

**Untersuchungen von *Sink / Source* Verhältnissen
in transgenen Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), welche den
PsGPT und *AtNTT* überexprimieren. Analysen von
Freilandanzuchten und Analysen von Kartoffeln, welche die
AtATase2 überexprimieren.**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Christian Greiten

aus Köln

Dezember 2008

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Februar 2004 bis November 2008 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. U.-I. Flügge
Prof. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2009

„Die Wahrheit triumphiert nie, ihre Gegner sterben nur aus.“

Max Planck, 23.04.1858 - 04.10.1947

Begründer der Quantentheorie & Nobelpreisträger

1. Einleitung	1
1.1 Der Stärkemetabolismus	1
1.1.1 Die Synthese von Stärke in Blättern	2
1.1.2 Stärkemobilisierung in Blättern	3
1.1.3 Der Transport von Assimilaten in die Knolle	6
1.1.4 Die Stärkesynthese in Knollen	9
1.1.5 Die Bedeutung von GPT und NTT für die Stärkesynthese in Knollen	11
1.2 Der Purinmetabolismus	13
1.2.1 Die Purin-„de novo“-Biosynthese	13
1.2.2 Das Purin-Recycling	15
1.2.3 Die <i>Arabidopsis thaliana atd2</i> -Mutante	16
1.3 Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Verbrauchsmaterial	18
2.1.2 Verwendete Antibiotika	18
2.1.3 Verwendete Vektoren	19
2.1.4 Verwendete Oligonukleotide	20
2.2 Arbeiten mit <i>Solanum tuberosum</i>	21
2.2.1 Anzucht	21
2.2.2 Haltung	21
2.2.3 Transformation von Kartoffelblättern	22
2.2.4 Induktion von Kalli	23
2.2.5 Probennahme	23

2.3	Mikrobiologische Methode	24
2.3.1	Anzucht von <i>Escherichia Coli</i>	24
2.3.2	Herstellung TSS-kompetenter <i>Escherichia Coli</i> Zellen	24
2.3.3	Transformation TSS-kompetenter <i>Escherichia Coli</i> Zellen	25
2.3.4	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.3.5	Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien	26
2.3.6	Transformation elektrokompetenter Agrobakterien.....	26
2.4	Molekularbiologische Methoden	27
2.4.1	DNA-Techniken	27
2.4.1.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	27
2.4.1.2	Präparation von genomischer DNA aus Pflanzengewebe	27
2.4.1.3	Phenolische Extraktion von DNA.....	28
2.4.1.4	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	28
2.4.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.4.1.6	Colony-PCR	30
2.4.1.7	Sequenzierung von DNA	30
2.4.1.8	Restriktionsverdau von DNA	31
2.4.1.9	Fill-In.....	32
2.4.1.10	Dephosphorylierung von DNA	32
2.4.1.11	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.4.1.12	Abschätzung von DNA-Konzentrationen in einem Agarosegel.....	33
2.4.1.13	Elution von DNA aus einem Agarosegel.....	34
2.4.1.14	Ligation.....	34
2.4.1.15	TOPO-TA-Klonierung	34
2.4.1.16	TOPO-Klonierung	34
2.4.1.17	Herstellung von Genkonstrukten mit binären Vektoren	34
2.4.1.17.1	Herstellung des <i>entry</i> -Vektors.....	35
2.4.1.17.2	Herstellung des <i>destination</i> -Vektors	35
2.4.2	RNA-Techniken	35
2.4.2.1	Präparation von RNA aus pflanzlichem Gewebe.....	35
2.4.2.2	Konzentrationsbestimmung der RNA am TECAN	36
2.4.2.3	DNaseI-Verdau von DNA	37
2.4.2.4	Reverse-Transkription	37

2.4.2.5	RT-PCR.....	38
2.4.2.6	Formaldehydgel (RNA-Gel).....	38
2.4.2.7	Northern blot.....	39
2.4.2.8	Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde.....	40
2.4.2.8.1	Markierungsreaktion mit α - ³² P-dATP.....	40
2.4.2.8.2	Überprüfung der radioaktiven Markierung.....	41
2.4.2.8.3	Reinigung der DNA-Sonde.....	41
2.4.2.9	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden mit RNA-blots.....	41
2.5	Physiologische Methoden	42
2.5.1	Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blättern und Knollen ...	42
2.5.2	Bestimmung der Stärkegehalte in Blättern und Knollen	44
2.5.3	Bestimmung der Gehalte phosphorylierter Intermediate	45
2.5.4	Bestimmung von Chlorophyllgehalten in Blättern	45
2.5.5	Bestimmung der ATase2-Aktivität in Blättern und Knollen	46
2.5.5.1	Protein-Extraktion.....	47
2.5.5.2	Glutamat-Reaktion.....	47
2.5.5.3	Glutamatdehydrogenase Reaktion	48
2.5.6	Chlorophyllfluoreszenz Messungen.....	49
2.5.7	Infrarot-Gaswechsel-Analysen (IRGA)	49
2.5.8	¹⁴ C-Glukosefütterungen mit Knollenscheiben.....	50
2.5.9	Proteinbestimmung nach Bradford	51
2.5.10	Metabolitenanalyse mittels GC/MS.....	52
2.5.10.1	Extraktion und Probenvorbereitung.....	52
2.5.10.2	Gaschromatografie	53
2.5.10.3	Massenspektrometrie	53
2.5.10.4	Standards	54
2.5.10.5	Auswertung	54
2.5.11	Bestimmung der Gehalte von ATP, ADP und ADP-Glukose	54
2.6	Statistische Methoden und Berechnungen.....	55
2.6.1	Standardabweichung.....	55
2.6.2	Standardfehler.....	55
2.6.3	t-Test.....	56

3. Ergebnisse 57

3.1	Überexpression der ATase2 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in <i>Solanum tuberosum</i>.....	57
3.1.1	Hintergrund.....	57
3.1.2	Überprüfung des Purin-„de novo“-Biosyntheseweges in Kartoffelknollen.....	57
3.1.3	Klonierung der ATase2 in den pGWB2- und den B33-pBin-Kan-Vektor	59
3.1.4	Expressionsanalyse der Konstrukte in transformierten Kartoffelpflanzen	60
3.1.5	ATase2-Aktivitätsmessungen	62
3.1.6	Weiterführende Untersuchungen der 35S-ATase2-Überexprimierer	64
3.1.6.1	Zuckergehalte in Blättern.....	64
3.1.6.2	Zuckergehalte in Kartoffelknollen	65
3.1.6.3	Gehalte von F6P und G6P in Kartoffelknollen	66
3.1.6.4	Stärkegehalte in Kartoffelknollen	66
3.1.6.5	Knollenertrag pro Pflanze	69
3.1.6.6	Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze	71
3.1.6.7	Stärkegehalte in Blättern	73
3.1.6.8	Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile	75
3.1.6.9	¹⁴ C-Glukose-Aufnahmen von Knollenscheiben	77
3.1.6.10	Messungen des Gaswechsels und der Elektronentransportrate von Blättern	79
3.1.6.11	HPLC-Messungen von ATP, ADP und ADP-Glukose in Kartoffelknollen.....	81
3.1.6.12	Fazit.....	82
3.1.7	Weiterführende Untersuchungen der B33-ATase2-Überexprimierern ..	83
3.1.7.1	Zuckergehalte in Blättern.....	83
3.1.7.2	Zuckergehalte in Kartoffelknollen	84
3.1.7.3	Gehalte von F6P und G6P in Kartoffelknollen	85
3.1.7.4	Stärkegehalte in Kartoffelknollen	86

3.1.7.5	Knollenertrag pro Pflanze	87
3.1.7.6	Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze	89
3.1.7.7	Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile	90
3.1.7.8	Fazit.....	91
3.2	Untersuchungen an GPT/NTT-Überexprimierern	92
3.2.1	Ergebnisse aus dem Gewächshaus	92
3.2.1.1	Zuckergehalte in Blättern.....	93
3.2.1.2	Stärkegehalte in Blättern	97
3.2.1.3	Knollenertrag pro Pflanze	98
3.2.1.4	Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze	99
3.2.1.5	Messungen des Verhältnisses von F_v zu F_m und des Gesamtchlorophyllgehalts	100
3.2.1.6	Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile	103
3.2.1.7	Trockengewichte der Wurzeln und der Stolone von Kartoffelpflanzen	104
3.2.1.8	Fazit.....	105
3.2.2	Ergebnisse der Freilandanzuchten im Jahr 2006	105
3.2.2.1	Feldaufbau im Jahr 2006.....	106
3.2.2.2	Zuckergehalte in Kartoffelknollen	106
3.2.2.3	Stärkegehalte der Kartoffelknollen	107
3.2.2.4	Knollenertrag und Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze.....	109
3.2.2.5	Fruchtertrag pro Pflanze und Fruchtgröße	110
3.2.3	Ergebnisse der Freilandanzuchten im Jahr 2007	111
3.2.3.1	Feldaufbau im Jahr 2007.....	112
3.2.3.2	Zuckergehalte in Kartoffelknollen	112
3.2.3.3	Stärkegehalte in Kartoffelknollen.....	114
3.2.3.4	Knollenertrag und Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze	115
3.2.3.5	Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile	116
3.2.3.6	Fruchtertrag pro Pflanze und Fruchtgröße	117
3.2.3.7	HPLC-Messungen von ATP, ADP und ADP-Glukose in Kartoffelknollen.....	119
3.2.3.8	Fazit.....	120

3.2.4	Vorläufige Untersuchungen an GPT/NTT/ATase2-Überexprimierern...	120
3.2.4.1	Expressionsanalyse des GPT und des NTT durch RT-PCR	121
3.2.4.2	Zuckergehalte in Blättern	123
3.2.4.3	Stärkegehalte in Blättern	124
3.2.4.4	Stärkegehalte in Kartoffelknollen	125
3.2.4.5	Knollenertrag und Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze	125
3.2.4.6	Fazit	127

4. Diskussion 128

4.1	Die ATase2-Überexprimierer	128
4.1.1	Änderungen in Knollen der 35S-ATase2-Überexprimierer	131
4.1.2	Änderungen in Knollen der B33-ATase2-Überexprimierer	134
4.1.3	Änderungen in oberirdischen Pflanzenteilen der ATase2-Überexprimierer	135
4.1.4	Fazit	137
4.2	Die GPT/NTT-Überexprimierer	137
4.2.1	Weitere Untersuchungen aus dem Gewächshaus	139
4.2.2	Die Freilandanzuchten in den Jahren 2006 und 2007	141
4.2.3	Vorläufige Untersuchungsergebnisse von GPT/NTT/ATase2-Überexprimierern	145
4.2.4	Fazit	147

5. Literaturverzeichnis 148

6. Abbildungsverzeichnis 159

7. Tabellenverzeichnis 163

8.	Abkürzungsverzeichnis	164
9.	Anhang	169
9.1	Klimadaten für die Jahre 2006 und 2007	169
10.	Kurzzusammenfassung und Abstract	170
10.1	Kurzzusammenfassung	170
10.2	Abstract	171
11.	Danksagungen und Formalia	172
11.1	Danksagungen	172
11.2	Erklärung	173
11.3	Lebenslauf	174

1. Einleitung

1.1 Der Stärkemetabolismus

Fast die gesamte Biomasseproduktion auf der Erde beruht auf der Photosynthese. Pflanzen nutzen die Energie des Sonnenlichts, um aus anorganischen Ausgangssubstanzen Biomasse aufzubauen (Heldt, 2003). Während der Photosynthese wird in den Chloroplasten die Energie von Photonen zu chemischer Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat (NADPH) umgewandelt (Lichtreaktion). ATP und NADPH werden genutzt, um CO_2 aus der Atmosphäre zu assimilieren und zu 3-Phosphoglycerat (3PGA), dem ersten greifbaren Produkt der Photosynthese, zu reduzieren (Dunkelreaktion). 3PGA wird in zwei weiteren Reaktionen zu Triosephosphat, welches zur Bildung von Kohlenhydraten dient. Dabei entsteht hauptsächlich Stärke (Chloroplast) und Saccharose (Cytosol) (Vreugdenhil, 2007). Kohlenhydrate dienen der Pflanze als Lieferant und Speichermedium für Energie, welche zum Wachstum und zur Erhaltung fundamentaler metabolischer Prozesse erforderlich ist.

Kohlenhydrate werden überwiegend in den Chloroplasten tragenden Zellen von Blättern (*Source-Gewebe*) synthetisiert und von dort zu den Orten des Verbrauchs (*Sink-Gewebe*) transportiert. Die hauptsächliche Transportform in den meisten Pflanzen ist dabei Saccharose.

Die bei der Photosynthese gebildeten Triosephosphate (Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat) werden zum einen über den in der inneren Chloroplastenmembran lokalisierten Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT) (Flügge und Heldt, 1991) ins Cytosol transportiert, wo sie der Synthese von Saccharose dienen. Zum anderen verbleiben sie im Chloroplasten zur Regeneration des primären CO_2 -Akzeptors Ribulose-1,5-bisphosphat und zur Bildung transitorischer Stärke.

1.1.1 Die Synthese von Stärke in Blättern

Blattstärke stellt einen transienten Speicher für Assimilate dar, der während der Nacht mobilisiert wird, um den Blattmetabolismus und die Saccharose-Synthese sowie den Transport von Saccharose zu den Orten des Verbrauchs (*Sink*-Organe) aufrecht zu erhalten (Geiger und Servaites, 1994).

Die Synthese von Stärke und Saccharose muss streng reguliert werden, um ausreichend Saccharose für den Export bereitzustellen und um transitorische Stärke für die Nacht aufzubauen (Stitt und Quick, 1989). Außerdem sind immer genügend Triosephosphate bereitzuhalten, um den primären CO₂-Akzeptor Ribulose-1,5-bisphosphat zu regenerieren.

Ein wichtiger Regulator ist dabei die Verfügbarkeit von phosphorylierten Metaboliten, die bei der Photosynthese gebildet werden, und von Orthophosphat (P_i), welches bei der Synthese von Saccharose entsteht. Wichtigste Regulationsstelle der Stärkesynthese ist die Adenosindiphosphat-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) (Neuhaus und Stitt, 1990). Dieses Heterotetramer, bestehend aus zwei großen (regulatorischen) und zwei etwas kleineren (katalytischen) Untereinheiten (Morell et al., 1987; Okita et al., 1990), wird durch 3-Phosphoglyzerat (3PGA) und P_i allosterisch reguliert, wobei 3PGA aktiviert und P_i inhibiert (Sowokinos, 1981; Preiss, 1988). Ein steigendes 3PGA/P_i-Verhältnis stimuliert also die Stärkesynthese als Folge einer wachsenden Bereitstellung von Photoassimilaten durch die Photosynthese. Ein sinkendes 3PGA/P_i-Verhältnis inhibiert die AGPase-Aktivität, um einen exzessiven Fluss von Triosephosphaten in die Stärkesynthese zu unterbinden (Heldt et al., 1977). Die AGPase unterliegt zudem einer posttranslationalen Redoxregulation. Dabei wird eine intermolekulare Cystein-Brücke zwischen den beiden katalytischen Untereinheiten gebildet und somit die AGPase-Aktivität inhibiert. Im Licht reduzierte Thioredoxine können analog zur Aktivierung von Enzymen des Calvinzyklus auch zur Monomerisierung und somit zur Aktivierung der AGPase führen. So wird sichergestellt, dass die Synthese von transitorischer Stärke nur im Licht abläuft (Hendriks et al., 2003; Tiessen et al., 2002).

Ausgangsprodukt der Stärkesynthese in Blättern ist Fruktose-6-Phosphat (F6P), ein Intermediat des Calvinzyklus. F6P wird über die Phosphoglukoisomerase (PGI) zu Glukose-6-Phosphat (G6P) isomerisiert. Die Phosphoglukomutase (PGM) überträgt in einem weiteren Schritt den Phosphatrest des sechsten Kohlenstoffatoms auf das erste, wobei Glukose-1-Phosphat (G1P) entsteht. G1P wird dann durch eine

Reaktion mit ATP zu ADP-Glukose. Die AGPase katalysiert diese Reaktion (Smith et al., 1997). Das dabei anfallende Pyrophosphat (PP_i) wird durch eine plastidäre Pyrophosphatase in zwei Phosphatmoleküle gespalten und damit dem Reaktionsgleichgewicht entzogen, was die Gesamtreaktion irreversibel macht (Weiner et al., 1987).

ADP-Glukose ist das Ausgangsprodukt für die Stärkesynthese. Stärkesynthasen (SS) katalysieren den Transfer des Glukoserestes von ADP-Glukose auf das reduzierte Ende eines bereits existierenden $\alpha(1\rightarrow4)$ -Polyglukans und bilden so Amylose und Amylopektin, die beiden Bestandteile der Stärke. Zur Bildung von Amylopektin hydrolysieren Stärkeverzweigungs-Enzyme (starch branching enzymes, SBE) diese $\alpha(1\rightarrow4)$ Verbindungen und übertragen den Glukosylrest $\alpha(1\rightarrow6)$ auf einen anderen Glukoserest in der Kette (Smith, 1995; Martin und Smith, 1995). Stärkeentzweigungs-Enzyme (debranching enzymes) sind zur Synthese von Amylopektin ebenfalls nötig. Sie heben vermutlich falsch platzierte Verzweigungen auf (Delatte et al., 2006)

1.1.2 Stärkemobilisierung in Blättern

Während der Nacht wird die transitorische Stärke in den Blättern abgebaut, um Saccharose zu synthetisieren. Diese ist erforderlich, um die Versorgung von nicht photosynthetisch aktiven Geweben zu gewährleisten und um die Blatzelle selbst mit Reduktionsäquivalenten und Energie zu versorgen.

Stärke liegt in Form von semikristallinen Körnern vor, welche hauptsächlich aus Amylose und Amylopektin bestehen. Folglich muss die einleitende Reaktion des Stärkeabbaus von einem Enzym katalysiert werden, welches diese semikristalline Struktur an der Oberfläche der Stärkekörnern angreifen und lösliche Glukane produzieren kann, die dann zum Abbau durch andere hydrolytische Enzyme bereit stehen. Ein Enzym, welches dazu in der Lage wäre, ist die Endoamylase α -Amylase (Fincher, 1989). Im Endosperm von keimenden Getreidekörnern hydrolysiert diese α -Amylase $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidische Bindungen und setzt lösliche Polyglukane frei, die dann für einen weiteren Abbau (s.u.) zur Verfügung stehen.

Neuere Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* zeigen jedoch, dass α -Amylasen für den Stärkeabbau in Blättern nicht unbedingt nötig sind (Yu et al., 2005).

Der im Moment gängigsten Theorie zum Stärkeabbau zufolge wird Stärke in Chloroplasten zu Maltose und Glukose abgebaut. An diesem Abbau beteiligt sind ein

Entzweigungsenzym (debranching enzyme), die Glukan-Wasser-Dikinase (GWD), die Phosphoglukan-Wasser-Dikinase (PWD), das Disproportionierungs-enzym (DPE), sowie β -Amylasen (Zeeman et al., 1989; Lao et al., 1999; Ritte et al., 2002; Scheidig et al., 2002; Baunsgaard et al., 2005; Kötting et al., 2005).

Stärkeabbau (s. Abbildung 1) erfordert die Phosphorylierung von Amylopektin durch die GWD (Ritte et al., 2000). In Arabidopsis ist etwa einer von 2000 Glukosylresten phosphoryliert, in Speicherstärke von Kartoffelknollen sind es etwa viermal so viele. Im Gegensatz dazu ist Stärke im Endosperm von Getreidekörnern kaum oder gar nicht phosphoryliert (Zeeman et al., 2007; Yu et al., 2001a).

Ein zweites Enzym, die PWD, ist ebenfalls an der Phosphorylierung der Stärke beteiligt. Diese phosphoryliert jedoch lediglich bereits durch die GWD phosphorylierte Glukosylreste (Kötting et al., 2005; Ritte et al., 2006).

Möglicherweise bricht diese Phosphorylierung die kristalline Packung der Stärkekörner auf und macht so Amylopektinketten für einen weiteren Abbau zugänglich. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Exoamylase β -Amylase zusammen mit Isoamylase 3 (ISA3, debranching enzyme) für den weiteren Abbau sorgt, indem sie Maltose (β -Amylase 3) und lineare Polyglukane (ISA3) freisetzt.

β -Amylase hydrolysiert dabei $\alpha(1\rightarrow4)$ - und ISA3 $\alpha(1\rightarrow6)$ -glykosidische Verbindungen (Smith et al., 2005; Scheidig et al., 2002).

Da die β -Amylase nur dann in der Lage ist, Maltose von linearen Polyglukanen abzuspalten, wenn diese länger sind als drei Glukosylreste, produziert sie zwangsläufig Maltotriosen. Letztere werden durch das plastidäre Disproportionierungsenzym (DPE1) auf ein Rezeptorpolyglukan, wie z.B. Maltotriose, übertragen, wobei Glukose und Maltopentaose entsteht (Critchley et al. 2001), die dann wieder Substrat für DPE1 ist.

Die beim hydrolytischen Abbau von Stärke anfallenden Hauptprodukte Maltose und Glukose werden durch den plastidären Glukosetransporter (Weber et al., 2000) und den Maltoseexporter (MEX1) (Niittyla et al., 2004) ins Cytosol transportiert, wo sie der Synthese von Saccharose dienen.

Neben der Produktion der freien Zucker Glukose und Maltose kann auch G1P gebildet werden. Letzteres entsteht bei der phosphorolytischen Spaltung durch α -Glukan-Phosphorylase (Pho1). Die Bedeutung der phosphorolytischen Spaltung von linearen Polyglukanen im Chloroplasten ist bisher nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass die Bildung von G1P metabolischen Prozessen innerhalb des

Chloroplastens dient (Sonnewald et al., 1995). Eine mögliche Aufgabe der Phosphorylase könnte die Bereitstellung von Substraten für den oxidativen Pentose Phosphat Weg (OPPP) (Zeeman et al., 2004) oder den Calvinzyklus sein (Weise et al. 2006).

Im Cytosol wird Maltose von einem cytosolischen Disproportionierungsenzym (DPE2) unter Abspaltung von Glukose auf ein Rezeptorpolyheteroglukan (Fettke et al., 2005) übertragen. Die dabei abgespaltene Glukose wird durch die Hexokinase unter ATP-Verbrauch zu G6P phosphoryliert, welches die PGI in G1P umwandelt. Letzteres steht dann zur Synthese von Saccharose bereit. Der auf das Rezeptorpolyheteroglukan übertragene Glukosylrest wird von der cytosolischen α -Glukan-Phosphorylase (Pho2) als G1P abgespalten (Lu and Sharkey, 2006).

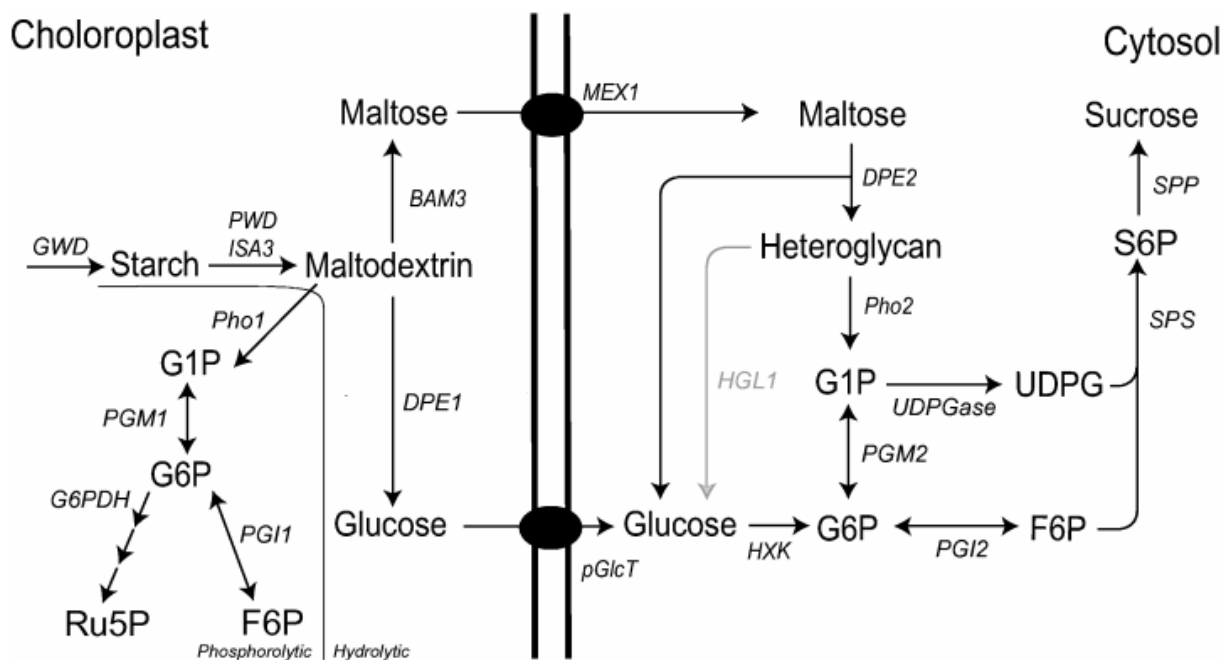


Abbildung 1: Abb. Aus Lu und Sharkey (2006), Hypothetischer Weg des Stärkeabbaus. GWD, Glukan-Wasser-Dikinase; PWD, Phosphoglukan-Wasser-Dikinase; ISA3, Isoamylase 3; Pho1, plastidäre α -Glukan-Phosphorylase; PGM1, plastidäre Phosphoglukomutase; G6PDH, Glucose-6-6-Phosphat-Dehydrogenase; PGI1, plastidäre Phosphoglukoisomerase; BAM3, β -Amylase 3; DPE1, Disproportionierungsenzym; MEX1, Maltosetransporter; pGlcT, Glukosetransporter; DPE2, Disproportionierungsenzym 2; F6P, Fruktose-6-Phosphat; G1P, Glukose-1-Phosphat; G6P, Glucose-6-Phosphat; HGL1, Heteroglykan-Glukosidase; Pho2, cytosolische α -Glukan-Phosphorylase; UDPG, Uridin-5-Diphosphat-Glucose; UDPGase, UDP-Glucose-Pyrophosphorylase; PGM2, cytosolische Phosphoglukomutase; PGI2, cytosolische Phosphoglukoisomerase; HXK, Hexokinase; Ru5P, Ribulose-5-Phosphat; S6P, Saccharose-6-Phosphat; SPS, Saccharosephosphat-Synthase; SPP, Saccharosephosphat-Phosphatase

1.1.3 Der Transport von Assimilaten in die Knolle

Saccharose, die aus einem Glukose und einem Fruktoserest besteht, ist die hauptsächliche Transportform von Kohlenhydraten in Pflanzen. Bei wenigen Pflanzen können Kohlenhydrate jedoch auch als Zuckeralkohle (Sorbitol und Mannitol) oder als Zucker der Raffinosefamilie transportiert werden, wobei sich auch hier meistens ebenso Saccharose finden lässt (Zamski und Schnaffer, 1996). Saccharose aus dem Cytosol von Mesophyllzellen dient den *Sink*-Geweben als Energielieferant für Wachstum und Entwicklung und dem Aufbau von Speicherstoffen wie z. B. Stärke.

Im Licht werden die über den TPT (Flügge und Heldt, 1991) aus den Chloroplasten exportierten Triosephosphate über eine Aldolase zu Fruktose-1,6-Bisphosphat (F1,6BP) kondensiert. F1,6BP wird in einem ersten irreversiblen Schritt zu F6P dephosphoryliert und kann dann mit UDP-Glukose über die Saccharosephosphat-Synthase zu Saccharose-6-Phosphat (Suc6P) verknüpft werden. Anschließend wird Suc6P durch die Saccharosephosphat-Phosphatase (SPP) in einer irreversiblen Reaktion zu Saccharose dephosphoryliert. G6P und G1P werden über die Reaktionen der PGI und PGM aus F6P gebildet. Die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase bildet aus UTP und G1P, unter Freisetzung eines Pyrophosphats, UDP-Glukose (Heldt, 2003; Vreugdenhil, 2006).

Diese Reaktion läuft nur im Licht ab, da die Fruktose-1,6-Bisphosphatase im Dunkeln durch hohe Fruktose-2,6-Bisphosphat-Konzentrationen (F2,6BP) gehemmt ist (Stitt et al., 1984). Eine effiziente Synthese von Saccharose im Dunkeln ist daher nur aus exportierter Maltose bzw. Glukose möglich (s. Abb. 1).

Die in den Mesophyllzellen gebildete Saccharose diffundiert durch Plasmodesmata in die Bündelscheidezellen hinein. Für den Weitertransport in die Siebröhren stehen zwei Wege zur Verfügung. Zum einen kann Saccharose über den Symplasten der Bündelscheiden- und Geleitzellen in die Siebröhren diffundieren (Roberts und Oparka, 2003) und zum anderen besteht die Möglichkeit eines apoplastischen Transports, welcher vor allem bei Pflanzen wichtig ist, deren Geleit- und Siebzellen nicht besonders stark durch Plasmodesmata mit den umgebenden Zellen verbunden sind (Sauer, 2007).

Für den apoplastischen Transport sind Translokatoren unabdingbar, welche Saccharose in den Apoplasten befördern. Da die apoplastische Saccharose-

Konzentration viel niedriger ist als in den *Source*-Zellen, erfordert dieser Transport keine Energie, da er entlang eines Konzentrationsgradienten verläuft.

In einigen Pflanzenfamilien reichen die Plasmodesmata bis in den Siebzellen/Geleitzellen-Komplex, was vermuten lässt, dass der Saccharosetransport ins Phloem überwiegend symplastisch erfolgt. Im Gegensatz zu diesen „symplastic loaders“ sind in Phloemparenchymzellen und im Siebzellen/Geleitzellen-Komplex von Kartoffelblättern wesentlich weniger Plasmodesmata zu finden. Dies lässt eine apoplastische Beladung der Siebzellen vermuten (van Bel et al., 1992).

Die dazu notwendigen Transporter wurden in den 90er Jahren entdeckt (Riesmeier et al., 1992; Lalonde et al., 1999; Weise et al., 2000). Saccharosetransporter (SUTs) bilden 3 Unterfamilien SUT1, SUT2 und SUT4, die in der Plasmamembran von Siebzellen lokalisiert sind (Kühn, 2003; Reinders et al., 2002).

SUT1 ist ein hoch affiner Transporter mit K_m -Werten zwischen 139 μ M und 1,5 mM und geringer Transportkapazität. SUT4 ist dagegen durch K_m -Werte zwischen 5 mM und 6 mM charakterisiert, hat also schwache Affinitäten zu seinem Substrat, besitzt dafür aber eine hohe Transportkapazität (Weise et al., 2000). SUT2 ist in zwei Subfamilien unterteilt, wobei eine Familie fast ausschließlich Saccharosetransporter von monokotyledonen Pflanzen enthält. In der anderen Subfamilie befinden sich Saccharosetransporter-ähnliche Proteine mit geringer Affinität und Transportkapazität oder überhaupt keiner Transportaktivität. Diese sind strukturell untereinander sehr ähnlich und womöglich an der Regulation von SUT1 und SUT4 oder an der Perzeption von Zuckern beteiligt. Letzteres wird durch strukturelle Ähnlichkeiten mit Zuckersensoren aus Hefe (RGT2 und SNF3) untermauert (Özcan et al., 1996; Barker et al., 2000; Kühn, 2003). Darüber hinaus zeigen alle drei Transporterfamilien „in vitro“ die Kapazität, Homo- und Heterooligomere zu bilden (Reinders et al., 2002), was die Möglichkeit suggeriert, dass die Transporter in höher organisierten Komplexen arbeiten. Derartige Komplexe konnten aber bisher „in planta“ nicht nachgewiesen werden.

Der Transport von Saccharose aus dem Apoplasten in die Geleitzellen erfolgt über einen Symport mit Protonen (H^+). Der dafür notwendige Protonengradient wird durch eine phloemspezifische H^+ -ATPase erzeugt, welche mit den SUTs in der Plasmamembran von Sieb- und Geleitzellen co-lokalisiert ist (Dewitt und Sussman, 1995; Frommer und Sonnewald, 1995) und unter ATP-Verbrauch Protonen in den

Apoplasten befördert. Die dafür notwendige Energie (ATP) wird aus einem kleinen Teil der importierten Saccharose gewonnen (Lerchl et al., 1995).

Die Translokation der Saccharose zu den *Sinks* erfolgt über einen Massenfluss, der durch Druckunterschiede zwischen *Source*- und *Sink*-Gewebe getrieben wird. Diese Druckunterschiede werden entlang des Phloems dadurch aufrechterhalten, dass Substanzen, die auf dem Weg zu den *Sinks* aus den Siebröhren entweichen, wieder aufgenommen werden (van Bel, 2003a). Auch Saccharose geht zu einem gewissen Teil auf diesem Weg aus den Siebröhren verloren, wird aber ständig von Saccharosetransportern wieder zurückbefördert (Kühn et al., 1997).

Die Entladung von Saccharose in die *Sink*-Gewebe kann wie die Beladung ebenfalls apoplastisch oder symplastisch ablaufen.

Die Freisetzung von Saccharose aus den Siebelementen in den Apoplasten geschieht durch Diffusion oder durch Saccharose-Effluxproteine (Kühn, 2003). Für die Aufnahme von Saccharose aus dem Apoplasten gibt es drei Möglichkeiten.

Einmal kann Saccharose aktiv über einen Saccharose/H⁺-Symporter in die Parenchymzellen transportiert werden. Des Weiteren lässt sich Saccharose im Apoplasten durch eine zellwandgebundene Invertase spalten, wobei die dabei entstehenden Hexosen (Fruktose und Glukose) über Hexosetransporter aufgenommen werden (Frommer und Sonnewald, 1995). Drittens besteht die Möglichkeit einer endocytotischen Aufnahme von Saccharose ins Cytosol (Oparka und Prior, 1988).

SUT1 wird zusammen mit einer H⁺-ATPase ebenfalls in Siebzellen von Knollen exprimiert (Kühn, 2003). Wie antisense Experimente deutlich machten, spielt dieser H⁺-Symporter, aber nur in der frühen Knollenentwicklung eine Rolle. Ihm könnte dabei die Aufgabe zufallen, Saccharose aus dem Apoplasten in die Phloemparenchymzellen zu befördern oder aber Saccharose aus den Siebzellen in den Apoplasten zu exportieren.

Für eine effektive symplastische Entladung der Siebelemente stehen in Knollen, zumindest in der frühen Entwicklung, Plasmodesmata mit einem außergewöhnlich hohen „size exclusion limit“ (SEL) zur Verfügung. Proteine bis zu einer Größe von 60 kDa können frei durch diese Zellverbindungen diffundieren (Oparka und Turgeon, 1999), was eine effiziente Entladung fördern würde. Es gibt Hinweise darauf, dass Phytohormone und kalziumabhängige Signalmechanismen die Apertur dieser

Plasmodesmata verändern (Baluska et al., 2001) und so für die notwendige Regulation der symplastischen Entladung sorgen können.

Frühe Untersuchungen an den zahlreichen Plasmodesmata zwischen dem Siebzellen/Geleitzellen-Komplex und dem umgebenden Speichergewebe in Knollen suggerieren eine symplastische Entladung (Oparka, 1986).

In Kartoffelknollen konnte auch gezeigt werden, dass während der frühen Knollenentwicklung (Elongationsphase der Stolone) apoplastische Entladungswege vorherrschen (Viola et al., 2001). Während der beginnenden Knollenentwicklung tritt jedoch ein Wechsel von apoplastischer zu symplastischer Entladung ein. Symplastische Entladung ist dann auch in der weiteren Knollenentwicklung der dominierende Entladungsmodus der Siebelemente (Viola et al., 2001).

Ein weiteres Indiz für den Wechsel des Entladungsmodus ist die Abnahme der Invertaseaktivität zu Beginn der Knollenbildung. Dies könnte einem Wechsel vom Saccharose-Abbau durch die zellwandgebundene Invertase zu einem Abbau von Saccharose im Cytosol durch die Saccharose-Synthase (SuSy) entsprechen.

1.1.4 Die Stärkesynthese in Knollen

Die Metabolisierung von Saccharose in Knollen vollzieht sich auf verschiedenen Wegen. So kann Saccharose entweder durch die apoplastische oder die cytosolische Invertase zu Glukose und Fruktose hydrolysiert oder durch die Saccharose-Synthase zu Fruktose und UDP-Glukose umgesetzt werden (Heldt, 2003).

Welche dieser Möglichkeiten dominierend ist, hängt entscheidend vom Entwicklungszustand der Knolle ab.

Wie in 1.1.3 erwähnt ergibt sich während der frühen Knollenentwicklung ein Wechsel von Saccharosespaltung durch die Invertase zu Saccharosespaltung durch die Saccharose-Synthase (SuSy) (Appeldoorn et al., 1997). Invertase- und Saccharose-Synthase-Aktivität sind während der Knollenentwicklung gegenläufig korreliert. Die Abnahme der Invertaseaktivität kennzeichnet den Beginn der Speicherphase. Es wird vermutet, dass die Zunahme der SuSy-Aktivität positiv mit der Stärke des *Sinks* korreliert, welche durch die Fähigkeit definiert ist, Saccharose zu metabolisieren und/oder Stärke zu synthetisieren (Zrenner, 1995).

Die Produkte der Saccharosespaltung (Glukose und Fruktose) gehen über die Aktivitäten der Enzyme Hexokinase (HK), Phosphoglukoisomerase (PGI) und Phosphoglukomutase (PGM) in den Hexosephosphatpool über (Ferne et al., 2001).

Die aus der Saccharosespaltung durch SuSy gewonnene UDP-Glukose muss zu diesem Zweck zunächst über die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase zu G1P umgesetzt werden.

Diese Hexosephosphate dienen dann der Stärkesynthese oder als Substrat für die Glykolyse und den OPPP in den Amyloplasten (Neuhaus und Emes, 2000).

Die Stärkesynthese in den Amyloplasten hängt von der Belieferung mit Kohlenstoffgrundgerüsten und Energie in Form von ATP ab.

Die Kohlenstoffgrundgerüste werden über den Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator (GPT) (Kammerer et al., 1998) in den Amyloplasten transportiert. Hauptsächlichste Transportform ist G6P. Der Transport erfolgt im strikten Gegentausch mit P_i oder Triosephosphaten.

Energie wird dem Amyloplasten in Form von ATP zugeführt. Dies geschieht über den plastidären Adenylat-Translokator (NTT; Kampfenkel et al., 1995). Dieser transportiert ATP im Gegentausch mit Adenosindiphosphat (ADP) in die Amyloplasten.

Die Synthese von Stärke erfolgt ausgehend von G6P analog zur Stärkesynthese in Chloroplasten über die Enzyme PGM und AGPase sowie diverse Stärkesynthasen und Stärkeverzweigungsenzyme (s. 1.1.1).

Auch bei der Stärkesynthese in Amyloplasten kommt der AGPase eine zentrale Rolle zu. Wie in Chloroplasten wird die AGPase allosterisch reguliert (s. 1.1.1). 3PGA-Gehalte in Knollen sind während der Knollenentwicklung relativ konstant (Geigenberger und Stitt, 2000). Sie verändern sich jedoch bei Verwundung, Wasserstress, hohen Temperaturen oder Sauerstoffmangel. Durch Wasserstress z. B. wird die SPS durch Phosphorylierung aktiviert, was zu einer erhöhten Saccharose-Resynthese im Cytosol führt. Der dadurch sinkende 3PGA-Gehalt inhibiert die AGPase und reduziert so die Stärkesynthese (Geigenberger et al., 1997 und 1999). Die allosterische Regulation erlaubt es, innerhalb von Sekunden die Rate der Stärkesynthese an die Verfügbarkeit von Zuckern anzupassen.

Wie die AGPase in Blättern wird auch die AGPase aus Knollen durch posttranslationale Redoxmechanismen reguliert (s. 1.1.1; Tiessen et al., 2002). Diese Regulation passt die Stärkesynthese innerhalb von 30-60 min an die Verfügbarkeit von Zuckern an (Geigenberger, 2003).

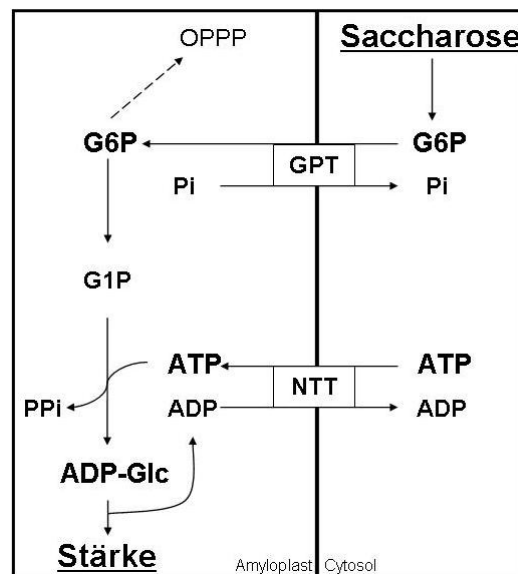


Abbildung 2: Schema der Stärkesynthese in Amyloplasten. GPT, Glukose--Phosphat/Phosphat-Translokator; NTT, Nukleosidtriphosphat-Translokator; ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat; G6P, Glukose-6-Phosphat; G1P, Glukose-1-Phosphat; ADP-Glc, ADP-Glukose; PP_i, Pyrophosphat; P_i, Orthophosphat; OPPP, oxidativer Pentosephosphat-Weg

1.1.5 Die Bedeutung von GPT und NTT für die Stärkesynthese in Knollen

Im Gegensatz zur Stärkesynthese in Chloroplasten hängt die Synthese von Stärke in Amyloplasten heterotropher Gewebe vom Import von Kohlenstoffgrundgerüsten und Energie ab.

Während der GPT für den Import von G6P sorgt, transportiert der NTT ATP in die Amyloplasten. In Kartoffelpflanzen existieren drei Isoformen des GPT (*GPT1*, 2 und 3). *GPT1* und 2 werden vor allem in heterotrophen Geweben stark exprimiert, die Expression von *GPT3* konnte bisher nur nach Infektion von Kartoffelpflanzen mit *Phytophthora infestans* gefunden werden (Kammerer et al., 1998; Ludewig, pers. Kommunikation). In Arabidopsis konnten bisher zwei Isoformen des NTT gefunden werden (*NTT1* und 2), in Kartoffelpflanzen lediglich eine (Kampfenkel et al., 1995; Neuhaus et al., 1997, Möhlmann et al., 1998; Linka et al., 2003).

Wie wichtig diese beiden Transporter für die Stärkesynthese sind, zeigen unter anderem antisense- und Überexpressions-Experimente in Kartoffeln (Tjaden, 1998; Zhang et al., 2008).

Kartoffelpflanzen, welche ein antisense-Konstrukt gegen den NTT exprimieren und dadurch eine verminderte NTT-Aktivität zeigen, haben einen bis zu 50 % reduzierten Stärkegehalt im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Außerdem weisen sie ein niedrigeres

Verhältnis von Amylose zu Amylopektin auf. In Wildtyppflanzen (WT) hat Amylose einen Anteil von ungefähr 18,8 % an der gesamten Stärkemenge. In NTT-antisense Pflanzen dagegen macht Amylose nur ca. 11,5 % der gesamten Stärkemenge aus. Ein weiteres Merkmal der antisense-Pflanzen ist der reduzierte Knollenertrag pro Pflanze. Sie bilden zwar im Mittel mehr Knollen als der WT, diese sind aber wesentlich kleiner, so dass der Knollenertrag pro Pflanze um 5 % - 30 % reduziert ist. Positiv korreliert mit dem reduzierten Stärkegehalt ist die erhöhte Menge an löslichen Zuckern, welche fast doppelt so hoch konzentriert sind wie im WT (Tjaden et al., 1998).

Im Gegensatz zu Untersuchungen von Zhang et al., 2008 berichten Tjaden et al. (1998) von Pflanzen mit erhöhter NTT-Aktivität, welche den NTT unter Kontrolle des 35S-Promotors überexprimieren. Bei diesen Pflanzen wiesen zwei von drei untersuchten Linien einen um 16 % und 36 % erhöhten Stärkegehalt in Knollen auf. Diese Pflanzen haben im Kontrast zu antisense-Pflanzen ein erhöhtes Verhältnis von Amylose zu Amylopektin. Bei ihnen hat Amylose einen Anteil von bis zu 27 % des gesamten Stärkegehaltes in Knollen. In diesen Pflanzen wurden außerdem weniger lösliche Zucker gefunden und ein verminderter Knollenertrag im Vergleich zu WT-Pflanzen.

Die von Zhang und Mitarbeitern untersuchten Pflanzen exprimieren einerseits eine cDNA des NTT1 aus *Arabidopsis thaliana* oder andererseits eine cDNA des GPT aus Erbsenwurzeln (*Pisum Sativum*) in Sense-Orientierung unter Kontrolle des B33-Patatin Promotors. Letzterer wird überwiegend in Knollen und Wurzeln exprimiert (Rocha-Sosa et al., 1989). Außerdem wurden Pflanzen generiert, welche beide Konstrukte gleichzeitig exprimieren.

Die untersuchten Linien, welche entweder das GPT- oder das NTT-Konstrukt exprimierten, zeigten im Falle des GPT eine bis zu 1,8 mal und im Falle des NTT eine bis zu zweimal erhöhte Aktivität. Bei keiner dieser Linien konnten jedoch Änderungen im Stärkegehalt oder im Knollenertrag beobachtet werden.

An Pflanzen, welche beide Konstrukte überexprimierten, konnten jedoch deutliche Änderungen in den untersuchten Parametern beobachtet werden. Sie zeigten ebenfalls zweimal mehr NTT- und 1,8 mal mehr GPT-Aktivität als Kontrollpflanzen. Darüber hinaus wiesen sie einen bis zu 19 % erhöhten Knollenertrag und einen bis zu 28 % höheren Stärkegehalt auf als WT-Pflanzen auf, so dass der gesamte Stärkeertrag pro Pflanze um bis zu 44 % höher lag.

Ähnlich wie bei Tjaden (1998) zeigten auch die Überexprimierer beider Konstrukte ein gestiegenes Verhältnis von Amylose zu Amylopektin, welches sich durch einen gestiegenen Anteil der Amylose am gesamten Stärkegehalt auszeichnete.

Darüber hinaus wurden unveränderte Gehalte an ADP-Glukose, ADP, ATP und löslichen Zuckern gemessen. Auch Messungen der AGPase-Proteinmenge zeigten keine Änderungen in der Abundanz dieses Enzyms. Aus diesen Daten ergab sich die Schlussfolgerung, dass die Stärkesynthese in den Amyloplasten von Kartoffelpflanzen durch die Aktivitäten des NTT und GPT co-limitiert ist.

1.2 Der Purinmetabolismus

1.2.1 Die Purin-„de novo“-Biosynthese

Purinnukleotide sind essentielle Komponenten für Pflanzenwachstum und -entwicklung. Sie werden entweder „de novo“ synthetisiert oder ausgehend von Purinbasen und Purinnukleosiden recycled. Die Nukleotidsynthese versorgt die Pflanze mit Energieträgern in Form von z. B. ATP und stellt Vorläufer einer Vielzahl von Biosynthesewegen zur Verfügung. Deshalb sind Purin- und Pyrimidinnukleotide Bestandteile fundamentaler biologischer Funktionen. Purinnukleotide sind besonders während der Zellteilung und dem Zellwachstum als Untereinheiten von Nukleinsäuren unabdingbar (Senecoff et al., 1996). Sie sind direkte Vorläufer der Vitamin-B-Synthese und haben Anteil an der Synthese von Cofaktoren wie Nikotinamid und Flavin-Coenzym (Herz et al., 2000). Außerdem agieren sie als Signalmoleküle und stellen energiereiche Metabolite zur Synthese von Polysacchariden und Sekundärprodukten (Stasolla et al., 2003) dar. Überdies sind sie essentielle Bestandteile von Cytokininen, welche Wachstum und Entwicklung steuern (Stasolla et al., 2003).

In höheren Pflanzen werden Purinnukleotide über den „de novo“-Weg neu synthetisiert. Die Synthese (s. Abbildung 3) geht von einfachen Molekülen aus und erfordert als Komponenten die Aminosäuren Glycin, Glutamin und Aspartat, 10-formyl-Tetrahydrofolat (THF) und CO₂, sowie Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP), welches die aktivierte Riboseeinheit stellt. Die Purin-„de novo“-Biosynthese bis zum Inosinmonophosphat (IMP) besteht aus zehn Schritten, welche in Abbildung 3 dargestellt sind. In zwei anschließenden Reaktionen durch die Produkte der Gene

AtpurA und *AtpurB* wird aus IMP AMP. AMP wird zur Synthese von GMP wahrscheinlich über den StBT1-Transporter (Leroch et al., 2005) ins Cytosol transportiert und dort über die Reaktionen der AMP-Deaminase zu IMP konvertiert, welches dann durch die IMP-Dehydrogenase und die GMP-Synthase zu GMP umgeformt wird.

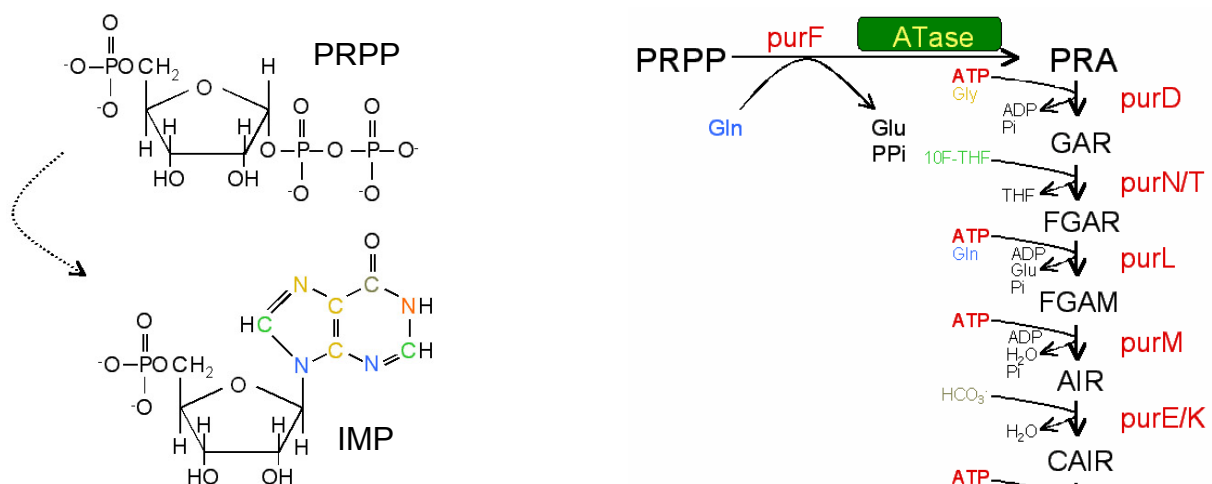


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Purin-,de novo“-Biosyntheseweges; Abkürzungen: PRPP, 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat; Gln, Glutamin; Glu, Glutamat; ATase, Amidophosphoribosyltransferase; PRA, 5-Phosphoribosylamin; Gly, Glycin; GAR, Glycinamid ribonucleotid; FGAR, Formylglycinamid Ribonucleotid; FGAM, Formylglycinamid Ribonucleotid; AIR, 5-Aminoimidazol Ribonucleotid; CAIR, 4-Carboxy Aminoimidazol Ribonucleotid; Asp, Aspartat; SAICAR, N-Succinyl-5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonucleotid; AICAR, 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonucleotid; FAICAR, 5-Formaminoimidazol-4-Carboxamid Ribonucleotid; IMP, Inosinmonophosphat; PurF-PurH, Gene der katalysierenden Enzyme.

Eingangsenzym dieses Biosyntheseweges ist die Amidophosphoribosyltransferase (ATase), welche in *Arabidopsis thaliana* von mindestens drei Genen kodiert wird (*AtpurF1*, *AtpurF2*, *AtpurF3*). Alle purF-Gene tragen laut der TargetP-Datenbank (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP) (Emanuelsson et al., 2000) ein chloroplastidäres Transitpeptid. Auch alle anderen an der Synthese von IMP beteiligten Enzyme sind wahrscheinlich in Plastiden lokalisiert (Boldt und Zrenner, 2003). *AtpurF1* kodiert eine wurzelspezifische und *AtpurF2* eine blattspezifische Isoform (Ito et al., 1994). *AtpurF3* wird schwach in Blättern, Schoten und Wurzeln exprimiert (Boldt und Zrenner 2003). Die Enzyme, welche in zwei weiteren Schritten AMP synthetisieren (*AtpurA* und *AtpurB*), sind laut der TargetP-Datenbank ebenfalls plastidär lokalisiert.

Die „de novo“-Biosynthese von Purinnukleotiden beginnt mit der Bildung von Phosphoribosylamin (PRA) aus PRPP und Glutamin durch die ATase, welches das Schlüsselenzym dieser Reaktion ist und wahrscheinlich allosterisch reguliert wird. Über die Regulation des Purin-Biosyntheseweges in Pflanzen ist bislang noch wenig bekannt.

In *E. coli* bewirken extrazelluläre Nukleotide die Induktion der zentralen Regulatorproteine purR oder pyrR, welche die Transkription der Purin- und/oder Pyrimidinsynthesegene reprimieren (Turner et al., 1998). In Hefe unterliegen die Gene der AMP-Synthese einer feedback-Inhibition und der Regulation durch die zwei Transkriptionsfaktoren Basp1 und Basp2, welche mit dem Enzym SAICAR (s. Abbildung 3) interagieren. Möglicherweise agiert SAICAR als Purinnukleotid-Sensor innerhalb der Zelle (Rebora et al., 2001). Frühere Studien an *Glycin max* legen nahe, dass die ATase durch die Produkte PRA, Glutamat, IMP, AMP und P_i allosterisch inhibiert wird (Reynolds et al., 1984). Außerdem besteht die Möglichkeit einer hormonellen Regulation. So wird z.B. die Expression von *AtpurC* (*PUR7*) durch externe Zugabe von Auxin stimuliert (Senecoff et al., 1996).

1.2.2 Das Purin-Recycling

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich erfordert die „de novo“ Synthese fünf ATP zur Bildung eines AMP und sieben ATP zur Bildung von GMP. Das Recycling dieser Purine erfordert lediglich ein ATP, spart also Energie. Purinbasen, Nukleotide und Nukleoside aus dem Zellmetabolismus oder -katabolismus (DNA- und RNA-Abbau etc.) werden während des Recyclings ineinander umgewandelt.

Die Purinbasen Adenin und Guanin werden dabei über die Aktivitäten der Enzyme Adenin- und Hypoxanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase zu Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP). PRPP dient bei diesen Reaktionen als Ribosephosphat-Donor. Adenosin- und Inosin/Guanosin-Phosphorylasen sind in der Lage, mit den entsprechenden Purinbasen und Ribose-1-P die jeweiligen Nukleoside zu synthetisieren. Die beiden letzteren Enzyme sind in Pflanzen jedoch nicht besonders aktiv (Moffatt und Ashihara, 2002). Purinnukleoside werden durch Kinasen und/oder durch Nukleosid-Phosphotransferasen in die entsprechenden Nukleotide umgewandelt und so ebenfalls recycled.

Adenin-Phosphoribosyltransferasen und Adenosin-Kinasen spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Bildung von Cytokinin (Moffatt und Ashahira, 2002).

Natürlich vorkommende Cytokinine sind Adeninderivate, welche aus Isopentenyl und AMP gebildet werden. Die Isoprenoidseitenkette des Isopentenyl-Adenosinmonophosphats kann dann modifiziert werden, um die unterschiedlichen Cytokinine zu erzeugen.

1.2.3 Die *Arabidopsis thaliana atd2*-Mutante

Van der Graaff et al. (2004) untersuchten die Rolle der ATase für das Pflanzenwachstum und für die Entwicklung in transgenen *Nicotiana tabacum*-Pflanzen mit einer reduzierten ATase-Aktivität sowie in einer *Arabidopsis thaliana* T-DNA Insertionsmutante (*atd2* ATase deficient 2) mit fehlender ATase2-Aktivität. Sowohl der transgene Tabak als auch die *Arabidopsis*-Mutante besaßen einen vergleichbaren Phänotyp, der sich durch stark verzögertes Wachstum und schwere Chlorosen in den Blättern auszeichnete. *atd2*-Pflanzen bildeten zudem weiße Blätter, hatten aber grüne Kotyledonen. Darüber hinaus fehlte in der *atd2*-Mutante das Palisadenparenchym. Letzteres wurde durch eine zweite Lage Schwammparenchym ersetzt. Die Komplementation der *atd2*-Mutante mit der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors stellte normales Wachstum und normale Blattentwicklung wieder her und ergab zudem eine massive Stärkeakkumulation in den Blättern. Ähnliche Beobachtungen gelangen bei einer biochemischen Komplementation durch Keimung auf IMP-haltigem Medium.

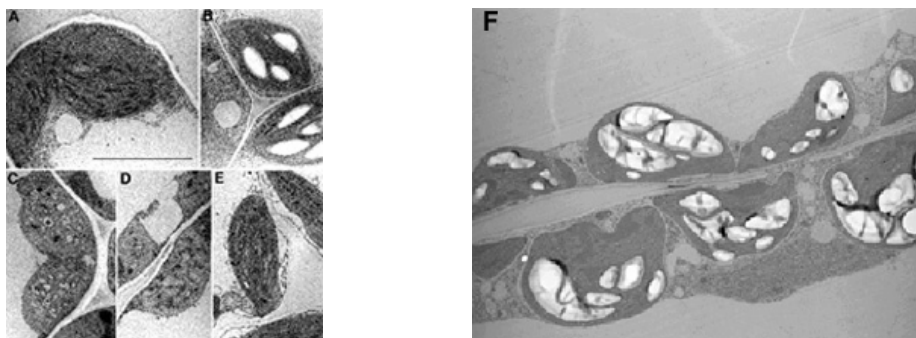


Abbildung 4: Chloroplasten der *atd2*-Mutante. A-E, Chloroplastenstruktur von 2 Wochen alten Keimlingen, welche in Flüssigmedium zur Keimung gebracht wurden. A, C24-Wildtyp; B, C24-WT gekeimt in Flüssigmedium mit 5mM IMP; C, *atd*- Mutant; D und E, *atd2* gekeimt in Flüssigmedium mit 5mM IMP; F, *atd2* mit 35S::ATase2 komplementiert; Größenskala in A = 1µm; (Bilder von Eric van der Graaff et al., 2004; F unveröffentlicht, Vergrößerung nicht bekannt)

Aus Abbildung 4 wird deutlich, dass eine Überexpression der ATase2 mit dem 35S-Promotor im *atd2*-Hintergrund zu einer massiven Stärkeakkumulation in Chloroplasten führt (Abb.4 F). Exogen appliziertes IMP hat im WT den gleichen Effekt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit waren Untersuchungen an Kartoffelpflanzen, welche sowohl den GPT aus Erbsenwurzeln als auch den NTT1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle durch den B33-Promotor überexprimieren. Diese Pflanzen sollten unter Freilandbedingungen untersucht werden, um die Untersuchungsergebnisse mit Beobachtungen aus dem Gewächshaus zu vergleichen.

Ausgehend von der Arbeit van der Graaffs (2004) über den Purinmetabolismus ergab sich zudem die Überlegung, die ATase2 aus *Arabidopsis thaliana* in *Solanum tuberosum* überzuexprimieren. Somit erstrecken sich die Untersuchungen ebenfalls auf die Auswirkungen einer Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des B33- und des 35S-Promotors in *Solanum tuberosum*. Der Stärkegehalt in Knollen und Blättern sowie der Knollenertrag waren Schwerpunkt dieser Analysen. Außerdem sollte die ATase2 im Hintergrund der GPT/NTT-Überexprimierer exprimiert werden, um die Auswirkungen auf die Pflanze zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Verbrauchsmaterial

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme stammten von den Herstellern Biomol (Hamburg, D), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merck AG (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D), New England Biolabs (Frankfurt a. M., D). Der Reinheitsgrad war „research grade“ oder der höchstmöglich verfügbare.

Enzyme für die Molekularbiologie lieferten die Hersteller Invitrogen (Karlsruhe, D), MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D), Promega (Mannheim, D), Qiagen (Hilden, D), Roche (Mannheim, D) und Sigma (Deisenhofen, D).

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden über die Firma KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar, D) bezogen.

Gerätetypen und deren Hersteller werden, soweit dies für die Versuchsdurchführung von Bedeutung ist, bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

2.1.2 Verwendete Antibiotika

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antibiotika sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

<u>Antibiotikum</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Hygromycin	100 µg/ml
Rifampicin	150 µg/ml
Chloramphenicol	20 µg/ml
Carbenicillin	100 µg/ml
Cefotaxim	500 µg/ml
Sulfonamid	5,25 µg/ml

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der verwendeten Antibiotika und deren Konzentrationen

2.1.3 Verwendete Vektoren

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

<u>Vektor</u>	<u>Herkunft</u>	<u>pflanzliche Resistenz</u>	<u>bakterielle Resistenz</u>
pGEM®-T-Easy	Promega	-	Ampicillin
pGWB2	MPI	Kanamycin	Chloramphenicol, Hygromycin
pGWB5	MPI	Kanamycin	Chloramphenicol, Hygromycin
TOPO-TA	Invitrogen	-	Ampicillin
pENTRY SD/D/TOPO	Invitrogen	-	Chloramphenicol, Kanamycin
B33-pBIN-Kan	-	Kanamycin	Hygromycin
B33-pBIN-Hyg	-	Hygromycin	Kanamycin
pGreen II	-	Sulfonamid	Hygromycin

Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren sowie deren Herkunft und Resistenzen

2.1.4 Verwendete Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

<u>Gen</u>	<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Anlagerungs- Temp. [°C]</u>
1) purF	CGestPurFstF	CGTTTCGTCCAAACCCAACC	62
	CGestPurFstR	CAGAACTAGTAGTATTGAAAATTGAGC	62
2) purD	CGestPurDstF	GATAAATATGGAATTCCAACCTGC	62
	CGestPurDstR	GACACTCTGGATCTCCAAAGCG	64
3) purN/T	CGestPurN/TstF	GCAAGGAATTTTTCCAGTGTAGG	64
	CGestPurN/TstR	GTAGGATCTTAGAGAACCCACG	66
4) purL	CGestPurLstF	GTAAGGTTTTGCTCGACCCG	64
	CGestPurLstR	GACCTTATCCATTTGGTGGC	64
5) purM	CGestPurMstF	GGATTCATATCTTGTGGCTGG	62
	CGestPurMstR	GACCACTTTGCTTCAGAACCC	64
6) purE	CGestPurEstF2	CGTCAGCGCAGCAAATTGAG	62
	CGestPurEstR2	GCTTCTCAAGTGTGGCAACG	62
7) purC	CGestPurCstF	GCTGCAATCTTTGAACTCACC	62
	CGestPurCstR	GAAGCAAGAATTCTGTCTAACG	62
8) purB	CGestPurBstF2	GCAGAGGAGTTTGTCTTGTC	60
	CGestPurBstR2	GCTGCCAGCGTGAAATAGG	60
9) purH	CGestPurHstF	GAGTGGAGTGCCTGTGAAGC	64
	CGestPurHstR	CATAAAAACCAACATGTGCAAGC	64
10) At4g34740	ATase2F	CACCGGATCCATGGCGGCCACCTCTAGC	73,9
	ATase2R	AAGTCGACCTACCGTACCCAACCTCC	68
AtNTT	NTT-fwd	ATGGAAGCTGTGATTCAAACCA	62
	NTT-rev	TTATAAGTTGGTGGGAGCAGATTTC	68
St β - Tubulin	TubSt_fwd	AAATGTGCAGAACAAGAACTCATCC	70
	TubSt_rev	CATAACAAGTTCACTTTGGCAG	62

Tabelle 2.3: Zusammenstellung der Bezeichnungen der verwendete Oligonukleotide und der Gene oder Genfragmente, die mit ihnen amplifiziert wurden. Außerdem sind die Primersequenzen und deren Anlagerungstemperaturen hier aufgeführt.

2.2 Arbeiten mit *Solanum tuberosum*

2.2.1 Anzucht

Die Anzucht von *Solanum tuberosum* erfolgte auf 3MS-Gelrite-Platten. Es wurde ausschließlich *Solanum tuberosum* cv. Desirée verwendet.

3MS-Gelrite-Platten:

4,6 g/l	Murashige & Skoog Medium (M0244)
30 g/l	Saccharose (3% _(w/v))
3 g/l	Gelrite
500 mg/l	Cefotaxim
pH 5,8	KOH

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen kamen, falls erforderlich, weitere Antibiotika zur Selektion hinzu (s. Tabelle 2.1 und 2.2).

2.2.2 Haltung

Die Haltung der Kartoffeln erfolgte in Sterilkultur auf 3MS Platten in einem Pflanzenkulturschrank mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden bei einer Temperatur von 22 °C.

Nach dem Erreichen einer Größe von ca. 12 cm und der Ausbildung von ausreichend Wurzelmasse wurden die Stecklinge in Erde umgetopft und ins Gewächshaus transferiert. Dort erhielten sie im Mittel 40 kLux Licht und wurden einer mittleren Tages- und Nachttemperatur von 22 °C bzw. 16 °C ausgesetzt.

Zur Ermittlung der Wurzelmasse wurden die Kartoffeln in einem Tongranulat (Lamstedt-Ton) mit einer Körnung von 2 - 4 mm angezogen und wöchentlich mit 0,2 % Wuxal (Fa. Manna) gedüngt.

2.2.3 Transformation von Kartoffelblättern

Zur Transformation von Kartoffelblättern waren folgende Medien erforderlich.

3MS-Medium 4,6 g/l MS (M0244)
 30 g/l Saccharose
 pH 5,8 KOH

GMS-Medium 4,4 g/l MS (M0244)
 16 g/l Glukose
 pH 5,8 KOH

CG76-Medium GMS-Medium +
 5 g/l NAA
 1 g/l Benzylaminopurin (BAP)
 500 mg/l Cefotaxim
 3 g/l Gelrite

Blätter junger Kartoffelpflanzen aus Sterilkultur wurden abgeschnitten und auf ein mit 3MS-Medium getränktes und steriles Filterpapier gelegt. Der Stengelansatz wurde entfernt und die Blätter mit einem sterilen Skalpell eingeritzt. 12 bis 15 der so verletzten Blätter mussten, mit der Oberseite nach unten, in eine Petrischale mit 12 ml 3MS-Medium überführt werden.

Zur Transformation kamen transgene durch Zentrifugation und anschließende Resuspendierung aufkonzentrierte Agrobakterien hinzu, welche das gewünschte Konstrukt enthielten.

Dieser Ansatz wurde zwei Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um die Transformation einzuleiten.

Zur Induktion von Kalli wurden die Blättchen danach auf CG76 Platten ausgelegt und im Pflanzenkulturschrank gelagert.

2.2.4 Induktion von Kalli

Zur Induktion von Kalli war folgendes Medium erforderlich.

<u>CG75-Medium</u>	GMS-Medium + (s. 2.2.3)
	2 mg/l Zeatin
	0,02 mg/l NAA
	500 mg/l Cefotaxim
	3 g/l Gelrite

Zur Selektion von positiv transformierten Pflanzen wurden dem Medium die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt (s. Tabelle 2.1 und 2.2).

Nach einwöchiger Inkubation auf CG76-Platten (s. 2.2.3) wurden die Blättchen zur Induktion von Kallus und Sproßwachstum auf CG75-Platten überführt und nach zwei Wochen auf frische CG75-Platten umgesetzt. Diese Umsetzung wiederholte sich alle zwei Wochen, bis nach fünf bis zehn Wochen die ersten Sprosse aus den Kalli wuchsen. Auswachsende Sprosse wurden mit Kalli in sterile Einmachgläser (F. Weck) mit CG75-Medium gesetzt. Nach Erreichen einer Größe von zwei bis vier cm wurden die Sprosse vom Kallus abgeschnitten und in Einmachgläser mit 3MS-Medium (s. 2.2.1) überführt. Nach Ausbildung einer Wurzel und dem Erreichen einer Größe von fünf bis zehn cm erfolgte die Duplikation der Pflanzen. Dazu wurden sie auf halber Höhe abgeschnitten und die dabei erzeugten Kopfstecklinge in neue Einmachgläser mit 3MS-Medium überführt. Die Duplikate konnten nach Erreichen einer Größe von ca. 12 cm und der Ausbildung von genügend Wurzelmasse in Erde umgetopft und ins Gewächshaus transferiert werden.

2.2.5 Probennahme

Proben von Blättern und Knollen wurden mit einem Korkbohrer ($r = 0,35$ cm) geerntet, in Eppendorfgläser überführt und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Knollenproben wurden vor dem Einfrieren mit einer Reibe in etwa einen mm dicke Scheiben zerlegt, um einen späteren Aufschluss zu erleichtern. So präpariert konnten die Proben mehrere Monate bei -80 °C lagern.

2.3 Mikrobiologische Methode

2.3.1 Anzucht von *Escherichia Coli*

Escherichia coli Bakterien (*E. coli*, Stamm DH5 α) wurden entweder auf LB-Platten oder in LB-Flüssigkultur bei 37 °C angezogen. Zur Selektion transgener Organismen kamen die entsprechenden Antibiotika zu den Medien hinzu (s. Tabelle 2.1 und 2.2).

<u>LB-Medium</u>	2 g	Trypton
	1 g	Hefeextrakt
	2 g	NaCl
ad	200 ml	H ₂ O

<u>LB-Platten</u>	200 ml	LB-Medium
	3 g	Bakterien-Agar

Die Lagerung der Bakterien erfolgte einige Wochen lang bei 4 °C auf LB-Platten oder als Glycerinstammkultur (500 μ l Kultur und 500 μ l 30 % Glycerin in LB-Medium) bei -80 °C.

2.3.2 Herstellung TSS-kompetenter *Escherichia Coli* Zellen

E. coli Zellen (Stamm DH5 α) wurden in fünf ml LB-Medium angeimpft und über Nacht im Bodenschüttler (Fa. New Brunswick G25, Edison (USA)) bei 37 °C angezogen. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Über-Nacht-Kultur in 100 ml frisches LB-Medium gegeben und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,3-0,4 geschüttelt. Nach ca. 2 Stunden wurden die Bakterien bei 3000 rpm für 10 min pelletiert, das Pellet in eisgekühltem TSS Medium (Chung und Miller, 1993) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde zu 50 μ l in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

<u>TSS-Medium</u>	10 % (w/v)	Polyethylenglykol 8000
	5 % (w/v)	Dimethylsulfoxid
	20-50 mM	MgCl ₂
	20-50 mM	MgSO ₄
	pH 6,5	NaOH

2.3.3 Transformation TSS-kompetenter *Escherichia Coli* Zellen

Ein 50 µl Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 15 µl Ligationsansatz (s. 2.4.1.14) bzw. 50-200 ng DNA vermengt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen zur Aufnahme von DNA für 50 Sekunden auf 42 °C erwärmt. Nach diesem Heatshock wurde der Ansatz mit 800 µl LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, 2 Minuten bei 6000 rpm pelletiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen (s. Tabellen 2.1 und 2.2).

2.3.4 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobakterien (GV2260) wurden entweder auf YEB-Platten oder in YEB-Flüssigkultur bei 28 °C angezogen. Zur Selektion transgener Organismen kamen die entsprechenden Antibiotika zu den Medien hinzu (s. Tabelle 2.1 und 2.2).

<u>YEB-Medium</u>	5 g/l	Bacto Pepton
	1 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	Beef-Extrakt
	5 g/l	Saccharose
	0,5 g/l	MgSO ₄ *7 H ₂ O

<u>YEB-Platten</u>	YEB-Medium
	15 g/l Bakterien Agar

Die Lagerung der Bakterien erfolgte einige Wochen lang bei 4 °C auf YEB-Platten oder als Glycerinstammkultur (500 µl Kultur und 500 µl 30 % Glycerin in YEB-Medium) bei -80 °C.

2.3.5 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

Agrobakterien wurden in 5 ml MGL-Medium mit den Antibiotika Rifampicin (150 µg/ml) und Carbenicillin (100 µg/ml) angeimpft und ein bis zwei Tage bei 28 °C im Bodenschüttler (Fa. New Brunswick G25, Edison (USA)) wachsen gelassen.

Nach Erreichen der frühen Sättigung wurde die Vorkultur mit MGL-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,04 E - 0,08 E verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 E weiter inkubiert (ca. 4 Stunden).

Danach wurden die Zellen pelletiert (5 min, 4 °C, 5000 rpm), in 40 ml 1mM HEPES (pH 7,0) resuspendiert, erneut pelletiert und in 40 ml 1 mM HEPES / 10 %_(v/v) Glycerin (pH 7,0) resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation der Bakterien und Aufnahme des Pellets in 2 ml eisgekühltem 1 mM HEPES / 10 %_(v/v) Glycerin.

Diese Suspension wurde auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, 30 Sekunden lang erneut zentrifugiert und das Pellet in 200 µl 1 mM HEPES / 10 %_(v/v) Glycerin aufgenommen. Diese Suspension wurde zu 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>MGL-Medium</u>	5 g/l	Bacto Peptone
	2,5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	5 g/l	Mannit
	1,6 g/l	Na-Glutamat
	0,25 g/l	KH ₂ PO ₄
	0,1 g/l	MgSO ₄ *7H ₂ O
	1 mg/l	Biotin

2.3.6 Transformation elektrokompetenter Agrobakterien

100-500 ng DNA (ca. 1 bis 2 µl) wurden zu 50 µl gefrorenen elektrokompetenten Agrobakterien gegeben und 2 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvetten (Fa. PEQlab, Erlangen) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 400 Ω, und 2,5 kV mit einem Delay von 8 bis 9 Millisekunden. Sofort wurde ein ml YEB-Medium (s. 2.3.4) auf RT zugegeben und der Transformationsansatz bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Nach

zwei Stunden wurden die Bakterien für zwei Minuten bei 8000 rpm in der Zentrifuge aufkonzentriert, 50 – 200 µl der Suspension auf YEB-Platten (s. 2.3.4) ausgestrichen und zwei Tage bei 28 °C wachsen gelassen. Nach zwei Tagen wurden einzelne Kolonien gepickt, erneut auf YEB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die daraus resultierenden Bakterien wurden mit der Impföse in 3MS-Medium (s. 2.2.3) resuspendiert und zur Transformation von Kartoffelblättchen eingesetzt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 DNA-Techniken

2.4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde das Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit® der Firma Biorad genutzt und nach Herstellerangaben verwendet. Um „low copy“-Plasmide zu isolieren bot sich der Einsatz des Promega Midi-Prep Kit® nach Herstellerangaben an.

2.4.1.2 Präparation von genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Um DNA eines ausreichend hohen Reinheitsgrades für die PCR (s. 2.4.1.5) zu erhalten, erwies sich eine leicht abgewandelte Version des Protokolls von Liu (Liu et al. 1995) als geeignet. Dazu wurde Blattmaterial entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Proben wurden mit einem vorgekühlten Bohrer zermahlen und in 500 µl Extraktionspuffer aufgenommen. Die Extrakte wurden anschließend mit 400 µl PCI ausgeschüttelt. Um überflüssiges Blattmaterial und Proteine abzutrennen, wurden die Extrakte 15 Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Die dadurch entstandene wässrige Phase musste in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Zur Fällung der DNA aus der Lösung wurden 0,8 Volumen Isopropanol hinzugefügt und der Ansatz 15 Minuten bei RT inkubiert. Die ausgefallene DNA konnte dann durch zehn minütige Zentrifugation bei 3500 rpm

pelletiert, zwei mal mit Ethanol (70%) gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst werden.

<u>2x-Puffer</u>	0,6 M	NaCl
	100 mM	Tris HCl, pH 7,5
	40 mM	EDTA
	4 % (w/v)	Sakosyl
	1 % (w/v)	SDS

<u>Extraktionspuffer</u>	25 ml	2x-Puffer
	20 ml	12 M Harnstoff
	2,5 ml	Phenol
	2,5 ml	H ₂ O

PCI Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1 (v/ v/ v))

2.4.1.3 Phenolische Extraktion von DNA

Um eine DNA-Lösung von unerwünschten Proteinen zu befreien, wurde diese mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt und mit 200 µl PCI (s. 2.4.1.2) versetzt. Durch Schütteln lösten sich die Proteine im Phenol und befanden sich nach 15 minütiger Zentrifugation nicht mehr in der wässrigen Phase. Diese obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.4.1.4 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung können durch Zugabe von Alkohol und Salzen gefällt werden. Dabei verdrängen Ionen die polaren Wassermoleküle von den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren und setzen so ihre Löslichkeit herab.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol (100%) und 1 / 10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) versetzt und die DNA durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in Wasser gelöst. Wurde die DNA für eine Sequenzierung (s. 2.4.1.7) genutzt, musste sie in hochreinem Wasser für die HPLC gelöst werden.

2.4.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction, Saiki et al., 1985 und Saiki et al., 1988) ist eine Methode zur enzymatischen Vermehrung spezifischer DNA-Sequenzen. Die Methode beruht auf einer zyklischen Reaktion, die sich zwischen 25 und 40 mal wiederholt. Dabei wird die DNA zunächst bei 95 °C denaturiert, was die Bindung spezifischer, zur Matrizen-DNA reziproker Oligonukleotide (Primer s. 2.1.4) ermöglicht. Diese Bindung oder auch Anlagerung erfolgt bei Primer-spezifischen Temperaturen zwischen 55 °C und 65 °C, welche sich aus der Länge der Primer und deren Guanin- und Cytosinbasen Gehalt ableiten.

Die Anlagerung der Primer und der daraus resultierende DNA-Doppelstrang ermöglichen die Bindung einer thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase, Quiagen, Hilden), welche bei 72 °C eine Kopie des Matrizestranges synthetisiert, wobei sie Desoxynukleotide an die freien Hydroxylgruppen am 3'-Ende der Primer anknüpft. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich so die Anzahl der gewünschten DNA-Fragmente. Die Taq-Polymerase fügt an jeden synthetisierten DNA-Strang zusätzliche Adeninnukleotide an, so dass ein poly-Adenin Überhang entsteht.

<u>Standard PCR-Ansatz</u>	ca. 5 µg	Matrizen-DNA
	0,5 µl	forward Primer (10mM)
	0,5 µl	reverse Primer (10 mM)
	0,25 µl	Taq-Polymerase
	2,5 µl	Puffer 10x
	0,5 µl	dNTP's (10 mM)
	ad 25 µl H ₂ O	

<u>Pfu-PCR</u>	3-5 µg	DNA
	2 µl	dNTP's (10 mM)
	1 µl	forward Primer (10 mM)
	1 µl	reverse Primer (10 mM)
	5 µl	Puffer 10x
	1 µl	Pfu-Polymerase
	ad 50 µ H ₂ O	

<u>Standard PCR-Programm</u>	1. 94 °C	5 min	Denaturierung
	2. 94 °C	40 sek	Denaturierung
	3. 55 °C*	40 sek	Anlagerung der Primer
	4. 72 °C	~ 60 sek / kb	DNA-Synthese
	5. 25-40 fache Wiederholung von Schritt 2-4		
	6. 72 °C	5 min	finale DNA-Synthese
	7. 18 °C	∞	Ende

* Die Anlagerungstemperatur ist für die jeweiligen Primer spezifisch und wird bei den einzelnen Experimenten angegeben

2.4.1.6 Colony-PCR

Eine spezielle Form der PCR ist die Colony-PCR. Sie wurde angewendet, um transformierte Bakterien auf das Vorhandensein des Transgens zu überprüfen. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden dazu einzelne Kolonien gepickt und in den PCR-Ansatz (s. 2.4.1.5) übertragen. Die in den Zellen enthaltene DNA diente dann als Matrize für die Reaktion.

2.4.1.7 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden mittels der Kettenabbruchmethode (Sanger und Coulson, 1975) durchgeführt. Die Methode beruht auf einer PCR-Reaktion (s. 2.4.1.5), bei der neben den im Überschuss vorliegenden 2'-Desoxynukleotiden auch fluoreszenzmarkierte 2'-3'-Didesoxynukleotide in den wachsenden DNA-Strang eingebaut werden, was zu einem Abbruch der DNA-Kette führt. Dadurch entstehen

unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren 3'-Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.

Die Fragmente wurden auf einem vertikalen Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laser detektiert.

Zur Sequenzierung wurde das BigDye[®]-Terminator v. 3.1 Cycle-Sequencing-Kit (Fa. Applied Bioscience) verwendet.

Für eine Standard-Reaktion wurden je nach Größe der aufgereinigten DNA 100 ng - 200 ng Plasmid-DNA oder 25 - 50 ng eines gereinigten PCR-Produktes sowie 1 µl Primer mit einer Endkonzentration von 10 pmol und 2 µl BigDye-Mix eingesetzt und zu einem Volumen von 10 µl mit H₂O_{HPLC} aufgefüllt.

<u>PCR-Programm</u>	1.	20 sek	96 °C (initiale Denaturierung)
	2.	10 sek	96 °C (Denaturierung)
	3.	5 sek	50 °C (Primer annealing)
	4.	4 min	60 °C (Elongation)
	5.	35 fache Wiederholung der Schritte 2-4	

Anschließend wurde die Reaktion mit H₂O_{HPLC} auf 20 µl aufgefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte am Institut für Genetik der Universität zu Köln. Das Ergebnis wurde mit dem Programm Chromas lite v. 2.0 ausgewertet.

2.4.1.8 Restriktionsverdau von DNA

Beim Restriktionsverdau werden Restriktionsendonukleasen aus Bakterien genutzt um doppelsträngige DNA an spezifischen pallindromischen Sequenzen zu schneiden.

Die Enzyme wurden für die jeweiligen Reaktionen gemäß den Herstellerempfehlungen verwendet (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot oder Fa. Promega, Mannheim). Es handelte sich dabei um eine Restriktion, die entweder zu Testzwecken für zwei Stunden oder für einen Großverdau über Nacht durchgeführt wurde. Es wurden Enzymmengen zwischen einer Unit und 10 Units verwendet, wobei zu beachten war, dass eine Unit Enzym in einer Stunde ca. 1 µg DNA verdaut. Die Inkubationstemperatur ergab sich aus dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms.

2.4.1.9 Fill-In

Zur Erzeugung glatter (blunt) DNA-Enden wurde die Klenow-DNA-Polymerase (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Diese verfügt über eine 5'→3'-DNA-Polymerase- und eine 3'→5'-DNA-Exonuklease-Funktion. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen Klenow-Puffer, 1/40 Volumen dNTP-Mix (je 10 mM) und 1 µl Klenow-Polymerase versetzt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach 15 minütiger Deaktivierung des Enzyms bei 70 °C konnte dann die DNA mit dem QIAquick-PCR-Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach den Herstellerangaben aufgereinigt werden.

2.4.1.10 Dephosphorylierung von DNA

Zur Dephosphorylierung von linearer DNA wurde SAP (alkalische Phosphatase aus Shrimps) benutzt. Zu 8 µl DNA kamen 1 µl 10x SAP-Puffer sowie 1 µl SAP hinzu. Die Reaktion für „blunt end“ DNA-Fragmente wurde 60 min, die für „sticky end“ DNA-Fragmente 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die SAP 15 min bei 65 °C deaktiviert. Die dephosphorylierten DNA-Fragmente konnten dann mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt werden.

2.4.1.11 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente der Größe nach zu analytischen oder präparativen Zwecken aufgetrennt werden (Maniatis et al. 1982). Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches zwischen den Nukleotiden der DNA interkaliert, werden die Laufbanden der DNA im Gel unter UV-Licht sichtbar. Als Referenzgröße werden 2 bis 15 µl einer 1kb-Leiter (Fa. Invitrogene, Karlsruhe) mit bekannten Größenstandards aufgetragen.

Eingewogene Agarose wurde in 50 bis 200 ml 1x-TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht und vollständig gelöst. Die Menge an eingewogener Agarose richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Für Fragmente größer als 1 kb wurde ein 1% (w/v) Gel gewählt, für kleinere Fragmente 1-3% (w/v).

Nach dem Abkühlen der Lösung auf 50-60 °C und Zugabe von Ethidiumbromid wurde die Lösung in einen mit Paketband abgedichteten Gelträger gegossen. Zum Auftragen der Proben wurden je nach Anzahl und Menge unterschiedliche Gelkämme in die Träger eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurden das Paketband

sowie der Kamm entfernt. Der Gelträger kam anschließend in eine Gelkammer mit 1x-TAE-Puffer und die zuvor mit 10x Auftragepuffer versetzten Proben und der Größenstandard wurden in die Geltaschen gefüllt. Der TAE-Puffer sollte dabei das Gel überdecken. An die Kammer wurde eine Gleichspannung von 70-120 V bei einer Stromstärke von 150 mA angelegt. Zur Dokumentation des Laufs wurde das Gel mit einem Geldokumentationssystem (Fa. Intas, Göttingen) auf einem UV-Tisch fotografiert und das Bild als TIFF- Datei auf einem PC gespeichert.

50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

2 M Tris / HAc pH 7,5
50 mM EDTA

10x-Auftragepuffer 20 % (w/v) Ficoll 400
 1 % (w/v) SDS
 0,05 % (w/v) Xylenblau
 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
 40 mM Tris / HAc pH 7,5
 100 mM EDTA

Ethidiumbromid-Lösung 1 % (w/v) Ethidiumbromid in H₂O

2.4.1.12 Abschätzung von DNA-Konzentrationen in einem Agarosegel

Zur groben Abschätzung der DNA-Konzentration in einer aufgetragenen Probe eignet sich die Leuchtstärke der Banden unter UV-Licht im Vergleich zum ebenfalls aufgetragenen Größenstandard (s. 2.4.1.9).

Die Banden des angegebenen Markers enthalten pro µl eingesetztem Marker 10 ng DNA, wobei die 1,6 kb Bande doppelt so viel DNA aufweist. Durch Vergleich der Intensitäten der jeweiligen Banden lässt sich so die DNA-Konzentration relativ gut abschätzen.

2.4.1.13 Elution von DNA aus einem Agarosegel

Zur Elution von DNA aus einem Agarosegel nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel-Extraction Kit[®] der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.1.14 Ligation

Bei der Ligation mittels T4-DNA-Ligase werden DNA-Fragmente mit endständiger 3`-OH-Gruppe, mit Fragmenten mit 5`-Phosphatgruppe miteinander verknüpft. Bei dieser ATP-verbrauchenden Reaktion können sowohl komplementäre als auch glatte (blunt) Enden miteinander verbunden werden. Für die Reaktion wurden DNA-Fragment und Vektor je nach Größe im Verhältnis 3:1 oder 1:3 gemischt, wobei die kürzere DNA jeweils in der dreifachen molaren Menge verwendet wurde. Für eine 20 µl Reaktion wurde dem Ligationsansatz 2 µl 10x-Ligationspuffer, sowie 1 bis 2 Units T4 DNA-Ligase (Promega) hinzugefügt. Die Ligation erfolgte über Nacht in einem auf 12 °C temperiertem Wasserbad. Anschließend wurde der Ansatz direkt zur Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen genutzt (s.2.3.3).

2.4.1.15 TOPO-TA-Klonierung

Hierzu wurde das TOPO-TA-Cloning Kit[®] gemäß den Herstellerinformationen verwendet.

2.4.1.16 TOPO-Klonierung

Hierzu wurde das pENTRY-SD/D/-TOPO-Cloning Kit[®] gemäß den Herstellerinformationen verwendet.

2.4.1.17 Herstellung von Genkonstrukten mit binären Vektoren

Die Transformation von *Solanum tuberosum* mit Agrobakterien erforderte die Herstellung von Genkonstrukten mit binären Vektoren. Binäre Vektoren stammen ursprünglich aus Agrobakterien und dienen ihnen zur Infiltration des Wirtgewebes.

Zur Transformation von Pflanzen eignen sich abgewandelte binäre Vektoren, die über Agrobakterien in die zu transformierende Pflanze eingeschleust werden.

2.4.1.17.1 Herstellung des *entry*-Vektors

Zur Herstellung eines *entry*-Vektors wurde die TOPO-Klonierung verwendet.

Dabei wurde zunächst ein Primer synthetisiert, welcher beim Startkodon (ATG) des zu untersuchenden Gens ansetzt. Ihm wurde eine Sequenz vorangesetzt (CACCATG...), welche die Hybridisierung mit der überhängenden GAGG-Sequenz des Vektors erlaubte. Der reverse-Primer endete am letzten Kodon des Gens, wobei darauf zu achten war, dass das Leseraster erhalten blieb.

Mit diesen Primern (Tab. 2.3) und der Pfu-Proofreading-Polymerase (Biorad) wurde eine PCR (s. 2.4.1.5) durchgeführt. Die Pfu-Polymerase ist eine „Blunt-end“ Polymerase, welche keine überhängenden Nukleotide produziert.

Dieses PCR-Produkt wurde mit dem pENTR SD/D/-TOPO-Cloning Kit® in den pENTR-Vektor kloniert. Nach Präparation des Vektors (s. 2.4.1.1), wurde dieser sequenziert, um die Korrektheit der Insertion zu überprüfen (s. 2.4.1.7).

2.4.1.17.2 Herstellung des *destination*-Vektors

Um das im *entry*-Vektor enthaltene PCR-Produkt in den *destination*-Vektor zu übertragen, wurde der Gateway-LR-Clonase Enzyme-Mix® nach Herstellerangaben verwendet.

Bei dieser Reaktion übertrug sich die gewählte DNA-Sequenz aus dem *entry*-Vektor mittels homologer Rekombination auf den *destination*-Vektor, so z.B. die cDNA der ATase2. In diesem Fall war der Vektor pGWB2 der Zielvektor. Um die ATase2 in den B33-pBin-Kan-Vektor zu klonieren wurde eine Restriktion (s. 2.4.1.8) gefolgt von einer normalen Ligation angewendet (s. 2.4.1.14).

Dieser Vektor konnte zur Transformation von Agrobakterien (s. 2.3.6) genutzt werden, welche im weiteren Verlauf der Experimente *Solanum tuberosum* transfizierten.

2.4.2 RNA-Techniken

2.4.2.1 Präparation von RNA aus pflanzlichem Gewebe

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Pflanzenproben wurden zur Gewinnung von RNA mit einem vorgekühlten Mörser pulverisiert, mit dem dreifachen Volumen Z6-Puffer versetzt und bis zur Homogenität zerrieben. Die Proben wurden mit 600 µl PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25 : 24 : 1) ausgeschüttelt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Nach der Homogenisation aller Proben wurden diese 15 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Die dabei entstandene obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die in der wässrigen Phase enthaltene RNA konnte durch Zugabe von 0,7 Volumen absolutem Ethanol und 1/20 Volumen 1 M Essigsäure bei Raumtemperatur gefällt und durch 15 minütige Zentrifugation bei 12000 rpm pelletiert werden. Das Pellet wurde zunächst mit 3 M Natriumacetat Lösung, anschließend mit 75 % Ethanol (verdünnt mit H₂O_{DEPC}) gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 500 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen und bei 65 °C unter leichtem Schütteln gelöst und zur Reinigung erneut für 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde erneut abgenommen, in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die in ihm enthaltene RNA durch Zugabe von 500 µl 5 M Lithiumchlorid über Nacht bei 4 °C gefällt. Am Folgetag wurde die RNA durch 15 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert und zweimal mit 75 % Ethanol (mit H₂O_{DEPC} verdünnt) gewaschen. Nach Trocknung des Pellets im Exsikkator wurde das Pellet in 50-100 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen und bei 65 °C gelöst. So präpariert konnte die RNA bei -20 °C bis zur Verwendung lagern.

<u>Z6-Puffer</u>	8 M	Guanidiniumhydrochlorid pH 7,0
	20 mM	EDTA
	20 mM	MES
	0,7 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

DEPC-H₂O 0,2 % (v/v) Diethylpyrocarbonat

Die Lösung wurde 1h gerührt und danach autoklaviert

2.4.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA am TECAN

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA-Proben wurde ein photometrisches Verfahren angewandt. Dabei wurde die Absorption einer 1:50 bzw. 1:100 verdünnten Probe bei 260 nm und 280 nm in einem Multiplattenphotometer (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim) gemessen. Eine UV-Platte mit 96 Kavitäten wurde zur Bestimmung des Nullwerts zunächst mit 100 µl H₂O_{DEPC} beschickt und gemessen. Danach wurden die Absorptionen der verdünnten Proben gemessen und von dem Messwert der Nullwert der jeweiligen Kavitäten abgezogen. Aus der OD ließ sich mittels der Formel

$$((OD_{260nm} - 0,0011) / 0,0068) * x * 0,08)$$

die Konzentration der RNA in ng / µl berechnen. Dabei gibt der Quotient eine experimentell bestimmte Regression und der Faktor 0,8 eine Umrechnung von DNA in RNA an. Die Umrechnung ist notwendig, da die Regressionsreihe mit verschiedenen DNA-Konzentrationen bestimmt wurde. Der Faktor x bezieht sich auf die eingesetzte Verdünnung und hat somit den Wert 50 oder 100.

2.4.2.3 DNaseI-Verdau von DNA

Eine Methode zur Bestimmung des Expressionsniveaus eines Gens ist die RT-PCR (s. 2.4.2.5).

Um dabei Verunreinigungen durch genomische DNA zu vermeiden, wird vorher ein DNaseI-Verdau durchgeführt.

Dazu wurden 5 µg RNA eingesetzt und dieser Lösung 10 µl 5x „1st strand buffer“, sowie 2 µl RNase freie DNaseI zugesetzt. Das ganze wurde mit H₂O_{DEPC} auf 50 µl aufgefüllt und die Reaktion 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden 5 µl 25 mM EDTA zugesetzt und der Ansatz 10 min auf 65 °C erhitzt.

2.4.2.4 Reverse-Transkription

Bei der Reversen-Transkription wird isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Man nutzt dabei ein retrovirales Enzym, welches DNA-Kopien von den in den Proben enthaltenen mRNAs herstellt. Für eine RT mit einem Endvolumen von 20 µl wurden ca. 2 µg isolierter RNA (s. 2.4.2.1 und 2.4.2.2) eingesetzt. Nach

Zugabe von 1 μl oligo-dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Fa. Invitrogene) und 1 μl dNTPs (je 10 mM) konnte die Reaktion mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ auf 13 μl aufgefüllt werden.

Die Mixtur wurde 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, auf Eis gestellt und mit 4 μl 5x „first strand buffer“ sowie 2 μl DTT (0,1 M) versetzt. Die Lösung wurde bei 42 °C zwei Minuten lang erwärmt, die Reaktion durch Zugabe eines μl Reverser-Transkriptase (Superscript II, Invitrogene) gestartet und 50 min bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15 minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt. Die erhaltene cDNA ließ sich sofort verwendet oder bei -20 °C lagern.

2.4.2.5 RT-PCR

Die RT-PCR ermöglicht die semiquantitative Bestimmung der mRNA-Menge eines bestimmten Gens in einem RNA-Extrakt (s. 2.4.2.1). Dazu verwendet man cDNA in zwei getrennten PCR-Reaktionen, welche im linearen Amplifikationsbereich ablaufen (<30 Zyklen). Man nutzt in der einen Reaktion genspezifische Primer, während in der anderen Primer für ein Gen mit relativ hoher und vor allem konstitutiver Expressionsrate gewählt werden. Für letztere kommen Primer für das Aktin-Gen oder das β -Tubulin-Gen in Frage.

Die Reaktionen werden auf ein Agarosegel (s. 2.4.1.11) aufgetragen. Der Vergleich der Leuchtstärken der jeweiligen Banden lässt Rückschlüsse auf die relative Menge an cDNA im Ansatz und so auf die Menge an mRNA im Extrakt zu.

Für eine RT-PCR werden 1-2 μl der Reversen Transkription (s. 2.4.2.4) eingesetzt. Da man davon ausgehen kann, dass die Aktin- oder die β -Tubulin-mRNA in allen Ansätzen gleich konzentriert ist, lassen sich alle Aussagen über den mRNA-Gehalt eines Gens in einer Probe auf die Leuchtstärke der Aktin- bzw β -Tubulin-Bande beziehen.

2.4.2.6 Formaldehydgel (RNA-Gel)

Zur Auftrennung von isolierter RNA (s. 2.4.2.1) unter denaturierenden Bedingungen wurde ein formaldehydhaltiges Agarosegel gegossen.

Dazu wurden 3 g Agarose in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ aufgeköcht und vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 20 ml 10x RB und 32,5 ml Formaldehydlösung (36%) zugegeben und das ganze in einen mit einem Gelkamm bestückten Gelträger gegossen.

Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Gelkammer gesetzt. Letztere wurde bis knapp unter den Rand des Gels mit 1x RB-Puffer befüllt. Jede Spur wurde mit ca. 30 µg RNA beladen. Die Proben wurden mit H₂O_{DEPC} auf 20 µl aufgefüllt und mit 20 µl Formamid, 6 µl Formaldehyd und 5 µl 10x RB versetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben 10 min bei 65 °C denaturiert und danach auf Eis gekühlt, um ein Renaturieren zu vermeiden. Das Gel wurde bei 150 V ca. 1 Stunde laufen gelassen. Um den gleichmäßigen RNA-Gehalt der Proben zu dokumentieren, wurde diesen je 1 µl Ethidiumbromid und 1 µl Blaumarker zugesetzt. Auf diese Weise lassen sich nach dem Lauf des Gels die rRNA Banden auf einem UV-Tisch sichtbar machen. Die Leuchtintensität dieser Banden sollte in allen Spuren in etwa gleich sein.

<u>10x RB-Puffer</u>	0,2 M	MOPS
	0,5 M	NaAc
	0,01 M	EDTA

2.4.2.7 Northern blot

Durch einen Northern blot wird die elektrophoretisch aufgetrennte RNA (s. 2.4.2.6) auf eine Nylon-Membran übertragen. Dies erfolgt über Hochsalzpuffer (10x SSC) und ist in Standardwerken beschrieben (Ausubel et al., 1997). Für die Übertragung wurden Biotransfer-Membranen (Fa. Pall, Portsmouth, UK) verwendet.

Über eine mit 10x SSC gefüllte Wanne wurde eine Glasplatte gelegt. Auf diese kamen zwei in Gelbreite zurechtgeschnittene Streifen Whatman-Papier, wobei die Enden des Papiers in den 10x-SSC Puffer eintauchten. Auf diese beiden Streifen kamen vier in Gelgröße zurechtgeschnittene und mit 10x-SSC angefeuchtete Whatman-Papiere und darauf das Gel mit der Oberseite nach unten.

Auf das Gel kam die ebenfalls zurechtgeschnittene Biotransfer-Membran (Fa. Pall, Portsmouth, UK) und darauf vier weitere angefeuchtete Whatman-Papiere. Beim Aufbau war darauf zu achten, dass zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen eingeschlossen wurden.

Den Abschluss bildete ein etwa 10 cm hoher Stapel Krepppapier, welcher mit einem Gewicht beschwert wurde. Der SSC-Puffer wurde mittels Kapillarkräften durch den Aufbau gezogen, wobei die Nukleinsäuren aus dem Gel auf die Membran gelangten.

Der Blot lief über Nacht. Am nächsten Morgen wurde der Blot abgebaut und die Membran in einem UV-Crosslinker (UV-Stratalinker 2400, Fa. Stratagene, Amsterdam (NL)) mit einer Energie von 120 mJoule irreversibel mit der DNA vernetzt. Die Membran war trocken bei Raumtemperatur lagerbar.

2.4.2.8 Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Bei der Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde werden während der Neusynthese eines DNA-Stranges Desoxynukleotide eingebaut, welche ein radioaktives Isotop tragen.

Dabei gelangt ^{32}P über die α -Phosphatgruppe von α - ^{32}P -dATP in das Zucker-Phosphat-Rückgrat.

Der Polymerisations-Start der DNA wird durch Hexanukleotide markiert, welche statistisch alle 4000 Nukleotide an den Matrizenstrang binden (random priming).

Die Sonde hybridisiert mit der komplementären RNA auf einer Nylonmembran (s. 2.4.2.7) und kann über ihre Strahlung detektiert werden.

Die Intensität der abgegebenen Strahlung ist dabei proportional zur Menge der auf der Membran befindlichen RNA, mit welcher die Sonde hybridisiert.

Das als Sonde verwendete Fragment wurde in einen Vektor kloniert (s. 2.4.1.14) und sequenziert (s. 2.4.1.7). Vor der Markierung wurde das Fragment mittels PCR amplifiziert und gereinigt (s. 2.4.1.5).

2.4.2.8.1 Markierungsreaktion mit α - ^{32}P -dATP

Zur Markierung wurden etwa 150 ng DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit 10 μl Labelling Mix A versetzt und der Ansatz mit H_2O auf 40 μl aufgefüllt. Die DNA wurde 10 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Der Reaktion wurden 2 μl BSA [10 mg / ml], 2 μl Klenow-DNA-Polymerase und 50 μCi α - ^{32}P -dATP zugegeben. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μl durchgeführt und bei 37 °C ca. vier Stunden inkubiert.

Der Labelling Mix A wurde aus drei getrennt angesetzten Lösungen hergestellt. Dazu wurden Lösung A, B und C im Volumenverhältnis 1 : 2,5 : 1 gemischt.

<u>Lösung A</u>	1,25 M	Tris / HCl pH 8,2
	125 mM	MgCl ₂
	2 Vol. %	β-Mercaptoethanol
	je 0,5 mM	dNTPs
<u>Lösung B</u>	2 M	Hepes / NaOH pH 6,6
<u>Lösung C</u>	3,6 µg / µl	Desoxyhexanukleotide (Boehringer, Mannheim)

2.4.2.8.2 Überprüfung der radioaktiven Markierung

Um den Einbau markierter Nukleotide in die neusynthetisierte DNA zu überprüfen, wurde 1 µl der Markierungsreaktion abgenommen, mit 200 µl H₂O verdünnt, mit 10 µl Heringsspermien-DNA versetzt und mit 250 µl 20 % (w/v) TCA gefällt.

Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Aktivität von Pellet und Überstand wurde mit einem Flächenmonitor bestimmt. Aus diesen Werten konnte der prozentuelle Einbau berechnet werden. Dieser sollte etwa 70 % der Gesamtaktivität betragen.

2.4.2.8.3 Reinigung der DNA-Sonde

S200-spin-columns (Fa. Pharmacia, Freiburg) wurden zum Resuspendieren des Säulenmaterials geschüttelt, geöffnet und in ein Eppendorfgefäß gesetzt. Zur Abtrennung des Puffers in der Säule wurde diese bei leicht geöffnetem Deckel 1 min lang bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die Markierungsreaktion auf diese übertragen. Durch einminütige Zentrifugation bei 3500 rpm wurde die Sonde eluiert und konnte zur Hybridisierung eingesetzt werden. Enzyme, nicht eingebaute Nukleotide und Salze der Markierungsreaktion verblieben auf der Säulenmatrix.

2.4.2.9 Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden mit RNA-blots

Die RNA-tragende Nylonmembran wurde im Hybridisierungssofen unter Rotation eine Stunde bei 68 °C mit 30 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert, um eine unspezifische Bindung der Sonde an die Membran zu vermeiden.

Die Sonde wurde 10 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis gestellt und dann zum Hybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung der Sonde mit der komplementären RNA lief über Nacht bei 58 °C. Am nächsten Morgen wurde die Hybridisierungslösung in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt und bis zur erneuten Verwendung oder bis zum vollständigen Abklingen bei -20 °C gelagert.

Die Membran wurde mit Waschlösungen steigender Stringenz, d.h. sinkendem Salzgehalt gewaschen, um unspezifisch gebundene Nukleinsäuren zu entfernen. Dazu wurde die Hybridisierungsröhre zunächst mit Waschlösung I (6x SSC, 0,5 % SDS) durchspült. Darauf folgten zwei 10 minütige Waschschrte bei 65 °C mit Waschlösung I und II (4x SSC, 0,5 % SDS). Nach dem zweiten Waschschrte wurde die Aktivität in der Hybridisierungsröhre mit einem Zählrohr bestimmt. Bei zu hoher Hintergrundaktivität wurde nochmals 10 min mit Lösung III (2x SSC, 0,5 % SDS) gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und auf einem Phosphor-Storage-Screen (Fa. Molecular Dynamic, Krefeld) exponiert. Dieser wurde nach Ende der Exposition mit einem Phosphor-Imager (Storm 860, Fa. Molecular Dynamics, Krefeld) gescannt (Version 4.1), als TIFF-Datei gespeichert und mit der Software ImageQuant-Mac (Version 1.2) ausgewertet.

<u>Hybridisierungspuffer</u>	0,5 M	NaH ₂ PO ₄	pH 7,2
	7 % (w/v)	SDS	
	1 mM	EDTA	

2.5 Physiologische Methoden

2.5.1 Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blättern und Knollen

Zur Bestimmung löslicher Zucker in Blättern wurden zwei 0,38 cm² große Blattscheiben mit einem Korkbohrer ausgestanzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Von Knollen wurden etwa 0,5 cm³ große Proben entnommen und in ca. 1 mm dicke Scheiben zerlegt.

Zur Extraktion der Zucker wurden die Proben mit 900 µl 80 % Ethanol im Wasserbad eine Stunde bei 75 °C inkubiert. 500 µl des ethanolischen Extraktes wurden danach in der Speed Vac (Fa. Eppendorf, Hamburg) bei Raumtemperatur eingetrocknet.

Die kristallisierten Zucker wurden in 500 µl H₂O resuspendiert und für die Zuckermessung verwendet. 10 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl H₂O und 90 µl Messpuffer versetzt und einem gekoppelten enzymatischen Test unterzogen (Bergmeyer 1970; Stitt et al., 1989). Dabei wurden sequentiell folgende Enzyme mit einem 96 Nadeln tragendem Stempel (Werkstatt Bot. Institut) zugesetzt:

1. 7 U Hexokinase (Roche, Mannheim)
2. 20 mU Phosphoglukomutase (Roche, Mannheim)
3. 0,2 U Phosphoglukoisomerase (Roche, Mannheim)
4. 120 U Invertase (Roche, Mannheim)

In diesen enzymatischen Reaktionen wurden Glukose, Fruktose und Saccharose unter Bildung von NADH zu 6-Phosphoglukonolacton umgesetzt (s. Abb. 1). Die Bildung von NADH ist dabei proportional zur Menge der oben genannten Zucker und konnte photometrisch bei 340 nm erfasst werden.

Die eigentlichen Messungen wurden hauptsächlich in einem Multiplatten-Photometer (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim) in Multiplatten (Elisa-Platte Microton, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit einem jeweiligen Volumen von 200 µl pro Kavität durchgeführt.

Aus den einzelnen Extinktionsänderungen konnte nach folgender Formel die Konzentrationen der Zucker im Extrakt berechnet werden.

$$\Delta c = (\Delta E * \pi * r^2) / (\epsilon_{340}(\text{NADH}) * V_E)$$

ΔE : Absolute Extinktionsänderung

r : Radius [cm]

$\epsilon_{340}(\text{NADH})$: Extinktionskoeffizient NADH bei $\lambda = 340$ nm [cm²/µmol]

V_E : Eingesetztes Extraktvolumen [cm³]

Δc : Konzentrationsänderung [µmol/Extrakt]

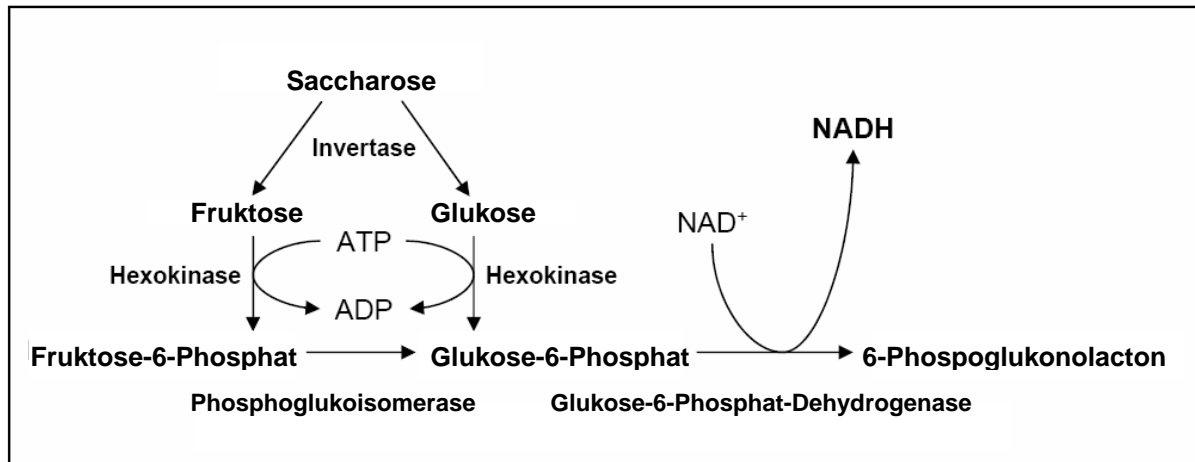


Abbildung 5: Schematische Darstellung der bei der Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose auftretenden Reaktionen. ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat; NAD⁺, Nicotinamidadenindinukleotid; NADH, Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)

<u>Messpuffer</u>	110 mM	Hepes
	22,2 mM	MgCl ₂
	4,4 mM	ATP
	1,8 mM	NAD ⁺
	0,2 U	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

2.5.2 Bestimmung der Stärkegehalte in Blättern und Knollen

Die unter 2.5.1 ausgestanzten Blattscheiben wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 900 µl KOH (0,2 M) versetzt und einem Bohrer (Fa. Heidolph, Schwabach) homogenisiert. Nach einer Stunde im Wasserbad bei 95 °C wurde der pH-Wert mit 1 M HAc auf 5,5-6 eingestellt, 80 U α-Amylase und 7 U Amyloglukosidase zum Verdau der Stärke hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dies hatte zur Folge, das sämtliche im Extrakt enthaltene Stärke zu Glukose abgebaut wurde, welche analog zur Messung des Gehaltes an löslichen Zuckern nach Bergmeyer (1970) im gekoppelten enzymatischen Test durch Zugabe von Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase erfasst werden konnte (s. 2.5.1).

Bei der Stärkemessung in Knollen wurde eine 0,38 cm² große und 1 mm dicke Scheiben ausgestanzt und gewogen, um den Stärkegehalt mit dem Frischgewicht zu korrelieren.

Aufgrund des hohen Stärkegehaltes von Knollen wurde der Stärkeextrakt 1:10 verdünnt zur Messung eingesetzt.

2.5.3 Bestimmung der Gehalte phosphorylierter Intermediate

Zur Bestimmung der Gehalte an phosphorylierten Intermediaten in Knollen oder Blättern wurden drei 0,38 cm² große und 1 mm dicke Scheiben ausgestanzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Extraktion und Messung erfolgte nach der Methode von Häusler (Häusler et al., 2000). Die Proben wurden mit 300 µl 0,5 M Perchlorsäure und einem Bohrer (Fa. Heidolph, Schwabach) homogenisiert und danach mit weiteren 300 µl 0,1 M Perchlorsäure versetzt. Durch Zugabe von 35 µl 1 M K₂CO₃ wurden die Proben neutralisiert und konnten anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufgehoben werden.

Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm und Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß konnten die Proben zur Messung der phosphorylierten Intermediate eingesetzt werden. Die eigentlichen Messungen wurden in einem Multiplatten-Photometer (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim) in Multiplatten (Elisa-Platte Microlon, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit einem jeweiligen Volumen von 200 µl pro Kavität durchgeführt.

2.5.4 Bestimmung von Chlorophyllgehalten in Blättern

Die Bestimmung der Chlorophyllgehalte erfolgte photometrisch nach der Methode von Graan und Ort (1984) mit dem Unterschied, das hier 80% EtOH als Extraktionsmedium diente. Zwei 0,38 cm² große Blattscheiben wurden mit einem Korkbohrer ausgestanzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur Extraktion der Zucker (s. 2.5.1) wurden die Proben mit 900 µl 80 % Ethanol im Wasserbad eine Stunde bei 75 °C inkubiert. 100 µl dieses Extraktes wurde 1:10 verdünnt und zur photometrischen Bestimmung der Chlorophyllgehalte herangezogen. Die Konzentrationsbestimmung des Ansatzes erfolgte bei Wellenlängen von $\lambda = 648$ nm (Chl. b), $\lambda = 652$ nm (Gesamtchlorophyll) und $\lambda =$

664nm (Chl. a), wobei eine Küvette mit 80 % Ethanol zur Bestimmung des Nullwertes diente. Unter Verwendung der von Graan und Ort (1984) definierten Extinktionskoeffizienten wurden die Chlorophyllgehalte ermittelt.

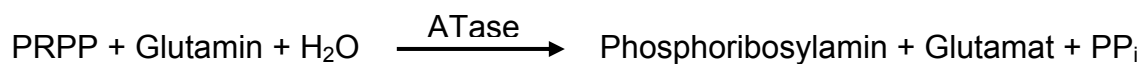
$$\text{Chl. a } (\mu\text{g/ml}) = 13,19 \cdot A_{664} - 2,57 \cdot A_{648}$$

$$\text{Chl. b } (\mu\text{g/ml}) = 22,10 \cdot A_{648} - 5,26 \cdot A_{664}$$

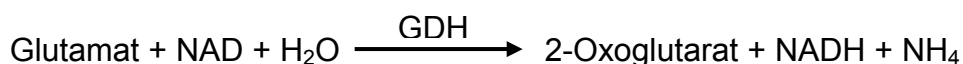
$$\text{Chl. a+b } (\mu\text{g/ml}) = 7,93 \cdot A_{664} + 19,53 \cdot A_{648}$$

2.5.5 Bestimmung der ATase2-Aktivität in Blättern und Knollen

Die Bestimmung der ATase2-Aktivität in transgenen *Solanum tuberosum* Pflanzen erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von Ralf Boldt (van der Graaff et al, 2004). Gemessen wurde die zeitabhängige Bildung von Glutamat, welches bei der von der ATase katalysierten Reaktion anfällt.



Gebildetes Glutamat wurde in einem an NAD^+ gekoppelten enzymatischen Test am Multiplattenphotometer (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim) quantifiziert. Dazu wurde die Glutamatdehydrogenase (GDH) verwendet, welche Glutamat und NAD zu 2-Oxoglutarat, NH_4 und NADH umsetzt.



Da das chemische Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite des Glutamates und des NAD liegt, wurde APAD (3-Acetylpyridinadenindinukleotid), ein NAD-Analogon verwendet, welches das chemische Gleichgewicht auf die Seite der 2-Oxoglutarat Bildung verschiebt, indem es die Rückreaktion verhindert.

Gebildetes APADH konnte durch Fluoreszenzmessungen am Multiplattenphotometer (excitation-filter 340 nm, emission-filter 465 nm) und Vergleich mit einer Eichreihe quantifiziert werden.

2.5.5.1 Protein-Extraktion

Um eine optimale Kühlung des Blattmaterials und der Reagenzien zu gewährleisten, eignete sich die Proteinextraktion im Kühlraum bei 7 °C.

Ca. 5 g Blattmaterial wurden geerntet und 1:1 (w/v) mit vorgekühltem Extraktionspuffer im Mörser homogenisiert. Nach Filtration des Homogenisats durch vier Lagen Miracloth wurde der Extrakt 45 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Von diesem Rohextrakt wurden 50 µl zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (Bradford, 1976) abgenommen und auf Eis gelagert.

Der Überstand wurde nach der Zentrifugation über zuvor mit 25 ml Extraktionspuffer äquilibrierten PD10-Säulen (Fa. Amersham) entsalzt. Dabei war ein Totvolumen der Säule von 2,7 ml zu beachten. Der Extrakt wurde mit Extraktionspuffer von der Säule eluiert und in Polypropylenröhrchen aufgefangen. Von diesem entsalzten Extrakt wurden ebenfalls 50 µl zur Proteinbestimmung nach Bradford abgenommen und auf Eis gelagert. Der Extrakt konnte nun für die Bestimmung der ATase2-Aktivität eingesetzt werden.

<u>Extraktionspuffer</u>	100 mM	Hepes / KOH pH 6,8
	1 mM	EDTA
	1 mM	MgCl ₂
	20 mM	DTT
	5 mM	Glutathion
	0,5 mM	PMSF

2.5.5.2 Glutamat-Reaktion

Der entsalzte Pflanzenextrakt enthält glutamatbildende Enzymaktivitäten, die bis zu 80 % der Gesamtaktivität ausmachen können. Es war also notwendig zwischen der PRPP-abhängigen und der PRPP-unabhängigen Glutamatbildung zu unterscheiden. Deshalb wurde die Reaktion mit und ohne PRPP im Reaktionspuffer durchgeführt. Die Differenz zwischen PRPP-abhängiger und PRPP-unabhängiger Glutamatbildung entspricht der ATase-Aktivität.

850 µl Reaktionspuffer (mit oder ohne PRPP) wurden mit 150 µl entsalztem Extrakt gemischt und bei 30 °C für 40, 60 und 100 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation

wurde die Reaktion 3 Minuten lang bei 80 °C gestoppt, 3 Minuten auf Eis gekühlt, dann für 10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach konnten die Proben 3 Tage lang bei -80 °C gelagert werden, ohne dass das gebildete Glutamat abgebaut wurde.

<u>Reaktionspuffer</u>	58,82 mM	Hepes / KOH pH 6,8
	20,53 mM	NaF
	5,88 mM	Glutamin
	5,88 mM	MgCl ₂
	3,53 mM	PRPP

2.5.5.3 Glutamatdehydrogenase Reaktion

Um die Menge an gebildetem Glutamat zu quantifizieren, wurde ein gekoppelter enzymatischer Test durchgeführt. Der Abbau von Glutamat bzw. die Bildung von APADH wurde am Multiplattenphotometer fluorometrisch (exc.: 340 nm; emi.: 465 nm; gain: 80) solange verfolgt, bis sich keine Änderungen in der Kinetik mehr zeigten (s. 2.5.5).

216,7 µl Messpuffer wurden zu 33,3 µl auf Eis aufgetauter Probe bzw. zu 33,3 µl Eichreihe (0-10 µM) gegeben und die Fluoreszenz einige Minuten lang beobachtet, bis sich ein konstanter Wert (Nullwert) eingestellt hatte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einer Unit Glu-DH gestartet und so lange beobachtet, bis sich keine Änderungen in der Kinetik mehr ergaben. Durch Subtraktion des Nullwerts von der maximal erreichten relativen Fluoreszenzeinheit und Vergleich mit der relativen Fluoreszenz der Eichreihe, ließ sich die Glutamatkonzentration in der jeweiligen Probe ermitteln.

Durch Subtraktion der relativen Fluoreszenzeinheiten der PRPP-unabhängigen von der PRPP-abhängigen Glutamatreaktion, ließ sich die ATase-Aktivität berechnen und auf den Gesamtproteingehalt beziehen.

<u>Messpuffer</u>	57,71 mM	Tris-HCl pH 8
	3,47 mM	APAD

2.5.6 Chlorophyllfluoreszenz Messungen

Zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurde das PAM-Fluorometer der Fa. Walz verwendet (PAM 2100). Chlorophyllfluoreszenz beruht im Wesentlichen auf Fluoreszenz des Photosystems II (PSII) (Krause und Weis, 1991) und kann Auskunft geben über die Intaktheit des Photosystems sowie einer Vielzahl anderer photosynthetischer Prozesse wie z.B. Elektronentransport an der Thylakoidmembran oder die Dunkelreaktion. Zur Messung des Verhältnisses von F_v zu F_m wurde die Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie genutzt (Schreiber et al., 1986). Dabei kommt ein schwach gepulstes Messlicht zum Einsatz, welches die Grundfluoreszenz (F_0) der Lichtsammelkomplexe anregt. Bei Gabe eines sättigenden Lichtblitzes wird die variable Fluoreszenz (F_v), die vom PSII-Reaktionszentrum ausgeht, messbar. Diese erreicht im dunkeladaptierten Zustand einen Maximalwert (F_m). Durch Belichtung kommt es zu einem Abfall der maximalen Fluoreszenz auf einen Minimalwert (F_t) (Kautsky Effekt). Bei Gabe kurzer gesättigter Lichtblitze erreicht die variable Fluoreszenz den Wert F_m . Die Anteile der Photochemie und der Wärmeabgabe an der Fluoreszenzlöschung lassen sich so trennen. Die aus den Messwerten ableitbaren Parameter der nicht photochemischen Fluoreszenzlöschung (q_N) und der photochemischen Fluoreszenzlöschung (q_P), sowie das F_v/F_m -Verhältnis wurden wie beschrieben (Schreiber et al., 1986) berechnet. Die photosynthetische Elektronentransportrate wurde wie beschrieben nach Genty (Genty et al., 1989) berechnet. Vor Beginn der Messungen wurden zur Bestimmung von F_0 und F_m einzelne Blätter 10 min dunkeladaptiert.

2.5.7 Infrarot-Gaswechsel-Analysen (IRGA)

Mit der Infrarotgasanalyse (IRGA) kann der Gasaustausch an intakten Pflanzen gemessen werden (Wolf et al., 1969). Darunter versteht man die Aufnahme von CO_2 im Licht, die Abgabe von O_2 im Rahmen der Dunkelatmung sowie die Freisetzung von Wasserdampf bei der Transpiration. Man verwendet dafür offene Gasanalysensysteme, bei denen die Messung differentiell im Durchflußverfahren erfolgt. Dabei wird ein Gasstrom mit definierter Fließgeschwindigkeit zu einem Teil in eine Infrarotmesszelle geleitet, in der die CO_2 - und Wasserdampfkonzentration ermittelt wird (Referenzgas), und zum anderen Teil in eine Kammer geführt, in welcher ein definierter Ausschnitt einer intakten Blattspreite eingespannt ist. Nach

Überfließen der Blattspreite wird dieser Teil des Luftstroms (Analysegas) in eine zweite Messzelle geleitet, in der ebenfalls die CO₂- und Wasserdampfkonzentrationen gemessen werden. Die Unterschiede der CO₂- und Wasserdampfkonzentrationen in Referenz- und Analysegas bilden den primären Datensatz, aus dem sich Transpirationsrate und Assimilationsrate berechnen lassen. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis des molaren Gasstroms pro Zeiteinheit sowie der eingespannten Blattfläche.

Die Transpirationsrate (E) beträgt:

$$E = u(w_o - w_e)/(1 - w_o)$$

Dabei entspricht w_e dem Wasserdampfpartialdruck der zur Blattkammer führenden Luft und w_o dem Wasserdampfpartialdruck der aus der Blattkammer ausströmenden Luft und u dem molaren Gasstrom. Letzterer berechnet sich wie folgt:

$$u = (P \cdot f) / (R \cdot T \cdot a)$$

In dieser Gleichung bezeichnet P den Luftdruck, f die Flussrate, R die universelle Gaskonstante, T die absolute Temperatur und A die Blattfläche.

Die Assimilationsrate (A) beträgt:

$$A = u(c_e - c_o) \cdot ((1 - w_e)/(1 - w_o))$$

c_e und c_o bezeichnen die CO₂-Konzentrationen des Referenz- bzw. Analysegases.

2.5.8 ¹⁴C-Glukosefütterungen mit Knollenscheiben

Um Glukose-Aufnahme und ihren Einbau in Stärke zu bestimmen, wurden Fütterungsexperimente mit ¹⁴C-Glukose durchgeführt.

Dazu wurden aus wachsenden Kartoffelknollen etwa 1 cm² große und 1 mm dicke Scheiben ausgestanzt und in Erlenmeyer Kolben mit 20mM MES-KOH (pH 6,5) überführt. Die Scheiben wurden drei Mal in diesem Puffer gewaschen und zum Starten der Fütterung in Kolben mit 10 ml Inkubationspuffer überführt. Um die

Aufnahme von ^{14}C markierter Glukose zeitabhängig zu verfolgen, wurden nach einer bzw. zwei, drei, vier und fünf Stunden Knollenscheiben entnommen, drei mal mit 20mM MES-KOH (pH 6,5) gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Knollenscheiben mit 1 ml EtOH (80 %) versetzt und eine Stunde im Wasserbad bei $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, um lösliche Zucker zu extrahieren. 500 μl des ethanolischen Extrakts wurden mit 4,5 ml Rotizint eco (Fa. Roth, Karlsruhe) versehen und im Szintillationszähler gemessen.

Der Rest der Scheibe wurde mit EtOH (80 %) gewaschen, mit 900 μl KOH (0,2 M) und einem Bohrer homogenisiert und eine Stunde im Wasserbad bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, um die Stärke in Lösung zu bringen. Nach dem Lösen der Stärke musste der pH Wert der Lösung mit 1 M HAc auf 5,5-6 eingestellt werden, um einen Stärkeverdau zu ermöglichen. Dazu wurden dem Ansatz 80 U α -Amylase und 7 U Amyloglukosidase hinzugefügt und die Stärke über Nacht bei RT verdaut.

Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurden 500 μl des Überstandes mit 4,5 ml Rotizint eco versetzt und im Szintillationszähler gemessen.

<u>Inkubationspuffer</u>	20 mM	MES-KOH pH 6,5
	200 mM	Glukose
	200 mM	Mannitol

2.5.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Pflanzenextrakten wurde die von Bradford vorgeschlagene Methode verwendet (Bradford, 1976). Das Prinzip dieser Farbreaktion beruht auf der Eigenschaft des in der Rotiquantlösung enthalten Coomassie Brilliant Blue G250, bei der Bindung an basische Aminosäuren von dem kationischen in den anionischen Zustand überzugehen. Im kationischen Zustand absorbiert es Licht maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda=470\text{ nm}$ und im anionischen bei $\lambda=595\text{ nm}$. Diese Farbänderung kann im Photometer detektiert und unter Berücksichtigung einer Eichreihe quantifiziert werden.

<u>Reaktionsansatz Eichreihe</u>	10-200 μl	0,1 mg/ml BSA
	5 μl	Extraktionspuffer
	200 μl	Rotiquant
	ad 1000 μl	H ₂ O
<u>Reaktionsansatz für Proben</u>	5 μl	Proteinextrakt
	200 μl	Rotiquant
	ad 1000 μl	H ₂ O

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Absorption der Proben bei 450 nm (A_{450}) und 590 nm (A_{590}) in einem Photometer (Novospec II, Pharmacia, Karlsruhe) bestimmt. Der Quotient A_{450}/A_{590} diente als Maß für die Proteinkonzentration.

2.5.10 Metabolitenanalyse mittels GC/MS

2.5.10.1 Extraktion und Probenvorbereitung

Ungefähr 100 mg gefrorenes Blattmaterial wurden mit 300 μl auf -20 °C gekühltem Methanol und einem Bohrer homogenisiert. Anschließend kamen 30 μl ebenfalls auf -20 °C gekühltes Ribitol (0,3 mg/ml in Methanol) hinzu. Nach kurzem Vortexen musste die Probe 15 Minuten bei 70 °C geschüttelt werden. Es folgte die Zugabe von 200 μl Chloroform, kurzes Vortexen und erneutes Schütteln bei 37 °C für fünf Minuten. Anschließend kamen 400 μl H₂O_{HPLC} hinzu, woraufhin sich eine polare und eine apolare Phase bildeten. Nach kurzem Vortexen und fünf minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurden 160 μl der oberen Phase abgenommen, in ein verschließbares GC-Fläschchen überführt und in der SpeedVac bis zur Trockne eingengt.

Zur Derivatisierung wurde das GC-Fläschchen geöffnet in einen Exsikkator gestellt, um Kondenswasser zu entfernen. Anschließend wurde zu jeder Probe 40 μl Methoxyaminlösung (20 mg Methoxyamin-HCl in einem ml Pyridin abs.) gegeben, kurz gevortext und für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert. Methoxymierung verhindert die

Ringbildung von reduzierenden Zuckern und schützt Ketogruppen vor einer möglichen Decarboxylierung (Schweer, 1982).

Danach wurden zur Silylierung von Carboxyl-, Hydroxyl-, Amin- und Amidgruppen 70 µl MSTFA hinzu gegeben, kurz gevortext und die Proben 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Silylierung senkt die Siedepunkte der Metabolite und erhöht deren Molekulargewichte. Die derivatisierten Proben wurden in Bördeldeckelfläschen mit Mikroeinsätzen überführt und mit einem Deckel fest verschlossen. Die Proben waren so bereit zur Messung.

2.5.10.2 Gaschromatografie

Trärgas des benutzten GC/MS-Systems war Helium 5.0, das mit einem Druck von 60,7 kPa anlag. Die Trennsäule war eine HP-5ms-Kapillarsäule (Agilent, USA) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm, einer Länge von 30 m und mit (5%-Phenyl)-methylpolysiloxan als Trägermaterial. Ein GC/MS-Lauf wurde vollautomatisch durch Zugabe von zwei µl derivatisierter Probe gestartet. Die Temperatur des GC-Ofens betrug für fünf Minuten 70 °C und stieg dann mit einer Rate von 5 °C/min bis auf 280 °C an.

Diese Temperatur wurde für sieben Minuten gehalten, bevor wieder auf 70°C gekühlt wurde und ein neuer Lauf beginnen konnte.

2.5.10.3 Massenspektrometrie

Das mit dem Gaschromatografen gekoppelte Massenspektrometer ionisiert und fragmentarisiert die von der Säule eluierenden Substanzen und beschleunigt diese im Hochvakuum. Anhand der Flugbahnen der einzelnen Fragmente konnte auf ihr Verhältnis von Masse zu Ladung geschlossen werden. Die Ionenquelle war auf 230 °C und das Quadrupol auf 150 °C temperiert. Geeicht wurde das Massenspektrometer mit Perfluorotributylamin (PFTBA), und zwar über die ChemStation-Software (Agilent, USA) als Ausführung eines so genannten Autotunes. Zur Messung wurde die Scan-Methode gewählt. Bei dieser Betriebsart werden alle Massen von 50-600 amu in 0,1 amu Schritten kontinuierlich gemessen, wobei der Analysator 2,69 Durchgänge durch dieses Spektrum pro Sekunde misst.

2.5.10.4 Standards

Zur Evaluierung der Massenspektren sind Standards unabdingbar. Zur Herstellung der Standards wurde etwa 1 mg Substanz in einem ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ gelöst. Von der Lösung wurden 5-15 μl in GC-Fläschchen überführt, in der SpeedVac getrocknet und dann derivatisiert und gemessen. Die derivatisierten Lösungen konnten bei Bedarf 1:10 mit Pyridin verdünnt gemessen werden.

2.5.10.5 Auswertung

Die Auswertung der GC/MS-Läufe erfolgte mit dem Programm ChemStation (Agilent, USA). Als Ergebnis wird durch dieses Programm eine Tabelle als Textdatei ausgegeben, die mit den gängigen Tabellenkalkulationsprogrammen bearbeitet werden kann.

2.5.11 Bestimmung der Gehalte von ATP, ADP und ADP-Glukose

Die Extraktion der Proben wurde nach der von Häusler et al. (2000) vorgeschlagenen Methode durchgeführt. Die Nukleotide konnten mit einer hoch sensitiven Fluoreszenzmethode detektiert werden (Haink and Deussen, 2003). Dabei mussten Adenosin Nukleotide in fluoreszierende Etheno-Adenosin-Nukleotide umgewandelt werden, bevor sie mittels HPLC (high-performance liquid chromatography) aufgetrennt wurden.

Dazu wurde ein Aliquot des Extraktes mit 10 % (v/v) Chloracetaldehyd in 62 mM Natriumcitrat und 76 mM Kaliumdihydroxidphosphat (pH = 5,2) derivatisiert und der Ansatz 40 Minuten bei 80 °C inkubiert. Nach dem schnellen Abkühlen auf Eis und einer Minute Zentrifugation bei 4 °C und 20000 g konnte der Ansatz zur HPLC eingesetzt werden. Die Auftrennung erfolgte in einem reversed-phase HPLC-System (Waters Alliance 2795; Waters, Milford, USA) und TBAS-Puffer sowie reinem Acetonitril (Roti C Solv HPLC; Roth, Karlsruhe, Germany) als Eluent.

Ein Lauf dauerte 4,5 Minuten, anschließend erfolgte eine drei minütige Rekalibrierung der Säule mit Acetonitril. Die Fluoreszenz wurde mit Licht der Wellenlänge 280 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 410 nm detektiert.

Die Chromatogramme wurden mit dem Empower Softwarepaket (Waters, Milford, USA) ausgewertet.

<u>TBAS-Puffer</u>	5,7 mM	Tetrabutylammoniumbisulfat
	30,5 mM	Kaliumdihydroxidphosphat

2.6 Statistische Methoden und Berechnungen

2.6.1 Standardabweichung

Die Standardabweichung (StAbw) ist ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert und wurde nach folgender Formel berechnet:

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

Dabei entspricht x_i den Einzelwerten, \bar{x} den Mittelwerten und n der Anzahl der Einzelwerte.

2.6.2 Standardfehler

Der Standardfehler ist wie die Standardabweichung ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um einen Mittelwert. Bei der Berechnung wird die Standardabweichung durch die Quadratwurzel der Anzahl der Einzelwerte (n) geteilt, so dass die Streuung um den Mittelwert mit zunehmender Probenzahl abnimmt.

$$\text{Standardfehler} = \frac{StAbw}{\sqrt{n}}$$

2.6.3 t-Test

Mit dem t-Test wird überprüft, ob sich zwei Gruppen von Messwerten signifikant voneinander unterscheiden. So kann die Wahrscheinlichkeit p berechnet werden, die ein Maß für die Unterschiedlichkeit ist. Ist $p < 0,05$, sind die Messwertgruppen mit einer Wahrscheinlichkeit von $> 95\%$ unterschiedlich.

Der Test wurde 1908 von Gosset entwickelt und unter dem Pseudonym „student“ veröffentlicht.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Teilgebiete bearbeitet, weshalb sich der Ergebnissteil in zwei Abschnitte gliedert. Im ersten Abschnitt findet sich eine Zusammenstellung der verschiedenen Analysen an transgenen Kartoffelpflanzen, welche die ATase2 aus *Arabidopsis thaliana* (*A. th.*) unter Kontrolle zwei verschiedener Promotoren überexprimieren.

Im zweiten Teil sind die Ergebnisse der Untersuchungen an Kartoffelpflanzen, welche den PsGPT und den AtNTT1 unter Kontrolle des B33-Promotors gleichzeitig überexprimieren, zusammengefasst.

3.1 Überexpression der ATase2 aus *Arabidopsis thaliana* in *Solanum tuberosum*

3.1.1 Hintergrund

Die ATase2 (Amidophosphoribosyltransferase2) ist, wie in der Einleitung beschrieben, das Schlüsselenzym der Purin- „de novo“- Biosynthese.

Dieses Enzym sollte in Kartoffelpflanzen unter der Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren überexprimiert werden, um die Auswirkungen auf die Kartoffelpflanze zu untersuchen.

Bei den Promotoren handelt es sich zum einen um den in nahezu allen Geweben konstitutiv exprimierten 35S-Promotor aus dem Cauliflower mosaic virus (CaMV) und zum anderen um den hauptsächlich in Kartoffelknollen exprimierten B33-Patatin-Promotor (Rocha-Sosa, 1989).

3.1.2 Überprüfung des Purin-„de novo“-Biosyntheseweges in Kartoffelknollen

Eine Überexpression der ATase2 kann nur dann zu Veränderungen in der Pflanze führen, wenn die der ATase nachgeschalteten Gene (s. Abbildung 3) des Purinbiosyntheseweges auch in den entsprechenden Geweben exprimiert werden. Deshalb wurde zunächst überprüft, ob die ESTs (expressed sequence tags) dieser Gene tatsächlich auch in Knollen vorhanden sind.

Eine entsprechende Analyse war bereits Gegenstand meiner Diplomarbeit (Greiten, 2004). Sie ist jedoch auch für die vorliegende Arbeit relevant.

Datenbankrecherchen via KEGG (<http://www.genome.jp>) und BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) nach ESTs der Enzyme des „de novo“-Purin-Biosyntheseweges ergaben, dass das Gen jedes an der Bildung von IMP beteiligten Enzyms in Kartoffelknollen oder in mit Knollen assoziierten Geweben exprimiert wird (s. Tabelle 3.1).

Gen	Enzym	EST Id	Gewebe
purF	ATase	8653088	Knolle
purD	GARS	8950919	Knollenspross
purN/T	GART	8651860	Knolle
purL	FGARAT	8655348	Knolle
purM	AIRS	8031011	Knolle
purE	AIRC	8950760	Knollenspross
purC	SAICARS	5570491	Stolon
purB	ASAL	8326422	Knollenspross
purH	AICART	8030806	Knolle

Tabelle 3.1: Dargestellt sind die Enzyme des „de novo“-Purin-Biosyntheseweges, deren Gene und EST Id sowie das Gewebe, in denen die ESTs exprimiert wurden.

ATase, Amidophosphoribosyltransferase; GARS, Glycinamid Ribonucleotid Synthetase; GART, Glycinamid Ribonucleotid Transformylase; FGARAT, Formylglycinamidin Ribonucleotid Synthetase; AIRS, 5-aminoimidazol Ribonucleotid Synthetase; AIRC, 5-aminoimidazol Carboxylase; SAICARS, N-succinyl-5-aminoimidazol Ribonucleotid-Synthetase; ASAL, Adenylosuccinat-Lyase; AICART, 5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid-Transformylase

Bei vier von zehn Genen konnten auf diesem Weg deren Expression in wachsenden Knollen nicht nachgewiesen werden. Sie waren entweder in austreibenden Knollen oder in Stolonen exprimiert. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden Fragmente der ESTs aus cDNA von WT-Kartoffelknollen amplifiziert (s. 2.4.2.4 und Abb. 6).

Zunächst wurden zu den gefundenen ESTs komplementäre Primer (s. Tabelle 2.3) designed und bestellt, um PCRs auf die cDNA von Knollen durchzuführen (s. 2.4.1.5). Dazu wurde aus WT-Kartoffelknollen extrahierte RNA (s.2.4.2.1) mit RNase-freier DNaseI (Fa. Roche) verdaut, um sie von Kontaminationen mit genomischer DNA zu befreien (s. 2.4.2.3). Die RNA wurde anschließend mittels Reverser-Transkription zu cDNA umgeschrieben (s. 2.4.2.4), um sie für PCRs zur Amplifizierung von EST-Fragmenten zu verwenden. So sollte der Nachweis erbracht werden, dass sämtliche an der Synthese von IMP beteiligten Enzyme in Kartoffelknollen exprimiert werden.

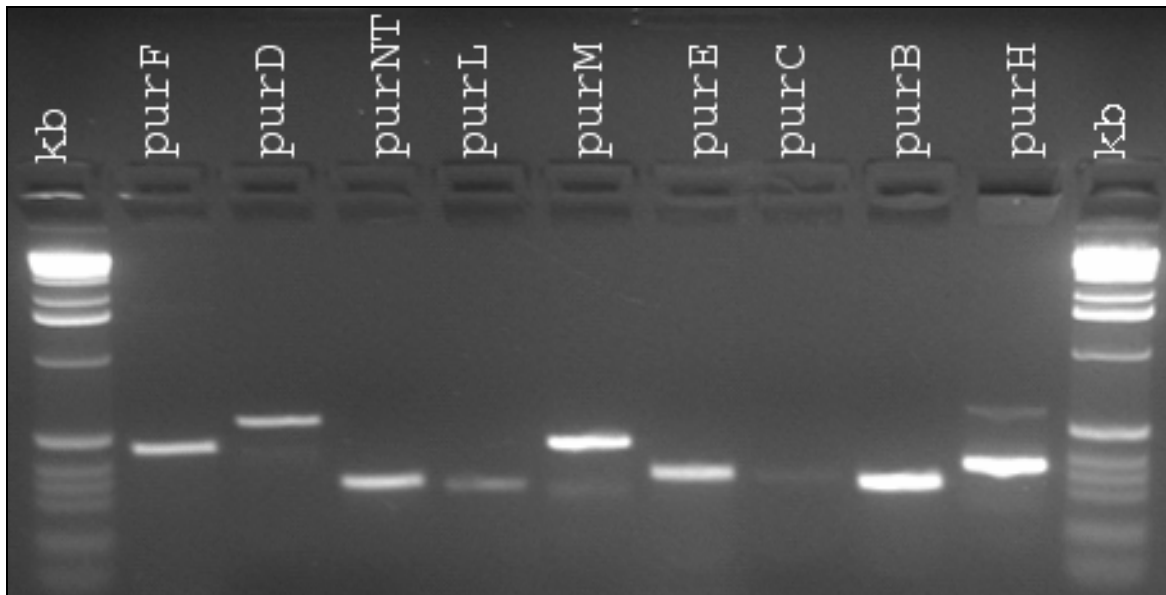


Abbildung 6: 2 % Agarose-Gel mit amplifizierten Fragmenten der ESTs an der „de novo“-Synthese von IMP beteiligter Enzyme; kb = 1kb-Leiter (Invitrogen); purF – purH bezeichnen Gene der „de novo“-Purinbiosynthese. Die verwendeten Anlagerungstemperaturen und Primer finden sich in Tabelle 2.3.

Aus dem Gelfoto ist ersichtlich, dass zumindest die ESTs der gesuchten Gene der Purin-„de novo“-Biosynthese in Knollen vorhanden sind. Die Fragmente wurden zur Verifizierung mit den entsprechenden forward-Primern sequenziert (s. 2.4.1.7) Die Ergebnisse dieser Sequenzierungen bestätigten die Echtheit der amplifizierten Fragmente (s. Greiten, 2004).

3.1.3 Klonierung der ATase2 in den pGWB2- und den B33-pBin-Kan-Vektor

Um die ATase2 in Kartoffelknollen zu exprimieren wurde sie in den B33-pBin-Kan-Vektor kloniert (s. 2.4.1.17), welcher eine konstitutive knollenspezifische Expression (Rocha-Sosa, 1989) ermöglicht. cDNA der ATase2 wurde aus *A. th.* WT-RNA gewonnen, die zunächst extrahiert (s. 2.4.1.2) und anschließend mittels Reverser-Transkription zu cDNA umgeschrieben wurde (s. 2.4.2.4). Zur Amplifikation diente das Standard-PCR-Programm (s. 2.4.1.5) mit einer Anlagerungstemperatur von 58 °C und den Primern AT2F und AT2R (s. Tabelle 2.3).

Zur knollenspezifischen Expression wurde die cDNA der ATase2 in den binären Vektor B33-pBin-Kan ligiert (s. 2.4.1.14). Dazu wurde die cDNA zunächst in den pENTRY/SD/D/TOPO-Vektor kloniert (s. 2.4.1.16), anschließend über Restriktion (s.

2.4.1.8) mit BamHI und Sall isoliert und in den mit BamHI und Sall linearisierten B33-pBin-Kan-Vektor ligiert.

Zur unspezifischen konstitutiven Expression in nahezu allen Geweben wurde die ATase2 cDNA in den pGWB2-Vektor kloniert (s. 2.4.1.17). Dieser Vektor ist Gateway-kompatibel, so dass die cDNA der ATase2 aus dem pENTRY/SD/D/TOPO-Vektor mittels einer LR-Clonase-Reaktion (s. 2.4.1.17) in den binären Vektor rekombiniert werden konnte. Die auf diese Weise modifizierten Vektoren kamen zur Transformation von Agrobakterien zum Einsatz.

Nach Selektion der transformierten Agrobakterien (s. 2.3.6 und 2.1.3) mit den entsprechenden Antibiotika wurde eine colony-PCR durchgeführt (s. 2.4.1.6)

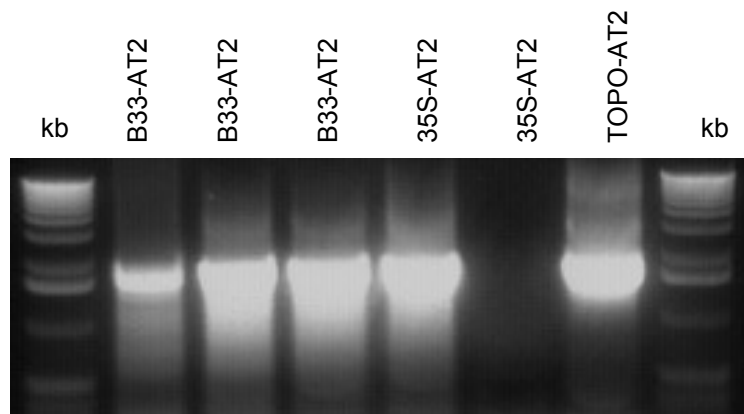


Abbildung 7: Gelbild der colony-PCR auf transformierte Agrobakterien; B33:AT2: ATase2 im B33-pBIN-Kan-Vektor; 35S:AT2: ATase2 im pGWB2-Vektor; TOPO-AT2: ATase2 im TOPO-Vektor als Positivkontrolle; kb, 1kb-Leiter Invitrogen; die PCR wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 55°C mit 32 Zyklen durchgeführt.

Das Gelbild zeigt das 1686 bp große PCR-Produkt der ATase2. Für jedes der beiden Konstrukte konnten positiv transformierte Agrobakterien selektioniert werden, um sie zur Transformation von Kartoffelblättern (s. 2.2.3) einzusetzen.

3.1.4 Expressionsanalyse der Konstrukte in transformierten Kartoffelpflanzen

Zur Expressionsanalyse des B33-pBin::ATase2-Konstruktes wurden Proben aus Knollen entnommen. Zur Analyse des 35S-pGWB2::ATase2-Konstruktes dienten Blattproben.

Aus diesen Proben wurde RNA extrahiert (s. 2.4.2.1), welche auf einem RNA-Gel (s. 2.4.2.6) aufgetrennt und mittels eines Northern blots (s. 2.4.2.7) auf eine Nylonmembran transferiert wurde. Diese Membran wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (s. 2.4.2.8), um die Expression der ATase2 in Knollen bzw. Blättern nachzuweisen.

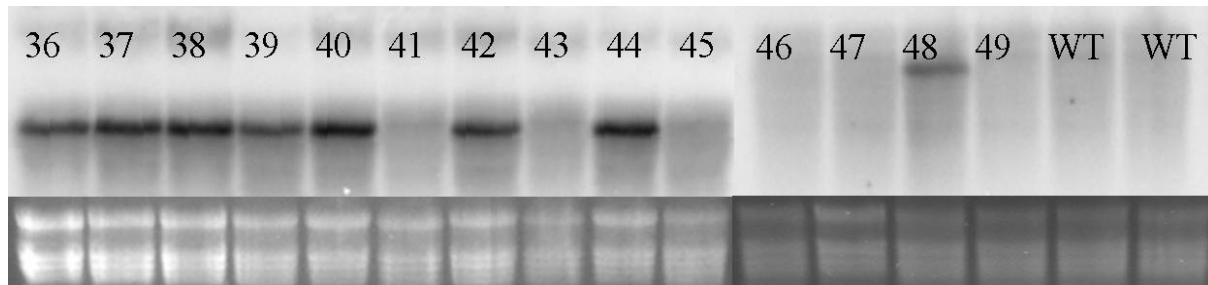


Abbildung 8: Northern blots mit aus Blättern extrahierter RNA, welcher mit einer Sonde für die ATase2 hybridisiert wurde. 36-49: Nummerierung der Pflanzenlinien, welche mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformiert wurden; WT: Wildtyp; unten: RNA-Gel mit ribosomalen RNA-Banden als Beladungskontrolle

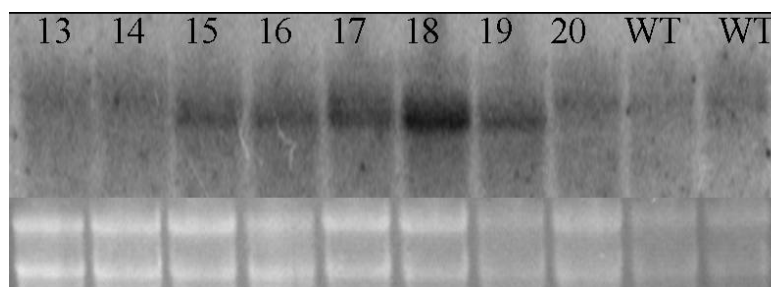


Abbildung 9: Northern blot mit aus Knollen extrahierter RNA, welcher mit einer Sonde für die ATase2 hybridisiert wurde. 13-20: Nummerierung der Pflanzenlinien, welche mit dem B33-pBin::ATase2-Konstrukt transformiert wurden; WT: Wildtyp; unten: RNA-Gel mit ribosomalen RNA-Banden als Beladungskontrolle

Wie aus den Northern blots ersichtlich ist, wurden sowohl für das 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt als auch für das B33-pBin::ATase2-Konstrukt positiv transformierte Pflanzen selektioniert, welche die ATase2 unterschiedlich stark exprimierten. Von den Pflanzen mit den größten Transkriptmengen wurden vier ausgewählt und für nachfolgende Untersuchungen verwendet und zwar die Linien 37, 40, 42, 44 im Falle der 35S-Überexprimierer und die Linien 15, 16, 17, und 19 bei den B33-Überexprimierern.

3.1.5 ATase2-Aktivitätsmessungen

Wie unter 3.1.4 beschrieben wurden positiv transformierte Pflanzen selektioniert. Um sicherzustellen, dass diese Pflanzen nicht nur die eingesetzten Konstrukte exprimieren sondern auch ein funktionales Genprodukt des ATase2-Gens besitzen, wurden Aktivitätsmessungen des Enzyms in Blättern und Knollen vorgenommen. Die Messung der ATase2-Aktivität erfolgte photometrisch mit einem an APAD gekoppelten enzymatischen Test. (s. 2.5.5).

Über die Reaktion der Glutamatdehydrogenase wurde die vom Substrat PRPP abhängige Glutamatbildung gemessen. Da die untersuchten Pflanzenextrakte Glutamat-bildende Enzymaktivitäten aufwiesen, die bis zu 80 % der gesamten Glutamatbildung ausmachten, wurden Ansätze mit und ohne zugesetztem PRPP, dem Substrat der ATase, analysiert (s. 2.5.5).

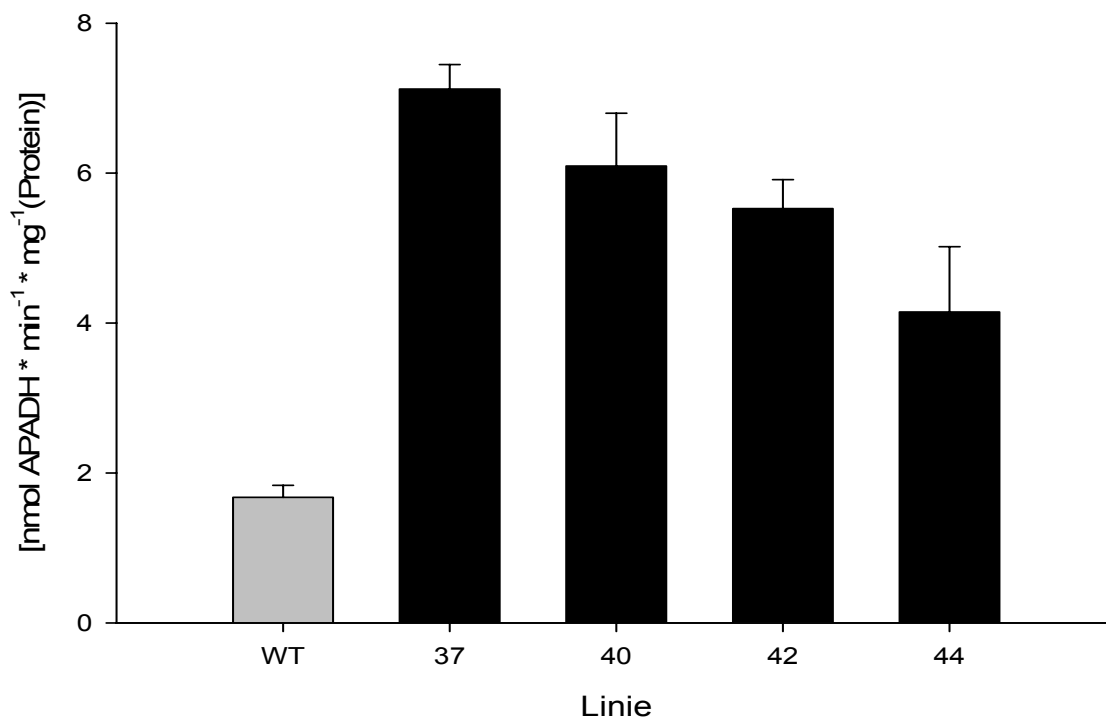


Abbildung 10: ATase-Aktivität in Blattextrakten der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen. 37-44: Nummerierung der Pflanzenlinien; WT: Wildtyp. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von n = 6 Einzelmessungen \pm Standardfehler.

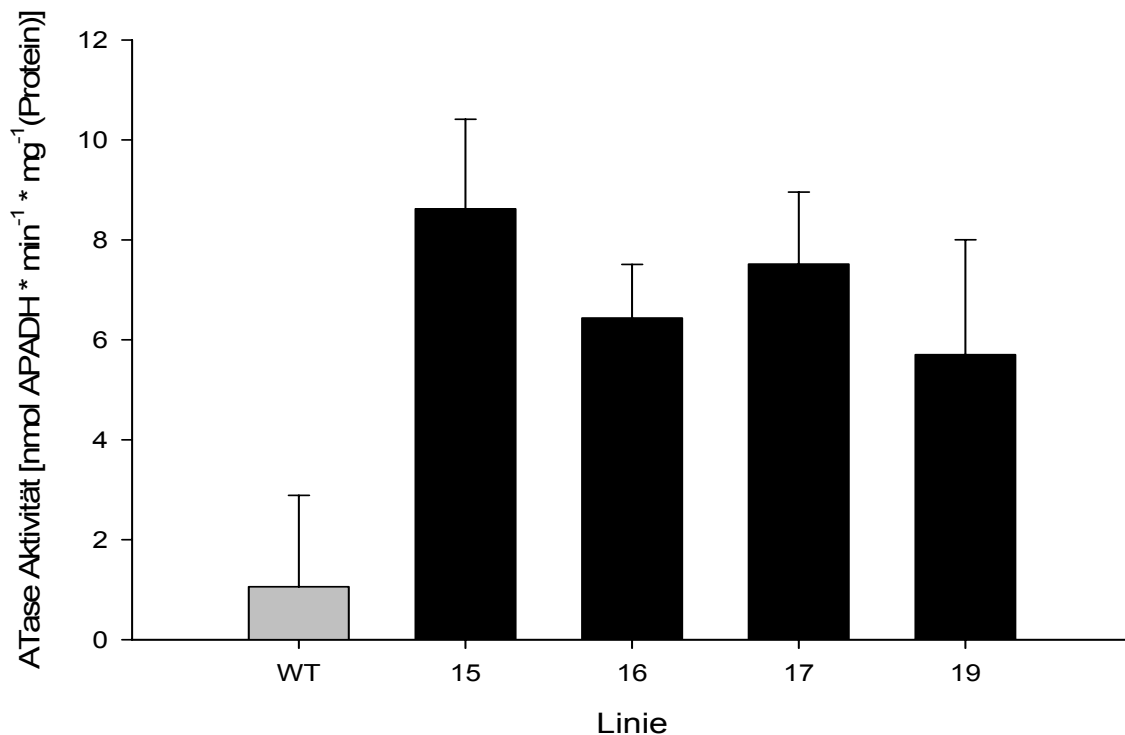


Abbildung 11: ATase-Aktivität in Knollenextrakten der mit dem B33-pBin::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen. 15-19: Nummerierung der Pflanzenlinien; WT: Wildtyp. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von $n = 6$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie aus den Diagrammen (s. Abb. 10 und 11) ersichtlich, besaßen die untersuchten transgenen Pflanzen nicht nur Transkripte für das Gen der ATase2 sondern auch deutlich erhöhte ATase2-Aktivitäten. Die Signifikanz dieser Werte wurde mit dem student's-T-Test (s. 2.6.3) ermittelt und lag in allen Linien bei $p < 0,05$.

Für die mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen waren die Aktivitäten für Linie 37 4,3 mal höher, für Linie 40 3,6 mal höher, für Linie 42 3,3 mal höher und für Linie 44 2,5 mal höher als im Wildtyp.

Bei den Pflanzen, welche mit dem B33-pBin::ATase2-Konstrukt transformiert wurden, waren die Aktivitäten für die Linien 15, 16, 17, und 19 8,2, 6,1, 7,1 bzw. 5,4 mal höher als im Wildtyp. Die Messwerte stimmten in ihrer Größenordnung mit denen von transgenen Tabakpflanzen überein, welche die ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors überexprimieren (Boldt, unveröffentlicht). Die funktionelle Expression der ATase2 konnte somit in allen untersuchten Linien nachgewiesen werden.

3.1.6 Weiterführende Untersuchungen der 35S-ATase2-Überexprimierer

3.1.6.1 Zuckergehalte in Blättern

In der von van der Graaff et al. im Jahr 2004 beschriebenen *atd2*-Mutante (*Atase2* *deficient*; s. 1.2.3) mit fehlender ATase2-Aktivität akkumuliert Blattstärke, wenn sie mit einem 35S-ATase2-Konstrukt komplementiert wird. So liegt die Vermutung nahe, dass in den transgenen Kartoffelpflanzen die Gehalte der Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose Änderungen unterliegen, da sie die Kohlenstoffgrundgerüste der Stärke liefern. Deshalb wurden diese Gehalte zunächst in Blättern untersucht (s. 2.5.1). Zur besseren Charakterisierung möglicher entwicklungsbedingter Unterschiede wurden Proben unterschiedlich alter Blättern untersucht. Analysiert wurden Blattproben aus dem dritten und sechsten voll ausgebildeten Fiederblatt, ausgehend vom Apikalmeristem der Pflanze.

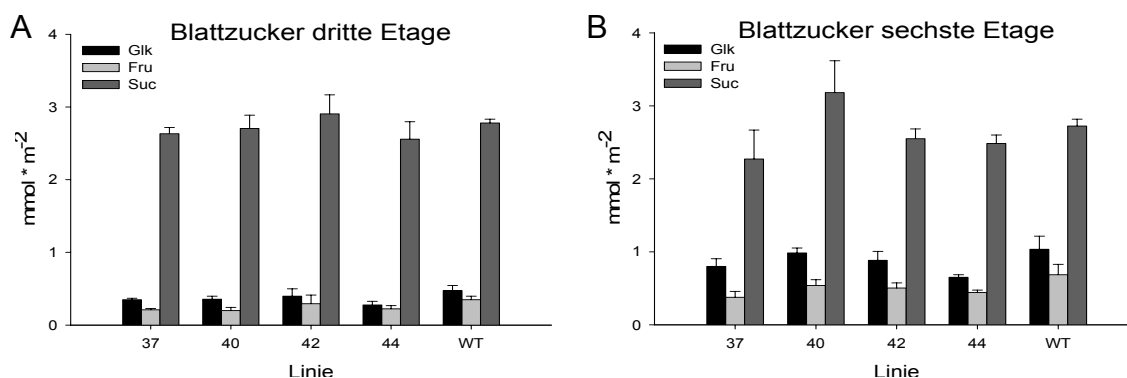


Abbildung 12: Zuckergehalte in Blättern der dritten (A) und sechsten (B) Blattetage in mmol pro m² Blattfläche. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen. WT, Wildtyp; Glk, Glukose; Fru, Fruktose; Suc, Saccharose. Die Werte sind Mittelwerte von n = 5 Einzelmessungen ± Standardfehler.

Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer von mehreren Ernten und macht deutlich, dass die Zuckergehalte in Blättern der transgenen Pflanzen ähnlich zu denen im WT waren. Dies galt sowohl für die Proben des dritten als auch für die Proben des sechsten Fiederblatts (Abb. 12, A + B). Signifikanzanalysen (s. 2.6.3) ergaben keine Wahrscheinlichkeit für Unterschiede bei den gemessenen Gehalten von Glukose, Fruktose und Saccharose zwischen transgenen Pflanzen und dem WT. Im sechsten Fiederblatt fanden sich im Vergleich zum dritten fast doppelt so große Glukose- und Fruktosekonzentrationen, wohingegen die Konzentrationen an

Saccharose gleich waren. Die Größenordnung der gemessenen Werte ist mit Literaturdaten (Tiessen et al., 2002; Zhang et al., 2008) vergleichbar.

3.1.6.2 Zuckergehalte in Kartoffelknollen

Auch die Zuckergehalte von Knollen wurden nach 12 Wochen Wachstum im Gewächshaus untersucht (s. 2.5.1). Ähnlich wie in den Blättern konnten in Knollen keine signifikanten Änderungen der Zuckergehalte festgestellt werden. Die Fruktosegehalte lagen nahe am Detektionslimit und wurden zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit weggelassen.

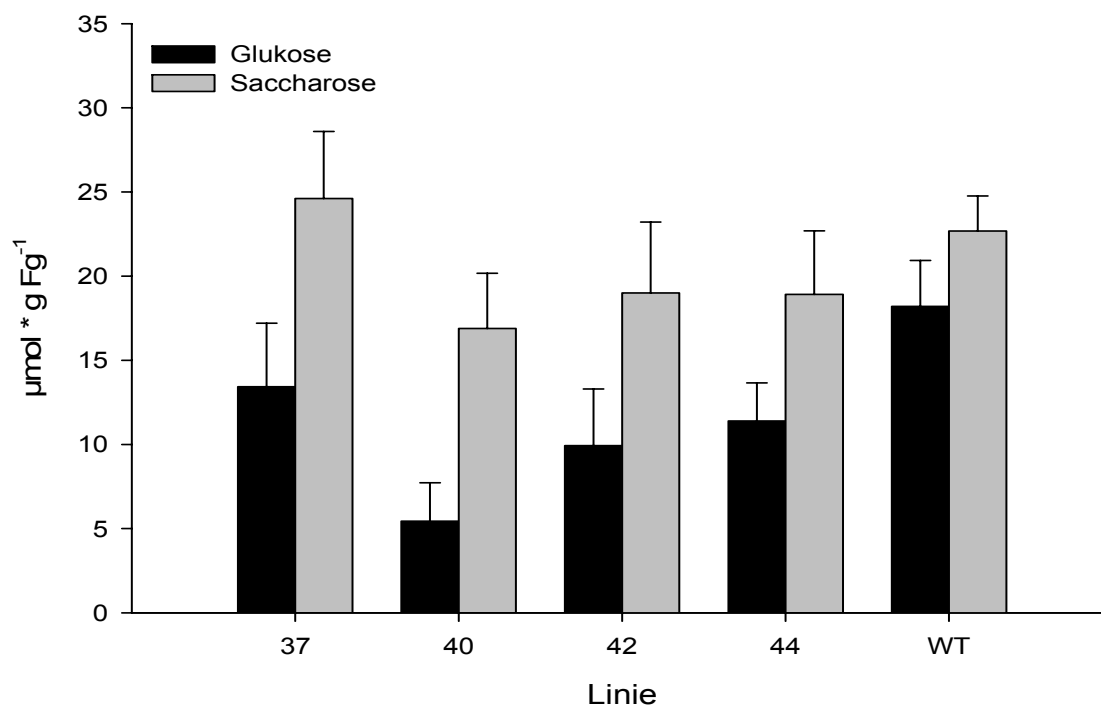


Abbildung 13: Gehalte von Glukose und Saccharose von Kartoffelknollen in μmol pro g Frischgewicht (Fg). 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Die Glukosekonzentrationen in Knollen lagen bei ca. $10 \mu\text{mol}$ pro g Frischgewicht, die Saccharosekonzentrationen bei ca. $20 \mu\text{mol}$ pro g Frischgewicht. Die Größenordnung dieser Werte ist mit Literaturdaten vergleichbar (z. B. Tiessen et al., 2002; Zhang et al., 2008).

3.1.6.3 Gehalte von F6P und G6P in Kartoffelknollen

Um zu prüfen, ob die Überexpression der ATase2 Auswirkungen auf die Gehalte der phosphorylierten Intermediaten F6P und G6P hat, wurden letztere in Knollen nach 12 Wochen Wachstum quantifiziert (s. 2.5.3).

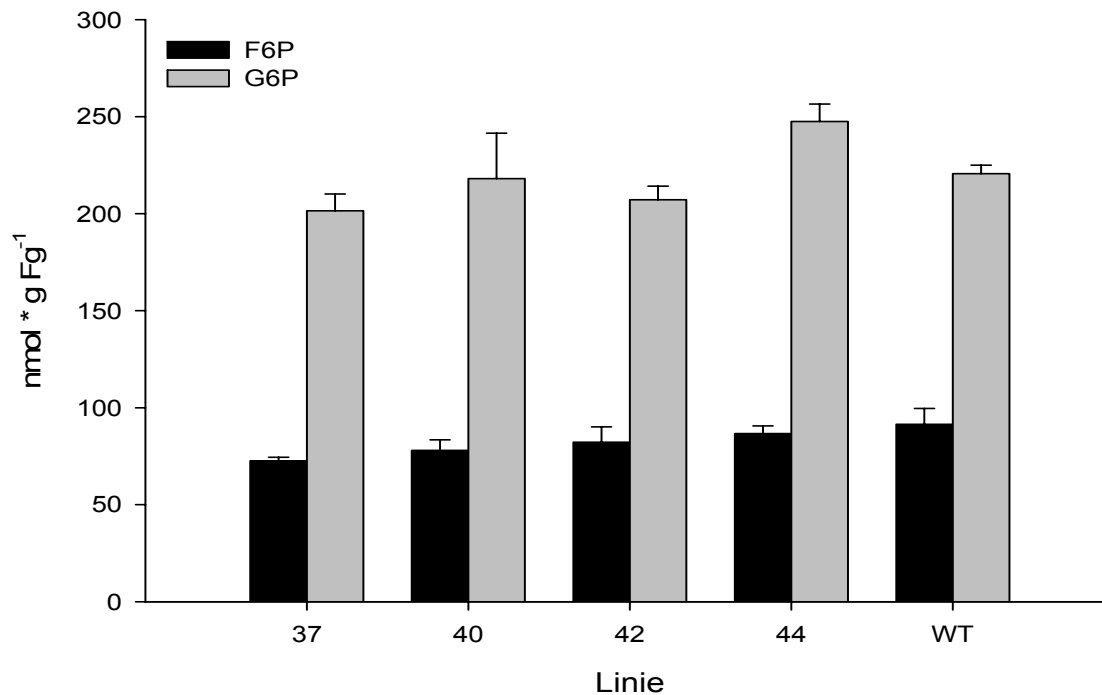


Abbildung 14: F6P- und G6P-Gehalt in Kartoffelknollen in nmol pro g Frischgewicht (Fg). 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von n = 4 Einzelmessungen ± Standardfehler.

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, stimmten die Gehalte der beiden gemessenen Hexosephosphate in den transgenen Linien mit denen im WT in etwa überein. Die Tendenz der transgenen Pflanzen zu niedrigeren F6P-Gehalten konnte durch einen Signifikanztest nicht bestätigt werden. F6P-Konzentrationen in der Knolle lagen bei ca. 80 nmol pro g Frischgewicht, G6P-Konzentrationen bei ca. 220 nmol pro g Frischgewicht. Die Gehalte an F6P und G6P pro g Frischgewicht sind in der Größenordnung mit Literaturdaten vergleichbar (Tiessen et al., 2002; Zhang et al., 2008).

3.1.6.4 Stärkegehalte in Kartoffelknollen

Wie unter 1.3 bereits erwähnt liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung des Stärkegehalts der Knollen und des Knollenertrags in transgenen

Kartoffelpflanzen, welche die ATase2 überexprimieren. Die Ausgangsüberlegung war, durch einen gesteigerten Blattstärkegehalt die Versorgung von Knollen mit Assimilaten zu verbessern und so indirekt eine Änderung im Stärkegehalt der Knollen oder im Ertrag von Knollen zu erzielen. Beide Größen sind von großer wirtschaftlicher Bedeutung, sei es für die Futter- und Nahrungsmittelproduktion oder für industrielle Applikationen.

Zur Ermittlung des Stärkegehalts (s. 2.5.2) von Knollen und des Knollenertrags wurden 12 Wochen alte Kartoffelpflanzen untersucht. Wie aus Abbildung 15 deutlich wird, konnten keine einheitlichen Änderungen im Stärkegehalt erzielt werden.

Die zu Beginn der Arbeit ermittelten Stärkekonzentrationen der 35S-ATase-Überexprimierer in Knollen zeigten in Linie 37, 40 und 44 signifikante Steigerungen um bis zu 25 % (Linie 37) im Vergleich zum WT. Dabei lag die Wahrscheinlichkeit p über 95 % ($p < 0,05$) (s. Abb. 15-A). Diese Werte wurden im Januar 2006 ermittelt (01.06) und ließen vermuten, dass eine Steigerung des Stärkegehalts von Knollen durch Überexpression der ATase2 erzielt werden kann. Die darauf folgenden Ernten (s. Abb. 15 B-D) zeigten jedoch keine deutliche Erhöhung der Stärkekonzentration. Die Linien 37 und 40, welche im Januar 2006 (A) einen signifikant erhöhten Stärkegehalt aufwiesen, zeigten im Dezember 2006 (C, 12.06) eine signifikant geringere Stärkekonzentration in ihren Knollen. Die Linien 42 und 44 dagegen wiesen mit dem WT vergleichbare Werte auf. Letzteres traf auch für die Ernten im April 2006 und 2008 (B und D, 04.06, 04.08) zu, bei der die Stärkekonzentration aller transgenen Linien ähnlich der im WT war. Im September 2008 (E, 09.08) konnte jedoch wieder eine signifikant gesteigerte Stärkekonzentration in den transgenen Linien festgestellt werden. Die in den Linien 37, 40 und 44 ermittelten Stärkegehalte lagen dabei mit einer Wahrscheinlichkeit von $> 95\%$ über denen des WT. Linie 37 wies dabei 1,3 mal, Linie 40 wies 1,4 mal und Linie 44 wies 1,1 mal mehr Stärke auf als der WT.

Insgesamt scheinen die 35S-ATase2-Überexprimierer also eine Tendenz zu besitzen, mehr Stärke in ihren Knollen zu akkumulieren. Dies wurde auch in der Ernte vom April 2006 deutlich. Auch in der Ernte vom April 2006 wiesen die transgenen Linien zwar keine signifikanten Änderungen im Stärkegehalt auf, die Mittelwerte der Stärkekonzentration der 35S-ATase2-Überexprimierer lagen allerdings über dem Mittelwert des WT (D, 04.08).

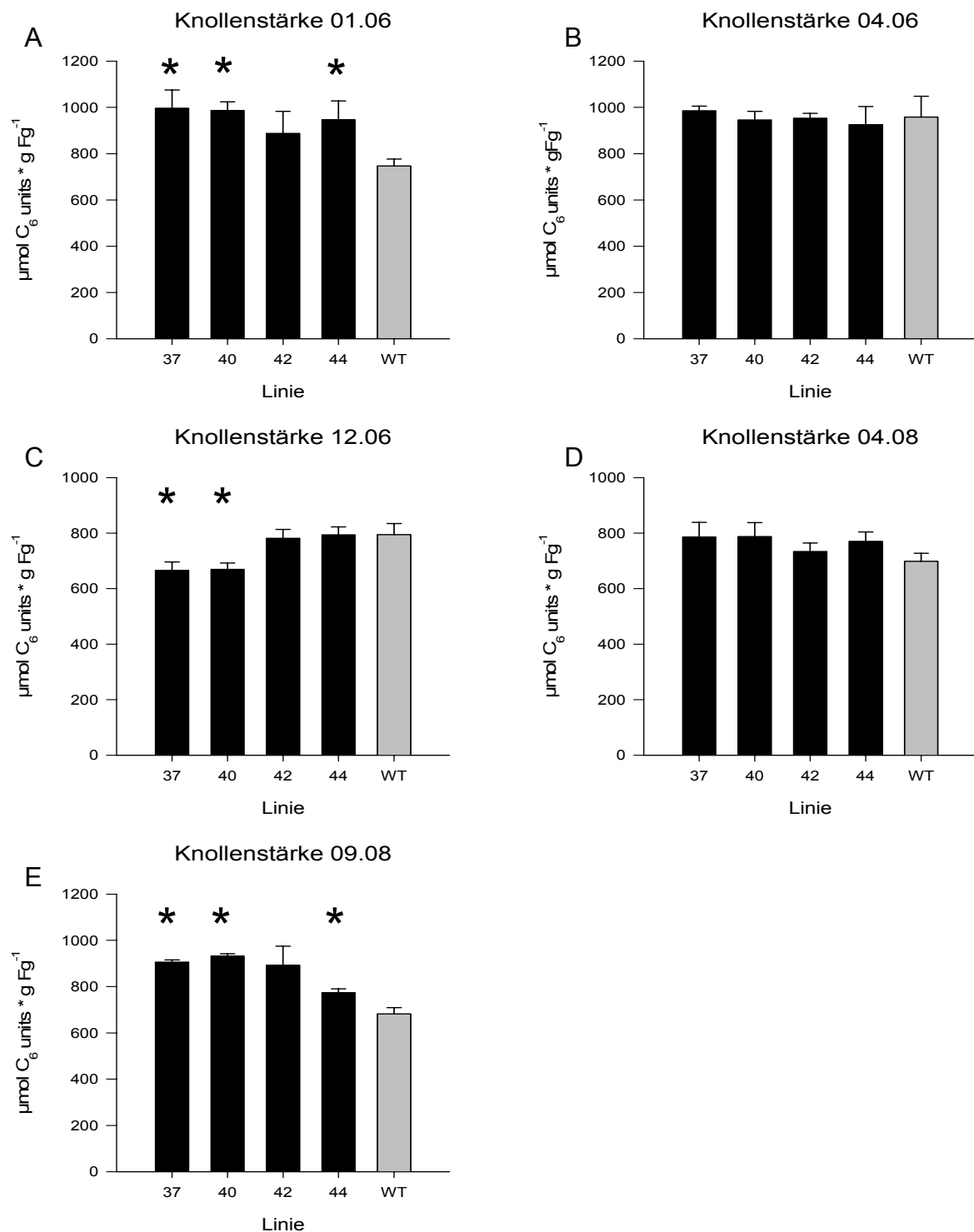


Abbildung 15: Stärkegehalte von Kartoffelknollen der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen in $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht (Fg). 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. A-E, siehe Text

Die Stärkekonzentrationen in Knollen lagen bei allen Ernten zwischen 700 und 1000 $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht, was mit Literaturdaten für 12 Wochen alte Kartoffelpflanzen überein stimmt (Tiessen et al., 2002, Zhang et al., 2008).

3.1.6.5 Knollenertrag pro Pflanze

Die Knollen 12 Wochen alter Pflanzen wurden gesammelt und gewogen, um festzustellen, ob eine ATase2-Überexpression einen Einfluss auf die Knollenbildung bzw. das Knollenwachstum hat. Die erzielten Knollenerträge pro Pflanze stimmten mit Literaturdaten überein und lagen zwischen 50 und 200 g Frischgewicht pro Pflanze (Zhang et al., 2008). Da der Knollenertrag jedoch stark von der Größe des Topfs abhängig ist, ist ein Vergleich mit Literaturdaten nicht ohne weiteres möglich (vgl. Regierer et al., 2002).

Nach mehreren Ernten (s. Abb. 16 A-E) ergab sich für den Knollenertrag pro Pflanze ein einheitlicheres Bild als für den Stärkegehalt (s. 3.1.6.5). Drei von fünf dargestellten Ernten (s. Abb. 16 A, B und E) wiesen im Vergleich zum WT keine signifikanten Änderungen im Knollenertrag pro Pflanze auf.

Im Gegensatz dazu zeigten die Ernten vom Dezember 2006 und vom April 2008 (s. Abb. 16 C und D) zum Teil veränderte Erträge. In der Ernte vom Dezember 2006 bildeten die Pflanzen weniger Knollen aus, wobei eine Signifikanz ($p < 0,05$) für die Linien 37, 42 und 44 vorlag. Die Linie mit dem geringsten Knollenertrag wies lediglich 78 % des Knollenertrags des WT auf. Im April 2008 dagegen konnte bei Linie 42 ein signifikant erhöhter Knollenertrag festgestellt werden, welcher 1,36 mal höher lag als der des WT.

Insgesamt hat es den Anschein, dass die Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors keine Änderungen im Knollenertrag bewirkt.

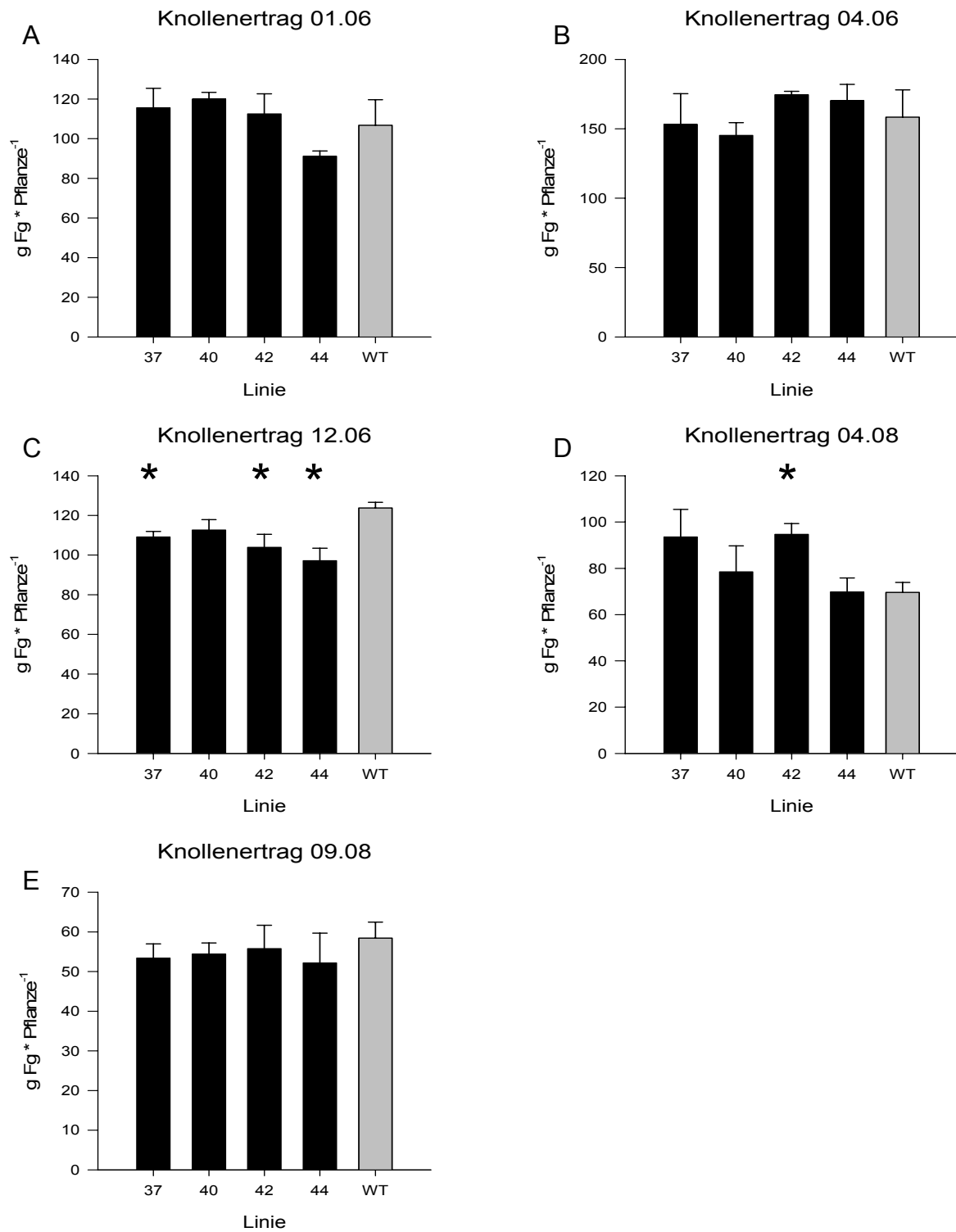


Abbildung 16: Knollenertrag in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. A-E, siehe Text

3.1.6.6 Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze

Der Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze als Menge an Stärke, die pro Pflanze aus Knollen gewonnen werden kann, errechnet sich durch Multiplikation des Stärkegehaltes von Knollen mit dem Knollenertrag pro Pflanze. Er liefert einen eindeutigen Hinweis darauf, ob eine Ertragssteigerung vorliegt oder nicht. Zur Analyse des Stärkeertrags pro Pflanze wurden die Messergebnisse der in 3.1.6.5 und 3.1.6.6 analysierten Kartoffeln herangezogen.

Die Analyse des Stärkeertrages von Knollen pro Pflanze ergab ein ähnliches Bild wie die des Stärkegehaltes. Da sich - wie in 3.6.6.6 gezeigt - durch Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors keine Änderungen im Knollenertrag ergeben haben, aber die Pflanzen eine Tendenz aufwiesen, mehr Stärke in ihren Knollen zu speichern, zeigten die transgenen Linien einen gesteigerten Stärkeertrag pro Pflanze. Ein gesteigerter Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze traf jedoch, wie für die Stärkegehalte in Knollen, nicht für alle Ernten und alle Linien zu.

In den Ernten vom Januar 2006, April 2008 und September 2008 (s. Abb. 17 A, D und E) konnten bei einigen Linien signifikante Steigerungen des Stärkeertrags festgestellt werden. So wies Linie 40 in den genannten Ernten einen gesteigerten Stärkeertrag von bis zu 49 % (A) im Vergleich zum WT auf. Ebenfalls signifikant verändert war der Knollenertrag der Linie 42 in den Ernten vom Januar 2006 (A) und April (B) 2008, welcher um bis zu 42 % (D) höher war als der des WT. Linie 37 zeigte gesteigerte Erträge in den Ernten vom April 2008 (D) und September 2008 (E). Im April konnte ein um 51 % höherer Stärkeertrag festgestellt werden als im entsprechenden WT.

In der Ernte vom Dezember 2006 (C) zeigten die Linien 40 und 44 allerdings einen signifikant verringerten Stärkeertrag gegenüber dem WT. Bei Linie 40, welche in 3 Ernten einen erhöhten Stärkeertrag aufwies, lag der Stärkeertrag in dieser Ernte um 30 % niedriger als im WT. Linie 44 zeigte dabei 33 % weniger Stärke als der WT.

In der Ernte vom April 2006 (B) war der Stärkegehalt aller Linien annähernd mit dem des WT identisch.

Nach Auswertung der dargestellten Ernten ist davon auszugehen, dass die transgenen Pflanzen lediglich tendenziell einen gesteigerten Stärkeertrag in Knollen pro Pflanze besitzen. Dieser beruht auf einem gesteigerten Stärkegehalt in Knollen, da der Knollenertrag pro Pflanze im Wesentlichen unverändert ist.

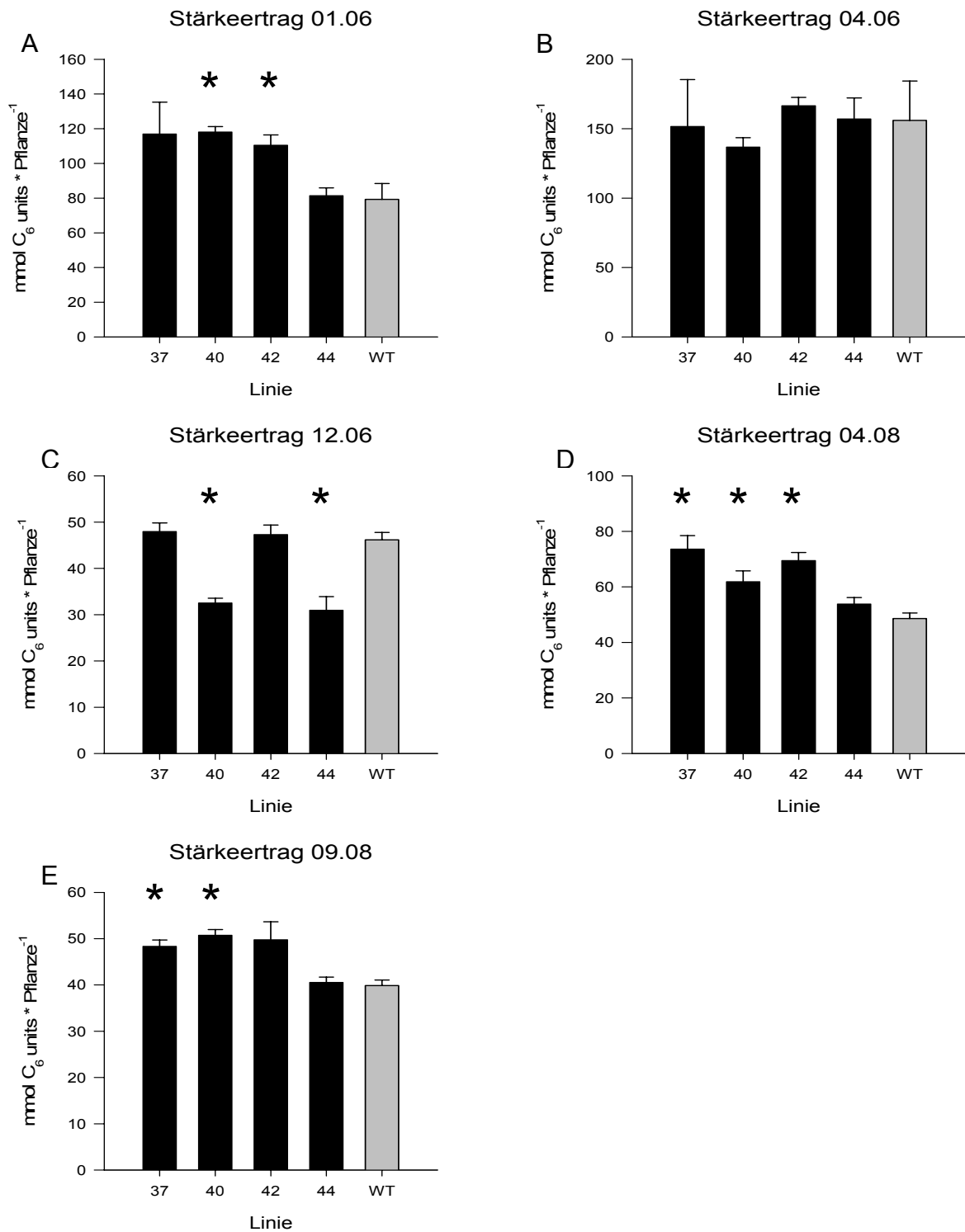


Abbildung 17: Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze in mmol C₆ units pro Pflanze. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. A-E, siehe Text

3.1.6.7 Stärkegehalte in Blättern

Van der Graaff et al. führten 2002 den Nachweis, dass *atd2*-Mutanten (Atase2 deficient; s. 1.2.3), welche die ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors überexprimierten, massiv Stärke in ihren Chloroplasten akkumulierten (s. Abb. 4). So lag die Vermutung nahe, dass auch transgene Kartoffelpflanzen, welche ebenfalls die ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors überexprimieren, einen gesteigerten Blattstärkegehalt aufweisen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Stärkegehalte von Blättern in mehreren Ernten untersucht (s. 2.5.2). Dazu dienten ca. 10 Wochen alte Pflanzen, bei denen die Blätter noch keine Seneszenz zeigten. Blattproben wurden stets am frühen Nachmittag aus dem sechsten voll ausgebildeten Fiederblatt ausgehend vom Apikalmeristem entnommen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 18 dargestellt, aus der ersichtlich ist, dass sich auch für den Stärkegehalt in Blättern keine einheitlichen Änderungen ergaben. Die gemessenen Blattstärkekonzentrationen stimmten mit Literaturdaten überein und lagen zwischen 10 und 40 mmol C₆ units pro m² Blattfläche (Zhang et al., 2008).

Signifikant größere Stärkegehalte konnten nur in der Ernte vom April 2008 (D) für Linie 40 und in der Ernte vom September 2008 (E) für Linie 44 festgestellt werden. In allen anderen dargestellten Ernten waren keine signifikanten Änderungen des Stärkegehalts in Blättern im Vergleich zum WT zu beobachten. Dennoch lagen die Mittelwerte der Blattstärkegehalte in den transgenen Linien vor allem in den Ernten vom Januar 2006 (A), April 2006 (B) und September 2008 (E) stets über dem Mittelwert des WT. Daher besteht Grund zu der Annahme, dass die transgenen Linien, auch was den Stärkegehalt in Blättern anbelangt, eine Tendenz besitzen, mehr Stärke zu bilden als der WT.

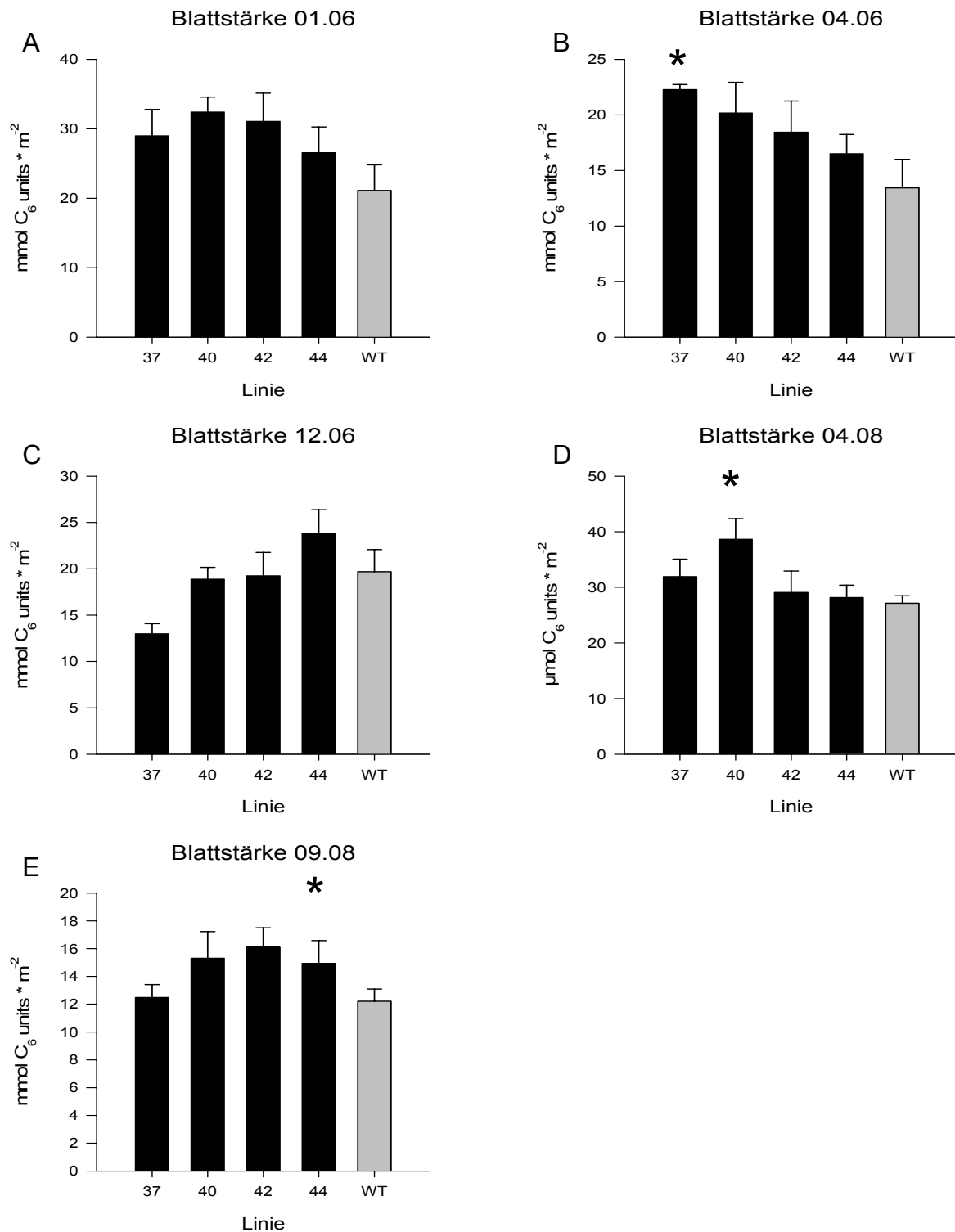


Abbildung 18: Stärkegehalte von Blättern in mmol C₆ units pro m² Blattfläche. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; * = signifikant (p < 0,05); Die Werte sind Mittelwerte von n ≥ 3 Einzelmessungen ± Standardfehler. A-E, siehe Text

3.1.6.8 Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile

Änderungen der Gehalte wichtiger Substanzen wie Zucker oder Stärke können nicht nur den Knollenertrag pro Pflanze sondern auch das Wachstum der oberirdischen Pflanzenteile beeinflussen. Deshalb wurde bei jeder Ernte nicht nur der Knollenertrag sondern auch das Gewicht der grünen oberirdischen Pflanzenteile bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 19 A bis E dargestellt, aus denen ersichtlich ist, dass keine signifikante Änderung im Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile festgestellt werden konnte. In der Ernte vom Dezember 2006 (C) fand sich jedoch bei Linie 44 eine signifikante Verringerung des durchschnittlichen Pflanzengewichtes um 27 % im Vergleich zum WT. Die Pflanzen wogen durchschnittlich zwischen 40 und 70 g, bei einer Höhe von zwischen 40 und 70 cm (nicht gezeigt).

Insgesamt scheint aber eine Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors keinen Einfluss auf das Gewicht der grünen oberirdischen Pflanzenteile zu besitzen.

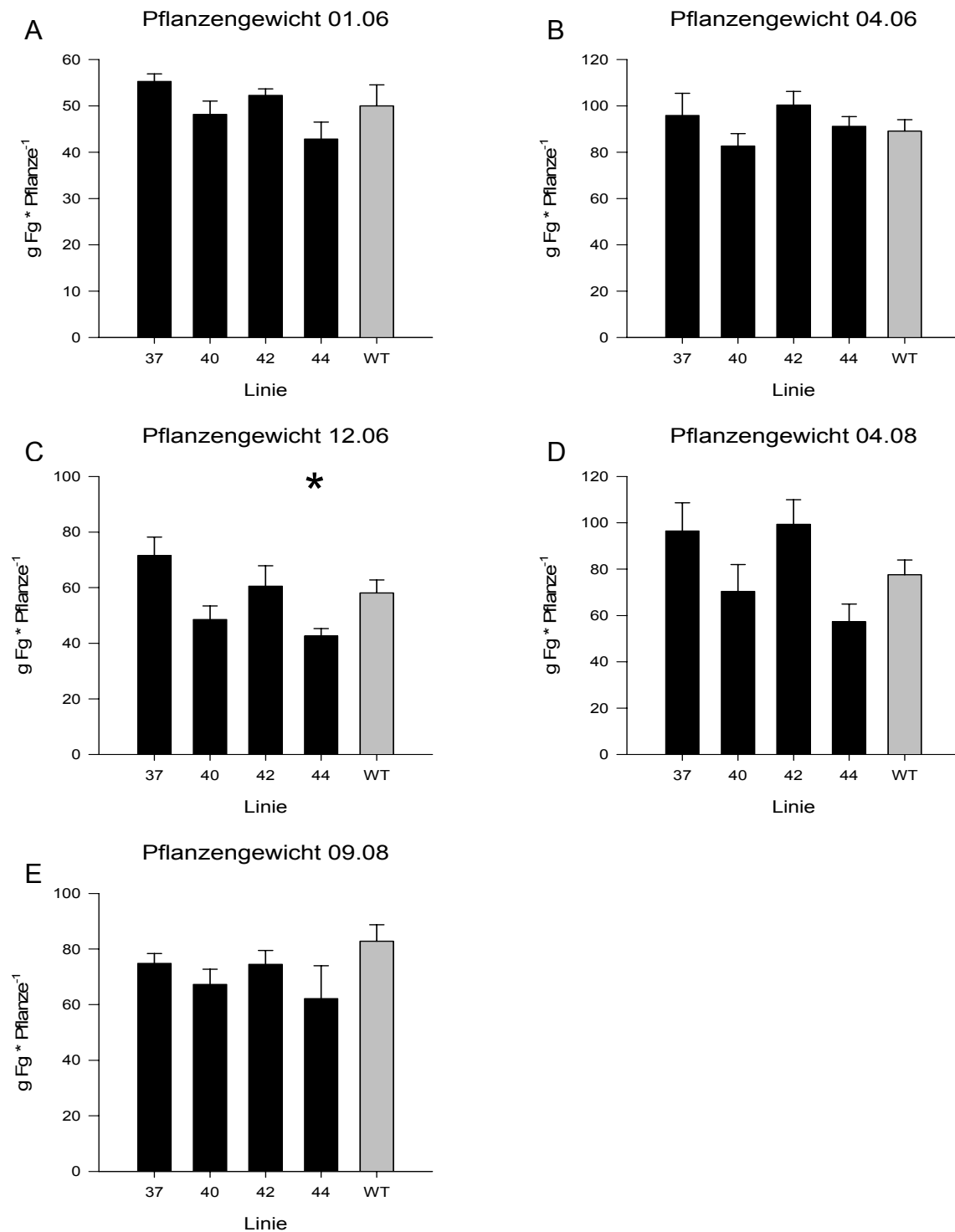


Abbildung 19: Gewichte der grünen oberirdischen Pflanzenteile in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. A-E, siehe Text

3.1.6.9 ^{14}C -Glukose-Aufnahmen von Knollenscheiben

Wie unter 3.1.6.4 dargestellt besitzen die mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen eine Tendenz, höhere Stärkekonzentrationen in ihren Knollen aufzubauen als Wildtyppflanzen. Diese Erkenntnis zu Beginn der Arbeit (s. Abb. 15 A) führte zu weiteren Analysen, unter anderem zu ^{14}C -Glukose Aufnahmeexperimenten (s. 2.5.8) mit Knollenscheiben. So sollte belegt werden, dass die transgenen Pflanzen im Vergleich zum WT eine höhere Stärkesyntheserate bzw. einen erhöhten Fluss von Kohlenhydraten in die Stärke besitzen.

Nach Extraktion der Knollenscheiben mit Ethanol und Aufschluss der Stärke konnte der zeitabhängige Einbau von mit ^{14}C markierter Glukose in die löslichen Bestandteile sowie in die Stärke ermittelt werden. Die Ergebnisse des Aufnahmeversuchs sind in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt.

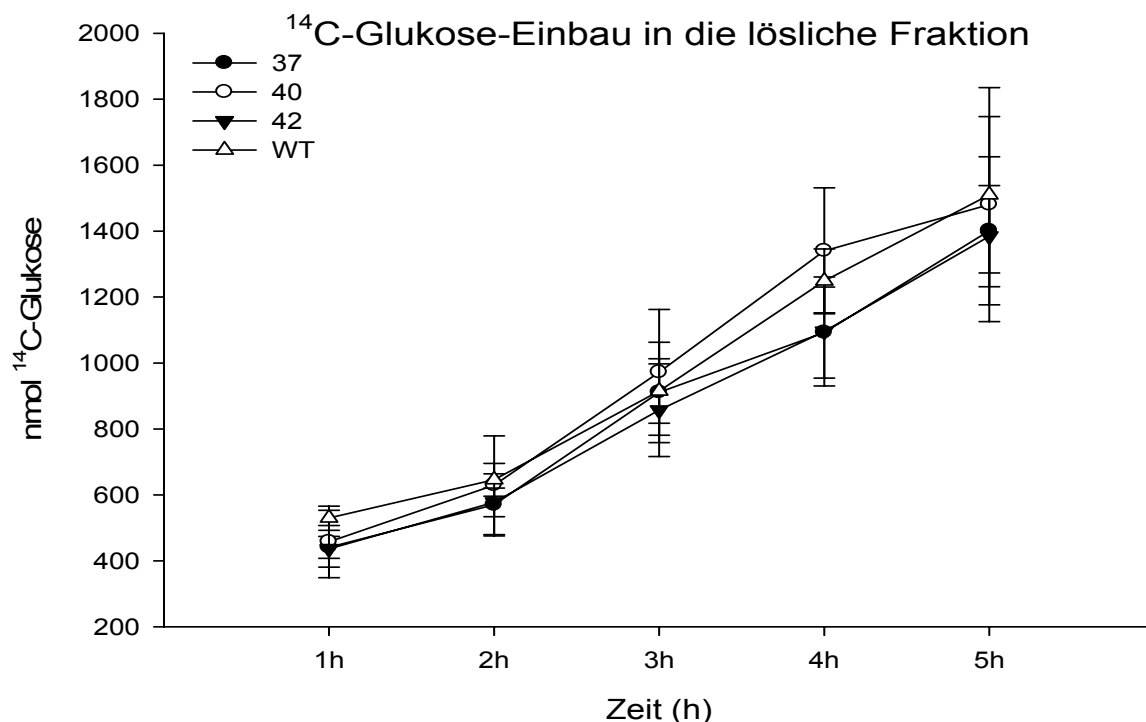


Abbildung 20: ^{14}C -Glukose-Aufnahme in die lösliche Fraktion von Knollenscheiben. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

In Abbildung 20 ist die zeitabhängige Aufnahme von mit ^{14}C markierter Glukose in die löslichen Bestandteile von Knollenscheiben dargestellt. Wie aus dem Diagramm

hervorgeht, war die Aufnahme von ^{14}C -Glukose in die lösliche Fraktion über den Untersuchungszeitraum von 5 Stunden hinweg nahezu konstant. Zwischen den transgenen Linien und dem WT gab es dabei keine Unterschiede.

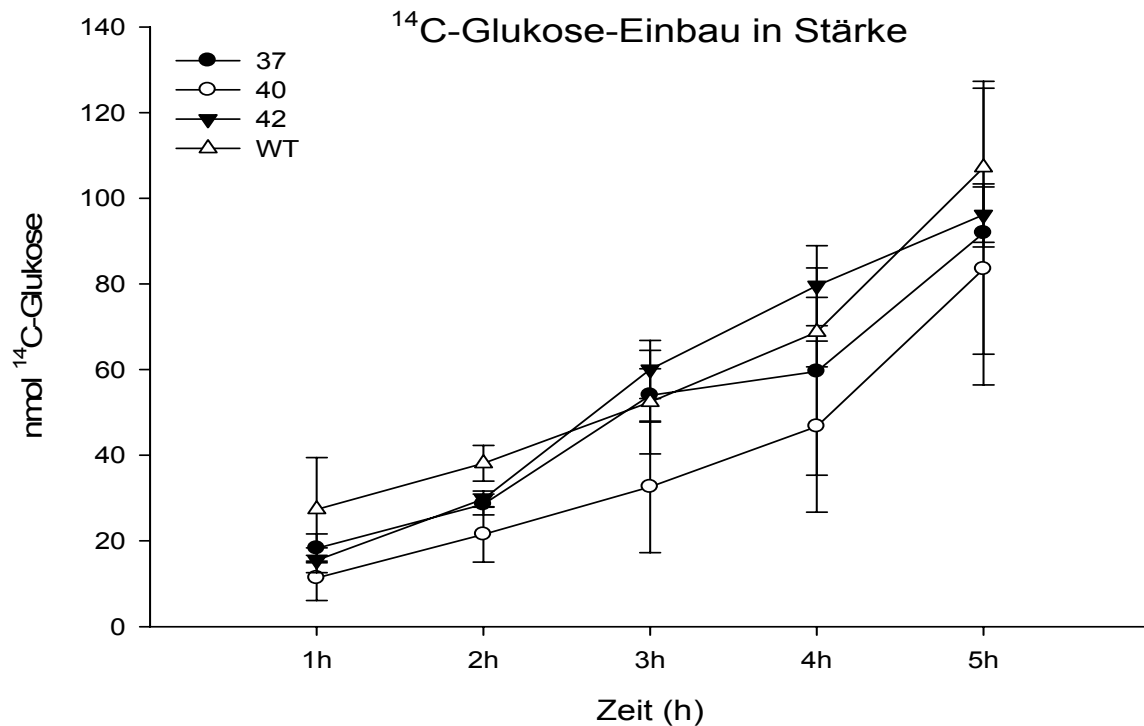


Abbildung 21: ^{14}C -Glukose-Aufnahme in die unlösliche Fraktion von Knollenscheiben. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

In Abbildung 21 ist die Inkorporation von ^{14}C -Glukose in Stärke dargestellt. Die Inkorporationsrate war innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden konstant und nahm dann leicht zu. Aber auch für den Einbau der radioaktiv markierten Glukose in Stärke konnten keine Unterschiede zwischen transgenen Pflanzen und dem WT festgestellt werden.

3.1.6.10 Messungen des Gaswechsels und der Elektronentransportrate von Blättern

Um die Ursache der tendenziell gestiegenen Stärkegehalte (s. 3.1.6.7) in Blättern zu ergründen, erschien es sinnvoll, die CO₂-Assimilationsrate der transgenen Kartoffelblätter bei verschiedenen Belichtungsstärken zu ermitteln und sie mit der des WT zu vergleichen (s. 2.5.7). Eine mögliche Ursache für eine gesteigerte Blattstärkekonzentration hätte eine gesteigerte Assimilation von CO₂ durch die Photosyntheseapparate sein können.

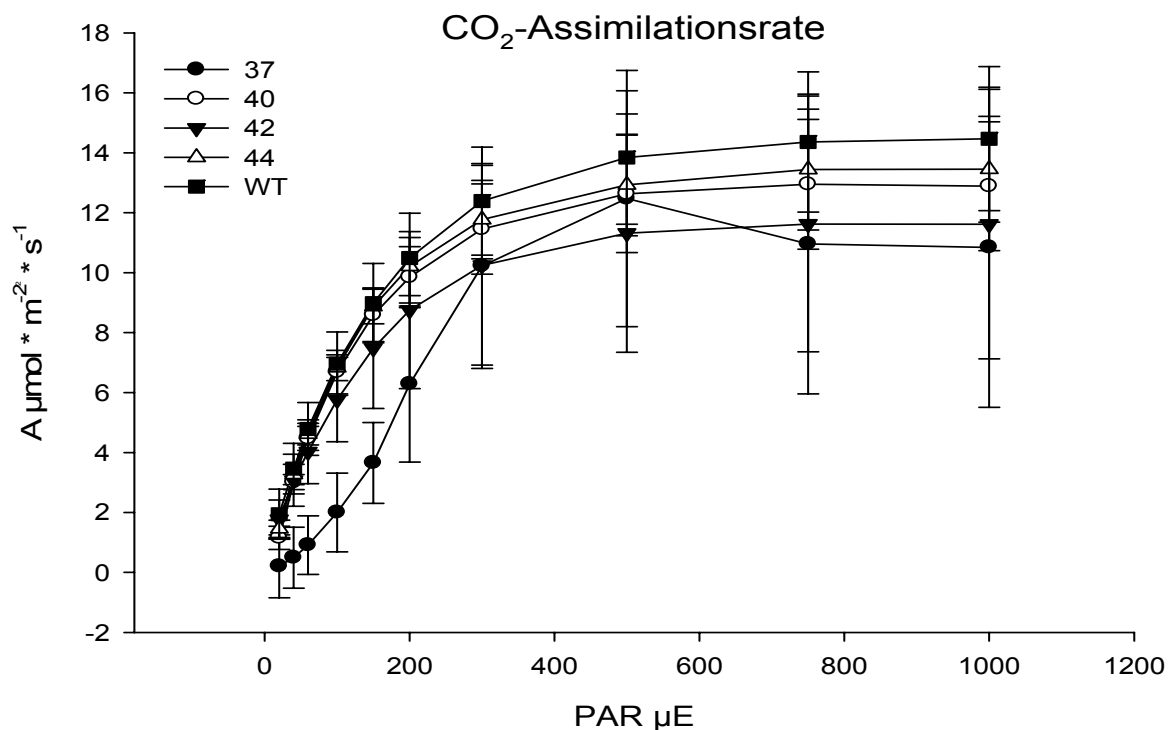


Abbildung 22: CO₂-Assimilationsrate von Kartoffelblättern in μmol assimiliertem CO₂ pro m² Blattfläche und Sekunde. PAR, photosynthetic active radiation; μE, μEinstein. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von n = 3 Einzelmessungen ± Standardfehler.

Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, stieg bei wachsender Belichtungsstärke die Rate der CO₂-Assimilation pro m² Blattfläche und Sekunde. Im Bereich von 0 bis ca. 200 μE verlief diese Steigerung linear zur Belichtungsstärke. Ab einer Belichtungsstärke von 200 μE trat allerdings eine Lichtsättigung ein, die durch nur noch sehr geringe

Zunahmen der Assimilationsrate gekennzeichnet war. Ab einer Belichtungsstärke von 550 μE konnte keine Zunahme der Assimilationsrate mehr festgestellt werden. In diesem Experiment wurden keine signifikanten Unterschiede in der CO_2 -Assimilationsrate zwischen den transgenen Pflanzen und dem WT gefunden.

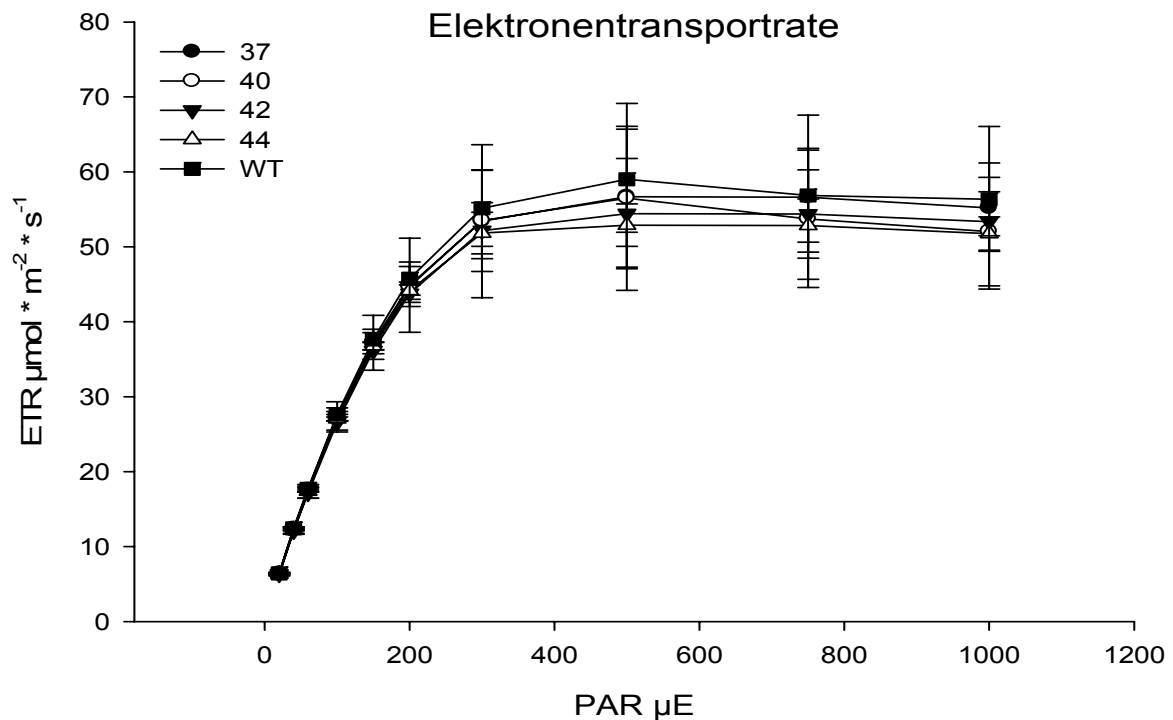


Abbildung 23: Elektronentransportrate von Kartoffelblättern in μmol pro m^2 Blattfläche und Sekunde. PAR, photosynthetic active radiation; μE , $\mu\text{Einstein}$. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Die Elektronentransportrate (ETR) wurde simultan zur CO_2 -Assimilationsrate gemessen (s. 2.5.7). Auch in der ETR wiesen die transgenen Pflanzen keine Änderungen zum WT auf. Ähnlich wie die CO_2 -Assimilationsrate stieg auch die ETR linear bis zu einer Lichtstärke von ca. 200 μE . Bei höheren Belichtungsstärken trat mit zunehmender Intensität eine Lichtsättigung ein, bei der keine weiteren Steigerungen der ETR mehr zu beobachten waren. Auch in der ETR wiesen die transgenen Pflanzen keine Änderungen zum WT auf.

3.1.6.11 HPLC-Messungen von ATP, ADP und ADP-Glukose in Kartoffelknollen

ADP-Glukose ist der direkte Vorläufer der Stärkesynthese, ATP und ADP sind Produkte aus der Purinbiosynthese (s. 1.1 und 1.2). Veränderte Stärkegehalte in Knollen könnten Änderungen im Gehalt von ADP-Glukose nach sich ziehen oder von ihnen ausgehen. Eine Überexpression der ATase2 könnte einen Einfluss auf die Gehalte von ATP und ADP haben. Deshalb wurden die Gehalte von ADP-Glukose, ADP und ATP in Knollenextrakten mittels HPLC gemessen (s. 2.5.11).

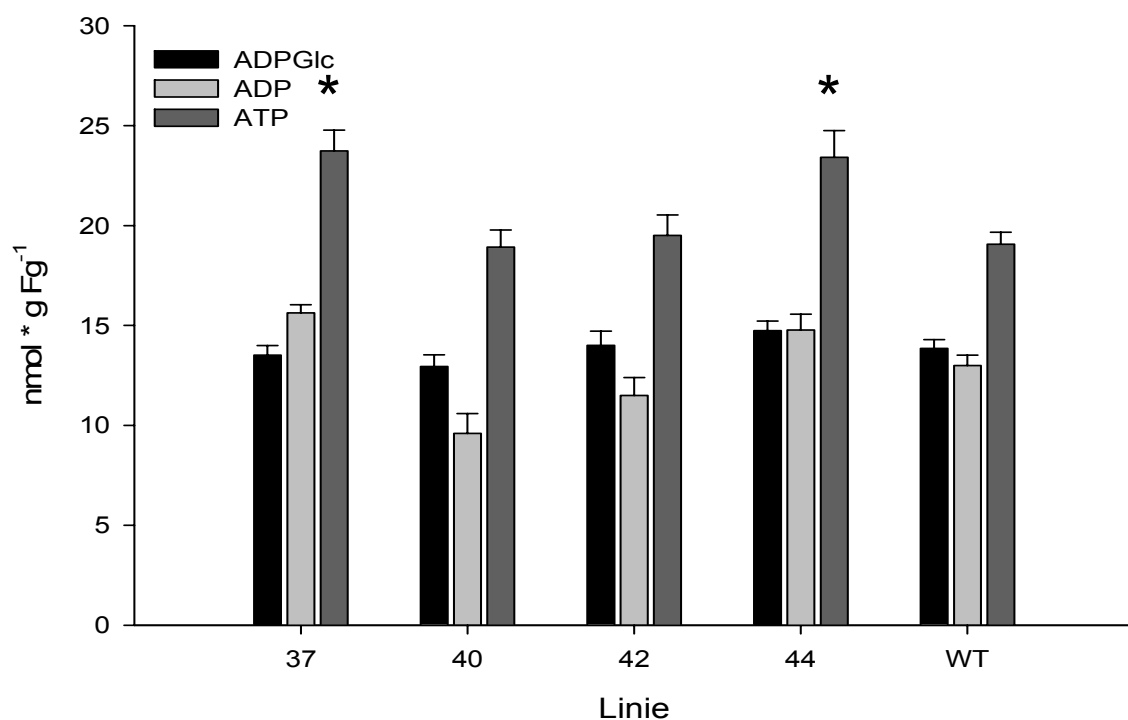


Abbildung 24: Gehalte von ADP-Glukose, ADP und ATP in Kartoffelknollen in nmol pro g Frischgewicht (Fg). 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n = 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich konnten keine eindeutigen Änderungen in den Gehalten von ADP-Glukose, ATP und ADP in Knollen gemessen werden. Die ADP-Glukosekonzentrationen lagen bei allen transgenen Linien und beim WT bei ca. 14 nmol pro g Frischgewicht. Die ADP-Konzentrationen bewegten sich zwischen 10 und 15 nmol pro g Frischgewicht, die ATP-Konzentrationen zwischen 15 und 20 nmol pro

g Frischgewicht. Lediglich die Linien 37 und 44 wiesen signifikant leicht erhöhte ATP-Konzentrationen in ihren Knollen auf.

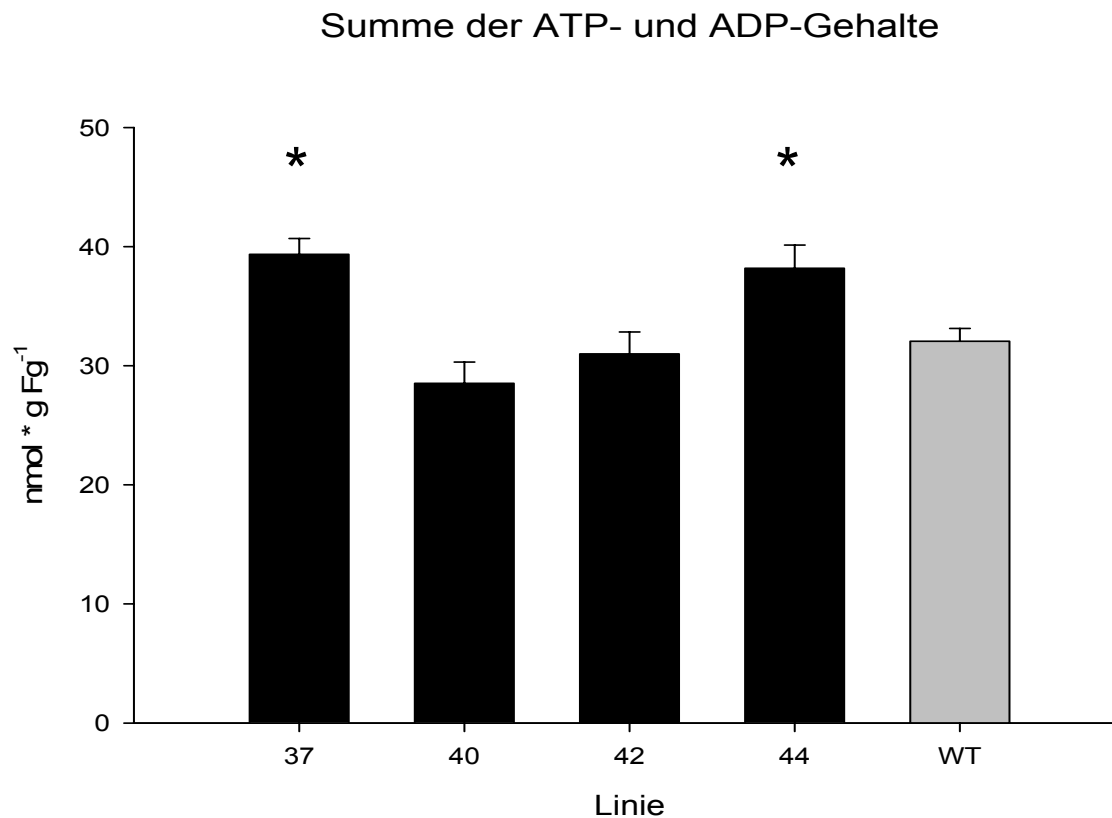


Abbildung 25: Gesamtgehalte von ADP und ATP von Kartoffelknollen in nmol pro g Frischgewicht. 37-44: Nummerierung der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n = 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Bei der Betrachtung der Gesamtgehalte an ATP und ADP (Abb. 25) war festzustellen, dass die Linien 37 und 44 leicht erhöhte Gesamtkonzentrationen an ATP und ADP in Knollen aufwiesen. Diese Steigerungen beruhten größtenteils auf einer erhöhten ATP Konzentration in Knollen und waren mit $p < 0,05$ signifikant.

3.1.6.12 Fazit

Die durchgeführten Experimente und Untersuchungen lieferten keine eindeutigen Hinweise darauf, dass eine Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors eine Auswirkung auf den Metabolismus der Kartoffelpflanze hat. Es konnten lediglich Tendenzen zu einer stärkeren Akkumulation von Stärke in Knollen

und Blättern beobachtet werden. Sofern Änderungen bei der photosynthetischen Leistungsfähigkeit oder der Stärkesyntheserate bestehen sollten, sind diese wahrscheinlich zu gering, um sie mit den gewählten Methoden nachzuweisen. Das trifft auch für die Gehalte an ATP, ADP und ADP-Glukose zu, mit Ausnahme des ATP Gehalts in Linien 37 und 44, welcher dort signifikant höher war als im WT.

3.1.7 Weiterführende Untersuchungen der B33-ATase2-Überexprimierern

3.1.7.1 Zuckergehalte in Blättern

Genexpression unter der Kontrolle des B33-Patatin-Promotors findet nahezu ausschließlich in Knollen statt (Rocha-Sosa, 1989). So sollten Auswirkungen der ATase2-Überexpression auf den Blattmetabolismus höchstens indirekt erfolgen. Zur Überprüfung möglicher Effekte wurden die Gehalte an Glukose, Fruktose und Saccharose daher auch in Blättern untersucht (s. 2.5.1).

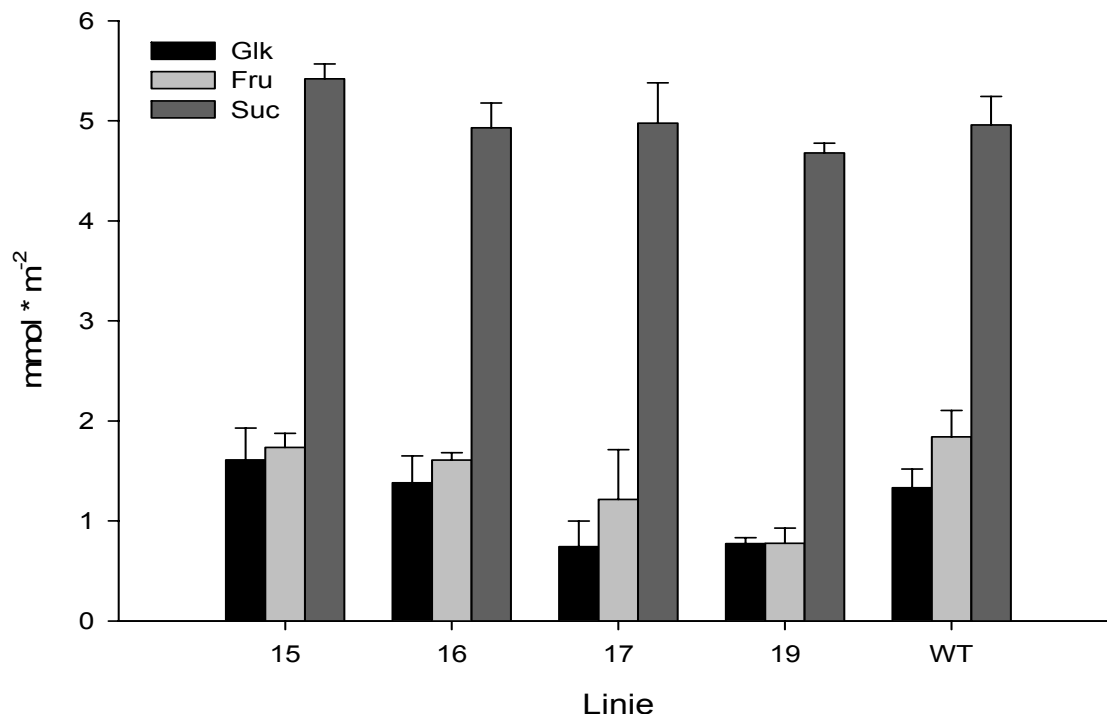


Abbildung 26: Zuckergehalte von Blättern in mmol pro m² Blattfläche. 15-19: Nummerierung der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen. WT: Wildtyp; Glk, Glukose; Fru, Fruktose; Suc, Saccharose. Die Werte sind Mittelwerte von n = 4 Einzelmessungen ± Standardfehler.

Die Glukosekonzentration lag in der dargestellten Ernte (Abb. 26) zwischen 0,5 und 1,5 mmol pro m² Blattfläche, die Fruktosekonzentration zwischen 0,8 mmol und 1,8 mmol und die Saccharosekonzentration bei ca. 5 mmol pro m² Blattfläche. Wie erwartet konnten im Vergleich zum WT keine veränderten Zuckergehalte in Blättern festgestellt werden.

3.1.7.2 Zuckergehalte in Kartoffelknollen

Da der B33-Patatin-Promotor fast ausschließlich in Knollen aktiv ist (Rocha-Sosa, 1989), wurden deren Zuckergehalte bestimmt (s. Abb. 27; s. 2.5.1). Da in Knollen generell wenig Fruktose vorhanden ist, wurde auch in dieser Abbildung auf eine Darstellung der Fruktosekonzentration verzichtet.

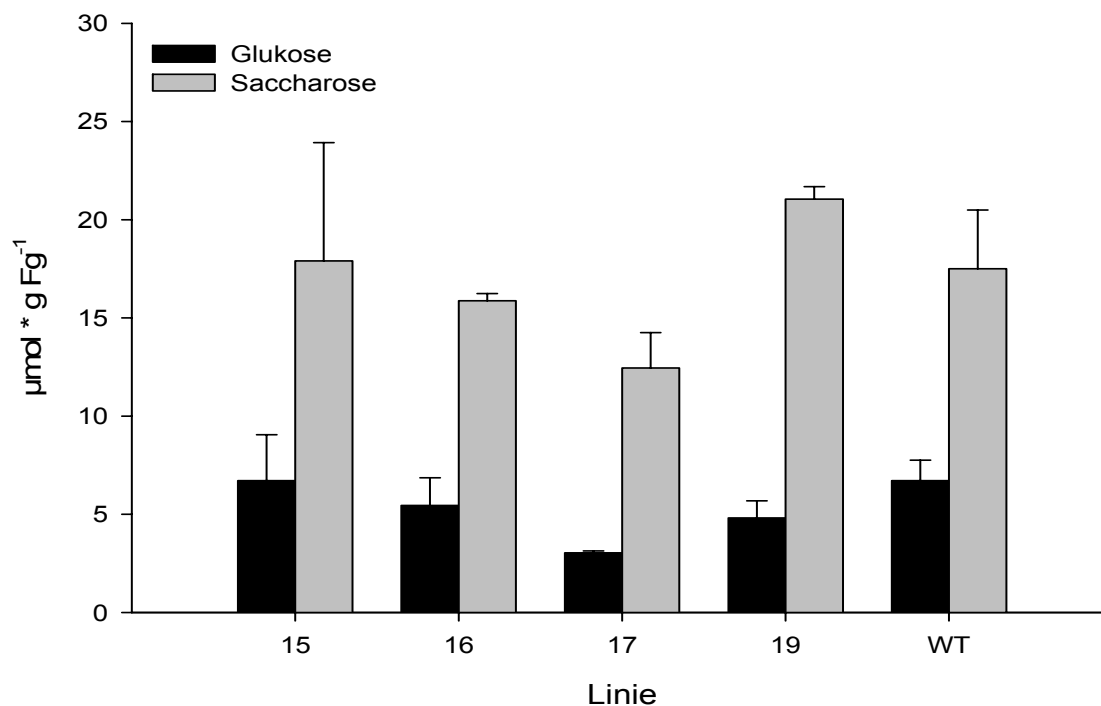


Abbildung 27: Zuckergehalt in Kartoffelknollen in µmol pro g Frischgewicht (Fg). 15-19: Nummerierung der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von n = 4 Einzelmessungen ± Standardfehler.

Wie aus der Abbildung 27 hervorgeht, waren die Glukose- und Saccharosekonzentrationen ähnlich denen des WT. Die Glukosekonzentrationen lagen bei ca. 5 µmol pro g Frischgewicht, die Saccharosekonzentrationen bei ca. 15

$\mu\text{mol pro g}$ Frischgewicht. Eine Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des B33-Promotors scheint also keine Auswirkungen auf die Pools an löslichen Zuckern in der Knolle zu haben.

3.1.7.3 Gehalte von F6P und G6P in Kartoffelknollen

Auch in den B33-ATase2-Überexprimierern wurden die Konzentrationen an den phosphorylierten Intermediaten F6P und G6P ermittelt (s. 2.5.3). Diese sind in Abbildung 28 dargestellt.

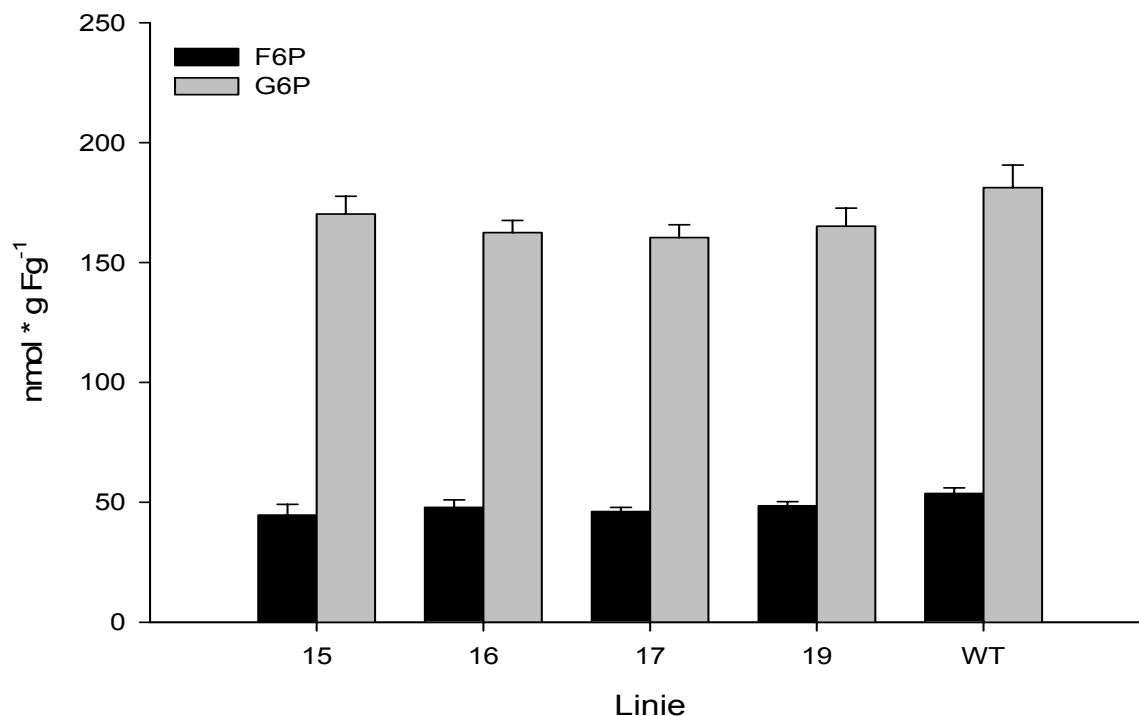


Abbildung 28: F6P- und G6P-Gehalte in Knollen in nmol pro g Frischgewicht (Fg). 15-19: Nummerierung der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Die Abbildung zeigt sehr deutlich, dass die transgenen Linien mit dem WT vergleichbare Konzentrationen an F6P und G6P in ihren Knollen besaßen. So lagen die F6P-Konzentrationen bei ca. 45 nmol pro g Frischgewicht und die G6P-Konzentrationen bei ca. 165 nmol pro g Frischgewicht. Diese Werte stimmen der Größenordnung nach mit den Messungen an den 35S-ATase2-Überexprimierern (s. 3.1.6.3) sowie mit Literaturdaten überein (Tiessen et al., 2002; Zhang et al., 2008).

3.1.7.4 Stärkegehalte in Kartoffelknollen

Auch bei den Untersuchungen an den B33-ATase2-Überexprimierern lag das Hauptaugenmerk auf dem Stärkegehalt von Knollen und dem Knollenertrag pro Pflanze. Ein Vergleich der Stärkegehalte der transgenen Linien und des WT ist in Abbildung 29 dargestellt.

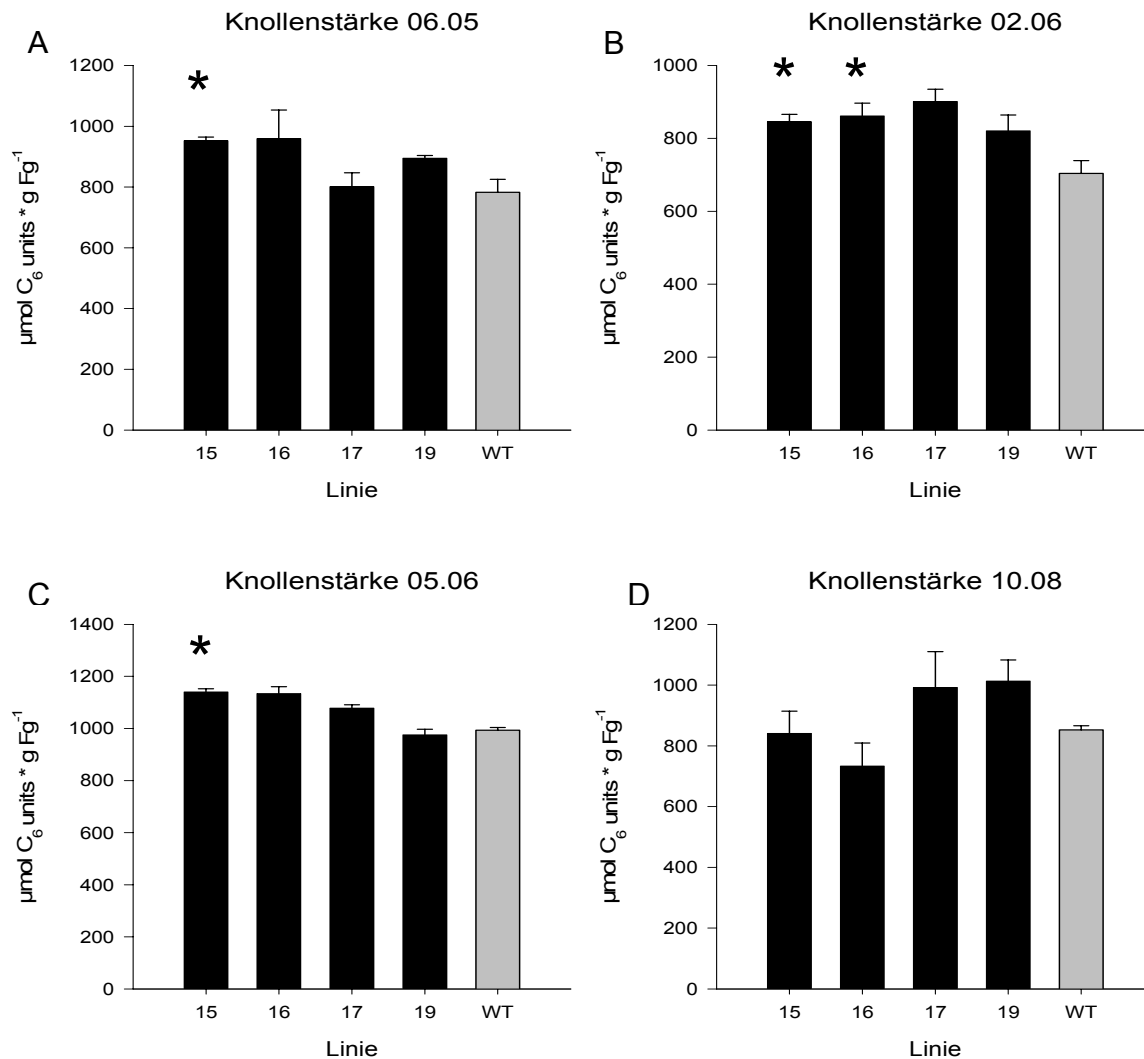


Abbildung 29: Stärkegehalte von Kartoffelknollen pro Pflanze in µmol C₆ units pro g Frischgewicht (Fg). 15-19: Nummerierung der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT, Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. A-D, siehe Text

Da beim Stärkegehalt von Knollen der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen bei den einzelnen Ernten im Vergleich zum WT

unterschiedlich starke Änderungen ermittelt werden konnten, enthält auch die Abbildung 29 mehrere Ernten (Abb. 29 A bis D). Generell beliefen sich die Stärkegehalte in Knollen des WT auf Werte zwischen 700 und 1000 $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht, was mit Literaturdaten aber auch mit anderen Ernten (vgl. 3.1.6.4; Tiessen et al., 2002; Zhang et al., 2008) der Größenordnung nach übereinstimmte.

Für diese Untersuchungen (s. 2.5.2) wurden wie auch unter 3.1.6.4 dargestellt zwölf Wochen alte Kartoffelpflanzen genutzt.

Die Diagramme zeigen, dass durch Überexpression der ATase2 in Knollen keine eindeutigen Änderungen in deren Stärkegehalt erzielt werden konnten. Lediglich eine Tendenz zu höheren Stärkekonzentrationen in Knollen ließ sich feststellen. Diese Beobachtung wurde mit $p < 0,05$ signifikant gesteigerten Stärkegehalten in der Linie 15 untermauert, die im Juni 2005 (A), im Februar 2006 (B) und im Mai 2006 (C) höhere Stärkegehalte zeigte als der korrespondierende WT. Diese Steigerungen beliefen sich im Vergleich zum WT auf 22 % im Juni 2005 (A), auf 20% im Februar (B) und auf 15 % im Mai 2006 (C).

Darüber hinaus zeigte auch Linie 16 im Februar 2006 einen um 22 % signifikant gesteigerten Stärkegehalt im Vergleich zum WT.

3.1.7.5 Knollenertrag pro Pflanze

Beim Knollenertrag der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen konnten eindeutiger Ergebnisse als beim Stärkegehalt von Knollen ermittelt werden (Abb. 30 A bis D). Wie aus der Abbildung 30 ersichtlich ist, konnten bei allen dargestellten Ernten mit $p < 0,05$ signifikante Verringerungen im Knollenertrag pro Pflanze beobachtet werden. In der Ernte vom Juni 2005 (A) ergab sich bei Linie 16 eine signifikante Knollenertragsverringerung von 30 %. In der Ernte vom Februar 2006 (B) konnte ein signifikanter Rückgang im Knollenertrag von 46 % (Linie 16) und 34 % (Linie 17) beobachtet werden. Bei der Ernte vom Mai 2006 (C) wiesen sogar alle Linien signifikant geringere Knollenerträge auf. Sie lagen bei Linie 15 13 %, bei Linie 16 29 %, bei Linie 17 36 % und bei Linie 19 21 % niedriger als beim WT. Die Ernte vom Oktober 2008 (D) wies ebenfalls signifikante Änderungen im Knollenertrag auf. So bildete Linie 15 34 % und Linie 17 20 % weniger Knollen als der korrespondierende WT.

Der WT bildete bei allen dargestellten Ernten zwischen 110 g und 170 g Knollen, was in etwa auch bei anderen Ernten gemessen wurde (s. 3.1.6.5).

Die Pflanzen, welche die ATase2 unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimieren, bilden demnach tendenziell weniger Knollenmasse pro Pflanze aus als die Wildtyppflanzen.

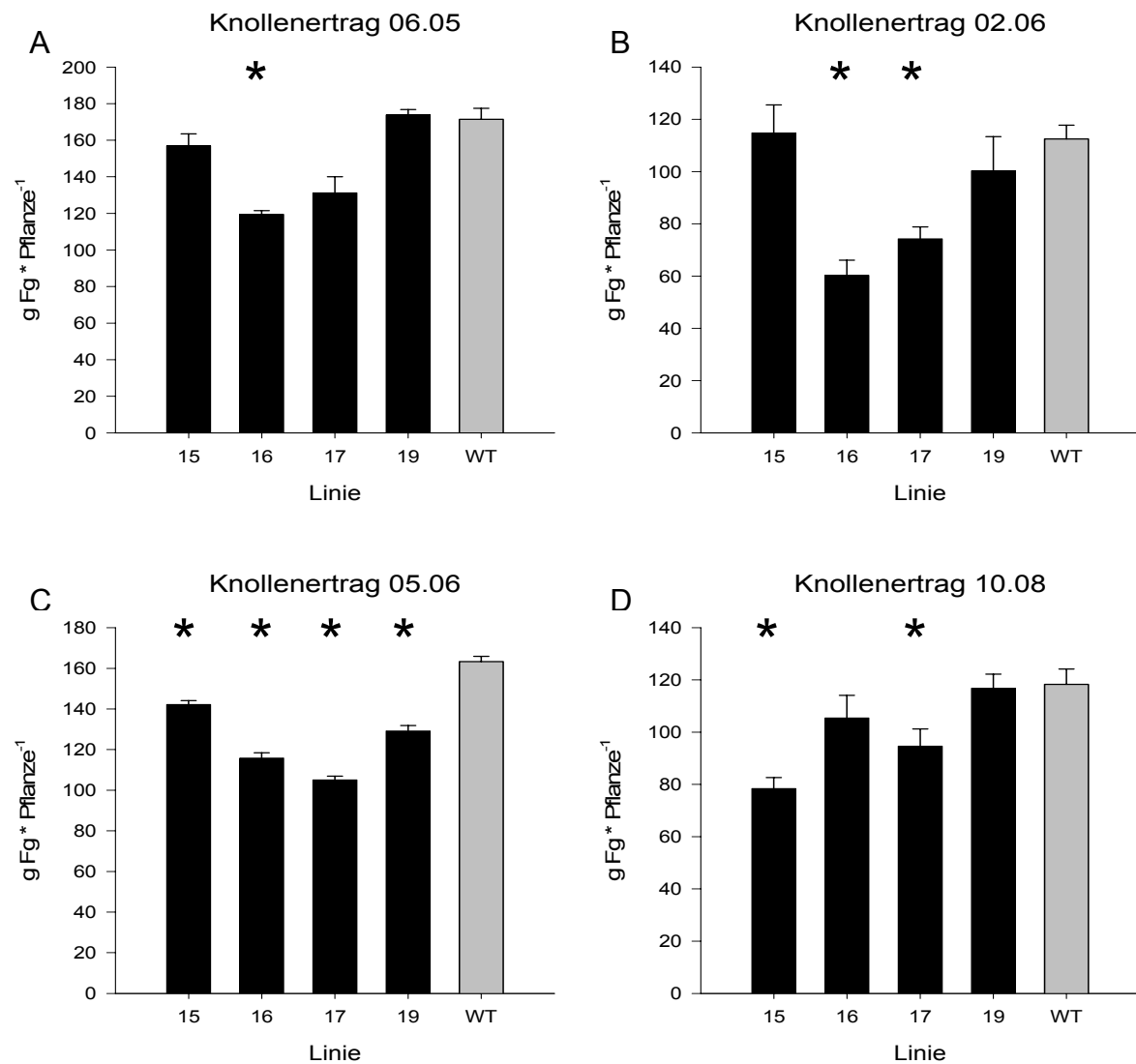


Abbildung 30: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze. 15-19: Nummerierung der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. A-D, siehe Text

3.1.7.6 Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze

Für die Kartoffelpflanzen, welche die ATase2 unter der Kontrolle des B33-Promotors exprimieren wurde, wie bereits für die 35S-ATase2-Überexprimierer, der Gesamtstärkeertrag pro Pflanze errechnet (Abb. 31 A bis D).

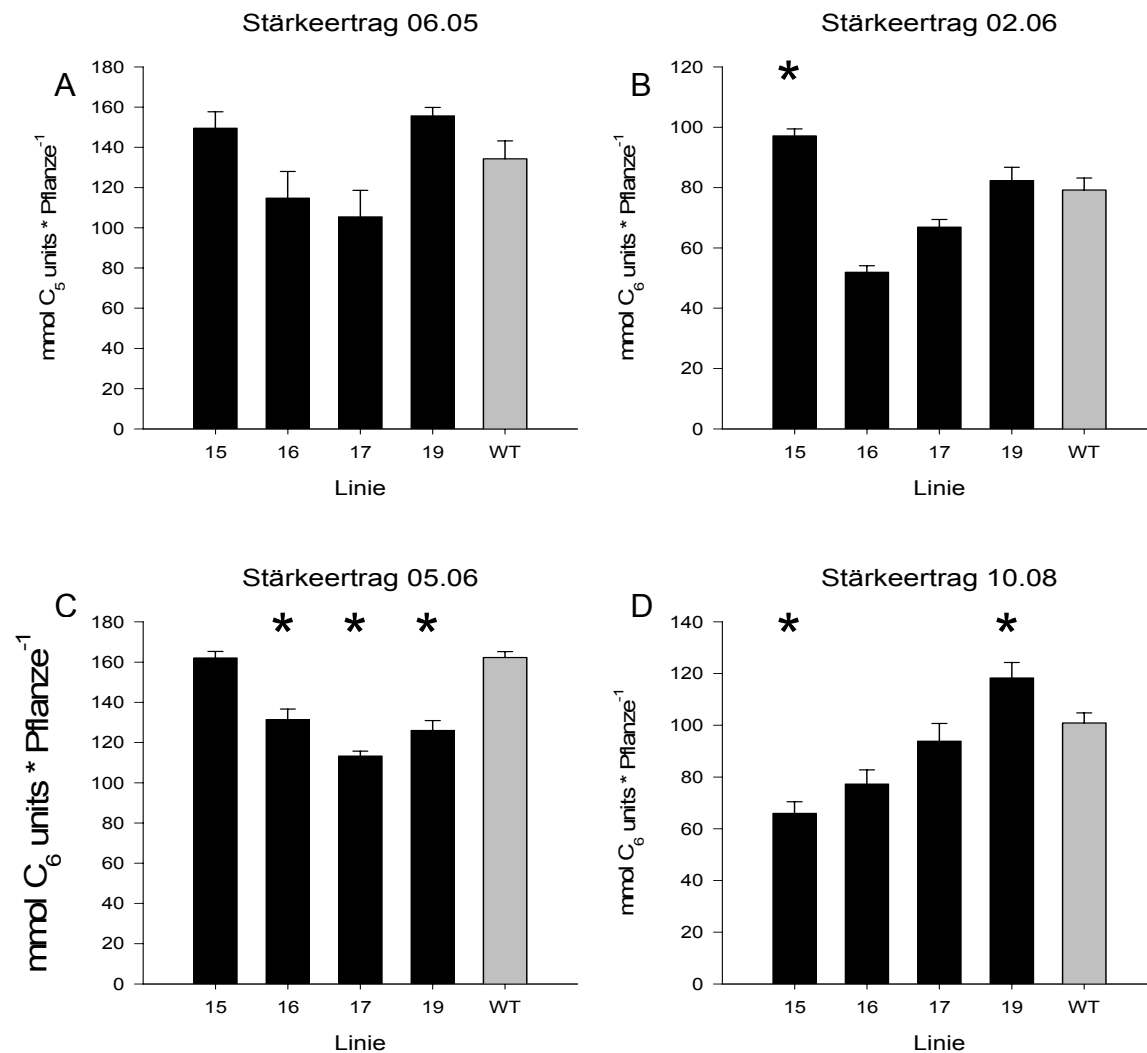


Abbildung 31: Stärkeertrag von Knollen in mmol C₆ units pro Pflanze. 15-19: Nummerierung der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. A-D, siehe Text

Wie aus den Diagrammen ersichtlich ist, wirkt sich der tendenziell geringere Knollenertrag der transgenen Pflanzen negativ auf den Stärkeertrag pro Pflanze aus. Nur in zwei Linien ergab sich ein signifikant gesteigerter Stärkeertrag, und zwar für Linie 15 bei der Ernte vom Februar 2006 (B) und für Linie 19 bei der Ernte vom Oktober 2008 (D), in welcher Linie 15 einen signifikant geringeren Stärkeertrag

zeigte. In dieser Ernte war der Stärkeertrag der Linie 15 im Vergleich zum WT um 35 % niedriger.

In der Ernte vom Juni 2005 (A) konnten keine signifikanten Änderungen im Stärkeertrag festgestellt werden, wohingegen bei der Ernte vom Mai 2006 drei von vier transgenen Pflanzen eine Verringerung zeigten (C). Der Stärkeertrag pro Pflanze war im Mai 2006 bei Linie 16 um 19 %, bei Linie 17 um 30 % und bei Linie 19 um 22 % geringer als beim WT.

Die Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des B33-Promotors bewirkte demnach tendenziell eine Verringerung des Stärkeertrags von Knollen pro Pflanze.

3.1.7.7 Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile

In Abbildung 32 sind die Gewichte der grünen oberirdischen Pflanzenteile von vier verschiedenen Ernten dargestellt. In diesen Ernten waren die einzigen signifikanten Änderungen negativ, d.h. die transgenen Pflanzen waren insgesamt kleiner. Besonders bei der Ernte vom Februar 2006 (B) zeigten fast alle transgenen Linien ein im Vergleich zum WT signifikant verringertes Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile. Das Pflanzengewicht lag bei Linie 15 um 27 % niedriger als im WT, wobei der Standardfehler bei dieser Linie sehr hoch war. Linie 16 zeigte 23 %, Linie 17 15 % und Linie 19 19 % weniger Gewicht bei den grünen Pflanzenteilen als der WT. Bei den anderen dargestellten Ernten (A, C und D) wies ausschließlich Linie 15 eine signifikante Verringerung des Pflanzengewichts auf. Das Pflanzengewicht lag in der Ernte vom Juni 2005 (A) um 9 %, in der Ernte vom Mai 2006 (C) um 5 % und in der Ernte vom Oktober 2008 (D) um 35 % niedriger als beim WT.

Somit zeigt lediglich die Linie 15 bei allen dargestellten Ernten ein signifikant geringeres Gewicht der grünen oberirdischen Pflanzenteile.

Bei den transgenen Linien konnte somit wieder nur eine Tendenz beobachtet werden weniger grüne Pflanzenteile zu bilden als der WT, da die Bewertung nur einer einzelnen Linie nicht ausschlaggebend sein darf.

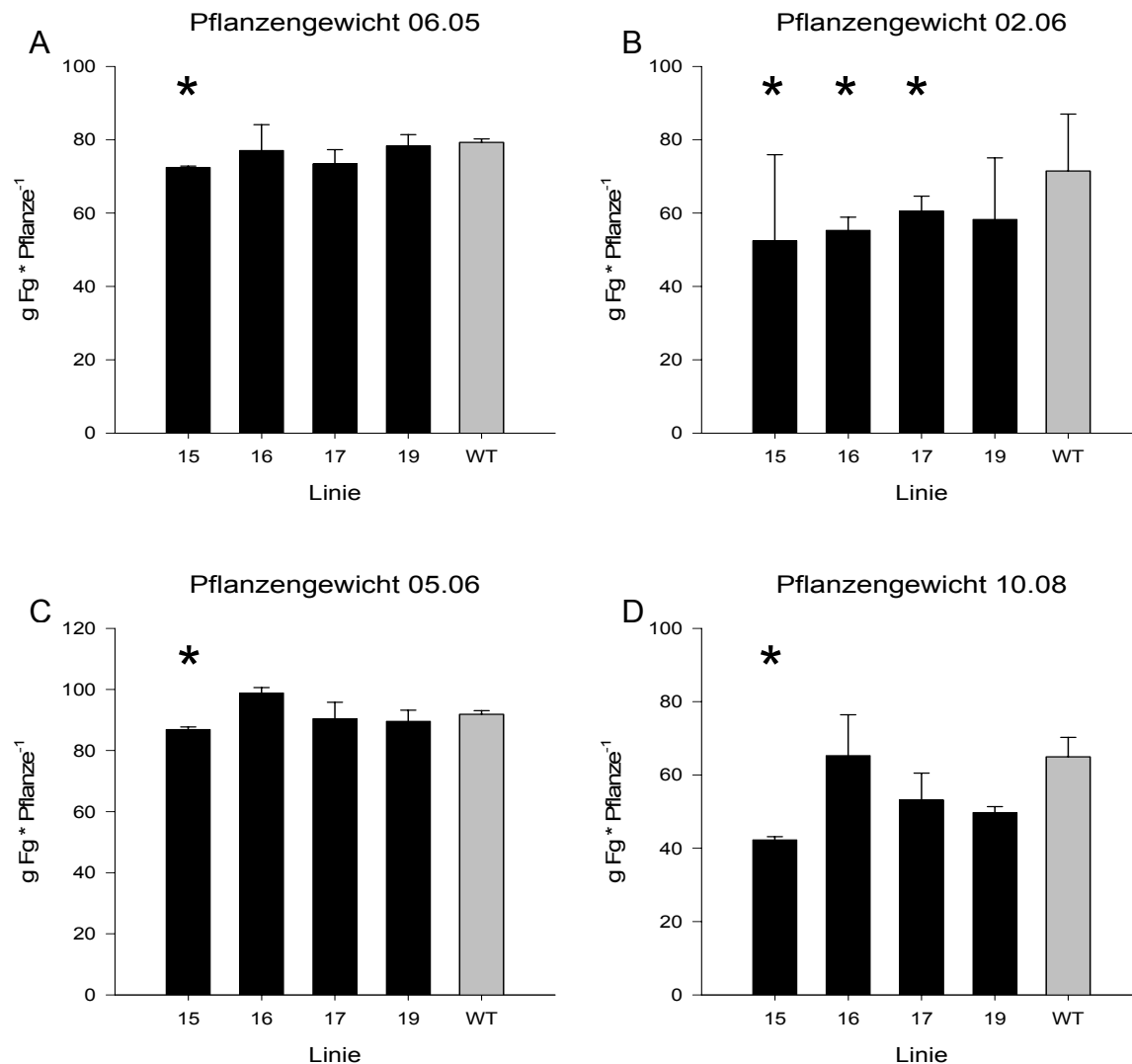


Abbildung 32: Gewichte der grünen oberirdischen Pflanzenteile in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze. 15-19: Nummerierung der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. A-D, siehe Text

3.1.7.8 Fazit

Die dargestellten Ergebnisse lassen, wie für die Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors, auch für die Überexpression unter der Kontrolle des B33-Promotors keine eindeutige Aussage zu den Auswirkungen auf die Pflanze zu. Auch bei den B33-ATase2-Überexprimierern lassen sich allenfalls Tendenzen feststellen, mehr Stärke in Knollen zu akkumulieren. Im Gegensatz zu den 35S-ATase2-Überexprimierern zeigen die B33-ATase2-Überexprimierer eine Tendenz dazu, weniger Knollenmasse pro Pflanze auszubilden, wodurch sich ein tendenziell geringerer Stärkeertrag pro Pflanze ergibt. Auch scheinen die grünen Pflanzenteile tendenziell weniger zu wiegen als die des WT.

3.2 Untersuchungen an GPT/NTT-Überexprimierern

3.2.1 Ergebnisse aus dem Gewächshaus

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Durchführung und die Analyse zweier Freilandexperimente mit Kartoffelpflanzen, welche den *ANTT1* und den *PsGPT* unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimieren. Bei diesen Untersuchungen lag das Hauptaugenmerk ebenfalls auf dem Stärkegehalt von Knollen und dem Knollenertrag. Die Pflanzen wurden bereits im Gewächshaus eingehend analysiert und zeigten sowohl einen erhöhten Stärkegehalt als auch einen gesteigerten Knollenertrag. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden bereits 2008 veröffentlicht (Zhang et al., 2008) und unter 1.1.5 kurz zusammengefasst. Die untersuchten Linien waren dabei BGA24, BGA31 und BGA32.

Während der Analyse des ersten Freilandexperiments traten jedoch Probleme auf, die weitere Untersuchungen im Gewächshaus nötig machten. Bestandteil dieser Untersuchungen war eine entwicklungsabhängige Analyse des Stärkegehaltes von Knollen und des Knollenertrags, bei der auch die Zucker- und Stärkekonzentrationen in Blättern bestimmt wurden. Außerdem musste die Masse von unterirdisch gebildeten Pflanzenteilen, den Wurzeln und Stolonen, ermittelt werden.

Die Darstellung dieser Untersuchungen wird der Beschreibung der Freilandexperimente 2006 und 2007 aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit vorangestellt.

3.2.1.1 Zuckergehalte in Blättern

Die Zuckergehalte von drei verschiedenen Blattetagen wurden entwicklungsabhängig untersucht. Um sicherzustellen, dass die Proben immer aus etwa gleich alten Blättern stammten, wurden die Blattetagen von oben nach unten gezählt und das 30 %-, 50 %- und 70 %-Blatt zur Probennahme ausgewählt. Bei 10 Blattetagen wäre also das dritte, fünfte und siebte voll ausgebildete Blatt ausgehend vom Apikalmeristem untersucht worden.

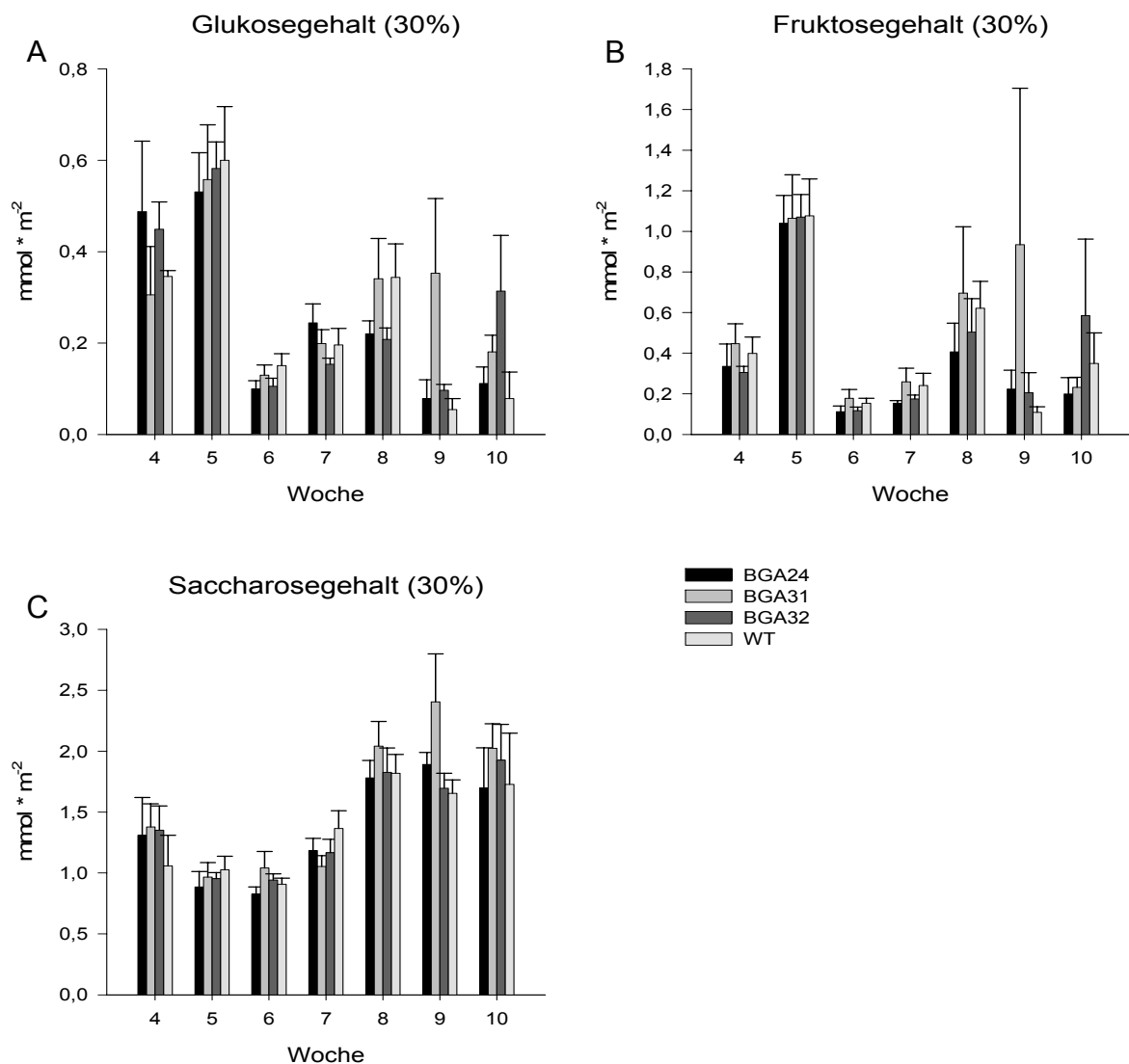


Abbildung 33: Zuckergehalte im 30 %-Blatt in mmol pro m² Blattfläche. A: Glukosegehalte während der Wachstumsphase; B: Fruktosegehalte während der Wachstumsphase; C: Saccharosegehalte während der Wachstumsphase; WT: Wildtyp; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von n = 4 Einzelmessungen ± Standardfehler.

In Abbildung 33 A bis C sind die Gehalte von Glukose, Fruktose und Saccharose pro m^2 Blattfläche für einen Entwicklungszeitraum von 7 Wochen dargestellt. Untersucht wurde dabei ein relativ junges 30 % Blatt.

Die Zuckerkonzentrationen in Blättern waren über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg ähnlich zu denen des WT.

Auffällig war, dass der Glukosegehalt in Woche 4 und 5 nach dem Transfer ins Gewächshaus relativ hoch war ($0,4$ bis $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$), und dann in Woche 6 auf ca. $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$ abfiel. In Woche 7 und 8 stieg die Glukosekonzentration auf ca. $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$ und sank in Woche 9 und 10 wieder auf $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$.

Ähnlich verhielt sich die Konzentration von Fruktose, welche zwischen Woche 4 und 5 von ca. $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$ auf ca. $1 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$ anstieg und dann in Woche 6 auf $0,15 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$ absank. Auch die Fruktosekonzentration erfuhr in Woche 8 ein kleines Zwischenhoch von $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$ und lag dann in der neunten und zehnten Woche bei ca. $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$.

Für die Saccharosekonzentration in Blättern ergab sich ein eher umgekehrtes Bild im Verlauf der Wachstumsperiode. Der Saccharosegehalt lag in Woche 4 bei ca. $1,4 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$, sank in Woche 5 und 6 auf ungefähr $1 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$ ab, stieg dann bis zur achten Woche auf ca. $1,8 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$ und blieb von da an bis zur zehnten Woche konstant hoch.

Die Untersuchungen am 50 %-Blatt (s. Abb. 34 A-C) spiegelten im Wesentlichen die Untersuchungsergebnisse des 30 %-Blatts wieder. Auch im 50 %-Blatt waren keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen Linien und WT erkennbar. Die Konzentrationsänderungen im Verlauf der Wachstumsphase waren innerhalb der Fehlergrenzen ebenfalls mit denen des WT vergleichbar.

Gleiches galt für die Untersuchungen des 70 %-Blatts (Abb. 35 A bis C), bei welchem sich im Verlauf der Wachstumsphase exakt die gleichen Änderungen in den Gehalten von Glukose, Fruktose und Saccharose zeigten. Die einzelnen Konzentrationen der Zucker lagen in etwa auf demselben Niveau wie im 30 %- bzw. 50 %-Blatt, bis auf die Saccharosekonzentration, welche im 70 %-Blatt den geringsten Wert zeigte. Beim Vergleich der Zuckergehalte in den drei Blattetagen zeigt Saccharose mit zunehmendem Blattalter geringere Gehalte. So lag der Saccharosegehalt im 30 %-Blatt nach 10 Wochen Wachstum im Gewächshaus bei ca. $1,8 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$, im 50 %-Blatt bei ca. $1,4 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$ und im ältesten 70-% Blatt bei nur noch ca. $1,2 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}$.

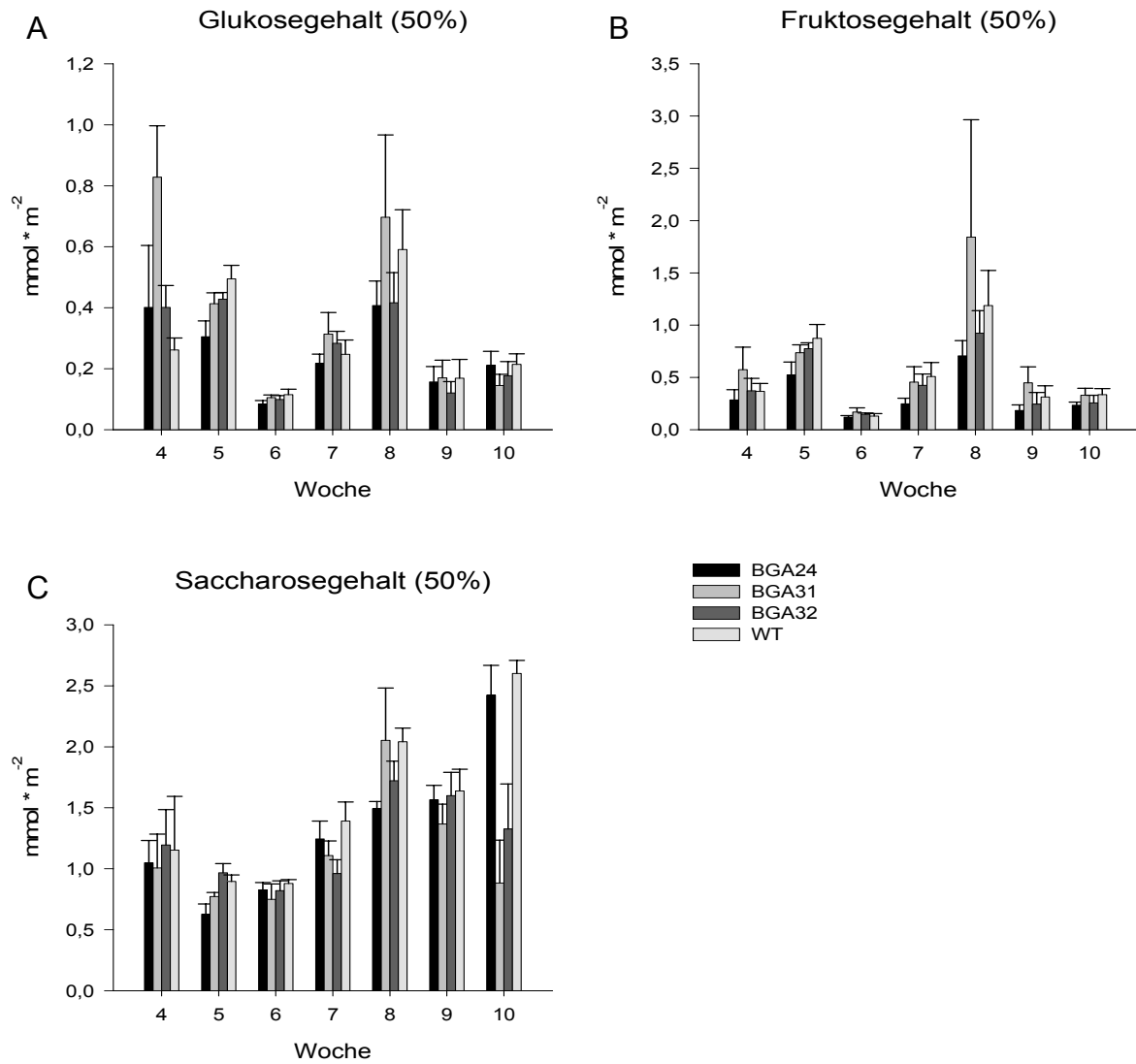


Abbildung 34: Zuckergehalte im 50%-Blatt in mmol pro m^2 Blattfläche. A: Glukosegehalte während der Wachstumsphase; B: Fruktosegehalte während der Wachstumsphase; C: Saccharosegehalte während der Wachstumsphase. WT: Wildtyp; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von $n = 4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

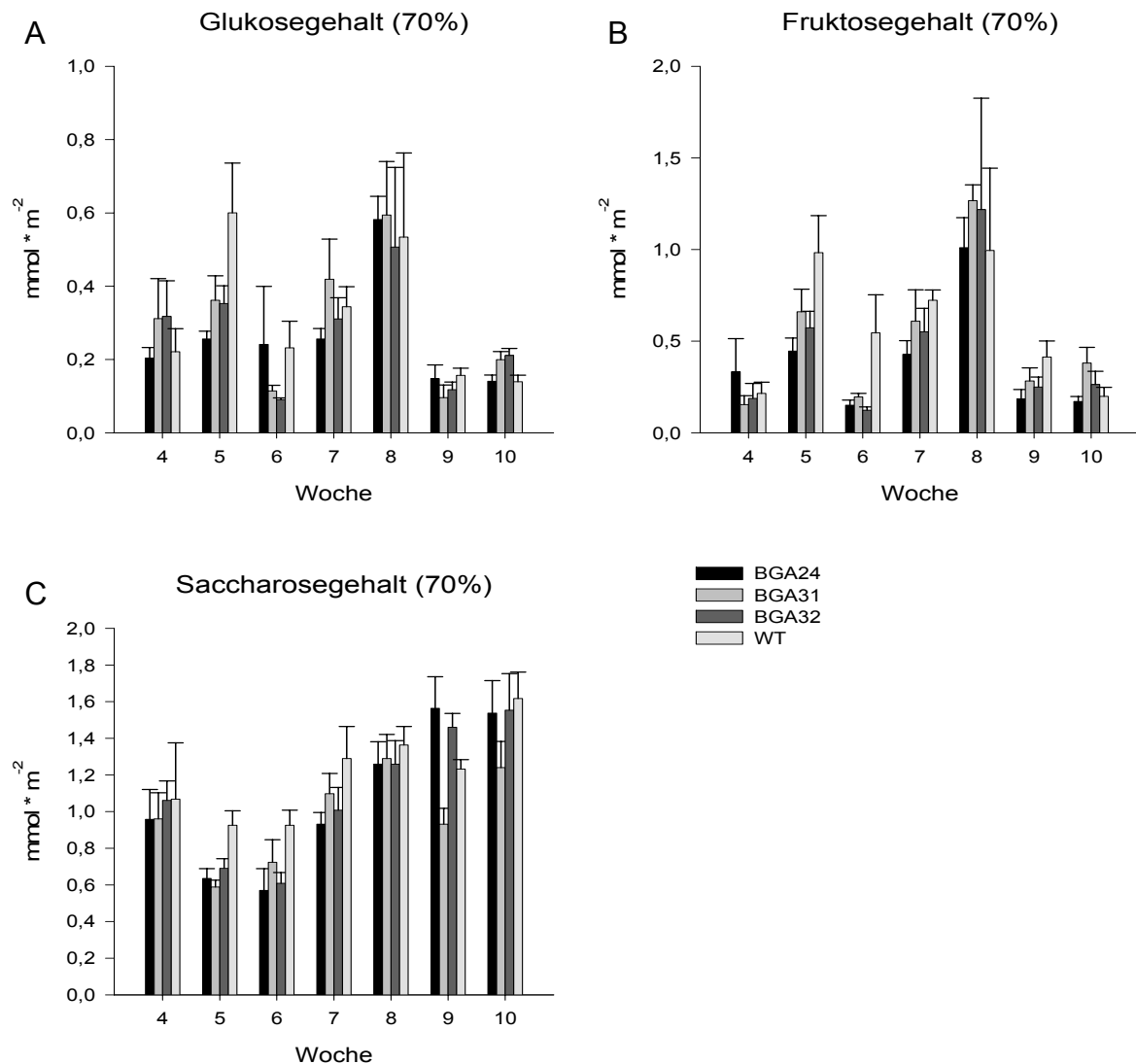


Abbildung 35: Zuckergehalte in 70%-Blättern in mmol pro m^2 Blattfläche. A: Glukosegehalte während der Wachstumsphase; B: Fruktosegehalte während der Wachstumsphase; C: Saccharosegehalte während der Wachstumsphase. WT: Wildtyp; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von $n = 4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Insgesamt ergaben diese Untersuchungen, dass sich auch im Verlauf der Wachstumsphase keine Änderungen im Gehalt der Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose von Blättern im Vergleich zum WT einstellten. Eine Überexpression des NTT und des GPT unter Kontrolle des B33-Promotors in Kartoffelknollen scheint also keine Auswirkungen auf die Zuckergehalte im Blatt zu haben.

3.2.1.2 Stärkegehalte in Blättern

Parallel zur Messung der Gehalte von Glukose, Fruktose und Saccharose wurde eine Stärkebestimmung in Blättern durchgeführt (s. 2.5.2). Die Messergebnisse finden sich in nachfolgender Abbildung (Abb. 36 A-C).

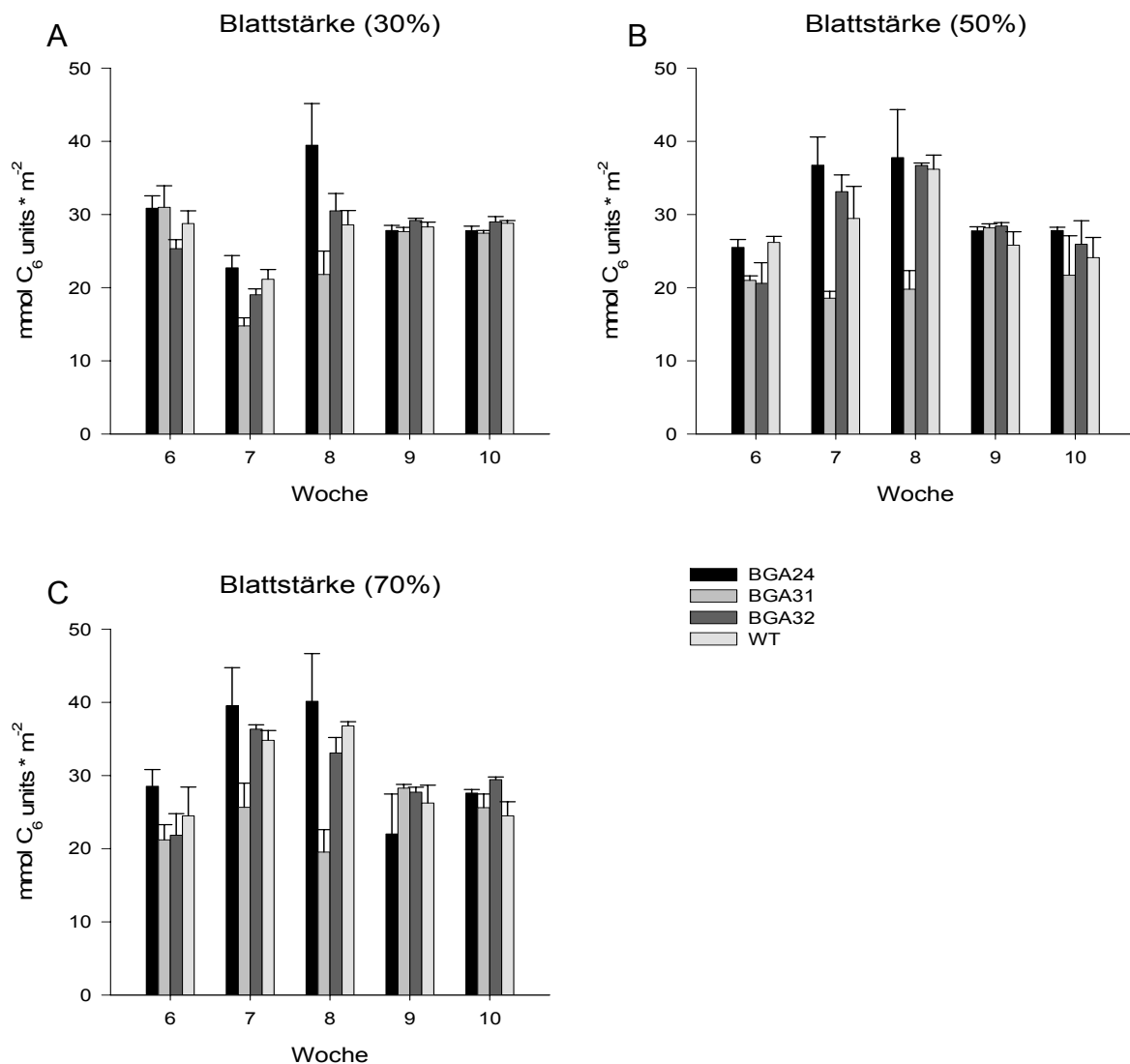


Abbildung 36: Stärkegehalte in Blättern während der Wachstumsphase in $\text{mmol C}_6 \text{ units pro m}^2$. A: Stärkegehalte im 30%-Blatt; B: Stärkegehalte im 50%-Blatt; C: Stärkegehalte im 70%-Blatt; WT: Wildtyp; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von $n = 4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, waren die Stärkegehalte der transgenen Pflanzen pro m^2 Blattfläche im Verlauf der Pflanzenentwicklung ebenfalls mit denen des WT vergleichbar. Dies galt sowohl für das 30 %-Blatt als auch für das 50 %- und 70 %-Blatt. Dabei lagen die Gehalte an Stärke im Blatt während des untersuchten

Entwicklungszeitraums in etwa bei 30 mmol C₆ units pro m² Blattfläche, was mit anderen Ernten und Literaturdaten übereinstimmt (s. 3.1.6.7; Tiessen et al., 2002; Zhang et al., 2008).

3.2.1.3 Knollenertrag pro Pflanze

In diesem entwicklungsabhängigen Experiment wurde ebenfalls der Knollenertrag pro Pflanze bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 37 dargestellt. Auch wenn bereits ein signifikant erhöhter Knollenertrag nachgewiesen werden konnte (Zhang et al., 2008), war noch nicht geklärt, in welcher Entwicklungsphase sich dieser einstellt.

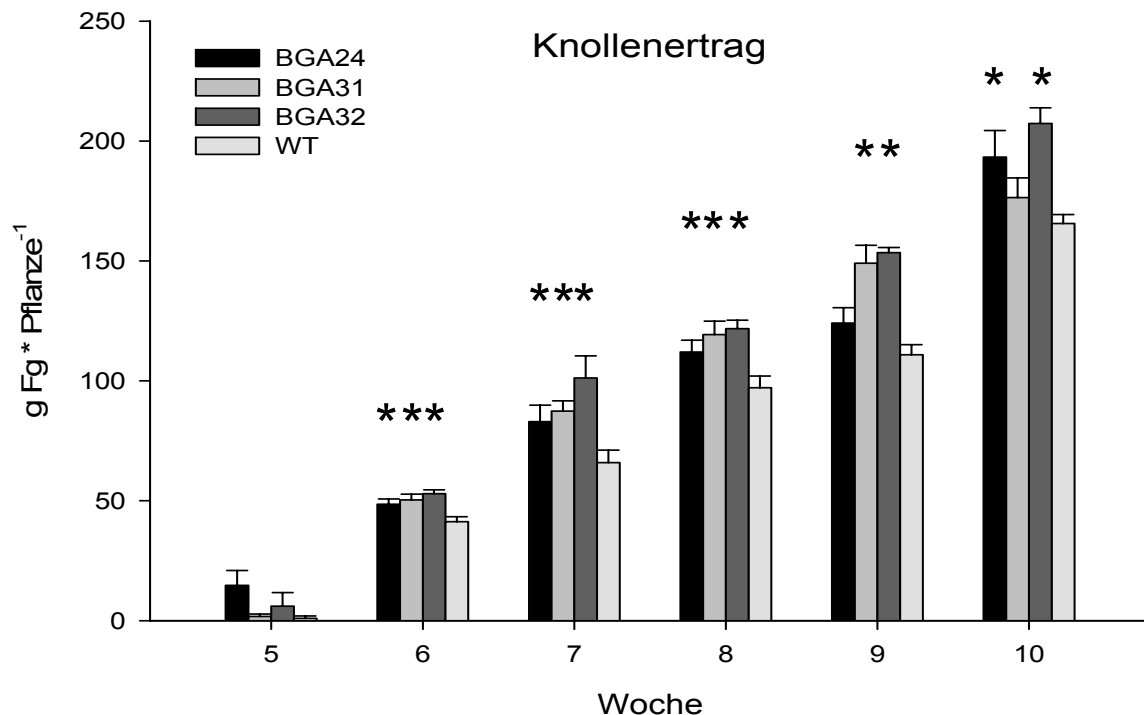


Abbildung 37: Knollenertrag der B33-GPT/NTT-Überexprimierer in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze über einen Untersuchungszeitraum von 6 Wochen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von n = 5 Einzelmessungen ± Standardfehler. * = signifikant mit p < 0,05

Wie aus der Abbildung ersichtlich zeigten die Kartoffelpflanzen bereits nach 5 Wochen die ersten Knollen. Der Knollenertrag des WT nahm von da an stetig zu, bis sich nach 10 Wochen ein Knollenertrag von ca. 150 g Frischgewicht einstellte.

Nach 5 Wochen war zu erkennen, dass die transgenen Pflanzen bereits mehr Knollenmasse besaßen als der WT. Dieser Trend steigerte sich, bis nach 10 Wochen der Knollenertrag pro Pflanze bei Linie BGA24 um 17 %, bei Linie BGA31 um 7 % und bei Linie BGA32 sogar um 25 % höher lag als beim WT.

Die transgenen Pflanzen zeigten also über die Wachstumsphase hinweg einen signifikant erhöhten Knollenertrag pro Pflanze, welcher bereits zu Beginn der Knollenbildung höher war als beim korrespondierenden WT.

3.2.1.4 Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze

Auch der Stärkegehalt in Knollen lag bei den transgenen Pflanzen höher als beim WT. Die entsprechenden Daten wurden bereits veröffentlicht (Zhang et al., 2008), weshalb hier lediglich der Stärkertrag von Knollen pro Pflanze gezeigt wird, welcher sich durch Multiplikation des Stärkegehaltes mit dem Knollenertrag pro Pflanze ergibt (s. Abb. 38).

Da erst nach der Ausbildung von einer hinreichenden Menge an Knollen Proben für die Stärkebestimmung genommen werden konnten, sind lediglich die Stärkeerträge pro Pflanze ab der sechsten Woche nach dem Transfer ins Gewächshaus dargestellt.

Wie aus der Abbildung entnommen werden kann, wiesen die transgenen Kartoffelpflanzen bereits nach 7 Wochen im Gewächshaus einen signifikant höheren Stärkertrag auf als der WT. Er lag nach 10 Wochen bei der Linie BGA24 um 24 %, bei Linie BGA31 um 12 % und bei Linie BGA32 um 43 % höher als beim WT zur gleichen Zeit.

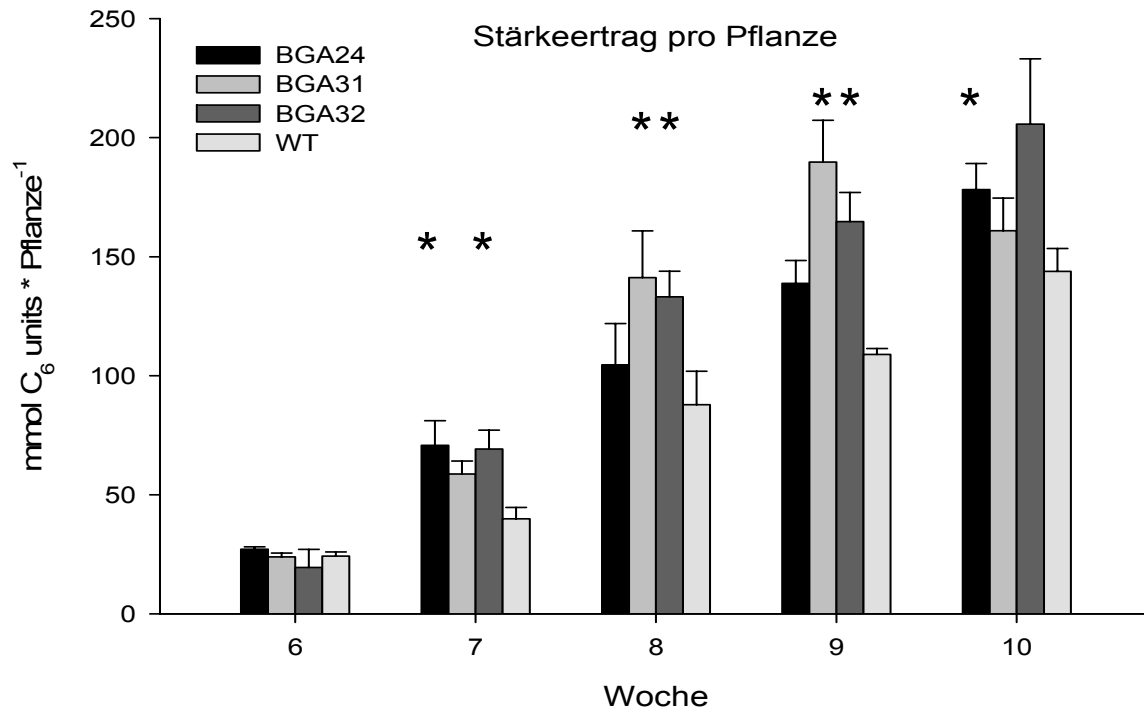


Abbildung 38: Stärkeertrag von Kartoffelknollen der B33-GPT/NTT-Überexprimierer in mmol C₆ units pro Pflanze über einen Untersuchungszeitraum von 5 Wochen. WT: Wildtyp; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von n = 4 Einzelmessungen ± Standardfehler. * = signifikant mit p < 0,05

Schon nach 7 Wochen im Gewächshaus zeigten die transgenen Pflanzen also einen gesteigerten Stärkeertrag pro Pflanze, welcher auch zu allen anderen Untersuchungszeitpunkten über dem Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze des WT lag.

3.2.1.5 Messungen des Verhältnisses von F_v zu F_m und des Gesamtchlorophyllgehalts

Wie unter 3.2.1 angesprochen, zeigten sich bei der Analyse des Freisetzungsvorgangs im Jahr 2006 (s. 3.2.2) Unstimmigkeiten, die eine erneute Untersuchung der transgenen Pflanzen im Gewächshaus nötig machten. So bildeten die Pflanzen augenscheinlich weniger grüne oberirdische Pflanzenteile und zeigten zudem früher Anzeichen von Seneszenz. Deshalb wurden den Pflanzen im Gewächshaus über fünf Wochen hinweg Blattproben zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts entnommen und das Verhältnis von F_v zu F_m an drei Blatttagen bestimmt (s. 2.5.4 + 2.5.6). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 39 A bis F dargestellt.

Wie aus der Abbildung 39 zu entnehmen ist, fanden sich im Gesamtchlorophyllgehalt keine Unterschiede zwischen transgenen Linien und WT. Der Chlorophyllgehalt war 6 Wochen nach dem Transfer ins Gewächshaus am größten und nahm von da an bis zur Ernte nach 12 Wochen ab. Dies traf sowohl für die 30 %-Blätter als auch für die 50 %- und 70 %-Blätter zu, wobei sich herausstellte, dass die relativ jungen 30 %-Blätter (A) am meisten Chlorophyll pro m^2 Blattfläche enthielten. Bei ihnen lag der Chlorophyllgehalt nach 6 Wochen im Gewächshaus bei ca. $700 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ und sank bis zur elften Woche auf ca. $200 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ ab. Im 50 %-Blatt (B) betrug der Chlorophyllgehalt in der sechsten Woche ungefähr $550 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ und fiel bis zur elften Woche auf ca. $120 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$. Im 70 %-Blatt (C) lag der Chlorophyllgehalt nach sechs Wochen im Gewächshaus bei ca. $500 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ und sank bis zur elften Woche auf ca. $100 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ ab. Der Gehalt von Chlorophyll in Blättern ist typischerweise ein Marker für Seneszenz. Während der Auflösung der Chloroplasten in der Seneszenz wird das in ihnen enthaltene Chlorophyll abgebaut (Quirino et al., 2000).

Die Integrität des Photosystems II (PSII) lässt sich mit Hilfe des Verhältnisses von F_v zu F_m (s. 2.5.6) bestimmen (Krause, 1991). Es gibt Auskunft über die photosynthetische Leistungsfähigkeit der Pflanze. Ebenso wie der Chlorophyllgehalt wurde auch das Verhältnis von F_v zu F_m in drei verschiedenen Blattetagen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 D bis F aufgeführt, aus der ersichtlich ist, dass sich bei den relativ jungen 30 %-Blättern (D) der transgenen Pflanzen eine Reduktion des Verhältnisses von F_v zu F_m früher zeigte als beim WT. Bereits nach sieben Wochen im Gewächshaus zeigte sich bei den transgenen Linien eine Abnahme des Verhältnisses von F_v zu F_m , welche zudem schneller verlief als beim WT (D). Dieses Verhalten ließ sich auch in den 50 %- und 70 %-Blättern erkennen, wenn auch schwächer ausgeprägt.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die transgenen Pflanzen etwas früher seneszent werden als der WT. Die Untersuchungen im Gewächshaus bestätigten demnach die im Freiland beobachtete frühere Seneszenz der Pflanzen.

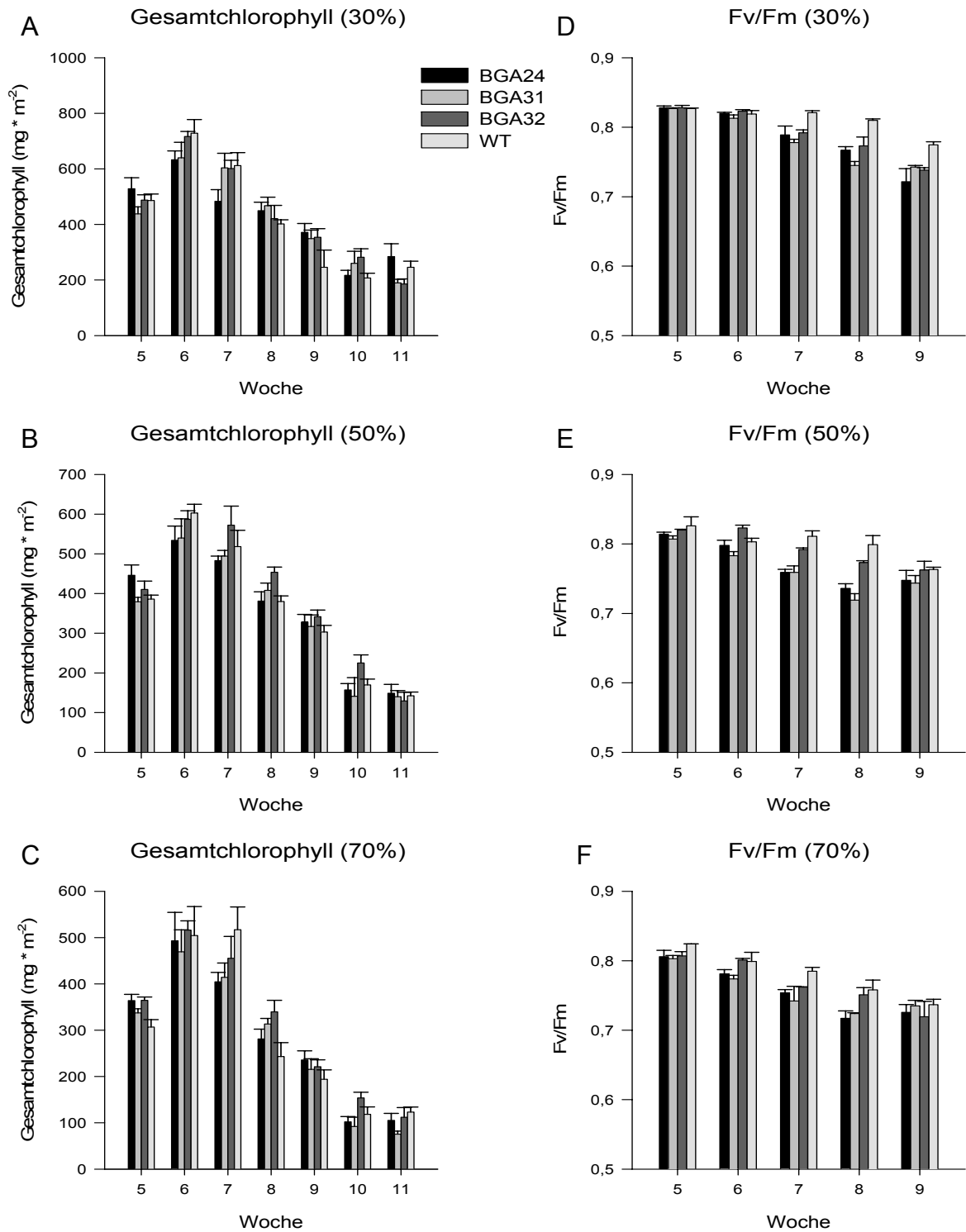


Abbildung 39: Gesamtchlorophyllgehalte in mg pro m² Blattfläche und F_v/F_m-Verhältnisse für einen Untersuchungszeitraum von 7 Wochen. A: Gesamtchlorophyllgehalt im 30 %-Blatt; B: Gesamtchlorophyllgehalt im 50 %-Blatt; C: Gesamtchlorophyllgehalt im 70 %-Blatt; D: F_v/F_m-Verhältnis im 30 %-Blatt; E: F_v/F_m-Verhältnis im 50 %-Blatt; F: F_v/F_m-Verhältnis im 70 %-Blatt. Die Werte sind Mittelwerte von n = 4 Einzelmessungen ± Standardfehler.

3.2.1.6 Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile

Wie bereits unter 3.2.1.5 erwähnt konnte bei den transgenen Linien im Freilandversuch 2006 (s. 3.2.2) eine verminderte Ausbildung der grünen oberirdischen Pflanzenteile beobachtet werden. Auch aus diesem Grund wurden die Pflanzen nochmals im Gewächshaus untersucht, insbesondere im Hinblick auf das Gewicht der grünen Pflanzenteile. Diese Untersuchungsergebnisse sind in Abbildung 40 dargestellt.

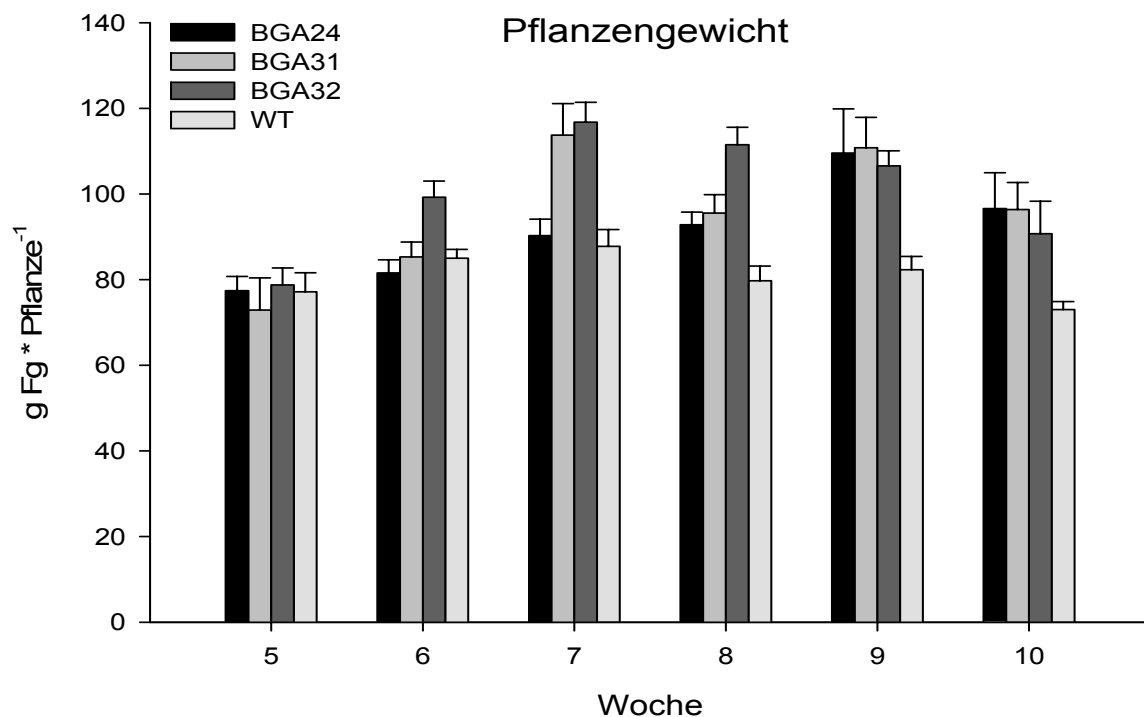


Abbildung 40: Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von n = 5 Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Im Kontrast zu den Beobachtungen im Freiland ließen die transgenen Pflanzen im Gewächshaus keine Wachstumsverzögerungen erkennen sondern wuchsen besser als der WT. Ab der sechsten Woche nach dem Transfer der Pflanzen ins Gewächshaus zeigte zumindest die Linie BGA32 ein erhöhtes Frischgewicht der grünen Pflanzenteile, ebenso Linie BGA31 ab der siebten Woche. Ab der achten Woche bis zum Ende des Untersuchungszeitraums von 10 Wochen zeigten alle transgenen Linien eine Steigerung des Frischgewichts der grünen oberirdischen

Pflanzenteile, und zwar bei Linie BGA24 und BGA31 um 32 % und bei Linie BGA32 um 24 % im Vergleich zum WT.

Ein Rückgang des Pflanzengewichts in der elften Woche geht auf senescente bzw. bereits abgestorbene Blätter zurück, die zum Schutz vor Parasiten entfernt wurden.

3.2.1.7 Trockengewichte der Wurzeln und der Stolone von Kartoffelpflanzen

Um die Ursache des im Freiland geringeren und des im Gewächshaus größeren Frischgewichts der grünen Pflanzenteile der transgenen Linien (s. 3.2.3.5 + 3.2.1.6) zu ergründen, wurde ein Versuch zur Quantifizierung der Wurzelmasse durchgeführt. Dabei wuchsen die Pflanzen auf Tongranulat, welches einmal wöchentlich mit 0,2 % Wuxal[®] gedüngt wurde (s. 2.2.2). Zum Erntezeitpunkt nach 12 Wochen wurde das Tongranulat vorsichtig ausgeschüttelt und die Trockenmasse von Wurzeln und Stolonen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 41 dargestellt.

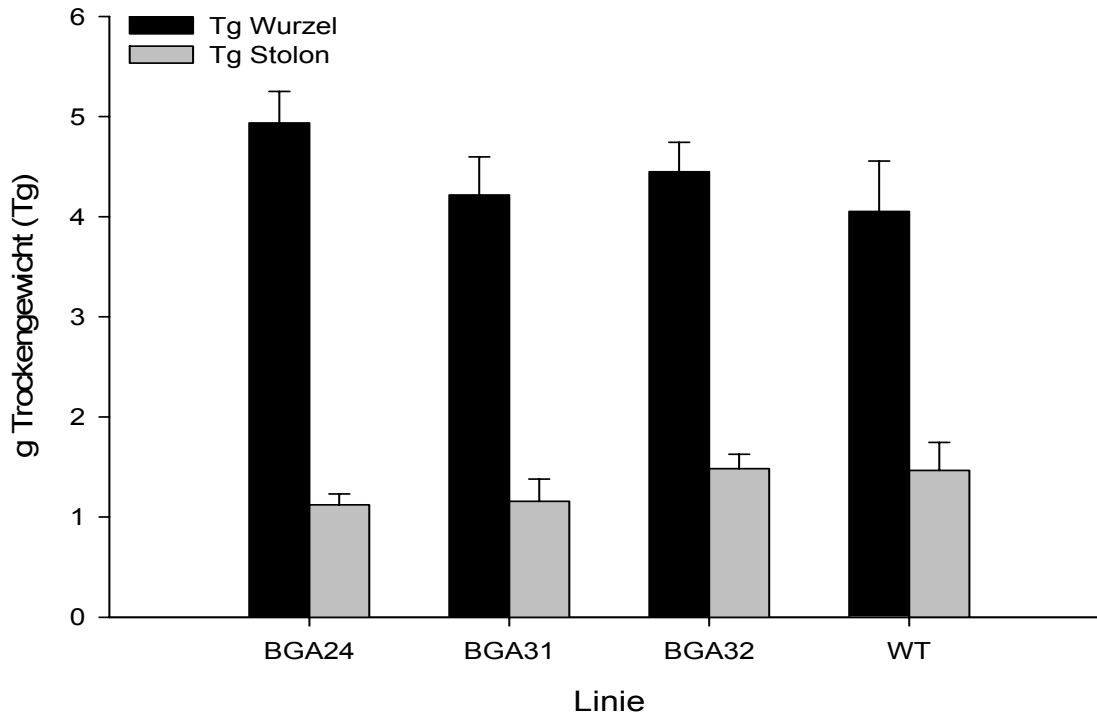


Abbildung 41: Trockengewichte von Wurzeln und Stolonen in g Trockengewicht.(Tg) pro Pflanze. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von n = 6 Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Masse von Stolonen oder Wurzeln gefunden werden.

3.2.1.8 Fazit

Die GPT/NTT-Überexprimierer zeigen im Gewächshaus einen höheren Stärkegehalt in Knollen sowie einen gesteigerten Knollenertrag pro Pflanze. Daraus ergibt sich ein signifikant gesteigerter Stärkeertrag in Knollen pro Pflanze von bis zu 43 % bei Linie BGA32 (s. 3.2.1.4), obwohl die Pflanzen früher seneszent werden und die Seneszenz schneller verläuft als beim WT (s. 3.2.1.5). Trotzdem erreichen die transgenen Pflanzen im Gewächshaus ein höheres Frischgewicht ihrer grünen oberirdischen Pflanzenteile als der WT, was nicht durch ein verbessertes Wurzelwachstum zu erklären ist. Die Gehalte von Glukose, Fruktose und Saccharose in Blättern und Knollen sind durch die Überexpression des GPT und NTT nicht beeinflusst worden, gleiches gilt für die Gehalte von F6P und G6P in Knollen.

Um die Gewächshausanzuchten besser mit den Freilandanzuchten vergleichen zu können, müssten in Zukunft Gewächshausanzuchten in Erdbeeten durchgeführt werden. Außerdem müssen die Versuche zur Ermittlung der Wurzelmasse (s. 2.2.1) mit unterschiedlichen Düngerkonzentrationen durchgeführt werden.

3.2.2 Ergebnisse der Freilandanzuchten im Jahr 2006

Wie bereits unter 1.3 erwähnt wurde, war die Durchführung und Analyse zweier Freisetzungsexperimente in den Jahren 2006 und 2007 ein zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Kartoffelpflanzen, welche den *PsGPT* und *AtNTT1* unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimieren, wurden am MPI für Züchtungsforschung in Köln (Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln) auf einem umzäunten Acker angebaut und nach 22 Wochen Wachstum geerntet. Es sollte untersucht werden, ob sich die bereits veröffentlichten Daten aus dem Gewächshaus (Zhang et al., 2008) im Freiland bestätigen lassen.

3.2.2.1 Feldaufbau im Jahr 2006

In Abbildung 42 ist schematisch der Aufbau des Versuchsfeldes dargestellt. Um mögliche Standortvorteile oder -nachteile durch Randlage oder Lage in der Mitte auszugleichen, wurden die verschiedenen transgenen Linien und der WT gleichmäßig über das Feld verteilt. Dazu wurden 8 Reihen mit je 4 Parzellen angelegt und jede Parzelle mit 20 Pflanzen einer Linie bepflanzt.

Die äußeren Bedingungen für den Anbau von Kartoffeln waren dort zwar nicht optimal, doch stand kein besserer Standort zur Verfügung. Kartoffeln benötigen für optimales Wachstum einen eher mageren sandigen Boden und keinen lehmigen schlecht durchlüfteten Boden wie auf dem Versuchsfeld.

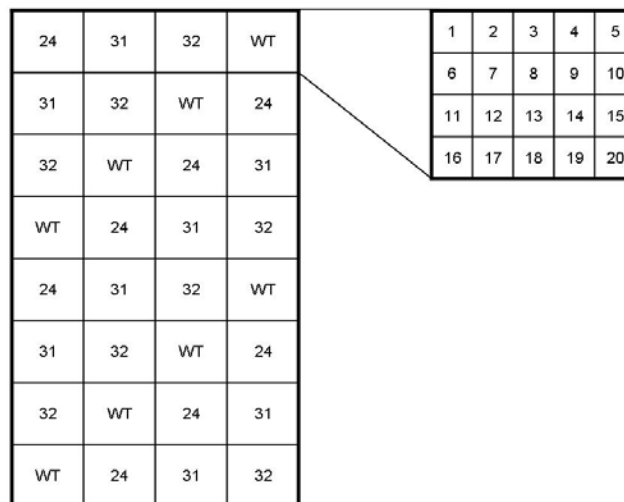


Abbildung 42: Schematische Darstellung des Versuchsfeldes im Jahr 2006. Das Feld lag auf dem Gelände des MPI für Züchtungsforschung in Köln. 24-32: Nummerierung der transgenen BGA-Linien; WT: Wildtyp

3.2.2.2 Zuckergehalte in Kartoffelknollen

Aus jeder Parzelle (s. Abb. 42) wurden nach 22 Wochen Wachstum die fünf Pflanzen für weitere Untersuchungen ausgewählt, welche den größten Knollenertrag zeigten. Neben dem Stärkegehalt der Knollen (s. 3.2.2.3) wurden auch die Gehalte von Glukose, Fruktose und Saccharose bestimmt (s. Abb. 43).

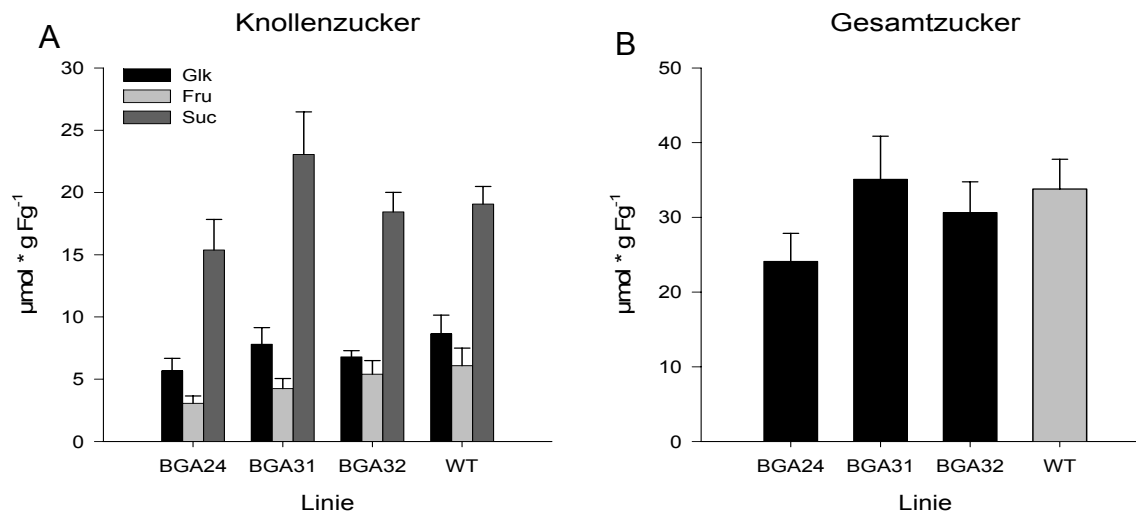


Abbildung 43: Zuckergehalte in Kartoffelknollen (A) und Gesamtzucker-Gehalt (B) in $\mu\text{mol pro g}$ Frischgewicht des Freilandversuchs im Jahr 2006. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 40$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, konnten keine signifikanten Änderungen in den Gehalten von Glukose, Fruktose oder Saccharose beobachtet werden (A), was bei Betrachtung der kalkulierten Gesamtzucker deutlich (B) wird. Die Gesamtzucker wurden durch Addition der einzelnen Zuckerkonzentrationen berechnet. Bei dieser Ernte konnten untypisch hohe Fruktosegehalte in Knollen der transgenen Linien und der WT festgestellt werden. Die war aber auch bei der letzten Ernte im Jahr 2007 der Fall (s. 3.2.3.2).

3.2.2.3 Stärkegehalte der Kartoffelknollen

Im Gewächshaus zeigte sich bereits, dass die transgenen BGA-Linien im Vergleich zum WT einen gesteigerten Stärkegehalt in ihren Knollen und einen gesteigerten Knollenertrag pro Pflanzen besitzen (Zhang et al., 2008). Diese Eigenschaften sollten bei dem durchgeführten Freilandversuch verifiziert werden.

Die Untersuchungsergebnisse für den Stärkegehalt von Knollen sind in Abbildung 44 dargestellt.

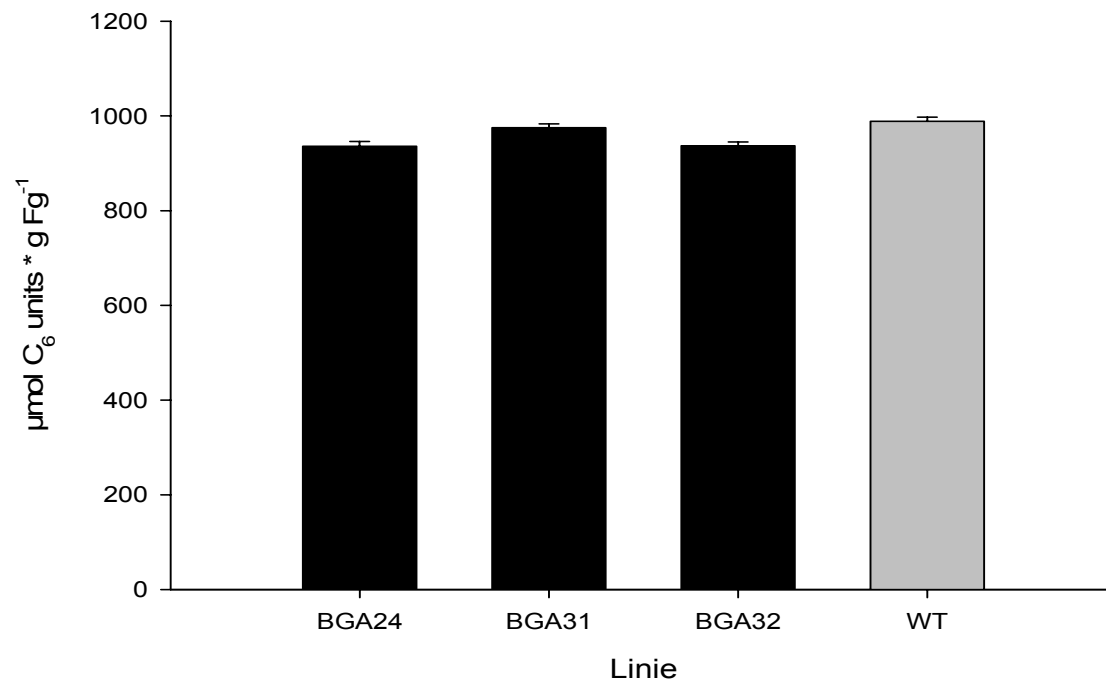


Abbildung 44: Stärkegehalt in Kartoffelknollen der GPT/NTT-Überexprimierer in $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht des Freilandversuchs im Jahr 2006. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 40$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, konnten die Ergebnisse aus dem Gewächshaus im Freiland nicht reproduziert werden. Die transgenen Linien besaßen im Freiland einen unveränderten bis leicht geringeren Stärkegehalt in ihren Knollen als der WT.

3.2.2.4 Knollenertrag und Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze

Der Knollenertrag war ebenfalls ein wichtiger Parameter, der im Freiland untersucht werden sollte. Deshalb wurde von jeder geernteten Pflanze der Knollenertrag bestimmt.

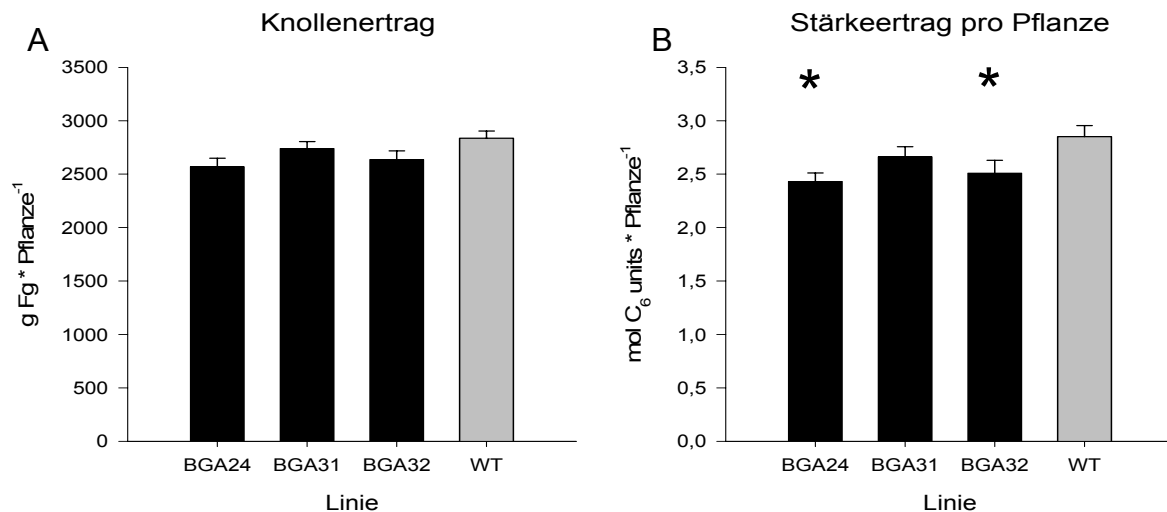


Abbildung 45: Knollenertrag und Gesamtstärkeertrag pro Pflanze des Freilandversuchs im Jahr 2006
 A: Knollenertrag in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze; B: Gesamtstärkeertrag von Knollen in mol C₆ units pro Pflanze. WT: Wildtyp; * = signifikant (p < 0,05); Die Werte sind Mittelwerte aus n = 40 Einzelmessungen ± Standardfehler.

Wie aus den Diagrammen ersichtlich ist, konnte auch im Freiland bei den transgenen Pflanzen kein gesteigerter Knollenertrag pro Pflanze festgestellt werden. Der Knollenertrag schien wie der Stärkegehalt von Knollen im Vergleich zum WT leicht erniedrigt zu sein. Als Folge des leicht verringerten Stärkegehalts von Knollen und des Knollenertrags pro Pflanze ergab sich auch ein gesunkener Stärkeertrag in Knollen pro Pflanze. Dieser war bei Linie BGA24 und BGA32 signifikant um 15 % bzw. 12 % verringert. Linie BGA31 zeigte zwar auch einen niedrigeren Knollenertrag, bei dem jedoch keine Signifikanz festgestellt wurde.

3.2.2.5 Fruchtertrag pro Pflanze und Fruchtgröße

Im Freiland bot sich die Möglichkeit, die Bildung der Kartoffelfrüchte näher zu untersuchen. Im Gewächshaus bilden die Pflanzen nur selten Früchte. Sie dienen der Pflanze als generatives Fortpflanzungsmittel und entstehen zumeist aus Selbstbefruchtung. Im Freiland wurden die Anzahl und die Gesamtmasse der Früchte ermittelt. Die gemessenen Massen sind in Abbildung 46 A und B dargestellt.

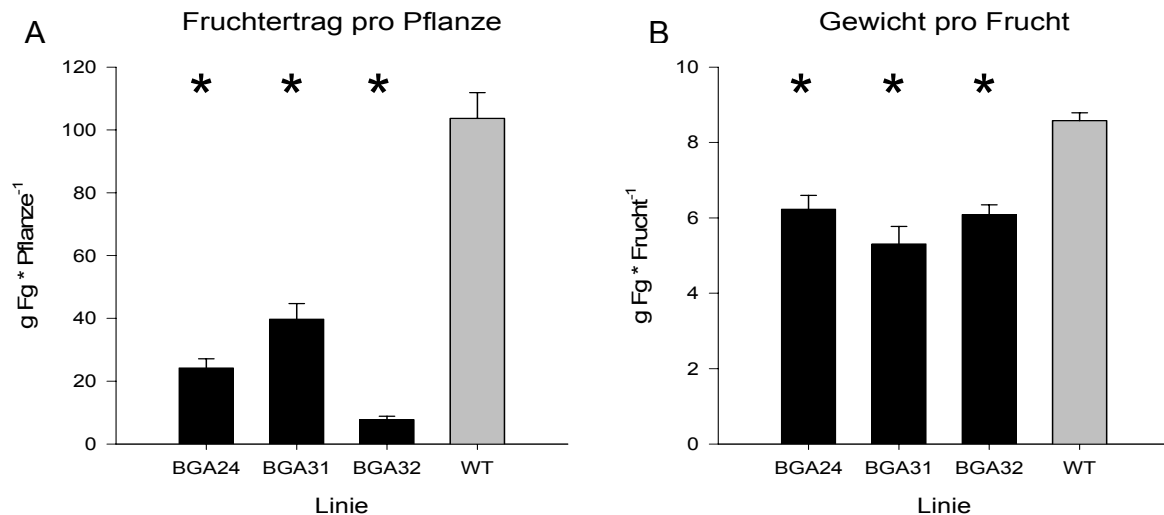


Abbildung 46: Fruchtertrag pro Pflanze (A) und Gewicht pro Frucht (B) bei Freilandanzuchten im Jahr 2006 in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze bzw. Frucht. WT: Wildtyp; *= signifikant ($p < 0,05$); Werte sind Mittelwerte aus $n = 40$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie aus der Abbildung 46 zu entnehmen ist, wurden in den transgenen Pflanzen deutliche Rückgänge im Fruchtertrag (A) und im Fruchtgewicht (B) festgestellt. Der Fruchtertrag pro Pflanze lag bei den Linien BGA24, BGA31 und BGA32 bei 23 %, 38 % bzw. 7 % des Ertrags des WT. Die Früchte besaßen bei diesen Linien nur 73 %, 62 % bzw. 71 % des Gewichts der Früchte des WT. Daraus wird deutlich, dass die transgenen Pflanzen nicht nur wesentlich weniger sondern auch wesentlich kleinere Früchte bildeten als der WT.

3.2.3 Ergebnisse der Freilandanzuchten im Jahr 2007

Im Jahr 2007 wurde das Experiment von 2006 mit einigen Änderungen wiederholt. Da sich im Jahr 2006 bei den transgenen Linien wider Erwarten keine erhöhten Stärkegehalte von Knollen und Knollenerträge einstellten, wurde versucht die Ursachen dafür zu ergründen. Zu diesem Zweck wurde in diesem Jahr nicht einmal sondern dreimal geerntet. Die erste Ernte fand 12 Wochen nach der Aussaat im April statt, die zweite nach 15 Wochen und die dritte und letzte Ernte nach 22 Wochen Wachstum. Es lag die Vermutung nahe, dass die transgenen Pflanzen eventuell in den ersten Wachstumsmonaten im Vergleich zum WT einen Vorsprung in Knollenmenge bzw. Stärkegehalt besitzen und in den letzten Wochen vor der Ernte vom WT eingeholt werden.

Zu den einzelnen Erntezeitpunkten wurden aus jeder Parzelle (s. 3.2.3.1) die 5 größten Pflanzen mitsamt ihren Knollen ausgegraben und untersucht. Bei der dritten Ernte wurden die verbliebenen 10 Pflanzen geerntet.

3.2.3.1 Feldaufbau im Jahr 2007

Für die Durchführung des Freisetzungsexperiments im Jahr 2007 wurde der gleiche Feldaufbau gewählt wie im Jahr 2006. Auch das gewählte Gelände für die Durchführung lag nur einige Meter vom Standort des Freilandexperiments 2006 entfernt, befand sich also auch auf dem umzäunten Gelände des MPI für Züchtungsforschung am Carl-von-Linné-Weg in Köln.

24	31	32	WT	1	2	3	4	5
31	32	WT	24	6	7	8	9	10
32	WT	24	31	11	12	13	14	15
WT	24	31	32	16	17	18	19	20
24	31	32	WT					
31	32	WT	24					
32	WT	24	31					
WT	24	31	32					

Abbildung 47: Schematische Darstellung des Versuchsfeldes im Jahr 2007. Das Feld lag auf dem Gelände des MPI für Züchtungsforschung in Köln. 24-32: Nummerierung der transgenen BGA Linien; WT: Wildtyp

3.2.3.2 Zuckergehalte in Kartoffelknollen

Die Gehalte von Glukose, Fruktose und Saccharose in Knollen wurden nach jeder Ernte bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 dargestellt.

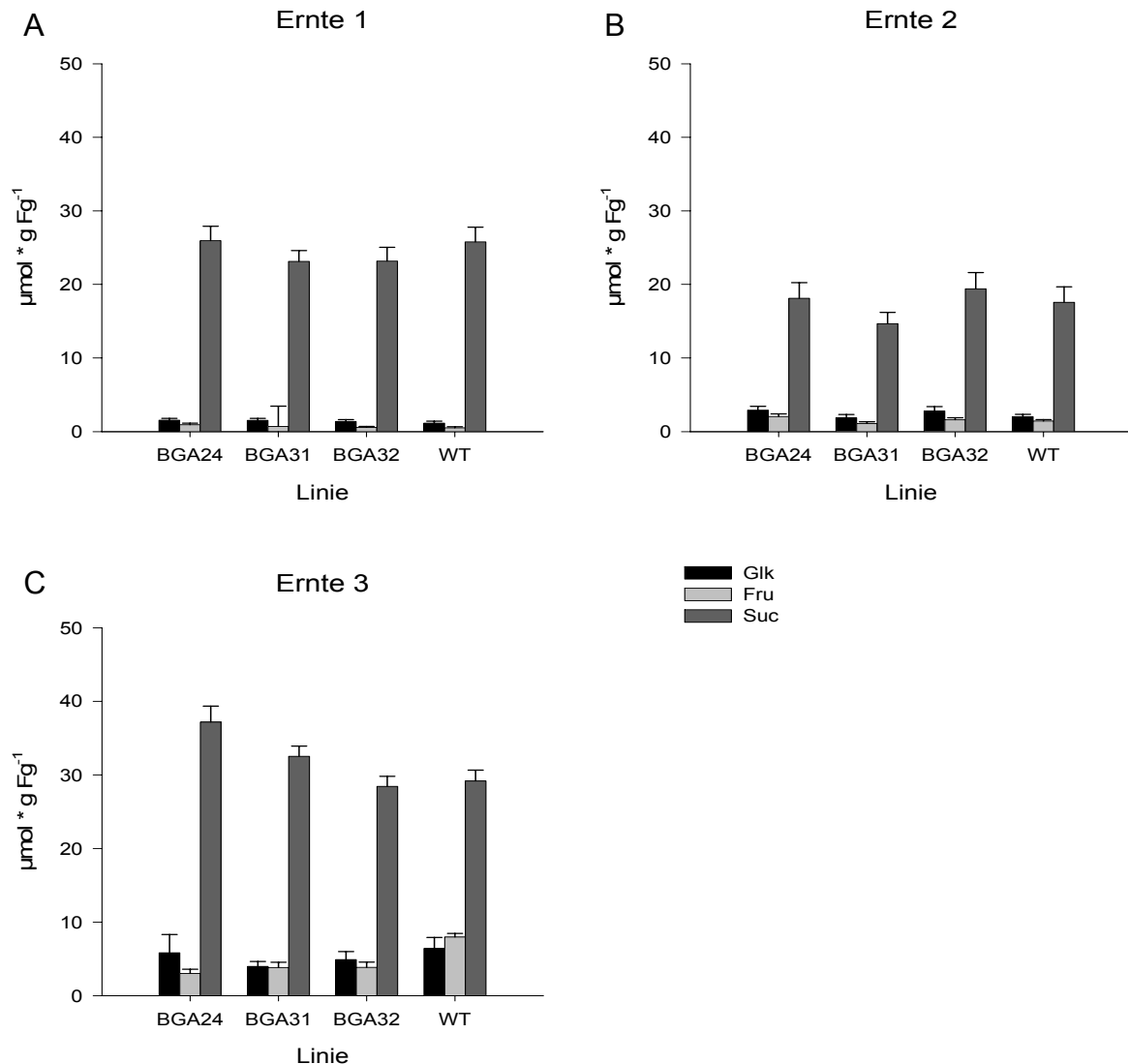


Abbildung 48: Zuckergehalte in Kartoffelknollen aus den Freilandanzuchten im Jahr 2007 zu den unterschiedlichen Erntezeitpunkten in μmol pro g Frischgewicht (Fg); WT: Wildtyp;. Die Werte sind Mittelwerte von $n = 5$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. A: Ernte nach 12 Wochen; B: Ernte nach 15 Wochen; C: Ernte nach 22 Wochen; Glk: Glukose; Fru: Fruktose; Suc: Saccharose

Wie in Abbildung 48 zu erkennen ist, konnten in den ersten beiden Ernten (A und B) keine signifikanten Änderungen in den Gehalten der gemessenen Zucker gefunden werden. Auch in der dritten Ernte wurden keine deutlichen Änderungen festgestellt, jedoch zeigten die transgenen Linien leicht verringerte Gehalte an Glukose und Fruktose im Vergleich zum WT. Ob diese Verringerungen zugunsten eines gestiegenen Saccharosegehaltes verliefen, konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Im Vergleich zum Vorjahr wiesen die Pflanzen zum letzten Erntezeitpunkt generell einen höheren Saccharosegehalt auf, und zwar mit 30 bis 40 μmol pro g Frischgewicht einen doppelt so hohen. Die Glukose- und Fruktosegehalte dagegen

lagen im Vorjahr auf etwa dem gleichen Level von ca. 2 bis 10 μmol pro g Frischgewicht.

3.2.3.3 Stärkegehalte in Kartoffelknollen

Bei der Freisetzung im Jahr 2007 wurde wie unter 3.2.3 erwähnt zu drei Zeitpunkten geerntet. Dabei sollte untersucht werden, ob die transgenen Pflanzen eventuell in den ersten Monaten des Wachstums einen erhöhten Stärkegehalt in Knollen aufweisen oder nicht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 49 dargestellt.

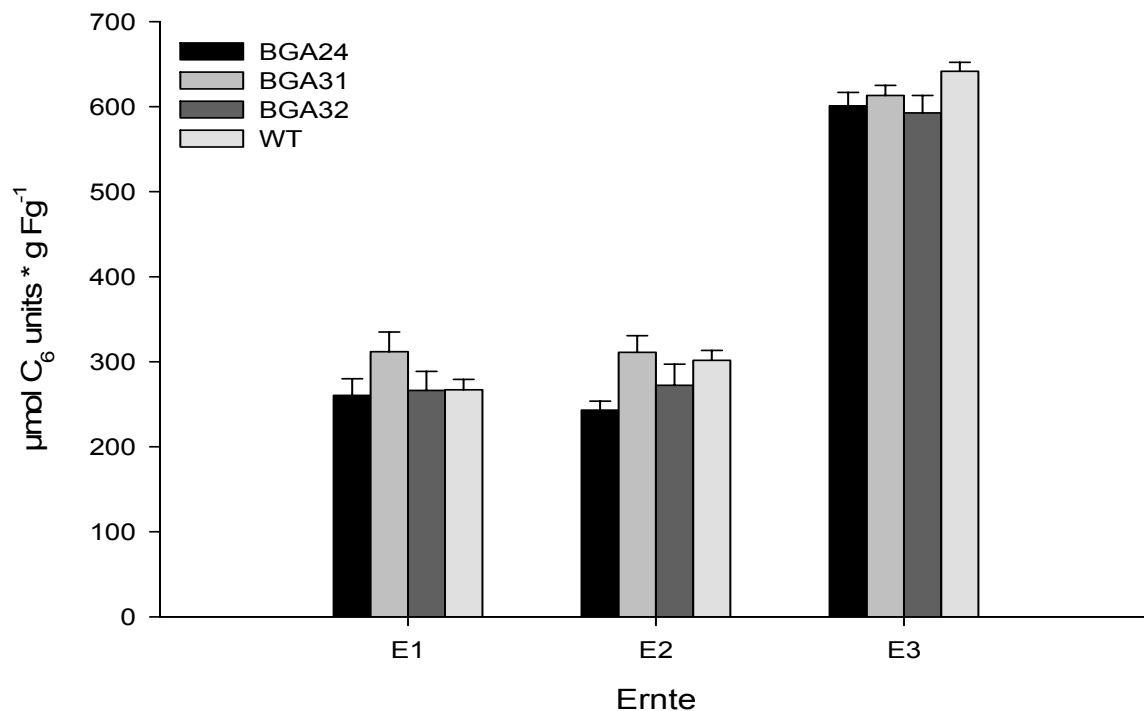


Abbildung 49: Stärkegehalte in Kartoffelknollen aus Freilandanzuchten im Jahr 2007 zu den unterschiedlichen Erntezeitpunkten in $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht (Fg). WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 5$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. E1: Ernte nach 12 Wochen; E2: Ernte nach 15 Wochen; E3: Ernte nach 22 Wochen

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, konnten zu allen drei Erntezeitpunkten keine gesteigerten Stärkegehalte in Knollen gefunden werden. Zum zweiten (E2) und zum letzten Erntezeitpunkt (E3) zeigten die transgenen Pflanzen sogar einen leicht verringerten Stärkegehalt von Knollen. In Ernte 3 zeigte die Linie BGA24 eine

Verringerung um 6 %, die Linie BGA31 eine um 4 % und die Linie BGA32 eine Verringerung von 8 % im Vergleich zum WT.

Im Jahr 2007 lagen die Stärkegehalte in Knollen beim WT bei 641 $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht und somit deutlich unter den Gehalten des Vorjahrs. Im Vorjahr zeigte der WT eine Stärkekonzentration von 989 μmol pro g Frischgewicht (s. 3.2.2.3).

Auch bei diesen Ernten konnten also die Ergebnisse aus dem Gewächshaus nicht reproduziert werden. Die transgenen Pflanzen zeigten einen bis zu 8 % geringeren Stärkegehalt in ihren Knollen im Vergleich zum WT.

3.2.3.4 Knollenertrag und Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze

Auch der Knollenertrag pro Pflanze wurde im Jahr 2007 zu drei Zeitpunkten in der Wachstumsphase bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 50 A dargestellt. Abbildung 50 B zeigt den errechneten Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze.

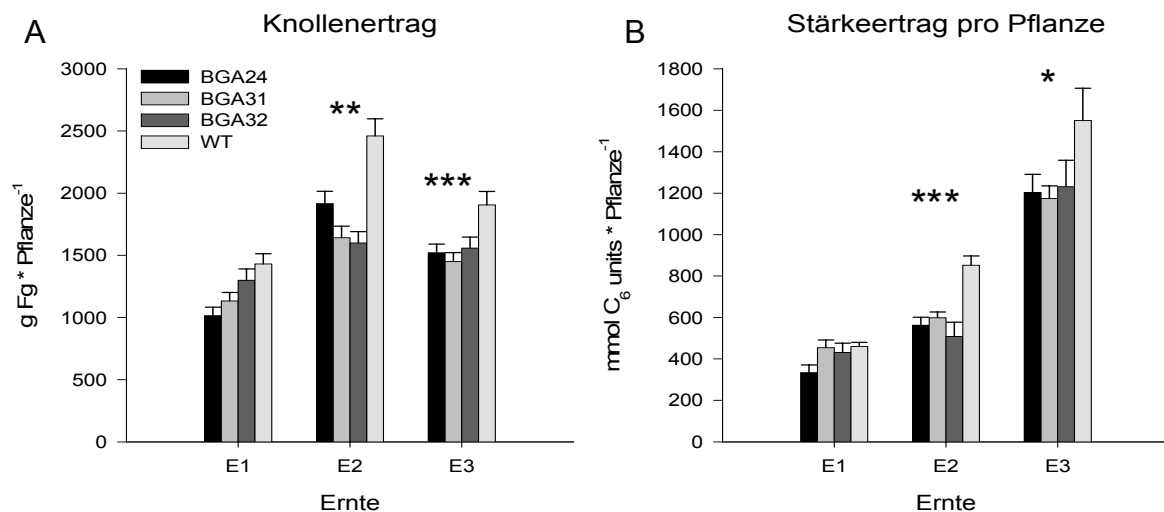


Abbildung 50: Knollenertrag und Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze aus Freilandanzuchten im Jahr 2007. A: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht. B: Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze in mmol C₆ units pro Pflanze. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); E1: Ernte nach 12 Wochen; E2: Ernte nach 15 Wochen; E3: Ernte nach 22 Wochen;

Wie aus Abbildung 50 A hervorgeht, waren in den transgenen Linien bereits bei der ersten Ernte Knollenertragsrückgänge zu beobachten. Diese wurden bei der zweiten Ernte deutlicher und lagen bei den Linien BGA24, BGA31, BGA32 um 22 %, 33 % bzw. 35 % niedriger als beim WT. Dieser Unterschied war auch nach der dritten und

letzten Ernte festzustellen, jedoch nicht mehr so stark ausgeprägt. Zum letzten Erntezeitpunkt lagen die Knollenerträge der transgenen Linien signifikant um 22 %, 24 % bzw. 21 % unter dem Knollenertrag pro Pflanze des WT. Die generell geringeren Knollenerträge pro Pflanze zum letzten Erntezeitpunkt waren zum einen darin begründet, dass viele Knollen bereits im Boden faulten und nicht mehr zur Analyse herangezogen wurden. Zum anderen wurden bei den einzelnen Ernten nur die jeweils größten Pflanzen zu Untersuchungen herangezogen, weshalb am Ende die Pflanzen übrig blieben, welche über die Wachstumsperiode hinweg den schlechtesten Wuchs zeigten.

Bei der Berechnung des Stärkeertrages pro Pflanze machte sich der gesunkene Stärkegehalt in den Knollen zusammen mit dem niedrigeren Knollenertrag deutlich bemerkbar. So lag der Stärkeertrag pro Pflanze bereits nach der zweiten Ernte bei allen transgenen Linien signifikant, mit $p < 0,05$, unter dem des WT. Bei den Linien BGA24, BGA31 und BGA32 befand er sich zu diesem Zeitpunkt 34 %, 30 % und 40 % unter dem Knollenertrag des WT. Zur letzten Ernte betrug dieser Unterschied noch 22 %, 24 % und 21 % mit einer Signifikanz bei Linie BGA31.

Im Gegensatz zum Gewächshaus konnten also auch in diesem Jahr keine Erhöhungen im Knollenertrag oder im Stärkeertrag pro Pflanze ermittelt werden.

Auch der Knollenertrag fiel im Jahr 2007 deutlich geringer aus als im Vorjahr. Der WT zeigte im Jahr 2006 im Mittel 2837 g Knollen, wohingegen er im Jahr 2007 nur 1904 g Knollen pro Pflanze aufwies, was aber vermutlich auch auf die Vorgehensweise bei der Ernte zurückzuführen war (s. 4.2.2).

3.2.3.5 Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile

Während der Freisetzung im Jahr 2006 wurde wie bereits erwähnt (s. 3.2.1.5), bei den transgenen Pflanzen eine geringere Ausbildung von oberirdischen Pflanzenteilen beobachtet. Deshalb wurde bei den Ernten im Jahr 2007 das Frischgewicht dieser Teile pro Pflanze bestimmt. Die in Abbildung 51 dargestellten Ergebnisse dieser Messungen fielen so eindeutig aus, dass bei der dritten und letzten Ernte auf die Ermittlung der Frischgewichte verzichtet wurde.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, wiesen die transgenen Linien zum ersten und zum zweiten Erntezeitpunkt ein deutlich geringeres Frischgewicht ihrer grünen Pflanzenteile auf.

Die Linien BGA24 und BGA32 zeigten zur ersten Ernte 25 % weniger Frischgewicht ihrer grünen Teile und die Linie BGA31 wies ein um 26 % verringertes Frischgewicht im Vergleich zum WT auf. Diese Unterschiede wurden bei der zweiten Ernte noch deutlicher. Dort zeigten die Linie BGA24 ein um 30 %, die Linien BGA31 und BGA32 ein um 43 % verringertes Frischgewicht der grünen Pflanzenteile.

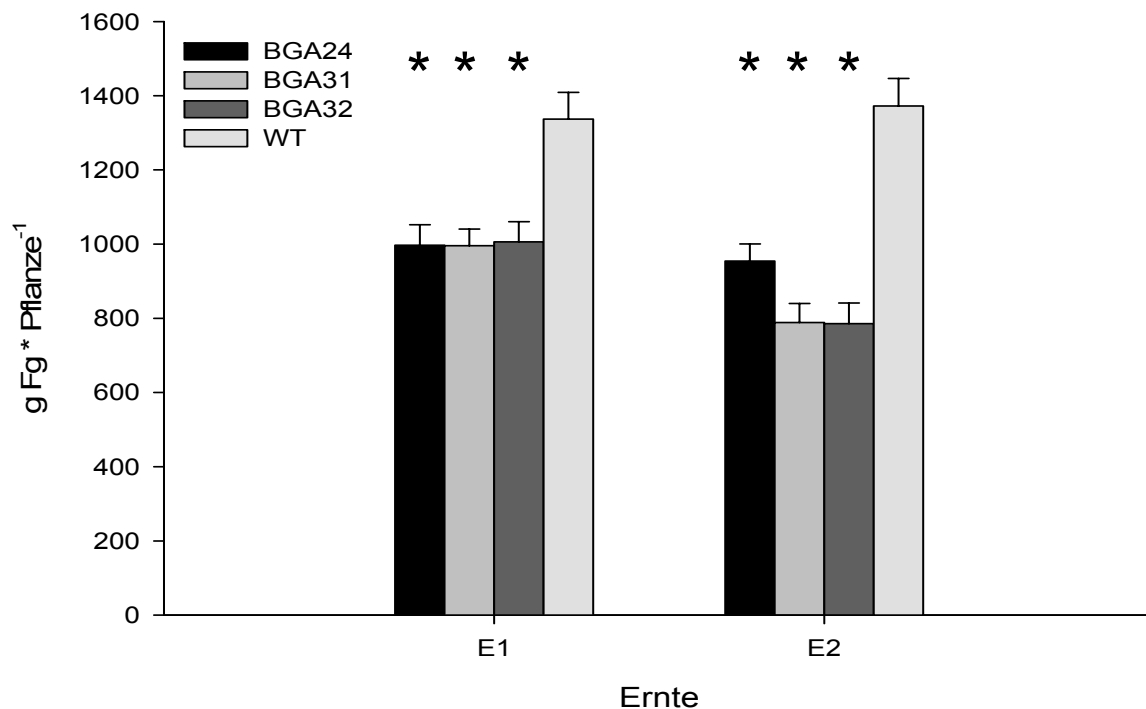


Abbildung 51: Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile aus Freilandanzuchten im Jahr 2007 in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze. WT: Wildtyp; *= signifikant ($p < 0,05$); E1: Ernte nach 12 Wochen; E2: Ernte nach 15 Wochen

Im Freiland zeigten die transgenen Pflanzen also auch beim Frischgewicht ihrer grünen oberirdischen Pflanzenteile ein signifikant unterschiedliches Ergebnis im Vergleich zum Gewächshaus (s. 3.2.1.6).

3.2.3.6 Fruchtertrag pro Pflanze und Fruchtgröße

Ebenso wie im Jahr 2006 wurde auch im Freisetzungsexperiment 2007 das Frischgewicht der Früchte und der Fruchtertrag pro Pflanze bestimmt. Abbildung 52 zeigt als Ergebnis dieser Messungen, dass die Pflanzen auch in diesem Jahr einen deutlichen Rückgang der Masse an gebildeten Früchten pro Pflanze (A) und ebenso

kleinere Früchte (B) aufwiesen. Zum zweiten Erntezeitpunkt war dieser Unterschied bereits so ausgeprägt, dass, wie bei der Massenbestimmung der grünen Pflanzenteile, bei der dritten Ernte auf die Messung des Frischgewichts an Früchten verzichtet wurde. Zudem waren die Früchte zur dritten Ernte bereits größtenteils abgefallen, was eine Bestimmung ihrer Frischgewichte pro Pflanze zusätzlich erschwert hätte.

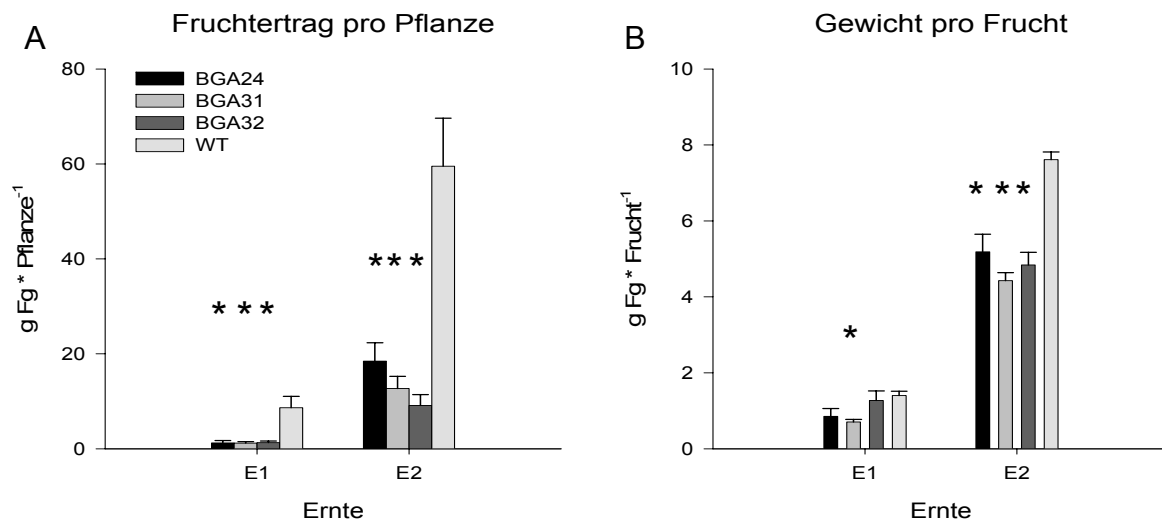


Abbildung 52: Fruchtertrag pro Pflanze (A) und Gewicht pro Frucht (B) bei Freilandanzuchten im Jahr 2007 in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze bzw. Frucht. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); E1: Ernte nach 12 Wochen; E2: Ernte nach 15 Wochen; Werte sind Mittelwerte aus $n = 5$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Bei der zweiten Ernte lagen die Frischgewichte der Früchte pro Pflanze bei den Linien BGA24, BGA31 und BGA32 um 69 %, 79 % und 85 % unter denen des WT. Die berechneten Massen pro Frucht waren 32 %, 42 % bzw. 37 % geringer als die Fruchtmasse des WT.

Die transgenen Pflanzen bildeten also auch im Jahr 2007 signifikant weniger und kleinere Früchte als der WT.

3.2.3.7 HPLC-Messungen von ATP, ADP und ADP-Glukose in Kartoffelknollen

Die transgenen Linien zeigten im Gewächshaus einen gesteigerten Stärkeertrag pro Pflanze (s. 3.2.1.2). Deshalb lag die Vermutung nahe, dass sich bei den Gehalten von ADP-Glukose, ADP und ATP ebenfalls Änderungen zeigen würden. Aus diesem Grund wurden die Gehalte dieser Substanzen mittels HPLC (s. 2.5.11) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 53 dargestellt, aus der ersichtlich ist, dass bei den transgenen Linien keine eindeutigen Änderungen im Vergleich zum WT auftraten.

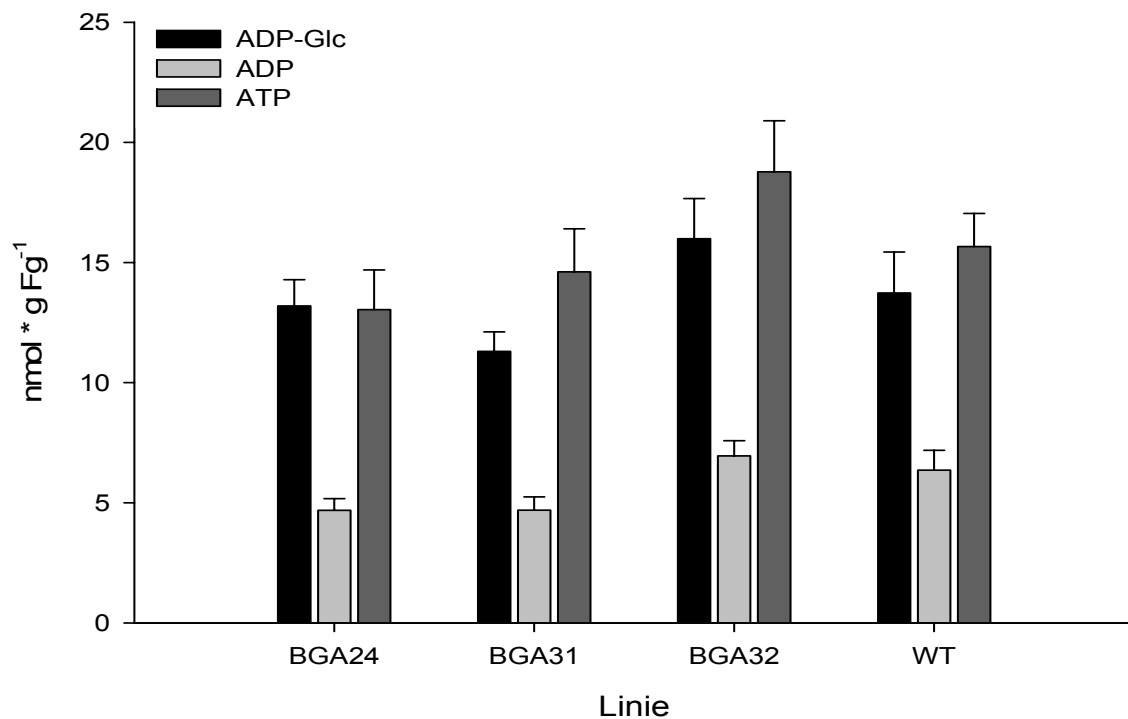


Abbildung 53: Gehalte von ADP-Glukose (ADP-Glc), ADP und ATP in Kartoffelknollen, in nmol pro g Frischgewicht (Fg). WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von n = 8 Einzelmessungen \pm Standardfehler.

3.2.3.8 Fazit

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Gewächshaus (s. 3.2.1) zeigen die transgenen Pflanzen, welche den *PsGPT* und den *AtNTT1* unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimieren, im Freiland leicht geringere Stärkegehalte in Knollen und auch geringere Knollenerträge im Vergleich zum WT (s. 3.2.2.3, 3.2.2.4, 3.2.3.3 und 3.2.2.4). Außerdem weisen sie ein geringeres Wachstum auf, was bei Betrachtung der gebildeten Masse an grünen Pflanzenteilen deutlich wird (s. 3.2.3.5). Zudem bilden die transgenen Linien im Freiland weniger und kleinere Früchte als der WT (s. 3.2.2.5 und 3.2.3.6). Die Zuckergehalte von Knollen sowie die Gehalte von ADP-Glukose, ADP und ATP von Knollen werde durch Überexpression der beiden Transporter scheinbar nicht beeinflusst (s. 3.2.2.2, 3.2.3.2 und 3.2.3.7). Für weitere Analysen der Unterschiede zwischen Gewächshaus- und Freilandanzuchten bieten sich Gewächshausanzuchten in Erdbeeten an, bei denen wahlweise nur ein Spross oder alle Sprosse wachsen gelassen werden (s. 4.1.3).

3.2.4 Vorläufige Untersuchungen an GPT/NTT/ATase2-Überexprimierern

Die GPT/NTT/ATase2-Überexprimierer sind Kartoffelpflanzen, welche die ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors sowie den GPT aus Erbsenwurzeln und den NTT1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimieren. Es sollte getestet werden, ob die ATase2-Überexpression evtl. im Hintergrund der GPT/NTT-Überexprimierer einen Einfluss auf den Stärkegehalt von Knollen und den Knollenertrag ausübt.

Zu diesem Zweck wurde eine transgene Linie, welche den *PsGPT* unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimierte (BG1; Zhang et al., 2008), mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt sowie dem B33-pBin::NTT-Konstrukt co-transformiert. In diesem Fall musste so vorgegangen werden, da beide zur Transformation eingesetzten Konstrukte eine Kanamycin-Resistenz-Kassette enthielten. So war davon auszugehen, dass die Pflänzchen, die aus den Kalli wuchsen, zumindest eines der beiden Konstrukte exprimierten. Wäre eine BGA-Linie (s. 3.2) zur Transformation mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt herangezogen worden, wären aus jedem Kallus Pflänzchen gewachsen, was eine Selektion unmöglich gemacht hätte.

3.2.4.1 Expressionsanalyse des GPT und des NTT durch RT-PCR

Mit den auf Kanamycin selektierten Pflanzen wurde zum Nachweis der Insertion und Expression eines oder beider Konstrukte eine RT-PCR (s. 2.4.2.5) durchgeführt.

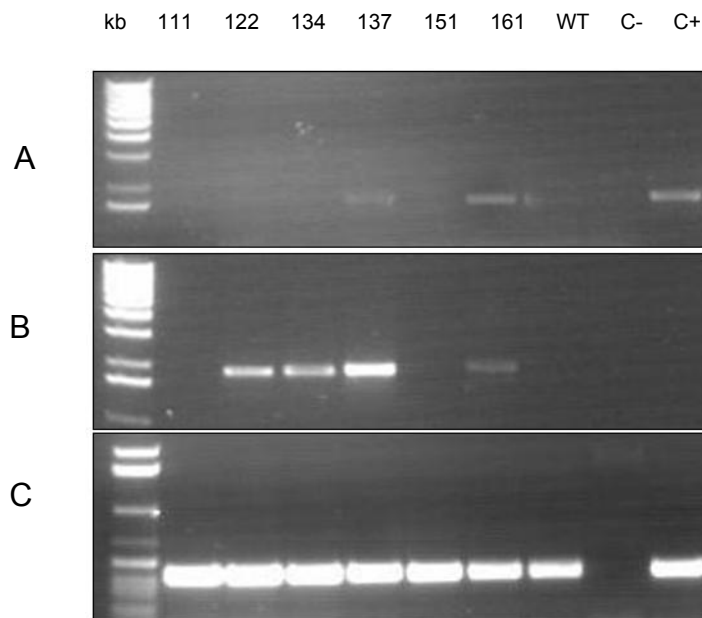


Abbildung 54: Nachweis der Insertion des ATase2- und des NTT-Gens durch RT-PCR. A: RT-PCR mit Primern FAT2 + RAT2 zum Nachweis der ATase2. B: RT-PCR mit Primern NTTfwd + NTTrev zum Nachweis des NTT. C: RT-PCR mit den Primern Tubst1fwd und Tubst1rev zum Nachweis des Housekeeping-Gens β -Tubulin. C-: Negativkontrolle mit H₂O; C+: Positivkontrolle mit RNA der 35S-ATase2 Überexprimierer; WT: Wildtyp; 111 - 161 Nummerierung der transformierten Pflanzen (später GNA - bzw. GN-Linien genannt, siehe Text)

Das Gelfoto (Abb. 54 A) zeigt die Ergebnisse einer PCR auf cDNA der co-transformierten Pflanzen. Für diese PCR wurden Primer für die Amplifikation der ATase2 cDNA verwendet. Anhand der beiden 1,7 kb großen Banden war zu erkennen, dass die Linien 137 und 161 Transkripte für die ATase2 aufwiesen. Mit einer PCR auf die gleiche cDNA konnte unter Verwendung der NTT Primer (B) festgestellt werden, dass diese beiden Linien ebenfalls Transkripte des NTT besaßen, was an den beiden 1,8 kb großen Banden zu erkennen war (B). Daher werden sie im Folgenden als GNA-Linien (GPT, NTT, ATase2) bezeichnet. Aus der Teilabbildung 54 B kann ebenfalls entnommen werden, dass die Linien 122 und 134 lediglich Transkripte für den NTT aufwiesen, weshalb sie im Folgenden als GN-Linien bezeichnet werden (GPT, NTT). In Abbildung 54 C ist eine PCR auf das Housekeeping-Gen β -Tubulin dargestellt, welche als Nachweis dafür diente, dass

in allen PCR-Ansätzen cDNA vorhanden war. Für die PCR mit NTT-Primern wurde wie für die PCR mit ATase2-Primern ebenfalls eine positive Kontroll-PCR, in diesem Fall mit cDNA aus BGA Linie 31, durchgeführt, welche aber nicht abgebildet ist.

Es konnten also nur zwei Linien gefunden werden, welche beide Konstrukte gleichzeitig überexprimierten. Zur vorläufigen Analyse dieser transgenen Pflanzen wurden die Linien 137 und 161 im Gewächshaus angezogen. Die Linien 122 und 134, welche nur die Expression des NTT aufwiesen, sowie die Linie BGA31 (s. 3.2), dienten dabei als Kontrollpflanzen.

Bei diesen Linien wurde von einer Expression des GPT ausgegangen, da für die zur Transformation verwendete Linie (BG1) bereits der Nachweis für eine Expression sowie für eine höhere GPT-Aktivität erbracht wurde (Zhang et al., 2008).

Allerdings ist der Nachweis der ATase2- und NTT1-Transkripte in den Linien 137 und 161 kein Beweis dafür, dass deren Translation auch zu funktionalen Genprodukten führt. Ein solcher Nachweis kann nur durch Aktivitätsmessungen erbracht werden und steht im Fall der hier transformierten Linien für die ATase2 und den NTT noch aus.

3.2.4.2 Zuckergehalte in Blättern

Nach zehn Wochen Wachstum im Gewächshaus wurden auch bei den GNA-Linien die Gehalte von Glukose, Fruktose und Saccharose in Blättern untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 55 dargestellt.

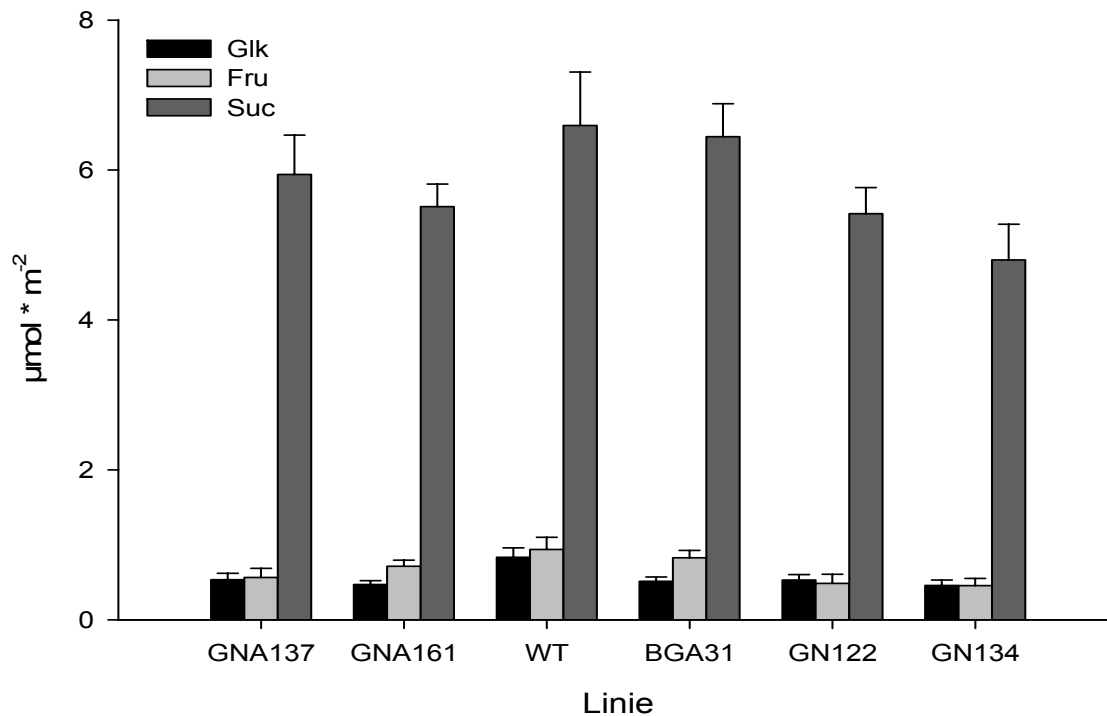


Abbildung 55: Zuckergehalte in Blättern in $\mu\text{mol pro m}^2$ Blattfläche. WT: Wildtyp; Glk: Glukose; Fru: Fruktose; Suc: Saccharose; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 5$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie aus der Abbildung 55 ersichtlich ist, konnten weder für die co-transformierten GNA-Linien 137 und 161 noch für die Kontrollpflanzen BGA31, GN122 und GN134 signifikante Änderungen der Konzentrationen von Glukose, Fruktose und Saccharose in Blättern gefunden werden.

Dies korrespondiert zum einen mit den Beobachtungen an den BGA-Linien (s. 3.2.1.1) und zum anderen auch mit denen an den ATase2-Überexprimierern (s. 3.1.6.1).

Eine Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors und des NTT unter Kontrolle des B33-Promotors im Hintergrund der BG1-Linie scheint also keine Auswirkungen auf die Gehalte der gemessenen Zucker in Blättern zu haben.

3.2.4.3 Stärkegehalte in Blättern

Die Stärkegehalte von Blättern der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt und dem B33-pBin::NTT-Konstrukt transformierten BG1-Linie sowie die der Kontroll-Pflanzen BGA31, GN122 und GN134 wurden nach 10 Wochen Wachstum im Gewächshaus analysiert. Die Untersuchungsergebnisse sind in Abbildung 56 dargestellt.

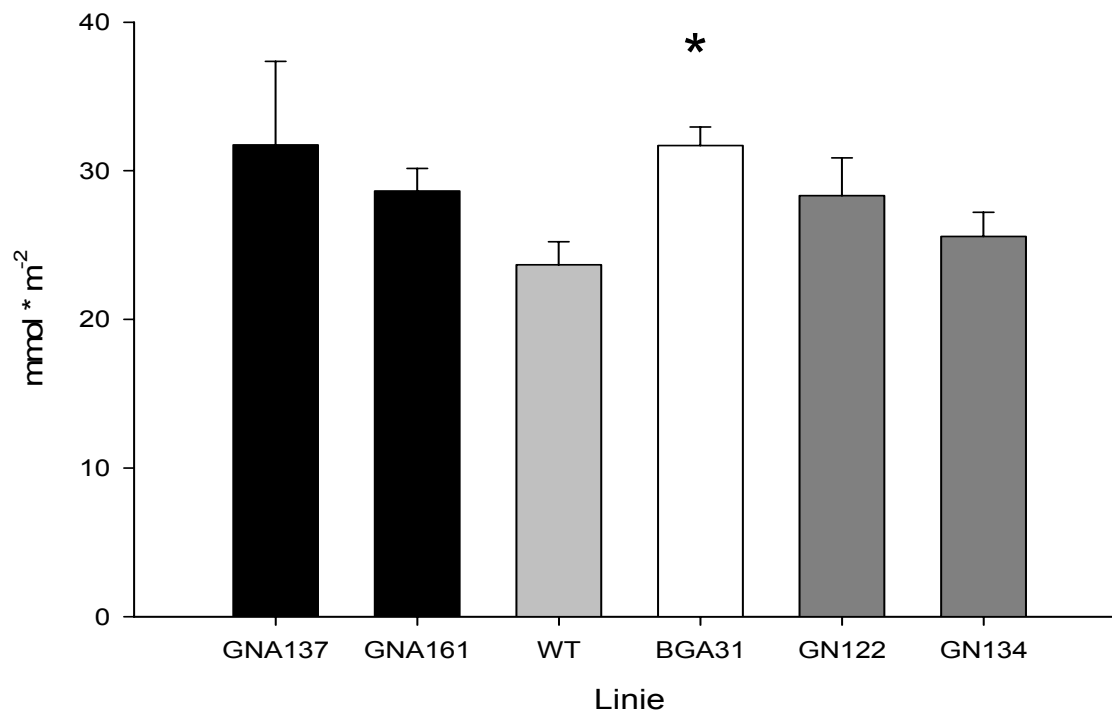


Abbildung 56: Stärkegehalte von Blättern in mmol pro m² Blattfläche. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von n = 5 Einzelmessungen ± Standardfehler. * = Signifikanz p < 0,05

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, konnten bei den Linien GNA137, GNA161, GN122 und GN134 im Vergleich zum WT keine signifikanten Änderungen im Stärkegehalt der Blätter festgestellt werden. Linie BGA31 zeigte im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (s. 3.2.1.2) bei diesem Versuch einen signifikant (p = 0,01) höheren Blattstärkegehalt als der WT. Bei diesem Befund ist jedoch von einer Ausnahme auszugehen, da ein derartiges Ergebnis bei Linie BGA31 noch nie gemessen wurde.

Eine gleichzeitige Überexpression der ATase2, des GPT und des NTT unter den oben genannten Promotoren scheint demnach keinen Einfluss auf die Stärkegehalte in Blättern zu haben.

3.2.4.4 Stärkegehalte in Kartoffelknollen

Die Stärkegehalte von Knollen der co-transformierten Linien sowie der Kontrollpflanzen wurden nach 12 Wochen Wachstum im Gewächshaus analysiert.

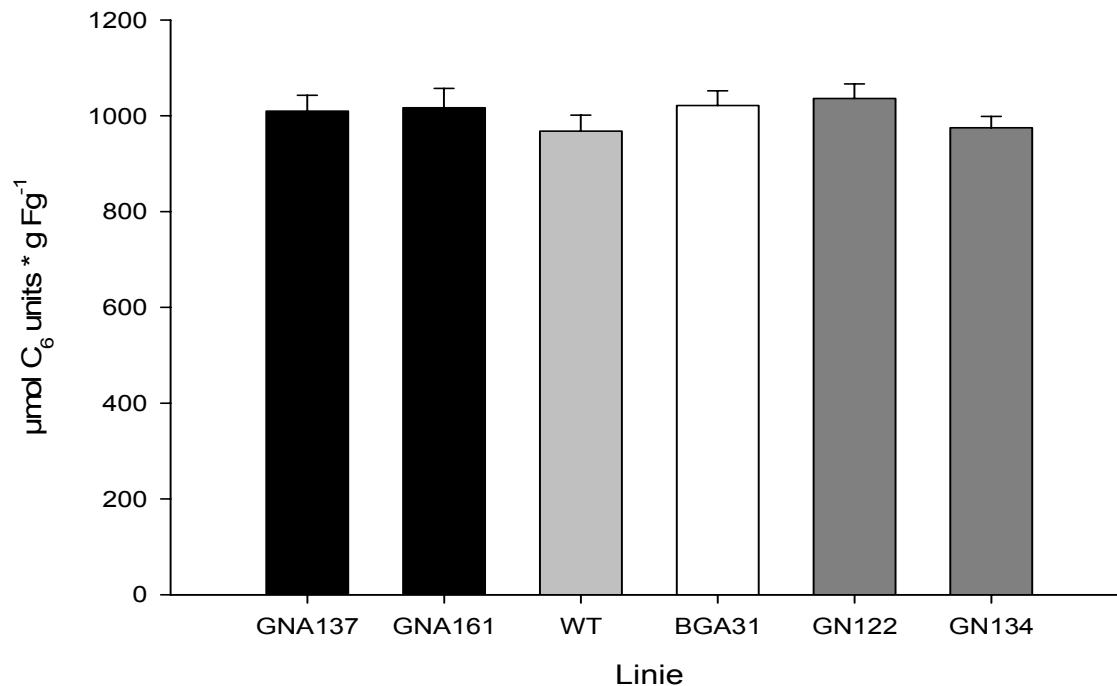


Abbildung 57: Stärkegehalte von Kartoffelknollen in µmol C₆ units pro g Frischgewicht; WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von n = 5 Einzelmessungen ± Standardfehler.

Signifikante Änderung im Stärkegehalt der transgenen Pflanzen im Vergleich zum WT konnten in diesem Versuch nicht festgestellt werden. Weder die GNA-Linien noch die Kontrollpflanzen zeigten die erwartete Erhöhung der Stärkekonzentration in Knollen. Dennoch ist in den transgenen Linien eine Tendenz zu erkennen, mehr Stärke pro g Frischgewicht zu besitzen. Dies wurde für die Kontrolllinie BGA31 bereits gezeigt (s. 3.2.1.4) und zumindest von den GN-Linien erwartet, die durch Transformation mit den Konstrukten entstanden, die auch zur Herstellung der BGA-Linien verwendet wurden.

3.2.4.5 Knollenertrag und Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze

Wie unter 3.1.6.5 gezeigt wiesen die Pflanzen, welche die ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors überexprimieren, keine deutlichen Änderungen im Knollenertrag im Vergleich zum WT auf. Die BGA-Linien 24, 31 und 32, welche den GPT und NTT

unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimieren, ergaben - wie unter 3.2.1.3 dargestellt - einen signifikant höheren Knollenertrag. Um zu testen, wie sich eine gleichzeitige Überexpression aller drei Gene auf den Knollenertrag auswirkt, wurden auch die Knollenerträge der doppelt transformierten Pflanzen und der Kontroll-Pflanzen nach 12 Wochen Wachstum im Gewächshaus untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 58 dargestellt.

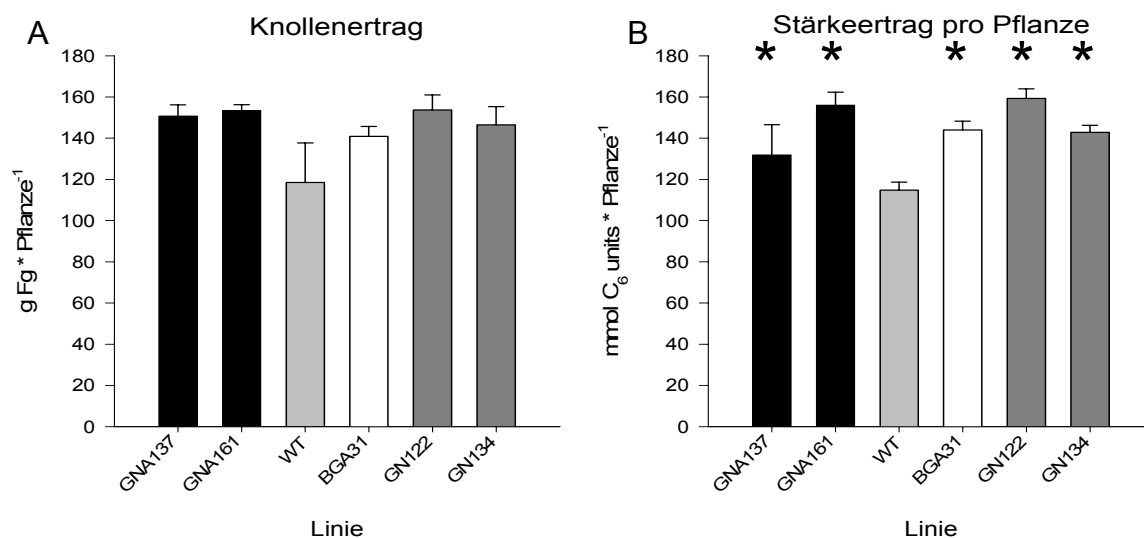


Abbildung 58: Knollenertrag und Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze; A: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht. B: Stärkeertrag pro Pflanze in mmol C₆ units pro Pflanze. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); Die Werte sind Mittelwerte von $n = 5$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie aus Abbildung 58 A ersichtlich ist, wiesen die untersuchten transgenen Pflanzen im Vergleich zum WT eine leichte Steigerung des Knollenertrags auf, die allerdings nicht durch einen Signifikanztest untermauert werden konnte. Dennoch war bei Linie BGA31 anzunehmen, dass zumindest sie einen gesteigerten Knollenertrag zeigen würde, was schließlich bereits in mehreren Ernten (z. B. s. 3.2.1.3) der Fall war. Die in diesem Fall fehlende Signifikanz wurde deshalb auf den relativ hohen Standardfehler bei den Messungen des WT zurückgeführt.

Die Erträge der transgenen Linien (GNA, BGA, GN) waren in etwa auf dem gleichen Niveau und vom WT unterschiedlich. Sie lagen bei ca. 150 g Knollen pro Pflanze. Der WT ergab im Vergleich einen Knollenertrag von ca. 120 g pro Pflanze. Deshalb war davon auszugehen, dass der Knollenertragszuwachs auf die Expression des GPT und des NTT zurückzuführen war.

Die Erträge der GNA-Linien zeigten also keine Änderung im Vergleich zur BGA31 Linie, womit vorläufig auszuschließen wäre, dass die Überexpression der ATase2 im Hintergrund einer Überexpression des GPT und NTT eine zusätzliche Knollenertragserhöhung bewirkte. Die GN-Linien, welche lediglich den GPT und den NTT unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimierten, zeigten ebenfalls im Vergleich zur BGA Linie 31 keine Änderung im Knollenertrag und stellen damit eine Kontrolle zu den bereits untersuchten BGA-Linien 24, 31 und 32 dar (s. 3.2).

Bei Betrachtung der Abbildung 58 B wird deutlich, dass sowohl die GNA- als auch die Kontrolllinien (BGA, GN) einen signifikanten Zuwachs ($p < 0,05$) in ihrem Stärkeertrag pro Pflanze aufwiesen. Auch in diesem Fall waren die Stärkeerträge von Knollen pro Pflanze der GNA-Linien ähnlich zu denen der Linie BGA31 und der Linien GN122 und GN134, so dass wiederum Grund zu der Annahme bestand, dass die beobachteten Zuwächse im Stärkeertrag von Knollen pro Pflanzen nur auf der Überexpression des GPT und des NTT beruhen.

3.2.4.6 Fazit

Eine gleichzeitige Überexpression der ATase2 unter der Kontrolle des 35S-Promotors und des GPT sowie des NTT unter Kontrolle des B33-Promotors scheint keine Änderungen im Stärkegehalt von Knollen und im Knollenertrag im Vergleich zum WT zu bewirken, die über die Änderungen durch eine Überexpression des GPT und des NTT hinausgehen.

Die unter 3.1.6.4 beschriebenen Tendenzen der ATase2-Überexprimierer, mehr Stärke in Knollen zu akkumulieren als der WT, scheinen also zu gering zu sein, um im Hintergrund einer GPT- und NTT-Überexpression auffällig zu werden.

Dennoch stehen weiterführende Untersuchungen aus. So wurde die ATase2 bereits in den pGreen-Vektor kloniert, welcher eine Sulfonamid-Resistenz-Kassette enthält. Für die Funktionalität dieses Vektors in Kartoffelpflanzen liegen bereits positive Testergebnisse vor (nicht gezeigt). Somit ist es nunmehr möglich, die bereits beschriebenen BGA-Linien (Zhang et al., 2008) effizient zu transformieren.

4. Diskussion

Wie unter 1.3 beschrieben war die Analyse der ATase2-überexprimierenden Kartoffelpflanzen im Gewächshaus eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit. Ein weiteres zentrales Anliegen war die Untersuchung von *PsGPT*- und *AtNTT*-überexprimierenden Kartoffelpflanzen während zweier Freilandexperimente sowie der Vergleich der dabei gewonnenen Erkenntnisse mit Ergebnissen aus dem Gewächshaus. Außerdem sollten Kartoffelpflanzen erzeugt werden die den GPT, den NTT und die ATase2 simultan überexprimieren, um festzustellen, ob eine Überexpression der ATase2 im GPT/NTT-Hintergrund positive Effekte hinsichtlich des Stärkegehaltes von Knollen und/oder des Knollenertrags ausübt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden diskutiert. Die Diskussion wurde zu diesem Zweck in zwei Teile untergliedert.

Im ersten Teil (4.1) wird versucht, den Untersuchungen an ATase2 überexprimierenden Kartoffelpflanzen und den dabei beobachteten Phänotypen einen theoretischen Hintergrund zu geben. Der zweite Teil (4.2) befasst sich mit GPT/NTT-überexprimierenden Kartoffelpflanzen. In ihm werden die beobachteten Diskrepanzen zwischen Anzuchten im Gewächshaus und Anzuchten im Freiland verglichen und mögliche Ursachen dafür dargestellt. Die vorläufigen Untersuchungen an GPT/NTT/ATase2-überexprimierenden Kartoffelpflanzen werden mit eingebunden.

4.1 Die ATase2-Überexprimierer

WT-Kartoffelpflanzen cv. Desirée wurden mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt und dem B33-pBin::ATase2-Konstrukt transformiert (s. 3.1.3 + 2.2.3). Das 35S-ATase2-Konstrukt ermöglichte die konstitutive Expression der ATase2 durch den 35S- Cauliflower mosaic virus Promotor in nahezu allen Geweben. Das B33-ATase2-Konstrukt wird nahezu ausschließlich in Knollen exprimiert (Rocha-Sosa, 1989).

Wie unter 3.1.2 beschrieben konnten alle an der IMP-Synthese beteiligten Enzyme in Knollen nachgewiesen werden. Diese sind in Knollen ebenso wie in Blättern plastidär lokalisiert (Boldt und Zrenner, 2003). Die Reaktionen von IMP zu AMP bzw. GMP werden jeweils von zwei weiteren Enzymen katalysiert, die von den Genen *AtpurA* und *AtpurB* (AMP) und *AtguaA* und *AtguaB* (GMP) kodiert sind. Die subzelluläre Lokalisation von *AtpurA* (EC 6.3.4.4) und *AtpurB* (EC 4.3.2.2) ist laut TargetP

(www.cbs.dtu.dk/services/TargetP) (Emanuelsson et al., 2000) chloroplastidär, die von *AtguaA* (EC 6.3.5.2) und *AtguaB* (EC 6.3.5.5) cytosolisch.

Die Transformation ergab ATase2 überexprimierende Kartoffeln, was sich durch einen Northern blot (s. 2.4.2.7 + 3.1.4) und dessen Hybridisierung mit einer ATase2-Sonde nachweisen ließ. Dass diese Transkripte auch funktionale Genprodukte besaßen, konnte durch „in vitro“-Aktivitätsmessungen der ATase2 in Blattextrakten der transgenen Pflanzen nachgewiesen werden (s. 2.5.5 + 3.1.5).

Van der Graaff et al. zeigten 2002, dass *Arabidopsis atd2*-Mutanten (*Atase2* deficient; s. 1.2.3) einen Phänotyp besaßen, welcher durch kleinen Wuchs und weiße Blätter gekennzeichnet war aber grüne Kotyledonen besaß. Außerdem wies diese Mutante eine zweite Lage Schwammparenchym anstelle eines Palisadenparenchyms auf. Bei transgenen Tabakpflanzen mit einer reduzierten ATase2-Aktivität wurden ebenfalls geringeres Wachstum sowie schwere Chlorosen in Blättern beobachtet.

Durch Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors oder durch Applikation von IMP zum Wachstumsmedium konnte in der *atd2*-Mutante der wildtypische Phänotyp wiederhergestellt werden. Bei der Komplementation durch das 35S-ATase2-Konstrukt zeigte sich eine Stärkeakkumulation in Blättern, die über die der WT-Pflanzen hinausging (s. Abb. 4 A und F). Biochemische Komplementation mit 5 mM IMP im Flüssigmedium stellte ebenfalls normales Wachstum wieder her, jedoch ohne eine Stärkeakkumulation zu bewirken. Diese zeigte sich jedoch im WT, welcher mit 5 mM IMP im Medium wuchs (s. Abb. 4 B).

Hung et al. untersuchten im Jahr 2004 *cia1* Mutanten von *Arabidopsis thaliana* welche einen Defekt beim Proteinimport in Chloroplasten aufwiesen. Bei einer dieser Mutanten war der Proteinimport um 50 % reduziert, was u. a. durch Transportversuche mit der kleinen Untereinheit der RubisCO (Rbcs) belegt wurde. Deshalb bekam die Mutante die Bezeichnung *cia*, die für chloroplast import apparatus steht. Die entsprechenden Pflanzen waren durch verzögertes Wachstum und blassgrüne Blätter gekennzeichnet, hatten aber grüne Kotyledonen. Außerdem besaßen sie kleinere Zellen deren Anzahl im Vergleich zum WT um 50 % reduziert war. Wie sich durch positionelles Klonieren herausstellte, lag die Ursache für diesen Phänotyp in einer defekten ATase2, was deren Bedeutung für die Zellteilung bestätigte. Hung et al. untersuchten also die gleiche Mutante wie van der Graaff et al. (2002) und fanden einen ähnlichen Phänotyp. Hung et al. konnten wildtypisches

Wachstum durch Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors wiederherstellen, berichteten aber nicht von einer Stärkeakkumulation in Blättern. Im Gegensatz zu van der Graaf et al. verlief außerdem eine biochemische Komplementation mit 5 mM IMP im Flüssigmedium erfolglos. Des Weiteren ergab die Zugabe von zwei weiteren von der Purin-„de novo“-Biosynthese abhängenden Produkten, Cytokininen und NADH, keine Komplementation. Der Zusatz von 5 mM AMP zum Flüssigmedium konnte allerdings annähernd normales Wachstum und normale Entwicklung wiederherstellen. Sie führte jedoch ebenfalls nicht zu einer Stärkeakkumulation in Blättern. Der beobachtete Phänotyp der *atd2*- bzw. *cia1*-Mutante beruht also sehr wahrscheinlich auf einem Mangel an IMP bzw. AMP und GMP.

Die ermittelte Reduktion des Proteinimports in Chloroplasten könnte also ebenfalls von verminderten ATP- bzw. GTP-Gehalten herrühren. ATP-Hydrolyse ist für die Bindung von Proteinen an den TOC-Komplex und deren Translokation unabdingbar (Olsen et al., 1989 und Theg et al., 1989). Der TOC-Komplex ist ein Proteintranslokator in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten (Schnell et al., 1997). Zudem sind 2 von 3 TOC-Komponenten GTPasen (Kessler et al., 1994). ATP- und GTP-Zugabe während der Proteinimportexperimente an Mutanten konnte jedoch nur wenig an der Importrate ändern. Die genaue Ursache für den Defekt im Proteinimport konnte von Hung et al. nicht geklärt werden.

Ihre Schlussfolgerung war, dass die Purin-„de novo“-Biosynthese nicht nur für die Zellteilung sondern auch für die Chloroplastenentwicklung von Bedeutung ist.

In differenzierten Zellen, wie z. B. in Knollen am Ende der Speicherphase, finden sich nur noch schwache Aktivitäten der Purin-„de novo“-Biosynthese dafür jedoch hohe Aktivitäten bei Genen des Purinrecyclings (Smith und Atkins, 2002). Girke et al. fanden 2000 heraus, dass zusätzlich zur feedback-Inhibition der ATase2 durch die Produkte IMP, AMP und GMP (Reynolds et al., 1984) noch transkriptionelle Regulationswege für die Purin-„de novo“-Synthese existieren. So konnten sie zeigen, dass die Expression von *AtpurM* (AIR-Synthase; s. Abb. 3) in Samen 19 Mal höher war als in Wurzeln oder Blättern, wohingegen die Expression von *purF* bis *purH* in etwa gleich war. Auch in Wurzelknöllchen der Langbohne (*Vigna unguiculata*) konnte eine transkriptionelle Reprimierung des *purM* Gens durch Produkte der Stickstofffixierung (Smith und Atkins, 2002) beobachtet werden.

Sollte die transkriptionelle Regulation von *purM* auch in Kartoffelpflanzen ein Mechanismus für die Regulierung bzw. Limitierung der „de novo“-Bioynthese von Purinen sein, so könnte diese zusammen mit einer allosterischen Inhibition der ATase2 verhindern, dass eine Überexpression der ATase2 überhaupt einen Effekt auf die Pflanze ausübt.

4.1.1 Änderungen in Knollen der 35S-ATase2-Überexprimierer

Die Kartoffelpflanzen, welche die ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors überexprimieren, zeigten eine Tendenz, bei unverändertem Knollenertrag pro Pflanze (s. 3.1.6.5) mehr Stärke in Knollen zu akkumulieren als der WT (s. 3.1.6.4). Daraus ließ sich ein Stärkeertrag pro Pflanze berechnen, der um bis zu 51 % höher lag als beim WT (Linie 37, Abb. 17 D). Diese Ergebnisse waren jedoch inkonsistent, so dass nicht von einer echten Steigerung des Stärkeertrags pro Pflanze ausgegangen werden kann.

Viele Versuche zur Steigerung des Stärkegehalts von Knollen bzw. des Knollenertrags pro Pflanze in der Vergangenheit erzielten nicht den beabsichtigten Erfolg sondern oft das Gegenteil (z. B. Trethewey et al., 1998).

Bei einigen Ansätzen gelang es jedoch einen erhöhten Stärkegehalt von Knollen und/oder einen gesteigerten Knollenertrag zu bewirken (s. u.).

Dazu zählten Versuche mit transgenen Kartoffelpflanzen, die eine mutierte Form der bakteriellen AGPase exprimierten, welche nicht durch feedback-Inhibition reguliert werden konnte (Stark et al., 1992).

Antisensing der UMP-Synthase, einem Schlüsselenzym der Pyrimidin-„de novo“-Biosynthese, führte zu einer Aktivierung des Pyrimidin-Recyclings sowie zu höheren Uridinnukleotidgehalten, was einen gesteigerten Fluss von ¹⁴C-markierter Saccharose in die Stärke und somit größere Stärkegehalte in Knollen zur Folge hatte (Geigenberger et al., 2005).

Antisensing der plastidären Adenylatkinase (ADK) ergab einen um 60 % höheren Stärkegehalt in Knollen und gesteigerte Knollenerträge (Regierer et al., 2002).

Zudem konnten durch Überexpression des *PsGPT* und des *AtNTT1* unter Kontrolle des B33-Promotors höhere Stärkegehalte in Kartoffelknollen und Knollenerträge pro pflanze erreicht werden (Zhang et al., 2008 und die vorliegende Arbeit).

Im Zusammenhang mit Purinen und deren Synthese oder Recycling ist vor allem die Arbeit von Regierer et al. aus dem Jahr 2002 für die vorliegende Arbeit von großer Relevanz.

Wie bereits erwähnt führte die Expression eines antisense-Konstrukts für die ADK unter Kontrolle des 35S-Promotors zu einem gesteigerten Stärkegehalt in Knollen und höheren Knollenerträgen pro Pflanze, was bei einer Freilandanzucht bestätigt werden konnte. Im Freiland war der Stärkeertrag pro Pflanze um bis zu 100 % erhöht (Oliver et al., 2007). Die ADK katalysiert die Reaktion von ATP und AMP zu 2 Molekülen ADP, ist also für eine Äquilibrierung des Adenylatpools verantwortlich (Regierer et al., 2002).

Oliver et al. untersuchten 2007 mögliche Ursachen dieser Knollenertragssteigerung. Sie fanden genau wie Regierer et al. (2002) einen veränderten Adenylatpool in Knollen. So stellten sie einen leicht erhöhten ATP- und AMP- sowie einen stark erhöhten ADP-Spiegel im Vergleich zum WT fest, woraus ein reduziertes ATP / ADP-Verhältnis resultierte. Darüber hinaus beobachteten sie eine um 30 % bis 50 % erhöhte Respiration bei gleichen Gehalten an Saccharose, Glukose und Fruktose und nur leicht verminderten Gehalten von F6P und G6P. Bei ^{14}C -Glukose-Aufnahmeversuchen an Knollenscheiben stellte sich heraus, dass die Pflanzen mit verminderter ADK-Aktivität die gleiche Aufnahmerate wie der WT besaßen, wobei jedoch der Fluss der markierten Glukose zur Stärke signifikant erhöht war.

Wie bereits unter 1.1.1 erwähnt wird die AGPase allosterisch reguliert und unterliegt einer Regulation durch Redoxaktivierung über Thioredoxin. Der Aktivierungszustand der AGPase korreliert mit Saccharosekonzentrationen im Cytosol von Blättern und Knollen. Wie sich herausstellte, verläuft die Perzeption von Saccharose dabei über eine Signalkaskade, die SNF-ähnliche Proteinkinasen, Hexokinase und Trehalose-6-Phosphat involviert (Hendriks et al., 2003; Tiessen et al., 2003; Kolbe et al., 2005).

In ADK-antisense-Linien war der Aktivierungszustand der AGPase 1,6 bis 2,8 mal höher als im WT. Diese Steigerung konnte nicht auf höhere Zuckergehalte zurückgeführt werden, da keine Änderungen an glykolytischen Intermediaten inklusive Hexosephosphaten und 3PGA, einem allosterischen Aktivator der AGPase, festgestellt werden konnten. Deshalb wurden WT-Knollenscheiben mit 2 mM Adenin im Inkubationspuffer gefüttert. Daraus resultierte eine 32 % höhere Aktivierung der AGPase als in Kontroll-Versuchen ohne Adenin. Ähnliche Beobachtungen machten Loef et al. (2001), die ebenfalls Adenin-Fütterungen an Knollenscheiben vornahmen.

Auch sie konnten einen größeren Adenylatpool und eine zwei- bis vierfach stimulierte Stärkesynthese feststellen. Diese Untersuchungen zeigten, dass Adeninnukleotide die Fähigkeit besitzen, den Redoxzustand der AGPase zu beeinflussen, da sie als Substrat direkt mit der AGPase interagieren können. „In vitro“ konnte gezeigt werden, dass die Redoxaktivierung der AGPase durch Thioredoxin oder DTT auf die Anwesenheit von ATP oder ADP-Glukose angewiesen ist. Letztere werden benötigt, um die aktive Konformation des Enzyms nach dessen Reduktion wieder herzustellen (Fu et al., 1998).

Eine Überexpression der ATase2 in Kartoffeln könnte zu ähnlichen Veränderungen in der Zelle geführt haben wie in ADK-antisense Kartoffelpflanzen (Oliver et al., 2007). Wie unter 3.1.6.2 gezeigt konnten in Knollen der 35S-ATase2-Überexprimierer ebenfalls keine Änderungen der Gehalte an Glukose, Fruktose und Saccharose beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen an ADK-antisense-Pflanzen stellte sich aber keine Verringerung in den Gehalten von F6P und G6P ein (s. 3.1.6.3). Ebenso ergaben sich auch keine einheitlichen Änderungen in den Gehalten von ADP, ATP und ADP-Glukose. Bis auf die Linien 37 und 44 zeigten die anderen transgenen Linien (40 und 42) Werte auf WT-Niveau. Bei Linie 37 und 44 konnten allerdings größere Gehalte von ATP und ADP gefunden werden (s. 3.1.6.11, Abb. 24). In der Summe waren die Gehalte von ATP und ADP signifikant höher als im WT (s. 3.1.6.11, Abb. 25), was zu einer Aktivierung der AGPase geführt haben könnte. Auf diese Weise könnten sich die tendenziell gestiegenen Stärkegehalte in Knollen erklären lassen. Allerdings sind die Messungen der ATP-, ADP- und ADP-Glukose-Gehalte mit Pflanzen aus nur einer Anzucht durchgeführt worden, welche nach 12 Wochen geerntet wurde. Sie bedürfen also einer Verifizierung evtl. auch zu anderen Zeitpunkten (s.u.). Außerdem korreliert der größere Adenylatpool in den Linien 37 und 44 nicht immer mit einem gestiegenen Stärkegehalt in Knollen bzw. Stärkeertrag pro Pflanze (s. 3.1.6.4 und 3.1.6.6).

In differenzierten Zellen wie z. B. in Knollen am Ende der Speicherphase finden sich nur noch geringe Aktivitäten der Purin-„de novo“-Biosynthese, dafür aber hohe Aktivitäten bei Genen des Purinrecyclings (Smith und Atkins, 2002). Eine enge Regulation der „de novo“-Synthese durch feedback-Inhibition der ATase2 und eine mögliche Regulation nachgeschalteter Gene auf transkriptioneller Ebene (s. 4.1) könnte bedeuten, dass die transgenen Kartoffelpflanzen eventuell nur während der frühen Knollenentwicklung und während der Speicherphase eine Stimulation der

Stärkesynthese durch einen vergrößerten Adenylatpool erfahren. In diesen Phasen ist nämlich die Rate der Purin-„de novo“-Synthese relativ hoch (Smith und Atkins, 2002; Stasolla et al., 2003).

Um weitere Erkenntnisse über die entwicklungsabhängige Stimulation der Stärkesynthese zu gewinnen, müssten Ernten zu früheren Zeitpunkten durchgeführt und der Aktivierungszustand der AGPase festgestellt werden.

Sollte sich der tendenziell gesteigerte Stärkegehalt in Knollen tatsächlich auf einen größeren Aktivierungszustand der AGPase zurückführen lassen, so hätte sich durch diesen Ansatz die Fähigkeit von Knollen, Saccharose zu metabolisieren bzw. Stärke zu synthetisieren, verbessert und damit die *Sink*-Stärke erhöht (Zrenner, 1995).

Anhand der inkonsistenten Ergebnisse ist aber davon auszugehen, dass die Auswirkungen der ATase2-Überexpression auf den Adenylatpool so gering sind, dass die Stärkesynthese allenfalls zu bestimmten Zeiten stimuliert wird, wenn nämlich der Purin-„de novo“-Biosyntheseweg nicht durch die Produkte IMP, AMP und GMP gehemmt wird und die Transkription der am Syntheseweg beteiligten Gene hoch ist. Damit ließe sich auch erklären, warum die Aufnahmeversuche mit ¹⁴C-Glukose (s. 3.1.6.9) und die Messungen der Assimilationsrate sowie der ETR (s. 3.1.6.10) keine Unterschiede im Vergleich zum WT zeigten.

4.1.2 Änderungen in Knollen der B33-ATase2-Überexprimierer

In Kartoffelpflanzen, welche die ATase2 unter Kontrolle des B33-Promotors überexprimieren, konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie bei den 35S-ATase2-Überexprimierern. Auch in diesen Linien ließ sich ein tendenziell höherer Stärkegehalt in Knollen feststellen (s. 3.1.7.4). Allerdings ergab sich auch ein tendenziell geringerer Knollenertrag (s. 3.1.7.5), wodurch sich der Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze verringerte (s. 3.1.7.6). Die Gehalte von Glukose, Fruktose und Saccharose von Knollen sowie deren Gehalte an F6P und G6P waren wie bei den 35S-ATase2-Überexprimierern auf WT-Niveau (s. 3.1.7.2 und 3.1.7.3).

Prinzipiell könnten dort dieselben Mechanismen zu einer stimulierten Stärkesynthese geführt haben wie bei den 35S-ATase2-Überexprimierern (s. 4.1.1). Der in diesen Linien beobachtete tendenziell geringere Knollenertrag ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Verwendung des B33-Promotors zur Expression zurückzuführen. Im nachfolgenden Abschnitt (4.1.3) wird diskutiert, dass die Expression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors zu tendenziell höheren Stärkegehalten in Blättern

führt. So könnte der eventuell gestiegene Bedarf an Assimilaten, in Knollen mit stimulierter Stärkesynthese, gedeckt worden sein, so dass sich normale Knollenerträge einstellten. Bei den B33-Überexprimierern war der Stärkegehalt in Blättern nicht erhöht (s. 3.1.7.4). Eine Stimulation der Stärkesynthese in Knollen war zwar vorhanden, was durch einen tendenziell erhöhten Stärkegehalt pro Frischgewicht belegt wurde, insgesamt bildeten diese Linien jedoch weniger bzw. kleinere Knollen.

Der geringere Knollenertrag pro Pflanze könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Purin-„de novo“-Biosynthese energieaufwendig ist. So werden für die Herstellung eines Moleküls IMP vier ATP benötigt, wobei vier ADP und vier P_i entstehen (s. Abb. 3). Die Bildung von AMP aus IMP erfordert die Hydrolyse eines GTP zu GDP und P_i . Phosphorylierung des AMP zu ADP durch die Adenylatkinase würde die Hydrolyse eines weiteren ATP zu ADP nach sich ziehen. Außerdem wird für die Synthese von PRPP, dem Ausgangssubstrat der Purinbiosynthese, ein ATP zu AMP umgesetzt. Diese Reaktion wird durch die Phosphoribosylpyrophosphatsynthase katalysiert, welche aus Ribulose-5-Phosphat PRPP bildet. In Blättern könnten die bei diesen Reaktionen entstandenen Moleküle ADP durch Photophosphorylierung zu ATP umgewandelt werden. Dies ist in Knollen jedoch nur durch Glykolyse und Respiration möglich, wobei zusätzlich Zucker verbraucht würden. Wenn dann das Blatt nicht in der Lage ist, den dadurch gestiegenen Zuckerbedarf zu decken, könnten in Folge dessen die beobachteten Verringerungen im Knollenertrag pro Pflanze eingetreten sein.

4.1.3 Änderungen in oberirdischen Pflanzenteilen der ATase2-Überexprimierer

Die Blätter der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen zeigten eine Tendenz, mehr transitorische Stärke zu akkumulieren als der WT (s. 3.1.6.7). Auch hier könnten Änderungen im Adenylatpool, analog zur stimulierten Stärkesynthese in Knollen, die Ursache sein (s. 4.1.2). Kolbe et al. zeigten 2005, dass auch in Blättern von *A. th.* die AGPase durch hohe Saccharosekonzentrationen reaktiviert wird. Der Saccharosegehalt wird dort wahrscheinlich über ähnliche Signalkaskaden perzipiert wie in Knollen (s. 4.1.2). Kolbe et al. konnten durch Überexpression der Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase

belegen, dass auch in Blättern die Synthese von T6P im Cytosol zur Signalweiterleitung erforderlich ist (Kolbe et al., 2005). Jedoch konnte in Blättern keine Veränderung bei den Gehalten von Saccharose, Glukose oder Fruktose festgestellt werden, was gegen eine Aktivierung der AGPase durch hohe Saccharosegehalte spricht. Ob in Blättern durch Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors Änderungen im Adenylatpool eingetreten sind, konnte nicht überprüft werden. Messungen von Metaboliten mittels GC/MS lieferten allerdings keine Hinweise darauf (nicht gezeigt). Mittels GC/MS und der verfügbaren Metaboliten-Datenbank ist es zwar prinzipiell möglich Adeningehalte zu bestimmen, jedoch konnten die Gehalte von Adeninnukleotiden damit nicht untersucht werden. Die gemessenen Adeningehalte zeigten keine Änderungen zum WT.

Der größere Energieaufwand der Purin-„de novo“-Biosynthese (s. Abb. 3 + 4.1.2) von AMP und GMP im Vergleich zum Purinrecycling stellt in Blättern kein größeres Problem dar, da im Zuge der Photophosphorylierung ADP zu ATP phosphoryliert werden kann.

Falls in Blättern der transgenen Pflanzen eine ständig höhere Aktivität der Purin-„de novo“-Biosynthese aufgetreten wäre, so hätten Änderungen in der CO₂-Assimilationsrate oder in der ETR festgestellt werden müssen. Da dies nicht der Fall war (s. 3.1.6.10), ist davon auszugehen, dass man durch die bereits erwähnte starke entwicklungsabhängige Regulation der ATase2 bzw. der ihr nachgeschalteten Gene (s. 4.1.1 + 1.2.1), nur zeitweise erhöhte Assimilationsraten bzw. ETR hätte feststellen können. Dennoch wiesen die Blätter der 35S-ATase2-Überexprimierer tendenziell höhere Stärkegehalte auf. Bei diesen Pflanzen ist somit vermutlich nicht nur eine Erhöhung der *Sink*- sondern auch eine Steigerung der *Source*-Stärke aufgetreten. Damit ließe sich erklären, warum die Pflanzen mehr Stärke in Knollen bei gleichem Gewicht der grünen oberirdischen Pflanzenteile (s.3.1.6.8) und gleichem Knollenertrag (s. 3.1.6.5) wie der WT aufwiesen.

Im Gegensatz dazu wiesen die B33-ATase2-Überexprimierer zwar einen tendenziell höheren Stärkegehalt in Knollen auf (s. 3.1.7.4), jedoch stellte sich auch tendenziell ein geringerer Knollenertrag ein (s. 3.2.1.3). Bei diesen Pflanzen wurde zudem ein Trend zu geringeren Stärkegehalten in Blättern festgestellt (s. 3.1.7.5) sowie ein geringeres Gewicht der grünen oberirdischen Pflanzenteile (s. 3.1.7.7).

Vermutlich hat die bereits beschriebene Erhöhung der *Sink*-Stärke (s. 4.1.2) in den Knollen der B33-Überexprimierer deren Bedarf an Assimilaten gesteigert, welcher

aber nicht durch eine erhöhte *Source*-Kapazität ausgeglichen werden konnte. So ist es zwar vermutlich zu einem erhöhten Fluss von Kohlenhydraten in die Knollenstärke gekommen, diese fehlten dann aber in anderen Pflanzenteilen, was zu vermindertem Wachstum der gesamten Pflanze führte.

4.1.4 Fazit

Aufgrund der insgesamt sehr inkonsistenten Ergebnisse beruhen die Erklärungsversuche für die tendenziell aufgetretenen Veränderungen durch die Überexpression der ATase2 größtenteils auf Vermutungen.

Es ist fraglich, ob sich weitere Untersuchungen als lohnend erweisen würden. Für weitere Versuche sollte eine mutierte nicht allosterisch regulierte Form der ATase2 in Kartoffelpflanzen überexprimiert werden, was zumindest eine feedback-Inhibition des Enzyms verhindern würde. Damit stiege die Wahrscheinlichkeit Änderungen im Adenylatpool zu erzielen und somit im Stärkegehalt von Knollen und im Knollenertrag pro Pflanze.

4.2 Die GPT/NTT-Überexprimierer

Die Kartoffelpflanze ist eine der wichtigsten Kulturpflanzen der Welt. Sie tragen zur menschlichen Ernährung bei. Ihre Knollen enthalten hauptsächlich Stärke, die bis zu 80 % des Trockengewichts ausmachen kann (Kruger, 1997). Zusätzlich zur Nahrungsmittelproduktion liefert sie Rohstoffe für die Industrie. So war und ist es nach wie vor ein Ziel der klassischen Pflanzenzüchtung sowie der biotechnologischen Forschung, den Stärkeertrag pro Pflanze zu erhöhen (Martin und Smith, 1995; Smith et al., 1997).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (s. 1.1.5) hängt die Synthese von Stärke in Amyloplasten heterotropher Gewebe im Gegensatz zur Stärkesynthese in Chloroplasten vom Import von Kohlenstoffgrundgerüsten und Energie in Form von ATP ab (Schünemann et al., 1993; Neuhaus et al., 1997).

In Amyloplasten von Knollen sorgt der GPT für den Import von G6P, der NTT für den Import von ATP. G6P stammt aus dem Abbau von Saccharose im Cytosol, durch Aktivitäten der SuSy, der Invertase, der UDP-Glukosepyrophosphorylase (UGPase), der Hexokinase und der PGM. ATP wird in Mitochondrien synthetisiert.

Wie wichtig diese beiden Transporter für die Stärkesynthese sind, belegen unter anderem antisense- und Überexpressions-Experimente in Kartoffelpflanzen (Tjaden, 1998; Zhang et al., 2008; Kapitel 1.1.5). Kartoffelpflanzen, die ein NTT-antisense-Konstrukt unter Kontrolle des 35S-Promotors überexprimierten, zeigten einen verringerten Stärkegehalt in Knollen sowie einen verminderten Knollenertrag im Vergleich zum WT (Tjaden et al., 1998). Überexpression des NTT unter Kontrolle des 35S-Promotors führte zu inkonsistenten Resultaten. Es konnten zwar Linien mit erhöhtem Stärkegehalt in Knollen selektioniert werden, diese wiesen aber im Vergleich zum WT einen geringeren Knollenertrag auf. Deshalb wies lediglich eine dieser Linie einen nichtsignifikanten Zuwachs im Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze auf, der 17 % höher lag als im WT. Darüber hinaus zeigten die transgenen Linien unter bestimmten Wachstumsbedingungen kleineren Wuchs sowie gelbliche und verschrumpelte Blätter (Tjaden et al., 1998).

Um diesen Blattphänotyp zu vermeiden, transformierten Zhang et al. Kartoffelpflanzen mit einem Konstrukt, das den NTT1 aus *A. th.* unter Kontrolle des B33-Promotors exprimiert. In diesen Pflanzen ergaben sich jedoch keine Änderungen im Stärkegehalt von Knollen oder im Knollenertrag pro Pflanze (Zhang et al., 2008). Gleichzeitig wurden auch Pflanzen generiert, die den GPT aus Erbsenwurzeln unter Kontrolle des gleichen Promotors überexprimierten. Auch in diesen transgenen Linien waren keine Änderungen im Stärkegehalt oder im Knollenertrag zu beobachten.

Allerdings führte eine Überexpression des NTT- im GPT-Hintergrund zu einem signifikanten Zuwachs im Stärkegehalt von Knollen und im Knollenertrag pro Pflanze (Zhang et al., 2008; s. 3.2.2.3 + 3.2.2.4). So liegt die Vermutung nahe, dass in WT-Kartoffelpflanzen die Stärkegehalte von Knollen und der Knollenertrag durch die Aktivitäten beider Transporter kontrolliert werden. Die Stärkesynthese erfährt wahrscheinlich durch die Verfügbarkeit der Substrate der AGPase, G1P (über G6P) und ATP eine Limitierung. So könnte eine Reduktion der Aktivität eines der beiden Transporter einen Rückgang im Stärkegehalt und/oder Knollenertrag bewirken. Dies konnte für den NTT bereits gezeigt werden (Tjaden et al., 1998; s.o.). Auch verminderte Aktivitäten des GPT in Knollen führten zu solchen Resultaten, was bei Untersuchungen an GPT-RNAi-Pflanzen (RNA interference) mit reduzierter Aktivität des GPT1 und GPT2 deutlich wurde (Ludewig, pers. Kommunikation).

Wie in Abschnitt 4.1.1 bereits erwähnt, berichteten Regierer et al. (2002) von Kartoffelpflanzen mit reduzierter ADK-Aktivität und erhöhtem Stärkegehalt in Knollen sowie erhöhtem Knollenertrag. Oliver et al. (2008) konnten dies auf einen höheren Aktivierungszustand der AGPase zurückführen, welcher durch einen größeren Adenylatpool und bessere Verfügbarkeit von ATP erreicht wurde.

Vor dem Hintergrund der co-Limitation der Stärkesynthese durch den GPT und den NTT wäre es interessant zu überprüfen, ob in diesen Pflanzen eine pleiotrope Aktivierung des GPT und des NTT stattgefunden hat und im Amyloplasten so mehr Substrate für die Stärkesynthese zur Verfügung standen.

Auch Pflanzen, die eine nicht allosterisch regulierte mutierte Form einer bakteriellen AGPase überexprimieren, müssten dahingehend überprüft werden (Stark et al., 1992). Stark et al. berichteten von einem höheren Stärkegehalt in Knollen dieser Pflanzen.

Die simultane Überexpression beider Transporter (NTT und GPT) führte nicht nur zu Erhöhungen im Stärkegehalt von Knollen und im Knollenertrag sondern änderte auch die Zusammensetzung der Stärke. In den transgenen Linien konnte ein höheres Verhältnis von Amylose zu Amylopektin festgestellt werden, was auf eine bessere Verfügbarkeit von ADP-Glukose dem Substrat der Stärkesynthasen hindeutet. Die granagebundenen Stärkesynthasen (GBSS) sind für die Bildung von Amylose verantwortlich (Visser et al., 1991; Kuipers et al., 1994) und zeigen eine niedrigere Affinität zu ADP-Glukose als ihre löslichen Isoformen, die für die Bildung von Amylopektin verantwortlich sind (Smith et al., 1997). Bei besserer Verfügbarkeit von ADP-Glukose kann dementsprechend mehr Amylose gebildet werden.

Zusammengenommen verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Verfügbarkeit von Substraten der AGPase die Synthese von Stärke, insbesondere die von Amylose, limitiert.

4.2.1 Weitere Untersuchungen aus dem Gewächshaus

Wie bereits unter 3.2.1 erwähnt traten während der Freilandanzuchten der GPT/NTT-Überexprimierer (BGA-Linien) in den Jahren 2006 und 2007 Probleme auf, die erneute Untersuchungen der transgenen Pflanzen im Gewächshaus erforderlich machten.

Im Wesentlichen konnten die Ergebnisse von Zhang et al. (2008) reproduziert werden. Wie erwartet stellten sich in den transgenen Linien keine Änderungen in den

Zucker- oder Stärkegehalten und der Morphologie von Blättern ein, was belegt, dass die Verwendung des B33-Promotors den von Tjaden et al. (1998) beobachteten Blattphänotyp unterbindet (s. 4.2).

Die transgenen Pflanzen besaßen zudem von Beginn der Knollenbildung an einen gesteigerten Knollenertrag (s. 3.2.1.3). Frühere Untersuchungen ergaben lediglich, dass die BGA-Linien nach 10 und 12 Wochen Wachstum im Gewächshaus einen höheren Knollenertrag besitzen (Zhang et al., 2008). Damit einher ging eine wie auch von Zhang et al. beschriebene Steigerung des Gesamtstärkeertrags pro Pflanze, welcher ab der siebten Woche nach dem Transfer der Pflanzen ins Gewächshaus signifikant höher war als im WT.

Durch die Untersuchungen im Gewächshaus sollte die Möglichkeit evaluiert werden, die transgenen Pflanzen früher zu ernten als den WT, ohne Verluste im Knollen- oder Stärkeertrag hinzunehmen. Zumindest bei Anzuchten im Gewächshaus wäre dies möglich. Ausgehend vom Stärkeertrag (s. 3.2.1.4) pro Pflanze könnten die transgenen Kartoffelpflanzen bis zu zwei Wochen früher geerntet werden als der WT, der für den selben Stärkeertrag pro Pflanze ein bis zwei Wochen längeres Wachstum benötigt.

Die im Freiland beobachtete früher einsetzende Seneszenz (s. 4.2.2) trat auch im Gewächshaus auf und konnte mittels PAM-Fluorometrie (s. 2.5.6) gemessen werden. Die Ursachen dafür sind aber nach wie vor unklar.

Kooman et al. (1996) untersuchten den Einfluss der Temperatur auf die Seneszenz und fanden widersprüchliche Effekte. Einerseits konnten sie feststellen, dass hohe Temperaturen meistens die Seneszenz beschleunigen, andererseits fanden sie aber heraus, dass hohe Temperaturen die *Sink*-Stärke von Knollen herabsetzen konnten, was gleichzeitig die Seneszenz verlangsamte. Obwohl im Gewächshaus moderate Temperaturen herrschen, könnte trotzdem vermutet werden, dass in Knollen mit gesteigerter *Sink*-Stärke die Auswirkungen dieser Effekte schwächer ausfallen als im WT und so frühere Seneszenz beobachtet werden kann. Jedenfalls ist auszuschließen, dass veränderte Zuckergehalte in Blättern für die verfrüht einsetzende Seneszenz verantwortlich sind (Quirino et al., 2000), da keine Änderungen in den Gehalten der gemessenen Zucker beobachtet werden konnten (s. 3.2.1.1).

Im Gegensatz zu Untersuchungen im Freiland (s. 4.2.2) zeigten die Pflanzen ab der siebten Woche nach dem Transfer ins Gewächshaus ein signifikant höheres Gewicht

ihrer grünen oberirdischen Pflanzenteile. Aufgrund der erhöhten *Sink*-Stärke von Knollen dieser Pflanzen wäre eigentlich das Gegenteil zu erwarten gewesen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei den B33-ATase2-Überexprimierer diskutiert (s. 4.1.3). Daraus lässt sich schließen, dass die Versorgung von Knollen mit Assimilaten nicht limitiert ist, wenn die Pflanzen im Gewächshaus angezogen werden. Dennoch könnten die unter 4.1.3 diskutierten Gründe für ein schlechteres Pflanzenwachstum im Freiland zutreffend sein, da die äußeren Bedingungen wie Belichtung, Wasser- und Nährstoffversorgung sowie Temperatur und Tageslänge dort nicht wie im Gewächshaus kontrollierbar sind (s. 4.2.2).

Größere Frischgewichte der oberirdischen Pflanzenteile könnten u. a. durch ein verbessertes Wurzelwachstum und der damit verbundenen besseren Versorgung der Pflanze mit Wasser und Nährstoffen begründet sein. Der B33-Promotor ist auch schwach in Wurzeln aktiv. Eine Überexpression des NTT und GPT hätte dort zu Veränderungen führen können, die nicht in die Überlegungen zum Pflanzenwachstum miteinbezogen wurden.

Durch Untersuchungen der Wurzeltrockengewichte konnten jedoch Änderungen im Wurzelwachstum vorläufig ausgeschlossen werden (s. 3.2.1.7). Eventuell treten Änderungen im Wurzelwachstum aber nur unter bestimmten Bedingungen auf, wenn z. B. Wasserdefizite oder Probleme mit der Durchlüftung des Bodens eintreten. Folglich müssten weitere Versuchsreihen unter verschiedenen Bedingungen z. B. mit unterschiedlicher Düngung oder Bewässerung durchgeführt werden.

4.2.2 Die Freilandanzuchten in den Jahren 2006 und 2007

Im Gegensatz zu Anzuchten im Gewächshaus zeigten Freilandanzuchten der GPT/NTT-Überexprimierer, wie unter 3.2.2 und 3.2.3 dargestellt, keine Erhöhungen im Stärkegehalt von Knollen und im Knollenertrag. Im Freiland konnten sogar leicht reduzierte Stärkegehalte in Knollen und geringere Knollenerträge beobachtet werden, was im Vergleich der beiden Anzuchten im Jahr 2007 (3.2.3.3 und 3.2.3.4) deutlicher ausfiel als 2006 (3.2.2.3 und 3.2.2.4). Letzteres ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die dritte Ernte im Jahr 2007 generell geringere Knollenerträge aufwies als die im Jahr 2006 und so Unterschiede stärker ausgeprägt waren. 2006 wurden pro Pflanze durchschnittlich 2,5 kg Knollen gebildet (s. 3.2.2.4), im Jahr 2007 hingegen nur ca. 1,5 - 2 kg (s. 3.2.3.4). Der Unterschied im Knollenertrag zwischen den beiden Jahren war wahrscheinlich zu einem in den unterschiedlichen

klimatischen Verhältnissen dieser beiden Jahre begründet (s. u. und Anhang), zum anderen aber auch in der Vorgehensweise bei den drei Ernten 2007. 2007 wurde 12, 15 und 22 Wochen nach der Aussaat der Knollen geerntet, wobei jeweils die fünf bzw. zehn (Ernte 3) augenscheinlich am besten gewachsenen Pflanzen ausgewählt wurden. Zur dritten Ernte nach 22 Wochen waren dementsprechend nur noch die zehn Pflanzen auf dem Acker, welche während der Wachstumsperiode den schlechtesten Wuchs aufwiesen. Zudem war es in den beiden vorhergegangenen Ernten nicht zu vermeiden, dass einige Pflanzen durch Abknicken von Sprossen beschädigt wurden. Die gleichen Argumente könnten auch die Unterschiede im durchschnittlichen Stärkegehalt von Knollen 2006 und 2007 erklären. 2006 zeigten die Knollen durchschnittlich 800 - 1000 $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht (s. 3.2.2.3), 2007 nur ca. 600 $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht (s. 3.2.3.3).

Was die beobachteten Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem WT im Freiland sowie im Gewächshaus anbelangt, müssen mehrere Argumente in Betracht gezogen werden. Zur Untersuchung dieser Unterschiede mussten erneute Analysen im Gewächshaus durchgeführt werden (s. 3.2.1).

Die im Freiland beobachtete und im Gewächshaus bestätigte früher einsetzende Seneszenz der transgenen Linien könnte dazu geführt haben, dass die Knollen der transgenen Linien ihre Speicherphase früher beendeten und so der WT mehr Stärke in Knollen akkumulieren konnte. Eine Expression der Isopentenyltransferase (IPT) unter Kontrolle des SAG12-Promotors (Seneszenz assoziiertes Gen) könnte dem entgegenwirken. Der SAG12-Promotor ist ausschließlich in seneszenten Blättern aktiv (Gan und Amasino, 1995). IPT ist das Eingangsenzym der Cytokinin-Biosynthese. IPT-Expression unter Kontrolle des SAG12-Promotors führte in transgenen Tomaten zu einer unterdrückten Seneszenz und leicht größeren Früchten (Swartzberg et al., 2006). Die Verwendung des SAG12 Promotors hat dabei den Vorteil, dass er durch Cytokinine autoreguliert wird und so nur bei einsetzender Seneszenz aktiv ist. Expression der IPT wirkt der Seneszenz durch vermehrte Bildung von Cytokinin entgegen, was zu einer Inhibition der SAG12 Transkription führt.

Einen größeren Einfluss auf den Stärkegehalt von Knollen und den Knollenertrag könnte das bei den transgenen Pflanzen generell beobachtete schlechtere Wachstum im Freiland ausgeübt haben (s. 3.2.3.5). Bereits nach 12 Wochen konnte bei den transgenen Linien ein signifikant geringeres Frischgewicht der oberirdischen

Pflanzenteile gemessen werden, was mit einem Rückgang im Knollenertrag korrelierte (s. 3.2.3.4). Dieser Unterschied lag bis zur letzten Ernte nach 22 Wochen vor. So besteht Grund zur Annahme, dass die transgenen Pflanzen über die Wachstumsperiode hinweg weniger CO₂ assimilierten und es deshalb zu geringeren Erträgen kam als im WT.

Außerdem hat die Art der Vermehrung einen Einfluss auf die Pflanzenentwicklung. Für Anzuchten im Gewächshaus wurden die Kartoffelpflanzen in Gewebekultur klonal vermehrt und als Stecklinge in Töpfe mit Erde umgesetzt. Für Freilandanzuchten wurden im Kühlraum gelagerte und bereits vorgekeimte Knollen ausgesät. Aus Knollen wachsen generell mehrere Sprosse aus, die für die Bildung der Knollenmasse verantwortlich sind. Deshalb sind die im Freiland gewachsenen Pflanzen allgemein größer als die im Gewächshaus angezogenen. Im Gewächshaus konnte aus Platzmangel nur ein Spross an der Pflanze verbleiben, während alle anderen aus den Stolonen erwachsenen Sprosse ausgegeizt (entfernt) wurden. Außerdem wurde das Wachstum der Pflanzen und der Knollen durch die Topfgröße limitiert.

Falls die Überexpression des GPT und des NTT Änderungen im Keimungsverhalten der Knollen bewirkt hat, könnte dies eine Erklärung für den beobachteten schlechteren Wuchs sein. Das Keimungsverhalten der transgenen Knollen wurde bisher jedoch nicht untersucht und könnte Gegenstand zukünftiger Analysen sein. Ein erhöhter Fluss von Kohlenhydraten in die Stärke könnte z. B. die Synthese von Patatin gestört haben. Patatine sind Glykoproteine, die während der Knollenentwicklung akkumulieren und wichtig für die Keimung sind (Hannapel, 1991; Ewing und Struik, 1992).

Wie in 3.2.3.6 gezeigt bildeten die transgenen Pflanzen unter Freilandbedingungen wesentlich weniger und auch kleinere Früchte als der WT. Somit ist anzunehmen, dass die transgenen Linien auch im Freiland einen erhöhten Fluss von Assimilaten in die Knolle aufweisen. Eine gesteigerte *Sink*-Stärke von Knollen könnte dazu führen, dass andere *Sinks*, wie z. B. die Früchte und Blüten, mit Assimilaten unterversorgt sind und deshalb schlechter ausgebildet werden. Um zu testen, ob eine erhöhte *Sink*-Stärke mit einer Änderung der Gehalte von ADP-Glukose, dem Substrat der Stärkesynthasen, bzw. den Gehalten der Substrate des NTT, ATP und ADP, korreliert, wurden die entsprechenden Substanzen mittels HPLC gemessen. Es konnten jedoch keine signifikanten Änderungen in den Gehalten von ADP-Glukose,

ATP und ADP festgestellt werden (s. 3.2.3.7). Dies schließt jedoch eine erhöhte *Sink*-Stärke nicht aus, da vermutlich der bereits erwähnte schlechtere Wuchs und die verfrüht eintretende Seneszenz für den geringeren Stärkegehalt von Knollen und den geringeren Knollenertrag in den transgenen Pflanzen verantwortlich sind.

Ein weiterer Faktor, der bei Anzuchten im Freiland nicht außer Acht gelassen werden darf, ist das Vorhandensein von Mykorrhiza, welche im Gewächshaus durch Verwendung steriler Erde nicht auftreten. Dieser Pilz liefert der Pflanze Phosphat, Nitrat, K^+ und Wasser und wird von der Pflanze mit Kohlenhydraten versorgt. Somit bilden auch Mykorrhiza metabolische *Sinks*, die mit anderen *Sinks* um Assimilate konkurrieren (Heldt, 2003, Bucher, pers. Kommunikation). Wie weit die Mykorrhizierung im Freiland reichte, oder ob überhaupt eine Symbiose bestand, konnte nicht untersucht werden.

Vermutlich trugen auch die klimatischen Verhältnisse der Jahre 2006 und 2007 zur beobachteten Diskrepanz zwischen Gewächshaus- und Freilandanzuchten bei. Wie aus denen im Anhang dargestellten Klimadiagrammen zu entnehmen ist (s. Anhang, Abb. 59 - 61), waren die klimatischen Verhältnisse in den beiden Jahren der Freilandanzuchten unterschiedlich. Die durchschnittlichen Tageshöchsttemperaturen lagen im Jahr 2006 relativ hoch (s. Abb. 59 A) und im Jahr 2007 deutlich niedriger (s. Abb. 59 B). Die gemessenen Niederschläge dagegen fielen im Jahr 2007 deutlich höher aus als im Jahr 2006 (s. Abb. 60 A und B), was mit der Anzahl an Sonnenstunden pro Tag korrelierte (s. Abb. 61 A und B). Beide Jahre waren im Durchschnitt durch relativ extreme Wetterlagen gekennzeichnet. Der Sommer 2006 war für eine normale Entwicklung der Kartoffeln viel zu warm und es fiel zu wenig Niederschlag. Der Sommer 2007 war insgesamt zu kalt und es regnete zu häufig. Hinzu kommt die bereits erwähnten (s. 3.2.2.1), für den Anbau von Kartoffelpflanzen schlecht geeignete Bodenqualität, so dass davon auszugehen ist, dass in diesen Jahren keine repräsentativen Ergebnisse produziert werden konnten.

4.2.3 Vorläufige Untersuchungsergebnisse von GPT/NTT/ATase2-Überexprimierern

Die GPT/NTT/ATase2-Überexprimierer wurden durch Transformation einer *PsGPT*-überexprimierenden Linie (BG1, Zhang et al., 2008) mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt und dem B33-pBin::NTT-Konstrukt erzeugt. Für die BG1-Linie wurde durch Zhang et al. (2008) bereits die Insertion des GPT-Gens ins Genom der Pflanze sowie eine gesteigerte Aktivität des GPT nachgewiesen.

Durch Selektion auf Kanamycin wurden doppelt positiv transformierte Linien gefunden. In diesen Linien konnte die Insertion und Expression des NTT und der ATase2 durch RT-PCR (s. 2.4.2.5) nachgewiesen werden (s. 3.2.4.1). Ob die Transkripte der beiden Transgene auch funktionelle Genprodukte besitzen, bleibt noch zu überprüfen.

Wie für die von Zhang et al. (2008) bereits beschriebenen BGA-Linien wurden auch für die in diesem Abschnitt beschriebenen transgenen GNA-Linien die Gehalte von Glukose, Fruktose und Saccharose in Blättern (s. 3.2.4.2) und deren Stärkegehalte (s. 3.2.4.3) bestimmt. Signifikante Änderungen in den genannten Gehalten konnten bei ihnen nicht festgestellt werden. Auch die Zuckergehalte von Knollen waren unverändert im Vergleich zum WT (s. 3.2.4.4). Die Ergebnisse entsprechen also denen der BGA-Linien 24, 31 und 32 (Zhang et al., 2008) und denen der ATase2-Überexprimierer (s. 3.1.6.7). Da für die Untersuchung der GNA-Linien bisher nur eine Ernte durchgeführt werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass sich beim Vergleich mehrerer Ernten eine Tendenz zu höheren Blattstärkegehalten einstellt, wie es bei den 35S-ATase2-Überexprimierern der Fall war.

Bei den Stärkegehalten von Knollen konnten ebenfalls keine signifikanten Änderungen beobachtet werden (s. 3.2.4.5). Weder die GNA-Linien noch die GN-Linien 122 und 134 noch die Linie BGA31, welche als Kontrolle analysiert wurden, zeigten die erwarteten signifikanten Unterschiede zum WT. In dieser Ernte konnte bei den transgenen Pflanzen lediglich eine Tendenz festgestellt werden, größere Stärkegehalte in Knollen zu besitzen.

Auch der Knollenertrag der untersuchten Linien zeigte keine signifikanten Änderungen im Vergleich zum WT, was aber auf den relativ hohen Standardfehler bei den Messungen am WT zurückgeführt wurde. Der Knollenertrag der transgenen Linien lag in etwa auf dem gleichen Niveau, welches höher war als beim WT. Erst Berechnungen des Stärkeertrages von Knollen pro Pflanze zeigten die erwarteten

eindeutigen Unterschiede zwischen transgenen Linien und WT (s. 3.2.4.6). Bei den transgenen Linien konnten keine Unterschiede zwischen GPT/NTTT/ATase2- (GNA-Linien) und GPT/NTT-Überexprimierern (GN-Linien) festgestellt werden.

Eine Überexpression der ATase2 im Hintergrund einer GPT/NTT-Überexpression (GNA-Linien) bewirkte also keine Unterschiede im Vergleich zum WT, welche über die einer simultanen Überexpression des GPT und des NTT (BGA-Linien + GN-Linien)) hinausgingen.

Die beobachteten Unterschiede zwischen ATase2-Überexprimierern und WT (s. 3.1.6) sind wahrscheinlich zu gering, um im GPT/NTT-Überexpressions-Hintergrund aufzufallen.

Die festgestellten Änderungen in den GNA-Linien sind also eindeutig auf die Überexpression des GPT und NTT zurückzuführen und durch die unter 4.2.1 bis 4.2.3 diskutierten bzw. durch die von Zhang et al. (2008) dargelegten Hintergründe zu erklären.

Die bei diesem Ansatz erzeugten GN-Linien 122 und 134, welche nur den GPT und den NTT überexprimieren, könnten nach Bestätigung einer erhöhten NTT-Aktivität als Kontrollen für die GPT/NTT-Überexprimierer (BGA-Linien) bzw. als weitere transgene Pflanzen dieses Ansatzes dienen.

4.2.4 Fazit

Überexpression des *PsGPT* und des *AtNTT1* in Kartoffelknollen führt zu signifikanten Steigerungen im Stärkegehalt von Knollen und des Knollenertrags pro Pflanze, wenn die Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus angezogen wurden. Der daraus berechnete Stärkeertrag pro Pflanze lag bis zu 43 % höher als im WT (s. 3.2.1.4).

Bei Freilandanzuchten der transgenen Linien konnten jedoch keine Ertragssteigerungen bei Kartoffelknollen beobachtet werden (s. 3.2.2.4 und 3.2.3.4). Dies konnte auf eine verfrüht eintretende und schneller verlaufende Seneszenz (s. 3.2.1.5) sowie allgemein schlechteres Wachstum (s. 3.2.3.5) zurückgeführt werden. Wie weit das Wurzelwachstum der transgenen Pflanzen und das Keimungsverhalten ihrer Knollen damit zusammen hängen, konnte nicht geklärt werden. Es bleibt abzuwarten, ob eine Überexpression des IPT-Gens unter Kontrolle des SAG12-Promotors im Hintergrund einer GPT/NTT-Überexpression Änderungen im Verlauf der Seneszenz und damit am Pflanzenwachstum insgesamt bewirkt.

Überexpression der ATase2 im GPT/NTT-Hintergrund (GNA-Linien) führte zu keiner Veränderung im Stärkegehalt von Knollen oder des Knollenertrags im Vergleich zum WT, die über die Änderungen in GPT/NTT-Überexprimierer (BGA- und GN-Linien) hinausgingen. Die Auswirkungen auf den Stärkegehalt von Blättern und Knollen sowie im Stärkeertrag pro Pflanze, wie sie für die 35S-ATase2-Überexprimierer festgestellt wurden, sind also zu gering, um im Hintergrund einer GPT/NTT-Überexpression zum Tragen zu kommen.

Gerade im GPT/NTT-Hintergrund wäre die Expression einer mutierten allosterisch nicht regulierbaren Form der ATase2 interessant, da Purine Bestandteile der Cytokinine darstellen. Analog zu Expression des IPT-Gens unter Kontrolle des SAG12-Promotors, könnte auch eine gesteigerte Cytokinin Synthese in Folge eines erhöhten Purinpools, der beobachteten frühen Seneszenz der BGA-Linien entgegenwirken.

5. Literaturverzeichnis

- Appeldoorn N. J. G., de Bruijn, S. M., et al. (1997).** "Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberisation of potato." *Planta* 202(2): **220-226**.
- Ausubel, F. M., Brent, R., et al. (1997).** *Current Protocols in Molecular Biology*. New York.
- Barker, L., Kuhn, C., et al. (2000).** "SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements." *Plant Cell* 12(7): 1153-1164.
- Baluska, F., Cvrckova, F., et al. (2001).** "Sink Plasmodesmata as Gateways for Phloem Unloading. Myosin VIII and Calreticulin as Molecular Determinants of Sink Strength?" *Plant Physiol.* 126(1): **39-46**.
- Baunsgaard, L., Lutken, H., et al. (2005).** "A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in Arabidopsis." *Plant J* 41(4): **595-605**.
- Bergmeyer, H. U. (1970).** *Methoden der enzymatischen analyse*. Weinheim, Verlag Chemie Weinheim.
- Boldt R. und Zrenner, R. (2003).** "Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants." *Physiologia Plantarum* 117(3): **297-304**.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: **248-54**.
- Chung, C. T. and Miller, R. H. (1993).** "Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells." *Methods Enzymol* 218: **621-7**.
- Critchley, J. H., Zeeman, S. C., et al. (2001).** "A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis." *Plant J* 26(1): **89-100**.
- Delatte, T., Umhang, M., et al. (2006).** "Evidence for Distinct Mechanisms of Starch Granule Breakdown in Plants." *J. Biol. Chem.* **281**(17): 12050-12059.
- DeWitt, N. D. and Sussman, M. R. (1995).** "Immunocytological Localization of an Epitope-Tagged Plasma Membrane Proton Pump (H⁺-ATPase) in Phloem Companion Cells." *Plant Cell* 7(12): **2053-2067**.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., et al. (2000).** "Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence." *Journal of Molecular Biology* 300(4): **1005-1016**.
- Ewing, E.E. and Struik, P.C. 1992.** "Tuber formation in potato: induction, initiation and growth". *Hort. Rev.* 14, pp. **89-197**.

- Fernie, A. R., Roessner, U., et al. (2001).** "The Sucrose Analog Palatinose Leads to a Stimulation of Sucrose Degradation and Starch Synthesis When Supplied to Discs of Growing Potato Tubers." *Plant Physiol.* 125(4): **1967-1977**.
- Fettke, J., Poeste S., et al. (2005).** "Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme." *Plant Cell Physiol* 46(12): **1987-2004**.
- Fincher, G. B. (1989).** "Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: **305-346**.
- Flügge, U. I. and Heldt, H. W. (1991).** "Metabolite Translocators of the Chloroplast Envelope." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42(1): 129-144.
- Frommer, W. B. and Sonnewald, U. (1995).** "Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species." *J. Exp. Bot.* 46(6): **587-607**.
- Fu, Y., Ballicora, M. A., et al. (1998).** "Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase." *J Biol Chem* 273(39): **25045-52**.
- Gan, S. and Amasino, R. M. (1995).** "Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin." *Science* 270(5244): **1986-8**.
- Geigenberger, P., Reimholz, R., et al. (1997).** "Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit." *Planta* 201(4): **502-518**.
- Geigenberger, P., Reimholz, R., et al. (1999).** "Decreased expression of sucrose phosphate synthase strongly inhibits the water stress-induced synthesis of sucrose in growing potato tubers." *The Plant Journal* 19(2): **119-129**.
- Geigenberger, P. and Stitt, M. (2000).** "Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and AGPS transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase." *The Plant Journal* 23(6): **795-806**.
- Geigenberger, P., Stamme, C., et al. (2001).** "Tuber Physiology and Properties of Starch from Tubers of Transgenic Potato Plants with Altered Plastidic Adenylate Transporter Activity." *Plant Physiol.* 125(4): **1667-1678**.
- Geigenberger, P. (2003).** "Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers." *J. Exp. Bot.* 54(382): **457-465**.
- Geigenberger, P., Regierer, B., et al. (2005).** "Inhibition of de Novo Pyrimidine Synthesis in Growing Potato Tubers Leads to a Compensatory Stimulation of the Pyrimidine Salvage Pathway and a Subsequent Increase in Biosynthetic Performance." *Plant Cell* 17(7): **2077-2088**.

- Geiger, D. R. and Servaites, J. C. (1994).** Diurnal Regulation of Photosynthetic Carbon Metabolism in C3 Plants. 45: **235-256**.
- Genty, B., Briantais, J. M. und Baker, N. R. (1989).** "The relationship between the quantum yield of photosynthetic transport and quenching of chlorophyll fluorescence." Biochim. Biophys. Acta 990: **87-92**.
- Girke, T., Todd, J., et al. (2000).** "Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds." Plant Physiol 124(4): **1570-81**.
- Graan, T. and Ort, D. R. (1984).** "Quantitation of the rapid electron donors to P700, the functional plastoquinone pool, and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts." J Biol Chem 259(22): **14003-10**.
- Greiten, C. (2004).** "Analyse putativer Transmembranproteine von *Arabidopsis thaliana*, deren Gene durch Zucker dereguliert werden, und Überexpression der ATase2 aus *Arabidopsis thaliana* in *Solanum tuberosum*." Diplomarbeit, unveröffentlicht
- Häusler, R. E., Fischer K., et al. (2000).** "Determination of low-abundant metabolites in plant extracts by NAD(P)H fluorescence with a microtiter plate reader." Anal Biochem 281(1): **1-8**.
- Haink, G. and Deussen, A. (2003).** "Liquid chromatography method for the analysis of adenosine compounds." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 784(1): **189-93**.
- Hannapel, D. J. (1991).** "Characterization of the early events of potato tuber development." Physiologia Plantarum 83(4): **568-573**.
- Heldt, H. W., Chon, C. J., et al. (1977).** "Role of Orthophosphate and Other Factors in the Regulation of Starch Formation in Leaves and Isolated Chloroplasts." Plant Physiol 59(6): **1146-1155**.
- Heldt, H. W., Flügge, U. I., et al. (1991).** "Diversity of Specificity and Function of Phosphate Translocators in Various Plastids." Plant Physiol 95(2): **341-343**.
- Heldt, H. W. (2003).** Pflanzenbiochemie. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Hendriks, J. H., Kolbe, A. et al., (2003).** "ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species." Plant Physiol 133(2): **838-49**.
- Herz S, Eberhard S, Bacher A. 2000.** Biosynthesis of riboflavin in plants. The ribA gene of Arabidopsis thaliana specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4- dihydroxy-2-butanone 4-phosphat synthase. Phytochemistry 53:**723-31**

- Hung, W. F., Chen, L. J., et al. (2004).** "Characterization of Arabidopsis glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase-deficient mutants." *Plant Physiol* 135(3): **1314-23**.
- Ito, T., Shiraishi, H., et al. (1994).** "Two amidophosphoribosyltransferase genes of Arabidopsis thaliana expressed in different organs." *Plant Molecular Biology* 26(1): **529-533**.
- Kammerer, B., Fischer, K., et al. (1998).** "Molecular Characterization of a Carbon Transporter in Plastids from Heterotrophic Tissues: The Glucose 6-Phosphate Phosphate Antiporter." *Plant Cell* 10(1): **105-118**.
- Kampfenkel, K., Möhlmann, T., et al. (1995).** "Molecular characterization of an Arabidopsis thaliana cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants." *FEBS Letters* 374(3): **351-355**.
- Kessler, F., Blobel, G., et al. (1994).** "Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery." *Science* 266(5187): **1035-9**.
- Kötting, O., Pusch, K., et al. (2005).** "Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in Arabidopsis leaves. The phosphoglucan, water dikinase." *Plant Physiol* 137(1): **242-52**
- Kolbe, A., Tiessen, A., et al. (2005).** "Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31): **11118-23**.
- Kooman, P. L., Fahem, M., et al. (1996).** "Effects of climate on different potato genotypes 2. Dry matter allocation and duration of the growth cycle." *European Journal of Agronomy* 5(3-4): **207-217**.
- Krause, G. H. and Weis, E. (1991).** "Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42(1): **313-349**.
- Kruger, N. J. (1997).** "Plant metabolism. Carbohydrate synthesis and degradation". Addison Wesley Longman Limited. 2: **83-102**.
- Kühn, C., Franceschi, V. R., et al. (1997).** "Macromolecular Trafficking Indicated by Localization and Turnover of Sucrose Transporters in Eucleate Sieve Elements." *Science* 275(5304): **1298-1300**.
- Kühn, C. (2003).** "A Comparison of the Sucrose Transporter Systems of Different Plant Species." *Plant Biology*(3): **215-232**.
- Kühn, C., Hajirezaei, M.-R., et al. (2003).** "The Sucrose Transporter StSUT1 Localizes to Sieve Elements in Potato Tuber Phloem and Influences Tuber Physiology and Development." *Plant Physiol.* 131(1): **102-113**.

- Kuipers, A. G. J., Jacobsen, E., Visser, R.G.F. (1997).** "Antisense Technologies: A practical approach. Application of antisense technology in plants". C. P. Litchenstein, Nellen, W.: **191-219**.
- Lalonde, S., Boles, E., et al. (1999).** "The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing." *Plant Cell* 11(4): **707-26**.
- Lao, N. T., Schoneveld, O., et al. (1999).** "An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase." *Plant J* 20(5): **519-27**.
- Lerchl, J., Geigenberger, P., et al. (1995).** "Impaired Photoassimilate Partitioning Caused by Phloem-Specific Removal of Pyrophosphate Can Be Complemented by a Phloem-Specific Cytosolic Yeast-Derived Invertase in Transgenic Plants." *Plant Cell* 7(3): **259-270**.
- Leroch, M., Kirchberger, S., et al. (2005).** "Identification and Characterization of a Novel Plastidic Adenine Nucleotide Uniporter from *Solanum tuberosum*." *J. Biol. Chem.* 280(18): **17992-18000**.
- Liu, Y. G., Mitsukawa, N., et al. (1995).** "Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR." *Plant J* 8(3): **457-63**.
- Linka, N., Hurka, H., et al. (2003).** "Phylogenetic relationships of non-mitochondrial nucleotide transport proteins in bacteria and eukaryotes." *Gene*, 306, **27-35**.
- Loef, I., Stitt, M., et al. (2001).** "Increased levels of adenine nucleotides modify the interaction between starch synthesis and respiration when adenine is supplied to discs from growing potato tubers." *Planta* 212(5): **782-791**.
- Lu, Y. and Sharkey, T. (2004).** "The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells." *Planta* 218(3): **466-473**.
- Lu, Y. and Sharkey, T. (2006).** "The importance of maltose in transitory starch breakdown." *Plant, Cell & Environment* 29(3): **353-366**.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982).** „Molecular cloning a laboratory manual.“ Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Martin, C. and Smith, A. M. (1995).** "Starch biosynthesis." *Plant Cell* 7(7): 971-85.
- Moffatt, B. A. and Ashihara, H. (2002).** "Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and Metabolism." *The Arabidopsis Book*.
- Morell, M. K., Bloom, M., et al. (1987).** "Subunit Structure of Spinach Leaf ADPglucose Pyrophosphorylase." *Plant Physiol* 85(1): **182-187**.
- Möhlmann, T., Tjaden, J., et al. (1998).** "Occurrence of two plastidic ATP/ADP transporters in Arabidopsis thaliana molecular characterisation and comparative structural analysis of similar ATP/ADP translocators from plastids and Rickettsia prowazekii". *Eur J Biochem* 252: **353-359**

- Neuhaus, H. E. and Stitt, M. (1990).** "Control analysis of photosynthate partitioning." *Planta* 182(3): **445-454**.
- Neuhaus, H.E., Thom. E., et al. (1997).** "Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana*" *The Plant Journal* 11(1): **73-82**.
- Neuhaus, H. E. and Emes, M. J. (2000).** "Nonphotosynthetic metabolism in plastids." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51(1): **111-140**.
- Niittyla, T., Messerli, G., et al. (2004).** "A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves." *Science* 303(5654): **87-9**.
- Okita, T. W., Nakata, P. A., et al. (1990).** "The Subunit Structure of Potato Tuber ADPglucose Pyrophosphorylase." *Plant Physiol* 93(2): **785-790**.
- Oliver, S. N., Tiessen, A., et al. (2008).** "Decreased expression of plastidial adenylate kinase in potato tubers results in an enhanced rate of respiration and a stimulation of starch synthesis that is attributable to post-translational redox- activation of ADP-glucose pyrophosphorylase." *J. Exp. Bot.*: **erm 312**.
- Olsen, L. J., Theg, S. M., et al. (1989).** "ATP is required for the binding of precursor proteins to chloroplasts." *J Biol Chem* 264(12): **6724-9**.
- Oparka, K. J. (1986).** "Phloem unloading in the potato tuber. Pathways and sites of ATPase." *Protoplasma* 131(3): **201-210**.
- Oparka, K. J. and Prior, D. A. M. (1988).** "Movement of Lucifer Yellow CH in potato tuber storage tissues: A comparison of symplastic and apoplastic transport." *Planta* 176(4): **533-540**.
- Oparka, K. J. and Turgeon, R. (1999).** "Sieve Elements and Companion Cells—Traffic Control Centers of the Phloem." *Plant Cell* 11(4): **739-750**.
- Oparka, K. J. and Roberts, A. G. (2001).** "Plasmodesmata. A Not So Open-and-Shut Case." *Plant Physiol.* 125(1): **123-126**.
- Özcan, S., Dover, J., et al. (1996).** "Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(22): 12428-12432.
- Preiss, J. (1988).** *The biochemistry of plants*. San Diego, Academic Press.
- Preiss, J., Ball, K., et al. (1991).** "Starch biosynthesis and its regulation." *Biochem Soc Trans* 19(3): **539-47**.
- Quirino, B. F., Noh, Y. S., et al. (2000).** "Molecular aspects of leaf senescence." *Trends Plant Sci* 5(7): **278-82**.

- Rebora, K., Desmoucelles, C., et al. (2001):** Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol Cell Biol* 21(23): **7901-7912**
- Regierer, B., Fernie, A. R., et al. (2002).** "Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants." *Nat Biotechnol* 20(12): **1256-60**.
- Reinders, A., Schulze, W., et al. (2002).** "Protein-Protein Interactions between Sucrose Transporters of Different Affinities Colocalized in the Same Eucleate Sieve Element." *Plant Cell* 14(7): **1567-1577**.
- Reynolds, P. H., Blevins, D. G., et al. (1984).** "5-Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from soybean root nodules: kinetic and regulatory properties." *Arch Biochem Biophys* 229(2): **623-31**.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., et al. (1992).** "Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast." *Embo J.* 11(13): **4705-13**.
- Ritte, G., Lorberth, R., et al. (2000).** "Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules." *Plant J* 21(4): **387-91**.
- Ritte, G., Lloyd, J. R., et al. (2002).** "The starch-related R1 protein is an $\hat{I}\pm$ -glucan, water dikinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(10): **7166-7171**.
- Ritte, G., Heydenreich, M., et al. (2006).** "Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases." *FEBS Lett* 580(20): **4872-6**.
- Roberts and Oparka (2003).** "Plasmodesmata and the control of symplastic transport." *Plant, Cell & Environment* 26(1): **103-124**.
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., et al. (1989).** "Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene." *Embo J* 8(1): **23-29**.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., et al. (1988).** "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): **487-491**.
- Saiki, R. K., Scharf, S. et al., (1985).** "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230(4732): **1350-1354**.
- Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975).** "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." *J Mol Biol* 94(3): **441-8**.
- Sauer, N. (2007).** "Molecular physiology of higher plant sucrose transporters." *FEBS letters* 581(12): **2309-2317**.

- Scheidig, A., Fröhlich, A., et al. (2002).** "Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves." *The Plant Journal* 30(5): **581-591**.
- Schnell, D. J., Blobel, G., et al. (1997).** "A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope." *Trends Cell Biol* 7(8): **303-4**.
- Schreiber, U., Schliwa, U., et al. (1986).** "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer." *Photosynthesis Research* 10(1): **51-62**.
- Schunemann, D., Borchert, S., et al. (1993).** "ADP/ATP Translocator from Pea Root Plastids (Comparison with Translocators from Spinach Chloroplasts and Pea Leaf Mitochondria)." *Plant Physiol.* 103(1): **131-137**.
- Schweer, H. (1982).** "Gas chromatography-mass spectrometry of aldoses as omethoxime, o- 2-methyl-2-propoxime and o-n-butoxime pertrifluoroacetyl derivatives on OV-225 with methylpropane-4 as ionization agent." *J. Chromatogr.* 236: **355-360**.
- Senecoff, J. F., McKinney, E. C., et al. (1996).** "De Novo Purine Synthesis in *Arabidopsis thaliana* (II. The PUR7 Gene Encoding 5[prime]-Phosphoribosyl-4-(N- Succinocarboxamide)-5-Aminoimidazole Synthetase Is Expressed in Rapidly Dividing Tissues)." *Plant Physiol.* 112(3): **905-917**.
- Smith, A. M., Denyer, K., et al. (1995).** "What Controls the Amount and Structure of Starch in Storage Organs?" *Plant Physiol* 107(3): **673-677**.
- Smith, A. M., Denyer, K., et al. (1997).** "The Synthesis of the Starch Granule." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: **67-87**.
- Smith, A. M., and Atkins C. A. (2002).** "Purine Biosynthesis. Big in Cell Division, Even Bigger in Nitrogen Assimilation." *Plant Physiol.* 128(3): **793-802**.
- Smith, A. M., Zeeman, S. C., et al. (2005).** "Starch degradation." *Annu Rev Plant Biol* 56: **73-98**.
- Sonnewald, U., Basner, A., et al. (1995).** "A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis." *Plant Mol Biol* 27(3): **567-76**.
- Sowokinos, J. R. (1981).** "Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*: II. CATALYTIC PROPERTIES AND REGULATION OF ADP-GLUCOSE AND UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE ACTIVITIES IN POTATOES." *Plant Physiol* 68(4): **924-929**.
- Stark, D.M., Timmerman, K.P., et al. (1992)** "Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase." *Science*, 258, **287-292**.

- Stasolla, C., Katahira, R., et al. (2003).** "Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants." *Journal of Plant Physiology* 160(11): **1271-1295**.
- Stitt, M., Herzog, B., et al. (1984).** "Control of Photosynthetic Sucrose Synthesis by Fructose 2,6-Bisphosphate : I. Coordination of CO₂ Fixation and Sucrose Synthesis." *Plant Physiol* 75(3): **548-553**.
- Stitt, M., Kurzel, B., et al. (1984).** "Control of Photosynthetic Sucrose Synthesis by Fructose 2,6-Bisphosphate : II. Partitioning between Sucrose and Starch." *Plant Physiol* 75(3): **554-560**.
- Stitt, M. (1987).** "Fructose 2,6-Bisphosphate and Plant Carbohydrate Metabolism." *Plant Physiol* 84(2): **201-204**.
- Stitt, M. (1989).** "Product Inhibition of Potato Tuber Pyrophosphate:Fructose-6-Phosphate Phosphotransferase by Phosphate and Pyrophosphate." *Plant Physiol* 89(2): **628-633**.
- Stitt, M., Lilley, R. M., et al. (1989).** "Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves." *Methods in Enzymology*, Academic Press. 174: **518-552**.
- Stitt, M., Quick, W. P. (1989).** "Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation." *Physiologia Plantarum* 77(4): **633-641**.
- Swartzberg, D., Dai, N., et al. (2006).** "Effects of Cytokinin Production under Two SAG Promoters on Senescence and Development of Tomato Plants." *Plant Biology* 8(5): **579-586**.
- Theg, S. M., Bauerle C., et al. (1989).** "Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes." *J Biol Chem* 264(12): **6730-6**.
- Tiessen, A., Hendriks, J. H., et al. (2002).** "Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply." *Plant Cell* 14(9): **2191-213**.
- Tiessen, A., Prescha, K., et al. (2003).** "Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers." *Plant J* 35(4): **490-500**.
- Tjaden, J., Möhlmann, T., et al. (1998).** "Altered plastidic ATP ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch." *The Plant Journal* 16(5): **531-540**.

- Trethewey, R. N., Geigenberger, P., et al. (1998).** "Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis." *The Plant Journal* 15(1): 109-118.
- Turner, R. J., Bonner, E. R., et al. (1998):** Purification and characterization of *Bacillus subtilis* PyrR, a bifunctional pyr mRNA-binding attenuation protein/uracil phosphoribosyltransferase." *J Biol Chem* 273(10): 5932-5938
- van Bel, A., Gamalei, Y., et al. (1992).** "Dissimilar phloem loading in leaves with symplasmic or apoplasmic minor-vein configurations." *Planta* 186(4): 518-525.
- van Bel, A. (2003).** "The phloem, a miracle of ingenuity." *Plant, Cell & Environment* 26(1): 125-149.
- van der Graaff, E., Hooykaas, P., et al. (2004).** "Molecular analysis of "de novo" purine biosynthesis in solanaceous species and in *Arabidopsis thaliana*." *Front Biosci* 9: 1803-16.
- Viola, R., Roberts, A. G., et al. (2001).** "Tuberization in Potato Involves a Switch from Apoplastic to Symplastic Phloem Unloading." *Plant Cell* 13(2): 385-398.
- Visser, R. G., Somhorst, I., et al. (1991).** "Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs." *Mol Gen Genet* 225(2): 289-96.
- Vreugdenhil, D., Ed. (2007).** *Potato Biology and Biotechnology - Advances and Perspectives* -. Amsredam, Elsevier.
- Weiner, H., Stitt, M., Heldt H. W. (1987).** "Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves." *Biochimica et biophysica acta* 893(1): 13-21.
- Weise, A., Barker, L., et al. (2000).** "A New Subfamily of Sucrose Transporters, SUT4, with Low Affinity/High Capacity Localized in Eucleate Sieve Elements of Plants." *Plant Cell* 12(8): 1345-1356.
- Weise, S. E., Schrader, S. M., et al. (2006).** "Carbon Balance and Circadian Regulation of Hydrolytic and Phosphorolytic Breakdown of Transitory Starch." *Plant Physiol.* 141(3): 879-886.
- Wolf, D. D., Pearce, R. B., et al. (1969).** Measuring Photosynthesis of Attached Leaves with Air Sealed Chambers. 9: 24-27.
- Yu, T. S., Zeeman, S. C., et al. (2005).** "alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves." *J Biol Chem* 280(11): 9773-9.
- Yu, Y., Mu, H. H., et al. (2001a).** "Identification of the Maize Amyloplast Stromal 112-kD Protein as a Plastidic Starch Phosphorylase." *Plant Physiol.* 125(1): 351-359.

- Zamski, E., Schnaffer, A.A. (1996).** Photoassimilate, Distribution Plants and Crops. New York, Decker.
- Zeeman, S. C., Umemoto, T., et al. (1998).** "A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyglycogen." *Plant Cell* 10(10): **1699-712**.
- Zeeman, S. C., Thorneycroft D., et al. (2004).** "Plastidial α -Glucan Phosphorylase Is Not Required for Starch Degradation in Arabidopsis Leaves But Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress." *Plant Physiol.* 135(2): **849-858**.
- Zeeman, S. C., Delatte, T., et al. (2007).** "Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms." *Functional Plant Biology* 34(6): **465- 473**.
- Zhang, L., Häusler, R. E., Greiten, C., et al. (2008).** "Overriding the co-limiting import of carbon and energy into tuber amyloplasts increases the starch content and yield of transgenic potato plants." *Plant Biotechnology Journal* 6(5): **453-464**.
- Zrenner, R., Salanoubat, M., et al. (1995).** "Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants *Solanum tuberosum*." *The Plant Journal* 7(1): **97-107**.
- Zrenner, R., Stitt, M., et al. (2006).** "Pyridin and Purine biosynthesis and degradation in plants." *Annual Review of Plant Biology* 57(1): **805-836**.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abb. Aus Lu und Sharkey (2006), Hypothetischer Weg des Stärkeabbaus.	5
Abbildung 2: Schema der Stärkesynthese in Amyloplasten.....	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Purin-„de novo“- Biosyntheseweges. 14	
Abbildung 4: Chloroplasten der <i>atd2</i> -Mutante. Bilder von Eric van der Graaff et al., 2004	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der bei der Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose auftretenden Reaktionen.)	44
Abbildung 6: 2 % Agarose-Gel mit amplifizierten Fragmenten der ESTs an der „de novo“-Synthese von IMP beteiligter Enzyme.....	59
Abbildung 7: Gelbild der colony-PCR auf transformierte Agrobakterien.....	60
Abbildung 8: Northern blots mit aus Blättern extrahierter RNA, welcher mit einer Sonde für die ATase2 hybridisiert wurde.....	61
Abbildung 9: Northern blot mit aus Knollen extrahierter RNA, welcher mit einer Sonde für die ATase2 hybridisiert wurde.....	61
Abbildung 10: ATase-Aktivität in Blattextrakten der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen.....	62
Abbildung 11: ATase-Aktivität in Knollenextrakten der mit dem B33-pBin::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen.....	63
Abbildung 12: Zuckergehalte in Blättern der dritten (A) und sechsten (B) Blatttage in mmol pro m ² Blattfläche.....	64
Abbildung 13: Gehalte von Glukose und Saccharose von Kartoffelknollen in µmol pro g Frischgewicht (Fg).....	65
Abbildung 14: F6P- und G6P-Gehalt in Kartoffelknollen in nmol pro g Frischgewicht (Fg).....	66
Abbildung 15: Stärkegehalte von Kartoffelknollen der mit dem 35S-pGWB2::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen in µmol C ₆ units pro g Frischgewicht (Fg).....	68
Abbildung 16: Knollenertrag in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze.	70
Abbildung 17: Stärkeertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze in mmol C ₆ units pro Pflanze.	72
Abbildung 18: Stärkegehalte von Blättern in mmol C ₆ units pro m ² Blattfläche.	74

Abbildung 19: Gewichte der grünen oberirdischen Pflanzenteile in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze.....	76
Abbildung 20: ^{14}C -Glukose-Aufnahme in die lösliche Fraktion von Knollenscheiben.	77
Abbildung 21: ^{14}C -Glukose-Aufnahme in die unlösliche Fraktion von Knollenscheiben.	78
Abbildung 22: CO_2 -Assimilationsrate von Kartoffelblättern in μmol assimiliertem CO_2 pro m^2 Blattfläche und Sekunde.	79
Abbildung 23: Elektronentransportrate von Kartoffelblättern in μmol pro m^2 Blattfläche und Sekunde.....	80
Abbildung 24: Gehalte von ADP-Glukose, ADP und ATP in Kartoffelknollen in nmol pro g Frischgewicht (Fg).....	81
Abbildung 25: Gesamtgehalte von ADP und ATP von Kartoffelknollen in nmol pro g Frischgewicht.....	82
Abbildung 26: Zuckergehalte von Blättern in mmol pro m^2 Blattfläche. 15-19: Nummerierung der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Kartoffelpflanzen.....	83
Abbildung 27: Zuckergehalt in Kartoffelknollen in μmol pro g Frischgewicht (Fg)...	84
Abbildung 28: F6P- und G6P-Gehalte in Knollen in mmol pro g Frischgewicht (Fg).	85
Abbildung 29: Stärkegehalte von Kartoffelknollen pro Pflanze in $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht (Fg).....	86
Abbildung 30: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze. 15-19: Nummerierung der mit dem B33-pBIN::ATase2-Konstrukt transformierten Pflanzen.	88
Abbildung 31: Stärkeertrag von Knollen in mmol C_6 units pro Pflanze.	89
Abbildung 32: Gewichte der grünen oberirdischen Pflanzenteile in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze.....	91
Abbildung 33: Zuckergehalte im 30 %-Blatt in mmol pro m^2 Blattfläche. A: Glukosegehalte während der Wachstumsphase; B: Fruktosegehalte während der Wachstumsphase; C: Saccharosegehalte während der Wachstumsphase.....	93
Abbildung 34: Zuckergehalte im 50%-Blatt in mmol pro m^2 Blattfläche. A: Glukosegehalte während der Wachstumsphase; B: Fruktosegehalte während der Wachstumsphase; C: Saccharosegehalte während der Wachstumsphase.....	95

Abbildung 35: Zuckergehalte in 70%-Blättern in mmol pro m ² Blattfläche. A: Glukosegehalte während der Wachstumsphase; B: Fruktosegehalte während der Wachstumsphase; C: Saccharosegehalte während der Wachstumsphase.....	96
Abbildung 36: Stärkegehalte in Blättern während der Wachstumsphase in mmol C ₆ units pro m ² . A: Stärkegehalte im 30%-Blatt; B; Stärkegehalte im 50%-Blatt; C: Stärkegehalte im 70%-Blatt	97
Abbildung 37: Knollenertrag der B33-GPT/NTT-Überexprimierer in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze über einen Untersuchungszeitraum von 6 Wochen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von n = 5 Einzelmessungen ± Standardfehler. * = signifikant mit p < 0,05.....	98
Abbildung 38: Stärkeertrag von Kartoffelknollen der B33-GPT/NTT-Überexprimierer in mmol C ₆ units pro Pflanze über einen Untersuchungszeitraum von 5 Wochen. .	100
Abbildung 39: Gesamtchlorophyllgehalte in mg pro m ² Blattfläche und F _v /F _m -Verhältnisse für einen Untersuchungszeitraum von 7 Wochen. A: Gesamtchlorophyllgehalt im 30 %-Blatt; B: Gesamtchlorophyllgehalt im 50 %-Blatt; C: Gesamtchlorophyllgehalt im 70 %-Blatt; D: F _v /F _m -Verhältnis im 30 %-Blatt; E: F _v /F _m -Verhältnis im 50 %-Blatt; F: F _v /F _m -Verhältnis im 70 %-Blatt.....	102
Abbildung 40: Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze. WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von n = 5 Einzelmessungen ± Standardfehler.	103
Abbildung 41: Trockengewichte von Wurzeln und Stolonen in g Trockengewicht.(Tg) pro Pflanze.....	104
Abbildung 42: Schematische Darstellung des Versuchsfeldes im Jahr 2006.	106
Abbildung 43: Zuckergehalte in Kartoffelknollen (A) und Gesamtzucker-Gehalt (B) in µmol pro g Frischgewicht des Freilandversuchs im Jahr 2006.	107
Abbildung 44: Stärkegehalt in Kartoffelknollen der GPT/NTT-Überexprimierer in µmol C ₆ units pro g Frischgewicht des Freilandversuchs im Jahr 2006.....	108
Abbildung 45: Knollenertrag und Gesamtstärkeertrag pro Pflanze des Freilandversuchs im Jahr 2006 A: Knollenertrag in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze; B: Gesamtstärkeertrag von Knollen in mol C ₆ units pro Pflanze.....	109
Abbildung 46: Fruchtertrag pro Pflanze (A) und Gewicht pro Frucht (B) bei Freilandanzuchten im Jahr 2006 in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze bzw. Frucht.	110
Abbildung 47: Schematische Darstellung des Versuchsfeldes im Jahr 2007.	112

Abbildung 48: Zuckergehalte in Kartoffelknollen aus den Freilandanzuchten im Jahr 2007 zu den unterschiedlichen Erntezeitpunkten in μmol pro g Frischgewicht (Fg);	113
Abbildung 49: Stärkegehalte in Kartoffelknollen aus Freilandanzuchten im Jahr 2007 zu den unterschiedlichen Erntezeitpunkten in $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht (Fg).....	114
Abbildung 50: Knollenertrag und Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze aus Freilandanzuchten im Jahr 2007. A: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht. B: Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze in mmol C_6 units pro Pflanze.	115
Abbildung 51: Gewichte der oberirdischen Pflanzenteile aus Freilandanzuchten im Jahr 2007 in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze	117
Abbildung 52: Fruchtertrag pro Pflanze (A) und Gewicht pro Frucht (B) bei Freilandanzuchten im Jahr 2007 in g Frischgewicht (Fg) pro Pflanze bzw. Frucht. WT: Wildtyp; * = signifikant ($p < 0,05$); E1: Ernte nach 12 Wochen; E2: Ernte nach 15 Wochen; Werte sind Mittelwerte aus $n = 5$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.....	118
Abbildung 53: Gehalte von ADP-Glukose (ADP-Glc), ADP und ATP in Kartoffelknollen, in nmol pro g Frischgewicht (Fg). WT: Wildtyp; Die Werte sind Mittelwerte von $n = 8$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.....	119
Abbildung 54: Nachweis der Insertion des ATase2- und des NTT-Gens durch RT-PCR.....	121
Abbildung 55: Zuckergehalte in Blättern in μmol pro m^2 Blattfläche.	123
Abbildung 56: Stärkegehalte von Blättern in mmol pro m^2 Blattfläche.....	124
Abbildung 57: Stärkegehalte von Kartoffelknollen in $\mu\text{mol C}_6$ units pro g Frischgewicht.....	125
Abbildung 58: Knollenertrag und Stärkeertrag von Knollen pro Pflanze; A: Knollenertrag pro Pflanze in g Frischgewicht. B: Stärkeertrag pro Pflanze in mmol C_6 units pro Pflanze.....	126
Abbildung 59: Höchsttemperaturen während der Wachstumsperiode 2006 (A) und 2007 (B) in $^{\circ}\text{C}$	169
Abbildung 60: Niederschlag während der Wachstumsperiode 2006 (A) und 2007 (B) in mm pro m^2	169
Abbildung 61: Sonnenstunden während der Wachstumsperiode 2006 (A) und 2007 (B) in h pro Tag.....	169

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der verwendeten Antibiotika und deren Konzentrationen.....18

Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren sowie deren Herkunft und Resistenzen.....19

Tabelle 2.3: Zusammenstellung der Bezeichnungen der verwendete Oligonukleotide und der Gene oder Genfragmente, die mit ihnen amplifiziert wurden. Außerdem sind die Primersequenzen und deren Anlagerungstemperaturen hier aufgeführt.....20

Tabelle 3.1: Enzyme des „de novo“-Purin-Biosyntheseweges, deren Gene und EST Id sowie das Gewebe, in denen die ESTs exprimiert wurden.....58

8. Abkürzungsverzeichnis

α -32P-dATP	dATP mit radioaktiv markierter ersten Phosphatgruppe
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
μ	mikro
μ Ci	Mikrocurie
μ E	μ mol Photonen * m^{-2} * s^{-1} (mikro-Einstein)
Ω	Ohm
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
$\frac{1}{2}$ MS	halbkonzentriertes MS-Medium
32 P	radioaktives Phosphorisotop mit einem Atomgewicht von 32
3 MS	dreifach konzentriertes MS-Medium
A	Absorption
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
amu	Atomic Mass Unit, 1 amu = 1 Da
ATase	Amidophosphoribosyltransferase
<i>A. th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bidest. und bd.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CaMV	Blumenkohl (Cauliflower) Mosaik Virus
cDNA	copyDNA
cm	Zentimeter
CoA	Koenzym A
cv.	Cultivar

d	Strecke, die Licht durch eine Lösung zurücklegt
DCMU	3-(3,4-dichlorphenyl)-1-1-dimethyl-urea
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiotheritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETR	(photosynthetische) Elektronentransportrate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tag
et al.	und andere
F	Farad
F6P	Fruktose-6-Phosphat
Fa.	Firma
Fg	Frischgewicht
Fru	Fruktose
fwd.	engl. forward
g	Gramm
G6P	Glukose-6-Phosphat
GBSS	granagebunde Stärke-Synthase
GC/MS	kombinierte Gaschromatograf / Massenspektrometer Einheit
GDP	Guanosindiphosphat
Glk	Glukose
GMP	Guanosinmonophosphat
GPT	Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin
INV	Invertase
HPLC	high performance liquid chromatography
IMP	Inosinmonophosphat
IRGA	Infrarot-Gasanalysator
kb	Kilobasen

kLUX	Kilolux
l	Liter
LB	Luria/Bertani (Medium für Bakterienkultur)
M	Molar (mol/l)
MCS	Mehrfachklonierungsstelle (multiple cloning site)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
m	Meter
mA	Milliampere
MES	4-Morpholinoethan-sulfonsäure
min	Minute
MOPS	4-morpholinopropan-sulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
ms	Millisekunde
MS-Medium	Murashige & Skoog-Medium
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Messungen
N	Stickstoff
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NTT	Nukleosidtriphosphat-Translokator
OD _x	optische Dichte (Koeffizient gibt die Wellenlänge des Lichtes an)
p	piko
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung (radiation)
PCI	Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol
PCR	polymersae-chain-reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Ionen-Konzentration
P _i	anorganisches Phosphat
PGM	Phosphoglukomutase

ppm	Konzentrationsangabe: Teile pro Million Teile
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
RB	Laufpuffer (RNA-Gel)
rev-	eng. reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat- Carboxylase/Oxygenase
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
s. o.	siehe oben
SSC	Sodium Chloride / Sodium Citrate
<i>S. t.</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
s. u.	siehe unten
Suc	Saccharose
SuSy	Saccharosesynthase
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-DNA
Tg	Trockengewicht
THF	Tetrahydrofolat
TMS	Trimethylsilyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche

v/v	Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
y x g	y-fache Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$)
z.B.	zum Beispiel

9. Anhang

9.1 Klimadaten für die Jahre 2006 und 2007

Die folgenden Klimadaten wurden von der Wetterstation am Köln/Bonner Flughafen gemessen und sind der Datenbank von Wetter-Online (www.wetter-online.de) entnommen (Abb. 59 bis 61).

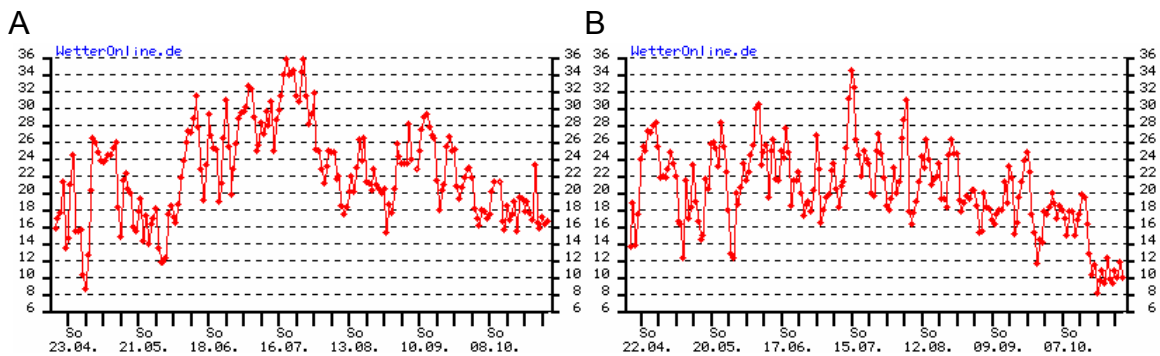


Abbildung 59: Höchsttemperaturen während der Wachstumsperiode 2006 (A) und 2007 (B) in °C

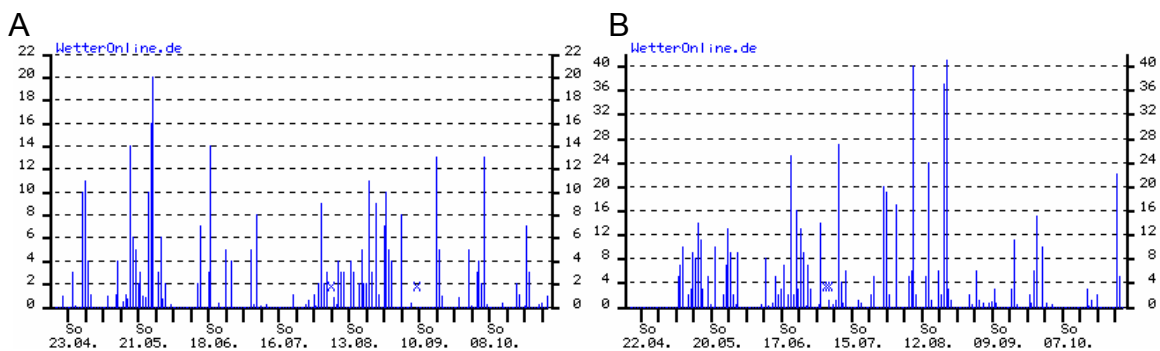


Abbildung 60: Niederschlag während der Wachstumsperiode 2006 (A) und 2007 (B) in mm pro m²

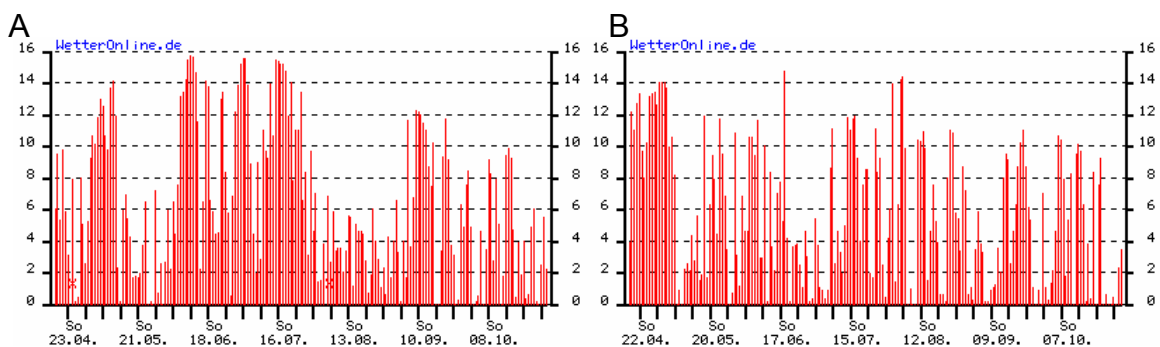


Abbildung 61: Sonnenstunden während der Wachstumsperiode 2006 (A) und 2007 (B) in h pro Tag

10. Kurzzusammenfassung und Abstract

10.1 Kurzzusammenfassung

Die Kartoffelpflanze ist eine der wichtigsten Kulturpflanzen der Welt. Ihre Knollen enthalten hauptsächlich Stärke, die bis zu 80 % des Trockengewichts ausmachen kann. Zusätzlich zur Nahrungsmittelproduktion liefert sie Rohstoffe für industrielle Applikationen. So war und ist es nach wie vor ein Ziel der klassischen Pflanzenzüchtung sowie der biotechnologischen Forschung, den Stärkeertrag pro Pflanze zu erhöhen.

Ein Bestandteil der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen von biotechnologisch veränderten Kartoffelpflanzen, welche die ATase2 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle des 35S-CaMV- (Cauliflower Mosaic Virus) oder des B33-Patatin-Promotors überexprimierten.

Einen weiteren Bestandteil stellte die Analyse von Freilandanzuchten bereits beschriebenen (Zhang et al., 2008) transgener Kartoffelpflanzen mit erhöhter GPT- und NTT-Aktivität in ihren Knollen dar.

Beide Ansätze verfolgten das Ziel, Erhöhungen im Stärkegehalt und/oder im Ertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze zu bewirken.

Eine Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des 35S-Promotors konnte im Vergleich zum WT lediglich tendenziell erhöhte Stärkegehalte in Kartoffelknollen und Blättern bewirken. Es traten keine signifikanten Änderungen im Knollenertrag pro Pflanze auf.

Überexpression der ATase2 unter Kontrolle des B33-Promotors hatte ebenfalls nur tendenziell erhöhte Stärkegehalte von Knollen zur Folge, was jedoch zu Lasten des Knollenertrags pro Pflanze ging.

Kartoffelpflanzen mit erhöhter GPT- und NTT-Aktivität in ihren Knollen zeigten bei Anzuchten im Gewächshaus signifikante Steigerungen im Stärkegehalt und im Ertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze im Vergleich zum WT. Bei Freilandanzuchten wiesen die transgenen Pflanzen jedoch eine leichte Verringerung im Stärkegehalt und im Ertrag von Kartoffelknollen pro Pflanze auf. Darüber hinaus zeigten sie insgesamt schlechteres Wachstum der oberirdischen Pflanzenteile und früher einsetzende Seneszenz. Die Ursachen der Unterschiede zwischen Gewächshaus- und Freilandanzuchten konnte nicht abschließend geklärt werden.

10.2 Abstract

Potato plants are one of the most important crops in the world. Potato tubers mainly contain starch, which constitutes up to 80 % of their dry weight. In addition to food production potato plants deliver resources for industrial applications. So it has ever been an aim of classical breeding and biotechnological research to improve the starch content and yield of potato tubers.

One part of this treatise was the analysis of biotechnologically modified potato plants which overexpressed the ATase2 from *Arabidopsis thaliana* under control of the 35S-CaMV- (Cauliflower Mosaic Virus) or of the B33-Patatin-promotor.

Another part was the analysis of field trials with potato plants exhibiting an increased GPT- and NTT-activity in their tubers which had already been described (Zhang et al., 2008).

Both approaches had the ambition to increase the starch content and/or the tuber yield per plant.

Overexpression of ATase2 under control of the 35S-promotor merely caused trends to result in higher starch contents in tubers and leaves. Significant changes in tuber yield per plant did not emerge.

Overexpression of ATase2 under control of the B33-promotor caused trends to result in higher tuber starch contents as well, at the expense of tuber yield per plant, however.

Potato plants with increased GPT- and NTT-activity in tubers grown in the greenhouse exhibited significant increases in tuber starch contents and tuber yield in comparison with the WT.

In case field trials, however, the starch content and the yield of tubers per plant were slightly reduced. Moreover they exhibited a worse growth of the aerial parts of the plant and an earlier senescence. The reasons for these differences between greenhouse and field trials could not be finally clarified.

11. Danksagungen und Formalia

11.1 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich bei all denen zu bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. U.- I. Flügge für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren.

Bei Frau Prof. Dr. S. Waffenschmidt bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Frau Prof. Dr. K. Schnetz danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Frank Ludewig für seine ständige Ansprechbarkeit und große Hilfe bei den Laborarbeiten, sowie für diverse Exkursionen zu anderen Forschungseinrichtungen und die damit verbundenen langen „Arbeitstage“.

Dem Gärtnereiteam danke ich für die Betreuung meiner Kartoffelpflanzen.

Natürlich gilt auch meiner Familie ganz besonderer Dank für die nicht hoch genug einzuschätzende Unterstützung während des gesamten Studiums und in den letzten Tagen vor dem Abgabetermin der Arbeit.

Auch möchte ich mich bei den „Jungs“ (Dr. H. Fahnenstich, H.-H. Kunz, Dr. F. Ludewig, Dr. M. Girth, M. Engqvist,) für die meist sehr kreative Gestaltung der Feierabende bedanken.

Natürlich geht auch ein großes Dankeschön an den Rest der Arbeitsgruppe Flügge und besonders an die Technischen Assistenten für die Organisation vieler schöner Abende im Kreis der Kollegen.

Aber ganz besonders möchte ich mich bei Sabrina dafür bedanken, dass sie immer da war und mich unterstützte, wo immer sie nur konnte. Danke!

11.2 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Universität zu Köln sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge betreut worden.

Christian Greiten

Köln, Dezember 2008

11.3 Lebenslauf

Christian Greiten

Taubengasse 19

50676 Köln

Telefon: 0174 9838561

e-mail: christiangreiten@gmx.de

Geburtsdatum: 02.01.1978

Geburtsort: Siegen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

08/1984 – 07/1988 Katholische Grundschule Kirchhudem - Welschen Ennest

08/1988 – 07/1997 Städtisches Gymnasium Olpe, Abitur

08/1997 – 09/1998 Zivildienst am Ketteler Cardijn Werk Kirchhudem

10/1998 – 11/2004 Studium der Biologie an der Universität zu Köln, Diplom
Hauptfach: Botanik
Nebenfächer: Genetik, Biochemie
Diplomarbeit in der AG Prof. Dr. U.-I. Flügge mit dem
Thema: „Analyse putativer Transmembranproteine von
Arabidopsis thaliana, deren Gene durch Zucker dereguliert
werden, und Überexpression der ATase2 aus *Arabidopsis
thaliana* in *Solanum tuberosum*.“

seit 02/2005 Wissenschaftliche Hilfskraft / Wissenschaftlicher
Mitarbeiter am Bot. Inst., AG Flügge und Promotion

Köln, den 17.12.2008