watanabe, H., Oghi, K. and Irie, M. (1991) Isolation, characterisation, and primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease with higher specific activity from *Trichoderma viride*. J. Biochem. 110, 896-904.
- 86) Ioerger, T.R., Clark, A.G. and Kao, T.-h. (1990) Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9732-9735.
- 87) Jakobek, J.L. and Lindgren, P.B. (1993) Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. Plant Cell 5, 49-56.
- Jakobek, J.L., Smith, J.A. and Lindgren, P.B. (1993) Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. Plant Cell 5, 57-63.
- 89) Jang, J.-C. and Sheen, J. (1994) Sugar sensing in higher plants. Plant Cell 6, 1665-1679.
- 90) Janssens, G.A., Goderis, I.J., Broekaert, W.F. and Broothaerts, W. (1995) A molecular method for *S*-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theor. Appl. Genet. **91**, 691-698.
- 91) Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6, 3901-3907.
- 92) Jefferson, R.A. and Wilson, K.J. (1991) The GUS gene fusion system. In: Stanton, B.G., Schilperoort, R.A. (eds.) Plant Molecular Biology Manual B14, Kluwer Academic Publishers.
- 93) Jerpseth, B., Greener, A., Short, J.M., Viola, J. and Kretz, P.L. (1992) XL1-blue MRF' E. coli cells: McrA⁻, McrCB⁻, McrF⁻, Mrr⁻, HsdR⁻ derivative of XL1-blue cells. Stratagies 5, 81-82
- 94) Johnson, J.F., Allan, D.L. and Vance, C.P. (1994) Phosphorus stress-induced proteoid roots show altered metabolism in *Lupinus albus*. Plant Physiol. **104**, 657-665.
- 95) Joshi, C.P. (1987) An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. Nucl. Acids Res. 15, 6643-6653.
- 96) Jost, W., Bak, H., Glund, K., Terpstra, P. and Beintema, J.J. (1991) Amino acid sequence of an extracellular, phosphate-starvation-induction-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. Eur. J. Biochem. **198**, 1-6.
- 97) Kao, T.-h. and Huang, S. (1994) Gametophytic self-incompatibility: a mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction. Plant Physiol. 105, 461-466.
- 98) Kao, T.-h. and McCubbin, A.G. (1997) Molecular and biochemical bases of gametophytic selfincompatibility in Solanaceae. Plant Physiol. Biochem. 35, 171-176.
- 99) Kaufmann, H., Salamini, F. and Thompson, R.D. (1991) Sequence variability and gene structure at the self-incompatibility locus *Solanum tuberosum*. Mol. Gen. Genet. **226**, 457-466.
- 100) Kawata, Y., Sakiyama, F. and Tamaoki, H. (1988) Amino-acid sequence of ribonuclease T₂ from Aspergillus oryzae. Eur. J. Biochem. 176, 683-697.
- 101) Kawata, Y., Sakiyama, F., Hayashi, F. and Kyogoku, Y. (1990) Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T₂ from Aspergillus oryzae. Eur. J. Biochem. 187, 255-262.

- 102) Keller, B. and Baumgartner, C. (1991) Vascular-specific expression of the bean Grp-1.8 gene is negatively regulated. Plant Cell 3, 1051-1061.
- 103) Klein, T.M., Gradziel, T., Fromm, M.E. and Sandford, J.C. (1988) Factors influencing gene delivery into Zea mays cells by high-velocity microprojectiles. Biol. Technology 6, 559-563.
- 104) Köck, M., Löffler, A., Abel, S. and Glund, K. (1995) cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. Plant Mol. Biol. 27, 477-485.
- 105) Köck, M., Theierl, K., Stenzel, I. and Glund, K. (1998) Extrazellular administration of phosphatesequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. Planta **204**, 404-407.
- 106) Kurihara, H., Mitsui, Y., Ohgi, K., Irie, M., Mizuno, H. and Nakamura, K.T. (1992) Crystal and molecular structure of RNase Rh, a new class of microbial ribonuclease from *Rhizopus niveus*. FEBS Lett. **306**, 189-192.
- 107) Lam, E. and Chua, N.-H. (1989) ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaik virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. Plant Cell 1, 1147-1156.
- 108) Lam, E. and Chua, N.-H. (1990) GT-1 binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. Science 248, 471-474.
- 109) Lanahan, M.B., Ho, T., Rodgers, S.W. and Rodgers, J.C. (1992) A gibberellin response complex in cereal α-amylase gene promoters. Plant Cell 4, 203-211.
- 110) Lawton, M.A., Dean, S.M., Dron, M., Kooter, J.M., Kragh, K.M., Harrison, M.J., Yu, L., Tanguay, L., Dixon, R.A. and Lamb, C.J. (1991) Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor, SBF-1, closely related to GT-1. Plant Mol. Biol. 16, 235-249.
- 111) Lee, H.-S., Singh, A. and Kao, T.-h. (1992) RNase X2, a pistil-specific ribonuclease from *Petunia inflata*, shares sequence similarity with solanceous S proteins. Plant Mol. Biol. **20**, 1131-1141.
- 112) Lefebvre, D.D., Duff, S.M.G., Fife, C.A., Julien-Inalsingh, C. and Plaxton, W.C. (1990) Response to phosphorus deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Plant Physiol. **93**, 504-511.
- 113) Lefrancois, C., Chupeau, Y. and Bourgin, J.P. (1993) Sexual and somatic hybridization in the genus *Lycopersicon*. Theor. Appl. Genet. **86**, 533-546.
- 114) Leggewie, G., Willmitzer, L. and Riesmeier, J.W. (1997) Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake deficient yeast mutant: Identification of phosphate transporters from higher plants. Plant Cell 9, 381-392.
- 115) Lenburg, M.E. and O'Shea, E.K. (1996) Signaling phosphate starvation. TIBS 21, 383-387
- 116) Lers, A., Khalchitski, A., Lomaniec, E., Burd, S. and Green, P.J. (1998) Senescence-induced RNases in tomato. Plant Mol. Biol. **36**, 439-449.
- 117) Li, X. and Ashihara, H. (1990) Effects of inorganic phosphate on sugar catabolism by suspensioncultured *Catharanthus roseus*. Phytochemistry **29**, 497-500.
- 118) Ling. H.-Q., Kriseleit, D. and Ganal, M.W. (1998) Effect of tricarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Ly-copersicon esculentum* Mill.) Plant Cell Rep., im Druck
- 119) Liu, C., Muchal, U.S. and Raghothama, K.G. (1997) Differential expression of TPSI1, a phosphate starvation-induced gene in tomato. Plant Mol. Biol. 33, 867-874.
- 120) Liu, C., Muchal, U.S., Uthappa, M., Kononowicz, A.K. and Raghothama, K.G. (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. Plant Physiol. 116, 91-99.
- 121) Löffler, A., Abel, S., Jost, W., Beintema, J.J. and Glund, K. (1992) Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. Plant Physiol. 98, 1472-1478.
- 122) Löffler, A. (1993) Pho-Regulation in höheren Pflanzen: Reinigung, Charakterisierung und Sequenzierung intrazellulärer Ribonukleasen. Dissertation A, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- 123) Löffler, A., Glund, K. and Irie, M. (1993) Amino acid sequence of an intracellular, phosphatestarvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. Eur. J. Biochem. 214, 6627-633.
- 124) Lombardo, A.J. and Brown, G.B. (1996) A quantitative and specific method for measuring transcript levels of highly homologous genes. Nucl. Acids Res. 24, 4812-4816.
- 125) Loughman, B.C., Ratcliffe, R.G. and Schwabe, J.W.R. (1989) Galactose metabolism in Zea mays root tissues observed by ³¹P-NMR spectroscopy. Plant Sci. 58, 11-23.
- 126) Lowry, H.O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
- 127) Luehrsen, K.R. and Walbot, V. (1993) Firefly luciferase as a reporter for plant gene expression studies. Promega Notes 44, 24-29.
- 128) Lütcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F. and Scheele, G.A. (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. EMBO J. 6, 43-48.
- 129) Lynch, J. (1995) Root architecture and plant productivity. Plant Physiol. 109, 7-13.
- 130) Makino, K., Amemura, M., Kawamoto, T., Kimura, S., Shinagawa, H., Nakata, A. and Suzuki, M. (1996) DNA binding of PhoB and ist interaction with RNA polymerase. J. Mol. Biol. 259, 15-26.
- 131) Malboobi, M.A. and Lefebvre, D.D. (1995) Isolation of cDNA clones of genes with altered expression levels in phosphate-starved *Brassiga nigra* suspension cells. Plant Mol. Biol. 28, 859-870.
- 132) **Malboobi, M.A. and Lefebvre, D.D.** (1997) A phosphate-starvation inducible β -glucosidase gene (*psr*3.2) isolated from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family. Plant Mol. Biol. **34**, 57-68.
- 133) Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Conell, C., Quon, D., Sim, G.K. and Efstratiadis, A. (1978) The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell 15, 687
- 134) **Maniatis, T., Sambrock, J., Fritsch, E.F.** (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 135) **Maniatis, T., Sambrock, J., Fritsch, E.F.** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 136) Marschner, H. (1986) Mineral nutrition in higer plants. Vol. 1, Academic Press London.
- 137) Marschner, H. (1995) Mineral nutrition in higer plants. 2nd edn., Academic Press London.
- 138) Martin, A., Auger, E.A., Blum, P.H. and Schultz, J.E (1989) Genetic basis of starvation survial in nondifferentiating bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 43, 293-316.
- 139) Matton, D.P., Mau, S.-L., Okamoto, S., Clarke, A.E. and Newbigin, E. (1995) The S-locus of Nicotiana alata: genomic organisation and sequence analysis of two S-RNase alleles. Plant Mol. Biol. 28, 847-858.
- 140) Mau, S.-L., Williams, E.G., Atkinson, A., Anderson, M.A., Cornish, E.C., Grego, B., Simpson, R.J., Kheyr-Pour, A. and Clarke, A.E. (1986) Style proteins of a wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*) associated with expression of self-incompatibility. Planta 169, 184-191.
- 141) McClure, B.A., Du, H., Liu, Y.-H. and Clarke, A.E. (1993) S-locus products in Nicotiana alata pistils are subject to organ-specific post-transcriptional processing but not post-translational processing. Plant Mol. Biol. 22, 177-181.
- 142) Meador III, J. and Kennell, D. (1990) Cloning and sequencing the gene encoding *Escherichia coli* ribonuclease I: exact physical mapping using the genome library. Gene **95**, 1-7.
- 143) Menkens, A.E., Schindler, U. and Cashmore, A.R. (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. TIBS 20, 506-510.
- 144) Mimura, T., Sakano, K. and Shimmen, T. (1996) Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. Plant Cell Envir. 19, 311-320.
- 145) Mimura, T. (1995) Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. Plant Cell Physiol. 36, 1-7.

- 146) Miner, J.N. and Yamamoto, K.R. (1991) Regulatory crosstalk at composite response elements. TIBS 16, 423-427.
- 147) Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Whalen, M.C., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, J.B. and Stall, R.E. (1990) Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria-pepper interactions. MPMI 3, 41-47.
- 148) Muchhal, U.S., Pardo, J.M. and Raghothama, K.G. (1996) Phosphate transporters from the higer plant *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 10519-10523.
- 149) Myöhänen, S. and Wahlfors, J. (1993) Primer extension on ALF. BioTechniques 14, 16-17.
- 150) Newbigin, E., Anderson, M. A. and Clarke, A. E. (1993) Gametophytic self-incompatibility systems. Plant Cell 5, 1315-1324.
- 151) Newbigin, E. (1996) The evolution of self-incompatibility: A molecular voyeur's perspective. Sex. Plant Reprod. 9, 357-361.
- 152) Newman, T.C., Ohme-takagi, M., Taylor, C.B. and Green, P.J. (1993) DST sequences, highly conserved among plant *SAUR* genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. Plant Cell. 5, 701-714.
- 153) Norioka, N., Norioka, S., Ohnishi, Y., Ishimizu, T., Oneyama, C., Nakanishi, T. and Sakiyama, F. (1996) Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding S-allele specific stylar RNases in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of japanese pear, Pyrus pyrifolia Nakai. J. Biochem. 120, 335-345.
- 154) Nover, L., Kranz, E. and Scharf, K.D. (1982) Growth cycle of suspension cultures of *Lycopersicon* esculentum und *L. Peruvianum*. Biochem. Physiol. Pflanzen 177, 483-499.
- 155) Nürnberger, T., Abel, S., Jost, W. and Glund, K. (1990) Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation. Plant Physiol. 92, 970-976.
- 156) Nürnberger, T. (1991) Phosphatregulierte Induktion einer extrazellulären Ribonuclease in kultivierten Tomatenzellen (*Lycopersicon esculentum*). Dissertation A, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 157) Ogawa, N., Sitoh, H., Miura, K., Paolo, J., Magbanua, V., Bun-ya, M., Harashima, S. and Oshima, Y. (1995) Structure and distribution of specific *cis*-elements for transcriptional regulation of *PHO84* in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 249, 406-416.
- 158) Ohme-Takagi, M., Taylor, C.B., Newman, T.C. and Green, P.J. (1993) The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11811-11815.
- 159) Oshima, Y. (1982) Regulatory circuits for gene expression: The metabolism of galactose and Phosphate. In: Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R. (eds.) The molecular biology of the yeast Saccaromyces-Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory
- 160) Ozanne, P.G. (1980) Phosphate nutrition of plants A general treatise. In: Khasawneh, E., Sample, E. C., Kamprath, E. J. (eds.) The role of phosphorus in agriculture. ASA Publication Vol. 1, 559-585, Madison.
- 161) Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448.
- 162) Pedersen, T.J., Arwood, L.J., Spiker, S., Guiltinan, M.J. and Thompson, F. (1991) High mobility group chromosomal proteins bind to AT-rich tracts flanking plant genes. Plant Mol. Biol. 16, 95-104.
- 163) Pen, J., van Ooyem, A.J.J., van den Elzen, P.J.M., Rietveld, K. and Hoekema, A. (1992) Direct screening for high-level expression of an introduced α -amylase gene in plants. Plant Mol. Biol. **18**, 1133-1139.
- 164) **Prentki, P. and Kirsch, H.M.** (1984) *In vitro* insertion mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene **29**, 303-313.
- 165) Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nuc. Acids Res. 23, 4878-4884.

- 166) Reinbothe, C., Tewes, A., Luckner, M. and Reinbothe, S. (1992) Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. Plant J. 2, 917-926.
- 167) Rick, C.M., Laterrot, H. and Philouze, J. (1990) A revised key for the *Lycopersicon* species. Tomato Genet. Coop. Rep. 40, 31.
- 168) **Rivers, B.A., Bernatzky, R., Robinson, S.J. and Jahnen-Dechent, W.** (1993) Molecular diversity at the self-incompatibility locus is a salient feature in natural populations of wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*). Mol. Gen. Genet. **238**, 419-427.
- 169) Roeder, R.G. (1996) The role of general initiation factors in transcription RNA polymerase II. TIBS 21, 327-335.
- 170) Royo, J., Kowayama, Y. and Clarke, A.E. (1994) Cloning and nucleotide sequence of two S-RNases from *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. Plant Physiol. 105, 751-752.
- 171) Saba-El-Leil, M.K., Rivard, S., Morse, D. and Cappadocia, M. (1994) The S11 and S13 selfincompatibility alleles in *Solanum chacoense* Bitt. are remarkably similar. Plant Mol. Biol. 24, 571-583.
- 172) Sadka, A., DeWald, D.B., May, G.D., Park, W.D. und Mullet, J.E. (1994) Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar-inducible genes. Plant Cell 6, 737-749.
- 173) Sanger, F., Miklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA-sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- 174) Schachtman, D.P., Reid, R.J. and Ayling, S.M. (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant Physiol. 116, 447-453.
- 175) Schledzewski, K. and Mendel, R.R. (1994) Quantitative transient gene expression: comparison of the promoters for maize polyubiquitin1, rice actin1, maize-derived *Emu* and CaMV 35S in cells of barley, maize and tobacco. Transgenic Res. **3**, 249-255.
- 176) Schmidt, M.-E., Heim, C., Wylegalla, C., Helmbrecht, C. und Wagner, K.G. (1992) Charakterisation of phosphate uptake by suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. J. Plant Physiol. 140, 179-184.
- 177) Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E. and Thiel, H.-J. (1993) Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. Science **261**, 1169-1171.
- 178) Schumann, H. (1995) Klonierung genomischer Sequenzen der intrazellulären RNase LX aus Tomate. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 179) Sessa, G., Morelli, G. and Ruberti, I. (1993) The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. EMBO J. 12, 3507-3517.
- 180) Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A. (1987) Structure and function of the regulatory genes for the phosphate regulon in *Escherichia coli*. In: Torriani-Gorini, A., Rothman, F.G., Silver, S., Wright; A., Yagil, E. (eds.) Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. American Society for Microbiologie, Washington, D.C., 20-25
- 181) Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. and Huse, W.P. (1988) λ-ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo-excision properties. Nucl. Acids Res. 16, 7583-7600.
- 182) Simpson, G.G. and Filipowicz, W. (1996) Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. Plant Mol. Biol. 32, 1-41.
- 183) Smith, F.W., Ealing, P.M., Dong, E. and Delheize, E. (1997) The cloning of two Arabidopsis genes belonging to a phosphate transporter family. Plant J. 11, 83-92.
- 184) Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences amoung DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517
- 185) **Stenzel, I.** (1993) Klonierung genomischer Sequenzen einer extrazellulären RNase (RNase LE) aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus). Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- 186) Struhl, K. (1985) Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8419-8423.
- 187) Tadano, T., Ozawa, K., Sakei, H., Osaki, M. and Matsui, H. (1993) Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. Plant Soil 155/156, 95-98.
- 188) Tanksley, S.D., Ganal. M.W., Prince, J.P., de Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Miller, L., Paterson, A.H., Pineda, O., Röder, M.S., Wing, R.A., Wu, W. and Young, N.D. (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132, 1141-1160.
- 189) Taylor, C.B., Bariola, P.A., DelCardayre, S.B., Raines, R.T. und Green, P.J. (1993) RNS2: A senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5118-5122.
- 190) Tewes, A., Glund, K., Walter, R. and Reinbothe, H. (1984) High yield isolation and recovery of protoplasts from suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Z. Pflanzenphysiol. 113, 141-150
- 191) **Theierl, K.** (1991) Manipulation intrazellulärer Phosphatpools und die Induktion einer extrazellulären RNase in Tomatenzellsuspensionskulturen (*Lycopersicon esculentum*). Dipolmarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 192) **Theodorou, M.E. and Plaxton, W.C.** (1993) Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. Plant Physiol. **101**, 339-344.
- 193) Töpfer, R., Pröls, M., Schell, J. and Steinbiß, H-H. (1988) Trancient gene expression in tobacco protoplasts: II. Comparison of the reporter gene systems for CAT, NPT II, and GUS. Plant Cell Rep. 7, 225-228.
- 194) **Torres-Schumann, S., Ringli, C., Heierli, D., Amrhein, N. and Keller, B.** (1996) *In vitro* binding of the tomato bZIP transcriptional activator VSF-1 to a regulatory element that controls xylem-specific gene expression. Plant J. **9**, 283-296.
- 195) **Torriani,A., Ludtke, D.N.** (1985) The Pho regulon of *Escherichia coli*. In: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Kjelgaard, N.O. (eds.) The molecular biology of bacterial growth. Boston, Jones and Bartlett Publishers, Inc, 224-242.
- 196) **Trubia, M., Sessa, L. and Taramelli, R.** (1997) Mammalian Rh/T₂/S-glycoprotein ribonuclease family genes: Cloning of a human member located in a region of chromosome 6 (6q27) frequently deleted in human malignancies. Genomics **42**, 342-344.
- 197) Tsai, D.-S., Lee, H.-S., Post, L.C., Kreiling, K.M. and Kao, T.-h. (1992) Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. Sex. Plant Reprod. 5, 256-263.
- 198) **Tscheudschilsuren, G.** (1994) Untersuchungen zur Expression der RNasen in Tomatenkeimlingen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 199) Vogel, K., Horz, W. and Hinnen, A. (1989) The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with PHO5 upstream activation regions. Mol. Cell. Biol. 9, 2050-2057
- 200) Watanabe, H., Naitoh, A., Suyama, Y., Inokuchi, N., Shimada, H., Koyama, T. and Irie, M. (1990) Primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from Aspergillus saitoi. J. Biochem. 108, 303-310.
- 201) Watanabe, H., Narumi, H., Inaba, T., Ohgi, K. and Irie, M. (1993) Purification, some properties, and primary structure of a base non-specific ribonuclease from oyster (*Crussdstrea grigus*). J. Biochem. 114, 800-807.
- 202) Wengelnik, K. and Bonas, U. (1996) HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **178**, 3462-3469.
- 203) Wilson, C.M. (1975) Plant nucleases. Annu. Rev. Plant Physiol. 26, 187-208.

- 204) Wilson, C.M. (1982) Plant nucleases. Biochemistry and development of multiple molecular forms. In: Ratazzi, M. C., Scandalios, J. G., Whitt, G.S. (eds.) Isoenzymes: Curr. Top. Biol. Med. Res. 6, 33-54.
- 205) Xue, Y., Carpenter, R., Dickinson, H.G. and Coen, E.S. (1996) Origin of allelic diversity in Antirrrhinum S locus RNases. Plant Cell 8, 805.814.
- 206) Yang, N.S. and Russel, D. (1990) Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem cell-specific expression of GUS gene in transgenic tobacco plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4144-4148.
- 207) Ye, Z.-H. and Droste, D.L. (1996) Isolation and characterisation of cDNAs encoding xylogenesisassociated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. Plant Mol. Biol. **30**, 697-709.
- 208) Yin, Y., Chen, L. and Beachy, R. (1997) Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice. Plant J. 12, 1179-1188.
- 209) Yoshida, K., Kuromitsu, Z., Oogawa, N. and Oshima, Y. (1989a) Mode of expression of the positive regulatory genes PHO2 and PHO4 of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 217, 31-39.
- 210) Yoshida, K., Ogawa, N. and Oshima, Y. (1989b) Function of the PHO regulatory genes for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. **217**, 40-46.
- 211) Zilversmismit, D.B. et al. (1950) J. Lab. Clin. Med. 35, 155.

Anhang 1: Genomische Sequenz der RNase LE mit 2668 bp upstream des Translationsstartkodons gelegener Sequenz. Die Aminosäuresequenz wurde im Vergleich mit der cDNA-Sequenz der RNase LE (KÖCK et al., 1995) abgeleitet. Der Klon pgLE5' enthält das *SacI/XbaI*-Fragment und der Klon pgLE3' das *XbaI/SalI*-Fragment. Signifikante Merkmale, wie TATA-Boxen, Transkriptionsstartpunkte, Translationsstartpunkt, Stop-Kodon, Poly(A)-Signal und Polyadenylierungsstelle sowie ausgewählte Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet. Die Intronsequenzen wurden kleingedruckt dargestellt. Die Zahlen auf der linken Seite geben die Nukleotidposition bezogen auf den Haupttranskriptionsstartpunkt (Startpunkt I, vgl. Kap. 4.3.2.1.) an. Auf der rechten Seite wurde die Position der Aminosäuren bezogen auf die Numerierung im reifen Protein angegeben.

Ecl136II (SacI)

- 2621	GAGCTCACTGCAAATGTGTGGTATTTTTCTTGATTAATTGTGGGCGTAATACATAAAT
- 2563	ATGCCATTAATTTGACTTCAGTTCACGTTTGTGTCCTCCAACTTTGGGTACGCATAAAAT
- 2503	TGAAGGAAATCAATGTGTAAATAAGGTTAAGTTAAAAGAGCACTTATGTGTTATGCCATT
- 2443	AATTGTGTCTGACAAGCATTTACCATCTTATTTATCAGTCTCTAATATTTTTTACATTT
- 2383	TAAAAAAAGTTGCACAAATCTCCTTTCGGATACATCTCTATCAACTCTCGGATGATGCAT
- 2323	TTTCTTATCCTATACATTCCTCTCATTAAGTAATGTATTATTCGTAATAGCTATGTATTC
- 2263	ACAGGTTTCTTGCCCAAATGCAACCAAAAAATGGCATAGTATGACAACCTTTGCTTATCT
- 2203	TGTGGTCCTTCAAAATCAAAATTAACTTATAAGGCAAAACTCGATAAATTTAAAGTTCTA
- 2143	TTCATGAAGCAAGTAATGTCAAAAATTGAAAATCATTCAT
- 2083	AATATAAATCAAAAACATGAGTTGACCAACCTTTGCGCAGGGATTAGATAATGACCATTC
- 2023	GTTATTATGACCCGTCTAAATTCAACCAAGATTATTCATTTGCCGCACGTAGCCTCTTGT
- 1963	ATTTTGTCCTAAGCATCTTTTTTATCCCATGCTTTTATAAAGGAAAAATAAAATTAATGG
- 1903	ATACCACACAAATTGCAATGCCTTGTTTCTTTTTTTTTT
- 1843	GTGACATGAGTTTTGAGAGCATATTGACATCTATATATTGAAATTTAAACTATAGTACCG
- 1783	GAAATAAAGAATTTTGCGTCAATTATTGCACGATAATAATTATAATTATTTGTAATTATG
- 1723	ATAACAATAATAAACAAATATAATTATTATAATCAATACACTATATAATA
- 1663	ACTTTAGTGATCGTGAAAACAAACATACAAGTTTTACATCAACACGTACCTAAAAGATTG
- 1603	GTTTGTATATAGTTCAATTTGGTCAAATGTGGATTGGTACATTTTTATTATTGGCTATGA
- 1543	CAATGCCGTGGTGCAATAGAACATTAGTTGTCACGATATAATGAATTTTTTTAAAATATA
- 1483	TTTTTACAATCTAGTGTAATGATTTTTTTACATAATCCATTAATGTAATTTAGTTTGTTA
- 1423	CAATAGATTACTTATGTAGTTATGTTTATTAATTCTAGGCTATGAACCATGCTAGTATTG
- 1363	AATAGAGTTATCTAGGATTATATTTTTAAGTGATCTGATTGTAAAAATATTTATACATCA
- 1303	TCTATGTAAAAGTTAATTTTATTTAATTTAAATTTAAAAATAAT
- 1243	TGAAATCATATAAATAAAAAAGATGTGAAAGAAAGTTGTCTATAGGCCTAAAAGGTCCTG
- 1183	GTATAGGTATGTGTTGCTTTGTCTACTCTTCCTTGTGTTCACATACAATCCCTTAAATT
- 1123	GTCTAATTTTTTCGTAAAAAAATTACATTATATTAAGTTCTGAATCCTACTTTAATATC
- 1063	GGGGTCGAAGGGTTTGGAATTTAGCTCAATATACAATATCAGTATGAACTGAAACTCAAT
- 1003	TGTAAGAATTATGGGGAGGTATGGAGAGCATATTAATTATTATAATATAGATATAATGAA
- 943	CAATTCATTCATGAGAGAAGTATAAATGTGAAATCGACAGTGGCCAATAATTCAATTAAT <i>Nde</i> I
- 883	CAAGACTTAAAAATAAATAATTAAAACATCACACATGTTGCATTCATATGAACCGTTTT
- 823	ATTTTATTTATTTAATTAACACTATATAATAATAATAATGAACTCAATAATTAGTTCC
- 763	TTAATTTTATTTAAATTATCTGTTTGTTGCACGTCTCTTACAAAACATTATTTTCATAAA
- 703	ATCAATGCATAAATTATCGTTCTTTTTTTTTTTTTATAGGTTATTAGCCTTGAAAATATACA
- 643	TTTGACCAACTTAGAAAAACCAATCATGTTTATTTGTTAAATTAATT
- 583	TAACTCGTATTCATTAACTGATAACTTGAGTTTCAAAAAAATTAAATAACGATAGAAGA
- 523	ATAAGTCAAATTAGAAATGGGACGGCGAGAGTAATACTTAGAAGGTGTTTCTTCATTATT
- 463	ТСАӨССТСАТТТАТСТТАСАСТТТТААААТААТТААААТААТАА
- 403	AATCATGAAAAATAATTTAAATCTGAGCGTGTTTTAGTGTGTAATATGCTTAATACAAAT
- 343	AACTAACATTATTGACAACTTTCCATCTTCCAAGATTTGAGAAAAGGTTCTATAAAAGGA
- 283	ATAAAATTAAAAATGTTTCCTTAAAATCAGCCCAAATCAACATATTAAAATAACATTATT
- 223	ATTATTATATTATTGTACTAAATATACTTTAGAATATACCAAAAATCAATAATTGGCATCT
162	TATA-Box-ähnliche Sequenz
- 103	IAIUAAIIGTGTUAACATUAAAAAUAU Transkrintionsstartnunkt II

- 103 **A**TTATATCAAGCTCCTCAATTTCACACTTTAAAAAGTTAGACTTTTCACATCTTTCATTT

	TATA-Box Transkriptionsstartpunkt I	
- 43	ATTATTTTTTCC TATAAAT AAAACCCCCAAAATCACTTTATC A AATCACTACCAATACA	
18	AAAAAAAATAATTTTTTTTTACAAGAAAAAAAAAAAA	
	MASNSAFSLF	- 25
78	TTGATTTTGTTAATTATTACACAATGTTTATCAGTCCTCAATGCTGCTAAAGATTTTGAC	
	L I L I I T Q C L S V L N A A K D F D	5
138	~ TTTTTCTACTTTGTTCAACAGqtacacatttaatttttttqattqattcaaattctttta	
	FFYFVOO	12
198		12
258		
230		23
318		23
510		12
270		43
3/8	AATAATAATGATGGGGACTTATCCATCAAATTGTGATCCAAACAGTCCTTATGACCAATCT	(2)
	N N N D G T Y P S N C A P N S P Y D Q S	63
438	CAGgtattcaatat <u>tctaga</u> aacatagtctcattctaattgatgttaccagagtcgaatt	64
100		04
470 559		
558		
018		
6/8	gaaggcaaggggtttaaagtacaaggttcacaactatgacaaaatgatatttttgttg	
738	ttatacatgaatagttgaatctcgttagggtaagaatatattcattggttcaattgagtt	
798	tccttcgccgaaaaattataccgcatatatatgacaaaaatgaattttcttgattagatt	
858	atgaatggttgaatteettgatataagaaaagaetagtgtaetataaaeaaggtteaagt	
918	ttttctttagatcataagttcaactcataggtgtgaattgtcatggttcaacatttattt	
978	${\tt gaaattcctcgtatgaatttctgatttcgttactacctatttataagtttttgaattgac$	
1038	tcgacagATTTCTGACTTAATTAGTAGTATGCAACAAAATTGGCCAACACTAGCGTGCCC	
	I S D L I S S M Q Q N W P T L A C P	82
1098	AAGTGGTAGTGGCTCAACATTTTGGTCACATGAATGGGAAAAGCATGGCACTTGTGCTGA	
	SGSGSTFWSHEWEKHGTCAE	102
1158	ATCCGTTCTCACAAACCAACACGCTTATTTTAAGAAGGCTCTTGATCTCAAGAATCAAAT	
	S V L T N Q H A Y F K K A L D L K N Q I	122
1218	TGATCTTTTGTCAATTCTTCAAGGTGCTGACATTCATCCTGACGGCGAATCTTATGACCT	
	D L L S I L Q G A D I H P D G E S Y D L	142
1278	GGTCAATATTAGAAATGCAATTAAAAGCGCGATTGGATATACTCCTTGGATCCAATGTAA	
	V N I R N A I K S A I G Y T P W I Q C N	162
1338	TGTAGACCAGTCGGGTAACAGTCAGCTATACCAGGTTTACATTTGTGTTGATGGCTCGGG	
	V D Q S G N S Q L Y Q V Y I C V D G S G	182
1398	TTCAAGTCTCATTGAGTGCCCTATTTTCCCTGGAGGGAAATGTGGCACAAGCATTGAGTT	
	S S L I E C P I F P G G K C G T S I E F	202
1458	CCCAACATTT TAA ACTAGTGTTTGTTCTTTTAGCCATATTTCATATGCCTAAATTTGTTG	
	РТF -	205
1518	 ͲϹʹͲͲϹʹϹϹʹϹʹͲͲϪʹͲϪϹʹͲϪͲϔͲϹʹͲʹͲʹ;ϓͳϔͳϿʹͳϪͳϪͳϪͳϪϹϪͲʹϹʹϪͲʹϹʹϪͲʹϹϪͲϓʹϤϓϓ	
1010	PolyA-Signal Polyadenylierungsstelle	
1578	AAAAGCTATGCCTTGTTTGGAGC AATAA CATATTGAAAATTGTTGTTTG <u>T</u> TCTTAGTACT	
1638	CAACATAAAATATATTATTAACTGAATATTTTCAAATATATCTCGTTCAAATGGGACAAC	
1698	TTAATAGACTTGGTCATAATTTAAATCGCTATACACTAAATTAAATTGTATGAATAAGCA	
1758	TATATTATATTTTCGGGATTAAATAGTTGATTAATTCCGTTCACAATAGTAAATTG	
	ca. 1000 bp	
	AGATACTTCAGCAACTAATATTGCCATAAAAACATATTATTGGTGACAACTGTTATAGAT	
	ATTAGCGGTGACTAGTATTGTCACAAAAACATACTATTAGTGACGAGTATTATAGATATT	
	GGCGGCGACTACTATAACAAAAACTACTATTAGTGCCGAGGTGGAGTATTAACTAGTGTA	
	ATTGGTTAGCAAGCTAGATGGTTGAGTTAGTTAACTAATCAACTAGAGTTAGTGAGAAAT	
	ATTGACAGGTGACATTAGTTACACAATATACAGATTCAATATACACAATATACAGATTCA	
	ATGTATCAAGTTACACAATTCAATCAATGCAATTTCTTTC	
	AAGUTTAAAGUTUCAATTATGGAGUTATCATGATATCAGAGUCTAUGATCCGTTGACCTG	
	CAGGTCGAC	

Anhang 2: Nukleotid-Sequenz des PCR-Fragmentes PCR14/2, das den kodierenden Bereich der genomischen Sequenz des Genes PSI14/C vollständig umfaßt (vgl. Kap.4.5.2.). Die Aminosäuresequenz wurde im Vergleich mit der cDNA-Sequenz des Klons PSI14 (ZIETHE, unveröffentlicht) abgeleitet. Signifikante Merkmale, wie Translationsstartpunkt und Stop-Kodon sowie ausgewählte Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet. Die DST-Element-ähnlichen Sequenzen in der 3'UTR wurden gelb hervorgehoben. Die Intronsequenzen wurden kleingedruckt dargestellt. Die Zahlen auf der linken Seite geben die Nukleotidposition bezogen auf den Translationsstartpunkt an, während auf der rechten Seite die Position der Aminosäuren angegeben ist.

1	ATGGCTGGAATTGTAGTGGTTTTCGACTTTGACAAGACAATTATTGAGGTGGATAGTGAT	
	MAGIVVVFDFDKTIIEVDSD	20
61	AATTGGGTGGTGGATGAGTTAGGCGCCACTGATTTGTTCAATCAA	
	N W V V D E L G A T D L F N Q L L P T M	40
121	CCATGGAACTCTCTCATGGttagttttctttttctctttagcatatttttttgg	
	P W N S L M	46
181	${\tt tactatacttttctgctcgtccgtcgaggtttgtgcaacgggctgcccaacaataaagct}$	
241	gataatctctgttgtgtttcaaataacaggATAGAATGATGAAGGAGCTTCATACACAAG	
	D R M M K E L H T Q	56
301	GCAAAACAATACAAGACATTGAAGAGGTACTGAAACGGGTTCCCATACACCCCAGGATTG	
	G K T I Q D I E E V L K R V P I H P R I	76
361	TTCCGGCTATTAAATCAGCTCATGCATTAGGgtacgtataacgtatctcataattrcagc	
	V P A I K S A H A L G	87
421	$\tt ttccctaaattttgtatagaaactaatcgaatgtgtgttaattcagGTGTGATTTGAGAG$	
	CDLR	91
481	TAATTAGCGATGCAAATGTATTCTTCATCGAAACAATATTGAAACATCTCGGAATCAGGG	
	VISDANVFFIETILKHLGIR	111
541	ATTGTTTTTCTGAGATCAACACCAATCCAGGCTACGTCGATGGGGAAGGCAGGC	
	D C F S E I N T N P G Y V D G E G R L R	131
601	TCCTCCCTTATGTTGATTTTCAAAAATCCCCTCATAGTTGCAATCTCTGCCCTCCCAACA	
	I L P Y V D F Q K S P H S C N L C P P N	151
661	TGTGCAAGgtaactaaatactaaatccttcaatttctatattaaataat	
	M C K EcoRI	154
721	tttcctaattgagattctgtctgtttaatgcagGGTATGATAGTAGAGA <u>GAATTC</u> AAGCT	
	GMIVERIQA	163
781	AAGGAAGGGAAGAAGAGAATGATTTATCTAGGCGATGGAATCGGCGATTTCTGCCCCAGT	
	K E G K K R M I Y L G D G I G D F C P S	183
841	TTGAAGCTGAGGGAAGCAGATTTTGTGATGCCAAGAAAAGATTTCCCAGCCTGGAATTTG	• • •
	L K L R E A D F V M P R K D F P A W N L	203
001	Jpe1 አሞአ አ አሞአ አ አ አ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ የ ሚያርጥ አ አ አ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ ለ	
901		223
961		223
701		2/3
1021		243
1021		263
1081		203
1001		269
1141		20)
I I	0 1111 0110111 0 1 1 1110 1	

Anhang 3: Genomische Sequenzen der Gene PSI14/A und PSI14/B. Die Aminosäuresequenzen wurden im Vergleich mit den entsprechenden cDNA-Sequenzen abgeleitet. Signifikante Merkmale, wie TATA-Box, Translationsstartpunkt, Stop-Kodon, Poly(A)-Signale und Polyadenylierungsstellen sowie ausgewählte Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet. Die Intronsequenzen wurden kleingedruckt dargestellt. Die Zahlen auf der linken Seite geben die Nukleotidposition bezogen auf den Translationsstartpunkt an. Auf der rechten Seite wurde die Position der Aminosäuren angegeben.

Tripletts, die sich in der genomischen Sequenz und der entsprechenden cDNA-Sequenz unterscheiden, wurden fettgedruckt und das Triplett aus der cDNA-Sequenz unter dem entsprechenden Triplett der genomischen Sequenz angegeben.

Genomische Sequenz des Genes PSI14/A einschließlich 839 bp upstream des Translationsstartkodons gelegener Sequenz

Die cDNA-Sequenz unterscheidet sich von der genomischen Sequenz im Kodon der Aminosäure 101 (konservativer Austausch : Isoleucin statt Leucin), im Kodon der Aminosäure 181 (beide kodieren Cystein) sowie in den Kodons der Aminosäuren 187 (Arginin statt Serin) und 222 (Lysin statt Glutamin). Der Promotor enthält eine dreimal wiederholte 16 bp lange Sequenz (Position -480, -450 und -420, bezogen auf das Translationsstartkodon; grün markiert) sowie eine zweimal wiederholte 21 bp lange Sequenz (Position -475 und -445; eingerahmt).

- 839	AAGCTTTTGATAAAAACAATCAAATTTATATATATATATA	
- 780	AAAAAATCGATTGAACCCTTCTCTGCCATAGCACCAAATGAATCAATTCAAAATTGTATG	
- 720	TGTCAAGTGGTATAAGTTGTCGAGTGGATTAATAGAGCATAAATATTCATGTTTTGAATG	
- 660	ATAATCATTGATTGTAAAATGTCCCTTTCATTAAATAATTTAATAATTTATCATAGATGT	
- 600	ТТАААТТААТТТСТСТСТАТААААТААТТТТААТАТТАААААА	
- 540	CTATTTATAATTTTTAAATAGTTGGTAAAGAGAAAAAATAAAAATAAAAAA	
- 480	TATAATACATCACATAAATCTAGTTTTTTCTATATTACATCACATAAAATCTAGTTTATCG	
- 420	<mark>TATATTACATCACATA</mark> GATTTATTCTCCCATGTAATTCATACAAGGATTTAGTTCAATCC <i>Eco</i> RI	
- 360	TAATTTGTGGA <u>GAATTC</u> CATTCCCTGCCTGGAATATTCCTTCGAATTTCTATAAATTCTC	
- 300	CCAACTAATAAATGAAAACTAATTTATACCTTAAATCAAAAAGATTTATCCACCGCAGGA	
- 240	TCAAAATCTAACGGCTAATGTGGAAAATTATTTGAAAACGCAAGTGAGTATAGGAATTTG	
- 180	AGTGGCTTTGCCTTAACTTGTGTAGTATTATTCCCTTCGCATCTTATTTTCTTATACCTA TATA-Box	
- 120	ATTCCCTTTTTTTTCCCCTTTCCTATAAATCTCCCTCTTCATTCACAAACCCAAATACATCC 5'-Ende der cDNA-Klone $\downarrow \downarrow \downarrow$	
- 60	CATAACAACAACAAACAAACAGAG C T C TTCTTTTCTCTTCTGAAAAGTTACTCAAAAA	
1	ATG GCTGGAATTGTAGTGGTTTTCGACTTCGACAAGACGATTATCGATGTGGATAGTGAT	
	MAGIVVVFDFDKTIIDVDSD	2
61	AACTGGGTGGTGGATGAATTAGGCGCCACTGATTTATTCAATCAGCTTCTTCCCACTATG	
	N W V D E L G A T D L F N Q L L P T M	40
121	CCATGGAACTCTCTCATGGtaacttttctttcttaattaactatagttttatgctcttc	
	PWNSLM	4
181	tttcaaagcacaaggctgataattttatgttttgtttcaaataacagaATAGAATGATGA	
	D R M M	5
241	AGGAGCTCCATACACAAGGCAAAACAATACAAGACATTGAAGAGGTACTGAAACGGGTTC	
	K E L H T Q G K T I Q D I E E V L K R V	7
301	CCATACACCCCAGGATTGTTCCGGCTATTAAATCAGCTCATGCATTAGGgtacgtataac	
	PIHPRIVPAIKSAHALG	8
361	${\tt gtatctcataatttcagcttccctaaattttgtatagaaactaatcgaatgtgtgttaat$	
421	tcaqGTGTGATTTGAGAGTAATTAGCGATGCAAATGTATTCTTC CTC GAAACAATATTGA	
	C D L R V I S D A N V F F L E T I L	10
	ATC	
	I	
481	AACATCTCGGAATTAGGGATTGTTTCTCAGAGATCAACACTAATCCAGGCTACGTCGATG	
	K H L G I R D C F S E I N T N P G Y V D	12

Anhang

541	GGGAAGGCAGGCTTCGAATCCTTCCTTATGTTGATTTTCAAAAATCCCCTCATGGTTGCA	
	G E G R L R I L P Y V D F Q K S P H G C	145
601	ATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGgtaactaaatactaaatcctttaatttctatgta	
	NLCPPNMCK	154
661	atatgaaattaactaattattcctaattgagattctgtctg	
	EcoRI G M I	157
721	GTAGAGA <u>GAATTC</u> AAGCTAAGGAAGGAAGAAGAAGAATGATTTATCTAGGCGATGGAATC	
	V E R I Q A K E G K K R M I Y L G D G I	177
781	GGCGATTTC TGT CCCAGTTTGAAGCTG AGC GAAGCAGATTTTGTGATGCCAAGAAAAGAT	
	G D F C P S L K L S E A D F V M P R K D	197
	TGC AGG	
	R SpeI	
841	TTCCCAGCCTGGAATTTGATAAATAAAAACAGGAC <u>ACTAGT</u> AAAAGCAACGGTCCACGAG	
	F P A W N L I N K N R T L V K A T V H E	217
901	TGGACCAACGGC CAA GAACTTGAACACATTTTGCTACAATTGATCAACACAATCAACATG	
	W T N G Q E L E H I L L Q L I N T I N M	237
	ААА	
	ĸ	
961	GAAGAAAGCCAATTGTTATCAGTGGATTACTGCAAATTAGTGACAATGTCAAAAGCAGCT	
	E E S Q L L S V D Y C K L V T M S K A A	257
1021	CATGGAGCGTTGCCACAGGCTCTTCCAGTGCCTTAC TAA TGCCAAGTTTGCTTGAGTCAA	
	HGALPQALPVPY- Hindill	269
1081	TACCATGAAGCTTGTGACTTGCAATTGGTTTCGATTTTAGGTAGTTAAATATGGTTTCTT	
1142	$\begin{array}{c} \mathbf{TGTTAAC} \\ \mathbf{TGGGCCT} \\ \mathbf{CAACATTGTTATTGTTTTTTTTTTTGTATGACAATTGCATTATG} \\ \mathbf{Polyadenylierungsstelle} \\ \downarrow \end{array}$	
1201	GCAACG G AAATCGGTGTGTCGCATATAACTCTGTTGCGATATGTCTATAGTAACTGTTTT	
1261	ATAGCAACCGTTGTAAACTGTTGCAACACCACTATCTATAGCAACAATTAATCTTTAGTTT	
	PolyA-Signal	
1321	AGTATGACACTTTTCTATGGTTGCTGCAACAGTTGCGAACCGTTGTAAAAGATC TATAA C Polyadenylierungsstelle ↓	
1381	AACTTTTTTATTATACAACTCGGTCTACTC T ATTACAACAGTTCTTCTAAACTATTGCAA	
1441	CAATATTATTAGTCTATTACAATAGACTTTTTTAAATGGTAAACAATCATATAATAATAGA	
1501	λ	

1501 AAATATTAAACTAATATGTACTTCAACTAGT

Genomische Sequenz des Genes PSI14/B einschließlich 990 bp upstream des Translationsstartkodons gelegener Sequenz

Die cDNA-Sequenz unterscheidet sich von der genomischen Sequenz im Kodon der Aminosäure 214 (konservativer Austausch : Threonin statt Glycin). Der Transkriptionsstartpunkt wurde mittels Primerextension ermittelt (vgl. Kap. 4.5.6.). Die in der 3'UTR identifizierten DST-Element-ähnlichen Sequenzen (vgl. Kap. 4.5.5.) wurden gelb hervorgehoben.

*Eco*RI

- 990	GAATTCCTTTATTAAAATTTTTGGCTCTGCCACTGCCAAAATATGTCATAATCTAGAATT	
- 930	TCCTCTTTGCCTTAAAAAAGAGAATTAAGCAATTTTTGTCTCGCCTAATCATGAAAAAAC	
- 870	TTACCTGCACCAGATGCTTACACCAAAATTCATTTTATGTGATTTAATGAAGTAAAACT	
- 810	CGTGTTAATTAATTAGGAACATTTAATTTTGTTAGAAAATATTCTTCAGGTAAATTAGTA	
- 750	AAATTATCATTCTCATTTATGATTTCTTAAAGAACAGATAAATAGAAAAAGGCATAACAC	
- 690	ATAAATATGTACTTTAACTTGGCATCTATATAATCACATTTTGATTGTGCATAAATAA	
- 630	ACTTAAATTTGTATAAAATTTAATTAAATAGATTCACACGTCTTACGTGACATAATACAC	
- 570	GTAGAACACCACTTACGATACAAAATTTTCATGTAAAATGCCACGTAAAACGAACTATTT	
- 510	ATTTAGTTTTATATAAGTTTAAATATCTGCTTAAACTTCGAGCACATATATGTTAATTGA	
- 450	AGCCAAGTTAAATTATATTTTTATATATTATCTCATAAAAAATTGACAGCTAATATAAAA	
- 390	TAGATAGAATTAAAAAATATATATATATATAAGAGAATGTAACATAAAATCAAATACCTA	
- 330	TATTAAATCATATAAATCTAGATTTAGTGTCCTCCGTTATTACTAGAAGATTTTAGTTTC	
- 270	AATTCTAATTTTGGAGAATGCACATGGAATATTCTGTTATATTCCTTCAATTTCGCATAA	
- 210	ATAGTTAAGGATACGGAAAGAAGAAAACCAAGTGAGTATATGAATTTGAGTGACTCTTCG	
- 150	TTAACTTACCACTAACATATGTAATATTCCCCTCGGCATCTTATTTTTTTGTACCTTTTTA	
100	TATA-Box Transkriptionsstartpunkt	
	- ↓ -	
- 90	TCACTCCC TATAAAG CTCCCTCTTCATTAGTTTGGTGT T CACAAACCAAAACAACAAGAA 5'-Ende der cDNA-Klone	
- 30	ϫʹϫϫ ΔϹϪϾϪ ϹͲϹͲ ͲϹͲϪͲϪͲͲϹϪͲϪϪϪϪϪϪϪ ϪͳϾ ϾϹͲϾϾϪϪͳϒϾ;ͳϾϾ;	
50		10
30		10
50		30
90		50
70	DI. F. N. O. I. I. D. T. M. D. W. N. S. I. M.	46
150		40
210		
210		62
270		02
270		87
330		02
550		87
200		07
390		07
450		97
430		117
510		11/
510		127
570		157
570	TTTTCAAAAATCCCCCTCATGGTTGCAATCTCTGCCCTCCCAACATGTGCAAGgtaactaa	154
(20)	FQKSPHGCNLCPPNMCK	154
630		
600	<i>LCO</i> KI	
070	C M T V F P T O N K F C K K	168
750		100
750		100
810		100
010		200
	A D F V M P K K D F P A W N L I N K N R	208

		SpeI																			
870	CA	CTA	GTA	AAA	GCA	GGG	GTC(CAC	GAG	TGG	ACC	AAC	GGC	AAA	GAA	CTT	GAA	CAC.	ATT	TTGC	
	Т	L	V	K	А	G	V	Н	Е	W	Т	Ν	G	Κ	Ε	L	Е	Н	I	L	228
					ż	ACG															
						т															
930	TA	CAA'	TGG	ATC	AAC	ACAA	ATC	AAC	ATTO	GAA	GAA	AGC	CAA	ΓTG	T'TA'	TCA	ATG	GAG	TAT	TGCA	
	L	Q	W	I	Ν	Т	I	Ν	I	Е	Е	S	Q	L	L	S	М	Е	Y	С	248
990	AA'	TTC	CAG	ACG	AAA	CCCI	AAT	GCA	GAT	CAT	GGA	GCC	TTG	CCA	CGG	ССТ	CTT	CCA	GTG	CCTT	
	Κ	F	Q	Т	Κ	Ρ	Ν	А	D	Н	G	А	L	Ρ	R	Ρ	L	Ρ	V	Ρ	268
1050	AC	TAA'	rgco	CAAC	GTT.	rgc1	GGG	CTTC	CAAT	FAC	CAT	GAAC	GCC	ГGТ(GAC	rtg(CAA	TTG	GTT?	$\Gamma T T T$	
	Y	-																			269
1110	GA	TTT?	TAG	GTAC	GTTA	AAA	TAT	GGG	rtt1	TTT	GTTA	AAC	rgg(GCTA	ACAZ	ACA	GTG	TTA	GTC	TTTA	
1170	AG	TAT	GTG	GTTI	rgco	GTTC	CTGA	AAA	CTC	TTA	G <mark>GG(</mark>	CTCC	GTC	ГСG	C <mark>CA</mark>	FAG	ATT	r <mark>cc</mark> o	CAA	ATA <mark>A</mark>	
									F	PolyA	-Sign	ale	Poly	yaden	ylier	ungss	telle	Pol	yA-Si	gnal	
1000																↓					
1230	TA.	TTT(GGGA	<mark>A</mark> AA/	AAA'	rgt'i	"TG".	L.L.C			["T TZ	ATA/	A TTT	rgt".	ΓΑΑ/	$A\underline{T}A'$	L.I.I.	TT G	ATA	AA TA	
						Ţ	Polya	adeny	nerur	igsste	llen	Ţ									
1290	ጥጥ	гта	ممت	prprpr	raa7	• • T AC	TAT	pipipir	pipipir	רידיר	ЗТG	- TATA'	רידיר	TAG	rca/	ΔΑΤ	стс	ATT:	ATC	рфф	
1350	GA	ם ב ב ב	ממידית	יבב		г <u>а</u> ас	זמיזי		ידייין		ידידיר ידידיר	<u></u> רידם (ממר		ממר		тст	Δ. ΤΔ		 	
1410	TTT		2 	ימידים		יאיג זידער			ግጥ አ ጀ		3220 3220		ממר ממר			3ΔT		יעדי		TTAG	
1470	TC			2227	ים בית משבי	гаал	ידי אי זידעי	יידי י מאריי	יידי ב וידי בי					14 1 1 1	34 3 T V	1111					
1 1/0	TOT				- 66			ניהי		LOA.											

Anhang 4: Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei PSI14-cDNA-Klone aus *L. esculentum* Mill. cv. Lukullus (rot) mit den aus den genomischen Sequenzen g14/A bzw. g14/B aus *L. esculentum* cv. VFNT Cherry abgeleiteten Aminosäuresequenzen (blau) und den Aminosäuresequenzen der vier Reis-cDNA-Klone (vgl. Kap. 5.2.). Identische Aminosäuren wurden durch Striche dargestellt sowie nicht bestimmbare Aminosäuren durch ein Fragezeichen (?). Die zur Optimierung des Alignments in die Aminosäuresequenz des Klons C73042 eingeführte Lücke wurde durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet.

PSI14/C	MAGIVVVFDFDKTIIEVDSDNWVVDELGATDLFNQLLPTMPWNSLMDRMMKELHTQGKTI	60
PSI14/A	DDD	
g14/A	DDD	
PSI14/B	DDD	
g14/B	DD	
D24646	T	
D39141	T	
C73042	T	
C74865	TT	
PSI14/C	QDIEEVLKRVPIHPRIVPAIKSAHALGCDLRVISDANVFFIETILKHLGIRDCFSEINTN	120
PSI14/A	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
g14/A	LT	
PSI14/B		
g14/B		
D24646	V-V?GPCSGS	
D39141	A-VAGRSA-LDV-AACYGTLG-RDNDOH	
C73042	$\Delta - VAG - 2SARSTRASS - HOGLLR* - LR - TL T -$	
C74865		
071005		
PSI14/C		180
$PSI1/\Delta$		100
$\sigma 1/\Lambda$	C	
$g_{I+/A}$		
$r 3 \Pi 4 / D$	G	
g14/D	G	
PSI14/C	CPSLKLREADFVMPRKDFPAWNLINKNRTLVKAGVHEWTNGKELEHILLQWINTINIEES	240
PSI14/A	TLLR	
g14/A	QLM	
PSI14/B	TT	
g14/B		
PSI14/C	QLLSMENCKFQTKHNAAHGALPRPLPVPY	269
PSI14/A	VDYLV-MSKQA	
g14/A	VDYLV-MSKQA	
PSI14/B	YPD	
g14/B	YPD	

Anhang 5: Alignment der Intronsequenzen aus den drei PSI14-Genen. Die Intronsequenzen des Genes PSI14/C wurden als Referenz für den Vergleich benutzt. Nukleotide, die in den Intronsequenzen der Gene PSI14/A bzw. PSI14/B identisch sind im Vergleich mit der entsprechenden Sequenz des Genes PSI14/C, wurden durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet. Zur Optimierung des Alignment's wurden Lücken (dargestellt als Striche) eingefügt.

Intron 1

PSI14/C	TTAGTTTTCTTTTTCTCTTCA-TCTTAG-CATATTTTTTTGGTACTATACTTTTCTGCTCGTC
PSI14/A	*A*C*****_******TAATTAA**-*TAG******C*-**T******
PSI14/B	******G*********T*A***TA***TA***TA
PSI14/C	CGTCGAGGTTTGTGCAACGGGCTGCCCAACAATAAA-GCTGATAATCTCTGTTGTGTTTCA
PSI14/A	A**GC*C-**G******TTTTA***T******
PSI14/B	*********************************
PSI14/C	AATAACAGG
PSI14/A	****
PSI14/B	* * * * * * *

Intron 2

PSI14/C	GTACGTATAACGTATCTCATAATTTCAGCTTCCCTAAATTTTGTATAGAAACTAATCGAA-TGTG
PSI14/A	***************************************
PSI14/B	**************************************
PSI14/C	TGTTAATTCAG
PSI14/A	*****
PSI14/B	* * * * * * * * *

Intron 3

PSI14/C	GTAACTAAATACTAAATCCTTCAATTTCTATATTAA-ATAATTCGTGAATTAGTTT
PSI14/A	*********************************G*-**T**GA****AA*-*-*****-**-
PSI14/B	*********************************G*_**T**GA****AA*_*_**********
PSI14/C	CCTAATTGAGATTCTGTCTGTTTAATGCAG
PSI14/A	****************
PSI14/B	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Anhang 6: Strukturelemente im Promotor der RNase LE, die Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten *cis*-Elementen pflanzlicher Promotoren aufweisen. Identische Nukleotide wurden durch Striche dargestellt. Die Numerierung bezieht sich auf den Haupttranskriptionsstartpunkt. (W = A/T).

Position	<i>cis</i> -Element		Sequenz (5'-3')	Referenz
	Translationsstartpunkt	cons.:	TAAACAA ATG GCT	JOSHI, 1987
47			G A	
	Transkriptionsstartpunkt	cons.:	CT CA TCA	JOSHI, 1987
1			AAAT	
-102			A – T – – T –	
	TATA-Box	cons.:	TATAAAT	JOSHI, 1987;
- 31 bis - 24				ROEDER, 1996
- 136 bis - 129			AT	
	G-Box	cons.:	CACGTG	MENKENS et al., 1995
- 734 bis - 729			C	
-1977 bis -1972			A	
-2539 bis -2534			T	
	Rootelement	cons.:	ATATTATATTCCCT	ELMAYAN und TEPFER,
- 108 bis - 95			A-A-AA-A	1995
- 217 bis - 204			TG-A-TA	
- 242 bis - 229			A	
	RSE-Element	cons.:	CAACTTTCATATCCATGT	KELLER und BAUMGART-,
- 328 bis - 311	(Root specific element)		CATCTTCCAA	NER; 1991
	ASL-Box	cons.:	$\texttt{GCATC} \ (N) \ 9 \ \texttt{GCATC}$	YIN et al., 1997
- 169 bis - 144			(N)15 A	
	GATA-Motiv	cons.:	C A GA A GATA	YIN et al., 1997
- 309 bis - 301			G-TT TG-	
- 569 bis - 561			T-AC T	
	AC-I Element	cons.:	CCCACCTACCA	HATTON et al., 1997
- 321 bis - 311			T T T	
	Bindestelle des Tran-	cons.:	CAATWATT	Sessa et al., 1993
- 417 bis - 410	skriptonsfaktors ATHB1		T	
- 972 bis - 962	aus Arabidopsis		T	
-1705 bis -1695			T	
-1743 bis -1733			T	
-1766 bis -1756				
	Bindestelle des Tran-	cons.:	GGTTAAWWW	Lawton et al., 1991
- 264 bis - 255	skriptonsfaktors SBF1		C C	
- 410 bis - 401	der Bohne		TT	
- 608 bis - 599			T	

Anhang 7: Strukturelemente in den Promotoren der Gene PSI14/A bzw. PSI14/B mit Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten pflanzlichen *cis*-Elementen. Desweiteren wurden direkte Sequenzwiederholungen in die Übersicht aufgenommen. Identische Nukleotide wurden durch Striche dargestellt. Die Numerierung bezieht sich jeweils auf das Translationsstartkodon.

PSI14/A

Position	cis-Element	Sequenz (5'-3')		Referenz
	Translationsstartpunkt	cons.:	TAAACAA ATG GCT	JOSHI, 1987
- 33 bis - 23	CT-Box	cons.:	TTCTCTCTCCT T-TCT	BOLLE et al., 1994
- 99 bis - 93	TATA-Box	cons.:	TATAAAT 	JOSHI, 1987; ROEDER, 1996
- 419 bis - 406 - 449 bis - 436	Rootelement	cons.:	ATATTATATTCCCT CCA-A- CCA-A-	ELMAYAN und TEPFER, 1995
- 420 bis - 404 - 450 bis - 434	16 bp-Sequenzwieder- holung	cons.:	TATATTACATCACATA	
- 445 bis - 424 - 475 bis - 454	21 bp-Sequenzwieder- holung	cons.:	TACATCACATAAATCTAGTTT	
- 813 bis - 799	Palindrom	cons.:	TATATATATATATA	

PSI14/B

Position	<i>cis</i> -Element		Sequenz	Referenz
	Translationsstartpunkt	cons.:	TAAACAA ATG GCT	JOSHI, 1987
1	Transkriptionsstartpunkt	cons.:	ACA CT CA TCA	JOSHI, 1987
-52			TGT T CAC	
- 82 bis - 76	TATA-Box	cons.:	TATAAAT 	JOSHI, 1987; ROEDER, 1996
	G-Box	cons.:	CACGTG	MENKENS et al., 1995
- 249 bis - 244			A	
- 573 bis - 568			A	
	Rootelement	cons.:	ATATTATATTCCCT	ELMAYAN und
- 242 bis - 228			C-GATA-	TEPFER, 1995
- 331 bis - 317			ACATA-	
- 426 bis - 412			C-CATAA	
- 436 bis - 422			T-TA-ATA-	
	Palindrom	cons.:	TATATATATATA	
- 373 bis - 359				

Danksagung

An dieser Stelle sei all denen recht herzlich gedankt, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

Frau Dr. M. Köck für die Möglichkeit der Bearbeitung des interessanten Themas, für ihre vielfältige Unterstützung und stete Bereitschaft zur Diskussion theoretischer und praktischer Probleme sowie für die langjährige sehr gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. M. Ganal (IPK Gatersleben) für die Durchführung der Genkartierung der RNasen LE und LX sowie die Bereitstellung der genomischen Tomaten-DNA-Bank.

Frau Prof. U. Bonas (Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Bereitstellung der *Xanthomonas campestris*-Stämme sowie Herrn Prof. R. R. Mendel (TU Braunschweig) für die Überlassung des Plasmid-Klones pRT 101LUC.

Herrn Dr. E. Görschen (IPB Halle) für die Einführung in die Transformationsmethode mittels Partikelkanone sowie Frau Dr. B. Hauser für ihre Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Schnitte.

Nicht zuletzt danke ich allen MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe für ihre konstruktive Zusammenarbeit und stete Diskussionsbereitschaft und sowie viele praktische Hinweise. Mein besonderer Dank geht dabei an Frau Dr. S. Hertel für ihre Unterstützung und Hilfe bei den Laborarbeiten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den angegebenen Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle/Saale, den 03. 05. 1998

Irene Stenzel

Lebenslauf

Name:	Irene Stenzel		
Geburtsdatum:	15. Juni 1969		
Geburtsort:	Halle/Saale		
Familienstand:	ledig		
Schulbildung			
1976 - 1986	Besuch der Polytechnischen Oberschule		
1986 - 1988	Besuch der Erweiterten Oberschule, Abitur		
Ausbildung			
1988 - 1993	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg		
Nov. 1992-	Diplomarbeit am Fachbereich für Biochemie/Biotechnologie der		
Aug. 1993	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Abteilung Pflanzen- biochemie) in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Köck. Titel der Diplomarbeit:		
	"Klonierung genomischer Sequenzen einer extrazellulären RNase (RNase LE) aus Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. Lukul-lus)"		
ab Sep. 1993	Anfertigung der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Köck		
	Titel der Doktorarbeit		
	"Isolierung und Charakterisierung genomischer Sequenzen Phosphat-		
	mangel induzierbarer Gene aus Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. Lukullus)"		