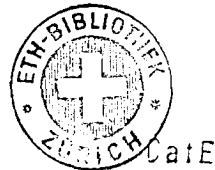


**Molecular characterization of
sucrose-cleaving enzymes from carrot**



A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
MARKUS ROBERT HARDEGGER
Dipl. Natw. ETH
born January 28, 1966
citizen of Gams SG

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. N. Amrhein, examiner
PD Dr. A. Sturm, co-examiner
PD Dr. F. Keller, co-examiner

Zürich 1997

Summary

Sucrose, the major transport form of assimilated carbon in most plant species, is synthesized in the photosynthetic leaf tissue, from where it is transported to the heterotrophic parts of a plant. Sucrose utilization is initiated by sucrose cleavage which is catalyzed by two different enzymes, β -fructosidase and sucrose synthase. The soluble acid β -fructosidase isoenzyme I (SI) of carrot had previously been purified to homogeneity and antibodies were raised against the deglycosylated polypeptide (Unger et al. 1992). A cDNA library was made and cDNAs were isolated using these antibodies. Three very similar cDNA clones (98% identity) were found and named *SI* class 1-3. All three cDNAs coded for 661 amino acid long proteins containing a 115 amino acid long leader sequence. Steady-state transcript levels of *SI* were found in young leaves, in the primary root, flowers and immature seeds from carrots. Transcripts coding for the soluble acid β -fructosidase isoenzyme II (*SII*), isolated and sequenced by Unger (1993), were only detected at low levels in primary roots and at high levels in taproots.

Polypeptide fragments of each isoenzyme were produced in *E. coli* and polyclonal antibodies were raised against them. The antibody against SI recognized mainly SI polypeptides, the neutral β -fructosidase and an unknown protein, whereas the antibody against SII detected SII polypeptides, the cell wall β -fructosidase and the neutral β -fructosidase. Unspecific binding was observed at 68 kDa for the antibody against SII.

The genes for *SI* and *SII* were isolated from a carrot genomic library. Their gene structures are very similar, whereas the approximately 2700-bp-long promoter sequences showed no prominent homologies. Computer analysis revealed two possible transcription factor binding sites in the *SII* promoter region. The determination of the transcription start sites revealed that the expression of the *SI* is most likely post-transcriptionally controlled. In addition, two sucrose synthase genes were isolated and sequenced. Steady state transcripts were found for both sucrose synthase genes.

In order to manipulate the expression of sucrose-cleaving enzymes within carrot plants, an efficient transformation and regeneration system was established for the carrot cultivar Nantaise. Different *Agrobacterium tumefaciens* strains were used to test the frequency of T-DNA transfer to different carrot tissues. Hypocotyl segments of 7-day-old

seedlings were found to be the best starting material for transformation. The medium for selecting and propagating transgenic cells was optimized. Transgenic plants were regenerated through somatic embryogenesis in liquid cultures.

S/ and *S//* promoter sequences of various lengths were fused to the β -glucuronidase (*GUS*) gene and carrot cells were transformed. *GUS* activity driven by *S/* promoter fragments was found in cotyledons and their vascular bundles and in newly emerging leaves which were partially or completely enclosed by neighboring petioles. *S//* promoter driven *GUS* expression was mainly found in taproots, in the phloem parenchyma tissue close to the intrafascicular cambium and in the inner section of fibrous lateral roots.

Information from this work combined with existing results led to the postulation that the soluble acid β -fructosidases may control the regulation of the cell turgor and hence cell expansion.

Zusammenfassung

In den meisten Pflanzenarten wird assimilierter Kohlenstoff als Saccharose transportiert. Die Saccharose wird in photosynthetisch aktivem Blattgewebe synthetisiert und anschliessend zu den heterotrophen Geweben einer Pflanze transportiert. Die Saccharosespaltung durch eine β -Fructosidase oder eine Saccharose Synthase ist der erste Schritt der Metabolisierung der Saccharose. Das lösliche, saure β -Fructosidase Isoenzym I (SI) der Karotte wurde gereinigt, und Antikörper wurden gegen das deglykosylierte Protein hergestellt (Unger *et al.* 1992). Mit Hilfe dieser Antikörper wurden aus einer cDNA-Bibliothek verschiedene SI/cDNA Klone isoliert. Drei sehr ähnliche Klone (98% Identität) wurden sequenziert. Die Klone kodieren für ein 661 Aminosäuren umfassendes Protein. Die ersten 115 Aminosäuren bilden eine Leitsequenz, die im aktiven Enzym nicht mehr vorhanden ist. Transkripte des Genes für die SI wurden in jungen Blättern, in primären Wurzeln, in Blüten und unreifen Samen der Karotte gefunden. Starke Expression des Genes für das lösliche, saure β -Fructosidase Isoenzyme II (SII), isoliert und sequenziert von Unger (1993), wurde in Speicherwurzeln gefunden.

In Kaninchen wurden polyklonale Antikörper gegen Polypeptidfragmente des SI und SII, welche in *E. coli* produziert worden waren, hergestellt und mit Hilfe der "Western Blot" Technik getestet. SI Polypeptide, die neutrale β -Fructosidase sowie ein unbekanntes Protein wurden vom Antiserum gegen SI erkannt. Das Antiserum gegen SII erkannte SII Polypeptide, die extrazelluläre und die neutrale β -Fructosidase. Zusätzlich wurde eine unspezifische Bindung des Antiserums gegen SII an Material in der Höhe von 68 kDa beobachtet.

Die Gene der SI und SII wurden aus einer Gen-Bibliothek isoliert und sequenziert. Die Anordnung der Exons und Introns ist in beiden Genen sehr ähnlich. Dagegen enthielten die Promotorbereiche keine homologen Abschnitte. Mit Computeranalysen wurden zwei mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im SII Promotor identifiziert. Die Bestimmung der Startstellen der Transkription sowie andere Resultate zeigten auf, dass die Genexpression des SI sehr wahrscheinlich während der Translation reguliert wird. Im weiteren wurden zwei Saccharose Synthase Gene isoliert und sequenziert. Transkripte wurden für beide Gene gefunden.

Ein Transformations- und Regenerationssystem für Nantaise Karotten wurde entwickelt, um die Genexpression der Saccharose-spaltenden Enzyme innerhalb der Karottenpflanze verändern zu können. Verschiedene *Agrobacterium tumefaciens* Stämme wurden benützt, um die Frequenz, mit welcher die T-DNA in verschiedene Karottengewebe transferiert wird, zu bestimmen. Mit Hypocotylstückchen 7 Tage alter Keimlinge wurden die besten Ergebnisse erzielt. Das Medium für die Selektion und Vermehrung transgener Zellen wurde optimiert. Transgene Pflanzen wurden mit Hilfe der somatischen Embryogenese in Flüssigkulturen regeneriert.

Unterschiedlich lange Promotorsequenzen des *S/* und *S//* Genes wurden mit dem β -Glucuronidasegen (*GUS*) fusioniert und Karottenzellen damit transformiert. β -Glucuronidaseexpression, gesteuert durch *S/* Promotorstücke, wurde in Kotyledonen und der Leitbündel sowie in jungen Blättern, welche von benachbarten Blattstielen eingeschlossen waren, gefunden. In Speicherwurzeln wurde die β -Glucuronidase, gesteuert durch *S//* Promoterstücke, in Phloemparenchymzellen, welche nahe dem intrafasciculären Kambium liegen, sowie im inneren Teil der Seitenwurzeln exprimiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit bestehendem Wissen kombiniert und eine mögliche Funktion der β -Fructosidasen beim Aufbau eines Zellurgors zur Ausdehnung der Zelle postuliert.