

Forschungsvorhaben: Trilaterales Projekt

Genosome -

Vergleichende genomische Analyse der Meristementwicklung in Solanaceae

Förderkennzeichen: 0313149A

Zuwendungsempfänger: Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
(IPK Gatersleben):

Ausführende Stelle: Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Projektleiter: Dr. Uwe Scholz, Prof. Uwe Sonnewald, **Dr. Sophia Sonnewald (Koordinator)**

Laufzeit: 01.09.2004 bis 31.12.2007 (Beginn: 01.01.2005)

I. 1. Aufgabenstellung

Ziel des trilateralen Verbundprojektes war es am Beispiel von Tomaten- und Kartoffelpflanzen die molekularen Mechanismen der Meristemfunktion und -aktivität zu untersuchen. Dazu hatten sich fünf Arbeitsgruppen aus Spanien, Frankreich und Deutschland zusammengeschlossen, um verschiedene Meristem-assoziierte Entwicklungsprozesse zu untersuchen. So wurden neben Veränderungen in der Meristemaktivität, wie sie bei Bildung von Kartoffelknollen aus Stolonen stattfindet, die Regulation und Ausbildung von axillären Meristemen und die Re-aktivierung von dormanten in aktive Meristeme, wie sie bei der Keimung von Kartoffelknollen erfolgt, studiert. Die vergleichende bioinformatische Analyse von Transkriptprofilen sollte zur Identifizierung von für die entsprechenden Entwicklungsprozesse spezifischen und übergeordneten Regulatoren führen. Die funktionelle Überprüfung identifizierter Kandidatengene sollte durch Expression in transgenen Pflanzen unter Verwendung spezifischer Promotoren erfolgen. Dazu wurde geprüft, ob bereits bekannte Regulatoren und meristem-spezifische Promotoren aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* auch in Solanaceae Anwendung finden können.

Die Ergebnisse werden neue biotechnologische Ansätze liefern, um die Kohlenhydratverteilung, den Ertrag und die Lagerfähigkeit von Erntegut zu verbessern.

Die Identifizierung von Genen, die die Dormanz von Kartoffelknollen kontrollieren, die Bereitstellung von Datenbanken und bioinformatischen Analysetools sowie die vergleichende Datenanalyse waren Bestandteil dieses Arbeitspaketes.

Partner 1: Regulation der Dormanz bei Kartoffelknollen

Prof. Dr. Uwe Sonnewald, Dr. Sophia Sonnewald, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK): Abteilung Molekulare Zellbiologie, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben; ab 01.08.2005 Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Biochemie, Staudtstr. 5, 91058 Erlangen

Partner 2: Bereitstellung von Datenbanken; Analysetools und bioinformatische Datenanalyse

Dr. Uwe Scholz, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK): Abteilung Cytogenetik und Genomanalyse, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben

I. 2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde

Aufgrund der spezifischen Kompetenzen der einzelnen Projektpartner waren ideale Voraussetzungen für die Durchführung dieses Projektes gegeben. Die Gruppen von U. und S. Sonnewald sind an der Regulation metabolischer Prozesse durch endo- und exogene Faktoren und an der molekularen Analyse von Stoffwechselwegen interessiert. Die molekularen und biochemischen Veränderungen während der Knollenentwicklung und –

Keimung standen seit vielen Jahren im Mittelpunkt der Forschungsarbeiten. So konnte u.a. gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit von Saccharose wichtig für das Wachstum des Keims ist. Weiterhin wurden erste transgene Ansätze verfolgt, um die Rolle des Phytohormons Gibberellin bei der Keimung detaillierter zu untersuchen. Darüber hinaus bestand die Expertise zur Herstellung hoch-spezifischer cDNA-Banken sowie die Möglichkeit die technologischen Plattformen des IPKs, wie z.B. zur Sequenzierung und zur Erstellung von Makroarrays zu nutzen. So waren in Vorarbeiten bereits meristem-spezifische cDNA-Bibliotheken von Kartoffelknollen erzeugt, ein im Umfang begrenztes Sequenzierprogramm initiiert und Macroarray-Experimente durchgeführt worden.

U. Scholz war als Bioinformatiker wesentlich an der Erstellung der CR-EST Datenbank am IPK beteiligt und besaß bereits Erfahrungen in der Entwicklung von Datenbanken und der Datenintegration. So gab es enge Kooperationen im Rahmen des BMBF-Projektes „Bioinformatik Centrum Gatersleben-Halle: BIG-GH“. Hier wurde insbesondere an dem Teilprojekt „Aufbau eines Plant Data Warehouses“ gearbeitet. Darüber hinaus war er in das begonnene Sequenzierungsprojekt involviert und wo er maßgeblich an der Analyse der Sequenzen und der entsprechenden Auswertung beteiligt war. Weiterhin waren Erfahrung in der Verwaltung von Expressionsdaten im Besonderen von Daten basierend auf Macroarray-Experimenten vorhanden.

I. 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Start des Projektes war der 01. September 2004. Allerdings konnte in der AG von von S. Sonnewald, erst zum 01.01.2005 eine geeignete Mitarbeiterin gefunden und eingestellt werden (Frau Melanie Senning). In der AG von U. Scholz wurde der Mitarbeiter (Herr Burkhard Steuernagel) zum 15.09.2005 eingestellt. Nach Absprache mit PTJ wurde die Laufzeit bis zum 31.12.2007 kostenneutral verlängert.

Die Aufgaben waren zwischen den beiden Partnern klar verteilt. Partner 1 (U. und S. Sonnewald) waren für die molekularen Arbeiten (z.B. Herstellung der cDNA-Banken, Genexpressions-experimente, Herstellung und Analyse von transgenen Pflanzen) verantwortlich, die in WP 1.1, 2.3 und WP 3 beschrieben waren. U. Scholz war für die Erstellung der Datenbanken und die vergleichende Datenanalyse zuständig (WP4).

Im Folgenden ist der Ablauf gemäß der im Antrag aufgeführten Planung genauer beschrieben.

- Herstellung normalisierter cDNA-Banken aus ruhenden und aktiven Kartoffelaugen, Generierung eines Meristem-spezifischen c-DNA Arrays

Die normalisierten cDNA-Banken wurden aus Material vom einen Feldversuch hergestellt und als SDBN (Solanum tuberosum dormant buds normalized) und SSBN (Solanum tuberosum sprouting buds normalized) bezeichnet. 2304 ESTs der SDBN und 1152 Klone der SSBN-Bibliothek wurden sequenziert und zusammen mit den in Vorarbeiten gewonnen Sequenzen aus nicht-normalisierten cDNA-Banken analysiert und die entsprechenden

Informationen in der CR-EST Datenbank abgelegt und an die GABI-Primärdatenbank weitergeleitet.

Von der Herstellung eines eigenen auf dem ESTs der cDNA-Banken beruhenden c-DNA Arrays wurde abgesehen, da sich parallel ein Konsortium zusammengefunden hatte, mit dem Ziel einen 44K Kartoffel Oligo Chip (POCI- potato oligo chip initiative) herzustellen und gemeinsam zu nutzen. Dieser Chip umfasst(e) alle 2004 öffentlich verfügbaren Kartoffel-spezifischen EST und cDNA Sequenzen und zusätzlich bis dahin nicht publizierte Information, wie z.B. die der normalisierten Banken aus diesem Projekt. Mit Zustimmung der PTJ haben wir für unsere späteren Experimente diesen 44K Microarray verwendet, während für die initialen Analysen der kommerziell erwerbliche 10K Microarray von TIGR benutzt wurde (siehe unten)

- Erfassung der transkriptionellen Veränderungen in ruhenden und aktiven Kartoffelaugen mittels Microarrays

Zwei verschiedene Arten von Experimenten wurden durchgeführt, um die transkriptionellen Veränderungen während der Brechung der Keimruhe und dem nachfolgenden Austreiben des Keims zu erfassen. In ersten Experimenten wurde der 10K TIGR Array benutzt und mit cDNA Sonden hybridisiert, die aus ruhenden Augen bzw. aus gerade zu keimen beginnenden Kartoffelaugen präpariert wurden. Nachdem der POCI-Array Ende 2006 für uns verfügbar war, wurde damit ein vergleichbares Experiment durchgeführt und die Daten ausgewertet.

Parallel wurde ein experimentelles System etabliert, das es uns erlaubt, die Keimung ruhender Kartoffelaugen kontrolliert innerhalb von 3-5 Tagen zu induzieren. Dabei wurde die Beobachtung ausgenutzt, dass die Applikation von Gibberellinsäure (GA₃) die Keimruhe brechen und das Austreiben induzieren kann. Dieses System sollte es uns ermöglichen Gene zu identifizieren, die vor dem bzw. zum Zeitpunkt der Brechung der Keimruhe aktiv sind und daher vermutlich Schlüsselregulatoren darstellen. Daher wurde der POCI-Array zusätzlich mit Probenmaterial aus diesem experimentellen System hybridisiert.

- Identifizierung von Kandidatengenen und deren funktionale Analyse

Die Analyse der verschiedenen Expressionsprofile offenbarte eine Vielzahl von Genen, deren Expression sich während der Induktion der Keimung verändert. Für die detaillierte funktionale Untersuchung wurden zwei Gene ausgewählt; ein GA-reguliertes Gen, das als GARP (GA reguliertes Protein) bezeichnet wurde und das Kartoffel-homologe Gen zu Let6 (StLet6). Let6 ist ein Transkriptionsfaktor aus Tomate, der zur Gruppe der *Knotted-like* Homeobox Gene gehört. Die Expression von GARP wurde in transgenen Kartoffelpflanzen zunächst durch Überexpression bzw. RNAi-vermitteltes *silencing* unter Kontrolle des CaMV-35S Promoters verändert, während StLet6 durch die Expression eines RNAi-Konstruktes ausgeschaltet werden sollte.

- GA- und KNOX-abhängige Regulationsmechanismen.

Da es in der Literatur verschiedene Hinweise darauf gibt, dass KNOX-Proteine die Expression von GA-Biosynthesegenen im Meristem unterdrücken, war ein weiteres Ziel diese Beziehung näher zu charakterisieren.

In Vorarbeiten sind dazu transgene Kartoffelpflanzen erzeugt worden, die hervorgerufen durch die Expression einer GA20-oxidase bzw. einer GA2-oxidase aus *A. thaliana*, erhöhte bzw. verringerte Gehalte an biologisch-aktiven GAs aufweisen. Allerdings zeigten unsere Untersuchungen, dass die Modifikation der GA-Biosynthese ohne Einfluss auf das Keimungsverhalten der Kartoffelknollen blieb. Als Ursache dafür wird die zu geringe Aktivität des verwendeten CaMV 35S Promoters während des untersuchten Entwicklungsabschnittes angenommen. Daher wurden beide Gene auch unter Kontrolle des chimären STLS1/CaMV 35S- Promoters (L700-GA20ox; L700-GA2ox) kloniert, von dem in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass dieser in Kartoffelknollen sehr aktiv ist (Hajirezaei und Sonnewald, 1999). Zudem wurden transgene Pflanzen erzeugt, die beide Gene unter Kontrolle des UFO-Promoters (aus *Arabidopsis*) exprimieren. Der UFO-Promoter wurde im Rahmen dieses Projektes in transgenen Kartoffeln getestet und die Aktivität in austreibenden Kartoffelknollen nachgewiesen (siehe unten).

Darüber hinaus wurde die Sequenz des *Knotted-like* Gens aus Tabak (NTH15) benutzt, um in der TIGR-Datenbank nach homologen Kartoffel-EST's zu suchen. Dabei konnten drei nahe verwandte EST-Klone gefunden werden. Weitere Analysen ergaben, dass die ESTs dem in Microarray identifizierten StLet6 Klon repräsentieren. Transgene Pflanzen, die ein RNAi-Konstrukt tragen wurden erzeugt und molekular und im Hinblick auf verändertes Keimverhalten analysiert.

- Analyse Meristem-spezifischer Promotoren aus *Arabidopsis thaliana* in Kartoffelpflanzen.

Um zu prüfen inwieweit Meristem-spezifische Promotoren aus *A. thaliana* in *Solanaceae* Anwendung finden können, wurden verschiedene Promotoren ausgewählt, mit GFP oder GUS als Reportergene fusioniert und in Kartoffelpflanzen transformiert und analysiert. Die Konstrukte wurden vom französischen Partner (P. Laufs, INRA de Versailles) hergestellt und uns zur Verfügung gestellt.

- Entwicklung projektrelevanter Datenbanken

Zur Entwicklung projektrelevanter Datenbanken wurden existierende Systeme analysiert und auf ihre Adaptierbarkeit hin überprüft. Ziel war es hier bestehende Systeme zu erweitern, um so den Pflege- bzw. Administrationsaufwand nach Förderungsende des GENOSOME-Vorhabens möglichst zu minimieren. Die konkrete Umsetzung wird detailliert im Abschnitt II beschrieben.

- Vergleichende Datenanalyse

Die vergleichende Datenanalyse stellte die größte Herausforderung für das Arbeitspaket 4 im Projekt dar. Hier war zu untersuchen, welche Möglichkeiten existieren um eine Array- und Organismen-übergreifende Vergleichbarkeit überhaupt zu erreichen. Die Analyse der zu erfüllenden Bedingungen für die wurde durchgeführt und das „Mapping“ von Features von unterschiedlichen Arrays und unterschiedlichen Organismen definiert.

Während der Analyse ist die Entscheidung gefallen alle Daten sowohl über die Experimentbeschreibungen als auch die Sequenzen bis hin zu den einzelnen Expressionswerten in ein Data Warehouse zu integrieren.

- Web-basiertes Informationssystem

Um das Projekt öffentlich zu machen und den Austausch von Informationen und Daten zu ermöglichen, wurde ein Portal im Internet erstellt. Dazu wurde die Webadresse www.genosome.org registriert und frei geschaltet.

I. 4. wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Kartoffel ist nach Reis, Weizen und Mais die viertwichtigste Kulturpflanze. Der überwiegende Teil der Kartoffelknollen wird für die menschliche Ernährung verwendet, der verbleibende Teil als Tierfutter eingesetzt, industriell verarbeitet oder als Saatkartoffel für den Anbau im Folgejahr aufbewahrt. Die Knolle ist ein wichtiges Grundnahrungsmittel, die reich an Stärke ist, aber auch einen hohen Anteil an Proteinen, Mineralien und Vitaminen besitzt. Da diese meist frisch verzehrt werden, besteht ein ganzjähriger Bedarf an Kartoffeln. Daher ist eine Lagerung notwendig. Obwohl die Bedingungen optimiert wurden, kommt es häufig zum unerwünschten Austreiben, der mit einem Qualitätsverlust einhergeht (Davies und Ross, 1984). So kommt es zum Abbau von Stärke, der zur Akkumulation von löslichen Zuckern führt, die negative Auswirkungen auf den Geschmack und die weitere Verarbeitung haben. Das Verständnis der dem Keimungsprozess zugrunde liegenden Mechanismen hat daher direkte Auswirkungen auf Landwirtschaft und Industrie und könnte zum Beispiel zu einer Verbesserung der Lagerfähigkeit der Knollen führen.

Nach der Ernte durchlaufen die Kartoffelknollen eine Phase der Dormanz, die als das temporäre Aussetzen des sichtbaren Wachstums bei pflanzlichen Strukturen, die ein Meristem besitzen, definiert wurde (Lang *et al.*, 1987). Die Keimruhe setzt allmählich während der Knollenbildung ein und ist ungefähr zum Zeitpunkt der Ernte voll ausgebildet (Burton, 1989). Direkt nach der Ernte befindet sich die Knolle in der immanenten oder Endodormanz, in der unabhängig von günstigen oder ungünstigen äußeren Bedingungen keine Keimung stattfindet (Hemberg, 1985; Lang *et al.*, 1987). Daran schließt sich meist eine Periode der „erzwungenen“ Dormanz an, in der die Keimung durch ungünstige äußere Bedingungen gehemmt werden kann (Hemberg, 1985; Lang *et al.*, 1987).

Die Länge der Dormanz wird somit durch Umweltfaktoren wesentlich beeinflusst. So spielen die Temperatur, die Tageslänge und die Wasserversorgung während des Wachstums aber auch die Temperatur während der Lagerung eine wichtige Rolle. Darüber hinaus ist sie genetisch festgelegt und kann Kultivar-abhängig zwischen 1 und 20 Wochen dauern (Hemberg, 1985).

Während der Dormanz ist die Knolle (wenn auch vermindert) metabolisch aktiv und entwickelt sich von einem sink zu einem source-Organ, das den sich neu bildenden Sproß mit Energie und Nährstoffen versorgt (Sonnewald, 2001). Mit dem Ende der Dormanzphase kommt es zur Re-aktivierung der Meristemaktivität und zu verstärkter Stoffwechselaktivität. Die Raten von DNA-, RNA- und Proteinsynthese nehmen zu (Suttle, 1996), die Aktivitäten verschiedener Enzyme steigen an (Merlo *et al.*, 1993; Biemelt *et al.*, 2000; Hajirezaei *et al.*, 2003) und Stärke und Speicherproteine werden aus dem Inneren der Knolle mobilisiert (Davies und Ross, 1984).

Darüber hinaus wird die Länge der Keimruhe entscheidend durch den Gehalt an Phytohormonen bestimmt, die als Aktivatoren (z.B. GA oder Cytokinin) oder Inhibitoren wirken (z.B. Abscisinsäure (ABA))(zusammengefasst in Suttle, 2004). So kann die Dauer der (Endo-)Dormanz durch die exogene Gabe verschiedener Phytohormone (oder Analoga) verlängert oder verkürzt werden (Hemberg, 1985; Coleman, 1987; Suttle, 1996; Claassens *et al.*, 2005)

Zugabe von Auxin zu endodormanten Augen hatte keinen Effekt auf das Keimungsverhalten, konnte aber in physiologischen Konzentrationen das Keimwachstum bei nicht-endodormanten Augen stimulieren (Hemberg, 1985; Suttle, 2004b). Das lässt vermuten, dass Auxine keinen Einfluss auf das Ende der Endodormanz haben, jedoch beim anschließenden Wachstum des Keims eine Rolle spielen könnten.

Behandlung mit ABA bewirkt eine transiente Verlängerung der Dormanz, ist jedoch nicht in der Lage, die Keimung für längere Zeit zu unterdrücken (Hartmans und van Es, 1979). Während der Knollenbildung steigt die endogene ABA-Konzentration und sinkt mit dem Ende der Dormanz (Korableva *et al.*, 1980; Suttle & Hultstrand, 1994). ABA scheint für die Erhaltung der Dormanz notwendig zu sein, obwohl es keinen spezifischen Schwellenwert zu geben scheint, dessen Unterschreitung die Keimung ermöglicht (Suttle, 1995; Sorce *et al.*, 1996; Biemelt *et al.*, 2004).

Die Wirkung exogen applizierter Gibberelline auf die Dormanz von Kartoffelknollen wurde schon früh untersucht (z.B. Rappaport *et al.*, 1965; Blumenthal-Goldschmidt und Rappaport, 1965). Exogenes Gibberellin schien die Keimruhe zu brechen und das Wachstum des Keims induzieren. Unter Verwendung eines biologischen Tests konnten Smith und Rappaport (1961) zeigen, dass der Gehalt an GAs während der Ruhephase niedrig ist, am Ende der Dormanz aber ansteigt. (Smith und Rappaport (1961). Bei neueren Messungen mit GC-MS-

SIM konnten keine signifikanten Unterschiede im Gibberellin Gehalt zwischen endodormanten und keimungskompetenten, ungekeimten Knollen festgestellt werden. Erst nach Einsetzen des Keimwachstums stieg die GA-Konzentration (Suttle, 2004). Das stimmt mit der Hypothese von Hartmans und van Es (1979) überein, dass GA möglicherweise nur das Wachstum des Keims vorantreibt während andere Substanzen für das Brechen der Keimruhe verantwortlich sind. Auch ein transgener Ansatz konnte keine klare Antwort geben (Carrera et al., 2000). Während transgene Kartoffelknollen, die eine endogene GA20-oxidase überexprimierten durch eine verkürzte Dormanzperiode gekennzeichnet waren, blieb die Länge der Keimruhe der Kartoffelknollen in antisense-Pflanzen unverändert (Carrera et al., 2000).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bisher weder mit Hilfe biochemischer Methoden noch durch einen biotechnologischen Ansatz die Rolle von GA in der Regulation der Dormanz eindeutig geklärt werden konnte. Insgesamt ist davon auszugehen, dass die Länge der Dormanz durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Phytohormone gesteuert wird.

Obwohl einzelne Gene identifiziert wurden, die unterschiedlich stark während der Dormanz exprimiert werden (z.B. Bachem et al. 2000; Faivre-Rampant et al., 2004), ist der molekulare Mechanismus und der Ablauf der Prozesse weitgehend unverstanden (Ferne und Willmitzer, 2001) und sind globale transkriptionelle Veränderungen mittels Microarrays bisher nicht erfasst worden.

Im Vorfeld des Projektes wurden bioinformatische Ressourcen etabliert, die in Genosome genutzt werden konnten. Hierzu gehört die CR-EST Datenbank (vgl. Künne *et al.*, 2005), in der ESTs und verschiedene Versionen von Clustering-Projekten gespeichert werden können. Das System wurde zur Verwaltung der Kartoffel-ESTs erweitert. Des Weiteren existierte eine Vorversion der FLAREX-Datenbank für Macro- und Microarray-resultate, welche innerhalb des Projektes weiterentwickelt werden konnte. Die Datenbanken sind eingebettet in die Oracle DBMS Infrastruktur des IPK, welche auch in vollem Umfang genutzt werden konnte und unter zentraler Administration von IPK-Hauspersonal steht.

Zu Anfang des Projektes wurden zwei öffentliche Datenbanken auf Nutzbarkeit untersucht. ArrayExpress (vgl. Parkinson *et al.*, 2005) bot zum damaligen Stand eine gute Infrastruktur zur Speicherung von Microarray-Daten an. Die Datenbank setzte auf das MAGE-ML (vgl. Spellman *et al.*, 2002) auf und entsprach so dem vom MGET Konsortium geforderten Standard. Der Nachteil war, dass öffentliche Expressionsdaten von Kartoffeln zwar verfügbar, aber nicht diesem Standard genügend vorhanden waren. Als Integrationsplattform konnte „ArrayExpress“ also nicht genutzt werden.

Eine zweite Datenbank war Genevestigator (vgl. Zimmermann *et al.*, 2005), welche eine wohl durchdachte Analyseplattform für integrierte Microarray Daten bot. Die Nutzbarkeit für

Genome war aber nicht gewährleistet. Als einzige Pflanzenspezies war dort *A. thaliana* verfügbar. Außerdem beschränken sich die Analysemethoden in Genevestigator auf jeweils dieselbe Arrayplattform (Affymetrix). Im Gegensatz dazu sollten in Genome Expressionsergebnisse zwischen Spezies (und so auch Plattformen) verglichen werden.

Referenzen:

- Bachem, C, van der Hoeven R, Lucker J, Oomen R, Casarini E, Jacobsen E, Visser R (2000) Functional genomic analysis of potato tuber life cycle. *Potato Res.* 43: 297-312.
- Biemelt S, Hajirezaei M, Hentschel E, Sonnewald U. (2000) Comparative analysis of abscisic acid content and starch degradation of tubers harvested from different varieties. *Potato Res* 43: 371-382
- Blumenthal-Goldschmidt S, Rappaport L. (1965) Regulation of bud rest in tubers of potato, *Solanum tuberosum* L.: II. Inhibition of sprouting by inhibitor β complex and reversal by Gibberellin A_3 . *Plant and Cell Physiology*; 6:601-608
- Burton WG. (1989) *The Potato*. Ed 3. Longman Scientific & Technical, Essex, UK
- Carrera E, Bou J, García-Martínez JL, Prat S. (2000) Changes in GA20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *The Plant Journal*; 22:247-256.
- Claassens MMJ, Verhees J, van der Plas LHW, van der Krol AR, Vreugdenhil D. (2005) Ethanol breaks dormancy of the potato tuber apical bud. *Journal of Experimental Botany*; 56:2515-2525
- Coleman WK. (1987) Dormancy release in potato tubers: a review. *American Potato Journal*; 64:57-68
- Davies HV, Ross HA. (1984) The pattern of starch and protein degradation in tubers. *Potato Research*; 27:373-381
- Faivre-Rampant O, Cardle L, Marshall D, Viola R, Taylor M (2004) Changes in gene expression during meristem activation in *Solanum tuberosum* with a focus on the regulation of an auxin response factor. *J Exp. Bot.* 397: 613-622.
- Fernie AR, Willmitzer L. (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology*; 127:1459-1465
- Hajirezaei M, Börnke F, Peisker M, Takahata Y, Lerchl J, Kirakosyan A, Sonnewald U (2003) Decreased sucrose content triggers starch breakdown and respiration in stored potato tubers (*Solanum tuberosum*). *J Exp Bot* 54:477-488
- Hartmans KJ, van Es A. (1979) The influence of growth regulators GA₃, ABA, kinetin and IAA on sprout and root growth and plant development using excised potato buds. *Potato Research*; 22:319-332
- Hemberg T. (1985) Potato Rest. In: Li PH (ed.) *Potato Physiology*:353-388. Academic Press, Orlando/Florida.
- Korableva, N. P., K. A. Karavaeva & L. V. Metlitskii, (1980) Changes of abscisic acid content in potato tuber tissue in the period of deep dormancy and during germination. *Fizilogia Rastenii* 27: 441-446.
- Künne C, Lange M., Funke T., Miehe H., Grosse I., Scholz U. (2005) CR-EST: a resource for crop ESTs. *Nucl. Acids Res.*, 33: D619-621.
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL. (1987) Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*; 22: 371-377
- Merlo L, Geigenberger P, Hajirezaei M, Stitt M. (1993) Changes of carbohydrates, metabolites and enzyme activities in potato tubers during development, and within a single tuber along a stolon-apex gradient. *Journal of Plant Physiology*; 142:392-402
- Parkinson H., Sarkans U., Shojatalab M., Abeygunawardena N., Contrino S., Coulson R, Farne A., Garcia Lara G, Holloway E., Kapushesky M., et al (2005). ArrayExpress-a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucl. Acids Res.*, 33: D553-D555.
- Rappaport L, Blumenthal-Goldschmidt S, Clegg MD, Smith OE. (1965) Regulation of bud rest in tubers of potato, *Solanum tuberosum* L.: I. Effect of growth substances on excised potato buds. *Plant and Cell Physiology*; 6:587-599
- Smith OE, Rappaport L (1961) Endogenous gibberellins in resting and sprouting potato tubers. *Adv in Chem Ser* 28: 42-48
- Sonnewald, U (2001) Control of potato tuber sprouting. *Trends in Plant Science*, 6:333-335.
- Sorce, C., A. Piaggese, N. Ceccarelli & R. Lorenzi, (1996) Role and metabolism of Abscisic acid in potato tuber dormancy and sprouting. *Journal of Plant Physiology* 149: 548-552.
- Spellman P.T., Miller M., Stewart, Troup C., Sarkans U., Chervitz S., Bernhart D., Sherlock G., Ball C., Lepage M., et al. (2002) Design and implementation of microarray gene expression markup language (MAGE-ML). *Genome Biology*, 3:research0046.1-0046.9
- Suttle JC. (1996) Dormancy in tuberous organs: problems and perspectives. In: Lang GA (ed.) *Plant*

- Dormancy: 133-143. CAB International
- Suttle JC. (2004a) Physiological regulation of potato tuber dormancy. *American Journal of Potato Research*; 81:253-262
- Suttle JC. (2004b) Involvement of endogenous gibberellins in potato tuber dormancy and early sprout growth: a critical assessment. *Journal of Plant Physiology*; 161:157-164
- Suttle, J. C., Hultstrand, J. F (1994) Role of endogenous abscisic acid in potato microtuber dormancy. *Plant Physiology* 105: 891-896.
- Zimmermann P., Hennig L., Grissem W. (2005) Gene expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends in Plant Science*, 9: 407-409.

I. 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Auf bioinformatischer Seite konnte mit dem Verbund-Projekt BIC-GH (Bioinformatik Centrum Gatersleben-Halle) zusammengearbeitet werden. Konkret gab es Kooperationen auf dem Gebiet der Entwicklung der Operativ-Systeme wie CR-EST oder FLAREX sowie bei dem Aufbau von Integrationssystemen Stichwort „Plant-Data-Warehouse“. Technische Infrastruktur wie Datenbank-Server, Webserver und Applikationssysserver wurden gemeinsam genutzt. Die Ressourcen stehen unter zentraler IPK-Administration, was den Weiterbetrieb der in Genosome entwickelten Bioinformatik-Anwendungen absichert.

U. und S. Sonnewald sind Mitglieder des POCI-Konsortiums, das koordiniert von Dr. Christian Bachem (Universität Wageningen; Niederlande) den 44KOLigo-Chip für Kartoffel entwickelt und finanziert hat. Darüber hinaus bestand eine enge Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. C Bachem. Die Hybridisierung und die primäre Auswertung der TIGR Arrays wurden an der Universität in Wageningen durchgeführt, weil zu diesem Zeitpunkt die Infrastruktur an der FAU nicht vorhanden und die Durchführung nicht möglich war.

Weiterhin bestand seit 2001 eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. P. Hedden (Rothamsted Research), um die GA-Gehalte in transgenen Tabak- bzw. Kartoffelpflanzen zu bestimmen (Stipendium vom DAAD für S. Sonnewald).

II. 1. Darstellung der erzielten Ergebnisse

II. 1.1. *Herstellung normalisierter cDNA-Banken aus ruhenden und aktiven Kartoffel- augen, Generierung eines Meristem-spezifischen c-DNA Arrays*

Vor dem sichtbaren Austreiben von Kartoffelknollen kommt es zur Re-aktivierung der Meristemtätigkeit. Um transkriptionelle Veränderungen im Meristem während der Keimung von Kartoffelknollen zu erfassen, wurden spezifische cDNA-Bibliotheken aus ruhenden und keimenden Kartoffelaugen erstellt. Dazu wurden zunächst ruhende Augen und ca. 2mm große Keime aus Kartoffelknollen präpariert und anschließend die PolyA-RNA isoliert. Die cDNA Synthese erfolgte mit Hilfe des TimeSaver™ Synthesis Kit (Amersham, Bioscience). Die Normalisierung wurde mittels PCR-Technik entsprechend der Methoden von Ko (1990) und Kochi et al. (1995) durchgeführt. Die cDNA-Banken wurden entsprechend ihrer Herkunft

als SDBN (Solanum tuberosum dormant buds normalized) bzw. SSBN (Solanum tuberosum sprouting buds normalized) bezeichnet. 2304 ESTs von SDBN und 1152 ESTs von SSBN wurden sequenziert.

Die Qualität der erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Phred-Algorithmus überprüft und nach Anwendung weiterer Kriterien (z.B. Länge der Sequenzen, Entfernen von PolyA – Ketten) wurden 2028 (SDBN) bzw. 1128 (SSBN) hochwertige EST-Sequenzen erhalten, die in CR-EST-Datenbank integriert wurden. Die erhaltenen ESTs wurden zusammen mit den in Vorarbeiten gewonnen EST-Sequenzen einer Cluster-Analyse (STACKPACK) unterzogen. Die Ergebnisse zeigen, dass die normalisierten Banken mit ca. 80% einem wesentlich höheren Anteil an Singletons enthalten als konventionell hergestellte cDNA- Bibliotheken (Tabelle 1). Ein BLASTN-Vergleich gegen den damals bei TIGR verfügbaren Datensatz (ca. 38.000 Unigene abgeleitet von rund 190.000 Kartoffel –ESTs; Stand 2004) zeigte darüber hinaus, dass ca. 15% der ESTs aus den erstellten cDNA-Banken neue Sequenzinformation lieferten.

Tabelle 1. Ergebnisse der Cluster-Analyse der Kartoffel-spezifischen cDNA-Banken; im Rahmen des Projektes erzeugte cDNA-Banken sind fett dargestellt.

| Library | Name | total no. of clones | No. of Singletons | % of Singletons /library | % of Singletons/ total ESTs (6833) |
|--------------|---|---------------------|-------------------|--------------------------|------------------------------------|
| STDB | Solanum tuberosum dormant buds | 1455 | 806 | 55 | 16 |
| SDBT | Solanum tuberosum dormant buds (TripleEx) | 561 | 211 | 37 | 4 |
| SDBN | Solanum tuberosum dormant buds, normalized | 2028 | 1622 | 80 | 32 |
| SSBT | Solanum tuberosum sprouting buds (TripleEx) | 1661 | 511 | 31 | 10 |
| SSBN | Solanum tuberosum sprouting buds, normalized | 1128 | 892 | 79 | 17 |
| Total | | 6833 | 4042 | | 59 |

Ein ursprüngliches Ziel des Projektes war es ein eigenen 10K Microarray zu entwickeln, der mit Meristem-spezifischen Genen aus Kartoffeln angereichert ist. Kommerziell verfügbar war zu der Zeit ein Mikroarray von TIGR, der ca. 10.000 cDNA-Klone enthält, die aus verschiedenen cDNA-Bibliotheken stammen, auf dem aber Meristem-spezifische Gene (insbesondere aus Kartoffelknollen) nicht ausreichend repräsentiert sind. Von der Herstellung eines eigenen Arrays wurde allerdings Abstand genommen, da im Rahmen der *potato oligo chip initiative* (POCI) ein 44K Kartoffel-Oligo-Chip entwickelt wurde, der die bisher bekannte Gen-Information von Kartoffelpflanzen umfasst. Auch die EST-Sequenzen der im Rahmen dieses Projektes erstellten c-DNA Bibliotheken sind in die Ableitung der

60mer Oligos einbezogen worden. Dieser Chip wurde neben dem TIGR Chip für die Analysen verwendet. Ende 2006 wurde an der FAU Erlangen-Nürnberg eine Transkriptomplattform etabliert, um die Microarray-Experimente durchführen zu können.

II. 1.2. *Transkriptionelle Veränderungen während der Keimung von Kartoffelknollen*

Zwei verschiedene experimentelle Ansätze wurden verfolgt, um Gene zu identifizieren, die bei Brechung der Keimruhe und dem nachfolgenden Austreiben von Kartoffelknollen eine Schlüsselrolle spielen.

In ersten Experimenten wurden die Expressionsprofile von ruhenden und gerade zu keimen beginnenden Augen aus Kartoffelknollen aufgenommen und miteinander verglichen. Dazu wurden die entsprechenden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonden hergestellt und sowohl der 10K TIGR Array als auch der POCI-Array damit hybridisiert. Die Auswertung der Daten ergab das 435 (TIGR Array) bzw. 1900 (POCI-Array) Gene eine mindestens zweifache Änderung in ihrer Expressionshöhe aufwiesen. Von den 435 differentiell exprimierten Genen, die mittels des TIGR-Arrays identifiziert wurden, waren 352 bei der Keimung induziert und 83 in ihrer Expression verringert.

Ca. 16% der während der Keimung induzierten Gene sind Transkriptionsfaktoren, mehr als 20% kodieren für Stoffwechsellenzyme und etwa 6.5% entfallen auf Hormon-regulierte Proteine bzw. Enzyme der Phytohormon-Biosynthese. Weitere induzierte Gene kodieren für Proteine, die in Transkription und Translation involviert sind bzw. den Zellzyklus regulieren, was verdeutlicht, dass sich das „inaktive“ Meristem in ein aktiv wachsendes Gewebe gewandelt hat. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem POCI-Array ermittelt, wobei eine höhere Anzahl differentiell exprimierter Gene gefunden wurde.

Unter den differentiell exprimierten Genen befanden sich auch mehrere Homologe der GAST1-Familie (*GA stimulated transkript*). Eines der Gene (GARP – GA regulated protein) wurde bereits in früheren Untersuchungen, die mit einem 1.5K Macroarray durchgeführt wurden, als während der Keimung stark induziert gefunden und als ein erster Kandidat für weitere Untersuchungen selektiert.

Interessanterweise war auch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren induziert, die bei der geordneten Entwicklung von Meristemen bzw. Blattprimordien eine Rolle spielen, wie z.B. Homologe zu *Let6*; *Aintegumenta*, *Nam*- und *Yabby*-ähnlichen. Da *StLet6* zu den Homoeobox-Genen zu zählen ist, deren Rolle im Rahmen des Projektes ebenfalls untersucht werden sollte, wurde *StLet6* als ein weiterer Kandidat für die funktionelle Analyse ausgewählt.

Um Gene zu identifizieren, die vor dem sichtbaren Austreiben der Keime aktiv sind und somit vermutlich Schlüsselregulatoren darstellen, wurde ein zweites Experiment durchgeführt. Dabei wurde die langjährige Erkenntnis ausgenutzt, dass die Applikation von GA₃ die

Keimruhe brechen kann. Darauf beruhend wurde ein Assay etabliert, bei dem isolierte Knollenstückchen, die ein Auge enthalten in GA₃-haltiger Lösung inkubiert und anschließend im Dunklen auf feuchtem Filterpapier gelagert werden. Dies erlaubt die relativ gleichzeitige Induktion der Keimung, die gewöhnlich 3 Tage nach Beginn der Behandlung einsetzt. Fünf Tage nach der Behandlung sind ca. 95% (und mehr) aller Augen gekeimt. Es wurde eine optimale Konzentration von 50µM GA₃ ermittelt. Zum Vergleich werden isolierte Knollenstückchen mit Wasser behandelt, wobei nur in maximal 10% der untersuchten Proben ein Brechen der Keimruhe beobachtet werden konnte. Probenmaterial wurde 1, 2, 3, und 5 Tage nach Beginn der entsprechenden Behandlung entnommen und benutzt um Sonden herzustellen, die auf dem POCI-Array (mit je 2 Replikaten) hybridisiert wurden. Die Expressionsdaten wurden mit Hilfe der „Genespring“-Software auf die Wasser-behandelte Probe normalisiert und einer statischen Analyse unterzogen. Dabei konnten 7101 Gene ermittelt werden, die sich in ihrer Expression zu einem der Zeitpunkte mindestens um den Faktor zwei verändert. Tabelle 2 gibt eine Auflistung über die Anzahl der hoch- bzw. herunterregulierten Gene zu den untersuchten Zeitpunkten nach GA₃-Behandlung.

Tabelle 2. Anzahl differentiell exprimierter Gene nach 1, 2, 3 und 5d GA₃ Behandlung von isolierten Kartoffeläugen.

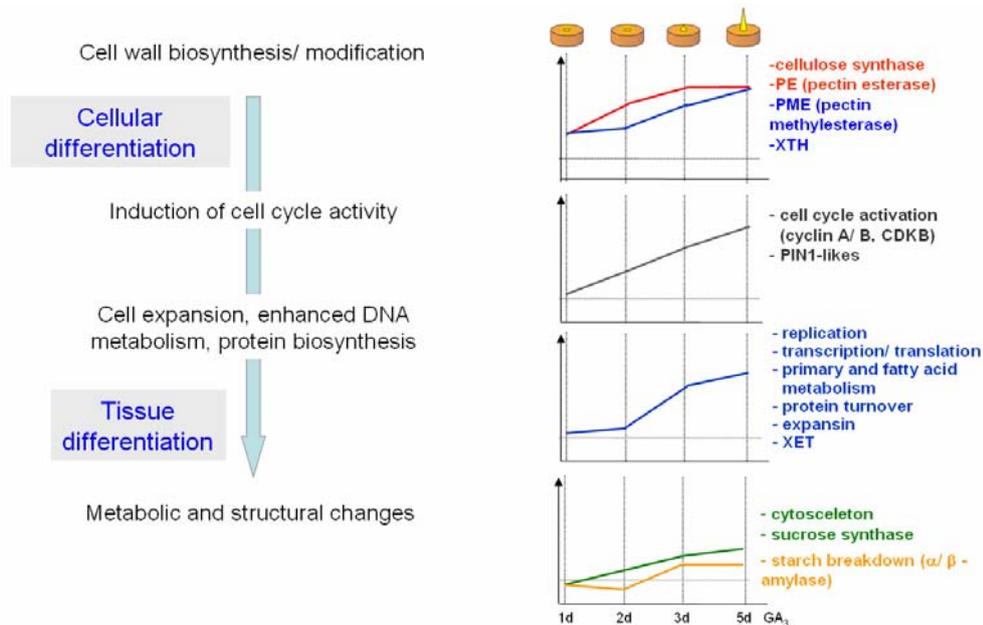
| GA ₃ -Behandlung vs. H ₂ O Kontrolle | Anzahl differentiell exprimierte Gene (2x) | Hoch-reguliert | Herunter-reguliert |
|--|--|----------------|--------------------|
| 1d GA ₃ | 945 | 481 | 464 |
| 2d GA ₃ | 1289 | 506 | 783 |
| 3d GA ₃ | 3945 | 3625 | 320 |
| 5d GA ₃ | 4946 | 4419 | 527 |

Die Daten spiegeln wider, dass ab dem Tag 3 eine Vielzahl von Genen in ihrer Expression erhöht ist, was mit der Induktion des Sproßwachstums einhergeht. Ein Tag nach GA₃-Behandlung sind hingegen etwa gleich viele Gene in ihrer Expression erhöht bzw. erniedrigt. Darunter befinden sich solche Gene, die sich aufgrund der GA-Behandlung in ihrer Expressionshöhe verändert haben. Die weitere Analyse der Daten lässt sich eine Reihe von interessanten Expressionsprofilen unterscheiden, z.B. solche, die ein Expressionsmaximum direkt vor dem sichtbaren Brechen der Keimruhe haben (Tag 2), aber auch solche die einen kontinuierlich Anstieg zeigen oder erst ab mit dem Wachstum des Keims ansteigen oder abfallen. Solche Gruppen enthalten potentielle Kandidatengene, die durch vergleichende Analyse näher eingeschränkt und verifiziert werden müssen.

Direkt nach der Ernte befindet sich die Knolle in der immanenten oder Endodormanz, in der unabhängig von günstigen oder ungünstigen äußeren Bedingungen keine Keimung stattfindet (Hemberg, 1985; Turnbull und Hanke, 1985a; Lang *et al.*, 1987). Die

Endodormanz wird durch Faktoren in dem betroffenen Meristem selbst bestimmt (Lang *et al.*, 1987). An die Endodormanz schließt sich meist eine Periode der „erzwungenen“ Dormanz an, in der die Keimung durch ungünstige äußere Bedingungen gehemmt wird (Hemberg, 1985; Turnbull und Hanke, 1985a; Lang *et al.*, 1987).

Abb.1 Schematische Darstellung möglicher Entwicklungsabläufe sowie Expressionsprofile ausgewählter Gene nach GA₃-vermittelter Induktion der Keimung von isolierten Kartoffelaugen.



Die Analyse und Zuordnung der einzelnen Gene lässt folgenden Ablauf von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen vermuten (Abb.1). Zunächst kommt es zur zellulären Differenzierung, die gefolgt wird von einer Gewebe-Differenzierung, d.h. der Entwicklung des Sprosses. So sind bereits einen Tag nach GA₃-Behandlung eine Vielzahl von Genen induziert, die bei der Modifikation (Lockerung) der Zellwände eine Rolle spielen (z.B. Expansine, XTH (Xyloglucanendotrans-Glucosidase/ -Hydrolase) (Abb.1). Nach 2 Tagen sind erste Vertreter von Genen induziert, die den Zellzyklus regulieren, was auf eine beginnende Zellteilungs-aktivität schließen lässt. Dem folgt (3dGA₃) eine Aktivierung der Replikation, Transkription und Translation sowie des Primärstoffwechsels, die sehr wahrscheinlich das Wachstum des Keims gewährleisten (Abb. 1).

II. 1.3. Funktionelle Analyse von Kandidatengen (GARP; StLet6)

Wie bereits erwähnt, wurde GARP als ein erstes Kandidatengen identifiziert. Northern Blot Analysen mit verschiedenen Geweben (Augen, Speicherparenchym) unterschiedlich lange gelagerter Kartoffelknollen konnten bestätigen, dass die Genexpression während der Keimung spezifisch im apikalen Bereich verstärkt wird. GARP gehört zur GAST1- Familie für die eine konservierte C-terminale Region mit 12 Cystein-Resten charakteristisch ist, und die aufgrund eines Signalpeptids vermutlich extrazellulär lokalisiert sind (Herzog *et al.*, 1995). Ihre

Funktion ist allerdings weitgehend unbekannt. Neuere Untersuchungen anderer Gruppen deuten an, dass einige Vertreter bei der Abwehr von Pathogenen (Segura et al., 1999) oder als Antioxidantien bei der Zellelongation eine Rolle spielen könnten (Wigoda et al., 2006).

Um die Funktion von GARP aufzuklären, wurden zunächst Northern Blot Analysen mit verschiedenen Kartoffel-Geweben durchgeführt. Die Ergebnisse legen nahe, dass das Gen überwiegend in wachsenden Organen, wie z.B. Stengel, Wurzelspitzen exprimiert wird. Eine C-terminale Fusion mit dem GFP-Reporter gen deutet darüber hinaus tatsächlich auf eine apoplastische Lokalisation des Proteins hin. Zur funktionalen Überprüfung wurden transgenen Pflanzen erzeugt, die ein Überexpressions- oder RNAi-Konstrukt tragen. Die transgenen Kartoffelpflanzen wurden mittels Northern blotting auf verminderte bzw. verstärkte Expression von GARP geprüft und positive Linien selektiert. Diese Pflanzen zeigten keine phänotypischen Veränderungen ihrer Wachstumseigenschaften. Im ersten Experiment zeigten einige der GARP-RNAi Kartoffelknollen ein verzögertes Austreiben, was sich aber in Wiederholungsexperimenten nicht bestätigte. Auch die verstärkte Expression von GARP hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Länge der Keimruhe.

Die weitere molekulare Analyse der RNAi-Knollen zeigte eine verstärkte Expression anderer Mitglieder der GAST1-Genefamilie, was auf eine Kompensation des *silencing* Effektes hindeutet. In Fortführung dieses Projektes werden im Rahmen von EU-SOL transgene Pflanzen erzeugt, die alle vier vermuteten Mitglieder der Genfamilie mittels RNAi-Technik ausschalten.

Neben GARP wurde der Homoeobox-Transkriptionsfaktor *Let6* als ein weiterer Kandidat für die funktionelle Analyse ausgewählt. Auch hier konnten RT-PCR Analysen eine verstärkte Transkriptakkumulation während der Knollenlagerung und der Brechung der Keimruhe bestätigen. RNAi-Pflanzen wurden hergestellt und molekular und im Hinblick auf verändertes Keimverhalten untersucht (siehe II 1.4).

II. 1.4. Die Rolle von GA und KNOX-Genen bei der Knollenkeimung

GA spielt vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Keimung, was dadurch unterstützt wird, dass exogen appliziertes GA die Keimruhe brechen kann (siehe oben). Um die Rolle von GA näher zu untersuchen, sind in Vorarbeiten transgene Kartoffelpflanzen erzeugt worden, die durch die konstitutive Expression einer GA20-oxidase bzw. einer GA2-oxidase aus *A. thaliana* erhöhte bzw. verringerte Gehalte an biologisch-aktiven GAs aufweisen. Dies konnte durch ein verändertes Längenwachstum der Pflanzen sowie durch Messung der endogenen GA-Gehalte in Blättern belegt werden, die in Zusammenarbeit mit Dr. P. Hedden (Rothamsted Research) durchgeführt wurde. Allerdings zeigten unsere Untersuchungen, dass die Steigerung der GA-Biosynthese ohne Einfluss auf das

Keimungsverhalten der Kartoffelknollen blieb. Eine leicht verzögerte Keimung (ca. 2 Wochen) konnte allerdings bei Knollen beobachtet werden, die die AtGA2-ox1 exprimierten. Als Ursache für das Ausbleiben eines signifikanten Effektes wurde die zu geringe Aktivität des verwendeten CaMV 35S Promoters während des untersuchten Entwicklungsabschnittes angenommen und vermutet, dass die Expressionshöhe in Kartoffelknollen nicht ausreichend ist, um signifikante Veränderungen im GA-Gehalt zu erzielen (z.B. um einen bestimmten Schwellenwert zu über- oder unterschreiten). Daher wurden beide Gene unter Kontrolle des chimären STLS1/CaMV 35S- Promoters (L700-GA20ox; L700-GA2ox) kloniert, von dem in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass dieser in Kartoffelknollen sehr aktiv ist (Hajirezaei und Sonnewald, 1999). Beide Konstrukte wurden in Kartoffelpflanzen transformiert und jeweils 5 stark exprimierende Linien für weitere Analysen ausgewählt. Dabei begannen die L700-GA20ox Linien ca. 1-2 Wochen früher zu keimen als vergleichbare Wildtyp- Kartoffelknollen, während L700-GA2ox exprimierenden Kartoffelknollen erst 2-3 Wochen später als Wildtyp-Knollen austrieben. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Expression der GA20-oxidase bzw. der GA2-oxidase unter Kontrolle des STLS1/CaMV 35S- Promoters zu einem leichten, aber nicht deutlich veränderten Keimungsverhalten führt. Eine andere Beobachtung war, dass die Keime GA20-ox exprimierender Knollen (wie auch die Sprosse) sich durch ein schnelleres Wachstums auszeichnen, während GA2-ox exprimierende Keime langsamer als vergleichbare Kontrollen wachsen. Das scheint die These zu stützen, dass GA vermittelte Prozesse wesentlich für das Wachstum des Sprosses sind.

Außerdem wurden transgene Pflanzen erzeugt, die beide Gene unter Kontrolle des Meristem-spezifischen UFO-Promoters exprimieren (II 1.5) Bisher konnten 4 Linien für UFO-GA2-ox und 5 Linien für UFO-GA20-ox regeneriert werden. Die entsprechenden Linien zeigten alle keine auffälligen Veränderungen im Phänotyp. Der Erfolg der Transformation konnte für alle UFO-GA2-ox Linien und für 3 der UFO-GA20-ox Linien bestätigt werden. Da jedoch jeweils nur wenige Transformanten erhalten wurden muss die Transformation wiederholt werden.

Da es in der Literatur verschiedene Hinweise darauf gibt, dass KNOX-Proteine die Expression von GA-Biosynthesegenen im Meristem unterdrücken, war ein weiteres Ziel des Arbeitspaketes diese Beziehung näher zu charakterisieren. Die Sequenz des Tabak-Klons NTH15 wurde benutzt, um in der TIGR-Datenbank nach homologen Kartoffel-EST's zu suchen. Dabei konnten drei nahe verwandte EST-Klone gefunden werden, wobei zwei davon identisch waren und sich von dem dritten nur in wenigen Nukleotiden unterschieden. Die beiden verschiedenen Sequenzen wurden benutzt um RNAi-Konstrukte herzustellen, die anschließend in Kartoffelpflanzen transformiert wurden. Jeweils 75 transgene Pflanzen wurden regeneriert, von denen 40-50 nach dem Transfer ins Gewächshaus mittels Northern

Blot analysiert wurden. Kartoffelknollen von 6-10 ausgewählten Linien wurden geerntet, bei Raumtemperatur gelagert und das Keimungsverhalten beobachtet, wobei kein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Knollen sichtbar war.

Parallel dazu ergab die weitere Sequenzanalyse, dass die zwei NTH-like Sequenzen starke Homologie zu dem *Let6*-Homologen (der in den Microarray-Analysen gefunden wurde) aus Kartoffel aufwies (bzw. identisch waren). Die Klonierung des kompletten ORFs ließ vermuten, dass beide Sequenzen das gleiche Gen repräsentieren, aber unterschiedliche allelische Versionen darstellen.

Da Northern Blots nicht geeignet waren, um die Effizienz des Silencings tatsächlich abzuschätzen, wurde eine semi-quantitative PCR Analyse durchgeführt, die offenbarte, dass in den transgenen Linien *Let6* nicht oder nur marginal in seiner Expression verringert war. Weitere Ansätze wie z.B. die Expression dominant-negativer Varianten werden im Rahmen von EU-SOL verfolgt, um die Funktion näherer zu untersuchen.

II. 1.5. Analyse Meristem-spezifischer Promotoren aus *Arabidopsis thaliana* in Kartoffelpflanzen.

Um zu prüfen, in wie weit Meristem-spezifische Promotoren aus *A. thaliana* auf Kartoffelpflanzen übertragbar sind, wurden verschiedene Meristem-spezifische Promotoren und Promotoren, die die Expression von Zellzyklus-Genen regulieren ausgewählt. Die entsprechenden Promotorabschnitte wurden mit der Beta-Glucuronidase (GUS) und mit dem Grün-Fluoreszierenden Protein (GFP) als Reporter gen fusioniert und in Pflanzenexpressions-Vektoren kloniert (INRA Versailles). Die Konstrukte wurden in *Agrobakterien* eingebracht und in Kartoffelpflanzen transformiert. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die ausgewählten Promotoren und die Anzahl der erzeugten und exprimierenden transgenen Pflanzen.

Von den erhaltenen transgenen Linien wurden Längsschnitte durch das apikale Sproßmeristem angefertigt und auf GUS- bzw. GFP-Aktivität untersucht und positive Linien selektiert.

Tabelle 3. Übersicht über die für die Transformation in Kartoffelpflanzen ausgewählten Promotorkonstrukte.

| Konstrukt/ Promoter | Genbezeichnung | Funktion, Expression | Anzahl transgener Linien | Positive Linien |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------|
| AtML1:GUS | Meristem-Layer 1 | Meristem, epidermale Zellschicht | 13 | 1, 7, 8, 10, 12 |
| AtML1:GFP | | | 45 | 40 |
| ANT:GUS | AINTEGUMENTA | Organprimordien | 13 | 2, 3, 5, 7, 11 |
| ANT:GFP | | | 8 | all negative |
| UFO:GUS | Unusual floral organs | Grenzschicht zu Organprimordien | 19 | 2, 4, 12, 15, 17 |
| UFO:GFP | | | 37 | 16, 31 |
| C2A:GUS | Cyclin-abhängige Kinase 1 | Regulation des Zellzyklus | 54 | 1, 2, 4, 5, 9 |

| | | | | |
|---------|---------------------|---|----|------------------|
| Cyc:GUS | Cyclin B | Regulation des Zellzyklus | 35 | 7, 8, 10, 11, 15 |
| WUS:GFP | Wuschel | Organisatorisches Zentrum des Meristems | 75 | negativ! |
| WUS:GUS | | | 75 | negativ! |
| STM:GFP | Shoot meristem less | Organisatorisches Zentrum des Meristems | 75 | negativ! |
| STM:GUS | | | 75 | negativ! |

Von diesen wurde das Expressionsmuster auch in weiteren Organen, z.B. Blüte, Wurzel, und während der Knollenentwicklung studiert (Tab. 4). Promotoren, die die Expression Zellzyklus-regulierender Gene steuern, schienen konstitutive Expression während der Knollenentwicklung zu vermitteln. Hingegen ist der AtML1 Promoter spezifisch in der äußeren Zellschicht der Meristeme aktiv und wird vom französischen Partner weiter analysiert. Der UFO-Promoter war erwartet in Blütenprimordien aktiv und zeigte darüber hinaus auch meristem-spezifische Expression in Kartoffelknollen. Dieser wurde daher ausgewählt, um Expression AtGA20-oxidase und AtGA2-oxidase zu steuern.

Tabelle 4. Expressionsmuster verschiedener Promoter:GUS Konstrukte in transgenen Kartoffelpflanzen.

Pflanzenmaterial wurde histochemisch auf GUS-Aktivität untersucht und die Intensität abgeschätzt: -, keine Expression; (+), sehr schwach bzw. nicht in allen Linien, + - ++++ schwach bis sehr stark.

| Konstrukt | Blüte | Blatt/ Blattachsel | Wurzelspitze | Stolon | Wachsende Knolle | Keimende Knolle |
|-----------|-------|-----------------------|--------------|--------|---------------------|--------------------|
| ANT:GUS | ++ | + | - | + | ++ | -/+ |
| UFO:GUS | (+) | - | - | + | + | + |
| AtML1:GUS | ++ | + | - | + | + | + |
| C2A:GUS | ++ | Not done | (+) | +++ | +++ | ++ |
| CYC:GUS | ++ | Not done | (+) | ++ | ++++ | +++ |

Für zwei Promotoren (WUS, STM) konnte weder GUS- noch GFP-Aktivität in Kartoffelpflanzen nachgewiesen werden. Diese Konstrukte wurden parallel am INRA (P. Laufs Gruppe) in *A. thaliana* transformiert, wo sie das erwartete Expressionsmuster zeigten.

II. 1.6. Vergleichende Datenanalyse und Entwicklung Projekt-relevanter Datenbanken

Die Hauptziele des Arbeitspaketes 4 waren die Etablierung projektrelevanter Datenbanken und die vergleichende Datenanalyse der Expressionsdaten.

Zur Speicherung der EST-Informationen sowie der Expressionsdaten wurden zwei Systeme angepasst und für das Genosome Projekt erweitert.

In Kooperation mit Bioinformatik-Kollegen am IPK wurde die CR-EST-Datenbank (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/>) erweitert. Neben der Speicherung aller Sequenzinformationen sind Blast- und Clustering-Ergebnisse sowie Mappings zu GeneOntology und KEGG-Pathways abgelegt. Für alle ESTs sind die Trace-Files verfügbar, die auf die Qualität der Sequenz Rückschlüsse erlauben. Alle Kartoffel-ESTs, die im Rahmen vom GENOSOME-Projekt erzeugt wurden, sind somit für den weltweiten Zugriff verfügbar.

Parallel wurden die Sequenzen in Kooperation mit der GABI-PD (GABI-Primärdatenbank) zur NCBI-Genbank submittiert.

Für Expressionsdaten, die mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden auf Nylonmembranen hybridisiert wurden (Macroarrays), konnte die FLAREX-Datenbank (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/flarex/>) in Kooperation mit Kollegen am IPK erweitert werden. Die Informationen werden nach Vorgaben des MIAMI-Standards (Minimal Information About Microarray experiments) gespeichert.

Innerhalb des gesamten GENOSOME-Projektes kamen verschieden Array-Plattformen wie z. B. cDNA-Arrays, Oligo-Arrays sowie Affymetrix zum Einsatz. Weiterhin war die Einbeziehung öffentlich verfügbarer Expressionsdaten für die vergleichende Datenanalyse von Vorteil. Aufgrund der unterschiedlichen Plattformen und der Notwendigkeit der Einbindung öffentlicher Daten wurde ein Datenintegrationssystem mit dem Ziel der vergleichenden Datenanalyse entwickelt. Für die Durchführung der Analysen existieren drei Herausforderungen. Diese sind:

1. Annotation der Experimente:

Dazu gehören die Beschreibung der Array-Plattform, das Protokoll der Hybridisierung, die Durchführung der Rohdaten-Normalisierung und die verwendeten Proben. Die exakte Dokumentation des verwendeten Pflanzenmaterials unter Nutzung von kontrollierten Vokabularien, wie Organismus, Sorte, Gewebe, Entwicklungszustand, genetische Modifikationen sowie spezielle Behandlungen .

2. Sequenz-Mapping:

Verschiedene Arrays enthalten verschiedene Features. Dies resultiert aus verschiedenen gespotteten Sequenzen bzw. Oligonukleotiden. Die Identifizierung von orthologen oder äquivalenten Sequenzen ist für die vergleichende Analyse verschiedener Arrays essentiell. Durch die bisher nicht verfügbare genomische Sequenz von Solanaceae ist hier die Einbeziehung von Modellorganismen wie z. B. *Arabidopsis thaliana* erforderlich.

3. die eigentlichen Expressionswerte

Durch die Verwendung von unterschiedlichen Technologien existiert bei den Werten eine unterschiedliche Verteilung. Signalintensitäten bei Fluoreszenz-Markierung (z. B. Cy3 oder Cy5) oder radioaktiver Markierung (z. B. ³³P) können nicht direkt verglichen werden. Genauso ist der Vergleich von Werten aus Experimenten mit einer Farbmarkierung mit relativen Verhältnisse bei Zwei-Farben-Experimenten nicht möglich.

Um diese Herausforderungen zu überwinden wurde ein Integrationssystem mit dem Namen BATEX (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/batex/>) entwickelt. Herzstück des Systems ist ein Data Warehouse. Während der ETL-Prozesse (Extraction-Transformation-Loading) werden die Annotationen der Experimente angepasst sowie Sequenzen aufeinander abgebildet. Die

Modifikationen sind im speziellen die Zuordnung zu kontrollierten Vokabularien und Ontologien mit dem Ziel die Problematik von Synonymen und Homonymen zu überwinden. Der Workflow des Datenvergleichs unter Verwendung von BATEX kann wie folgt zusammengefasst werden:

- Relevante Annotationskategorien der Experimente identifizieren und in „BATEX Stage“ einpflegen.
- Automatische Generierung eines Application Programmer Interface (API), um die Entwicklung von Parsern zur Datenextraktion zu unterstützen.
- Parser für alle Datenquellen sind verfügbar und werden ausgeführt.
- Annotation der Daten werden angepasst. Begriffe (Terme) aus Ontologien oder kontrollierten Vokabularien werden zugewiesen und den Importprozeduren zugeordnet.
- Sequenzen von allen verschiedenen Arrays werden in „BATEX Sequence“ importiert.
- Bilaterale Abbildungen (Mappings) zwischen Sequenzen von verschiedenen Arrays werden vor berechnet.
- Optional: Durchführung eines manuellen Sequenz-Mappings (empfohlene für bekannte Kandidatengene)
- Ladeprozess in eine BATEX-Instanz mit konfigurierbaren Dimensionen (Annotations-Kategorien). Für unterschiedliche Anwendungsszenarien können unterschiedliche Instanzen erzeugt werden.
- Daten aus BATEX können in Form von Expressionsmatrizen exportiert werden.
- Die exportierten Daten können dann mit externen Tools (z. B. TIGR MEV) visualisiert werden.

Die zum Projektende importierten Daten fasst die folgende Tabelle zusammen.

Tabelle 5: Importierte Daten ins BATEX-Warehouse

| Partner | Array-Plattform | Anzahl Experimente | Anzahl Hybridisierungen |
|--------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------------|
| FAU | TIGR potato cDNA micro-array | 1 | 4 |
| FAU | POCI | 1 | 32 |
| CSIC | TIGR potato cDNA micro-array | 2 | 4 |
| MPIZ | Custom tomato oligo micro-array | 1 | 20 |
| Public data (SGED) | TIGR potato cDNA micro-array | 5 | 107 |

Die Vergleichbarkeit der Daten wurde anhand von Kandidatengenen aus verschiedenen Organismen (Kartoffel und Tomate) exemplarisch untersucht. Als Ergebnis kann festgestellt werden, dass eine qualitative Aussage (wie Hoch- bzw.- Herunter-Regulierung) über verschiedene Arrayplattformen hinweg und ebenso bei verschiedenen Organismen getroffen werden kann.

Zwei Partner des GENOSOME-Verbundes (S. und U. Sonnewald FAU Erlangen-Nürnberg; S. Prat CSIC Madrid) sind Mitglied der Potato-Oligo-Chip- Initiative (POCI). Für die Annotation des POCI-Arrays wurde ein webbasiertes System entwickelt welches unter der Adresse <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci/> verfügbar ist. Folgende Features wurden dabei implementiert:

- Download der Oligo- und Consensus-Sequenzen.
- Präsentation der BLAST-Ergebnisse aller POCI-Sequenzen gegen TAIR-Proteine oder gegen NCBI's non redundant peptides.
- Alignment-Möglichkeit von Such-Sequenzen gegen POCI-Consensus-Sequenzen mittels BLASTN.
- Hinzufügen neuer Sequenzen-Annotation für autorisierte Benutzer.

Weitere Aufgabe im Arbeitspaket 4 war die Entwicklung eines webbasierten Informationssystems mit Nutzer-Identifizierung zur Veröffentlichung der Projektergebnisse und zur Unterstützung des Datenaustausches. Als Ergebnis wurde Genosome Homepage <http://www.genosome.org> etabliert. Diese Web-Präsentation wird über das Förderungsende hinaus weiterhin vom IPK Gatersleben betreut.

II. 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Vgl. hierzu Bericht vom 26.3.2008 von V. Bodensiek, IPK Gatersleben

II. 4. Darstellung des voraussehbaren Nutzens und der Verwertbarkeit der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den Projektzielen wurden nachfolgend aufgelistete Ergebnisse erzielt, die einer Verwertung zugänglich gemacht werden könnten:

- hoch-spezifische cDNA-Bibliotheken, deren EST-Sequenzen mit in die Herstellung eines 44K Oligo-Chip (POCI) eingeflossen sind (vorr. ab 2009 kommerziell über Fa. Agilent verfügbar).
- Expressionsprofile, die Kandidatengene für die Modifikation des Keimverhaltens von Kartoffelknollen liefern
- Expressionsprofile, die in der Auswahl geeigneter Kandidaten zur Isolierung von Gewebe-spezifischen Promotoren führen können.
- Identifizierung des UFO-Promoters als möglichen Kandidaten für Meristem-spezifische Expression in keimenden Kartoffelknollen
- Erstellung einer Datenbank und die Anwendung, Optimierung und Entwicklung von bioinformatischen Analyse-Techniken zur vergleichenden Analyse von Transkriptprofilen und EST-Sequenzen.
- Transgene Kartoffelpflanzen mit veränderter Expression von Kandidatengenen

Die weitere Analyse der Expressionsdaten, die Selektion weiterer Kandidaten sowie die detaillierte Analyse von weiteren transgenen Pflanzen werden im Rahmen des EU-Sol Projektes bzw. in dem vom BMBF geförderten Sicherheitsforschung-Projekt „Gentechnische Ansätze zur Begrenzung der Ausbreitungsfähigkeit von Kartoffelknollen“ weitergeführt.

Bei der Entwicklung der Datenbanken und Integrationssysteme wurde auf Erweiterbarkeit und vor allem auf Adaptierbarkeit großer Wert gelegt. So können die Systeme so angepasst werden, dass Informationen zu anderen Organismen als ausschließlich *Solanaceae* verwaltet werden können. In Planung ist eine Erweiterung auf Mais.

II. 5. während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Wie unter I. 3 und II.1 aufgeführt hat sich zu Beginn der Projektlaufzeit das POCI-Konsortium zusammengeschlossen, mit dem Ziel einen 44K Oligo-Chip für Kartoffeln zu entwickeln. Daher wurden die Bestrebungen einen eigenen Microarray herzustellen nicht weiter verfolgt. Wissenschaftlich gesehen gab es eine wesentliche Veröffentlichung am Ende der Projektlaufzeit von Kloosterman et al., 2007 (Plant J. 52: 362-373), die zeigt, dass das Ausschalten einer Kartoffel-eigenen GA2-oxidase keinen wesentlichen Einfluss auf das Keimverhalten hat, was sich gut mit unseren Daten deckt.

Die oben beschriebenen Datenbanken zur Verwaltung von Expressionsdaten haben sich während der Projektlaufzeit weiterentwickelt. So wurden in Genevestigator Daten weiterer Arten wie z.B. der Gerste aufgenommen. Eine weiterhin existierende Fokussierung auf Affymetrix-Experimente machte aber eine Anwendung im Rahmen von Genosome nicht möglich. Ähnliche Erweiterungen konnten für das System ArrayExpress festgestellt werden. Der Fokus von ArrayExpress als Repository für einzelne Experimente auf nur einer Arrayplattform machte eine Anwendung im Genosome Projekt nicht möglich, da hier plattformübergreifend analysiert werden sollte.

II. 6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Die Ergebnisse von Genosome bzw. des TP 4 wurden bzw. werden fachlich interessierten Stellen auf verschiedene Weisen zugänglich gemacht. So wurden wesentliche Ergebnisse, die auf internen Projekttreffen ausgetauscht und diskutiert wurden über der Webseite: www.genosome.org allen Partnern und teilweise der Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Weiterhin erfolgte die Freigabe der EST-Sequenzen, die im Rahmen von Genosome gewonnen wurden, in einer öffentlichen Datenbank (Genbank). Darüber hinaus wurden die Resultate des Verbundprojekts auf Fachkongressen präsentiert und in Fachzeitschriften veröffentlicht.

6.1 Freigabe von EST-Sequenzen für öffentliche Datenbanken

Im Laufe des Projektes wurden etwa 3.500 Klone der cDNA-Banken sequenziert und zusammen mit den bereits in Vorarbeiten gewonnenen ca. 3.500 Sequenzen kontinuierlich in der CR-EST-Datenbank des IPK Gatersleben veröffentlicht (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est>). 2005 wurden die insgesamt 6.833 EST-Sequenzen aus 5 verschiedenen Kartoffelknollen-cDNA-Banken, der Öffentlichkeit zugänglich gemacht (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht über die veröffentlichten EST-Sequenzen aus Kartoffel-cDNA-Banken (siehe auch Tab.1).

| Name | Gewebe/ Behandlung | Art der cDNA-Bibliothek | Anzahl der EST-Sequenzen |
|--|---|---|--------------------------|
| STDB <i>Solanum tuberosum</i> dormant buds | Ruhende Augen von Kartoffelknollen, direkt nach der Ernte entnommen | Konventionell (λ ZAPII) | 1455 |
| SDBT <i>Solanum tuberosum</i> dormant buds (TripleEx) | Ruhende Augen von Kartoffelknollen, direkt nach der Ernte entnommen | Gerichtet, in 5'-3' Orientierung (λ TriplEX) | 561 |
| SDBN <i>Solanum tuberosum</i> dormant buds, normalized | Ruhende Augen von Kartoffelknollen, direkt nach der Ernte entnommen | Normalisiert | 2028 |
| SSBT <i>Solanum tuberosum</i> sprouting buds (TripleEx) | 2mm lange Keime von Kartoffelknollen nach ca. 3-monatiger Lagerung | Gerichtet, in 5'-3' Orientierung (λ TriplEX) | 1661 |
| SSBN <i>Solanum tuberosum</i> sprouting buds, normalized | 2mm lange Keime von Kartoffelknollen nach ca. 3-monatiger Lagerung | Normalisiert | 1128 |
| Total | | | 6833 |

6.2 Veröffentlichungen auf Fachkongressen

Das Genosome-Projekt (bzw. das Teilprojekt 4) und seine Ergebnisse wurden auf nationalen und internationalen Fachkongressen vorgestellt. Die Präsentation erfolgte durch Vorträge, Poster und Veröffentlichungen in Tagungsbänden. Nachfolgend sind die Titel bzw. die Art der Beiträge dargestellt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht über die Präsentationen von Genosome (Partner 4)

| Jahr | Veranstaltung | Präsentation | Titel |
|------|--|--------------|--|
| 2005 | Statusseminar zum BMBF-Forschungsschwerpunkt GABI, Potsdam | Vortrag | GENOSOME-Comparative Genomic of Solanaceae Meristems |
| 2006 | European Training and | Vortrag | An Introduction to Data Base Systems |

| | | | |
|------|---|---------|--|
| | Networking Activity: Summer School, 20th – 29th September Potsdam, Germany | | and Data Warehouses |
| 2006 | International Workshop Integrative Bioinformatics, 3rd annual meeting 4th to 6th September 2006 Rothamsted Research, UK | Poster | Using Data Warehouse Technology for Integrative Analysis of Gene Expression Data |
| 2007 | Statusseminar zum BMBF-Forschungsschwerpunkt GABI, Bonn | Vortrag | GENOSOME-Comparative Genomic of Solanaceae Meristems |
| 2007 | Tagung: Molekularbiologie der Pflanzen (Darbringhausen) | Poster | Transkriptionelle Regulation der Kartoffelknollen Dormanz |

6.3 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

B. Kloosterman, D. De Koeyer, R. Griffiths, B. Flinn, B. Steuernagel, U. Scholz, S. Sonnewald, U. Sonnewald, G.J. Bryan, S. Prat, Z. Banfalvi, J.P. Hammond, P. Geigenberger, K.L. Nielsen, R.G.F. Visser, and C.W.B. Bachem (2008). Genes driving potato tuber initiation and growth: Identification based on transcriptional changes using the POCI array. *Functional & Integrative Genomics*.

M. Senning, B. Steuernagel, A. Hartmann, U. Sonnewald, U. Scholz, S. Sonnewald (2007.) Regulation der Keimruhe von Kartoffelknollen. *GenomXPress*, 3:7–10.