

# **Erkennung von Regulationssequenzen für die Transkription in heterologen Systemen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Ing. (FH) Daniela Jacob

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. M. Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner  
2. Prof. Dr. Bernd Appel  
3. Priv.-Doz. Dr. Thomas Pickardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2003

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Bedeutung der Übertragung heterologer Regulationssequenzen für die Risikobewertung gentechnisch veränderter Organismen .....	1
1.2 Regulationssequenzen der Transkriptionsinitiation .....	5
1.2.1 Transkriptionsinitiation in Prokaryonten.....	6
1.2.2 Transkriptionsinitiation in Eukaryonten.....	11
1.2.2.1 Der Core-Promotor der RNA-Polymerase II in Pflanzen .....	18
1.2.3 Transkriptionsinitiation in Plastiden .....	20
1.3 In der vorliegenden Arbeit untersuchte Promotoren.....	24
1.4 Ziel der Arbeit.....	27
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits .....	28
2.1.1 Chemikalien.....	28
2.1.2 Enzyme und Kits.....	28
2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Pflanzen.....	29
2.2.1 Verwendete Bakterienstämme .....	29
2.2.2 Klonierungsvektoren .....	29
2.2.3 Vorhandene Promotorkonstrukte .....	30
2.2.4 Promotorderivate, Reportergene .....	31
2.2.5 Pflanzen .....	32
2.3 Nährmedien und Kulturbedingungen .....	32
2.4 Stammhaltung .....	33
2.5 Primer .....	33
2.5.1 Primer zur Herstellung der pflanzenspezifischen Promotoren.....	34
2.5.2 Primer zur Herstellung der bakteriellen Promotoren.....	34
2.5.3 Primer zur Herstellung der Chloroplasten Promotoren.....	35
2.5.4 Primer für die 5´-RACE.....	36
2.5.5 Primer für die ortsspezifische Mutagenese des ST-LS1-Promotors.....	37

2.5.6 Primer für die quantitative RT-PCR (Taq®Man).....	38
2.5.7 Primer zur Sondenherstellung für die Northern Hybridisierung.....	38
2.5.8 Sequenzierprimer, Primer für die Direkt-PCR.....	39
2.6 DNA-Techniken.....	40
2.6.1 Plasmid-Isolierungstechniken.....	40
2.6.2 DNA-Aufreinigungstechniken.....	40
2.6.3 Fluorometrische DNA-Konzentrationsbestimmung .....	41
2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.6.5 Enzymatische Reaktionen.....	41
2.6.5.1 DNA-Restriktion.....	41
2.6.5.2 Alkalische Phosphatase Behandlung.....	42
2.6.5.3 Auffüllreaktion mit Klenow-Enzym .....	42
2.6.5.4 Ligation .....	43
2.6.6 Transformation.....	43
2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
2.6.7.1 PCR zur Amplifizierung definierter Promotorsequenzen .....	44
2.6.7.2 Direkt-PCR .....	45
2.6.7.3 Megaprimer PCR .....	45
2.6.7.4 Sondenherstellung mittels PCR .....	47
2.6.8 Sequenzierung.....	48
2.7 RNA-Techniken.....	48
2.7.1 RNA-Isolierung.....	48
2.7.2 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	49
2.7.3 RNA-Gelelektrophorese .....	49
2.7.4 Northern Hybridisation und Visualisierung .....	50
2.7.5 Bestimmung des Transkriptionsstarts mittels 5'-RACE .....	50
2.7.6 TaqMan® Universal RT-PCR .....	52
2.8 Lumineszenz-Messung.....	54
2.9 Nachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase.....	55
2.10 Biolistischer Gentransfer .....	55
2.10.1 Vorbereitung der Microcarrier .....	56
2.10.2 Gold-Coating-Ansatz.....	56
2.10.3 Vorbereitung der Pflanzen.....	56
2.10.4 Partikelbombardement.....	56

2.10.5 Gus-Nachweis .....	57
<b>3 Ergebnisse und Auswertung .....</b>	<b>58</b>
3.1 Untersuchung der pflanzenspezifischen Promotoren in Eubakterien .....	58
3.1.1 Klonierungsarbeiten .....	60
3.1.1.1 Herstellung der pBin-Konstrukte und Transformation in <i>E. coli</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>P. putida</i> und <i>Acinetobacter</i> sp. BD413 .....	60
3.1.1.2 Herstellung der pKK-Konstrukte und Transformation in <i>E. coli</i> .....	66
3.1.1.3 Klonierung der <i>HaeIII</i> -Restriktionsfragmente des ST-LS1-Promotors in pKK232-8 und Transformation in <i>E. coli</i> .....	71
3.1.2 Computer-gestützte Sequenzanalyse der pflanzenspezifischen Promotoren.....	73
3.1.2.1 Computer-gestützte Suche nach prokaryontischen Promotor Konsensus Sequenzen .....	73
3.1.2.2 Bestimmung des AT-Gehalts.....	76
3.1.3 Genexpressionsbestimmungen.....	79
3.1.3.1 Genexpressionsbestimmung mittels Lumineszenzmessung.....	79
3.1.3.2 Nachweis der Transkriptmenge mittels TaqMan® Universal PCR.....	85
3.1.3.3 Nachweis der Genexpression mittels Northern Hybridisierung .....	86
3.1.3.4 Nachweis der phänotypischen Ausprägung eines Antibiotikumresistenzgens durch Aktivität pflanzenspezifischer Promotoren in Bakterien .....	88
3.1.4 Transkriptionsstartbestimmung ausgewählter Promotoren mittels 5'-RACE.....	91
3.1.4.1 Bestimmung des Transkriptionsstarts des ST-LS1-Promotors.....	92
3.1.4.2 Bestimmung des Transkriptionsstarts des CaMV 35S-Promotors .....	96
3.1.4.3 Bestimmung des Transkriptionsstarts des Nos-Promotors.....	97
3.1.4.4 Bestimmung des Transkriptionsstarts des KST1-Promotors.....	98
3.1.5 Mutagenese des ST-LS1-Promotors .....	99
3.1.5.1 Ortsspezifische Mutagenese des ST-LS1-Promotors.....	101
3.1.6 Ermittlung der Expressionsstärke der mutagenisierten ST-LS1-Promotor-Derivate durch Messung der Luziferase-Aktivität .....	102
3.1.7 Untersuchung der Transkripte der mutagenisierten ST-LS1-Promotoren.....	105
3.1.8 Herstellung von pBi101.2-Konstrukten mit mutagenisierten ST-LS1-Promotoren ....	106
3.1.8.1 Klonierungsarbeiten .....	106
3.1.9 Partikelbombardement von <i>N. tabacum</i> .....	108
3.1.9.1 Genexpressionsbestimmungen der mutagenisierten ST-LS1-Promotoren .....	108
3.2 Untersuchung von bakteriellen und Plastiden Promotoren in <i>N. tabacum</i> .....	110

3.2.1 Herstellung von pBi101.2-Konstrukten mit den bakteriellen und Plastiden Promotoren .....	110
3.2.2 Sequenzanalyse der bakteriellen und Plastiden Promotoren .....	112
3.2.2.1 Computer-gestützte Suche nach eukaryontischen Promotor Konsensus Sequenzen in den untersuchten bakteriellen und Plastiden Promotoren .....	112
3.2.3 Partikelbombardement von <i>N. tabacum</i> .....	114
3.2.3.1 Genexpressionsbestimmung der bakteriellen und Plastiden Promotoren .....	114
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>116</b>
4.1 Spezifität von Promotorsequenzen.....	116
4.2 Identifizierung von Promotorsequenzen.....	125
4.2.1 Computer-gestützte Suche nach Promotor Konsensus Sequenzen.....	125
4.2.2 Transkriptionsstartbestimmungen.....	130
4.3 Analyse des ST-LS1-Promotors .....	133
4.4 Schlußfolgerungen .....	136
<b>5 Literatur .....</b>	<b>140</b>
<b>6 Anhang.....</b>	<b>166</b>
6.1 Plasmidkarten.....	166
6.1.1 Restriktionskarte des Vektors pBin19.....	166
6.1.2 Darstellung des T-DNA Bereichs von pBinlux-Sall.....	167
6.1.3 Darstellung des T-DNA Bereichs von pBinlux-BamHI.....	167
6.1.4 Darstellung des T-DNA Bereichs des Vektors pBi101.2.....	167
6.1.5 Restriktionskarte des Vektors pKK232-8.....	168
6.1.6 Darstellung des rekombinanten Bereichs des Plasmides pKKlux .....	168
6.1.7 Darstellung des rekombinanten Bereichs des Plasmides pKKlux-BamHI.....	169
6.1.8 Restriktionskarte des Vektors pLitmus28 .....	169
6.1.9 Restriktionskarte des Plasmides Mini-Tn5luxAB.....	170
6.2 Pflanzenspezifische Promotorsequenzen.....	171
6.2.1 35S-Promotor aus CaMV .....	171
6.2.2 B33-Patatin-Promotor .....	171
6.2.3 ST-LS1-Promotor.....	172
6.2.4 RolC-Promotor.....	172
6.2.5 Promotor P 130 .....	172
6.2.6 Promotor P 247 .....	173
6.2.7 FBP1,1-Promotor .....	173

6.2.8	FBP1,7-Promotor .....	174
6.2.9	Nos-Promotor.....	174
6.2.10	SKT2-Promotor.....	174
6.2.11	KST1-Promotor.....	175
6.2.12	KCO1-Promotor.....	176
6.3	Promotorsequenzen aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> .....	176
6.3.1	Promotorregion des <i>psbA</i> -Gens .....	177
6.3.2	Promotorregion des <i>rbcL</i> -Gens.....	177
6.3.3	Promotorregion des <i>accD</i> -Gens .....	177
6.3.4	Promotorregion des <i>rpoB</i> -Gens .....	177
6.3.5	Promotorregion des <i>atpB</i> -Gens.....	177
6.3.6	Promotorregion des <i>clpP</i> -Gens .....	178
6.4	Bakterielle Promotorsequenzen .....	178
6.4.1	Promotorregion des <i>bla</i> -Gens .....	178
6.4.2	Promotorregion des <i>nptIII</i> -Gens .....	178
6.4.3	Promotorregion des <i>lac</i> -Operons .....	178
6.5	Alignments.....	179
6.5.1	Alignment der Sequenzierungen des Nos-Promotors.....	179
6.5.2	Alignment der Sequenzierungen des KCO1-Promotors .....	180
6.5.3	Alignment der Sequenzierungen des KST1-Promotors .....	181

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAP	`Abridged Anchor Primer´
Abb.	Abbildung
AdMLP	Adenovirus Major Late Promotor
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz
<i>amt</i>	Adenin-Methyltransferase Gen
ATP	Adenosintriphosphat
AUAP	`Abridged Universal Amplification Primer´
<i>bla</i>	β-Lactamase Gen
bp	Basenpaare
BRE	`IIB recognition element´
BSA	`bovine serum albumin´ (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CA	Chloramphenicol
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen
ccc	`covalently closed circular´ (superhelikal)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIAP	`Calf Intestine Alkaline Phosphatase´
cm	Zentimeter
CsCl	Caesiumchlorid
cv.	cultivar
°C	Grad Celsius
dC	Desoxycytosin
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPE	`downstream promoter element´
DTNB	5,5´-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FA-Gelpuffer	Formaldehyd-Gelpuffer
Fam	6-Carboxy-Fluorescein
g	Gramm
G	Guanin
GTF	`general transcription factor´
GSP	genspezifischer Primer
<i>gus</i>	β-Glucuronidase Gen
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde(n)
HGT	horizontaler Gentransfer
I	Inosin
Inr	Initiator

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kbp	kilo Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
km <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	`left border` (linke Grenze)
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	Molar
MCS	`multiple cloning site`
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
ms	Millisekunden
$\mu$ F	Mikrofarad
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
NEP	`nuclear-encoded plastid RNA polymerase`
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nm <sup>R</sup>	Neomycinresistenz
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
<i>nos</i>	Nopalinsynthase Gen
<i>nptII</i>	Neomycin-Phosphotransferase Gen II
<i>nptIII</i>	Neomycin-Phosphotransferase Gen III
nt	Nukleotid
<i>ocs</i>	Octopinsynthase Gen
OD	optische Dichte
$\Omega$	Ohm
P	Promotor
PCR	`polymerase chain reaction` (Polymerase-Kettenreaktion)
PEP	`plastid-encoded plastid RNA polymerase`
pg	Pikogramm
PIC	Prä-Initiationskomplex
Pu	Purinbase
Py	Pyrimidinbase
R	Adenin oder Guanin
RACE	`Rapid Amplification of cDNA Ends`
RB	`right border` (rechte Grenze)
rif <sup>R</sup>	Rifampicinresistenz
RLU	`relative light units` (Relative Lichteinheiten)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	DNA-abhängige RNA Polymerase
Rox	6-Carboxy-X-rhodamin
rpm	`rounds per minute` (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA



RT	Raumtemperatur
RT´	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SLF	´sigma-like factor´
snRNA	´small nuclear´ RNA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAF	TBP assoziierter Faktor
Tamra	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Bindungsprotein
tc <sup>R</sup>	Tetrazyklinresistenz
T-DNA	´transfer´ DNA
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
Temp.	Temperatur
TF	Transkriptionsfaktor
TFTC	´TBP-free TAF <sub>II</sub> -containing complex´
Ti-Plasmid	´tumor inducing plasmid´
TLF	´TBP-like factor´
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tn	Transposon
TRF	´TBP-related factor´
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	´transfer´ RNA
TY	Trypton Yeast
U	´unit´ (Einheit)
UE(s)	Untereinheit(en)
ü. N.	über Nacht
UAS	´upstream activating sequences´
UTR	´untranslated region´
UV	ultraviolett
V	Volt
var.	Varietät
W	Adenin oder Thymin
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronid
Y	Cytosin oder Thymin

## Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit sollte die Spezifität von Promotoren analysiert und ihre Funktionalität über 'kingdom'-Grenzen hinaus untersucht werden. Hierfür wurden zwölf pflanzenspezifische Promotoren, welche in der Gentechnik zur Herstellung von transgenen Pflanzen eingesetzt werden, auf Genexpression in fünf Bakterienarten untersucht. Die Bakterienarten, in denen die pflanzenspezifischen Promotoren untersucht wurden, stellten mit *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas putida* und *Acinetobacter* sp. Vertreter taxonomisch unterschiedlicher Gruppen dar. Auch die untersuchten pflanzenspezifischen Promotoren stammten aus phylogenetisch nicht-verwandten Gruppen wie Pflanzen, Pflanzenviren und Agrobakterien. Weiterhin wurden drei bakterielle und sechs Plastiden Promotoren auf Genexpression in *Nicotiana tabacum* untersucht. Die drei bakteriellen Promotoren stammten aus *E. coli* und *Streptococcus faecalis*, die Plastiden Promotoren aus *N. tabacum*.

Die pflanzenspezifischen Promotoren wurden zur Quantifizierung der Expression mit den promotorlosen *luxAB*-Genen aus *Vibrio harveyi* und dem promotorlosen *cat*-Gen fusioniert. Die Frequenz mit der die pflanzenspezifischen Promotoren in den untersuchten Bakterienarten zu einer Expression führten, war mit einer Expressionsrate von 50 % der getesteten Kombinationen sehr hoch. Für einen Promotor (P), den P ST-LS1 aus *Solanum tuberosum*, wurde eine Expression in allen fünf untersuchten Bakterienarten nachgewiesen. Zwei der getesteten pflanzenspezifischen Promotoren, P RolC aus *Agrobacterium rhizogenes* und P 247 aus *N. tabacum* zeigten keine Expression der *luxAB*-Gene in den untersuchten Bakterienarten. Für zwei pflanzenspezifische Promotoren, P ST-LS1 und P Nos aus *A. tumefaciens* erfolgte für *E. coli* der Nachweis der phänotypischen Relevanz der heterologen Genexpression, da diese ein Wachstum auf Agarplatten mit einer gängigen Selektionskonzentration von Chloramphenicol ermöglichten. Die Charakterisierung der mRNA-Transkripte ausgewählter Fusionen der pflanzenspezifischen Promotoren mit den Reporter genen zeigten eindeutig, dass für die Transkriptionsinitiation durch die bakterielle RNA-Polymerase Sequenzelemente der pflanzenspezifischen Promotoren genutzt wurden. In zwei Fällen, dem P 35S aus Cauliflower Mosaic Virus und P Nos, wurde die pflanzliche TATA-Box zur Transkriptionsinitiation in *E. coli* genutzt. Eine genaue Charakterisierung der durch die bakterielle RNA-Polymerase genutzten -10-Region in dem P ST-LS1 in *E. coli* und *Acinetobacter* sp. fand durch Mutagenese statt. Hierbei wurden sogenannte 'down-Mutanten' hergestellt, die in *E. coli* und *Acinetobacter* sp. eine Reduktion der Expression gegenüber dem

Wildtyp-Promotor P<sub>ST-LS1</sub> aufwiesen. Zur Untersuchung der Expression der mutagenisierten Promotoren und des Wildtyp-Promotors P<sub>ST-LS1</sub> in *N. tabacum* wurden diese mit dem promotorlosen *gus*-Gen fusioniert. Die mutagenisierten Promotoren zeigten nach stabiler Integration in das Pflanzengenom von *N. tabacum* eine unverminderte Expression in bezug auf den Wildtyp-Promotor.

Die bakteriellen und Plastiden Promotoren wurden zur Untersuchung der Expression in *N. tabacum* ebenfalls mit dem promotorlosen *gus*-Gen fusioniert. Die Untersuchung ergab nur in einem einzigen Fall von neun getesteten Promotoren, dem des Plastiden Promotors des *accD*-Gens eine sehr geringe transiente Expression. Diese Expression müßte durch die Herstellung stabiler transgener Pflanzen überprüft werden.

Eine Vorhersage über das Ausmaß einer möglichen heterologen Expression nachgeschalteter Gene durch eine Computer-gestützte Suche nach potentiellen eukaryontischen bzw. prokaryontischen Konsensus Sequenzen in den verwendeten Promotoren konnte nicht getroffen werden.

## 1 Einleitung

### 1.1 Bedeutung der Übertragung heterologer Regulationssequenzen für die Risikobewertung gentechnisch veränderter Organismen

Die Bedeutung des horizontalen Gentransfers (HGT) ist eine der meist untersuchten Fragestellungen in den Biowissenschaften. Unter HGT versteht man die asexuelle Übertragung von genetischem Material zwischen verwandten und nicht-verwandten Organismen. Voraussetzung für einen HGT ist die Aufnahme und stabile Integration von DNA in die Erbsubstanz eines Empfänger-Organismus zur Weitergabe an die nachfolgenden Generationen. Folgen für den Phänotyp des Empfängers ergeben sich nur, wenn die übertragene DNA exprimiert wird. Die Expression der inserierten DNA setzt eine Transkription und Translation voraus.

Der Austausch genetischen Materials zwischen Bakterien ist ein in der Natur vorkommendes Phänomen (Veal *et al.*, 1992). Zwischen Bakterien erfolgt der HGT durch Transduktion, Konjugation oder Transformation. Die Möglichkeit des Gentransfers zwischen z. B. Pflanzen und Bakterien im Erdboden wird ebenfalls diskutiert (Nielsen *et al.*, 1998; Dröge *et al.*, 1998). Bei der Herstellung von gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) kommt es durch die Übertragung von DNA zwischen verschiedenen Organismen ebenfalls zum HGT.

Bevor GVOs in Deutschland und in der Europäischen Union freigesetzt und in Verkehr gebracht werden können, wird nach dem Gentechnikrecht eine Risikobewertung des jeweiligen GVOs vorgenommen. Bei diesen Risikobewertungen werden im Wesentlichen die Auswirkungen des neuen Genprodukts auf das Verhalten und die Eigenschaften der gentechnisch veränderten Organismen bewertet. Sie basieren daneben häufig auf der Annahme, dass die für eine Organismengruppe typischen Regulationssequenzen in heterologen Organismengruppen aufgrund der unterschiedlichen Regulationsmechanismen nicht erkannt werden und somit eine Expression übertragener Gene ohne gleichzeitige Übertragung der passenden Regulationssequenzen nicht zu erwarten wäre.

In Deutschland wurden bisher 129 Freisetzungsanträge für GVOs gestellt (Internet-Seite des Robert Koch-Instituts: [www.rki.de/Gentec/Freisetzungen/Versuch.htm](http://www.rki.de/Gentec/Freisetzungen/Versuch.htm); Stand 13.09.2002), wobei im Wesentlichen Freisetzungen gentechnisch veränderter Pflanzen beantragt wurden. Das Ziel der genetischen Veränderung bei Pflanzen ist häufig das Einführen einer Herbizid- oder Schädlingsresistenz (Delannay *et al.*, 1989; Quinn, 1990; Cheng *et al.*, 1992) sowie genetische Veränderungen, welche zu veränderten Inhaltsstoffen

von Ertragspflanzen wie z. B. die Stärkezusammensetzung in der Kartoffel führen (Sonnewald, 1992).

In der Zukunft werden gentechnisch veränderte Pflanzen neben der Herstellung von Lebensmitteln und Tierfutter auch für die Produktion von Therapeutika und Impfstoffen eingesetzt werden (Tacket und Mason, 1999; Brandt, 2000). Erste Versuche zum Einsatz von Vaccinen auf pflanzlicher Basis werden an Versuchstieren schon vorgenommen. So wurden orale Immunisierungen von Mäusen und Kaninchen mittels transgener Kartoffeln mit dem Oberflächen-Antigen von Hepatitis B (HBsAg; Kong *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 2000), sowie der Untereinheit B des Enterotoxins aus *Escherichia coli* (recLT-B; Lauterslager *et al.*, 2001), dem VP60 des Virus des hämorrhagischen Fiebers bei Kaninchen (RHDV; Castanón *et al.*, 1999) und dem Glykoprotein S des Schweinevirus verantwortlich für transmissible Gastroenteritiden (TGEV; Escribano und Borca, 2000) durchgeführt. Weiterhin wurde in gentechnisch verändertem Mais recLT-B und das Spike Protein des TGEV (Streatfield *et al.*, 2001) exprimiert und Mäusen zur oralen Immunisierung verabreicht.

Das Ziel der gentechnischen Veränderung ist also die Herstellung eines spezifischen Proteins. Bei der Risikobewertung gentechnisch veränderter Pflanzen geht man in der Regel davon aus, dass Gene, die unter der Kontrolle bakterieller Promotoren stehen, nicht in Pflanzen exprimiert werden können und umgekehrt. Dies wurde jedoch bisher nicht systematisch untersucht und/oder in der Literatur beschrieben.

Expressionsvektoren sollten so konstruiert sein, dass eine Expression der übertragenen Gene nur spezifisch in dem Zielorganismus erfolgt. Es gibt jedoch Beispiele dafür, dass heterologe Promotor-Empfängersysteme eine Expression übertragener Gene zulassen. Hierbei wurden als Empfängersysteme diejenigen Organismengruppen bezeichnet, denen die heterologe Promotor- bzw. Regulationssequenz übertragen wurde. Einer der am häufigsten verwendeten Promotoren in transgenen Pflanzen ist der 35S Promotor aus Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), welcher die Sequenz einer typischen pflanzlichen Promotorregion aufweist (Odell *et al.*, 1985; Benfay und Chua, 1990). Dieser Promotor ist in der Lage, sowohl in *E. coli* (Assaad und Signer, 1990) als auch in *Schizosaccharomyces pombe* (Gmünder und Kohli, 1989; Pobjecky *et al.*, 1990; Hirt *et al.*, 1990) eine Expression nachgeschalteter Gene zu bewirken. Weiterhin wurde für den Promotor des Adenin-Methyltransferase Gens (*amt*) des *Chlorella* Virus eine Expression in den transgenen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays* und *Sorghum* Zellen als auch in verschiedenen Bakterienarten wie *E. coli*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* und *Xanthomonas campestris* beschrieben (Mitra *et al.*, 1994).

Weitere Beispiele, bei denen eine Expression in heterologen Promotor-Empfängersystemen für die Risikobewertung von GVO von Interesse sein dürften, gilt es zu untersuchen.

Zur Transformation dikotyler Pflanzen wird häufig das natürliche Transformationssystem des Gram-negativen Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* genutzt. Hierbei wird die zu inserierende DNA durch Vektorsysteme (binäre Vektoren), basierend auf dem Ti-Plasmid (‘tumor inducing plasmid’) aus *A. tumefaciens* in das pflanzliche Genom eingeschleust (Klee *et al.*, 1987; Zambryski, 1988). Diese Fremd-DNA, welche unter der Kontrolle pflanzlicher oder pflanzenspezifischer Regulationssequenzen steht, wird durch die T-DNA (‘transfer DNA’) des Vektors flankiert von den repetitiven Sequenzen der rechten und linken Grenze (RB, LB) stabil in das Chromosom der Pflanze integriert. Die T-DNA des zur Transformation von Pflanzen oft genutzten Vektors pBin19 oder dessen Derivate (Bevan, 1984; Jefferson *et al.*, 1987) beinhaltet jedoch auch die *lacZ*’-Region mit der ‘multiple cloning site’ (MCS) aus M13mp19. Die Expression der *lacZ*’-Region wird durch den bakteriellen Lac-Promotor reguliert und mit in das Pflanzengenom integriert. Weiterhin wird das bakterielle Gen, welches für die Neomycin-Phosphotransferase II (*nptII*) kodiert, unter der Kontrolle des Nopalin-Synthase (*nos*) Promotors und der DNA-Sequenz für die Polyadenylierung des Octopin-Synthase Gens (*ocs*) für die Selektionierung der Pflanzen auf Kanamycin genutzt.

Mehrere Arbeitsgruppen haben die Transkription pflanzenspezifischer T-DNA Gene von *A. tumefaciens* u. a. auch ausgehend von dem Nos-Promotor in *Agrobacterium* beschrieben (Gelvin *et al.*, 1981; Schröder *et al.*, 1983; 1984; Janssens *et al.*, 1984). Vancanneyt *et al.* (1990) beschrieben die Beobachtung, dass die zur Beurteilung der Expression in Pflanzen eingebrachten bakteriellen Reportergene, welche unter der Kontrolle eukaryontischer Promotoren stehen, in Agrobakterien exprimiert wurden.

Desweiteren ist bei der Erzeugung transgener Pflanzen auch im Einzelfall nicht auszuschließen, dass eine Übertragung von DNA-Sequenzen jenseits der LB und RB stattfinden kann (Fray *et al.*, 1994; Martineau *et al.*, 1994; Ramanathan und Veluthambi, 1995). Die Gene außerhalb der T-DNA, vor allem die Antibiotikumresistenzgene, stehen unter der Kontrolle bakterieller Promotoren.

Bei monokotylen Pflanzen wird die gentechnische Veränderung häufig mittels Partikelbombardement vorgenommen (Klein *et al.*, 1989a). Hierbei werden oft pUC-Derivate zur Herstellung transgener Pflanzen eingesetzt. Bei einem erfolgreichen Gentransfer kommt es zur vollständigen, möglicherweise mehrfachen Integration des eingesetzten Plasmides in das Pflanzengenom. Auch bei diesen Plasmiden wird die *lacZ*’-Region mit der MCS für die in das Pflanzengenom zu inserierende DNA durch den bakteriellen Lac-Promotor reguliert.

Desweiteren werden auf diese Weise die Markergene zur Selektion in Bakterien, wie im Falle der pUC-Derivate das Antibiotikumresistenzgen für Ampicillin (*bla*), mit dem für die Expression in Bakterien benötigten Promotor in das Pflanzengenom integriert. So wurde z. B. für die Transformation von Mais zur Herstellung der insektenresistenten Maislinie CG00526-176 pUC18 eingesetzt. Dies führte zur Integration des *bla*-Gens in das Pflanzengenom dieser Linie (Duggan *et al.*, 2000).

Weiterhin scheint die Beurteilung der Genexpression ausgehend von heterologen Promotoren von Bedeutung, da das Persistieren der zur Transformation verwendeten gentechnisch veränderten Agrobakterien in den gentechnisch veränderten Pflanzen beobachtet werden konnte. Diese wurden auf der Oberfläche und im Gewebe von gentechnisch veränderten Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*), nicht jedoch in den Blüten oder ausgereiften Samen der Pflanzen nachgewiesen (Matzk *et al.*, 1996). Agrobakterien werden nach der Transformation der Pflanze durch Antibiotikumzusatz entfernt. Bei der Verwendung von Samen zur Vermehrung gentechnisch veränderter Pflanzen, wie es bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) der Fall ist, stellt das Persistieren der Agrobakterien kein Problem dar. Werden gentechnisch veränderte Pflanzen vegetativ vermehrt, wie im Falle der Kartoffel (*S. tuberosum*), würden Agrobakterien, die in den gentechnisch veränderten Pflanzen persistieren, mit freigesetzt werden. Durch Konjugation könnten die Plasmide der Agrobakterien zwischen ihnen und dem zum konjugativen Transfer befähigten Bakterien ausgetauscht werden.

Desweiteren muß bei der Risikobewertung die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers von gentechnisch veränderten Pflanzen auf Bakterien berücksichtigt werden. Bis heute sind die meisten Transformationsexperimente natürlich kompetenter Bakterien mit Pflanzen-DNA erfolglos geblieben (Becker *et al.*, 1994; Schlüter *et al.*, 1995; Broer *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1997; Bertolla *et al.*, 1999a). Sowohl Gebhard und Smalla (1998) als auch die Arbeitsgruppe um de Vries (1998, 2001) konnten jedoch unter Laborbedingungen zeigen, dass *Acinetobacter* sp. und *Pseudomonas stutzeri*, welche ein *nptII*-Gen mit einer Deletion besaßen, DNA von transgenen Pflanzen mit einem vollständigen *nptII*-Gen mit einer geringen Frequenz aufnehmen und daraufhin exprimieren konnten. Nielsen *et al.* (2000) erweiterten das Experiment von Gebhard und Smalla (1998), indem sie die Untersuchungen in steriler Erde nach Zugabe von Nährstoffen durchführten. Auch hierbei konnte der oben beschriebene *Acinetobacter* sp. Stamm das *nptII*-Gen aus der DNA transgener Zuckerrüben aufnehmen und exprimieren. Somit sind kompetente Bakterien in der Lage DNA von transgenen Pflanzen unter der Voraussetzung aufzunehmen, dass homologe bakterielle DNA-

Sequenzen vorhanden sind. Wie eingehend beschrieben, beinhalten gentechnisch veränderte Pflanzen bakterielle Sequenzen wie Antibiotikumresistenzgene, bakterielle Promotoren und andere Sequenzen von Klonierungsvektoren, welche Möglichkeiten darstellen, durch homologe Rekombination in bakterielle Genome integriert zu werden (Gebhard und Smalla, 1998; Bertolla *et al.*, 2000; de Vries *et al.*, 2001; Mercer *et al.*, 2001).

Der Fall eines horizontalen Gentransfers unter natürlichen Bedingungen wird hingegen als sehr gering eingeschätzt (Nap *et al.*, 1992; Schlüter *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1998; de Vries *et al.*, 2001). Der Fragestellung, ob ein horizontaler Gentransfer von gentechnisch veränderten Pflanzen, welche ein Antibiotikumresistenzgen unter der Kontrolle bakterieller Regulationssequenzen in das Pflanzengenom integriert haben, auf Bakterien stattfinden kann, wird in den letzten Jahren mit immer optimierteren Bedingungen nachgegangen (Duggan *et al.*, 2000; Chambers *et al.*, 2002). Chambers *et al.* (2002) führten Fütterungsversuche mit Hühnern durch, denen gentechnisch veränderter Mais, welcher das Antibiotikumresistenzgen *bla* enthielt, verabreicht wurde. *bla* konnte im Kropf und im Magen der Hühner nachgewiesen werden, jedoch nicht im Darm. Durch die Degradierung der DNA wird ein Gentransfer zwischen der DNA des gentechnisch veränderten Mais und der Mikroflora des Darms für unwahrscheinlich gehalten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es sowohl bei einem natürlichen horizontalen Gentransfer als auch bei der Erzeugung gentechnisch veränderter Organismen zum Austausch von regulatorischen DNA-Sequenzen zwischen nicht-verwandten Organismen kommt und es von großer Bedeutung für die Bewertung gentechnisch veränderter Organismen ist, die häufig verwendeten Regulationssequenzen, insbesondere Promotoren, auf ihre Expression in heterologen Organismen zu untersuchen.

## **1.2 Regulationssequenzen der Transkriptionsinitiation**

Genexpression ist ein komplexer Prozess aus Transkription und Translation, wobei die Transkriptionsinitiation der entscheidende Schritt für die Regulation der Genexpression ist. Der Transkriptionsapparat von Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten weist große Unterschiede aber auch Gemeinsamkeiten auf. Allen gemein ist, dass für die Expression von Genen die jeweilige RNA-Polymerase (RNAP) u. a. mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren spezifische Erkennungs- und Bindungsstellen auf der DNA, sogenannte Promotoren, benötigt. Promotoren sind ein wesentlicher Bestandteil der Regulation der Genexpression. Die Expressionsrate eines Gens ist abhängig von der Stärke eines Promotors, d. h. der Affinität der RNAP zu der Promotorsequenz. Biochemisch gesehen beinhaltet der Promotor die DNA-



Sequenzen, welche für eine basale und nicht maximale Transkription verantwortlich sind (Fassler und Gussin, 1996).

Die Struktur der Promotoren ist für die einzelnen Organismengruppen spezifisch, obwohl es Hinweise dafür gibt, dass sich die RNAP von Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben. Es wurden Homologien der Untereinheiten (UEs) der bakteriellen RNAP, der archealen RNAP und der eukaryontischen RNAP I, RNAP II und RNAP III festgestellt (Tab. 1), welche Mitglieder einer konservierten Protein-Familie, der sogenannten 'multisubunit RNAP family' sind (Sentenac *et al.*, 1992; Soppa, 1999; Ebright, 2000; Minakhin *et al.*, 2001).

**Tab. 1:** Multisubunit RNA-Polymerasen. Konservierte UEs der bakteriellen RNAP, archealen RNAP und eukaryontischen RNAP I, II und III (Ebright, 2000).

Bakterielle RNAP	$\beta'$	$\beta$	$\alpha'$	$\alpha''$	$\omega$	
Archeale RNAP	A'/A''	B	D	L	K	+ 6 UE
Eukaryontische RNAP I	RPA1	RPA2	RPC5	RCP9	RPB6	+ 9 UE
Eukaryontische RNAP II	RPB1	RPB2	RPB3	RPB11	RPB6	+ 7 UE
Eukaryontische RNAP III	RPC1	RPC2	RPC5	RPC9	RPB6	+ 11 UE

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Prokaryonten und Eukaryonten ist, dass prokaryontische Gene häufig in Form von Operons angeordnet sind. Bei der Expression der Gene wird ausgehend von einem Promotor eine polycistronische RNA gebildet, die für die Synthese mehrerer Proteine verantwortlich ist. Bei eukaryontischen Genen ist jeweils ein Promotor für die Expression eines Gens verantwortlich. Das gebildete Primärtranskript enthält Exon- und Intronbereiche, wobei die Intronbereiche durch Spleißvorgänge aus dem Primärtranskript geschnitten werden, da in der Regel nur die Exonbereiche für die Synthese von Proteinen kodieren.

### 1.2.1 Transkriptionsinitiation in Prokaryonten

Burgess und Travers sowie Dunn und Bautz haben 1969 erstmalig beschrieben, dass sich die bakterielle RNAP aus zwei Komponenten zusammensetzt, dem Core-Enzym ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) und dem sigma Faktor ( $\sigma$ -Faktor). Die Erkennung der Promotorstrukturen der DNA durch die RNAP und somit die Initiation der Transkription wird durch  $\sigma$ -Faktoren vermittelt. Nur das Holo-Enzym der RNAP ( $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ) kann spezifisch an die DNA binden und die Transkription initiieren.

Die meisten Bakterienarten synthetisieren mehrere verschiedene  $\sigma$ -Faktoren, welche unterschiedliche Promotorsequenzen erkennen. Momentan sind 14 verschiedene Klassen von  $\sigma$ -Faktoren bekannt, die in zwei Familien, die  $\sigma^{70}$ - und  $\sigma^{54}$ -Familie, unterteilt werden (Wösten, 1998a). Der primäre  $\sigma$ -Faktor, welcher in allen bekannten Eubakterien vorhanden ist (Gruber und Bryant, 1997), ist für Expression der Gene des Zellwachstums und die Expression der Haushaltsgene verantwortlich. In *E. coli*, wie auch in den meisten anderen Gram-negativen Bakterien, ist dieser primäre  $\sigma$ -Faktor bekannt als  $\sigma^{70}$  und in *Bacillus subtilis* bzw. Gram-positiven Bakterien als  $\sigma^A$  (Helmann und Chamberlain, 1988).

Die Promotorsequenz der DNA, welche von dem RNAP Holo-Enzym mit  $\sigma^{70}$  oder  $\sigma^A$  erkannt wird, beinhaltet zwei konservierte Sequenzen mit jeweils sechs Nukleotiden (nt), die –10-Region und die –35-Region (Pribnow, 1975a; 1975b; Schaller *et al.*, 1975). Die stark konservierte –10-Region hat die Konsensus Sequenz TATAAT und erstreckt sich häufig von Position –12 bis –7 bezogen auf die Transkriptionsinitiationsstelle. Stromaufwärts der –10-Region mit einem optimalen Abstand von 16 bis 18 nt befindet sich die weniger stark konservierte –35-Region mit der Konsensus Sequenz TTGACA, meist positioniert von –35 bis –30. Der optimale Abstand der –10-Region zur Transkriptionsinitiationsstelle (+1) beträgt fünf bis neun Nukleotide. In den meisten der untersuchten Sequenzen wird die Transkriptionsinitiationsstelle von einer Purinbase gebildet (siehe Abb. 1a; Rosenberg und Court, 1979; Hawley und McClure, 1983; Harley und Reynolds, 1987; Lisser und Margalit, 1993; Helman, 1995; Ozoline *et al.*, 1997).

Der prozentuale Anteil der jeweiligen Nukleotide in den beiden Konsensus Hexameren der –35- und –10-Regionen in den *E. coli*- und *B. subtilis*-Promotoren hängt von der Zusammenstellung und der Anzahl, sowie den angewandten Methoden bzw. Algorithmen beim Vergleich der jeweiligen Promotoren ab (Tab. 2).

**Tab. 2:** Vergleich des prozentualen Anteils der aufgeführten Nukleotide der –35- und –10-Regionen in den untersuchten Promotoren.

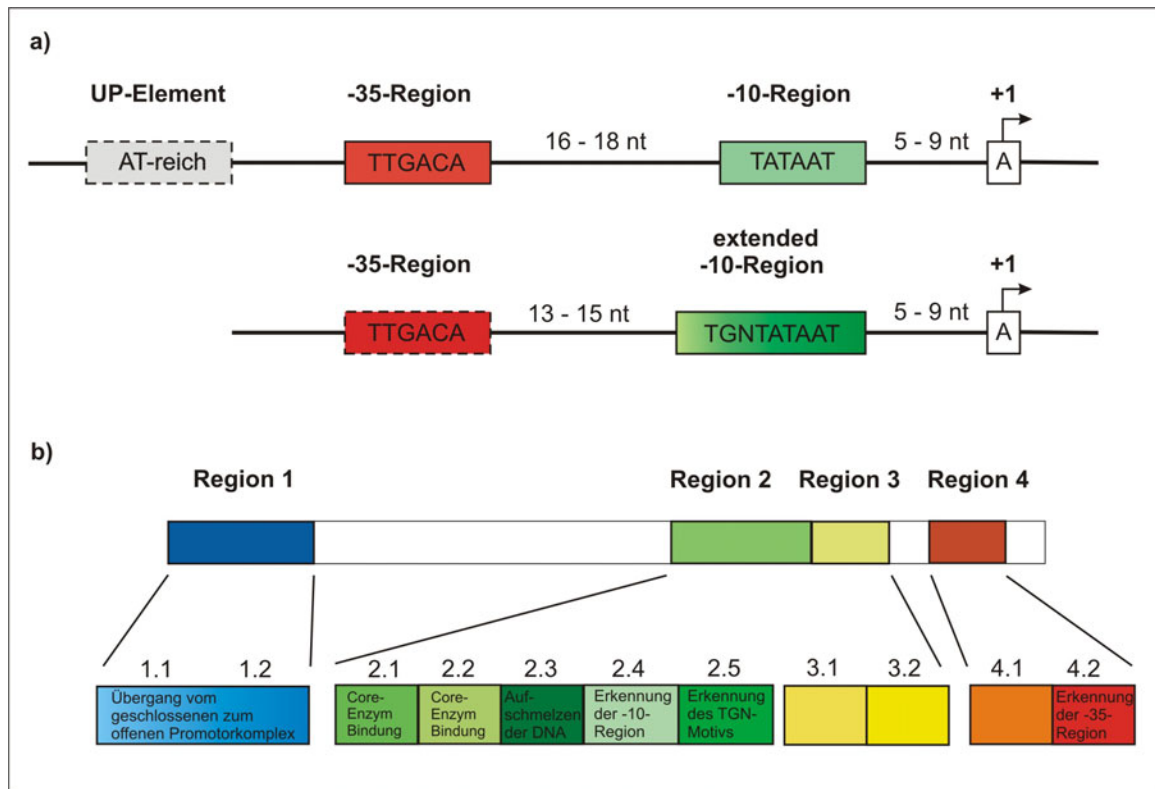
Referenz	Spezies	Anzahl der Promotoren	–35-Region						–10-Region					
			T	T	G	A	C	A	T	A	T	A	A	T
Hawley und McClure, 1983	<i>E. coli</i>	112	82	84	79	64	54	45	79	95	44	59	51	96
Harley und Reynolds, 1987	<i>E. coli</i>	263	78	82	68	58	52	54	82	89	52	59	49	89
Lisser und Margalit, 1993	<i>E. coli</i>	298	69	79	61	56	54	54	77	76	60	61	56	82
Helmann, 1995	<i>B. subtilis</i>	236	88	84	77	64	52	55	94	96	60	77	74	93

In der Konsensus Sequenz der  $-35$ -Region sind bei allen Untersuchungen die ersten beiden Nukleotide des Hexamers (TTGACA) am stärksten konserviert. In der  $-10$ -Region sind die Nukleotide an den Positionen 2 und 6 (TATAAT) nach den Promotoranalysen von Hawley und McClure (1983), Harley und Reynolds (1987) und Helmann (1995) am stärksten konserviert. Hingegen weist die Analyse von Lissner und Margalit (1993) auf die starke Konservierung des Nukleotids an Position 6 der  $-10$ -Region hin, die Nukleotide der Positionen 1 und 2 weisen mit 77 % bzw. 76 % eine ähnlich starke Konservierung auf.

Zusätzlich wurde bei einigen Promotoren an Position  $-15/-14$  ein TG-Motiv festgestellt, welches zu einer 'extended  $-10$ -Region' mit der Konsensus Sequenz TGNTATAAT führt (siehe Abb. 1a, Keilty und Rosenberg, 1987; Kumar *et al.*, 1993). Bei Vorhandensein der 'extended  $-10$ -Region' konnte auch bei fehlender Konsensus Sequenz für die  $-35$ -Region eine Genexpression nachgewiesen werden (Kumar *et al.*, 1993; Bown *et al.*, 1997; Dombroski, 1997). Sind beide Konsensus Hexamere in einer Promotorstruktur vorhanden, so führte das TG-Motiv zu einer Erhöhung der Genexpression (Chan und Busby, 1989).

Besonders stark exprimierte Gene weisen außerdem in ihrer Promotor-DNA stromaufwärts der  $-35$ -Region eine konservierte AT-reiche Region auf (Estrem *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1998). Für den Promotor P1 des *rrnB* konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Region der  $\alpha$ -UEs der RNAP an das sogenannte UP-Element, welches den Bereich von  $-40$  bis  $-60$  in bezug auf die Transkriptionsinitiationsstelle umfasst, bindet (siehe Abb. 1a; Ross *et al.*, 1993; Blatter *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1994).

Durch Sequenzvergleiche der Proteine der  $\sigma^{70}$ -Familie in Eubakterien wurden vier hoch konservierte Aminosäureregionen ( $\sigma^{70}$ -Regionen 1-4; siehe Abb. 1b) identifiziert, welche für die Bindung des  $\sigma^{70}$ -Faktors an das Core-Enzym, die Erkennung der Promotorregion, die Bindung an die Promotorregion, für das Aufschmelzen der Promotor-DNA und somit für die Bildung des offenen Promotor-Komplexes verantwortlich sind (Helmann und Chamberlain, 1988; Lonetto *et al.*, 1992). Zwei Subregionen der Proteine sind hierbei wichtig für die Erkennung und Bindung an die Promotorsequenz der DNA. Die Subregion 2.4 erkennt die  $-10$ -Region und die Subregion 4.2 die  $-35$ -Region. Mutationen in den Regionen 2.4 und 4.2 führten zu der Änderung der spezifischen Interaktionen des RNAP Holo-Enzyms mit den  $-10$ - und  $-35$ -Konsensus Sequenzen (Gardella *et al.*, 1989; Siegele *et al.*, 1989; Zuber *et al.*, 1989; Daniels *et al.*, 1990; Waldburger *et al.*, 1990).



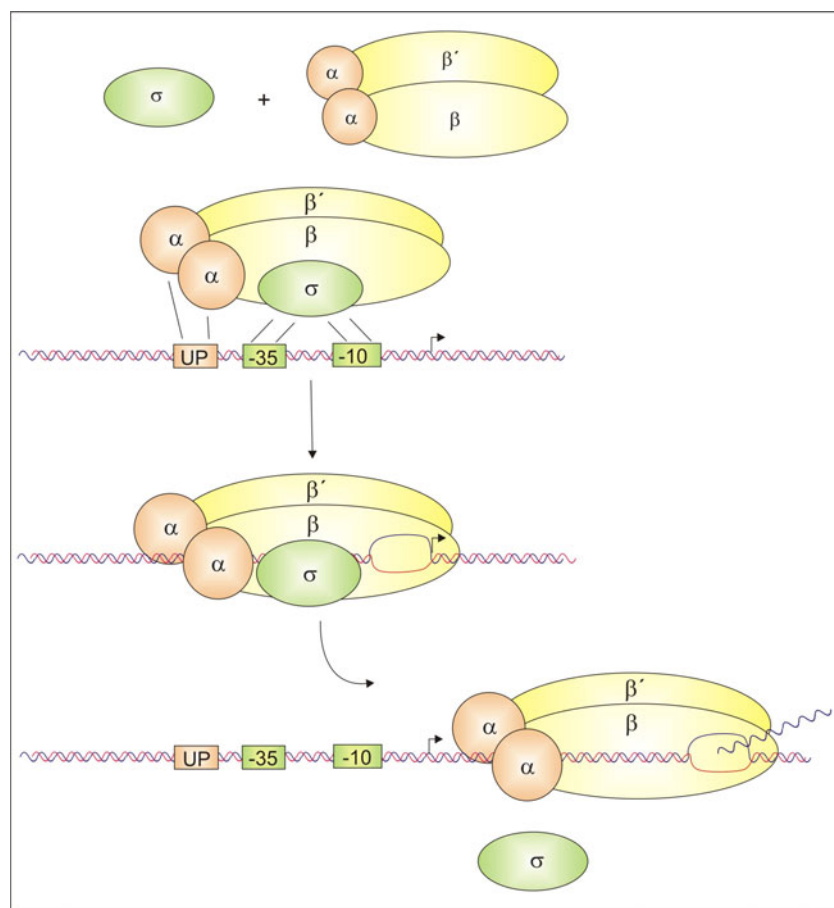
**Abb. 1:** Schematische Darstellung einer prokaryontischen Promotorregion, welche von dem  $\sigma^{70}$ -Faktor des Holo-Enzyms der RNAP erkannt wird. **a** Aufbau der Promotorregion mit den -35- und -10-Konsensus Sequenzen sowie dem UP-Element, welches nur in stark exprimierenden Promotoren vorhanden ist. Der Transkriptionsstart (Pfeil) wird häufig von einer Purinbase gebildet. Bei Vorhandensein einer 'extended -10-Region' ist die -35-Region entbehrlich. **b** Struktureller Aufbau des  $\sigma^{70}$ -Faktors mit den vier Regionen und den dazugehörigen Subregionen mit den entsprechenden Funktionen (modifiziert nach Wösten, 1998a).

Der genaue Hergang zwischen der Protein-Protein-Interaktion des  $\sigma^{70}$ -Faktors mit dem Core-Enzym, sowie der Protein-Nukleinsäure-Interaktionen zwischen dem  $\sigma^{70}$  als Bestandteil des Holo-Enzyms und der Promotorsequenz, ist noch nicht vollständig geklärt und wird wie folgt formuliert (Abb. 2):

Durch die Subregionen 2.1 und 2.2 des  $\sigma^{70}$ -Faktors wird dieser an die  $\beta$ - und  $\beta'$ -UEs an das Core-Enzym der RNAP ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) gebunden, wobei die Hauptbindungsstelle von der N-terminalen Region der  $\beta'$ -UE ausgeht (Arthur und Burgess, 1998; Burgess und Anthony, 2001). Die Assoziation des Core-Enzyms mit dem  $\sigma^{70}$ -Faktor führt zu einer Konformationsänderung des  $\sigma^{70}$ -Faktors (Young *et al.*, 2001). Dies wiederum verändert den Abstand zwischen den  $\sigma^{70}$ -Regionen 2.4 und 4.2. Kuznedelov *et al.* (2002) konnten zeigen, dass eine sogenannte 'flexible flap'-Domäne der  $\beta$ -UE der RNAP mit der Region 4 von  $\sigma^{38}$ , welcher mit  $\sigma^{70}$  nahe verwandt ist, interagiert. Somit wird eine weitere Konformationsänderung ausgelöst, die zur korrekten Positionierung der  $\sigma$ -Regionen 4 und 2 zu den -35- und -10-Promotorsequenzen der DNA führt. Die DNA ist dabei teilweise um die

RNAP gewunden (Zinkel und Crothers, 1991; Perez-Martin *et al.*, 1994). Die  $\sigma^{70}$ -Regionen 4.2 und 2.4 können nun mit der doppelsträngigen  $-35$ -Region und  $-10$ -Region der Promotor-DNA interagieren (Dombroski *et al.*, 1992; 1996) und bilden den geschlossenen Promotor-Komplex. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass nur die doppelsträngige DNA der  $-10$ -Region stromaufwärts der Position  $-10$  wichtig für die Bindung an die  $\sigma^{70}$ -Region 2.4 ist (Dombroski, 1997). Die Region 2.5 des  $\sigma^{70}$ -Faktors der RNAP aus *E. coli* ist für die Erkennung des 'extended  $-10$ -Motivs' verantwortlich (Barne *et al.*, 1997; Bown *et al.*, 1999).

Wiederum andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die  $\sigma^{70}$ -Region 2 auch an der Bindung der  $-10$ -Sequenz der einzelsträngigen DNA des kodierenden Stranges beteiligt ist, um somit den offenen Promotor-Komplex zu stabilisieren (Roberts und Roberts, 1996; Marr und Roberts, 1997; Huang *et al.*, 1997; Qiu und Helmann, 1999; Young *et al.*, 2001).



**Abb. 2:** Vereinfachtes Modell der Transkriptionsinitiation in Prokaryonten. Das Core-Enzym ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) der RNAP bildet mit dem  $\sigma$ -Faktor das Holo-Enzym, welches an die Promotorregion binden kann. Nach erfolgreicher Transkriptionsinitiation dissoziiert der  $\sigma$ -Faktor vom Holo-Enzym und das Core-Enzym geht in die Elongation und damit zur RNA-Synthese über. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Weiterhin ist die  $\sigma^{70}$ -Subregion 2.3 im Holo-Enzym-Komplex für das Aufschmelzen der DNA im Bereich -11 bis +1 und somit für Bildung des offenen Promotor-Komplexes verantwortlich (Juang und Helmann, 1994; Rong und Helmann, 1994; Guo und Gralla, 1998; Panaghie *et al.*, 2000). Die Region 1 des  $\sigma^{70}$ -Faktors aus *E. coli* ist beteiligt an einem Isomerisierungsvorgang, der benötigt wird für den Übergang des geschlossenen Promotor-Komplex zu dem offenen Promotor-Komplex (Wilson und Dombroski, 1997). Das Aufschmelzen der DNA ist mit einer Konformationsänderung der RNAP verbunden, die die Bildung einer Transkriptionsblase zur Folge hat (Roe *et al.*, 1985). Der Template-Strang wird in das aktive Zentrum des Core-Enzyms gedrängt, welches von den  $\beta$ - und  $\beta'$ -UE der RNAP gebildet wird. Nach der Bindung des ersten Nucleosidtriphosphats für die Bildung der RNA folgen weitere Phosphodiesterbindungen. Erst werden kurze abortive RNA-Transkripte gebildet (< 10 Nucleotide), die aus dem 'ternary Komplex' entlassen werden (Gralla *et al.*, 1980; Munson und Reznikoff, 1981). In diesem Zustand verweilt das Holo-Enzym an der Promotor-DNA. Nach erfolgreicher Transkriptionsinitiation dissoziiert der  $\sigma$ -Faktor aus dem Komplex (Hansen und McClure, 1980; Krummel und Chamberlin, 1989) und das Core-Enzym ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) verlässt für die Elongation den Promotor.

### 1.2.2 Transkriptionsinitiation in Eukaryonten

Eukaryonten besitzen drei verschiedene RNA Polymerasen (RNAP), die die Transkription der DNA in RNA katalysieren. Die RNAP I transkribiert die Gene, welche für die rRNA kodieren, die RNAP II transkribiert die Gene der mRNA als auch bestimmte snRNAs, und die RNAP III transkribiert die Gene der tRNAs sowie 5S RNA (Zawel und Reinberg, 1995; Fassler und Gussin, 1996).

Die RNAP II, welche die Gene der mRNA transkribiert und auf die ich mich bei der Beschreibung der Transkriptionsinitiation in Eukaryonten beschränken möchte, besteht in phylogenetisch sehr unterschiedlichen Organismen meistens aus zwölf UEs (Woychik, 1998). Sie kann nur durch die Bindung von allgemeinen Transkriptionsfaktoren ('general transcription factors', GTFs) unter Bildung des Prä-Initiationskomplexes (PIC) die spezifische Transkription initiieren. Hierzu gehören die GTFs TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH. Die Rolle des TFIIA als GTF wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Diese einzelnen GTFs, mit Ausnahme des TFIIB, setzen sich wiederum aus UEs zusammen (Zawel und Reinberg, 1995; Orphanides *et al.*, 1996; Roeder, 1996; Hampsey, 1998; Woychik und Hampsey, 2002).

In Eukaryonten gibt es drei verschiedene Familien von *cis*-regulierenden DNA-Sequenzelementen zur Transkriptionsinitiation durch die RNAP II. Hierzu gehört die Familie des Core-Promotors, die 'promoter-proximal elements' und die 'promoter-distal elements' oder auch Enhancer genannt (Orphanides *et al.*, 1996). Die *cis*-regulierenden DNA-Sequenzelemente, welche nicht zu dem Core-Promotor gehören, werden oft auch als 'upstream activating sequences' (UAS) bezeichnet.

Der Core-Promotor ist für die Bindung der GTFs und damit der RNAP II verantwortlich und kontrolliert die Lage der Transkriptionsinitiationsstelle. Er kann mehrere Sequenzelemente beinhalten (Abb. 3). Ein Sequenzelement des Core-Promotor ist die AT-reiche TATA-Box mit der Konsensus Sequenz TATA(A/T)A(A/T) (Breathnach und Chambon, 1981; Bucher und Trifonov, 1986; Bucher, 1990). Sie ist in den meisten Eukaryonten konserviert und liegt 25 bis 30 nt stromaufwärts von der Transkriptionsinitiationsstelle, wobei die exakte Lokalisation der ersten Base T (TATAAAA) je nach Gen von Position -34 bis -26 variiert (Breathnach und Chambon, 1981). Die Vergleiche der Konsensus Sequenzen der TATA-Box ergaben die stärkste Konservierung der Basen an den Positionen zwei, drei, vier und sechs (TATAAAA; Bucher, 1990). Mutationsanalysen bestätigten die Konservierung dieser Basen (Myers *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 1988; Giangrande *et al.*, 1989; Wobbe und Struhl, 1990). Klassischerweise nimmt man an, dass an die TATA-Box eine UE des TFIID bindet, welche als TBP (TATA-Bindungsprotein) bekannt ist (Hernandez, 1993; Burley und Roeder, 1996). TFIID umfasst außerdem noch eine Anzahl von TBP assoziierten Faktoren oder TAFs (Burley und Roeder, 1996; Verrijzer und Tijan, 1996; Tansey und Herr, 1997; Albright und Tjian, 2000). In *in vitro*-Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass unter bestimmten Umständen auch Transkriptionsinitiation ohne TBP nachgewiesen werden konnte (Usheva und Shenk, 1994; Wiczorek, 1998). In *Drosophila* hat man neben dem TBP einen sogenannten 'TBP-related factor' (TRF1) gefunden, welcher dem TBP homolog ist. In diesem Falle erkennt der TRF1 in Analogie zur TATA-Box eine sogenannte TC-Box. Diese Sequenz ist TC-reich und liegt ca. 25 nt stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle. Der TRF1 gehört zu einem Proteinkomplex ('TBP-free TAF<sub>II</sub>-containing complex'; TFTC), welcher Transkriptionsfaktoren beinhaltet, die sich von denen des TFIID-Komplexes unterscheiden (Crowley *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1997; Holmes und Tjian, 2000). Außerdem wurden in Metazoa neben dem TBP noch weitere TBP-ähnliche Faktoren ('TBP-like factors'; TLFs) identifiziert, welche für die Erkennung der Promotor-DNA unabhängig von der TATA-Box

verantwortlich sind. Man nimmt an, dass TLFs an der Expression spezifischer Gene beteiligt sind (Dantone *et al.*, 1999).

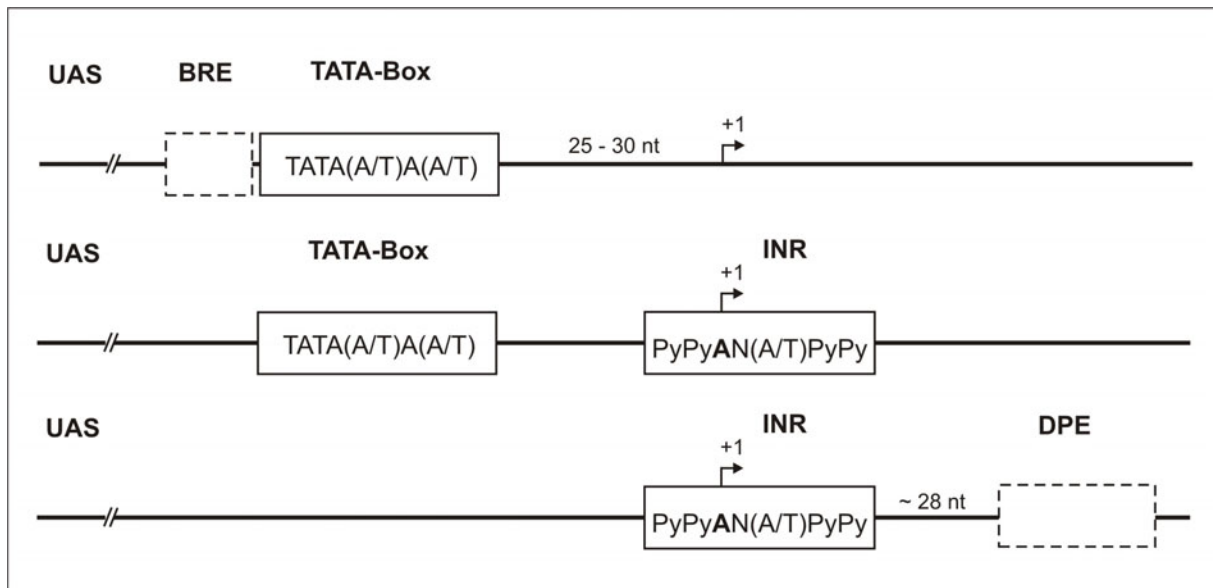
Direkt stromaufwärts der TATA-Box befindet sich in dem humanen Transkriptionsapparat der RNAP II ein weiteres Core-Promotor-Element, das 'IIB recognition element' (BRE). An diesem Element mit der Konsensus Sequenz (G/C)(G/C)(G/A)CGCC bindet der Faktor TFIIB (Lagrange *et al.*, 1996; 1998; Qureshi und Jackson, 1998).

Wieder andere Core-Promotoren werden als TATA-less bezeichnet und beinhalten den sogenannten Initiator (Inr), der für die korrekte Transkriptionsinitiation verantwortlich ist (Smale und Baltimore, 1989; Zenzie-Gregory *et al.*, 1992; Smale, 1997). Die Konsensus Sequenz des Inr wird durch PyPyA<sub>+1</sub>N(A/T)PyPy (A<sub>+1</sub> = Transkriptionsinitiationsstelle) in den Promotorsequenzen von Säugergenen (Bucher, 1990; Javahery *et al.*, 1994) und durch TCA<sub>+1</sub>(G/T)TPy in den TATA-less Promotorsequenzen von *Drosophila* Genen (Arkhipova, 1995) beschrieben, sie ist weniger stark konserviert und umgibt als Sequenz die Transkriptionsinitiationsstelle. Mutationsanalysen des Inr aus Genen von Säugetieren ergaben, dass innerhalb der Konsensus Sequenz das A an Position +1, ein A oder T an Position +3 und eine Pyrimidinbase an Position -1 bezogen auf die Transkriptionsinitiationsstelle für die Stärke des Inr-Elements am wichtigsten sind (Bucher, 1990; Javahery *et al.*, 1994). Das Inr-Element kann ebenfalls in Promotoren vorhanden sein, welche eine TATA-Box beinhalten. Hierbei führt es oft zu einer Erhöhung der Expressionsstärke des Promotors (Javahery *et al.*, 1994; Lo und Smale, 1996). An der Bindung an den Inr sind die TAFs des TFIID-Komplexes oder andere Transkriptionsfaktoren wie TFII-I oder YY1 beteiligt (Martinez *et al.*, 1994; Smale, 1997; Chalkley und Verrijzer, 1999; Albright und Tjian, 2000).

Desweiteren wurde ein Promotorelement in *Drosophila* und in humaner DNA entdeckt, welches bisher nur in TATA-less aber Inr-haltigen Promotoren nachgewiesen wurde. Dieses sogenannte 'downstream promoter element' (DPE) erstreckt sich typischerweise von Position +28 bis +34 bezogen auf die Transkriptionsinitiationsstelle mit der Konsensus Sequenz PuG(A/T)CGTG und ist mitverantwortlich für die präzise Transkriptionsinitiation durch das Inr-Element. Das DPE wird durch die TAFs erkannt (Burke und Kadonaga, 1996; 1997; Albright und Tjian, 2000).

Für die Transkription *in vivo* werden neben dem Core-Promotor, welcher für die basale Transkription verantwortlich ist, noch wie einleitend beschrieben die 'promoter-proximal elements' und/oder Enhancer benötigt. Dies sind kurze regulatorisch wirkende Sequenzen.





**Abb.3:** Schematische Darstellung möglicher eukaryontischer Promotorregionen. Die TATA-Box ist am häufigsten in eukaryontischen Promotoren vertreten. Sie liegt ca. 25 bis 30 nt stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle (Pfeil). Im humanen Transkriptionsapparat befindet sich teilweise direkt stromaufwärts der TATA-Box das 'TATA recognition element' (BRE). Neben der TATA-Box beinhalten einige Promotoren das Inr-Element. Die Transkriptionsinitiation geht häufig von einem Adenin aus. TATA-less Promotoren beinhalten nur das Inr-Element. In TATA-less Promotoren wurde in *Drosophila* und in humanen Zellen das 'downstream promoter element' (DPE) nachgewiesen. Cis-regulierende DNA-Sequenzelemente, die nicht zum Core-Promotor gehören, wurden als UAS dargestellt.

Die 'promoter-proximal elements' sind Sequenzen, die an den Core-Promotor grenzen, wohingegen Enhancer bis zu einige kbp stromaufwärts oder stromabwärts des Core-Promotors liegen können. Beide Elemente stellen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren (TF) dar, welche die basale Transkription ausgehend von dem Core-Promotor verstärken, abschwächen und regulieren können (Johnson und McKnight, 1989; Mitchell und Tjian, 1989; Zawel und Reinberg, 1995; Fassler und Gussin, 1996; Orphanides *et al.*, 1996; Hampsey, 1998). Zu den 'promoter-proximal elements' gehören z. B. die CAAT- und GC-Box. Sowohl CAAT- als auch GC-Box können in beiden Orientierungen in der Promotor-DNA vorkommen (Bucher, 1990). Zu jedem eukaryotischen Gen gehören für Bindung von TFs meistens mehrere Sequenzelemente, welche die Transkription des Gens kontrollieren. Sie sind u. a. dafür verantwortlich, dass bestimmte Gene nur in bestimmten Zelltypen und in bestimmten Entwicklungsstadien der Organismen exprimiert werden. Einige Gene hingegen, wie z. B. Haushaltsgene werden mehr oder weniger konstitutiv in allen Zelltypen exprimiert. Hierbei nehmen die TAFs des TFIID-Komplexes die Rolle von zellspezifische Coaktivatoren ein, welche zwischen der Core-Maschinerie und den Transkriptionsaktivatoren interagieren (Flanagan *et al.*, 1991; Verrijzer und Tjian, 1996; Freiman *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde ein Proteinkomplex, welcher als Mediator bezeichnet wird, identifiziert. Der Mediator wird benötigt, um die Informationen



Die Zusammensetzung des PICs variiert in Abhängigkeit von den Core-Promotor-Elementen und ist deswegen nur vereinfacht dargestellt worden. So wurde bei dieser Beschreibung nur auf den TFIID-Komplex eingegangen, dabei wurden weitere Möglichkeiten der Promotorerkennung durch TRF oder TLF vernachlässigt.

Der TFIID-Komplex bestehend aus TBP und TAFs ist für die Erkennung des Promotors verantwortlich (Hernandez, 1993; Burley und Roeder, 1996; Verrijzer und Tjian, 1996; Albright und Tjian, 2000). Die Bindung an die TATA-Box erfolgt durch die Carboxyterminale Domäne (CTD) des TBP. Die TAFs interagieren mit den angrenzenden Sequenzen wie dem Inr oder dem DPE. Das TBP bindet an die TATA-Box in der kleinen Furche der DNA (Lee *et al.*, 1991; Starr und Hawley, 1991) und nimmt eine sattelähnliche Struktur über die gekrümmte Form der DNA an (Nikolov *et al.*, 1992; 1996). Dies verursacht eine Verzerrung und damit ein geringfügiges Entwinden der DNA im Bereich der TATA-Box und ermöglicht dadurch eine bessere Interaktion des TFIIA, des TFIIB, der TAFs und anderer regulatorischer Proteine mit der DNA. Danach kann die Bindung des TFIIA durch Interaktion mit dem TBP und der DNA stromaufwärts der TATA-Box erfolgen, welche den TBP-DNA-Komplex stabilisiert (Lagrange *et al.*, 1996; Orphanides *et al.*, 1996; Hampsey, 1998). Die Bindung des TFIIB erfolgt durch direkte Interaktion mit dem TBP. In humanen Zellen interagiert der TFIIB mit dem BRE stromaufwärts der TATA-Box, aber auch mit Sequenzen stromabwärts der TATA-Box. TFIIB stabilisiert einerseits den TBP-TATA-Komplex und ist außerdem wichtig bei der Definition der Transkriptionsrichtung (Nikolov *et al.*, 1995; 1996; Lagrange *et al.*, 1996; 1998; Tsai und Sigler, 2000). Unterschiedliche Mutationsstudien des TFIIB haben Auswirkungen auf die Zusammensetzung des PICs hervorgebracht sowie Veränderungen in der Transkriptionsinitiationsstelle gezeigt (Li *et al.*, 1994; Cho und Buratowski, 1999; Hawkes und Roberts, 1999; Fatar *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass TFIIB verantwortlich ist für den korrekten Abstand zwischen der TATA-Box und dem Transkriptionsstart (Leuther *et al.*, 1996). TFIIB ist weiterhin beteiligt an der Bindung des Komplexes aus RNAP II und TFIIF an das TBP, wobei er sowohl mit der RNAP II als auch dem TFIIF interagiert (Ha *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1994; Sun und Hempsey, 1995; Fang und Burton, 1996; Leuther *et al.*, 1996). Der Faktor TFIIF ist in humanen Zellen ein Heterotetramer, bestehend aus zwei großen UEs (TFIIF $\alpha$ /RAP74) und zwei kleinen UEs (TFIIF $\beta$ /RAP30), welche verschiedene Domänen besitzen. Er stellt mit den kleinen UEs den Kontakt zu der nicht phosphorylierten RNAP II (RNAP IIA) her und führt sie zu dem Komplex an der DNA (Sopta *et al.*, 1985; Flores *et al.*, 1988; Lu *et al.*, 1991). Die Bindung der RNAPII und des TFIIF stabilisiert den Komplex aus DNA, TBP und TFIIB. Dabei

interagiert RAP30 mit der DNA auf beiden Seiten der TATA-Box, wohingegen für RAP74 in unterschiedlichen Experimenten die Interaktion mit der stromabwärtsliegenden DNA-Sequenz der TATA-Box als auch die Interaktion mit der DNA auf beiden Seiten der TATA-Box nachgewiesen wurde (Kim *et al.*, 1997; Forget *et al.*, 1997). Die humane RNAP II weist die Interaktion von drei UEs u. a. der größten und der zweitgrößten UE über 60 bp (Position -53 bis +9) mit der DNA auf. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass nach der Bindung des TFIIF und der RNAP II an den Komplex die Promotor-DNA um die RNAP II gewunden ist (Kim *et al.*, 1997; Forget *et al.*, 1997). TFIIF ist außerdem als Elongationsfaktor an der Transkription (Reines *et al.*, 1996) und mit TFIIB an der Regulation der CTD-Phosphatase-Aktivität der RNAP II beteiligt (Kim *et al.*, 1994; Chambers *et al.*, 1995; Kobor *et al.*, 2000; Kamada *et al.*, 2001). Die Bindung der RNAP II durch den Faktor TFIIF an den TFIID-TFIIB-Promotor-Komplex führt nur durch die Bindung von zwei weiteren GTFs TFIIE und TFIIF zum PIC zur Initiation der RNA-Synthese. Hierbei wird TFIIE durch direkte Interaktion mit der RNAP IIA an den Komplex gebunden (Maxon *et al.*, 1994; Leuther *et al.*, 1996). TFIIE humaner Zellen ist ebenfalls ein Heterotetramer, bestehend aus je zwei großen und zwei kleinen UEs (TFIIE $\alpha$ , TFIIE $\beta$ ; Ohkuma *et al.*, 1990; Inostroza *et al.*, 1991). Die UEs sind beteiligt am unspezifischen Kontakt des TFIIE zur DNA direkt stromabwärts der Transkriptionsblase und somit nahe dem aktiven Zentrums der RNAP II (Leuther *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2000). Weiterhin vermittelt TFIIE die Bindung von TFIIF (Flores *et al.*, 1992; Maxon *et al.*, 1994), wodurch der PIC vervollständigt wird. TFIIF ist mit neun UEs der größte und der komplexeste GTF. Er ist der einzige GTF mit definierter Enzymaktivität, die als ATP-abhängige DNA-Helikase- und Cyclin-abhängige Proteinkinase-Aktivität beschrieben wird (Schaeffer *et al.*, 1993; Feaver *et al.*, 1994; Serizawa *et al.*, 1995; Svejstrup *et al.*, 1996; Tirode *et al.*, 1999). Damit ist TFIIF verantwortlich für das Aufschmelzen der Promotor-DNA und ist beteiligt an der Phosphorylierung der CTD der RNAP II. Es wurden zwei verschiedene Modelle erstellt wie eine der beiden Helikasen, die TFIIF beinhaltet, das Aufschmelzen der Promotor-DNA katalysiert (Douziech *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000). In beiden Fällen interagiert die UE des TFIIF, welche diese Helikase beinhaltet, mit der DNA und führt zu einer ATP-abhängigen Bildung des offenen Promotor-Komplexes. Das Aufschmelzen der DNA erfolgt zwischen den Nukleotiden der Positionen -9 bis +2 im PIC (Holstege *et al.*, 1997; Yan und Gralla, 1997). Auch TFIIE ist mitverantwortlich für das Aufschmelzen der Promotor-DNA, indem er die aufgeschmolzene Promotor-DNA stabilisiert (Holstege *et al.*, 1995; Kuldell und Buratowski, 1997). Die RNAP II bildet mit ihren beiden größten UEs das aktive Zentrum, welche nun

durch Phosphodiesterbindungen der NTPs die RNA-Synthese katalysiert. Hierbei werden erst abortive RNAs synthetisiert bevor die RNAP II zur produktiven RNA-Synthese übergeht. Die größte UE der RNAP II enthält eine CTD, die je nach genomischer Komplexität des Organismus 26 bis 52 Wiederholungen von einem Heptapeptid mit der Konsensus Sequenz Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (Corden, 1990) beinhaltet. Die Phosphorylierung der CTD der RNAP II ist ATP-abhängig und findet beim Übergang des PICs in den Elongationskomplex statt. Hierbei wird bevorzugt Serin der Konsensus CTD phosphoryliert. Die Phosphorylierung der CTD ist ein komplexer Mechanismus, wobei unklar ist, ob TFIIF die einzige Proteinkinase beinhaltet, die die CTD nach Bildung des PICs phosphoryliert (Dahmus, 1996; Trigon *et al.*, 1998). In *Saccharomyces cerevisiae* wurden bisher vier Cyclin-abhängige Proteinkinasen identifiziert, die während der Transkription an der Phosphorylierung der CTD beteiligt sind (Murray *et al.*, 2001). Eine dieser Proteinkinasen ist für das Recyclen der phosphorylierten Form der RNAP II verantwortlich. Jedoch kann nur die phosphorylierte RNAP II (RNAP IIO) den Promotor verlassen (Dahmus, 1996). Nach der Promotor Clearance werden die GTFs TFIIB, TFIIE und TFIIF aus der Bindung des Komplexes entlassen und die RNAP II mit TFIIF kann in die Phase der Elongation übergehen, wobei die GTFs TFIID und TFIIA an dem Promotor-DNA verweilen (Orphanides *et al.*, 1996; Roeder, 1996). Die Phosphorylierung der CTD der RNAP II durch TFIIF wird durch TFIIE (Lu *et al.*, 1992; Ohkuma *et al.*, 1995) und durch den Mediator-Komplex stimuliert, wobei der Mediator mit der CTD der RNAP II interagiert (Kim *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 1998). Dies führt in einigen Arbeitsgruppen zu der Interpretation, dass der Mediator zu der basalen Transkriptionsmaschinerie der RNAP II gehört (Gustafsson und Samuelsson, 2001; Woychik und Hampsey, 2002).

*In vivo* nimmt man an, dass ein Holo-Enzym-Komplex (Abb. 4a), welcher in Abhängigkeit der Reinigungsmethoden die RNAP II, TFIIF bzw. TFIIB, TFIIF und TFIIF sowie den Mediator-Komplex als auch weitere Coaktivatoren beinhaltet in einem Schritt an die Promotor-DNA bindet (Kim *et al.*, 1994; Thompson und Young, 1995; Halle und Meisterernst, 1996; Greenblatt, 1997; Myer und Young, 1998; Myers *et al.*, 1998; Ranish *et al.*, 1999). Hierbei bindet erst TFIID an der Promotor DNA und dann erfolgt die Bindung des Holo-Enzyms, die durch Aktivatoren stimuliert wird.

### 1.2.2.1 Der Core-Promotor der RNA-Polymerase II in Pflanzen

Die in dem Abschnitt 1.2.2 beschriebene basale Transkriptionsmaschinerie ist auch wesentlicher Bestandteil der Transkription der mRNA-Gene durch die RNAP II pflanzlicher

Zellen, die im Vergleich zu anderen eukaryontischen Zellen wie Hefe-, tierischen oder humanen Zellen eher selten untersucht worden sind (Kuhlemeier, 1992; Sugiura, 1997; Singh, 1998). Die große Sequenzhomologie der UEs der RNAP II verschiedener eukaryontischer Organismen (Woychik, 1998) als auch die funktionale Konservierung der TATA-Box, untersucht in *N. tabacum*, *Drosophila melanogaster* und in HeLa *in vitro*-Systemen, weisen auf evolutionäre Konservierung der basalen Transkriptionsmaschinerie der RNAP II in Eukaryonten hin (Yamaguchi *et al.*, 1998). Ackerman *et al.* (1987) ist es gelungen verschiedene Proteinfractionen aus Weizenkeimen zu isolieren, die GTFs enthielten. So konnte für TFIIA aus Weizen die gleiche Funktion wie für die des humanen TFIIA an pflanzlichen und viralen Promotoren gezeigt werden (Burke *et al.*, 1990). Außerdem wurde u. a. die Kristallstruktur des TBP aus *A. thaliana*, sowie die Bildung des Komplexes aus dem humanen TFIIB mit dem TBP aus *A. thaliana*, gebunden an die TATA-Box des Adenovirus Major Late Promotor (AdMLP), durch Röntgenstrukturanalysen untersucht (Nikolov *et al.*, 1992; 1995). Schon Gasch *et al.* (1990) haben bei der Entdeckung zweier Gene für das TBP aus *A. thaliana* nachweisen können, dass beide Proteine an die Promotor-DNA des AdMLP binden und damit das humane TBP ersetzen können, um die basale Transkription *in vitro* zu aktivieren. Auch in Mais wurden zwei Gene, welche für TBPs kodieren, entdeckt. Diese TBPs führten zu unterschiedlichen Expressionsmustern und regulieren vermutlich unterschiedliche zellspezifische Funktionen (Haass und Feix, 1992; Vogel *et al.*, 1993). Die Arbeitsgruppen stellten eine starke Konservierung der CTD der TBPs aus Hefe und *A. thaliana* bzw. *Z. mays* fest. Weiterhin konnte in Untersuchungen mit verschiedenen 5'-upstream-Fragmenten des Phenylalanin-Ammonium-Lyase Promotors aus Reis gezeigt werden, dass ein Minimalpromotor, welcher die TATA-Box und den Inr beinhaltet, für die korrekte basale Transkription verantwortlich ist (Zhu *et al.*, 1995).

Die Konsensus Sequenzen der pflanzlichen Promotor-Regionen wurden durch den Vergleich von 79 publizierten genomischen DNA-Sequenzen höherer Pflanzen ermittelt (Joshi, 1987). Hierbei lag die TATA-Box mit der Konsensus Sequenz TATATATA  $32 \pm 7$  nt stromaufwärts von der Transkriptionsinitiationsstelle, wobei die ersten vier Nukleotide und das Adenin an Position sechs mit 90 – 97 % am stärksten konserviert waren. Die Konsensus Sequenz des Inr wurde mit  $TCA_{+1}TCA$  beschrieben. Ein Adenin war in 85 % der untersuchten pflanzlichen Promotoren Transkriptionsinitiationsstelle. Die Analyse der Konsensus Sequenz der pflanzlichen TATA-Box unterscheidet sich nicht von der vorher beschriebenen TATA-Box mit der Konsensus Sequenz TATA(A/T)A(A/T) (Breathnach und Chambon, 1981; Bucher und Trifonov, 1986; Bucher, 1990). Die pflanzliche Konsensus Sequenz des Inr zeigt

eine weniger starke Homologie zu der Konsensus Sequenz PyPyA<sub>+1</sub>N(A/T)PyPy aus Säugerzellen (Javahery *et al.*, 1994).

Auch in Pflanzen sind *in vivo* weitere *cis*-regulierende Elemente notwendig, die Bindungsstellen für Aktivatoren als auch Repressoren darstellen und somit die basale Transkription ausgehend von dem Core-Promotor verstärken, abschwächen und regulieren können.

### 1.2.3 Transkriptionsinitiation in Plastiden

An der Transkription in den Plastiden höherer, photosynthetischer Pflanzen sind zwei verschiedene RNA-Polymerasen, die PEP (plastid-encoded plastid RNA polymerase) und die NEP (nuclear-encoded plastid RNA polymerase) beteiligt (Maliga, 1998; Hess und Börner, 1999).

Die PEP, welche der RNAP aus Eubakterien sehr ähnlich ist, initiiert die Transkription an einem dem  $\sigma^{70}$ -Typ ähnlichen Promotor (Allison, 2000). Das PEP Core-Enzym setzt sich aus den UEs zusammen, die von den Genen *rpoA* ( $\alpha$ -UE), *rpoB* ( $\beta$ -UE), *rpoC1* ( $\beta'$ -UE) und *rpoC2* ( $\beta''$ -UE) des Plastidgenoms exprimiert werden. Es wird als  $\alpha_2\beta\beta'\beta''$  beschrieben, wobei die  $\beta'$ - und die  $\beta''$ -UE äquivalent dem N- und C-Terminus der  $\beta'$ -UE des Core-Enzyms der bakteriellen RNAP sind (Hu und Bogorad, 1990; Hu *et al.*, 1991; Igloi und Kössel, 1992; Suguiira, 1992). In Plastiden aus *Sinapis alba* L. hat man neben der eben beschriebenen PEP (PEP-B) eine komplexere Form mit mindestens 13 Polypeptiden der PEP (PEP-A) nachweisen können. Hierbei konnte PEP-B in Etioplasten von im Dunkeln gewachsenen Senf-Sämlingen und PEP-A in Chloroplasten von grünen Senf-Sämlingen nachgewiesen werden. Beide Enzyme binden *in vitro* unter verschiedenen Voraussetzungen an identische Promotorstrukturen und transkribieren dieselben Gene (Pfannschmidt und Link, 1994; 1997). Durch Sequenzierung der N-Termini der beiden größten UEs der PEP-A (110 kDa, 141 kDa) konnte festgestellt werden, dass diese identisch mit den Genprodukten von *rpoB* und *rpoC2* der PEP-B aus *S. alba* sind (Pfannschmidt *et al.*, 2000). Somit wird angenommen, dass PEP-A und PEP-B das gleiche Core-Enzym besitzen, jedoch in Etioplasten bzw. Chloroplasten zusätzlich unterschiedliche Komponenten binden. Die Komplexität des Core-Enzyms hängt wahrscheinlich von dem Entwicklungsstadium des Chloroplasten ab (Link, 1996, Pfannschmidt *et al.*, 2000). Eine PEP, welche in Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium in bezug auf Promotorselektivität und Lichtabhängigkeit variiert, konnte außerdem in Weizen nachgewiesen werden (Sato *et al.*, 1999).

Für die Promotorerkennung der PEP sind höchstwahrscheinlich sogenannte  $\sigma$ -ähnliche Faktoren ('sigma-like factors', SLF) verantwortlich (Allison, 2000; Hakimi *et al.*, 2000). Aus den Etioplasten und Chloroplasten von Senf konnten drei SLFs mit Größen von 67, 52 und 29 kDa isoliert werden (Tiller *et al.*, 1991; Tiller und Link, 1993). Nachdem sich die Annahme bestätigte, dass die SLFs im Zellkern kodiert werden, fand man Sequenzen mit Homologien zu den bakteriellen  $\sigma$ -Faktoren, welche als cDNAs kloniert wurden. Somit sind heutzutage die Sequenzen einer großen Anzahl von SLFs aus z. B. *Arabidopsis* (Isono *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997; Yao und Allison, 1998; Kanamaru *et al.*, 1999; Fujiwara *et al.*, 2000), Mais (Tan und Troxler, 1999; Lahiri *et al.*, 1999), Reis (Tozawa *et al.*, 1998) und Senf (Kestermann *et al.*, 1998) bekannt.

Die Promotorstruktur, welche von dem PEP Holo-Enzym erkannt wird, beinhaltet die für die Eubakterien bekannten -35- (TTGACA) und -10- (TATAAT) Konsensus Sequenz Elemente (Abb. 5a). Allerdings ist in den PEP Promotoren das TTG des -35-Sequenz Elements hochkonserviert, wo hingegen das -10-Sequenz Element mit TANNNT weniger stark konserviert ist. Der optimale Abstand der beiden Konsensus Sequenzen voneinander liegt hier bei  $18 \pm 1$  nt, der optimale Abstand der -10-Region zum Transkriptionsstart liegt bei  $6 \pm 1$  nt (Gruissem und Tonkyn, 1993; Link, 1994). Die Transkriptionsaktivität einiger PEPs ist von im Zellkern gebildeten Transkriptionsfaktoren abhängig, welche mit upstream-Elementen des Promotors interagieren (Sun *et al.*, 1989; Iratni *et al.*, 1994; Allison und Maliga, 1995; Kim und Mullet, 1995).

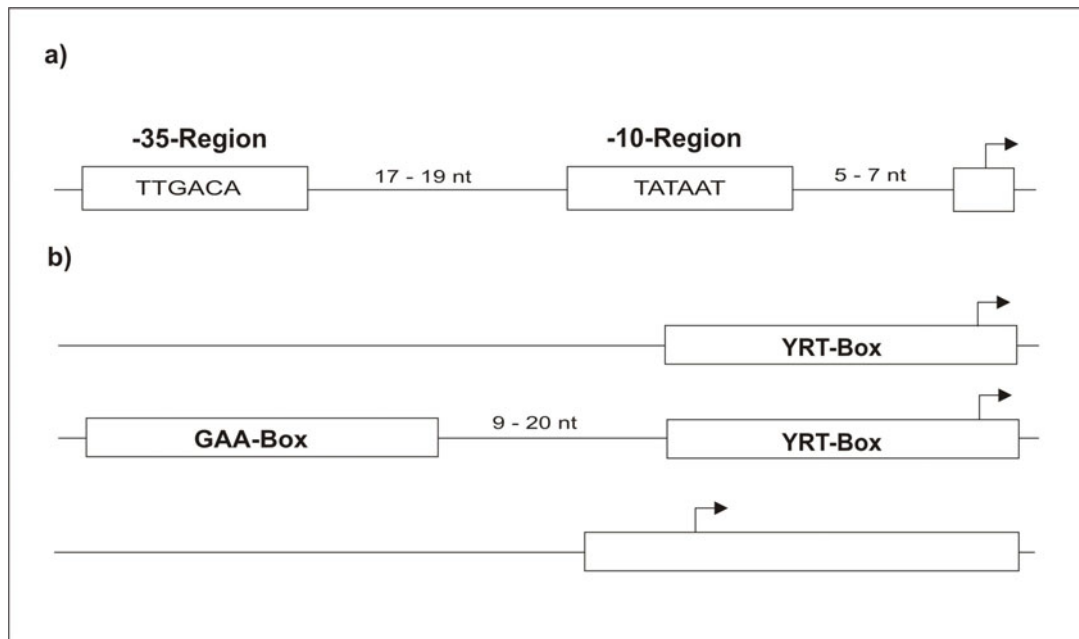
Die zweite RNA-Polymerase, die NEP wurde erstmalig von Morden *et al.* im Jahre 1991 beschrieben. Bei der Sequenzierung des Plastoms des nicht-photosynthetischen Organismus *Epifagus virginiana* konnten keine funktionalen *rpo*-Gene identifiziert werden. Die NEP wird im Zellkern der Pflanzenzellen kodiert und besteht aus einer einzigen UE, welche für ein T7 Bakteriophagen-ähnliches Enzym kodiert (Lerbs-Mache, 1993). Das Gen, welche für diese RNAP kodiert, wurde bisher in *Chenopodium album* (Weihe *et al.*, 1997), *A. thaliana* (Hedtke *et al.*, 1997; 1999), *N. tabacum* (Hedtke *et al.*, 2002), *Z. mays* (Young *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999) und *Triticum aestivum* (Ikeda und Gray, 1999) identifiziert. Das nukleäre Genom von *A. thaliana* enthält drei Gene, welche für Bakteriophagen-ähnliche RNAPs (*RpoT*;1, *RpoT*;2, *RpoT*;3) kodieren (Hedtke *et al.*, 1997; 1999; 2000) und in *N. tabacum* liegen sogar zwei orthologe Sets dieser drei Gene vor (Hedtke *et al.*, 2002). *RpoT*;1 kodiert hierbei für die RNAP, welche in den Mitochondrien aktiv ist und das *RpoT*;3-Genprodukt ist in den Chloroplasten aktiv (Hedtke *et al.*, 1997; 1999). Für das *RpoT*;2-Genprodukt aus *A. thaliana* und *N. tabacum* konnte festgestellt werden, dass dieses sowohl in Mitochondrien als auch in



Chloroplasten zu finden ist und vermutlich die Gene beider Genome transkribiert (Hedtke *et al.*, 2000; 2002). Somit wurden für die Plastiden von *A. thaliana* und *N. tabacum* zwei verschiedene nukleär kodierte Bakteriophagen-ähnliche RNAPs beschrieben.

Der Sequenzvergleich von NEP-Promotoren aus den Plastomen von Monokotyledonen ergab zwei konservierte Boxen (Abb. 5b). Eine Box (YRT-Box) erstreckt sich um die Transkriptionsinitiationsstelle mit der Konsensus-Sequenz YATAGAATAA, wobei das YATA-Motiv am stärksten konserviert ist. Eine weitere Box (GAA-Box) mit demselben verkürzten Motiv ATAGAAT, jedoch mit der stärksten Konservierung der Sequenz GAAT, befindet sich 9-12 nt stromaufwärts der YRT-Box (Silhavy und Maliga, 1998; Hübschmann und Börner, 1998; Hess und Börner, 1999; Weihe und Börner, 1999). Der Sequenzvergleich von NEP-Promotoren aus dem Plastom von *N. tabacum* weist ein ähnliches Boxen-Motiv auf. Die Konsensus Sequenz der YRT-Box wird mit der Sequenz ATAGAATRAA um die Transkriptionsinitiationsstelle beschrieben (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Miyagi *et al.*, 1998; Hess und Börner, 1999; Weihe und Börner, 1999; Kapoor und Sugiura, 1999). Die GAA-Box mit der Sequenz ATAWGAA liegt hier ca. 20 nt stromaufwärts der YRT-Box. Die Analyse des *rpoB* Promotors aus *N. tabacum* ergab, dass die Funktion und Stärke des Promotors von einer Sequenz 15 nt stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle (-14 bis +1) abhängt. Diese Sequenz beinhaltet ebenfalls ein YATA-Motiv (-8 bis -5), wobei die Nukleotide CAT an den Positionen -8 bis -6 am stärksten konserviert sind (Liere und Maliga, 1999a). Eine Sequenz mit dem GAAT-Motiv (-21 bis -18) liegt nur 9 nt stromaufwärts des YATA-Motivs des *rpoB* Promotors und beeinflusst nach der Analyse von Liere und Maliga (1999a) die RNAP-Aktivität nur sehr gering. Die Funktion und Stärke des *accD* Promotors wiederum hängt von einer Sequenz mit 19 nt (-17 bis +2) ab. Auch dieser Promotor beinhaltet das YATA-Motiv (-9 bis -6) mit TAT an den Positionen -9 bis -7 (Liere und Maliga, 1999a; 1999b), jedoch keine GAA-Box. Die analysierten Promotorregionen des *rpoB* als auch der *accD* Promotor aus *N. tabacum* weisen auf keine weiteren *cis*-regulatorischen Elemente hin (Liere und Maliga, 1999a; 1999b). Andere NEP-Promotoren wie der *rpoB* Promotor aus dem Mais (Silhavy und Maliga, 1998) und der *clpP*-511 Promotor aus dem Tabak (Hajdukiewicz *et al.*, 1997) weisen auch nur die YRT-Box auf (Abb. 5b). Weiterhin wurden auch NEP-Promotoren beschrieben wie der *clpP*-53 Promotor aus Tabak, deren Sequenzaufbau sich vollkommen von den ermittelten Konsensus Sequenzen unterscheidet (Abb. 5b; Sriraman *et al.*, 1998). Hier stellt sich die Frage, ob dieser Promotor nur von einer modifizierten Form der NEP oder nicht doch von einer anderen RNAP erkannt wird (Kapoor und Sugiura, 1999). Für die Transkription der Gene des *rrn*-Operons in den Plastiden von Spinat wird sogar

angenommen, dass neben den beiden beschriebenen Polymerasen (PEP, NEP) noch eine weitere nukleär kodierte RNAP verantwortlich ist (Iratni *et al.*, 1997; Bligny *et al.*, 2000).

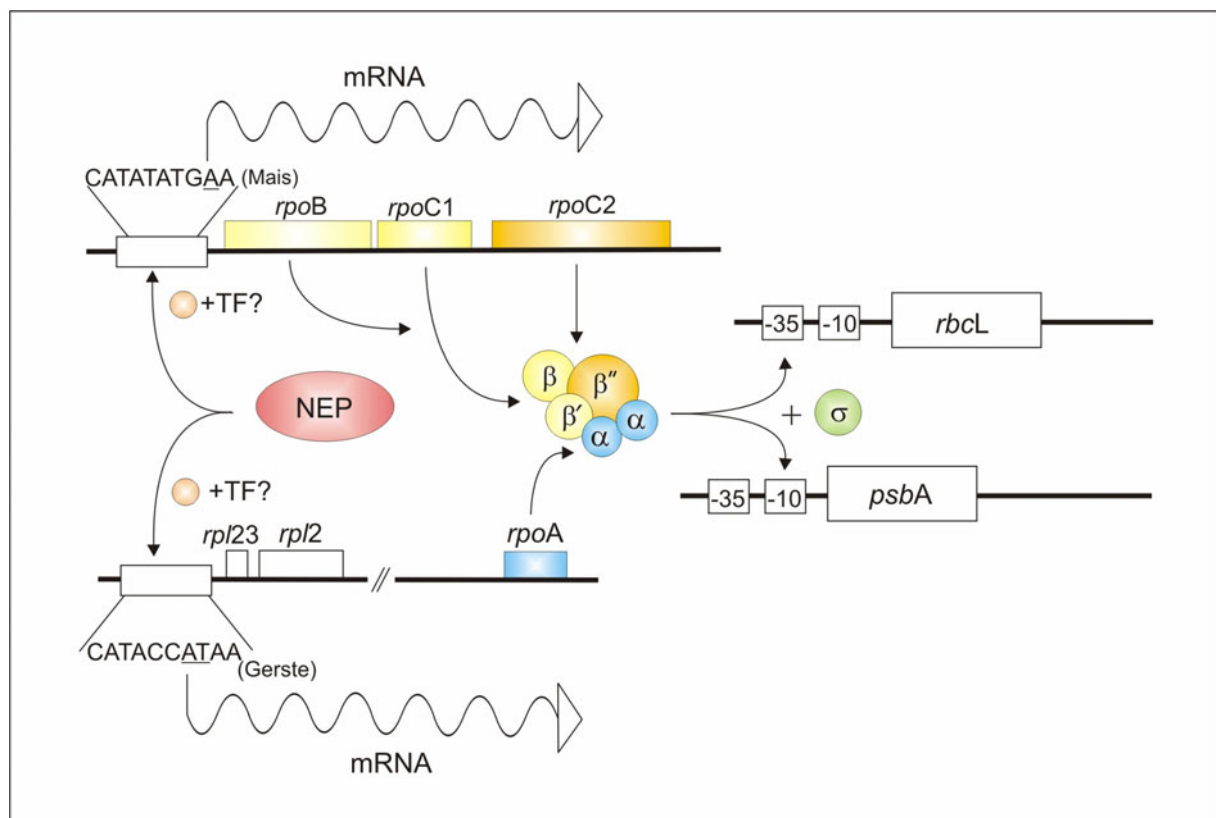


**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Promotorregionen, welche von den verschiedenen Plastiden Polymerasen zur Transkriptionsinitiation genutzt werden (modifiziert nach Weihe und Börner, 1999). **a**  $\sigma^{70}$ -Typ ähnlicher Promotor der PEP mit den -35- und -10-Konsensus Sequenzen. **b** Drei Typen von Promotorregionen, die von den verschiedenen NEPs zur Transkriptionsinitiation genutzt werden (Weihe und Börner, 1999). Eine Promotorregion weist das charakteristische YRT-Motiv innerhalb einer AT-reichen Sequenz auf. Daneben gibt es NEP-Promotoren, welche sowohl die YRT-Box als auch 9 bis 20 nt stromaufwärts eine weitere Box mit dem hochkonserviertem GAA-Motiv enthalten. Andere NEP-Promotoren weisen keine der beiden beschriebenen Motive auf. Der Transkriptionsstart wurde durch einen Pfeil dargestellt.

In den Plastid-Genen oder -Operons werden drei Gen-Klassen unterschieden: Zur Gen-Klasse I gehören Gene oder Operons, welche von PEP Promotoren aus transkribiert werden. Dies sind vor allem die Plastid-Gene des Photosystem I und II. Die Gene oder Operons der Gen-Klassen II besitzen sowohl PEP als auch NEP Promotoren. Hierzu gehören Operons, welche Haushaltsgene mit Genen der Photosynthese vereinen oder auch nur Haushaltsgene beinhalten. Die Gene oder Operons der Gen-Klasse III, die nur NEP Promotoren zur Transkription der Haushaltsgene besitzen sind eher selten (Hajdukiewicz *et al.*, 1997).

Allgemein anerkannt ist die Meinung, dass PEP und NEP in bestimmten Wachstumsphasen der Plastiden aktiv sind. Die NEP ist hierbei aktiv bei der Expression der Haushaltsgene in den nicht differenzierten Proplastiden. Bei der Weiterentwicklung zu Chloroplasten übernimmt dann überwiegend die PEP die Expression der Haushaltsgene und exprimiert weiterhin die Gene, welche für den photosynthetischen Apparat benötigt werden

(Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Maliga, 1998). Desweiteren transkribiert die NEP Gene der Plastiden in nicht-grünem Gewebe und Gene, welche in metabolischen Synthesewegen involviert sind wie z. B. die Gene der Biosynthese von Aminosäuren und Fettsäuren (Hess und Börner, 1999). Ein Beispiel des Zusammenspiels von NEP und PEP ist in der Abb. 6 dargestellt. Die unterschiedlichen Promotoren der NEP und PEP, welche durch die entsprechenden Enzyme erkannt werden, ermöglichen die Abgrenzung der Aufgaben der jeweiligen RNAP.



**Abb. 6:** Spezifität und Funktion der NEP bzw. PEP (Hess und Börner, 1999). Die NEP, welche aus einer einzigen UE besteht, transkribiert mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren (TF) z. B. die Gene *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* der PEP. Die PEP wiederum erkennt mit Hilfe des  $\sigma$ -Faktors die für Eubakterien-ähnlichen -35- und -10-Konsensus Sequenzen der Promotoren der Gene *rbcL* und *psbA*.

### 1.3 In der vorliegenden Arbeit untersuchte Promotoren

In dieser Arbeit wurden zwölf pflanzenspezifische Promotoren (Tab. 3) auf ihre Expression in Eubakterien untersucht. Diese pflanzenspezifischen Promotoren werden zur Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen genutzt und stammten aus den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. U. Sonnewald (Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben) und Prof. Dr. B. Müller-Röber (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm).

Weiterhin wurden drei bakterielle und sechs Plastiden Promotoren (Tab. 3) auf ihre Expression in *N. tabacum* untersucht. Die untersuchten bakteriellen Promotoren werden bei der Herstellung transgener Pflanzen in das Pflanzengenom integriert. Die Untersuchung der Plastiden Promotoren in Eukaryonten ist aus evolutionsbiologischer Sicht interessant, da sich nach heutigem Kenntnisstand Plastiden wie auch Mitochondrien aus Eubakterien-ähnlichem Endosymbionten entwickelten (Gray, 1993; 1999). Die Plastiden Promotoren wurden von Dr. K. Liere (Humboldt Universität, Berlin) zur Verfügung gestellt.

**Tab. 3:** Untersuchte pflanzenspezifische, bakterielle und Plastiden Promotoren.

Promotor (P)	Herkunft und Eigenschaften
P 35S	35S Promotor des CaMV (Frank <i>et al.</i> , 1980; Odell <i>et al.</i> , 1985). Pflanzenspezifischer Promotor mit konstitutiver bzw. gewebsspezifischer Wirkung in Blättern und Wurzeln (Benfay und Chua, 1990).
P B33	Klasse 1 Patatin-Gen aus <i>S. tuberosum</i> var. Berolina (Rocha-Sosa <i>et al.</i> , 1989). Der Promotor vermittelt eine knollenspezifische Expression, die durch Saccharose induzierbar ist (Liu <i>et al.</i> , 1990).
P ST-LS1	Das ST-LS1-Gen ist ein 'single copy' Gen aus <i>S. tuberosum</i> . Das 10 kDa große Protein wird als Komponente des Sauerstoff-bildenden Komplexes des Photosystems II in Chloroplasten-haltigen Zellen gebildet (Eckes <i>et al.</i> , 1986; Stockhaus <i>et al.</i> , 1989a). Der Core-Promotor (-130 bis +11) führt zu keiner detektierbaren Expression des fusionierten Reportergens in Tabak. Hingegen führt die Promotorregion von -334 bis +11 zu einer blatt-, stammspezifischen und lichtinduzierbaren Expression, jedoch mit einem Drittel des Expressionsniveaus des vollständigen Promotors (-1600 bis +11). Dies ist auf das Vorhandensein von positiv regulierenden Elementen in der Region von -530 bis -261 zurückzuführen (Stockhaus <i>et al.</i> , 1987; 1989b).
P RolC	Das <i>rolC</i> -Gen stammt aus dem Ri-Plasmid von <i>Agrobacterium rhizogenes</i> und induziert mit den weiteren Genen des 'root locus' ( <i>rol</i> ) in Pflanzen die 'hairy root disease' (White <i>et al.</i> , 1985; Slightom <i>et al.</i> , 1986). Der pflanzenspezifische Promotor führt in transgenem Tabak und Reis zu einer Expression in Phloemzellen (Schmülling <i>et al.</i> , 1989; Matsuki <i>et al.</i> , 1989; Sugaya und Uchimaya, 1992). In transgenen Kartoffeln führt der Promotor neben der Expression in Phloemzellen auch zu einer Expression im vaskulärem Parenchym (Graham <i>et al.</i> , 1997). Die Expression wird in transgenen Tabakpflanzen durch Saccharose induziert (Yokoyama <i>et al.</i> , 1994).
P 130	Alkoholdehydrogenase-Gen aus <i>N. tabacum</i> var. Samsun. Der Promotor wird im Leitgewebe induziert (persönliche Mitteilung G. Mönke, IPK Gatersleben).
P 247	Gen kodiert für ein caldomulin-ähnliches Protein in <i>N. tabacum</i> zur Calcium-Bindung und wird im Cytosol von spezifischen Mesophyllzellen exprimiert (persönliche Mitteilung G. Mönke, IPK Gatersleben).

P FBP	Gen, welches für die cytoplasmatische Fruktose-1,6-bisphosphatase in <i>S. tuberosum</i> (L. cv. Désirée) kodiert. Expression in Mesophyllzellen, jedoch nicht an Chloroplasten gebunden. Untersuchung von zwei verschiedenen großen Promotorfragmenten mit 1,7 und 1,1 kbp, welche sich wahrscheinlich durch die Anwesenheit eines gewebsspezifischen Enhancers unterscheiden (persönliche Mitteilung M. Ebnet, IPK Gatersleben).
P Nos	Nopalin-Synthase Gen aus dem Ti-Plasmid aus <i>A. tumefaciens</i> . Für die maximale Genexpression werden 88 bp des Promotors benötigt, welche die CAAT- und die TATA-Box beinhalten (Shaw <i>et al.</i> , 1984). Die Expressionseigenschaft des Promotors wird unterschiedlich als konstitutiv (Herrera-Estrella <i>et al.</i> , 1984) bzw. temporal, organspezifisch vor allem im Wurzelsystem von Pflanzen (Ha und An, 1989) beschrieben.
P SKT2	Gen kodiert für einen einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal in <i>S. tuberosum</i> (L. cv. Désirée; Erhardt <i>et al.</i> , 1997). Der Promotor vermittelt selektive Expression in Xylem-Parenchymzellen (persönliche Mitteilung N. Weigmann, MPI-MP Golm).
P KST1	Gen kodiert für einen einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal in <i>S. tuberosum</i> (Müller-Röber <i>et al.</i> , 1995; Zimmermann <i>et al.</i> , 2001). Der Promotor vermittelt selektive Expression in Schließzellen und in der Blütenbasis (Plesch <i>et al.</i> , 2001).
P KCO1	Gen kodiert für einen auswärts gleichrichtenden Kaliumkanal in <i>A. thaliana</i> (Czempinski <i>et al.</i> , 1997; Schönknecht <i>et al.</i> , 2002). Der Promotor vermittelt Expression in verschiedenen Geweben der Pflanze, einschließlich Blättern, Schließzellen, Blüten und Wurzeln (persönliche Mitteilung K. Czempinski, MPI-MP Golm).
P Lac	Promotor des <i>lac</i> -Operons aus <i>E. coli</i> (Jacob <i>et al.</i> , 1964; Dickson <i>et al.</i> , 1975). Die Expression des <i>lac</i> -Operons wird durch Laktose induziert. Das Operon unterliegt einer positiven und negativen Kontrolle. Die negative Kontrolle erfolgt durch die Bindung des Repressorproteins an den Operator. Die Transkription erfolgt jedoch nur nach Bindung des CRP (Cyclic AMP Receptor Protein) an den Promotor (positive Kontrolle).
P NptIII	Das <i>nptIII</i> -Gen stammt aus pJH1 aus <i>Streptococcus faecalis</i> und verleiht Kanamycinresistenz (Trieu-Cout und Courvalin, 1983).
P Bla	Promotor der Tem1 $\beta$ -Lactamase ( <i>bla</i> ) des Tn3 aus <i>E. coli</i> . Das Gen verleiht Ampicillinresistenz (Wishart <i>et al.</i> , 1983).
P RbcL	Gen kodiert für die große UE der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (Shinozaki und Sugiura, 1982a; 1982b). Der Promotor stammt aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> und wird von der PEP erkannt. Für die volle Promotoraktivität wird nur der Core-Promotor benötigt. Die Transkriptmenge ist lichtunabhängig (Allison <i>et al.</i> , 1996; Shiina <i>et al.</i> , 1998).
P PsbA	Gen kodiert für das 32 kDa D1 Polypeptid des reaktiven Zentrums des Photosystems II (Shinozaki <i>et al.</i> , 1986). Der Promotor stammt aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> , ist lichtinduzierbar und wird von der PEP erkannt (Staub und Maliga, 1994; Allison <i>et al.</i> , 1996). Die Sequenz beinhaltet eine 'extended -10-Region', welche in den höheren Pflanzen hochkonserviert ist (Satoh <i>et al.</i> , 1999).

---

P ClpP	Gen kodiert für die proteolytische UE der ATP-abhängigen Clp Protease (Maurizi <i>et al.</i> , 1990; Shikanai <i>et al.</i> , 2001). Der Promotor stammt aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> und wird sowohl von der PEP (PclpP-95) als auch von der NEP (PclpP-53) zur Transkriptionsinitiation genutzt (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1997; Sriraman <i>et al.</i> , 1998).
P AtpB	Gen kodiert für die $\beta$ -UE der ATPase (Shinozaki <i>et al.</i> , 1986; Orozco <i>et al.</i> , 1990). Der Promotor stammt aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> und wird sowohl von der PEP als auch von der NEP erkannt (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1997; Kapoor <i>et al.</i> , 1997; Kapoor und Sugiura, 1999).
P AccD	Gen kodiert für eine UE der Acetyl-CoA Carboxylase (Sasaki <i>et al.</i> , 1993). Der Promotor stammt aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> und wird von der NEP erkannt (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1997; Liere und Maliga, 1999b).
P RpoB	Gen kodiert für die $\beta$ -UE der PEP (Shinozaki <i>et al.</i> , 1986; Ohme <i>et al.</i> , 1986). Der Promotor stammt aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> und wird von der NEP erkannt (Allison <i>et al.</i> , 1996; Serino und Maliga, 1998; Liere und Maliga, 1999a).

---

#### 1.4 Ziel der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Spezifität von Promotorsequenzen untersucht werden. Hierfür sollte eine Auswahl von pflanzenspezifischen Promotoren, die in der Gentechnik zur Herstellung von transgenen Pflanzen eingesetzt werden, auf Genexpression in Bakterien untersucht werden. Desweiteren sollten bakterielle und Plastiden Promotoren auf Expression in Pflanzen untersucht werden. Neben der Fragestellung, welche Promotoren zu einer Expression nachgeschalteter Gene führen können, sollte untersucht werden, welches Ausmaß diese Genexpression annehmen kann.

Weiterhin sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob mit einer Computergestützten Suche nach potentiellen eukaryontischen bzw. prokaryontischen Konsensus Sequenzen in den Sequenzen der verwendeten Promotoren eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob und mit welchem Ausmaß die heterologe Expression der nachgeschalteten Gene erfolgt.

Im Falle einer Genexpression sollten die Transkripte der jeweiligen Promotoren durch Transkriptionsstartanalyse und Northern Hybridisierung näher charakterisiert werden. Es sollte die Möglichkeit geprüft werden, ob optimierte Vektoren mit Promotoren, welche nur in dem Zielorganismus zu der gewünschten Expression führen, hergestellt werden können.

Diese Ergebnisse sollen einen Beitrag zur Bewertung der biologischen Sicherheit beim Einsatz gentechnisch veränderter Organismen liefern, da sie einen Aspekt der Risikobewertung, nämlich die Möglichkeit der Expression der übertragenen Gene in andere Organismengruppen, beleuchten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

#### 2.1.2 Enzyme und Kits

**Tab. 4:** Verwendete Enzyme und Kits

Substanz / Kit	Hersteller
5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends	Life Technologies, Eggenstein
ABI PRISM® FS Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Applied Biosystems, Weikersheim
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Cryobank™	Mast Diagnostica, Reinfeld
DNA-Größenstandards	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Elongase™ Enzym Mix	Life Technologies, Eggenstein
Primer	TIP MOLBIOL, Berlin Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg <i>Metabion</i> , Martinsried
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
Klenow-Enzym	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
NucleoSpin®Plus-Kit	Clontech Laboratories Inc., Heidelberg
PCR Fluorescein Labeling Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick™ Gel Extraktion Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Renaissance® Kit	NEN Life Science Products, Zaventem, Belgien
SV RNA Isolation System Kit	Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Titan One Tube RT PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Wizard™ DNA Clean-Up System	Promega GmbH, Mannheim

## 2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Pflanzen

### 2.2.1 Verwendete Bakterienstämme

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme und deren genotypischen Eigenschaften sind in Tab. 5 dargestellt.

**Tab. 5:** Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Charakteristika
<i>E. coli</i> K-12 Stamm DH5 $\alpha$ (Hanahan, 1983)	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>
<i>E. coli</i> K-12 Stamm CC118( $\lambda$ <i>pir</i> ) (Herrero <i>et al.</i> , 1990)	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>pho20A</i> <i>thi-1</i> <i>rpsE</i> <i>rpoB</i> <i>argE</i> (Am) <i>recA1</i> ; Infektion mit dem Phagenlysat $\lambda$ <i>pir</i> von <i>E. coli</i> SY327( $\lambda$ <i>pir</i> )
<i>Y. enterocolitica</i> Stamm 78 (Lewin <i>et al.</i> , 1996)	Serovar O:13,7; Biovar 1A; der Stamm enthält ein Plasmid der Größe 52 kbp
<i>A. tumefaciens</i> Stamm ATHV <sup>a</sup>	Modifizierter <i>A. tumefaciens</i> Stamm A281 (Hood <i>et al.</i> , 1986); in pEHA101 wurde das Kanamycin- resistenz Gen deletiert; chromosomaler Hintergrund von <i>A. tumefaciens</i> Stamm C58; <i>rif</i> <sup>R</sup>
<i>P. putida</i> <sup>b</sup>	Umweltisolat
<i>Acinetobacter</i> species Stamm BD413 (Nielsen <i>et al.</i> , 1997)	Mutante des Stammes BD4; <i>rif</i> <sup>R</sup>

Die Bakterienstämme wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: <sup>a</sup> J. Schiemann, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig; <sup>b</sup> Stammsammlung der Technischen Fachhochschule, Berlin

### 2.2.2 Klonierungsvektoren

Die in Tab. 6 aufgeführten Vektoren dienen der Klonierung der zu untersuchenden Promotoren (pBin19, pBi101.2, pKK232-8) oder der Klonierung der 5'-RACE Produkte (pLitmus28).



**Tab. 6:** Klonierungsvektoren

Plasmid	Charakteristika
pBin19 (Bevan, 1984)	Binärer Vektor zur Transformation von Pflanzen mit <i>A. tumefaciens</i> ; RK2 origin; km <sup>R</sup> ; T-DNA mit nm <sup>R</sup> und <i>lacZ'</i> -Region aus M13mp19; 11777 bp
pBi101.2 (Jefferson <i>et al.</i> , 1987)	Binärer Vektor zur Transformation von Pflanzen mit <i>A. tumefaciens</i> ; Derivat von pBin19 mit promotorlosem <i>gus</i> als Reporter gen; 12200 bp
pKK232-8 (Brosius, 1984)	Promotorstudien-Vektor mit promotorlosem <i>cat</i> als Reporter gen; Transkriptionsstop <i>rrnB</i> vor der MCS; Derivat von pBR322; amp <sup>R</sup> ; 5094 bp
pLitmus28 (Evans <i>et al.</i> , 1995)	Klonierungsvektor; pUC Derivat; amp <sup>R</sup> ; M13 origin; ColE1 origin; <i>lacZ'</i> -Region mit MCS; 2823 bp

### 2.2.3 Vorhandene Promotorkonstrukte

Die in Tab. 7 aufgeführten Plasmide sind im Rahmen der Diplomarbeit (Jacob, 1997) an der Technischen Fachhochschule zu Berlin entstanden. Sie wurden zur Lumineszenzmessung und für weitergehende Untersuchungen in die Arbeit mit einbezogen.

**Tab. 7:** Vorhandene Promotorkonstrukte

Plasmid	Charakteristika
pBinlux-SalI/pKKlux	pBin19/pKK232-8 fusioniert mit den promotorlosen <i>luxAB</i> -Genen aus <i>Vibrio harveyi</i>
p35Slux/pKK35lux (Lewin <i>et al.</i> , 1998)	pBin19/pKK232-8 mit der Fusion des 35S-Promotors (540 bp) aus CaMV und den <i>luxAB</i> -Genen; Promotorursprung: pBinAR (Höfgen and Willmitzer, 1990)
pB33lux/pKKB33lux (Lewin <i>et al.</i> , 1998)	pBin19/pKK232-8 mit der Fusion des Promotors (1500 bp) des Klasse I B33-Patatin Gens aus <i>S. tuberosum</i> und den <i>luxAB</i> -Genen; Promotorursprung: pB33-pBin19 (Rocha-Sosa <i>et al.</i> , 1989)
pST-LS1lux/pKKST-LS1lux (Lewin <i>et al.</i> , 1998)	pBin19/pKK232-8 mit der Fusion des Promotors (1600 bp) des ST-LS1-Gens aus <i>S. tuberosum</i> und den <i>luxAB</i> -Genen; Promotorursprung: pBin-L700 (Eckes <i>et al.</i> , 1986)
pRolClux/pKKRolClux (Lewin <i>et al.</i> , 1998)	pBin19/pKK232-8 mit der Fusion des Promotors (1150 bp) des <i>rolC</i> Gens aus <i>A. rhizogenes</i> und den <i>luxAB</i> -Genen; Promotorursprung: pBin19-RolC (Yokoyama <i>et al.</i> , 1994)

### 2.2.4 Promotorderivate, Reportergene

Die in Tab. 8 beschriebenen Promotoren wurden entweder mittels PCR und sequenzspezifischen Primern amplifiziert und kloniert oder direkt durch DNA-Restriktion der Promotorderivate gewonnen und in die entsprechenden Vektoren kloniert. Zur Untersuchung der Expressionsstärke der pflanzlichen Promotoren in Bakterien wurden die promotorlosen *luxAB*-Gene aus *V. harveyi* als Reportergene eingesetzt.

**Tab. 8:** Promotorderivate, Reportergene

Plasmid	Charakteristika, Beschreibung des Promotors
Mini-Tn5 <i>luxAB</i> (De Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)	Vektor pUT mit Mini-Tn5 <i>luxAB</i> und $tc^R$ als <i>XbaI/EcoRI</i> -Fragment; enthält die promotorlosen <i>luxAB</i> -Gene aus <i>V. harveyi</i>
pBinG130 <sup>a</sup>	pBin19 fusioniert mit dem Promotor (P 130, 1400 bp) des Alkoholdehydrogenase Gens aus <i>N. tabacum</i> (var. Samsun)
pBinG247 <sup>a</sup>	pBin19 fusioniert mit dem Promotor (P 247, 1200 bp) eines Gens aus <i>N. tabacum</i> , welches für ein calmodulin-ähnliches Protein codiert
pME1 <sup>b</sup>	pBi101.1 fusioniert mit dem FBP1,7-Promotor (1700 bp) des Gens der cytoplasmatischen Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) aus <i>S. tuberosum</i> (L. cv. Désirée)
pFBPase1,1 <sup>b</sup>	pBin19 fusioniert mit dem <i>EcoRI</i> -Fragment des FBP1,1-Promotors (1100 bp), welcher am 5'-Ende um 600 bp gegenüber dem Promotor aus pME1 verkürzt ist
pBi101-SKT2 <sup>c</sup>	pBi101 fusioniert mit dem SKT2-Promotor (3100 bp) des Gens aus <i>S. tuberosum</i> (L. cv. Désirée), welches für einen einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal kodiert
pDKP3 <sup>d</sup>	pBi101 fusioniert mit dem KST1-Promotor (1500 bp) des Gens aus <i>S. tuberosum</i> , welches für einen einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal kodiert
pPK-Gus-4 <sup>c</sup>	pGPTV-HPT (Becker, 1990) fusioniert mit dem KCO1-Promotor (870 bp) des Gens aus <i>A. thaliana</i> , welches für einen auswärts gleichrichtenden Kaliumkanal kodiert
pKL12 <sup>f</sup>	pBluescript-Derivat mit dem Promotor (P RbcL, 207 bp) des Gens für die große UE der Ribulose-1,6-bisphosphat Carboxylase aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> (Acc. # Z00044, von Position 57328 bis 57534)

pKL13 <sup>f</sup>	pBluescript-Derivat mit dem Promotor (P PsbA, 227 bp) des Gens für das D1-Protein des Photosystem II aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> (Acc. # Z00044, von Position 1822 bis 1596)
pKL14 <sup>f</sup>	pBluescript-Derivat mit dem Promotor (P ClpP, 306 bp) des Gens für die proteolytische UE der Clp-ATP-abhängigen Protease aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> (Acc. # Z00044, von Position 74712 bis 74407)
pKL18 <sup>f</sup>	pBluescript-Derivat mit dem Promotor (P AtpB, 315 bp) des Gens für die $\beta$ -UE der ATPase aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> (Acc. # Z00044, von Position 57139 bis 5682)
pKL43 <sup>f</sup>	pBluescript-Derivat mit dem Promotor (P AccD, 376 bp) des Gens für eine UE der Acetyl-CoA Carboxylase aus den Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> (Acc. # Z00044, von Position 59385 bis 59760)
pKL44 <sup>f</sup>	pBluescript-Derivat mit dem Promotor (P RpoB, 323 bp) des Gens für die $\beta$ -UE der PEP aus dem Chloroplasten von <i>N. tabacum</i> (Acc. # Z00044, von Position 28050 bis 27728)

Die Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: <sup>a</sup> G. Mönke, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben; <sup>b</sup> M. Ebnet, IPK Gatersleben; <sup>c</sup> N. Weigmann, Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie (MPI-MP) Golm; <sup>d</sup> T. Ehrhardt, MPI-MP Golm; <sup>e</sup> K. Czempinski, MPI-MP Golm; <sup>f</sup> K. Liere, Humboldt Universität Berlin

### 2.2.5 Pflanzen

Die Expressionseigenschaften ausgewählter Promotoren in der Pflanze wurden in *N. tabacum* cv. Samsun NN überprüft.

### 2.3 Nährmedien und Kulturbedingungen

*E. coli*, *Y. enterocolitica*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. BD413 wurden auf LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) und *A. tumefaciens* auf TY-Medium (Beringer, 1974) angezogen. Die Inkubation der mit Yersinien, Pseudomonaden, *Acinetobacter* und Agrobakterien beimpften Agarplatten erfolgte 24 bis 48 h bei 28 °C, bei *E. coli* über Nacht bei 37 °C. Flüssigkulturen wurden unter den genannten Bedingungen bei 180 bis 200 rpm geschüttelt.

Zur selektiven Anzucht der Bakterienstämme, die ein Antibiotikumresistenzgen besaßen, wurden folgende Antibiotikumkonzentrationen in die jeweiligen Medien gegeben:

Ampicillin	100 µg/ml	Rifampicin	50 µg/ml
Chloramphenicol	25 µg/ml	Tetracyclin	10 µg/ml
Neomycin	100 µg/ml		

## 2.4 Stammhaltung

Alle Stämme wurden mit Hilfe des Cryobank™-Systems (Mast Diagnostica) archiviert. Die Bakterienkulturen sind bei diesem System an Keramikkügelchen gebunden und werden bei  $-20\text{ °C}$  und  $-75\text{ °C}$  gelagert. Die Archivierung erfolgte entsprechend dem Protokoll der Herstellerfirma. Die Anzucht der Stämme erfolgte durch den Verdünnungsausstrich einer Keramikugel auf LB- bzw. TY-Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikumzusatz und deren Kultivierung bei  $28\text{ °C}$  bzw.  $37\text{ °C}$ .

## 2.5 Primer

Die Primer wurden lyophilisiert bezogen und mit Wasser für molekulargenetische Zwecke zu einer Stammlösung gelöst. Von dieser Stammlösung wurden Arbeitsverdünnungen mit  $30\text{ ng}/\mu\text{l}$  hergestellt.

Die Primer sind in den Tab. 9 bis Tab. 16 aufgeführt. Vorhandene Restriktionsschnittstellen der Primer wurden in den Sequenzen *kursiv* dargestellt.

### 2.5.1 Primer zur Herstellung der pflanzenspezifischen Promotoren

**Tab. 9:** Verwendete Primer zur Herstellung des Nos-, KST1- und KCO1-Promotors. Die Lokalisationen der Primer des Nos-Promotors beziehen sich auf die DNA-Sequenz des Vektors pBin19 (Acc. # U09365), bei dem KCO1-Promotor auf die DNA-Sequenz mit der Acc. # Y07825 und bei dem KST1-Promotor auf die DNA-Sequenz mit der Acc. # AJ242852 (2-KST1-S) und die DNA-Sequenz des Vektors pBi101 mit der Acc. # U12639 (KST-AS).

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation	Region	Restriktions-schnittstelle	Annealing Temp. [°C]
Nos-S1	GCG TCG ACC TGC GTG CAA TCC ATC TTG	8909-8931	5'UTR <i>nos</i>	<i>SalI</i>	54
Nos-AS1	CGC CCG GGA ACG GAT AAA CCT TTT CAC G	9391-9371	5'UTR <i>nos</i>	<i>SmaI</i>	54
2-KCO1-S	CGC CCG GGC TCG AGT GGT TGA ATG	241-256	5'UTR KCO1-Gen	<i>SmaI</i> , <i>XhoI</i>	46
KCO1-AS	CGC CCG GGT CTA GAC TCA AAC CAG	1223-1208	5'UTR KCO1-Gen	<i>SmaI</i> , <i>XbaI</i>	46
2-KST1-S	CGC CCG GGA TCG TCA TCA GAA GAG GTG G	4-23	5'UTR KST1-Gen	<i>SmaI</i>	60
KST-AS	CAT AAG GGA CTG ACC ACC CGG G	2553-2532	MCS pBi101	<i>SmaI</i>	60

### 2.5.2 Primer zur Herstellung der bakteriellen Promotoren

**Tab. 10:** Verwendete Primer zur Herstellung der Promotoren von *nptIII* und *bla*. Die Lokalisationen der Primer des *NptIII*-Promotors beziehen sich auf die DNA-Sequenz des Vektors pBin19 (Acc. # U09365) und die des *Bla*-Promotors auf die DNA-Sequenz des Vektors pKK232-8 (Acc. # U13859).

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation	Region	Restriktions-schnittstelle	Annealing Temp. [°C]
NPTIII-Sma-S	GCG CCC GGG CAT AAT TGT GGT TTC AAA ATC GGC	2085-2108	5'UTR <i>nptIII</i>	<i>SmaI</i>	55
NPTIII-AS	GCG CCC GGG TTA TTA TTT CCT TCC TCT TTT C	2275-2254	5'UTR <i>nptIII</i>	<i>SmaI</i>	55
Amp-Sma-S	GCG CCC GGG CGT CAG GTG GCA CTT TTC G	5020-5002	5'UTR <i>bla</i>	<i>SmaI</i>	50
Amp-AS	GCG CCC GGG ACT CTT CCT TTT TCA ATA TTA TTG	4887-4910	5'UTR <i>bla</i>	<i>SmaI</i>	50

### 2.5.3 Primer zur Herstellung der Chloroplasten Promotoren

**Tab. 11:** Verwendete Primer zur Herstellung der Chloroplasten Promotoren. Die Lokalisation bezieht sich auf die Chloroplasten-DNA aus *N. tabacum* (Acc. # Z00044).

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation	Region	Restriktions-schnittstelle	Annealing Temp. [°C]
psbA-S	GCG AAG CTT CCC GGG CAA CCC ACT AGC	1822-1805	5' UTR <i>psbA</i>	<i>HindIII/SmaI</i>	60
psbA-AS	GCG CCC GGG TAA AAT CTT GGT TTA TTT AAT C	1596-1619	5' UTR <i>psbA</i>	<i>SmaI</i>	60
rbcL-Sma-S	GCG CCC GGG AGT CAG GTA TTT CCA TTT C	57328-57356	5' UTR <i>rbcL</i>	<i>SmaI</i> ,	52
rbcL-AS3	CGC CCG GGA ATT CCG TGT TAA TGA AAC	57534-57515	5' UTR <i>rbcL</i>	<i>SmaI, EcoRI</i>	52
accD-Sma-S	GCG CCC GGG GAG CTC TTT CCT ACC CAT C	59385-59400	5' UTR <i>accD</i>	<i>SmaI, SacI</i>	54
accD-AS	GCG CCC GGG AAT TCC TAT CAG ACT AAG C	59760-59744	5' UTR <i>accD</i>	<i>SmaI, EcoRI</i>	54
rpoB-Sma-S	GCG CCC GGG AGC TCT CTC TTC TCT AC	28050-28036	5' UTR <i>rpoB</i>	<i>SmaI</i>	54
rpoB-AS	GCG CCC GGG AAT TCA ACA GAT ACA AAT GG	27728-27745	5' UTR <i>rpoB</i>	<i>SmaI, EcoRI</i>	54
atpB-Sma-S	GCG CCC GGG AGC CAA TTA GAT ACA AAT AAT GAA TCG	57139-57117	5' UTR <i>atpB</i>	<i>SmaI</i>	65
atpB-AS3	CGC CCG GGA ATT CAA AAT AAA TGT CCG C	56825-56845	5' UTR <i>atpB</i>	<i>SmaI, EcoRI</i>	65
clpP-Sma-S	CGC CCC GGG AAT GAG TCC ATA CTT ATT TAT C	74712-74689	5' UTR <i>clpP</i>	<i>SmaI</i>	60
clpP-AS	CGC CCC GGG ATA TGA CCC AAT ATA TCT GAC AAG	74407-74420	5' UTR <i>clpP</i>	<i>SmaI</i>	60

### 2.5.4 Primer für die 5'-RACE

Für die 5'-RACE wurden die im Kit (Life Technologies) mitgelieferten Anker- und `Abridged Universal Amplification Primer´ (AAP, AUAP) verwendet. Die genspezifischen Primer (GSP) sind analog Sequenzabschnitten aus dem *luxA*-Gens aus *V. harveyi* und dem *cat*-Gen des Vektors pKK232-8.

**Tab. 12:** Verwendete Primer zur Bestimmung der Transkriptionsstarts mittels 5'-RACE. Die Lokalisation bezieht sich auf die DNA-Sequenz der *luxAB*-Gene aus *V. harveyi* (Acc. # M10961) und des *cat*-Gens des Vektors pKK232-8 (Acc. # U13859). \* I = Inosin. Inosin dient der Erniedrigung der Schmelztemperatur des Primers.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation	Region	Restriktions-schnittstelle	Annealing Temp. [°C]
AAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG*	/	/	<i>MluI/SalII/SpeI</i>	65
AUAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	/	/	<i>MluI/SalII/SpeI</i>	65
GSP1/ <i>luxA</i> -3	CAA CAT AAG GAT TCC C	882-864	<i>luxA</i>	/	42
GSP2/ <i>luxA</i>	GCG TAC TAG TCA GTG AAG TGG TGC TCT AGC AAC C	849-825	<i>luxA</i>	<i>SpeI</i>	65
GSP3/ <i>luxA</i>	GCG TAC TAG TCC ACA ACC TTC AGA CGC TTT GC	810-788	<i>luxA</i>	<i>SpeI</i>	65
GSP1/ <i>Cat</i>	GAT GAG CAT TCA TCA G	479-464	<i>cat</i>	/	42
GSP2/ <i>Cat</i>	GCA CTA GTG CAA GAA TGT GAA TAA AGG CCG	459-437	<i>cat</i>	<i>SpeI</i>	65

### 2.5.5 Primer für die ortsspezifische Mutagenese des ST-LS1-Promotors

**Tab. 13:** Verwendete Primer zum Einfügen von Basenaustauschen in den ST-LS1-Promotor. Die Lokalisation bezieht sich auf die Promotor-Sequenz des ST-LS1-Gens aus *S. tuberosum* (Acc. # X04753), sowie die DNA-Sequenz der *luxAB*-Gene aus *V. harveyi* (Acc. # M10961) und die DNA-Sequenz des Vektors pBin19 (Acc. # U09365).

\* Basenaustausche gegenüber der Originalsequenz sind **rot** eingezeichnet.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation	Region	Annealing Temp. [°C]
pBin19 6847	CAA TTT CAC ACA GGA AAC AGC	6867-6848	<i>lacZ</i>	60
pBin19 6746	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCG	6746-6766	<i>lacZ</i>	60/56
luxA/AS2	GAT AGC TCA GGT GGC TGA TAA G	753-732	<i>luxA</i>	60
ST-LS1/1530/OM	GCA AAG TGA AAA TAA ATA ATT CAT AC	1530-1555	5'UTR ST-LS1-Gen	60
1530-D-TATAAT	GCA AAG TGA AAA TAA ATA <b>AGT TAT AAT</b> AAG*	1530-1559	5'UTR ST-LS1-Gen	56
1530-TGNTAT	GCA AAG TGA AAA TAA ATA <b>TGT TAT AAT</b> AAG*	1530-1559	5'UTR ST-LS1-Gen	56
1530-TATAAT	GCA AAG TGA AAA TAA ATA <b>ATT TAT AAT</b> AAG*	1530-1559	5'UTR ST-LS1-Gen	56
1530-CGTACG	GCA AAG TGA AAA TAA ATA <b>ATT CGT ACG</b> AAG*	1530-1559	5'UTR ST-LS1-Gen	60
1530-CCTACC	GCA AAG TGA AAA TAA ATA <b>ATT CCT ACC</b> AAG*	1530-1559	5'UTR ST-LS1-Gen	60
1530-CACGGCT	GCA AAG TGA AAA TAA ATA <b>ATT CAC GCT</b> AAG*	1530-1559	5'UTR ST-LS1-Gen	60



### 2.5.6 Primer für die quantitative RT-PCR (Taq®Man)

Die Taq®Man-Oligonukleotid-Sonde als auch die Primer der Tab. 14 binden auf einem Sequenzabschnitt des *luxB*-Gens aus *V. harveyi* und wurden für die quantitative RT-PCR eingesetzt.

**Tab. 14:** Verwendete Primer zur Herstellung quantitativer PCR-Produkte. Die Lokalisation bezieht sich auf die DNA-Sequenz der *luxAB*-Gene aus *V. harveyi* (Acc. # M10961).

\* F: 6-Carboxy-Fluorescein (Fam); T: 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin (Tamra = Quencher).

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation	Region	Annealing Temp. [°C]
lux2270F	CCG TTA ACC CAC ACG CGT	2270-2287	<i>luxB</i>	60
lux2329R	TGC TCG TCG CAT TCA CAA A	2329-2311	<i>luxB</i>	60
Fam-Sonde-Tamra	F – CAC TGA AGG CCG TCC TGC GCA – T*	2289-2309	<i>luxB</i>	60

### 2.5.7 Primer zur Sondenherstellung für die Northern Hybridisierung

Die Sonde für die Northern Hybridisierung ist einem 400 bp Sequenzabschnitt auf dem *luxA*-Gen von *V. harveyi* homolog. Sie wurde mittels PCR und durch die in Tab. 15 aufgelisteten Primern hergestellt.

**Tab. 15:** Verwendete Primer zur Sondenherstellung. Die Lokalisation bezieht sich auf die DNA-Sequenz der *luxAB*-Gene aus *V. harveyi* (Acc. # M10961).

Primer	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation	Region	Annealing Temp. [°C]
luxA/S1	AAT CCA ACT GAA TCC ATC GGC	1171-1191	<i>luxA</i>	57
luxA/AS1	GGC GAT TGG TGT CTT TGT GG	1577-1558	<i>luxA</i>	57

### 2.5.8 Sequenzierprimer, Primer für die Direkt-PCR

**Tab. 16:** Verwendete Primer zur Sequenzierung und für die Direkt-PCR. Die Lokalisation bezieht sich auf die angegebene DNA-Sequenz der Acc. #.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Acc. #	Lokalisation	Region	Annealing Temp. [°C]
luxA/AS2	GAT AGC TCA GGT GGC TGA TAA G	M10961	753-732	<i>luxA</i>	53
Bi-2052/7273	TGA TTC TGT CGC TAC TGA TTA CCG	U12668	2053-2076	pBi101.2, Vektor-DNA	58
Gus-2583-AS	TTC ACG GGT TGG GGT TTC TAC	U12668	2585-2565	<i>gus</i>	58
LacZ/S1	GAG TTA GCT CAC TCA TTA GG	U09365	6949-6930	<i>lac</i>	43
Bin19S	CTC TTC GCT ATT ACG CCA G	U09365	6666-6684	<i>lac</i>	58
ST-LS1305	CAA GTC AAT CTC TTG GGT CCC	X04753	1305-1325	5'UTR ST-LS1-Gen	58
L700-1	CAA GGA TTA GTT GAA TCG GG	X04753	282-263	5'UTR ST-LS1-Gen	55
L700-2	CAT TCC CAC AAG AAA GAC G	X04753	887-869	5'UTR ST-LS1-Gen	55
L700-3	TTG TTG CCT GTT GGA GAC	X04753	1205-1188	5'UTR ST-LS1-Gen	55
pKK232-8/S1	TGA ACG CTC TCC TGA GTA	U13859	73-90	pKK232-8, Vektor-DNA	55
pKK232-8/AS1	GTT CTT TAC GAT GCG ATT	U13859	329-312	<i>cat</i>	55
LitF	CAT GAT TAC GCC AAG CTA CG	/	/	pLitmus28, MCS	55
LitR	GTA AAA CGA CGG CCA GTC CG	/	/	pLitmus28, MCS	60
KCO113S	GGG GAT GTT TTG AAG TAT GC	Y07825	353-372	5'UTR KCO1-Gen	60
KCO632S	GAA GAA CAA TTG CGA GAT CCG	Y07825	862-882	5'UTR KCO1-Gen	60
KCO311AS	GCC AAA ATA TCC AGC ATG ACG	Y07825	551-531	5'UTR KCO1-Gen	58
KCO618AS	GAT GAT GTT CTC ACA AGT TGG C	Y07825	858-838	5'UTR KCO1-Gen	60
KST438S	CAA ACA TCA AGC ACA TGG AAC C	AJ242852	442-463	5'UTR KST1-Gen	58
KST914S	CCT ATT TGG GAT TTG TTG GTC	AJ242852	918-938	5'UTR KST1-Gen	60
KST1340S	GTA GGC AAG TAG CAA TGT CAC G	AJ242852	1344-1365	5'UTR KST1-Gen	60
KST304AS	GGC CCA CAT GCA TGA AGT TTC	AJ242852	307-287	5'UTR KST1-Gen	60
KST692AS	GGA AAT GAC GTT GGA ACT CTG	AJ242852	695-675	5'UTR KST1-Gen	58
KST1189AS	CAA ACG AGG CGA GAT ATG AG	AJ242852	1173-1192	5'UTR KST1-Gen	60
KST1523AS	CGA GTT TCT TGG AAA GGC AAT G	AJ242852	1526-1505	5'UTR KST1-Gen	58

## 2.6 DNA-Techniken

### 2.6.1 Plasmid-Isolierungstechniken

Zur Überprüfung erfolgreicher Klonierungen in *E. coli* und zur DNA-Sequenzierung wurden Plasmidisolierungen mit dem NucleoSpin®Plus-Kit (Clontech) durchgeführt. Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen in 2 bis 10 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum-Zusatz über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Entsprechend dem NucleoSpin®Plus-Kit Protokoll wurden dann die Plasmide von den Kulturen isoliert.

Die Plasmidisolierungsmethode mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) wurde bei Benötigung großer Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli* vorgenommen. Hierfür wurden die Zellen mit den jeweiligen zu isolierenden Plasmiden je nach Kopienzahl in 100 bis 500 ml LB-Medium mit Antibiotikum-Zusatz über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Von diesen Flüssigkulturen wurden dann nach den Angaben des Herstellers die Plasmide isoliert.

Die Plasmidisolierung mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (Sambrook *et al.*, 1989) wurde angewandt zur Gewinnung hochreiner, konzentrierter Plasmide der ccc-Form. Diese Methode der Plasmidisolierung erfolgte für Plasmide, die für das Partikelbombardement eingesetzt wurden. Die Anzucht der Kulturen erfolgte wie beschrieben bei der Plasmidisolierungsmethode nach QIAGEN.

### 2.6.2 DNA-Aufreinigungstechniken

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA z. B. nach Restriktionsverdau erfolgte bei den pBin-Konstrukten mit Phenol-Chloroform und anschließender Fällung mit Isopropanol (Sambrook *et al.*, 1989).

Bei Plasmiden, deren Gesamtgröße kleiner als 10 kbp war, wurde die DNA-Reinigung mit dem Wizard™ DNA Clean-Up System (Promega) durchgeführt. Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers, wobei die DNA nach der Elution in Aqua bidest. vorlag.

Zur Klonierung gezielter DNA-Fragmente wurden Restriktionsverdaus elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel mit dem QIAquick™ Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers eluiert. Dieses Kit eignet sich nur zur Eluierung von DNA-Fragmenten der Größe 100 bis 10000 bp. Die DNA lag nach der Elution in Aqua bidest. vor.

DNA-Fragmente der Größe von 100 bis 10000 bp, die mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt wurden, wurden durch das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### **2.6.3 Fluorometrische DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die DNA-Konzentration wurde fluorometrisch mit dem DyNA Quant 200-Fluorometer (Hoefer - Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) bestimmt. Diese Messung wird weder durch vorhandene RNA- noch Proteinverunreinigungen gestört. Die hochspezifische Erfassung der DNA erfolgt mit einem Farbstoff (Hoechst-Dye Solution 33258 Stammlösung, Frankfurt a. M.), der sich in die kleinen Furchen der DNA-Helix einlagert. Die DNA-Konzentrationsmessung erfolgte, nach Kalibrierung des Gerätes mit einem Standard, nach den Angaben des Herstellers.

### **2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte in Horizontalelektrophorese-Apparaturen (GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein; Biometra, Göttingen). Je nach Anforderung wurden 0,8 bis 2,0 %ige Agarosegele eingesetzt. Den Gelen wurde zur Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zu 100 ml Agarose-Lösung zugegeben. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer (100 mM Tris-HCl; 100 mM Borsäure; 1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. Die Laufzeit und angelegte Spannung variierte je nach Größe und Konzentration der Agarosegele zwischen 1 bis 3 Stunden bei 70 bis 140 V.

Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurden folgende DNA-Größenstandards (MBI Fermentas) mitgeführt: 100 bp DNA Ladder (100-1000 bp), 1 kbp DNA Ladder (ab 500 bp) und  $\lambda$  DNA/*Eco*130I (ab 1000 bp).

Von den Agarosegelen wurden mit Hilfe der Fotodokumentationsanlagen (Polaroid MP4<sup>+</sup> Instant Camera System, Polaroid, Offenbach; INTAS Modellreihe 95KFE103, Rothhaar & Schroeder) Bilder erstellt.

### **2.6.5 Enzymatische Reaktionen**

#### **2.6.5.1 DNA-Restriktion**

Die DNA-Restriktionsverdau wurden nach den von den Herstellern der Enzyme (MBI Fermentas, New England Biolabs) empfohlenen Bedingungen in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Pro Verdau wurde ca. 50 bis 200 ng DNA und 8 bis 12 U der erforderlichen Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die optimale Salzkonzentration wurde durch die Zugabe der entsprechenden Menge an 10x Enzympuffer erreicht. Weitere Zusätze wie BSA (Rinderserumalbumin) oder Triton TX-100 waren entweder im Enzympuffer enthalten (MBI Fermentas) oder wurden nach den vom Hersteller empfohlenen Richtlinien eingesetzt (New

England Biolabs). Die Inkubationszeit betrug 1 bis 2 Stunden. Die Inkubationstemperaturen richteten sich nach dem Temperaturoptimum der Restriktionsendonuklease.

Für präparative Zwecke erfolgte ein proportionales Scale-up des Standard-Restriktionsansatzes bis zu 200  $\mu$ l.

Die Verdau wurden anschließend mit 0,1 Volumen Bromphenolblau-Lösung (0,25 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose in 1x TE pH 8,0) gestoppt.

### **2.6.5.2 Alkalische Phosphatase Behandlung**

Für diese Reaktion wurde die 'Calf Intestine Alkaline Phosphatase' (CIAP, MBI Fermentas) verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 50  $\mu$ l. Die DNA wurde nach der Restriktion sofort zur Phosphatase-Behandlung eingesetzt. Zum Verdau-Ansatz mit maximal 20 pmol DNA-Enden wurden 5  $\mu$ l 10x Enzympuffer, sowie 1  $\mu$ l (1 U) CIAP gegeben und ad 50  $\mu$ l mit Aqua bidest. aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten. Die Denaturierung der Phosphatase erfolgte durch Erhitzen des Ansatzes bei 75 °C für 10 Minuten mit anschließender zweimaliger Phenolisierung. Danach wurde die DNA gefällt.

### **2.6.5.3 Auffüllreaktion mit Klenow-Enzym**

Mit Hilfe des Klenow-Enzyms (MBI Fermentas) wurden die nach einer DNA-Restriktion erhaltenen 5'-kohäsiven Enden zu glatten Enden aufgefüllt. Die Auffüllreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l mit maximal 1  $\mu$ g DNA durchgeführt. Die Reaktion erfolgte entweder bei geeigneter Pufferkonzentration durch den Restriktionsansatz direkt nach dem Restriktionsverdau nach Aufreinigung der verdauten DNA durch das Wizard<sup>TM</sup> DNA Clean-Up System (Promega GmbH) oder durch Phenol-Chloroform mit anschließender Fällung. Es wurden 1  $\mu$ l (bei 20  $\mu$ l Restriktionsverdau) oder 3  $\mu$ l (nach Fällung) 10x Enzympuffer, 1  $\mu$ l dNTP (4 mM) und 1 bis 5 U Klenow-Enzym zusammengegeben und auf ein Endvolumen von 30  $\mu$ l mit Aqua bidest. aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C. Anschließend wurde die Reaktion für 15 Minuten bei 70 °C gestoppt. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur erfolgte die Reinigung der DNA (s. o.).

#### 2.6.5.4 Ligation

Die Ligase-Ansätze erfolgten in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l. Es wurden 50 bis 100 ng Insert-DNA eingesetzt. Die Menge an eingesetzter Vektor-DNA richtete sich nach der Anzahl der freien Enden des Inserts und wurde im Verhältnis 1:1 zueinander gegeben. Zum Ansatz wurden weiterhin 2  $\mu$ l 10x Ligase-Puffer, 2  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) gegeben und mit Aqua bidest. ad 20  $\mu$ l aufgefüllt. Bei blunt-end Ligationen wurden maximal 5 % PEG 4000 vom Gesamtvolumen zugesetzt.

Blunt-end Ligationsansätze wurden mindestens drei Stunden bei RT und sticky-end Ligationsansätze über Nacht bei 12 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach der Inkubation wurde der Ansatz, sofern er nicht sofort transformiert wurde, bei -20 °C gelagert.

#### 2.6.6 Transformation

Die in dieser Arbeit untersuchten Bakterienstämme wurden auf unterschiedliche Weise transformiert.

Der *E. coli* K-12 Stamm DH5 $\alpha$  wurde mit der Hitzeschock-Methode nach Hanahan (1983) transformiert. Die nach dieser Methode hergestellten kompetenten Zellen wurden entweder direkt mit 10  $\mu$ l eines Ligationsansatzes oder 10 bis 100 ng eines Plasmids transformiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75 °C mehrere Monate aufbewahrt.

*Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens* und *P. putida* wurden durch Elektroporation mit dem Elektroporator Easy ject (Equi Bio, Angleur, Belgien) transformiert.

Das Protokoll zur Transformation von *Y. enterocolitica* ist beschrieben in Lewin *et al.* (1998).

Die elektrokompetenten Zellen von *A. tumefaciens* wurden nach dem Protokoll von Nagel *et al.* (1989) hergestellt. Hierfür wurde der Stamm jedoch nicht wie beschrieben in YEP-Medium, sondern in TY-Medium angezogen. Zur Regeneration der elektroporierten Zellen wurde SOC-Medium (Sambrock *et al.*, 1989) statt YEP-Medium eingesetzt.

Die Herstellung elektrokompetenter *P. putida*-Zellen, sowie deren Elektroporation wurden nach dem Protokoll von Artiguenave *et al.* (1997) mit den Elektroporationsparametern 12,5 kV cm<sup>-1</sup>, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  und einer Pulszeit von 5 ms durchgeführt.

Die elektrokompetenten Zellen, die nicht sofort transformiert wurden, wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75 °C mehrere Monate gelagert.

Die Filtertransformation von *Acinetobacter* sp. BD413 wurde nach der Beschreibung von Nielsen *et al.* (1997) vorgenommen.

### 2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) ist ein *in vitro*-Verfahren zur Amplifizierung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Nukleinsäuregemisch.

Bei der Reaktion wird die doppelsträngige DNA der Probe durch Erhitzen auf 95 °C in ihre Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Danach wird die Probe auf eine Temperatur abgekühlt, die für die Hybridisierung der Primer an ihrer Zielsequenz optimal ist (Primer Annealing), so daß für die Taq-Polymerase ein doppelsträngiger Startpunkt für die Auffüllreaktion des DNA-Einzelstranges entsteht (Elongation). Eine Temperaturerhöhung auf 72 °C verschafft optimale Bedingungen für die Amplifikation der DNA durch die Taq-Polymerase. Durch Wiederholung des Zyklus von Denaturierung, Primer Annealing und Elongation wird eine exponentielle Vermehrung der Ziel-DNA erreicht.

Die PCR-Amplifikationen erfolgten in den Thermocyclern GeneAmp® PCR System 2400 und 9700 (PE Applied Biosystems).

#### 2.6.7.1 PCR zur Amplifizierung definierter Promotorsequenzen

Die PCR, deren Reaktionsansatz und Temperaturprofil des Thermocyclers in Tab. 17 dargestellt sind, wurde zur Amplifizierung der Promotorsequenzen von P KST1, P KCO1, P NptIII, P Bla, P PsbA, P RbcL, P AccD, P RpoB, P AtpB und P ClpP eingesetzt. Die jeweiligen Primer enthielten Restriktionsschnittstellen, die ein gezieltes Klonieren der PCR-Produkte in die jeweiligen Vektoren ermöglichte.

**Tab. 17:** PCR-Reaktionsansatz und Thermocycler-Bedingungen zur Amplifikation definierter Promotorsequenzen. \* Die Wahl der Annealing-Temperatur richtete sich nach den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer. \*\* Der gewählte Zeitraum für die Elongation war abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Nukleinsäure-Fragmentes (ca. 1 min/1 kbp zu amplifizierendes Nukleinsäure-Fragment).

Reaktionsansatz	Temperaturprofil		
0,1 – 1 ng Template-DNA 10 µl 10x PCR-Puffer 8 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub> 10 µl 2 mM dNTP-Mix je 150 ng Primer <u>2,5 U Taq DNA-Polymerase</u> ad 100 µl Aqua bidest.	5 min	95 °C	1x
	1 min	95 °C	
	30 s	55 – 60 °C*	35x
	1 – 2 min**	72 °C	
	7 min	72 °C	1x
	∞	4 °C	

### 2.6.7.2 Direkt-PCR

Die Direkt-PCR ermöglichte den Nachweis von inserierter DNA richtiger Orientierung in einem Vektor ohne vorherige Isolierung der DNA. Für diesen Zweck wurden Flüssigkulturen der zu überprüfenden Klone über Nacht angezogen. 1  $\mu$ l dieser Kultur dienten im PCR-Ansatz (siehe Tab. 18) als Template.

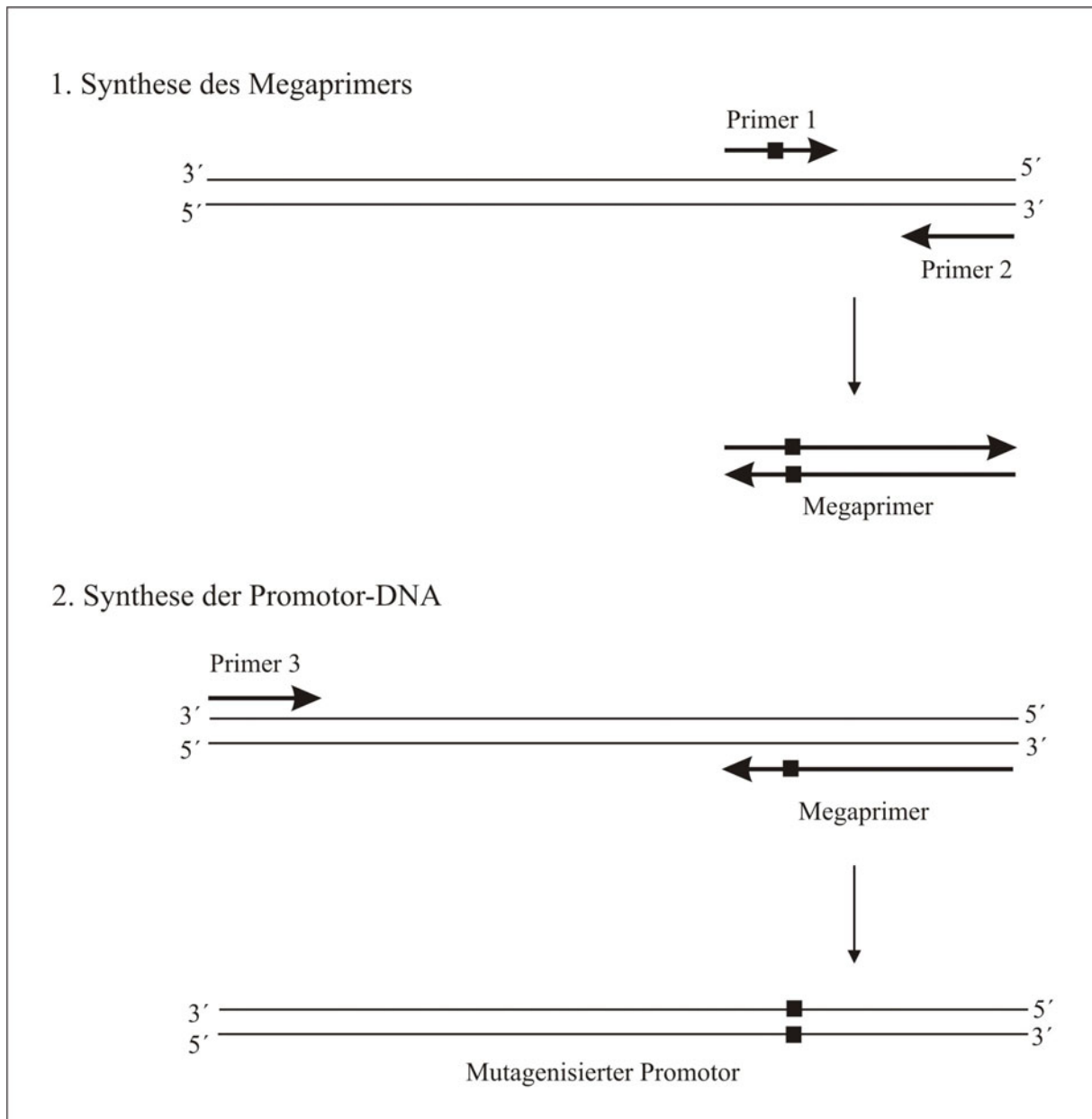
**Tab. 18:** Reaktionsansatz und Thermocycler-Bedingungen der Direkt-PCR. \* Die Wahl der Annealing-Temperatur richtete sich nach den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer.

Reaktionsansatz	Temperaturprofil		
1,0 $\mu$ l Template-Kultur 2,5 $\mu$ l 10x PCR-Puffer 1,5 $\mu$ l 25 mM MgCl <sub>2</sub> 2,5 $\mu$ l 2 mM dNTP-Mix je 75 ng Primer <u>0,5 U Taq DNA-Polymerase</u> ad 25 $\mu$ l Aqua bidest.	10 min	95 °C	1x
	20 s	95 °C	
	20 s	53 – 60 °C*	35x
	1 min	72 °C	
	7 min	72 °C	1x
	$\infty$	4 °C	

### 2.6.7.3 Megaprimer PCR

Die Methode der Megaprimer PCR ist ein *in vitro*-Verfahren zur Einführung von Basenaustauschen oder Deletionen in die zu amplifizierenden Nukleinsäure-Sequenzen (Abb. 7; Barik, 1996). Zur Einführung der gewünschten Modifikation werden zwei PCR-Runden benötigt, die mit drei verschiedenen Primern durchgeführt werden. In der ersten PCR-Runde wird ein Primer mit gewünschter Modifikation (Mismatch-Primer) in Kombination mit einem zweiten Primer eingesetzt. Das resultierende Amplifikat enthält den jeweilig gewünschten Basenaustausch oder die Deletion und wird in einer zweiten PCR-Runde in Kombination mit einem dritten Primer als Megaprimer eingesetzt.





**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Megaprimer PCR. Primer 1 stellt den Mismatch-Primer dar (■ = Mismatch).

Bei der Megaprimer-PCR sollte darauf geachtet werden, dass die eingesetzte Polymerase keine 'proof-reading'-Aktivität besitzt. Die Reaktionsansätze und Thermocycler-Bedingungen sind in Tab. 19 dargestellt. Entgegen herkömmlichen PCR-Protokollen wird die Template-DNA in der zweiten PCR-Runde im  $\mu\text{g}$ -Bereich eingesetzt. Dieses verhindert ein 'selfannealing' der Megaprimer.

**Tab. 19:** Reaktionsansatz und Thermocycler-Bedingungen der Megaprimer PCR. In der 1. PCR-Runde wurden die Megaprimer hergestellt, welche in der 2. PCR-Runde zur Synthese der Promotor-DNA eingesetzt wurden. \* Die Wahl der Annealing-Temperatur richtete sich nach den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer.

Reaktionsansatz	Temperaturprofil		
<b>1. PCR-Runde</b>  1,0 ng Template-DNA 10,0 µl 10x PCR-Puffer 8,0 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub> 10,0 µl 2 mM dNTP-Mix 150 ng Primer 150 ng Mismatch-Primer <u>2,5 U Taq DNA-Polymerase</u> ad 100 µl Aqua bidest.	7 min	96 °C	1x
	1 min	96 °C	
	30 s	56 bzw. 60 °C*	35x
	1 min	72 °C	
	7 min	72 °C	1x
	∞	4 °C	
<b>2. PCR-Runde</b>  1,0- 5,0 µg Template-DNA 10,0 µl 10x PCR-Puffer 8,0 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub> 10,0 µl 2 mM dNTP-Mix 150 ng Primer 150 ng Mismatch-Primer <u>2,5 U Taq DNA-Polymerase</u> ad 100 µl Aqua bidest.	7 min	96 °C	1x
	1 min	96 °C	
	2 min	60 °C	35x
	2 min	72 °C	
	7 min	72 °C	1x
	∞	4 °C	

#### 2.6.7.4 Sondenherstellung mittels PCR

Bei bekannter DNA-Sequenz ist die Amplifizierung eines DNA-Fragmentes mit gleichzeitiger Markierung durch fluoreszenzmarkierte Nukleotide möglich. Diese fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden als Sonden zur Detektion spezifischer DNA oder RNA mittels Hybridisierung eingesetzt.

Für die Markierung solcher DNA-Fragmente wurde der PCR Fluorescein Labeling Mix (Roche Diagnostics) eingesetzt. Zur Herstellung der Sonden wurden die von der Herstellerfirma empfohlenen PCR-Protokolle verwendet.

## 2.6.8 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahrens nach Sanger *et al.* (1977).

Die Reaktion wurde nach den in Tab. 20 aufgezeichneten Bedingungen mit dem ABI PRISM<sup>®</sup> FS Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) und den im Kapitel 2.6.7 beschriebenen Thermocycler durchgeführt.

**Tab. 20:** Reaktionsansatz und Thermocycler-Bedingungen der Sequenzierung. \* Die Wahl der Annealing-Temperatur richtete sich nach den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer. \*\* Der Hersteller macht keine Angaben über die genaue Zusammensetzung.

Reaktionsansatz	Temperaturprofil		
250 ng DNA 3 µl Big Dye** 30 ng Primer ad 10 µl Aqua bidest.	2 min	96 °C	1x
	10 s	95 °C	
	5 s	42 – 60 °C*	25x
	4 min	72 °C	
	∞	4 °C	

Die Reinigung und Fällung der Sequenzieransätze erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Proben wurden auf 4,8 %ige PAGE-Plus-Gele aufgetrennt und mit dem ABI PRISM<sup>®</sup> 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems) analysiert.

Zur Auswertung der Sequenzdaten wurden die Programme Factura<sup>™</sup> 2.2.0 und Auto Assembler<sup>™</sup> 2.1 (PE Applied Biosystems) verwendet. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Mac Vector<sup>™</sup> 6.5.3 (Oxford Molecular Group).

## 2.7 RNA-Techniken

### 2.7.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem SV RNA Isolation System Kit (Promega) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Isolierung der RNA aus Bakterien ist es wichtig, dass die Flüssigkulturen in kürzester Zeit auf eine optische Dichte von 0,6 bis 1,0 bei einer Wellenlänge 600 nm (OD<sub>600</sub>) heranwachsen. Weitere wichtige Schritte sind die Inaktivierung endogener RNasen, sowie der DNase-Verdau, welche in dem Kit beinhaltet waren.

### 2.7.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde eine 1:50 oder 1:100 Verdünnung der RNA mit Aqua bidest. hergestellt und diese in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm gemessen. Eine Absorption  $A_{260}$  von 1,0 entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$ . Zur Untersuchung der Reinheit der RNA wurde diese Verdünnung ebenfalls bei einer Wellenlänge  $\lambda = 280$  nm gemessen. Das Verhältnis der Absorptionen von  $A_{260}/A_{280}$  liegt bei einer Protein-, DNA-freien RNA-Präparation zwischen 1,9 und 2,1.

### 2.7.3 RNA-Gelelektrophorese

Zur weiteren Untersuchung der RNA mittels Northern Hybridisierung wurden denaturierende Agarosegele mit Formaldehyd erstellt. Hierbei wurde das Protokoll aus Sambrook *et al.* (1989) optimiert.

Um RNA der Größe von 2000 bis 3000 Basen im Blot nachzuweisen, eignet sich ein 1,3 %iges denaturierendes Agarosegel. Für ein Agarosegel mit z. B. dem Volumen von 110 ml wurden 1,43 g Agarose, 11 ml 10x FA-Gelpuffer (0,2 M MOPS; 50 mM NaAcetat; 10 mM EDTA; pH 7,0 mit NaOH) und 99 ml DEPC-Wasser (0,1 %) zueinander gegeben, aufgeköcht und auf 65 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 1,26 ml 37 %iges Formaldehyd polymerisierte das Gel ohne Zusatz von Ethidiumbromid in der vorgesehenen Kammer.

Als Laufpuffer wurde der 10x FA-Gelpuffer mit entsprechender Menge von DEPC-Wasser versetzt. Zusätzlich wurde 37 %iges Formaldehyd in einem Anteil von 1/50 zum Endvolumen des Laufpuffers gegeben.

Vor dem Beladen des Gels mit den RNA-Proben, lief dieses 30 Minuten bei 5 bis 7 V/cm vor. Vier Teile der RNA-Probe (max. 30  $\mu\text{g}$ ) sowie 5  $\mu\text{l}$  des RNA-Markers (Promega) wurden mit einem Teil 5x Beladungspuffer (16  $\mu\text{l}$  Bromphenolblau-Lösung; 80  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA, pH 8,0; 720  $\mu\text{l}$  37 % Formaldehyd; 2 ml 100 % Glycerol; 3084  $\mu\text{l}$  Formamid; 4 ml 10x FA-Gelpuffer; ad 10 ml DEPEC-Wasser) versetzt, 3 bis 5 Minuten auf 65 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

Der Gellauf erfolgte ebenfalls bei 5 bis 7 V/cm. Die Puffer der beiden Kammern wurden stündlich durchmischt, um eine Ionenkonzentrierung zu vermeiden.

Nach dem Lauf wurden die Spuren des Markers abgeschnitten und über Nacht im Ethidiumbromid-Bad (5  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromidlösung [10 mg/ml] zu 100 ml DEPC-Wasser) gefärbt.

#### 2.7.4 Northern Hybridisation und Visualisierung

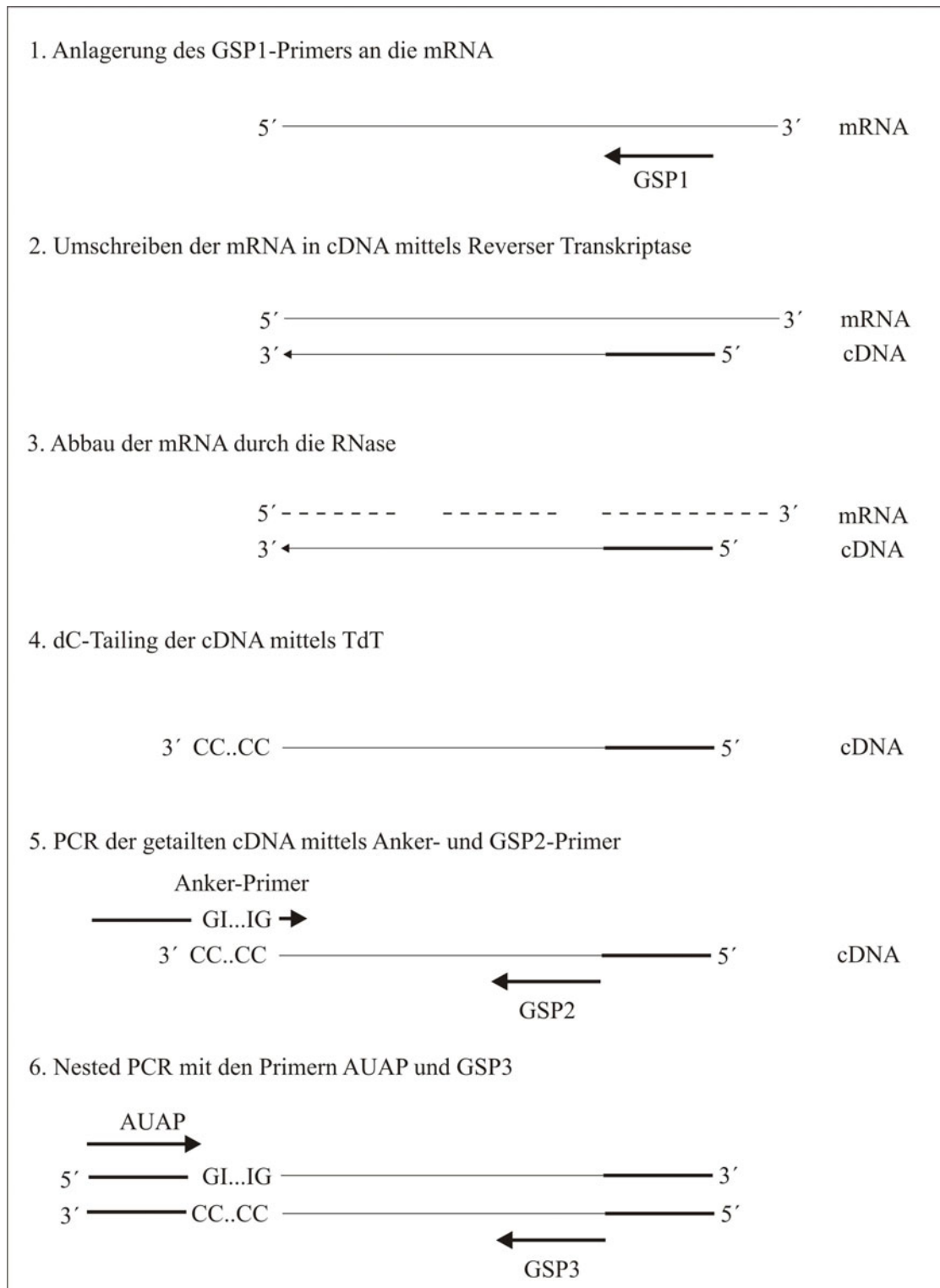
Um das Gel auf eine Membran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) zur Hybridisierung zu übertragen, wurde ein Kapillarblot (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

Die Hybridisierungen und Visualisierungen wurden mit dem Renaissance<sup>®</sup> Kit (NEN Life Science Products) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden die fluoreszenzmarkierten Sonden mit Hilfe der indirekten Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dabei schließt sich dem Hybridisierungsschritt eine Inkubation mit einem Antikörperkonjugat an. Die nachfolgende katalytische Reaktion bewirkt eine Lichtemission, welche mit einem Chemilumineszenz-Film (Lumi-Film, Chemiluminescent Detection Film, Boehringer Mannheim) detektiert wurde und die Lage der RNA-Hybridmoleküle zeigt.

#### 2.7.5 Bestimmung des Transkriptionsstarts mittels 5'-RACE

Die Methode der 'Rapid Amplification of cDNA Ends' (RACE) dient zur Charakterisierung von mRNA-Enden (Frohman *et al.*, 1988). Dabei wird die Nukleinsäuresequenz einer mRNA-Matrize zwischen einer definierten Sequenz und einer unbekanntem Sequenz am 3'- oder 5'-Ende der mRNA amplifiziert (Abb. 8).

Mit Hilfe des 5'-RACE System (Life Technologies) wurden die Transkriptionsstarts in dieser Arbeit charakterisiert. Dabei wurden aus der Gesamt-RNA mit Hilfe des genspezifischen Primers 1 (GSP1) und der Reversen Transkriptase (RT<sup>ˆ</sup>) komplementäre DNA-Stränge (cDNA) der zu untersuchenden mRNA gebildet. Bei der Auswahl der Nukleotidsequenz des GSP1 sollte darauf geachtet werden, dass die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Primers nahe der optimalen Elongationstemperatur der RT<sup>ˆ</sup> liegt. Die verwendete SuperScript<sup>™</sup> II RT<sup>ˆ</sup> ist nur bis 50 °C hitzestabil. Nach Degradierung der mRNA aus der Heteroduplex mit Hilfe eines RNase Mix, wurde die cDNA gereinigt. Durch die Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) und Zugabe von dCTP's wurde das 3'-Ende der cDNA mit einem Cytosin-Schwanz (C-Schwanz) versehen ('tailing'). Zur Amplifizierung der getailten cDNA wurde ein weiterer genspezifischer Primer (GSP2) und ein im Kit enthaltener Anker-Primer (AAP) eingesetzt. Der Anker-Primer bindet an dem C-Schwanz der cDNA und beinhaltet zur Erniedrigung der  $T_m$  Inosin statt Guanin, sowie Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der amplifizierten Nukleinsäure-Fragmente. Dem kann noch eine Nested-PCR mit einen weiteren genspezifischen Primer (GSP3) und dem 'Abridged Universal Amplification Primer' (AUAP) angeschlossen werden.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der 5'-RACE.

Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und konnten hinterher direkt sequenziert oder kloniert werden.

Die einzelnen Reaktionsschritte der 5'-RACE wurden mit den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen und Reaktionsbedingungen durchgeführt. Das Temperaturprofil der PCR der dC-getailten cDNA sowie der Nested-PCR ist in Tab. 21 dargestellt.

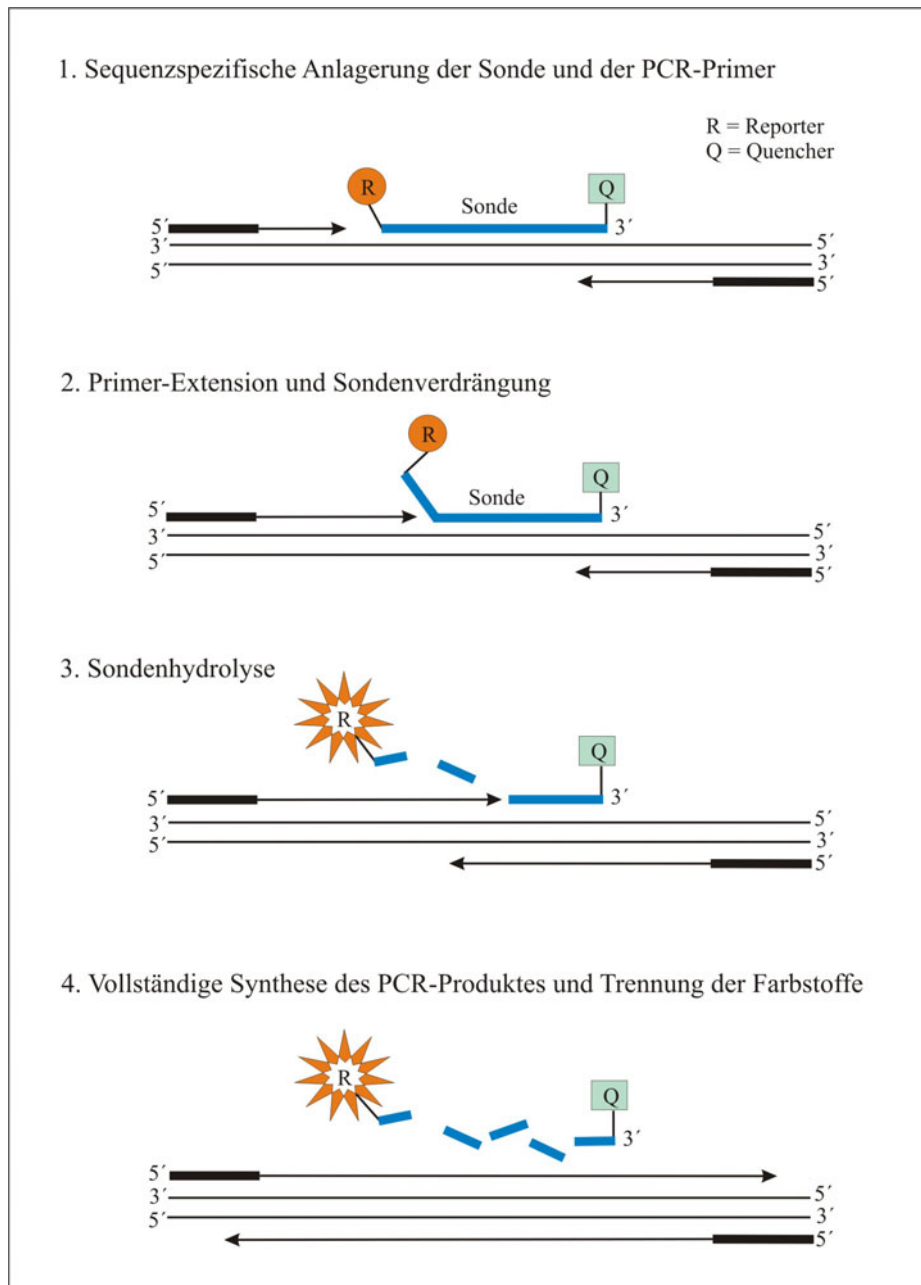
**Tab. 21:** Temperaturprofil der 5'-RACE-PCR. \* Zur Elongation wurde der ELONGase™ Ezyme Mix (Life Technologies™) eingesetzt, welcher bei einer Temperatur von 68 °C das Aktivitätsoptimum besitzt.

Temperaturprofil		
2 min	94 °C	1x
1 min	94 °C	
30 s	65 °C	35x
2 min	68 °C*	
10 min	68 °C	1x
∞	4 °C	

### 2.7.6 TaqMan® Universal RT-PCR

Das TaqMan® System (PE Applied Biosystems) ist eine auf PCR beruhende Methode, bei der die Amplifikationsreaktion durch den Einsatz einer zusätzlichen Fluoreszenz-gekoppelten Oligonukleotid-Sonde verfolgt und quantifiziert werden kann (Abb. 9).

Die sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff (Fam, 6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Molekül (Tamra, 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) versehen. Ihre Sequenz ist so gewählt, dass sie zeitlich vor den PCR-Primern zwischen deren Bindungsstellen auf der Zielsequenz bindet. Solange die Sonde intakt ist, unterdrückt das Quenching-Molekül durch die räumliche Nähe, das durch Anregung entstehende Signal des Reporterfarbstoffes. Bei der Elongation der Primer zerlegt die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease die Sonde in ihre Nukleotide. Durch die Trennung von Reporterfarbstoff von dem Quencher-Molekül kommt es zur Detektion des Reporterfarbstoffes. Aus dem Anstieg der freien Reporterkonzentration ergibt sich ein wachsendes Fluoreszenzsignal, das proportional zu der Anzahl des PCR Produkts ist. Der Zeitpunkt, bei dem ein signifikanter Anstieg des Signals erfolgt, erlaubt Rückschlüsse auf die Anfangskonzentration der zu quantifizierenden Nukleinsäure.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der TaqMan®PCR.

Die TaqMan®PCR wurde zur Bestätigung der Ergebnisse der Lumineszenz-Messung herangezogen. Hierbei wurden die nach Isolierung der Gesamt-RNA aus verschiedenen Bakterienstämmen gewonnenen *luxAB*-mRNA Moleküle quantifiziert.

Die Reaktion des Umschreibens der mRNA in die cDNA durch die Reverse Transkriptase (RT) und die nachfolgende quantitative PCR wurden in einem Schritt mit dem Titan One Tube RT-PCR System (Roche) und denen in Tab. 22 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Zur Konzentrationsberechnung der Proben wurde eine Standardreihe des Plasmids pKklux mit den Konzentrationen 730 pg/μl (Standard 1) bis 0,073 pg/μl (Standard 5) mitgeführt.



**Tab. 22:** Protokoll der quantitativen RT-PCR. \* Die genaue Zusammensetzung wurde vom Hersteller nicht angegeben.

Reaktionsansatz	Temperaturprofil		
100 ng Gesamt-RNA bzw. X pg Standard-DNA (s.o.) 10,0 µl 5 x RT'-PCR-Puffer * 0,5 µl 100 µM Rox-Farbstoff 1,0 µl RNase- Inhibitor (40 U/µl) 5,0 µl 2 mM dNTP-Mix 2,5 µl 100 mM DTT 2,0 µM Fam-Sonde-Tamra 0,5 µl Primer lux2270F (150 ng) 0,5 µl Primer lux2329R (150 ng) 1,0 µl Enzym-Mix (RT/Taq-Polymerase) ad 50 µl DEPC-Wasser	cDNA-Synthese		
	30 min	50 °C	1x
	10 min	95 °C	1x
	30 s	95 °C	
	1 min	60 °C	35x
	∞	4 °C	

Die TaqMan® PCR und deren Auswertung wurde mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detektor (PE Applied Biosystems) durchgeführt.

## 2.8 Lumineszenz-Messung

Die Bakterienkulturen mit den Fusionen aus den zu untersuchenden Promotoren und den promotorlosen *luxAB* aus *V. harveyi* wurden zur Ermittlung der Expressionsstärke auf Biolumineszenz untersucht. Die Lumineszenzmessungen wurden mit dem Microumat LB96P (Berthold GmbH & Co. KG) durchgeführt.

Die zur Lumineszenz-Messung angezogenen Bakterienkulturen wurden in den jeweiligen Flüssigmedien (siehe Kap. 2.3) in einem Schüttelinkubator bei 28 °C und 200 rpm bis zu einer  $OD_{600} = 1,0$  bis 1,3 ( $OD_{600} = 1,0$  entspricht einer Zellzahl von  $10^9$  Zellen/ml) inkubiert. Nach Verdünnung der Kulturen der stationären Phase auf eine Zellzahl von  $10^6$  Zellen/ml, wurde die Lumineszenz von 100 µl der verdünnten Kultur über eine Zeitspanne von 10 s bei 28 °C im Luminometer gemessen. Als Substrat wurde zu jeder Probe 50 µl Dekanal-Lösung (2 %iges Dekanal in 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0) injiziert. Von jeder Probenverdünnung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der am Luminometer angeschlossenen Software (Instrument Software Version 2.01, Programm Win Glow, Berthold GmbH & Co. KG). Von dem aufgezeichneten Kurvenverlauf der Messung wurde mit Hilfe dieser Software das Integral

über den Zeitraum von 10 s gebildet und als Meßergebnis in Relative Lichteinheiten (RLU) dargestellt. Die Werte der Dreifachbestimmung wurden gemittelt.

Als Screening einer erfolgreichen Klonierung mit *luxAB* und anschließender Transformation des Plasmids in die zu untersuchenden Bakterienzellen, wurden die Lumineszenzen direkt von den unverdünnten stationären ü. N.-Kulturen gemessen.

## 2.9 Nachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase

Kulturen von *E. coli* mit den Fusionen aus den zu untersuchenden Promotoren und dem promotorlosen *cat*-Gen des Vektors pKK232-8 wurden auf LB-Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chloramphenicol (5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml und 30 µg/ml) auf Expressionsstärke untersucht.

Hierfür wurden die Bakterienkulturen in LB flüssig mit Ampicillin (100 µg/ml) in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm ü. N. inkubiert. Nach Bestimmung der OD<sub>600</sub> wurden die Kulturen so verdünnt, dass pro LB-Agarplatte mit Chloramphenicol zwischen 10<sup>2</sup> bis 10<sup>3</sup> Zellen ausplattiert wurden. Zur Berechnung des prozentualen Anteils gewachsener Kolonien mit und ohne Antibiotikum, wurde von derselben Verdünnungsstufe der jeweiligen Kultur eine LB-Agarplatte ohne Chloramphenicol angelegt. Die Kolonien der antibiotikumhaltigen Platten wurden nach 48 h und die der Platten ohne Antibiotikum nach 24 h Inkubation bei 37 °C ausgezählt.

## 2.10 Biolistischer Gentransfer

Bei der Transformation von Pflanzen mit Hilfe der Partikelkanone (Klein *et al.*, 1989b) werden kleine mit DNA beschichtete Gold- oder Wolframpartikel (Microcarrier) durch eine Helium getriebene Partikelkanone in intakte Pflanzenzellen hineingeschossen. Bei Eintritt in die Pflanzenzellen wird die DNA von den Partikeln abgestreift. Die Expression der eingeführten rekombinanten DNA beginnt, wenn die DNA in den Zellkern oder in die Plastiden gelangt. Die DNA kann entweder in das Pflanzengenom integriert werden und es kommt zur stabilen Transformation. Häufiger ist jedoch das Verbleiben der DNA im freien Zustand im Zellkern mit anschließendem Abbau durch nukleolytische Enzyme. Hierbei wird eine transiente Expression erzeugt.

### 2.10.1 Vorbereitung der Microcarrier

Als Microcarrier wurde Goldpulver verwendet. Hierfür wurden 30 mg Goldpulver (1  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad Laboratories, München) mit 1 ml 70 %igen EtOH versetzt, 5 min gevortext und nach 1 min absetzen kurz zentrifugiert, damit der Überstand abgehoben werden kann. Anschließend folgt ein dreimaliges Waschen des Goldpellets mit je 1 ml Aqua bidest. Die Suspension wurde 2 min gevortext, der Überstand nach 1 min absetzen kurz zentrifugiert und abgenommen. Das Goldpellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  sterilem 50 %igen Glycerin resuspendiert (Endkonzentration 60 mg/ml).

### 2.10.2 Gold-Coating-Ansatz

Für drei Schuss werden unter ständigem Rühren 25  $\mu\text{l}$  Gold (60 mg/ml) mit 3  $\mu\text{g}$  Plasmid DNA, 25  $\mu\text{l}$  2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und 10  $\mu\text{l}$  0,1 M Spermidin-Lösung gemischt, 3 min gevortext und nach 1 min absetzen kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und der Coating-Ansatz mit je 140  $\mu\text{l}$  70 %igen EtOH und absolutem EtOH gewaschen. Nach Zugabe von 24  $\mu\text{l}$  absolutem EtOH zum Coating-Ansatz wurde dieser resuspendiert und je 8  $\mu\text{l}$  des Ansatzes auf je einen Macrocarrier pipettiert und getrocknet.

### 2.10.3 Vorbereitung der Pflanzen

Für das Partikelbombardement wurden von 1 bis 2 Monate alten sterilen *N. tabacum* Blättern mit dem 'Korkbohrer 5' Blattscheiben hergestellt. Vier dieser Blattscheiben wurden in eine Petrischale gelegt, mit MS-Medium (Murashige and Skoog Basalmedium, Tomes *et al.*, 1990) mit 2 % Saccharose bedeckt, und über Nacht bei 23 °C unter Licht in Gewebekulturkammern aufbewahrt.

### 2.10.4 Partikelbombardement

Das Bombardement erfolgte mit dem Modell 'PDS 1000/He biolistic particle delivery system' von Bio-Rad (München). Es wurden 1100 psi 'rupture disks' verwendet. Die Macrocarrier mit dem zu untersuchenden Coating-Ansatz wurden in die Haltevorrichtungen eingebaut. Die Petrischalen mit den Tags zuvor hergestellten Blattscheiben in MS-Medium wurden auf die Plattform in die 2. oder 3. Ebene geschoben. Nachdem das Gerät geschlossen wurde, wurde ein Vakuum mit 26 inch Hg angelegt und der Schuß ausgelöst. Nach dem Beschuß wurde die Kammer wieder belüftet (20 s.) und die Proben entnommen. Die Petrischalen mit den

bombardierten *N. tabacum* Blattscheiben in MS-Medium wurden wiederum 2 Tage bei 23 °C und Licht in den Gewebekulturkammern aufbewahrt.

### **2.10.5 Gus-Nachweis**

Für den transienten Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidase wurden die Blattscheiben in eine Petrischale mit GUS-Färbelösung (Mendel *et al.*, 1989) überführt. Die Blattscheiben wurden in der Lösung bei 37 °C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Bei einer Expression des *gus*-Gens wird der Farbstoff 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid (X-Gluc) durch die  $\beta$ -Glucuronidase hydrolysiert und es kommt zur Blaufärbung des Pflanzengewebes. Um das Chlorophyll aus den Blättern zu entfernen, wurden die Blattscheiben am darauffolgenden Tag mit 70 % EtOH bei 72 °C über Nacht gewaschen. Die Aufbewahrung der Blattscheiben erfolgte ebenfalls in 70 %igen EtOH im Kühlschrank.

### 3 Ergebnisse und Auswertung

#### 3.1 Untersuchung der pflanzenspezifischen Promotoren in Eubakterien

Die Abb. 10 beschreibt die schematische Vorgehensweise der Untersuchung der pflanzenspezifischen Promotoren.

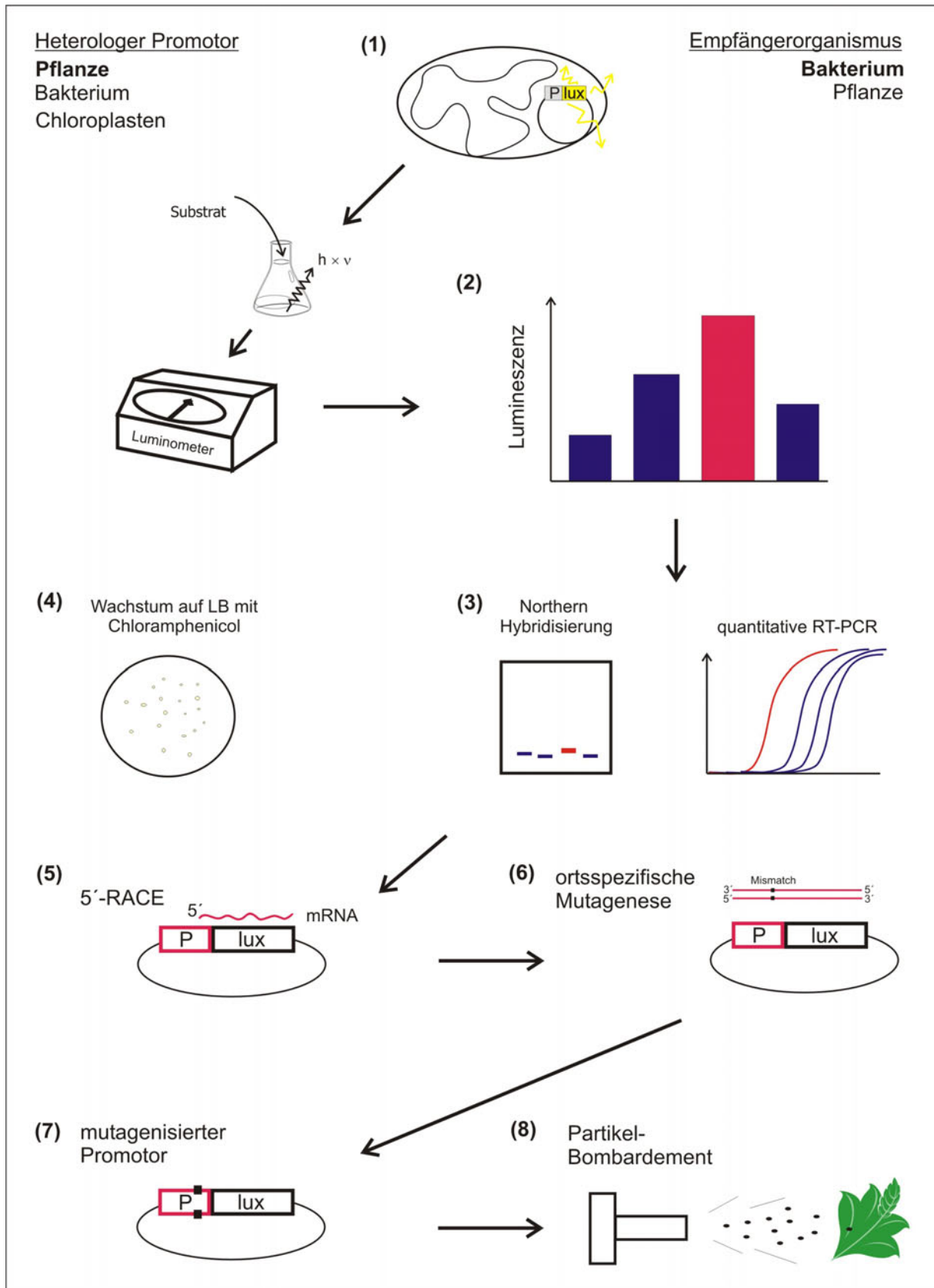
Es wurden die Promotoren P 35S aus CaMV, P Nos aus *A. tumefaciens* und P RolC aus *A. rhizogenes*, die Promotoren P B33, P ST-LS1, P KST1, P FBP1,1, P FBP1,7 und P SKT2 aus *S. tuberosum*, die Promotoren P 130 und P 247 aus *N. tabacum* und der Promotor P KCO1 aus *A. thaliana* untersucht (Kap. 1.3, Tab. 3).

Fusionen der pflanzenspezifischen Promotoren mit den promotorlosen *luxAB*-Genen aus *V. harveyi* wurden in den für Promotorstudien hergestellten Vektor pKK232-8 und in den Pflanzentransformationsvektor pBin19 kloniert. Die pKK-Konstrukte wurden in *E. coli* und die pBin-Konstrukte in *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. BD413 transformiert (siehe (1) in Abb. 10) und auf Biolumineszenz (2) untersucht. Zur Bestätigung der durch die Biolumineszenz-Messungen ermittelten Genexpressionsstärken wurde mit der RNA ausgewählter Transformanten, die die beschriebenen Fusionen enthielten, quantitative RT-PCR und Northern Hybridisierung (3) durchgeführt.

Weiterhin ermöglichten Promotor-*cat*-Fusionen in dem Vektor pKK232-8 in *E. coli* den phänotypischen Nachweis einer heterologen Genexpression als Wachstum auf Agarplatten mit Chloramphenicol (4).

Für die Promotoren P 35S, P ST-LS1, P Nos und P KST1 wurden mittels 5'-RACE die Transkriptionsstarts bestimmt (5). In Abhängigkeit der Transkriptionsstarts konnte eine Zuordnung der von der bakteriellen DNA-abhängigen RNA Polymerase erkannten -35- und -10-Konsensus Sequenzen stattfinden. Für den P ST-LS1 wurden mehrere Mutanten mit ortsspezifischen Basenaustauschen in der -10-Konsensus Sequenz hergestellt (6). Die Genexpression der Mutanten wurde wiederum mit Hilfe der Biolumineszenz analysiert. Weiterhin fand eine Charakterisierung der Transkripte mittels Northern Hybridisierung und 5'-RACE statt.

Für die Untersuchung der Genexpression in *N. tabacum* wurden die Mutanten und der Wildtyp P ST-LS1 in den Pflanzentransformationsvektor pBi101.2 kloniert (7). Dieser besitzt zur Bestimmung der Expressionsstärke in Pflanzen ein promotorloses  $\beta$ -Glucuronidase Gen (*gus*). Die Expression des *gus*-Gens ausgehend von den mutagenisierten Promotoren konnte nach dem Partikelbombardement nachgewiesen werden (8).



**Abb. 10:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Untersuchung der pflanzenspezifischen Promotoren (nähere Erläuterung siehe Text).

### 3.1.1 Klonierungsarbeiten

Insgesamt wurden in dieser Arbeit zwölf pflanzenspezifische Promotoren auf Genexpression in Bakterien untersucht. Acht der Promotoren wurden im Rahmen der Arbeit sowohl in den Pflanzentransformationsvektor pBin19 (Bevan, 1984; siehe Kap. 6.1.1, Abb. 43) als auch in den Promotorstudienvektor pKK232-8 (Brosius, 1984; siehe Kap. 6.1.5, Abb. 47) kloniert. Die Konstrukte mit den Fusionen aus den Promotoren P 35S, P B33, P ST-LS1 und P RolC mit den *luxAB*-Genen in pBin19 (siehe Kap. 3.1.1.1, Abb. 13) und pKK232-8 (siehe Kap. 3.1.1.2, Abb. 15), sowie pKKlux als Negativ-Kontrolle (siehe Kap. 6.1.6, Abb. 48) sind im Rahmen der Diplomarbeit entstanden und wurden in die weiteren Genexpressionsstudien integriert.

Die Plasmide, aus denen die Promotoren für die Klonierungsarbeiten gewonnen wurden, sind in Kap. 2.2.4, Tab. 8 aufgeführt. Die Abb. 11 zeigt eine schematische Darstellung der MCS der Ausgangsderivate. Die *luxAB*-Gene, die mit den Promotoren fusioniert wurden, wurden aus den Plasmiden Mini-Tn5*luxAB* (De Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990; siehe Kap. 6.1.9, Abb. 51) oder pBinlux-SalI (siehe Kap. 6.1.2, Abb. 44) gewonnen.

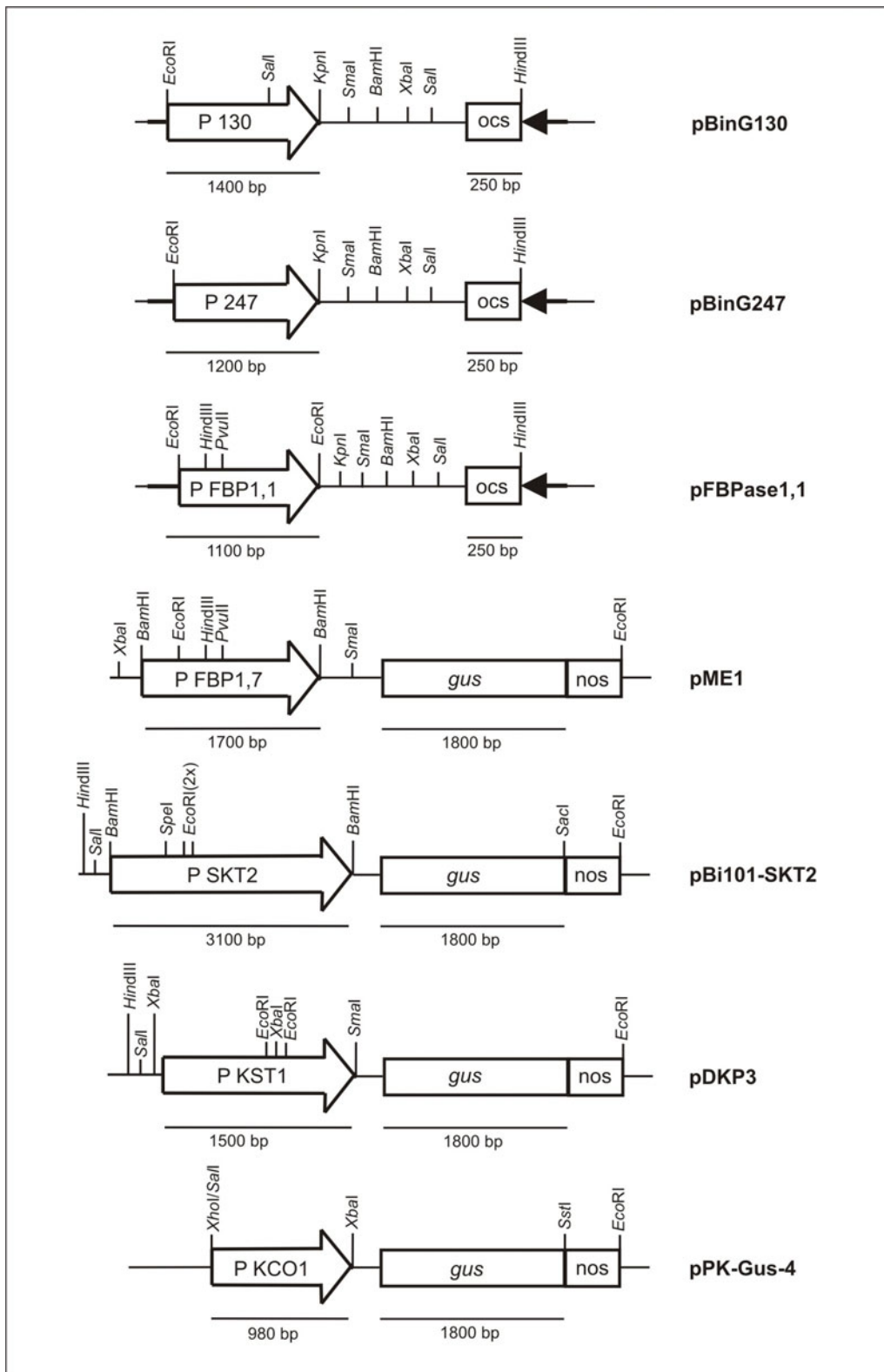
Die erzeugten Plasmide, welche durch die Fusionen der Promotoren mit den *luxAB*-Genen in den jeweiligen Vektoren entstanden sind, werden innerhalb dieser Arbeit als Konstrukte bezeichnet.

Zur Beurteilung der Höhe der Genexpression der heterologen Promotoren wurde der Lac-Promotor als homologer Promotor mit den *luxAB*-Genen fusioniert und dessen Genexpressionsstärke mitaufgeführt.

#### 3.1.1.1 Herstellung der pBin-Konstrukte und Transformation in *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. BD413

Die Klonierungsschritte zur Herstellung der pBin-Konstrukte wurden aufgrund unterschiedlicher Vektoren und dem Vorhandensein verschiedenster Restriktionsschnittstellen in den DNA-Sequenzen der Promotoren unterschiedlich durchgeführt. Bei den Derivaten pBinG130, pBinG247 und pFBPase1,1 lagen die Promotoren bereits in dem Vektor pBin19 vor, so dass nur die Klonierung der *luxAB*-Gene erfolgen musste.

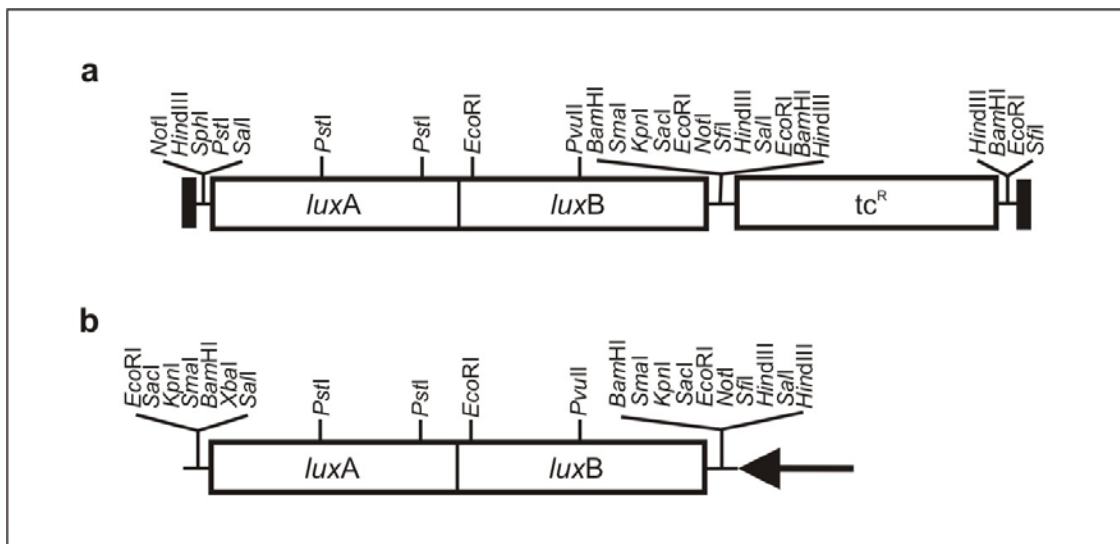
Zur Insertion der *luxAB*-Gene wurden die Plasmide pBinG130 mit *Bam*HI, pBinG247 und pFBPase1,1 mit *Sal*I restringiert. Die *luxAB*-Gene wurden zur Insertion in die linearisierten Promotor-Derivate als *Bam*HI-Fragment aus dem Plasmid pBinlux-SalI und als *Sal*I-Fragment aus dem Plasmid Mini-Tn5*luxAB* isoliert. Abb. 12 zeigt den unterschiedlichen



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der MCS der Ausgangsderivate mit den pflanzenspezifischen Promotoren. Die pBin19-Derivate (pBinG130, pBinG247 und pFBPase1,1) weisen stromabwärts der *HindIII*-Schnittstelle in antisense den Lac-Promotor (←) auf. Die Transkriptionstermination stammt aus dem Octopin-Synthase Gen (ocs). Die pBi101-Derivate (pME1, pBi101-SKT2 und pDKP3) bzw. das pGPTV-HPT-Derivat (pPK-Gus-4) besitzen zum Nachweis der Genexpressionsstärke der Promotoren in Pflanzen ein promotorloses  $\beta$ -Glucuronidase Gen (*gus*) und die Transkriptionstermination des Nopalinsynthase Gens (nos).



Aufbau des Transposon-Bereichs des Plasmides Mini-Tn5*luxAB* (a) im Vergleich zu der MCS mit dem *luxAB*-Fragment aus pBin*lux*-*SalI* (b). Die 3,2 kbp große DNA-Bande mit den *luxAB*-Genen wurde mit der *Bam*HI restringierten DNA des Plasmides pBinG130 bzw. der *SalI* restringierten DNA der Plasmide pBinG247 und pFBPase1,1 ligiert. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert.



**Abb. 12:** Schematische Darstellung der *luxAB*-Gene mit Restriktionsschnittstellen **a** des Transposon-Bereichs des Mini-Tn5*luxAB* (de Lorenzo *et al.*, 1990) und **b** der MCS des pBin*lux*-*SalI* mit dem Lac-Promotor (Pfeil).

Zur Herstellung der weiteren Konstrukte wurden sowohl die DNA der Promotor-Fragmente als auch die *luxAB*-Gene in pBin19 kloniert. Die DNA der Promotoren P FBP1,7 und P SKT2 wurde nach Restriktion der Fragmente kloniert. Die DNA-Fragmente der Promotoren P Nos, P KST1 und P KCOI wurden mittels PCR und sequenzspezifischen Primern hergestellt. Durch Integration von Restriktionsschnittstellen in die Oligonukleotide konnten die PCR-Fragmente in die Vektoren kloniert werden.

Durch *Bam*HI-Restriktion wurden die DNA-Fragmente mit P FBP1,7 und P SKT2 gewonnen. Die Promotor-Fragmente wurden in den *Bam*HI restringierten Vektor pBin19 kloniert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

Die DNA der Fusion des pBin19 mit P FBP1,7 wurde zur Insertion der *luxAB*-Gene mit *SalI* und die DNA des Klons mit der Fusion des pBin19 mit P SKT2 mit *SalI* und *Hind*III restringiert. Zur Klonierung der *luxAB*-Gene wurde das Plasmid Mini-Tn5*luxAB* mit *SalI* bzw. *Hind*III und *SalI* geschnitten und das jeweilige 3,2 kbp große DNA-Fragment isoliert. Anschließend wurden die entsprechenden DNA-Fragmente miteinander ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

Für die Promotoren P KST1, P KCO1 und P Nos, welche mittels PCR hergestellt wurden, dienten als Template-DNA pDKP3 (P KST1), pPK-Gus-4 (P KCO1) und pBin19 (P Nos). Zur Herstellung des P Nos wurde mit den Primern Nos-S1 und Nos-AS1 ein ca. 500 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit *Sau3A* geschnitten und dann in den *Bam*HI restringierten Vektor pBin19 kloniert. Nach einem Doppelverdau mit *Sal*I und *Hind*III wurde die entsprechende *luxAB*-DNA in die Restriktionsschnittstellen kloniert und der Ligationsansatz in DH5 $\alpha$  transformiert.

Für die Klonierung zur Herstellung der pKST1lux- und pKCO1lux-Konstrukte wurde zuerst das *Bam*HI-Fragment mit den *luxAB*-Genen aus pBinlux-SalI in den *Bam*HI restringierten Vektor pBin19 kloniert. Der Ligationsansatz wurde in DH5 $\alpha$  transformiert. So wurde ein weiterer pBinlux (pBinlux-BamHI) hergestellt. Die Darstellungen beider Plasmide (pBinlux-SalI, pBinlux-BamHI), mit dem unterschiedlichen Aufbau der MCS sind Kap. 6.1.2, Abb. 44 und Kap. 6.1.3, Abb. 45 aufgeführt. Zur Klonierung der Promotoren wurde die DNA des pBinlux-BamHI mit *Sma*I geschnitten. Die DNA-Fragmente, welche P KST1 und P KCO1 beinhalten, wurden mittels PCR und sequenzspezifischer Primer (2-KST1-S und KST1-AS bzw. 2-KCO1-S und KCO1-AS) mit *Sma*I-Restriktionsschnittstellen hergestellt, mit *Sma*I verdaut und in die *Sma*I-Schnittstelle von pBinlux-BamHI kloniert. Der Ligationsansatz wurde wiederum in DH5 $\alpha$  transformiert.

Die richtigen Orientierungen der klonierten Promotor-DNA-Fragmente wurden durch spezifische Restriktionsverdau und Sequenzierungen überprüft. Bei allen pBin-Konstrukten wurden die Übergänge der Promotor-Sequenz zu den *luxAB*-Genen durch Sequenzierung mit dem Primer luxA/AS2 überprüft.

Die Basenabfolge der Promotor-Fragmente P Nos, P KST1 und P KCO1, welche mittels PCR hergestellt wurden, wurde durch Sequenzierung überprüft. Bei den Promotoren P KST1 und P KCO1 wurden Basenaustausche gegenüber den übermittelten Originalsequenzen festgestellt. Dies führte zur Sequenzierung der Promotorbereiche der Ausgangsderivate pPK-Gus-4 und pDKP3. Ein Vergleich der sequenzierten Bereiche (Kap. 6.5.2, Abb. 53 und Kap. 6.5.3, Abb. 54) zeigte, dass die ermittelten Basenaustausche auch in den DNA-Sequenzen der Derivate vorlagen, mit Ausnahme des P KCO1 im pBin-Konstrukt, welcher zwei Basenaustausche gegenüber der Originalsequenz am 5'-Ende aufweist und des P Nos im pBin-Konstrukt, welcher einen Basenaustausch gegenüber der Originalsequenz (Kap. 6.5.1, Abb. 52) aufweist. Dieser Basenaustausch befindet sich jedoch außerhalb der Sequenz des von Shaw (1984) beschriebenen Nos-Promotors.

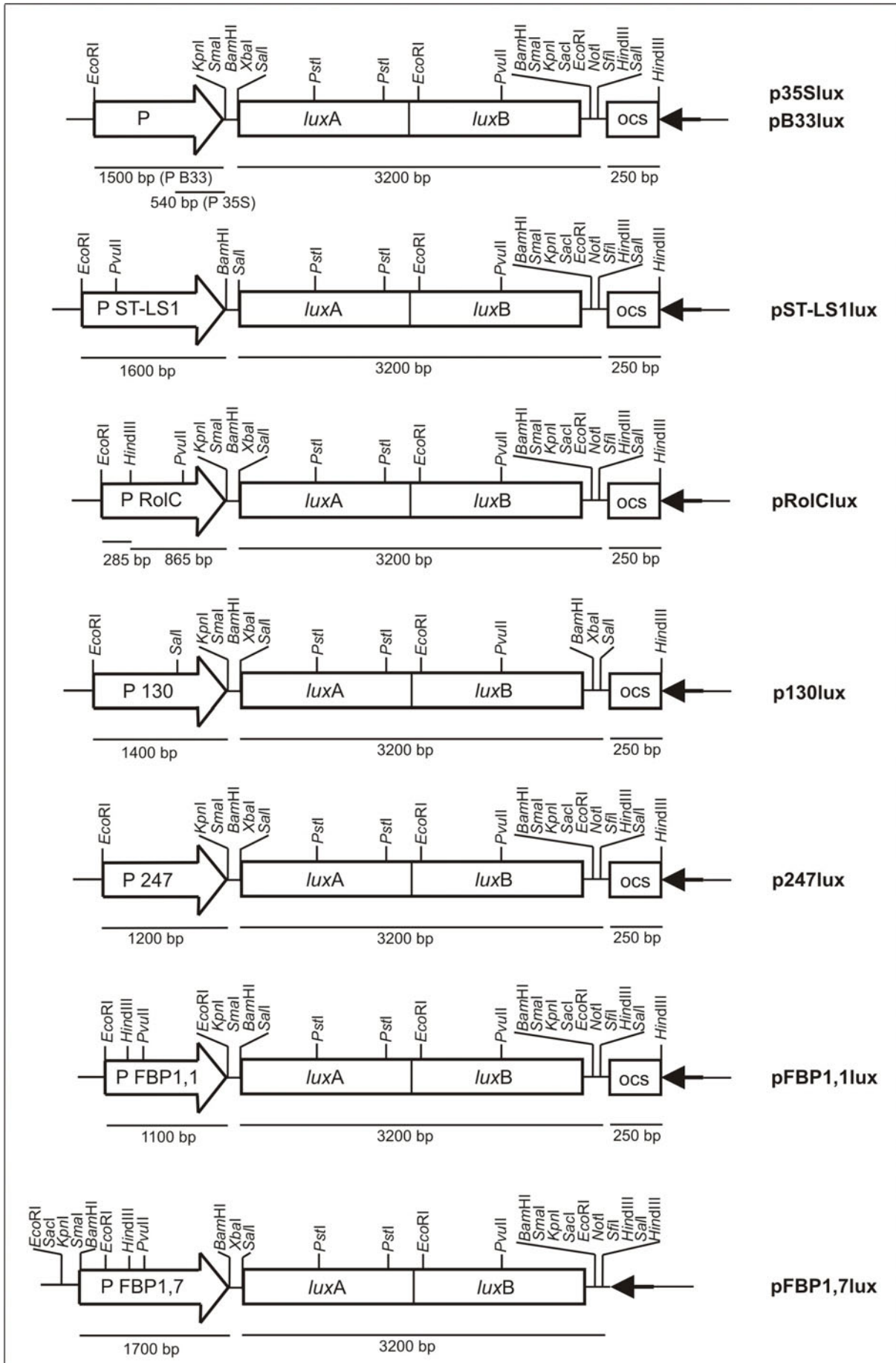
Um die Genexpressionsstärke der pflanzenspezifischen Promotoren mit einer homologen Genexpression vergleichen zu können, wurde der Promotor des *lac*-Operons untersucht. Hierfür wurde der P Lac aus pBin19 mit dem *SalI*-Fragment der *luxAB*-Gene fusioniert. Die Fusion (placlux) erwies sich in den verschiedenen Bakterienarten als instabil. Das Konstrukt, welches zwischen dem P Lac und dem *SalI*-Fragment der *luxAB*-Gene die Terminationssequenz des Octopin-Synthase Gens beinhaltet (plac<sub>OCS</sub>lux), war stabil.

Als weiterer bakterieller Promotor wurde die nach Transposonmutagenese von *Y. enterocolitica* Stamm 78 mit dem Mini-Tn5*luxAB* entstandene Promotorfusion P 143 in pBin19 kloniert und zum Vergleich der bakteriellen Expression in *Yersinia* mitgeführt.

In der Tab. 23 wurde die Herstellung der pBin-Konstrukte nochmals zusammengefasst dargestellt. Abb. 13 zeigt die schematische Darstellung der MCS aller pBin-Konstrukte.

Name des Promotors	Name des Ausgangsderivates	Klonierungsvektor des Ausgangsderivates	Promotor-Restriktionsfragment	PCR-Restriktionsfragment	<i>luxAB</i> -Restriktionsfragment	Name des pBin-Konstruktes
<b>P 35S</b>	pBinAR	pBin 19	-	-	<i>SalI</i> -Fragment	<b>p35Slux</b>
<b>P B33</b>	pB33-Bin19	pBin 19	-	-	<i>SalI</i> -Fragment	<b>pB33lux</b>
<b>P ST-LS1</b>	pBin-L700	pBin 19	-	-	<i>SalI</i> -Fragment	<b>pST-LS1lux</b>
<b>P RolC</b>	pBin19-RolC	pBin 19	-	-	<i>SalI</i> -Fragment	<b>pRolClux</b>
<b>P 130</b>	pBinG130	pBin 19	-	-	<i>Bam</i> HI-Fragment	<b>p130lux</b>
<b>P 247</b>	pBinG247	pBin 19	-	-	<i>SalI</i> -Fragment	<b>p247lux</b>
<b>P FBP1,1</b>	pFBPase1,1	pBin 19	-	-	<i>SalI</i> -Fragment	<b>pFBP1,1lux</b>
<b>P FBP1,7</b>	pME1	pBi101.1	<i>Bam</i> HI-Fragment	-	<i>SalI</i> -Fragment	<b>pFBP1,7lux</b>
<b>P SKT2</b>	pBi101-SKT2	pBi101	<i>Bam</i> HI-Fragment	-	<i>SalI/Hind</i> III-Fragment	<b>pSKT2lux</b>
<b>P Nos</b>	pBin 19	-	-	<i>Sau</i> 3A-Fragment	<i>SalI/Hind</i> III-Fragment	<b>pNoslux</b>
<b>P KST1</b>	pDKP3	pBi101	-	<i>Sma</i> I-Fragment	<i>Bam</i> HI-Fragment	<b>pKST1lux</b>
<b>P KCO1</b>	pPK-Gus-4	pGPTV-HPT	-	<i>Sma</i> I-Fragment	<i>Bam</i> HI-Fragment	<b>pKCO1lux</b>
<b>P Lac</b>	pBin 19	-	-	-	<i>SalI</i> -Fragment	<b>placlux</b>
<b>P Lac<sub>OCS</sub></b>	pBinAR	pBin 19	-	-	<i>SalI</i> -Fragment	<b>plac<sub>OCS</sub>lux</b>

**Tab. 23:** Überblick über die Strategien zur Klonierung der pflanzenspezifischen Promotoren und der *luxAB*-Fragmente in pBin19, sowie die Namen der resultierenden pBin-Konstrukte. Zum Vergleich der Expressionsstärke heterologer Promotoren wurde der bakterielle Promotor des *lac*-Operons in pBin19 untersucht.



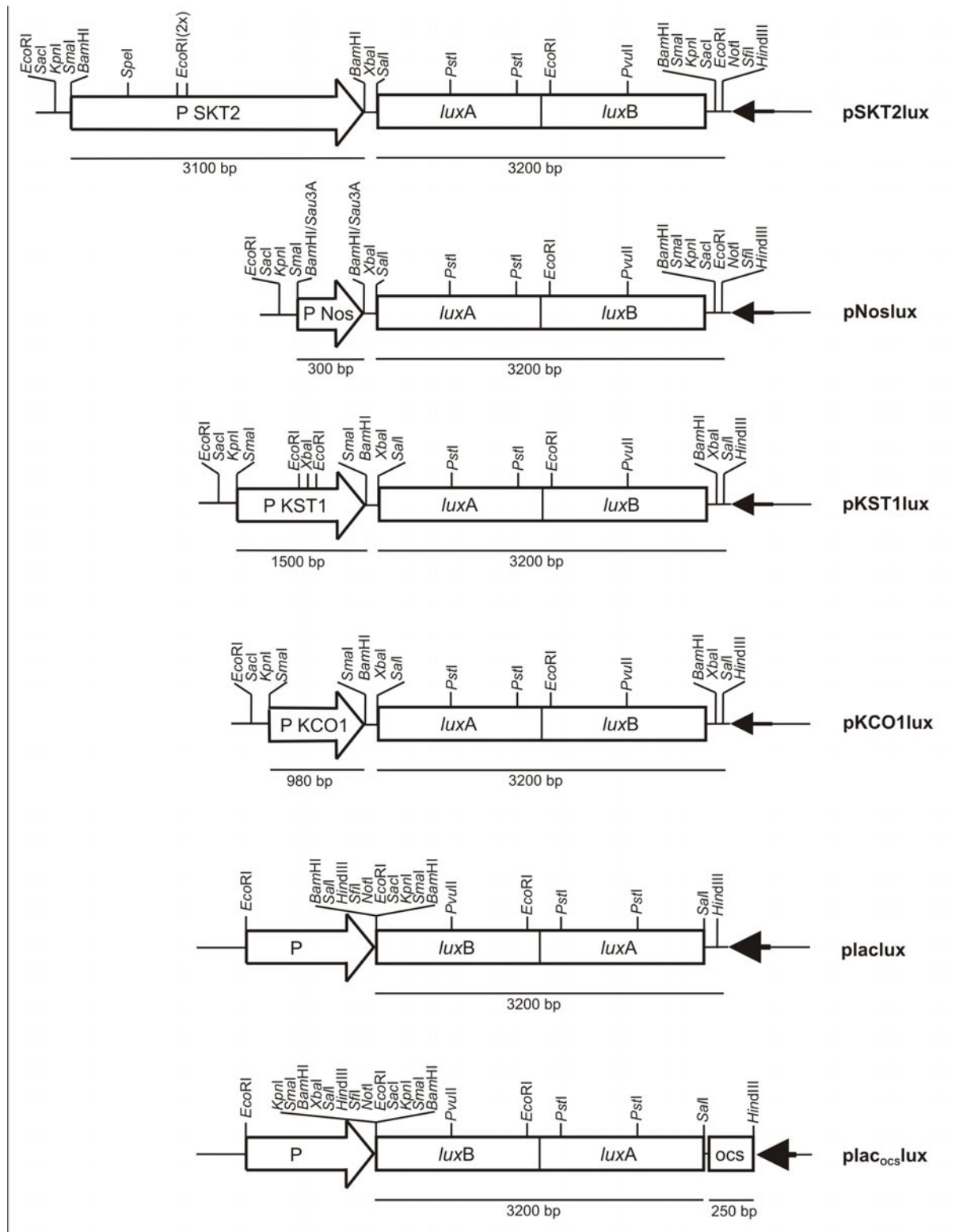


Abb. 13: Schematische Darstellung der MCS der pBin-Konstrukte.

### 3.1.1.2 Herstellung der pKK-Konstrukte und Transformation in *E. coli*

Der Vektor pKK232-8 wurde für Promotorstudien konzipiert. Er besitzt stromaufwärts vor der MCS einen Transkriptionsstop ( $T_1$ ) und zum Nachweis der Expressionsstärke klonierter Promotoren ein promotorloses Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen (*cat*). Die Promotoren

P 130, P 247, P FBP1,1, P FBP 1,7, P Nos, P SKT2, P 35S, P B33, P ST-LS1 und P RoIC wurden mit dem *cat*-Gen fusioniert. *E. coli* Transformanten mit den Fusionen wurden auf Wachstum auf LB-Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chloramphenicol untersucht. Um die Expressionsstärke der Promotoren in pKK232-8 mit den pBin-Konstrukten mittels Lumineszenz vergleichen zu können, wurden die *luxAB*-Gene zwischen die Sequenz der Promotor-DNA und dem *cat*-Gen inseriert.

Die DNA der Promotor-Derivate pBinG130, pBinG247 und pFBPase1,1 wurde durch *EcoRI*-Restriktion verdaut. Durch den *EcoRI*-Verdau des Plasmides pFBPase1,1 wurde das Promotor-Fragment herausgeschnitten. Danach wurden die kohäsiven Enden der DNA der linearisierten Plasmide pBinG130 und pBinG247 sowie das DNA-Fragment mit dem P FBP1,1 aufgefüllt. Die DNA von pBinG130 wurde weiterhin mit *BamHI*, die von pBinG247 mit *SalI* restringiert. Die Promotor-DNA der Derivate pME1 (P FBP1,7) und pBi101-SKT2 (P SKT2) lag durch *BamHI*-Restriktion zur weiteren Klonierung in pKK232-8 vor. Die Herstellung und Aufarbeitung des P Nos erfolgte wie in Kap. 3.1.1.1 beschrieben.

Zur Klonierung der Promotor-Fragmente wurde die DNA des Vektor pKK232-8 mit *SmaI* und *BamHI*, sowie *SmaI* und *SalI* doppelt verdaut, als auch nur mit *BamHI* oder *SmaI* verdaut. Das DNA-Fragment mit P 130 wurde mit dem *SmaI/BamHI* verdauten Vektor ligiert, sowie die DNA-Fragmente mit P 247 und P FBP1,1 mit den *SmaI/SalI* bzw. *SmaI* verdauten Vektor ligiert. Die *BamHI*-Fragmente mit P FBP1,7 und P SKT2, sowie das *Sau3A*-Fragment mit P Nos wurden mit der *BamHI* geschnittenen Vektor-DNA ligiert. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

Zur Klonierung der *luxAB*-Gene wurden die Fusionen mit den Promotoren P FBP1,1 und P FBP1,7 *SalI* und die Fusion mit P 130 *BamHI* verdaut. Die DNA der Fusionen mit den Promotoren P 247, P SKT2 und P Nos wurden mit *HindIII* und *SalI* restringiert.

Zur Insertion der *luxAB*-Gene wurde das Plasmid Mini-Tn5*luxAB* *SalI* bzw. *HindIII* und *SalI* geschnitten. Das *BamHI*-Fragment der *luxAB*-Gene wurde aus pBin*lux*-*SalI* isoliert. Die Promotor-*cat*-Fusionen wurden mit dem jeweiligen *luxAB*-Fragment ligiert und in DH5 $\alpha$  transformiert.

Zur Herstellung der pKK-Konstrukte mit den Promotoren P KST1 und P KCO1 wurde zuerst in den *BamHI* verdauten Vektor pKK232-8 das *BamHI*-Fragment der *luxAB*-Gene aus pBin*lux*-*SalI* inseriert. Hierbei entstand der pKK*lux*-*BamHI* (siehe Kap. 6.1.7, Abb. 49). Diese DNA wurde *SmaI* verdaut und mit den *SmaI*-geschnittenen PCR-Fragmenten, deren Herstellung in Kap. 3.1.1.1 erklärt wurde, ligiert und in DH5 $\alpha$  transformiert. Die Promotoren

P Nos, P KCO1 und P KST1 wurden vollständig sequenziert (Kap. 6.5.1, Abb. 52, Kap. 6.5.2, Abb. 53 und Kap. 6.5.3, Abb. 54).

Die Insertion des Lac-Promotors in pKKlux war für den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  letal. Er konnte nach erfolgreicher Klonierung und Transformation des Plasmides nicht mehr in LB-Medium mit Ampicillin angezogen werden.

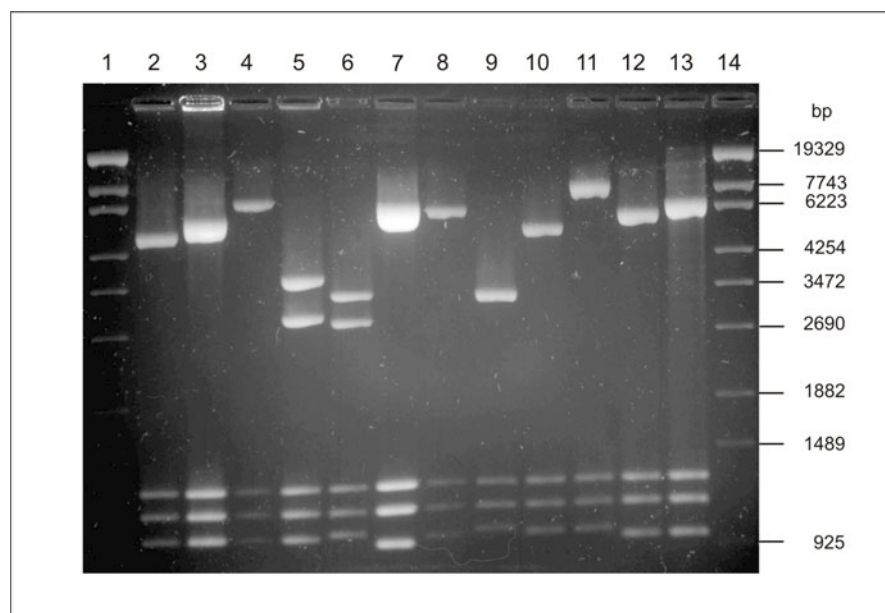
Die richtigen Orientierungen der klonierten Promotor-DNA-Fragmente der Promotor-*cat*-Fusionen wurden durch spezifische Restriktionsverdau und Sequenzierungen überprüft. Bei allen pKK-Konstrukten wurden die Übergänge der Promotor-Sequenz zu den *luxAB*-Genen durch Sequenzierung mit dem Primer *luxA/AS2* überprüft.

Die Tab. 24 fasst die Klonierungsschritte der Promotor-*cat*-Fusionen und der pKK-Konstrukte sowie deren Namen zusammen.

Name des Promotors	Name des Ausgangsderivates	Promotor-Restriktionsfragment	PCR-Restriktionsfragment	Name der Promotor- <i>cat</i> -Fusion	<i>luxAB</i> -Restriktionsfragment	Name des pKK-Konstruktes
-	pKK232-8	-	-	-	<i>SalI/HindIII</i> -Fragment	pKKlux
P 35S	pBinAR	<i>EcoRI</i> -blunt/ <i>SalI</i> -Fragment	-	pKK35S	<i>SalI/HindIII</i> -Fragment	pKK35Slux
P B33	pB33-Bin19	<i>EcoRI</i> -blunt/ <i>SalI</i> -Fragment	-	pKKB33	<i>SalI/HindIII</i> -Fragment	pKKB33lux
P ST-LS1	pBin-L700	<i>EcoRI</i> -blunt/ <i>SalI</i> -Fragment	-	pKKST-LS1	<i>SalI/HindIII</i> -Fragment	pKKST-LS1lux
P RolC	pBin19-RolC	<i>EcoRI</i> -blunt/ <i>SalI</i> -Fragment	-	pKKRolC	<i>SalI</i> -Fragment	pKKRolClux
P 130	pBinG130	<i>EcoRI</i> -blunt/ <i>BamHI</i> -Fragment	-	pKK130	<i>BamHI</i> -Fragment	pKK130lux
P 247	pBinG247	<i>EcoRI</i> -blunt/ <i>SalI</i> -Fragment	-	pKK247	<i>SalI/HindIII</i> - Fragment	pKK247lux
P FBP1,1	pFBPase1,1	<i>EcoRI</i> -blunt-Fragment	-	pKKFBP1,1	<i>SalI</i> -Fragment	pKKFBP1,1lux
P FBP1,7	pME1	<i>BamHI</i> -Fragment	-	pKKFBP1,7	<i>SalI</i> -Fragment	pKKFBP1,7lux
P SKT2	pBi101-SKT2	<i>BamHI</i> -Fragment	-	pKKSKT2	<i>SalI/HindIII</i> -Fragment	pKKSKT2lux
P Nos	pBin19	-	<i>Sau3A</i> -Fragment	pKKNos	<i>SalI/HindIII</i> -Fragment	pKKNoslux
P KST1	pDKP3	-	<i>SmaI</i> -Fragment	-	<i>BamHI</i> -Fragment	pKKKST1lux
P KCO1	pPK-Gus-4	-	<i>SmaI</i> -Fragment	-	<i>BamHI</i> -Fragment	pKKKCO1lux

**Tab. 24:** Überblick über die Klonierungsstrategien der pflanzenspezifischen Promotoren in pKK232-8 und die Namen der resultierenden Promotor-*cat*-Fusionen. Nach Klonierung der *luxAB*-Gene entstanden die pKK-Konstrukte.

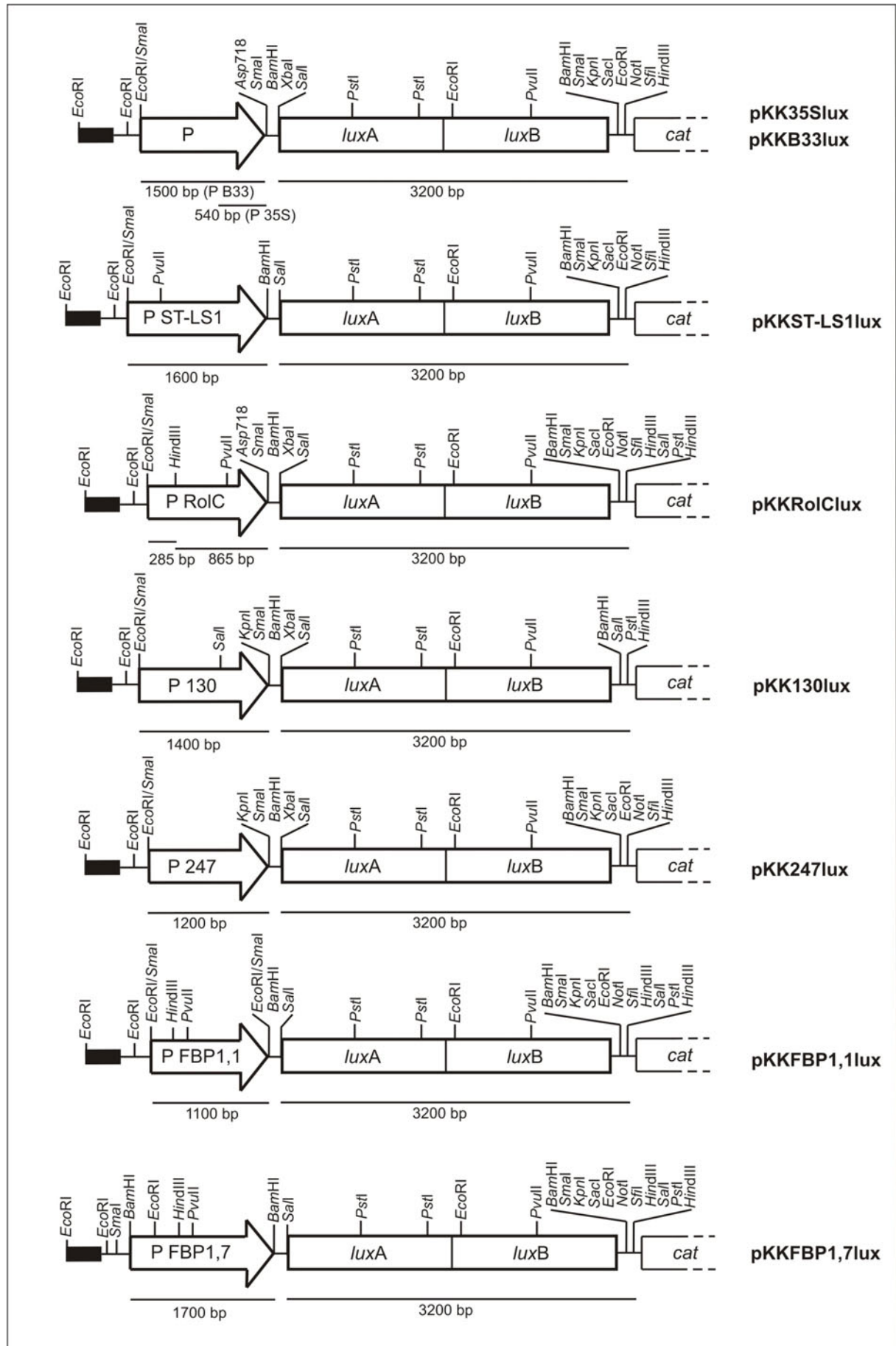
Weiterhin ließ sich die Insertion der Promotor- bzw. *luxAB*-DNA in pKK232-8 durch *PvuII*-Restriktion nachweisen. Abb. 14 zeigt ein 0,8 %iges Agarosegel mit den *PvuII* restringierten pKK-Konstrukten (mit Ausnahme des Konstruktes pKKFBP1,1lux). Die DNA des Vektor pKK232-8 wurde durch *PvuII*-Restriktion in drei Fragmente geschnitten (2677 bp, 1278 bp und 1139 bp). Die Promotor-Fragmente inserierten in das größte DNA-Fragment des Vektors. Die *luxAB*-Gene wiesen eine weitere *PvuII*-Restriktionsschnittstelle auf und ergaben zwei Fragmente mit 2393 bp und 993 bp (bei Klonierung des *luxAB-SalI*-Fragments) bzw. 949 bp (bei Klonierung des *luxAB-BamHI*-Fragments). Hierbei inserierte das große *luxAB*-Fragment (2393 bp) in das größte Fragment bestehend aus Vektor-DNA und Promotor-DNA. Ein verändertes Restriktionsmuster wiesen die pKK-Konstrukte mit den Promotoren P ST-LS1, P RolC, P FBP1,1 und P FBP1,7 auf. Sie besaßen in den jeweiligen Promotor-Fragmenten eine weitere *PvuII*-Restriktionsschnittstelle, so dass es zur Restriktion des entstandenen großen Fragments kam.

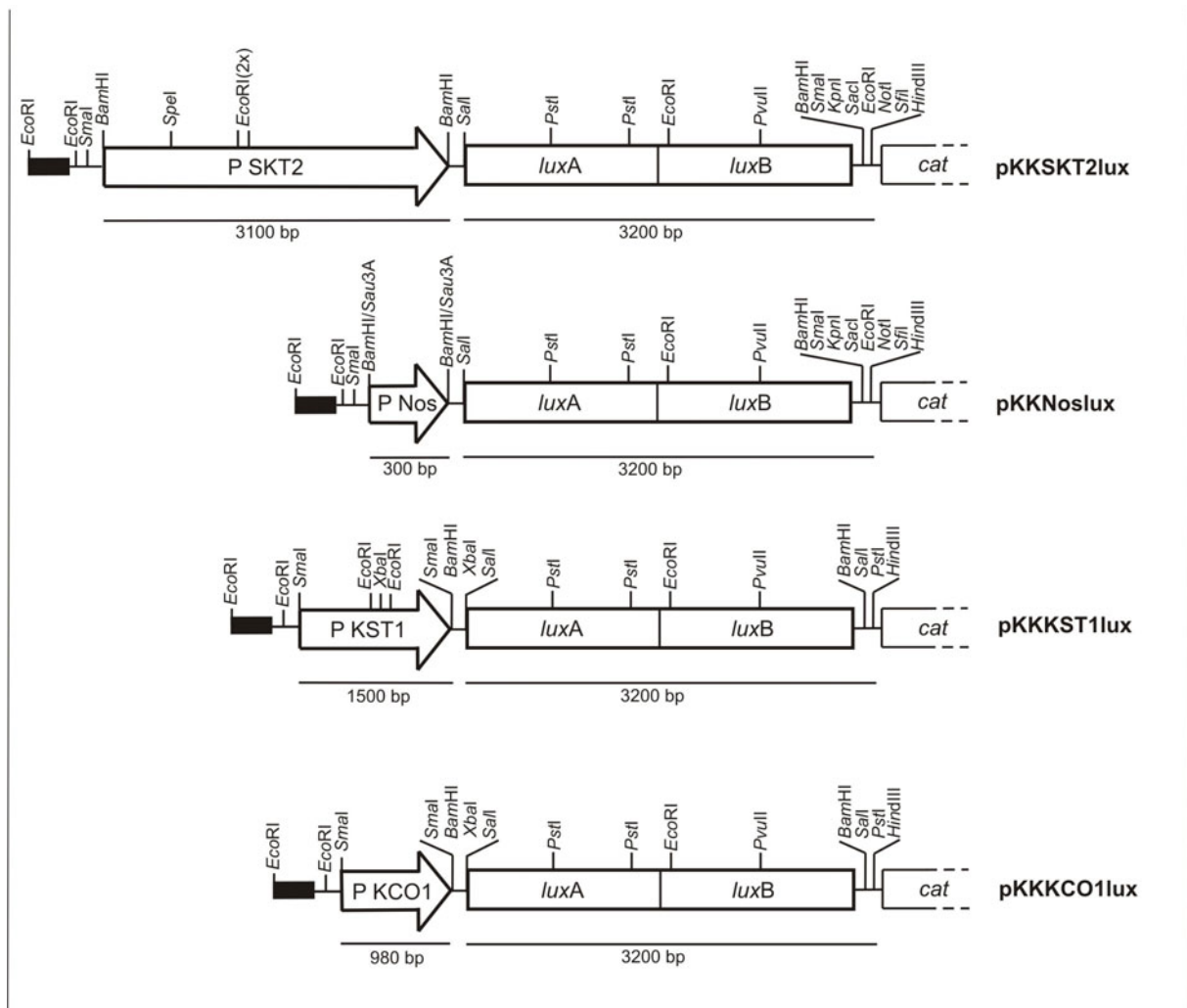


**Abb. 14:** Restriktionsverdau der pKK-Konstrukte mit *PvuII*. 1 =  $\lambda$  DNA/*Eco130I*, 2 = pKKlux, 3 = pKKARlux, 4 = pKKB33lux, 5 = pKKST-LS1lux, 6 = pKKRolClux, 7 = pKK130lux, 8 = pKK247lux, 9 = pKKFBP1,7lux, 10 = pKKNoslux, 11 = pKKSkt2lux, 12 = pKKKCO1lux, 13 = pKKKST1lux, 14 =  $\lambda$  DNA/*Eco130I*.

Zusammenfassend sind die pKK-Konstrukte mit der MCS, sowie den weiteren Restriktionsschnittstellen in Abb. 15 dargestellt.







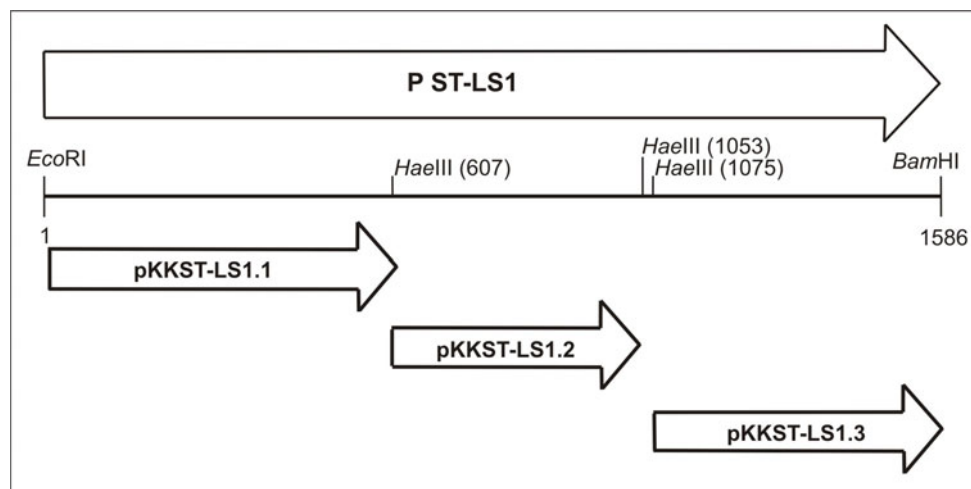
**Abb. 15:** Schematische Darstellung der MCS der pKK-Konstrukte. Stromaufwärts der klonierten Promotoren liegt ein Transkriptionsstop, stromabwärts schließt sich die DNA des promotorlosen *cat*-Gens an.

### 3.1.1.3 Klonierung der *Hae*III-Restriktionsfragmente des ST-LS1-Promotors in pKK232-8 und Transformation in *E. coli*

Der Promotor des ST-LS1-Gens zeigte schon in den Voruntersuchungen (Jacob, 1997) eine starke Genexpression in *E. coli*, *Y. enterocolitica* und *A. tumefaciens*. Stockhaus *et al.* (1987) beschrieben, dass für eine Genexpression in Pflanzen nur 334 bp der 5'-upstream Region des ST-LS1-Gen benötigt werden. Die Genexpressionsstärke war jedoch gegenüber der der 1600 bp 5'-upstream Region um zwei Drittel reduziert. Eine 5'-upstream Region von 130 bp, welche die CAAT- und TATA-Sequenzelemente enthielt, zeigte keinerlei Genexpression.

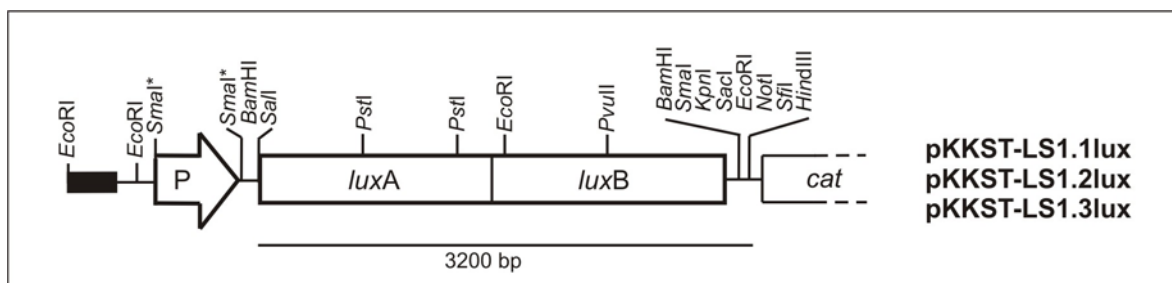
Um Teilfragmente des Promotors P ST-LS1 auf die Expressionsstärke in Bakterien untersuchen zu können, wurde eine Subklonierung vorgenommen. Hierfür wurde die DNA des Promotor-Fragmentes mittels Doppelverdau mit *Eco*RI und *Bam*HI von der restlichen DNA des Derivates pBin-L700 getrennt. Die kohäsiven Enden des *Eco*RI/*Bam*HI-Verdau

wurden aufgefüllt und nach Auftrennung der DNA in einem 0,8 %igen präparativen Agarosegel, wurde das 1600 bp große P ST-LS1-Fragment eluiert. Der anschließende Restriktionsverdau mit *Hae*III trennte die Promotor-DNA in vier Fragmente (Abb. 16), wovon drei Fragmente in den *Sma*I restringierten Vektor pKK232-8 kloniert wurden. Nach blunt-end Ligation wurde der Ligationsansatz in DH5 $\alpha$  transformiert.



**Abb. 16:** Schematische Darstellung des *Eco*RI/*Bam*HI-Fragmentes des Promotors P ST-LS1 mit den vorhandenen *Hae*III-Restriktionsschnittstellen. Die dargestellten *Hae*III-DNA-Fragmente wurden in pKK232-8 kloniert und erhielten die Namen pKKST-LS1.1, pKKST-LS1.2 und pKKST-LS1.3.

Zur Klonierung der DNA der *lux*AB-Gene, wurde das *Sal*I/*Hind*III-Fragment aus Mini-Tn5*lux*AB in die *Sal*I und *Hind*III restringierten Plasmide mit den *cat*-Fusionen kloniert. Die Ligationsansätze wurden wiederum in DH5 $\alpha$  transformiert. Die rekombinanten Plasmide wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierungen überprüft. In Abb. 17 ist die MCS der entstanden pKK-Konstrukte dargestellt.



**Abb. 17:** Schematische Darstellung der pKK-Konstrukte mit den *Hae*III-DNA-Fragmenten des P ST-LS1. \* Die Restriktionsschnittstelle kann durch das Enzym *Sma*I nicht mehr erkannt werden, da je nach DNA-Fragment eine aufgefüllte *Eco*RI oder *Bam*HI bzw. *Hae*III Restriktionsschnittstelle mit *Sma*I ligiert wurde.



1993). Diese Nukleotide blieben auch bei der Analyse konserviert. Bei den restlichen Basen der Konsensus Sequenzen waren bei der  $-35$ -Region wie auch bei der 'extended  $-10$ -Region' drei Mismatches und bei der  $-10$ -Region zwei Mismatches erlaubt. Der Abstand zwischen den beiden Hexameren wurde auf 15 bis 20 nt festgelegt.

Die Länge der untersuchten pflanzenspezifischen Promotorsequenzen variierte von 300 bis 3100 bp. Um die Ergebnisse der Suche miteinander vergleichen zu können, wurden die 300 bp des jeweiligen Promotor-Fragments analysiert, die direkt stromaufwärts der zu transkribierenden *luxAB*-Genen lagen.

Die Computeranalyse lieferte für jede mögliche Übereinstimmung einen Treffer. Bei der Erkennung der  $-35$ - in Abhängigkeit von der  $-10$ -Konsensus Sequenz wurden Treffer gefunden, bei denen eine der beiden Sequenzen identisch ist und die andere Konsensus Sequenz sich um ein bis mehrere Nukleotide verschiebt. Solche Übereinstimmungen wurden als ein Treffer gerechnet, da angenommen werden kann, dass die RNAP einen solchen Promotorbereich als eine Erkennungsstelle betrachtet.

In Tab. 25 wurden die Ergebnisse der Computer-gestützten Suche nach potentiellen bakteriellen Konsensus Sequenzen dargestellt. Im Anhang (Kap. 6.2) wurden diese Treffer in den pflanzenspezifischen Sequenzen farblich hervorgehoben.

Mit acht Treffern wurde für den P SKT2 mit Abstand das höchste Ergebnis an Übereinstimmungen mit der Konsensus Sequenz erzielt. Für die weiteren Promotoren wurden null bis vier Treffer gefunden. Vier Treffer wurden für P B33, drei für P 35S, P ST-LS1, P RolC, P 247 und P KST1 gefunden. Weiterhin konnte ein Treffer für P FBP1,1 bzw. P FBP1,7, P Nos und P KCO1 festgestellt werden. Die Analyse ergab keinen Treffer für den P 130. Die Homologie zu dem bekannten Hexamer der  $-35$ -Konsensus Sequenz variierte zwischen drei bis vier Basen. Bei der  $-10$ -Konsensus Sequenz lag sie bei vier bis fünf Basen. Für die 'extended  $-10$ -Region' wurden sechs bzw. sieben Basen Übereinstimmung gefunden. Somit war die Homologie der potentiellen prokaryontischen Konsensus Sequenzen gegenüber der bekannten  $\sigma^{70}$ -Konsensus Sequenzen eher gering.

Die Untersuchung der Subklone des P ST-LS1 ergab für P ST-LS1.2 sieben Treffer, wovon in einem Fall eine vollkommene Homologie mit der  $-10$ -Konsensus Sequenz nachzuweisen war. Jedoch war in diesem Falle der Abstand zwischen den beiden Hexameren mit 19 und 20 nt nicht optimal. Für P ST-LS1.1 konnten zwei Treffer nachgewiesen werden. Die Suche in P ST-LS1.3 entspricht den 300 bp, welche im Gesamtfragment des P ST-LS1 analysiert wurden.

Promotor	Potentielle Promotorsequenz (-35/-10-Sequenz oder 'extended -10-Sequenz')	Position in Acc. # siehe Anhang	Abstand zwischen der -35- und -10-Sequenz [nt]	Übereinstimmung mit der Konsensus Sequenz	Trefferzahl
P 35S	TTGcCc / TATtgT TGTgAagAT TGCCATcAT	2405/2426 2429 2466	15 - -	4/6 und 4/6 6/9 6/9	3
P B33	TTtcaA (TTcAag) / TATAtT (TATtAT) TTtAtt (TTGgtt) / TAaAAT TGTcAaAcT TTGttA/cAaAAT	1493(1494)/ 1518(1520) 1617(1621)/1642 1628 1683/1706	19/18/20 19/15 - 17	3/6 und 5/6 3/6 und 5/6 6/9 4/6 und 4/6	4
P ST-LS1	TTtgtA (TTGtag) /gATAAT TGATAatgT TTattA (TTatCA) /gAaAAT	1395(1396)/1419 1418 1512(1515)/1537	18/17 - 19/16	3/6 und 5/6 6/9 3 bzw. 4/6 und 4/6	3
P ST-LS1.1	TGCgAgAgt TTtgtA (TTtgaA;TTGAat) / TAccAT (cATAgT)	351 485(486;487)/ 510(513)	- 19/18/17/20	6/9 3 bzw. 4/6 und 4/6	2
P ST-ST1.2	TTtCA / TATgcT TTagCA / TAcAgT TTaACc /aATAcT TTGttt (TTtAag; TTtAgt)/ gAgAAT TTGAgT (TTGtgc) / gATgAT TTtgaA (TTGAag) / TATAAT TTcAag / gATAtT	754/775 788/809 897/922 938(941;942)/ 963 361(366)/387 381(382)/407 398/420	15 15 19 19/16/15 20/15 20/19 16	4/6 und 4/6 4/6 und 4/6 4/6 und 4/6 3/6 und 4/6 4 bzw. 3/6 und 4/6 3 bzw. 4/6 und 6/6 3/6 und 4/6	7
P ST-LS1.3	TTtgtA (TTGtag) /gATAAT TGATAatgT TTattA (TTatCA) /gAaAAT	1395(1396)/1419 1418 1512(1515)/1537	18/17 - 19/16	3/6 und 5/6 6/9 3 bzw. 4/6 und 4/6	3
P RolC	TTaAaA / TATAtT TTGtgg / aATAtT (TATtT) TTtgCt (TTGctc) /gATtAT	978/1002 1061/1083(1085) 1096(1097)/1122	18 16/18 20/19	4/6 und 5/6 3/6 und 4/6 3/6 und 4/6	3
P 130	-	-	-	-	0
P 247	TGATAaAgT TTctgA / TAaAAT TTtcaA (TTcAac) / TATccT	889 907/928 1092(1093)/1114	- 15 16/15	7/9 3/6 und 5/6 3/6 und 4/6	3
P FBP1,1	TGGcATccT	1035	-	6/9	1
P FBP1,7	TGGcATccT	1646	-	6/9	1
P Nos	TTccCc / cATAtT	9016/8990	20	3/6 und 4/6	1
P SKT2	TTtAtA(TTataA) / TATtAT TTacaA / TAaAAT TTtAtA / TAaAAT TTGtat / aATtAT TTGctA / aAaAAT TGTaAaAgT TTGctc / TATtT TGCTATtT	2731/2756 2767/2791 2785/2810 2805/2831 2897/2923 2905 2913/2936 2933	19/18 18 19 20 20 - 17 -	4 bzw. 3/6 und 5/6 3/6 und 5/6 4/6 und 5/6 3/6 und 4/6 4/6 und 5/6 6/9 3/6 und 4/6 7/9	8
P KST1	TTctCc / gATAcT (TActAT) TGGgAagAT TTcttA (TTaAag) / aAgAAT	1307/1332(1334) 1325 1366(1369)/1391	18/20 - 19/16	3/6 und 4/6 6/9 3/6 und 4/6	3
P KCO1	TTGAtt / cATAgT	1177/1198	15	4/6 und 4/6	1

**Tab. 25:** Ergebnisse der Computer-gestützten Suche nach potentiellen bakteriellen Konsensus Sequenzen in den pflanzenspezifischen Promotoren. Untersucht wurden die 300 bp der Promotoren, welche direkt vor dem Fragment mit den *luxAB*-Genen lagen. Übereinstimmungen der Nukleotide mit der  $\sigma^{70}$ -Konsensus Sequenz wurden in Großbuchstaben dargestellt. Verschiebt sich die Konsensus Sequenz bei der Suche nur um ein bis mehrere Nukleotide, so wurde diese Sequenz in Klammern dargestellt und als ein Treffer gezählt. Der Sequenzursprung bezieht sich auf die Acc. # (wenn vorhanden), der im Anhang aufgeführten Sequenzen.

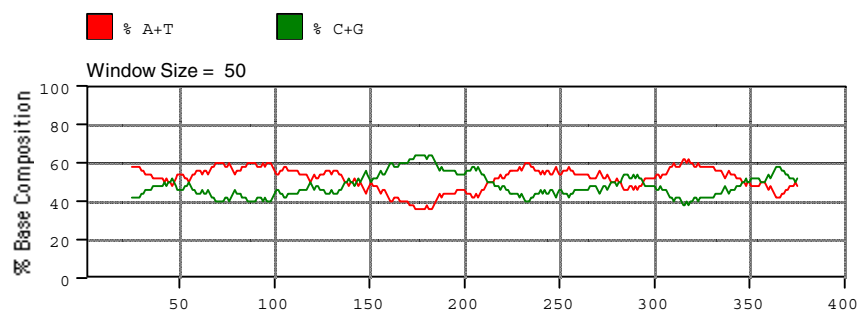
### 3.1.2.2 Bestimmung des AT-Gehalts

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Genexpressionsstärke von pflanzenspezifischen Promotoren in Bakterien und dem AT-Gehalt gibt, wurde dieser bestimmt. Um den AT-Gehalt der Promotoren vergleichen zu können, wurden wiederum die 300 bp des Promotor-Fragmentes analysiert, die direkt stromaufwärts der zu transkribierenden *luxAB*-Genen lagen. Die Berechnung des AT-Gehalts ist bei einem 'window size = 50' jeweils von einem Punkt aus auf je 25 bp stromaufwärts und stromabwärts, also insgesamt 50 bp, bezogen. Abb. 18 führt die Diagramme der untersuchten AT-Gehalte der Promotoren auf, wobei die AT-Gehalte von P FBP1,1 und P FBP1,7 zusammen dargestellt wurden, da sie identisch sind. Die Diagramme sind nach zunehmenden AT-Gehalt angeordnet. Die Darstellung zwischen 50 bis 350 entspricht dem AT-Gehalt der untersuchten 300 bp der Promotoren.

P 35S und P Nos besitzen mit 52,6 % und 53,7 % den geringsten AT-Gehalt. Bei den weiteren Promotoren liegt er bei 60 % oder darüber. Der AT-Gehalt des P SKT2 ist mit 76,6 % am höchsten. Dies zeigt den Zusammenhang mit der Trefferzahl der potentiellen prokaryontischen Konsensus Sequenzen auf. Jedoch wurde für den P 130 kein Treffer gefunden, während der AT-Gehalt mit 61,6 % relativ hoch ist. Auch für P FBP1,1 bzw. P FBP1,7 und P KCO1 liegt der AT-Gehalt mit 64,3 % und 66,7 % relativ hoch, und für diese Promotoren konnte jeweils nur ein Treffer bei der Computer-getützten Suche ermittelt werden.

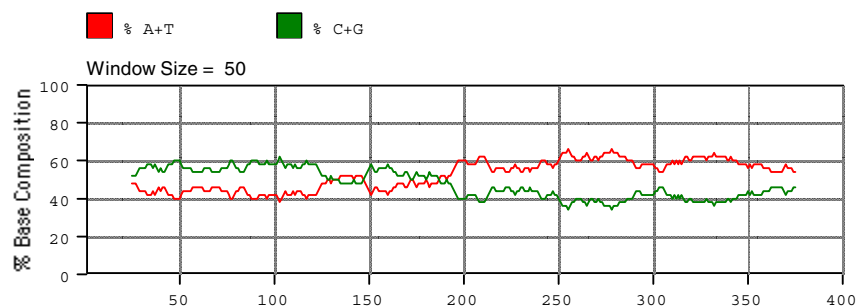
#### P 35S

AT-Gehalt: 52,6 %



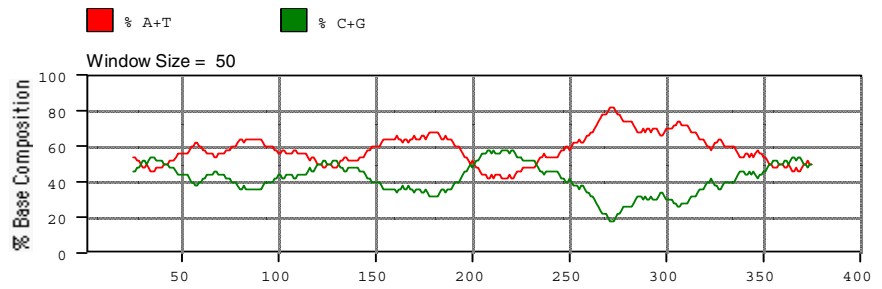
#### P Nos

AT-Gehalt: 53,7 %



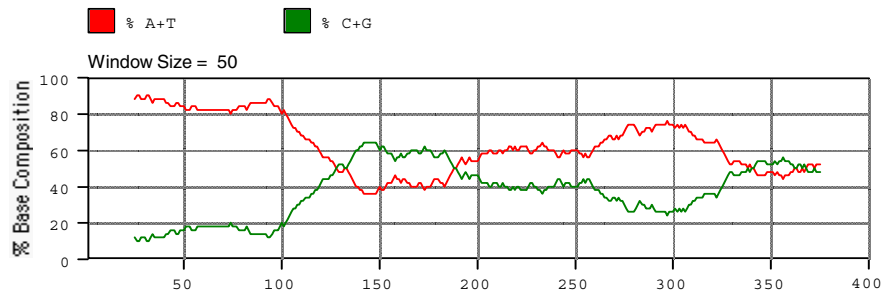
**P RoIC**

AT-Gehalt: 60,0 %



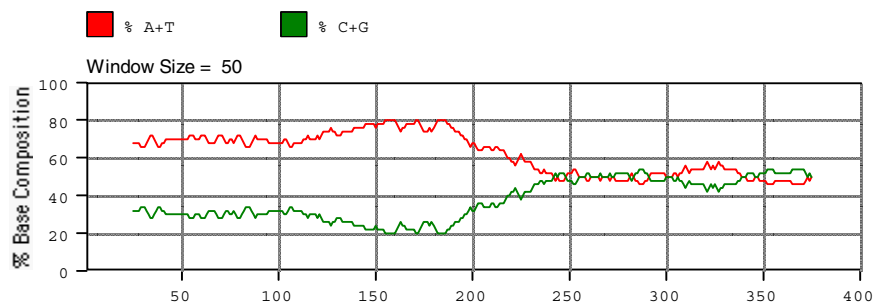
**P 130**

AT-Gehalt: 61,6 %



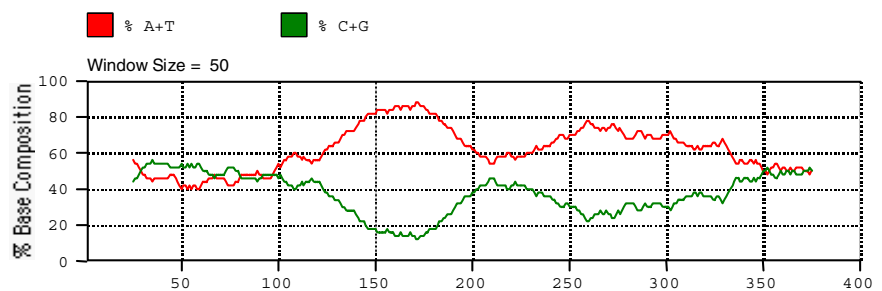
**P 247**

AT-Gehalt: 63,7 %



**P B33**

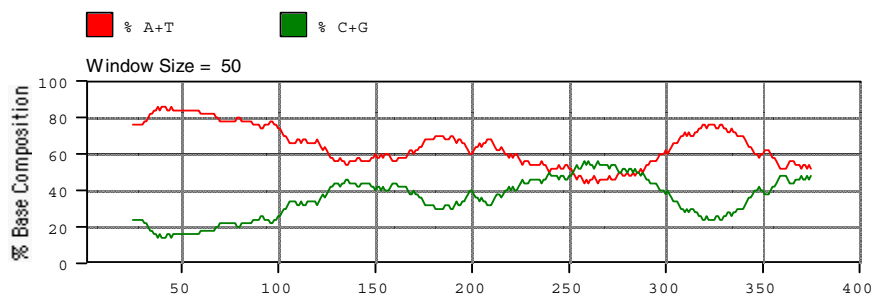
AT-Gehalt: 64,3 %



**P FBP1,1**

**P FBP1,7**

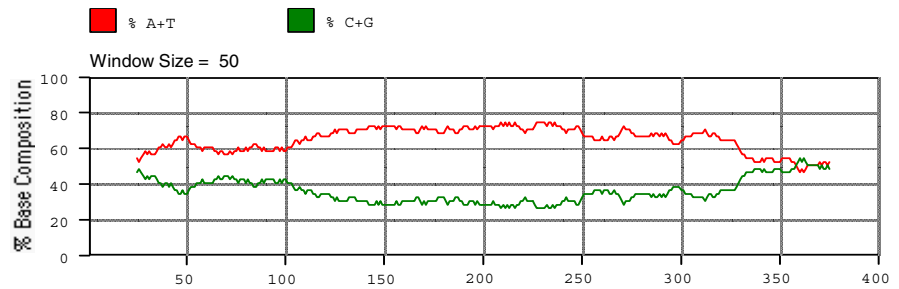
AT-Gehalt: 64,3 %



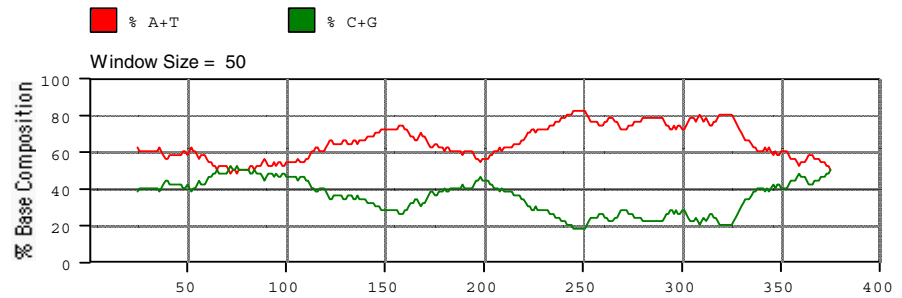


**P KCO1**

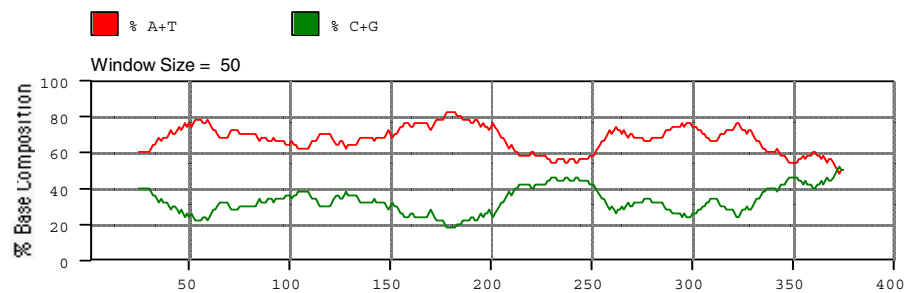
AT-Gehalt: 66,7 %

**P KST1**

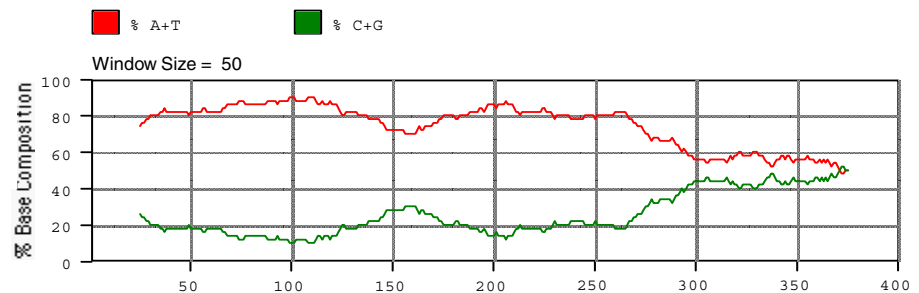
AT-Gehalt: 67,0 %

**P ST-LS1**

AT-Gehalt: 68,7 %

**P SKT2**

AT-Gehalt: 76,6 %



**Abb. 18:** Darstellung des AT-Gehaltes innerhalb der 300 bp (in der Darstellung 50 bis 350) der Sequenz der pflanzenspezifischen Promotoren, welche direkt vor dem Klonierungsfragment mit den zu transkribierenden *luxAB*-Genen lagen.

### 3.1.3 Genexpressionsbestimmungen

#### 3.1.3.1 Genexpressionsbestimmung mittels Lumineszenzmessung

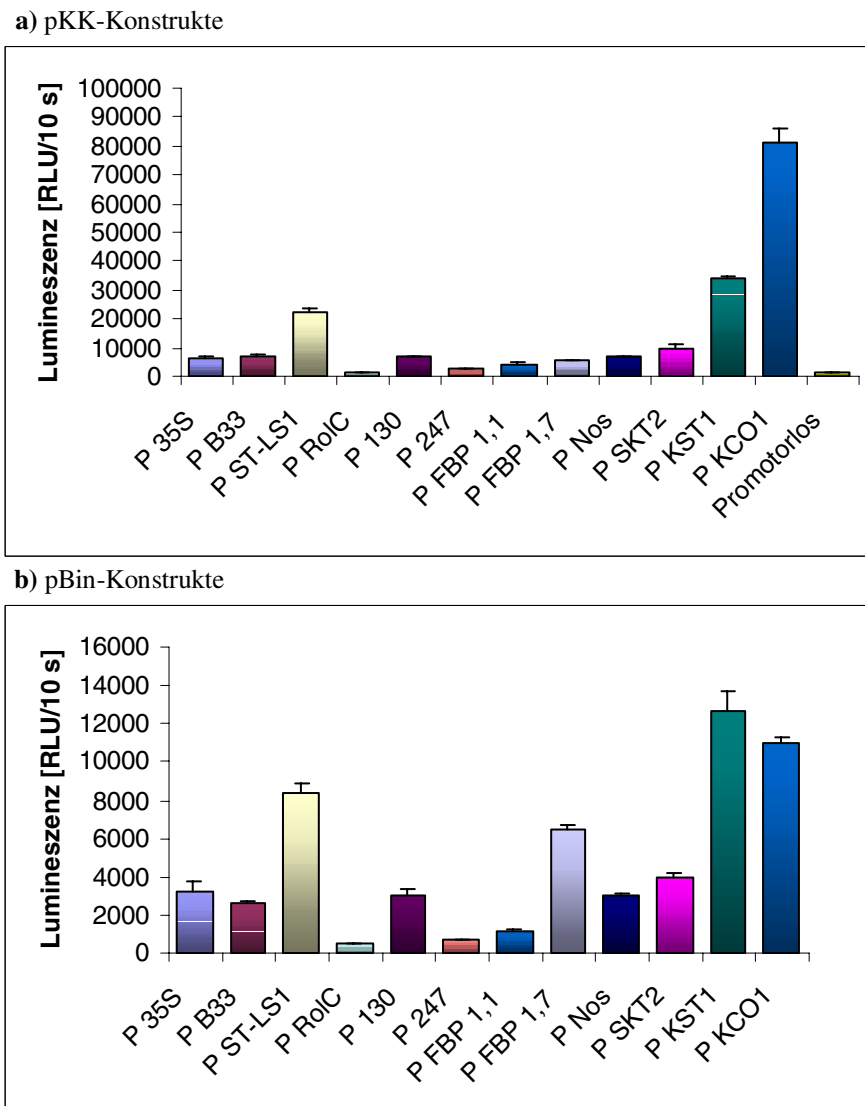
Zum Nachweis einer möglichen Expression der *luxAB*-Gene durch die pflanzenspezifischen Promotoren wurde die Lumineszenz in RLU/10 s gemessen. Die Lumineszenz der pflanzenspezifischen Promotoren innerhalb der pBin-Konstrukte wurde in *E. coli* K-12 Stamm DH5 $\alpha$ , *Y. enterocolitica* Stamm 78, *A. tumefaciens* Stamm ATHV, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. BD413 bestimmt. Die Lumineszenz der pKK-Konstrukte wurde aufgrund des Replikationsursprungs des Plasmides und der Instabilität der Konstrukte in *Yersinia* (Jacob, 1997) nur in *E. coli* untersucht.

Die folgenden abgebildeten Histogramme der Lumineszenzen stellen die Mittelwerte dreier Dreifachbestimmungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen dar.

In Abb. 19 sind die Lumineszenzen ausgehend von den pflanzenspezifischen Promotoren der pKK-Konstrukte denen der pBin-Konstrukte in *E. coli* gegenübergestellt. Die pKK-Konstrukte wiesen aufgrund der höheren Kopienzahl (15 bis 20) eine doppelt bis 3,5-fach höhere Lumineszenz gegenüber den pBin-Konstrukten (Kopienzahl 3 bis 7) auf. Als Negativ-Kontrolle wurde die Lumineszenz des promotorlosen pKKlux-Konstruktes mit 1000 RLU/10 s gemessen. Der Vektor pKK232-8 besitzt im Gegensatz zum Vektor pBin19 vor der MCS einen Transkriptionsstop, welcher das Durchlesen stromaufwärts liegender Sequenzen verhinderte. Die Fusion des pBin19 mit den *luxAB*-Genen ohne pflanzenspezifischen Promotor, stellte keine geeignete Negativ-Kontrolle dar, da bakterielle Vektorsequenzen zu einer Genexpression führten (Mudge, 1996; Jacob, 1997). Bakterielle Kulturen, welche keine *luxAB*-Gene beinhalteten, wiesen eine Hintergrund-Lumineszenz von etwa 100 RLU/10 s auf.

Die Lumineszenzmessungen in *E. coli* zeigten, dass acht der zwölf getesteten pflanzenspezifischen Promotoren eine Genexpression verursachten, die der Genexpression ausgehend von dem P 35S aus CaMV entsprachen oder stärker waren. Der P 35S aus CaMV wurde als Positiv-Kontrolle mitgeführt, da dessen Expression in *E. coli* bereits von Assaad und Signer (1990) beschrieben wurde. Die Promotoren P B33, P 130, P FBP1,7, P Nos und P SKT2 zeigten eine Expression der *luxAB*-Gene, die vergleichbar mit der des P 35S waren. Stärkere Genexpressionen wiesen hingegen die Promotoren P ST-LS1, P KST1 und P KCO1 auf. Die Lumineszenzen ausgehend von den Promotoren P RolC und P 247 entsprachen der Negativ-Kontrolle. Die Genexpression ausgehend von P FBP1,1 war etwas höher als die der Negativ-Kontrolle. Beim Vergleich der Lumineszenzen ausgehend von den Promotoren in den pKK-Konstrukten mit denen der pBin-Konstrukte zeigten zwei Konstrukte diskrepante Werte. Der P FBP1,7 zeigte im pBin-Konstrukt eine zu hohe Expression im Vergleich zu dem

pKK-Konstrukt. Die Expression ausgehend von dem P KCO1 war wiederum im pBin-Konstrukt im Vergleich zu dem pKK-Konstrukt zu niedrig.



**Abb. 19:** Lumineszenzmessungen der **a** pKK-Konstrukte und **b** pBin-Konstrukte in *E. coli*.

Eine mögliche Ursache für die geringere Genexpression des pKCO1lux gegenüber dem pKKKCO1lux könnten die beiden Basenfehlpaarungen nahe dem 5'-Ende des Promotors (Kap. 6.5.2, Abb. 53) sein. Interessant ist auch die Beobachtung, dass der P FBP1,7 gegenüber dem P FBP1,1, welcher am 5'-Ende um 600 bp verkürzt ist, in dem pBin-Konstrukt eine höhere Genexpression aufweist. Möglicherweise führten die unterschiedlichen Zusammensetzungen der MCS der P FBP1,1- bzw. P FBP1,7-Konstrukte zu einem veränderten Genexpressionsverhalten. Lisser und Margalit (1994) konnten durch Computeranalyse von *E. coli* Promotoren zeigen, dass die die Konsensus Sequenzen (-35- und

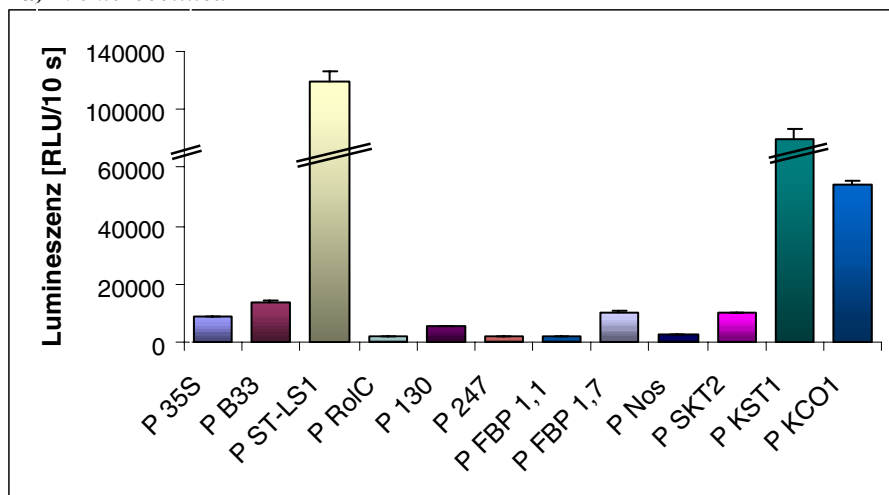
-10-Region) umgebenden Nukleotide entscheidend für die physikalisch-chemischen und strukturellen Eigenschaften der DNA sind und somit die Promotorstärke beeinflussen können.

Zum Vergleich der Genexpression der heterologen, pflanzenspezifischen Promotoren mit einem homologen bakteriellen Promotor wurde die Genexpression des Lac-Promotors fusioniert mit den *luxAB*-Genen in pBin19 gemessen. Hierbei wurde für pla<sub>lux</sub> unter Zugabe von IPTG eine Lumineszenz von 200000 RLU/10 s gemessen. Dieses Konstrukt erwies sich in *E. coli* als instabil, so dass dieser Wert nicht reproduziert werden konnte. Für das Konstrukt pla<sub>OCSlux</sub> konnte 260000 RLU/10 s gemessen werden. Die Genexpression ausgehend von dem Lac-Promotor ist somit ca. 20mal höher als die stärkste pflanzenspezifische Genexpression.

Weiterhin wurde in unserem Labor der Promotor des TEM1 *bla*-Gens (P Bla) mit den *luxAB*-Genen fusioniert und in den Vektor pKK232-8 kloniert. Die Expression ausgehend von P Bla führte in *E. coli* bei Anwesenheit von Ampicillin im Medium zu einer sechsfach höheren Expression als die des P KST1 (pKK-Konstrukt, persönliche Mitteilung A. Lewin).

Die Lumineszenz der pflanzenspezifischen Promotoren der pBin-Konstrukte in *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. sind in Abb. 20 dargestellt.

a) *Y. enterocolitica*



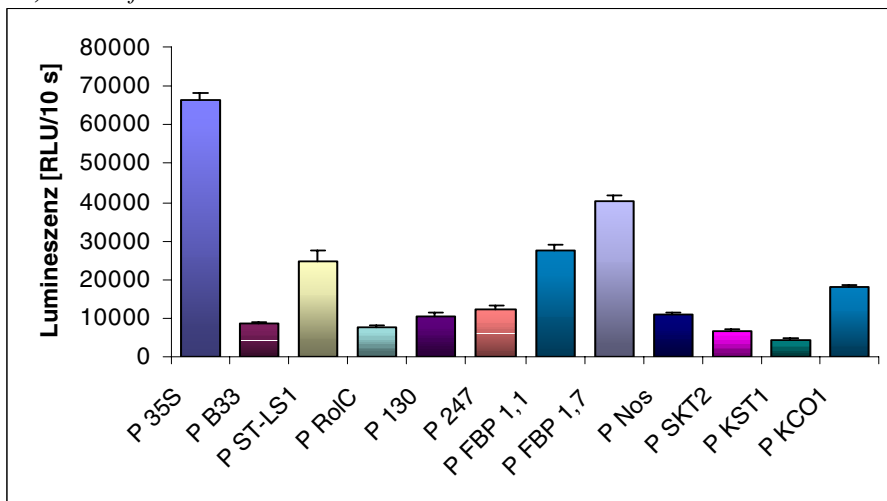
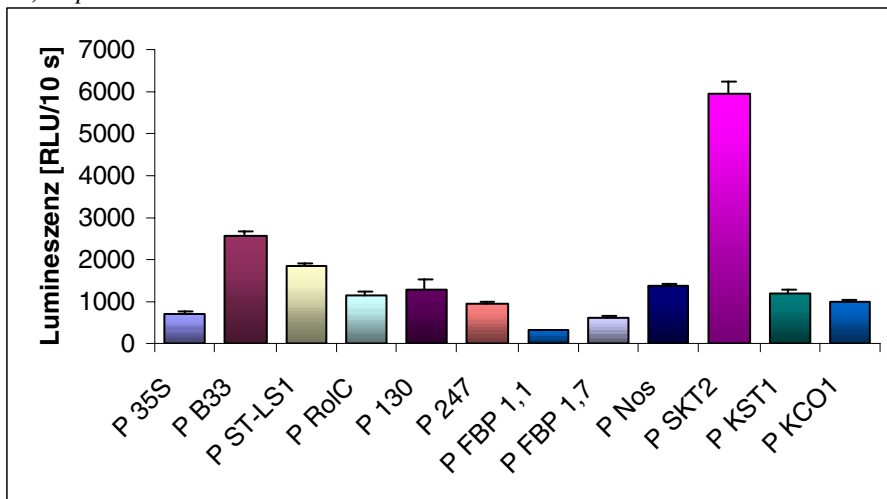
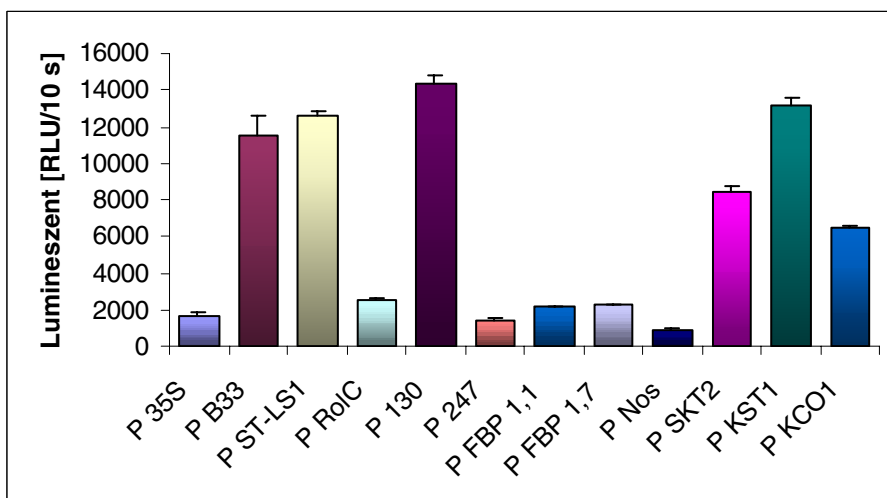
b) *A. tumefaciens*c) *P. putida*d) *Acinetobacter* sp. BD413

Abb. 20: Lumineszenzmessungen der pBin-Konstrukte in **a** *Y. enterocolitica*, **b** *A. tumefaciens*, **c** *P. putida* und **d** *Acinetobacter* sp. BD413

In *Y. enterocolitica* zeigten drei Promotoren, P B33, P FBP1,7 und P SKT2, eine Genexpressionsstärke, die mit der des P 35S vergleichbar war. P ST-LS1, P KST1 und P KCO1 zeigten wiederum eine sehr starke Expression der *luxAB*-Gene. Vergleicht man die Expressionen der Promotoren in *E. coli* mit denen in *Yersinia*, so sehen sich die Profile der Histogramme sehr ähnlich. Die Lumineszenz war jedoch im Wildtyp *Yersinia*-Stamm höher als im *E. coli* K-12 Stamm. Beide Arten gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*, so dass die übereinstimmende Genexpression durch die pflanzenspezifischen Promotoren erklärbar ist. Für das *plac<sub>OCS</sub>lux*-Konstrukt wurde in *Yersinia* eine Genexpression von 180000 RLU/10 s gemessen. Vergleicht man die Genexpression des *plac<sub>OCS</sub>lux*-Konstrukts mit der des P ST-LS1, so war diese nur 1,5-fach höher und ungefähr doppelt so hoch wie die des P KST1. In der Abbildung nicht dargestellt ist die Expressionsstärke eines Promotors P 143 aus *Y. enterocolitica*. Dieser Promotor wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe mittels Transposonmutagenese mit dem Mini-Tn5*luxAB* (De Lorenzo *et al.*, 1990) im Chromosom von *Y. enterocolitica* Stamm 78 (Lewin *et al.*, 1996) identifiziert und nach Restriktion mit den *luxAB*-Genen in pBin19 kloniert. Es ist jedoch nicht bekannt, welchem Gen dieser Promotor zuzuordnen ist und ob er reguliert wird oder als konstitutiver Promotor angesehen werden muß. Die Lumineszenz des P 143 mit ca. 30000 RLU/10 s deutet eher auf einen schwachen Promotor hin. Hingegen erreichten die pflanzenspezifischen Promotoren P ST-LS1 mit 125000 RLU/10 s, P KST1 mit 95000 RLU/10 s und P KCO1 mit 55000 RLU/10 s Expressionsniveaus, die die Expressionsstärke des P 143 weit überstiegen.

In *A. tumefaciens* wurde die stärkste Genexpression der *luxAB*-Gene durch den P 35S aus CaMV verursacht. Weiterhin starke Expressionen zeigten P ST-LS1, P FBP1,1 und P FBP1,7. Für das *plac<sub>OCS</sub>lux*-Konstrukt wurde in *Agrobacterium* eine Lumineszenz von 50000 RLU/10 s gemessen. Somit wurde für den pflanzenspezifischen Promotor P 35S mit 66000 RLU/10 s eine stärkere Lumineszenz gemessen als für den bakteriellen Lac-Promotor, der aus *E. coli* stammt.

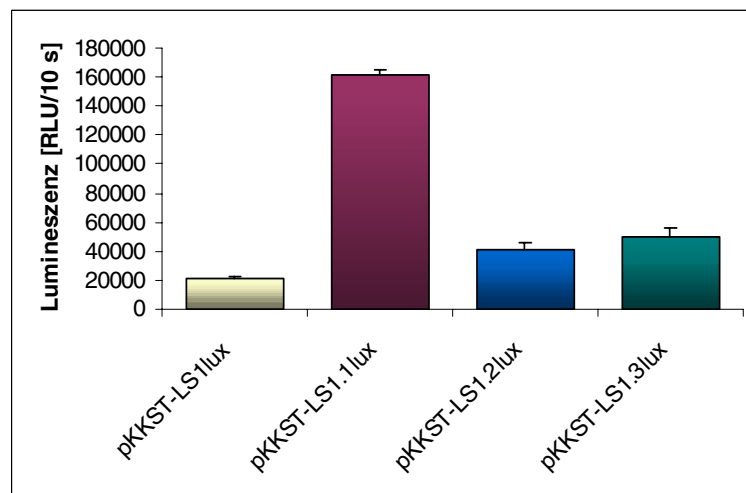
In *P. putida* zeigte das Konstrukt mit P SKT2, gefolgt von P B33 und P ST-LS1 die stärkste Genexpression. Für das *plac<sub>OCS</sub>lux*-Konstrukt wurde in *P. putida* eine Lumineszenz von 2700 RLU/10 s gemessen.

In *Acinetobacter* sp. Stamm BD413, einem Stamm mit einer natürlichen Kompetenz für DNA-Aufnahme (Nielsen *et al.*, 1997), führten die Promotoren P B33, P ST-LS1, P 130, P SKT2, P KST1 und P KCO1 zu einer Genexpression. Für das *plac<sub>OCS</sub>lux*-Konstrukt wurde in *Acinetobacter* eine Lumineszenz von 9000 RLU/10 s gemessen. Somit war die

Lumineszenz ausgehend von dem  $\text{plac}_{\text{OCSlux}}$ -Konstrukt geringer als die der pBin-Konstrukte mit den pflanzlichen Promotoren P B33, P ST-LS1, P 130 und P KST1.

Die Untersuchung der Lumineszenz der Subklone des P ST-LS1 in pKK232-8 ist in Abb. 21 dargestellt.

Hierbei verursachten die Subklone eine höhere Genexpression als das 1600 bp umfassende Wildtyp (WT) ST-LS1-Promotorfragment. Das Promotorfragment des pKKST-LS1.1 führte zu einer Lumineszenz, die achtfach höher war. pKKST-LS1.2 exprimierte die *luxAB*-Gene doppelt so stark wie der WT-Promotor und pKKST-LS1.3, dem Fragment mit der identischen Sequenz am 3'-Ende vor den zu exprimierenden *luxAB*-Genen wie der P ST-LS1 im pKKST-LS1lux-Konstrukt, wies ein 2,5-fach höhere Genexpression gegenüber dem WT-Promotor auf.



**Abb. 21:** Lumineszenzmessung der pKK-Konstrukte der Subklone des P ST-LS1 im Vergleich zu dem Gesamtfragment in *E. coli*.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es in 50 % der getesteten Kombinationen aus pflanzenspezifischem Promotor und Bakterienart zu einer Genexpression kam (Tab. 26). Der Promotor P ST-LS1 führte in allen fünf Bakterienarten zu einer Expression der *luxAB*-Gene. Zwei Promotoren, P RolC und P 247, führten in keiner der Bakterienarten zu einer Genexpression.

Promotor	<i>Escherichia coli</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Acinetobacter sp. BD413</i>
P 35S					
P B33					
P ST-LS1					
P RolC					
P 130					
P 247					
P FBP1,1					
P FBP1,7					
P Nos					
P SKT2					
P KST1					
P KCO1					

Genexpression     
 keine Genexpression

**Tab. 26:** Zusammenfassende Darstellung der Expression der *luxAB*-Gene durch die pflanzenspezifischen Promotoren.

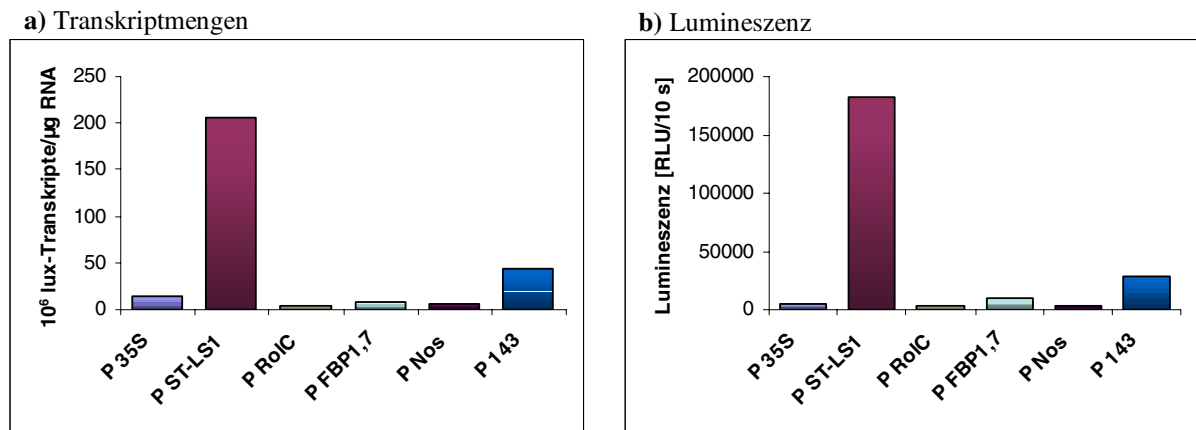
### 3.1.3.2 Nachweis der Transkriptmenge mittels TaqMan® Universal PCR

Die Methode der TaqMan® Universal PCR diente zum quantitativen Nachweis der *luxAB*-mRNA. Sie wurde eingesetzt um nachzuweisen, dass die Stärke der Lumineszenz mit der Menge an *luxAB*-Transkript der jeweiligen Konstrukte korrelierte und die Lumineszenzwerte somit die Promotorstärken widerspiegeln. Zum Vergleich der Transkriptmengen mit der Stärke der Lumineszenz wurde von jeweils denselben *Y. enterocolitica*-Kulturen ausgewählter pBin-Konstrukte zu einem identischen Zeitpunkt sowohl Gesamt-RNA für den Ansatz der quantitativen RT-PCR isoliert als auch die Lumineszenz der Kulturen bestimmt. Abb. 22 zeigt die Gegenüberstellung der jeweiligen Meßergebnisse. Der Vergleich der mRNA-Transkriptmengen mit den Lumineszenzen der pflanzenspezifischen Promotoren P 35S, P ST-LS1, P RolC, P FBP1,7 und P Nos in *Y. enterocolitica* zeigte, dass das verwendete *luxAB*-Reportersystem zur Bestimmung der Transkriptionsstärke in Bakterien geeignet war. Alle Promotoren wiesen zu den Transkriptmengen übereinstimmende Lumineszenzwerte auf.

Weiterhin wurde der in Kapitel 3.1.3.1 beschriebene Promotor P 143 aus *Y. enterocolitica* analysiert. Vergleicht man die Genexpressionsstärke des pflanzenspezifischen Promotors P ST-LS1 mit der des P 143, so ist diese sechsmal stärker als die des *Yersinia*-Promotors. Die



weiteren in Abb. 22 aufgeführten pflanzenspezifischen Promotoren haben jedoch eine viel schwächere Genexpression als der P 143.



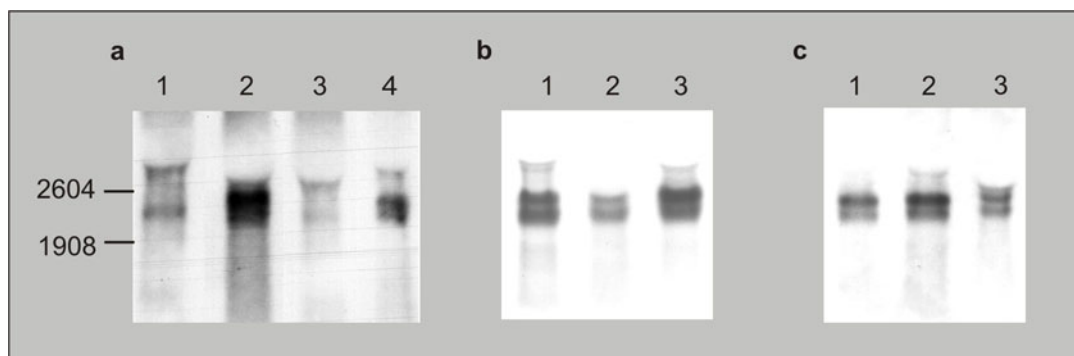
**Abb. 22:** Gegenüberstellung der **a** *luxAB*-Transkriptmengen und der **b** Lumineszenzwerte ausgewählter pBin-Konstrukte in *Y. enterocolitica*.

### 3.1.3.3 Nachweis der Genexpression mittels Northern Hybridisierung

Zur Charakterisierung der *luxAB*-Transkripte in ausgewählten Transformanten mit Promotor-*luxAB*-Fusionen wurden Northern Hybridisierungen durchgeführt. Hierfür wurden zwischen 3 bis 10 µg Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde homolog einem 400 bp großen Sequenzabschnitt aus dem *luxA*-Gen hybridisiert.

Abb. 23 zeigt die Hybridisierungsergebnisse der Transkripte der Promotoren P SKT2, P ST-LS1, P FBP1,7 und P KST1 in *E. coli* und P ST-LS1 in *Y. enterocolitica* und *P. putida*.

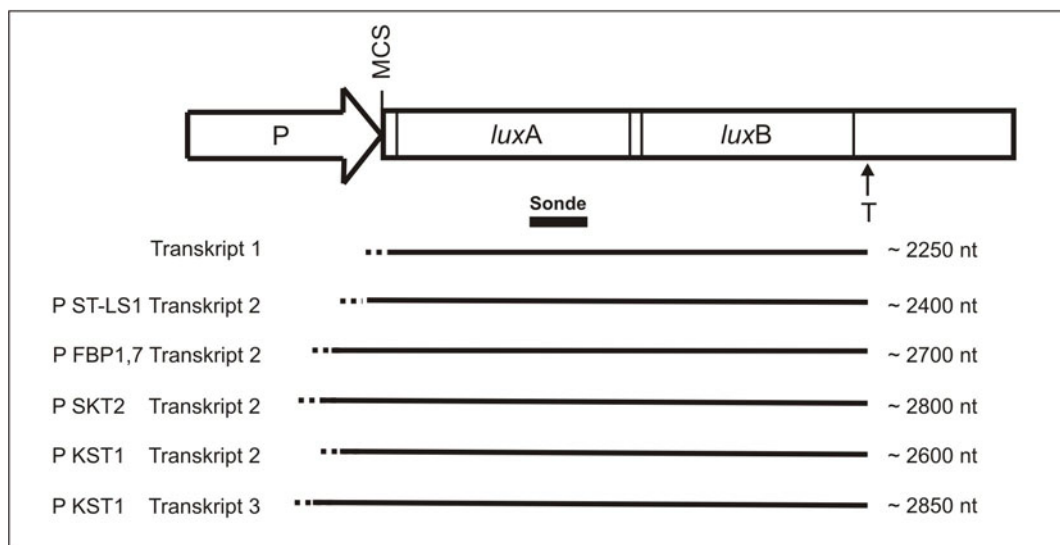
Die Northern Hybridisierungen aller untersuchten Transkripte zeigten distinkte Banden und weisen damit auf spezifische Transkriptionsstartpunkte hin. Bei den untersuchten Konstrukten, waren mindestens zwei Transkripte zu erkennen. Das Konstrukt, welches den P KST1 beinhaltet, zeigt als einziges ein schwaches drittes Transkript.



**Abb. 23:** Northern Hybridisierung. **a** 1 = pKKSKT2lux, 2 = pST-LS1lux, 3 = pFBP1,7lux, 4 = pKST1lux in *E. coli*. **b** 1 = *E. coli* (pKKSST-LS1lux), 2 = *Y. enterocolitica* (pST-LS1lux), 3 = *E. coli* (pST-LS1lux). **c** 1 = *E. coli* (pST-LS1lux), 2 = *E. coli* (pKKSST-LS1lux); 3 = *P. putida* (pST-LS1lux).

Bei der Berechnung der Transkriptlängen identischer Transkripte in unterschiedlichen Blots traten methodisch bedingt Unterschiede in den Transkriptlängen auf. Es konnte somit nur eine Abschätzung der Transkriptlängen erfolgen. Das Transkript, welches je nach Blot bei einer Länge von 2250 bis 2450 nt lag, war bei allen Proben identisch. Geht man von einer Transkriptlänge von 2250 nt aus, würde das Transkript innerhalb des Klonierungsfragmentes mit den *luxAB*-Genen starten (siehe Abb. 24) und das Vorkommen in allen untersuchten Konstrukten erklären.

Für den Promotor P SKT2 konnte ein weiteres Transkript der ungefähren Größe von 2800 nt, für P FBP1,7 ein Transkript mit der Größe von 2700 nt und für P KST1 zwei weitere Transkripte mit den Größen von 2600 nt und 2850 nt nachgewiesen werden. Für den P ST-LS1 konnte gezeigt werden, dass die Transkriptlängen mit einer Größe zwischen 2400 und 2600 nt in *E. coli*, *Y. enterocolitica* und *P. putida* identisch waren, als auch die Transkripte der pKK- und pBin-Konstrukte in *E. coli*.



**Abb. 24:** Schematische Darstellung der durch Northern Hybridisierung erhaltenen Transkriptlängen. Transkript 1 wurde bei allen getesteten Proben identifiziert. Die Promotoren P ST-LS1, P FBP1,7 und P SKT2 wiesen ein zweites Transkript auf. Bei dem Promotor P KST1 konnte neben einem zweiten noch ein drittes Transkript identifiziert werden.

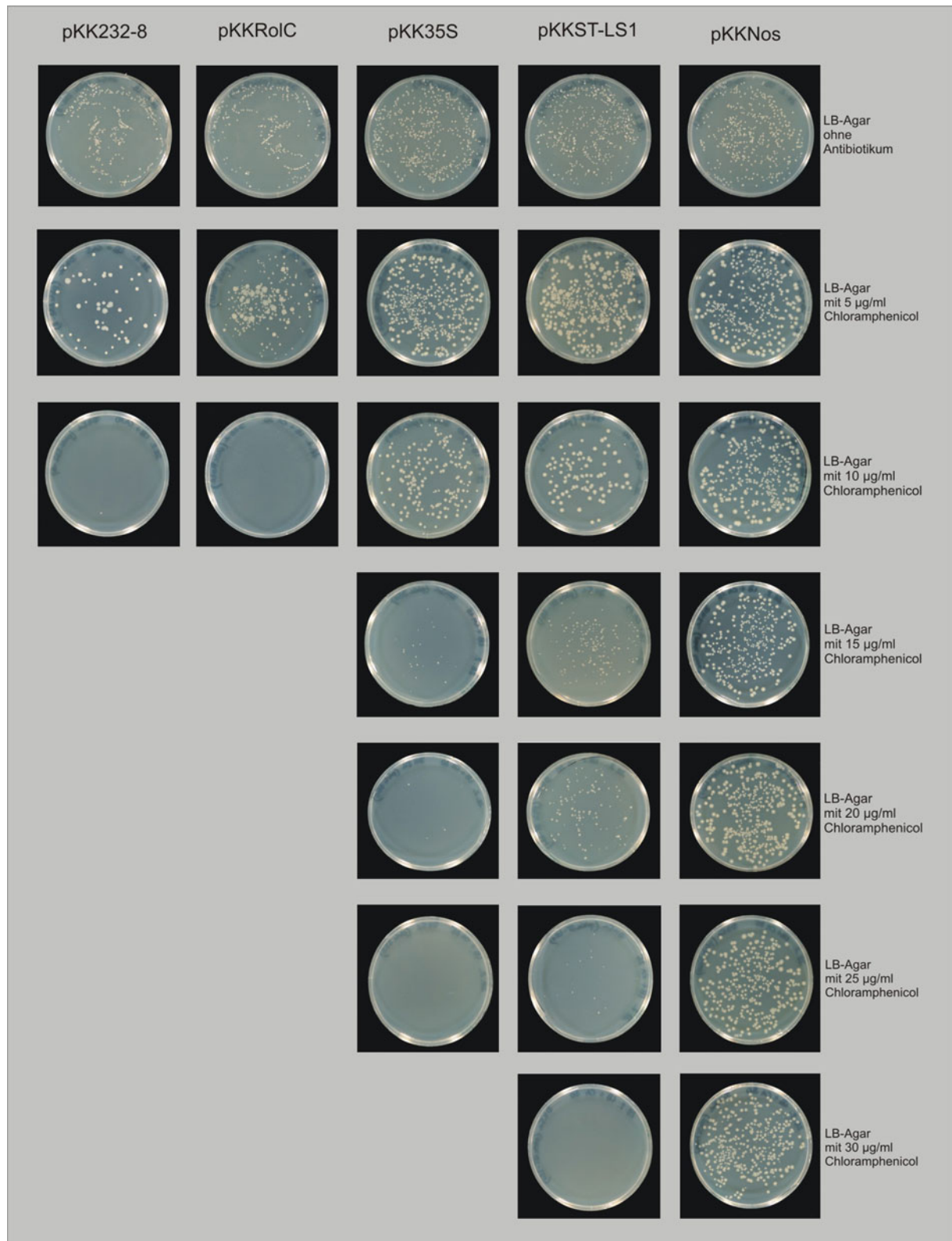
Somit konnte für alle untersuchten Konstrukte die Genexpression ausgehend von den jeweiligen pflanzenspezifischen Promotoren bestätigt werden. Die analysierten Transkriptlängen weisen, mit der Ausnahme des kürzesten Transkripts, darauf hin, dass die Transkriptionsinitiation durch die bakterielle RNA-Polymerase von den pflanzenspezifischen Promotoren ausging.

Eine Erklärung für die ca. 2250 nt großen Transkripte konnte durch Sequenzierung der 5'-RACE-Produkte gefunden werden (siehe Kap. 3.1.4).

### **3.1.3.4 Nachweis der phänotypischen Ausprägung eines Antibiotikumresistenzgens durch Aktivität pflanzenspezifischer Promotoren in Bakterien**

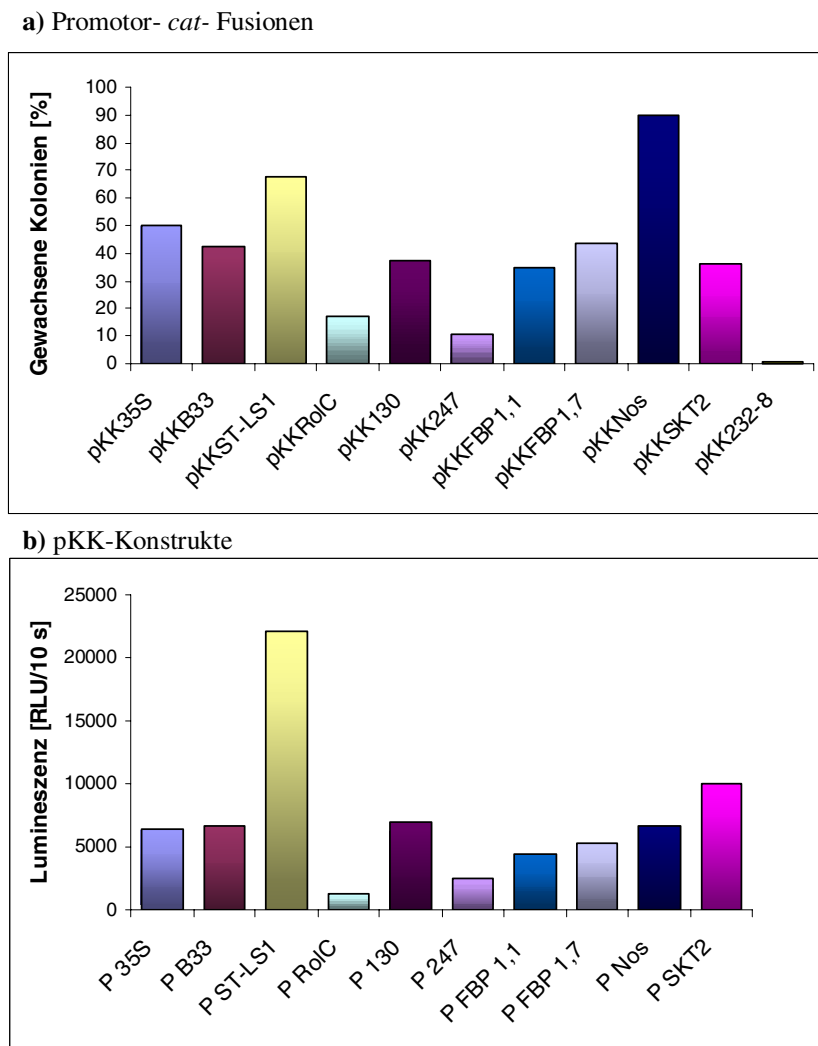
Der Vektor pKK232-8 besitzt für Promotorstudien ein promotorloses *cat*-Gen, welches den Nachweis der Genexpression der *E. coli* K-12 DH5 $\alpha$  Stämme mit den Promotor-*cat*-Fusionen durch Wachstum auf Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chloramphenicol (CA) erlaubt. Der Nachweis der Expression erfolgte für die Promotor-*cat*-Fusionen pKK35S, pKKB33, pKKST-LS1, pKKRoIC, pKK130, pKK247, pKKFBP1,1, pKKFBP1,7, pKKSKT2 und pKKNos auf LB-Agarplatten mit 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 15  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml und 30  $\mu$ g/ml CA. Als Negativ-Kontrolle wurde der pKK232-8 mitgeführt (Abb. 25).

P Nos exprimiert das *cat*-Gen so stark, dass die Fusion in *E. coli* bis zu einer Konzentration von 30  $\mu$ g/ml CA zu einem gleichmäßigen Wachstum von über 95 % gegenüber der Kontrollplatte ohne Antibiotikum führte. Hingegen zeigten die Stämme mit der Negativ-Kontrolle pKK232-8, sowie mit den Fusionen pKKRoIC, pKK247 und pKKFBP1,1 bei 10  $\mu$ g/ml CA kein Wachstum mehr auf den Agarplatten. *E. coli* mit den Fusionen pKKB33, pKK130, pKKFBP1,7 und pKKSKT2 wuchs nicht mehr auf Agarplatten mit 15  $\mu$ g/ml CA. Der Stamm mit der Fusion pKK35S zeigte auf 20  $\mu$ g/ml CA nur noch ein sehr schwaches Wachstum, wohingegen *E. coli* mit pKKST-LS1 auf 25  $\mu$ g/ml CA noch Wachstum zeigte.



**Abb. 25:** Vergleichendes Wachstum ausgewählter Promotor-*cat*-Fusionen und pKK232-8 als Negativ-Kontrolle in *E. coli* auf LB-Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen von CA.

In Abb. 26 ist der Vergleich des prozentualen Wachstums der *E. coli*-Stämme mit den Fusionen auf Agarplatten mit 5 µg/ml CA gegenüber den Lumineszenzwerten der pKK-Konstrukte in *E. coli* dargestellt. Die Expressionsniveaus der *cat*- bzw. *luxAB*-Gene transkribiert von dem jeweiligen untersuchten Promotor ähnelten sich sehr, mit der Ausnahme des Nos-Promotors. Dessen Expression des *cat*-Gens war stärker als die Expression ausgehend von dem ST-LS1-Promotor, welcher wiederum die *luxAB*-Gene am stärksten exprimierte.



**Abb. 26:** Vergleich der Genexpression der *E. coli*-Stämme mit den Promotor-*cat*-Fusionen als Wachstum auf LB-Agarplatten mit 5 µg/ml CA gegenüber den Lumineszenzwerten der pKK-Konstrukte.

Für die diskrepanten Ergebnisse des P Nos in bezug auf die Expression der *luxAB*- und *cat*-Gene konnte keine Erklärung gefunden werden. Der Klon wurde durch Restriktionsverdaus mit *DraI*, *PvuII* und *EcoRI* überprüft. Weiterhin wurde durch Sequenzierung geprüft, ob der stromaufwärts der MCS liegende Transkriptionsstop (T<sub>1</sub>, siehe Kap. 6.1.5, Abb. 47) aus der

Fusion pKKNos verloren gegangen ist. Die DNA-Sequenz des Promotors, sowie deren Übergänge zum *cat*-Gen wurden durch Sequenzierung ebenfalls nochmals überprüft. Der einzige Unterschied zwischen den Konstrukten mit den der *luxAB*-Genen und dem *cat*-Gen ist die 5'-UTR des jeweiligen Reportergens. Sie beträgt bei den *luxAB*-Genen ca. 140 bp und bei dem *cat*-Gen nur ca. 80 bp.

Eine Möglichkeit wäre, dass das mRNA-Transkript der *luxAB*-Gene damit instabiler wäre und schneller degradiert wurde. Die anderen *cat*-Fusionen, die ähnliche Expressionen zeigten wie die *luxAB*-Fusionen, haben jedoch die gleiche 5'-UTR des *cat*-Reportergens wie die Fusion pKKNos.

Schlussfolgernd ist festzuhalten, dass bei einer typischen Selektionskonzentration von 25 µg/ml Chloramphenicol zwei Promotor-*cat*-Fusionen, pKKST-LS1 und pKKNos in der Lage waren, Wachstum zu vermitteln. Mit einer Ausnahme (pKKNos) wurden die gemessenen Lumineszenzwerte der *E. coli* Stämme mit den pKK-Konstrukten durch den Wachstumsnachweis der Stämme mit den Promotor-*cat*-Fusionen auf Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5 µg/ml bis 30 µg/ml CA bestätigt.

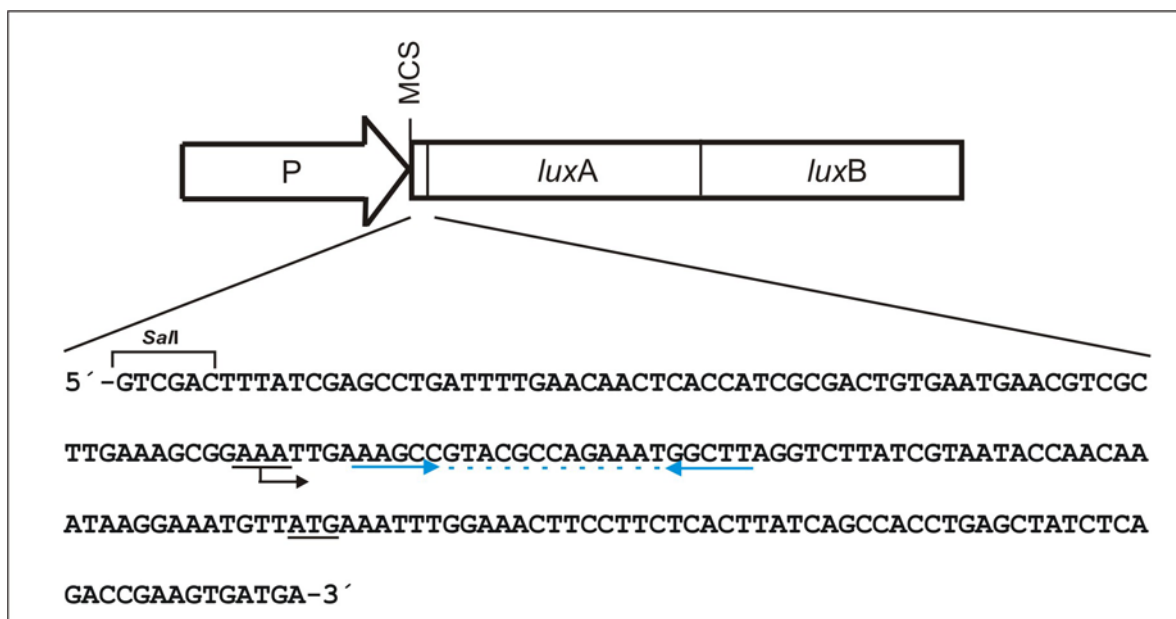
### 3.1.4 Transkriptionsstartbestimmung ausgewählter Promotoren mittels 5'-RACE

Zur Bestimmung der Transkriptionsstarts der pflanzenspezifischen Promotoren P ST-LS1, P 35S, P KST1 und P Nos mittels 5'-RACE wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die 5'-RACE-Produkte wurden zur Kartierung des Transkriptionsstarts entweder direkt sequenziert oder nach Klonierung sequenziert.

In dem *luxAB*-Klonierungsfragment wurde ein mehrere Nukleotide umfassender Bereich vor dem Translationsstart des *luxA*-Gens festgestellt an dem mRNA-Transkripte starteten (Abb. 27). Diese mRNA-Starts wurden in den RACE-Produkten aller untersuchten Promotoren gefunden und bestätigten somit das Ergebnis der Northern Hybridisierung (Kap. 3.1.3.3).

Eine Ursache für das gehäufte Auftreten der mRNA-Starts könnte die Degradierung der mRNA sein. Die Endoribonuklease E (RNase E) ist das Schlüsselenzym für die Initiation der mRNA-Degradierung in Bakterien. Das Enzym setzt den ersten Schnitt bevorzugt stromaufwärts eines `stem-loop´ geschützten 3'- oder 5'-Endes der mRNA. Danach kann die Degradierung durch 3'→5' Exonukleasen des Degradosoms erfolgen. Für *E. coli* wurde als Schnittstelle der RNase E eine wenig konservierte Einzelstrang Konsensus Sequenz mit (A/G)AUU(A/U) beschrieben (Rauhut und Klug, 1999). Die RACE-Produkte zeigten gehäuft den mRNA-Start an den in der Abb. 27 eingezeichneten drei Adenin-Basen. Zwei dieser

Adenin-Basen mit den stromabwärts liegenden zwei Thymin-Basen (AATT) bilden in der mRNA die Sequenz AAUU, welche als mögliche Schnittstelle für die RNase E fungieren könnte. Drei Nukleotide stromabwärts der Sequenz AATT ist mit AAGCC eine Sequenz zu finden, welche mit der Sequenz GGCTT als 'inverted repeat' einen möglichen 'stem-loop' ausbilden könnte (Abb. 27). Somit handelte es sich bei den analysierten Transkripten innerhalb des *luxAB*-Klonierungsfragmentes wahrscheinlich um mRNA-Degradierungsprodukte, welche ebenfalls die zusätzlichen Hybridisierungsbanden im Northern Blot erklären würden (siehe Abb. 23, Kap. 3.1.3.3).

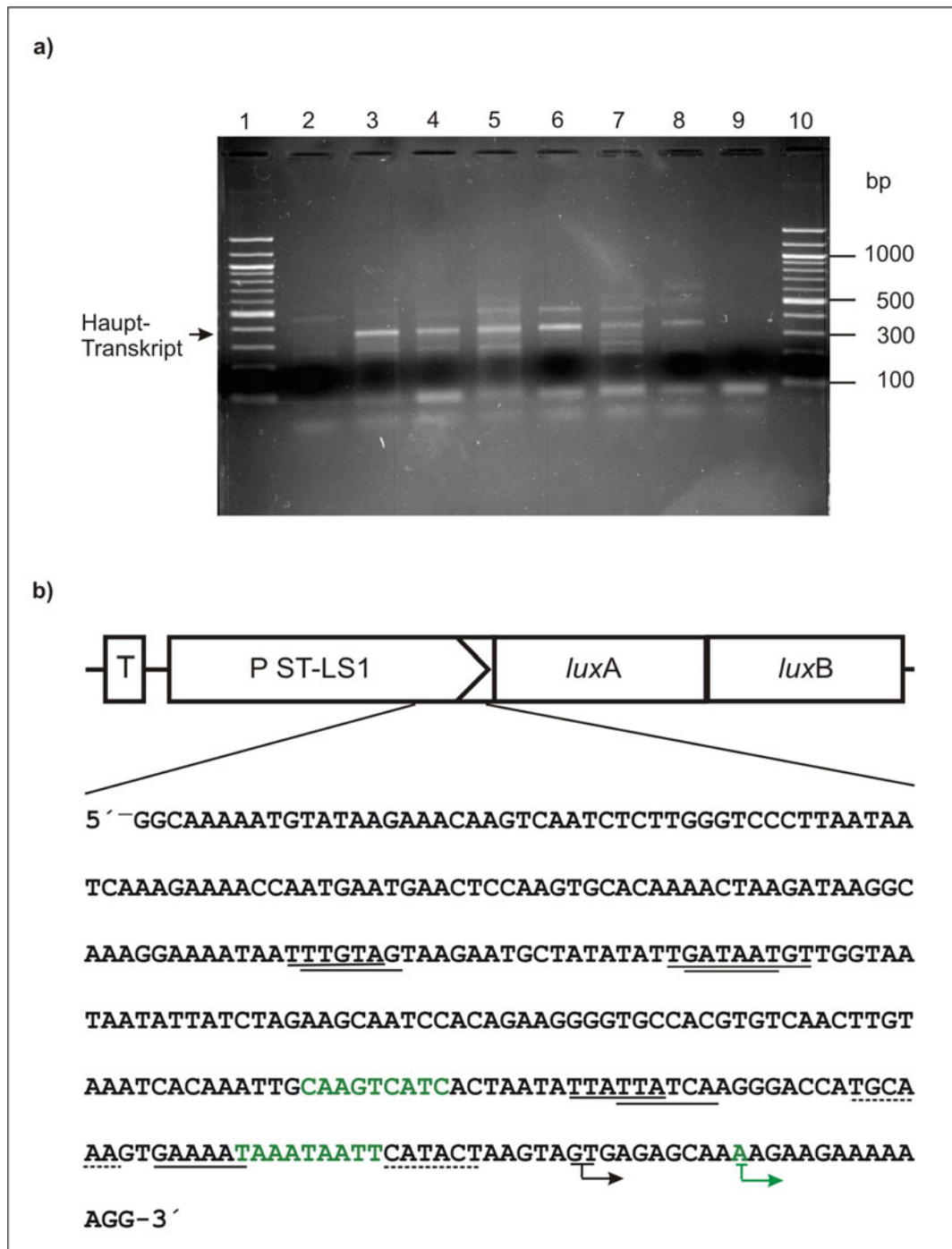


**Abb. 27:** Schematische Darstellung der rekombinanten DNA der Plasmide mit 200 nt der 5'-upstream Region des *luxAB*-Fragmentes. Der schwarze Pfeil zeigt die möglichen Schnittstellen der RNase E in der mRNA. Die blauen Pfeile markieren einen 'inverted repeat', welcher in der mRNA einen 'stem-loop' ausbilden könnte. Das Startcodon für den Translationsstart des *luxA*-Gens wurde unterstrichen.

#### 3.1.4.1 Bestimmung des Transkriptionsstarts des ST-LS1-Promotors

Der Transkriptionsstart des P ST-LS1 wurde in *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. untersucht. Es wurde in allen untersuchten Bakterienarten ein prominentes Transkript (Abb. 28) gleicher Größe nachgewiesen. Die Größe des Transkripts lag bei 370 nt. Die elektrophoretische Auftrennung der RACE-Produkte im Agarosegel zeigte eine unterschiedliche Intensität des Transkripts in den untersuchten Bakterienarten. Für *P. putida* und *A. tumefaciens* konnte nur eine schwache Bande des Transkripts nachgewiesen werden.





**Abb. 28:** Ergebnisse der 5'-RACE des P ST-LS1. **a** 1,5 %iges Agarosegel mit einer Auftragsmenge von 10  $\mu$ l des PCR-Ansatzes der 5'-RACE. Spur 1 und 10 = 100 bp ladder, Spur 2 = *E. coli* (pKKlux), Spur 3 = *E. coli* (pKKST-LS1lux), Spur 4 = *E. coli* (pST-LS1lux), Spur 5 = *Y. enterocolitica* (pST-LS1lux), Spur 6 = *Acinetobacter* sp. (pST-LS1lux), Spur 7 = *P. putida* (pST-LS1lux), Spur 8 = *A. tumefaciens* (pST-LS1lux), Spur 9 = H<sub>2</sub>O-Kontrolle. **b** Schematische Darstellung der rekombinanten DNA des pKKST-LS1lux mit 300 nt der Sequenz des 3'-Endes des P ST-LS1. Unterstrichen dargestellt sind die potentiellen per Computer-gestützte Analyse ermittelten -35- und -10-Konsensus Sequenzen. CAAT- und TATA-Box, sowie der Transkriptionsstart (mit Pfeil) in Pflanzen sind in grüner Schrift dargestellt. Der Transkriptionsstart innerhalb der untersuchten Bakterienarten wurde durch einen schwarzen Pfeil markiert und die auf den prokaryontischen Transkriptionsstart bezogenen potentiellen -35- und -10-Regionen sind unterbrochen gestrichelt dargestellt.



Durch Direktsequenzierung der 5'-RACE-Produkte konnte der Transkriptionsstart in den getesteten Bakterienarten zwölf bzw. 13 nt stromabwärts der eukaryontischen TATA-Box kartiert werden (Abb. 28). Bei der Sequenzierung der DNA nach Klonierung wurde neben dem analysierten Transkriptionsstart, vor allem bei den RACE-Produkten aus *P. putida* und *A. tumefaciens*, eine Verschiebung des Starts auf 14 bzw. 15 nt stromabwärts der eukaryontischen TATA-Box ermittelt.

Weiterhin wurde eine Analyse der 5'-RACE-Produkte der Promotor-*cat*-Fusion pKKST-LS1 und des Subklons pKKST-LS1.3lux in *E. coli* durchgeführt. Die Direktsequenzierung des *cat*-Transkripts als auch des *lux*-Transkripts des am 5'-Ende verkürzten P ST-LS1 in *E. coli* bestätigen den Transkriptionsstart zwölf bzw. 13 nt stromabwärts der eukaryontischen TATA-Box.

Durch die Analyse des Transkriptionsstarts konnte auf eine potentielle -10- und -35-Konsensus Sequenz als Erkennungssequenz für die bakterielle RNAP zur Transkriptionsinitiation geschlossen werden. Die potentielle -10-Region mit der Sequenz CATACT liegt direkt stromabwärts der eukaryontischen TATA-Box an Position -6/-7 bis -11/-12 bezogen auf den bakteriellen Transkriptionsstart. Die Sequenz CATACT zeigt in vier der sechs Basen Homologie zur -10-Konsensus Sequenz TATAAT (Hawley und McClure, 1983; Harley und Reynolds, 1987; Lissner und Margalit, 1993). Weiterhin wurde das Hexamer TGCAA als potentielle -35-Sequenz an Position -28/-29 bis -33/-34 identifiziert. Die Transkriptionsinitiation erfolgte somit nicht an den durch die Computeranalyse identifizierten potentiellen -10- und -35-Konsensus Sequenzen.

Weitere Transkriptionsstarts konnten durch Sequenzierung dieser 5'-RACE-Produkte nicht ermittelt werden.

Die Transkriptionsstarts der Subklone des P ST-LS1 mit den Promotoren P ST-LS1.1 und P ST-LS1.2 wurden ebenfalls näher charakterisiert.

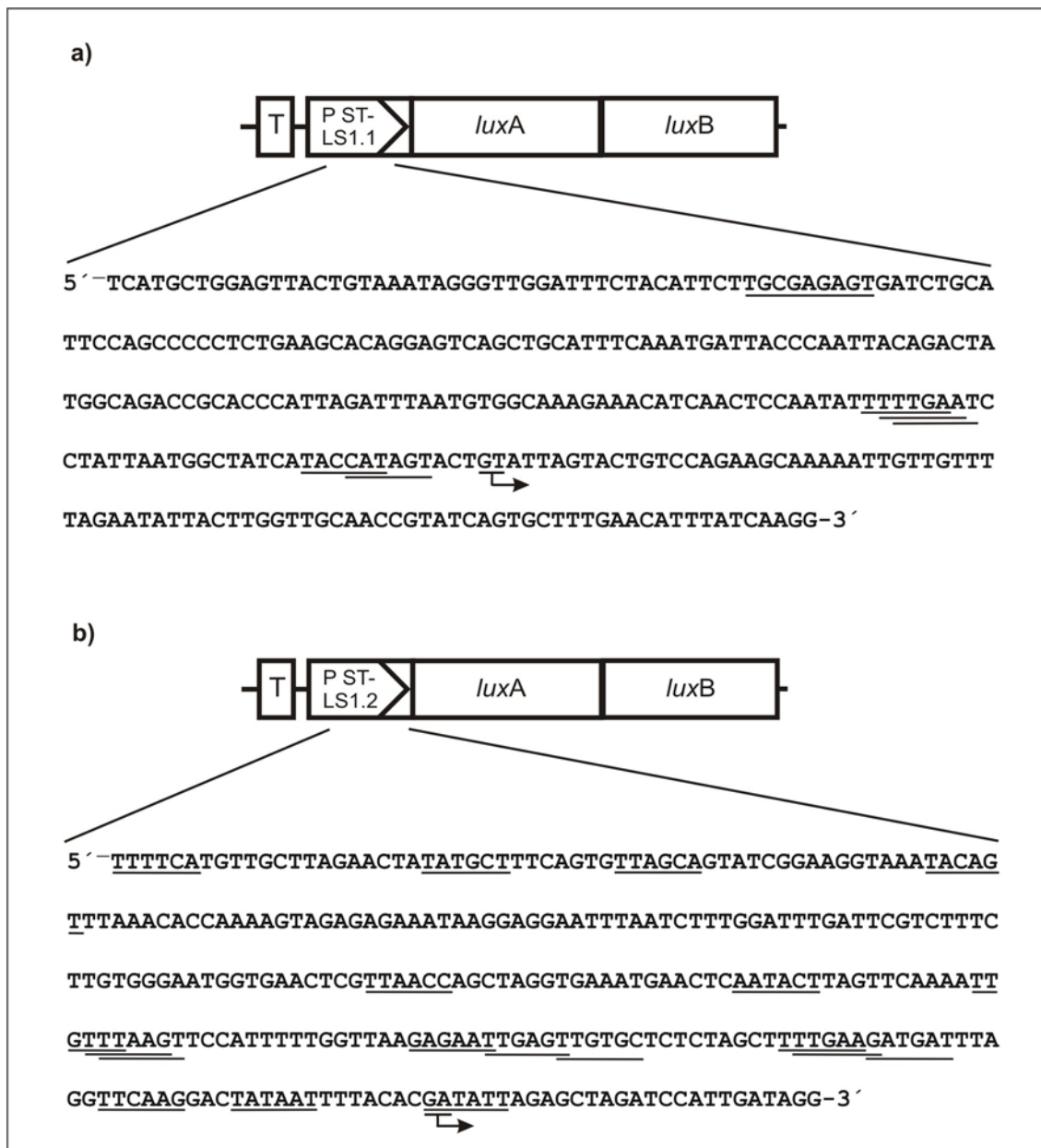
Durch Direktsequenzierung der 5'-RACE-Produkte der Subklone pKKST-LS1.1lux und pKKST-LS1.2lux wurden die in Abb. 29 dargestellten Transkriptionsstarts bestimmt. Diesen Transkriptionsstarts konnten durch die Computer-gestützte Analyse potentielle -35- und -10-Konsensus Sequenzen zugewiesen werden.

Der Transkriptionsstart des P ST-LS1.1 liegt vier bzw. fünf oder sieben bzw. acht nt stromabwärts potentieller -10-Konsensus Sequenzen.

Für den P ST-LS1.2 liegt der Transkriptionsstart acht bzw. neun nt stromabwärts der potentiellen -10-Konsensus Sequenz mit dem Hexamer TATAAT, welche der -10-Konsensus

Sequenz in *E. coli* entspricht. Ein weiterer Start an den umliegenden potentiellen Konsensus Sequenzen konnte mittels 5'-RACE nicht gefunden werden.

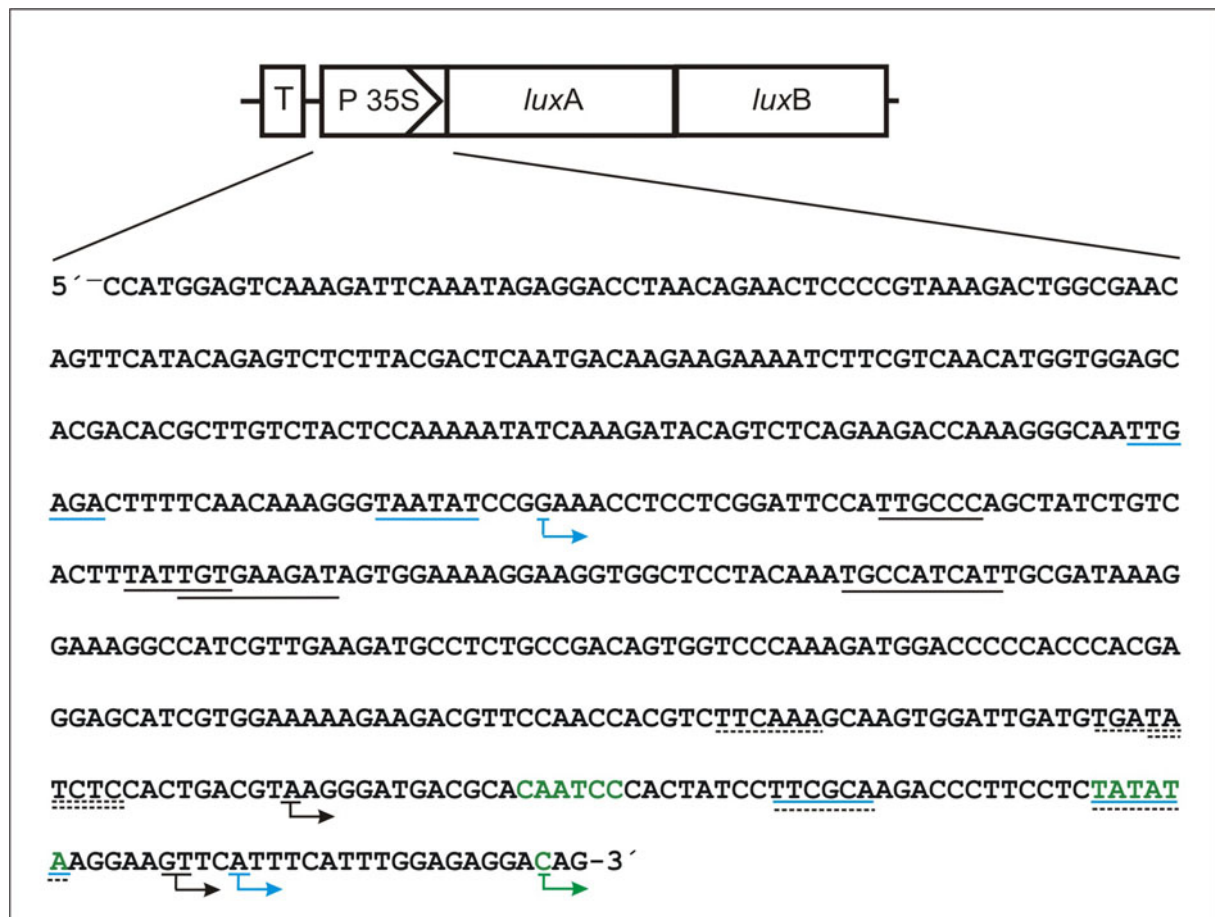
Die Transkriptionsstarts der Subklone des P ST-LS1 konnten mittels 5'-RACE nicht in dem Gesamtfragment P ST-LS1 nachgewiesen werden.



**Abb. 29:** Schematische Darstellungen der rekombinanten DNA des **a** pKKST-LS1.1lux und **b** pKKST-LS1.2lux mit 300 nt der Sequenzen des 3'-Endes des jeweiligen Promotorfragmentes. Unterstrichen dargestellt sind potentielle -35- und -10-Konsensus Sequenzen. Die mittels 5'-RACE analysierten Transkriptionsstarts in *E. coli* sind durch Pfeile dargestellt.

### 3.1.4.2 Bestimmung des Transkriptionsstarts des CaMV 35S-Promotors

Bei der Transkriptionsstartbestimmung des P 35S mittels 5'-RACE in *E. coli* konnten zwei Starts festgestellt werden. Ein Transkriptionsstart wurde sechs bzw. sieben nt stromabwärts der eukaryontischen TATA-Box und ein weiterer Transkriptionsstart wurde 13 nt stromaufwärts der CAAT-Box kartiert (Abb. 30).



**Abb. 30:** Schematische Darstellung der rekombinanten DNA des pKK35Slux mit der vollständigen Sequenz des P 35S. Schwarz unterstrichen dargestellt sind potentielle mittels Computer-gestützter Suche gefundene -35- und -10-Konsensus Sequenzen. CAAT- und TATA-Box, sowie der Transkriptionsstart (mit Pfeil) in Pflanzen sind in grüner Schrift dargestellt. Die Transkriptionsstarts in *E. coli* kartiert mittels 5'-RACE sind durch schwarze Pfeile dargestellt. Potentielle -35- und -10-Regionen, welche für die Transkriptionsinitiationen in *E. coli* verantwortlich sein könnten, wurden schwarz gestrichelt. Die von Assaad und Signer (1990) analysierten -35- und -10-Konsensus Sequenzen mit deren Transkriptionsstarts zweier identifizierter Transkripte sind blau unterstrichen bzw. als blaue Pfeile dargestellt.

Nach Assaad und Signer (1990) liegt in *E. coli* der Transkriptionsstart des kürzeren, schwächeren Transkripts zehn nt stromabwärts der TATA-Box. In bezug auf den Abstand zur von Assaad und Signer (1990) beschriebenen möglichen -10-Region als Erkennungssequenz für die bakterielle RNAP, sind beide beschriebenen Transkriptionsstarts möglich, und das Auffinden unterschiedlicher Starts leitet sich möglicherweise von der Verwendung

unterschiedlicher Methodiken ab. Die Transkriptionsstartbestimmungen bei Assaad und Signer (1990) erfolgten mit dem 'RNase-Protection Assay'.

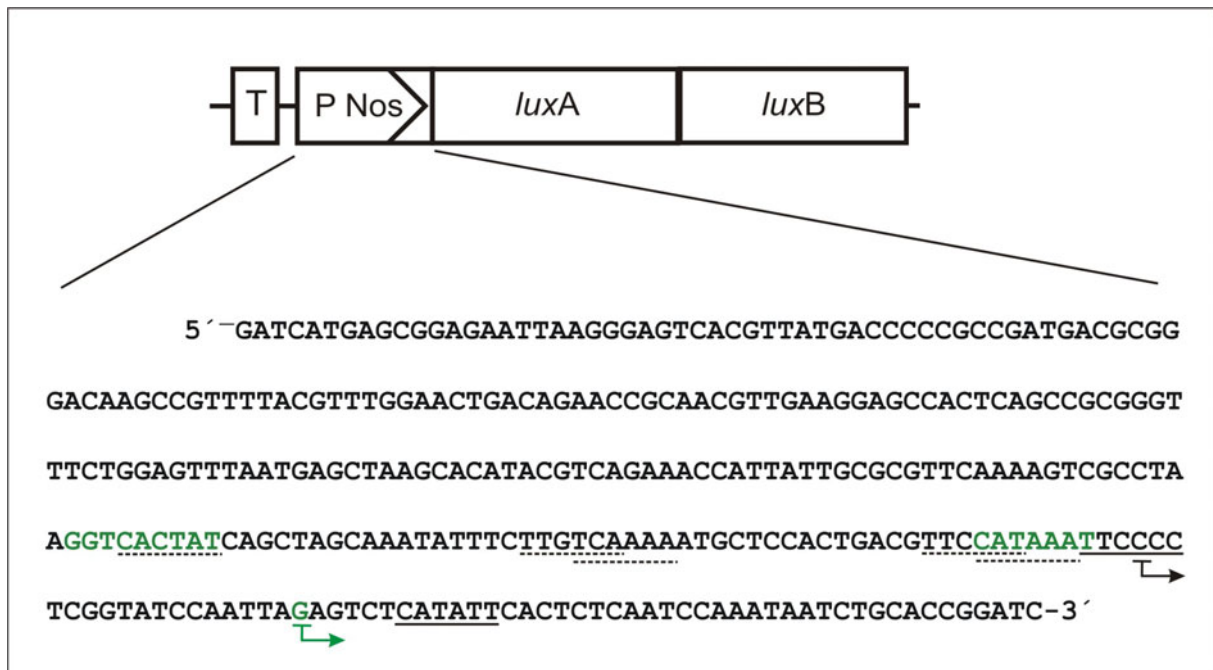
Ein weiterer Transkriptionsstart wurde 13 nt stromaufwärts der CAAT-Box kartiert. Dieser Transkriptionsstart wurde nur einmal als PCR-Produkt und nach Klonierung sequenziert. Durch die Computer-gestützte Suche nach prokaryontischen Promotor Konsensus-Sequenzen konnten diesem Start keine -35- und -10-Konsensus Sequenzen zugeordnet werden. Eine potentielle -10-Region oder auch 'extended -10-Region' wurde neun nt stromaufwärts des Transkriptionsstarts mit der Sequenz (TGA)TATCTC gefunden. 18 nt stromaufwärts dieser -10-Region befindet sich mit TTCAA eine potentielle -35-Region.

Ein weiterer Start, wie von Assaad und Signer (1990) beschrieben an Position -315 bezogen auf den pflanzlichen Transkriptionsstart, konnte mit der 5'-RACE nicht festgestellt werden.

Den mit Computer-gestützter Suche nach prokaryontischen Promotor Konsensus Sequenzen identifizierten zwei 'extended-10-Regionen' und der Kombination aus -35- und -10-Region konnten mittels 5'-RACE keine Transkriptionsstarts zugeordnet werden.

### 3.1.4.3 Bestimmung des Transkriptionsstarts des Nos-Promotors

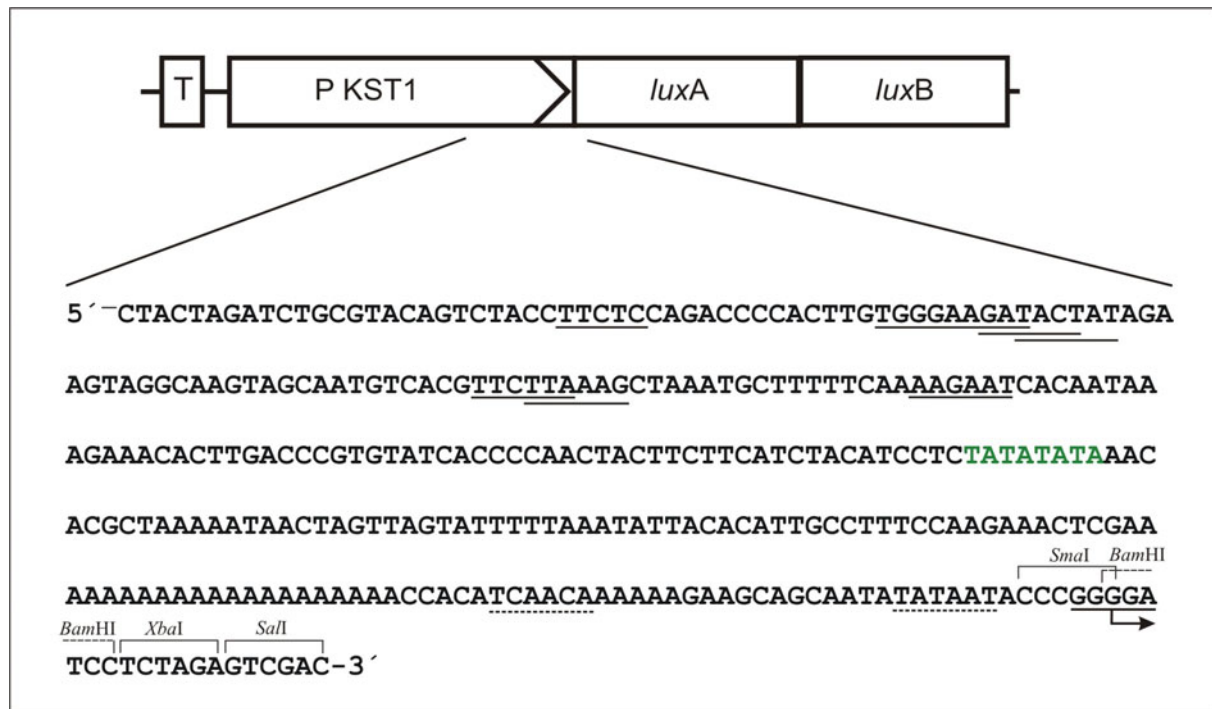
Der Transkriptionsstart des P Nos wurde mittels 5'-RACE für das pKK-Konstrukt pKKNoslux und für die Promotor-*cat*-Fusion pKKNos in *E. coli* untersucht. Sowohl die *lux*- als auch die *cat*-Fusion wiesen trotz der unterschiedlichen Expressionsniveaus ausgehend von P Nos den gleichen Transkriptionsstart drei Nukleotide stromabwärts der eukaryontischen TATA-Box auf (Abb. 31). Die durch Computer-gestützte Suche gefundene potentielle bakterielle Konsensus Sequenz wurde nicht zur Transkriptionsinitiation in *E. coli* genutzt. Hingegen ist es möglich, dass die eukaryontische TATA-Box als solche genutzt wurde. Es wurden zwei auf den Transkriptionsstart in *E. coli* bezogene potentielle -35- und -10-Regionen gefunden. Die Sequenz CATAAA als mögliche -10-Region liegt nur drei nt stromaufwärts des Transkriptionsstarts kartiert in *E. coli* und somit wäre der Abstand sehr gering. Eine zugehörige -35-Region ist mit der Sequenz TCAAAA 17 nt stromaufwärts von der -10-Region zu finden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kombination der Sequenzen TTGTCA und 17 nt stromabwärts TTCCAT als potentielle -35- bzw. -10-Regionen. Hierbei liegen zwischen der -10-Region und dem kartierten Transkriptionsstart sechs Nukleotide.



**Abb. 31:** Schematische Darstellung der rekombinanten DNA des pKKNoslux mit der vollständigen Sequenz des P Nos. Unterstrichen dargestellt sind potentielle mittels Computer-gestützter Suche gefundene -35- und -10-Konsensus Sequenzen. CAAT- und TATA-Box, sowie der Transkriptionsstart (mit Pfeil) in Pflanzen sind in grüner Schrift dargestellt. Der Transkriptionsstart in *E. coli* kartiert mittels 5'-RACE ist durch einen schwarzen Pfeil und die dazugehörigen potentiellen -35- und -10-Regionen schwarz gestrichelt dargestellt.

#### 3.1.4.4 Bestimmung des Transkriptionsstarts des KST1-Promotors

Für den KST1-Promotor konnte durch direkte Sequenzierung der 5'-RACE-Produkte und durch Sequenzierung der klonierten 5'-RACE-Produkte nur ein Transkriptionsstart in *E. coli* festgestellt werden (Abb. 32). Dieser liegt innerhalb der Sequenz der Restriktionsschnittstellen für *Sma*I und *Bam*HI zwischen der Promotorsequenz und der Sequenz des *luxAB*-Fragmentes und erstreckt sich über die fünf Nukleotide GGGGA. Aus methodischen Gründen, dem Anhängen eines C-Schwanzes an das 3'-Ende der cDNA als Erkennungssequenz für den Ankerprimer, lässt sich der Transkriptionsstart nicht genauer eingrenzen. Direkt stromaufwärts des Transkriptionsstarts liegt eine AT-reiche Region u. a. mit der Sequenz TATAAT als potentielle -10-Region als Erkennungssequenz für die bakterielle RNAP. 17 nt stromaufwärts wäre mit TCAACA eine mögliche -35-Region zu finden. Die Computeranalyse zeigte hier jedoch keine Homologien zu den Suchkriterien. Jedoch konnten weiter stromaufwärts Treffer mit den -35- und -10-Konsensus Sequenzen, sowie der 'extended -10-Region' gefunden werden.



**Abb. 32:** Schematische Darstellung der rekombinanten DNA des pKKKST1lux mit 300 nt der Sequenz des 3'-Endes des P KST1. Unterstrichen dargestellt sind mittels Computer-gestützter Suche identifizierte potentielle -35- und -10-Konsensus Sequenzen. Die mögliche TATA-Box für die Transkriptionsinitiation in Pflanzen ist in grüner Schrift dargestellt. Der Transkriptionsstart in *E. coli* wurde durch einen Pfeil dargestellt und die dazugehörigen möglichen -35- und -10-Regionen wurden schwarz gestrichelt.

### 3.1.5 Mutagenese des ST-LS1-Promotors

Nach der Bestimmung der Transkriptionsstarts des P ST-LS1 in den untersuchten Bakterienarten konnte mittels Computer-gestützter Suche keine der analysierten potentiellen -35- und -10- Regionen aufgrund des Abstandes dem Transkriptionsstart zugewiesen werden (siehe Kap. 3.1.4.1). Durch Mutagenese möglicher Regionen des Promotors, welche als Erkennung für die RNA-Polymerase zur Transkriptionsinitiation in Frage kamen, sollte die -10-Region identifiziert werden.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die pflanzliche TATA-Box des P ST-LS1 mutagenisiert (Steinborn, 2000). Sie weist eine hohe Ähnlichkeit zur bakteriellen Konsensus Sequenz auf und wurde als potentielle -10-Region für die Promotorerkennung durch die bakterielle RNA-Polymerase angenommen. Ortsspezifische Mutagenesen dieser Region erzielten jedoch nur geringfügige Veränderungen in der Stärke der exprimierten Gene gegenüber der Originalsequenz. Eine weitere potentielle -10-Region wurde in Abb. 33 als unterstrichene Sequenz innerhalb der Originalsequenz des P ST-LS1 dargestellt. Sie liegt zwölf bzw. 13 nt stromabwärts von der pflanzlichen TATA-Box. Dieses Hexamer besitzt mit



a

Konsensus Sequenzen der -35- und -10-Regionen in *E. coli*

b

## Originalsequenz des ST-LS1-Promotors



## Entstandene Sequenzen nach Basenaustauschen



**Abb. 33: a** Schematische Darstellung der -35- und -10-Konsensus Sequenzen in *E. coli*. Der optimale Abstand der beiden Hexamere voneinander liegt bei 16 bis 18 nt. Der optimale Abstand der -10-Region zum Transkriptionsstart liegt bei 5 bis 9 nt. Der Transkriptionsstart wird häufig von einer Purinbase (Adenin oder Guanin) gebildet (Hawley und McClure, 1983; Harley und Reynolds, 1987; Lissner und Margalit, 1993).

**b** Darstellung von 80 Basen der 5' upstream-Region des ST-LS1-Promotors als Originalsequenz und mit ortsspezifischen Basenaustauschen (rot). CAAT- und TATA-Box, welche für die Transkriptionsinitiation in Pflanzen notwendig sind, sowie der Transkriptionsstart (Pfeil) in Pflanzen sind grün dargestellt. Die potentielle -10- und -35-Region zur Transkriptionsinitiation, sowie der Transkriptionsstart (Pfeil) in Bakterien wurden in der Originalsequenz unterstrichen. Die Mutanten des P ST-LS1 H, J und K sind 'down-Mutanten', welche zur Verminderung der Genexpression führen sollten. Die Mutanten L und N sollten als 'up-Mutanten' die Genexpressionsstärke des zu exprimierenden Gens erhöhen. Die Sequenzen der -10-Region der Mutante L und der 'extended -10-Region' der Mutante N entsprechen den Konsensus Sequenzen in *E. coli*. Die Mutanten D und M dienen als Template-DNA bei der Megaprimer-PCR zur Herstellung der Mutante N.

fünf bzw. sechs nt einen optimalen Abstand zum Transkriptionsstart in *E. coli* und weist außerdem die beiden am stärksten konservierten Basen der Konsensus Sequenz (P ST-LS1: CATACT; Konsensus Sequenz: TATAAT) in *E. coli* auf (Hawley und McClure, 1983; Harley und Reynolds, 1987). Die Darstellung in Abb. 33 zeigt die durch die ortsspezifische Mutagenese eingebrachten Basenaustausche gegenüber der Originalsequenz.

### 3.1.5.1 Ortsspezifische Mutagenese des ST-LS1-Promotors

Die ortsspezifischen Basenaustausche wurden mit der Methode der Megaprimer-PCR (Barik, 1996) in die Promotorsequenz des P ST-LS1 eingeführt.

Insgesamt wurden fünf P ST-LS1-Derivate mit Substitutionen (P ST-LS1H, P ST-LS1J, P ST-LS1K, P ST-LS1L und P ST-LS1N) und der P ST-LS1 mit der Originalsequenz hergestellt (Abb. 33). In der ersten PCR-Runde wurden die Megaprimer mittels der Mismatch-Primer (Kap. 2.6.7.3) bzw. dem Primer der Originalsequenz ST-LS1/1530/OM, dem Primer pBin19 6847 (Kap. 2.5.5; Tab. 13) und dem Derivat pBin-L700 als Template-DNA amplifiziert. Die Größe der Megaprimer lag bei 320 bp. Eine Ausnahme bildete jedoch die Herstellung der Mutante N des P ST-LS1. Hierbei wurde erst der Megaprimer der Mutante M mittels PCR mit dem Mismatch-Primer 1530-D-TATAAT, dem Primer luxA/AS2 und der Mutante P ST-LS1D des Plasmids pST-LS1Dlux als Template-DNA hergestellt. Diese Mutante ist in der eingangs beschriebenen ersten Versuchsreihe der Mutagenese der TATA-Box des P ST-LS1 entstanden (Steinborn, 2000). Das hieraus resultierende Megaprimer-Amplifikat hatte eine Größe von 220 bp.

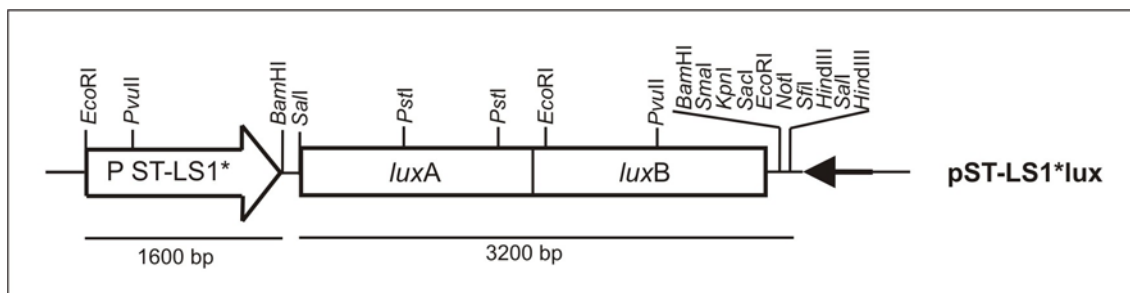
Das Vorhandensein der gewünschten Basenaustausche wurde durch Sequenzierung überprüft. In einer zweiten PCR-Runde wurden die Megaprimer in Kombination mit dem Primer pBin19 6746 und pBin-L700 als Template-DNA zur Amplifikation der mutagenisierten Promotoren eingesetzt. Die Amplifikate wurden mit *EcoRI* und *SalI* doppelt verdaut und mit dem *EcoRI/SalI* verdauten Vektor pBin19 ligiert und in DH5 $\alpha$  transformiert. Die Insertionen der Promotor-DNA wurde durch Restriktion und die vorhandenen Basenaustausche durch Sequenzierung mit dem Primer ST-LS1305 überprüft (Abb. 34). Mit der Mutante P ST-LS1M als Template-DNA wurde mittels PCR, den Primern 1530-TGNTAT und pBin19 6847 der Megaprimer hergestellt, welcher für die Amplifikation der Mutante N in einer zweiten PCR-Runde eingesetzt wurde. Die weitere Klonierung des Promotors P ST-LS1N in pBin19 und weitere Vorgehensweise erfolgte wie für die anderen Derivate beschrieben.



	10	20	30
<i>P<sub>ST-LS1</sub></i>	T A A A T A A T T C A T A C T A A G T A G T G A G A G C A A		
<i>P<sub>ST-LS1-PCR</sub></i>	T A A A T A A T T C A T A C T A A G T A G T G A G A G C A A		
<i>P<sub>ST-LS1H</sub></i>	T A A A T A A T T C G T A C G A A G T A G T G A G A G C A A		
<i>P<sub>ST-LS1J</sub></i>	T A A A T A A T T C C T A C C A A G T A G T G A G A G C A A		
<i>P<sub>ST-LS1K</sub></i>	T A A A T A A T T C A C G C T A A G T A G T G A G A G C A A		
<i>P<sub>ST-LS1L</sub></i>	T A A A T A A T T T A T A A T A A G T A G T G A G A G C A A		
<i>P<sub>ST-LS1N</sub></i>	T A A A T A T G T T A T A A T A A G T A G T G A G A G C A A		

**Abb. 34:** Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Alignments der Sequenzierung des *P<sub>ST-LS1</sub>* gegenüber dem mit PCR hergestellten, unmutierten Promotor *P<sub>ST-LS1-PCR</sub>* und den Mutanten H, J, K, L und N.

Die DNA der Promotor-Derivate wurde mit *SalI* restringiert, mit dem *SalI* restringierten *luxAB*-Fragment ligiert und in *DH5 $\alpha$*  transformiert. Die richtige Orientierung der *luxAB*-Gene wurde durch *Bam*HI-Restriktion überprüft. Abb. 35 zeigt die schematische Darstellung der MCS der pBin-Konstrukte mit den mutierten bzw. den nicht-mutierten Promotoren sowie der Originalsequenz von *P<sub>ST-LS1</sub>* nach Klonierung der PCR-Fragmente und der *luxAB*-Gene.

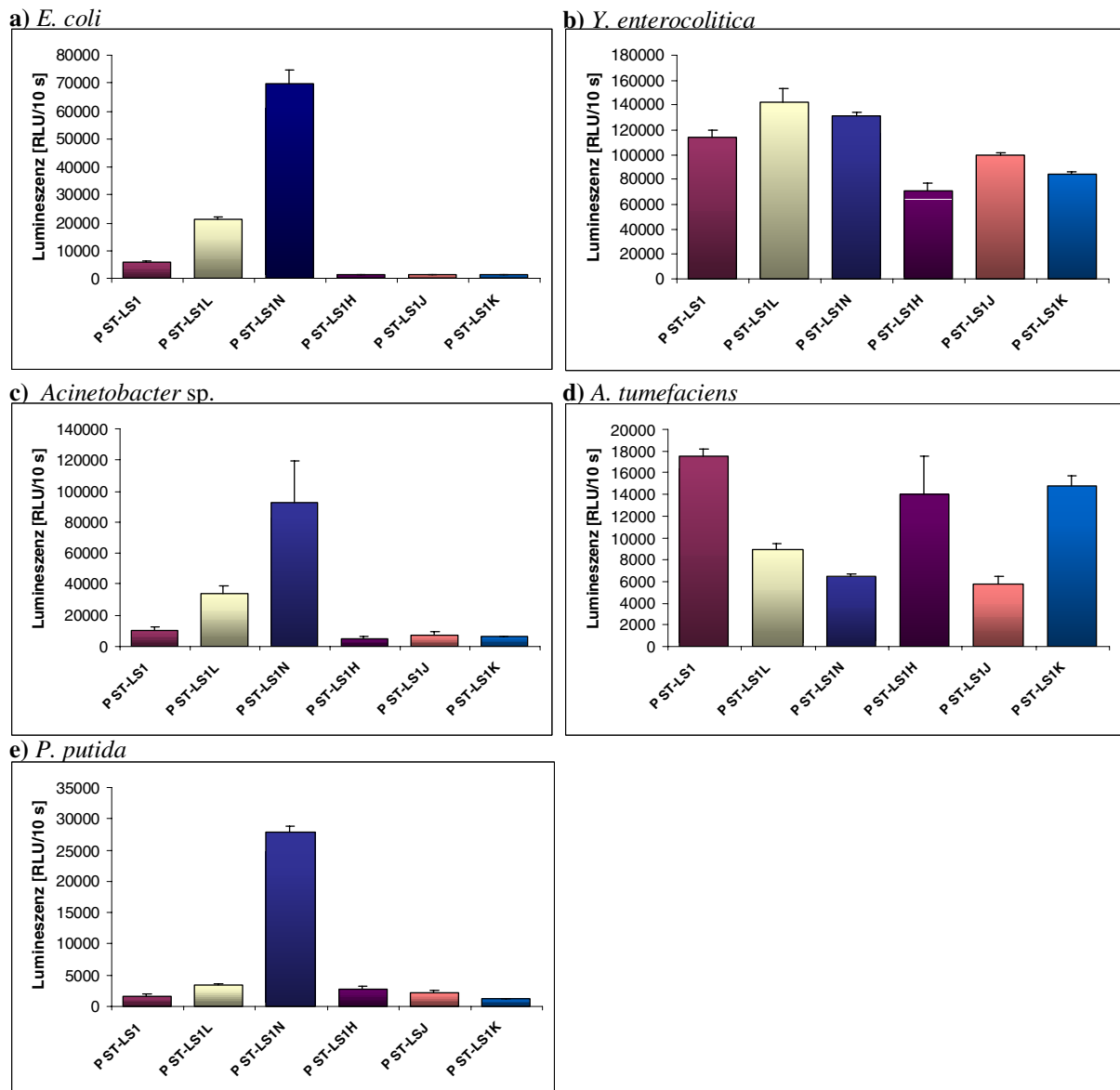


**Abb. 35:** Schematische Darstellung der MCS der pBin-Konstrukte mit *P<sub>ST-LS1</sub>*, welcher entsprechend der Originalsequenz oder mit Substitutionen mittels PCR hergestellt wurde. \* = PCR; H; J; K; L; N.

### 3.1.6 Ermittlung der Expressionsstärke der mutagenisierten *ST-LS1*-Promotor-Derivate durch Messung der Luziferase-Aktivität

Die ortsspezifische Mutagenese der potentiellen  $-10$ -Region (CATACT) des *P<sub>ST-LS1</sub>* führte in *E. coli* und *Acinetobacter sp.* zu einem eindeutig verändertem Expressionsverhalten (Abb. 36). Die Expression der 'down-Mutanten' *P<sub>ST-LS1H</sub>*, *P<sub>ST-LS1J</sub>* und *P<sub>ST-LS1K</sub>* erniedrigte die Expression in *E. coli* auf ein Fünftel der Expression des WT-Promotors. In *Acinetobacter sp.* wurde die Expression halbiert. Die 'up-Mutante' *P<sub>ST-LS1L</sub>* mit der optimierten  $-10$ -Region (TATAAT) führte in beiden Bakterienstämmen zu einer 3,5-fachen Erhöhung der Expressionsstärke. Die Mutagenese der potentiellen  $-10$ -Region zu einer

‘extended –10-Region’ der Mutante P ST-LS1N (TGNTATAAT) führte in *E. coli* zu einer zwölfmal höheren Expression und in *Acinetobacter* sp. zu einer neunmal höheren Expression gegenüber dem WT-Promotor.



**Abb. 36:** Vergleich der Lumineszenzmessungen der P ST-LS1-Mutanten in **a** *E. coli*, **b** *Y. enterocolitica*, **c** *Acinetobacter* sp., **d** *A. tumefaciens* und **e** *P. putida*

Für die Bakterienarten *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens* und *P. putida* führte die Mutagenese der potentiellen –10-Region des P ST-LS1 vor allem bei den ‘down-Mutanten’, nicht zu der erwarteten Expressionserniedrigung und damit Verminderung der Stärke der Lumineszenz.

In *Y. enterocolitica* war die Lumineszenz der ‘down-Mutanten’ P ST-LS1H mit 71000 RLU/10 s, P ST-LS1J mit 100000 RLU /10 s und P ST-LS1K mit 85000 RLU/10 s gegenüber der Expression des WT-Promotors mit 114000 RLU/10 s nicht eindeutig erniedrigt. Ebenso zeigten die ‘up-Mutanten’ P ST-LS1L mit einer Lumineszenz von 142000 RLU/10 s und

P ST-LS1N mit 130000 RLU/ 10 s keine eindeutig stärkere Expression der *luxAB*-Gene. Bei der Anzucht der 'up-Mutanten' in flüssigen LB-Medium zur Lumineszenzmessung war jedoch auffällig, dass die Mutante L ein verlangsamtes und die Mutante N ein stark verlangsamtes Wachstum aufwies, so dass deren Lumineszenzmessung meist Stunden nach der Messung der anderen Kulturen erfolgte. Die Expression der *luxAB*-Gene, welche mit einem hohen Energieverbrauch für die Zellen verbunden ist, führte bei diesen Mutanten zu einer verminderten Expression der Haushaltsgene und wirkte vielleicht auf Zellen letal, die bei der Messung der OD<sub>600</sub> zur Berechnung der Verdünnung für die Lumineszenzmessung miteinbezogen wurden. Die *luxAB*-Gene wurden somit wahrscheinlich nur von einem geringen Anteil lebender Zellen bei gleicher Zellzahl (Gesamtzellzahl) gegenüber den Kulturen anderer Mutanten exprimiert.

Die Mutanten zeigten in *A. tumefaciens* keine eindeutige Veränderung des Expressionsverhalten. Alle Mutanten wiesen im Vergleich zum WT-Promotor P ST-LS1 eine Erniedrigung der Lumineszenz auf, wobei z. B. die 'down-Mutante' J mit ca. 6000 RLU/10 s die gleiche Lumineszenz aufwies wie die 'up-Mutante' N. Weiterhin exprimierten die Mutanten H und J die *luxAB*-Gene stärker als die Mutanten L und N. In *A. tumefaciens* führte somit die Mutagenese nicht zu dem erwarteten Ergebnis.

In *P. putida* war die Lumineszenz der 'up-Mutante' L doppelt so hoch und die der Mutante N 16 mal höher als die Lumineszenz des WT-Promotors P ST-LS1 mit 1700 RLU/ 10 s. Als einzige der 'down-Mutanten' zeigte K eine Erniedrigung der Lumineszenz mit 1100 RLU/10 s. Die Mutanten H und J wiesen mit 2700 RLU/10 s und 2100 RLU/10 s eine leichte Erhöhung der Lumineszenz gegenüber dem WT-Promotor auf.

Trotz identischem Transkriptionsstart des P ST-LS1 in allen fünf getesteten Bakterienarten führte die Mutagenese der potentiellen -10-Region, die für die Transkriptionsinitiation durch die RNAP mit verantwortlich ist, nicht zu einem einheitlichen Expressionsverhalten in den untersuchten Bakterienarten.

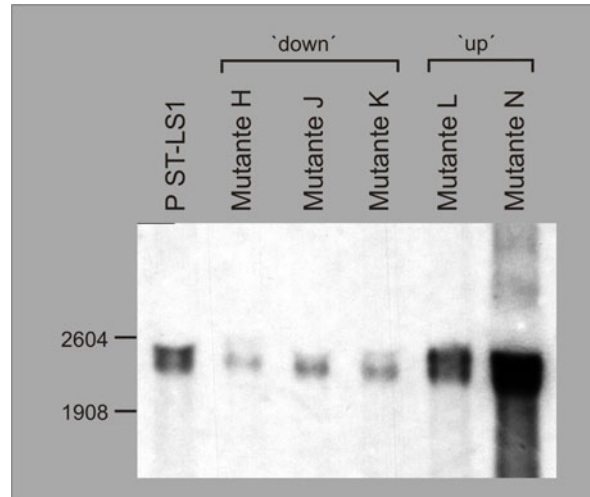
Mit der Mutagenese der Promotorsequenz des P ST-LS1 konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* und *Acinetobacter* sp. die Sequenz CATACT des P ST-LS1 als -10-Region genutzt wurde. Für die anderen Bakterienarten konnte dies nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Mutagenese des P ST-LS1 in den verschiedenen Bakterienarten zeigten auch, dass die Herstellung 'optimierter Vektoren', welche bei einem möglichen Gentransfer von Pflanzen auf Bakterien zu keiner Genexpression in möglichst vielen Bakterien führen sollen, sehr schwer ist.

### 3.1.7 Untersuchung der Transkripte der mutagenisierten ST-LS1-Promotoren

Um nachzuweisen, ob die Einführungen der ortsspezifischen Basenaustausche in den P ST-LS1 zu Veränderungen der Transkriptmenge oder der Transkriptionsstarts führten, wurde von den P ST-LS1-Mutanten Northern Hybridisierung und 5'-RACE durchgeführt. Hierfür wurde Gesamt-RNA der Mutanten P ST-LS1H, P ST-LS1J, P ST-LS1K, P ST-LS1L und P ST-LS1N, sowie des P ST-LS1-PCR aus *E. coli* isoliert.

Für die Northern Hybridisierung wurde je 5 µg Gesamt-RNA der untersuchten Proben elektrophoretisch aufgetrennt und mit der *luxA*-Sonde hybridisiert. Die Intensitätszunahme der Banden der 'up-Mutanten' P ST-LS1L und P ST-LS1N gegenüber dem unmutierten P ST-LS1, dargestellt in Abb. 37, verdeutlicht die Zunahme der Transkriptmengen. Für diese Mutanten konnten zwei Banden der Größe 2250 und 2400 nt identifiziert werden, welche identisch mit den Transkriptlängen des WT-Promotors waren. Für die 'down-Mutanten' P ST-LS1H und P ST-LS1J zeigte die Hybridisierung jeweils nur die Bande der Größe von 2250 nt, welche dem mRNA-Degradierungsprodukt des *luxAB*-Klonierungsfragmentes entsprach. Die 'down-Mutante' P ST-LS1K wies dagegen auch die Bande der Größe von 2400 nt mit einer sehr geringen Intensität auf.



**Abb. 37:** Northern Hybridisierung des P ST-LS1 im Vergleich zu den Mutanten P ST-LS1H, P ST-LS1J, P ST-LS1K, P ST-LS1L und P ST-LS1N.

Zur Durchführung der Transkriptionsstartbestimmungen mittels 5'-RACE wurde je 1 µg Gesamt-RNA der Proben eingesetzt. Für die 'up-Mutanten' P ST-LS1L und P ST-LS1N, sowie den P ST-LS1-PCR wurde sowohl durch Direktsequenzierung der 5'-RACE-Produkte als auch nach Klonierung der RACE-Produkte in pLitmus28 mit anschließender Sequenzierung der in Kapitel 3.1.4.1 beschriebene Transkriptionsstart zwölf bzw. 13 nt

stromabwärts der pflanzlichen TATA-Box bestätigt. Für die 'down-Mutanten' P ST-LS1H, P ST-LS1J und P ST-LS1K konnte mit der Methode der 5'-RACE kein Transkriptionsstart innerhalb der Promotorregion identifiziert werden. PCR-Fragmente, deren Größe auf das mRNA-Degradierungsprodukt des *luxAB*-Fragmentes hindeuteten, wurden nicht näher charakterisiert.

Die Northern Hybridisierung und 5'-RACE bestätigten das Ergebnis der Lumineszenzmessung in *E. coli*.

### 3.1.8 Herstellung von pBi101.2-Konstrukten mit mutagenisierten ST-LS1-Promotoren

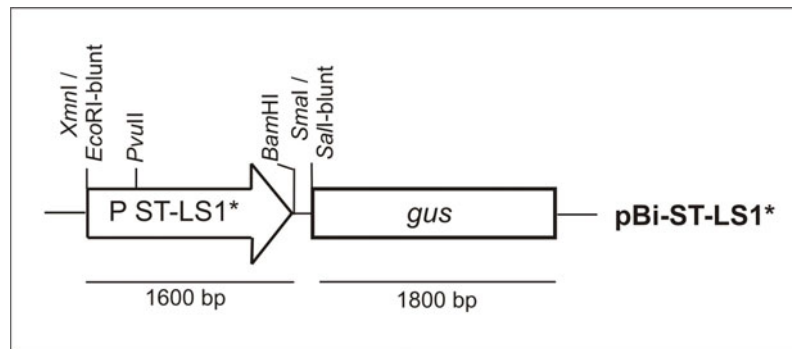
Ein wichtiges Ziel der Arbeit war die Frage nach der Möglichkeit der Herstellung 'sicherer Vektoren', die eine minimierte heterologe Genexpression aufweisen bei voller Funktionsfähigkeit in dem Zielorganismus. Durch ortsspezifische Basenaustausche des P ST-LS1 konnten sogenannte 'down-Mutanten' mit einer geringeren Genexpression gegenüber dem WT-Promotor in *E. coli* und *Acinetobacter* sp. BD413 hergestellt werden. Da hierbei im Promotorfragment des P ST-LS1 die für die Genexpression in Pflanzen verantwortliche CAAT- und TATA-Box nicht verändert wurden, sollte der Frage nachgegangen werden, ob die 'down-Mutanten' veränderte Expressionseigenschaften gegenüber dem WT-Promotor in Pflanzen aufweisen.

Um die Expressionseigenschaften der Mutanten P ST-LS1H, P ST-LS1J und P ST-LS1K, sowie des P ST-LS1-PCR in Pflanzen beurteilen zu können, musste eine Umklonierung in den Vektor pBi101.2 (Jefferson *et al.*, 1987; Kap. 6.1.4, Abb. 46) erfolgen. Dieser Vektor enthält zur Bestimmung der Transkriptionsstärke in Pflanzen ein promotorloses  $\beta$ -Glucuronidase Gen. pBi101.2 kann sowohl zur Beurteilung transienter Expression nach Partikelbombardement eingesetzt werden als auch zur Herstellung transgener Pflanzen.

#### 3.1.8.1 Klonierungsarbeiten

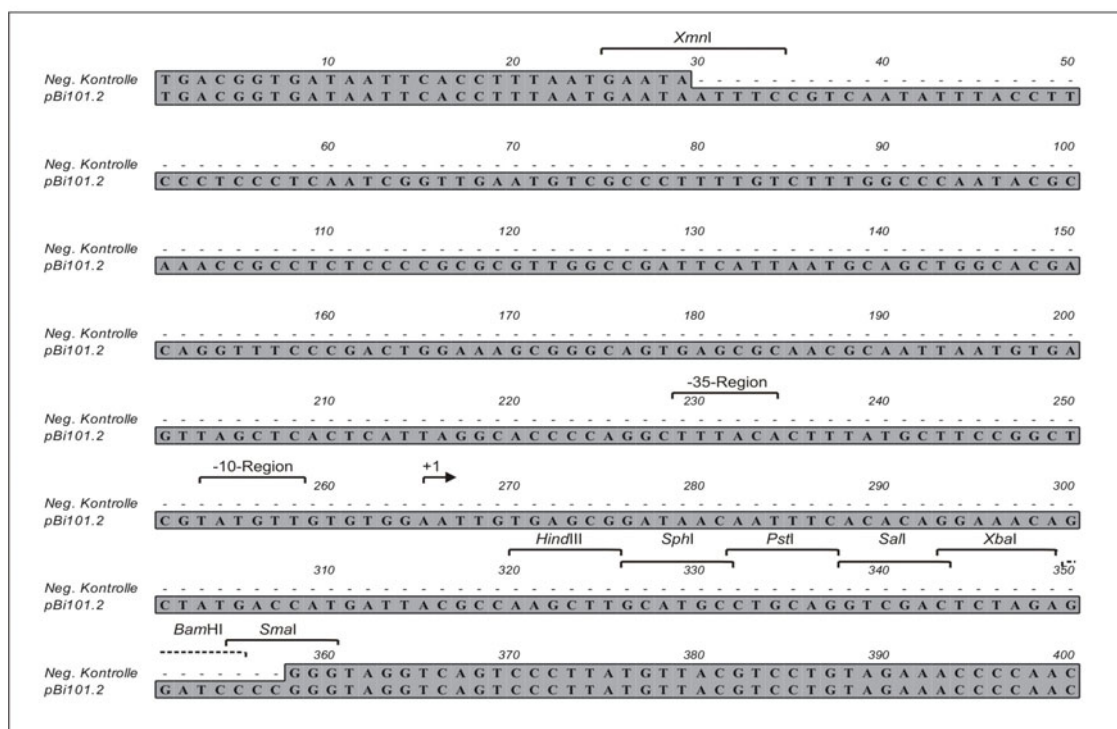
Zur Isolierung der Promotor-Fragmente der Plasmide P ST-LS1H, P ST-LS1J, P ST-LS1K und P ST-LS1-PCR wurde die DNA mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SalI* geschnitten, anschließend die kohäsiven Enden aufgefüllt und nach Auftrennung der DNA in einem präparativen Agarosegel konnten die Promotor-Fragmente eluiert werden.

Die Promotor-Fragmente wurden mit der *XmnI/SmaI*-restringierten Vektor-DNA des pBi101.2 ligiert (Abb. 38) und in *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  transformiert.



**Abb. 38:** Schematische Darstellung eines Teilausschnitts der pBi-Konstrukte mit P ST-LS1 und dessen Mutanten. \* = H; J; K

Als Negativ-Kontrolle wurde die *XmnI/SmaI*-restringierte Vektor-DNA religiert und in DH5 $\alpha$  transformiert. Durch den *XmnI/SmaI*-Verdau der pBi101.2 Vektor-DNA wurde aus dem Vektor ein ca. 330 bp großes DNA-Fragment stromaufwärts der MCS entfernt, welches den Lac-Promotor enthielt (Abb. 39).



**Abb. 39:** Ausschnitt eines Alignments der Sequenzen des Vektors pBi101.2 mit Darstellung der Restriktionsschnittstellen, Promotorerkennungssequenzen des *lac*-Operons (-35-, -10-Region) und dem dazugehörigen Transkriptionsstart im Vergleich zu der Sequenz der Negativ-Kontrolle, in welcher die Sequenz zwischen *XmnI* und *SmaI* entfernt wurde. Die DNA der Promotoren, deren Expression der *gus*-Gene in *N. tabacum* getestet werden sollte, wurde zwischen die *XmnI*- und *SmaI*-Restriktionsschnittstellen kloniert.

Die erfolgreiche Klonierung mit richtiger Orientierung der Promotor-Fragmente in pBi101.2 wurde durch Direkt-PCR mit den Primern ST-LS1-1305 und GUS-2583-AS überprüft. Zur Bestimmung der Größe der inserierten Fragmente wurde eine weitere Direkt-PCR mit den

Primern Bi-2052 und Gus-2583-AS angeschlossen. Die DNA der ausgewählten Klone pBi-ST-LS1X/S, pBi-ST-LS1HX/S, pBi-ST-LS1JX/S und pBi-ST-LS1KX/S wurde dann am jeweiligen 5'- und 3'-Ende der Promotor-Fragmente durch Sequenzierung nochmals überprüft. In Abb. 38 ist ein Ausschnitt der rekombinanten DNA schematisch dargestellt.

Für die Pflanzentransformation wurde Caesiumchlorid-Gradienten-gereinigte DNA mit einer Konzentration von ca. 1 µg/µl hergestellt.

### 3.1.9 Partikelbombardement von *N. tabacum*

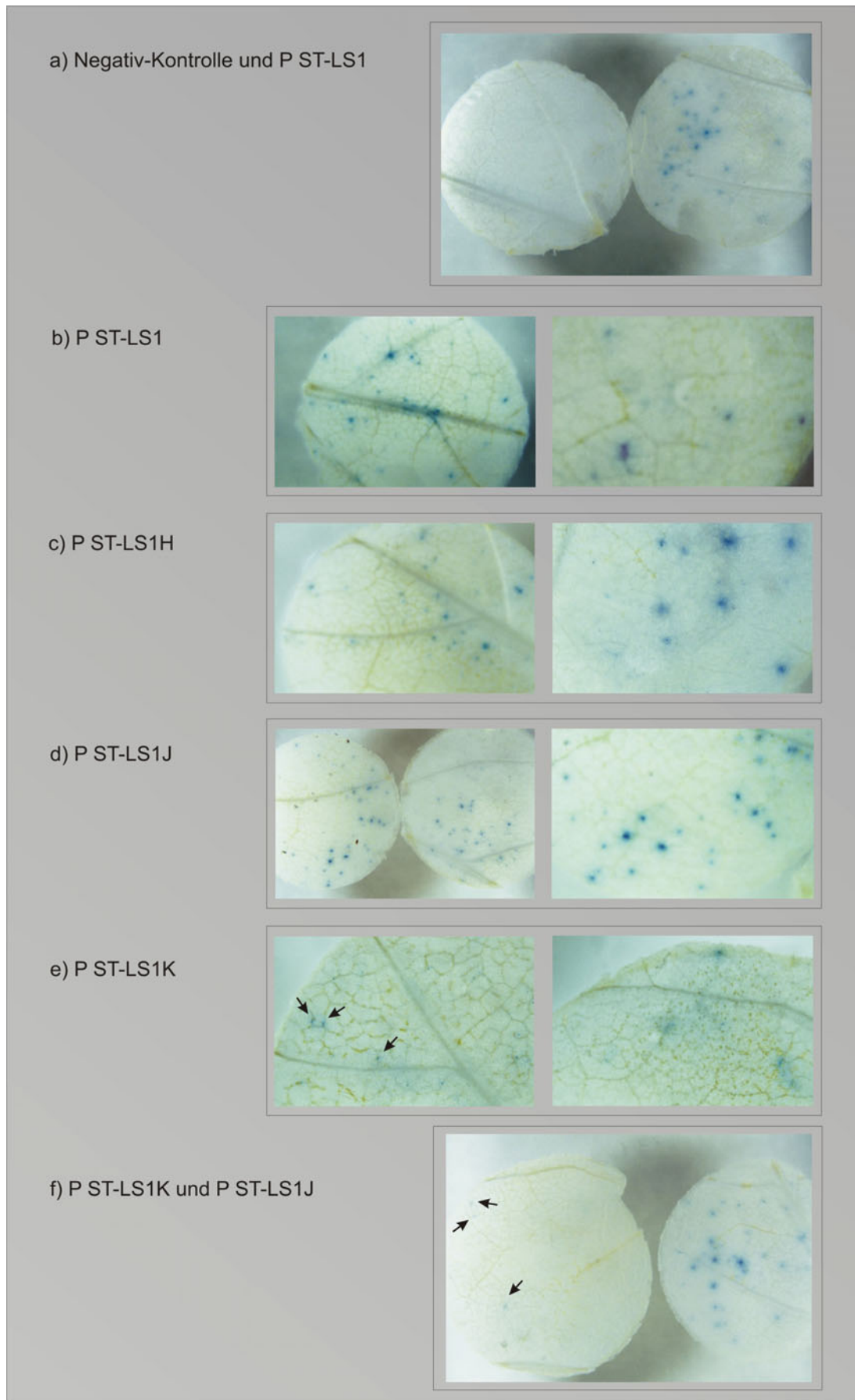
Zur Überprüfung der transienten Genexpression ausgehend von dem P ST-LS1 und dessen Mutanten H, J und K wurde ein Partikelbombardement von *N. tabacum* vorgenommen. Hierfür wurden mit den zu testenden Plasmiden der pBi-Konstrukte jeweils zweimal vier bis fünf Beschüsse der präparierten Blattscheiben vorgenommen. Der Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität erfolgte durch Hydrolyse des Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure, wobei eine Blaufärbung des transformierten Pflanzengewebes entstand. Zur besseren Hervorhebung der Blaufärbung des transformierten Gewebes, wurde dieses anschließend mit 70 %igem Ethanol entfärbt.

Die DNA des pBi-Konstrukts mit dem Wildtyp-Promotor P ST-LS1 diente in der Versuchsreihe auch als Positiv-Kontrolle, da dessen Genexpression in *N. tabacum* mehrfach beschrieben wurde (Eckes *et al.*, 1986; Stockhaus *et al.*, 1987; Stockhaus *et al.*, 1989b). Als Negativ-Kontrolle wurde die in Kapitel 3.1.8.1 beschriebene DNA des pBi101.2 mitgeführt.

#### 3.1.9.1 Genexpressionsbestimmungen der mutagenisierten ST-LS1-Promotoren

Die Ergebnisse der Expression der *gus*-Gene ausgehend von den mutagenisierten ST-LS1-Promotoren gegenüber dem WT-Promotor und der Negativ-Kontrolle in *N. tabacum* sind in Abb. 40 dargestellt. Die Mutanten P ST-LS1H und P ST-LS1J zeigten eine mit dem WT-Promotor vergleichbare Expressionsstärke. Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante P ST-LS1K eine wesentlich geringere Expression. Der Unterschied der Mutanten H und J zu K liegt in den Basenaustauschen an unterschiedlichen Positionen gegenüber dem WT-Promotor. Bei den Mutanten H und J wurden die Positionen -16 und -20 bezogen auf den pflanzlichen Transkriptionsstart des WT-Promotors von T (-16) und A (-20) jeweils gegen G (P ST-LS1H) bzw. jeweils gegen C (P ST-LS1J) ausgetauscht. Bei der Mutante P ST-LS1K wurden die Positionen -18/-19 von A/T zu G/C in der Promotor-Sequenz verändert.

Die Herstellung stabiler, transgener Tabakpflanzen durch *Agrobacterium*-vermittelten Transfer, zeigte für alle drei 'down-Mutanten' eine unverminderte Expression im Vergleich zum WT-Promotor (persönliche Mitteilung E. Glickman, IPK Gatersleben).



**Abb. 40:** Vergleich der transienten Expression der P ST-LS1-Mutanten (H, J und K) gegenüber dem WT-Promotor P ST-LS1 und der Negativ-Kontrolle in *N. tabacum*.



Mit den 'down-Mutanten' konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die DNA-Sequenz eines pflanzlichen Promotors so zu verändern, dass dieser die Expressionsstärke des WT-Promotor in der Pflanze beibehält, jedoch in Bakterien (*E. coli* und *Acinetobacter* sp.) die Expressionseigenschaft stark vermindert wird.

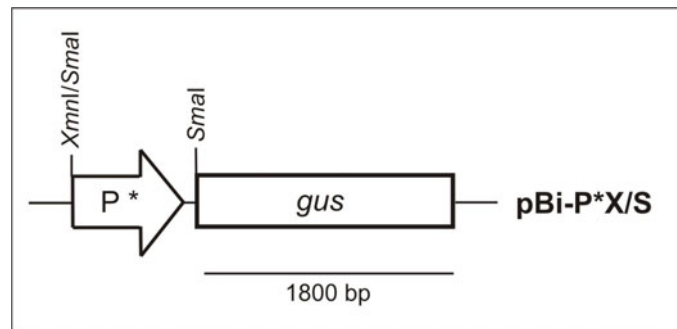
### 3.2 Untersuchung von bakteriellen und Plastiden Promotoren in *N. tabacum*

Es wurden die bakteriellen Promotoren des *lac*-Operons (P Lac), der Neomycin-Phosphotransferase III (P NptIII) und der TEM1  $\beta$ -Lactamase (P Bla) untersucht. Bei den Plastiden Promotoren wurden die Promotoren der Gene *psbA* (P PsbA) und *rbcL* (P RbcL), welche von der PEP erkannt werden, *accD* (P AccD) und *rpoB* (P RpoB), welche von der NEP erkannt werden, sowie *atpB* (P AtpB) und *clpP* (P ClpP), welche sowohl von der PEP als auch der NEP erkannt werden, untersucht. Die untersuchten Plastiden Promotoren stammten aus dem Chloroplasten von *N. tabacum*.

Die bakteriellen und Plastiden Promotoren wurden nach Fusionierung mit dem promotorlosem *gus*-Gen des Vektors pBi101.2 auf Expression in *N. tabacum* untersucht.

#### 3.2.1 Herstellung von pBi101.2-Konstrukten mit den bakteriellen und Plastiden Promotoren

Die bakteriellen Promotoren P NptIII und P Bla, sowie alle Plastiden Promotoren wurden mittels PCR mit spezifischen Primern (siehe Kap. 2.5.2, Tab. 10; Kap. 2.5.3, Tab. 11) und der jeweiligen spezifischen Template DNA (siehe Kap. 2.2.2, Tab. 6: pBin19, pKK232-8; Kap. 2.2.4, Tab. 8: pKL12, pKL13, pKL14, pKL18, pKL43, pKL44) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden zur Klonierung in den Vektor pBi101.2 mit *SmaI* geschnitten. Danach wurden die PCR-Produkte mit der *XmnI/SmaI*-restringierten Vektor-DNA des pBi101.2 ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Insertion der Promotor-Fragmente in den Vektor pBi101.2 wurde durch Direkt-PCR analysiert. Die DNA ausgewählter Klone wurde durch Sequenzierung auf Sequenzhomologie mit der Template-DNA und richtige Orientierung im Vektor überprüft. In Abb. 41 ist schematisch der rekombinante Bereich mit den auf Expression zu untersuchenden Promotoren des Vektor pBi101.2 dargestellt.



**Abb. 41:** Schematische Darstellung eines Teilausschnitts der pBi-Konstrukte mit den zu untersuchen Promotoren. P\* = NptIII; Bla; PsbA; RbcL; AccD; RpoB; AtpB; ClpP

Zur Expressionsstudie des P Lac wurde der im Vektor pBi101.2 stromaufwärts der MCS enthaltene Lac-Promotor genutzt. Um den Abstand der Promotorstrukturen zu dem zu transkribierenden *gus*-Gen zu verkürzen, wurde die MCS aus der Vektor-DNA entfernt (siehe Kap. 3.1.8.1, Abb. 39). Hierfür wurde pBi101.2 mit *Hind*III und *Sma*I restringiert, die *Hind*III-Restriktionsschnittstelle aufgefüllt, religiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die rekombinante DNA wurde durch Sequenzierung überprüft. Die pBi-Konstrukte erhielten die in Tab. 27 aufgeführten Bezeichnungen.

Für die Pflanzentransformation wurde Caesiumchlorid-Gradienten gereinigte DNA mit einer Konzentration von ca. 1  $\mu$ g/ $\mu$ l hergestellt.

Promotor	pBi-Konstrukt
P Lac	pBi-Lac
P Bla	pBi-BlaX/S
P NptIII	pBi-NptIII X/S
P PsbA	pBi-PsbAX/S
P RbcL	pBi-RbcLX/S
P AccD	pBi-AccDX/S
P RpoB	pBi-RpoBX/S
P AtpB	pBi-AtpBX/S
P ClpP	pBi-ClpPX/S

**Tab. 27:** pBi-Konstrukte

Bei der Sequenzierung des Konstrukts pBi-AccDX/S wurde zwischen den Positionen 59391 und 59392 in bezug auf die Sequenz der Chloroplasten-DNA von *N. tabacum* (Acc. # Z00044) eine Insertion eines C festgestellt (siehe Kap. 6.3.3). Da sich diese Insertion am 5'-Ende der Promotorsequenz befindet und die Erkennungssequenz für die NEP 261 Basen stromabwärts von der Insertion liegt, ist es unwahrscheinlich, dass diese Änderung der Sequenz eine mögliche Expression beeinflussen würde.

### 3.2.2 Sequenzanalyse der bakteriellen und Plastiden Promotoren

Wie bei der Computer-gestützten Sequenzanalyse der pflanzenspezifischen Promotoren auf prokaryontische Promotor Konsensus Sequenzen, stellt sich auch bei den bakteriellen und Plastiden Promotoren die Frage, ob mittels Computer-gestützter Suche nach eukaryontischen Promotor Konsensus Sequenzen eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit und die Stärke einer heterologen Genexpression getroffen werden kann.

#### 3.2.2.1 Computer-gestützte Suche nach eukaryontischen Promotor Konsensus Sequenzen in den untersuchten bakteriellen und Plastiden Promotoren

Die Promotorregion eukaryontischer Gene, welche von der RNAP II zur Transkriptionsinitiation genutzt wird, ist wesentlich komplexer aufgebaut als die prokaryontischer Gene (siehe Kap. 1.2.2). Als häufigste Konsensus Sequenz wurde in eukaryontischen Promotoren die TATA-Box mit der Sequenz TATA(A/T)A(A/T) nachgewiesen (Breathnach und Chambon, 1981; Bucher und Trifonov, 1986; Bucher, 1990). Sie liegt ungefähr 25 bis 30 nt stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle.

Die pflanzlichen Promotorregionen zeigten nach einem Vergleich von Joshi (1987) ebenfalls eine starke Konservierung der TATA-Box mit der Konsensus Sequenz TATATATA. Hierbei waren die ersten vier Nukleotide und das A an Position sechs mit 90 % bis 97 % am häufigsten vertreten. An Position fünf und sieben der pflanzlichen TATA-Box kommt neben dem T ebenfalls ein A am häufigsten in der Konsensus Sequenz vor.

Somit unterscheidet sich die Konsensus Sequenz der pflanzlichen TATA-Box (Joshi, 1987) nicht von der vorher beschriebenen TATA-Box mit der Konsensus Sequenz TATA(A/T)A(A/T) (Breathnach und Chambon, 1981; Bucher und Trifonov, 1986; Bucher, 1990). Da Joshi (1987) nur 79 pflanzliche Promotorregionen untersucht hatte und im Gegensatz dazu von Bucher (1990) 502 Promotoren untersucht wurden, lehnte sich die Computer-gestützte Suche an die Sequenz TATA(A/T)A(A/T) an.

Bei der nachfolgenden Computer-gestützten Suche wurde jeweils die gesamte Sequenz der bakteriellen und Plastiden Promotoren auf die Konsensus Sequenzen der TATA-Box mit folgendem Motiv analysiert:

➤ TATA- Konsensus Sequenz

TATAWAW

W = A oder T

(1 Mismatch erlaubt)

Bei der Konsensus Sequenz wurden die konservierten Basen im Fettdruck dargestellt. Für die nicht konservierte Region der TATA-Konsensus Sequenz wurde eine Mismatch erlaubt. Es wurde die gesamte Promotor-Sequenz analysiert. Für jede Übereinstimmung mit der angegebenen TATA-Konsensus Sequenz lieferte die Computeranalyse einen Treffer. Bei sich überlappenden Sequenzen, welche Homologien zur Konsensus Sequenz zeigten, wurde nur ein Treffer angegeben. Die Ergebnisse der Computeranalyse sind in Tab. 28 dargestellt.

Promotor	Potentielle Promotorsequenz	Position in Acc. # (siehe Anhang)	Übereinstimmung mit der Konsensus Sequenz	Trefferzahl
<b>P Lac</b>	-	-	-	-
<b>P Bla</b>	gATAAAT	4915	6/7	2
	TATgTAT	4944	6/7	
<b>P NptIII</b>	TATtTAA	2169	6/7	2
	TATAAtT	2218	6/7	
<b>P PsbA</b>	TATATAA	1707	7/7	2
	(TATAAgT)	(1705)	(6/7)	
	aATAAAA	1683	6/7	
<b>P RbcL</b>	TATATAT	57385	7/7	3
	(TATATAT)	(57387)	(7/7)	
	(TATATgA)	(57389)	(6/7)	
	(TATgAAA)	(57391)	(6/7)	
	TATAcAA	57401	6/7	
	TATgAAA	57507	6/7	
<b>P AccD</b>	TATtAAA	59461	6/7	5
	TATtAAA	59603	6/7	
	TATATtA	59613	6/7	
	aATATAA	59628	6/7	
	(TATAAAg)	(59630)	(6/7)	
	TATtAAT	59649	6/7	
	(aATATAT)	(59653)	(6/7)	
	(TATATAg)	(59655)	(6/7)	
<b>P RpoB</b>	TATATAT	27965	7/7	4
	TATAcAA	27822	6/7	
	TATAAcT	27810	6/7	
	TATcAAT	27758	6/7	
<b>P AtpB</b>	-	-	-	-
<b>P ClpP</b>	TATtTAT	74697	6/7	8
	TATgAAT	74638	6/7	
	gATAAAT	74617	6/7	
	(aATAAAT)	(74612)	(6/7)	
	gATAAAA	74603	6/7	
	TATgAAT	74591	6/7	
	TATAAAg	74582	6/7	
	aATAAAA	74573	6/7	
	gATATAT	74423	6/7	

**Tab. 28:** Ergebnisse der Computer-gestützten Suche nach potentiellen TATA-Konsensus Sequenzen in den bakteriellen und Plastiden Promotoren. Übereinstimmungen mit der Konsensus Sequenz wurden in Großbuchstaben dargestellt. Verschiebt sich die Konsensus Sequenz bei der Suche nur um eine bis mehrere Basen, so wurde diese Sequenz in Klammern dargestellt und als ein Treffer gezählt. Der Sequenzursprung bezieht sich auf die Acc. # der im Anhang aufgeführten Sequenzen.

Im Anhang (Kap. 6.3; Kap. 6.4) wurden die Treffer in den jeweiligen bakteriellen und Plastiden Promotoren farbig markiert.

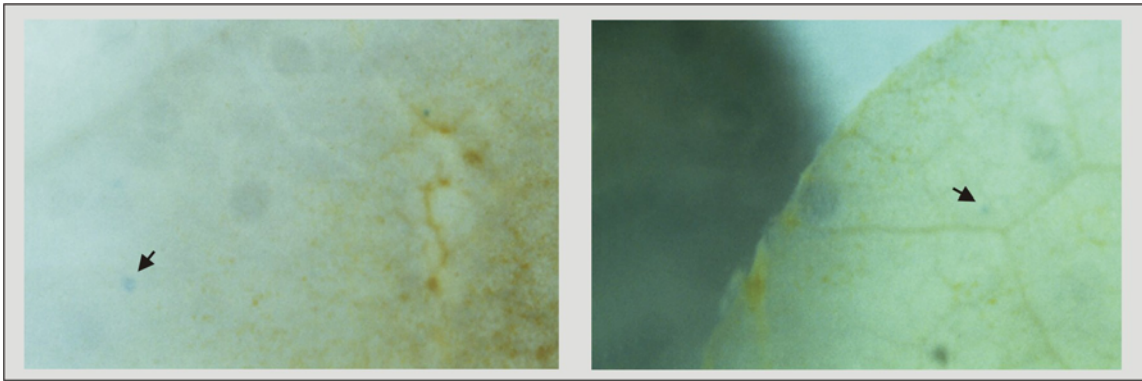
Für den bakteriellen Promotoren P Lac und den Plastiden Promotor P AtpB wurde innerhalb der untersuchten Sequenz keine Homologie zu der Konsensus Sequenz gefunden. Jeweils zwei Treffer wurden für die bakteriellen Promotoren P Bla und P NptIII, sowie für den Plastiden Promotor P PsbA gefunden. Für die Promotoren P RbcL wurden drei, für P RpoB vier, für P AccD fünf und für P ClpP acht Treffer gefunden. In der Sequenz des bakteriellen Promotors P NptIII überlappt eine der beiden potentiellen TATA-Konsensus Sequenzen mit der -35-Region, welche als Erkennungssequenz für die bakterielle RNAP dient. Bei den Plastiden Promotoren wurde für P RbcL, P AccD und P ClpP ein Treffer erzielt, welcher die Sequenz umgibt, die von der jeweiligen Polymerase (PEP, NEP) als Erkennungssequenz für die Transkriptionsinitiation in den Chloroplasten genutzt wird.

### **3.2.3 Partikelbombardement von *N. tabacum***

Zur Beurteilung der transienten Genexpression ausgehend von den zu testenden Promotoren, wurden zweimal vier bis fünf Beschüsse mit der DNA der pBi-Konstrukte auf präparierte Blattscheiben von *N. tabacum* vorgenommen. Als Kontrollen wurde die DNA der Negativ-Kontrolle des pBi101.2 (Kap. 3.1.8.1) und die DNA des pBi-ST-LS1 als Positiv-Kontrolle (Kap. 3.1.9) mitgeführt. Wie für die Mutanten des P ST-LS1 in Kapitel 3.1.9 bereits beschrieben, erfolgte der Nachweis der Expression der  $\beta$ -Glucuronidase durch Hydrolyse des Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure.

#### **3.2.3.1 Genexpressionsbestimmung der bakteriellen und Plastiden Promotoren**

Mit der Methode des Partikelbombardements von *N. tabacum* konnten für die bakteriellen Promotoren P Lac, P Bla und P NPTIII und für die Plastiden Promotoren P PsbA, P RbcL, P RpoB, P AtpB und P ClpP keine Expression der *gus*-Gene festgestellt werden. Für das Konstrukt pBi-AccDX/S mit dem P AccD konnten mit Hilfe 35-facher Vergrößerung zwei Spots durch Blaufärbung des transformierten Gewebes identifiziert werden (Abb. 42). Die Expression ausgehend von der Positiv-Kontrolle des P ST-LS1 in *N. tabacum* und die fehlende Expression der Negativ-Kontrolle ist in Abb. 40 (Kapitel 3.1.9.1) dargestellt. Negativ- und Positiv-Kontrolle wurden in jeder Versuchsreihe des Bombardements mitgeführt.



**Abb. 42:** Teilausschnitte von Blattscheiben aus *N. tabacum*. Die Expression des *gus*-Gens ausgehend von dem P AccD ist anhand zweier Spots (Pfeil) erkennbar.

Die Expression der *gus*-Gene ausgehend von dem P AccD ist sehr schwach im Vergleich zur Positiv-Kontrolle. Die Methodik ermöglicht es nicht, eine genaue Lokalisation der übertragenen DNA in den Zellen anzugeben. Es besteht die Möglichkeit, dass durch den Beschuss die DNA im Chloroplasten exprimiert wurde. In den Chloroplasten würde die Promotor-DNA des P AccD durch die NEP mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren erkannt werden und durch die Expression der *gus*-Gene zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Das Ergebnis der Expression der *gus*-Gene ausgehend von dem P AccD müsste durch die Herstellung transgener Pflanzen von *N. tabacum* mit diesen Promotor überprüft werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Spezifität von Promotorsequenzen

Das Ziel der Arbeit war es, die Spezifität von Promotorsequenzen, welche für die Bindung der jeweiligen RNAP mit Hilfe der entsprechenden Transkriptionsfaktoren und somit für die Transkriptionsinitiation verantwortlich sind, zu untersuchen. Da die Ähnlichkeiten der RNAPs aus Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten, sowie deren Sequenzen zur Erkennung für die Transkription in Prokaryonten und Eukaryonten schon häufig in der Literatur diskutiert wurden (Sentenac *et al.*, 1992; Fassler und Gussin, 1996; Soppa, 1999; Ebright, 2000; Minakhin *et al.*, 2001), sollte mit dieser Arbeit die Funktionalität von Promotoren in verschiedenen 'kingdoms' untersucht werden. Hierfür wurden zwölf pflanzenspezifische Promotoren auf Genexpression in fünf Bakterienarten, sowie drei bakterielle und sechs Plastiden Promotoren auf Genexpression in *N. tabacum* untersucht.

Die Bakterienarten, in denen die pflanzenspezifischen Promotoren untersucht wurden, stellten Vertreter taxonomisch unterschiedlicher Gruppen dar. *E. coli* und *Y. enterocolitica* gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. *A. tumefaciens* ist eine Bakterienart, welche mit Pflanzen interagiert und zur Familie der *Rhizobiaceae* gehört. *P. putida* und *Acinetobacter* sind weitverbreitete Bodenbakterien, wobei der Stamm *Acinetobacter* sp. BD413 eine natürliche Kompetenz aufweist (Nielsen *et al.*, 1997). Die zu untersuchenden pflanzenspezifischen Promotoren stammten ebenfalls aus phylogenetisch nicht-verwandten Gruppen wie Pflanzen, Pflanzenviren und Agrobakterien. Sechs der Promotoren stammten aus *S. tuberosum* (P B33, P ST-LS1, P FBP1,1, P FBP1,6, P SKT2 und P KST1), zwei aus *N. tabacum* (P 130 und P 247) und einer aus *A. thaliana* (P KCO1). Je ein pflanzenspezifischer Promotor stammte aus CaMV (P 35S), *A. rhizogenes* (P RoIC) und *A. tumefaciens* (P Nos).

Die bakteriellen Promotoren, welche in *N. tabacum* untersucht wurden, stammten aus *E. coli*, (P Lac und P Bla) und *S. faecalis* (P NptIII). Die Plastiden Promotoren stammten aus *N. tabacum*, wobei vier der Promotoren (P RbcL, P PsbA, P ClpP, P AtpB) Erkennungssequenzen der RNAP (PEP) aufwiesen, die denen des  $\sigma^{70}$ -Faktors aus *E. coli* sehr ähnlich sind. Die Promotoren P ClpP und P AtpB wiesen außerdem Erkennungssequenzen für eine Bakteriophagen-ähnliche RNAP (NEP) auf, welche ebenfalls in zwei weiteren Plastiden Promotoren (P AccD und P RpoB) vorhanden waren.

Die Frequenz mit der die pflanzenspezifischen Promotoren in den untersuchten Bakterienarten zu einer Expression führte, war mit einer Rate von 50 % der getesteten Kombinationen erstaunlich hoch. Bei den getesteten bakteriellen und Plastiden Promotoren in

*N. tabacum* kam es nur in einem Falle (P AccD) zu einer sehr geringen Expression. Dies weist daraufhin, dass die untersuchten pflanzenspezifischen Promotoren Sequenzen beinhalten, die von der bakteriellen RNAP zur Transkriptionsinitiation genutzt wurden. Die getesteten bakteriellen und Plastiden Promotoren wiesen hingegen mit einer Ausnahme keine Sequenzen auf, die von der eukaryontischen RNAP II aus *N. tabacum* zur Transkriptionsinitiation genutzt werden konnten. Dieses Ergebnis verdeutlicht zwei unterschiedliche Aspekte: einerseits konnten im Falle pflanzenspezifischer Promotoren in Prokaryonten heterologe Promotoren zur Transkriptionsinitiation genutzt werden und andererseits wird damit bewiesen, dass die Transkriptionsmaschinerie in Prokaryonten viel einfacher aufgebaut ist als die der Eukaryonten, so dass die angebotenen pflanzenspezifischen Promotorsequenzen erkannt wurden.

Bisher wurde die Genexpression ausgehend von heterologen Promotoren nur in wenigen Fällen beschrieben. Assaad und Signer (1990) beschrieben die Expression ausgehend von dem P 35S aus CaMV in *E. coli*. Der Promotor des *amt*-Gens aus dem *Chlorella* Virus zeigte eine Expression in verschiedenen transgenen Pflanzen als auch in verschiedenen Bakterienarten (Mitra *et al.*, 1994). Mehrere Autoren beschrieben die Genexpression ausgehend von den pflanzenspezifischen Promotoren der T-DNA von *A. tumefaciens* in *Agrobacterium* (Gelvin *et al.*, 1981; Schröder *et al.*, 1983; 1984; Jansens *et al.*, 1984). Weiterhin wurde von Pandolfini *et al.* (2000) beschrieben, dass die 'untranslatierte leader region' des *rolA*-Gens aus *A. rhizogenes* ein Intron enthält, welches als prokaryontischer Promotor zu einer Expression in Agrobakterien, Rhizobien und Bakteroiden führte.

Die Erkennung der Promotorregion wird in Eubakterien durch den  $\sigma$ -Faktor des Holo-Enzyms der RNAP vermittelt. Der primäre  $\sigma$ -Faktor, welcher zur Transkription der Haushaltsgene genutzt wird, ist als  $\sigma^{70}$  in Gram-negativen Bakterien bekannt und ist in allen bekannten Eubakterien für die Lebensfähigkeit notwendig (Gruber und Bryant, 1997). Der  $\sigma^{70}$ -Faktor der RNAP erkennt zur Transkriptionsinitiation die -35- und -10-Regionen mit den Konsensus Sequenzen TTGACA und TATAAT und einem optimalen Abstand von  $17 \pm 1$  nt (Hawley und McClure, 1983; Harley und Reynolds, 1987; Lissner und Margalit, 1993) bzw. der 'extended -10-Region' mit der Konsensus Sequenz TGNTATAAT (Keilty und Rosenberg, 1987; Kumar *et al.*, 1993). Sind solche bakteriellen Sequenzen in den pflanzenspezifischen Promotorsequenzen vorhanden, kann es zu einer Expression der nachgeschalteten Gene kommen. Neben dem Vorhandensein der -35- und -10-Regionen in den Promotorsequenzen ist, nach der Computeranalyse von Lissner und Margalit (1994) an *E. coli* Promotoren, die Nukleotidzusammensetzung der umliegenden Sequenzen für die



physikalisch-chemischen und strukturellen Eigenschaften der DNA und somit auch für die Stärke eines Promotors verantwortlich.

Bei den pflanzenspezifischen Promotoren verursachte ein Promotor, P ST-LS1, in allen fünf untersuchten Bakterienarten eine Expression. Hingegen führten zwei der untersuchten pflanzenspezifischen Promotoren, P RolC und P 247, zu keiner Expression. Die anderen Promotoren zeigten in den untersuchten Bakterien unterschiedliche Expressionsverhalten. Der P KST1 führte z. B. zu einer starken Expression in *E. coli*, *Y. enterocolitica* und *Acinetobacter* sp. In *A. tumefaciens* und *P. putida* fand hingegen nur eine sehr geringe Expression statt.

Die Promotoranalysen von Hawley und McClure (1983), Harley und Reynolds (1987) und Lisser und Margalit (1993) beschränkten sich auf Analysen von Promotoren, welche von der RNAP aus *E. coli* erkannt wurden. Allgemein wird die Stärke eines Promotors darüber definiert, wie ähnlich die -35- und -10-Regionen der jeweiligen Promotoren den Konsensus Sequenzen bei einem optimalen Abstand von  $17 \pm 1$  nt der beiden Regionen zueinander sind (Dombroski *et al.*, 1992; Busby und Ebright, 1994). Dass sich Konsensus Sequenzen von Promotoren anderer Bakterienarten gegenüber denen von *E. coli* unterscheiden können, zeigten z. B. die Analysen der Konsensus Sequenzen von den Gram-positiven Bakterien *Streptomyces* (Strohl, 1992) und *Corynebacterium glutamicum* (Pátek *et al.*, 1996) als auch die des Gram-negativen Bakteriums *Campylobacter jejuni* (Tab. 29; Wösten *et al.*, 1998b).

**Tab. 29:** Vergleich der putativen  $\sigma^{70}$  Konsensus Sequenzen (modifiziert nach Wösten *et al.*, 1998b). Es wurden 29 Promotorsequenzen aus *Streptomyces* (Strohl, 1992), 33 Promotorsequenzen aus *C. glutamicum* (Pátek *et al.*, 1996), 21 Promotorsequenzen aus *C. jejuni* (Wösten *et al.*, 1998b) und 263 Promotorsequenzen aus *E. coli* (Harley und Reynolds, 1987) untersucht. \* Aufgeführt wurden nur die Nukleotide, welche in mehr als 47 % der Fälle an den Positionen vorkamen.

Spezies	Nukleotide an Position [%]*																													
	-39	-38	-37	-36	-35	-34	-33	-32	-31	-30	//	-22	-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4
<i>Streptomyces</i> (Strohl, 1992)				T <sub>86</sub>	T <sub>90</sub>	G <sub>100</sub>	A <sub>69</sub>	C <sub>66</sub>		//											T <sub>59</sub>	A <sub>86</sub>								T <sub>100</sub>
<i>C. glutamicum</i> (Pátek <i>et al.</i> , 1996)				T <sub>48</sub>	T <sub>48</sub>	G <sub>73</sub>	C <sub>52</sub>		A <sub>52</sub>	//								G <sub>55</sub>			T <sub>79</sub>	A <sub>73</sub>		A <sub>58</sub>					T <sub>85</sub>	
<i>C. jejuni</i> (Wösten <i>et al.</i> , 1998b)	T <sub>52</sub>	T <sub>67</sub>	T <sub>57</sub>	A <sub>67</sub>	A <sub>76</sub>	G <sub>62</sub>	T <sub>57</sub>		T <sub>71</sub>	T <sub>52</sub> //	T <sub>62</sub>	T <sub>62</sub>	T <sub>52</sub>	T <sub>57</sub>	T <sub>71</sub>	T <sub>52</sub>	T <sub>71</sub>	G <sub>52</sub>		T <sub>95</sub>	A <sub>90</sub>	T <sub>57</sub>	A <sub>76</sub>	A <sub>62</sub>	T <sub>81</sub>	T <sub>86</sub>		A <sub>52</sub>		
<i>E. coli</i> (Harley und Reynolds, 1987)				T <sub>78</sub>	T <sub>82</sub>	G <sub>68</sub>	A <sub>58</sub>	C <sub>52</sub>	A <sub>54</sub>	//											T <sub>82</sub>	A <sub>89</sub>	T <sub>52</sub>	A <sub>59</sub>	A <sub>49</sub>	T <sub>89</sub>				

Die Konsensus Sequenz der -35-Region aus *Streptomyces* entsprach in den ersten fünf Positionen (TTGAC) der aus *E. coli*. An Position sechs wurde mit 62 % eine Purinbase gefunden (Strohl, 1992). Die Promotorsequenzen von *C. glutamicum* zeigten dagegen schon an Position vier der -35-Region mit einem Cytosin eine Differenz gegenüber den *E. coli*-Promotoren auf. Für die -10-Region wiesen die Analysen beider Bakterien an den Positionen eins, zwei und sechs (TANNNT) dieselben Basen auf, die auch in *E. coli* am stärksten konserviert sind. Die Promotorregionen der Gene aus *C. jejuni* besitzen drei konservierte Regionen bei 10, 16 und 35 nt stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle. Die -10-Region entspricht der -10-Konsensus Sequenz der  $\sigma^{70}$  *E. coli* Promotoren, wohingegen die -35-Region vollkommen verschieden gegenüber der von *E. coli* ist. In der Studie von Wösten *et al.* (1998b) wurde festgestellt, dass nur sechs von elf Promotoren aus *C. jejuni* in *E. coli* zu einer Expression führten. Diese Untersuchungen zu Promotor Konsensus Sequenzen verschiedener Bakterienarten als auch die unterschiedliche Expression ausgehend von den pflanzenspezifischen Promotoren in den untersuchten Bakterienarten beweisen, dass die Strukturen, welche die jeweilige bakterielle RNAP zur Transkriptionsinitiation nutzt, meist nur geringe, aber für das Bakterium spezifische Unterschiede aufweist.

In *E. coli* wurde die Genexpression der pflanzenspezifischen Promotoren in zwei verschiedenen Vektoren untersucht. Der Vektor pKK232-8 wurde für Promotorstudien konzipiert und besitzt einen Transkriptionsstop vor der MCS. Dieser Vektor ist aufgrund seines Replikationsursprungs nicht für die Expressionsstudien in *A. tumefaciens*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. geeignet. Auch in *Y. enterocolitica* konnte er nicht verwendet werden, da Rekombinationsereignisse zu Rearrangements führten. Der Pflanzentransformationsvektor pBin19 besitzt keinen Transkriptionsstop vor der MCS, wodurch es bei der promotorlosen Kontrolle zur Expression der inserierten *luxAB*-Gene als Reportergene durch die stromaufwärts liegenden bakteriellen DNA-Sequenzen kam (Jacob, 1997). pBin19 besitzt mit dem RK2 einen 'broad host range' Replikationsursprung und konnte somit in die anderen zu untersuchenden Bakterienarten transformiert werden. Die Interpretation der Ergebnisse der Promotorexpression waren für die pKK- und pBin-Konstrukte in *E. coli* identisch. Einzig die Höhe der Expression des P KCO1 und P FBP1,7 war diskrepant zwischen den beiden Plasmiden. Somit konnten die pBin-Konstrukte zur Beurteilung der Expression ausgehend von den pflanzenspezifischen Promotoren in *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. herangezogen werden.

In *E. coli* zeigten acht der untersuchten pflanzenspezifischen Promotoren (P B33, P ST-LS1, P 130, P FBP1,7, P Nos, P SKT2, P KCO1 und P KST1) eine Expression der *luxAB*-Gene, die stärker war als die des P 35S, welcher als Positiv-Kontrolle mitgeführt

wurde (Assaad und Signer, 1990). Somit exprimierten in dem Laborstamm *E. coli* K-12 DH5 $\alpha$  die meisten der pflanzenspezifischen Promotoren. In *Y. enterocolitica* ging von zwei Promotoren (P 130 und P Nos), die in *E. coli* exprimierten, keine Expression aus. Der P ST-LS1 führte in *Y. enterocolitica* zur stärksten Expression der *luxAB*-Gene. Die Expressionsniveaus der pBin-Konstrukte in dem *E. coli* K-12 Stamm DH5 $\alpha$  waren im Gegensatz zu denen des *Yersinia* WT-Stamms sehr gering, aber vergleichbar mit denen in *Acinetobacter* sp. In *Acinetobacter* sp. führten sechs Promotoren (P B33, P ST-LS1, P 130, P SKT2, P KST1 und P KCO1) zu einer Expression. Das höchste Expressionsniveau der *luxAB*-Gene ging hier von dem P 130 aus. In *A. tumefaciens* exprimierten fünf der pflanzenspezifischen Promotoren (P 35S, P ST-LS1, P FBP1,1, P FBP1,7 und P KCO1) die *luxAB*-Gene, wobei die stärkste Genexpression mit Abstand von dem P 35S ausging. Der Promotor P FBP1,1 führte nur in *A. tumefaciens* zu einer Expression. Die geringsten Expressionen ausgehend von den pflanzenspezifischen Promotoren wurden in *P. putida* gemessen. Hier exprimierten nur P B33, P ST-LS1 und P SKT2, drei Promotoren aus *S. tuberosum*, die *luxAB*-Gene. Die Höhe der Lumineszenzmessungen der pBin-Konstrukte in *P. putida* war im Vergleich zu den Messungen in den anderen Bakterienarten sehr gering. *P. putida* benötigt als obligat aerober Mikroorganismus Sauerstoff zum Wachstum. Bei der Oxidationsreaktion durch die bakterielle Luziferase wird ebenfalls molekularer Sauerstoff benötigt (Blouin *et al.*, 1996). Sauerstoff darf bei dieser Reaktion kein limitierender Faktor sein. So konkurrieren zwei Mechanismen um den Sauerstoff, wobei das Wachstum der Zellen im Vordergrund steht und somit die niedrigen Lumineszenzwerte erklärbar wären.

Eine weitere Möglichkeit für die geringe Expression der pflanzenspezifischen Promotoren in *P. putida* wäre, dass sich die  $\sigma^{70}$ -Faktor Erkennungssequenzen zur Transkriptionsinitiation von *P. putida* von denen aus *E. coli* unterscheiden. Für *P. putida*, *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens* und *Acinetobacter* sp. gibt es bisher keine Veröffentlichungen, welche sich mit den -35- und -10-Region  $\sigma^{70}$  Konsensus Sequenzen befassen. Jedoch gibt es einzelne Veröffentlichungen, wie die molekulare Charakterisierung der *rpoH*-Genregulation in dem *P. putida* Stamm KT2440 (Manzanera *et al.*, 2001), in welcher mögliche -35- und -10-Sequenzen zur Transkriptionsinitiation diskutiert wurden. Das *rpoH*-Gen, welches für den Hitzeschock  $\sigma^{32}$ -Faktor kodiert, wird bei einem Zellwachstum von 30 °C von drei verschiedenen Promotoren exprimiert. Zwei der Promotoren weisen Homologien zu den Konsensus Sequenzen des  $\sigma^{70}$ -Faktors auf, wobei sie mit den Sequenzen TCTTGAT und GGTATA für die -35- bzw. -10-Region des P1 und TTCCAG und CACAAG für die -35- bzw. -10-Region des P3 sehr diskrepant gegenüber den Konsensus Sequenzen in *E. coli*

sind. Der Abstand zwischen der –35- und –10-Region beträgt bei P1 17 Nukleotide und bei P3 18 Nukleotide. Zwischen dem Transkriptionsstart und der –10-Region befinden sich bei P1 neun Nukleotide und bei P3 sieben Nukleotide.

Untersuchungen heterologer Promotoren in *A. tumefaciens* sind von besonders großer Bedeutung, da zur Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen u. a. bakterielle Gene unter der Kontrolle pflanzenspezifischer Promotoren mittels binärer Vektoren und *A. tumefaciens* in das Pflanzengenom eingeschleust und dort exprimiert werden. Der Frage, ob diese pflanzenspezifischen Promotoren eine Expression der bakteriellen Gene schon in *Agrobacterium* bewirken, wurde zwar schon nachgegangen (Gelvin *et al.*, 1981; Schröder *et al.*, 1983; 1984; Jansens *et al.*, 1984), sie wurde aber nicht systematisch geklärt. Mit der Sequenzierung des Genoms von *A. tumefaciens* C58 (Wood *et al.*, 2001) werden sich zunehmend Untersuchungen zu den Promotoren der entschlüsselten Gene anschließen, um mögliche Promotor Konsensus Sequenzen für *A. tumefaciens* zu erstellen. Das *et al.* (1986) charakterisierten die Promotoren der sechs Operons (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*) des Ti-Plasmids aus *A. tumefaciens*, welche die Virulenzgene tragen. Die Promotoren zeigten eine Homologie zur –10-Region, weniger zur –35-Region der untersuchten Konsensus Sequenzen für *E. coli*. Die –10-Region der *vir*-Promotoren wurde mit der Konsensus Sequenz (T/G)NTAA(T/C) beschrieben. Dabei fällt auf, dass die Nukleotide an den Positionen eins, zwei und sechs, welche in *E. coli* am stärksten konserviert sind, bei diesen Promotoren am geringsten konserviert sind. Diese Untersuchung ist auch deswegen interessant, da nur die Gene zweier *vir*-Operons (*virA* und *virG*) in *Agrobacterium*-Kulturen exprimiert wurden. Die Expression der Gene der anderen vier Operons wurde nur bei Cokultivierung von *Agrobacterium* mit Pflanzenzellen beobachtet.

Interessant ist auch die Beobachtung, dass der P FBP1,1, welcher am 5'-Ende um 600 bp verkürzt gegenüber dem P FBP1,7 ist, in allen getesteten Bakterienarten eine geringere Expression aufwies als der P FBP1,7. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die Verkürzung des 5'-Endes des Promotors die Plasmid-DNA eine andere Struktur annahm und somit nicht die DNA-Sequenzen, die in dem P FBP1,7 zu einer Expression durch die bakterielle RNAP führten, in dem P FBP1,1 nicht optimal erkannt wurden (Geiselman, 1997; Dai und Rothman-Denes, 1999). Weiterhin könnten Sequenzen des 5'-Endes des P FBP1,7, welche auf den 600 bp liegen, die in dem P FBP1,1 nicht vorhanden sind für die erhöhte Expression des P FBP1,7 gegenüber dem P FBP1,1 verantwortlich sein. Dies würde bedeuten, dass möglicherweise Sequenzen, welche über 1100 bp stromaufwärts des Translationsstarts des *luxA*-Gens lagen, für die Transkriptionsinitiation verantwortlich wären. Womöglich führte das Vorhandensein zusätzlicher Nukleotide in der MCS der pBin- bzw.

pKK-Konstrukte der beiden Promotoren zu einem veränderten Expressionsverhalten. Bei dem pFBP1,1lux-Konstrukt liegen die Restriktionsschnittstellen *EcoRI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI* und *SalI* zwischen der Sequenz des P FBP1,1 und den Reportergenen, wohingegen bei dem pFBP1,7lux-Konstrukt nur die DNA-Sequenz der Restriktionsschnittstellen von *BamHI*, *XbaI* und *SalI* zwischen P FBP1,7 und den *luxAB*-Genen zu finden ist. Der Unterschied der Restriktionsschnittstellen bei den pKK-Konstrukten liegt nur in einer aufgefüllten *EcoRI*-Schnittstelle ligiert mit *SmaI* in dem pKKFBP1,1lux-Konstrukt gegenüber dem pKKFBP1,7lux-Konstrukt. Lisser und Margalit (1994) konnten durch Computeranalyse von *E. coli*-Promotoren zeigen, dass die Nukleotide, welche die Konsensus Sequenzen (-35- und -10-Region) umgeben, entscheidend für die physikalisch-chemische und strukturelle Eigenschaft der DNA sind und somit die Promotorstärke beeinflussen können.

Um die Höhe der heterologen Expression in Bakterien beurteilen zu können wurde die Expressionsstärke mit bakteriellen, also homologen Promotoren verglichen. Der Lac-Promotor führte in den untersuchten Bakterienarten zu sehr unterschiedlichen Expressionsstärken.

In *E. coli* konnte für den P Lac eine Expression gemessen werden, welche 20 mal stärker war als die des stärksten Pflanzenpromotors P KST1 (pBin-Konstrukt). Der Promotor des TEM1 *bla*-Gens, welcher in unserem Labor mit den *luxAB*-Genen fusioniert und in den Vektor pKK232-8 kloniert wurde, führte in *E. coli* hingegen nur zu einer sechsfach höheren Expression verglichen mit dem P KST1 (pKK-Konstrukt).

In *Yersinia* führte der P Lac zu einer Expression, die nur 1,5mal höher bzw. doppelt so hoch war wie die durch die pflanzlichen Promotoren P ST-LS1 und P KST1 bewirkten Expressionen. Die Expression eines weiteren bakteriellen Promotors, welcher aus dem *Y. enterocolitica* Stamm 78 gewonnen wurde, war schwächer als die Expression dreier pflanzenspezifischer Promotoren (P ST-LS1, P KST1 und P KCO1) in *Y. enterocolitica*.

Zur Charakterisierung der *luxAB*-Transkripte wurden Northern Hybridisierungen, quantitative PCRs und 5'-RACE-Analysen von ausgewählten Promotor-*luxAB*-Fusionen durchgeführt. Mit den Northern Hybridisierungen konnte durch die Anwesenheit distinkter Banden gezeigt werden, dass es zu spezifischen Transkriptionsstarts in den Pflanzenpromotoren kam.

Außerdem wurde ein Transkript identischer Länge in allen Promotor-*luxAB*-Fusionen nachgewiesen. Durch Transkriptionsstartbestimmungen konnte gezeigt werden, dass dieses Transkript in der 5'-untranslatierten Region des *luxA*-Gens begann und es sich hierbei um ein Degradierungsfragment handelte. Das 5'-Ende der mRNA dieser Transkripte wurde von den Nukleotiden 5'-AAUU-3' gebildet, welche als Erkennungssequenz für die Endoribonuklease

E (RNase E) dienen könnte. Die RNase E ist das Schlüsselenzym für die Initiation der mRNA-Degradierung. Für *E. coli* wurde die Konsensus Sequenz mit (A/G)AUU(A/U) oft in Kombination mit zusätzlichen lateralen 'stem-loop'-Ankern beschrieben (Rauhut und Klug, 1999). In 3'-Richtung der untersuchten Sequenz wurde ein 'inverted repeat' gefunden, welcher eine 'stem-loop'-Struktur ausbilden könnte und somit die Erkennung der Sequenz 5'-AAUU-3' als Erkennungssequenz für die RNase E erhöht. Nach dem initialen Bruch der mRNA durch die RNase E, kann die Degradierung durch die 3'→5'-Exonukleasen und weiteren Enzyme des Degradosoms erfolgen. Das Problem von Arbeiten mit bakterieller mRNA ist, dass diese Halbwertszeiten besitzen, welche im Bereich von wenigen Minuten liegen. Im Vergleich dazu liegen mRNA-Halbwertszeiten eukaryontischer Zellen im Bereich von Stunden. Diese geringen mRNA-Halbwertszeiten ermöglichen Bakterien eine schnelle Anpassung an eine sich verändernde Umgebung. Bei der Herstellung von Reportersystemen sollte eine Erkennungssequenz für die RNase E mit 'stem-loop'-Strukturen in der 5'untranslatierten Region wie sie in den *luxAB*-Genen gefunden wurde, vermieden werden. Die Degradierung wirkte sich jedoch nicht auf die Translation aus, wie die mRNA-Mengen ausgewählter Promotor-*luxAB*-Fusionen in *Y. enterocolitica* mittels quantitativer PCR im Vergleich zur Stärke der Lumineszenz bewiesen. Hierbei wurde für die Promotoren P 35S, P ST-LS1, P RolC und P Nos gezeigt, dass die ermittelten Transkriptmengen der *luxAB*-mRNA mit den Luziferase-Aktivitäten korrelierte und sich somit die Lumineszenzmessung zur Beurteilung der Expressionsstärke eignete.

Fusionen der pflanzenspezifischen Promotoren mit dem promotorlosen *cat*-Gen erlaubten den Nachweis der phänotypischen Ausprägung durch Wachstum auf Agarplatten mit Chloramphenicol. Hierbei wiesen die Promotoren P ST-LS1 und P Nos Expressionsstärken des *cat*-Gens in *E. coli* auf, die bei einer typischen Selektionskonzentration von 25 µg/ml für Chloramphenicol Wachstum vermitteln konnten. Weiterhin konnte durch den Vergleich der Expressionsstärken der pflanzenspezifischen Promotoren in den beiden Reportersystemen (*cat* und *luxAB*) bewiesen werden, dass die untersuchten Promotoren und nicht die Sequenzen des jeweiligen Reportersystems für die Expressionen der Reportergene verantwortlich waren. Eine Ausnahme bildete hier jedoch die Expression des P Nos. Dieser exprimierte die *luxAB*-Gene in *E. coli* ähnlich stark wie der P 35S aus CaMV und somit geringer als der P ST-LS1. Die Expression des *cat*-Gens ausgehend von dem P Nos war jedoch viel stärker als die des P ST-LS1. Alle weiteren getesteten Promotoren führten zu Lumineszenzen in *E. coli*, die mit dem Wachstum der *E. coli*-Stämme mit den Promotor-*cat*-Fusionen auf Agarplatten mit Chloramphenicol korrelierten. Für das *luxAB*-Transkript ausgehend von dem P Nos wurde in *Y. enterocolitica* nachgewiesen, dass die Transkriptmenge mit der Proteinmenge an gebildeter

Luziferase und somit mit der Luziferase-Aktivität korrelierte. Außerdem wiesen die Transkripte von der Promotor-*cat*-Fusion (pKKNos) und der Promotor-*luxAB*-Fusion (pKKNoslux) von P Nos in *E. coli* den gleichen Transkriptionsstart auf. Somit blieb die Ursache für die unterschiedliche Expressionsstärke der beiden Reportersysteme ausgehend von P Nos ungeklärt. Die Ursache könnte sowohl auf der Transkriptions-, als auch auf der Translationsebene zu suchen sein. Die Proteinmenge eines bestimmten Proteins in der Zelle wird durch die Transkriptionsrate des zu exprimierenden Gens, die Zerfallsrate bzw. Degradierung der mRNA, die Translationsrate der mRNA und die Degradierung des Proteins bestimmt. Kuzj *et al.* (1998) beschrieben, dass die Stabilität der *cat*-Transkripte in *E. coli* Kulturen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase variierte, aber die Translationsrate nicht mit der erhöhten mRNA-Stabilität korrelierte. Die *cat*-mRNA-Halbwertszeit war während der lag-Phase lang, nahm in der exponentiellen Phase ab und erhöhte sich wieder in der stationären Phase. Betrachtete man jedoch die Menge an *cat*-mRNA bezogen auf die Zellmasse, so erkannte man keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Wachstumsphasen. Dieses lässt darauf schließen, dass es Kompensationsmechanismen für die *cat*-Transkription gibt. In dem Falle der Expression des *cat*-Gens ausgehend von dem P Nos könnte jedoch eine erhöhte mRNA-Stabilität vorliegen, die auch zu einer erhöhten Menge an Chloramphenicol-Acetyltransferase führte.

Für Expressionsstudien von Promotoren bedeutet dieses Ergebnis, dass in einzelnen Fällen verschiedene Reportersysteme zu einer unterschiedlichen Aussage über die Stärke eines Promotors führen können. So wurde z. B. eine Transkription der nopalinen T-DNA-Region des Ti Plasmids C58 in *E. coli* und *Agrobacterium* beschrieben (Janssens *et al.*, 1984). Für diese Expression waren die Promotorsequenzen der nopalinen T-DNA verantwortlich. Daneben wurde eine Expression der Fusion des Promotors des Nopalin Synthase Gens mit der kodierenden Region der  $\beta$ -Galactosidase in *Agrobacterium*, jedoch ohne Angabe der Expressionshöhe beschrieben. Die in dieser Arbeit gemessene geringe Menge an Luziferase-Aktivität des Nos-Promotors in *A. tumefaciens* wurde als nicht signifikant eingestuft.

Bei der Untersuchung der bakteriellen und Plastiden Promotoren führte nur der Plastiden Promotor P AccD zu einer sehr geringen Expression in *N. tabacum*. Dieser Promotor wird in Chloroplasten von der NEP exprimiert. Die NEP erkennt auf der Promotor-DNA mit der YRT-Box und teilweise GAA-Box Sequenzen, welche weder den Konsensus Sequenzen der bakteriellen -35- und -10-Regionen, noch der eukaryontischen TATA-Box oder dem Inr-Element ähnlich sind. Der P AccD besitzt zur Erkennung durch die NEP nur die YRT-Box mit dem hochkonservierten YATA-Motiv, welches hier durch die Nukleotide TAT an Position -9 bis -7 bezogen auf den Transkriptionsstart in Chloroplasten gebildet wird (Liere

und Maliga, 1999a; 1999b). Zwei mögliche Ereignisse können zu der positiven Expression ausgehend von dem P AccD in *N. tabacum* nach dem Partikelbombardement geführt haben. Eine Möglichkeit ist, dass die inserierte DNA in den Zellkern gelangte und die RNAP II des Tabaks auf der Promotor-DNA Sequenzen erkannt hatte, welche zu einer sehr geringen Expression führte. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die durch das Bombardement eingeführte DNA teilweise in die Chloroplasten gelangte, dort die Promotor-DNA von der NEP erkannt, zu einer Expression und somit zu einem falsch positiven Ergebnis führte. Die Methodik des Partikelbombardements ermöglicht es nicht, eine genaue Lokalisation der übertragenen DNA in den Zellen anzugeben. Um nachzuweisen, dass diese Expression durch die RNAP II des Tabaks verursacht wurde, müssten gentechnisch veränderte Pflanzen mit dem P AccD hergestellt werden.

Ein Problem ist, dass Ergebnisse transients Genexpressionsstudien in Pflanzen mittels Partikelbombardement sich bei der Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen mit derselben DNA nicht immer reproduzieren lassen. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die getesteten bakteriellen und Plastiden Promotoren in transgenen Pflanzen zu einer Genexpression der nachgeschalteten Gene führen könnten. Jedoch ist diese Wahrscheinlichkeit eher gering (Christou, 1994).

## **4.2 Identifizierung von Promotorsequenzen**

Ein weiteres wichtiges Ziel der Arbeit war die Beantwortung der Fragestellung, ob mit einer Suche nach eukaryontischen bzw. prokaryontischen Konsensus Sequenzen in den Promotorsequenzen eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob und mit welchem Ausmaß eine heterologe Expression der nachgeschalteten Gene erfolgt. Auch ein möglicher Zusammenhang zwischen dem AT-Gehalt und der Genexpressionsstärke der pflanzenspezifischen Promotoren sollte überprüft werden.

Gängige Methoden zur Identifizierung von Promotorsequenzen sind die Analyse von DNA-Sequenzen mit Hilfe von Suchmaschinen und Software oder/und die Bestimmung des Transkriptionsstarts.

### **4.2.1 Computer-gestützte Suche nach Promotor Konsensus Sequenzen**

Um vergleichende Aussagen über die Computer-gestützte Suche nach Promotorsequenzen in den pflanzenspezifischen Promotoren und über deren AT-Gehalt treffen zu können, wurden jeweils 300 bp des 3'-Endes der Promotoren auf das Vorhandensein von prokaryontischen Konsensus Sequenzen untersucht. Der kleinste untersuchte pflanzenspezifische Promotor P Nos hatte eine Gesamtlänge von 306 bp. Für die Computer-gestützte Suche nach



potentiellen prokaryontischen Konsensus Sequenzen in den pflanzenspezifischen Promotoren wurde nach den von Hawley und McClure (1983), Harley und Reynolds (1987) und Lissner und Margalit (1993) beschriebenen Hexameren für die -35- und -10-Region gesucht. Hierbei wurden gegenüber der Konsensus Sequenz der -35-Region mit TTGACA drei Mismatches erlaubt und bei der -10-Region mit TATAAT zwei Mismatches erlaubt. Bei der Sequenz der -35-Region blieben die ersten beiden Nukleotide (TTGACA) konserviert und bei der -10-Region die Nukleotide an Position zwei und sechs (TATAAT). Obwohl eine Spacerregion von  $17 \pm 1$  nt zwischen den Konsensus Hexameren als optimal angesehen wird, berichteten Hawley und McClure (1983), dass die Promotoren mit den Konsensus Sequenzen in einem Abstand von 15 bis 20 nt noch funktionstüchtig waren. Außerdem wurde in die Suche die 'extended -10-Region' (Keilty und Rosenberg, 1987) miteinbezogen. In dieser Sequenz wurden drei Mismatches erlaubt bei einer Konservierung der Positionen eins, zwei, fünf und neun (TGNTATAAT). In einer Analyse von Ozoline *et al.* (1997) wurden 441 Promotorsequenzen, welche von der *E. coli* RNAP erkannt wurden, statistisch nach dem Auftreten von -10-Regionen untersucht. Hierbei wurden neben der Konsensus Sequenz für die -10-Region mit TATAAT noch zwölf weitere häufig auftretende -10-Konsensus Hexamere beschrieben. Diese wurden bei der Analyse mit berücksichtigt, ergaben jedoch keine weiteren Treffer.

Die Gestaltung der Computer-gestützten Suche nach potentiellen eukaryontischen Konsensus Sequenzen in den bakteriellen bzw. Plastiden Promotoren erwies sich als schwieriger, da eukaryontische Promotoren wesentlich heterogener als prokaryontische Promotoren aufgebaut sind. Sie weisen für die basale Transkription häufig die TATA-Box auf (Breathnach und Chambon, 1981; Bucher und Trifonov, 1986; Bucher, 1990), jedoch gibt es daneben auch Promotoren, welche als TATA-less bezeichnet werden und nur das Inr-Element aufweisen (Smale und Baltimore, 1989; Zenzie-Gregory *et al.*, 1992). In *Drosophila*- und humanen Promotoren wurden in TATA-less Promotoren neben dem Inr-Element das 'downstream promoter element' (DPE) nachgewiesen (Burke und Kadonaga, 1996; 1997). Dieses Element liegt ca. 30 nt stromabwärts der Transkriptionsinitiationsstelle und beeinflusst die Promotoraktivität. Des Weiteren sind die Konsensus Sequenzen der pflanzlichen Promotoren mit der einzigen aussagekräftigen Studie von Joshi (1987) eher gering untersucht. Die Computer-gestützte Suche wurde in den bakteriellen und Plastiden Promotoren nach der TATA-Box mit der Konsensus Sequenz TATAWAW mit der Konservierung an Position zwei und drei vorgenommen. Die Suche erlaubte einen Mismatch, wobei an den Positionen fünf und sieben sowohl ein Adenin als auch Thymin als ein Treffer erkannt wurde. Im Gegensatz zu der Suche in den pflanzenspezifischen Promotorsequenzen wurde in den bakteriellen und

Plastiden Promotoren die gesamte Promotorsequenz nach Konsensus Sequenzen untersucht. Die Größe der Promotoren variierte von 132 bp für den P Bla bis 376 bp für den P AccD. Dies erlaubte zwar nicht den direkten Vergleich der Anzahl der Treffer der jeweiligen untersuchten Promotoren, aber eine Reduzierung der untersuchten DNA-Sequenz auf die Länge von 132 bp des kleinsten Promotors wäre nicht sinnvoll gewesen, da eukaryontische Promotoren aufgrund ihrer Komplexität und durch Vorhandensein von den 'upstream activating sequences' mehrere Hundert Basenpaare lang sein können.

Allgemein zeigte das Ergebnis der Computer-gestützten Analyse in den untersuchten Promotoren nach Konsensus Sequenzen keine Übereinstimmung zwischen der Anzahl der gefundenen Treffer, sowie deren Homologie zur Konsensus Sequenz und der Wahrscheinlichkeit und Stärke einer heterologen Genexpression der jeweiligen Promotoren. Die maximale Trefferanzahl lag sowohl bei den pflanzenspezifischen als auch bei den bakteriellen bzw. Plastiden Promotoren bei acht Treffern.

Bei den pflanzenspezifischen Promotoren wurde die höchste Trefferquote für den SKT2-Promotor aus *S. tuberosum* festgestellt. Dieser Promotor führte zwar in *P. putida* zu der stärksten Genexpression aller getesteten Promotoren, jedoch war die Genexpression in *E. coli*, *Y. enterocolitica* und *Acinetobacter* sp. im Gegensatz zu der des P ST-LS1 eher gering. In *A. tumefaciens* wurde die geringe Lumineszenz ausgehend von dem P SKT2 sogar als nicht signifikante Genexpression gewertet. Für die Promotoren P RoIC und P 247, welche beide keine Genexpression in den getesteten Bakterienarten verursachten, wurden jeweils drei Treffer mit der Computeranalyse gefunden. Ebenfalls drei Treffer wurden für den P ST-LS1 festgestellt, welcher in den fünf getesteten Bakterienarten zu einer Genexpression führte. Der einzige pflanzenspezifische Promotor für den überhaupt keine potentielle bakterielle Konsensus Sequenz gefunden werden konnte, war der P 130. Dieser zeigte immerhin in *E. coli* und *Acinetobacter* sp. eine signifikante Genexpression. Je ein Treffer wurde für die Promotoren P FBP1,1, P FBP1,7, P Nos und P KCO1 festgestellt. Die unterschiedliche Expression der Promotoren des FBPase-Gens (P FBP1,1 und P FBP1,7) wurde schon eingehend beschrieben. Durch den vorgegebenen Suchmodus wurden für beide Promotoren identische Treffer gefunden, obwohl P FBP1,7 in *E. coli*, *Y. enterocolitica* und *A. tumefaciens* eine Expression der nachgeschalteten Gene verursachte. Im Gegensatz dazu führte der P FBP1,1 nur in *A. tumefaciens* zu einer Expression. Für den P Nos konnte nur eine Expression in *E. coli* festgestellt werden. Hingegen führte der P KCO1 teilweise zu einer sehr starken Expression in *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens* und *Acinetobacter* sp.

Bei der Untersuchung des AT-Gehalts der pflanzenspezifischen Promotoren waren für einige Promotoren Beziehungen zwischen der Expressionsstärke und der Höhe des

AT-Gehalts abzulesen. So wiesen die Promotoren P KCO1 mit 66,7 %, P KST1 mit 67,0 % und P ST-LS1 mit 68,7 % ein sehr hohen AT-Gehalt auf. Der P KST1 führte zwar nur in drei der getesteten Bakterienarten und der P KCO1 in vier der getesteten Bakterienarten zu einer Genexpression, jedoch waren die Genexpressionen in *E. coli* und *Y. enterocolitica* sehr stark. Einen höheren AT-Gehalt als P KCO1, P KST1 und P ST-LS1 wies nur der P SKT2 mit 76,6 % auf, welcher mit Ausnahme von *A. tumefaciens* in den weiteren vier untersuchten Bakterienarten zur Genexpression führte. Weiterhin auffällig war, dass die pflanzenspezifischen Promotoren P 35S aus CaMV mit 52,6 % und die beiden Promotoren P Nos mit 53,7 % und P RolC mit 60 % aus den Agrobakterien eher geringe AT-Gehalte aufwiesen. Im Vergleich zu dem AT-Gehalt von 42 % des Stammes *A. tumefaciens* C58 (Wood *et al.*, 2001) ist der AT-Gehalt der beiden Promotoren aus *Agrobacterium* um ca. 12 % bzw. 18 % höher. Der AT-Gehalt des Genoms von *E. coli* liegt bei etwa 49 % (Blattner *et al.*, 1997) und der der fünf Chromosomen von *A. thaliana* bei ca. 65 % (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Der Promotor P KCO1 aus *A. thaliana* liegt mit einem AT-Gehalt von 66,7 % nur gering über dem AT-Gehalt des Genoms. Die AT-Gehalte der Promotoren aus *S. tuberosum* betragen 64,3 % für den P B33 bis 76,6 % für den P SKT2. Diese hohen AT-Gehalte können dazu beitragen, dass diese Sequenzen von der prokaryontischen Transkriptionsmaschinerie zur Initiation genutzt wurden.

Die Korrelation zwischen der möglichen Genexpression bzw. Genexpressionsstärke der untersuchten Promotoren in bezug auf das Vorhandensein von potentiellen Konsensus Sequenzen in diesen Promotoren gestaltet sich u. a. deswegen als schwierig, da eine Vorhersage möglichst für mehrere Spezies getroffen werden sollte. Demeler und Zhou (1991) entwickelten ein Programm zur Vorhersage von *E. coli*-Promotoren durch die Verwendung eines neuronalen Netzwerkes. Dabei konnte mit optimalen Parametern eine Vorhersagegenauigkeit von bis zu 100 % getroffen werden. Diese Vorhersage wurde jedoch nur für *E. coli* demonstriert, dessen Promotorsequenzen am besten untersucht sind (Hawley und McClure, 1983; Harley und Reynolds, 1987; Lissner und Margalit, 1993). Die Anwendung von Algorithmen zur Erkennung von Promotorsequenzen, welche für *E. coli*- bzw. *B. subtilis*-Promotoren entwickelt wurden, lassen sich nicht unbedingt auf andere Bakterienarten anwenden. Wenn sie dann auf andere Bakterienarten angewandt wurden, wie z. B. auf *Helicobacter pylori* (Vanet *et al.*, 1999), so fehlte der Vergleich zu den ermittelten Konsensus Sequenzen durch experimentelle Daten.

Um vor allem die Stärke von Promotoren in Prokaryonten beurteilen zu können, genügt es nicht, nach den Konsensus Sequenzen und dem Abstand der Boxen zueinander zu suchen. Die DNA-Konformation als auch die elektrostatische Bindung innerhalb der Promotoren sind von

großer Bedeutung (Nickerson und Achberger, 1995; Geiselman, 1997; Dai und Rothman-Denes, 1999) sowie das Vorhandensein von Bindungsstellen für bakterielle Transkriptionsaktivatoren (Busby und Ebright, 1994; Vicente *et al.*, 1999) und/oder das Vorhandensein des UP-Elements (Ross *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1994). In Eukaryonten ist die Problematik noch größer, da die basale Transkription, d. h. die Transkriptionsinitiation durch die RNAP II mit ihren dazugehörigen GTFs an den Core-Promotor-Elementen wie TATA-Box und/oder Inr-Element *in vivo* nicht existent ist. Für die Transkription *in vivo* werden zusätzlich zu dem Core-Promotor noch wie einleitend beschrieben die 'promoter-proximal elements' und/oder Enhancer benötigt (Johnson und McKnight, 1989; Mitchell und Tjian, 1989; Zawel und Reinberg, 1995; Fassler und Gussin, 1996; Orphanides *et al.*, 1996; Hampsey, 1998). Außerdem hat in Eukaryonten die Chromatinstruktur einen regulierenden Einfluß auf die Transkription (Paranjape *et al.*, 1994; Kornberg und Lorch, 1995; Struhl, 1999).

Diese Problematik spiegelt auch das Ergebnis der Computer-gestützten Suche in den bakteriellen und Plastiden Promotoren nach der eukaryontischen TATA-Box wieder. Bei der Analyse für den P ClpP wurden acht Treffer, für P AccD fünf, für P RpoB und P RbcL vier bzw. drei, sowie für die Promotoren P PsbA, P NptIII und P Bla je zwei Treffer gefunden. Nur für zwei Promotoren (P Lac und P AtpB) wurden keine Treffer festgestellt. Im Gegensatz zu der hohen Expressionsrate der pflanzenspezifischen Promotoren in Prokaryonten in Kombination mit der hohen Anzahl der Treffer, kam es bei den bakteriellen bzw. Plastiden Promotoren nur in einem einzigen Fall, dem P AccD, zu einer sehr geringen Expression.

Die Frage nach einer Möglichkeit der Vorhersage der Expression in Prokaryonten ausgehend von eukaryontischen Promotorsequenzen durch den Nachweis von weiteren Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren scheint auch nicht vielversprechender. Die Transkriptionsfaktoren der Eukaryonten zeichnen sich durch eine große Vielfältigkeit aus und sind dann auch über große Distanzen des Promotors verteilt (Vanet *et al.*, 1999). Eine Untersuchung in *A. thaliana* hatte gezeigt, dass fast 6 % des Genoms für mehr als 1500 Transkriptionsfaktoren kodieren (Riechmann *et al.*, 2000). Nur 8 bis 23 % der *Arabidopsis* Proteine, welche Funktionen innerhalb der Transkription einnehmen, zeigten verwandte Gene in anderen eukaryontischen Genomen. Ursache hierfür ist die unabhängige Evolution von vielen pflanzlichen Transkriptionsfaktoren (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Bei dieser Spezifität pflanzlicher Transkriptionsfaktoren ist die geringe Expression der bakteriellen bzw. Plastiden Promotoren in *N. tabacum* verständlich. Ein weiteres Problem ist, dass für viele Transkriptionsfaktoren die Erkennungssequenzen noch nicht charakterisiert wurden. Der Nachweis einer perfekten Bindungsstelle auf der DNA-Sequenz des Promotors

muß andererseits nicht immer der Beweis dafür sein, dass unter bestimmten Bedingungen der korrespondierende Faktor bei der Transkription des Gens vorhanden ist (Pedersen *et al.*, 1999). Trotz alledem wäre die Verbindung einer Computer-gestützten Suche nach den Core-Promotor-Elementen wie TATA-Box und/oder Inr-Element in eukaryontischen Promotoren in Verbindung mit Erkennungssequenzen für weitere Transkriptionsfaktoren, welche in bestimmten Wachstumsphasen in den jeweiligen Geweben zu einer Genexpression führen könnten, sehr viel aussagekräftiger. Jedoch kann diese Methode zur Vorhersage der Erkennung von Promotorsequenzen nach Übertragung in Organismen anderer 'kingdoms' nicht angewandt werden.

#### 4.2.2 Transkriptionsstartbestimmungen

Durch die Bestimmung der Transkriptionsstarts ausgewählter Promotor-*luxAB*- und/oder Promotor-*cat*-Fusionen sollte geklärt werden, ob die durch die Computer-gestützte Suche gefundenen potentiellen Konsensus Sequenzen in den pflanzenspezifischen Promotoren für die Transkriptionsinitiation durch die bakterielle RNAP verantwortlich waren. Für die vier untersuchten pflanzenspezifischen Promotoren P ST-LS1, P 35S, P Nos und P KST1 traf keine der durch Computeranalyse gefundenen Konsensus Sequenzen als mögliche Erkennungssequenz für die bakterielle RNAP zu.

Für die Promotoren P ST-LS1 und P Nos wurde mit der Methode der 5'-RACE nur ein Transkriptionsstart innerhalb der DNA-Sequenz der pflanzenspezifischen Promotoren ermittelt. Für den P 35S wurden zwei mRNA-Starts ermittelt. Die Transkripte des P KST1 starteten in der MCS, wobei die für die Bindung der bakteriellen RNAP vorhandenen Konsensus Sequenzen innerhalb der Promotor-Sequenz lagen. Den ermittelten Transkriptionsstarts konnten ohne Computer-gestützte Analyse mögliche -35- und -10-Regionen zugeteilt werden. Hierbei wurde vor allem auf den Abstand des Transkriptionsstarts von der -10-Region mit fünf bis neun nt geachtet und auf den Abstand der beiden Konsensus Hexamere zueinander, welcher optimal bei 16 bis 18 nt liegt (Harley und Reynolds, 1987). Die nach dieser Methode ermittelten potentiellen -35- und -10-Regionen wichen meistens in einer der beiden Hexamere von der geforderten Nukleotidzusammensetzung der Computer-gestützten Suche ab, so dass es nicht zu einem Treffer kam. So befindet sich z. B. bei dem P KST1 vier bis acht nt stromaufwärts des Transkriptionsstarts eine konservierte -10-Region mit der Sequenz TATAAT. Die Erkennung durch die Computer-gestützte Suche fand nicht statt, da die 17 nt stromaufwärts liegende potentielle -35-Region die Sequenz TCAACA hatte. Würde man die Parameter der Konservierung der Nukleotide für die -35- und -10-Regionen bzw. der 'extended -10-

Region' bei der Computer-gestützten Suche nach den Konsensus Sequenzen weniger stringent gestalten, würde man sehr viel mehr Treffer erzielen. Diese Vielzahl von Treffern erhöht natürlich die Chance, die für die Bindung der RNAP verantwortlichen Sequenzen zu finden, jedoch erhöht sich die Zahl der nicht verantwortlichen Bindungsstellen um ein Vielfaches.

Für die beiden Subklone des P ST-LS1, den P ST-LS1.1 und P ST-LS1.2, führten die Computer-gestützten Suchen zu den potentiellen Bindungsstellen für die jeweiligen RNAPs. Die Zuordnung dieser Sequenzen nach Transkriptionsstartanalyse ergab für den P ST-LS1.1 sechs Nukleotide stromaufwärts die Sequenz TACCAT als potentielle  $-10$ -Region und drei mögliche  $-35$ -Regionen im Abstand von 17 bis 19 nt von der  $-10$ -Region. Für den P ST-LS1.2 wurde sieben nt stromaufwärts des Transkriptionsstarts durch die Computer-gestützte Analyse eine  $-10$ -Region gefunden, deren Sequenz eine 100 %ige Übereinstimmung zu der Konsensus Sequenz TATAAT zeigte. In Abhängigkeit von der  $-10$ -Region befanden sich 19 bzw. 20 nt stromaufwärts zwei mögliche  $-35$ -Regionen. Dies zeigt ebenfalls nochmals, dass für die Expressionsstärke von Promotoren nicht nur die Übereinstimmung zur Konsensus Sequenz wichtig ist, sondern auch der Abstand der beiden Konsensus Hexamere zueinander. Der Subklon P ST-LS1.2 besitzt zwar die konservierteste  $-10$ -Region, jedoch ist der Abstand mit 19 bis 20 nt zu der  $-35$ -Region nicht optimal. Dieser Subklon exprimierte die *luxAB*-Gene im Vergleich zu den Subklonen P ST-LS1.1 und P ST-LS1.3 am geringsten. Der Subklon P ST-LS1.1 zeigte zwar für die  $-35$ - und  $-10$ -Region nur Übereinstimmungen von drei bzw. vier gegenüber den sechs Nukleotiden der Konsensus Sequenz, der Abstand war jedoch für zwei der potentiellen  $-35$ -Regionen mit 17 und 18 nt optimal. P ST-LS1.1 exprimierte die *luxAB*-Gene vierfach höher als P ST-LS1.2.

Übereinstimmende Transkriptionsstarts wurden für den WT-Promotor P ST-LS1 und den Subklon P ST-LS1.3 trotz der unterschiedlichen Expressionshöhen festgestellt. Somit waren für die erhöhte Expressionsstärke des Subklons nicht zusätzliche Transkriptionsstarts verantwortlich, sondern eine spezifischere Bindung der RNAP an die  $-35$ - und  $-10$ -Region (siehe Kap. 4.3).

Die Transkriptionsstarts der Promotor-*cat*-Fusionen von P ST-LS1 und P Nos waren identisch mit denen der jeweiligen Promotor-*luxAB*-Fusionen. Im Falle des pKKNos ist dieses Ergebnis bemerkenswert, da die *cat*-Fusion des Nos-Promotors zu einer sehr starken Expression, erkennbar als Wachstum auf Chloramphenicol-haltigen Agarplatten, führte.

In *E. coli* lag der Transkriptionsstart für pKKNos und pKKNoslux 17 nt stromaufwärts von dem pflanzlichen Transkriptionsstart. Die pflanzliche TATA-Box wurde vermutlich auch in *E. coli* zur Transkriptionsinitiation für die RNAP als potentielle  $-10$ -Region genutzt.

Die Transkriptionsstartanalyse und die Relation der Lumineszenzwerte des pKKNoslux und pNoslux in *E. coli* deuten darauf hin, dass der Basenaustausch 148 nt stromaufwärts der TATA-Box in dem pBin-Konstrukt (pNoslux) keine Auswirkungen auf die Expression der nachgeschalteten Gene in *E. coli* hatte. Nach einer Analyse von Shaw *et al.* (1984) sind für die Expression der Nopalinsynthase in *Kalanchoe daigremontiana* mit einer Stärke, die der des Wildtyps entspricht nur 88 bp stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle in Pflanzen nötig. Diese Sequenz beinhaltet TATA- und CAAT-Box, welche für die unverminderte Expression in der Pflanze benötigt werden. Sequenzen die weiter stromaufwärts liegen sind für die komplexere Expression der *nos*-Gene in Pflanzen gegenüber Bakterien nicht notwendig.

Eine Transkriptionsstartbestimmung des P 35S aus CaMV wurde bereits von Assaad und Signer (1990) in *E. coli* durchgeführt. Sie analysierten die Starts mittels 'RNase Protection Assay'. Assaad und Signer charakterisierten einen schwachen Transkriptionsstart drei bzw. vier Nukleotide stromabwärts des mittels 5'-RACE in dieser Arbeit gefundenen Starts. Zur Transkriptionsinitiation nutzt die bakterielle RNAP hier wie in P Nos die TATA-Box als -10-Region. Ein weiterer, starker Transkriptionsstart wurde von Assaad und Signer an Position -315 bezogen auf den pflanzlichen Transkriptionsstart festgestellt. Dieser Start wurde mit der 5'-RACE nicht gefunden. Stattdessen wurde mit der Methodik der RACE ein weiterer Start 13 nt stromaufwärts der CAAT-Box kartiert.

Die Methode der 5'-RACE wurde vor allem zur Charakterisierung von 5'-Enden von mRNAs in Eukaryonten beschrieben (Frohman *et al.*, 1988). Die Etablierung dieser Methode für Transkriptionsstartbestimmungen in Prokaryonten setzt eine hohe Qualität der RNA vor allem der mRNA voraus. Wohingegen z. B. bei der Methode des 'S1-Mappings' direkt mit der mRNA gearbeitet wird, wird im Falle der RACE die mRNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Starke Sekundärstrukturen der mRNAs können zum Anhalten und Abfallen der Reversen Transkriptase führen. Dies würde dazu führen, dass vor allem lange Transkripte nicht in die cDNA umgeschrieben werden. Ein Erhitzen der RNA vor dem Umschreiben durch die Reverse Transkriptase sollte eigentlich möglichen Sekundärstrukturen entgegenwirken.

Ein Nachteil der Charakterisierung der Transkriptionsstarts mittels 5'-RACE ist eine Ungenauigkeit bei der Kartierung des Transkriptionsstarts bei Vorhandensein einer oder mehrerer Guaninbasen (G) am 5'-Ende des Transkripts. Zur Erkennung durch den Ankerprimer wird an die cDNA ein Cytosin-Schwanz angehängt. Bilden Guaninbasen den Transkriptionsstart ist die Transkriptionsstartbestimmung auf ein Nukleotid genau durch diese Methode nicht möglich.

### 4.3 Analyse des ST-LS1-Promotors

Der Promotor des ST-LS1-Gens aus *S. tuberosum* war in der Lage, in den fünf untersuchten Bakterienarten *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. eine Expression der Reportergene zu verursachen. Die Expressionseigenschaften des P ST-LS1 wurden in Pflanzen ebenfalls sehr genau untersucht. Der zur Herstellung von gentechnisch veränderten Pflanzen eingesetzte WT-Promotor P ST-LS1 umfasst mit 1600 bp sehr viel mehr DNA-Sequenz als der Core-Promotor. Stockhaus *et al.* (1987) untersuchten, welche DNA-Sequenzen des Promotors für eine Transkription nachgeschalteter Gene in Pflanzen nötig waren. Für eine lichtinduzierbare Expression des fusionierten *cat*-Gens in Tabak wurden 334 nt des 3'-Endes des Promotors benötigt. Die Expressionsstärke ausgehend von dem WT-Promotor mit 1600 bp war jedoch dreifach höher. Eine Fusion von 130 nt des 3'-Endes des P ST-LS1 mit dem *cat*-Gen, welche sowohl die TATA- als auch die CAAT-Box beinhaltete, reichte für eine Expression in der Pflanze nicht aus. Für die starke Expression des WT-Promotors P ST-LS1 innerhalb der Pflanzen waren positiv regulierende Elemente im Bereich von -530 bis -261 bezogen auf den pflanzlichen Transkriptionsstart verantwortlich (Stockhaus *et al.*, 1989b).

Diese Untersuchungen sind von Bedeutung, da sie darauf hinweisen, dass eine Verkleinerung des WT-Promotors von 1600 bp auf 334 bp bei Beibehaltung der induzierbaren jedoch nicht vollständigen Expression in Pflanzen, die Möglichkeit der heterologen Expression bei einem Gentransfer in Prokaryonten minimieren könnte. Dies wäre nicht nur für die Risikobewertung gentechnisch veränderter Pflanzen vorteilhaft, sondern würde auch die durch Transformation inserierte DNA in transgenen Pflanzen von überflüssigen Sequenzen befreien.

Drei Teilfragmente des P ST-LS1 mit Größen von 446 bp (P ST-LS1.2), 511 bp (P ST-LS1.3) und 607 bp (P ST-LS1.1) wurden mit den *luxAB*-Genen fusioniert und in pKK232-8 auf Expression in *E. coli* untersucht. Hierbei führte jeder dieser Subklone zu einer höheren Expression als der WT-Promotor mit 1600 bp. Das Promotorfragment (pKKST-LS1.3lux) mit den 334 bp, welche für eine induzierbare Expression in Pflanzen benötigt würden, führte zu einer Expression der *luxAB*-Gene in *E. coli*, die 2,5-fach höher war als die des WT-Promotors. Im Gegensatz zu dem Ergebnis der beiden Promotoren des FB Pase-Gens (P FB P1,1 und P FB P1,7) führte hier die Verkleinerung des P ST-LS1 am 5'-Ende um ca. 1100 bp zu einer Erhöhung der Expression. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Verkürzung der Promotor-DNA zu einer spezifischeren Bindung der RNAP an die Konsensus Sequenzen führte. Die Expressionsstärke der beiden weiteren Subklone zeigte, dass die RNAP auf diesen Sequenzen ausreichend Bindungsstellen findet, um die



Transkription zu initiieren. Durch die Verkürzung des Promotors kam es zur Konzentrierung der RNAP an der Konsensus Sequenz.

Somit kann resümierend festgestellt werden, dass im Falle des P<sub>ST-LS1</sub> die Verkürzung der Promotor-DNA am 5'-Ende nicht zu einer geringeren heterologen Genexpression in *E. coli* führte. Damit entfiel diese Möglichkeit der Herstellung eines 'sicheren Vektors'.

Die Transkriptionsstartbestimmung des P<sub>ST-LS1</sub> ergab für *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *A. tumefaciens*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. den identischen Start zwölf bzw. 13 nt stromabwärts der pflanzlichen TATA-Box. Direkt stromabwärts der TATA-Box und fünf bzw. sechs nt stromaufwärts des bakteriellen Transkriptionsstarts, lag mit der Sequenz CATACT eine potentielle -10-Region zur Erkennung durch die bakterielle RNAP. Durch ortsspezifische Basenaustausche innerhalb dieser Region wurden sogenannte 'up'- und 'down-Mutanten' hergestellt. Bei den 'up-Mutanten' wurde die Sequenz entsprechend einer optimierten -10-Region mit TATAAT und für die 'extended -10-Region' mit TGTTATAAT verändert. Bei zwei der 'down-Mutanten' wurden die an Position zwei und sechs liegenden, stark konservierten Basen Adenin und Thymin (CATACT) nach Guanin (CGTACG) bzw. Cytosin (CCTACC) verändert. Eine weitere 'down-Mutante' wies mit der Sequenz CACGCT eine Veränderung der Basen Thymin und Adenin an den Positionen drei und vier gegenüber der Ausgangssequenz (CATACT) auf.

Die 'up-Mutanten' führten in *E. coli*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. zu einer eindeutigen Erhöhungen der Expression. Für die Mutante mit der optimierten -10-Region wurde eine 3,5-fach höhere Expression gegenüber dem WT-Promotor in den Bakterienstämmen *E. coli* und *Acinetobacter* sp. gemessen. In *P. putida* führte diese Mutante zu einer Verdoppelung der Expression gegenüber der WT-Promotor. Die Expression der Mutante mit der 'extended -10-Region' führte in *E. coli* zu einer zwölffach höheren, in *P. putida* zu einer 16-fach höheren und in *Acinetobacter* sp. zu einer neunfach höheren Expression der zu transkribierenden Reportergene gegenüber dem WT-Promotor. Für *E. coli*, *P. putida* und *Acinetobacter* sp. konnte somit die Aussage bestätigt werden, dass im Allgemeinen die Stärke eines Promotors darüber definiert wird, wie ähnlich die -35- und -10-Regionen den Konsensus Sequenzen bei einem optimalen Abstand von  $17 \pm 1$  nt der beiden Regionen zueinander sind (Busby und Ebright, 1994). Außerdem führte das TG-Motiv der 'extended -10-Region' bei Vorhandensein der -35-Region zur Erhöhung der Genexpression (Chan und Busby, 1990).

Für die 'down-Mutanten' des P<sub>ST-LS1</sub> konnte in *E. coli* ein Fünftel der Expression gegenüber dem WT-Promotor gemessen werden. In *Acinetobacter* sp. führten die 'down-Mutanten' zu einer halb so starken Expression gegenüber dem WT-Promotor. In *P. putida* führten sie allerdings zu keiner Erniedrigung der Expression. Die 'up-Mutanten' in

*Y. enterocolitica* zeigten ein verzögertes Wachstum, so dass die Beurteilung der sehr schwachen Steigerung der Expression dieser Mutanten nur unter Vorbehalt geschehen kann. Die 'down-Mutanten' des P ST-LS1 führten in *Y. enterocolitica* nur zu einer unwesentlichen Verringerung der Expression. In *A. tumefaciens* führten sogar alle Mutanten des P ST-LS1 zu einer Erniedrigung der Genexpression gegenüber dem WT-Promotor. Bei der Darstellung der 5'-RACE-Produkte des P ST-LS1 im Agarosegel (Kap. 3.1.4.1, Abb. 28) fiel die Bande des Haupttranskripts in *A. tumefaciens* sehr schwach aus. *A. tumefaciens* zeigte neben dem Haupttranskript noch weitere schwache Banden, an denen möglicherweise nach Veränderung der -10-Region die Transkription verstärkt startete. Auch für *Y. enterocolitica*, *Acinetobacter* sp. und *P. putida* zeigten die RACE-Produkte im Gel ein ca. 100 bp größeres Transkript, jedoch mit einer viel schwächeren Intensität gegenüber dem Haupttranskript. Die direkte Sequenzierung der RACE-Produkte des P ST-LS1 ergab für alle untersuchten Bakterienarten den identischen Transkriptionsstart. Auch die Klonierung der RACE-Produkte aus den unterschiedlichen Bakterienarten ergab keine weiteren im Pflanzenpromotor befindlichen Starts. Trotzdem führten die Mutationen des P ST-LS1 zu unterschiedlichen Expressionsverhalten in den untersuchten Bakterienarten. Wie in Kap. 4.1 schon diskutiert, wurden die Konsensus Sequenzen für die -35- und -10-Region vor allem in *E. coli* untersucht. Diese -35- und -10-Konsensus Sequenzen und deren Abstände zueinander, sowie der Abstand der -10-Region zum Transkriptionsstart, können nicht auf alle weiteren Gram-negativen Bakterien übertragen werden. Wösten *et al.* (1998b), die sich mit der Untersuchung der -35- und -10-Konsensus Sequenzen in *C. jejuni* befassten, stellten ebenfalls resümierend fest, dass die Promotorsequenzen von Bakterien durch experimentelle Methoden wie z. B. Charakterisierungen der Transkriptionsstarts bestimmt werden müssen, da sie andere Sequenzmotive als die bekannten aus *E. coli* und *B. subtilis* beinhalten können.

Die Untersuchungen der *luxAB*-Transkripte ausgehend von den mutagenisierten Promotoren des P ST-LS1 erfolgten nur in *E. coli*. Die Veränderungen der Transkriptmengen je nach Mutante des P ST-LS1 gegenüber dem WT-Promotor, konnten mittels Northern Hybridisierung nochmals bestätigt werden. Die Charakterisierungen der Transkriptionsstarts der beiden 'up-Mutanten' ergaben den für den WT-Promotor beschriebenen Transkriptionsstart zwölf bzw. 13 nt stromabwärts der eukaryontischen TATA-Box.

Das Expressionsverhalten der drei 'down-Mutanten' des P ST-LS1 wurde in *N. tabacum* überprüft. Zwei der 'down-Mutanten', in denen das Adenin und Thymin der Ausgangssequenz (CATACT) durch Guanin (CGTACG) bzw. Cytosin (CCTACC) ersetzt wurde, zeigten bei der Untersuchung der transienten Expression keine Veränderung der Expression gegenüber dem WT-Promotor. Die dritte 'down-Mutante' des P ST-LS1, bei

welcher die Veränderung der Basen Thymin und Adenin der Ausgangssequenz (CATACT) an den Positionen drei und vier zu der Sequenz CACGCT führte, zeigte in dem transienten Versuch eine verminderte Expression gegenüber der Expression des WT-Promotors in *N. tabacum*. Die Herstellung stabiler, transgener Tabakpflanzen durch *Agrobacterium*-vermittelten Transfer, zeigte für alle drei 'down-Mutanten' eine unverminderte Expression im Vergleich zum WT-Promotor.

Die unterschiedlichen Substitutionen zweier Basen stromabwärts der pflanzlichen TATA-Box, welche die Expressionen in zwei der fünf Bakterienarten verminderten, hatten daher keine Auswirkungen auf das Expressionsverhalten der Promotoren in der Pflanze. Somit konnte für die Sequenzen der 'down-Mutanten' des P ST-LS1 gezeigt werden, dass die Herstellung eines 'optimierten Vektors' möglich ist. Jedoch kann man nicht davon ausgehen, dass ein vermindertes Expressionsverhalten dieser Mutanten in *E. coli* ebenfalls in weiteren Bakterienarten zu einer Erniedrigung der Expression führt. So sollte man in Hinblick auf die Risikobewertung für die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen Promotoren einsetzen, welche von vornherein eine niedrige Expression in mehreren Bakterienarten aufweisen. Hierfür würde sich z. B. der RolC-Promotor eignen, welcher in keiner der untersuchten Bakterienarten zu einer Expression führte. Dieser Promotor eignet sich für die Herstellung transgener Pflanzen auch deswegen besonders gut, da er zu einer Expression der eingeführten Gene in bestimmten Gewebetypen, in Phloemzellen und vaskulärem Parenchym, führte (Yokoyama *et al.*, 1994, Graham *et al.*, 1997). So könnte der P RolC z. B. gezielt eingesetzt werden, um 'Potato Leafroll Luteovirus'-resistente (PLRV) Kartoffellinien herzustellen, da sich dieses Virus nur in Phloemgewebe vermehrt (Graham *et al.*, 1997).

#### 4.4 Schlußfolgerungen

Die Untersuchung der Expressionseigenschaften von Promotoren über 'kingdom'-Grenzen hinaus zeigte eindeutig, dass eukaryontische Promotoren in Eubakterien mit einer viel größeren Wahrscheinlichkeit zu einer Expression nachgeschalteter Gene führten als bakterielle oder Plastiden Promotoren in Eukaryonten. In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass DNA-Sequenzen aus *S. cerevisiae* in fast 80 % der untersuchten Sequenzen zu einer Expression in *E. coli* führten (Tran, 2001). Hierbei wurden nicht gezielt Promotorsequenzen aus *S. cerevisiae* auf Expression in *E. coli* untersucht, sondern durch 'shot-gun'-Klonierungen erhaltene willkürliche DNA-Sequenzen mit den promotorlosen *luxAB*-Genen fusioniert und deren Expression bestimmt. Auch drei von vier untersuchten viralen Promotoren (Polyhedrin-Promotor des Baculo Virus, Thymidin-Kinase-Promotor des Herpes Simplex Virus, early Promotor des Cytomegalie Virus, early

Promotor des Simian Virus 40), welche in gängigen Vektoren für die Expression inserierter Gene in Zellkulturen genutzt werden, führten zu Expressionen nachgeschalteter Gene in *E. coli* (Chusainow, 2000). Bei den pflanzenspezifischen Promotoren, welche in 50 % der getesteten Kombinationen aus Promotor und Bakterienstamm zu einer Expression nachgeschalteter Gene führten, wurde in zwei Fällen die pflanzliche TATA-Box als -10-Region zur Transkriptionsinitiation durch die bakterielle RNAP genutzt. Diese Ergebnisse spiegeln einerseits die unterschiedliche Komplexität der Transkriptionsmaschinerien aus Prokaryonten und Eukaryonten wieder und bestätigen andererseits die Hypothese der Konservierung der Transkriptionsmaschinerie während der Evolution (Sentenac *et al.*, 1992; Fassler und Gussin, 1996; Soppa, 1999; Ebricht, 2000; Minakhin *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass bei der Herstellung von GVOs heterologe Genexpression vor allem in Prokaryonten stattfinden kann, wenn dadurch Sequenzen eingeführt werden, die durch die bakterielle RNAP zur Transkriptionsinitiation genutzt werden können. Vor allem bei der Herstellung von Expressionsvektoren sollte darauf geachtet werden, dass eine Expression der übertragenen Gene nur spezifisch in dem Zielorganismus erfolgt.

Eine Fragestellung, welche stark in der Literatur diskutiert wird, ist die Möglichkeit der Übertragung von DNA gentechnisch veränderter Pflanzen auf Bakterien. Damit die DNA von transgenen Pflanzen auf Bakterien übertragen und exprimiert werden kann, müssen mehrere aufeinanderfolgende biologische Ereignisse eintreten: die DNA muss durch Degradierung der Pflanzenzellen freigesetzt werden, es müssen transformierbare Bakterien vorhanden sein, die transgene DNA muss in die Erbsubstanz des Bakteriums integrieren und die DNA muss exprimiert werden. Durch diese Vielzahl von aufeinander folgenden Ereignissen wird der Fall eines horizontalen Gentransfers unter natürlichen Bedingungen als gering eingeschätzt (Nap *et al.*, 1992; Schlüter *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1998; de Vries *et al.*, 2001; Mercer *et al.*, 2001).

Im Erdboden gibt es nur wenige bekannte natürlich transformierbare Bakterien (Lorenz und Wackernagel, 1994; Paget und Simonet, 1994) und diese Bakterien finden selten Konditionen bei denen sie eine natürliche Kompetenz entwickeln können (Bertolla und Simonet, 1999b), welche für die Möglichkeit eines Gentransfers Voraussetzung ist. Untersuchungen zur Degradierung von DNA im Erdboden haben gezeigt, dass diese durch Bindung z. B. an Ton für Wochen persistieren kann und trotzdem von kompetenten Bakterien aufgenommen werden kann (Paget *et al.*, 1992; Gallori *et al.*, 1994). Nicht gebundene hochmolekulare DNA wird jedoch schnell durch die im Boden befindlichen DNasen

degradiert (Blum *et al.*, 1997). Das Persistieren von transgener Pflanzen-DNA im Boden über einen längeren Zeitraum wurde ebenfalls schon beschrieben (Widmer *et al.*, 1997; Paget *et al.*, 1998; Gebhard und Smalla, 1999). Dass kompetente Bakterien unter Laborbedingungen und bei Anwesenheit homologer bakterieller DNA-Sequenzen im Pflanzengenom in der Lage sind DNA von transgenen Pflanzen aufzunehmen (Gebhard und Smalla, 1998; de Vries *et al.*, 1998; 2001; Nielsen *et al.*, 2000; Kay *et al.*, 2002), wurde einleitend beschrieben. In einem vor kurzem veröffentlichten Experiment konnten Kay *et al.* (2002) die Übertragung des *aadA*-Gens, einem Gen welches Resistenz für Spektinomycin und Streptomycin vermittelt, aus transgenen Tabakpflanzen auf *Acinetobacter* sp. BD413 nachweisen. Hierfür wurde der Stamm *Acinetobacter* sp. BD413 zusätzlich mit DNA-Sequenzen des Chloroplasten Genoms versehen, da der Tabak über die gentechnisch Veränderung des Chloroplasten Genom hergestellt wurde. Der transgene Tabak wurde mit *Ralstonia solanacearum* und *Acinetobacter* sp. BD413 koinfiziert. *R. solanacearum* ist ein pflanzenpathogenes Bakterium, welches sich in der Wirtspflanze vermehrt und über das vasikuläre Gewebe die Pflanze kolonisiert. Dabei entstehen Konditionen, die einen Gentransfer von Pflanzen-DNA begünstigen (Bertolla *et al.*, 1999a). Der Gentransfer von Pflanzen-DNA auf *R. solanacearum* wurde nicht detektiert. Der *Acinetobacter* sp. Stamm war jedoch in der Lage, den mit *R. solanacearum* infizierten transgenen Tabak zu kolonisieren, seine natürliche Kompetenz (Nielsen *et al.*, 1997) zu entwickeln, das *aadA*-Gen aufzunehmen und einen Spektinomycin-resistenten Phänotyp auszubilden. Ein detektierbarer Gentransfer war abhängig von dem Vorhandensein homologer Sequenzen des Plastoms aus *N. tabacum* in *Acinetobacter* sp. BD413.

Eine Möglichkeit zur Verhinderung der Expression eukaryontischer Gene in Bakterien ist das Einführen eines Introns in die kodierende Region des zu exprimierenden Gens (Ohta *et al.*, 1990; Vancanneyt *et al.*, 1990). Vancanneyt *et al.* (1990) klonierten das Intron 2 des ST-LS1-Gens aus *S. tuberosum* in die kodierende Region des *gus*-Gens, welche für die  $\beta$ -Glucuronidase kodiert. Da Prokaryonten nicht in der Lage sind, die pre-mRNA zu spleißen, werden keine vollständigen Transkripte, die zu einem funktionsfähigen Proteinen translatiert werden könnten, gebildet. Bei gentechnisch veränderten Pflanzen werden häufig Introns verwendet, um die Genexpression zu verstärken (Kozziel *et al.*, 1996; Simpson und Filipowics, 1996).

Bei den Methoden zur Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen kommt es immer zur Insertion von bakteriellen Sequenzen in das Pflanzengenom. Diese stellen die Voraussetzung der Übertragung der transgenen Pflanzen-DNA auf Bakterien dar. Gerade auch bei der Insertion der Transgens in das Chloroplasten Genom (Daniell *et al.*, 2001; Maliga, 2002) kommt es zur Vervielfachung des Markergens, welches häufig ein Antibiotikumresistenzgen

ist. Die Ausbreitung von Antibiotikumresistenzen durch deren Anwendung in der Landwirtschaft (Witte, 1998) oder deren Vorhandensein in Lebensmitteln (Perreten *et al.*, 1997) stellt sowieso schon ein Problem dar. Deswegen müssen neue Methoden zur Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen angewandt werden, die das Risiko der Übertragung von Antibiotikumresistenzgenen aus gentechnisch veränderten Pflanzen auf Bakterien und damit auch die Diskussion darüber vermindern und die Akzeptanz dieser GVOs erhöhen. Daniell *et al.* (2001) stellten durch Transformation der Chloroplasten gentechnisch veränderte Pflanzen her, welche statt eines Antibiotikumresistenzgenes das Gen der Betain Aldehyd-Dehydrogenase aus Spinat zur Selektion beinhalten.

In der Zukunft werden gentechnisch veränderte Organismen vor allem auch für die Produktion von Therapeutika und Impfstoffe eingesetzt werden. Das Ziel der genetischen Veränderung ist die Produktion eines spezifischen Proteins. Hierfür sollten Expressionsvektoren eingesetzt werden, deren Kontrollelemente für die Genexpression gut charakterisiert sind. Bei einem erhöhten Gefährdungspotential für die Umwelt durch einen möglichen Gentransfer, sollte durch experimentelle Untersuchungen eine Expression dieser Gene unter Übertragung der benutzten Kontrollelemente möglichst ausgeschlossen werden. Eine Risikobewertung allein basierend auf Computer-gestützter Analyse der DNA-Sequenz gibt nach den Untersuchungen in dieser Arbeit keinen Aufschluß darüber, ob und/oder in welchem Ausmaß eine Genexpression in heterologen Organismen stattfinden kann.

## 5 Literatur

- Ackerman, S., Flynn, P. A., Davis, E. A. (1987).** Partial purification of plant transcription factors. I. Initiation. *Plant Mol Biol* **9**: 147-158.
- Albright, S. R., Tjian, R. (2000)** TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* **242**: 1-13.
- Allison, L. A. (2000)** The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* **82**: 537-548.
- Allison, L. A., Maliga, P. (1995)** Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid *psbD* core promoter. *EMBO J* **14**: 3721-3730.
- Allison, L. A., Simon, L. D., Maliga, P. (1996)** Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J* **15**: 2802-2809.
- Arkhipova, I. R. (1995)** Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis. *Genetics* **139**: 1359-1369.
- Arthur, T. M., Burgess, R. R. (1998)** Localization of a  $\sigma^{70}$  binding site on the N terminus of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\beta'$  subunit. *J Biol Chem* **273**: 31381-31387.
- Artiguenave, F., Vilagines, R., Danglot, C. (1997)** High-efficiency transposon mutagenesis by electroporation of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *FEMS Microbiol Lett* **153**: 363-369.
- Assaad, F. F., Signer, E. R. (1990)** Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **223**: 517-520.
- Barik, S. (1996)** Site-directed mutagenesis *in vitro* by megaprimer PCR. *Meth Mol Biol* **57**: 203-215.
- Barne, K. A., Bown, J. A., Busby, S. J., Minchin, S. D. (1997)** Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *EMBO J* **16**: 4034-4040.
- Becker, D. (1990)** Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. *Nucl Acids Res* **18**: 203.
- Becker, J., Siegert, H., Logemann, J., Schell, J. (1994)** Begleitende Sicherheitsforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Petunien. In: Bundesministerium für Forschung und Technik (Edit.). *Biologische Sicherheit, Forschung Biotechnologie*, Band **3**: 563-578.
- Benfey, P. N., Chua, N.-H. (1990)** The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* **250**: 959-966.
- Beringer, J. E. (1974)** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188-198.

- Bertolla, F., Frostegard, A., Brito, B., Nesme, X., Simonet, P. (1999a)** During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 467-472.
- Bertolla, F., Simonet, P. (1999b)** Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Res Microbiol* **150**: 375-384.
- Bertolla, F., Pepin, R., Passelegue-Robe, E., Paget, E., Simkin, A., Nesme, X., Simonet, P. (2000)** Plant genome complexity may be a factor limiting in situ the transfer of transgenic plant genes to the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4161-4167.
- Bevan, M. (1984)** Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl Acids Res* **12**: 8711-8721.
- Blatter, E. E., Ross, W., Tang, H., Gourse, R. L., Ebright, R. H. (1994)** Domain organization of RNA polymerase  $\alpha$ -subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell* **78**: 889-896.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y. (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Bligny, M., Courtois, F., Thaminy, S., Chang, C. C., Lagrange, T., Baruah-Wolff, J., Stern, D., Lerbs-Mache, S. (2000)** Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J* **19**: 1851-1860.
- Blouin, K., Walker, S. G., Smit, J., Turner, R. F. B. (1996)** Characterization of *in vivo* reporter systems for gene expression and biosensor applications based on *luxAB* luciferase genes. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2013-2021.
- Blum, S. A. E., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1997)** Mechanisms of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in non-sterile soil. *Syst Appl Microbiol* **20**: 513-521.
- Bown, J. A., Barne, K. A., Minchin, S. D., Busby, S. J. W. (1997)** Extended -10 promoters. In: Eckstein, F., Lilley, D. M. J. *Nucleic Acids and Molecular Biology* **11**: 41-52. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bown, J. A., Owens, J. T., Meares, C. F., Fujita, N., Ishihama, A., Busby, S. J., Minchin, S. D. (1999)** Organization of open complexes at *Escherichia coli* promoters. Location of promoter DNA sites close to region 2.5 of the  $\sigma^{70}$  subunit of RNA polymerase. *J Biol Chem* **274**: 2263-2270.
- Brandt, P. (2000)** Gentechnisch veränderte Pflanzen der "Zweiten und Dritten Generation": Was können wir erwarten? *Bundesgesundheitsbl* **43**: 87-93.
- Breathnach, R., Chambon, P. (1981)** Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* **50**: 349-383.



- Broer, I., Droege-Laser, W., Gerke, M (1996)** Examination of the putative horizontal gene transfer from transgenic plants to *Agrobacteria*. In: Schmidt, E. R., Hankeln, T. (Edit.), *Transgenic Organism and Biosafety, Horizontal Gene Transfer, Stability of DNA and Expression of Transgenes*. 66-70.
- Brosius, J. (1984)** Plasmid vectors for selection of promoters. *Gene* **27**: 151-160.
- Bucher, P., Trifonov, E. N. (1986)** Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. *Nucl Acids Res* **14**: 10009-10026.
- Bucher, P. (1990)** Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol* **212**: 563-578.
- Burgess, R. R., Anthony, L. (2001)** How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Curr Opin Microbiol* **4**: 126-131.
- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., Bautz, E. K. F. (1969)** Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* **221**: 43-46.
- Burke, C., Yu, X. B., Marchitelli, L., Davis, E. A., Ackerman, S. (1990)** Transcription factor IIA of wheat and human function similarly with plant and animal viral promoters. *Nucl Acids Res* **18**: 3611-3620.
- Burke, T. W., Kadonaga, J. T. (1996)** *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* **10**: 711-724.
- Burke, T. W., Kadonaga, J. T. (1997)** The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAF<sub>II</sub>60 of *Drosophila*. *Genes Dev* **11**: 3020-3031.
- Burley, S. K., Roeder, R. G. (1996)** Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* **65**: 769-799.
- Busby, S., Ebright, R. H. (1994)** Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**: 743-746.
- Castanón, S., Marin, M. S., Martin-Alonso, J. M., Boga, J. A., Casais, R., Humara, J. M., Ordás, R. J., Parra, F. (1999)** Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* **73**: 4452-4455.
- Chalkley, G. E., Verrijzer, C. P. (1999)** DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF<sub>II</sub>250-TAF<sub>II</sub>150 complex recognizes the initiator. *EMBO J* **18**: 4835-4845.
- Chambers, P. A., Duggan, P. S., Heritage, J., Forbes, J. M. (2002)** The fate of antibiotic resistance marker genes in transgenic plant feed material fed to chickens. *J Antimicrob Chemother* **49**: 161-164.
- Chambers, R. S., Wang, B. Q., Burton, Z. F., Dahmus, M. E. (1995)** The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J Biol Chem* **270**: 14962-14969.

- Chan, B., Busby, S. (1989)** Recognition of nucleotide sequences at the *Escherichia coli* galactose operon P1 promoter by RNA polymerase. *Gene* **84**: 227-236.
- Chang, C. C., Sheen, J., Bligny, M., Niwa, Y., Lerbs-Mache, S., Stern, D. B. (1999)** Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell* **11**: 911-926.
- Cheng, J., Bolyard, M. G., Saxena, R. C., Sticklen, M. B. (1992)** Production of insect resistant potato by genetic transformation with a  $\delta$ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Plant Sci* **81**: 83-91.
- Cho, E. J., Buratowski, S. (1999)** Evidence that transcription factor IIB is required for a post-assembly step in transcription initiation. *J Biol Chem* **274**: 25807-25813.
- Christou, P. (1994)** Gene transfer to plants via particle bombardement. In: Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A., *Plant Molecular Biology Manual*. 2nd Edition. **A2**: 1-15. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- Chusainow, J. (2000)** Genexpressionsstudien zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit viraler Promotoren in Bakterien. Diplomarbeit, Technische Fachhochschule Berlin.
- Corden, J. L. (1990)** Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **15**: 383-387.
- Crowley, T. E., Hoey, T., Liu, J. K., Jan, Y. N., Jan, L. Y., Tjian, R. (1993)** A new factor related to TATA-binding protein has highly restricted expression patterns in *Drosophila*. *Nature* **361**: 557-561.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Mueller-Roeber, B. (1997)** New structure and function in plant  $K^+$  channels: KCO1, an outward rectifier with a steep  $Ca^{2+}$  dependency. *EMBO J* **16**: 2565-2575.
- Dahmus, M. E. (1996)** Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **271**: 19009-19012.
- Dai, X., Rothman-Denes, L. B. (1999)** DNA structure and transcription. *Curr Opin Microbiol* **2**: 126-130.
- Daniell, H., Muthukumar, B., Lee, S. B. (2001)** Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet* **39**: 109-116.
- Daniell, H., Wiebe, P. O., Fernandez-San Millan, A. (2001)** Antibiotic-free chloroplast genetic engineering - an environmentally friendly approach. *Trends Plant Sci* **6**: 237-239.
- Daniels, D., Zuber, P., Losick, R. (1990)** Two amino acids in an RNA polymerase sigma factor involved in the recognition of adjacent base pairs in the -10 region of a cognate promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8075-8079.
- Dantonel, J. C., Wurtz, J. M., Poch, O., Moras, D., Tora, L. (1999)** The TBP-like factor: an alternative transcription factor in Metazoa? *Trends Biochem Sci* **24**: 335-339.
- Das, A., Stachel, S., Ebert, P., Allenza, P., Montoya, A., Nester, E. (1986)** Promoters of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid virulence genes. *Nucl Acids Res* **14**: 1355-1364.

- de Vries, J., Meier, P., Wackernagel, W. (2001)** The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol Lett* **195**: 211-215.
- de Vries, J., Wackernagel, W. (1998)** Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol Gen Genet* **257**: 606-613.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., Timmis, K. N. (1990)** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**: 6568-6572.
- Delannay, X., LaVallee, B. J., Proksch, R. K., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T., Marrone, P. G., Dodson, R. B., Augustine, J. J., Layton, J. G., Fischhoff, D. A. (1989)** Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Bio/Technol* **7**: 1265-1269.
- Demeler, B., Zhou, G. W. (1991)** Neural network optimization for *E. coli* promoter prediction. *Nucl Acids Res* **19**: 1593-1599.
- Dickson, R. C., Abelson, J., Barnes, W. M., Reznikoff, W. S. (1975)** Genetic regulation: the *lac* control region. *Science* **187**: 27-35.
- Dombroski, A. J., Walter, W. A., Record, M. T. Jr, Siegele, D. A., Gross, C. A. (1992)** Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor  $\sigma^{70}$ . Exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* **70**: 501-512.
- Dombroski, A. J., Johnson, B. D., Lonetto, M., Gross, C. A. (1996)** The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8858-8862.
- Dombroski, A. J. (1997)** Recognition of the -10 promoter sequence by a partial polypeptide of  $\sigma^{70}$  *in vitro*. *J Biol Chem* **272**: 3487-3494.
- Douziech, M., Coin, F., Chipoulet, J. M., Arai, Y., Ohkuma, Y., Egly, J. M., Coulombe, B. (2000)** Mechanism of promoter melting by the *Xeroderma pigmentosum* complementation group B helicase of transcription factor IIIH revealed by protein-DNA photo-cross-linking. *Mol Cell Biol* **20**: 8168-8177.
- Droege, M., Puehler, A., Selbitschka, W. (1998)** Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. *J Biotechnol* **64**: 75-90.
- Duggan, P. S., Chambers, P. A., Heritage, J., Forbes, J. M. (2000)** Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiol Lett* **191**: 71-77.
- Ebright, R. H. (2000)** RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* **304**: 687-698.
- Eckes, P. Rosahl, S., Schell, J., Willmitzer, L. (1986)** Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. *Mol Gen Genet* **203**: 14-22.

- Ehrhardt, T., Zimmermann, S., Mueller-Roeber, B. (1997)** Association of plant K<sup>+</sup><sub>in</sub> channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Lett* **409**: 166-170.
- Escribano, J. M., Borca, M. V. (2000)** Immunogenicity of a recombinant coronavirus spike glycoprotein expressed in transgenic plants. *Bundesgesundheitsbl* **43**: 110-115.
- Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W., Gourse, R. L. (1998)** Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9761-9766.
- Evans, P. D., Cook, S. N., Riggs, P. D., Noren, C. J. (1995)** LITMUS: multipurpose cloning vectors with a novel system for bidirectional in vitro transcription. *Biotechniques* **19**: 130-135.
- Faitar, S. L., Brodie, S. A., Ponticelli, A. S. (2001)** Promoter-specific shifts in transcription initiation conferred by yeast TFIIB mutations are determined by the sequence in the immediate vicinity of the start sites. *Mol Cell Biol* **21**: 4427-4440.
- Fang, S. M., Burton, Z. F. (1996)** RNA polymerase II-associated protein (RAP) 74 binds transcription factor (TF) IIB and blocks TFIIB-RAP30 binding. *J Biol Chem.* **271**: 11703-11709.
- Fassler, J. S., Gussin, G. N. (1996)** Promoters and basal transcription machinery in eubacteria and eukaryotes: concepts, definitions, and analogies. *Meth Enzymol* **273**: 3-29.
- Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Henry, N. L., Kornberg, R. D. (1994)** Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIHK. *Cell* **79**: 1103-1109.
- Flanagan, P. M., Kelleher, R. J., Sayre, M. H., Tschochner, H., Kornberg, R. D. (1991)** A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription *in vitro*. *Nature* **350**: 436-438.
- Flores, O., Lu, H., Reinberg, D. (1992)** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIF. *J Biol Chem* **267**: 2786-2793.
- Flores, O., Maldonado, E., Burton, Z., Greenblatt, J., Reinberg, D. (1988)** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. RNA polymerase II-associated protein 30 is an essential component of transcription factor IIF. *J Biol Chem* **263**: 10812-10816.
- Forget, D., Robert, F., Grondin, G., Burton, Z. F., Greenblatt, J., Coulombe, B. (1997)** RAP74 induces promoter contacts by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7150-7155.
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., Hirth, L. (1980)** Nucleotide sequence of Cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* **21**: 285-294.
- Fray, R. G., Wallace, A. D., Grierson, D. (1994)** Identification of unexplained DNA fragments within the T-DNA borders of the Bin19 plant transformation vector. *Plant Mol Biol* **25**: 339-342.

- Freiman, R. N., Albright, S. R., Zheng, S., Sha, W. C., Hammer, R. E., Tjian, R. (2001)** Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAF<sub>II</sub>105 in ovarian development. *Science* **293**: 2084-2087.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R. (1988)** Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8998-9002.
- Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K., Takahashi, H. (2000)** Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase  $\sigma$  factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **481**: 47-52.
- Gallori, E., Bazzicalupo, M., Dal Conto, L., Fani, R., Nannipieri, P., Vettori, C., Stotzky, G. (1994)** Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. *FEMS Microbiol Lett* **15**: 119-126.
- Gardella, T., Moyle, H., Susskind, M. M. (1989)** A mutant *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J Mol Biol* **206**: 579-590.
- Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Roeder, R. G., Chua, N. H. (1990)** *Arabidopsis thaliana* contains two genes for TFIID. *Nature* **346**: 390-394.
- Gebhard, F., Smalla, K. (1998)** Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1550-1554.
- Gebhard, F., Smalla, K. (1999)** Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol Ecol* **000**: 1-12.
- Geiselmann, J. (1997)** The role of DNA conformation in transcriptional initiation and activation in *Escherichia coli*. *Biol Chem* **378**: 599-607.
- Gelvin, S. B., Gordon, M. P., Nester, E. W., Aronson, A. I. (1981)** Transcription of the *Agrobacterium* Ti plasmid in the bacterium and in crown gall tumors. *Plasmid* **6**: 17-29.
- Giangrande, A., Mettling, C., Martin, M., Ruiz, C., Richards, G. (1989)** *Drosophila* Sgs3 TATA: effects of point mutations on expression *in vivo* and protein binding *in vitro* with staged nuclear extracts. *EMBO J* **8**: 3459-3466.
- Gmuender, H., Kohli, J. (1989)** Cauliflower mosaic virus promoters direct efficient expression of a bacterial G418 resistance gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **220**: 95-101.
- Graham, M. W., Craig, S., Waterhouse, P. M. (1997)** Expression patterns of vascular-specific promoters RolC and Sh in transgenic potatoes and their use in engineering PLRV-resistant plants. *Plant Mol Biol* **33**: 729-735.
- Gralla, J. D., Carpousis, A. J., Stefano, J. E. (1980)** Productive and abortive initiation of transcription *in vitro* at the *lac* UV5 promoter. *Biochem* **19**: 5864-5869.
- Gray, M. W. (1993)** Origin and evolution of organelle genomes. *Curr Opin Genet Dev* **3**: 884-890.

- Gray, M. W. (1999)** Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 678-687.
- Greenblatt, J. (1997)** RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 310-319.
- Gruber, T. M., Bryant, D. A. (1997)** Molecular systematic studies of eubacteria, using  $\sigma^{70}$ -type sigma factors of group 1 and group 2. *J Bacteriol* **179**: 1734-1747.
- Gruissem, W., Tonkyn, J. C. (1993)** Control mechanisms of plastid gene expression. *Crit Rev Plant Sci* **12**: 19-55.
- Guo, Y., Gralla, J. D. (1998)** Promoter opening via a DNA fork junction binding activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11655-11660.
- Gustafsson, C. M., Samuelsson, T. (2001)** Mediator - a universal complex in transcriptional regulation. *Mol Microbiol* **41**: 1-8.
- Ha, I., Roberts, S., Maldonado, E., Sun, X., Kim, L. U., Green, M., Reinberg, D. (1993)** Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev* **7**: 1021-1032.
- Ha, S. B., An, G. H. (1989)** Cis-acting regulatory elements controlling temporal and organ-specific activity of nopaline synthase promoter. *Nucl Acids Res* **17**: 215-223.
- Haass, M. M., Feix, G. (1992)** Two different cDNAs encoding TFIID proteins of maize. *FEBS Lett* **301**: 294-298.
- Hajdukiewicz, P. T., Allison, L. A., Maliga, P. (1997)** The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J* **16**: 4041-4048.
- Hakimi, M. A., Privat, I., Valay, J. G., Lerbs-Mache, S. (2000)** Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma<sup>70</sup>-type transcription factors between plants and bacteria. *J Biol Chem* **275**: 9215-9221.
- Halle, J. P., Meisterernst, M. (1996)** Gene expression: increasing evidence for a transcriptosome. *Trends Genet* **12**: 161-163.
- Hampsey, M. (1998)** Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 465-503.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hansen, S. K., Takada, S., Jacobson, R. H., Lis, J. T., Tjian, R. (1997)** Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF. *Cell* **91**: 71-83.
- Hansen, U. M., McClure, W. R. (1980)** Role of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in initiation. II. Release of sigma from ternary complexes. *J Biol Chem* **255**: 9564-9570.
- Harley, C. B., Reynolds, R. P. (1987)** Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucl Acids Res* **15**: 2343-2361.

- Hawkes, N. A., Roberts, S. G. (1999)** The role of human TFIIB in transcription start site selection *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **274**: 14337-14343.
- Hawley, D. K., McClure, W. R. (1983)** Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl Acids Res* **11**: 2237-2255.
- Hedtke, B., Boerner, T., Weihe, A. (1997)** Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* **277**: 809-811.
- Hedtke, B., Meixner, M., Gillandt, S., Richter, E., Boerner, T., Weihe, A. (1999)** Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*. *Plant J* **17**: 557-561.
- Hedtke, B., Boerner, T., Weihe, A. (2000)** One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep* **1**: 435-440.
- Hedtke, B., Legen, J., Weihe, A., Herrmann, R. G., Boerner, T. (2002)** Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J* **30**: 625-637.
- Helmann, J. D. (1995)** Compilation and analysis of *Bacillus subtilis*  $\sigma^A$ -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucl Acids Res* **23**: 2351-2360.
- Helmann, J. D., Chamberlin, M. J. (1988)** Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**: 839-872.
- Hernandez, N. (1993)** TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* **7**: 1291-1308.
- Herrera-Estrella, L., Van den Broeck, G., Maenhaut, R., Van Montagu, M., Schell, J., Timko, M., Cashmore, A. (1984)** Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector. *Nature* **310**: 115-120.
- Herrero, M., De Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1990)** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557-6567.
- Hess, W. R., Boerner, T. (1999)** Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int Rev Cytol* **190**: 1-59.
- Hirt, H., Koegl, M., Murbacher, T., Heberle-Bors, E. (1990)** Evolutionary conservation of transcriptional machinery between yeast and plants as shown by the efficient expression from the CaMV 35S promoter and 35S terminator. *Curr Genet* **17**: 473-479.
- Hoefgen, R., Willmitzer, L. (1990)** Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci* **66**: 221-230.
- Holmes, M. C., Tjian, R. (2000)** Promoter-selective properties of the TBP-related factor TRF1. *Science* **288**: 867-870.

- Holstege, F. C., Tantin, D., Carey, M., van der Vliet, P. C., Timmers, H. T. (1995)** The requirement for the basal transcription factor IIE is determined by the helical stability of promoter DNA. *EMBO J* **14**: 810-819.
- Holstege, F. C., Fiedler, U., Timmers, H. T. (1997)** Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *EMBO J* **16**: 7468-7480.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T., Chilton, M. D. (1986)** The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bacteriol* **168**: 1291-1301.
- Hu, J., Bogorad, L. (1990)** Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1531-1535.
- Hu, J., Troxler, R. F., Bogorad, L. (1991)** Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid *rpoC1* gene. *Nucl Acids Res* **19**: 3431-3434.
- Huang, D. H., Horikoshi, M., Roeder, R. G. (1988)** Activation of the adenovirus EIIa late promoter by a single-point mutation which enhances binding of transcription factor IID. *J Biol Chem* **263**: 12596-12601.
- Huang, X., Lopez, de Saro F. J., Helmann, J. D. (1997)**  $\sigma$  factor mutations affecting the sequence-selective interaction of RNA polymerase with -10 region single-stranded DNA. *Nucl Acids Res* **25**: 2603-2609.
- Huebschmann, T., Boerner, T. (1998)** Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. *Plant Mol Biol* **36**: 493-496.
- Igloi, G. L., Koessel, H. (1992)** The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit Rev Plant Sci* **10**: 525-558.
- Ikeda, T. M., Gray, M. W. (1999)** Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol Biol* **40**: 567-578.
- Inostroza, J., Flores, O., Reinberg, D. (1991)** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Purification and functional analysis of general transcription factor IIE. *J Biol Chem* **266**: 9304-9308.
- Iratni, R., Baeza, L., Andreeva, A., Mache, R., Lerbs-Mache, S. (1994)** Regulation of rDNA transcription in chloroplasts: promoter exclusion by constitutive repression. *Genes Dev* **8**: 2928-2938.
- Iratni, R., Diederich, L., Harrak, H., Bigny, M., Lerbs-Mache, S. (1997)** Organ-specific transcription of the *rrn* operon in spinach plastids. *J Biol Chem* **272**: 13676-13682.
- Isono, K., Shimizu, M., Yoshimoto, K., Niwa, Y., Satoh, K., Yokota, A., Kobayashi, H. (1997)** Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of  $\sigma^{70}$  factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14948-14953.
- Jacob, D. (1997)** Erkennung von Regulationssequenzen in heterologen Systemen. Diplomarbeit, Technische Fachhochschule Berlin.



- Jacob, F., Ullman, A., Monod, J. (1964)** Le promoteur, élément génétique nécessaire à l'expression d'un opéron. *Crit Rev Acad Sc Paris* **258**: 3125-3128.
- Janssens, A., Engler, G., Zambryski, P., Van Montagu, M. (1984)** The nopaline C58 T-DNA region is transcribed in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* **195**: 341-350.
- Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie-Gregory, B., Smale, S. T. (1994)** DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **14**: 116-127.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W. (1987)** GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901-3907.
- Johnson, P. F., McKnight, S. L. (1989)** Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* **58**: 799-839.
- Joshi, C. P. (1987)** An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl Acids Res* **15**: 6643-6653.
- Juang, Y. L., Helmann, J. D. (1994)** A promoter melting region in the primary  $\sigma$  factor of *Bacillus subtilis*. Identification of functionally important aromatic amino acids. *J Mol Biol* **235**: 1470-1488.
- Kamada, K., De Angelis, J., Roeder, R. G., Burley, S. K. (2001)** Crystal structure of the C-terminal domain of the RAP74 subunit of human transcription factor IIF. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3115-3120.
- Kanamaru, K., Fujiwara, M., Seki, M., Katagiri, T., Nakamura, M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Shinozaki, K., Tanaka, K., Takahashi, H. (1999)** Plastidic RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **40**: 832-842.
- Kapoor, S., Suzuki, J. Y., Sugiura, M. (1997)** Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *Plant J* **11**: 327-337.
- Kapoor, S., Sugiura, M. (1999)** Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus type II PatpB-290 plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **11**: 1799-1810.
- Kay, E., Vogel, T. M., Bertolla, F., Nalin, R., Simonet, P. (2002)** In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3345-3351.
- Keilty, S., Rosenberg, M. (1987)** Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J Biol Chem* **262**: 6389-6395.
- Kestermann, M., Neukirchen, S., Kloppstech, K., Link, G. (1998)** Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*). *Nucl Acids Res* **26**: 2747-2753.
- Kim, M., Mullet, J. E. (1995)** Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light-responsive *psbD-psbC* promoter. *Plant Cell* **7**: 1445-1457.

- Kim, T. K., Ebright, R. H., Reinberg, D. (2000)** Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIIH. *Science* **288**: 1418-1422.
- Kim, T. K., Lagrange, T., Wang, Y. H., Griffith, J. D., Reinberg, D., Ebright, R. H. (1997)** Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12268-12273.
- Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M. H., Kornberg, R. D. (1994)** A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* **77**: 599-608.
- Klee, H., Horsch, R., Rogers, S. (1987)** *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annu Rev Plant Physiol* **38**: 467-486.
- Klein, T. M., Harper, E. C., Svab, Z., Sanford, J. C., Fromm, M. E., Maliga, P. (1989b)** Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by particle bombardment process. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8502-8505.
- Klein, T. M., Kornstein, L., Sanford, J. C., Fromm, M. E. (1989a)** Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol* **91**: 440-444.
- Kobor, M. S., Simon, L. D., Omichinski, J., Zhong, G., Archambault, J., Greenblatt, J. (2000)** A motif shared by TFIIF and TFIIB mediates their interaction with the RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphatase Fcp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**: 7438-7449.
- Kong, Q., Richter, L., Yang, Y. F., Arntzen, C. J., Mason, H. S., Thanavala, Y. (2001)** Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11539-11544.
- Kornberg, R. D., Lorch, Y. (1995)** Interplay between chromatin structure and transcription. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 371-375.
- Koziel, M. G., Carozzi, N. B., Desai, N. (1996)** Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol Biol* **32**: 393-405.
- Krummel, B., Chamberlin, M. J. (1989)** RNA chain initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. Structural transitions of the enzyme in early ternary complexes. *Biochem* **28**: 7829-7842.
- Kuhlemeier, C. (1992)** Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Plant Mol Biol* **19**: 1-14.
- Kuldell, N. H., Buratowski, S. (1997)** Genetic analysis of the large subunit of yeast transcription factor IIE reveals two regions with distinct functions. *Mol Cell Biol* **17**: 5288-5298.
- Kumar, A., Malloch, R. A., Fujita, N., Smillie, D. A., Ishihama, A., Hayward, R. S. (1993)** The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J Mol Biol* **232**: 406-418.

- Kuzj, A. E., Medberry, P. S., Schottel, J. L. (1998)** Stationary phase, amino acid limitation and recovery from stationary phase modulate the stability and translation of chloramphenicol acetyltransferase mRNA and total mRNA in *Escherichia coli*. *Microbiol* **144**: 739-750.
- Kuznedelov, K., Minakhin, L., Niedziela-Majka, A., Dove, S. L., Rogulja, D., Nickels, B. E., Hochschild, A., Heyduk, T., Severinov, K. (2002)** A role for interaction of the RNA polymerase flap domain with the  $\sigma$  subunit in promoter recognition. *Science* **295**: 855-857.
- Lagrange, T., Kim, T. K., Orphanides, G., Ebright, Y. W., Ebright, R. H., Reinberg, D. (1996)** High-resolution mapping of nucleoprotein complexes by site-specific protein-DNA photocrosslinking: organization of the human TBP-TFIIA-TFIIB-DNA quaternary complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10620-10625.
- Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D., Ebright, R. H. (1998)** New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* **12**: 34-44.
- Lahiri, S. D., Yao, J., McCumbers, C., Allison, L. A. (1999)** Tissue-specific and light-dependent expression within a family of nuclear-encoded sigma-like factors from *Zea mays*. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**: 14-20.
- Lauterslager, T. G., Florack, D. E., van der Wal, T. J., Molthoff, J. W., Langeveld, J. P., Bosch, D., Boersma, W. J., Hilgers, L. A. (2001)** Oral immunisation of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine* **19**: 2749-2755.
- Lee, D. K., Horikoshi, M., Roeder, R. G. (1991)** Interaction of TFIID in the minor groove of the TATA element. *Cell* **67**: 1241-1250.
- Lerbs-Mache, S. (1993)** The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5509-5513.
- Leuther, K. K., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. (1996)** Two-dimensional crystallography of TFIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* **85**: 773-779.
- Lewin, A., Strauch, E., Hertwig, S., Hoffmann, B., Nattermann, H., Appel, B. (1996)** Comparison of plasmids of strains of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A with the virulence plasmid of a pathogenic *Y. enterocolitica* strain. *Zentralbl Bakteriol* **285**: 52-63.
- Lewin, A., Jacob, D., Freytag, B., Appel, B. (1998)** Gene expression in bacteria directed by plant-specific regulatory sequences. *Trans Res* **7**: 403-441.
- Li, Y., Flanagan, P. M., Tschochner, H., Kornberg, R. D. (1994)** RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* **263**: 805-807.
- Liere, K., Maliga, P. (1999a)** *In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J* **18**: 249-257.

- Liere, K., Maliga, P. (1999b)** Novel *in vitro* transcription assay indicates that the *accD* NEP promoter is contained in a 19 bp fragment. In: Argyroudi-Akoyunoglu, J. H., Senger, H. (Edit.), *The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology*. 79-84. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Link, G. (1994)** Plastid differentiation: organelle promoters and transcription factors. In: Nover, I. (Edit.), *Plant Promoters and Transcription Factors. Results Probl Cell Differ* **20**: 65-85. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Link, G. (1996)** Green life: control of chloroplast gene transcription. *BioEssays* **18**: 465-471.
- Lisser, S., Margalit, H. (1993)** Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucl Acids Res* **21**: 1507-1516.
- Lisser, S., Margalit, H. (1994)** Determination of common structural features in *Escherichia coli* promoters by computer analysis. *Eur J Biochem* **223**: 823-830.
- Liu, X. J., Prat, S., Willmitzer, L., Frommer, W. B. (1990)** *Cis* regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-inducible expression of a chimeric class I patatin promoter/GUS-gene fusion. *Mol Gen Genet* **223**: 401-406.
- Lo, K., Smale, S. T. (1996)** Generality of a functional initiator consensus sequence. *Gene* **182**: 13-22.
- Lonetto, M., Gribskov, M., Gross, C. A. (1992)** The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**: 3843-3849.
- Lorenz, M. G. Wackernagel, W. (1994)** Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**: 563-602.
- Lu, H., Flores, O., Weinmann, R., Reinberg, D. (1991)** The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**: 10004-10008.
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J. M., Reinberg, D. (1992)** Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358**: 641-645.
- Maliga, P. (1998)** Two plastids RNA polymerases of higher plants: an evolving story. *Trends Plant Sci* **3**: 4-6.
- Maliga, P. (2002)** Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 164-172.
- Manzanera, M., Aranda-Olmedo, I., Ramos, J. L., Marqués, S. (2001)** Molecular characterization of *Pseudomonas putida* KT2440 *rpoH* gene regulation. *Microbiol* **147**: 1323-1330.
- Marr, M. T., Roberts, J. W. (1997)** Promoter recognition as measured by binding of polymerase to nontemplate strand oligonucleotide. *Science* **276**: 1258-1260.
- Martineau, B., Voelker, T. A., Sanders, R. A. (1994)** On defining T-DNA. *Plant Cell* **6**: 1032-1033.

- Martinez, E., Chiang, C. M., Ge, H., Roeder, R. G. (1994)** TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *EMBO J* **13**: 3115-3126.
- Matsuki, R., Onodera, H., Yamauchi, T., Uchimiya, H. (1989)** Tissue-specific expression of the *rolC* promoter of the Ri plasmid in transgenic rice plants. *Mol Gen Genet* **220**: 12-16.
- Matzk, A., Mantell, S., Schiemann, J. (1996)** Localization of persisting *Agrobacteria* in transgenic tobacco plants. *Mol Plant Microbe Interact* **9**: 373-381.
- Maurizi, M. R., Clark, W. P., Kim, S. H., Gottesman, S. (1990)** *ClpP* represents a unique family of serine proteases. *J Biol Chem* **265**: 12546-12552.
- Maxon, M. E., Goodrich, J. A., Tjian, R. (1994)** Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIF: a model for promoter clearance. *Genes Dev* **8**: 515-524.
- Mendel, R. R., Müller, B., Schulze, J., Kolesnikov, V., Zelenin, A. (1989)** Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theor Appl Genet* **78**: 31-34.
- Mercer, D. K. Scott, K. P., Melville, C. M., Glover, L. A., Flint, H. J. (2001)** Transformation of an oral bacterium via chromosomal integration of free DNA in the presence of human saliva. *FEMS Microbiol Lett* **9976**: 1-5.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., Severinov, K. (2001)** Bacterial RNA polymerase subunit  $\omega$  and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 892-897.
- Mitchell, P. J., Tjian, R. (1989)** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378.
- Mitra, A., Higgins, D. W., Rohe, N. J. (1994)** A *Chlorella* virus gene promoter functions as a strong promoter both in plants and bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 187-194.
- Miyagi, T., Kapoor, S., Sugita, M., Sugiura, M. (1998)** Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence. *Mol Gen Genet* **257**: 299-307.
- Morden, C. W., Wolfe, K. H., dePamphilis, C. W., Palmer, J. D. (1991)** Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. *EMBO J* **10**: 3281-3288.
- Mudge, S. R. Lewis-Henderson, W. R., Birch, R. G. (1996)** Comparison of *Vibrio* and firefly luciferases as reporter gene systems for use in bacteria and plants. *Aust J Plant Physiol* **23**: 75-83.
- Mueller-Roeber, B., Ellenberg, J., Provart, N., Willmitzer, L., Busch, H., Becker, D., Dietrich, P., Hoth, S., Hedrich, R. (1995)** Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying  $K^+$  channel expressed in potato guard cells. *EMBO J* **14**: 2409-2416.

- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987)** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* **155**: 335-350.
- Munson, L. M., Reznikoff, W. S. (1981)** Abortive initiation and long ribonucleic acid synthesis. *Biochem* **20**: 2081-2085.
- Murray, S., Udupa, R., Yao, S., Hartzog, G., Prelich, G. (2001)** Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain by the Bur1 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* **21**: 4089-4096.
- Myer, V. E., Young, R. A. (1998)** RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J Biol Chem* **273**: 27757-27760.
- Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Bushnell, D. A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R. D. (1998)** The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Gen Dev* **12**: 45-54.
- Myers, L. C., Kornberg, R. D. (2000)** Mediator of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* **69**: 729-749.
- Myers, R. M., Tilly, K., Maniatis, T. (1986)** Fine structure genetic analysis of a  $\beta$ -globin promoter. *Science* **232**: 613-618.
- Nagel, R., Elliott, A., Masel, A., Birch, R. G., Manners, J. M. (1990)** Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **67**: 325-328.
- Nap, J.-P., Bijvoet, J., Stiekema, W. J. (1992)** Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Trans Res* **1**: 239-249.
- Nickerson, C. A., Achberger, (1995)** Role of curved DNA in binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to promoters. *J Bacteriol* **177**: 5756-5761.
- Nielsen, K. M., van Weerelt M. D., Berg, T. N., Bones, A. M., Hagler, A. N., van Elsas, J. D. (1997)** Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1945-1952.
- Nielsen, K. M., Bones, A. M., Smalla, K., van Elsas, J. D. (1998)** Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - a rare event? *FEMS Microbiol Rev* **22**: 79-103.
- Nielsen, K. M., van Elsas, J. D., Smalla, K. (2000)** Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413(pFG4 $\Delta$ nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1237-1242.
- Nikolov, D. B., Hu, S. H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N. H., Roeder, R. G., Burley, S. K. (1992)** Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* **360**: 40-46.
- Nikolov, D. B., Chen, H., Halay, E. D., Usheva, A. A., Hisatake, K., Lee, D. K., Roeder, R. G., Burley, S. K. (1995)** Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* **377**: 119-128.

- Nikolov, D. B., Chen, H., Halay, E. D., Hoffman, A., Roeder, R. G., Burley, S. K. (1996)** Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4862-4867.
- Odell, J. T., Nagy, F., Chua, N. H. (1985)** Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 810-812.
- Ohkuma, Y., Sumimoto, H., Horikoshi, M., Roeder, R. G. (1990)** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and characterization of general transcription factor TFIIE. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9163-9167.
- Ohkuma, Y., Hashimoto, S., Wang, C. K., Horikoshi, M., Roeder, R. G. (1995)** Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE- $\alpha$ . *Mol Cell Biol* **15**: 4856-4866.
- Ohme, M., Tanaka, M., Chunwongse, J., Shinozaki, K., Sugiura, M. (1986)** A tobacco chloroplast DNA sequence possibly coding for a polypeptide similar to *E. coli* RNA polymerase  $\beta$ -subunit. *FEBS Lett* **200**: 87-90.
- Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakamura, K. (1990)** Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding region. *Plant Cell Physiol* **31**: 805-813.
- Orozco, E. M. Jr, Chen, L. J., Eilers, R. J. (1990)** The divergently transcribed *rbcL* and *atpB* genes of tobacco plastid DNA are separated by nineteen base pairs. *Curr Genet* **17**: 65-71.
- Orphanides, G., Lagrange, T., Reinberg, D. (1996)** The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* **10**: 2657-2683.
- Orphanides, G., Reinberg, D. (2002)** A unified theory of gene expression. *Cell* **108**: 439-451.
- Ozoline, O. N., Deev, A. A., Arkhipova, M. V. (1997)** Non-canonical sequence elements in the promoter structure. Cluster analysis of promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucl Acids Res* **25**: 4703-4709.
- Paget, E., Monrozier, L. J., Simonet, P. (1992)** Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNaseI and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol Lett* **97**: 31-40.
- Paget, E., Lebrun, M., Freyssinet, G., Simonet, P. (1998)** The fate of recombinant plant DNA in soil. *Eur J Soil Biol* **34**: 81-88.
- Paget, E., Simonet, P. (1994)** On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiol Ecol* **15**: 109-118.
- Panaghie, G., Aiyar, S. E., Bobb, K. L., Hayward, R. S., de Haseth, P. L. (2000)** Aromatic amino acids in region 2.3 of *Escherichia coli* sigma 70 participate collectively in the formation of an RNA polymerase-promoter open complex. *J Mol Biol* **299**: 1217-1230.
- Pandolfini, T., Storlazzi, A., Calabria, E., Defez, R., Spena, A. (2000)** The spliceosomal intron of the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* is a prokaryotic promoter. *Mol Microbiol* **35**: 1326-1334.

- Paranjape, S. M., Kamakaka, R. T., Kadonaga, J. T. (1994)** Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **63**: 265-297.
- Pátek, M., Eikmanns, B. J., Pátek, J., Sahm, H. (1996)** Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiol* **142**: 1297-1309.
- Pedersen, A. G., Baldi, P., Chauvin, Y., Brunak, S. (1999)** The biology of eukarotic promoter prediction – a review. *Comp Chem* **23**: 191- 207.
- Pérez-Martin, J., Rojo, F., De Lorenzo, V. (1994)** Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol Rev* **58**: 268-290.
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M. (1997)** Antibiotic resistance spread in food. *Nature* **389**: 801-802.
- Pfannschmidt, T., Link, G. (1994)** Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Mol Biol* **25**: 69-81.
- Pfannschmidt, T., Link, G. (1997)** The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context. *Mol Gen Genet* **257**: 35-44.
- Pfannschmidt, T., Ogrzewalla, K., Baginsky, S., Sickmann, A., Meyer, H. E., Link, G. (2000)** The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.). Integration of a prokaryotic core into a larger complex with organelle-specific functions. *Eur J Biochem* **267**: 253-261.
- Plesch, G., Ehrhardt, T., Mueller-Roeber, B. (2001)** Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant J* **28**: 455-464.
- Pobjecky, N., Rosenberg, G. H., Dinter-Gottlieb, G., Kaeufer, N. F. (1990)** Expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene under the control of the CaMV 35S promoter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **220**: 314-316.
- Pribnow, D. (1975a)** Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. *J Mol Biol* **99**: 419-443.
- Pribnow, D. (1975b)** Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 784-788.
- Qiu, J., Helmann, J. D. (1999)** Adenines at -11, -9 and -8 play a key role in the binding of *Bacillus subtilis*  $\sigma^A$  RNA polymerase to -10 region single-stranded DNA. *Nucl Acids Res* **27**: 4541-4546.
- Qiunn, J. P. (1990)** Evolving strategies for genetic engineering of herbicide resistance in plants. *Biotech Adv* **8**: 321-333.
- Qureshi, S. A., Jackson, S. P. (1998)** Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol Cell* **1**: 389-400.



- Ramanathan, V., Veluthambi, K. (1995)** Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol Biol* **28**: 1149-1154.
- Ranish, J. A., Yudkovsky, N., Hahn, S. (1999)** Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev* **13**: 49-63.
- Rao, L., Ross, W., Appleman, J. A., Gaal, T., Leirmo, S., Schlax, P. J., Record, M. T. Jr, Gourse, R. L. (1994)** Factor independent activation of *rrnB* P1. An "extended" promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength. *J Mol Biol* **235**: 1421-1435.
- Rauhut, R., Klug, G. (1999)** mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 353-370.
- Reines, D., Conaway, J. W., Conaway, R. C. (1996)** The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends Biochem Sci* **21**: 351-355.
- Richter, L. J., Thanavala, Y., Arntzen, C. J., Mason, H. S. (2000)** Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* **18**: 1167-1171.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K., Yu, G. (2000)** Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**: 2105-2110.
- Robert, F., Forget, D., Li, J., Greenblatt, J., Coulombe, B. (1996)** Localization of subunits of transcription factors IIE and IIF immediately upstream of the transcriptional initiation site of the adenovirus major late promoter. *J Biol Chem* **271**: 8517-8520.
- Roberts, C. W. Roberts, J. W. (1996)** Base-specific recognition of the nontemplate strand of promoter DNA by *E. coli* RNA polymerase. *Cell* **86**: 495-501.
- Rocha-Sosa, M. Sonnewald, U., Frommer, W. B., Stratmann, M., Schell, J., Willmitzer, L. (1989)** Both development and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J* **8**: 23-29.
- Roe, J. H., Burgess, R. R., Record, M. T. Jr. (1985)** Temperature dependence of the rate constants of the *Escherichia coli* RNA polymerase-lambda PR promoter interaction. Assignment of the kinetic steps corresponding to protein conformational change and DNA opening. *J Mol Biol* **184**: 441-453.
- Roeder, R. G. (1996)** The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **21**: 327-335.
- Rong, J. C., Helmann, J. D. (1994)** Genetic and physiological studies of *Bacillus*  $\sigma^A$  mutants defective in promoter melting. *J Bacteriol* **176**: 5218-5224.
- Rosenberg, M., Court, D. (1979)** Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu Rev Genet* **13**: 319-353.

- Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., Gourse, R. L. (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase. *Science* **262**: 1407-1413.
- Ross, W., Aiyar, S. E., Salomon, J., Gourse, R. L. (1998) *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strengths: modular structure of bacterial promoters. *J Bacteriol* **180**: 5375-5383.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Sasaki, Y., Hakamada, K., Suama, Y., Nagano, Y., Furusawa, I., Matsuno, R. (1993) Chloroplast-encoded protein as a subunit of acetyl-CoA carboxylase in pea plant. *J Biol Chem* **268**: 25118-25123.
- Satoh, J., Baba, K., Nakahira, Y., Tsunoyama, Y., Shiina, T., Toyoshima, Y. (1999) Developmental stage-specific multi-subunit plastid RNA polymerases (PEP) in wheat. *Plant J* **18**: 407-415.
- Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., Chambon, P., Egly, J. M. (1993) DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* **260**: 58-63.
- Schaller, H., Gray, C., Herrmann, K. (1975) Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 737-741.
- Schlueter, K., Fuetterer, J., Potrykus, I. (1995) "Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs - if at all - at an extremely low frequency. *Bio/Technology* **13**: 1094-1098.
- Schmuelling, T., Schell, J., Spena, A. (1989) Promoters of the *rolA*, B, and C genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differentially regulated in transgenic plants. *Plant Cell* **1**: 665-670.
- Schoenknecht, G., Spoormaker, P., Steinmeyer, R., Bruggeman, L., Ache, P., Dutta, R., Reintanz, B., Godde, M., Hedrich, R., Palme, K. (2002) KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. *FEBS Lett* **511**: 28-32.
- Schroeder, G., Klipp, W., Hillebrand, A., Ehring, R., Koncz, C., Schroeder, J. (1983) The conserved part of the T-region in Ti-plasmids expresses four proteins in bacteria. *EMBO J* **2**: 403-409.
- Schroeder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E. W., Schroeder, J. (1984) The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem* **138**: 387-391.
- Sentenac, A., Riva, M., Thuriaux, P., Buhler, J.-M., Treich, I., Carles, C., Werner, M., Ruet, A., Huet, J., Mann, C., Chiannikulchai, N., Stettler, S., Mariotte, S. (1992) Yeast RNA polymerase subunits and genes. In: McKnight, S. L., Yamamoto, K. R. (Edit.), *Transcriptional Regulation*: 27-54. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Serino, G., Maliga, P. (1998)** RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiol* **117**: 1165-1170.
- Serizawa, H., Makela, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A., Young, R. A. (1995)** Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIF. *Nature* **374**: 280-282.
- Shaw, C. H., Carter, G. H., Watson, M. D. (1984)** A functional map of the nopaline synthase promoter. *Nucl Acids Res* **12**: 7831-7846.
- Shiina, T., Allison, L., Maliga, P. (1998)** *RbcL* transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell* **10**: 1713-1722.
- Shikanai, T., Shimizu, K., Ueda, K., Nishimura, Y., Kuroiwa, T., and Hashimoto, T. (2001)** The chloroplast *clpP* gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol* **42**: 264-273.
- Shinozaki, K., Sugiura, M. (1982a)** The nucleotide sequence of the tobacco chloroplast gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Gene* **20**: 91-102.
- Shinozaki, K., Sugiura, M. (1982b)** Sequence of the intergenic region between the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit and coupling factor  $\beta$  subunit gene. *Nucl Acids Res* **10**: 4923-4934.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., Sugiura, M. (1986)** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* **5**: 2043-2049.
- Siegele, D. A., Hu, J. C., Walter, W. A., Gross, C. A. (1989)** Altered promoter recognition by mutant forms of the  $\sigma^{70}$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **206**: 591-603.
- Silhavy, D., Maliga, P. (1998)** Mapping of promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the *iojap* maize mutant. *Curr Genet* **33**: 340-344.
- Simpson, G. G., Filipowicz, W. (1996)** Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Mol Biol* **32**: 1-41.
- Singh, K. B. (1998)** Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* **118**: 1111-1120.
- Slightom, J. L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L., Tepfer, D. (1986)** Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. *J Biol Chem* **261**: 108-121.
- Smale, S. T., Baltimore, D. (1989)** The "initiator" as a transcription control element. *Cell* **57**: 103-113.

**Smale, S. T. (1997)** Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta* **1351**: 73-88.

**Sonnewald, U. (1992)** Expression of *E. coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning. *Plant J* **2**: 571-581.

**Soppa, J. (1999)** Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects. *Mol Microbiol* **31**: 1295-1305.

**Sopta, M., Carthew, R. W., Greenblatt, J. (1985)** Isolation of three proteins that bind to mammalian RNA polymerase II. *J Biol Chem* **260**: 10353-10360.

**Sriraman, P., Silhavy, D., Maliga, P. (1998)** The phage-type PclpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucl Acids Res* **26**: 4874-4879.

**Starr, D. B., Hawley, D. K. (1991)** TFIID binds in the minor groove of the TATA box. *Cell* **67**: 1231-1240.

**Staub, J. M., Maliga, P. (1994)** Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *Plant J* **6**: 547-553.

**Steinborn (2000)** *In vitro* Mutagenese des ST-LS1 Promotors aus *Solanum tuberosum* für Promotorstudien in heterologen Expressionssystemen. Diplomarbeit, Technische Fachhochschule Berlin.

**Stockhaus, J. Eckes, P., Rocha-Sosa, M., Schell, J., Willmitzer, L. (1987)** Analysis of *cis*-active sequences involved in the leaf-specific expression of a potato gene in transgenic plants. *Proc Nat Acad Sci USA* **84**: 7943-7947.

**Stockhaus, J., Schell, J., Willmitzer, L. (1989a)** Correlation of the expression of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1 with the presence of chloroplasts. *EMBO J* **8**: 2445-2451.

**Stockhaus, J., Schell, J., Willmitzer, L. (1989b)** Identification of enhancer elements in the upstream region of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1. *Plant Cell* **1**: 805-813.

**Streatfield, S. J., Jilka, J. M., Hood, E. E., Turner, D. D., Bailey, M. R., Mayor, J. M., Woodard, S. L., Beifuss, K. K., Horn, M. E., Delaney, D. E., Tizard, I. R., Howard, J. A. (2001)** Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* **19**: 2742-2748.

**Strohl, W. R. (1992)** Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucl Acids Res* **20**: 961-974.

**Struhl, K. (1999)** Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**: 1-4.

**Sugaya, S., Uchimiya, H. (1992)** Deletion analysis of the 5'-upstream region of the *Agrobacterium rhizogenes* Ri Plasmid *rolC* gene required for tissue-specific expression. *Plant Physiol* **99**: 464-467.

**Sugiura, M. (1992)** The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* **19**: 149-168.

- Sugiura, M. (1997)** Plant *in vitro* transcription systems. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 383-398.
- Sun, E., Wu, B. W., Tewari, K. K. (1989)** *In vitro* analysis of the pea chloroplast 16S rRNA gene promoter. *Mol Cell Biol* **9**: 5650-5659.
- Sun, Z. W., Hampsey, M. (1995)** Identification of the gene (SSU71/TFG1) encoding the largest subunit of transcription factor TFIIF as a suppressor of a TFIIB mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3127-3131.
- Svejstrup, J. Q., Vichi, P., Egly, J. M. (1996)** The multiple roles of transcription/repair factor TFIIF. *Trends Biochem Sci* **21**: 346-350.
- Tacket, C. O., Mason, H. S. (1999)** A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect* **1**: 777-783.
- Tan, S., Aso, T., Conaway, R. C., Conaway, J. W. (1994)** Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II. *J Biol Chem* **269**: 25684-25691.
- Tan, S., Troxler, R. F. (1999)** Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: photoregulation and differential expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5316-5321.
- Tanaka, K., Tozawa, Y., Mochizuki, N., Shinozaki, K., Nagatani, A., Wakasa, K., Takahashi, H. (1997)** Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Lett* **413**: 309-313.
- Tansey, W. P., Herr, W. (1997)** TAFs: guilt by association? *Cell* **88**: 729-732.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- Thompson, C. M., Young, R. A. (1995)** General requirement for RNA polymerase II holoenzymes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4587-4590.
- Tiller, K., Eisermann, A., Link, G. (1991)** The chloroplast transcription apparatus from mustard (*Sinapis alba* L.). Evidence for three different transcription factors which resemble bacterial sigma factors. *Eur J Biochem* **198**: 93-99.
- Tiller, K., Link, G. (1993)** Sigma-like transcription factors from mustard (*Sinapis alba* L.) etioplast are similar in size to, but functionally distinct from, their chloroplast counterparts. *Plant Mol Biol* **21**: 503-513.
- Tirode, F., Busso, D., Coin, F., Egly, J. M. (1999)** Reconstitution of the transcription factor TFIIF: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol Cell* **3**: 87-95.
- Tomes, D. T., Weissinger, A. K., Ross, M., Higgins, R., Drummond, B. J., Schaaf, S., Malone-Schoneberg, J., Staebell, M., Flynn, P., Anderson, J. (1990)** Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. *Plant Mol Biol* **14**: 261-268.

- Tozawa, Y., Tanaka, K., Takahashi, H., Wakasa, K. (1998)** Nuclear encoding of a plastid sigma factor in rice and its tissue- and light-dependent expression. *Nucl Acids Res* **26**: 415-419.
- Tran, T. T. (2001)** Heterologe Genexpression in Bakterien durch Übertragung von Hefe-DNA-Sequenzen. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin.
- Trieu-Cuot, P., Courvalin, P. (1983)** Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* **23**: 331-341.
- Trigon, S., Serizawa, H., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Jackson, S. P., Morange, M. (1998)** Characterization of the residues phosphorylated *in vitro* by different C-terminal domain kinases. *J Biol Chem* **273**: 6769-6775.
- Tsai, F. T., Sigler, P. B. (2000)** Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *EMBO J* **19**: 25-36.
- Usheva, A., Shenk, T. (1994)** TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* **76**: 1115-1121.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., Rocha-Sosa, M. (1990)** Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* **220**: 245-250.
- Vanet, A., Marsan, L., Sagot, M. F. (1999)** Promoter sequences and algorithmical methods for identifying them. *Res Microbiol* **150**: 779-799.
- Veal, D. A., Stokes, H. W., Daggard, G. (1992)** Genetic exchange in natural microbial communities. In: Marshall, K. C. (Edit.), *Adv Microb Ecol* **12**: 383-430. Plenum Press, New York and London.
- Verrijzer, C. P., Tjian, R. (1996)** TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci* **21**: 338-342.
- Vicente, M., Chater, K. F., De Lorenzo, V. (1999)** Bacterial transcription factors involved in global regulation. *Mol Microbiol* **33**: 8-17.
- Vogel, J. M., Roth, B., Cigan, M., Freeling, M. (1993)** Expression of the two maize TATA binding protein genes and function of the encoded TBP proteins by complementation in yeast. *Plant Cell* **5**: 1627-1638.
- Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R., Suesskind, M. M. (1990)** Changes in conserved region 2 of *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  affecting promoter recognition. *J Mol Biol* **215**: 267-276.
- Weihe, A., Hedtke, B., Boerner, T. (1997)** Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucl Acids Res* **25**: 2319-2325.

- Weihe, A., Boerner, T. (1999)** Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends Plant Sci* **4**: 169-170.
- White, F. F., Taylor, B. H., Huffman, G. A., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1985)** Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol* **164**: 33-44.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Donegan, K. K., Reed, G. L. (1997)** Quantification of transgenic plant marker gene persistence in field. *Mol Ecol* **6**: 1-7.
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X., Tora, L. (1998)** Function of TAF<sub>II</sub>-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **393**: 187-191.
- Wilson, C., Dombroski, A. J. (1997)** Region 1 of  $\sigma^{70}$  is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **267**: 60-74.
- Wishart, W. L., Machida, C., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E. (1983)** *Escherichia coli* RNA polymerase binding sites and transcription initiation sites in the transposon Tn3. *Gene* **24**: 99-113.
- Witte, W. (1998)** Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**: 996-997.
- Wobbe, C. R., Struhl, K. (1990)** Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription in vitro. *Mol Cell Biol* **10**: 3859-3867.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F. Jr, Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D. Sr, Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutuyavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V., Nester, E. W. (2001)** The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2317-2323.
- Woesten, M. M. (1998a)** Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 127-150.
- Woesten, M. M., Boeve, M., Koot, M. G., van Nuene, A. C., van der Zeijst, B. A. (1998b)** Identification of *Campylobacter jejuni* promoter sequences. *J Bacteriol* **180**: 594-599.
- Woychik, N. A. (1998)** Fractions to functions: RNA polymerase II thirty years later. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 311-317.
- Woychik, N. A., Hampsey, M. (2002)** The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* **108**: 453-463.
- Yamaguchi, Y., Itoh, Y., Takeda, Y., Yamazaki, K. (1998)** TATA sequence requirements for the initiation of transcription for an RNA polymerase II *in vitro* transcription system from *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* **38**: 1247-1252.

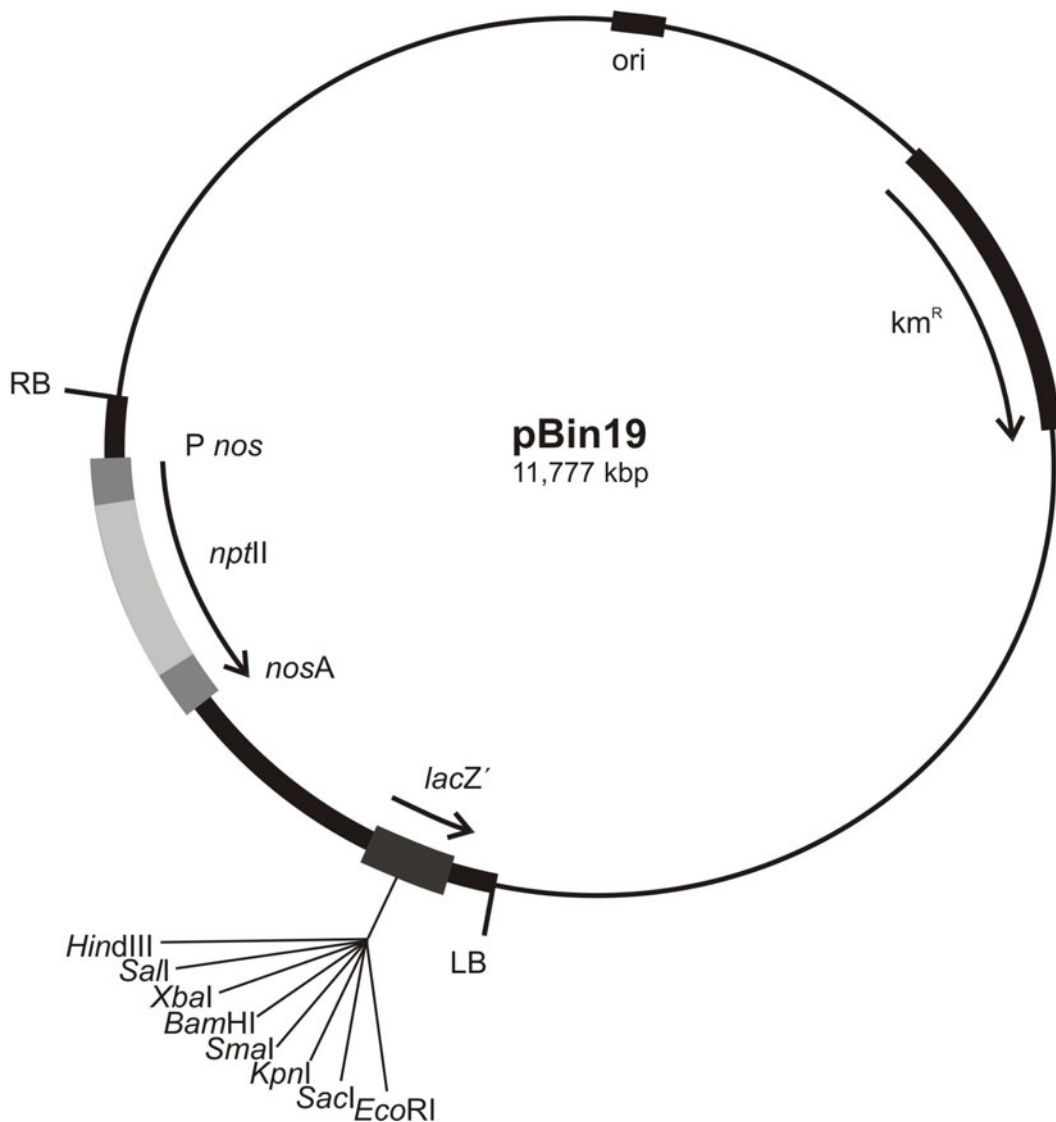
- Yan, M., Gralla, J. D. (1997)** Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation. *EMBO J* **16**: 7457-7467.
- Yao, J., Allison, L. A. (1998)** The cDNA sequence of AtSIG4, a new member of the nuclear-encoded sigma-like factor gene family in *Arabidopsis thaliana* (Accession No. AF101075). (PGR98-212) *Plant Physiol* **118**: 1536.
- Yokoyama, R., Hirose, T., Fujii, N., Aspuria, E. T., Kato, A., Uchimiya, H. (1994)** The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* **244**: 15-22.
- Young, B. A., Anthony, L. C., Gruber, T. M., Arthur, T. M., Heyduk, E., Lu, C. Z., Sharp, M. M., Heyduk, T., Burgess, R. R., Gross, C. A. (2001)** A coiled-coil from the RNA polymerase  $\beta'$  subunit allosterically induces selective nontemplate strand binding by  $\sigma^{70}$ . *Cell* **105**: 935-944.
- Young, D. A., Allen, R. L., Harvey, A. J., Lonsdale, D. M. (1998)** Characterization of a gene encoding a single-subunit bacteriophage-type RNA polymerase from maize which is alternatively spliced. *Mol Gen Genet* **260**: 30-37.
- Zambryski, P. (1988)** Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu Rev Genet* **22**: 1-30.
- Zawel, L., Reinberg, D. (1995)** Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu Rev Biochem* **64**: 533-561.
- Zenzie-Gregory, B., O'Shea-Greenfield, A., Smale, S. T. (1992)** Similar mechanisms for transcription initiation mediated through a TATA box or an initiator element. *J Biol Chem* **267**: 2823-2830.
- Zhu, Q., Dabi, T., Lamb, C. (1995)** TATA box and initiator functions in the accurate transcription of a plant minimal promoter *in vitro*. *Plant Cell* **7**: 1681-1689.
- Zimmermann, S., Hartje, S., Ehrhardt, T., Plesch, G., Mueller-Roeber, B. (2001)** The  $K^+$  channel SKT1 is co-expressed with KST1 in potato guard cells - both channels can co-assemble via their conserved  $K_T$  domains. *Plant J* **28**: 517-527.
- Zinkel, S. S., Crothers, D. M. (1991)** Catabolite activator protein-induced DNA bending in transcription initiation. *J. Mol Biol* **219**: 201-215.
- Zuber, P., Healy, J., Carter, H. L., Cutting, S., Moran, C. P. Jr, Losick, R. (1989)** Mutation changing the specificity of an RNA polymerase sigma factor. *J Mol Biol* **206**: 605-614.



## 6 Anhang

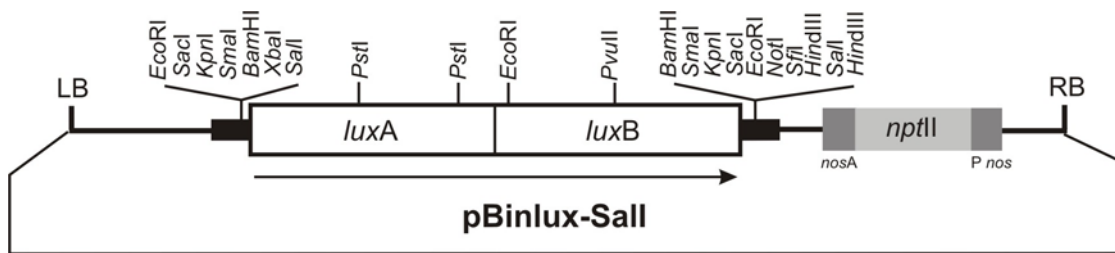
### 6.1 Plasmidkarten

#### 6.1.1 Restriktionskarte des Vektors pBin19



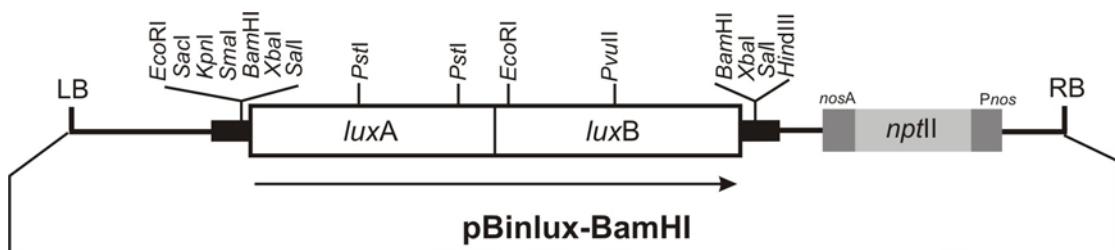
**Abb. 43:** Restriktionskarte des Vektors pBin19 (Bevan, 1984). Der binäre Vektor für *E. coli* und *A. tumefaciens* mit dem Replikationsursprung (ori) aus RK2 wird zur Transformation von Pflanzen eingesetzt. Der T-DNA Bereich (verstärkt schwarz) wird von der linken und rechten Grenze (LB, RB) flankiert. Die T-Region enthält den *lacZ'*-Bereich mit der MCS aus M13mp19. Rekombinante Klone können durch Blau/Weiß-Screening identifiziert werden. Zur Selektion transformierter Pflanzen enthält die T-Region ein dominant vererbbares Neomycin-Phosphotransferase Gen II (*nptII*). Die Expression des *nptII*-Gens wird durch den Promotor des Nopaline-Synthase Gens (*P nos*) gesteuert. Die Transkriptionstermination für das *nptII*-Gen stammt ebenfalls aus dem Nopaline-Synthase Gen (*nosA*). Außerhalb der T-Region enthält das Plasmid ein Kanamycinresistenz Gen (*km<sup>R</sup>*) für die Selektion in Bakterien.

### 6.1.2 Darstellung des T-DNA Bereichs von pBinlux-SalI



**Abb. 44:** Schematische Darstellung des rekombinanten T-DNA Bereichs des Plasmids pBinlux-SalI. Insertion der promotorlosen *luxAB*-Gene als *SalI*-Fragment aus Mini-Tn5*luxAB* (de Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990; siehe Kap. 6.1.9, Abb. 51) in die MCS des Vektors pBin19 (Bevan, 1984; siehe Kap. 6.1.1, Abb. 43). Die Größe des Plasmids pBinlux-SalI beträgt ca. 15 kbp.

### 6.1.3 Darstellung des T-DNA Bereichs von pBinlux-BamHI



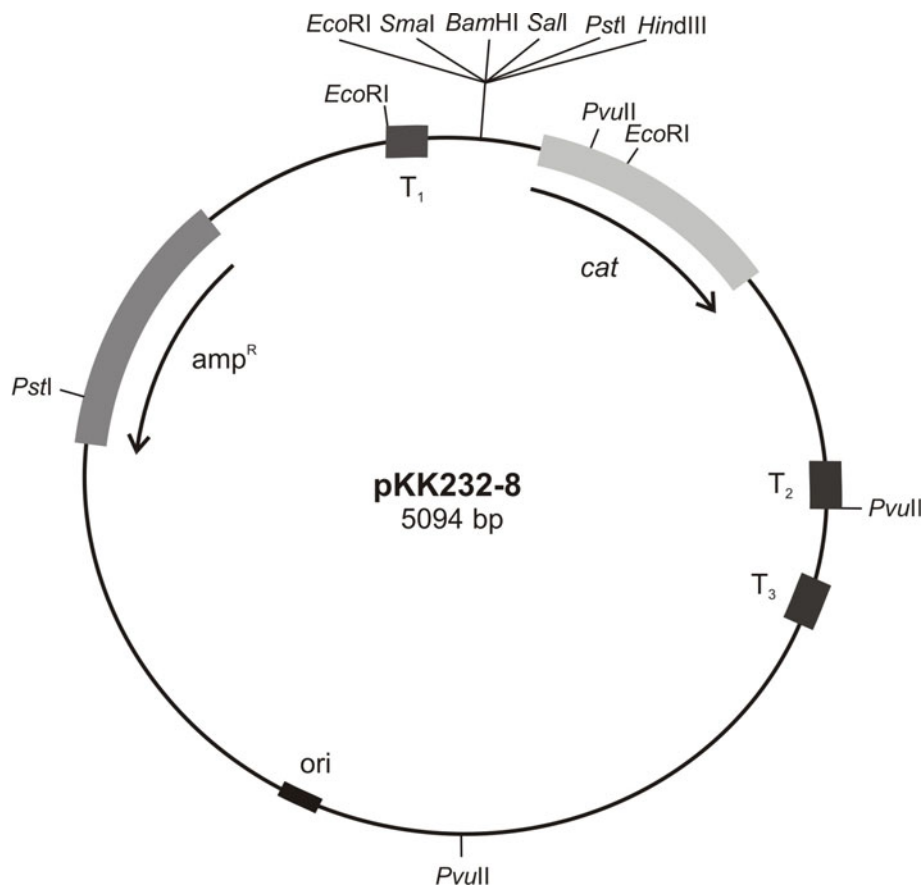
**Abb. 45:** Schematische Darstellung des rekombinanten T-DNA Bereichs des Plasmids pBinlux-BamHI. Insertion der promotorlosen *luxAB*-Gene als *BamHI*-Fragment aus pBinlux-SalI (siehe Kap. 6.1.2, Abb. 44) in die MCS des Vektors pBin19 (Bevan, 1984; siehe Kap. 6.1.1, Abb. 43). Die Größe des Plasmids pBinlux-BamHI beträgt ca. 15 kbp.

### 6.1.4 Darstellung des T-DNA Bereichs des Vektors pBi101.2



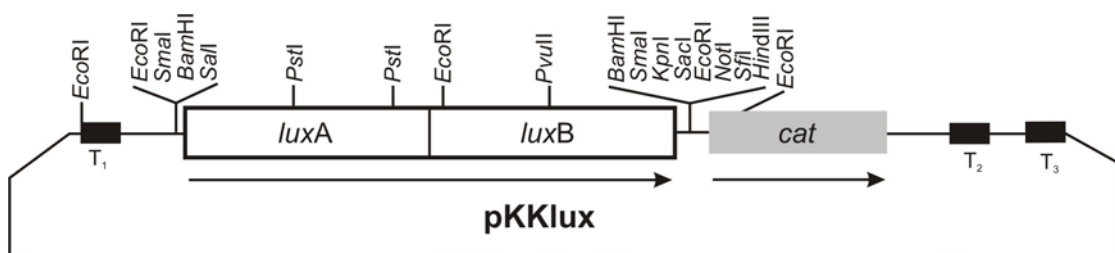
**Abb. 46:** Schematische Darstellung des T-DNA Bereichs des Plasmids pBi101.2 (Jefferson *et al.*, 1987). In die MCS des Vektors pBin19 (Bevan, 1984; siehe Kap. 6.1.1, Abb. 43) wurde ein promotorloses *gus*-Gen (1,87 kbp) inseriert mit der Transkriptionstermination aus dem Nopalinsynthesegen (*nosA*). Die Größe des pBi101.2 beträgt ca. 12,2 kbp.

### 6.1.5 Restriktionskarte des Vektors pKK232-8



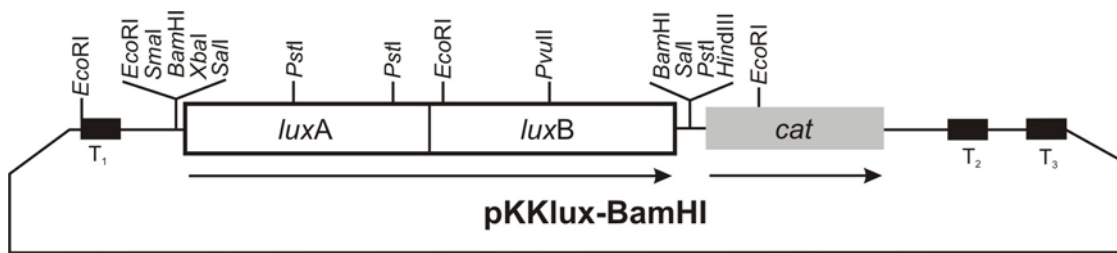
**Abb. 47:** Restriktionskarte des Vektors pKK232-8 (Brosius, 1984). Der für Promotorstudien konzipierte Vektor besitzt ein promotorloses Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen (*cat*), sowie einen Transkriptionsstop ( $T_1$ ) aus dem *rrnB*-Operons aus *E. coli* stromaufwärts der MCS und zwei Transkriptionsstops ( $T_2$ ,  $T_3$ ) des *rrnB* stromabwärts des *cat*-Gens. Der Replikationsursprung (*ori*) stammt aus dem Plasmid pBR322. Zur Selektion enthält das Plasmid ein Ampicillinresistenz Gen ( $amp^R$ ).

### 6.1.6 Darstellung des rekombinanten Bereichs des Plasmides pKKlux



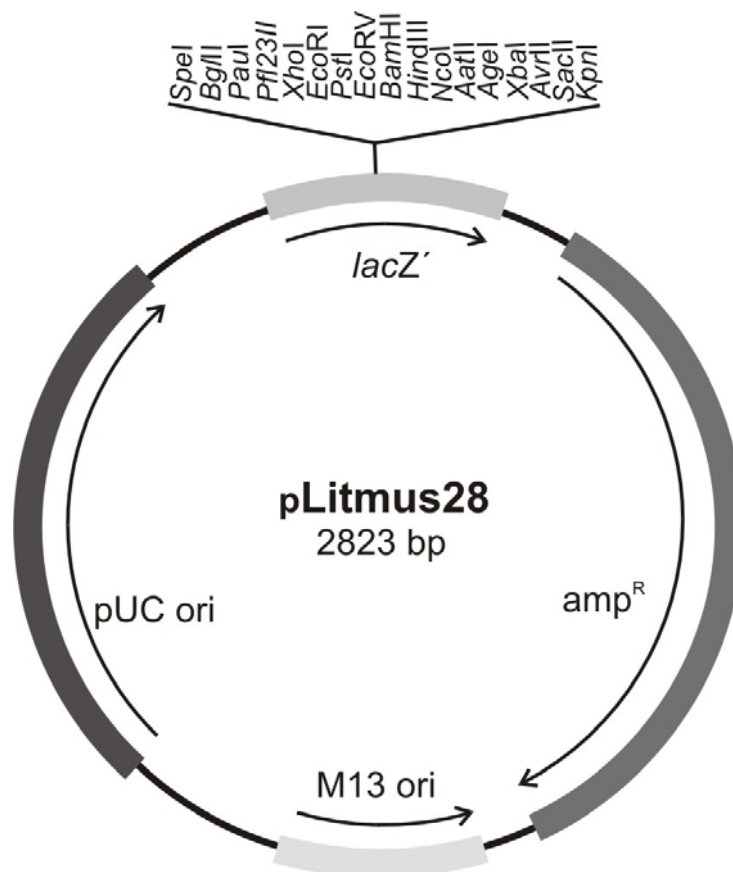
**Abb. 48:** Schematische Darstellung des rekombinanten Bereichs des Plasmides pKKlux. Insertion der promotorlosen *luxAB*-Gene als *SalI/HindIII*-Fragment aus dem Mini-Tn5*luxAB* (de Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990; siehe Kap. 6.1.9, Abb. 51) in die MCS des Vektors pKK232-8 (Brosius, 1984; siehe Kap. 6.1.5, Abb. 47). Die Größe des Plasmids pKKlux beträgt ca. 8,3 kbp.

### 6.1.7 Darstellung des rekombinanten Bereichs des Plasmides pKKlux-BamHI



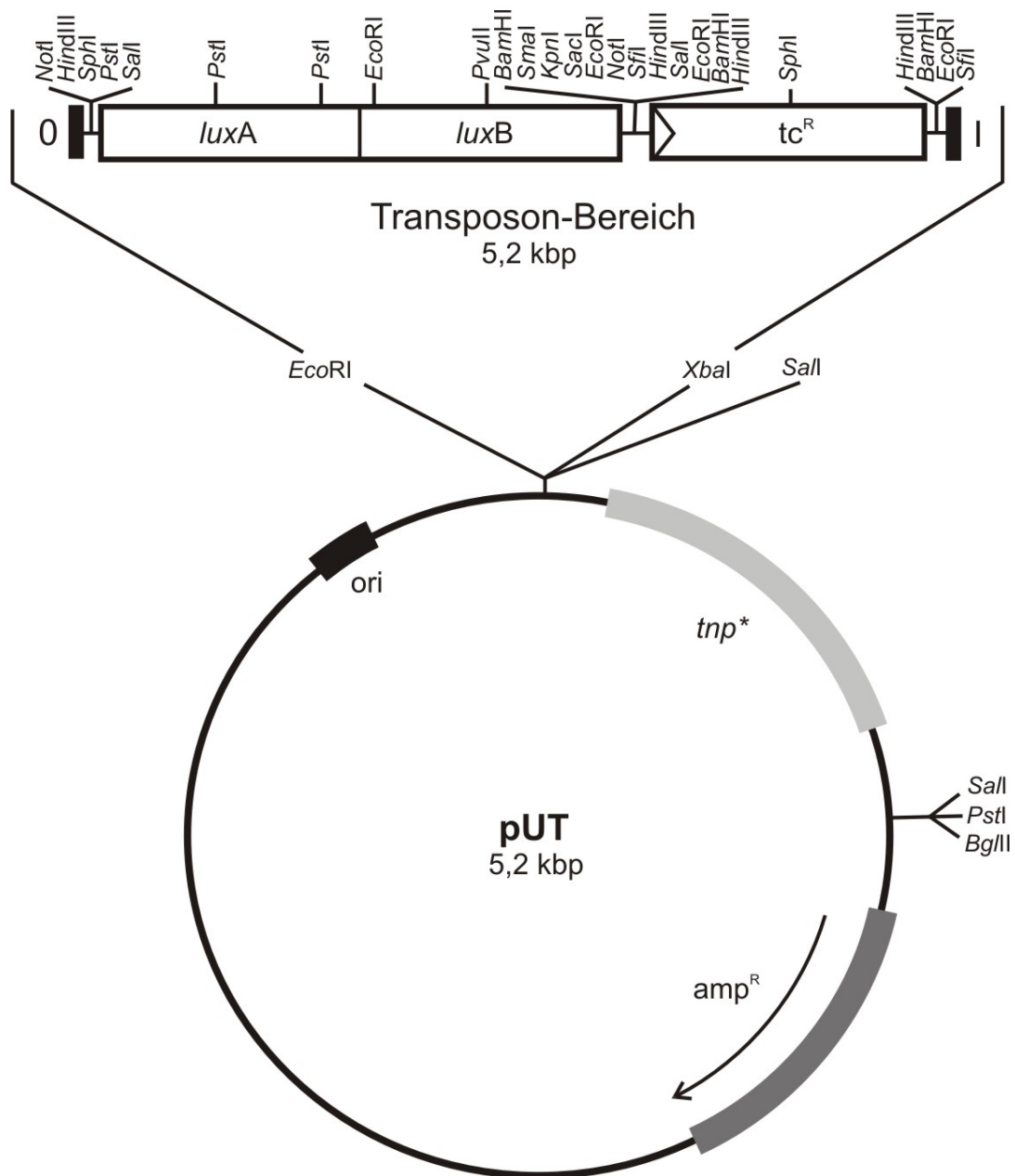
**Abb. 49:** Schematische Darstellung des rekombinanten Bereichs des Plasmides pKKlux-BamHI. Insertion der promotorlosen *luxAB*-Gene als *Bam*HI-Fragment aus dem pBinlux-SalI (siehe Kap. 6.1.2, Abb. 44) in die MCS des Vektors pKK232-8 (Brosius, 1984; siehe Kap. 6.1.5, Abb. 47). Die Größe des pKKlux beträgt ca. 8,3 kbp.

### 6.1.8 Restriktionskarte des Vektors pLitmus28



**Abb. 50:** Restriktionskarte des Vektors pLitmus28 (Evans *et al.*, 1995). pLitmus28 enthält den M13-Replikationsursprung (M13 ori) und den ColE1-Replikationsursprung (pUC ori). Zur Selektion enthält das Plasmid ein Ampicillinresistenz Gen ( $amp^R$ ). Die MCS unterbricht den *lacZ'*-Bereich, somit kann eine Blau/Weiß-Selektion stattfinden.

### 6.1.9 Restriktionskarte des Plasmides Mini-Tn5luxAB

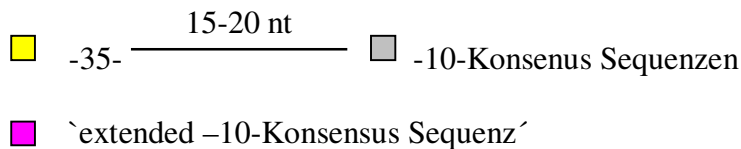


**Abb. 51:** Restriktionskarte des Plasmides Mini-Tn5luxAB (de Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990). Mini-Tn5luxAB wurde zum Auffinden von Promotorsequenzen in Gram-negativen Bakterien konstruiert. Für die Transposition enthält das Transposon repetitive Sequenzen des Tn5 (0, I) von 19 bp und ein Transposase Gen (*tnp\**). Zwischen diesen Sequenzen befinden sich die promotorlosen Luziferase-Gene (*luxAB*) aus *V. harveyi*. Als Selektionsmarker liegt in dem Transposonbereich ein Tetracyclinresistenz Gen (*tc<sup>R</sup>*). Das Transposon ist als *EcoRI/XbaI*-Fragment auf dem Vektor pUT lokalisiert. pUT besitzt den Replikationsursprung (*ori*) aus R6K und als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenz Gen (*amp<sup>R</sup>*).

## 6.2 Pflanzenspezifische Promotorsequenzen

Innerhalb der nachfolgenden Sequenzen der pflanzenspezifischen Promotoren sind CAAT- und TATA-Box kursiv im Fettdruck und der Transkriptionsstart innerhalb der Pflanzen nur im Fettdruck dargestellt.

Potentielle prokaryontische Promotor Konsensus Sequenzen sind wie folgt dargestellt:



### 6.2.1 35S-Promotor aus CaMV (531 bp)

Die DNA-Sequenz entspricht dem P 35S-Promotor aus dem Vektor pBAR-35S mit der Acc. # AJ251014. Die Sequenzierung ergab keinerlei Basenaustausche.

```

2173-CCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCCCCGTAAAGACTGGCGAACAGTTCATACA
GAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACGCTTGTCTACTCCAA
AAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCT
CCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAATC
CCATCATTTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACC
CACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCAC
TGACGTAAGGGATGACGCACAATCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATT
GGAGAGGACAG-2703
  
```

### 6.2.2 B33-Patatin-Promotor (1526 bp)

Die DNA-Sequenz entspricht der 5'UTR des B33-Patatin-Gens aus *S. tuberosum* mit der Acc. # X14483. Durch Sequenzierung wurde nur der Bereich von 1318-1713 überprüft.

```

188-AAATCATTGTTTTATTTTCTCTTTCTTTTTACAGGTATAAAAGGTGAAAATTGAAGCAAGATTGATTGCAA
GCTATGTGTCACCACGTTATTGATACTTTGGAAGAAAATTTTACTTATATGTCTTTGTTTAGGAGTAATATTTGA
TATGTTTTAGTTAGATTTTCTTGTCAATTTATGCTTTAGTATAATTTTAGTTATTTTTATTATATGATCATGGGTG
AATTTTGATACAAATATTTTTGTCAATTAATAAATTAATTTATCACAACTTGATTACTTTTCAGTGACAAAAAATG
TATTGTCGTAGTACCCTTTTTTGTGAATATGAATAATTTTTTTTATTTTGTGACAATGTAATGTCACTACTT
ATGATAATATTTAGTGACATATATGTCTGCGTAAAAGCAAACACTTTTCAGTGACAAAAATAATAGATTTAATCAC
AAAATTATTAACCTTTTTTATAATAATAAATTTATCCCTAATTTATACATTTAAGGACAAAAGTATTTTTTTATA
TATAAAAAATAGTCTTTAGTGACGATCGTAGTGTGAGTCTAGAAATCATAATGTTGAATCTAGAAAAATCTCAT
GCAGTGTAATAATAAACCTCAAAAAGGACGTTCCAGTCCATAGAGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAA
GAAAACCTCCCTTCAACAAGGACATTTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACACATATATTTATATATA
ATACTAATAAAGAATAGAAAAGGAAAGGTAAAACATCAATTAATCGTCTTTGTATATTTTTAGTGACAACTGATTG
ACGAAATCTTTTTCGTACACAAAATTTTTAGTGACGAAACATGATTTATAGATGATGAAATTTTGTCCCTCA
TAATCTAATTTGTTGTAGTGATCATTACTCCTTTGTTTGTATTTTGTGTCATGTTAGTCCATTAATAAAAAATAT
CTCTCTTCTTATGTACGTGAATGGTTGGAACGGATCTATTATATAATACTAATAAAGAAATAGAAAAAGGAAAGTG
AGTGAGGTTCCGAGGGAGAGAATCTGTTTAATATCAGAGTGCATCATGTGTCAATTTTATCGATATGACCCTAAC
TCAACTGAGTTTAAACCAATCCGATAAAGCGAGAAATCATAGTATTGAGTCTAGAAAAATCTCATGTAGTGTG
GGGTAACCTCAGCAAGGACGTTGAGTCCATAGAGAGGGGGTGTATGTGACACCCCAACCTCAGCAAAAAGAAAACC
TCCCCTCAAGAAGGACATTTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTCTCATCACACATATATATATATTATAATAACT
AATAATAATAGAAAAGGAAAGGTAAAACATCACTAACGACAGTTGCGGTGCAAACTGAGTGAGGTAATAAACAT
CACTAACTTTTATTGGTTATGTCAAACTCAAAGTAAAAATTTCTCAACTTGTTTACGTGCCTATATATACCATGCT
TGTTATATGCTCAAAGCACCAACAAAATTT-1713
  
```

### 6.2.3 ST-LS1-Promotor (1585 bp)

Die DNA-Sequenz entspricht der 5'UTR des ST-LS1-Gens aus *S. tuberosum* mit der Acc. # X04753. Durch Sequenzierung wurde nur der Bereich von 1235-1585 überprüft, dabei wurden Sequenzunterschiede an Position 1286/1287 von GG zu AA festgestellt, sowie das Fehlen eines A an Position 1583.

```

1-CCAAGTTTTTTTTGTTGTTTCTATCCACTGATGTCTGTGCTACTGAACATAATGCATATTGGGGGGGGGGGGT
TGTGTTTCATCTGTTGGACAAGCTAATAATATCTATTTGTTGTCTGAATCACAATTTTCCCATGATAAAATTAAGC
CAAAATTCGGCTTCTCACAACCTGATAGAATCTAATTTTATGACTTTTATCAAAAAAAGAAGAAGATAGAATCT
AATTTTATGACATTTAATGGTACCCATTCTTAAAAATTTCCGATTCAACTAATCCTTGGAGTTCATTTTCTCAT
AGGTGGATTTTCATGCTGGAGTTACTGTAAATAGGGTTGGATTTCTACATTCTTGCAGAGTTCATCTGCATTCAG
CCCCCTCTGAAGCACAGGAGTCAGCTGCATTTCAAATGATTACCCAATTACAGACTATGGCAGACCCGACCCATT
AGATTTAATGTGGCAAAGAAACATCAACTCCAATATTTTTGAATCCTATTAATGGCTATCATACCATAGTACTGT
ATTAGTACTGTCCAGAAGCAAAAATTTGTTGTTTTAGAAATATTACTTTGGTTGCAACCGTATCAGTGTCTTGAACAT
TTATCAAAGCCAAATACATAATGGTGCCTTGAAATCAACTCTAGTTTATTGAAATGATGTCTATTGAGCACCTAT
ATGTGTTGCCAGTATTGCCCATGCTTAACTTAGCATTCTGTAAACAAGTGTATGCTGGATGTTGGAATCGAACA
TGGAGTTTTTCATGTTGCTTAGAACTATATGCTTTCAGTGTAGCAATATCGGAAGGTAAAACAGTTTAAACACC
AAAAGTAGAGAGAAATAAGGAGGAATTTAATCTTTGGATTTGATTTCGTCTTTCTTGTGGGAATGGTGAACCTGTT
AACCAGCTAGGTGAAATGAACTCAATACTTAGTTCAAAAATTGTTTAAAGTTCCATTTTGGTTAAGAGAAATGAGT
TGTGCTCTCTAGCTTTTGAAGATGATTTAGGTTCAAGGACTATAATTTTACACGATATTAGAGCTAGATCCATTG
ATAAGCCCGCGTTTTCTTAATGTTTTTGGCCTTGTAATTTCTGTTTTACATTGATTGACTGAATGAGTTGTGCTCTT
TCTATATGATCTCGGATAAATCTTTTTCTCATGAGCTAACTTAAGTTAGGATATGAGCTAACTGGTCTCCAACAG
GCAACAACCCATAGAGGAACCAATCAGTTTTTTCTTTTTGTCTCTCTCTTCTTGCACGAGTGGACTTAGTAAAT
AGAAAGGAAAATGGCAAAAATGTATAAGAAACAAGTCAATCTCTGGGTCCCTTAATAATCAAAGAAAACCAATG
AATGAACTCCAAGTGCACAAAATAAGATAAGGCAAAGGAAAATAAATTGTAGTAAGAATGCTATATATGATAA
TGTGGTAATAATATTATCTAGAAGCAATCCACAGAAGGGGTGCCACGTGTCAACTTGTAAATCACAAATTGCAA
GTCATCACTAATAATTATTATCAAGGGACCATGCAAAGTGAAAAATAATAATTCATACTAAGTAGTGAGAGCAAAA
GAAGAAAAAAGG - 1585

```

■ *Hae*III-Restriktionsschnittstelle

### 6.2.4 RolC-Promotor (1120 bp)

Keine Acc. # vorhanden.

```

5'-CGAAAAAGGCAAGTGCCAGGGCCATTTAAAATACGGCGTTCGGAAACTGGCGCCAATCAGACACAGTCTCTGG
TCGGGAAAGCCAGAGGTAGTTTGGCAACAATCACATCAAGATCGATGCGCAAGACACGGGAGGCCTAAAAATCTG
GATCAAGCGCAAAGTATGCATGCGTGCATGTTTCAAGGTTTCAAGTACTGGGTTTGGTCTTTTCTTGTGCTGTTGT
TTGGCCTTAGCGAAAGGATGTCAAAAAGGATGCCATAAATGGGAGGAGTGGGGTAAAAGCTTAAAGTTGGCCCG
CTATTGGATTTTCGCGAAAGCGGCATTGGCAAACGTGAAGATTGCTGCATTCAAGATACTTTTTCTATTTTCTGGT
TAAGATGTAAAGTATTGCCACAATCATATTAATTAATACTAACATTGTATATGTAATATAGTGCAGAAATATCTATG
CCAAAATGATGTATTAATAATAGCAATAATAATATGTGTTAATCTTTTTCAATCGGGAATACGTTTAAAGCGATTA
TCGTGTTGAATAAATTATTCCAAAAGGAAATACATGGTTTTGGAGAACCTGCTATAGATATATGCCAAATTTACA
CTAGTTTAGTGGGTGCAAAACTATTATCTCTGTTTCTGAGTTTAAATAAAAAATAAATAAGCAGGGCGAATAGCAG
TTAGCCTAAGAAGGAATGGTGGCCATGTACGTGCTTTTAAAGAGACCCTATAATAAATTTGCCAGCTGTGTTGCTTT
GGTGCCGACAGGCCTAACGTGGGGTTTAGCTTGACAAAGTAGCGCCTTTCCGCAGCATAAATAAAGGTAGGCGGG
TGCGTCCCATTATTAAGGAAAAAGCAAAAAGCTGAGATTCCATAGACCACAAACCACCATTTATGGAGGACAGAA
CCTATTCCTCACGTGGGTGCTAGCTTTAAACCTAATAAGTAAAAACAAATTAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
ATATTCGCACAACGAGGCGACGTGGAGCATCGACAGCCGCATCCATTAATTAATAAATTTGTGGACCTATACCTA
ACTCAAATATTTTTATTATTTGCTCCAATACGCTAAGAGCTCTGGATTATAAATAGTTTGGATGCTTCGAGTT -
3'

```

### 6.2.5 Promotor P 130 (1341 bp)

Keine Acc. # vorhanden.

```

5'-GAATTCGAGCGACAACAATAAGAGATAATACAGATCTCAGCCAAGTTTTCAGCTACTTTTCTATTTTTGACAAA
TTAAACAATTTAGTTTACGTTAGTATAGATAAAACCAAAAAATGATCAATTCATTAATCCAATGCATAGAAATGT
TTGTTTTCTACCTGAGAATTTTGTCTCAGAAGATTTTGAATGCAACTCCAATCCATCTTGTGAAAGTTAAAGC
TAGGAGAGAACATTACAAGAACCAGTTCAAACGTTTTCTTCTAATGTTCAATGAGAACTGGAGTTAAGTCGTTTT
TGCTTCTCTTTTTTAGACTTTTTTTTTTAAACATTACAAGACTTGTATTTGGTACTTGCGAATATGTTTTTAGT

```

GGAAAATATTTTCTTATAAAAATATTTTATGGAAAATAAATGGTTTTATCACTTATTTTTCTTTGTTTGGTTGGT  
 GAGTAAAAATATTTTTCGGAAAAATATTTTCTAGTGTGGTTAAATGAGTAAAAAATATTTTATTTAGGAAAA  
 TATTTTTTATGGTACTCTCCTCACCCCTTCCCCAAGTCCACATGTTTCTTCTCCCTCCACTCCCCAAAT  
 ACCCAATGTTTCTATGACTATTTTTCTTCAAAAATTTAATTTATTTTTCTAAAAATTCACACAAACCCAAAGGAA  
 CTAATGTGATGCTTTATTTTTTTTTTACGCAAAAACAACATTTGAAATTTGTGCTCCATAGCTAAAAAGNAAATACT  
 CTTTTTCTTGATTGAAAAAAGTACTTTTTCTACGACATGAAAAATAAAGCATTCAATTTATTTGAAATAAAGAA  
 AATACTTTTTCTACATCATGAAAAGAAAATACTCATTTTTGTTGAAATAAAAAAATACTTTGTTGAAACGAAA  
 GAAATTACTTTAATTTTGCTACATCATGAAAAACAAAATACTTTTTACTTTCATCATTTTGTAAAGATGAAAGAAA  
 ATATTTTTTCTACGTCATGAAAAGAAAAGTAATTTTTTGTAAAATGAAAAATATATTTTTTTATATCATGAA  
 AAGGAAATTACTCATTTGTTGAAATAGAATTTTTTTTTTTATCTATATAACATTTAAAAAGAAAGGTGGGTGGGG  
 GCGTGAGTTGTGTGGGTAGGTGGGTATACGGGGTGGGTGGTGTATGGTTGGTAGGGATGGGCACACCCCTCAAAGT  
 CTCATTTTTTTCTTGCATTTAACTACCCTAGTGTGACCTGTGCGTAAAAACTCTATCCAATGTCTAACTCT  
 CTTATAAATAAAGCCTCTAATTAAGCCTTTTTGTATATGAAGAAGACAGAGGTCTCAAAGCTCGGTACC - 3´

## 6.2.6 Promotor P 247 (1123 bp)

Keine Acc. # vorhanden.

5´-GGTACCTCGTTATCGAACGCTATGTTGTTATTTTCGAGGTGGTGCAGAACTCATTGTCAGCAGGTAGGGGT  
 GCCAATTGTGAGTTTGACATTTTGAGCTTTAACCTGAAATTAGAGACACTTCAAAGAACAAAGTGTAAAAATAGTGT  
 GTGTTATGGAATTTGTATCAAATAACCAATATTATTCTTAGCCCAACGGTGGATGCCAAACTGTTTACCCTTAA  
 AATCGGATAACAATTAATTTATAAGTAATTTAAAGGATACGTGGATTAATTTGACACAAATGATGACTTGAAT  
 TGAATTAAGCGAATAATGATAAAAATAAATTCAAACCGTAAGCCTTGAAAAATGAGTCTCATTTGAACTGGATGC  
 GCAATTCAAATGATATCAGATATCATAGAATAATAGCTTACAAAAAGAAAAATGATGTTATATTTGCTTTTGGATGC  
 GTGTAACCATGTGCTTTACAAATAATCAGACCCCTTTATATAGTAGGGGAGTCCCTACTTTAGGTACAATTTCTAT  
 AAAATGTAAGAAATCACATGATTTGCTAATTAGCTGGTTTCTTATTGATACGTGCCGAGATTTCTGCCGTGACAC  
 CCGACCGATTATGGATATTTCTCCCTCCGTTATTGATCTAGCAATGTTTCTAGAGCTCATTCGGGGTCAGGGT  
 TGTTTCCGGGGTCACGTATTCGATGTTCTCGAGGACGGGCACTCTGACCTCGTATTTTGGTTCGATGGAATCTGG  
 GATCGATCTTCAACCTATTGAGTTTCAATCCCAATATGTCATTTAATAGACGAATCTGATTTCAACCGTATACAA  
 CCATTTTTGCCTAAAATAAAATAGAGAAACGAAATCGGAATAGACGAAAGAAAAGCGAAAAAGAAAA **TGATAAAGT**  
 AACGGTAAT **TTCTGA**ATAGTAAAATGACCC **TAAAA**TTAAAAATAAATCTTTAACGAATCCCAATAAATAGCCCT  
 ACTTATTTTCTCTGTTTACAGCTACGAACTTCTGGAAGCTCACTATGGACTGCTACTTCTCCTCCATTTAA  
 CCTCTCCTTCTCTCCTTCTCCTCATTCCCTCAATTTCTCC **TTTCAAC**AGCTTTTCTCTCTG **TATCCT**CTA  
 G-3´

## 6.2.7 FBP1,1-Promotor (1108 bp)

Keine Acc. # vorhanden.

5´-GAATCCGTTGGGCTTCATTATGTGTTTTTACATATTCGTTTTCTGAACCACCCCAACCCGGTGAAAAACAT  
 TGCTCTGCCACTGGCTCAATGTATTGACACAAATGAACTTCAAACCTGGGCAGGTGAATTTATGCTCTAGGAGCATT  
 GTATTATCTATGCAATGCATCAAACAAGGAAGAGATCTTAAAGCCAGAAAGTAATTTGATGCAATCAAAGTTATGC  
 AGCTGCAGGTGGAGTTAGTACAAGCTTCAGTAATTTGGCTCAGGCTTTCTTAGATCAACATGTTCTCAGCTTAA  
 TAAAAATGGAGGAAACCAAAGATTATGTTGTAATAATCATTTTTCTATCTTAGATGGTCTATCGGAAACAATTTAT  
 TATTACTCTATCCAATTCATTATATTTTCAAAGTTATGAAGTCCACGAAATATGTGACGTGGTAAAGAAAGAC  
 CCATGCCAAGCCAGTGGGATATAGAAACAAAACATGTAATAAAGAGAAACAAATAATGAGTTTTCGAAAAGAACAGA  
 AGTTAGCATAAGGACGAGAATCACATTATCTTAGGTGCCAACCACTAATCCTATGTATCATTTCTCCTCTTTCCAC  
 GTGTCATCCTACACTTCTTTGCCATCAGATTAGATAGCCCGTTAGTACCTACACTGTATATCAAAAAATACGT  
 AACAATCATCAAACATATCATCGATCAAAGGATATTTATCTTGATGTGCTTTTCGCCGTCCATTTGTAACGAGTTT  
 GGATGAATTTGATATACCCCACTCAGATATCAATATATTTTATAAAAAAGAAAACAAAATTTGAATACTAGTAATAT  
 CTATGTAGATATTTATTTTTTCAACAATCCTGTAAGTTATAAGGATAACTCACTTATATGTGACGTGGATAATGA  
 AGAGCTAGGCAGGCAGTGGAGATAGAAAACAAATTAAGCAGAGACGAAAAACAAATCAGTTAACAGAATGACGAA  
 TTGGATCACGTTTATCTTAGTGCCAACCACTGATCCCATGCTCTGCTCTTTCCACG **TGGCATCCT**CTGA  
 CGTCAGATCAGATTCCTCTTCTTTTTTTTTTTTTCTGTATATATATGAGCATTTTAGTAGT - 3´

## 6.2.8 FBP1,7-Promotor (1730 bp)

Keine Acc. # vorhanden.

5´-GGATCCAGCTAATGCTGCTCTTGTCACTCAAATGATGGTATCCCTCTCGTCCATCCAGTGTGTTGTCAAGTCC  
 TGTTAGGAACACAGTAAGGATATAAAACAAACATTTTGTGGTCTTCTTGGTTATTGAGTGTGCTGTTCACTTGT  
 TAAAATGACATATACGTAGTGAGAACTCAACTGTTGAGTACCATTGATCCGTCAATCTTGTGCGATAACTTTG  
 ATAAGGATATTTCAGGCATCAGACATGTCCACTCTATAGAACTTGGTCTTTTTTTTTTAAAAATAAAAAATAAAAT  
 GTTTGGCATACACGAACCTTCTGTTACTTTAGGCTGATCCAGAATAAAATGTTGTTTCTTCTCATTTCTGGAAATTAG  
 TTGTTTTGCACACGGAAGACTTTTCAAATTTACTAATTTGTGTTTCGTCCGTCTCAAACCTGGCTCACACTTTGGTGG



TCAATTTTACTTCTCAAGGTAAGCAATTACAGAATATGAATGTGCGCTCTCCTCATATTTATCCGAACAATAAAAA  
 ATGATATCTGTTTGCATATGCATGTAGATCACACACCCCCCCCCCCCCCGCCCTAGATTCCTCGATTTAGATT  
 AAATAATCATCTACAAGAATTCGGTTGGGCTTCATTATGTGTTTTTACATATTCGTTTCTGAACCACCCCAC  
 CCGGTGAAAAACATTGCTCTGCCACTGGCTCAATGTATTGACACAAAATGAACTTCAAACGGGCAGGTGAATTA  
 TGCTCTAGGAGCATTGTATTATCTATGCAATGCATCAAACAAGGAAGAGATCTTAAAGCCAGAAGTAATTTGATGC  
 AATCAAAAGTTATGCAGCTGCAGGTGGAGTTAGTACAAGCTTCAGTAATTTGGCTCAGGCTTTCTTAGATCAACA  
 TGTTCTCAGCTTAATTTAAAATGGAGGAAACCAAAGATTATGTTGTAATAATCATTTTCTATCCTAGATGGTCTAT  
 CGGAAACAATTTATTTTACTCCTATCCAATTCATTATATTTTTCAAAGTTATGAAGTCCACGAAATATGTGAC  
 GTGGGTAAAGAAGACCCATGCCAAGCCAGTGGGATATAGAAAACAAAACATGTAATAAAGAGAACAAATAATGAGT  
 TTCGAAAAGAACAGAAGTTAGCATAAGGACGAGAATCACATTATCTTAGGTGCCAACCACTAATCCTATGTATCA  
 TTCTCCTCTTCCACGTGTCATCCTACACTTCCTTTGCCATCAGATTAGATAGCCCGGTTAGTACCTACACTGTA  
 TATCAAAAAATACGTAACAATCATCCAAACATATCATCGATCAAAGGATATTTATCTTGATGTGCTTTTCGCCGTC  
 CATTGTAACGAGTTTGGATGAATTTGATATACACCCACTCAGATATCAATATATTTTATAAAAAAGAAACAAAATT  
 GAATACTAGTAATATCTATGTAGATATTTATTTTTTCAACAATCCTGTAAGTTATAAGGATAACTCACTTATATG  
 TGACGTGGATAATGAAGAGCTAGGCAGGCAGTGAGAGATAGAAAACAAATTAAGCAGAGACGAAAAACAAATCAGT  
 TAACAGAATGACGAATTGGATCACGCTTTATCTTAGTGCCAACCACTGATCCCATGCATCACTCTGCTCTTTCCA  
 CGTGGCATCCTCTGACGTGATCAGATTCTCTCTTTCTTTTTTTTTTCTGTATATATATGAGCATTTTAGTA  
 GT-3'

### 6.2.9 Nos-Promotor (306 bp)

Die Sequenz des P Nos stammt aus der Vektor-DNA von pBin19 (Acc. # U09365). Die angegebenen Lokalisationen beziehen sich auf diese Acc. # .

In dem P Nos des pNoslux-Konstrukts befindet sich ein Basenaustausch von C nach T an Position 9170 gegenüber pBin19 (siehe Alignment, Kap. 6.5.1).

9259-GATCATGAGCGGAGAATTAAGGGAGTCACGTTATGACCCCGCGGATGACGCGGGACAAGCCGTTTACG  
 TTTGGAAGTACAGAACCACAACGTTGAAGGAGCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAAATGAGCTAAGCACA  
 TACGTCAGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAGTGCCTAAAGTCACTATCAGCTAGCAAAATATTTCTTGTCAAAA  
 ATGCTCCACTGACGTTCCATAAAATTCCTCGGTATCCAATTAGAGTCTCATATTCCTCTCAATCCAAATAATC  
 TGCACCGGATC-8954

### 6.2.10 SKT2-Promotor (3036 bp)

Keine Acc. # vorhanden.

5'-AAATAGTAGTTAAATATTACATGAACAAAAATTAGAAAAAGCGTCACTCTTTGATAAACATTAAGATATT  
 TAAATTATAAATTAATTTTAAAGTAGGGGTGTCAAATGGGCGGGTTGAGTTGAAATTTGGAGATATTTAAATGGG  
 TTGAGATAGGAATCGGGTTGGGTCTTGACCCGCTCAAATATACTTTGGGCTCAAATGGGCTAAAAATGGGTTGGG  
 TCTTGACCCGCCAATTTGACTCGATTAATCTCAATAATTTTAAACATAGTGATATTTAACTTTTATAAATCACAAT  
 TCGAATTTTTCGCTAAAGATTTTTTTTTAAAAAAGTAAACAAATGGATAGATAAAATCATAAAAGATGTTAAATAGAT  
 AATAATTTATACCTTTAATATATGTATCTTAGTAAAGAGTTTTTAAACCGGGTTGAAATTTGGAGATTGAAATGGCT  
 CAATTGAGGATTATCTTAAATGGGTTAGGCATGAATGAGTTGAGATTGAACCAATTCAAATTTATCTTGAGCCC  
 AACCTTAAATTTCTGGGCGGGTTGGACGGGTTACCTATGTTTGGGTTCATTTTTTATACCCCTAATTTTAAAGTT  
 TGATTTAAATAAAATTTGAACTACATACATACATACATATATATATATATATATACATACATATATATAAAGTAAT  
 TGTTAGAAAATAATGTAGTCAATTTTTTTTTTAATTTCAAAGCACATATTTATGAAGTTGTTTTGTAGTTAGTCAA  
 ATAAAAATTTTACAATAAATTTTATTAATTTCTTGATAAACCAAGCCGCAAGAACAAAAAAGTTCAAGGAAAA  
 TAATTTAGGTAATTATTAAGTTGGAGAATGAGAGAGACTTGAATTTTTATAAAGAAAAAGAAATATAGAACACAA  
 TTTTTTTTCGAAAATAAAGCATCTTTAAAAGGGTCTAAATGAGAATAAGACACCATTGCTTCTACTAAGACTA  
 GGATAAATTAGCTAACTAGTCCAAATCCCTAACATAATTAATAAAAAATATCTATACTTTAAAAATAATTTAAAA  
 ATGTCAAAATGTCAATTTTTAGCAAATAAAGTGTATTCTAATATAATTCAGTTTCTTCTTTTATTTGGGACC  
 ACTTTTTGACTCCATTACGGGTGAAAGAAAAAACAAGACCCATTACCTACTTTTTTTCTCTCTAAAATTTTTTA  
 CCCAAATCTGTCTTTTATATTTCTCTCTCACCATTTTTTTTCAATTTCCATATCCTCAAGTAATTTTAAACC  
 TTGCCATTTTAAATCAAATTTCTCCATTTTTCTAGCAAAATCTCTAAATCATTCAAAGATTTTCAACCTTTGT  
 CGAAGTGAATTCGACTGATTTGCGATTGTTTCCATTAGGAATGAAAAATTTGAAATAATCGATTGGGATTTCTAA  
 GTGAATTCGACTGATTTGTTGAACCTTCGAGATTGTCTGCCACAAACGTATTACAACGGTTTTTTTACAAAAACAT  
 TTATATTACGTCGTAATAAATCATTTTATATATTACAACGGTTTTAAAAACACTAAATTCATTCGTTGACGCCGTA  
 AACAAATTAAGGTATCACACAAGCCTCCAGACAAGCTAAGCATCACAATAGGCATCACACAACTAAACAAGAG  
 GTCAACACTTACCAACCTCTAAAACCTCATACTACAATTAATTTTACAATTTGACTTCTTAAGAAAAATCACTTACT  
 CATCTTAGTCTAAAAGAGGGATAACCAAACTACCTCGAAGGCCGAACTTCACTCGAACAACTCAAAGCACTTC  
 GTCAACCGCACAAATCCAAAATGATCCCCAACTATCAAGAATAGATAGAGTTTCAAAAAGGAGCCCAATAATA  
 TCATATTGATAAGATTTAAAAATCGAGAATAAATAAGTTCAAAAATCACTTCAGAAATCAAAGTGACATTACATT  
 ACAGAAGCGGCAATTTAGTTTTAAATTTATGGAAAAGACAACAAAATTTTCAATCAAGGAAAAGAGAATGAGAAGT

CTGTCTATATAAAAAATATTTAATGTTTTATATTTTAAAGAAAAATTTAAATCTATTTGGGAAAAATTTTCAAAAAATTA  
 AGAAATGTTAGTGGCAGTTGAAAGCCTCATAACTTAAAGTACAAAATCGTCGCTATTTAAAAATATTTAATCTTATGTA  
 TAAAAAATCTTGTATTATATTATATTTGTAGCGGTTTCATTGAAAGCATCATAACTTAAAGTACAAAATCGCCGCTAT  
 TAAAATGTTTTAATCTTATATAATAAAAAATCTTGTATTATATTATATTTGTAGCGGTTTCATTGCAACCGTCGTTAT  
 ATAACCTGCCGTAATATTTAAGTGGGTAAAGCTGTGCATAGGGCCCTCCATGCACCTGATTTACACAAGAGGCCAAA  
 CCAATAAATATGACATGATATCATATCCCTATAGCTATGTCTGCATTATATTGGAGATCTGATGAGAAATAATAAA  
 AAGGGAAAATTTGATGAAATAACAAATTATTAATTAATTCAAATTAATGTTATAGTTATAGTTTATTTTAAAT  
 GTAATTTGCAGTAAATATTCTTTTTTTTTTTTTGTGCATCTGATTTCGATATACAATTAGCCATTTTGTATATACAATT  
 AACCATTTTATACATTTCCGTATAAAAATGTATAAAAATGCGTTTGTGTTTGTATAAAAGCGAGAGAAAAGTGTATAT  
 ACAAATACAAATACATATATTTTCGTCCTATACA TTTATAAA TTATACAAAATACATATCTTATTATACAAA TTACAA  
 TGTATAAATGAA TTTATATAAAAATTTGAATAAT TTGTA TAAAAATTTGGATGTTTGTAGCGAAT TATACAAAATCAAAA  
 GCTCCTTAACAACATAAAAATCTATAATATACAAATATGATTTTTATAT TTGCTA TA TGTAAAAG TTGCTC TAAA  
 AAAAAATAAGT TGTATTTTTCTATAAAGATAAACTAATTTCATACACAACCTCTCAAGGGCCACTCATATAAGGAC  
 CACCATCCAATTTCTTTTTCTCTCTAGTATACGCGGATCC - 3'

### 6.2.11 KST1-Promotor (1580 bp)

Die DNA-Sequenz entspricht der 5'UTR des *kst1*-Gens aus *S. tuberosum* mit der Acc.# AJ242852. Basenaustausche gegenüber dieser Sequenz traten übereinstimmend bei der Template-DNA, den pBin- und pKK-Konstrukten (pKST1lux, pKKKST1lux) auf:

Position 291 C zu T; Position 593 G zu A; Position 595 A zu T; Position 632, 633 CT zu AA;  
 Position 700 C zu G; Position 703 A zu C; Position 770 T zu A; Position 774,775 AA zu TT;  
 Position 982 G zu C; Position 991 G zu T; Position 1133 C zu A. Fehlen von Basen: C an  
 Position 307; C an Position 585; TG an Position 598/599; G an Position 607; T an Position  
 634; G an Position 789; G an Position 1329. Hinzufügen von Basen: T zwischen den  
 Positionen 494/495, A zwischen den Positionen 701/702; C zwischen den Positionen 938/939;  
 T zwischen den Positionen 977/978; C zwischen den Positionen 1061/1062; C zwischen den  
 Positionen 1156/1157; A zwischen den Positionen 1162/1163; A zwischen den Positionen  
 1164/1165 (siehe Alignment, Kap. 6.5.3).

4-ATCGTCATCAGAAGAGGTGGAATTAGAATTTTTTATTTAAAAAGTTTAAAAATATAAAACTTTTTAAATACACGA  
 AGGAGTCAAAGGTTGTTCAATCTTTACTATATGTAAAAAATTTTTAATTATATACAATCAACATATTTTTTTTG  
 TCGAAGAAGATTCAAATAAACCCCTTTATCATACTGACTTGGCTCCGCCCTAATCATCATCATTTAAATAAAAC  
 TTAAAACTATATCCTTTTCCATTTAATCTCTCCCACCTACACAAACACCTCATTTTCTAAGAAACTTCATGCATG  
 TGGGCCGTGTTATTTATTGCATGAACCAACCCCTTACCCGCTCTATCATTTTTTCATTCTACACCAACATTAAC  
 AAAACAAAATTTGTAATATATGATCCAATTTGTGACATAGTATACAAAAGAAATTCATGAACCTCCAAACATCAA  
 GCACATGGAACCTTATGTATGGAGAAGAGACAACAGCATTTGTAGGCATGCACATAATTTCAATTTTCAAAAAAA  
 TAATACTAAGATATATCAACCTTTTACAAATTTTGTCCATTATTTTGTCTTTCGACTTCCAATATAGGAATTTGGA  
 AATTGGAAAAGGTGATTCGAGAAATATATCCTATGAAATACTCTATACATTTTTTAATATAAATGAGAATATCAG  
 AGTTCCAACGTCATTTCCAATTTCTTACCTAAGATTTGATCACATGTTCAAAAATCAAACCTTACATTTTGTAAACAA  
 AACTACTTTAATAACATTAGGAAAGAAAAATTTGATTGCTTTAAATTTGGAAAAGGAAAAGGATAAAAAAGAACGTAGA  
 TTTTTTTTGTTTACTAAAACTAAAGTTTTCTCACATGGAATTCGATTTCTTATTGGTCCACGTGTTTTCCACAA  
 AATAGTTCCCAAATCCTATTTGGGATTTGTTGGTCAATTCAGAAAATGAAATGAAAAACCTATCTGTTTTT  
 CACTGAAATTCAGCCTTGCAATAAAATGCTTATTCTTAAATTTCTATCTTGGTGGAGATCCACCACCATTAC  
 CATTTTCCAAAAATCTTACAACATTATTTCCATTTTCTTTCTCTTAATTTCTCTCAACAAAATTTCCCTTGACCT  
 GAATTTATCAAAGAAAATCATGTTTGCACCTTACACTTTATAACTCATATCTCGCTCGTTTGTGTTTATTG  
 TGTTTCAATATTGCTATGTTTTCTTCTATTTTGTACTTGCATTTGCTCACTCGAGCTTTTGGTAACAATCTCTCT  
 ACTTCTACTAGATCTGCTACAGTCTACC TTCTCCAGACCCACTTG TGGGAAGATACTATAGAAGTAGGCAAGT  
 AGCAATGTCACG TTCTTAAAGCTAAATGCTTTTTTCAAAAAGAAATCACAATAAAAGAAAACACTTGACCCGTTGATCAC  
 CCAACTACTTCTTCTACATCCTCTATATATAAACACGCTAAAAATAACTAGTTAGTATTTTTAAATATTAC  
 ACATTGCCTTTCCAAGAACTCGAAAAAATAAAATTAATAAACCACATCAACAAAAAAGAGCAGCAATATA  
 TAATA - 1583

### 6.2.12 KCO1-Promotor (980 bp)

Die DNA-Sequenz stammt von der 5'UTR des *kco1*-Gens aus *A. thaliana* mit der Acc.# Y07825. Das pBin-Konstrukt (pKCO1lux) weist an Position 416 ein Basenaustausch von T nach G auf und an Position 491 das Fehlen der Base T. Im A-Stretch von Position 617-628 wurde ein A weniger und von 685-699 wurden ein bzw. zwei A weniger sowohl in der Template-DNA als auch in den pBin- und pKK-Konstrukten (pKCO1lux, pKKKCO1lux) sequenziert (siehe Alignment, Kap. 6.5.2).

```
241-CTCGAGTGGTTGAATGTTTTTAAAATTATGTCAAATTACCATGTATATCAATCACTTAGTAATGTTTTAGA
ACTATGTCAAATACTAGTGTGTGTTATATTTCTTTGTGTGTGGGGATGTTTTGAAGTATGCAATTTCTCACATAT
ATATGTATCATATGAGTGCATTAATAACATCTTTGATGTATGATAAACAATAAAAAATGTGATTTATCGACTT
ATAAAAAATCTTAACATATTGACATTAACATAAAAAATAGATTATTGTATGATATAGATTAAAAATGACGTCAT
GCTGGATATTTTGGCTTATTGGCTTGTACATTACTTGTGATTATGAGTGTATAATATAAAAACTAATTACTAGATT
TGCACAAAAAAGGATAGAAAATAAGACATTACATACATTTCTTATATGAA
AAAAAAAAAAAAAACATTTTTATACTAAGATACTAATGAAAAATCCTATCAAGAAAAATGAAGAAGATCATAAAAAC
AAAATTATCGGATTTGAAGAGAATAAATTTTGACCAAAAAAAGAAGATAATTAATAAAAAAACAAGAATT
GGCCAACTGTGAGAACATCATCAATGAAGAACAATTGCGAGATCCGACAACACCGCTTCTTTTGATTTGATCTT
ACTATCCTGGGTATGTCTCAATTTCTTCTTCATCTTCTCCTCCTTCAGTTTCGTGTTCTGTGCTGATTGATTACTCTC
ACAAAATCATCTTTTTCATTGTCTAAAGGTCTAATCTTTAGCTATAACTCAAAAATCTGTTTCTAAGTTCTGACAA
GTTTCTGAAACGAAATTCAAGTTTTTTGATACATATGTTTCATTTCTCAGAACAGGGTTAATTAACAAGAGATG
TCAATTTTGGCGATGGTTTTTCGTAACATAAACATGAGATTTGATTGTTCTGTGCAGATCTCATAGTTAATCTGGT
TTGAGTCTAGA-1223
```

### 6.3 Promotorsequenzen aus dem Chloroplasten von *N. tabacum*

Die Sequenzen stammen aus dem Chloroplasten von *N. tabacum* (Acc. # Z00044). Die angegebenen Lokalisationen beziehen sich auf diese Acc. #. Kursiv im Fettdruck dargestellt sind die Sequenzen, welche von der PEP oder/und NEP erkannt werden. Die entsprechende Transkriptionsinitiationsstelle ist im Fettdruck dargestellt.

Potentielle TATA-Konsensus Sequenzen sind wie folgt dargestellt:

■ TATA-Box

#### 6.3.1 Promotorregion des *psbA*-Gens

In dem P PsbA traten zwei Basenaustausche gegenüber dieser Sequenz übereinstimmend in der Template-DNA (pKL13) und dem pBi-PsbA auf:

Position 1675 A zu C und Position 1678 G zu T

```
1822-CCCGGGCAACCCACTAGCATATCGAAATTCTAATTTTTCTGTAGAGAAAGTCCGTATTTTTCCAATCAACTT
CATTAAAAATTTGAATAGATCTACATACACCTTGGTTGACACCGAGTATATAAGTCATGTTATACTGTTGAATAAA
AAGCCTTCCATTTCTATTTTGTAGAAAATACTAGTGTGCTTGGGAGTCCCTGATGATTAATAAAACCAAGA
TTTTACC-1596
```

### 6.3.2 Promotorregion des *rbcL*-Gens

In dem P RbcL trat ein Basenaustausch an Position 57508 von A zu G gegenüber dieser Sequenz übereinstimmend in der Template-DNA (pKL12) und dem pBi-RbcL auf.

```
57328-AGTCAGGTATTTCCATTTCAAAAAAAAAAAGTAAAAAGAAAAATTGGGTTGCGCTATATATATGAA
AGAGTATACAAATAATGATGTATTTGGCAAATCAAATACCATGGTCTAATAATCAAACATTCTGATTAGTTGATAA
TATTAGTATTAGTTGGAAATTTGTGAAAGATTCTATGAAAAGTTTCATTAACACGGAAATTC-57534
```

### 6.3.3 Promotorregion des *accD*-Gens

Insertion eines Cytosin zwischen den Positionen 59391 und 59392.

```
59385-CTCTTCTACCCATCCTGTATATTGTCCCCTTTGTTCCGTGTTGAAATAGAACCTTAATTTATTACTTA
TTTTTTTATTAAATTTTAGATTTGTTAGTGATTAGATATTAGTATTAGACGAGATTTTACGAAACAATTATTTTT
TTATTTCTTTATAGGAGAGGACAAATCTCTTTTTTCGATGCGAATTTGACACGACATAGGAGAAGCCGCCCTT
TTAAAATATATATTTTTAAATAATATAAAGGGGTTCCAACAATTAAATATATAGTGAAGTGTTCCTCCAGAT
TCAGAACTTTTTTCAATACTCACAATCCTTATTAGTTAATAATCCTAGTGATTGGATTTCTATGCTTAGTCTGA
TAGGAATTC-59760
```

### 6.3.4 Promotorregion des *rpoB*-Gens

```
28050-GAGCTCTCTCTTCTCTACAAATCATTTTTTTTAGCAACGAAATCCATAACAGAAAAGGGGTTAAATGCT
AAAAACCGATTCTAATTCATATATTTCTTTCTTATTTTTATGCCTTTATCTCAGCGAAAAGATCAAATGTCGAA
TCCATTTATTTTTCTGGTATTCAAGCAGGTTGGAATGTGTATTATCATAATAATGGTAGAAAATGGAATCATTTTT
GTTTTGATATTCATACAAAATTCATAACTTAATTAATAAGTCTAAGTAGCAGAAGTCTGTTTCTAGGGATGTT
TATCAATTTCTTTCCATTTGTATCTGTTGAATTC-27728
```

### 6.3.5 Promotorregion des *atpB*-Gens

```
57139-GAGCCAATTAGATACAAATAATGAATCGTAATAGAAATAGAAAATAAAGTTCAGGTTCGAATTCATAG
AATAGATAATATGGATGGGATTGTCATAATGATAGACAAATGAAAGACTTTCTCAAGATTCGATTCATCCACT
TGAGATTTTAAAATTAATAAGTTGGGTGGGCTTGCAAATTCAGTCTCAGTGAATAAGTAAACAATTGAA
TCGGTTCAATTGCATGGTGCCAACGAAATCGAGTGCTAATTCCTATTTTATTGAATTAACCGATCGACGTGCTAG
CGGACATTTATTTTGAATTC-56825
```

### 6.3.6 Promotorregion des *clpP*-Gens

```
74712-GAATGAGTCCATACTTATTTATCATTAGAAAGACCTATTTCGTAATAATTTGAGTTTATTCATTCTGTCT
TTCTTATGAATTTTTATAATCTATGGAATAAATAAATACGATAAAAACCAAATATGAATATATAAAGACATAA
AAAAAATTGTTACGTTTCCACCTCAAAGTGAAATATAGTATTTAGTTCTTTCTTTTCAATTAATGCCTATTGGTGT
TCCAAAAGTCCCTTTCCGAAGTCTGGAGAGGAAGATGCATCTTGGGTTGACGTATAGTGCGACTTGTCAATGATA
ATTGGGTCATAT-74407
```

## 6.4 Bakterielle Promotorsequenzen

Kursiv im Fettdruck sind die –35- und –10-Region dargestellt. Die entsprechende Transkriptionsinitiationsstelle ist im Fettdruck dargestellt.

Potentielle TATA-Konsensus Sequenzen sind wie folgt dargestellt:

■ TATA-Box

### 6.4.1 Promotorregion des *bla*-Gens

Die Sequenz stammt aus dem Vektor pKK232-8 (Acc. # U13859). Die angegebenen Positionen beziehen sich auf diese Acc. #.

5020–CGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACA**TTCAAATATGTAT**CCGCTCATGAG**ACAATA**ACCCT**GATAAAT**GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT-4887

### 6.4.2 Promotorregion des *nptIII*-Gens

Die Sequenz stammt aus dem Vektor pBin19 (Acc. # U09365). Die angegebenen Positionen beziehen sich auf diese Acc. #.

2085–CATAATTGTGGTTTCAAATCGGCTCCGTCGATACTATGTTATACGCCAACTTTGAAAACAACTTTGAAA  
AAGCTGTTTTCTGG**TATTTAA**GGTTTTAGAATGCAAGGAACAGTGAATTGGAGTTCGTC**TTGTTATAAAT**AGCTT  
CTTGGGG**TATCTTT**AAATACTGTAGAAAAGAGGAAGGAAATAATAA-2275

### 6.4.3 Promotorregion des *lac*-Operons

Die Sequenz stammt aus dem Vektor pBi101.2 (Acc. # U12668). Sie beinhaltet die pBi101.2 Vektor-DNA mit dem *lac*-Promotor von der *XmnI* – bis zur *HindIII*-Restriktionsschnittstelle.

2208–ATTTCCG**TCAATATTTA**ACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTGCGCCCTTTTGTCTTTGGCCCAATACG  
CAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG  
CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC**TTTACA**CTTTATGCTTCCGGC  
TCG**TATGTT**TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC-2497

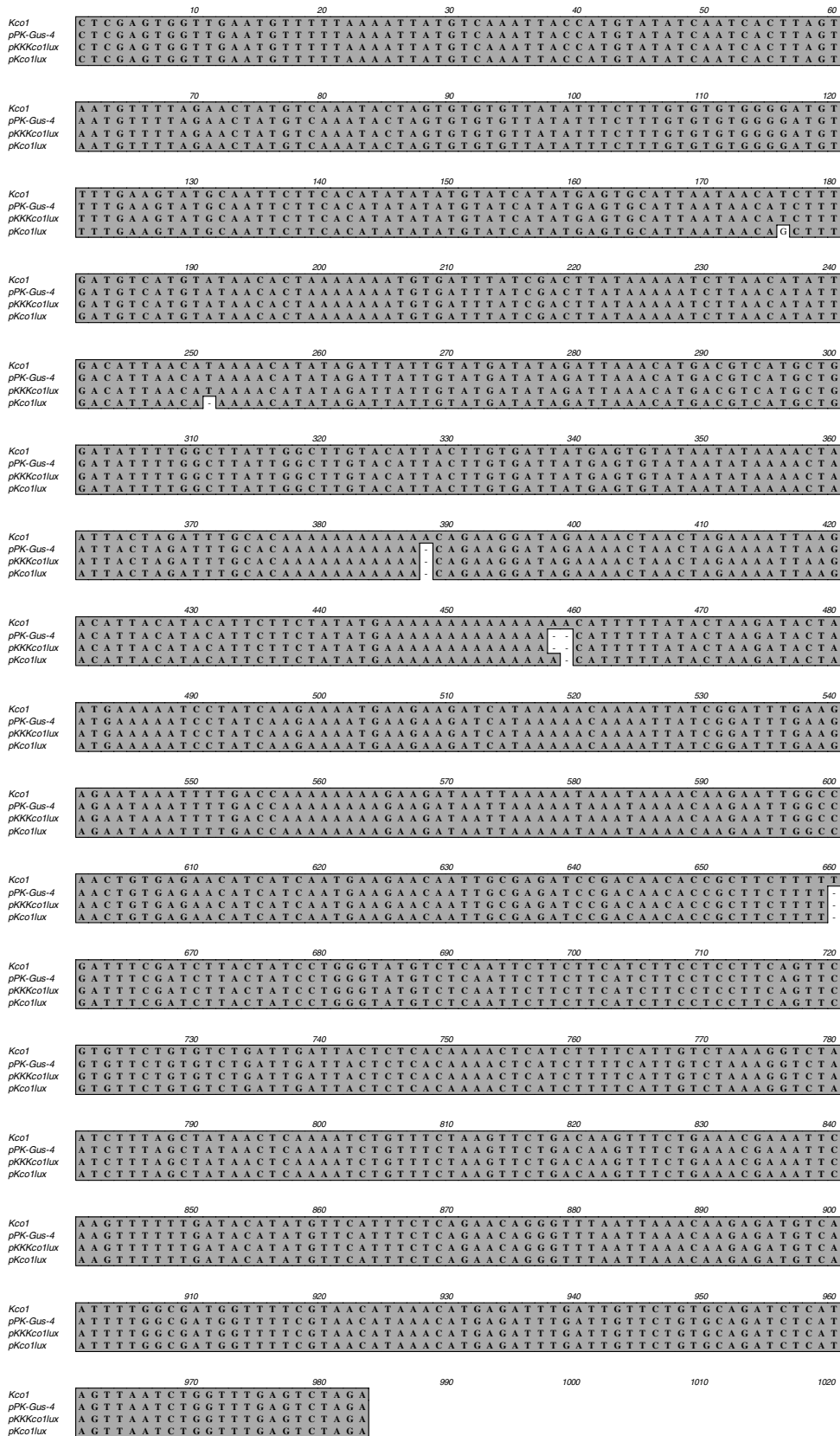
## 6.5 Alignments

### 6.5.1 Alignment der Sequenzierungen des Nos-Promotors

	10	20	30	40	50	60
<i>P Nos</i>	G A T C A T G A G C G G A G A A T T A A G G G A G T C A C G T T A T G A C C C C G C C G A T G A C G C G G G A C A A G					
<i>NosP26-364</i>	G A T C A T G A G C G G A G A A T T A A G G G A G T C A C G T T A T G A C C C C G C C G A T G A C G C G G G A C A A G					
<i>pKKNoslux</i>	G A T C A T G A G C G G A G A A T T A A G G G A G T C A C G T T A T G A C C C C G C C G A T G A C G C G G G A C A A G					
<i>pNoslux</i>	G A T C A T G A G C G G A G A A T T A A G G G A G T C A C G T T A T G A C C C C G C C G A T G A C G C G G G A C A A G					
	70	80	90	100	110	120
<i>P Nos</i>	C C G T T T T A C G T T T G G A A C T G A C A G A A C C G C A A C G T T G A A G G A G C C A C T C A G C C G C G G G T T					
<i>NosP26-364</i>	C C G T T T T A C G T T T G G A A C T G A C A G A A C C G C A A C G T T G A A G G A G C C A C T C A G C C G C G G G T T					
<i>pKKNoslux</i>	C C G T T T T A C G T T T G G A A C T G A C A G A A C C G C A A C G T T G A A G G A G C C A C T C A G C C G C G G G T T					
<i>pNoslux</i>	C C G T T T T A C G T T T G G A A C T G A C A G A A C C G C A A C G T T G A A G G A G C C A C T C A G C C G C G G G T T					
	130	140	150	160	170	180
<i>P Nos</i>	T C T G G A G T T T A A T G A G C T A A G C A C A T A C G T C A G A A A C C A T T A T T G C G C G T T C A A A A G T C G					
<i>NosP26-364</i>	T C T G G A G T T T A A T G A G C T A A G C A C A T A C G T C A G A A A C C A T T A T T G C G C G T T C A A A A G T C G					
<i>pKKNoslux</i>	T C T G G A G T T T A A T G A G C T A A G C A C A T A C G T C A G A A A C C A T T A T T G C G C G T T C A A A A G T C G					
<i>pNoslux</i>	T C T G G A G T T T A A T G A G C T A A G C A C A T A C G T C A G A A A C C A T T A T T G C G C G T T C A A A A G T C G					
	190	200	210	220	230	240
<i>P Nos</i>	C C T A A G G T C A C T A T C A G C T A G C A A A T A T T T C T T G T C A A A A A T G C T C C A C T G A C G T T C C A T					
<i>NosP26-364</i>	C C T A A G G T C A C T A T C A G C T A G C A A A T A T T T C T T G T C A A A A A T G C T C C A C T G A C G T T C C A T					
<i>pKKNoslux</i>	C C T A A G G T C A C T A T C A G C T A G C A A A T A T T T C T T G T C A A A A A T G C T C C A C T G A C G T T C C A T					
<i>pNoslux</i>	C C T A A G G T C A C T A T C A G C T A G C A A A T A T T T C T T G T C A A A A A T G C T C C A C T G A C G T T C C A T					
	250	260	270	280	290	300
<i>P Nos</i>	A A A T T C C C C T C G G T A T C C A A T T A G A G T C T C A T A T T C A C T C T C A A T C C A A A T A A T C T G C A A					
<i>NosP26-364</i>	A A A T T C C C C T C G G T A T C C A A T T A G A G T C T C A T A T T C A C T C T C A A T C C A A A T A A T C T G C A C					
<i>pKKNoslux</i>	A A A T T C C C C T C G G T A T C C A A T T A G A G T C T C A T A T T C A C T C T C A A T C C A A A T A A T C T G C A C					
<i>pNoslux</i>	A A A T T C C C C T C G G T A T C C A A T T A G A G T C T C A T A T T C A C T C T C A A T C C A A A T A A T C T G C A C					
	310	320	330	340	350	360
<i>P Nos</i>	T G G C A					
<i>NosP26-364</i>	C G G A T C					
<i>pKKNoslux</i>	C G G A T C					
<i>pNoslux</i>	C G G A T C					

**Abb. 52:** Alignment der Promotorsequenz des P Nos nach Shaw (P Nos, 1984), des *Sau3A*-Fragments aus pBin19 (NosP26-364) als Template-DNA für die PCR und des pKK- bzw. pBin-Konstrukts. Der Basenaustausch von C nach T in pNoslux befindet sich an Position 9170 des pBin19 (Acc. # U09365).

### 6.5.2 Alignment der Sequenzierungen des KCO1-Promotors



**Abb. 53:** Alignment der übermittelten Promotorsequenz des P KCO1, der Template-DNA pPK-Gus-4 für die PCR und des pKK- bzw. pBin-Konstrukts.

### 6.5.3 Alignment der Sequenzierungen des KST1-Promotors

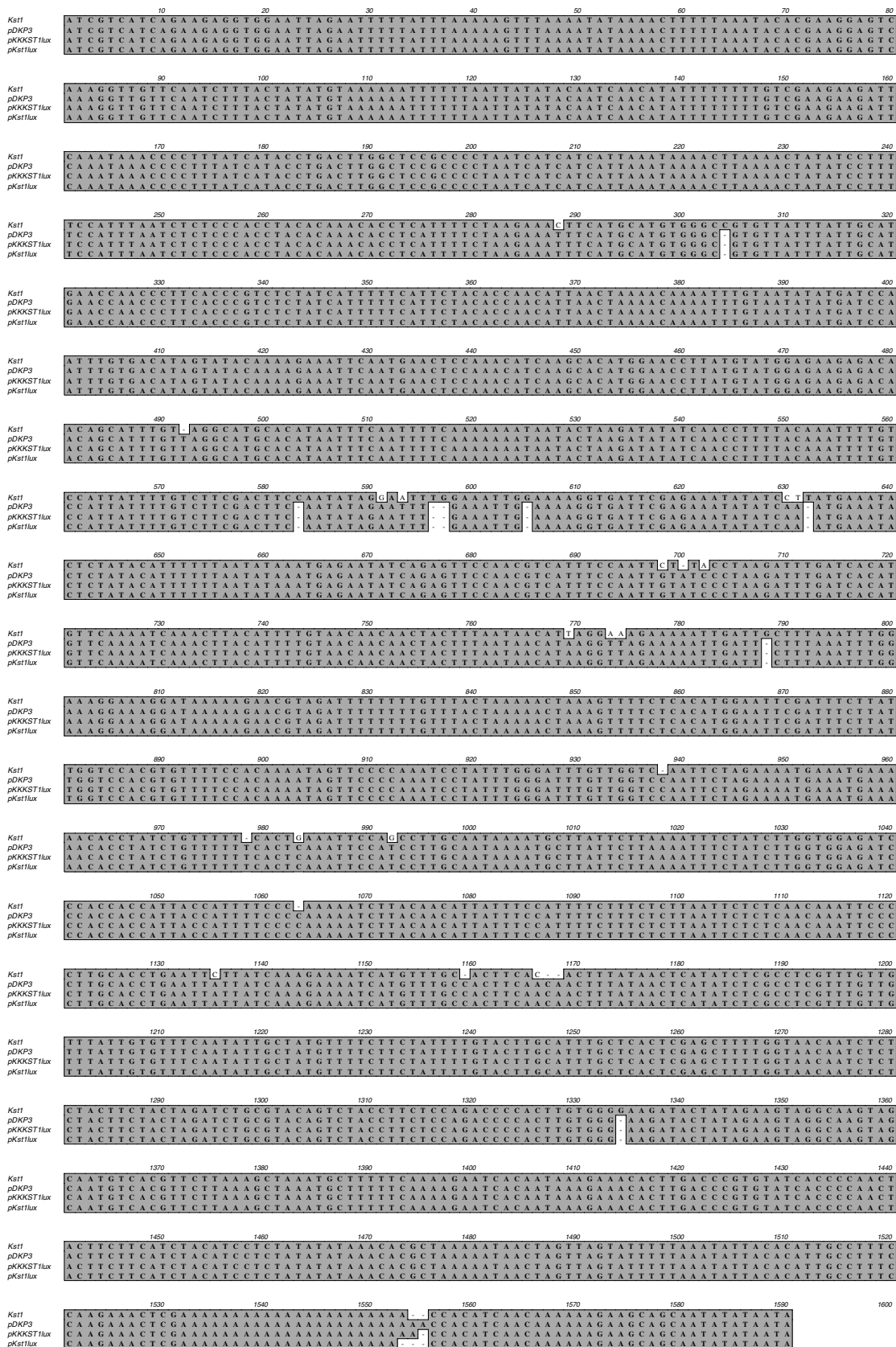


Abb. 54: Alignment der übermittelten Promotorsequenz des P KST1, der Template-DNA pDKP3 für die PCR und des pKK- bzw. pBin-Konstrukts.



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Daniela Jacob

geboren am 19. Februar 1965 in Berlin

### **Ausbildung**

1977 – 1983

Rheingau-Oberschule (Gymnasium), Berlin

Abschluss: Abitur

08/1984 – 07/1986

Ausbildung zur Medizinisch-technischen  
Laboratoriumsassistentin, Lette-Verein, Berlin

10/1992 – 12/1997

Studium der Biotechnologie, Technische  
Fachhochschule (TFH), Berlin

seit dem 07/1998

Promotion am Robert Koch-Institut, Berlin

### **Beruflicher Werdegang**

10/1986 – 06/1999

Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin  
(MTLA) im Institut für Krankenhaushygiene und  
Medizinische Mikrobiologie, Krankenhaus Moabit,  
Berlin

02/1995 – 02/1997

MTLA im Zentrallabor der DRK-Krankenhäuser  
Standort Rittberg und Westend, Berlin

07/1998 – 12/2001

Wissenschaftliche Angestellte in der Projektgruppe  
Biologische Sicherheit am Robert Koch-Institut, Berlin

seit dem 10/2002

Wissenschaftliche Angestellte in dem Zentrum für  
Biologische Sicherheit am Robert Koch-Institut, Berlin

## Publikationen

### in Fachzeitschriften

**Lewin A., Jacob D., Freytag B., Appel B. (1998).** Gene expression in bacteria directed by plant specific regulatory sequences. *Trans Res* **7**: 403-411.

**Jacob D., Lewin A., Meister B., Appel B. (2002).** Plant-specific promoter sequences carry elements that are recognised by the eubacterial transcription machinery. *Trans Res* **11**: 291-303.

### Konferenzbeiträge

**Jacob D., Lewin A., Freytag B., Appel B. (1998).** Studies on the recognition of plant specific regulatory sequences in bacteria. VAAM 1998, Frankfurt, 22.-25.3.1998.

**Jacob D., Lewin A., Freytag B., Appel B. (1999).** Gene expression in bacteria directed by plant specific regulatory sequences. VAAM 1999, Göttingen, 7.-10.3.1999.

**Jacob D., Lewin A., Appel B. (2000).** Efficiency of plant promoters in bacterial transcription. Microbiology 2000. 1. Gemeinsamer Kongress der DGHM, ÖGHMP, und VAAM. München, 12.-16.3.2000.

## **Danksagung**

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Juli 1998 bis Dezember 2001 in der Projektgruppe Biologische Sicherheit des Robert Koch-Instituts in Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. B. Appel, dem Leiter der Projektgruppe für Biologische Sicherheit am Robert Koch-Institut, danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. T. Börner und Herrn Priv.-Doz. Dr. T. Pickardt bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Astrid Lewin für die stetigen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen. Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Projekts P 12, insbesondere Heike Kaspar, Jens Hammerl, Dr. Stefan Hertwig, Anne Bernhardt, Iris Klein, Barbara Freytag und Beate Meister, möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre, sowie die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken. Bei Herrn Siegfried Pociuli und Herrn Horst Emmel möchte ich mich für die Sequenzierungen bedanken.

Ermöglicht wurde diese Arbeit außerdem durch die Bereitstellung der Plasmide mit den pflanzenspezifischen Promotoren von Prof. Dr. U. Sonnewald vom Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben und Prof. Dr. B. Müller-Röber vom Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm. Die Plasmide mit den Plastiden Promotoren wurden von Dr. K. Liere von der Humboldt Universität in Berlin zur Verfügung gestellt. Dafür möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. E. Glickman vom Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben für die Durchführung der Pflanzentransformations-Experimente bedanken.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Berlin, 10. Januar 2003

.....