Dissertation

Dagmar Enß

Untersuchung von putativen Diaminoxidasen für die Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese in *Senecio vernalis*

Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Untersuchung von putativen Diaminoxidasen für die Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese in *Senecio vernalis*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Dagmar Enß

Kiel

2009

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2009

Zugl.: Kiel, Univ. Diss., 2008

978-3-86955-144-9

Referent/in:	Prof. Dr. Dietrich Ober
Koreferent/in:	Prof. Dr. Wolfgang Blaschek
Tag der mündlichen Prüfung:	16.09.2009
Zum Druck genehmigt:	16.09.2009

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2009

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2009

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-144-9

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dietrich Ober danke ich für das spannende, abwechslungsreiche Thema, seine ständige Bereitschaft für Diskussion und Rat, dafür dass er den Ruf nach Kiel angenommen hat und für seine Unterstützung bei meinem Auslandsaufenthalt.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Blaschek danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Heiko Rischer danke ich ganz besonders für seine Bereitschaft, mich am VTT Technical Research Centre Finland zu betreuen, für die vielen spannenden Diskussionen und sein andauerndes Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Dr. Till Beuerle danke ich für die Hilfe bei der Etablierung der gaschromatographischen PA-Analytik in unserer Arbeitsgruppe in Kiel und für die Durchführung der GC-MS-Messungen.

Special thanks to Petri Lackman who carried out ^{1}H-NMR analysis of the transgenic tobacco hairy roots.

My grateful thanks to the working-group headed by Kirsi-Marja Oksman-Caldentey at the VTT for their great patience, many helpful hints in the lab, for extracting tobacco hairy roots and for their very warm welcome in Finland. Kiitos!

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an alle Mitarbeiter des Botanischen Instituts der Arbeitsgruppe Ober richten. Das angenehme Arbeitsklima und die vielen freundschaftlichen Beziehungen lassen die vergangenen drei Jahre zu den besten meiner bisherigen Ausbildung werden. Desweiteren danke ich auch den Mitarbeitern der Pharmazeutischen Biologie der TU-Braunschweig für die nette Aufnahme und den guten Start ins Doktoranden-Dasein.

Ganz besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern Marie-Luise und Peter Enß und meinen Schwestern Sonja und Petra, die mich in allen erdenklichen Weisen unterstützt haben, allen meinen Freunden, die gerade in den letzten Monaten ein Hochmaß an Geduld bewiesen haben und Carmen für die tolle Freundschaft. Das alles wäre nie passiert ohne…

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen ... III

Abkürzungsverzeichnis ... VIII

1 Einleitung ... 1
- 1.1 Vorkommen und Wirkung der Pyrrolizidin-Alkaloide ... 2
- 1.2 Evolution der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese ... 5
- 1.3 Die Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese und deren Enzyme ... 8
- 1.4 Ziel der Arbeit ... 11

2 Material und Methoden ... 12
- 2.1 Chemikalien, Kits, Enzyme und spezielle Materialien ... 12
- 2.2 Pflanzenkulturen ... 13
  - 2.2.1 Versuchspflanzen ... 13
  - 2.2.2 Medien ... 13
  - 2.2.3 Kulturführung ... 15
- 2.3 Bakterienkulturen ... 16
  - 2.3.1 Stämme ... 16
  - 2.3.2 Medien ... 16
  - 2.3.3 Kulturführung ... 17
- 2.4 Vektoren ... 18
- 2.5 Oligonukleotide ... 18
- 2.6 Allgemeine molekularbiologische Methoden ... 20
  - 2.6.1 Gewinnung von genomischer DNA ... 20
  - 2.6.2 Gewinnung von Gesamt-RNA ... 20
  - 2.6.3 Abbau der genomischen DNA in Gesamt-RNA ... 20
  - 2.6.4 cDNA-Synthese ... 21
  - 2.6.5 Agarosegel-Elektrophorese von Nukleinsäuren ... 21
  - 2.6.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren ... 22
  - 2.6.7 PCR ... 22
    - 2.6.7.1 Standard-PCR ... 22
    - 2.6.7.2 Reverse Transkriptase (RT)-PCR ... 24
  - 2.6.8 Klonierung von PCR-Produkten ... 26
    - 2.6.8.1 Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen ... 26
    - 2.6.8.2 Ligation ... 26
    - 2.6.8.3 Klonierung in pGEM®-TEasy ... 27
    - 2.6.8.4 Transformation ... 28
  - 2.6.9 Selektion von positiven Klonen ... 29
    - 2.6.9.1 Blau/Weiß-Selektion ... 29
    - 2.6.9.2 Restriktionsanalyse ... 30
    - 2.6.9.3 PCR ... 30
  - 2.6.10 Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparationen ... 31
  - 2.6.11 Reinigung von DNA ... 32
    - 2.6.11.1 Aus einem Agarosegel ... 32
    - 2.6.11.2 Aus einem PCR-Reaktionsansatz ... 32
  - 2.6.12 Northern-Blot ... 32
    - 2.6.12.1 RNA-Elektrophorese ... 32
    - 2.6.12.2 Kapillar-Blotting ... 33
    - 2.6.12.3 Hybridisierung ... 34
    - 2.6.12.4 Detektion ... 34

2.7 *in situ*-Hybridisierung 35
2.7.1 Fixierung von Pflanzenmaterial für die mikroskopischen Untersuchungen 35
2.7.1.1 FAA-Fixierung 35
2.7.1.2 HOPE-Fixierung 36
2.7.2 Einbettung des fixierten Materials 36
2.7.2.1 Einbettung in Paraplast™ X-tra 36
2.7.2.2 Einbettung in Technovit® 8100 38
2.7.3 Erstellung und Quantifizierung der Sonden für die *in situ*-Hybridisierung 38
2.7.3.1 Klonierung der DNA-Matrices zur Herstellung von RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung 38
2.7.3.2 *in vitro*-Transkription der RNA-Sonden 38
2.7.3.3 Dot-Blot für die Quantifizierung der RNA-Sonden 39
2.7.4 Durchführung einer *in situ*-Hybridisierung 40
2.7.4.1 Vorbehandlung der Schnitte 40
2.7.4.2 Hybridisierung der Schnitte 42
2.7.4.3 Nachbehandlung der Schnitte 43
2.7.4.4 Detektion der hybridisierten Transkripte 43
2.8 Proteinchemische Methoden 44
2.8.1 Aufschluss der Bakterienkulturen 44
2.8.2 Reinigung der rekombinaten Proteine über Nickel-Affinitäts-Chromatographie 45
2.8.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 45
2.8.4 Proteinfärbung 46
2.9 Klonierung der RNAi- und Überexpressions-Konstrukte mit dem Gateway®-System 47
2.9.1 Einführung der Rekombinationsstellen durch PCR 48
2.9.2 BP-Rekombination 48
2.9.3 Transformation des BP-Rekombinationsansatzes 48
2.9.4 LR-Rekombination 49
2.9.5 Transformation der LR-Rekombination 49
2.10 Transformation von Pflanzen 50
2.10.1 Transformation der RNAi-Konstrukte in *Agrobacterium rhizogenes* 50
2.10.2 Kontrolle des Transformationserfolges 50
2.10.3 Infektion der Pflanzen 50
2.10.3.1 Pflanzen aus dem Gewächshaus 51
2.10.3.2 Pflanzen aus der Sterilkultur 51
2.10.4 Pflege der infizierten Pflanzen 52
2.11 Analyse der transformierten *Hairy Root*-Klone 52
2.11.1 PCR auf *rol*B, *attB* und *virD1* 52
2.11.2 GUS-Test 55
2.11.3 Isolierung der Pyrrolizidin-Alkaloide aus den transgenen *Senecio vernalis*-HR-Klonen 55
2.11.3.1 Vorbereitung der transgenen *Hairy Root*-Klone für die Pyrrolizidin-Alkaloid-Extraktion 55
2.11.3.2 Isolierung der Pyrrolizidin-Alkaloide 55
2.11.4 Untersuchung der Alkaloid-Spektren mittels Gaschromatographie (GC) 56
2.11.5 Isolierung und Analyse der transgenen Tabak-HR-Klone 57
2.12 Sequenz-Analyse mit Hilfe von Computerprogrammen und Datenbanken 57
2.12.1 GCG 57
2.12.2 Chromas 57
2.12.3 GeneDoc 57
2.12.4 BLAST 57
2.12.5 Tair Restriction Analysis 58

3 Ergebnisse 59
3.1 Heterologe Expression von SVAO3 59
3.1.1 SVAO3-Expression in pET28a 59
3.1.2 SVAO3-Coexpression mit Chaperonen 60
3.2 Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 mittels RT-PCR 62
3.3 Lokalisierung von *svao1*-, *svao2*- und *svao3*-Transkripten durch gewebespezifische Northern-Blots 65
3.4 *In situ*-Hybridsierungen zur Lokalisation der HSS in *Jacobaea vulgaris* und der drei möglichen Diaminoxidasen in *Senecio vernalis* auf Transkript-Ebene 67
3.4.1 Transkriptnachweis der HSS aus *Jacobaea vulgaris* durch *in situ*-Hybridisierung 67
3.4.1.1 Klonierung und Synthese der Sonden 67
3.4.1.2 I*n situ*-Hybridisierungen 70
3.4.2 Transkriptionsnachweis von drei DAOs in *Senecio vernalis* durch *in situ*-Hybridisierung 72
3.4.2.1 Klonierung und Synthese der Sonden 72
3.4.2.2 *In situ*-Hybridisierungen 75
3.5 Suche nach diaminoxidaseartigen Sequenzen in *Jacobaea vulgaris* 77
3.6 Untersuchungen zum Einfluss von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 auf die PA-Biosynthese mittels transgenen *Hairy Root*-Klonen 78
3.6.1 Klonierung der RNAi- und Überexpressions-Konstrukte 81
3.6.1.1 Erzeugung der RNAi-Konstrukte 81
3.6.1.2 Erzeugung der Überexpressions-Konstrukte 84
3.6.2 Etablierung der Transformations-Methode 87
3.6.2.1 Etablierung der Transformationsmethode mittels GUS-Tests 91
3.6.3 Allgemeine Analysen der transgenen *Hairy Root*-Klone 93
3.6.3.1 Selektion auf Antibiotika-Empfindlichkeit 93
3.6.3.2 Untersuchungen der genomischen DNA 97
3.6.4 Analyse der transgenen *Hairy Root*-Klone auf veränderten Alkaloid-Gehalt 101
3.6.4.1 Analyse der Pyrrolizidin-Alkaloide mittels Gaschromatographie 101
3.6.4.2 Analyse der Diaminoxidase-Transkriptmengen in den *Senecio*-HR-Klonen mittels RT-PCR 113
3.6.4.3 Analyse der *egfp*-Transkription mittels PCR 125
3.6.5 Analyse der transgenen *Nicotiana tabacum*-HR-Klone 127
3.6.5.1 Analyse der Diaminoxidase-Transkripte in einigen Tabak-HR-Klonen 127
3.6.5.2 Analyse der Alkaloide mittels ^{1}H-NMR 129

4 Diskussion 132
4.1 Die SVAO3-Familie und deren heterologe Expression 132
4.2 Alternative Strategien zur Untersuchung der SVAO-Funktionen 134
4.2.1 Lokalisierung der HSS in *Jacobaea vulgaris* zur Etablierung der *in situ*-Hybridisierung 134
4.2.2 Lokalisierung der drei Diaminoxidasen in *Senecio vernalis* 138
4.2.3 Einfluss der Agrobakterien-vermittelten Transformation der Versuchs-pflanzen in Bezug auf die Pyrrolizidin-Alkaloide 141
4.3 Ausblick 151

5 Zusammenfassung 153
5.1 Deutsche Zusammenfassung 153
5.2 Abstract 155

6 Literaturverzeichnis ... 157

7 Anhang ... 168
7.1 Vektorkarten ... 168
7.2 Konstrukte ... 170
7.3 Ergebnisse der allgemeinen Analysen der transgenen *Hairy Root*-Klone ... 171
7.3.1 *Senecio*-Kontroll-HR-Klone ... 171
7.3.2 *Senecio*-SVAO1-RNAi-Klone ... 172
7.3.3 *Senecio*-SVAO2-RNAi-Klone ... 173
7.3.4 *Senecio*-SVAO3-RNAi-Klone ... 174
7.3.5 *Senecio*-SVAO1-Überexpressions-Klone ... 175
7.3.6 *Senecio*-SVAO3-Überexpressions-Klone ... 176
7.3.7 *Senecio*-GUS-Überexpressions-Klone ... 177
7.3.8 Tabak-Kontroll-HR-Klone ... 178
7.3.9 Tabak-SVAO1-Überexpressions-Klone ... 179
7.3.10 Tabak-SVAO3-Überexpressions-Klone ... 181
7.3.11 Tabak-GUS-Überexpressions-Klone ... 182
7.4 Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der transgenen *Senecio-Hairy Root*-Klone ... 183
7.4.1 Kontroll-HR-Klone ... 183
7.4.2 SVAO1-RNAi-Klone ... 184
7.4.3 SVAO2-RNAi-Klone ... 185
7.4.4 SVAO3-RNAi-Klone ... 186
7.4.5 SVAO1-Überexpressions-Klone ... 187
7.4.6 SVAO3-Überexpressions-Klone ... 188

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
A. rhizogenes	*Agrobacterium rhizogenes*
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CDP	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro(1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor) Tricyclo[3.3.1.1.3,7] Decan)-4-yl)-1-Phenyl-phosphat, Dinatriumsalz
DAO	Diaminoxidase
DHS	Desoxyhypusin-Synthase
DIG	Digoxigenin
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOC-PCR	PCR mit degenerierten Primern
DTT	1,4-Dithiothreithol
E. cannabinum	*Eupatorium cannabinum*
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	*Enhanced green fluorescent protein*
EGFPER	*Enhanced green fluorescent protein endoplasmatic reticulum-targeting*
eIF5A	eukaryontischer Initiationsfaktor 5A
EN	Endodermis
EX	Exodermis
FAA	Formaldehyd-Essigsäure
FID	Flammenionisationsdetektor
FTD	Flammenthermoionischer Detektor
GamborgB5mod	modifiziertes GamborgB5-Medium
GC	Gaschromatographie
GFP	*green fluorescent protein*
GUS	β-Glucuronidase
HEH	β-Hydroxyethylhydrazin
His	Histidin
HR	*Hairy Root*
HSS	Homospermidin-Synthase
IB	*Inclusion Bodies*
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
J. vulgaris	*Jacobaea vulgaris*
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
lacZ-Gen	β-Galactosidase-kodierendes Gen
LB	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
MCS	*Multi-Cloning-Site*
MOPS	3-Morpholino-O-propansulfonsäure
mRNA	*messenger*-Ribonukleinsäure
MS	Murashige und Skoog-Medium
MSOH	Murashige und Skoog-Medium ohne Hormone

% (m/v)	Prozent Masse pro Volumen
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
MS	Massenspektroskopie
N. tabacum	*Nicotiana tabacum*
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure
OD	Optische Dichte
PA	Pyrrolizidin-Alkaloid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAO	Polyaminoxidase
PBS	*Phosphate-buffered-saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
PH	Phloem
PMT	Putrescin-*N*-Methyltransferase
PZ	Perizykel
R_i	*root inducing*
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA*interference*
RNase	Ribonuklease
RP	Rindenparenchym
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	*small interfering* Ribonukleinsäure
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
SVAO	Aminoxidase von *Senecio vernalis*
S. vernalis	*Senecio vernalis*
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	*Tris-buffered-saline*
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N;N,N';N' –Tetramethylethylendiamin
T_i	*tumor inducing*
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	*Unit* (Einheit)
VT	Volumenteile
% (v/v)	Volumenprozent (v/v)
WOK	Wurzelorgankultur
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
X-Gluc	Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure
XY	Xylem

1 Einleitung

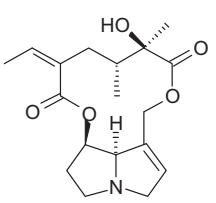
Auf Anregung von A. Kössel aus dem Jahre 1891 unterscheidet man zwischen dem Primär- und dem Sekundärstoffwechsel (Kössel, 1891). Im Gegensatz zu dem für Wachstum und Entwicklung aller Organismen essentiellen Primärstoffwechsel ist der Sekundärstoffwechsel in dieser Hinsicht entbehrlich. Seine Funktion ist vielmehr für alle Wechselwirkungen des Individuums mit seiner Umwelt notwendig, zum Beispiel bei der Abwehr potenzieller Feinde oder unerwünschter Konkurrenten, aber auch zur Anlockung von Bestäubern. Aus dieser Situation heraus entwickelte sich im Laufe der Evolution eine Vielzahl an Sekundärstoffwechselprodukten. Bis heute sind über 200.000 dieser Sekundärstoffe bekannt (Hartmann, 1985; Hartmann, 1996). Während man bis in die 70er Jahre des 20. Jahrhunderts der Meinung war, Sekundärstoffe wären eine Art Abfall- oder Nebenprodukt des Primärstoffwechsels (Mothes, 1955; Luckner, 1990), ist man heute davon überzeugt, dass der Sekundärstoffwechsel unter dem permanenten Selektionsdruck einer feindlichen Umwelt durch ständige Optimierung und Weiterentwicklung von nützlichen Sekundärstoffen hervorgegangen ist. Der Sekundärstoffwechsel ist somit im Gegensatz zum Primärstoffwechsel für Wachstum und Entwicklung eines Organismus zwar entbehrlich, jedoch ist er für das Überleben einer Pflanze in ihrer Umwelt absolut notwendig (Swain, 1977; Hartmann, 1985; Hartmann 1996).

Viele dieser Sekundärstoffe werden schon seit langem pharmazeutisch genutzt. So wussten schon Ärzte der Antike, wie z. B. Hippokrates von Kos (460 – 377 v. Chr.), um die schmerzlindernde Wirkung des Safts aus Weidenrinde. Was sie nicht wussten ist, dass die schmerzlindernde Wirkung auf dem Inhaltsstoff Salicin beruht – dem Vorläufer der heute als Aspirin® bekannten Acetylsalicylsäure. Auch viele andere moderne Arzneimittel basieren auf Wirkstoffen, die dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel entstammen. Die heutzutage stärksten Analgetika leiten sich vom Morphin ab, einem Alkaloid des Schlafmohns. Eine weitere große und durch ihre Vielfalt interessante Gruppe der Alkaloide stellen die in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) dar. Pyrrolizidin-Alkaloide eignen sich hervorragend als Modellsubstanzen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, da sie eindrucksvoll belegen, dass der Sekundärstoffwechsel kein Produkt von Zufällen ist, sondern vielmehr die Grundlage für die Entwicklung eines streng selektierten Spektrums an biologisch wirksamen Substanzen darstellt (Hartmann, 1987).

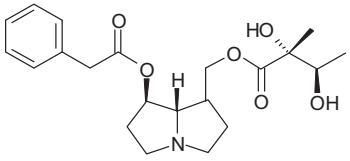
1.1 Vorkommen und Wirkung der Pyrrolizidin-Alkaloide

PAs wurden in mehr als 6.000 Spezies des Pflanzenreichs gefunden (Chou und Fu, 2006), die nicht sehr eng miteinander verwandt sind. Zu über 95 % kommen sie jedoch in den Familien der Asteraceae, der Boraginaceae, der Orchidaceae und der Fabaceae vor. Einzelne Vorkommen liegen in den Familien der Ranunculaceae, der Convolvulaceae, der Celastraceae und der Santalaceae (Hartmann und Witte, 1995).

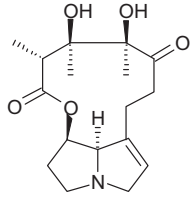
Bis heute sind mehr als 400 unterschiedliche PAs bekannt, die sich nach Hartmann und Witte in sechs Strukturtypen zusammenfassen lassen (Hartmann und Witte, 1995).



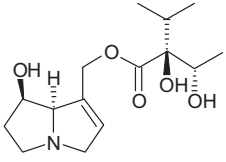
Senecionin-Typ
Asteraceae
(Senecioneae)



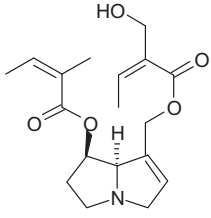
Ipangulin-Typ
Convolvulaceae



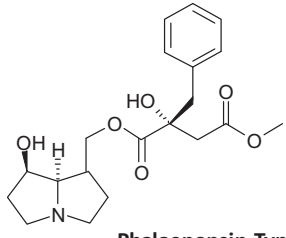
Monocrotalin-Typ
Fabaceae



Lycopsamin-Typ
Boraginaceae und
Asteraceae (Eupatorieae)



Triangularin-Typ
Asteraceae
(Senecioneae)



Phalaenopsin-Typ
Orchidaceae

Abbildung 1: Die sechs Strukturtypen der PAs mit ihrem Vorkommen nach Hartmann und Witte (1995)

Während die PAs innerhalb der Asteraceae, der Boraginaceae und der Fabaceae überwiegend in Form ihrer *N*-Oxide vorkommen, sind die PAs in *Phalaenopsis* spec. (Orchidaceae) nur teilweise *N*-oxidiert. In den Convolvulaceae (Gattung *Ipomoea*) liegen die PAs sogar überwiegend in ihrer tertiären Form vor (Hartmann und Witte, 1995; Jenett-Siems et al., 1998; Frölich et al., 2006). Eine Ausnahme zum Vorkommen der PAs als *N*-Oxide stellen

die PAs in den Samen von *Crotalaria scassellatii* (Fabaceaea) dar, die die PAs im lipophilen Milieu als tertiäre Amine gespeichert haben (Toppel et al., 1988; Chang und Hartmann, 1998).

Gut untersuchte Beispiele sind die PA-haltigen Pflanzen der *Senecio*-Arten, in denen die Wurzel als Ort der PA-Biosynthese in den Wurzeln identifiziert wurde. Senecionin-*N*-Oxid, als die erste PA-Grundstruktur dieser Synthese (Hartmann und Toppel, 1987; Hartmann et al., 1988), wird durch das Phloem zum Spross transportiert, wo die chemische Modifikation der Grundstruktur in das artspezifische Alkaloidprofil stattfindet (Hartmann und Toppel, 1987; Hartmann und Dierich, 1998). Die Akkumulation der PAs erfolgt in den Vakuolen der Zellen, wobei ein spezifischer Carrier für die Aufnahme der PAs in die Vakuole verantwortlich ist (Ehmke et al., 1988). Hauptsächlich werden die PAs in den für die Reproduktion wichtigen Organen, sowie jungen Pflanzenteilen gespeichert. So wurde in den Blütenköpfchen von *Senecio vulgaris* über 80 % der Gesamt-PA-Menge gefunden, womit die PA-Konzentration im Gegensatz zu den vegetativen Organen um den Faktor 30 größer war (Hartmann und Zimmer, 1986). Auch in anderen PA-haltigen Pflanzen zeigten sich die Blüten als Hauptspeicherort der PAs, wobei die Konzentration der PAs in den übrigen Organen innerhalb verschiedener Familien zu variieren scheint (Vandam et al., 1995).

Das vermehrte Auftreten von Vergiftungen des Weideviehs nach Aufnahme von PA-haltigen Pflanzen (White et al., 1973; Cheeke, 1994; Fletcher et al., 2009) trägt zum immer größer werdenden Bekanntheitsgrad der PAs bei und beweist die hervorragende Wirkung von PAs als Fraßschutz. Für die toxischen Eigenschaften der PAs auf Wirbeltiere wird die Doppelbindung in der 1,2-Position, eine veresterte allylische Hydroxylgruppe an Position 9 und eine freie oder ebenfalls veresterte Hydroxylgruppe an Position 9 verantwortlich gemacht (s. Abbildung 2). Die in den meisten Pflanzen primär vorkommenden, ungiftigen PA-*N*-Oxide sind auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften nicht membrangängig. Gelangen sie jedoch durch orale Aufnahme in den Verdauungstrakt, werden sie im dortigen alkalischen Milieu durch unspezifische Reduktion in ihre tertiäre, hydrophobe und damit membrangängige Form überführt. Anschließend werden sie im Darm passiv resorbiert und in der Lunge und Leber durch mikrosomale Cytochrom P-450-Monooxygenasen in reaktive, alkylierende Pyrrolderivate umgesetzt. Die Produkte dieser vom Organismus eigentlich als Entgiftung genutzten Reaktion alkylieren Proteine und

Nukleinsäuren, was zu zytotoxischen und genotoxischen Effekten führt (Mattocks, 1970; Mattocks und Legg, 1980; Mattocks et al., 1986; Fu et al., 2004).

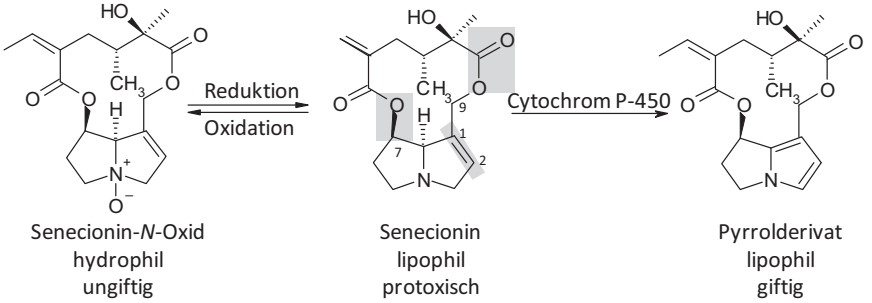


Abbildung 2: Unterschiedliche Formen der PAs bei der Giftungsreaktion im Körper. PAs liegen in den Pflanzen überwiegend als ungiftige *N*-Oxide vor, wie zum Beispiel Senecionin-*N*-Oxid. Bei Aufnahme werden sie im Darm zur tertiären, lipophilen Form reduziert und so passiv resorbiert. In der Leber oder Lunge findet die eigentliche Giftungsreaktion durch Cytochrom P-450-Monooxygenasen zum giftigen Pyrrolderivat statt. Für die giftigen Eigenschaften werden die grau unterlegten Molekülbereiche verantwortlich gemacht.

Verschiedene Tiere zeigen jedoch eine erhöhte Toleranz gegenüber der Toxizität der PAs. So wurde gezeigt, dass zum Beispiel Meerschweinchen und Hamster in der Leber eine mikrosomale flavinabhängige Multisubstrat-Monooxygenase besitzen, die tertiäre PAs effektiv in ihre polare, ungiftige *N*-Oxid-Form überführt (Miranda et al., 1991).

Ebenso wie auf Vertebraten wirken PAs auch auf Insekten giftig, da bei ihnen eine ähnliche Giftungsreaktion wie bei den Säugetieren abläuft. Auf ausgewachsene Tiere wirken PAs zytotoxisch, während sie auf Larven und Puppen mutagen wirken (Frei et al., 1992). Im Laufe der Evolution ist es jedoch einigen Insekten gelungen, sich an PAs in der Nahrung zu adaptieren und damit PA-haltige Pflanzen als eine exklusive Nahrungsquelle für sich zu erschließen. In unserer Arbeitsgruppe wird beispielsweise an dem Arctiid *Tyria jacobaeae* geforscht. Die Larven von *Tyria jacobaeae* besitzen in der Hämolymphe eine spezifische NADPH-abhängige flavinabhängige Monooxygenase, die Senecionin-*N*-Oxygenase. Die passiv in die Hämolymphe resorbierten tertiären PAs werden dort von dieser Monooxygenase vollständig in ungiftige *N*-Oxide überführt und können so in der Hämolymphe als wirksame Abwehrstoffe gegen potentielle Angreifer gespeichert werden (Lindigkeit et al., 1997). Die Larve signalisiert ihre Gefährlichkeit durch eine schwarz-gelbe Warnfärbung. Ein weiteres Beispiel der an PAs angepassten Insekten stellt der Bärenspinner (*Utetheisa ornatrix*) dar. Dieser nimmt als Larve die PAs seiner Hauptfutterpflanze,

Crotalaria spectabilis (Fabaceae), auf und transferiert sie während der Metamorphose über das Puppenstadium zum Schmetterling. Bei Nachwuchs werden die Eier mit den Alkaloiden vom Männchen und Weibchen vor Fraßfeinden geschützt (Dussourd et al., 1988). Desweiteren nutzt das Männchen die PAs zur Synthese von Pheromonen, mit denen es effektiv Weibchen anlockt (Dussourd et al., 1991).

1.2 Evolution der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese

Durch eine Kombination von physiologischen *in vivo*-Hemmexperimenten und enzymatischen Studien wurde die Homospermidin-Synthase (HSS) als erstes spezifisches Enzym der PA-Biosynthese identifiziert (Böttcher, 1993). Neben den Vorkommen der HSS in Pflanzen konnte das Enzym auch in bestimmten Bakterienarten nachgewiesen werden, die zu den α-Proteobakterien gehören. Vergleiche der kinetischen und physikalischen Eigenschaften der gereinigten nativen HSS aus *S. vernalis* und dem Bakterium *Blastochloris viridis* deuteten zwar zunächst auf eine enge phylogenetische Verwandtschaft der beiden Enzyme hin (Böttcher et al., 1994; Ober et al., 1996; Ober, 1997), nach erfolgreicher Klonierung und Überexpression der HSS aus *S. vernalis* und *Blastochloris viridis* zeigten die anschließenden vergleichenden Sequenzanalysen jedoch keinerlei Homologie auf Nukleinsäureebene (Tholl et al., 1996; Ober und Hartmann, 1999a). Stattdessen wies die pflanzliche HSS eine hohe Sequenzidentität zur Desoxyhypusin-Synthase (DHS) auf, einem ubiquitär in Eukaryonten und Archaebakterien vorkommenden Enzym des Primärstoffwechsels ohne funktionellen Bezug zur PA-Biosynthese. Die DHS katalysiert den ersten von zwei Schritten in der posttranslationalen Aktivierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A). In einer NAD^+-abhängigen Reaktion wird dabei eine Aminobutyl-Einheit des Spermidins auf einen spezifischen Lysin-Rest des eIF5A-Vorläuferproteins übertragen. Die biologische Funktion des aktivierten eIF5As ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es wurde jedoch an *Saccharomyces*-Zellen gezeigt, dass das aktivierte eIF5A für die Zellproliferation notwendig ist (Park et al., 1997). In Pflanzen wurde eine Beteiligung des aktivierten eIF5A bei der Samenkeimung (Moll et al., 2002; Wang et al., 2005b), Seneszenz und Apoptosis nachgewiesen (Wang et al., 2001).

Vergleichende enzymatische Charakterisierungen der rekombinanten DHS aus *Nicotiana tabacum* und *S. vernalis* mit der HSS aus *S. vernalis* und *S. vulgaris* zeigten, dass die DHS

mit annähernd der gleichen spezifischen Aktivität wie die HSS Spermidin und Putrescin zu Homospermidin umsetzen kann (Ober und Hartmann, 1999a, b; Ober et al., 2000; Ober et al., 2003b). Desweiteren wurde mit diesen Studien widerlegt, dass die pflanzliche HSS Putrescin sowohl als Aminobuty-Donor, als auch als Akzeptor zur Homospermidin-Synthese nutzen kann (Böttcher et al., 1994). Im Gegensatz zur bakteriellen HSS, die entweder Spermidin oder Putrescin als Aminobutyl-Donor verwenden kann (Ober et al., 1996), benötigt die pflanzliche HSS Spermidin als Aminobutyl-Donor für die Homospermidin-Synthese (Ober et al., 2000). Die hohe Identität auf Sequenzebene der cDNAs und der genomischen Strukturen, die Übereinstimmung wichtiger kinetischer Parameter und der gleiche Reaktionsmechanismus von HSS und DHS legen den Schluss nahe, dass die HSS und die DHS aus einem gemeinsamen proteinkodierenden Gen durch Duplikation hervorgegangen sind. Als Folge von Mutationen hat die neu entstandene Genkopie vermutlich die DHS-Aktivität verloren (s. Abbildung 3), wodurch sie dem enormen Selektionsdruck des hoch konservierten Primärstoffwechsels entzogen wurde. Die vorherige Nebenreaktion, die Aminobutylierung von Putrescin, wurde zur Hauptreaktion und das neu entstandene Enzym unterlag vermutlich seitdem als Teil der Biosynthese von effektiven Fraßschutz-Verbindungen dem Selektionsdruck der Herbivoren (Ober und Hartmann, 1999a; Ober und Hartmann, 2000).

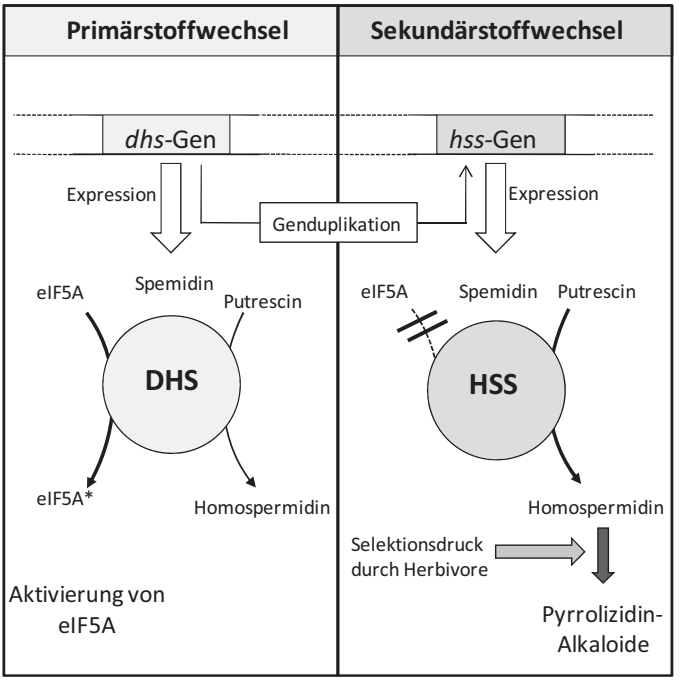


Abbildung 3: Evolutiver Ursprung der Homospermidin-Synthase (HSS) durch Genduplikation und Verlust der Desoxyhypusin-Synthase (DHS) -Aktivität nach Ober und Hartmann (2000). Während die DHS sowohl die Aktivierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A), als auch die Umsetzung von Putrescin zu Homospermidin katalysiert, hat die HSS die Fähigkeit zur Aktivierung des eIF5A verloren und katalysiert nur noch die Synthese von Homospermidin, das in die Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese eingeht.

Vor dem Hintergrund des eingangs erwähnten sporadischen Auftretens der PAs innerhalb der Angiospermen stellte sich die Frage, ob die Rekrutierung der HSS aus der ubiquitären DHS nur einmal oder mehrmals im Laufe der Angiospermen-Evolution in den verschiedenen PA-produzierenden Pflanzenfamilien aufgetreten ist, d.h. ob es sich um einen monophyletischen oder polyphyletischen Ursprung handelt. Im Falle eines monophyletischen Ursprungs der HSS hätten die heute PA-freien Pflanzen im Laufe der Evolution die Fähigkeit zur Synthese der PAs wieder verlieren müssen, zum Beispiel als Anpassung an einen Standort ohne Herbivoren oder an eine alternative, bessere Verteidigung. Im Falle eines polyphyletischen Ursprungs hätten sich parallele Biosynthesewege mit zum Teil identischen, hochkomplexen Strukturen entwickeln müssen. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden 23 DHS- und HSS-cDNA-Sequenzen unterschiedlicher Vertreter der Angiospermen phylogenetisch untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die HSS mindestens

viermal im Laufe der Evolution unabhängig aus der DHS hervorgegangen ist. Innerhalb der Familie der Asteraceae wird im Tribus Eupatorieae und im Tribus Senecioneae jeweils ein weiterer Ursprung vermutet. In den monokotylen Orchidaceae wird ein Ursprung vermutet, ein weiterer in den Boraginaceae (Reimann et al., 2004). Neuste phylogenetische Untersuchungen an *Phalaenopsis* spec. geben Grund zur Vermutung, dass die HSS und damit die Fähigkeit zur PA-Biosynthese in den Monokotylen schon sehr alt ist, da sich nicht nur die DHS- und HSS-Sequenzen recht stark unterscheiden (Nurhayati et al., 2009), sondern in zwei Vertretern der Poaceae auch PAs gefunden wurden, die jedoch auf Grund der fehlenden Doppelbindung zwischen C-1 und C-2 im Necinbasen-Grundkörper ungiftig sind (Koulman et al., 2008).

1.3 Die Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese und deren Enzyme

Grundsätzlich sind PAs Esteralkaloide, die aus einer Necinbase und einer oder mehreren Necinsäuren zusammengesetzt sind. Die unterschiedlichen Necinsäuren, mit denen die Necinbase verestert wird, sind nach Tracerexperimenten auf die verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin oder Isoleucin zurück zu führen (Crout et al., 1966; Crout et al., 1970; Crout et al., 1972; Cahill et al., 1980). Die Grundstruktur der Necinbase leitet sich von Ornithin oder Arginin ab, wobei Ornithin ausschließlich über Arginin in die PA-Biosynthese einfließt (Robins und Sweeney, 1979; Hartmann et al., 1988). Der Syntheseweg geht weiter über Agmatin, *N*-Carbamoylputrescin und Putrescin und Spermidin zum selten vorkommenden symmetrischen Polyamin Homospermidin, dem ersten spezifischen Zwischenprodukt der PA-Biosynthese (Spenser, 1985; Hartmann et al., 1988; Robins, 1989). Die Synthese des Homospermidins wird durch die Homospermidin-Synthase katalysiert, dem ersten für die PA-Biosynthese spezifischen Enzym (Böttcher, 1993; Ober et al., 2000). Homospermidin fließt ausschließlich in die PA-Biosynthese ein (Khan und Robins, 1985). Die nachfolgenden Reaktionen, die zur Bildung der Necinbase führen, sind bisher noch nicht charakterisiert. Unterschiedliche Gründe legen die Vermutung nah, dass die nachfolgenden Reaktionen unter anderem durch eine Diaminoxidase (DAO) katalysiert werden. Diese Gründe sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Basis dieser Überlegungen sind die chemischen Strukturen der einzelnen Zwischenprodukte, die im Rahmen des Primärstoffwechsels und der PA-Biosynthese isoliert wurden

(s. Abbildung 4). Ausgehend vom Polyamin Putrescin wird vermutlich das dem Primärstoffwechsel zugeordnete Δ_1-Pyrrolin hergestellt. Naheliegend ist eine desaminierende Oxidation des Putrescins durch eine Diaminoxidase zum 4-Aminobutanal, das anschließend zum ringförmigen Δ_1-Pyrrolin kondensiert. Unterstützt wird diese Vermutung durch Tracerversuche, bei denen Wurzeln von *Senecio*- und *Eupatorium*-Spezies mit [^{14}C]-Putrescin gefüttert wurden (Böttcher, 1993). Nach Zugabe des Polyaminoxidase- und kupferhaltigen Aminoxidase-Hemmstoffes β-Hydroxyethylhydrazin (HEH) wurde kein Δ_1-Pyrrolin mehr in den Wurzeln nachgewiesen. Desweiteren wurde auch gezeigt, dass sich Homospermidin in den Wurzeln anreicherte. Dies ist ein Hinweis, dass Homospermidin ebenfalls das Substrat einer Polyaminoxidase oder Diaminoxidase sein könnte. Während Polyaminoxidasen (PAOs) die desaminierende Oxidation eines sekundären Amins katalysieren (Tiburcio et al., 1997), greifen Diaminoxidasen in dieselbe Reaktion bei primären Aminen ein (Houen et al., 2005). Da beim Homospermidin die endständigen, also primären Aminogruppen desaminiert werden, spricht alles für eine Beteiligung einer Diaminoxidase.

Nach Aufhebung der HEH-Hemmung der oben erwähnten Tracerversuche durch Umsetzen der Wurzeln in HEH-freies Medium ging das markierte Homospermidin hoch kanalisiert in die PA-Biosynthese ein. Die Reaktionsabläufe bis zur Necinbase sind bisher weitgehend ungeklärt. Möglich ist, dass Homospermidin durch die bereits erwähnte putative Diaminoxidase zuerst zu 4-(4-Aminobutylamino)butanal und dann zu 4,4‘-Iminodibutanal desaminiert wird. Naheliegend wäre eine Zyklisierung dieser beiden Zwischenprodukte zum Iminium-Ion. Bei Tracerversuchen in den Blättern von *Heliotropium indicum* wurde ein ionisches Zwischenprodukt isoliert, dessen Struktur noch nicht aufgeklärt werden konnte (Frölich et al., 2007). Möglicherweise stellt dieses als „Metabolit x“ beschriebene Zwischenprodukt solch ein Iminium-Ion dar. Diese Vermutung konnte jedoch noch nicht bestätigt werden. Die maximale Konzentration von „Metabolit x“ wurde 6 h nach Zusatz des Tracers festgestellt. Danach wurde der Marker fast ausschließlich in den synthetisierten PAs nachgewiesen. In *Senecio*-Spezies konnte dieses Zwischenprodukt noch nicht isoliert werden (Toppel et al., 1987; Hartmann et al., 1989).

Desweiteren wurde gezeigt, dass Homospermidin in einer sogenannten Eintopfreaktion durch eine enzymatische Oxidation einer Erbsen-Diaminoxidase, die nicht-enzymatische

Zyklisierung unter physiologischen Bedingungen und eine Reduktion durch eine angekoppelte Dehydrogenase zu Tranchelanthamidin umgewandelt werden kann (Robins, 1982).

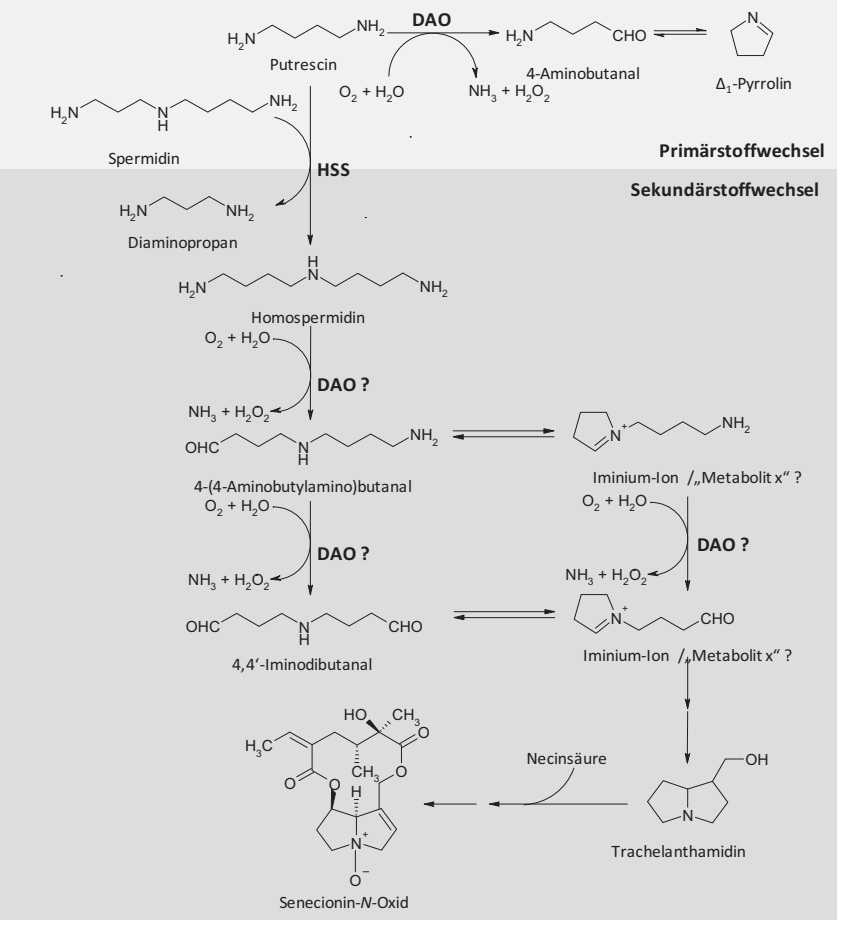


Abbildung 4: Ausschnitt aus dem postulierten Biosyntheseweg der PAs nach Adolph (1991), Böttcher (1993) und Graser und Hartmann (1997).

Ein Blick in die Biosynthese anderer Alkaloide zeigt, dass bereits zwei Diaminoxidasen identifiziert wurden, die desaminierende Zyklisierungen eines Diamins katalysieren. So wurde in *Hyoscyamus niger* eine DAO identifiziert, die *N*-Methylputrescin zu *N*-Methylaminobutanal desaminiert, das dann spontan zum *N*-Methylpyrrolinium zyklisiert (Hashimoto et al., 1990). Ebenso wurde in Wurzeln von *N. tabacum* eine Diaminoxidase gefunden, die auf Grund ihrer Eigenschaft *N*-Methylputrescin zu *N*-Methylaminobutanal

zu desaminieren, das dann nach Ringschluss in den Nicotingrundkörper eingeht, *N*-Methylputrescinoxidase genannt wird (Mizusaki et al., 1972; Walton und McLauchlan, 1990; McLauchlan et al., 1993; Heim und Jelesko, 2004; Katoh et al., 2007).

Diese Überlegungen führten in unserer Arbeitsgruppe zu der Hypothese, dass an der PA-Biosynthese mindestens eine DAO beteiligt ist, die Homospermidin als Substrat umsetzt. Um diese Diaminoxidase zu finden, wurden PCRs mit degenerierten Primern mit der cDNA von *Eupatorium cannabinum* und *S. vernalis* durchgeführt (Denker, 2008). Dabei wurden in *E. cannabinum* eine und in *S. vernalis* drei diaminoxidaseähnliche Sequenzen gefunden. Diese *Senecio*-DAOs wurden SVAO1, SVAO2 und SVAO3 genannt.

1.4 Ziel der Arbeit

Mehrere Indizien, die in Kapitel 1.3 vorgestellt wurden, sprechen dafür, dass an der Umsetzung von Homospermidin zum Necinbasengrundkörper der PAs eine Diaminoxidase beteiligt ist. In der PA-führenden Pflanze *S. vernalis* wurden drei diaminoxidaseähnliche cDNA-Sequenzen identifiziert, deren Proteine SVAO1, SVAO2 und SVAO3 genannt wurden. Die Funktion dieser drei Enzyme konnte trotz intensiver molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungen nicht geklärt werden (Denker, 2008). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die mögliche Beteiligung einer oder mehrerer SVAOs an der PA-Biosynthese mit neuen, innovativen Methoden untersucht werden. Dazu sollten zunächst die drei Sequenzen auf mRNA-Ebene mittels gewebespezifischen RT-PCRs, Nothern-Blots und *in situ*-Hybridisierungen lokalisiert werden. Desweiteren sollten die drei Diaminoxidasen durch RNAi- und Überexpressions-Studien *in planta* untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Kits, Enzyme und spezielle Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma, Fluka, Merck, Biozym, Fisher-Scientific und Aldrich in der Qualität „reinst“ verwendet. Bei Abweichungen wird im Text darauf hingewiesen.

Die Materialien für das molekularbiologische Arbeiten wurden von den Firmen Fermentas, Invitrogen, Sigma, Roche Diagnostics, Novagen oder Promega bezogen.

Auf die Bezugsquellen zusätzlich benötigter spezieller Reagenzien, Enzyme und Kits wird im Text hingewiesen. Die Anwendungen erfolgten, soweit nicht anders beschrieben, nach Herstellerangaben.

Die hergestellten Lösungen wurden mit Reinstwasser (Milli Q System, Millipore oder Arium 611, Sartorius) angesetzt und anschließend autoklaviert. Da die Reinstwasseranlage über einen Sterilfilter verfügt, der das Wasser auch von RNasen befreien soll, wurde das Wasser für Anwendungen mit RNA nicht wie üblich mit Dimethylpyrocarbonat (DMPC) versetzt, sondern nur autoklaviert. Thermolabile Reagenzien wurden durch einen Celluloseacetatfilter (0,22 µm; Roth) sterilfiltriert.

Antibiotika wurden als Stammlösungen (s. Tabelle 1) den Bakterien- und Pflanzenmedien nach dem Autoklavieren zugesetzt. Die eingesetzte Konzentration hing von der Anwendung ab und wurde im jeweiligen Kapitel beschrieben. Gelagert wurden alle Stammlösungen bei -20°C.

Tabelle 1: Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin	50 oder 100 µg/µl in Wasser
Kanamycin	50 oder 100 µg/µl in Wasser
Streptomycin	50 µg/µl in Wasser
Spectinomycin	50 µg/µl in Wasser
Hygromycin B	12,5 µg/µl in Wasser
Rifampicin	25 µg/µl in Wasser
Cefotaxim	100 µg/µl in Wasser
Meropenem	50 µg/µl in Wasser

2.2 Pflanzenkulturen

2.2.1 Versuchspflanzen

Senecio vernalis

S. vernalis wurde sowohl als komplette Sterilpflanze (für *in situ*-Hybridisierung, RT-PCRs, RNAi- und Überexpressions-Versuche), als auch als Wurzelorgankultur (WOK, für Gesamt-RNA-Gewinnung) verwendet. Sowohl die Sterilpflanze, als auch die WOKs wurden auf MSOH-Medium (s. Tabelle 2) angezogen; die *Hairy Roots* (HRs) ließen sich am erfolgreichsten auf Gamborg B5mod-Medium (s. Tabelle 4) kultivieren.

Jacobaea vulgaris

J. vulgaris wurde als Sterilpflanze (für die *in situ*-Hybridisierung) und als Wurzelorgankultur (für Gesamt-RNA-Gewinnung) verwendet. Beide Kulturen wurden auf MS20-Medium (s. Tabelle 2) kultiviert.

Nicotiana tabacum

N. tabacum der Linie Bx wurde freundlicherweise vom VTT Technical Research Centre Finland, Espoo, als Steril- und Gewächshauspflanze für die Überexpressions-Versuche (s. Kapitel 2.10) zur Verfügung gestellt. Verwendet wurden sowohl abgetrennte Blätter, als auch ganze Pflanzen. Als Sterilpflanze wurde *N. tabacum* auf Gamborg B5mod-Medium (s. Tabelle 4) angezogen.

2.2.2 Medien

Die Pflanzenmedien MSOH und MS20 (Murashige und Skoog, 1962) setzen sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2: Pflanzenmedien I

Bestandteile	**MSOH**	**MS20**
NH_4NO_3	41 mM	4 mM
KNO_3	38 mM	19 mM
$CaCl_2*2H_2O$	6 mM	3 mM
$MgSO_4*7H_2O$	3 mM	3 mM
KH_2PO_4	2 mM	1 mM
Saccharose	6 % (m/v)	3 % (m/v)
NaFeEDTA	0,2 mM	0,01 mM
Inosit	0,02 % (m/v)	0,01 % (m/v)
KJ-Stammlösung	0,2 % (v/v)	0,1 % (v/v)
Spurenelemente-Stammlösung	0,2 % (v/v)	0,1 % (v/v)
Vitamin-Stammlösung	0,2 % (v/v)	0,1 % (v/v)
Wasser		

Der pH-Wert wurde auf pH 5,8 eingestellt (InnoLab 720, WTW). Für festes Medium wurden pro Kolben à 80 ml Medium 720 mg, bzw. 1 g (für Pflanzen, die für *in situ*-Hybridisierung verwendet werden sollten) Agar zugegeben.

Tabelle 3: Stammlösungen für MSOH- und MS20-Medium

Spurenelemente-Stammlösung		**Vitamin-Stammlösung**	
H_3BO_3	10 mM	Nikotinsäure	0,1 % (m/v)
$MnSO_4*H_2O$	6 mM	Thiamin*HCl	1 % (m/v)
$ZnSO_4*7H_2O$	3 mM	Pyridoxin*HCl	0,1 % (m/v)
$NaMoO_4*2H_2O$	0,1 mM	Mesoinositol	10 % (m/v)
$CuSO_4*5H_2O$	10 mM	Wasser	
$CoCl_2*6H_2O$	10 mM	**Kaliumjodid-Stammlösung**	
Wasser		KJ	0,5 M
		Wasser	

Tabelle 4: Pflanzenmedium II - Gamborg B5mod-Medium

MOD1B5a-Makroelemente	100 ml
MOD1B5b-Mikroelemente	1 ml
B5f-Vitamine	10 ml
MOD1B5c	9,2 ml
Saccharose	30 g
Wasser	ad 1000 ml

Beim Gamborg B5mod-Medium (Gamborg et al., 1968) wurde mit 0,1 M KOH ein pH-Wert von 5,7 eingestellt. Für festes Medium wurden 0,3 % (m/v) Gelrite (Roth) zugesetzt.

Tabelle 5: Stammlösungen I für Gamborg B5mod-Medium

MOD1B5a-Makroelemente		**MOD1B5b-Mikroelemente**	
$NaH_2PO_4*H_2O$	12,5 mM	$MnSO_4*H_2O$	60 mM
KNO_3	0,25 M	H_3BO_3	50 mM
$(NH_4)_2SO_4$	10 mM	$ZnSO_4*7H_2O$	10 mM
$MgSO_4*7H_2O$	10 mM	$Na_2MoO_4*2H_2O$	1 mM
$CaCl_2*2H_2O$	10 mM	$CuSO_4*5H_2O$	1 mM
Wasser		$CoCl_2*6H_2O$	1 mM
		KJ	5 mM
		Wasser	

Tabelle 6: Stammlösungen II für Gamborg B5mod-Medium

B5f-Vitamine		**MOD1B5c-Lösung**	
Myo-Inositol	1 % (m/v)	$FeSO_4*7H_2O$	10 mM
Nikotinsäure	0,01 % (m/v)	$Na_2EDTA*2H_2O$	20 mM
Thiamin*HCl	0,1 % (m/v)	Wasser	
Pyridoxin*HCl	0,01 % (m/v)		
Wasser			

2.2.3 Kulturführung

Die Sterilkulturen von *S. vernalis* und *J. vulgaris* waren bereits in der Arbeitsgruppe etabliert. Die Sterilpflanzen wurden ca. alle 4 Wochen unter sterilen Bedingungen auf festes MSOH-Medium, die WOKs alle 2 Wochen in flüssiges MSOH (s. Tabelle 2) umgesetzt. Die HRs wurden alle 2 – 3 Wochen auf frische Platten mit festem Gamborg B5mod-Medium (s. Tabelle 4) umgesetzt. Die Sterilpflanzen wurden im Kulturraum bei 25°C mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit, die WOKs ebenfalls bei 25°C, aber in reiner Dunkelheit, gehalten. Die HRs wurden ebenfalls im Hell-Kulturraum, jedoch unter einem abdunkelnden Tuch, gehalten.

Für die Analyse der Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) und Nikotin-Alkaloide sowie der Expressionsmuster wurden alle zu untersuchenden HRs in flüssiges Gamborg B5mod-Medium (s. Tabelle 4) umgesetzt. Nach 14 Tagen Wachstum bei 25°C, 230 rpm und Dunkelheit wurde jeweils ein kleiner Teil der HRs zum Animpfen einer frischen Flüssigkultur verwendet. Nach nochmals 14 Tage Wachstum wurden die HRs geerntet, ein Teil wurde für die Expressions-Analysen (s. Kapitel 2.6.7.2.3) in flüssigem Stickstoff eingefroren und der Rest wie in Kapitel 2.11.5.1 beschrieben für die Extraktion vorbereitet.

2.3 Bakterienkulturen

2.3.1 Stämme

Zur Plasmidvermehrung (s. Kapitel 2.6.10) wurden die *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme DH5α, TOP10 und One Shot® OmniMax™ 2-T1 verwendet, die alle von Invitrogen bezogen wurden. Desweiteren wurde zur Plasmidvermehrung der *E. coli*-Stamm XL1Blue von Stratagene verwendet.

Zur heterologen Überexpression von Proteinen (s. Kapitel 2.7.4) wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet, der von Stratagene bezogen wurde.

Für die Pflanzentransformationen (s. Kapitel 2.10) wurde *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) des Stamms LBA9402/12 verwendet. Dieser Stamm ist ein rifampicinresistenter Abkömmling des Stammes NCPPB1855 (Pomponi et al., 1983).

2.3.2 Medien

Die verwendeten Bakterienmedien für *E. coli* setzen sich wie folgt zusammen:

Tabelle 7: Medien für die *E. coli*-Kulturführung

Bestandteile	**LB-Medium**	**SOB-Medium**	**SOC-Medium**	
Trypton/Pepton	1 % (m/v)	1 % (m/v)	Glucose (sterilfiltriert)	20 mM
Hefeextrakt	0,5 % (m/v)	0,5 % (m/v)	SOB-Medium (steril)	
NaCl	0,17 M	10 mM		
Wasser				

Beim LB-und SOB-Medium wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Für LB-Platten wurde Agar in einer Endkonzentration von 1,6 % (w/v) zugesetzt. Dem SOB-Medium wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte 1 M $MgCl_2$- und 1 M $MgSO_4$-Lösung in einer Endkonzentration von je 10 mM zugesetzt.

YEB-Medium, das zur Kultivierung von *A. rhizogenes* verwendet wurde, setzt sich folgend zusammen:

Tabelle 8: YEB-Medium für die *A. rhizogenes*-Kulturführung:

K_2HPO_4*$3H_2O$	2,9 mM
$MgSO_4$*$7H_2O$	0,8 mM
NaCl	1,7 mM
D-Manitol	55 mM
Hefeextrakt	0,04 % (m/v)
Wasser	

Der pH-Wert des YEB-Mediums wurde auf pH 7,0 eingestellt. Für YEB-Platten wurde Agar in einer Endkonzentration von 1 % (w/v) zugesetzt. Für den nichttransformierten *A. rhizogenes*-Stamm LB9402/12 wurde Rifampicin (100 mg/l) dem Medium zugesetzt. War dieser Stamm mit den RNAi- oder Überexpressions-Konstrukten (pDE19 – pDE21, pDE22 und pDE24; s. Tabelle 53, Kapitel 7.2) transformiert, wurde dem YEB-Medium Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Tabelle 9: Antibiotika-Konzentrationen im YEB-Medium

Rifampicin	100 mg/l
Streptomycin	20 mg/l
Spectinomycin	100 mg/l

2.3.3 Kulturführung

Als Vorbereitung zur Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen (s. Kapitel 2.6.10) wurden 7 ml LB-Medium (s. Tabelle 7) mit Antibiotikum (s. Tabelle 1; verwendete Endkonzentrationen: Ampicillin: 100 mg/l, Kanamycin: 50 mg/l, Streptomycin: 50 mg/l, Spectinomycin: 500 mg/l) versetzt und mit einer Kolonie des transformierten Klons angeimpft. Anschließend wurde das Medium über Nacht (ca. 15 h) bei 37°C und 250 rpm auf dem Schüttler (Innova 4230, New Brunswick Scientific) inkubiert.

Eine solche Kultur wurde auch mit dem zu untersuchenden Expressionsklon als Vorkultur für eine Fremdgen-Expression in *E. coli* angelegt. Am folgenden Tag wurden mit 200 µl dieser Vorkultur 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum als Hauptkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,8 angezogen. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Kultur wurde über Nacht bei 16°C oder 30°C unter Schütteln weiter inkubiert, bis sie am darauf folgenden Tag zur Proteinextraktion und -analyse weiterverarbeitet wurde (s. Kapitel 2.8.1)

Von allen wichtigen Konstrukten wurden Dauerkulturen angelegt. Zum Anlegen einer Dauerkultur wurden 750 µl einer Vorkultur zu 250 µl einer Mischung LB-Glycerin-Medium (LB-Medium mit 60 % Glycerin statt Wasser) gegeben und gemischt. Eingefroren und gelagert wurden diese Dauerkulturen bei -80°C.

2.4 Vektoren

Im Rahmen der Arbeit wurden folgende Vektoren verwendet:

Tabelle 10: Verwendete Vektoren; Vektorkarten s. Kapitel 7.1

Vektor	Hersteller	Größe	Besonderheiten
pET28a	Novagen	5369 bp	His-Tag am N-Terminus des rekombinanten Proteins, Kanamycin-Resistenz, T7-Promotor
pSPT18/19	Roche	3104 bp	pSPT18/19 haben spiegelbildliche Multi-Cloning-Sites (MCS), SP6- und T7-Promotor, Ampicillin-Resistenz
pGEM®-TEasy	Promega	3015 bp	direktes Klonieren von PCR-Produkten, SP6- und T7-Promotor, Ampicillin-Resistenz, Blau/Weiß-Screening
pGEM®-3Z	Promega	2743 bp	SP6- und T7-Promotor, Ampicillin-Resistenz, Blau/Weiß-Screening
pDONR221	Invitrogen	4762 bp	*attB*-Rekombinationsstellen, Kanamycin-Resistenz
pK7GWIWG2D(II),0	PSB Gent	14884 bp	binärer Vektor, 2 gegensätzlich orientierte *attB*-Rekombinationsstellen für RNAi, Streptomycin-/Spectinomycin-Resistenz in Bakterien, Kanamycin-Resistenz in Pflanzen, *ccdB*-Gen als Sebstmordgen für Selektion, je ein 35S-Promotor vor Fremdgen und *egfp*-Gen
pH7WG2D,1	PSB Gent	13181 bp	binärer Vektor, *attB*-Rekombinationsstellen, Streptomycin-/Spectinomycin-Resistenz in Bakterien, Hygromycin-Resistenz in Pflanzen, *ccdB*-Gen als Sebstmordgen für Selektion, 35S-Promotor vor Fremdgen, *rol*D-Promotor vor *egfper*-Gen

2.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer) waren Auftragssynthesen bei MWG-Biotech (Martinsried). Sie wurden nach Lieferung mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0 in einer Konzentration von 100 pmol/µl als Stammlösungen gelöst und in einer Konzentration von 10 mM im Reaktionsansatz verwendet. Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind in den jeweiligen Abschnitten der Ergebnisse aufgeführt.

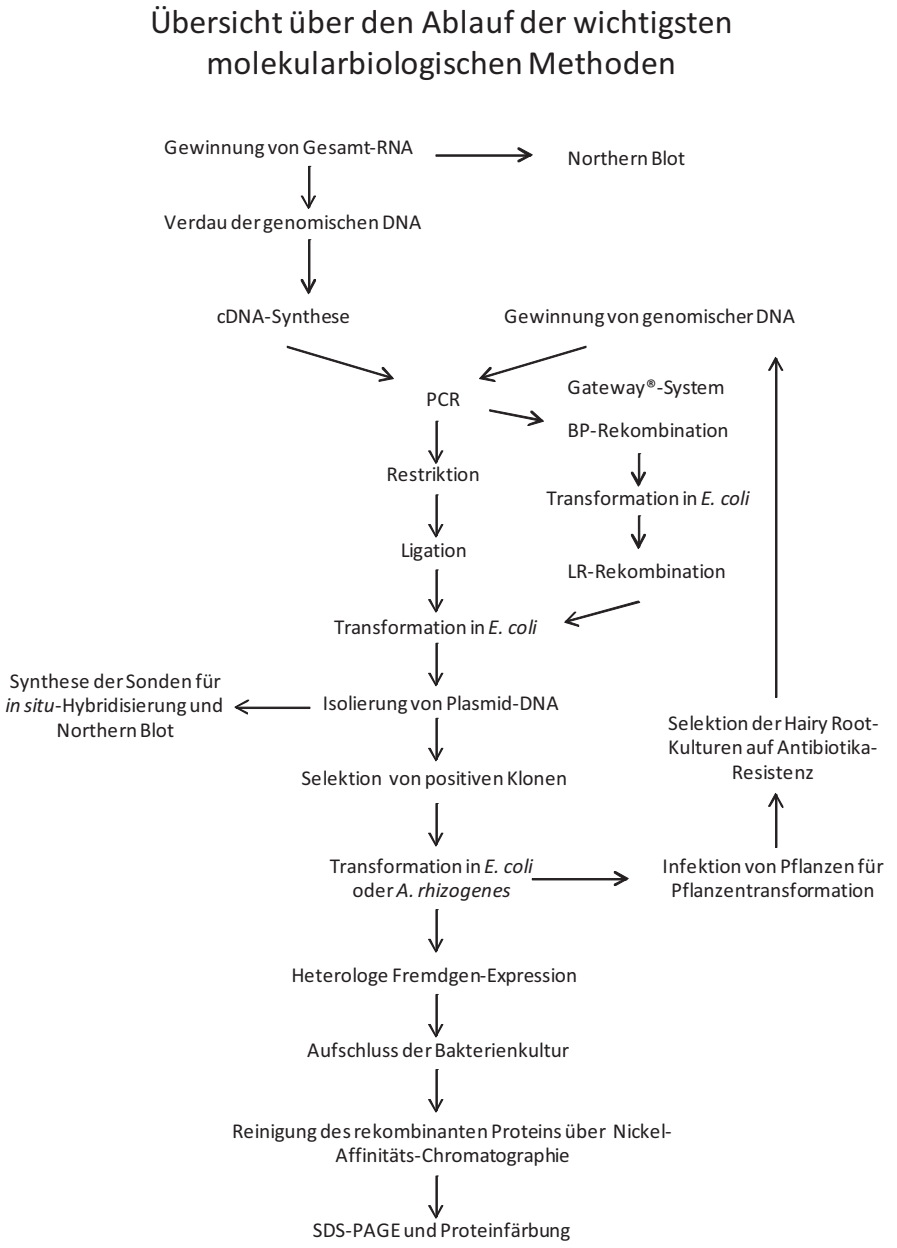


Abbildung 5: Übersicht über den Ablauf der wichtigsten molekularbiologischen Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

2.6 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.6.1 Gewinnung von genomischer DNA

Um aus pflanzlichem Gewebe die genomische DNA zu gewinnen, wurde dieses in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einem autoklavierten, mit flüssigem Stickstoff gekühlten Porzellanmörser zerkleinert. Das pulverförmige, zerkleinerte Gewebe wurde anschließend sofort zur DNA-Extraktion mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerprotokoll.

2.6.2 Gewinnung von Gesamt-RNA

Ebenso wie zur Isolation von genomischer DNA (s. Kapitel 2.6.1) wurden zur Extraktion von Gesamt-RNA die zu extrahierenden Pflanzengewebe zuerst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit einem RNase-freiem, vorgekühlten Mörser zu feinem Pulver zerkleinert. In einigen Fällen wurden die in flüssigem Stichstoff schockgefroren Pflanzenteile auch in ein ebenfalls bereits vorgekühltes 2 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben, mit 2 Stahlkugeln (rostfreier Stahl, 5 mm Durchmesser, Retsch) versetzt und anschließend 1 min mit Hilfe der Kugelmühle MM400 (Retsch) bei 30 Herz zerkleinert und gemischt. Die anschließende RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll.

2.6.3 Abbau der genomischen DNA in Gesamt-RNA

Sollte die cDNA zur Durchführung von RT-PCRs (s. Kapitel 2.6.7.2) verwendet werden, so wurden zuerst eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA mit Hilfe eines DNA-Abbaus entfernt. Dazu wurde folgender Ansatz gewählt:

Gesamt-RNA	1 µg
10x Puffer (Fermentas)	1 µl
DNase I (1 U/µl; Fermentas)	1 µl
Wasser, RNase-frei	ad 10 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Um die Aktivität des Enzyms zu stoppen, wurde dem Ansatz anschließend 1 µl einer 25 mM EDTA-Lösung zugesetzt und der Ansatz für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für die cDNA-Synthese eingesetzt.

2.6.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte durch Einsatz eines Oligo-dT-Primers (5'-GTC GAC TCG AGA ATT CTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'), der an das Poly-A-Ende der mRNA bindet. Dazu wurde überwiegend folgender Versuchsansatz gewählt:

Gesamt-RNA (z.T. nach DNA-Abbau)	1 µg
Oligo-dT-Primer (1 pmol/µl)	5 µl
Wasser, RNase-frei	ad 44 µl

Dieser Ansatz wurde 5 min bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Danach wurden folgende Bestandteile zum Ansatz dazu gegeben:

5x First Strand-Puffer (Invitrogen)	12 µl
0,1 M DTT	3 µl
10 mM dNTPs (each)	4 µl
Reverse Transkriptase SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1 µl

Das Umschreiben von Gesamt-RNA in cDNA erfolgte 60 min bei 55°C. Um Reverse Transkriptase zu denaturieren, wurde der Ansatz anschließend 15 min bei 70°C erhitzt. Dieser Ansatz wurde dann bis zum Einsatz für alle folgenden Reaktionen, wie z. B. RT-PCR, bei -20°C gelagert.

2.6.5 Agarosegel-Elektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Überprüfung der Qualität und Quantität von Nukleinsäuren im Anschluss an eine PCR (s. Kapitel 2.6.7), eine Restriktionsanalyse (s. Kapitel 2.6.9.2) und nach der RNA-Isolation (s. Kapitel 2.6.2) wurden Agarosegel-Elektrophoresen durchgeführt. Desweiteren wurden Agarosegele genutzt, um nach Restriktion von DNA-Konstrukten einzelne DNA-Fragmente zur weiteren Klonierung zu separieren. Verwendet wurden standardmäßig Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 1 bis 3 %. Dazu wurde die entsprechende Menge an Agarose (Qualität: NEO Ultra-Qualität; Roth) in 1x TBE-Puffer (s. Tabelle 11) geschmolzen, mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1,5 µg/ml; aus Stammlösung: 10 mg/ml; Roth) versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Für Fragmente unter 200 bp hat sich eine spezielle Agarose für kleine Fragmente (Low Melting-Agarose; MetaPhor) in einer Konzentration von 2,5 bis 3 % bewährt. Nach dem Erstarren des Gels wurden standardmäßig 5 µl der zu analysierenden Nukleinsäure-Probe mit 5 µl Stopp-Lösung (s. Tabelle 11) gemischt und in die Taschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in den Kammern Mini-Sub® Cell GT oder Wide-Mini-Sub® Cell

GT (Bio-Rad) in einem 1x TBE-Puffer. Als Spannungsgeber wurden entweder der LKB GPS 200/400 oder der EPS200 (beide Pharmacia) verwendet. Regulär erfolgte die Trennung bei 2,8 V/cm Elektrodenabstand für ca. 30 min. Anschließend wurde das Agarosegel mit UV-Licht der Wellenlänge 300 nm im MultiImager™ Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation und mit der Software AlphaImage™) ausgewertet.

Tabelle 11: Lösungen für die Agarosegel-Elektrophorese

10x TBE-Puffer		**Stopp-Lösung**	
Tris-Base	0,9 M	Xylencyanol	0,25 % (m/v)
Borsäure	0,9 M	Bromphenolblau	0,25 % (m/v)
EDTA	25 mM	Ficoll 400	25 % (m/v)
Wasser		EDTA	50 mM
		Wasser	

2.6.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Gehaltsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte UV-photometrisch mit dem Ultraspec 2100 pro (Amersham Biosciences). Die zu vermessende Probe wurde in einer 1:100-Verdünnung in einer Halbmikro-Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm vermessen. Bei 260 nm entspricht eine Absorption von 1 einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl bzw. einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Verunreinigungen von Proteinen und phenolischen Substanzen werden bei 280 nm, solche von Polysacchariden bei 320 nm miterfaßt. Daher kann über den Quotienten 260 nm/280 nm auf die Reinheit der Probe geschlossen werden. Bei reinen Proben liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0.

Der Gehalt an Nukleinsäuren wurde mit folgenden Formeln berechnet:

Konzentration der RNA (ng/µl) = $A_{260\ nm}$ x 40 x 100 (Verdünnungsfaktor)

Konzentration der DNA (ng/µl) = $A_{260\ nm}$ x 50 x 100 (Verdünnungsfaktor)

2.6.7 PCR

2.6.7.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR, wurde 1983 von Mullis entwickelt und 1988 erstmals veröffentlicht (Saiki et al., 1988). Die doppelsträngige DNA wird im ersten Schritt, der Denaturierung, aufgeschmolzen. Nach leichter Abkühlung binden in der nun folgen-

den Annealing-Phase Oligonukleotide an komplementäre Bereiche der DNA. In der dritten Phase, der Elongation, werden diese Oligonukleotide durch eine DNA-Polymerase vom 5'- zum 3'-Ende verlängert, so dass wieder ein DNA-Doppelstrang entsteht. Diese drei Phasen werden 20 bis 35 Mal wiederholt, so dass sich die DNA-Menge exponentiell vervielfältigt.

Für alle PCRs wurden folgende Geräte verwendet: Mastercycler Gradient, Mastercycler Personal (beide Eppendorf), Gene Amp® PCR System 9700 und Gene Amp® PCR System 2400 (beide Applied Biosystems).

Standardmäßig wurde für eine PCR folgende Reaktion angesetzt:

Ansatz Standard-PCR	
Forward-Primer (10 mM)	1 µl
Reverse-Primer (10 mM)	1 µl
cDNA	1,5 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0,50 µl
dNTPs (10 mM each)	0,50 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl; Invitrogen)	0,25 µl
Wasser	ad 25 µl

Programm	**Temperatur**	**Zeit**	**Zyklen**
Primärdenaturierung	95°C	3 – 5 min	
Denaturierung	95°C	45 s	
Annealing	50 - 65°C*	1 min	20 – 35 x
Elongation	72°C	1-5 min**	
Finale Elongation	72°C	10 min	
	15°C	∞	

* Die Annealing-Temperatur war abhängig von den verwendeten Primern. Normalerweise lag sie ca. 5°C unter deren Schmelztemperatur.

** Die Elongationszeit wurde nach der Länge der amplifizierten Fragmente ausgewählt. Je 1000 bp wurde 1 min Elongation gerechnet.

Neben der *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen) wurden für Standard-PCRs die Go*Taq*®-DNA-Polymerase (5 U/ml, Promega), die *Pfu*-DNA-Polymerase (2 – 3 U/µl; Promega) und die Platinum® *Pfx*-DNA-Polymerase (2,5 U/µl; Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet.

Für schwierige Templates, wie z. B. genomische DNA, wurde die Accu*Taq*™ LA-DNA-Polymerase (5 U/µl; Sigma) verwendet (s. Kapitel 2.11.1).

2.6.7.2 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Die RT-PCR wurde zum einen verwendet, um in cDNA-Präparationen verschiedener Pflanzengewebe (s. Kapitel 2.6.4) mit degenerierten Primern nach neuen Diaminoxidasen zu suchen. Zum anderen wurde sie mit genspezifischen Primern auch dazu verwendet, um die Expression unterschiedlicher Gene in verschiedenen Gewebeteilen zu untersuchen.

2.6.7.2.1 RT-PCR mit degenerierten Primern

Um schon geringe Mengen von an die cDNA angelagerten Primern zu verlängern und diese dann zu amplifizieren, wurde ein Touch-Down-Programm gewählt. Bei diesem Programmtyp wird die Annealing-Temperatur mit jedem Zyklus um 0,5°C verringert, um die Spezifität der PCR-Reaktionen zu erhöhen. Anschließend folgen noch einige Zyklen mit konstanter Annealing-Temperatur.

Ansatz RT-PCR	
degenerierter Forward-Primer (10 mM)	1 µl
degenerierter Reverse-Primer (10 mM)	1 µl
cDNA	1,5 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0,50 µl
dNTPs (10 mM each)	0,50 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl; Invitrogen)	0,25 µl
Wasser	ad 25 µl

Programm	**Temperatur**	**Zeit**	**Zyklen**
Primärdenaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	45 s	
Annealing	60°C	2 min	30 x, -0,5°C
Elongation	72°C	3 min	
Denaturierung	95°C	45 s	
Annealing	45°C	2 min	15 x
Elongation	72°C	3 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	
	15°C	∞	

2.6.7.2.2 RT-PCR mit genspezifischen Primern

Um die gewebespezifische Expression der drei in dieser Arbeit bearbeiteten Diaminoxidasen zu untersuchen, wurden Primer entworfen, die auf für jede Sequenz spezifische Bereiche gelegt wurden. Auf Grund der hohen Sequenzidentität der drei Sequenzen wurden die Primer in den recht unterschiedlichen 5'-UTR-Bereich der Sequenzen gelegt (mehr zur Lage der Primer s. Kapitel 3.2). Für diese PCRs wurden der Standardansatz und ein Standardtemperatur-Programm wie unter Kapitel 2.6.7.1 gewählt.

Zusätzlich zu den Proben wurden auch Positivkontrollen und Negativkontrollen durchgeführt. Als Template für die Positivkontrollen wurde Plasmid-DNA von Konstrukten verwendet, in die die zu amplifizierenden Sequenzbereiche integriert waren (pDE12-17, s. Tabelle 53, Kapitel 7.2). In Negativkontrollen wurde Gesamt-RNA verwendet, die genauso wie die restliche Gesamt-RNA in einem cDNA-Ansatz der Umschreib-Prozedur (s. Kapitel 2.6.4) unterzogen wurde. Jedoch wurde in diesen Ansätzen keine Reverse Transkriptase eingesetzt, so dass in der PCR nur eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA amplifiziert wurden.

2.6.7.2.3 Semiquantitative RT-PCR

Zur Analyse der Transkriptmenge der gentechnisch veränderten HR-Klone wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR verwendet. Nach Isolation der Gesamt-RNA aller Proben (s. Kapitel 2.6.2), Abbau der genomischen DNA (s. Kapitel 2.6.3) und Umschreiben der mRNA in cDNA (s. Kapitel 2.6.4) wurde zunächst für jedes Primerpaar die optimale Zyklenanzahl, bei der sich die PCR in der exponentiellen Phase befindet, ermittelt. Dazu wurde eine RT-PCR durchgeführt, bei der nach dem 20., 23., 26., 29., 32. und 35. Zyklus je 5 µl entnommen wurden. Diese Proben wurden anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

Ansatz PCR mit Probenentnahme	
Forward-Primer (10 mM)	2 µl
Reverse-Primer (10 mM)	2 µl
cDNA	4 µl
5x PCR-Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM each)	1 µl
Go*Taq*®-DNA-Polymerase (5 U/µl; Promega)	0,5 µl
Wasser	ad 50 µl

Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Primärdenaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	
Annealing	52,5 - 67°C	1 min	35 x*
Elongation	72°C	2-3 min	
Finale Elongation	72°C	5 min	
	15°C	∞	

* Probenentnahme nach dem 20., 23., 26., 29., 32. und 35. Zyklus je 5 µl

Die endgültigen RT-PCRs wurden dann mit einem 25 µl-Ansatz und dem Standardtemperatur-Programm mit der ermittelten optimalen Zyklenanzahl durchgeführt.

2.6.8 Klonierung von PCR-Produkten

2.6.8.1 Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Um ein mittels PCR amplifiziertes DNA-Fragment in einen Vektor zu klonieren, musste zunächst sowohl das PCR-Amplifikat, als auch der Vektor geschnitten werden, um die für die Ligation notwendigen kompatiblen Enden der DNA zu schaffen.

In der Regel wurden 15 - 20 µl des PCR-Ansatzes und 1 µg des Vektors für die Hydrolyse eingesetzt. Der Hydrolyseansatz wurde nach Herstellerangaben der Restriktionsendonukleasen (ausschließlich Fermentas) durchgeführt. Für eine quantitative Hydrolyse wurden die Ansätze 3 Stunden geschnitten. Bei einigen Ligationen wurde das PCR-Produkt vor der Hydrolyse noch durch Aufreinigung mit einem Kit von freien Nukleotiden und Polymerasen der PCR gereinigt (s. Kapitel 2.6.11.2).

Anschließend wurden sie mittels Agarosegel-Elektrophorese (s. Kapitel 2.6.5) mit anschließender Elution aus dem Gel (s. Kapitel 2.6.11.1) aufgereinigt. Die so geschnittene und gereinigte DNA wurde für die Ligation verwendet (s. Kapitel 2.6.8.2).

2.6.8.2 Ligation

Die DNA-Konzentrationen von Insert und Vektor wurden durch Auftragen von einigen Verdünnungen mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Durch Vergleich der Intensitäten der Banden im Agarosegel wurde unter Berücksichtigung der Molekularmasse bei-

der Fragmente ein Verhältnis von 1:10 (Vektor:Insert) errechnet und für folgende Ligation eingesetzt:

Vektor-DNA	x µl
Insert-DNA	y µl
5x Ligase-Puffer (Invitrogen)	2 µl
T4 DNA Ligase (1 U/µl; Invitrogen)	1 µl
Wasser	ad 10 µl

Der Ansatz ohne Ligase wurde 2 min bei 55°C erhitzt, um eventuell vorliegende Sekundärstrukturen zu lösen. Nach 2 min Abkühlen auf Eis wurde die Ligase zugegeben und der Ansatz eine Stunde bei 25°C inkubiert. Zur Denaturierung der Ligase wurde der Ansatz nach der Ligation 10 min lang bei 65°C erhitzt. Bis zur Transformation wurde der Ligationsansatz bei -20°C aufbewahrt.

Bei Schwierigkeiten mit der Ligation wurde dieser Ansatz variiert. So wurden beispielsweise beim Verhältnis von Vektor zu Insert ebenso Ansätze von 1:3 und 1:5 getestet. Auch bei Dauer und Temperatur der Ligation wurden Variationen durchgeführt, wie z. B. Ligation über Nacht bei 15°C oder 4°C.

2.6.8.3 Klonierung in pGEM®-TEasy

Für eine einfache Klonierung von PCR-Fragmenten eignet sich das pGEM®-TEasy-System der Firma Promega. Werden PCR-Fragmente mit einer *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert, so weisen sie an beiden Enden einen A-Überhang auf. Der Vektor pGEM®-TEasy ist bereits linear und hat an beiden offenen Enden T-Überhänge. Bei Kontakt dieses Vektors mit einem PCR-Produkt hybridisieren die A-Enden des PCR-Produkts mit den T-Überhängen des Vektors, so dass sie ligiert werden können. Somit ist weder für Vektor, noch für Insert eine vorherige Restriktion nötig. Es ist jedoch auch nicht möglich das PCR-Produkt gerichtet in den Vektor zu integrieren. Da diese Methode jedoch vor allem dazu genutzt wurde, PCR-Fragmente durch Sequenzierung zu überprüfen oder diese in einem Vektor zu konservieren, ist eine Orientierung des Inserts nicht zwingend notwendig. Ein weiterer Vorteil der Klonierung mit pGEM®-TEasy ist die Selektion der transformierten Klone mit der Blau/Weiß-Selektion, die in Kapitel 2.6.9.1 näher erläutert wird.

Die Klonierung in pGEM®-TEasy wurde auch zur Erstellung von Matrix-DNA für die *in vitro*-Transkription zur Sondensynthese für die *in situ*-Hybridisierung genutzt (s. Kapitel 2.7.3.1

und 2.7.3.2). pGEM®-TEasy eignet sich dafür, weil die beiden notwendigen RNA-Promotoren (T7 und SP6) die Multi-Cloning-Site (MCS) des Vektors flankieren (s. Kapitel 7.1).

Die Durchführung der Klonierung mit pGEM®-TEasy wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.8.4 Transformation

2.6.8.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die in der Arbeitsgruppe verwendeten Zellen wurden mit der Calciumchlorid-Methode kompetent gemacht. Dazu wurde aus einer Vorkultur der kompetent zu machenden Zellen eine Hauptkultur von 50 ml angeimpft (s. Kapitel 2.3.3). Diese Kultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,5 bei 37°C angezogen und anschließend bei 4°C 10 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert, um die Zellen zu ernten. Das Pellet wurde sehr vorsichtig und unter ständigem Kühlen in 25 ml einer 0,1 M $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und anschließend 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde erneut 5 min lang bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 5 ml einer eiskalten 0,1 M $CaCl_2$-Lösung mit 15 % Glycerin resuspendiert. Bis zum Abfüllen der Zellen in 100 µl-Aliquotes wurde die Suspension noch 12 bis 24 h bei 4°C gelagert. Die fertig aliqoutierten kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Bei der Transformation von DNA-Konstrukten in *A. rhizogenes* (s. Kapitel 2.10.1) wurden bereits kompetente Zellen vom VTT Technical Research Centre, Espoo, Finnland zur Verfügung gestellt.

2.6.8.4.2 Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen

Standardmäßig wurden alle Transformationen in kompetente *E. coli*-Zellen mit der Hitzeschock-Methode durchgeführt. Dazu wurden 3 bis 5 µl eines Ligationsansatzes (s. Kapitel 2.6.8.2) mit 100 µl kompetenten Zellen vorsichtig gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz im Eppendorf-Gefäß für 45 s in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42°C gegeben. Durch die Wärme wird die Membran, die durch das Calciumchlorid (s. Kapitel 2.6.8.4) bereits porös ist, für die einzuschleusende Plasmid-DNA durchlässig. Anschließend wurde der Transformationsansatz zuerst 2 min auf Eis abgekühlt und dann mit 275 µl eines auf 37°C angewärmten SOC-Mediums (s. Kapitel 2.3.2) versetzt. Dieses Medium fördert die Regeneration der durch den Hitzeschock labilen *E. coli*-Zellen. Zur

weiteren Regeneration und Vermehrung der transformierten Zellen wurden diese zunächst 60 min bei 37°C unter horizontalem Schütteln inkubiert, bevor 100 µl dieses Transformationsansatzes auf einer LB-Platte (s. Kapitel 2.3.2) mit dem jeweiligen selektierenden Antibiotikum ausplattiert wurden. Nach einer Nacht bei 37°C konnten die nun gewachsenen transformierten Bakterienkolonien zum Beispiel mit einer Minipräparation (s. Kapitel 2.6.10) und anschließender Restriktionsanalyse (s. Kapitel 2.6.9.2) auf den Ligations- bzw. Transformationserfolg untersucht werden.

A. rhizogenes wurde mittels Elektroporation transformiert (s. Kapitel 2.10.1).

2.6.9 Selektion von positiven Klonen

2.6.9.1 Blau/Weiß-Selektion

Bei den Vektoren pGEM®-TEasy und pGEM®-3Z (Promega) konnte eine erfolgreiche Ligation durch sogenannte Blau/Weiß-Selektion nachgewiesen werden. Dafür verantwortlich ist das β-Galactosidase-Gen (*lacZ*-Gen), das in pGEM®-TEasy durch die MCS unterbrochen ist. Wird ein PCR-Fragment erfolgreich in die MCS kloniert, so kann das Gen nicht vollständig und korrekt abgelesen werden und es entsteht eine weiße Bakterienkolonie. Wird jedoch keine DNA in die MCS integriert, so kann das β-Galactosidase-Gen vollständig transkribiert und translatiert werden. Die entstandene β-Galactosidase hydrolysiert das artifizielle Glycosid X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) unter Galactose-freisetzung zu 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol, das zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Da das Gen unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors steht, wird zusätzlich zum Transformationsansatz, dem selektierenden Antibiotikum und X-Gal noch Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) auf die LB-Platte gegeben, um die Transkription des β-Galactosidase-Gens zu induzieren. Desweiteren befindet sich auf dem pGEM®-TEasy-Vektor ein β-Lactamase-Gen für eine Ampicillin-Resistenz.

IPTG, X-Gal und Ampicillin wurden als Stammlösungen verwendet. IPTG wurde als 0,1 M wässrige Lösung bei 4°C gelagert, während X-Gal in einer Konzentration von 50 mg/ml in Dimethylform-amid gelöst wurde und anschließend lichtgeschützt bei -20°C gelagert wurde. Ampicillin wurde wie in Tabelle 1 beschrieben hergestellt und gelagert. Zur Herstellung einer LB-Platte (ca. 25 ml) für das Blau/Weiß-Screening wurden 100 µl der IPTG-,

20 µl der X-Gal- und 25 µl der Ampicillin-Stammlösung (100 µg/µl) auf der fertigen LB-Platte verteilt und einziehen gelassen.

2.6.9.2 Restriktionsanalyse

Im Anschluss an eine Minipräparation (s. Kapitel 2.6.10) wurde mit Hilfe der Restriktionsanalyse der Ligations- bzw. Transformationserfolg überprüft. Dazu wurde standardmäßig folgender Ansatz gewählt:

Plasmid-Lösung	5 µl
Restriktionsenzym 1 (10 U/µl)	0,1 µl
Restriktionsenzym 2 (10 U/µl)	0,1 µl
10x Restriktionspuffer	1 µl
Wasser	ad 10 µl

Wurde nur ein Restriktionsenzym benötigt, wurde 0,2 µl des Enzyms für einen Ansatz verwendet. Der Restriktionsansatz wurde 1 h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ansatzes durch Gelelektrophorese im Agarosegel (s. Kapitel 2.6.5) analysiert.

2.6.9.3 PCR

Nach der Transformation von *Agrobacterium rhizogenes* (s. Kapitel 2.10.1) mit den RNAi- und Überexpressions-Konstrukten wurden ausgewählte Klone mittels PCR auf das Vorhandensein der Plasmid-DNA getestet. Dazu wurde von diesen Klonen wie unter Kapitel 2.10.1 beschrieben ein Zell-Lysat angefertigt. Dieses Lysat wurde in einer PCR unter den folgenden Bedingungen mit den Klonierungsprimern eingesetzt:

Ansatz Screening-PCR	
Forward-Primer (10 mM)	1 µl
Reverse-Primer (10 mM)	1 µl
Zell-Lysat	1 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM each)	0,75 µl
Ampli*Taq* (5 U/µl; Roche Applied Systems)	0,25 µl
Wasser	ad 25 µl

Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Primärdenaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	45 s	
Annealing	50°C	1 min	30 x
Elongation	72°C	3 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	
	15°C	∞	

2.6.10 Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparationen

Eine Minipräparation wurde standardmäßig nach der Boiling-Methode (Holmes und Quigley, 1981) durchgeführt. Dazu wurde von allen zu untersuchenden Klonen eine 7 ml-LB-Kultur angefertigt (s. Kapitel 2.3.3). Zunächst wurden die Zellen von 1,5 bis 4,5 ml der Kultur durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden in 500 µl STET-Lösung (s. Tabelle 12) resuspendiert, mit 50 µl einer Lysozym-Lösung (s. Tabelle 12) versetzt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proteine der Probe durch Erhitzen bei 95°C für 90 s gefällt und abzentrifugiert. Der Rückstand wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 50 µl einer 7,5 mM Ammoniumacetat-Lösung und 500 µl eiskalten Isopropanol mit anschließender 15-minütigem Zentrifugation bei 4°C gefällt. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl Tris-HCl pH 8 wieder aufgenommen. Zum Abbau mitgefällter RNA wurde dem Puffer RNase A (10 µg/ml) zugesetzt und die Proben nach Resuspendierung für 30 min bei 37°C inkubiert.

Um den Ligations- bzw. Transformationserfolg zu überprüfen, wurde die isolierte Plasmid-DNA anschließend einer Restriktionsanalyse unterworfen (s. Kapitel 2.6.9.2).

Besonders reine Plasmid-DNA, wie sie zum Beispiel für die Sequenzierung nötig ist, wurde mit Hilfe des Kits Wizard Plus SV Miniprep (Promega) nach Herstellerangaben isoliert.

Tabelle 12: Lösungen für die Minipräparation

STET-Lösung		**Lysozym-Lösung**	
Tris-HCl pH 8,0	50 mM	Lysozym (aus Hühnerei)	10 mg/ml
EDTA	50 mM	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
Saccharose	8 % (w/v)		
Triton X-100	0,5 % (v/v)		

2.6.11 Reinigung von DNA

2.6.11.1 Aus einem Agarosegel

Im Anschluss an eine Restriktion (s. Kapitel 2.6.8.1) wurde der Restriktionsansatz meistens auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese, bei der sowohl Proteine, als auch kleinere DNA-Fragmente abgetrennt wurden, wurde die Bande des Fragments, das kloniert werden sollte, unter UV-Licht ausgeschnitten. Dabei wurde die DNA nur kurze Zeit und möglichst schwachem UV-Licht ausgesetzt, um DNA-Schädigungen zu vermeiden. Die DNA der ausgeschnittenen Bande wurde anschließend entweder mit dem QIAEX II-Kit (Qiagen) oder dem NucleoSpin® Extract II-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. Die gereinigte DNA wurde danach z. B. für die Ligation (s. Kapitel 2.6.8.2) oder die *in vitro*-Transkription der *in situ*-Sonden (s. Kapitel 2.7.3.2) eingesetzt.

2.6.11.2 Aus einem PCR-Reaktionsansatz

Für einige Klonierungen war es notwendig, die DNA eines PCR-Ansatzes von Enzymen und Ionen der PCR abzutrennen, um für die Restriktion (s. Kapitel 2.6.8.1) optimale Bedingungen zu schaffen. Dazu wurde entweder das QIAEX II-Kit (Qiagen) oder das NucleoSpin® Extract II-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben verwendet.

2.6.12 Northern-Blot

2.6.12.1 RNA-Elektrophorese

Da RNA als einzelsträngige Nukleinsäure zu Sekundärstrukturen neigt, ist für eine gute Trennung ein denaturierendes Formaldehyd-MOPS-Gel notwendig. Dazu wurde zunächst ein 1,2%iges Agarosegel gegossen, bei dem die Agarose in 1x MOPS-Puffer (s. Tabelle 13) geschmolzen wurde. Nach leichtem Abkühlen des Ansatzes wurde Formaldehyd in einer Endkonzentration von 2 % (v/v) und Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1,5 µg/ml) zugesetzt und in den mit RNase freiem Wasser gründlich ausgespülten Gelschlitten gegossen.

Jeweils 1 µg der zu untersuchenden Gesamt-RNA wurde mit halbem Volumen 2x RNA Loading Dye (Fermentas) gemischt und 10 min lang bei 80°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und dann in die Taschen des erstarrten Formaldehyd-MOPS-Gels pipettiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in 1x MOPS-Puffer in einer ebenfalls gut mit autoklaviertem, RNase-freiem Wasser gespülten Kammer bei 2,8 V/cm Elektrodenabstand für ca. 70 min.

Das Gel wurde bei 300 nm im MultiImager™ Light Cabinets (Alpha Innotech Corporation) fotografiert, wobei auf eine möglichst kurze UV-Bestrahlung des Gels geachtet wurde. Anschließend wurde das Gel zweimal 15 min in 20x SCC-Lösung (s. Tabelle 13) geschwenkt, um das Formaldehyd zu entfernen und, falls unterschiedliche mRNAs detektiert werden sollten, geteilt.

Tabelle 13: Puffer für die RNA-Elektrophorese

10x MOPS-Puffer		**20x SSC-Lösung**	
3-Morpholino-O-propansulfonsäure	0,2 M	NaCl	3 M
Na-Acetat	50 mM	Na-Citrat	0,3 M
EDTA	10 mM		
RNase freies Wasser			

2.6.12.2 Kapillar-Blotting

Der Transfer der RNA auf eine positivgeladene Nylonmembran (Roche) erfolgte durch Kapillar-Blotting nach folgendem Aufbau (s. Abbildung 6):

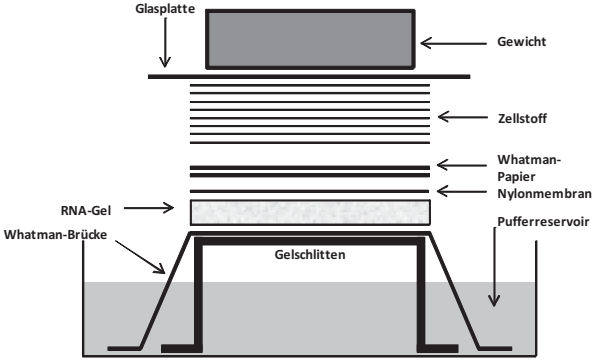


Abbildung 6: Aufbau des Kapillar-Blots für den Northern-Blot

Die Nylonmembran und das Whatmanpapier wurden vor dem Aufbau des Blots in Transferpuffer 20x SSC (s. Tabelle 13) äquilibriert. Außerdem wurde das RNA-Gel mit den Ta-

schen nach unten in den Aufbau gelegt. Während des Blots wurden alle 30 min die Zellstoff-Tücher erneuert, um eine hohe Saugkraft beizubehalten. Geblottet wurde insgesamt 5 Stunden.

Nach Beendigung des Blottens wurde die Nylonmembran 5 min in 2x SSC (s. Tabelle 13) gewaschen. Dann wurde die RNA auf der noch feuchten Membran durch UV-Crosslinking (Gerät: UV-Stratalinker 1800, Programm: Autocross, Stratagene) fixiert. Das Gel wurde zur Kontrolle des vollständigen Transfers nochmal fotografiert.

2.6.12.3 Hybridisierung

Zunächst wurde die Membran mit 6 ml DIG Easy Hyb-Puffer (Roche) in eine Hybridisierungsflasche (150 mm lang, GL 45; Schott) gegeben und 30 min bei 68°C unter Drehen im Hybridisierungsofen (HERAhybrid 6, Thermo) prähybridisiert. In dieser Zeit wurden die Sonden für 5 min bei 80°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Pro nachzuweisender mRNA wurden je 3 µl RNA-Sonde (ca. 100 ng/µl; s. Kapitel 2.7.3.2 und 2.7.3.3) mit 2 ml frischem DIG Easy Hyb-Puffer gemischt. Die prähybridisierte Membran wurde mit diesem Sondenmix über Nacht bei 68°C im Hybridisierungsofen unter Drehen inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran zweimal 5 min mit 2x SSC (mit 0,1 % SDS; s. Tabelle 13) bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Erhöhung der Stringenz wurde anschließend noch zweimal 15 min mit 0,1x SSC (mit 0,1 % SDS; s. Tabelle 13) bei 68°C gewaschen.

2.6.12.4 Detektion

Zunächst wurde die Membran 5 min in 1x Waschpuffer (s. Tabelle 14) gewaschen, bevor dann bei einer 30-minütigen Inkubation die unspezifischen Bindungen mit 1x Blocking-Lösung (s. Tabelle 14) abgesättigt wurden. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation mit einem Anti-DIG-AP-Antikörper (Roche), der 1:10.000 in 1x Blocking-Lösung verdünnt wurde. Dieser Antikörper bindet spezifisch an die in die Sonden integrierten Digoxigenin-Moleküle und hat eine alkalische Phosphatase (AP) gebunden. Nach zweifachem Waschen (je 15 min) in 1x Waschpuffer und kurzer Äquilibrierung in 1x Puffer 2 (s. Tabelle 15) erfolgte die Detektion mit dem Substrat CDP-Star (Roche), das nach Herstellerangaben auf die Membran gegeben wurde. CDP (2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro(1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor) Tricyclo[3.3.1.1.3,7]Decan)-4-yl)-1-Phenyl-phosphat, Dinatrium-

salz) wird durch die an den Anti-DIG-Antikörper gebundene alkalische Phosphatase dephosphoryliert, was zu einer Lichtemission bei 477 nm führt. Diese Emission wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (X-OMAT™, XAR-5, Kodak) detektiert. Die Expositionszeit betrug zwischen 10 und 60 min.

Tabelle 14: Wasch- und Blocking-Puffer für Membran-Blots

Bestandteile	**10x Waschpuffer**	**10x Blocking-Puffer**
Maleinsäure	100 mM	100 mM
NaCl	1,5 M	1,5 M
Tween 20	3 % (v/v)	-
Wasser		

Tabelle 15: Puffer 2 für die Detektion

NaCl	0,1 M
Tris-Base	0,1 M
$MgCl_2$	10 mM

2.7 *in situ*-Hybridisierung

2.7.1 Fixierung von Pflanzenmaterial für die mikroskopischen Untersuchungen

2.7.1.1 FAA-Fixierung

Voruntersuchungen ergaben, dass sich für die *in situ*-Hybridisierung die Formaldehyd-Alkohol- (FAA-) Fixierung am besten bewährte. Dazu wurde das Wurzelmaterial mit einem sehr scharfen Skalpell in 3-5 mm lange Stückchen geschnitten und in FAA-Fixierlösung (s. Tabelle 16) gegeben.

Tabelle 16: FAA-Fixierlösung

Ethanol (unvergällt)	50 % (v/v)
Essigsäure	5 % (v/v)
Formaldehyd (aus FA-Lösung, 37 %)	3,7 % (v/v)
Triton X-100	0,1 % (m/v)
Wasser, autoklaviert	

Die Pflanzenteile wurden auf Eis eine Stunde lang mit mehrfachem Entlüften im Vakuum (ca. 0,2 bar) mit der Fixierlösung infiltriert. Anschließend wurden die Proben in frischer Fixierlösung über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden sie eingebettet.

Die FAA-Fixierlösung wurde auch leicht variiert verwendet. Dazu wurde Formaldehyd (37%ig) durch festes Paraformaldehyd (ebenfalls in einer Endkonzentration von 3,7 %)

ersetzt. Da jedoch Paraformaldehyd eine giftige, krebserregende und leicht zu inhalierende Substanz ist, wurde diese Variante nur selten verwendet.

2.7.1.2 HOPE-Fixierung

Zusätzlich zur Standardfixierung mit FAA-Lösung wurde das pflanzliche Gewebe mit einer Fixierlösung fixiert, die für die Fixierung von menschlichem und tierischem Gewebe entwickelt wurde. Sie wurde von der DCS-Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg) entwickelt und freundlicherweise kostenlos zur Erprobung zur Verfügung gestellt. Das HOPE-System wurde speziell für einen guten Erhalt der im Gewebe vorliegenden RNA entwickelt und war somit für *in situ*-Hybridisierung attraktiv. Getestet wurde dieses System bis dahin jedoch nur an menschlichem und tierischem Gewebe.

2.7.2 Einbettung des fixierten Materials

2.7.2.1 Einbettung in Paraplast™ X-tra

Um die Gewebe-Proben für die Einbettung in Paraplast™ X-tra, einem wachsartigen Einbettmedium aus gereinigtem und gehärtetem Paraffin, vorzubereiten mussten diese zunächst dehydriert werden. Dazu wurde eine *tert*-Butanol-Reihe von 50 % bis 100 % verwendet (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: *tert*-Butanol-Reihe

	Gehalt an Alkohol in Stufe				
Bestandteile in VT	**50 %**	**70 %**	**95 %**	**100 %**	**reines *tert*-Butanol**
Wasser	50	30	-	-	-
Ethanol, 95 %, unvergällt	40	50	45	-	-
tert-Butanol	10	20	55	75	100
Ethanol, 100 %, unvergällt	-	-	-	25	-
Erythrosin (Endkonzentration 0,05 % m/v)	-	-	vorh.	-	-

Die Proben wurden eine Stunde in jeder Stufe (beginnend mit 50 % Alkohol) der *tert*-Butanol-Reihe bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Da reines *tert*-Butanol bei Raumtemperatur fest ist, wurde die letzte Stufe bei 30°C im Brutschrank durchgeführt. Diese Inkubation erfolgte über Nacht.

Am folgenden Tag wurden die Lösungen durch frisches, reines *tert*-Butanol ersetzt und eine Stunde bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte des *tert*-Butanols durch

geschmolzenes Paraplast™ ersetzt und die Gewebeproben darin 4 Stunden bei ca. 60 - 62°C im Wärmeschrank inkubiert.

Anschließend wurde die Lösung durch eine frische Mischung *tert*-Butanol/Paraplast™ (1:1) ersetzt und über Nacht bei 60°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die *tert*-Butanol/Paraplast™-Mischung durch reines Paraplast™ ersetzt und weiterhin bei 60°C inkubiert. Am 2. Tag wurde das Paraplast™ einmal erneuert. Am 3. Tag wurden die Proben dann zunächst für eine Stunde in frisches Paraplast™ gegeben und anschließend in Einmal-Einwägeschälchen (Roth) ausgegossen. Die Gewebestückchen wurden mit einer auf 60°C vorgewärmten Pinzette ausgerichtet bevor die Blöckchen bei Raumtemperatur aushärteten.

Die Paraplast™-Blöckchen wurden so geschnitten, dass jeweils ein Gewebestück, für die weitere Anwendung vorteilhaft orientiert, in einem Block vorhanden war. Diese kleinen Blöckchen wurden mit flüssigem Paraplast™ in den Kunststoffdeckel eines 5 ml-Szintillationsgefäßes mit Gewinde geklebt, die ein festes Einspannen ins Mikrotom ermöglichten.

Die so präparierten Paraplast™-Blöcke wurden an einem Rotationsmikrotom (HM 355S, Mikrotom) unter Verwendung von Einweg-Klingen (Histoknife® H, Heraeus Kulzer) mit dem Handantrieb geschnitten. Die Schichtdicke betrug 10 µm. Die entstandenen Schnittbänder wurden auf einem Tropfen destilliertem (!) Wasser auf einem Objektträger unter Wärmeeinwirkung gestreckt. Anschließend wurde vorsichtig das Wasser abgesaugt und die Schnitte noch 48 Stunden lang bei 37°C getrocknet, bevor sie für die *in situ*-Hybridisierung verwendet werden konnten.

Als Objektträger kamen Standardobjektträger (Menzel) zum Einsatz, die adhäsiv beschichtet wurden. Dazu wurden die Objektträger für 5 min in eine 2%ige 3-Aminopropyltriethoxysilan-Lösung (in Aceton; Sigma) getaucht. Anschließend wurden sie 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und dreimal 5 min in frisch-entgastem Wasser gewaschen. Vor Verwendung mussten die beschichteten Objektträger noch über Nacht unter dem Abzug getrocknet werden.

2.7.2.2 Einbettung in Technovit® 8100

Für die Einbettung in den hydrophilen Epoxidharz Technovit® 8100 (Heraeus Kulzer) wurden die fixierten Gewebeproben (s. Kapitel 2.7.1) in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30, 50, 70, 90 und 2 x 100 %) jeweils 30 min entwässert. Für die Präinfiltration wurde zunächst Technovit® 8100 (mit 6 mg Härter I pro ml) mit Ethanol gemischt, so dass sich eine Reihe mit aufsteigender Technovit®-Konzentration (20, 33, 66, 80 und 100 %) ergab. Die Proben wurden in jeder Stufe der Technovit®-Reihe 15 min im Vakuum auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zwei Tage lang in 100%igem Technovit®, das nach einem Tag gewechselt wurde, bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde zu neuem Technovit® Härter II (3,3 % v/v) gegeben, der als Radikalstarter die Polymerisation auslöst. In diese Mischung wurden die Gewebe-Proben gegeben. Die Proben wurden in kleine PCR-Gefäße überführt, bevor das Harz unter Luftausschluss bei 4°C auspolymerisierte. Die ausgehärteten Proben wurden mit Technovit® 3040 (Anwendung nach Herstellerangaben) aufgeblockt.

Die Epoxid-Blöckchen wurden ebenfalls mit dem Rotationsmikrotom geschnitten. Wegen der größeren Festigkeit des Materials konnte eine Schnittdicke von 5 µm erreicht werden. Die Schnitte wurden ebenfalls auf adhäsiv beschichtete Objektträger aufgebracht, bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur *in situ*-Hybridisierung trocken gelagert.

2.7.3 Erstellung und Quantifizierung der Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

2.7.3.1 Klonierung der DNA-Matrices zur Herstellung von RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

Um eine DNA-Matrix zur Herstellung der RNA-Sonden zu erstellen, wurden die zu detektierenden Sequenzbereiche in einen Vektor kloniert, dessen Multi-Cloning-Site von zwei RNA-Promotoren (T7 und SP6) flankiert wurde. Das ist notwendig, da das Insert später für die Sense- und Antisense-Sonden in beide Richtungen abgelesen werden sollte.

2.7.3.2 *in vitro*-Transkription der RNA-Sonden

Für die RNA-Sonden-Synthese ist es wichtig, ca. 1 µg hochreine, lineare Matrix-DNA zur *in vitro*-Transkription einzusetzen. Das Plasmid wurde zunächst linearisiert. Dies ist wichtig, da die RNA-Polymerase nicht direkt hinter dem Insert ihre Arbeit abbricht und somit weiter den Vektor abliest und dabei „run-around"-Produkte produziert, die für die Hybridisie-

rung ungeeignet sind. Der Restriktionsansatz wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Bande des geschnittenen Konstrukts wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Kits QIAEX II (Protokoll nach Herstellerangaben; Qiagen) aus dem Gel isoliert (s. auch Kapitel 2.6.11.1).

Als weitere Möglichkeit wurde das Konstrukt in einer PCR als Template eingesetzt. Dazu wurden Primer zugesetzt, die einige Basen vor und hinter der Klonierungskassette inklusive den beiden RNA-Promotoren binden. Hierdurch wurde in der anschließenden PCR ein linearer DNA-Strang synthetisiert, der sowohl die beiden Promotoren, als auch das Insert beinhaltet. Nach Kontrolle mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese wurde das PCR-Produkt mit dem NucleoSpin® Extract II-Kit (Protokoll nach Herstellerangaben; Macherey & Nagel) aufgereinigt und für die *in vitro*-Transkription eingesetzt (s. auch Kapitel 2.6.11.2).

Der Reaktionsansatz der *in vitro*-Transkription war wie folgt zusammengesetzt:

Matrix-DNA (linear, gereinigt)	1 µg
DIG-RNA-Labeling-Mix (Roche)	1,5 µg
T7-RNA-Polymerase (20 U/µl; Fermentas) **oder**	4 µl
SP6-RNA-Polymerase (20 U/µl; Fermentas)	0,4 µl
5x Transkriptionspuffer (Fermentas)	3 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl; Fermentas)	1 µl
Wasser, RNase-frei	ad 15 µl

Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, dann aliquotiert und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.7.3.3 Dot-Blot für die Quantifizierung der RNA-Sonden

Um die DIG-markierten RNA-Sonden in einer geeigneten Konzentration einzusetzen, wurde nach der Synthese zunächst die Konzentration mit Hilfe eines Dot-Blots abgeschätzt.

Dazu wurden Verdünnungen (10 ng/µl, 1 ng/µl, 0,1 ng/µl, 10 pg/µl und 1 pg/µl) einer ebenfalls DIG-gelabelten Kontroll-RNA (100 ng/µl; Roche) angefertigt. Außerdem wurden auch die zu untersuchenden Sonden verdünnt (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). Von jeder Verdünnung und den unverdünnten Lösungen wurde je 1 µl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) pipettiert, die nach dem Trocknen für 30 min bei ca. 120°C trocken erhitzt wurde, um die RNA zu fixieren. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurde die Membran 30 min in 20 ml 1x Blocking-Puffer (s. Tabelle 14) inkubiert.

Nach 30 min wurden 5 µl des Anti-DIG-AP-Antikörper (Verdünnung 1:5000, Roche) zugegeben. Dieser Antikörper bindet an die Digoxigenin-Moleküle der Sonden und der Kontroll-RNA. Nach 30 min Inkubationszeit wurde die Membran zweimal 15 min in 1x Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran 2 min in 1x Puffer 2 (s. Tabelle 15) gewaschen und schließlich in Färbelösung (s. Tabelle 18) überführt. In dieser Färbelösung setzt die alkalische Phosphatase, die an den Antikörper gebunden ist, die Reagenzien Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid und 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat zu einem violett-blauen Farbstoff um. Anhand der Farbintensität wurden die Konzentrationen der Sonden im Vergleich zur Kontroll-RNA bestimmt.

Tabelle 18: Färbelösung für den Dot-Blot und die *in situ*-Hybridisierung

NBT (Stammlösung 100 mg/ml in DMF 70%ig in Wasser)	0,1875 mg/ml
BCIP (Stammlösung 50 mg/ml in DMFA)	0,2 mg/ml
Puffer 2	

2.7.4 Durchführung einer *in situ*-Hybridisierung

Da beim Arbeiten mit RNA (in diesem Fall sowohl die Target-RNA in den Gewebeschnitten, als auch die RNA-Sonden) besondere Vorsicht vor ubiquitär vorkommenden RNasen erforderlich war, wurden alle Glasgeräte 4 bis 6 Stunden bei 200°C im Trockenschrank (Memmert) gebacken, alle Stammlösungen mit RNase freiem Wasser angesetzt und alle Verdünnungen mit autoklaviertem Wasser zubereitet.

Wenn keine anderen Angaben gemacht werden, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.7.4.1 Vorbehandlung der Schnitte

Um die in Paraplast™ eingebetteten (s. Kapitel 2.7.2.1) Gewebeschnitte den nachfolgenden Behandlungen zugänglich zu machen, wurde zunächst das Einbettmedium entfernt. Dazu wurden die Schnitte so lange in Roti-Histol (Roth), einem Xylol-Ersatz, geschwenkt, bis alle Schnitte vollständig entwachst waren.

Anschließend wurden die Schnitte zur Rehydrierung zweimal 5 min in 100%igem Ethanol, je 7 min in 95%-, 70%- und 50%igem Ethanol (unvergällt) und anschließend zweimal 7 min in Wasser inkubiert.

Um im Gewebe die Permeabilität der Zellwände und Membranen zu erhöhen und damit eine bessere Zugänglichkeit der Reagenzien zu schaffen wurden die Schnitte im Folgenden für 30 min bei 37°C in einer Proteinase K-Lösung (s. Tabelle 19) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch einen kurzen Waschschritt mit 1x PBS-Puffer (s. Tabelle 20) entfernt. Eventuell im Gewebe verbliebene Reste an Proteinase K wurden durch eine Inkubation der Schnitte in einer Glycin-TBS-Lösung (2 mg/ml in TBS-Puffer, s. Tabelle 19) für 2 min blockiert.

Nach zwei kurzen Waschschritten in 1x TBS-Puffer wurden die durch den Proteinase K-Verdau labilen Protein-Protein- und Protein-Nukleinsäure-Bindungen mit einer Formaldehyd-Behandlung wieder stabilisiert. Dazu wurden die Schnitte 20 min in einer 3,7%igen-Formaldehyd-PBS-Lösung (unter dem Abzug) inkubiert. Anschließend wurde das Formaldehyd durch zweifaches Waschen in 1x TBS-Puffer für je 5 min entfernt.

Um bei der späteren kolorimetrischen Detektion einen hohen Hintergrund durch unspezifische Anlagerungen der RNA-Sonden an das Gewebe zu verhindern, wurde im nächsten Schritt eine Acetylierung der basischen Aminogruppen durchgeführt. Dazu wurden die Gewebeschnitte zunächst in einem 0,1 M Triethanolamin-Puffer (s. Tabelle 20) kurz in einem Glasbad äquilibriert. Essigsäureanhydrid (Endkonzentration: 0,25 % v/v) wurde unter starkem Rühren zugegeben. Die Objektträger wurden so ins Glasbad gegeben, dass unter ihnen ein Magnet langsam weiterrühren konnte. Auf diese Weise wurden die Schnitte 10 min lang inkubiert. Anschließend wurden diese zweimal in 1x TBS-Puffer gewaschen.

Für die folgende Hybridisierung sollte eine reproduzierbare, hohe Menge an Sonde im pflanzlichen Gewebe vorliegen. Um das zu erreichen, musste dem Gewebe das Wasser entzogen werden. Dazu wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (50, 70, 95 und 100 %) mit je 5 min Inkubationszeit pro Schritt entwässert. Die so behandelten Schnitte wurden nun zur Vorbereitung des nächsten Arbeitsschrittes durch Verdunstung des Ethanols getrocknet.

Tabelle 19: Puffer I für die in situ-Hybridisierung

Proteinase K-Lösung, pH 8,0		**10x TBS-Puffer, pH 8,0**	
Tris-Base	0,1 M	Tris-Base	0,1 M
EDTA	50 mM	NaCl	1,5 M
Proteinase K	20 ng/ml	KCl	20 mM

Tabelle 20: Puffer II für die *in situ*-Hybridisierung

10x PBS-Puffer, pH 7,2		**0,1 M Triethanolamin-Puffer pH 8,0**	
NaCl	0,1 M	Triethanolamin	1,3 % (v/v)
KCl	20 mM	Wasser	
Na_2HPO_4	0,1 M		
KH_2PO_4	20 mM		

2.7.4.2 Hybridisierung der Schnitte

Die im Dot-Blot (s. Kapitel 2.7.3.3) quantifizierten RNA-Sonden wurden in einem Hybridisierungsmix, der sich wie folgt zusammensetzte, auf das trockene Gewebe (s. Kapitel 2.7.4.1) des Pflanzenschnittes gegeben:

Tabelle 21: Lösungen für die Transkript-Hybridisierung

Hybridisierungsmix		**10x Salzlösung, pH 6,8**	
10x Salzlösung	100 µl	NaCl	3 M
deionisiertes Formamid	400 µl	Tris-Base	0,1 M
33,33%ige Dextransulfat-Lösung	300 µl	Na_2HPO_4	0,1 M
Hefe-tRNA-Lösung (50 mg/ml; Invitrogen)	20 µl	EDTA	50 mM
RNase Inhibitor (40 U/µl; Fermentas)	1 µl		
RNase freies Wasser	174 µl		
Sense- oder Antisense-Sonde (ca. 100 ng/µl)	5 µl		

Vor dem Zusammengeben aller Reagenzien wurde die Sonde 10 min im Formamid bei 80°C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzuschmelzen. Desweiteren reduziert das verwendete Formamid die benötigte Hybridisierungstemperatur. Die 10x Salzlösung (s. Tabelle 21) stellte eine optimale Ionenstärke ein und das Dextransulfat beschleunigt die Bindung der Sonden an die Ziel-RNA im Schnitt. Die Hefe-tRNA soll unspezifische Bindungen abblocken und somit den Hintergrund reduzieren. Um sowohl die Ziel-RNA, als auch die RNA-Sonden vor RNasen zu schützen, wird dem Mix ein RNase-Inhibitor zugesetzt.

Auf die Objektträger wurden 400 µl dieses Hybridisierungsmixes gegeben. Um ein Abfließen des Mixes über die Objektträgerkante zu verhindern, wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit Roti®-Liquid Barrier (Roth) eingerahmt. Diese Substanz bildet um die

Schnitte einen hydrophoben Rand, so dass wässrige Flüssigkeit schlechter abfließen kann. Die Objektträger wurden waagerecht in eine luftdicht abschließende Box gelegt, die durch in Wasser getränktes Filterpapier feucht gehalten wurde, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. In dieser Box wurden die Schnitte über Nacht bei 50°C inkubiert.

2.7.4.3 Nachbehandlung der Schnitte

Bei den nachfolgenden Waschschritten macht man sich zu Nutze, dass ein hoher Ionengehalt stabilisierend, ein geringer hingegen destabilisierend auf die hybridisierten RNA-Doppelstränge wirkt. Die Schnitte wurden somit mit steigender Stringenz je 1 Stunde zuerst mit 2x SSC-Lösung (s. Tabelle 13), dann mit 1x SSC-Lösung und schließlich bei 60°C mit 0,1x SSC-Lösung gewaschen. Die nun noch ungebundenen RNA-Sonden wurden durch eine 30 minütige Inkubation in einer RNase A-Lösung (s. Tabelle 22) abgebaut, um den Hintergrund bei der Detektion zu reduzieren. RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNA ab. Daher bleiben Sonden-Ziel-mRNA-Doppelstränge unangetastet.

Tabelle 22: RNase A-Lösung

NaCl	0,5 M
Tris-Base	10 mM
EDTA	1 mM
RNase A (Roth)	20 ng/ml

2.7.4.4 Detektion der hybridisierten Transkripte

Um eine unspezifische Bindung des Anti-DIG-AP-Antikörpers (Roche) zu verhindern, wurden die Schnitte zuerst 30 min mit Puffer 1 (s. Tabelle 23) gewaschen und dann über Nacht bei 4°C in Puffer 1 mit 2 % Rinderserumalbumin (BSA) geblockt. Am darauf folgenden Tag wurde der Anti-DIG-Antikörper zunächst 5 min bei 13 500 rpm zentrifugiert und dann mit Puffer 1 mit 1 % BSA 1:200 verdünnt. Von dieser Antikörper-Verdünnung wurden 200 µl auf jeden Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden anschließend zwei Stunden lang in einer feuchten Box inkubiert.

Mit zwei Waschschritten á 10 min mit Puffer 1 wurden danach die ungebundenen Antikörper entfernt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal 10 min lang in Puffer 2 (s. Tabelle 23) äquilibriert, um danach ca. 5 Stunden in der Färbelösung (s. Tabelle 18) zu entwickeln. Jede halbe Stunde wurden die Schnitte kurz mit Wasser abgespült und im

Lichtmikroskop auf die Farbmarkierung hin untersucht und wieder in die Färbelösung gegeben.

Tabelle 23: Puffer IV für die *in situ*-Hybridisierung

Bestandteile	Puffer 1, pH 7,5	Puffer 2, pH 9,5
NaCl	0,15 M	0,1 M
Tris-Base	0,1 M	0,1 M
Triton X-100	0,15 % (v/v)	-
$MgCl_2$	-	10 mM

2.8 Proteinchemische Methoden

2.8.1 Aufschluss der Bakterienkulturen

Für die heterologe Expression von rekombinanten Proteinen, wurden wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, 100 ml einer *E. coli*-Kultur angezogen, und nach IPTG-Zugabe über Nacht bei 16 oder 30°C induziert. Diese Kultur wurde anschließend 20 min bei 4°C und 3500 rpm (Sigma 6K15, Sigma) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Lysispuffer ohne Imidazol (s. Tabelle 24) resuspendiert. Die Suspension wurden mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Erst dann wurde das Imidazol in einer Endkonzentration von 20 mM zugesetzt, da Imidazol die Aktivität des Lysozyms beeinträchtigen kann. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Die Proben wurden mit Ultraschall aufgeschlossen (Sonifier Cell Disruptor 250, Branson; 10 min; 50 %; 3,0 Mikrotip) und erneut 20 min bei 4°C und 3500 rpm zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurden 150 µl Nickel-NTA-Agarosesuspension (Qiagen) mit Lysispuffer für die Reinigung des rekombinanten Proteins (s. Kapitel 2.8.2) äquilibriert.

Tabelle 24: Lysispuffer pH 7,5 für den *E. coli*-Aufschluss

NaH_2PO_4* H_2O	50 mM
NaCl	0,3 M
β-Mercaptoethanol (direkt vor Gebrauch zugesetzt)	5 mM
Imidazol	20 mM
Wasser	

2.8.2 Reinigung der rekombinaten Proteine über Nickel-Affinitäts-Chromatographie

Der Überstand des Sonifikats (s. Kapitel 2.8.1) wurde mit der Nickel-NTA-Agarose in einem Falconröhrchen zusammengegeben und eine Stunde bei 4°C auf einem end-over-end-Schüttler (Pharmacia-LKB-Schlauchpumpe; modifiziert) inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine PD10-Hülse mit Fritte gegeben und der Durchlauf in einem Szintillationsgefäß aufgefangen. Es wurde sechsmal mit je 1,5 ml Waschpuffer (s. Tabelle 25) gewaschen und alle Fraktionen aufgefangen. Um das Salz des Waschpuffers von der Säule zu spülen, wurde mit 1,5 ml Lysispuffer (s. Tabelle 24) gespült und der Durchlauf aufgefangen. Anschließend wurde das Protein mit 1,5 ml und anschließend mit 1,0 ml Elutionspuffer (s. Tabelle 25) in mehreren Fraktionen eluiert.

Tabelle 25: Puffer für die Proteinreinigung

Bestandteile	**Waschpuffer, pH 8,0**	**Elutionspuffer, pH 8,0**
NaCl	1,5 mM	-
Imidazol	40 mM	240 mM
Lysispuffer (s. Tabelle 24)		

2.8.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteinexpression und His-Tag-Aufreinigung zu überprüfen, wurde die vertikale SDS-PAGE eingesetzt (Sambrook et al., 1989). Durchgeführt wurde die Elektrophorese in einer Mini-Protean® II oder III Kammer der Firma Bio-Rad mit dem Power-Supply Pharmacia LKB Multidrive XL (Pharmacia) als Spannungsgeber. Für die SDS-PAGE wurden 2-stufige Gele mit einer Schichtdicke von 0,75 mm gegossen, die aus einem 5%igen Sammel- (s. Tabelle 26) und einem 12%igen oder 15%igen Trenngel (s. Tabelle 26) aufgebaut waren. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurden die Taschen mit Hilfe einer Hamilton-Spritze (maximales Volumen 20 µl, Hamilton) mit 1x Elektrodenpuffer (s. Tabelle 27) gründlich gespült. Die mit SDS-Proben-Puffer (s. Tabelle 27) versetzten Proben wurden zum Denaturieren der Proteine fünf Minuten bei 95°C im Heizblock inkubiert. Anschlie-

ßend wurden sie mit der Hamilton-Spritze in die Taschen gegeben. Bei einem Kamm mit 10 Zähnen betrug das maximale Probenvolumen der Taschen 20 µl, bei 15 Zähnen 15 µl. Zusätzlich wurde als Molekulargewichtsstandard die Proteinleiter Protein Molecular Weight Standard (Fermentas) aufgetragen. Es wurde eine konstante Spannung von 200 V abnehmender Stromstärke (Startwert 75 mA) für ca. 50 min angelegt.

Tabelle 26: SDS-Sammel- und Trenngele

	Sammelgel, 2 Gele	**Trenngel, 2 Gele**	
Bestandteile	**5%ig**	**12%ig**	**15%ig**
30 % Acrylamid Mix	0,83 ml	4 ml	5,0 ml
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,63 ml	-	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS-Lösung	50 µl	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS-Lösung	50 µl	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	5 µl	4 µl	4 µl
Wasser	3,4 ml	3,3 ml	2,3 ml

Tabelle 27: Puffer für SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer)		**10x Elektrodenpuffer, pH 8,3**	
DTT	100 mM	Tris-Base	30 g
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	50 mM	Glycin	144 g
SDS	2 %	SDS	10 % (m/v)
Bromphenolblau	0,1 %	Wasser	
Glycerin	10 %		
Wasser			

2.8.4 Proteinfärbung

Um die Proteine im SDS-Gel zu detektieren, wurde eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt. Das Gel wurde für mindestens eine Stunde in der Färbelösung (s. Tabelle 28), dann genau 30 min in Entfärber I (s. Tabelle 29) und mindestens eine Stunde in Entfärber II (s. Tabelle 29) geschwenkt. Anschließend konnte das gefärbte Gel mit dem MultiImage™ Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation) abgelichtet werden, um dann entweder unter Luftausschluss in Folie eingeschweißt oder in Entfärber II gelagert zu werden.

Tabelle 28: SDS-Färbelösung

Coomassie™-Blue R250	0,125 % (m/v)
Methanol (technische Qualität)	50 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
Wasser	

Tabelle 29: Entfärber für die Proteinfärbung

Bestandteile	Entfärber I	Entfärber II
Methanol (technische Qualität)	50 % (v/v)	5 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)	7 % (v/v)
Wasser		

2.9 Klonierung der RNAi- und Überexpressions-Konstrukte mit dem Gateway®-System

Das Gateway®-System (Invitrogen) basiert auf der Fähigkeit von Bakteriophagen, Lambda-DNA gerichtet in das Genom von *E. coli* einzubauen. Durch bestimmte Rekombinations-Sequenzen (*attB1* und *attB2,* s. Abbildung 7), die sowohl im Vektor, als auch im PCR-Fragment enthalten sind, und einem Mix aus Bakteriophagen- und *E. coli*-Enzymen (Clonase™ Enzyme Mix) ist eine direkte Rekombination des PCR-Fragments in den Donor-Vektor pDOR221 (Invitrogen) ohne Restriktion und Ligation möglich. Dazu wird erst eine BP-Rekombination durchgeführt. Der entstandene Entry-Klon wird anschließend mit einem Destination-Vektor in der LR-Rekombination eingesetzt, wie es in Abbildung 7 dargestellt ist. Bei dieser Rekombination wurde das Gen in einen binären Vektor integriert, so dass ein Expressionsklon entstand. Als Destination-Vektoren fungierten für die RNAi-Konstrukte der Vektor pK7GWIWG2D(II) und für die Überexpressions-Konstrukte der Vektor pH7WG2D (beide PSB Gent).

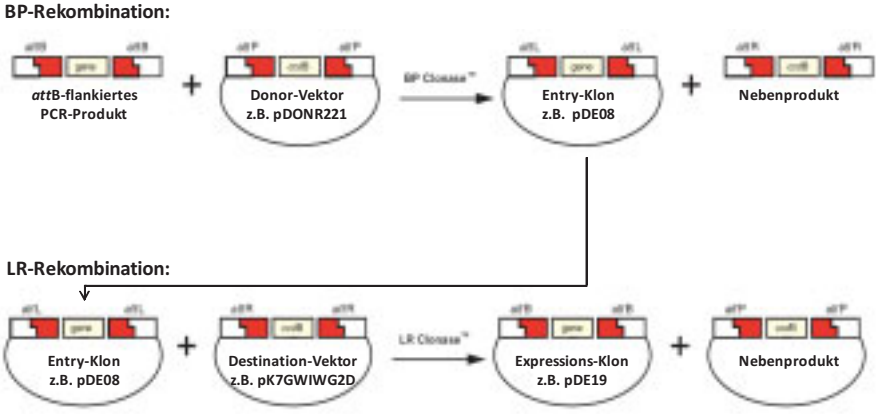


Abbildung 7: Schema der Gateway®-Klonierung modifiziert nach dem Gateway®-Manual (Invitrogen).

2.9.1 Einführung der Rekombinationsstellen durch PCR

Um die Sequenzen der RNAi- und Überexpressionsprodukte klonieren zu können, wurden diese zunächst aus cDNA mittels PCR amplifiziert (s. Kapitel 2.6.4). Verwendet wurden dazu Primer, die im Forward-Primer eine *attB1*-Sequenz, im Reverse-Primer eine *attB2*-Sequenz beinhalteten. Die durch die PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese aus dem Gel eluiert (s. Kapitel 2.6.11.1). Die so aufgereinigte DNA wurde anschließend in der BP-Rekombination eingesetzt (s. Kapitel 2.9.2).

2.9.2 BP-Rekombination

Für jede BP-Rekombination wurde folgender Ansatz verwendet:

pDONR221 (150 ng/µl; Invitrogen)	1 µl (= 50 fmol)
aufgereinigtes PCR-Produkt	50 fmol
BP Clonase™ II Enzym Mix (Invitrogen)	2 µl
1x TE-Puffer (s. Tabelle 30)	ad 10 µl

Die höchste Rekombinationsrate wurde erzielt, indem der Ansatz über Nacht bei 25°C inkubiert wurde. Anschließend wurde 1 µl einer Proteinase K-Lösung (2 µg/µl) zum Ansatz zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen.

Tabelle 30: 10x TE-Puffer

Tris-Base	0,1 M
EDTA	10 mM
Wasser	

2.9.3 Transformation des BP-Rekombinationsansatzes

Der BP-Rekombinationsansatz (s. Kapitel 2.9.2) wurde dann in folgender Transformation eingesetzt:

BP-Rekombinationsansatz	1 µl
Shot® OmniMax™2-T1-Zellen (Firma Invitrogen)	50 µl

Die Transformation erfolgte wie in Kapitel 2.6.8.4.2 beschrieben. Selektiert wurde mit Kanamycin (50 µg/ml) auf das Vorhandensein des Vektors. Ein erfolgreich rekombiniertes Konstrukt wurde mit Hilfe des *ccdB*-Gens, eines sogenannten Selbstmordgens, selektiert. Da der nicht-rekombinierte pDONR221-Vektor dieses für die Zellen tödliche Gen besitzt,

das bei erfolgreicher BP-Rekombination durch das Zielgen ersetzt wird, überleben nur solche Zellen die Transformation, die ein rekombiniertes Konstrukt aufgenommen haben.

Zusätzlich zur Selektion über das *ccdB*-Gen wurden die transformierten Zellen mit Hilfe der Minipräparation (s. Kapitel 2.6.10) und anschließender Restriktionsanalyse (s. Kapitel 2.6.9.2) auf erfolgreiche Integration des Gens untersucht. Von Klonen, bei denen das Konstrukt nachgewiesen wurde, wurde zum Erhalt besonders reiner Plasmid-DNA eine Spinpräparation mit dem Kit Wizard Plus SV Miniprep (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt (s. Kapitel 2.6.10). Diese DNA wurde für die anschließende LR-Rekombination (s. Kapitel 2.9.4) eingesetzt. Desweiteren wurden diese Konstrukte kontrollsequenziert (s. Kapitel 2.12).

2.9.4 LR-Rekombination

Für die LR-Rekombination wurde folgender Ansatz verwendet:

Entry-Klon	150 ng
pH7WG2D,1 oder pK7GWIWG2D(II)	150 ng
LR Clonase™ II Enzym Mix (Invitrogen)	2 µl
1x TE-Puffer	ad 10 µl

Die höchste Rekombinationsrate wurde erzielt, indem der Ansatz über Nacht bei 25°C inkubiert wurde. Anschließend wurde 1 µl einer Proteinase K-Lösung (2 µg/µl) zum Ansatz zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen.

2.9.5 Transformation der LR-Rekombination

Der LR-Rekombinationsansatz (s. Kapitel 2.9.4) wurde dann in folgender Transformation eingesetzt:

LR-Rekombinationsansatz	1 µl
TOP10-Zellen (Invitrogen)	50 µl

Die Transformation erfolgte wie in Kapitel 2.6.8.4.2 beschrieben. Die Selektion auf die Integration des Vektors erfolgte mit Spectinomycin (500 µg/ml).

Die transformierten Zellen wurden mit Hilfe der Minipräparation (s. Kapitel 2.6.10) und anschließender Restriktionsanalyse (s. Kapitel 2.6.9.2) auf erfolgreiche Integration des Gens untersucht. Von Klonen, bei denen das Konstrukt nachgewiesen wurde, wurde zum Erhalt besonders reiner Plasmid-DNA eine Spinpräparation mit dem Kit Wizard Plus SV

Miniprep (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt (s. Kapitel 2.6.10). Diese DNA wurde für die Transformation in *Agrobacterium rhizogenes* verwendet (s. Kapitel 2.10.1).

2.10 Transformation von Pflanzen

2.10.1 Transformation der RNAi-Konstrukte in *Agrobacterium rhizogenes*

Zur Transformation von *Agrobacterium rhizogenes* wurden 40 µl der chemisch kompetenten Zellen mit 50 – 100 ng des Plasmides gemischt. Dazu sollte die Plasmidlösung möglichst wenige Salze enthalten, da sonst bei der anschließenden Elektroporation Fehler auftreten konnten. Zur Elektro-poration wurden ein GenePulser und ein PulsController von BioRad verwendet.

Zur Regeneration der transformierten Zellen wurden diese mit 1 ml SOC-Lösung (s. Tabelle 7) gemischt und 1 h bei 37°C unter Schütteln (230 rpm) inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Mengen der Zellsuspension auf YEB-Platten (s. Tabelle 8) mit den Antibiotika Spectinomycin (100 mg/l), Streptomycin (20 mg/l) und Rifampicin (100 mg/l) ausplattiert. Die YEB-Platten wurden über 48 h bei 28°C im Dunklen inkubiert.

2.10.2 Kontrolle des Transformationserfolges

Um den Transformationserfolg zu überprüfen, wurden anschließend mehrere Kolonien gepickt und auf einer neuen Platte mit Selektionsmarker ausgestrichen. Diese wurde ebenfalls 48 h lang unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde von jedem ausgestrichenen Klon eine Impföse Bakterien in 300 µl TE-Puffer (s. Tabelle 30) suspendiert. Diese Suspension wurde dann 5 min im Wasserbad bei 100°C erhitzt, um die Zellen aufzuschließen. Anschließend wurden durch 10-minütige Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4°C die denaturierten Proteine pelletiert und der klare Überstand abgenommen. Für eine Standard-PCR zur Überprüfung auf das zu integrierende Plasmid wurde 1 µl dieses Überstandes eingesetzt (s. Kapitel 2.6.9.3).

2.10.3 Infektion der Pflanzen

Die Infektion der Pflanzen und erste Kultivierung der HR-Klone wurde am VTT Technical Research Centre Finland, Espoo, durchgeführt. Die anschließenden Analysen wurden überwiegend am Botanischen Institut der Universität Kiel durchgeführt.

2.10.3.1 Pflanzen aus dem Gewächshaus

Um Pflanzen aus dem Gewächshaus für die folgende Infektion verwenden zu können, mussten diese zuerst oberfächensterilisiert werden. Dazu wurden junge, aber vollständig differenzierte Blätter von *Senecio vernalis* und *Nicotiana tabacum* möglichst tief unten am Blattstiel abgeschnitten. Diese wurden 1 min lang in einem Bad aus 70 %igem Ethanol entwachst. Anschließend wurden sie ca. 10 min lang in einer Lösung aus 0,6 % Hypochlorid in sterilem Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Tween 20 und Rühren sterilisiert. Zur vollständigen Entfernung der Lösung wurden die Blätter dann sechsmal mit sterilem Wasser gewaschen und dann zum oberflächlichen Trocknen auf sterilem Papier ausgelegt. Anschließend wurden die durch die Desinfektion angegriffenen Enden der Blattstiele abgeschnitten und die Blätter infiziert (s. Kapitel 2.10.3.2).

2.10.3.2 Pflanzen aus der Sterilkultur

Da die Blätter von Pflanzen aus Sterilkultur nicht mehr desinfiziert werden mussten, konnten diese direkt nach dem Abschneiden von der Pflanze zur Infektion verwendet werden.

Die zu verwendenden Agrobakterien wurden 48 h vor der Infektion auf einer YEB-Platte (s. Tabelle 8) mit Antibiotika (s. Tabelle 9) frisch ausgestrichen. Zur Infektion der Pflanze sollten auch nur solche Bereiche der Bakterienkultur auf der Platte verwendet werden, die frisch gewachsen waren, also die Randbereiche. Ältere Bakterien ohne Kontakt zum Medium und den darin enthaltenen Selektionsmarkern können sich ohne die zu transformierenden Plasmide weitervermehren.

Zur Infektion wurde die Spitze einer sterilen Kanüle in den Rand der Bakterienmasse getaucht. Mit dieser Spitze wurde anschließend ca. ⅔ der Mittelrippe des zu infizierenden Blatts in regelmäßigen Abständen quer angeritzt. Dabei war darauf zu achten, dass die Mittelrippe nicht vollständig durchtrennt wurde, um eine spätere Versorgung des gesamten Blattes zu gewährleisten.

Die so infizierten Blätter wurden dann, je nach Blattform, entweder auf Platten mit Gamborg- B5mod ohne Antibiotikum, mit dem Blattstiel leicht ins Medium gedrückt, gelegt oder in Kästen mit selbigem Medium ins Medium gesteckt. Die zweite Methode empfahl sich bei schmalen, länglichen Blättern. Bei dieser Blattform wurden beim Auflegen des

Blattes leicht Agrobakterien über den Blattrand hinaus auf das Medium gewischt, die sich in den Tagen nach der Infektion so stark vermehrten, dass das infizierte Blatt abstarb.

2.10.4 Pflege der infizierten Pflanzen

Die infizierten Blätter wurden etwa eine Woche lang auf Gamborg B5mod-Medium (s. Tabelle 4) ohne Antibiotikum belassen. Bildeten sich während dieser Zeit schon Kolonien von Agrobakterien, dann wurden die Blätter wenn nötig zuerst mit einem sterilen Papiertuch von der Bakterienmasse befreit und dann auf Gamborg B5mod-Medium mit Cefotaxim (500 mg/l) und Meropenem (10 mg/l; Handelsname Meronem®, Astra Zeneca) gesetzt. Alle anderen Blätter wurden nach einer Woche auf dieses antibiotikahaltige Medium überführt.

Nach etwa 10 Tagen wurden die Wurzeln, die ca. 5 mm lang waren, vorsichtig vom Blatt abgeschnitten und auf Gamborg B5mod-Mediumplatten mit Cefotaxim (500 mg/l) und Meropenem (10 mg/l) gelegt. Diese Wurzeln wurden ebenfalls im Dunklen bei ca. 25°C weiterkultiviert.

Bei gutem Wachstum dauerte es etwa 2 bis 3 Wochen, bis die so genannten *Hairy Root* (HR)-Klone die komplette Petrischale ausgefüllt hatten. Zum Erhalt der HR-Klone wurde dann ein möglichst verzweigtes Wurzelstück herausgeschnitten und auf eine frische Medienschale gelegt und in dieser weiter kultiviert. Nach dem zweiten oder dritten Mal Umsetzen auf antibiotikahaltiges Medium wurde ein Aliquot des HR-Klons auf antibiotikafreies Medium umgesetzt. Wenn auf diesem Medium keine Agrobakterien mehr wuchsen, wurde der HR-Klon ausschließlich auf antibiotika-freiem Medium kultiviert.

2.11 Analyse der transformierten *Hairy Root*-Klone

2.11.1 PCR auf *rol*B, *attB* und *virD1*

Nach der Selektion aller HR-Klone auf Selektionsmedium wurden solche Klone, die auf Selektionsmedium unverändert weiterwuchsen, auf weitere Merkmale einer erfolgreichen Transformation untersucht. Zu den Merkmalen einer erfolgreichen Transformation gehört unter anderem der Einbau des agrobakterieneigenen *rol*B-Gens vom R_i-Plasmid und der in das *Agrobacterium* transformierte Fremd-DNA, die sich zwischen den *attB*-

Rekombinationsstellen in der T-DNA des binären Pflanzenvektors befindet. Die HR-Klone wurden auf das Vorhandensein dieser beiden Genabschnitte durch PCR überprüft.

Eine Standard-PCR zur Überprüfung auf das *rol*B-Gen wurde wie folgt durchgeführt:

Ansatz *rol*B-PCR	
Forward-Primer rolB3for (10 mM)	1 µl
Reverse-Primer rolB3rev (10 mM)	1 µl
genomische DNA	1,5 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl
DMSO (≥ 99,9 %)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,25 µl
Accu*Taq*™ LA-DNA-Polymerase (5 U/µl; Sigma)	0,20 µl
Wasser	ad 25 µl

Programm	**Temperatur**	**Zeit**	**Zyklen**
Primärdenaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	94°C	15 s	
Annealing	54°C	20 s	35 x
Elongation	68°C	20 min	
Finale Elongation	**2.11.2** 68°C	**2.11.3** 10 min	
	15°C	∞	

Eine Standard-PCR zur Überprüfung auf die Genabschnitte zwischen der *attB1*- und *attB2*-Sequenz wurde wie folgt durchgeführt:

Ansatz *attB*-PCR	
Forward-Primer DEattBfor (10 mM)	1 µl
Reverse-Primer DEattBrev (10 mM)	1 µl
genomische DNA	1,5 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl
DMSO (≥ 99,9 %)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,25 µl
Accu*Taq*™ LA-DNA-Polymerase (5 U/µl; Sigma)	0,20 µl
Wasser	ad 25 µl

Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Primärdenaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	94°C	15 s	
Annealing	60°C	20 s	30 x
Elongation	68°C	20 min	
Finale Elongation	68°C	10 min	
	15°C	∞	

Desweiteren war es wichtig zu überprüfen, ob die untersuchten Proben genomischer DNA frei von DNA waren, die von Agrobakterien stammten, die bei der DNA-Extraktion noch am Wurzelmaterial anhafteten. Dazu wurden mit allen Proben genomischer DNA PCRs auf das agrobakterieneigene *virD1*-Gen durchgeführt:

Ansatz *virD1*-PCR	
DEvirDfor (10 mM)	1 µl
DEvirDrev (10 mM)	1 µl
genomische DNA	1,5 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl
DMSO (≥ 99,9 %)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,25 µl
Accu*Taq*™ LA-DNA-Polymerase (5 U/µl; Sigma)	0,20 µl
Wasser	ad 25 µl

Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Primärdenaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	94°C	15 s	
Annealing	57°C	20 s	35 x
Elongation	68°C	20 min	
Finale Elongation	68°C	10 min	
	15°C	∞	

2.11.4 GUS-Test

Zur Überprüfung der Transgenität und Funktion des transformierten GUS-Gens wurden solche HR-Kulturen, die mit dem GUS-Konstrukt (s. Abbildung 25, Kapitel 3.6.2.1) transformiert worden waren, mit einem GUS-Färbetest untersucht (Urao et al., 1999). Dazu wurde ein Stück der zu untersuchenden Wurzel zusammen mit 1 ml GUS-Puffer (s. Tabelle 31) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Für 30 min wurde ein Unterdruck von ca. 0,8 bar angelegt, um das Gewebe besser mit dem Puffer zu infiltrieren. Anschließend wurde die Probe ca. 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine intensive Blaufärbung der Wurzel zeigte ein funktionsfähig integriertes *gus*-Gen an. Da die Wurzeln nicht durch Chlorophyll grün gefärbt waren, war eine anschließende Entfärbung mittels Ethanol nicht notwendig. Der GUS-Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert, die X-Gluc-Stammlösung bei -20°C.

Tabelle 31: Lösungen für den GUS-Test

GUS-Puffer, pH 7,0		**X-Gluc-Stammlösung**	
Na_2HPO_4	50 mM	X-Gluc (Roth)	10 mM
EDTA	10 mM	DMF	
$K_4Fe(CN)_6$	0,5 M		
Triton X-100	0,1 % (m/v)		
DMSO	2 % (m/v)		
X-Gluc; direkt vor Gebrauch zugesetzt aus Stammlösung	2 mg/ml		
β-Mercaptoethanol; direkt vor Gebrauch zugesetzt	0,05 % (v/v)		
Wasser			

2.11.5 Isolierung der Pyrrolizidin-Alkaloide aus den transgenen *Senecio vernalis*-HR-Klonen

2.11.5.1 Vorbereitung der transgenen *Hairy Root*-Klone für die Pyrrolizidin-Alkaloid-Extraktion

Die HR-Klone wurden wie unter Kapitel 2.2.3 angezogen und nach dem Ernten bei -20°C eingefroren. Die gefrorenen Wurzeln wurden anschließend über Nacht gefriergetrocknet (Beta I, Christ). Das so getrocknete Material wurde in der Kugelmühle MM400 (Retsch) zerkleinert und bis zur Extraktion der PAs luftdicht-abgeschlossen gelagert.

2.11.5.2 Isolierung der Pyrrolizidin-Alkaloide

Zur Isolierung der PAs wurde zunächst 0,025 g des gefriergetrockneten, pulverisierten Pflanzenmaterials eingewogen und in 10 ml 0,1 N H_2SO_4 suspendiert. Der Suspension wurden 31,25 µl eines internen Heliotrin-Standards (1 mg/ml in 0,1 N H_2SO_4; Latoxan)

zugesetzt. Das Material wurde 30 min unter Rühren extrahiert, anschließend abzentrifugiert und das Pellet erneut mit internem Standard versetzt und 30 min mit 10 ml 0,1 N H_2SO_4 extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure auf einen Gehalt von 0,5 N H_2SO_4 eingestellt und mit überschüssigem Zinkstaub (Korngröße < 63 µm, Roth) versetzt. Die anschließende Reduktion der PA-Oxide erfolgte fünf Stunden unter starkem Rühren. Zum Abtrennen des restlichen Zinkstaubs wurde der Extrakt 5 min bei 4700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit NH_4OH-Lösung auf pH 10 eingestellt und zum Binden des wässrigen Lösungsmittels auf eine mit Extrelut® NT (1,4 ml wässrige Phase/g Säulenmaterial; Merck) gefüllte Säule gegeben. Nach 20 min, in denen das Säulenmaterial die wässrige Phase gebunden hatte, wurden die PAs mit 40 ml Dichlormethan (Qualität „Pestillyse®“, 99,9 %, Roth, eigene Destillation) von der Säule eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter leichtem Druckluftstrom abgedampft und die PAs in 125 µl Methanol (Qualität „für die Gaschromatographie“, Merck) aufgenommen. Dieser Extrakt wurde anschließend gaschromatographisch analysiert (s. Kapitel 2.11.6).

2.11.6 Untersuchung der Alkaloid-Spektren mittels Gaschromatographie (GC)

Die gaschromatographischen Analysen wurden mit dem Gerät GC-2010 (Shimadzu) durchgeführt. Das Gerät wurde über einen PC mit der Software LABsolutions gesteuert. Der Probenauftrag erfolgte über den Autosampler AOC-20i (Shimadzu) bei 250°C mit einem Injektionsvolumen von 1 µl ohne Split. Zur Analyse der PAs lag die Anfangstemperatur bei 70°C. Diese Temperatur wurde 3 min gehalten, bevor sie mit 6°C/min auf 300°C angehoben wurde. 300°C wurden anschließend noch mal 3 min gehalten. Der Druck des Trägergases Helium betrug 140,5 kPa. Eingesetzt wurde eine BP-1-Säule mit einer Länge von 30 m, einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Schichtdicke der flüssigen Säulenphase von 0,25 µm. Die Detektion erfolgte simultan durch FID (Flammenionisationsdetektor) und FTD (Flammenthermoionischer Detektor). Durch Zugabe von Heliotrin als internen Standard erfolgte eine semiquantitative Auswertung der PAs, indem die Flächen der integrierten Peaks der *Senecio*-PAs Senecivernin, Senecionin und Senkirkin auf die des Heliotrins bezogen wurden.

2.11.7 Isolierung und Analyse der transgenen Tabak-HR-Klone

Die Isolation der Tabak-Alkaloide und deren Analyse mittels ^{1}H-NMR wurden in Abwesenheit im VTT durchgeführt und werden daher nicht weiter erläutert.

2.12 Sequenz-Analyse mit Hilfe von Computerprogrammen und Datenbanken

2.12.1 GCG

Das Softwarepaket „Wisconsin Package“ der Accelrys enthält eine Vielzahl an Anwendungen zur Sequenzanalyse von Proteinen und Nukleinsäuren. Dieses Programm wurde standardmäßig zur Erstellung von Alignments und zum Überprüfen und Vergleichen von Sequenzierungsdaten verwendet.

https://gcg.gwdg.de/

2.12.2 Chromas

Um die Sequenzierungsdaten visuell zu überprüfen, wurden die Daten der Firma MWG mit diesem Programm geöffnet und als Chromatogramm gedruckt.

http://www.technelysium.com.au/chromas.html

2.12.3 GeneDoc

Mit diesem Programm ist es möglich, Protein- und Nukleinsäure-Alignments mit mehreren Sequenzen zu analysieren und schattiert nach Sequenz-Ähnlichkeit darzustellen.

http://www.psc.edu/biomed/genedoc/

2.12.4 BLAST

Das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) findet zwischen Sequenzen Regionen lokaler Ähnlichkeit. Das Programm vergleicht Nukleinsäure- und Proteinsequenzen mit Sequenzen in der Datenbank und gibt die statistische Trefferquote dazu an.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

2.12.5 Tair Restriction Analysis

Mit diesem Internet-Tool wurden Sequenzen auf ihre Restriktionsschnittstellen analysiert. Es gibt an, welche Enzyme an welcher Stelle schneiden bzw. welche Restriktionsenzyme nicht schneiden.

http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl

3 Ergebnisse

3.1 Heterologe Expression von SVAO3

Sabine Denker identifizierte im Rahmen ihrer Doktorarbeit (Denker, 2008) aus *Senecio vernalis* drei Diaminoxidasen (DAOs), die SVAO1, SAVO2 und SVAO3 genannt wurden. Um zu überprüfen, ob eine oder mehrere dieser DAOs an der PA-Biosynthese beteiligt sind, wurden SVAO1 und SVAO2 in *E. coli* heterolog exprimiert und - soweit möglich - enzymatisch charakterisiert. SVAO3 wurde jedoch aus Zeitgründen nicht mehr von Sabine Denker exprimiert, was im Rahmen dieser Arbeit nachgeholt wurde.

3.1.1 SVAO3-Expression in pET28a

Für die heterologe Expression von SVAO3 in *E. coli* wurde der Vektor pET28a (s. Kapitel 7.1) gewählt, da dieser die Möglichkeit bietet, das exprimierte Protein am N-Terminus mit einem His-Tag zu verknüpfen. In unserer Arbeitsgruppe hatte sich gezeigt, dass eine Bindung des His-Tags am N-Terminus bei der Expression einiger Proteine vorteilhafter als am C-Terminus ist. Auf diese Weise wurden einige heterolog exprimierte Enzyme, die mit einem C-terminalen His-Tag unlöslich oder nicht aktiv waren, in einer löslichen und aktiven Form exprimiert (mündlich übermittelte Ergebnisse von Elisabeth Kaltenegger).

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus einer Sterilpflanze von *S. vernalis* gewonnen (s. Kapitel 2.6.2). Diese wurde in cDNA umgeschrieben (s. Kapitel 2.6.4) und für eine Standard-PCR (s. Kapitel 2.6.7.1) mit einer Annealing-Temperatur von 50°C mit den in Tabelle 32 aufgeführten Primern eingesetzt. Zur Amplifizierung wurde *Taq*-DNA-Polymerase verwendet.

Tabelle 32: Expressions-Primer für SVAO3. Unterstrichene Bereiche markieren Restriktionsschnittstellen: bei DEExpSVAO3ECfor: *Nde*I; bei DEExpSVAO3ECfor: *Xho*I; **der fettgedruckte Bereich** markiert das Stopp-Kodon.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DEExpSVAO3ECfor	5'- ATATACATATGGATGCAAGAAATCTCATC -3'	50°C
DEExpSVAO3ECrev	5'-ATATCTCGAG**TCA**AGCAGAAGAAGCGGCATTACAAACAG-3'	

Die Agarosegel-Elektrophorese (s. Kapitel 2.6.5) zeigte, dass bei der PCR das erwartete Amplifikat von ca. 2150 bp erzeugt wurde. Das Amplifikat wurde wie in Kapitel 2.6.11.2 beschrieben gereinigt. Dann wurden das Fragment und der Vektor pET28a mit *Nde*I und

*Xho*I geschnitten (s. Kapitel 2.6.8.1) und über Nacht bei 16°C ligiert (s. Kapitel 2.6.8.2). Der Ligationsansatz wurde in TOP10- und XL1Blue-Zellen transformiert (s. Kapitel 2.6.8.4.2). Ein Klon des TOP10-Ansatzes wurde mit Hilfe einer Minipräparation (s. Kapitel 2.6.10) und anschließender Restriktionsanalyse mit *Nde*I und *Xho*I (s. Kapitel 2.6.9.2) sowie durch eine Kontrollsequenzierung überprüft. Das entstandene Konstrukt wird im Folgenden pDE18 (s. Tabelle 53, Kapitel 7.2) genannt. Die Kontrollsequenzierung zeigte, dass sich die klonierte Sequenz in sechs Aminosäuren von der bisher als SVAO3 beschriebenen Sequenz (Denker, 2008) unterscheidet. Im C-terminalen Sequenzbereich befindet sich zudem eine Deletion von vier Aminosäuren. Auch Sabine Denker fand bei der Analyse dieser Sequenz einige weitere Sequenzen, die bis auf wenige Aminosäuren gleich waren. Es wurde daher vermutet, dass es sich um eine kleine Gen-Familie handelt. Möglicherweise handelt es sich bei der im Rahmen dieses Versuchs klonierten SVAO3-cDNA um ein Mitglied dieser Gen-Familie. Ein weiteres Mitglied dieser Familie wurde vermutlich bei der Klonierung der Überexpressions-Konstrukte für die Pflanzentransformationen identifiziert (s. Kapitel 3.6.1.2).

pDE18 wurde zur Expression in BL21(DE3)-Zellen transformiert. Als Negativkontrolle diente pET28a ohne Insert. Nach heterologer Expression zeigte ein SDS-Gel (s. Kapitel 2.8.3), dass das heterologe Protein, das ca. 80 kDa groß sein sollte, sich im unlöslichen Zellrückstand befand. Da die Expression nur sehr schwach war, wurde ein neuer Ansatz angezogen, der nach der Induktion statt bei 37°C bei nur 30°C inkubiert wurde. In diesem Ansatz wurde das exprimierte Protein auch wie unter Kapitel 2.8.2 beschrieben mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Auch hier zeigte das SDS-Gel, dass bei schwacher Expression das heterologe Protein ausschließlich in Form von *Inclusion Bodies* (IBs) gebildet worden war. Daher wurde pDE18 wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben im nächsten Schritt mit Chaparonen, die die Löslichkeit von heterolog exprimierten Proteinen steigern können, coexprimiert.

3.1.2 SVAO3-Coexpression mit Chaperonen

Zur Erhöhung der Löslichkeit des heterolog exprimierten Proteins wurde das cDNA-Transkript von *svao3* in pET28a, als Konstrukt pDE18 (s. Tabelle 52, Kapitel 7.2) genannt, in Zellen transformiert, die bereits Plasmide zur Expression von Chaperonen besaßen. Eine Coexpression mit Chaperonen wurde schon früher als Lösung bei IBs aus heterolog

exprimierten Diaminoxidasen beschrieben (Jung et al., 2003; Molnar et al., 2003). Chaperone, sogenannte Hitzeschockproteine, sind ein Reparatursystem für missgefaltete oder aggregierte Proteine. Stressbedingungen, wie z. B. Hitzeschock induzieren die Synthese von Chaperonen in der Zelle (Buchner, 2002). Eine gut untersuchte Chaperon-Familie ist die Gruppe der Hsp70-Proteine. Zusammen mit den Chaperonen der Familie Hsp60 erkennen sie die hydrophoben Bereiche der falsch gefalteten Proteine und überführen diese in eine lösliche, aktive Konformation (King et al., 1996; Daugaard et al., 2007).

Verwendet wurden dazu die Plasmide pRDKJG und pRgroELS. pRDKJG kodiert für das Hauptchaperon Dnak (69 kDa) und die beiden Co-Chaperone DnaJ (41 kDa) und GrpE (24 kDa). Die durch pREP4groELS kodierten Hitzeschock-Proteine GroEL und GroES sind hingegen ca. 60 und 12 kDa groß. Es wird vermutet, dass die durch pREP4groELS kodierten Chaperone eine Faltungskammer besitzen, die nur Proteine bis zu einer Größe von 60 kDa aufnimmt. Obwohl das für SVAO3 vorhergesagte Molekulargewicht ca. 80 kDa beträgt, wurde auch dieses Plasmid mit in den Versuchsansatz aufgenommen.

Die in Abbildung 8 aufgeführten Ansätze wurden transformiert und auf kanamycinhaltigem Medium selektiert. Da jedoch sowohl beide Chaperon-Vektoren, als auch pET28a eine Kanamycin-Resistenz besitzen, konnte nicht sichergestellt werden, dass jeder Klon beide Vektortypen beinhaltet. Um die Chance auf einen Klon mit beiden Plasmiden zu erhöhen, wurden von allen Probenansätzen je zwei Klone bearbeitet.

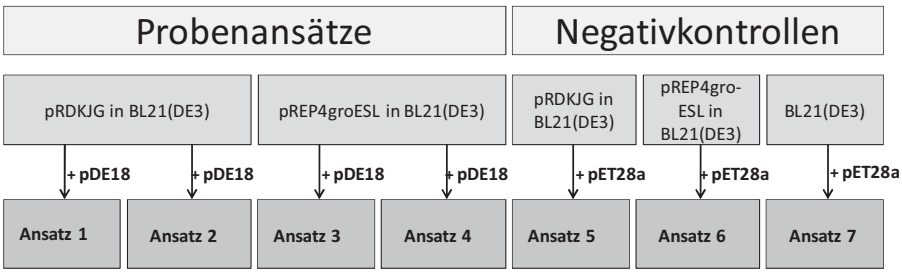


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Coexpression von SVAO3 mit Chaperonen

Die beiden Ansätze 1 und 2 mit Coexpression von pRDKJG zeigten keine Expression von SVAO3 im SDS-Gel. Möglicherweise enthielten beide untersuchten Klone nur das Plasmid zur Expression der Chaperone, denn diese waren im SDS-Gel gut sichtbar. Zurzeit wird daran gearbeitet, die Kanamycin-Resistenz von pRDKJG und pREP4groELS durch eine

Streptomycin-Resistenz auszutauschen, damit eine Coexpression mit allen gängigen Expressionsvektoren möglich ist.

Bei der Coexpression von pDE18 mit pREP4groELS wurden ebenfalls zwei Ansätze (Ansatz 3 und 4) mittels SDS-PAGE untersucht. Hier zeigte Ansatz 3 ebenfalls nur die Expression der Chaperone. In Ansatz 4 wurde allerdings ein ca. 80 kDa großes Protein exprimiert, bei dem es sich um die SVAO3 handeln könnte. Das Protein befand sich im unlöslichen Zellrückstand, woraus man auf eine erneute IB-Bildung schließen kann. Dies lässt sich damit erklären, dass vermutlich die coexprimierten Chaperone eine Faltungskammer besitzen, die nur Proteine bis zu einer Größe von 60 kDa aufnimmt (Roseman et al., 1996). Das 80 kDa große Protein war somit vermutlich zu groß, um mit den Chaperonen zu interagieren. Alle Probenansätze, auch die Negativkontrollen 5 und 6, zeigten die stark exprimierten Chaperone.

3.2 Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 mittels RT-PCR

Um erste Hinweise über die Expressionsorte von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 in *S. vernalis* zu erhalten, wurden gewebespezifische Reverse Transkriptase (RT)-PCRs durchgeführt. Dazu wurde die Gesamt-RNA getrennt aus den Blättern, dem Spross und den Wurzeln einer ca. sechs Wochen alten Sterilpflanze isoliert (s. Kapitel 2.2.3 und 2.6.2). Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurden wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben umgeschrieben und für die folgenden RT-PCRs eingesetzt. Für die PCRs wurden die in Tabelle 33, Tabelle 34 und Tabelle 35 aufgelisteten Primer verwendet. Dabei handelt es sich um sechs Primerpaare, jeweils zwei pro DAO-Sequenz. Die beiden Primerpaare dienen zur Amplifizierung eines Sequenz-Bereiches, der möglichst für die jeweilige Sequenz einmalig ist. Dazu wurden solche Sequenzbereiche gewählt, die wenig Übereinstimmung auf Nukleinsäureebene zu anderen Sequenzen aufwiesen. Diese Bereiche befinden sich im 5‘- und im 3‘-Bereich der Sequenzen (s. Abbildung 14) und enthalten sowohl Teile der kodierenden, als auch nichtkodierende Sequenzbereiche. Die amplifizierten Bereiche werden nach folgendem Schema benannt: DESVAO1for1 und DESVAO1rev1 sind Primer bei der Amplifikation des vorderen Bereichs von *svao1*, der *svao1-1* genannt wird, DESVAO1for2 und DESVAO1rev2 sind entsprechend Primer bei der Amplifikation des Bereichs, der *svao1-2* genannt wird, usw..

Tabelle 33: Primer für die Amplifikation von *svao1* bei *in situ*-Hybridisierung und RT-PCRs. Primerpaar DESVAO1for/rev1 dient zur Amplifikation der cDNA von *svao1-1*; Primerpaar DESVAO1for/rev2 dient zur Amplifikation der cDNA von *svao1-2*; unterstrichene Bereiche markieren Restriktionsschnittstellen: bei DESVAO1for1: *Hind*III; bei DESVAO1rev1: *Xba*I; bei DESVAO1for2: *BamH*I; bei DESVAO1rev2: *EcoR*I; die **fett gedruckten Bereiche** markieren *svao*-Sequenzbereiche.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DESVAO1for1	5'- TATAAAGCTT**ACAATTTATTCAAGAGAGTTAGAAT** -3'	61,1°C
DESVAO1rev1	5'- ATATTCTAGA**AAGGTGGGTGTTAGGAGTCTCGATA** -3'	
DESVAO1for2	5'- TATAGGATCC**CTATTGAGTGTATCCTACAGAATGT** -3'	62,1°C
DESVAO1rev2	5'- ATATGAATTC**TAAAGTAAATATGATTTTAACAAGC** -3'	

Tabelle 34: Primer für die Amplifikation von *svao2* bei *in situ*-Hybridisierung und RT-PCRs. Primerpaar DESVAO2for/rev1 dient zur Amplifikation der cDNA von *svao2-1*; Primerpaar DESVAO2for/rev2 dient zur Amplifikation der cDNA von *svao2-2*; unterstrichene Bereiche markieren Restriktionsschnittstellen: bei DESVAO2for1: *Hind*III; bei DESVAO2rev1: *Xba*I; bei DESVAO2for2: *BamH*I; bei DESVAO2rev2: *EcoR*I; die **fett gedruckten** Bereiche markieren *svao*-Sequenzbereiche.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DESVAO2for1	5'- TATAAAGCTT**GTGACAAGATATCGAGTATCAATAT** -3'	62,5°C
DESVAO2rev1	5'- ATATTCTAGA**GAAGGATGAGTTAAAACGTGGAGTC** -3'	
DESVAO2for2	5'- TATAGGATCC**TCGAATCAAGTGTATCTTCTAGTTT** -3'	63,5°C
DESVAO2rev2	5'- ATATGAATCC**GTGTTATCTTATTCGAGTATTTATT** -3'	

Tabelle 35: Primer für die Amplifikation von *svao3* bei *in situ*-Hybridisierung und RT-PCRs. Primerpaar DESVAO3for/rev1 dient zur Amplifikation der cDNA von *svao3-1*; Primerpaar DESVAO3for/rev2 dient zur Amplifikation der cDNA von *svao3-2*; unterstrichene Bereiche markieren Restriktionsschnittstellen: bei DESVAO3for1: *Hind*III; bei DESVAO3rev1: *Xba*I; bei DESVAO3for2: *BamH*I; bei DESVAO3rev2: *EcoR*I; die **fett gedruckten** Bereiche markieren *svao*-Sequenzbereiche.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DESVAO3for1	5'- TATAAAGCTT**ACACATTTCCTAGTGAGTTACAAAA** -3'	64,3°C
DESVAO3rev1	5'- ATATTCTAGA**TACATCGGATGTATGGAGACGGGTT** -3'	
DESVAO3for2	5'- TATAGGATCC**CAACATCCCACCAAATTCCGAGAGA** -3'	67°C
DESVAO3rev2	5'- ATATGAATCC**TCATCCAAGCTAGAAGAAAGAGTTC** -3'	

Die RT-PCRs wurden wie in Kapitel 2.6.7.2.2 beschrieben mit 35 Zyklen pro PCR durchgeführt. Die Primer zeigten selbst bei einer Variation der Annealing-Temperatur um 2°C nach oben und unten noch hohe Spezifität. Die Ergebnisse (s. Tabelle 36) änderten sich dadurch nicht.

Teile der Ergebnisse sind im folgenden Agarosegel-Bild der Abbildung 9 zu sehen. Aufgetragen sind die PCR-Produkte der PCRs gegen die jeweils vorderen Sequenzabschnitte (*svao1-1*, *svao2-1* und *svao3-1*) mit cDNA aus Blatt, Spross und Wurzel als *template*-DNA.

Zu jeder Probe wurde eine Positivkontrolle durchgeführt und aufgetragen, die aus der Amplifikation des jeweiligen Sequenzstückes aus einem Konstrukt bestand. Verwendet wurden dazu als Positivkontrolle für *svao1-1* das Konstrukt pDE12, für *svao2-1* pDE13 und für *svao3-1* pDE14 (alle s. Tabelle 53, Kapitel 7.2). In den Ansätzen der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Wasser ersetzt. Erwartet wurden bei der Amplifikation von *svao1-1* ein 211 bp-Fragment, bei der Amplifikation von *svao2-1* ein 179 bp großes Fragment und bei der Amplifikation von *svao3-1* ein 244 bp-Fragment. Banden in entsprechender Größe wurden in allen Proben detektiert. Neben diesen Banden wurden in einigen Proben, vor allen denen der Amplifikation von *svao1-1*, ca. 80 bp große Banden detektiert, die vermutlich Primerartefakte sind.

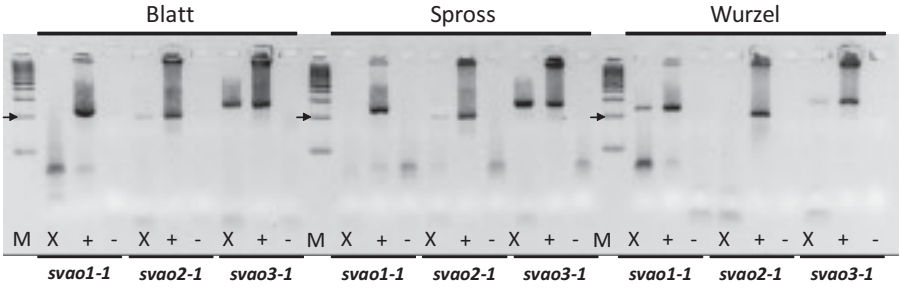


Abbildung 9: Agarosegel-Bild der RT-PCRs. Aufgetragen sind die Proben der RT-PCRs mit der cDNA aus Blatt, Spross und Wurzel auf die Transkripte von *svao1-1* (211 bp), *svao2-1* (179 bp) und *svao3-1* (244 bp). **M:** DNA-Marker 100 bp (Invitrogen; **Pfeil:** 200 bp-Bande), **X:** Probe, **+:** Positivkontrolle, **-:** Negativkontrolle

Die Ergebnisse dieser RT-PCRs lassen sich wie folgt zusammenfassen: Transkripte von *svao1* wurden nur in der Wurzel nachgewiesen. Transkripte von *svao2* hingegen wurden im Blatt und im Spross und solche von *svao3* wurden in allen untersuchten Pflanzenorganen gefunden.

Da bei diesem Versuch lediglich der Expressionsort, nicht aber die Expressionsstärke der Gene untersucht werden sollte, wurden keine semiquantitativen RT-PCRs durchgeführt. Über die Expressionsstärke der untersuchten Gene kann deshalb an Hand der Ergebnisse keine Aussage getroffen werden. Zwar wurden gleiche Mengen an RNA für das Umschreiben zur cDNA verwendet, da jedoch kein konstitutiv exprimiertes Kontroll-Gen in jeder Probe amplifiziert wurde, ist nicht feststellbar, ob die cDNA-Synthese in allen Proben quantitativ gleich verlaufen ist. Aus diesem Grund kann nicht sichergestellt werden, dass in allen Proben die gleiche Menge an cDNA-Template vorlag.

In Abbildung 9 nicht dargestellt wurden die Ergebnisse der PCRs der jeweils hinteren Sequenzabschnitte *svao1-2*, *svao2-2* und *svao3-2*. Lediglich bei der PCR zur Amplifikation des hinteren Sequenzabschnittes der cDNA von *svao2* im Spross wurde trotz Optimierung der PCR-Bedingungen kein Amplifikat nachgewiesen. Die Ergebnisse aller RT-PCRs wurden in Tabelle 36 zusammengefasst.

Tabelle 36: Ergebnisse der gewebespezifischen RT-PCRs. Nachweis der jeweils zwei Sequenzabschnitte pro cDNA-Transkript von *svao1*, *svao2* und *svao3* in Blatt, Spross und Wurzel. **+**: wurde nachgewiesen; **-:** wurde nicht nachgewiesen.

	cDNA-Transkript von *svao1*		**cDNA-Transkript von *svao2***		**cDNA-Transkript von *svao3***	
Pflanzen-organ	***svao1-1***	***svao1-2***	***svao2-1***	***svao2-2***	***svao3-1***	***svao3-2***
Blatt	-	-	+	+	+	+
Spross	-	-	+	-	+	+
Wurzel	+	+	-	-	+	+

3.3 Lokalisierung von *svao1*-, *svao2*- und *svao3*-Transkripten durch gewebespezifische Northern-Blots

Zur Bestätigung der RT-PCR-Ergebnisse und zur Quantifizierung der Transkriptmenge der drei Diaminoxidasen wurden Northern-Blots (s. Kapitel 2.6.12) durchgeführt. Verwendet wurde dazu je 1 µg derselben Gesamt-RNA, die bereits in den gewebespezifischen RT-PCRs (s. Kapitel 3.2) eingesetzt wurde. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in drei Abschnitte geteilt, so dass in jedem Abschnitt in der ersten Spur RNA des Blattes, in der zweiten Spur RNA des Sprosses und in der dritten Spur RNA der Wurzel aufgetrennt worden war. Die Gel-Teilung wurde durchgeführt, um jeden Abschnitt nach dem Übertragen der RNA auf die Membran mit Sonden gegen eine der drei DAOs zu hybridisieren. Für die Hybridisierung wurden dieselben DIG-markierten RNA-Sonden verwendet, die auch für die *in situ*-Hybridisierungen (s. Kapitel 3.4) verwendet wurden. Das Digoxigenin-(DIG)-System von Roche arbeitet mit nicht-radioaktiven Sonden, die mit Digoxigenin-Molekülen markiert sind. Diese Sonden hybridisieren mit der Ziel-mRNA im Gewebe der Untersuchungspflanze und werden mit Hilfe von Anti-DIG-Antikörpern über eine Farbreaktion nachgewiesen, wie sie bereits in Kapitel 2.7.3.3 beschrieben ist.

Für jede der drei DAOs wurden dazu zwei Sonden konstruiert und hergestellt. Diese Sonden hybridisieren mit den Bereichen der RNA, die in den gewebespezifischen RT-PCRs (s. Kapitel 3.2) amplifiziert wurden.

Jeder der drei Abschnitte wurde mit einer Hybridisierungslösung inkubiert, die aus einer Mischung aus je 1,5 µl der Sonde (ca. 100 ng/µl) für den ersten Sequenzbereich (zum Beispiel bei *svao1*: *svao1-1*) und 1,5 µl der Sonde (ebenfalls ca. 100 ng/µl) für den 2. Sequenzbereich der gleichen SVAO-cDNA (zum Beispiel *svao1-2*) und 2 ml Hybridisierungspuffer bestand (s. Kapitel 2.6.12.3).

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der Blots nach Detektionen der Membranen. Der erste Blot, der mit Sonden gegen mRNA-Transkripte von *svao1* hybridisiert wurde, zeigt nur ein schwaches Signal in der Wurzel. Im zweiten Blot konnte kein Signal mit Sonden gegen *svao2*-mRNA detektiert werden. Der dritte Blot zeigt Signale von *svao3*-mRNA in Blatt, Spross und Wurzel in unterschiedlicher Stärke.

Abbildung 10: Ergebnisse des gewebespezifischen Northern-Blots. Dargestellt sind die drei Blots, die mit Sonden gegen mRNA-Transkripte von *svao1*, *svao2* und *svao3* hybridisiert wurden. Aufgetragen wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA aus Blatt, Spross und Wurzel von *S. vernalis.*

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der gewebespezifischen RT-PCRs, so kann man große Übereinstimmungen feststellen. Beide Versuche zeigten, dass *svao1* nur in der Wurzel transkribiert ist. Der Northern-Blot zeigt, dass diese Expression jedoch recht schwach ist. *svao3* ist in allen untersuchten Pflanzenorganen transkribiert. Im Blatt scheint die Transkription am schwächsten und in der Wurzel am stärksten zu sein. Dies passt zu den Ergebnissen der RT-PCRs, die in allen Proben eine eindeutige Amplifikation der *svao3*-cDNA aufwiesen. RNA-Transkripte der *svao2* konnten mit den PCRs in Blatt und Spross nachgewiesen werden. Dieser Nachweis konnte nicht mit Hilfe des Northern-Blots bestätigt werden. Vermutlich liegt dies daran, dass der Northern-Blot deutlich weniger empfindlich ist als die RT-PCR (Dean et al., 2002) und somit geringe Mengen an *svao2*-Transkript nicht nachgewiesen werden konnten.

3.4 *In situ*-Hybridsierungen zur Lokalisation der HSS in *Jacobaea vulgaris* und der drei möglichen Diaminoxidasen in *Senecio vernalis* auf Transkript-Ebene

3.4.1 Transkriptnachweis der HSS aus *Jacobaea vulgaris* durch *in situ*-Hybridisierung

Das Enzym HSS wurde in den Wurzeln von *Jacobaea vulgaris* durch Immunolokalisiation lokalisiert (Niemüller, 2007). Es befindet sich in Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms. Diese Zellen bilden vier scharf abgegrenzte Zellgruppen, die dem Phloem des tetrarchen Leitbündels gegenüber liegen.

Zur Etablierung der Methode der *in situ*-Hybridisierung in der eigenen Arbeitsgruppe sollten zunächst die mRNA-Transkripte der HSS in *J. vulgaris* nachgewiesen werden. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob sich die mRNA der HSS in der Nähe des Translationsortes, also in den Zellen befindet, in denen die HSS bereits durch Immunolokalisations-Antikörper-Markierungen nachgewiesen wurde. Zur Lokalisierung wurden DIG-markierte RNA-Sonden eingesetzt, deren Aufbau bereits in Kapitel 3.3 zur Detektion der Northern-Blots beschrieben wurde. Die Konstruktion und Synthese dieser Sonden wird im folgenden Kapitel (3.4.1.1) vorgestellt.

3.4.1.1 Klonierung und Synthese der Sonden

Die HSS entwickelte sich im Laufe der Evolution mindestens viermal aus der Desoxyhypusin-Synthase (DHS), einem Enzym des Primärstoffwechsels (Ober und Hartmann, 1999a; Hartmann und Ober, 2000). Aus diesem Grund ist eine hohe Identität von DHS und HSS auf Sequenzebene nicht überraschend. Um für die Detektion der HSS auf Transkriptebene eine RNA-Sonde zu konstruieren, die nicht mit der ähnlichen DHS kreuzhybridisiert, wurden anhand eines Alignments der beiden Sequenzen ein HSS-Sequenzbereich gesucht, der möglichst wenig Übereinstimmung mit der DHS-Sequenz aufweist. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, liegt dieser ca. 400 bp-große Sequenzbereich mit etwa 300 bp am 3`-Ende des kodierenden Bereiches und mit etwa 100 bp im nichtkodierten 3`-Bereich der HSS-Sequenz.

Auf diesen Bereich wurden zwei Primer gebaut, die in Tabelle 37 aufgelistet sind. Für die Klonierung in die Vektoren pSPT18 und pSPT19 wurde in den Forward-Primer die Restriktionsschnittstelle von *Hind*III und in den Reverse-Primer die von *Xba*I integriert.

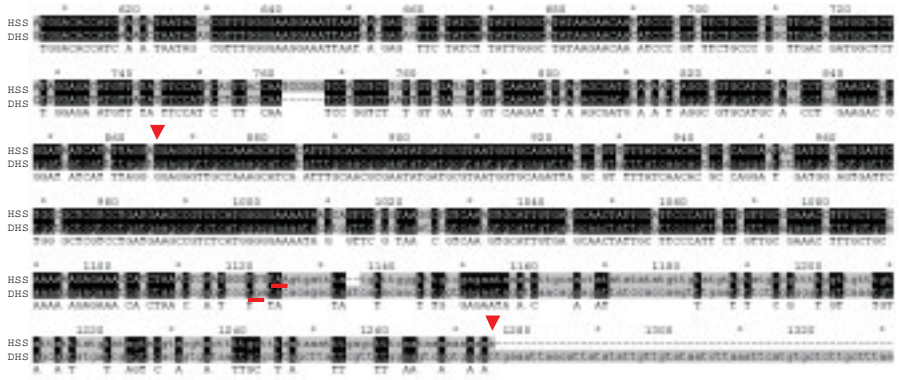


Abbildung 11: Teil eines HSS-DHS-Alignments mit Lage der HSS-Sonde. Rote Pfeilspitzen markieren Anfang und Ende der HSS-Sonde. Rot-unterstrichene Basen sind Stopp-Kodons und stellen damit das Ende des kodierenden Bereiches der Sequenzen dar.

Tabelle 37: Klonierungsprimer für HSS-Sonde. Unterstrichene Bereiche markieren Restriktionsschnittstellen: bei DE01SjAforSonde: *Hind*III und bei DE01SjArevSonde: *Xba*I.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DE01SjAforSonde	5'-TATAAAGCTTGAGGAGGGTTGCCAAAGCATCACAT-3'	55°C
DE01SjArevSonde	5'-ATATTCTAGAATTGAAAGCTCAAATTTATTAAAGCAAAAGT-3'	

In einer Standard-PCR (s. Kapitel 2.6.7.1) wurde ein ca. 500 bp großes Amplifikat erzeugt, das nach Reinigung (s. Kapitel 2.6.11.2) mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III geschnitten wurde (s. Kapitel 2.6.8.1). Anschließend wurde das Fragment in die beiden, ebenfalls mit *Xba*I und *Hind*III geschnittenen Vektoren pSPT18 und pSPT19 (s. Kapitel 7.1) ligiert.

Die Vektoren pSPT18 und pSPT19 sind identisch, weisen jedoch eine gegensätzlich orientierte Multi-Cloning-Sites (MCSs) auf. Bei der *in vitro*-Transkription der Sondensynthese wird die MCS der beiden entstandenen Konstrukte mit einer T7-RNA-Polymerase abgelesen (s. Kapitel 2.7.3.2). Es entstehen so beim Ablesen beider Vektoren Sense- und Antisense-RNA-Sonden. Während die Antisense-Sonde mit der Ziel-mRNA der HSS im Gewebe hybridisiert, dient die gegensätzlich orientierte Sense-Sonde als Negativkontrolle und zeigt eventuelle unspezifische Bindung der Sonden im Gewebe an.

Zur Identifikation von jeweils einem positiven Klon wurde zunächst eine Minipräparation (s. Kapitel 2.6.10) mit Restriktionsanalyse durch die Enzyme *Xba*I und *Hind*III (s. Kapitel 2.6.9.2) und anschließend eine Kontroll-Sequenzierung durchgeführt. Der Klon, der durch Integration des Inserts in pSPT18 entstanden ist, wurde pDE01 genannt, während der Klon, der durch Integration des Inserts in pSPT19 entstanden ist, pDE02 genannt wurde. pDE01 wurde dabei als Matrix für die Antisense-Sonde, pDE02 als Matrix für die Sense-Sonde verwendet (s. Tabelle 53, Kapitel 7.2).

Wie in der Tabelle 17 (s. Kapitel 2.7.4) zu sehen ist, wurde pro 1 ml Hybridisierungsmix 500 ng RNA-Sonde eingesetzt. Um diese Konzentration zu erreichen, musste die hergestellte Sonde mindestens eine Konzentration von 3 ng/µl aufweisen. Dazu musste die *in vitro*-Transkription mit T7-RNA-Polymerase zur Sondensynthese zunächst optimiert werden. Anfangs wurden 2 Units T7-RNA-Polymerase pro Mikroliter Ansatz verwendet. Der Ansatz wurde auch nur eine Stunde bei 37°C inkubiert. Desweiteren wurde eine Ethanol-Fällung der Sonden nach der Synthese durchgeführt, um die Sonden zu reinigen. Es zeigte sich jedoch, dass bei Einsatz von 5,3 Units T7-RNA-Polymerase pro Mikroliter Ansatz und einer Inkubation über Nacht bei 37°C unter Auslassen der anschließenden Ethanol-Fällung die Konzentration der synthetisierten RNA-Sonde von ca. 10 pg/µl auf 100 ng/µl gesteigert werden konnte.

Die Quantifizierung zweier solcher Sonden mit Hilfe eines Dot-Blots (s. Kapitel 2.7.3.3) ist in Abbildung 12 zu sehen. In der obersten und untersten Reihe befinden sich Markierungen, die durch Auftragen von je 1 µl der unverdünnten und verdünnten Sonde (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) mit anschließender Detektion entstanden sind. In der mittleren Reihe wurde DIG-markierte Kontroll-RNA in unterschiedlichen, bereits bekannten Konzentrationen aufgetragen. Durch Vergleich der Intensitäten der Signale von Sonden und Kontroll-RNA wurde die ungefähre Konzentration der synthetisierten Sonden auf etwas mehr als 100 ng/µl geschätzt. Auffällig war, dass die unverdünnten RNA-Sonden ein Signal zeigten, das nur in etwa so intensiv wie das der 1:10-verdünnten Sonden war. Es wird vermutet, dass die RNA-Konzentration der unverdünnten Sonde so hoch war, dass die Membran überladen wurde. Möglich ist auch, dass Bestandteile aus dem Syntheseprozess das vollständige Anbinden der RNA an die Membran blockierten. In der Verdünnung wä-

ren diese dann ebenso verdünnt und würden weniger intensiv die Bindung der RNA an die Membran blockieren.

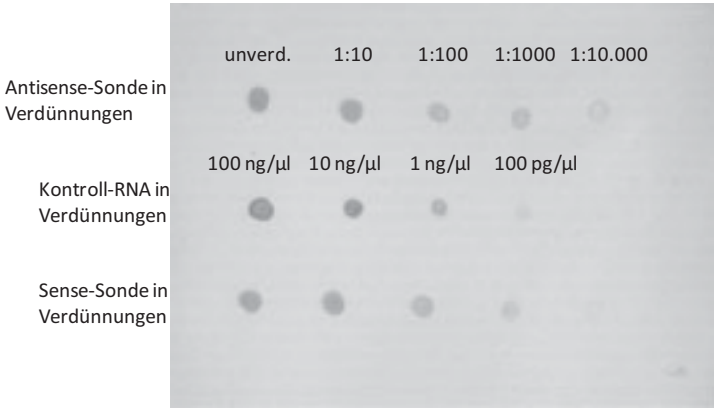


Abbildung 12: Dot-Blot zur Quantifizierung der RNA-Sonden (obere und untere Zeile) mit Hilfe einer Kontroll-RNA (mittlere Zeile). Von links nach rechts aufgetragen wurde jeweils zuerst die unverdünnte (unverd.) RNA, anschließend Verdünnungen von 1:10 bis 1:10.000.

3.4.1.2 I*n situ*-Hybridisierungen

Anfangs wurde die *in situ*-Hybridisierung nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe Facchini durchgeführt (Bird et al., 2003). Mit diesem Protokoll konnte jedoch kein Signal erzeugt werden. Desweiteren war der Gewebeerhalt nach Beendigung der Hybridisierungsprozedur so schlecht, dass das komplette Wurzelparenchym in den Schnitten fehlte. Aus diesem Grund wurden einige Änderungen im Protokoll durchgeführt, die in Tabelle 38 zusammengefasst sind:

Tabelle 38: Veränderungen im *in situ*-Protokoll, die zum besten Ergebnis führten.

Punkt der Veränderung	Ursprüngliches Protokoll	Verbessertes Protokoll	Auswirkungen
RNase A-Behandlung	40 µg/ml	20 ng/µl	detektierbares Signal
Menge an Hybridisierungsmix	100 µl	400 µl	
Hybridisierung	mit Deckgläschen	ohne Deckgläschen	verbesserter Strukturerhalt
Proteinase K-Behandlung	10 µg/ml	20 ng/ml	
Aufziehen der Schnitte auf Objektträger	mit autoklaviertem Leitungswasser	mit autoklaviertem, demineralisiertem Wasser	

Nach diesen Veränderungen wurden einige *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt, wie sie in Kapitel 2.7.4 beschrieben sind. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis einer solchen *in situ*-

Hybridisierung. Zu sehen sind Querschnitte durch eine junge Wurzel von *J. vulgaris* mit einem tetrarchen Leitbündel. In Bild A ist ein Schnitt zu sehen, der mit der Antisense-Sonde hybridisiert wurde. Dieser Schnitt zeigt eine deutliche, violett-blaue Markierung, die sich im Rindenparenchym und der Endodermis außerhalb des Perizykels gegenüber dem Phloem befindet. Im Bild B wurde dieselbe Wurzel mit Sense-Sonde hybridisiert. Es sind keine spezifischen Markierungen zu sehen. Die Markierung befindet sich wie erwartet in denselben Gewebebereichen, in denen die HSS von Niemüller mittels Immunolokalisation identifiziert wurde (Anke et al., 2004). Dieses Ergebnis wird in Kapitel 4.2.1 weiterführend diskutiert.

Damit war die Methode der *in situ*-Hybridisierung in der Arbeitsgruppe soweit etabliert, dass mit ihr die mRNA der drei *svao*-Gene in der *S. vernalis*-Wurzel lokalisiert werden sollte. Nach den Schwierigkeiten, die bei der heterologen Expression dieser drei DAOs aufgetreten waren, sollte die *in situ*-Hybridisierung weitere Erkenntnisse über eine mögliche Beteiligung einer oder mehrerer SVAOs an der PA-Biosynthese liefern, um dann gezielter an einer Lösung für das Expressions-Problem arbeiten zu können.

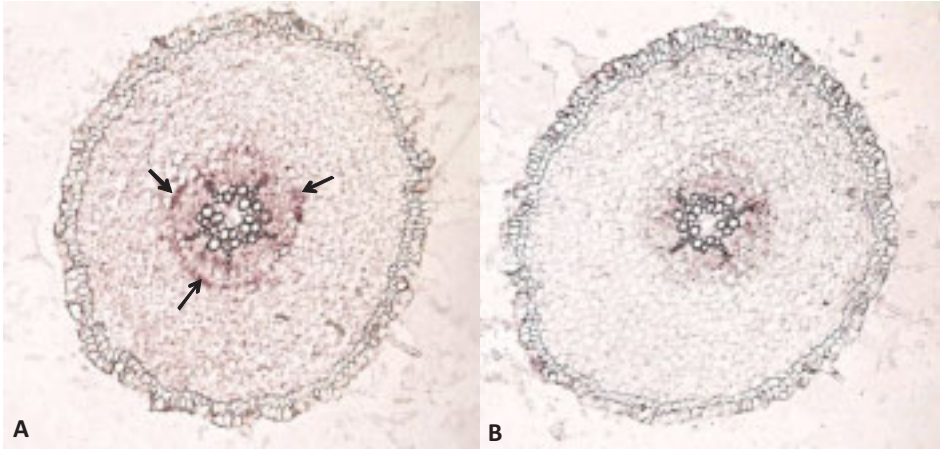


Abbildung 13: Ergebnis der *in situ*-Hybridisierung der HSS in *Jacobaea vulgaris*. Mikroskopische Vergrößerung 1:200; **A**: Schnitt inkubiert mit Antisense-Sonde; **B:** Schnitt inkubiert mit Sense-Sonde; **Pfeile** weisen auf Markierung; **EX**: Exodermis, **PH**: Phloem, **RP:** Rindenparenchym, **XY**: Xylem.

3.4.2 Transkriptionsnachweis von drei DAOs in *Senecio vernalis* durch *in situ*-Hybridisierung

3.4.2.1 Klonierung und Synthese der Sonden

Um für jede der drei DAOs einen möglichst spezifischen Sequenzbereich zu finden, der zum Entwurf der Sonden für die *in situ*-Hybridisierung und den Northern-Blot (s. Kapitel 2.6.12 und 2.7) genutzt werden konnte, wurde zunächst von den Nukleinsäuresequenzen der drei DAOs in *S. vernalis* ein Alignment erstellt (s. Abbildung 14). Anhand dieses Alignments wurden solche Sequenzbereiche identifiziert, in denen die drei Sequenzen die deutlichsten Unterschiede zeigen. Das sind vor allem die 5‘- und 3‘-Enden des kodierenden und unkodierenden Sequenzbereichs. Für eine intensive, klare Markierung bei der *in situ*-Hybridisierung sind Sonden von ca. 500 bp empfehlenswert. Bei kleineren Sonden kann es sein, dass mit den Sonden so wenig DIG gebunden wird, dass das Signal nur sehr schwach und eventuell nicht vom Hintergrund zu unterscheiden ist. Größere Sonden haben den Nachteil, dass sie nicht so gut ins Gewebe migrieren können. Auch dies kann zu einer Abschwächung der Markierungsintensität führen. Da es jedoch in keiner der drei Sequenzen einen ca. 400 bp großen und trotzdem für die Sequenz einmaligen Bereich gibt, wurden in jeder Sequenz zwei Bereiche festgelegt, auf die Sonden konstruiert wurden. Der jeweils erste liegt im nichtkodierenden und kodierenden 5‘-Bereich der Sequenz und wird im Folgenden „*gen-name-1*“ (zum Beispiel *svao1-1*). Der zweite Bereich liegt bei allen Sequenzen im kodierenden und unkodierenden 3‘-Bereich und wird „*gen-name-2*“ genannt (zum Beispiel *svao1-2*).

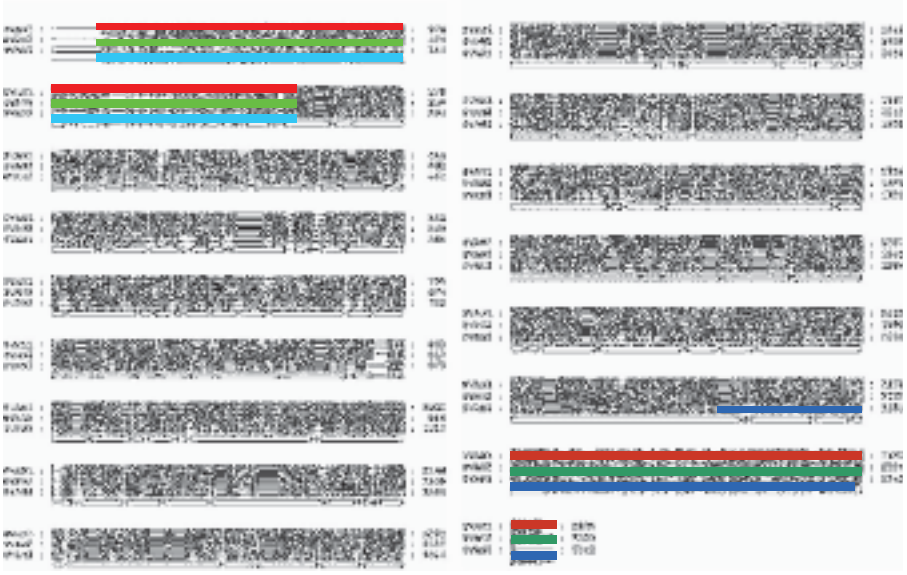


Abbildung 14: Alignment der Nukleinsäuresequenzen der drei Diaminoxidasen mit der Lage aller RNA-Sonden. Die sechs Sequenzbereiche, auf die die Sonden gebaut wurden, sind farbig markiert: **hellrot**: *svao1-1*, **hellgrün**: *svao2-1*, **hellblau**: *svao3-1*, **dunkelrot**: *svao1-2*, **dunkelgrün**: *svao2-2*, **dunkelblau**: *svao3-2*.

Das Ziel der folgenden Klonierung war, beide Bereiche jeder Sequenz zunächst in ein gemeinsames Konstrukt einzubringen. Dieses Konstrukt sollte dann als Matrix-DNA für die *in vitro*-Transkription der RNA-Sonden eingesetzt werden. Nach Transkription mit einer RNA-Polymerase sollte so eine ca. 400 bp lange RNA-Sonde entstehen, die auf Grund ihrer Länge eine ausreichende Menge an DIG-markierten Nukleotiden enthielt. Im Gewebe könnte eine solche Sonde dann nur zur Hälfte an die Ziel-mRNA binden, während die andere Hälfte zwar ungebunden wäre, das Signal auf Grund der enthaltenen DIG-Moleküle allerdings trotzdem verstärken würde. Auf diese Art wäre es möglich, einen Ziel-mRNA-Strang mit zwei Sonden zu hybridisieren, die zusammen für eine intensive Markierung sorgen würden.

Für die Klonierung wurde der Vektor pGEM®-3Z gewählt (s. Kapitel 7.1). Zunächst wurden die sechs Sequenzbereiche mittels Standard-PCR (s. Kapitel 2.6.7.1) mit den Primern aus Tabelle 33 - 35 (s. Kapitel 3.2) amplifiziert. Zuerst sollten die Sequenzfragmente *svao1-1*, *svao2-1* und *svao3-1* mit den Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hind*III in den Vektor kloniert werden. Anschließend sollten in die daraus hervorgehenden Konstrukte die Se-

quenzfragmente *svao1-2*, *svao2-2* und *svao3-2* mit den Restriktionsschnittstellen *BamH*I und *EcoR*I kloniert werden, wie es in Abbildung 15 gezeigt ist.

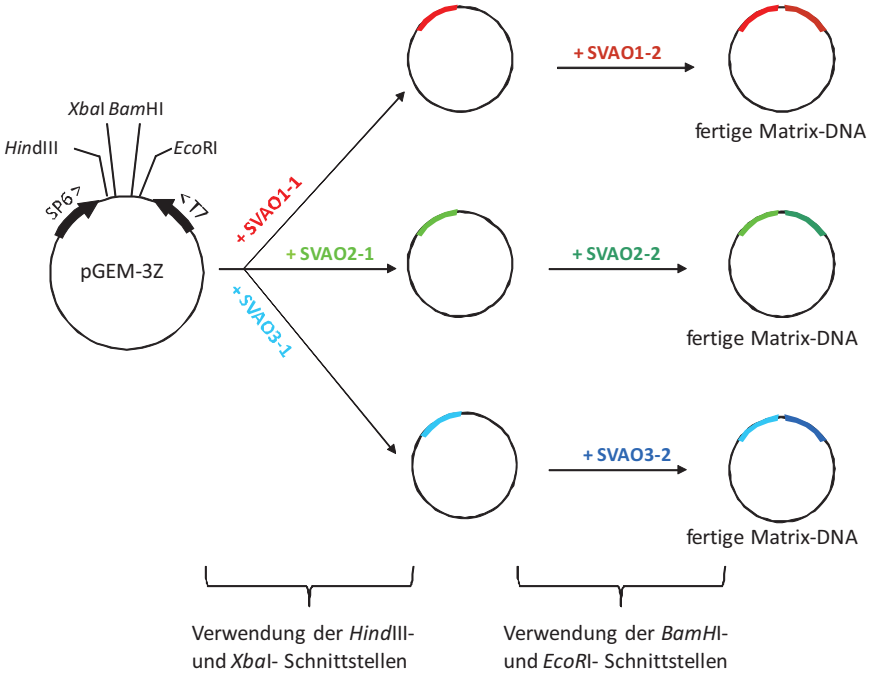


Abbildung 15: Klonierungsschema für Matrix-DNA der *in situ*-Sonden mit zwei Sequenzbereichen

Da die Klonierung von *svao1-1*, *svao2-1* und *svao3-1* in die Konstrukte mit den jeweils zwei. Sequenzbereichen jedoch nicht funktionierte, wurden alle sechs Sequenzen einzeln in pGEM®-TEasy (s. Kapitel 7.1) kloniert. Um für die *in vitro*-Transkription mit den RNA-Polymerasen schnell und einfach Matrix-DNA zur Verfügung zu haben, wurden die Primer der Tabelle 39 entwickelt. Eingesetzt in einer Standard-PCR (s. Kapitel 2.6.7.1) dienten sie zur Vervielfältigung des Bereichs von beiden RNA-Promotoren und der MCS der Konstrukte pDE12 – pDE17 (s. Tabelle 53, Kapitel 7.2).

Tabelle 39: Primer zur Amplifikation der Matrix-DNA für *in situ*-Sonden in pGEM®-TEasy

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DEpGEMTEfor	5'- TATAAATTGTAATACGACTCACTATAGGG -3'	55,5°C
DEpGEMTErev	5'- TATATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAA-3'	

Die *in vitro*-Transkription zur Synthese der DIG-markierten RNA-Sonden wurde wie in Kapitel 2.7.3.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden Sonden mit einer Konzentration von ca. 100 ng/µl hergestellt. In der folgenden Hybridisierungsprozedur (s. Kapitel 2.7.4.2) wurde zum Nachweis eines *svao*-Transkriptes jeweils die Sonde auf den vorderen Sequenzteil mit der Sonde auf den hinteren Sequenzteil gemischt und in einer Endkonzentration von 500 ng/µl Hybridisierungsmix, bzw. 250 ng Einzelsonde pro Mikroliter Hybridisierungsmix eingesetzt.

3.4.2.2 *In situ*-Hybridisierungen

Die Hybridisierung wurde wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben durchgeführt. Zunächst wurde versucht, die drei DAOs in unterschiedlichen Hybridisierungsansätzen einzeln nachzuweisen. Diese Hybridisierungen gegen Transkripte von *svao1*, *svao2* und *svao3* erbrachten kein Signal. Erst als die Sonden gegen Transkripte von *svao1* und *svao3* mit Endkonzentration von insgesamt 500 ng/µl Hybridisierungsmix gemischt wurden, wurden Markierungen sichtbar. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis einer *in situ*-Hybridisierung mit Sonden gegen mRNA-Transkripte von *svao1* und *svao3*. Zu sehen ist ein Querschnitt durch eine ca. 4-6 Wochen alte Wurzel von *S. vernalis.* In Bild A ist ein Schnitt zu sehen, der mit den Antisense-Sonden hybridisiert wurde. Dieser Schnitt zeigt eine deutliche, violett-blaue Markierung. Im Bild B wurde dieselbe Wurzel mit Sense-Sonde hybridisiert. Es sind keine spezifischen Markierungen zu sehen.

Die markierten Zellen der Wurzel, die in Bild A gezeigt wird, liegen im Rindenparenchym außerhalb des Perizykels gegenüber dem Phloem. Es handelt sich um dieselben Gewebebereiche, in denen die HSS lokalisiert wurde (Moll et al., 2002). Da die *in situ*-Markierung nicht mit den Sonden für nur eine Sequenz erzielt werden konnte, ist allerdings nicht eindeutig zu bestimmen, ob mRNA-Transkripte von *svao1* oder *svao3* in denselben Zellen wie die HSS zu finden sind. Die Möglichkeit, dass es sich bei der gesuchten Diaminoxidase mit Lokalisierung in den markierten Zellen um eine Art „Mischform“ zwischen der SVAO1- und

der SVAO3-Sequenz handelt, wird in Kapitel 4.2.2 unter Berücksichtigung weiterer Ergebnisse diskutiert.

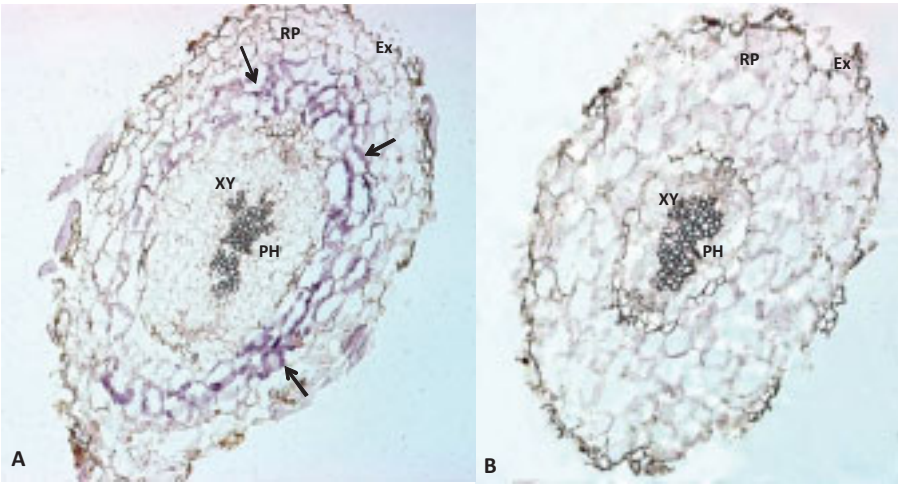


Abbildung 16: Lokalisation von SVAO1 und SVAO3 in *S. vernalis* mittels *in situ*-Hybridisierung. Mikroskopische Vergrößerung 1:200; **A**: Schnitt inkubiert mit Antisense-Sonde; **B**: Schnitt inkubiert mit Sense-Sonde; **Pfeile** weisen auf Markierung; **EX**: Exodermis, **PH**: Phloem, **XY**: Xylem.

Nach erfolgreicher Detektion der HSS in *J. vulgaris* (s. Abbildung 13) und einer oder mehreren diaminoxidaseartigen Sequenzen in *S. vernalis* (s. Abbildung 16) wurde deutlich, dass das Arbeiten mit *J. vulgaris* sehr viel vorteilhafter ist als das mit *S. vernalis*. Die Abbildungen zeigen, dass bei *J. vulgaris* ein sehr viel besserer Erhalt des Parenchymgewebes erreicht wurde. Der Grund ist vermutlich der größere Durchmesser der *J. vulgaris*-Wurzel. Während der Durchmesser der *S. vernalis*-Wurzel nur ca. 0,5 bis 1 mm beträgt, ist der der *J. vulgaris*-Wurzel etwa doppelt so groß. Dies führt zu einer deutlich besseren Handhabung der Wurzel im Rahmen der Einbettung in Paraplast™ und dadurch zu weniger Beschädigung des Gewebes während dieser langen Prozedur. Desweiteren scheinen Schnitte mit größerem Durchmesser besser an den adhäsiv-beschichteten Objektträgern anzuhaften. Dadurch kommt es zu weniger Schädigung des dünnwandigen Parenchym-Gewebes während der *in situ*-Hybridisierung. Ein weiterer Vorteil der *J. vulgaris*-Wurzeln im Vergleich zu den *S. vernalis*-Wurzeln ist, dass die Wurzeln der Sterilkultur-Pflanze von *J. vulgaris* deutlich besser differenziert zu seinen scheinen als die von *S. vernalis* und damit einer Freiland-Pflanze ähnlicher sind. Obwohl für alle Hybridisierungen bei *S. vernalis* ältere, ausgewachsene Wurzelteile verwendetet wurden, zeigten diese ein nicht optimal

ausdifferenziertes Leitbündel. Diese Beobachtung wurde auch schon zuvor in der Arbeitsgruppe gemacht.

Aus diesen Gründen wurde überlegt, auch in den Wurzeln von *J. vulgaris* nach einer DAO mit Beteiligung an der PA-Biosynthese zu suchen. Da jedoch bislang noch keine DAO-Sequenz für *J. vulgaris* bekannt ist, sollte nach dieser durch PCR mit degenerierten Primern gesucht werden (s. Kapitel 3.5).

3.5 Suche nach diaminoxidaseartigen Sequenzen in *Jacobaea vulgaris*

Zur Konstruktion der Primer wurde zunächst ein Alignment mit DAO-Sequenzen (EC 1.4.3.6.) aus folgenden Pflanzen erstellt*: Senecio vernalis* (*svao1* bis *svao3;* alle Denker, 2008), *Eupatorium cannabinum* (Denker 2008)*, Arabidopsis thaliana* (AT4G14940 und AT1G31670), *Brassica juncea* (AF449459.2)*, Pisum sativum* (AB457619.1)*, Lens culinaris* (AAB34918) und *Cicer arietinum* (AJ006052). Auf möglichst hoch konservierte Bereiche der Sequenzen wurden die Primer aus Tabelle 40 konstruiert.

Tabelle 40: Verwendete degenerierte Primer nach IUPAC Ambiguity Code für Nukleotide (Cornish-Bowden, 1985). Nach dem IUPAC Ambiguity Code stehen die folgende Buchstaben stehen für folgenden Nukleotid-Kombinationen: **B:** C, G oder T; **D:** A, G oder T; **H:** A, C oder T; **V:** A, C oder G; **N:** A, C, G oder T; **K:** G oder T; **Y:** A oder G; **S:** G oder C; **W:** A oder T; **M:** A oder C; **I:** Inosit

Name	Sequenz
DE02degfor01	5'-CAITHNCCYAGNTYICCYCA-3'
DE02degfor02	5'-ACYTTIDIGGTYAANCGGGT-3'
DE02degfor03	5'-AGITNITRYAWYAGYATYAA-3'
DE02degrev01	5'-ACNGCNARISYRTCITCNCC-3'
DE02degrev02	5'-DYRTRCCAIANIACDATRTC-3'
DE02degrev03	5'-CATIRNIGGRAARTCYTCYTG-3'

Neben den in Tabelle 40 aufgelisteten Primern wurden auch ein Oligo-dT-Primer (5'-GTC GAC TCG AGA ATT CTT TTT TTT TTT TTT-3', der bereits in Kapitel 2.6.4 erwähnt wurde, und sechs weitere degenerierte Primer verwendet, mit denen die cDNA-Sequenzen der drei SVAOs aus *S. vernalis* gefunden wurden (Denker, 2008).

Die Primer wurden wie in Kapitel 2.6.7.2.1 beschrieben in allen möglichen Kombinationen für PCRs eingesetzt. Es konnten keine Sequenzen mit Homologie zu den SVAO-Sequenzen identifiziert werden. Mögliche Gründe dafür werden in Kapitel 4.2.1 diskutiert.

3.6 Untersuchungen zum Einfluss von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 auf die PA-Biosynthese mittels transgenen *Hairy Root*-Klonen

Die Versuche zur Erstellung von transgenen Pflanzen wurden in Zusammenarbeit mit dem VTT Technical Research Centre Finland in Espoo (Finnland) geplant und durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, die Funktion der drei bekannten DAOs aus *S. vernalis* und deren Einfluss auf die PA-Biosynthese an Hand von RNAi- und Überexpressionsversuchen näher zu untersuchen.

Die RNA*interference*- (RNAi)-Versuche, die in Abbildung 17 schematisch skizziert sind, hatten zum Ziel, transgene *Hairy Root* (HR)-Kulturen zu erzeugen. In diesen Kulturen sollte die Expression von *svao1, svao2 und svao3*, die aus *S. vernalis* identifiziert wurden, einzeln herunterreguliert werden. Hierzu wurden Blätter von *S. vernalis*-Pflanzen mit *Agrobacterium rhizogenes* wie in Kapitel 2.10.3 beschrieben infiziert. Dazu wurden drei unterschiedliche Agrobakterien-Klone verwendet, die RNAi-Konstrukte mit Sequenzbereichen von *svao1*, *svao2* und *svao3* zum Herunterregulieren dieser drei Gene enthielten. In Kapitel 3.6.1.1 wird näher auf den Aufbau dieser RNAi-Konstrukte eingegangen. Anschließend sollte der PA-Gehalt der transgenen HR-Klone untersucht werden. Die Überlegung war, dass das Herunterregulieren einer an der PA-Biosynthese beteiligten DAO zu einer starken Reduktion im PA-Gehalt aller Klone, die durch Infektion mit demselben Agrobakterien-Klon entstanden sind, führen sollte. Dass diese Reduktion auch Schwankungen unterliegt, resultiert vor allem aus der Methode zur Erzeugung der transgenen Klone durch den ungerichteten Einbau der vom *Agrobacterium* übertragenen DNA ins pflanzliche Genom. Die damit verbundenen möglichen unerwarteten Effekte werden im Kapitel 4.2.3 ausführlich diskutiert.

Der Versuchsansatz, die zu untersuchenden DAO-Gene mittels RNAi herunterzuregulieren, wurde gewählt, da dies eine Möglichkeit ist, in einer Pflanze wie *S. vernalis*, deren Genom nicht entschlüsselt ist, Genregulationen vorzunehmen. Zur Untersuchung eines Gens einer Pflanze, deren Genom bereits vollständig aufgeklärt ist, werden sogenannte *Knock-Out*-Pflanzen bevorzugt verwendet. Bei diesen Mutanten wurde das zu untersuchende Gen deletiert oder zerstört. Dies führt zu einer vollständigen Ausschaltung des Ziel-Gens, was durch Abbau der mRNA des Zielgens bei RNAi nicht erreicht werden kann.

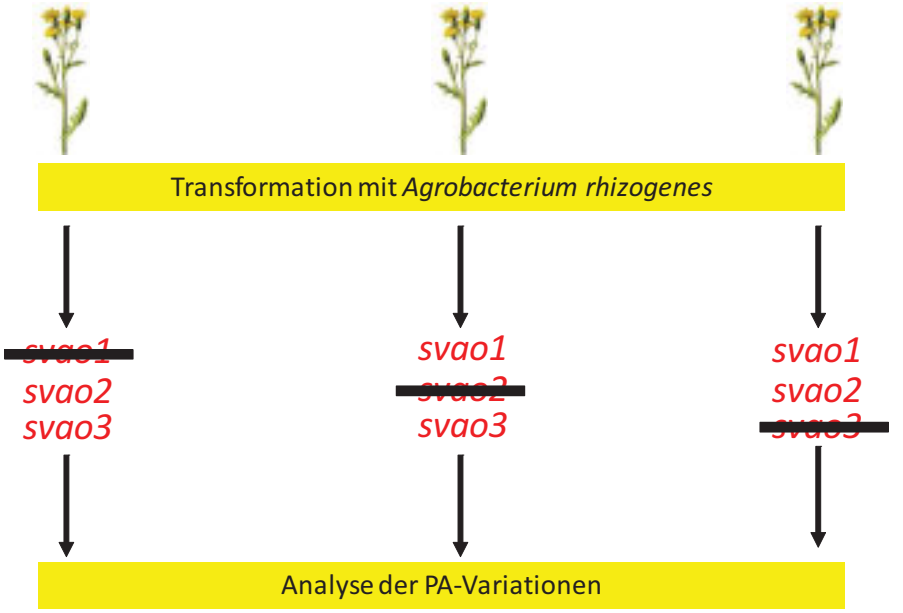


Abbildung 17: Schema zum Aufbau der RNAi-Versuche. *S. vernalis* wurde mittels *A. rhizogenes* einzeln mit drei RNAi-Konstrukten zum Herunterregulieren der Expression von *svao1*, *svao2* und *svao3* transformiert. Die Klone der drei entstandenen transgenen Kulturen wurden auf Veränderungen im PA-Gehalt in Bezug auf die Kontroll-HRs untersucht.

Bei den Überexpressions-Versuchen (s. Abbildung 18) sollte der gesamte proteinkodierende Bereich aller drei *svao*-Sequenzen sowohl in *S. vernalis* als auch in *N. tabacum* überexprimiert werden. Die dazu verwendeten Überexpressions-Konstrukte werden in Kapitel 3.6.1.2 vorgestellt. Transformiert wurde ebenfalls mittels *A. rhizogenes*. Nach Extraktion der Alkaloide aus den transgenen HR-Klonen wurden diese auf qualitative und quantitative Veränderungen des Alkaloid-Spektrums untersucht.

Bei einem starken Anstieg des PA-Gehalts in den *Senecio*-HR-Klonen in einer Kultur könnte vermutet werden, dass eine DAO mit Beteiligung an der PA-Biosynthese in dieser Kultur überexprimiert worden wäre. Dieses Ergebnis ist allerdings nur zu erwarten, wenn die überexprimierte DAO eine Art „Flaschenhals“ in der PA-Biosynthese darstellt, das heißt, wenn das Produkt der DAO-katalysierten Reaktion in begrenzter Menge in der PA-Biosynthese zur Verfügung steht und eine Konzentrationssteigerung dieses Produktes zu einer erhöhten PA-Konzentration führen würde. Diese Überlegung wird in Zusammenhang mit allen Ergebnissen in Kapitel 4.2.3 ausführlicher diskutiert.

Die Transformation von *N. tabacum* wurde durchgeführt, um über eine mögliche Veränderung des Nikotin-Alkaloid-Spektrums auf weitere Eigenschaften und Funktionen der SVAOs schließen zu können. Sowohl die PA-Biosynthese (Böttcher et al., 1994), als auch die Nikotin-Biosynthese (Leete, 1967; Mizusaki et al., 1968) gehen aus dem Polyamin Putrescin hervor. Der nächste Metabolit, der in der PA-Biosynthese aus der Umsetzung von Putrescin durch das Eingangsenzym der PA-Biosynthese, der Homospermidin-Synthese (HSS), hervorgeht ist Homospermidin (Böttcher, 1993; Böttcher et al., 1994). Interessanterweise kommt Homospermidin in geringer Menge in vielen Pflanzen vor, so auch in Tabak (Ober et al., 2003a). Es wird vermutet, dass Homospermidin, das über mehrere, noch nicht vollständig aufgeklärte Schritte zur Necinbase umgesetzt wird (Khan und Robins, 1985; Spenser, 1985), das Substrat der gesuchten DAO ist. Würde man in Tabak also eine DAO fremdexprimieren, die dieses Homospermidin zu einer PA-Vorstufe umsetzt, wäre diese Vorstufe möglicherweise im untersuchten Alkaloid-Spektrum sichtbar. Aus diesem Grund wurde versucht, die drei SVAOs auch in *N. tabacum* zu exprimieren.

Verglichen wurden die PA-Spektren aller transgenen HR-Klone mit solchen HR-Klonen, die durch Transformation von *S. vernalis* und *N. tabacum* mit Agrobakterien ohne Fremdgen in einem zusätzlichen binären Pflanzenvektor entstanden sind. Zur sprachlichen Vereinfachung werden diese Kulturen im Folgenden Kontroll-HRs genannt. Desweiteren wird jede einzelne HR, die durch ein Transformationsereignis entstanden ist, „Klon“ genannt. Alle HR-Klone, die durch Transformation einer Versuchspflanze durch Agrobakterien mit einem bestimmten Konstrukt oder mit nichttransformierten Agrobakterien entstanden sind, werden unter dem Begriff „Kultur“ zusammengefasst.

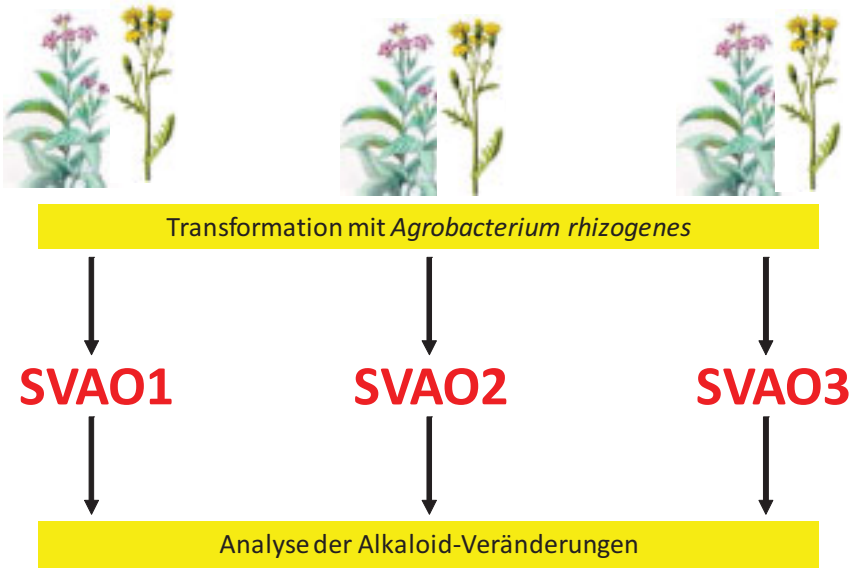


Abbildung 18: Schema zum Aufbau der Überexpressions-Versuche. *N. tabacum* und *S. vernalis* wurden mittels *A. rhizogenes* einzeln mit drei Überexpressions-Konstrukten zum Überexprimieren von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 transformiert. Die entstandenen transgegen Klone wurden auf Veränderungen im Alkaloid-Gehalt in Bezug auf die Kontroll-HRs untersucht.

3.6.1 Klonierung der RNAi- und Überexpressions-Konstrukte

3.6.1.1 Erzeugung der RNAi-Konstrukte

Zum Herabregulieren der drei DAO-kodierenden Gene in *S. vernalis* wurde zunächst ein ca. 500 bp langer Bereich in jeder Sequenz gesucht, der möglichst wenig Übereinstimmung mit einer anderen *svao*-cDNA-Sequenz aufweist. Wie auch schon in Kapitel 3.4.1.2 beschrieben wurde, ist das auf Grund der großen Übereinstimmungen der DAO-Sequenzen auf Nukleinsäureebene schwierig. Die Sonde bei der *in situ*-Hybridisierung sollte für eine intensive Markierung in großen Teilen mit der Ziel-mRNA im Gewebe hybridisieren. Bei sehr ähnlichen mRNAs würde die Sonde jedoch auch an diese binden und damit die Ergebnisse verfälschen. Im Gegensatz dazu wird die RNA des DAO-Sequenzbereiches, die durch Translation des ins pflanzliche Genom integrierte RNAi-Konstrukts entsteht und eine Haarnadelstruktur ausbildet, im Zuge des *Post-Transcriptional Gene Silencing* (PTGS) in 21- bis 23 bp-Fragmente abgebaut (van Blokland et al., 1994; s. auch Kapitel 4.2.3). Je mehr dieser kleinen Fragmente mit der Ziel-mRNA hybridisieren, desto vollständiger wird diese abgebaut und desto besser wird das Zielgen herunterreguliert. Aus diesem Grund sollten bei den RNAi-Versuchen kleinere Abschnitte

mit Übereinstimmungen der Sequenzen weniger ins Gewicht fallen als bei der *in situ*-Hybridisierung.

Für alle drei DAOs wurden Sequenzbereiche, die am 5'-Ende des unkodierenden Bereichs beginnen und im kodierenden Bereich enden, gewählt (s. Abbildung 19). Zur Amplifikation dieser Bereiche und zur Einführung der *attB*-Rekombinationsstellen zur Klonierung in die binären Gateway®-Pflanzenvektoren (s. Kapitel 2.9) wurden Primer gebaut, die in Tabelle 41 aufgeführt sind. Das Primerpaar DERNAi1for/rev wurde in einer Standard-PCR (s. Kapitel 2.6.7.1) zur Amplifikation des RNAi-Bereiches vom *svao1*-cDNA-Transkript eingesetzt. Das zweite Primerpaar DERNAi2for/rev diente der Amplifikation des RNAi-Bereiches vom *svao2*-cDNA-Transkript in der gleichen Standard-PCR. Der RNAi-Bereich vom cDNA-Transkript von *svao3* lies sich unter Verwendung des Primerpaars DERNAi3for/rev mit Accu*Taq*™LA-DNA-Polymerase amplifizieren.

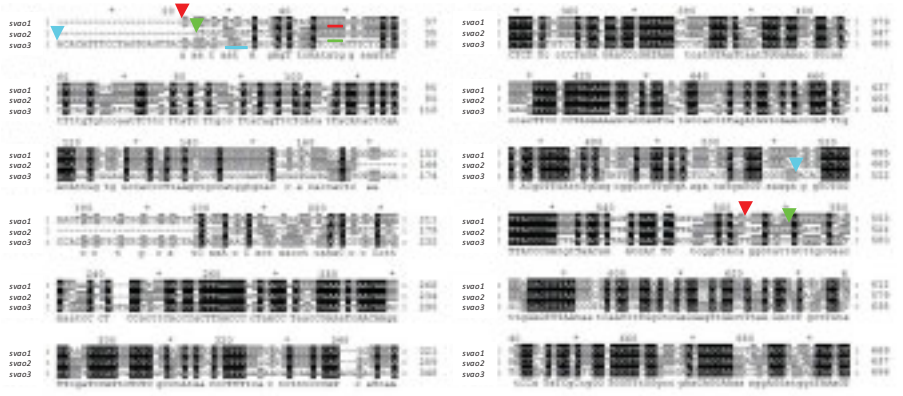


Abbildung 19: Ausschnitt eines Nukleinsäure-Alignments der cDNA-Sequenzen von *svao1*, *svao2* und *svao3* mit der Lage der für die RNAi-Konstrukte verwendeten Sequenz-Bereiche. Die Pfeilköpfe markieren Anfang und Ende der für die RNAi-Konstrukte verwendeten Sequenzbereiche; rot: RNAi-Bereich von *svao1*; grün: RNAi-Bereich von *svao2*; blau: RNAi-Bereich von *svao3*; die unterstrichenen Sequenzbereiche markieren die jeweiligen Start-Kodons für SVAO1, SVAO2 und SVAO3.

Tabelle 41: Primer für die RNAi-Konstrukte. Durchgehend unterstrichene Bereiche markieren die *attB1*-Rekombinationsstellen; gepunktet unterstrichene Bereiche markieren die *attB2*-Rekombinationsstellen; **fett gedruckte Bereiche** markieren SVAO-Sequenzbereiche; die Primerpaare DERNAi1for/rev, DERNAi2for/rev und DERNAi3for/rev wurden zur Amplifikation des jeweiligen *svao1/2/3*-Sequenzbereiches für die RNAi-Konstrukt verwendet.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DERNAi1for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**ACAATTTATTCAAGAGAGT-TAG**-3'	50,1°C
DERNAi1rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CTATAGCCCTATGCAGGTCA-TAC**-3'	
DERNAi2for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**GTGACAAGATCGAGTATC**-3'	50,1°C
DERNAi2rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CAAATACATGTGTAGCCGATA CAAG**-3'	
DERNAi3for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**ACACATTTCCTAGTGAGT-TAC**-3'	52,2°C
DERNAi3rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**ACCGACATCAACTGGAGTC-AC**-3'	

Die erhaltenen Amplifikate wurden wie in Kapitel 2.9 beschrieben mit Hilfe des Gateway®-Systems zuerst in den Donor-Vektor pDONR221 und anschließend in den Destination-Vektor pK7GWIWG2D(II),0 integriert. Diese Form der Klonierung war sehr schnell und effizient. Die entstandenen Klone enthielten die in Abbildung 20 dargestellten Konstrukte, die die Herabregulation der DAO durch mRNA-Abbau verursachen sollten.

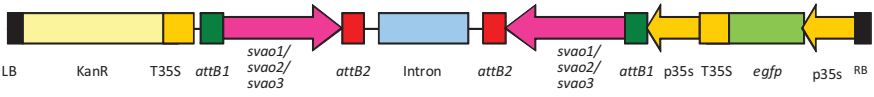


Abbildung 20: Schema der RNAi-Konstrukte. LB: *Left-Border*, **KanR**: Kanamycin-Resistenz-Gen, **t35S**: 35S-Terminator, ***attB1/2***: Rekombinationsstellen, ***svao1-3*:** Sequenzteile von *svao1-3*, **p35s**: 35S-Promotor, ***egfp***: Gen für das *enhanced green fluorescent protein*, **RB**: *Right-Border.*

Im Mittelstück befinden sich zwei gleiche Bereiche der jeweiligen Sequenz, die gegensätzlich orientiert sind und sich zwischen den *attB*-Rekombinationsstellen befinden. Zwischen diesen beiden Sequenzbereichen liegt ein nichtkodierendes Intron. Nach Integration der Klonierungskassette in das pflanzliche Genom und Transkription bildet dieser Bereich eine sogenannte „Haarnadel-Struktur" aus, die über mehrere Schritte letztendlich zur Blockade der Translation der mRNA des Zielgens führt (s. auch Kapitel 4.2.3). Dieser Mittelteil des Konstrukts liegt unter der Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors (kurz 35S-Promotor). Der 35S-Promotor ist ursprünglich aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus isoliert worden (Odell et al., 1985) und ist ein stark konstitutiv exprimierter Promotor, der zu starker Gen-Expression in allen Organen von dikotylen Pflanzen führt. Desweiteren befindet sich in-

nerhalb der Klonierungskassette, die durch die *Left-Border* (LB) und *Right-Border* (RB) begrenzt wird, ein *enhanced green fluorescent protein*- (*egfp*-) Gen und das Gen für die Kanamycin-Restistenz. Das *egfp*-Gen ist eine Weiterentwicklung des gängigen *green fluorescent protein*- (*gfp*-)Gens, das für ein unter UV-Licht grün fluoreszierendes Protein kodiert. Dieses Protein wurde aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert (Shimomura et al., 1962) und bietet nach Fusion mit anderen Proteinen die Möglichkeit, diese in lebenden Zellen mikroskopisch unter UV-Licht zu beobachten. Die Kanamycin-Resistenz, die ebenfalls mit der Klonierungskassette ins pflanzliche Genom übertragen wird, soll eine Selektion der erfolgreich transformierten Pflanzen ermöglichen. Der Vektor pK7GWIWG2D(II),0 wurde anderen RNAi-Vektoren vorgezogen, da er sich mit dem Gateway®-System für mehrere Konstrukte zeitsparend klonieren ließ (Karimi et al., 2007). Desweiteren wurde er in jüngster Vergangenheit bei Transformationen mit *A. rhizogenes* des Stammes LBA9402, der auch in den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt werden sollte, mit Erfolg eingesetzt (Schmidt et al., 2007).

Zur Überprüfung wurden die jeweiligen Entry-Klone (pDE08 - pDE10, s. 53, Kapitel 7.2) kontrollsequenziert. Alle drei SVAO-Sequenzfragmente stimmten mit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe (Denker, 2008) überein. Da die folgende LR-Rekombination in pK7GWIWG2D(II),0 sehr effizient verläuft und nicht zu einer Veränderung der rekombinierten Kassette führen kann, mussten die daraus resultierenden RNAi-Klone (pDE19 – pDE21, s. Tabelle 53, Kapitel 7.2) nicht mehr sequenziert werden.

3.6.1.2 Erzeugung der Überexpressions-Konstrukte

Bei den Überexpressions-Versuchen sollten alle drei DAO-Sequenzen in den beiden Versuchspflanzen *S. vernalis* und *N. tabacum* überexprimiert bzw. fremdexprimiert werden. Dazu wurden Primer auf den kompletten proteinkodierenden Bereich der *svao*-Sequenzen gebaut. Die Primer sind in Tabelle 42 dargestellt. Das Primerpaar Overex1for und Overex1+2rev wurde in PCR-Ansätzen zur Amplifikation des Transkriptes von *svao1* eingesetzt. Mit dem Primerpaar Overex2for und Overex1+2rev wurde versucht, das cDNA-Transkript von *svao2* zu amplifiziern. Das Primerpaar Overex3for/rev diente zur Amplifikation des Transkriptes von *svao3*. Diese Primer enthielten, ebenso wie bei den RNAi-Versuchen (s. Kapitel 3.6.1.1), Rekombinationsstellen für das Gateway®-System. Die Amplifikation der Transkripte von *svao1* und *svao3* war problemlos. Hingegen konnte

weder aus der cDNA von *S. vernalis*, noch von einem SVAO2-Expressionskonstrukt (Denker, 2008) der proteinkodierende Bereich von *svao2* amplifiziert werden. Daher konnten bei den Überexpressions-Versuchen die Auswirkungen einer überexprimierten SVAO2 nicht untersucht werden.

Tabelle 42: Primer für die Überexpressions-Konstrukte. Durchgehend unterstrichene Bereiche markieren die *attB1*-Rekombinationsstellen; gepunktet unterstrichene Bereiche markieren die *attB2*-Rekombinationsstellen; **fett gedruckte Bereiche** markieren *svao*-Sequenzbereiche; doppelt unterstrichene Bereiche markieren Start-oder Stopp-Kodons; die Primerpaare Overex1for/Overex1+2rev und Overex3for/rev wurden zur Amplifikation der *svao1/3*-Transkripte für die Überexpressions-Konstrukte verwendet; mit dem Primerpaar Overex2for/Overex1+2rev wurde versucht, *svao2*-Transkripte für das Überexpressions-Konstrukt zu amplifizieren; ***:** Mit dem Primerpaar Overex2for und Overex1+2rev wurden PCRs mit einer Annealing-Temperatur zwischen 50°C und 70°C durchgeführt. Es wurde jedoch kein Amplifikat erhalten.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
Overex1for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTT**ATG**AACATTGGATGTGCC-**ACC**-3'	55°C
Overex1+2rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC**CTA**CTAGAGTGCGGCCGCAT-**AAGA**-3'	
Overex2for*	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTT**ATG**AACATTGGATGTGCC-**ACC**-3'	
Overex3for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTT**ATG**GATGCAAGAAATCTC-**ATC**-3'	55°C
Overex3rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC**CTA**AGCAGAAGAAGCGGCA-**TTACAAAC**-3'	

Die Rekombination der proteinkodierenden Bereiche der cDNA-Transkripte von *svao1* und *svao3* in den Donor-Vektor pDONR221 wurde wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben durchgeführt. Die beiden DAO-cDNA-Sequenzen der daraus resultierenden Entry-Klone wurden mittels LR-Rekombination (s. Kapitel 2.9.4) in den binären Pflanzenvektor pH7WG2D,1 gebracht. Auch bei der Wahl dieses Vektors war die schnelle, effiziente Klonierung mittels *attB*-Rekombination und positive Erfahrungen des Gastinstitutes (Häkkinen et al., 2007) ausschlaggebend. Es entstanden die Expressionsklone pDE22 und pDE24 (s. Tabelle 53, Kapitel 7.2), die die in Abbildung 21 skizzierte Klonierungskassette aufweisen:

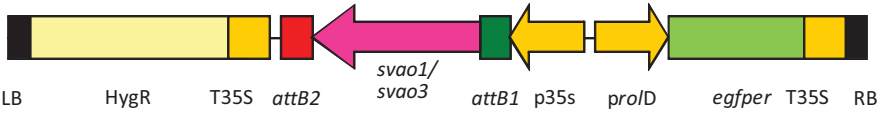


Abbildung 21: Schema der Überexpressions-Konstrukte. LB: *Left-Border*, **HygR**: Hygromycin-Resistenz-Gen, **t35S**: 35S-Terminator, ***attB1/2***: Rekombinationsstellen, **p35s**: 35S-Promotor, ***prolD***: *rol*D-Promotor, ***egfper***: Gen für das *enhanced green fluorescent protein endoplasmatic reticulum-targeting*, **RB**: *Right-Border.*

Der offene Leserahmen der *svao*-Gene steht ebenfalls unter der Kontrolle des 35S-Promotors, der schon in den RNAi-Konstrukten verwendet wurde (s. Kapitel 3.6.1.1). Desweiteren befindet sich in der Transformationskassette ein Gen für EGFP mit einer Signalsequenz aus Calreticulin für das endoplasmatische Retikulum (EGFPER). Calreticulin ist ein Protein, das Teil eines Proteinkomplexes im Lumen des endoplasmatischen Retikulums der Eukaryoten ist und dort als Chaperon bei der Faltung von Glykoproteinen wirkt. Als Fusionsprotein kann dieses Aufschluss über das Wachstumstadium von transgenen Tabak-Zellkulturen geben (Persson et al., 2002). Das *egfp*-Gen befindet sich unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten *rol*D-Promotors, der im *A. rhizogenes* die Expression des *rol*D-Gens auf dem R_i-Plasmid kontrolliert. Das Gen für eine Hygromycin-Resistenz ermöglicht die Selektion der transgenen Pflanzen mit dem herbizid wirkenden Hygromycin B.

Die entstandenen Entry-Klone (pDE25 und pDE27; s. Tabelle 53, Kapitel 7.2) wurden kontrollsequenziert. Dabei zeigte sich, dass die cDNA von *svao1* zu 100 % mit der der *svao1* von Denker (Denker, 2008) übereinstimmt. Abweichungen gab es jedoch bei der cDNA von *svao3*: Die Sequenzierung zeigte, dass sich pDE27 in 14 Basen von *svao3* unterscheidet. Auf Proteinebene führt das zu fünf veränderten Aminosäuren, wie im Alignment in Abbildung 22 zu sehen ist.
Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der in pDE27 befindlichen Sequenz um ein Mitglied der SVAO3-Familie handelt (Denker, 2008). Denker hatte festgestellt, dass es sich bei der dritten identifizierten Sequenz, SVAO3, um eine Gen-Familie handelt. Demnach exprimiert *S. vernalis* in den unterschiedlichen Pflanzenorganen (Blatt und Wurzel) mindestens drei Mitglieder dieser Familie. Diese stimmen zu 98,0 %, bzw. 99,8 % mit der zuerst aus dem Blatt identifizierten SVAO3 überein (Denker, 2008). Daher wird das Protein, das durch pDE27 kodiert wird, weiterhin SVAO3 genannt. Ein weiteres Mitglied dieser Gen-Familie wurde vermutlich im Rahmen der heterologen Expression von SVAO3 in *E. coli* identifiziert (s. Kapitel 3.1.1).

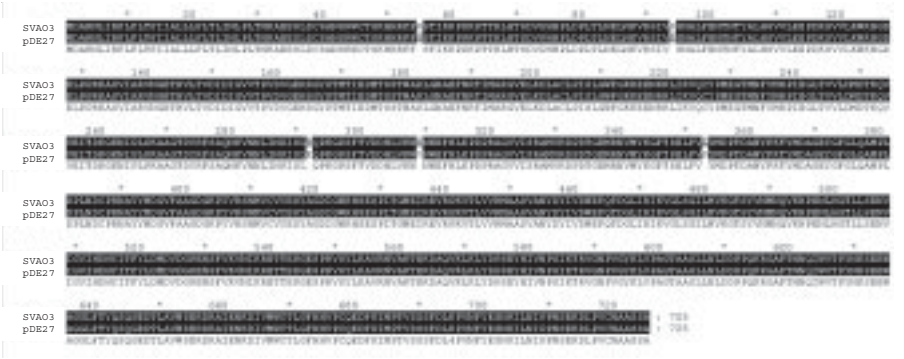


Abbildung 22: Alignment der Aminosäure-Sequenzen von SVAO3 (Denker, 2008) und pDE27. SVAO3: Aminosäure-Sequenz von SVAO3, **pDE27**: Aminosäure-Sequenz der im Rahmen der Pflanzentransformations-Versuche identifizierten SVAO3.

Die in Kapitel 3.6.1.1 und 3.6.1.2 erwähnten RNAi- und Überexpressions-Klone pDE19, pDE20, pDE21, pDE22 und pDE24 wurden wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben in Zellen des *A. rhizogenes*-Stammes LBA9402/12 transformiert. Der Transformationserfolg wurde mittels PCR kontrolliert (s. Kapitel 2.10.2). Jeweils ein Klon pro Konstrukt wurde für die folgenden Pflanzentransformationen verwendet. Desweiteren wurden *S. vernalis* und *N. tabacum* auch mit *A. rhizogenes* infiziert, der zuvor nicht mit einem binären Pflanzenvektor transformiert worden war. Die PA-Gehalte aller erzeugten Überexpressions- und RNAi-Klone wurden mit diesen HR-Klonen verglichen, die im Folgenden Kontroll-HRs genannt werden. Diese Kontroll-HR-Klone wurden herkömmlichen Wurzelorgankulturen (WOKs) für den Vergleich mit den RNAi- und Überexpressions-HR-Klonen vorgezogen, da somit alle untersuchten Klone die bei der Transformation mitübertragenen agrobakterieneigenen *rol*-Gene des R_i-Plasmids aufwiesen. *rol*-Gene scheinen unter anderem Einfluss auf den Sekundärstoffwechsel zu haben (Kiselev et al., 2007; Shkryl et al., 2008). Der Einfluss der *rol*-Gene wird in Kapitel 4.2.3 noch ausführlicher diskutiert.

3.6.2 Etablierung der Transformations-Methode

Bisher wurde in der Literatur noch keine Transformation von *S. vernalis* beschrieben. Deshalb wurde zuerst eine geeignete Transformations-Methode entwickelt.

Die in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte Methode der Transformation von *J. vulgaris* durch *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) wurde durch Abd Elhady eingeführt (Abd Elhady, 2006). Bei dieser Methode werden Pflanzenteile mit *A. tumefaciens* infiziert.

Durch Übertragung der T-DNA des *tumor inducing* (T_i)-Plasmides entsteht ein transgener Kallus, der neben den agrobakterieneigenen Genen auch die in die T-DNA integrierte Fremd-DNA des binären Pflanzenvektors enthält. Aus diesem Kallus kann durch Hormonzugabe eine vollständige transgene Pflanze regeneriert werden. Diese Methode wies jedoch den Nachteil auf, dass innerhalb mehrerer Monate nur sehr wenige transgene Pflanzen erzeugt werden konnten. Bei Verwendung dieser Transformations-Methode hätte zudem für die PA-Analyse (s. Kapitel 2.11.6) und die Expressions-Analyse (s. Kapitel 2.6.7.2.3) zu wenig Material der transgenen Pflanzen zur Verfügung gestanden.

Anders stellt sich eine Transformation mit *A. rhizogenes* dar. Bei der Übertragung der DNA von *A. rhizogenes* wird ein Teil des sogenannten R_i-Plasmids übertragen, das in der infizierten Zelle schon nach ca. 10 Tagen das Wachstum von feinen Wurzeln hervorruft (s. Abbildung 23). Diese Wurzeln werden auf Grund ihrer stark verzweigten Oberfläche *Hairy roots* (HRs) genannt. Desweiteren wird die T-DNA des binären Pflanzenvektors mit der darin integrierten Fremd-DNA übertragen. Die transgenen Wurzeln enthalten daher neben dem ursprünglichen pflanzlichen Genom auch die T-DNA des *root inducing* (R_i)-Plasmids von *A. rhizogenes* mit den *rol*-Genen und die Fremd-DNA des binären Pflanzenvektors. Diese Wurzeln, die direkt aus der infizierten Stelle wachsen, können nach einigen Tagen vom Blatt abgetrennt werden. Sie wachsen schnell und erzeugen so in kurzer Zeit große Mengen an Wurzelmaterial, was auch zur Produktion biogener Arzneistoffe genutzt wird (Guillon et al., 2006; Hu und Du, 2006).

Gerade für *S. vernalis* als Vertreter der Asteraceae stellt die Transformation mit *A. rhizogenes* eine besonders effiziente Transformations-Methode dar. Die HSS wurde in allen bisher untersuchten Vertretern der Asteraceae (*S. vernalis, Eupatorium cannabinum* und *J. vulgaris*) in den Wurzeln lokalisiert (Moll et al., 2002; Anke et al., 2004; Niemüller, 2007). Desweiteren ist seit langem bekannt, dass Wurzelorgankulturen von Pflanzen aus der Familie der Asteraceae ohne weitere Zusatzstoffe wie zum Beispiel Pflanzenhormone PAs bilden (Hartmann und Toppel, 1987; Hartmann et al., 1988; Hartmann, 1994). Mit der Transformation mit *A. rhizogenes* entfiel somit die langwierige, schwierige und teure Phase der Regeneration der transgenen Kalli zu Pflanzen, die bei Transformation mit *A. tumefaciens* notwendig ist.

Die Transformation mittels *A. rhizogenes* wurde am VTT Technical Research Centre Finland, Espoo, durchgeführt. Das verwendete Protokoll war für die Transformation von *N. tabacum* optimiert (Häkkinen et al., 2007). Aus diesem Grund wurde es für die Verwendung von *S. vernalis* zunächst angepasst. Im Gegensatz zu *N. tabacum* besitzt *S. vernalis* einen rosettigen Wuchs und ca. 3 bis 5 cm lange, fiederspaltige Blätter mit einem schmalen Blattstiel. Die Beobachtung, dass Infektionen des oberen Blattstiels sehr effizient sind, ist in vielen Arbeitsgruppen gemacht worden (Metz et al., 1995; Vanhala et al., 1995; Li et al., 2008; Sriskandarajah et al., 2008; Wang et al., 2008). Beim ursprünglichen Protokoll wurden die mit *Agrobacterium* infizierten Blätter auf Medium-Platten gelegt. Da die *Senecio*-Blätter jedoch einen sehr schmalen Bereich zwischen Blattstiel und Blattrand aufweisen, breiteten sich die Agrobakterien vom Blattstiel schnell auf die Medium-Platten aus, was innerhalb kürzester Zeit zu einem Überwachsen der Agrobakterien über das Blatt führte. Dieses Überwachsen löst nicht nur ein Welken des Blattes aus, sondern kann auch zu Mehrfach-Infektionen und damit zu Mehrfach-Integrationen der Klonierungskassette in die infizierte Zelle führen. Mehrfach-Integrationen führen zu vielen unkalkulierbaren Effekten, die in Kapitel 4.2.3 noch diskutiert werden. Aus diesem Grund wurden bei späteren Infektionen die untersten 1,5 cm des Blattstiels nicht infiziert und die Blätter nach der Infektion in Kästen mit Medium gesteckt. Auf diese Weise blieb das Medium agrobakterienfrei, was zu einer erhöhten Vitalität der Blätter nach der Infektion und damit zu einem schnelleren HR-Wachstum führte.

Es wurde beobachtet, dass die Wurzelbildung bei *Arabidopsis*-Keimlingen auf Medien mit einem Nitratgehalt von über 50 mM deutlich verlangsamt ist (Zhang et al., 1999). Das für die Kultivierung der HRs zunächst verwendete MSOH-Medium besitzt einen Nitrat-Gehalt von ca. 80 mM (Murashige und Skoog, 1962). Als festgestellt wurde, dass die entstandenen HRs sehr langsam wuchsen, wurde deshalb zu einem nitratärmeren Medium, GamborgB5mod, gewechselt (Gamborg et al., 1968). Dieses Medium enthält nur ca. 25 mM Gesamtnitrate, was sich in einem deutlich schnelleren Wurzelwachstum bemerkbar machte. Desweiteren wird dieses Medium mit Gelrite®, einem hochgereinigten, natürlichen Heteropolysaccharid hergestellt. Gelrite® hat den Vorteil, dass es klar polymerisiert und damit Bakterienkolonien und feine Wurzeln auf den Medien-Platten leicht sichtbar sind.

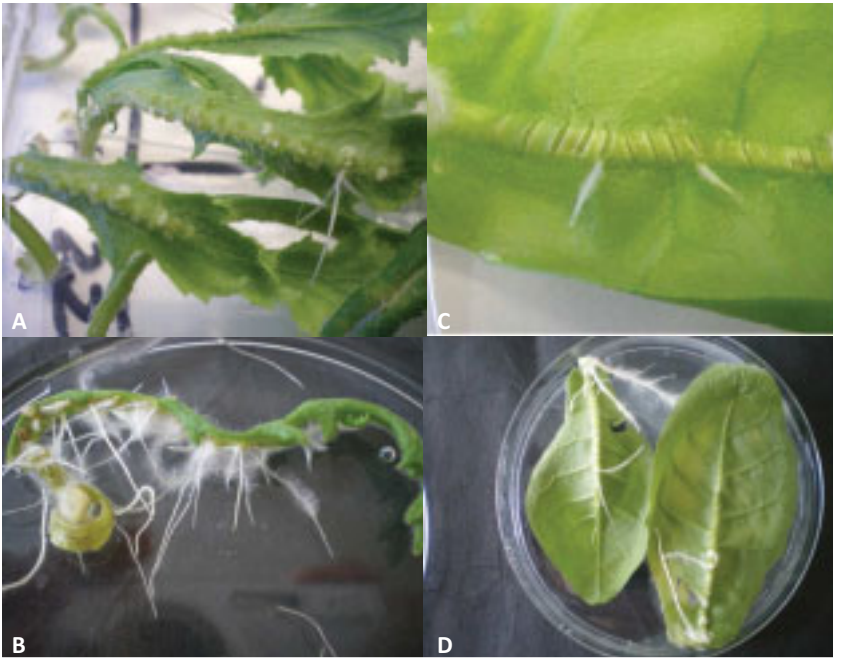


Abbildung 23: Mit *A. rhizogenes* infizierte Blätter reagieren auf die Infektion mit Bildung von HRs. A: *S. vernalis*-Blätter mit beginnendem HR-Wachstum; **B**: *S. vernalis*-Blatt mit fortgeschrittenem HR-Wachstum, **C**: Tabak-Blatt mit beginnendem HR-Wachstum, **D**: Tabak-Blätter mit fortgeschrittenem HR-Wachstum.

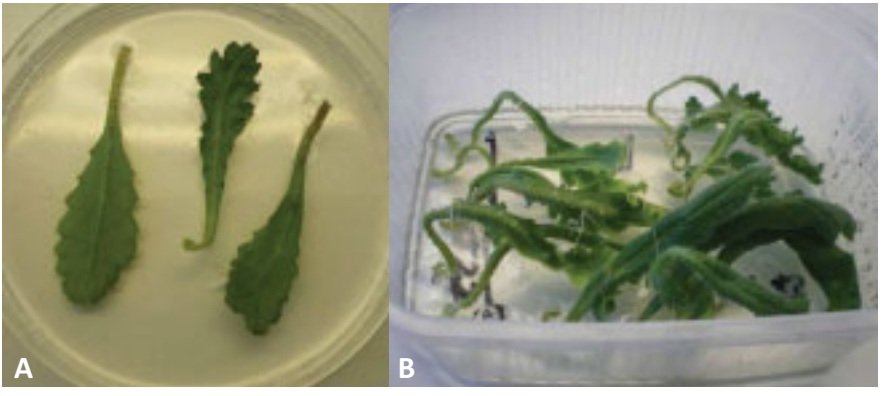


Abbildung 24: Kultivierung der infizierten *Senecio*-Blätter. A: *S. vernalis*-Blätter, die auf einer MSOH-Medium-Platte kultiviert wurden, **B**: *S. vernalis*-Blätter, die im Kunststoffkasten mit GamborgB5mod-Medium kultiviert wurden.

3.6.2.1 Etablierung der Transformationsmethode mittels GUS-Tests

Um die Methode der Transformation von *S. vernalis* mit *A. rhizogenes* zu etablieren, wurden zunächst *Senecio*- und Tabak-Pflanzen mit Agrobakterien infiziert, die ein GUS-Konstrukt enthielten. Das GUS-Konstrukt wurde vom VTT zur Verfügung gestellt. Die Klonierungskassette dieses Konstrukts ist in Abbildung 25 schematisch skizziert.

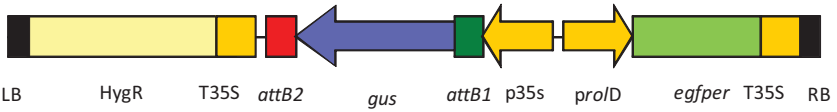


Abbildung 25: Schema des GUS-Konstrukts. LB: *Left-Border*, **HygR**: Hygromycin-Resistenz-Gen, **t35S**: 35S-Terminator, ***attB1/2***: Rekombinationsstellen, *gus*: β-Glucuronidase-Gen, **p35s**: 35S-Promotor, ***prolD***: *rol*D-Promotor, ***egfper***: Gen für das *enhanced green fluorescent protein endoplasmatic reticulum-targeting*, **RB**: *Right-Border.*

Das GUS-Konstrukt besteht aus einem β-Glucuronidase-Gen (Novel und Novel, 1973), das zwischen die *attB*-Rekombinationsstellen des Überexpressions-Vektor pH7WG2D,1 kloniert wurde. Es ist vom Aufbau mit den Konstrukten zur Überexpression von SVAO1 und SVAO3 in *S. vernalis* und *N. tabacum* identisch (s. Abbildung 21, Kapitel 3.6.1.2). Das β-Glucuronidase-Gen steht unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors. Desweiteren wird eine Hygromycin-Resistenz an die erfolgreich transformierten Pflanzen übermittelt. Eine optische Kontrolle des Transformationserfolges ist durch einen Nachweis der Expression des EGFPs unter UV-Licht möglich. Das dafür nötige *egfp*-Gen steht unter der Kontrolle des konstitutiven *rol*D-Promotors, der bereits in Kapitel 3.6.1.2 vorgestellt wurde. Begrenzt wird die Klonierungskassette durch die *Left-Border* und die *Right-Border*.

Die aus der Transformation mit *A. rhizogenes* mit dem GUS-Konstrukt hervorgegangenen HR-Klone wurden mittels PCR (s.Kapitel 3.6.3.2) auf die Anwesenheit des agrobakterieneigenen *rol*B-Gens, die Integration der Fremd-DNA über die *attB*-Rekombinationsstellen und die Abwesenheit persistenter Agrobakterien über das *virD1*-Gen untersucht. Von sieben untersuchten *Senencio*-GUS-Überexpressions-Klonen, wies einer das *rol*B-Gen und die Fremd-DNA auf. Acht der neun getesteten Tabak-GUS-Überexpressions-Klone wiesen ebenfalls diese beiden Gene auf. Diese neun Klone wurden anschließend dem in Kapitel 2.11.4 beschriebenen GUS-Test unterzogen. Bei diesem Test hydrolysiert die in den transformierten HRs heterolog exprimierte β-Glucuronidase X-Gluc, ein glykosiliertes Glucuronsäure-Derivat. Das freiwerdende 5-Brom-4-chlor-indoxyl oxidiert mit dem Luftsauer-

stoff zu einem blauen Indigo-Farbstoff. Alle der neun im GUS-Test untersuchten Klone wiesen nach einer Inkubation von 16 h bei 37°C eine intensive Blau-Färbung auf. Die Abbildung 26 zeigt die getestete *Senecio*-GUS-Überexpressions-HR und eine der Tabak-GUS-Überexpressions-HRs nach Beendigung der Inkubation. Als Negativkontrollen wurden eine Tabak-Kontroll-HR und eine *Senecio*-Kontroll-HR in gleicher Weise behandelt. Diese Proben waren nach Beendigung des GUS-Tests unverändert weiß. Das Ergebnis zeigt, dass alle untersuchten Wurzelproben das GUS-Konstrukt in ihr Genom integriert haben und es dort transkribiert und translatiert wird.

Die GUS-Überexpression in *S. vernalis* führte zu auffallend knorpeligen, wenig verzweigten und sehr langsam wachsenden Wurzelklonen, wie auch diejenige, die in Abbildung 26 A zu sehen ist. In *N. tabacum* wurde diese Beobachtung nicht gemacht. Dieses Phänomen wurde bereits in der Vergangenheit bei der Transformation anderer Pflanzenarten beobachtet (mündlich übermittelte Ergebnisse von Dr. Heiko Rischer).

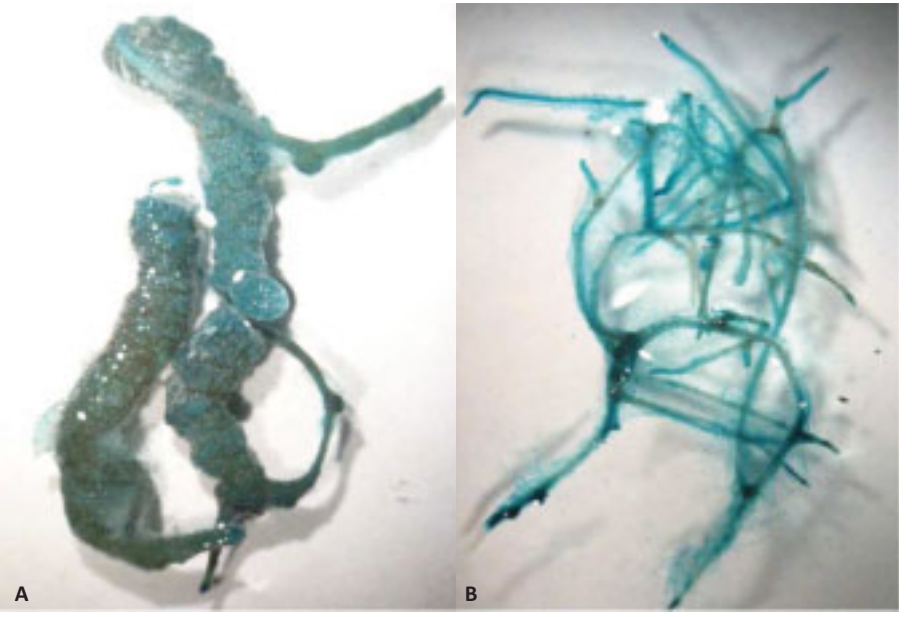


Abbildung 26: Ergebnisse des GUS-Tests. GUS-Überexpressions-HRs von *Senecio vernalis* **(A)** und *Nicotiana tabacum* **(B)** nach 16 h Inkubation bei 37°C in GUS-Puffer (s. Tabelle 31, Kapitel 2.11.4).

Mit dieser optimierten und mittels GUS-Test verifizierten Transformations-Methode wurden innerhalb von gut zwei Monaten 552 HR-Klone erzeugt, wie aus Abbildung 27 er-

sichtlich ist. Von jeder Kultur (Konstrukt in Versuchspflanzen oder nichttransformierter *A. rhizogenes* in Versuchspflanzen) wurden zwischen 27 und 80 HR-Klone (jede HR, die durch ein einzelnes Transformationsereignis entstanden ist) erzeugt.

Zur besseren Handhabung des Untersuchungsmaterials wurden Klone mit sehr langsamem Wachstum aussortiert, da diese für die folgenden PA- und Expressions-Analysen nicht im festgesetzten Zeitrahmen genügend Wurzelmaterial geliefert hätten. Nach der Elimination von Transportver-lusten zwischen Helsinki und Kiel standen insgesamt 266 HR-Klone zur Verfügung. Diese Klone wurden in Kiel auf Integration der Konstrukte untersucht.

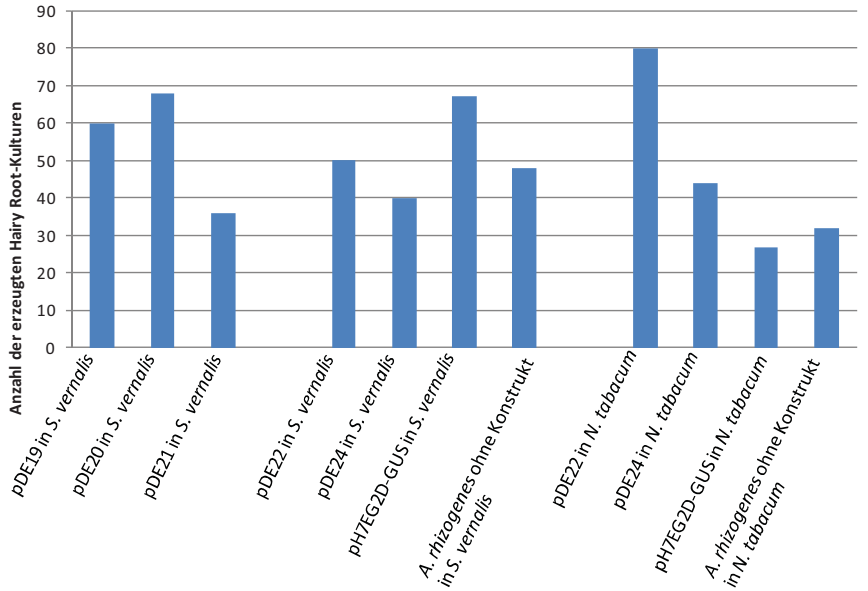


Abbildung 27: Übersicht über die Anzahl der erzeugten *Hairy Root*-Klone. pDE19: RNAi-Konstrukt zur Herabregulation der Expression von *svao1;* **pDE20:** RNAi-Konstrukt zur Herabregulation der Expression von *svao2;* **pDE21:** RNAi-Konstrukt zur Herabregulation der Expression von *svao3;* **pDE22:** Überexpressions-Konstrukt zur Überexpression von SVAO1; **pDE24:** Überexpressions-Konstrukt zur Überexpression von SVAO3; **GUS-Konstrukt:** Konstrukt zur Überexpression von GUS; ***A. rhizogenes* ohne Konstrukt:** zur Erzeugung von Kontroll-HRs (s. auch Tabelle 53, Kapitel 7.2).

3.6.3 Allgemeine Analysen der transgenen *Hairy Root*-Klone

3.6.3.1 Selektion auf Antibiotika-Empfindlichkeit

Als erster Schritt zur Überprüfung der HR-Klone auf Integration der Konstrukte sollten diese zunächst auf ihre Antibiotika-Empfindlichkeit getestet werden. Solche Klone, die

kein Konstrukt in ihr Genom integriert hatten, sollten auf Medium mit Zusatz von Kanamycin bzw. Hygromycin B nicht überleben. Die Kanamycin-Resistenz wird während der Transformation durch das in die Transformationskassette integrierte Neomycin-Phosphotransferase II (*nptII*)-Gen vermittelt. Bei nicht-resistenten Pflanzen wirkt das Aminoglykosid-Antibiotikum toxisch. Die Hygromycin-Resistenz wird durch das Hygromycin-Phosphotransferase (*hpt)*-Gen vermittelt. Ebenso wie Kanamycin ist Hygromycin in die Klasse der Aminoglykoside einzuordnen. Beide Antibiotika interagieren in Pflanzen vermutlich mit der 30S- und 50S-Untereinheit der Ribosomen in den Plastiden und beeinträchtigen so die Proteinbiosynthese (Weide et al., 1989; Nap et al., 1992).

Um die Konzentration der Antibiotika zu ermitteln, die nötig ist, um einen HR-Klon ohne Konstrukt (Kontroll-HR) abzutöten, wurde zunächst ein Vortest gemacht. Dazu wurden ein *Senecio*-Kontroll-HR-Klon und ein Tabak-Kontroll-HR-Klon zum einen auf antibiotikafreies Gamborg B5mod-Medium gesetzt und zum anderen auf Gamborg B5mod-Medium mit folgenden Antibiotika-Konzentrationen:

Kanamycin: 25/50/100/200 mg/l

Hygromycin B: 12,5/25/50 mg/l

Die HR-Klone wurden acht Tage unter den üblichen Bedingungen wachsen gelassen und anschließend ausgewertet. Schon bei einer Hygromycin B-Konzentration von 12,5 mg/l Medium wuchsen nur solche Tabak- und *Senecio*-HR-Klone, die ein Überexpressions-Konstrukt integriert hatten. Klone ohne Konstrukt (Kontroll-HRs) starben innerhalb der acht Tagen ab (s. Abbildung 28). Sehr viel unempfindlicher zeigte sich *S. vernalis* gegen Kanamycin. Selbst bei einer Konzentration von 200 ml/l Medium starben die Kontroll-HRs nicht ab. Sie veränderten jedoch ihr Wachstum: Bei Kanamycin-Konzentrationen bis 100 mg/l wuchsen die Kontroll-HRs in das Medium hinein. Bei 200 mg/l Kanamycin wuchsen diese nur oberflächlich auf den Medium-Platten. Dies wurde anschließend als ein Selektionskriterium bei den RNAi-Klonen verwendet. Die *N. tabacum*-Kulturen ließen sich ebenfalls sehr gut mit Hygromycin B selektieren. Kontroll-HR-Klone starben nach einigen Tagen auf hygromycinhaltigem Medium (12,5 mg/l) ab. Kanamycinresistente Tabak-Klone wurden nicht erzeugt, da die Kanamycin-Resistenz nur in den RNAi-Konstrukten integriert war.

Eine ähnliche Beobachtung wie für *S. vernalis* wurde bereits für *J. vulgaris*-Pflanzen in Sterilkultur gemacht. Diese wuchsen auch bei der höchsten getesteten Kanamycin-Konzentration von 100 mg/l im Medium (Abd Elhady, 2006). Eine noch extremere natürliche Resistenz gegen Kanamycin zeigt die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*). Nach einer *Agrobacterium*-Transformation wurden die transgenen Sprosse mit Kanamycin in einer Konzentration von 400 mg/l selektiert. Nur 5 % der Zuckerrübensprosse, die auf diesem Medium überlebt hatten, trugen die T-DNA und waren somit transgen (Hinchee et al., 1994).

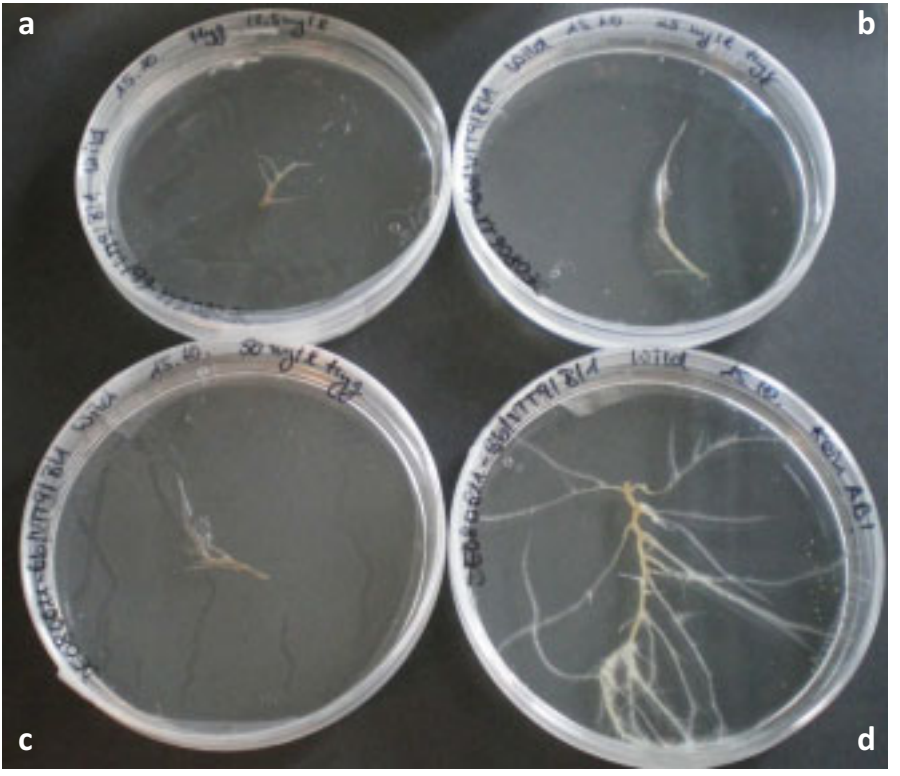


Abbildung 28: Vortest auf Antibiotika-Empfindlichkeit. Kontroll-HR-Klon von *S. vernalis* nach acht Tagen Kultivierung auf GamborgB5mod-Platten mit Hygromycin B in unterschiedlichen Konzentrationen: **a**: 12,5 mg/l; **b**: 25 mg/l; **c**: 50 mg/l; **d**: ohne Antibiotikum.

Auf Grund der Ergebnisse dieses Vortests wurde anschließend ein kleines Stück jedes RNAi-HR-Klons auf Platten mit GamborgB5mod-Medium mit 200 mg/l Kanamycin umgesetzt. Ein weiteres Stück wurde zum Vergleich auf eine Platte ohne Antibiotikum gesetzt.

Ebenso wurde auch mit den Überexpressions-Klonen verfahren, die jedoch auf Platten mit Hygromycin B (12,5 mg/l) gesetzt wurden. Alle Klone wurden zwei Wochen lang unter üblichen Bedingungen (s. Kapitel 2.2.3) kultiviert und anschließend ausgewertet.

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse dieser Auswertung: 45 % der untersuchten SVAO1-RNAi-Klone waren gegen Kanamycin resistent. Die Kultur, in die SVAO2-Expression herunterreguliert werden sollte, war zu 52 % kanamycinresistent. Bei der SVAO3-RNAi-Kultur zeigten 29 % aller untersuchten Klone eine Kanamycin-Restistenz. Die drei Kulturen zur Überexpression von SVAO1, SVAO3 und GUS in *S. vernalis* zeigten alle einen Anteil von ca. 38 % an Klonen, die gegen Hygromycin B resistent waren. Die Tabak-HR-Kulturen wiesen die höchsten Anteile an resistenten Klonen auf: Die Kultur zur Überexpression von SVAO1 hatte einen Anteil von 81 % resistenten Klonen. Bei der Überexpression von SVAO3 in Tabak waren 73 % der untersuchten Klone hygromycinresistent. Den höchsten Anteil an antibiotikaresistenten Klonen erreichte die Tabak-Kultur, in der das *gus*-Gen überexprimiert wurde mit 93 %.

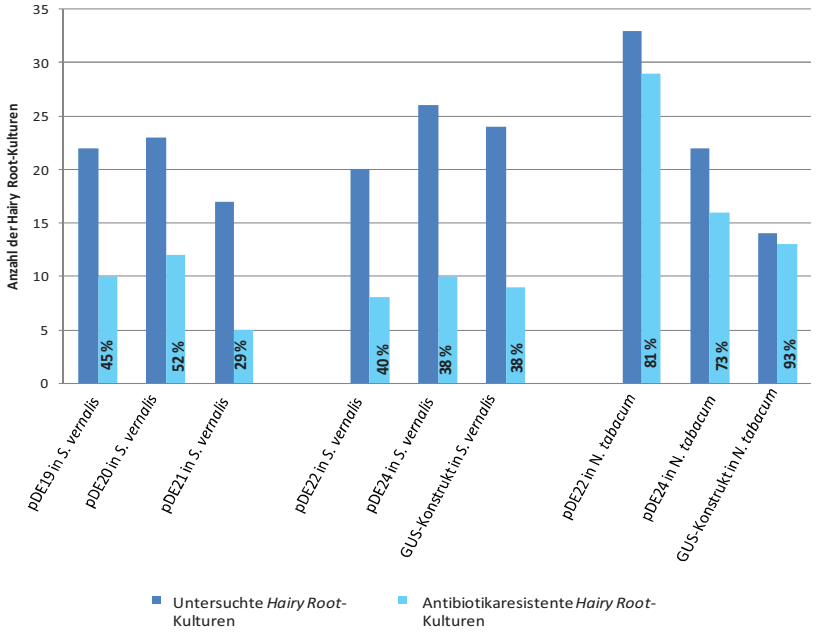


Abbildung 29: Anteil der antibiotikaresistenten *Hairy Root*-Klone. pDE19: RNAi-Konstrukt zur Herabregulation der Expression von *svao1;* **pDE20:** RNAi-Konstrukt zur Herabregulation der Expression von *svao2;* **pDE21:** RNAi-Konstrukt zur Herabregulation der Expression von *svao3;* **pDE22:** Überexpressions-Konstrukt zur Überexpression von SVAO1; **pDE24:** Überexpressions-Konstrukt zur Überexpression von SVAO3; **GUS-Konstrukt:** Konstrukt zur Überexpression von GUS (s. auch Tabelle 53, Kapitel 7.2).

3.6.3.2 Untersuchungen der genomischen DNA

Als eine weitere Überprüfung der HR-Klone auf Transgenität wurden alle Klone, die eine Resistenz gegen den Selektionsmarker aufzuweisen schienen, mittels PCR auf die Integration des *rol*B-Gens und der Fremd-DNA zwischen den *attB*-Rekombinationsstellen untersucht. Mit der PCR auf die *attB*-Rekombinationsstellen wurde indirekt die integrierte Fremd-DNA nachgewiesen, die im Zuge der Rekombination zwischen die beiden im binären Pflanzenvektor vorhandenen *attB*-Rekombinationsstellen eingebaut wurde. Die PCR auf die Rekombinationsstellen anstatt auf die Fremd-DNA selbst hatte den großen Vorteil, dass für alle PCRs das gleiche Primerpaar verwendet werden konnte. Dies vereinfachte die Handhabung der großen Probenmenge enorm. Über die Größe der entstandenen PCR-Produkte konnte darüber geurteilt werden, ob die SVAOs auch vollständig integriert worden waren. Diese Kontrolle ist sinnvoll, da beim Einschleusen der T-DNA in die Pflanzenzelle die DNA zum Teil durch wirtszelleigene Nukleasen degradiert wird. Diese unvollständige Fremd-DNA wird als *truncated T-DNA*, „gestutzte T-DNA“, bezeichnet (Tzfira et al., 2004).

Die agrobakterieneigenen *rol*-Gene sind hingegen in der T-DNA des R_i-Plasmids lokalisiert. Sie scheinen durch Interaktionen mit dem pflanzlichen Hormonhaushalt für das Wachstum der HRs und deren Phänotyp verantwortlich zu sein (Veena und Taylor, 2007). Im *A. rhizogenes* des Stammes LBA9402, der für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet wurde, wurden vier *rol*-Gene (*rol*A, *rol*B, *rol*C und *rol*D) nachgewiesen. Mit einer PCR wurde die Anwesenheit eines dieser Gene, des *rol*B-Gens, in der genomischen DNA aller antibiotikaresistenten Klone überprüft. Die Anwesenheit des *rol*B-Gens stellt eine Überprüfung auf die Integration der T-DNA des R_i-Plasmids dar.

Die PCR zur Amplifikation des *rol*B-Gens wurde mit den in Tabelle 43 aufgeführten Primern nach Standard-Protokoll (s. Kapitel 2.6.7.1) durchgeführt. Das spezifische 423 bp-lange Fragment konnte mit Hilfe der Accu*Taq*™-DNA-Polymerase amplifiziert werden. Die Primer-Sequenzen wurden der Literatur entnommen (Alpizar et al., 2006).

Tabelle 43: Primer auf eine Teilsequenz des *rol*B-Gens nach (Alpizar et al., 2006)

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DErolB3for	5'- GCTCTTGCAGTGCTAGATTT -3'	54°C
DErolB3rev	5'- GAAGGTGCAAGCTACCTCTC -3'	

In der zweiten PCR, die mit der genomischen DNA aller zu analysierenden HR-Klone durchgeführt wurde, wurde die zwischen den *attB1- und attB2*-Rekombinationsstellen liegende Fremd-DNA amplifiziert. Die Primer sind in Tabelle 44 angegeben und wurden in einer Standard-PCR (s. Kapitel 2.6.7.1) eingesetzt, die ebenfalls mit Accu*Taq*™-DNA-Polymerase zu einem Amplifikat führte. Je nach Fremd-DNA variierte die Größe des Amplifikates. Bei der Amplifikation der RNAi-Sequenzbereiche der drei DAOs wurden Amplifikate in der Größe von etwa 550 bp erwartet. Die Amplifikation der Überexpressions-Konstrukte mit Hilfe des Primerpaars DEattBfor/rev erzielte Amplifikate mit einer Größe von etwa 2150 bp und die der GUS-Konstrukte Amplifikate mit einer Größe von etwa 750 bp.

Tabelle 44: Primer zur Amplifikation der Fremd-DNA zwischen den *attB*-Rekombinationsstellen. DEattBfor liegt auf der *attB1*-Rekombinationsstelle, DEattBrev liegt auf der *attB2*-Rekombinationsstelle (s. Abbildung 20 und Abbildung 21, Kapitel 3.6.1).

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DEattBfor	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC -3'	60°C
DEattBrev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG -3'	

Die Auswertung der PCRs auf die Fremd-DNA zwischen den *attB*-Rekombinationsstellen und auf das *rol*B-Gen ist in Abbildung 30 zusammengefasst. Die *Senecio*-Überexpressions-Klone zeigten stark divergierende Ergebnisse: Während die Kulturen zur Überexpression von SVAO1 und SVAO3 zu 75 %, bzw. 80 % beide Gene aufwiesen, wurde wie bereits in Kapitel 3.6.2.1 erwähnt bei der Überexpression des GUS-Konstrukts nur ein Klon identifiziert, der beide Gene aufwies. Bei den Tabak-Kulturen zur Überexpression von SVAO1 wurden in 78 % aller untersuchten antibiotikaresistenten Klone die Fremd-DNA über die *attB*-Rekombinationsstellen und das *rol*B-Gen nachgewiesen, bei den Kulturen zur Überexpression von SVAO3 sogar in 100 % der untersuchten antibiotikaresistenten Klone. Anders als bei der GUS-Überexpression in *S. vernalis* wiesen jedoch die Tabak-GUS-Kulturen eine hohe Transformationseffizienz auf: In 89 % aller untersuchten Klone wurden die Fremd-DNA über die *attB*-Rekombinationsstellen und das *rol*B-Gen nachgewiesen.

Fasst man die RNAi-Ergebnisse zusammen, dann ist zu sehen, dass durchschnittlich 78 % der kanamycinresistenten RNAi-Klone beide Gene aufwiesen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Überexpressions-Klone, bei denen im Durchschnitt bei 73 % aller hygromycinresistenten Klone beide Gene nachgewiesen werden konnten, so stellt sich die Selektion mit Hilfe von Kanamycin für *S. vernalis* als ebenso effizient dar.

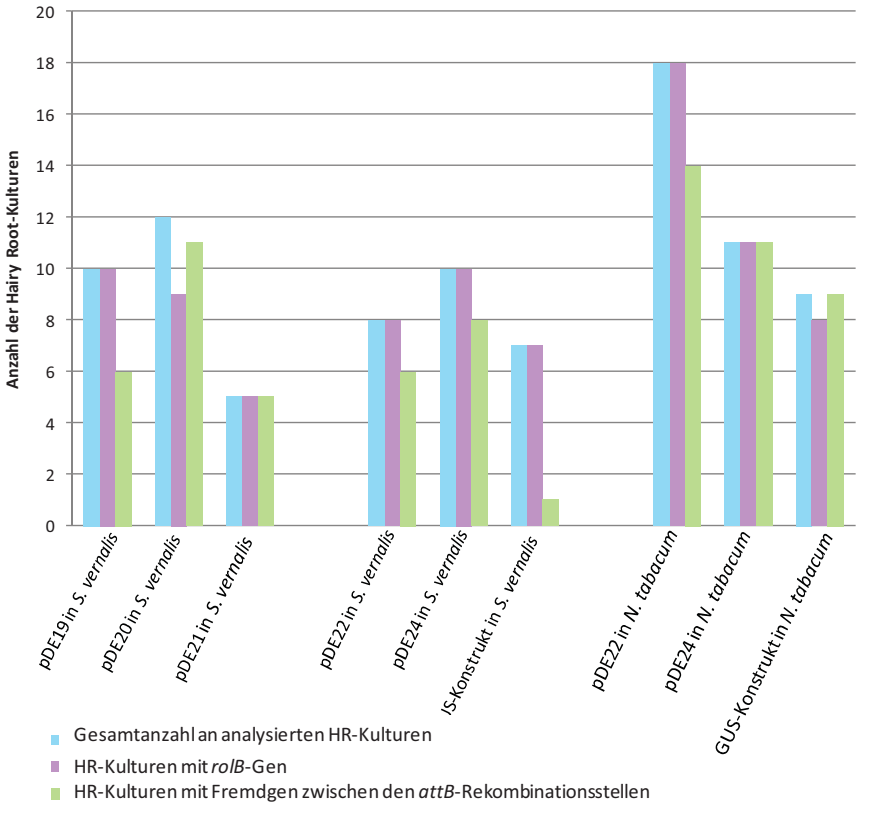


Abbildung 30: Analyse der genomischen DNA der *Hairy Root*-Klone. pDE19: RNAi-Konstrukt zur Herabregulation der Expression von *svao1;* **pDE20:** RNAi-Konstrukt zur Herabregulation der Expression von *svao2;* **pDE21:** RNAi-Konstrukt zur Herabregulation der Expression von *svao3;* **pDE22:** Überexpressions-Konstrukt zur Überexpression von SVAO1; **pDE24:** Überexpressions-Konstrukt zur Überexpression von SVAO3; **GUS-Konstrukt:** Konstrukt zur Überexpression von GUS (s. auch Tabelle 53, Kapitel 7.2).

Die dritte PCR, die mit der genomischen DNA aller Proben durchgeführt wurde, war die PCR auf das 444 bp große *virD1*-Gen (Mankin et al., 2007). Das *virD1*-Gen wurde bei einer Standard-PCR mit Accu*Taq*™-DNA-Polymerase (s. Kapitel 2.6.7.1) und mit dem Primerpaar

DEvirDfor/rev (s. Tabelle 45) amplifiziert. Die beiden Primer liegen auf dem Start- bzw. Stopp-Kodon des proteinkodierenden Sequenzbereiches.

Die virulenten (*vir*) Gene liegen ebenso wie die *rol*-Gene auf dem R_i-Plasmid, jedoch nicht in der bei der Infektion übertragenen T-DNA, sondern in einem DNA-Bereich, der nicht auf die Pflanzenzelle übertragen wird. Die *vir*-Gene kodieren unter anderem für die Proteine VirD1 und VirD2. Zusammen agieren diese beiden Enzyme als Restriktionsenzyme, die basengenau den Teil der T-DNA als Einzelstrang aus dem R_i-Plasmid schneiden (Scheiffele et al., 1995). Dieser Strang wird dann zusammen mit weiteren Vir-Proteinen über ein Tunnelprotein, das ebenfalls aus zwei Vir-Proteinen geformt ist, in die Zelle der Wirtspflanze geschleust (Christie und Vogel, 2000).

Mit der PCR auf das *virD1*-Gen wurde überprüft, ob die genomische DNA des untersuchten Klons frei von Verunreinigung durch persistierende Agrobakterien ist. Solche Verunreinigungen können zu falsch-positiven Ergebnissen bei den PCRs auf die *attB*-Rekombinationsstellen und das *rol*B-Gen führen.

Es ist natürlich fraglich, ob eine PCR mit negativem Ergebnis (kein Amplifikat nachweisbar) als ein Nachweis für die Abwesenheit von agrobakterieneigener DNA gewertet werden darf. Die PCR ist eine sensible Reaktion, die schnell durch Störungen unterbrochen wird. Solche Störungen können somit ein falsch-negatives Ergebnis und damit Agrobakterien-Freiheit vortäuschen. Es war daher besonders wichtig, diese PCR soweit zu optimieren, dass sie möglichst nicht mehr störungsanfällig war. Durchgeführt wurden daher alle PCRs mit der hocheffizienten und vor allem für genomische Proben geeigneten Accu*Taq*™LA-DNA-Polymerase. Desweiteren wurden zunächst einige Kontrollen eingeführt. Die erste Kontrolle bestand aus einer Probe genomischer DNA von einem HR-Klon, der sich bei ersten Probeläufen als mit Agrobakterien verunreinigt herausstellte. Diese Probe wurde bei allen weiteren PCRs als eine Positivkontrolle mitgeführt. Eine weitere Kontrolle stellte eine DNA-Präparation einer Agrobakterien-Suspension dar, die auch bei noch nicht optimalen PCR-Bedingungen das Amplifikat des *virD1*-Gens aufwies. Als eine Negativkontrolle diente ein Ansatz, in dem statt genomischer DNA Wasser eingesetzt wurde. Dieser Ansatz stellte sicher, dass positive Ergebnisse der *virD1*-PCRs nicht auf eventuelle Verunreinigungen des PCR-Ansatzes durch Agrobakterien-DNA zurückzuführen waren.

Das Ergebnis dieser PCRs zeigte, dass nach ca. drei Monaten der Kultivierung der HRs fast alle Klone frei von nachweisbaren Agrobakterien waren. Die Einzelfälle, in denen das *virD1*-Gen in der PCR nachgewiesen wurde, wurden diese Klone drei- bis viermal umgesetzt und dann erneut getestet. In dieser zweiten Runde wurde in keiner der Proben mehr *virD1* nachgewiesen. Alle Negativkontrollen fielen negativ aus.

Tabelle 45: Primer auf *virD1*. Bei DEvirDfor markiert der unterstrichene Bereich das Start-Kodon, bei DEvirDrev markiert der unterstrichene Bereich das Stopp-Kodon; die **fett gedruckten Bereiche** markieren den proteinkodierenden Sequenzbereich.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur
DEvirDfor	5'- **ATG**TCGCAAGGACGTAAGCCCA -3	57°C
DEvirDrev	5'- GGAGTCTT**TCA**GCATGGAGCAA -3'	

Der Nachweis auf Anwesenheit der Fremd-DNA über die *attB*-Rekombinationsstellen und des *rol*B-Gens und auf Abwesenheit persistierender Agrobakterien über das *virD1*-Gen mittels PCR diente vor allem zur Auswahl der Klone, die im Anschluss auf die Alkaloide hin untersucht werden sollten. Bis auf wenige Ausnahmen wurden nur solche Klone hinsichtlich ihres Alkaloid-Profils analysiert, die sowohl das Insert zwischen den *attB*-Rekombinationsstellen, als auch das *rol*B-Gen aufwiesen. Die Ausnahmen stellten einige Klone dar, die trotz Abwesenheit des *rol*B-Gens weiter untersucht wurden. Dies wurde gemacht, um über eventuelle Veränderungen der Alkaloide dieser HR-Klone neue Erkenntnisse über auf die Auswirkungen von RolB in *S. vernalis* und *N. tabacum* zu erhalten. In den weiteren Analysen wurden jedoch keine Auffälligkeiten dieser HR-Klone beobachtet.

Die Ergebnisse des Tests auf Antibiotika-Resistenz und der Analyse der genomischen DNA jedes einzelnen Klons befinden sich im Anhang (s. Kapitel 7.3).

3.6.4 Analyse der transgenen *Hairy Root*-Klone auf veränderten Alkaloid-Gehalt

3.6.4.1 Analyse der Pyrrolizidin-Alkaloide mittels Gaschromatographie

Von allen *Senecio*-HR-Klonen, die bei der Analyse der genomischen DNA (s. Kapitel 3.6.3.2) das *rol*B-Gen und die Fremd-DNA zwischen den *attB*-Rekombinationsstellen aufwiesen, wurden die Klone in Flüssigmedium angezogen (s. Kapitel 2.2.3). Diese Anzuchtmethode hat den Vorteil, dass die Wurzeln leicht zu ernten sind. Desweiteren wird bei

einer solchen Kulturführung eine größere Ausbeute an Pflanzenmaterial erzielt als bei Kultivierung auf Medium-Platten. Es wurde darauf geachtet, dass die Anzucht aller HR-Klone unter gleichen Bedingungen, wie z. B. Anzuchtdauer, Masse an Ausgangsmaterial zum Animpfen der Flüssigkultur und Größe der Anzuchtkolben, erfolgte. Dies schien wichtig, damit in einem so komplexen System spätere Schwankungen im PA-Gehalt nicht auf ungleichförmige Kulturbedingungen zurückgeführt werden könnten.

Nach der Ernte des Pflanzenmaterials wurde dieses wie in Kapitel 2.11.5.1 beschrieben gefrierge-trocknet und zerkleinert. Die Extraktion der PAs wurde wie in Kapitel 2.11.5.2 beschrieben durchgeführt. Zunächst wurde mit 0,1 g gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial gearbeitet. Um mehrere unabhängige Extraktionen jeder Probe durchführen zu können, wurde die Extraktion jedoch auf 0,025 g Pflanzenmaterial pro Probe optimiert. Die PA-Extrakte wurden mittels Gaschromatographie (GC, s. Kapitel 2.11.6) analysiert.

3.6.4.1.1 Etablierung der PA-Analytik und Ergebnisse der Kontroll-HR-Klone

Für die Herstellung von Tabak-HR-Kulturen wurde ausschließlich *N. tabacum* der Linie Bx verwendet. Sie stellt eine Klonkultur dar, deren Transformation erprobt ist. In Sterilkultur wird diese Kultur vegetativ vermehrt, wodurch genetisch völlig identische Pflanzenklone entstehen. Anders war hingegen die Situation bei *S. vernalis*. Da die Möglichkeit besteht, dass unterschiedliche Pflanzenklone eine unterschiedlich hohe Transformationseffizienz aufweisen (mündlich übermittelte Ergebnisse von PD Dr. Elisabeth Fuß) wurden möglichst viele unterschiedliche Pflanzenklone für die Transformationen verwendet. Aus diesem Grund wurden 27 unterschiedliche *Senecio*-Klone eingesetzt. Vierundzwanzig dieser Klone entstanden durch Oberflächensterilisation von Samen und anschließender Aufzucht der Pflanzen unter sterilen Bedingungen (durchgeführt von Mitarbeitern des VTTs vor Beginn des Gastaufenthalts). In den Tabellen in Kapitel 7.3 des Anhangs wurden diese Klone durch die Nummerierung „VTT1-24“ im kompletten Kulturnamen gekennzeichnet. Drei weitere Klonkulturen („Dn“, „Mn“ und „A“) waren bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Desweiteren wurde auch mit *Senecio*-Pflanzen gearbeitet, die unter unsterilen Bedingungen im Gewächshaus angezogen worden waren. Diese wurden durchgängig mit „VTTx“ bezeichnet, da eine Unterscheidung verschiedener Pflanzenklone in dieser Versuchsphase nicht durchgeführt wurde.

Wie schon in Kapitel 3.6 beschrieben, wurden sowohl *S. vernalis*, als auch *N. tabacum* unter anderem mit Agrobakterien infiziert, denen zuvor keine Fremd-DNA eintransformiert worden war. Im Folgenden werden diese Klone zur sprachlichen Vereinfachung „Kontroll-HR-Klone“ genannt. Die sechs Kontroll-HR-Klone SW-1 bis SW-6 von *S. vernalis* entstammen unterschiedlichen Pflanzenklonen. Während SW-1 bis SW-4 von infizierten *Senecio*-Pflanzen aus dem Gewächshaus abstammen, stammt SW-5 von der sterilen Klonkultur VTT9 und SW-6 von der ebenfalls sterilen Klonkultur VTT16 ab.

Zunächst wurden die GC-Chromatogramme dieser sechs Kontroll-HR-Klone qualitativ analysiert. Diese Messungen wurden aus zweierlei Gründen durchgeführt. Zum einen wurden anhand der Ergebnisse dieser ersten Messungen die PA-Extraktion (s. Kapitel 2.11.5.2) und die GC-Analyse (s. Kapitel 2.11.6) optimiert. Bei dieser Optimierung zeigte sich, dass unterschiedlich große verwendete Glasbecher und Magnetrührer bei der Reduktion mit Zinkstaub zu deutlichen Schwankungen im PA-Chromatogramm führten. Erklären lässt sich dieses Phänomen vermutlich damit, dass der Zinkstaub in verschiedenen Bechern und mit unterschiedlichen Magnetrührern während der fünfstündigen Reduktion unterschiedlich gut in Suspension gehalten werden kann, was zu einer unterschiedlich effizienten Reduktion der PA-*N*-Oxide zu tertiären PAs führt. Da bei der GC nur die tertiären PAs erfasst werden, kann es dadurch zu einer nicht quantitativen Erfassung der PAs kommen. Desweiteren wurde untersucht, ob ein zwischen pH 9 und 11 schwankender pH-Wert vor der Bindung des wässrigen Lösungsmittels an Extrelut® NT zu Veränderungen im gaschromatographischen PA-Chromatogramm führt, was nicht der Fall war. Darüber hinaus musste das organische Lösungsmittel, in dem die PAs nach Entzug des wässrigen Lösungsmittels aufgenommen wurden, optimiert werden. Bei der Verwendung von Dichlormethan in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe „für die Analyse“ wurden etliche unbekannte Substanzen im GC-Chromatogramm detektiert. Aus diesem Grund wurde das Lösungsmittel vor Gebrauch bei 40°C ohne Vakuum in einem Rotationsverdampfer destilliert. Damit wurde ein Großteil der unbekannten Substanzen aus dem Chromatogramm eliminiert.

Gekoppelt an den Gaschromatographen standen zwei unterschiedliche Detektoren zur Verfügung. Zum einen wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet. Dieser hat den Vorteil, dass alle organischen Verbindungen erfasst werden. Nachteilig ist jedoch

die geringere Empfindlichkeit im Gegensatz zum zweiten zur Verfügung stehenden Detektor. Bei diesem Detektor handelt es sich um einen flammenthermoionischen Detektor (FTD), der nur phosphor- und stickstoffhaltige Moleküle detektiert. Auf Grund der größeren Empfindlichkeit für PAs und Spezifität wurden alle Messungen mit dem FTD detektiert.

Während dieser ersten PA-Extraktionen und GC-Analysen wurde auch die optimale Konzentration des internen Standards Heliotrin ermittelt. Eingesetzt wurde der interne Standard zur relativen Quantifizierung der Gesamt-PAs. Heliotrin wurde ausgewählt, da es sich um ein käufliches PA handelt, dass natürlicherweise in *Heliotropium indicum* (Boraginacea) vorkommt, nicht aber in der Untersuchungspflanze *S. vernalis*. Desweiteren erscheint Heliotrin im gaschromatographischen Chromatogramm zwar in zeitlicher Nähe der natürlicherweise vorkommenden PAs, überlagert aber kein Signal derer. Mit 62,5 ng Heliotrin pro 25 mg Wurzelmaterial (Trockengewicht) wurde ein deutliches, gut auswertbares Signal bei der Gaschromatographie erzielt.

Neben der Methodenoptimierung war die Extraktion und PA-Analyse der Kontroll-HR-Klone notwendig, da die Ergebnisse der gaschromatographischen Analysen der RNAi- und Überexpressions-Klone mit denen der Kontroll-HRs verglichen werden sollten. Die Ergebnisse der Kontroll-HR-Klone lieferten somit einen Bezugswert für die Auswertung der RNAi- und Überexpressions-Klone.

Die Peaks im GC-Chromatogramm der Kontroll-HR-Klone (s. Abbildung 31) wurden zunächst über den Retentionsindex den Standard-PAs von *S. vernalis* zugeordnet (Witte et al., 1993). Später folgte eine Verifizierung dieser Zuordnung mit Hilfen der als Referenzsubstanzen zur Verfügung stehenden PAs Senecivernin, Senecionin und Senkirkin, die unter denselben Bedingungen mittels GC analysiert wurden. Die GC-Chromatogramme der Messungen dieser Referenzsubstanzen sind in Abbildung 33 dargestellt. Außerdem wurden zwei Extrakte von Kontroll-HR-Klonen von Dr. Till Beuerle (Institut für Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Brauschweig) mit Hilfe von massenspektroskopischer Gaschromatographie (GC-MS) untersucht. Da die Methode der GC-MS für die PA-Analytik in diesem Institut sehr gut etabliert ist, steht eine Datenbank mit einer großen Anzahl an MS-Daten für PAs zur Verfügung. Ein Ausschnitt eines GC-MS-Chromatogramms ist in Abbildung 32 zu sehen.

Neben den identifizierten PAs wurden noch einige nichtidentifizierte Substanzen im GC-Chromatogramm detektiert. Die GC-MS-Analyse gab Aufschluss darüber, dass es sich bei zwei dieser Substanzen entweder um noch nicht identifizierte PAs oder um Artefakte, die durch die hohen Temperaturen bei der GC entstanden sein könnten, handelt. Da dies nicht festgestellt werden konnte, wurden diese beiden Peaks nicht in die Berechnung der Gesamt-PAs einbezogen. Neben diesen beiden Peaks wurden zwei weitere unbekannte Substanzen im GC-Chromatogramm detektiert, bei denen es sich laut GC-MS nicht um PAs handelt. Eine dieser Substanzen tauchte nicht im GC-MS-Chromatogramm auf. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich um eine Substanz handelt, die zwar im Lösungsmittel für die herkömmliche GC, nicht aber in dem hochreinen Lösungsmittel für die GC-MS vorhanden ist. Im GC-MS-Chromatogramm ist hingegen ein Phthalat-Peak zu sehen, der in CG-Chromatogramm der Abbildung 31 nicht zu sehen ist, in anderen aber detektiert wurde. Phthalat ist ein Weichmacher, der Bestandteil von vielen Kunststoffprodukten ist. Nach der Verwendung von Kunststoff-Pipettenspitzen oder anderen Einmal-Kunststoffartikeln während der Extraktionsprozedur kann Phthalat im GC-Chromatogramm detektiert werden.

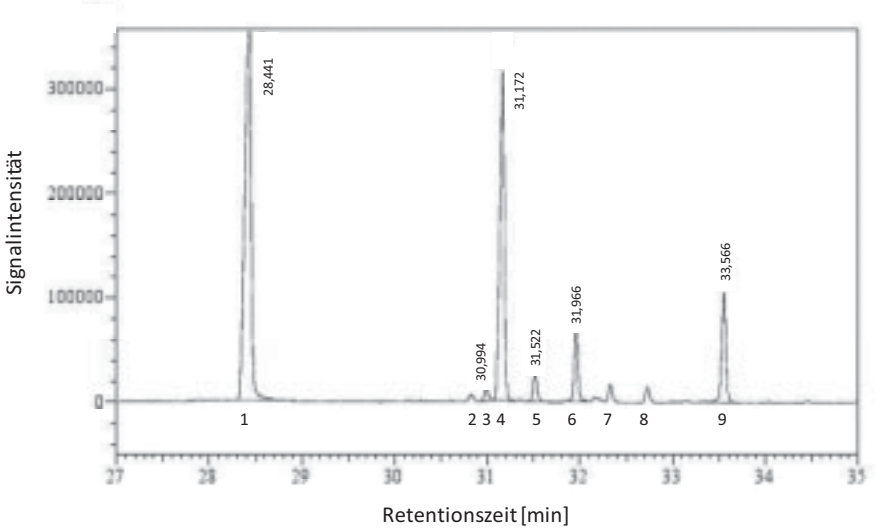


Abbildung 31: Ausschnitt eines GC-Chromatogramm eines Kontroll-HR-Extraktes. Peak 1: interner Standard Heliotrin, **Peak 2**: unbekanntes PA, **Peak 3**: Senecivernin, **Peak 4**: Senecionin, **Peak 5**: unbekanntes PA, **Peak 6**: Integerrimin, **Peak 7 + 8:** unbekannte Substanzen, **Peak 9:** Senkirkin; die Zahlen an den Peaks geben die Retentionszeiten an.

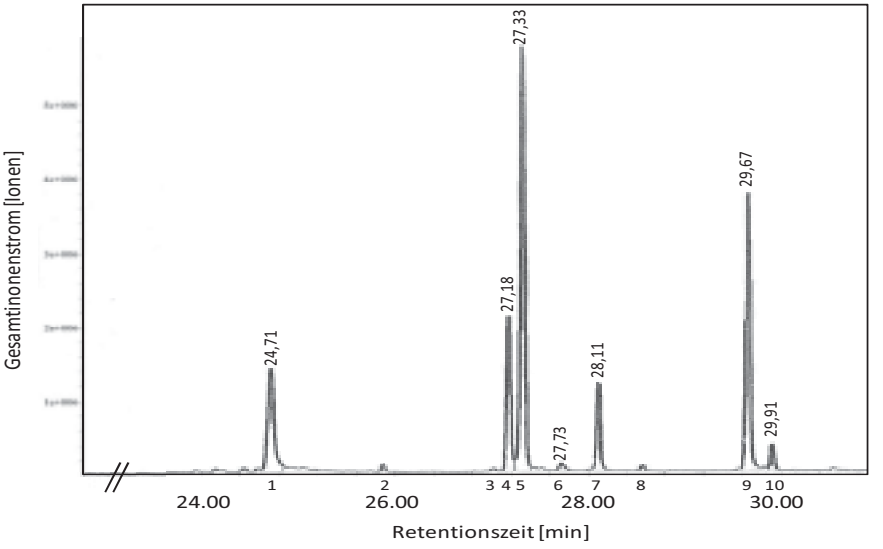


Abbildung 32: Ausschnitt eines GC-MS-Spektrum eines Kontroll-HR-Klons. 1: interner Standard Heliotrin, **2:** unbekannte Substanz, 3: unbekanntes PA, **4:** Senecivernin, **5:** Senecionin, **6:** unbekanntes PA, **7:** Integerrimin, **8**: unbekannte Substanz, **9:** Senkirkin, **10:** Phthalat; die Zahlen an den Peaks geben die Retentionszeiten an.

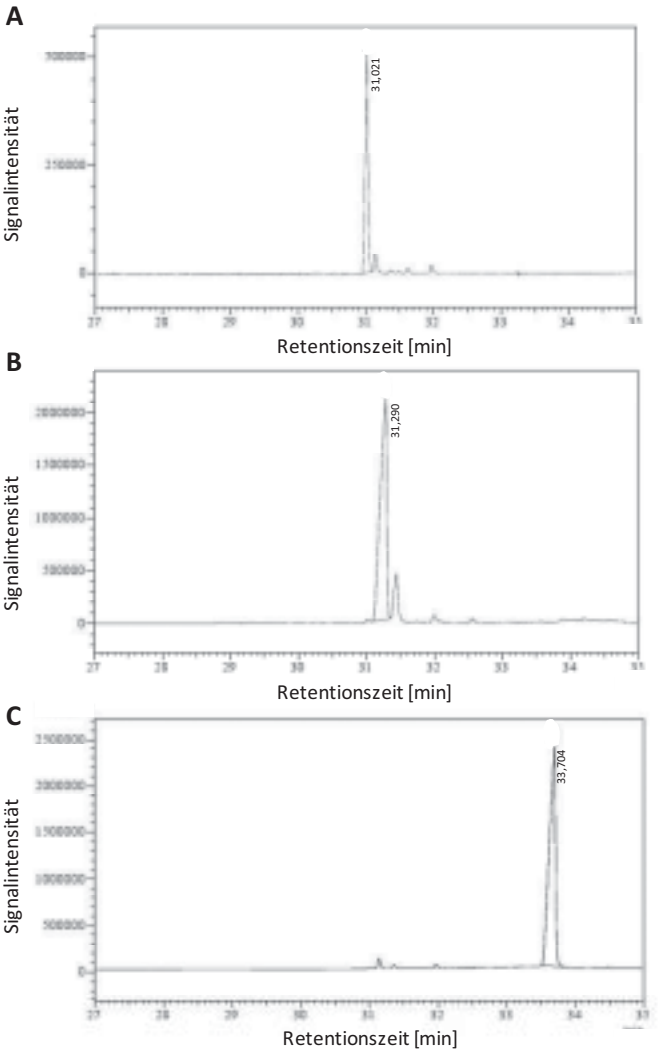


Abbildung 33: Ausschnitte von GC-Chromatogrammen der Referenz-Substanzen. A: Senecivernin, **B**: Senecionin, **C**: Senkirkin; die Zahlen an den Peaks geben die Retentionszeiten an.

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte über den internen Standard Heliotrin. Jedem Ansatz mit 25 mg Wurzelmaterial (Trockengewicht) wurden 62,6 ng Heliotrin bei der Extraktion mit 0,1 N H_2SO_4 zugesetzt. Zur relativen Quantifizierung der Gesamt-PAs wurden die Peak-Flächen von Senecivernin, Senecionin, Integerrimin und Senkirkin addiert und zu der Fläche des Heliotrin-Peaks ins Verhältnis gesetzt. Zur Ermittlung

eines Mittelwertes der Gesamt-PAs/internen Standard aller sechs untersuchten Kontroll-HR-Klone (SW1 - SW6) wurde jede Kultur dreimal extrahiert, vermessen und der Mittelwert der Gesamt-PA/interner Standard berechnet. Diese Quotienten sind in Abbildung 34 dargestellt. Sie schwanken zwischen 0,59 bei SW-3 und 1,45 bei SW-4. Diese Schwankungen im PA-Gehalt sind vermutlich auf die unterschiedlichen *S. vernalis*-Klone zurückzuführen, die für die Herstellung der Kontroll-HR-Klone verwendet wurden und werden in Kapitel 4.2.3 diskutiert. Anschließend wurde von diesen Mittelwerten aller sechs Klone der Durchschnitt gebildet. Dieser Durchschnitt stellt also den Mittelwert der Gesamt-PAs aller Kontroll-HR-Klone im Verhältnis zum internen Standard dar und wird im Folgenden vereinfacht „Mittelwert" genannt. Der Mittelwert beträgt 0,94. Mit diesem Mittelwert wurden in den Kapiteln 3.6.4.1.2 und 3.6.4.1.3 die Ergebnisse der GC-Analysen aller RNAi- und Überexpressions-Klone verglichen.

Alle Werte der Auswertung der GC-Messungen sind im Anhang in Kapitel 7.4 zu finden.

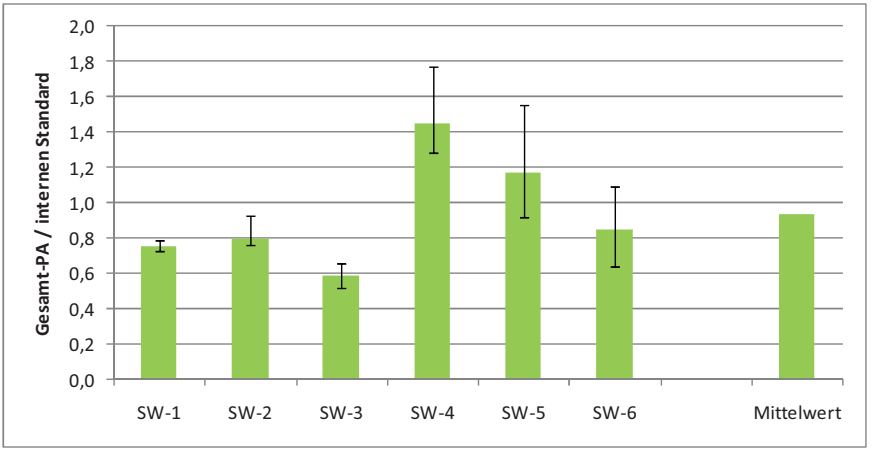


Abbildung 34: Gesamt-PA-Gehalt der Kontroll-HR-Klone. Die Balken geben den Mittelwert der drei Messungen eines jeden Klons an. Die Fehlerindikatoren über den Balken zeigen den minimalen bzw. maximalen Wert bei Messungen dieses Klons an.

Zum besseren Verständnis wird noch einmal hervorgehoben, dass alle HRs, die aus der Transformation einer Versuchspflanze durch *A. rhizogenes* mit demselben DNA-Konstrukt oder durch *A. rhizogenes* ohne Fremd-DNA hervorgegangen sind, im Folgenden als eine „Kultur" bezeichnet werden. Die Kulturen tragen die Kürzel SD1, SD2 und SD3 für die RNAi-Kulturen von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 und S1 und S3 für die Überexpressions-

Kulturen von SVAO1 und SVAO3. Jedes Individuum dieser Kultur ist aus einem unabhängigen Transformationsereignis entstanden und wird im Folgenden als „Klon“ bezeichnet. Der Name eines jeden Klons setzt sich aus dem Kulturnamen und einer durchlaufenden Nummer zusammen. So wird beispielsweise der dritte RNAi-Klon zur Herabregulation von der Expression von SVAO1 „SD1-3“ genannt.

3.6.4.1.2 Vergleich der PA-Gehalte der RNAi-Klone

Von den nun folgenden Ergebnissen der RNAi-, aber auch der Überexpressions-Kulturen in Kapitel 3.6.4.1.3 wurde kein Mittelwert pro Kultur gebildet, da sich jeder einzelne Klon aus einem unabhängigen Transformations-Ereignis ableitet, in dem sowohl die Fremd-DNA des binären Pflanzenvektors, als auch die T-DNA des R_i-Plasmids in unterschiedliche Bereiche des Wirtsgenoms integriert wurden. Aus diesem Grund sind die jeweiligen Klone einer Kultur genetisch unterschiedlich und lassen sich nicht direkt miteinander vergleichen. Ein Vergleich wird jeweils nur zwischen einem RNAi- oder Überexpressions-Klon und dem Mittelwert der Kontroll-HR-Klone gezogen.

Zunächst wurden von allen RNAi-Klonen die PAs nur einmal extrahiert (s. Kapitel 2.11.5.2) und gaschromatographisch untersucht (s. Kapitel 2.11.6). Anschließend wurden von jeder RNAi-Kultur (SD1, SD2 und SD3) drei Klone ausgewählt, deren PA-Gehalt durch zwei weitere Messungen bestätigt wurde. In der SVAO2-RNAi-Kultur wurden fünf Klone dreifachbestimmt. In der Abbildung 35 wurden alle Ergebnisse, die durch Einfach-Bestimmungen erhoben wurden, hell unterlegt. Die Werte, die durch Dreifach-Bestimmung ermittelt wurden, wurden dunkel unterlegt.

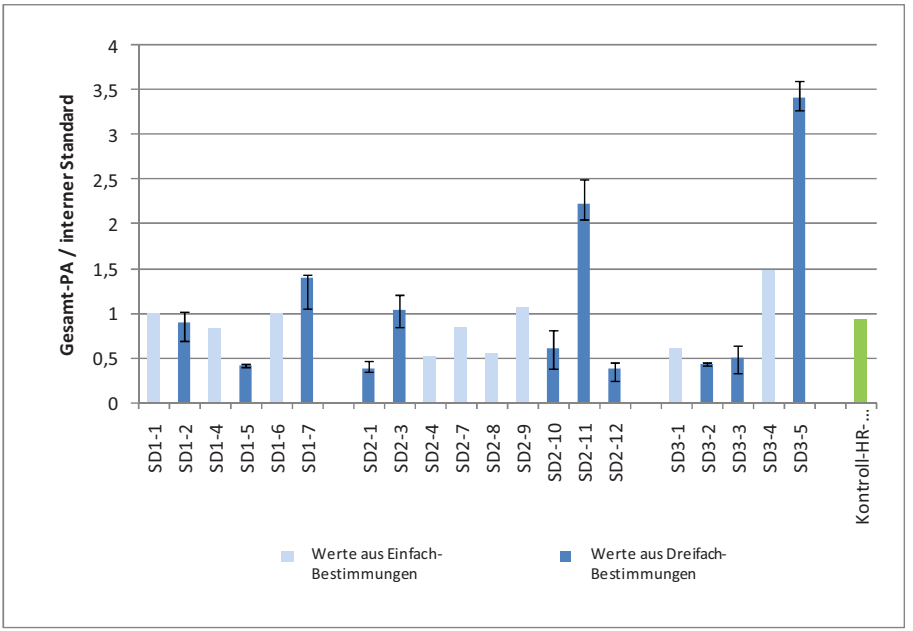


Abbildung 35: Gesamt-PA-Gehalt aller RNAi-Klone im Vergleich zum Kontroll-HR-Mittelwert. Die Balken geben den Mittelwert aller Messungen eines Klons an. Die Fehlerindikatoren über den Balken zeigen den minimalen bzw. maximalen Wert bei Messungen dieses Klons an.

Bei den Klonen zur Herabregulation von *svao1* wies SD1-5 mit 0,42 Gesamt-PA/interner Standard den niedrigsten PA-Gehalt auf. Im Vergleich zum Kontroll-HR-Mittelwert ist das eine Reduktion des PA-Gehalts um 44,9 %. Die Kultur SD1-7 wies hingegen den höchsten PA-Gehalt auf: Es wurde ein Quotient von 1,39 Gesamt-PA/interner Standard errechnet, was eine Steigerung um 48,0 % Gesamt-PA im Vergleich zum Kontroll-HR-Mittelwert ist. Alle weiteren Klone schwankten zwischen diesen beiden Werten. Im Allgemeinen ist zu erkennen, dass die Klone der SVAO1-RNAi-Kultur sich beim Gesamt-PA-Gehalt nicht wesentlich von dem der Kontroll-HRs und deren Schwankungen unterscheiden.

Bei den SVAO2-RNAi-Klonen fiel der Klon SD2-11 durch einen sehr hohen PA-Gehalt auf. Mit einem Quotienten von 2,22 Gesamt-PA/interner Standard enthielt dieser Klon 2,4 Mal so viel Gesamt-PAs wie der Kontroll-HR-Mittelwert. Den geringsten PA-Gehalt wies der Klon SD2-12 mit einem Quotienten von 0,38 Gesamt-PA/interner Standard auf, was eine Reduktion an Gesamt-PAs um 59,8 % im Vergleich zum Kontroll-HR-Mittelwert darstellte.

Bei den SVAO3-RNAi-Klonen SD3-1, SD3-2 und SD3-3 lagen die Quotienten Gesamt-PA/interner Standard zwischen 0,43 und 0,61, woraus sich eine Reduktion der Gesamt-PAs auf 46,1 % bis 65,4 % errechnete. Einen größeren Anteil an Gesamt-PAs im Gegensatz zu den Kontroll-HRs enthielten hingegen die Klone SD3-4 und SD3-5. Während SD3-4 59,3 % mehr PAs als die Kontroll-HRs produzierte, lag der Quotient Gesamt-PA/interner Standard bei SD3-5 sogar bei 3,41. Dieser Klon enthielt somit 363,2 % Gesamt-PAs im Vergleich zu den Kontroll-HRs und ist damit von allen untersuchten transgenen Klonen derjenige mit dem höchsten Anteil an Gesamt-PAs. Dies ist ein durchaus unerwartetes Ergebnis, da in den RNAi-Kulturen ein gleichbleibender oder reduzierter PA-Gehalt im Gegensatz zu den Kontroll-HRs, nicht jedoch eine Steigerung erwartet wurde.

Wie Abbildung 35 zeigt, gab es in allen Kulturen einige Klone, die deutlich weniger PAs als die Kontroll-HRs synthetisiert haben. Diese Klone kamen jedoch nicht gehäuft in einer Kultur vor, so dass sich für keine der Kulturen eine eindeutige Tendenz der Herabregulation der PA-Biosynthese feststellen lässt.

3.6.4.1.3 Vergleich der PA-Gehalte der Überexpressions-Klone

Bei den Klonen zur Überexpression von SVAO1 in *S. vernalis* zeigten die Klone S1-2, S1-3 und S1-5 sehr ähnliche Ergebnisse bei der Bestimmung der Gesamt-PAs (s. Abbildung 36). In allen drei Klonen ließen sich nur ca. 55 % PAs im Vergleich zu den Kontroll-HRs nachweisen. Im Gegensatz dazu wurde bei den Klonen S1-6, S1-7 und S1-8 ein höherer PA-Gehalt als in den Kontroll-HRs gemessen. Der Klon S1-6 produzierte ca. ⅓ mehr Gesamt-PAs als die Kontroll-HRs. In den Klonen S1-7 und S1-8 wurde der höchste Gehalt an Gesamt-PAs der Kultur gemessen. S1-7 enthielt 214,3 % Gesamt-PAs im Vergleich zu den Kontroll-HRs, während S1-8 mit 230,7 % an Gesamt-PAs im Vergleich zu den Kontroll-HRs den höchsten Anteil an Gesamt-PAs aller Überexpressions-Klone aufwies.

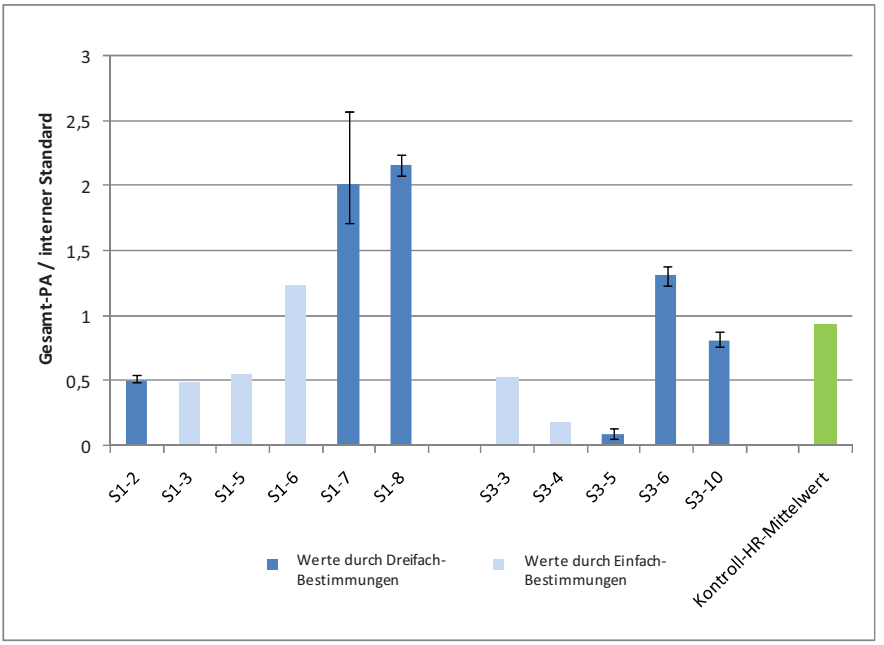


Abbildung 36: Gesamt-PA-Gehalt aller Überexpressions-Klone im Vergleich zum Kontroll-HR-Mittelwert. Die Balken geben den Mittelwert aller Messungen eines Klons an. Die Fehlerindikatoren über den Balken zeigen den minimalen bzw. maximalen Wert bei Messungen dieses Klons an.

Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, schwankten die Quotienten Gesamt-PA/interner Standard bei allen Klonen zur Überexpression von SVAO3 ebenfalls recht stark. Tendenziell wurde jedoch ein kleinerer PA-Gehalt im Vergleich zu den Kontroll-HRs erzielt als in allen anderen RNAi- und Überexpressions-Klonen. Das extremste Beispiel für diese Tendenz stellte der Klon S3-5 dar. Dieser wies einen Quotienten Gesamt-PA/interner von 0,09 auf und enthielt somit nur 9,9 % des Gesamt-PA-Gehalts der Kontroll-HRs. Damit war S3-5 der Klon mit dem niedrigsten PA-Gehalt von allen RNAi- und Überexpressions-Klonen. Möglicherweise lässt sich dieses Phänomen mit einer Cosuppression eines an der PA-Biosynthese beteiligten Enzyms durch die SVAO3-Überexpression erklären. Auf diesen Diskussionsansatz wird in Kapitel 4.2.3 noch näher eingegangen. Der einzige Klon der Überexpressions-Kultur von SVAO3, der mehr Gesamt-PAs produzierte als die Kontroll-HRs, war hingegen der Klon S3-6. S3-6 enthielt mit einem Quotienten Gesamt-PA/interner Standard von 1,31 in etwa 40 % mehr Gesamt-PAs als die Kontroll-HRs im Durchschnitt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass bei den Überexpressions-Kulturen keine der beiden Kulturen eindeutig mehr PAs synthetisierte als die Kontroll-HRs. Es ist jedoch auffällig, dass die Überexpressions-Kultur von SVAO3 tendenziell diejenige von allen transgenen Kulturen war, deren Klone den niedrigsten PA-Gehalt aufwiesen. Auf die Möglichkeit einer Cosuppression eines an der PA-Biosynthese beteiligten Enzyms durch Überexpression von SVAO3 wird in Kapitel 4.2.3 der Diskussion näher eingegangen.

3.6.4.2 Analyse der Diaminoxidase-Transkriptmengen in den *Senecio*-HR-Klonen mittels RT-PCR

Um die *svao*-Transkriptmengen in den RNAi- und *Senecio*-Überexpressions-Klonen zu überprüfen, wurden semiquantitative RT-PCRs durchgeführt, wie sie in Kapitel 2.6.7.2.3 beschrieben wurden. Zunächst wurden diese PCRs mit denselben Primern durchgeführt, die zur Klonierung der RNAi- und Überexpressions-Konstrukte verwendet wurden (s. Tabelle 41 und Tabelle 42). Für eine semiquantitative RT-PCR ist es wichtig, die optimale Zyklenanzahl zu ermitteln. Bei dieser Zyklenanzahl sollte sich die DNA-Vermehrung durch die PCR in der exponentiellen Phase befinden. Ist diese Zyklenanzahl überschritten, nimmt die Geschwindigkeit der DNA-Vermehrung bei den unterschiedlichen Proben der Amplifikation abhängig vom Amplifikat durch den Verbrauch eines oder mehrerer PCR-Bestandteile unterschiedlich schnell ab. In dieser Phase ist es nicht mehr möglich, aus der Intensität der Banden des PCR-Produktes auf die eingesetzte Templatemenge und damit auf die zu bestimmende Transkriptmenge der Probe zurück zu schließen. Ermittelt wurde diese optimale Zyklenanzahl durch PCRs mit den jeweiligen Primerpaaren, in denen nach dem 20., 23., 26., 29., 32. und 35. Zyklus ein Aliquot entnommen wurde und mittels Agarosegel-Elektrophorese untersucht wurde. Für die anschließenden RT-PCRs wurde die Zyklenanzahl gewählt, bei der im Agarosegel zum einen eine deutliche Bande zu sehen war, andererseits diese noch nicht die größte Intensität erreicht hatte. Diese optimale Zyklenanzahl ist in den Primer-Tabellen (s. Tabelle 46 bis Tabelle 49) für alle Primerpaare aufgelistet.

Ebenso wichtig für eine semiquantitative RT-PCR ist auch die Amplifikation eines konstitutiv exprimierten Kontroll-Gens. Dieses Kontroll-Gen wird in jeder Probe amplifiziert und soll sicherstellen, dass in jeder Probe die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde. Dies ist wichtig, da zwar die Menge an Gesamt-RNA nach der Isolation photometrisch ermittelt

wurde, die reverse Transkription in cDNA jedoch nicht auf Vollständigkeit überprüft werden kann. Werden also bei der Amplifikation des Kontroll-Gens unterschiedlich intensive Banden erzielt, so lassen sich die Ergebnisse der RT-PCRs der Proben nicht direkt vergleichen. Als Kontroll-Gene werden normalerweise sogenannte *Housekeeping*-Gene verwendet, wie z. B. Actin, β2-Microglobulin oder Glucose-6-phosphatdehydrogenase. Diese Gene des Primärstoffwechsels werden konstitutiv exprimiert. Da diese Gene für *S. vernalis* noch nicht identifiziert wurden, wurde die Desoxyhypusin-Synthase (DHS; Ober und Hartmann, 1999a) als Kontroll-Gen verwendet. Die DHS ist ebenfalls ein Enzym des Primärstoffwechsels, dessen Funktion für die Pflanze noch nicht vollständig geklärt ist. Sicher ist, dass die DHS bei der Aktivierung des eukaryontischen Initationsfaktors 5A (eIF5A) eine wichtige Rolle spielt. Die Primersequenzen und die ermittelte optimale Zyklenanzahl für dieses Gen befinden sich in Tabelle 48.

Tabelle 46: Primer 1 für die semiquantitative RT-PCRs der RNAi-Klone. Durchgehend unterstrichene Bereiche markieren die *attB1*-Rekombinationsstellen; gepunktet unterstrichene Bereiche markieren die *attB2*-Rekombinationsstellen; **fett gedruckte Bereiche** markieren SVAO-Sequenzbereiche. Das Primerpaar DERNAi1for/rev wurde in der Amplifikation des RNAi-SVAO1-Sequenzbereiches eingesetzt. Das Primerpaar DERNAi2for/rev diente zur Amplifikation des RNAi-SVAO2-Sequenzbereiches und das Primerpaar DERNAi3for/rev wurde zur Amplifikation des RNAi-SVAO3-Sequenzbereiches eingesetzt.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur	Zyklenanzahl
DERNAi1for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**ACAATTTATTCAAGAGAGTTAG** -3'	50,1°C	30
DERNAi1rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CTATAGCCCTATGCAGGTCATAC** -3'		
DERNAi2for	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**GTGACAAGATATCGAGTATC** -3'	50,1°C	32
DERNAi2rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**CAAATACATGTGTAGCCGATACAAG** -3'		
DERNAi3for	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**ACACATTTCCTAGTGAGTTAC** -3'	52,2°C	37
DERNAi3rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**ACCGACATCAACTGGAGTCAC** -3'		

Tabelle 47: Primer 2 für die semiquantitative RT-PCRs der Überexpressions-Klone. Durchgehend unterstrichene Bereiche markieren die *attB1*-Rekombinationsstellen; gepunktet unterstrichene Bereiche markieren die *attB2*-Rekombinationsstellen; **fett gedruckte Bereiche** markieren SVAO-Sequenzbereiche; doppelt unterstrichene Bereiche markieren Start-oder Stopp-Kodons. Das Primerpaar Overex1for/Overex1+2rev wurde zur Amplifikation der SVAO1-Transkripte eingesetzt. Das Primerpaar Overex3for/rev wurde zur Amplifikation der SVAO3-Transkripte eingesetzt.

Name	Sequenz	verwendete Annealing Temperatur	Zyklenanzahl
Overex1for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTT**ATG**AACA-**TTGGATGTGCCACC**-3'	55°C	32
Overex1+2rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC**CTA**CTAGAG **TGCGGCCGCATAAGA**-3'		
Overex3for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTT**ATG**AACA-**TTGGATGTGCCACC**-3'	55°C	28
Overex3rev	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTT**ATG**GAT-**GCAAGAAATCTCATC**-3'		

Tabelle 48: Primer für semiquantitativen RT-PCRs auf die cDNA des Kontroll-Gens *dhs*. Im Primer DE-DHSfor markiert der unterstrichene Bereich das Start-Kodon. Im Primer DE-DHSrev markiert der unterstrichene Bereich das Stopp-Kodon. Die **fett gedruckten Bereiche** markieren den proteinkodierenden Sequenzbereich.

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur	Zyklenanzahl
DE-DHSfor	5'-CCTTTAAACAAGA**ATGGAAGAATCTATG** -3'	55°C	32
DE-DHSrev	5'-CGTGTA**TCAGGAACTCGGC** -3'		

Für die semiquantitativen RT-PCRs wurde zunächst von allen Proben Gesamt-RNA isoliert (s. Kapitel 2.6.2). Dafür wurde ein Aliquot desselben HR-Materials verwendet, das auch für die PA-Analysen eingesetzt wurde (s. Kapitel 3.6.4.1), um die Ergebnisse beider Untersuchungen direkt korrelieren zu können. Die Konzentration der gewonnenen Gesamt-RNA wurde UV-photometrisch ermittelt (s. Kapitel 2.6.6). Zur Analyse der RNA-Qualität wurde je 1 µg RNA jeder Probe auf einem denaturierenden Formaldehyd-MOPS-Gel analysiert (s. Abbildung 37). Es ist zu sehen, dass die Intensität der Banden leicht variiert. Ebenfalls je 1 µg dieser RNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben (s. Kapitel 2.6.4), nachdem eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA abgebaut worden waren (s. Kapitel 2.6.3). Die so gewonnene cDNA wurde in den folgenden semiquantitativen RT-PCRs eingesetzt. Nach Durchführung aller PCRs wurde ein Aliquot jedes PCR-Produktes auf einem gemeinsamen Agarosegel analysiert, um die Intensitäten der Banden besser vergleichen zu können. In den folgenden Abbildungen (Abbildung 38 bis Abbildung 41) werden auf Grund der besseren Anschaulichkeit nur Ausschnitte dieses Gels gezeigt.

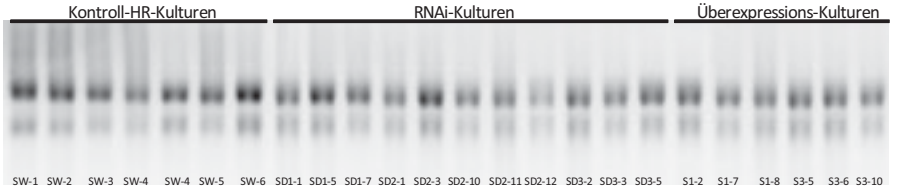


Abbildung 37: Formaldehyd-MOPS-Gel aller RNA-Proben für die semiquantitativen RT-PCRs. Aufgetragen wurde je Probe 1 µg Gesamt-RNA. Die Proben wurden 60 min bei 2,8 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt (s. auch Kapitel 2.6.12.1).

Abbildung 38 zeigt das Ergebnis der semiquantitativen RT-PCRs von allen RNAi-Klonen mit den Primern aus Tabelle 46. Das Primerpaar DERNAi1for/rev wurde zur Amplifikation der Transkripte der *svao1* eingesetzt. Die Transkripte der *svao2* wurden mit dem Primerpaar DERNAi2for/rev amplifiziert und das Primerpaar DERNAi3for/rev diente zur Amplifikation der Transkripte der *svao3*.

In der oberen Zeile befinden sich die Banden der PCRs auf die Transkripte der *svao1*, *svao2* und *svao3*; in der unteren Zeile wurden die PCR-Produkte der PCRs der jeweiligen Proben auf die Transkripte des Kontroll-Gens *dhs* aufgetragen. Zunächst ist zu sehen, dass die Banden der PCRs auf das Kontroll-Gen nicht in allen Proben gleich stark sind. Somit lassen sich nicht alle Proben untereinander vergleichen, sondern nur solche, bei denen die Banden der cDNA-Transkripte des Kontroll-Gens etwa gleich stark sind. Möglich ist, dass nicht exakt die gleiche Menge an RNA in jeder Probe eingesetzt wurde, wofür auch das Formaldehyd-MOPS-Gel (s. Abbildung 37) spricht. Desweiteren ist es auch möglich, dass die cDNA-Synthese oder die DNA-Amplifikation während der PCR nicht in allen Proben gleich effizient verlaufen ist. Die gleichen semiquantitativen RT-PCRs wurden auch mit allen sechs Kontroll-HR-Klonen (SW-1 bis SW-6) durchgeführt und sind in Abbildung 39 zu sehen. Hier ist auffällig, dass bei der Amplifikation des Kontroll-Gens in der Probe SW-1 kein Amplifikat nachgewiesen wurde, während die Ansätze der Amplifikation der Transkripte der *svao2* und der *svao3* je ein Amplifikat aufweisen. Der Ausfall dieser Bande lässt sich nur mit einem Ausfall der PCR erklären. Da jedoch noch fünf weitere Proben von Kontroll-HR-Klonen für einen Vergleich mit den RNAi- und Überexpression-Klonen zur Verfügung standen, wurde die PCR dieser Probe nicht weiter optimiert. Um eine Aussage über die Reduktion der Transkriptmenge der RNAi-Klone (s. Abbildung 38) zu treffen, wurden diese mit den Kontroll-HR-PCRs (s. Abbildung 39) verglichen.

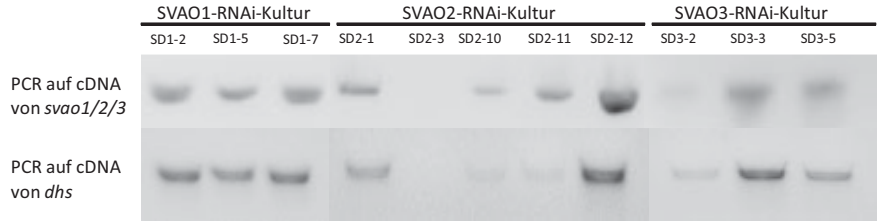


Abbildung 38: Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs der RNAi-Klone. In der oberen Zeile sind alle Proben der RNAi-Klone aufgezeigt. Bei der Kultur zur Herabregulation der Expression von *svao1* wurden PCRs mit allen Klonen auf die Transkripte der *svao1* mit dem Primerpaar DERNAi1for/rev durchgeführt. Bei der Kultur zur Herabregulation der Expression von *svao2* wurden PCRs mit allen Klonen auf die Transkripte von *svao2* mit dem Primerpaar DERNAi2for/rev durchgeführt und bei der Kultur zur Herabregulation der Expression von *svao3* wurden PCRs mit allen Klonen auf die Transkripte der *svao3* mit dem Primerpaar DERNAi3for/rev durchgeführt. Die untere Zeile zeigt die Ergebnisse der PCR mit dem Primerpaar DE-DHSfor/rev auf die Transkripte des Kontroll-Gens *dhs* mit allen RNAi-Klon-Proben.

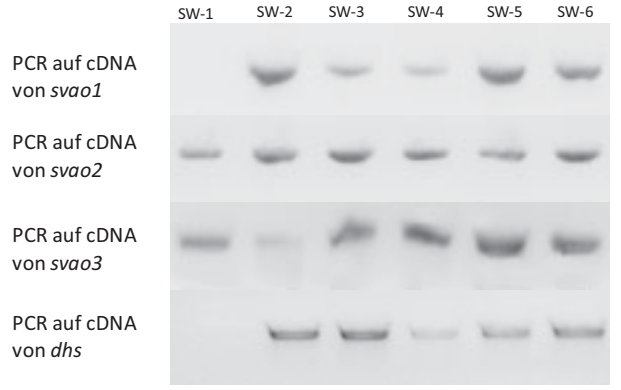


Abbildung 39: Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs der Kontroll-HR-Klone mit den RNAi-Primern. Die Proben der Kontroll-HR-Klone (SW-1 bis SW-6) wurden mit dem Primerpaar DERNAi1for/rev auf Transkripte von *svao1* (1. Zeile), mit dem Primerpaar DERNAi2for/rev auf Transkripte von *svao2* (2. Zeile), mit dem Primerpaar DERNAi3for/rev auf Transkripte von *svao3* (3. Zeile) und mit dem Primerpaar DE-DHSfor/rev auf Transkripte der *dhs* untersucht (4. Zeile).

Vergleicht man zunächst die Klone zur Herabregulation der Expression von *svao1* unter Berücksichtigung der Ergebnisse der PCRs auf die Transkripte der *dhs*, so stellt man fest, dass alle drei Klone SVAO1 gleich stark zu exprimieren scheinen. Die gleiche PCR mit den Kontroll-HR-Klonen zeigt hingegen recht unterschiedlich starke Banden, was sich jedoch bei einem Blick auf die DHS-PCRs mit einer unterschiedlichen Menge an cDNA erklären lässt. Vergleicht man die SVAO1-Banden von SW-2 oder SW-3 mit SD1-2, SD1-5 und

SD1-7, ist sichtbar, dass bei den SVAO1-RNAi-Klonen keine Reduktion der cDNA-Transkriptmenge von *svao1* im Gegensatz zu den Kontroll-HRs nachweisbar ist.

Auch bei den SVAO2-RNAi-Klonen zeigt die PCR mit DHS-spezifischen Primern, dass die Ausgangsmengen an cDNA unterschiedlich zu sein scheinen oder die PCRs unterschiedlich quantitativ verlaufen sind. Die Probe SD2-3 zeigt weder bei der PCR auf Transkripte der *dhs*, noch bei der auf die Transkripte der *svao2* eine Bande. Das spricht für eine komplett gescheiterte cDNA-Synthese. Bei allen anderen Proben ist ebenfalls eine positive Relation zwischen der PCR auf die Transkripte der *dhs* und auf die der Transkripte der *svao2* zu sehen. Damit sind die Schwankungen in der Intensität der Banden der PCR auf die Transkripte der *svao2* nicht auf eine unterschiedlich herabregulierte SVAO2-Expression zu beziehen. Auch der Vergleich aller SVAO2-RNAi-Proben mit den Kontroll-HR-Proben zeigt keine deutlichen Unterschiede in der Transkriptmenge.

Dieselbe Aussage lässt sich auch auf die Ergebnisse der PCRs mit SVAO3-spezifischen Primern übertragen. Auch hier schwankt die Intensität der Banden der cDNA-Amplifikation von *svao3* im gleichen Maße wie die der cDNA-Amplifikation der *dhs*. Auch ein Vergleich mit den Kontroll-HR-Proben zeigt, dass sich die cDNA-Transkriptmengen der *svao3* zwischen RNAi- und Kontroll-HR-Klonen nicht deutlich unterscheiden.

Zusammenfassend lassen sich zwei Aussagen treffen: Zum einen scheint die korrekte Quantifizierung der cDNA nicht in allen Proben gelungen zu sein, da die Intensität der Banden nach Amplifikation von cDNA-Transkripten der *dhs* zum Teil stark schwankt. Zum anderen lassen sich auch in den Proben, in denen die cDNA-Quantifizierung gelungen zu sein scheint, keine deutlichen Unterschiede in den Transkriptmengen von *svao1, svao2* und *svao3* zwischen RNAi-Klonen (zum Beispiel SD1-5 und SD3-5) und Kontroll-HR-Klonen (zum Beispiel SW-5 und SW-6) feststellen.

Abbildung 40 und Abbildung 41 sind analog zu Abbildung 38 und Abbildung 39 aufgebaut. Abbildung 40 zeigt in der oberen Zeile die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs der Überexpressions-Klone mit den Primern aus Tabelle 47, die untere Zeile zeigt Ergebnisse der PCRs mit denselben Proben auf die Transkripte der *dhs*.

Die Expression der *svao1*-Transkripte scheint in etwa in allen drei Überexpressions-Klonen gleich stark zu sein. Dies ist in sofern erstaunlich, da die PCR auf das Kontroll-Gen unter-

schiedlich starke Banden aufweist und bei der Kultur S1-2 sogar ganz ausgefallen ist. Möglich ist jedoch auch ein Pipettierfehler in dieser Probe. Ein Vergleich der Proben der PCRs mit den SVAO1-Überexpressions-Primern zeigt, dass die Expression von SVAO1 in den Überexpressions- und Kontroll-HR-Klonen gleichmäßig zu sein scheint.

Dasselbe Ergebnis zeigt sich bei den Überexpressions-Klonen von SVAO3. In allen drei Proben scheint die Expression in etwa gleichstark zu sein. Zudem zeigt auch die PCR mit den SVAO3-spezifischen Überexpressions-Primern mit den Kontroll-HR-Klonen sehr gleichförmige Banden.

Abbildung 40: Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs der *Senecio*-Überexpressions-Kulturen. In der oberen Zeile sind die Ergebnisse der PCRs der Überexpressions-Kulturen auf die Transkripte von *svao1* und *svao3* dargestellt. Die PCRs zum Nachweis der Transkripte von *svao1* wurden mit dem Primerpaar Overex1for/Overex1+2rev durchgeführt. Die PCRs zum Nachweis der Transkripte von *svao3* wurden mit dem Primerpaar Overex3for/rev durchgeführt. In der unteren Zeile sind die Ergebnisse der PCR auf die Transkripte der *dhs* mit dem Primerpaar DE-DHSfor/rev dargestellt.

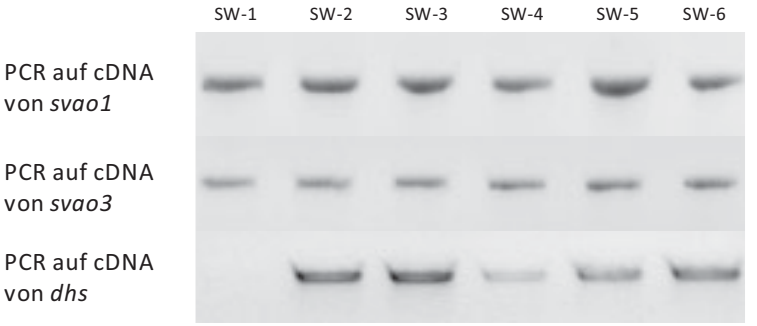


Abbildung 41: Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs der Kontroll-HR-Klone mit den Überexpressions-Primern. Die Proben der Kontroll-HR-Klone (SW-1 bis SW-6) wurden mit dem Primerpaar Overex1for/Overex1+2rev auf Transkripte von *svao1* (1. Zeile), mit dem Primerpaar Overex3for/rev auf Transkripte von *svao3* (2. Zeile) und mit dem Primerpaar DE-DHSfor/rev auf Transkripte der *dhs* untersucht (3. Zeile).

Die Ergebnisse der RT-PCRs der Überexpressions- und Kontroll-HR-Klone führten dazu, dass auch die SVAO1- und SVAO3-RNAi-Klone mit den Überexpressions-Primern gegen die beiden Sequenzen überprüft wurden, um zu testen, ob sich die Transkriptmenge in den RNAi-Klonen verändert hatte. Das Ergebnis bei beiden Kulturen war, dass alle Banden gleich stark waren. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den RNAi-, Überexpressions- und Kontroll-HR-Klonen. Diese Gleichförmigkeit führte zu der Vermutung, dass die verwendeten Primer eventuell nicht spezifisch für die untersuchten Sequenzen waren. Daher wurden für alle drei DAO-Sequenzen neue Primer entworfen, die in Tabelle 49 beschrieben sind. Es wurde versucht, diese Primer auf möglichst für jede Sequenz typische Bereiche zu legen, um eine hohe Spezifität zu erreichen. Alle drei Bereiche befinden sich in den proteinkodierenden Bereichen der Sequenzen. In der cDNA-Sequenz, die für SVAO1 kodiert, ist dies ein 343 bp langer Bereich. Bei der cDNA-Sequenz, die für SVAO2 kodiert, hat der amplifizierte Bereich eine Größe von 629 bp und bei der SVAO3-kodierenden cDNA-Sequenz ist dieser 358 bp groß. Zunächst wurden die Primer auf ihre Spezifität untersucht. Dazu wurde eine PCR durchgeführt, in der jedes der drei Primerpaare in drei Ansätzen mit Konstrukten von den drei DAO-cDNA-Sequenzen eingesetzt wurde. Als Positivkontrolle für das Primerpaar DESVAO1RTfor/rev (= Primerpaar 1) wurde das Konstrukt pDE25 (s. Tabelle 53, Kapitel 7.2) verwendet, für das Primerpaar DESVAO2RTfor/rev (= Primerpaar 2) wurde ein Konstrukt aus SVAO2-kodierender cDNA in pET28a (Denker, 2008) und für das Primerpaar DESVAO3RTfor/rev (= Primerpaar3) wurde pDE27 (s. Tabelle 53, Kapitel 7.2) verwendet. Das Ergebnis dieser PCR mit neun Proben ist in Abbildung 42 zu sehen.

Tabelle 49: Primer 3 für semiquantitative RT-PCRs. Die Primerpaare DESVAO1RTfor/rev (= Primerpaar 1), DESVAO2RTfor/rev (= Primerpaar 2) und DESVAO3RTfor/rev (= Primerpaar 3) wurde in den Amplifikationen der Transkripte von *svao1/2/3* eingesetzt.

Name	**Sequenz**	**verwendete Annealing-Temperatur**	**Zyklen-anzahl**
DESVAO1RTfor	5'-AGTATGACCTGCATAGGGCTATAGGGGTC-3'	61°C	29
DESVAO1RTrev	5'-GGGTTTTTCTGAATGTGGGTTACTAGTGG-3'		
DESVAO2RTfor	5'-GTTATCGGCTACACATGTATTGTACTCGC-3'	58°C	32
DESVAO2RTrev	5'-CAGTTGTGAAAGAGTTAGAGCGTTCAAC-3'		
DESVAO3RTfor	5'-TATAGATATTGGAGTTGTGACTCCAGTTGATGTCGG-3'	64,5°C	32
DESVAO3RTrev	5'-GCAGCCTTCGGTAACGGGATGTTCTTC-3'		

Abbildung 42: PCR zum Test der Primer-Spezifität. Primerpaar 1. DESVAO1RTfor/rev amplifiziert einen 343 bp großen Sequenzbereich, **Primerpaar 2**: DESVAO2RTfor/rev amplifiziert einen 629 bp großen Sequenzbereich, **Primerpaar 3**: DESVAO3RTfor/rev amplifiziert einen 358 bp großen Sequenzbereich, **M1**: DNA-Marker 100 bp (Invitrogen), **M2**: DNA-Marker Fast Ruler Middle Range (Fermentas); **SVAO2-K.:** SVAO2-Konstrukt (Denker, 2008)

Die beiden PCRs mit den Primerpaaren 1 und 2 zeigten deutlich, dass diese spezifisch waren. In der PCR mit Primerpaar 1 zeigte nur der Ansatz ein Amplifikat, in dem die Positivkontroll-DNA enthalten (pDE25) war. Sequenzbereiche der anderen Konstrukte wurden nicht vervielfältigt. Ebenso zeigte bei der PCR mit dem Primerpaar 2 nur der Ansatz ein Amplifikat, in dem das SVAO2-Konstrukt (Denker, 2008) als Positivkontroll-DNA enthalten war. Das dritte Primerpaar schien hingegen in Ansatz 1 in geringem Ausmaß an pDE25 zu binden, am SVAO2-Konstrukt jedoch nicht. Die DNA der Positivkontrolle pDE27 wurde erwartungsgemäß deutlich amplifiziert. Bei der Auswertung der folgenden semiquantitativen RT-PCRs muss daher berücksichtigt werden, dass bei den PCRs mit dem 3. Primerpaar in geringem Maße auch Transkripte von *svao1* miterfasst wurden.

Mit diesen drei Primerpaaren wurden alle RNAi-, Überexpressions- und Kontroll-HR-Klone überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 bis Abbildung 45 dargestellt. Auch diese Ergebnisse müssen wieder unter Berücksichtigung der PCRs auf das cDNA-Transkript des

Kontroll-Gen *dhs* gewertet werden, deren Ergebnisse sich unter den Proben auf die Transkripte von *svao1*, *svao2* und *svao3* befinden.

Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, zeigten die PCRs mit dem Primerpaar 1 auf die Transkripte von *svao1* ähnliche Ergebnisse, wie sie bereits mit den Klonierungsprimern erzielt worden sind. Es ist deutlich zu sehen, dass die RNAi-Klone auf keinen Fall weniger cDNA-Transkript von *svao1* als die Kontroll-HRs und sogar die Überexpressions-Klone aufwiesen. Auch in dieser PCR wird deutlich, dass bei der Probe S1-2 ein Fehler in der cDNA-Synthese vorliegen muss, da weder die Transkripte der *dhs* noch die der *svao1* amplifiziert wurden. Festzustellen ist außerdem, dass im Kontroll-HR-Klon SW-1 kein cDNA-Transkript der *dhs*, dafür aber welches der *svao1* amplifiziert wurde. Dies könnte an einer ausgefallen PCR liegen. Wie schon erwähnt wurden alle Proben zwar auf einem Agarosegel analysiert, die zu vergleichenden Proben aber zwecks größerer Übersichtlichkeit in den folgenden Abbildungen untereinander gestellt. Aus diesem Grund sind alle PCRs der Kontroll-HR-Klone auf die Transkripte der *dhs* identisch.

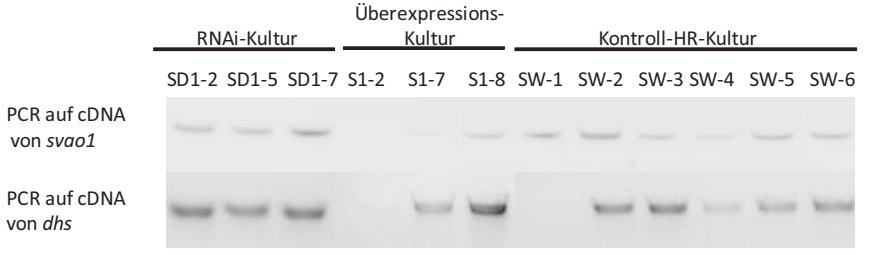


Abbildung 43: Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs mit dem Primerpaar 1. Die obere Zeile zeigt die Ergebnisse der semiquantiativen RT-PCRs mit dem Primerpaar, das Transkripte des *svao1*-Gens spezifisch amplifiziert. Untersucht wurden alle SVAO1-RNAi-Klone, alle SVAO1-Überexpressions-Klone und die Kontroll-HR-Klone. Die untere Zeile zeigt die Ergebnisse der Amplifikation der Transkripte der *dhs* in allen oben genannten Klonen.

Die größten Unterschiede zu den RT-PCRs mit den alten Primern sind in der PCR mit Primerpaar 2 zu erkennen. Außer in Klon SD2-12 wurde in keiner der RNAi-Klone ein cDNA-Transkript von *svao2* nachgewiesen. Vergleicht man jedoch die Banden der Amplifikation des cDNA-Transkripts der *dhs*, so sind alle Banden deutlich schwächer als die der Probe SD2-12. Möglich ist deshalb, dass die Konzentration der gesamten cDNA in den Proben SD2-1, SD2-10 und SD2-11 so gering ist, dass die cDNA-Transkriptmengen des *svao2*-Gens in diesen Proben durch die PCR nicht in einen detektierbaren Bereich amplifiziert wurden.

Das Ausbleiben der Signale ist somit nicht unbedingt auf eine starke Herabregulation der SVAO2-Expression zurückzuführen. In Probe SD2-3 wurde weder cDNA-Transkript der *dhs* noch solches von *svao2* amplifiziert. In diesem Fall scheint die cDNA-Synthese komplett gescheitert zu sein.

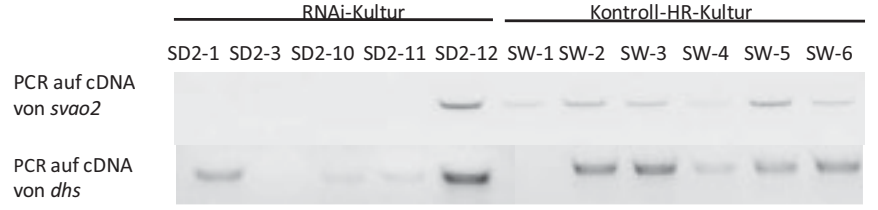


Abbildung 44: Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs mit Primerpaar 2. Die obere Zeile zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs mit dem Primerpaar, das Transkripte des *svao2*-Gens spezifisch amplifiziert. Untersucht wurden alle SVAO2-RNAi-Klone und die Kontroll-HR-Klone. Die untere Zeile zeigt die Ergebnisse der Amplifikation der Transkripte der *dhs* in allen oben genannten Klonen.

Ebenfalls ähnlich wie bei den RT-PCRs mit den Klonierungsprimern ist auch die PCR mit den neuen Primern auf die Transkripte von *svao3* ausgefallen. Sie zeigt wieder sehr gleichmäßig intensive Amplifikationsprodukte in allen Proben trotz starker Schwankungen in der Intensität der Banden der Transkripte der *dhs*. Da der Spezifitätstest gezeigt hat, dass Transkripte der *svao1* in geringem Maße durch Primerpaar 3 amplifiziert werden, ist es möglich, dass hier die Transkripte der in allen *Senecio*-HR-Klonen natürlicherweise vorkommenden *svao1* nachgewiesen wurden.

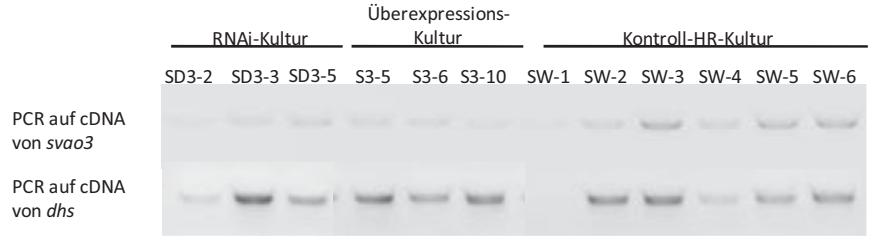


Abbildung 45: Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs mit Primerpaar 3. Die obere Zeile zeigt die Ergebnisse der semiquantiativen RT-PCRs mit dem Primerpaar, das Transkripte des *svao3*-Gens spezifisch amplifiziert. Untersucht wurden alle SVAO3-RNAi-Klone, alle SVAO3-Überexpressions-Kulturen und die Kontroll-HR-Klone. Die untere Zeile zeigt die Ergebnisse der Amplifikation der Transkripte der *dhs* in allen oben genannten Klonen.

Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs legen die Vermutung nah, dass weder das Herunterregulieren der SVAO-Expression in den RNAi-Versuchen, noch das Hochregulieren dieser in den Überexpressions-Versuchen funktioniert hat. Die cDNA-Transkriptmengen der *svao*-Gene schienen weder im Vergleich mit denen der Kontroll-HRs, noch mit denen der Überexpressions-Klone deutlich verringert zu sein. Auffällig waren auch die Schwankungen, die die Transkripte des Kontroll-Gens aufwiesen. Möglich ist, dass unterschiedlich viel RNA für die einzelnen Proben eingesetzt wurde. Das Formaldehyd-MOPS-Gel (s. Abbildung 37) zeigt leichte Schwankungen in den RNA-Konzentrationen aller Proben. Desweiteren ist es auch möglich, dass die cDNA-Synthese nicht in allen Proben gleich effizient verlaufen ist. Dieser Faktor lässt sich nur anhand des Kontroll-Gens überprüfen. Dieses Kontroll-Gen sollte konstitutiv exprimiert sein, d.h. keinerlei Regulation unterliegen. Für *S. vernalis* liegen bisher keine Informationen darüber vor, dass die *dhs* reguliert wird (Anke et al., 2004; Reimann et al., 2004). Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die *dhs* ein konstitutiv exprimiertes Gen ist und sich daher als Kontroll-Gen für die semiquantitativen RT-PCRs eignet. In *Arabidopsis thaliana* wurde hingegen gezeigt, dass die *dhs* in seneszenten Blättern und unter Trockenstress hochreguliert ist (Wang et al., 2001; Thompson et al., 2004). Tomatenpflanzen, in denen die Expression der DHS konstitutiv herunter reguliert wurde, zeigten eine verzögerte Fruchtreife (Wang et al., 2005a). Man könnte daher vermuten, dass die *dhs* auch in den *Senecio*-HR-Kulturen in Zusammenhang mit Seneszenz reguliert wird. Trotz der Bemühungen, alle HRs unter gleichen Bedingungen (gleiche Anzuchtzeit, gleiche Ausgangsmenge an Wurzelmaterial für die Anzucht, gleiche Menge an Medium, gleiche Anzuchttemperatur) anzuziehen, befanden sich diese zum Zeitpunkt der RNA-Gewinnung in unterschiedlichen Stadien der Alterung, da die verschiedenen Klone sehr unterschiedlich schnell wuchsen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die DHS in den unterschiedlichen Klonen aus diesem Grund verschieden stark exprimiert und somit als Kontroll-Gen ungünstig war.

Geht man davon aus, dass die Ergebnisse der RT-PCRs trotzdem auswertbar sind, dann zeigen diese, dass weder das Herunterregulieren der SVAO-Expression in den RNAi-Versuchen, noch das Hochregulieren dieser in den Überexpressions-Versuchen erfolgreich war. Vergleiche der Ergebnisse der RT-PCRs und der PA-Analysen bestätigen diese Vermutung. Beispielsweise zeigte die SVAO3-RNAi-Probe SD3-5, die mit der 3,5 fachen Menge

an Gesamt-PAs im Vergleich zu den Kontroll-HRs einen besonders hohen PA-Gehalt aufwies, weder eine auffällig erhöhte, noch verringerte Menge an cDNA-Transkript von *svao3*. Ebenso zeigte auch die SVAO3-Überexpressions-Probe S3-5, die nur etwa 10 % der Menge an Gesamt-PAs im Vergleich zu den Kontroll-HRs produzierte, keine erhöhte Transkriptmenge von *svao3*. Diese beiden Beispiele zeigen deutlich, dass es keine Korrelation zwischen den PA-Gehalten und den *svao*-Transkriptmengen gibt. Die Schwankungen in den PA-Gehalten sind damit nicht durch die Effekte des RNAi-Mechanismuses oder der Überexpression von SVAO1 oder SVAO3 hervorgerufen worden. Mögliche Ursachen für diese Schwankungen werden in Kapitel 4.2.3 ausführlicher diskutiert.

3.6.4.3 Analyse der *egfp*-Transkription mittels PCR

Nachdem die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs (s. Kapitel 3.6.4.2) die Vermutung nahe gelegt haben, dass weder der RNAi-Mechanismus, noch der der Überexpression zu den Schwankungen im PA-Gehalt der *Senecio*-HR-Klone geführt hatte, sollte festgestellt werden, ob die Transformationskassette in den genetisch veränderten HRs überhaupt transkribiert wurde. Da alle RNAi- und Überexpressions-Konstrukte (s. Abbildung 20 und Abbildung 21 in Kapitel 3.6.1) in ihrer Transformationskassette ein *egfp*-Gen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors integriert haben, bot sich als Expressions-Kontrolle eine Untersuchung der transgenen Klone unter UV-Licht an. Exprimiertes EGFP kann im UV-Licht durch seine grüne Fluoreszenz identifiziert werden. Christian Sievert aus unserer Arbeitsgruppe führte daher freundlicherweise Vorversuche durch, in denen er einige HRs von RNAi- und Überexpressions-Klonen, sowie Kontroll-HRs unter UV-Licht mikroskopierte. In diesen Tests zeigte *S. vernalis* eine starke Eigenfluoreszenz, die eine Erkennung eines eventuell exprimierten EGFPs schwer möglich machte. Aus diesem Grund wurde eine PCR auf Transkripte des *egfp*-Gens mit der cDNA aller RNAi- und Überexpressions-Klone durchgeführt. Dazu wurden Primer entworfen, die in einer PCR den kompletten 799 bp langen proteinkodierenden Bereich der Transkripte des *egfp*-Gens amplizifieren, das Signalpeptid des EGFPs zum endoplasmatischen Retikulum allerdings aussparen, da dieses nur in den Überexpressions-Konstrukten vorkommt. Bis auf dieses Signalpeptid sind die Sequenzen des *egfp*-Gens und des *egfper*-Gens identisch. Diese Primer sind in Tabelle 50 aufgeführt.

Tabelle 50: Primer für PCRs auf die Transkripte des *egfp*-Gens

Name	Sequenz	verwendete Annealing-Temperatur	Zyklen-anzahl
DE-egfpFOR	5'-CTTACAGCTCGTCCTTCTTGT-3'	53°C	27
DE-egfpREV	5'-ATGGTGAAGACTAATCTTTTTCTC-3'		

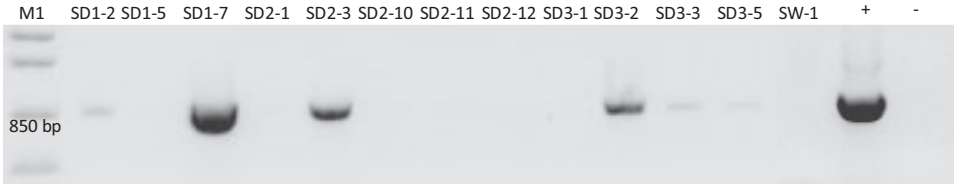


Abbildung 46: Ergebnisse der PCR auf Transkripte des *egfp*-Gens. Gezeigt sind die Ergebnisse der PCRs aller RNAi-Klone, eines Kontroll-HR-Klons **(SW-1)**, einer Positivkontrolle **(+)** und einer Negativkontrolle **(-)**. Als DNA für die Positivkontrolle diente der Vektor pH7WG2D,1 (s. Kapitel 7.1). In der Negativkontrolle wurde Wasser statt cDNA eingesetzt. **M1**: DNA-Marker Fast Ruler Middle Range (Fermentas).

Die PCR auf das cDNA-Transkript des *egfp*-Gens wurden mit allen untersuchten RNAi- und Überexpressions-Klonen durchgeführt. Wie in Abbildung 46 zu sehen ist, wurden Transkripte des *egfp*-Gens in den RNAi-Klonen SD1-7, SD2-3, SD3-2 und schwach in SD1-2, SD3-3 und SD3-5 nachgewiesen. Im Kontroll-HR-Klon SW-1 wurde erwartungsgemäß kein EGFP exprimiert. Auffallend ist, dass in keinem der Überexpressions-Klone (nicht dargestellt) cDNA-Transkript des *egfp*-Gens mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Vergleicht man den Aufbau der RNAi- und Überexpressionskassette (s. Abbildung 20 und Abbildung 21), so ist festzustellen, dass die Rekombinationsstellen und damit die Fremd-DNA in beiden Konstrukten unter der Kontrolle eines konstitutiven 35S-Promotors steht. Das *egfp*-Gen steht im RNAi-Konstrukt ebenfalls unter der Kontrolle eines 35S-Promotors, das des Überexpressions-Konstrukts hingegen unter der eines ebenfalls konstitutiven *rol*D-Promotors. Dieser Promotor entstammt dem R_i-Plasmid von *A. rhizogenes* und reguliert dort die Expression der *rol*-Gene (Goddijn et al., 1993). Möglicherweise hat das Einbringen des *rol*D-Promotors in die HRs durch das Überexpressions-Konstrukt zusätzlich zu einer Kopie, die durch die agrobakterieneigenen *rol*-Gene und deren Promotoren in das Genom der HRs integriert worden ist, zu einer Cosuppression und damit zum Herunterregulieren der *rol*D-Promotoren in *S. vernalis* geführt. Das würde erklären, warum nur EGFP in den RNAi-Klonen exprimiert wurde.

Die Ergebnisse zeigen also, dass zumindest das *egfp*-Gen der RNAi-Klone unter der Kontrolle des 35S-Promotors zum Teil transkribiert wurde, während das *egfper*-Gen der Überexpressions-Klone in *S. vernalis* unter der Kontrolle des *rol*B-Promotors scheinbar nicht transkribiert wurde. Eine Aussage über die Transkription der SVAO-kodierenden Fremd-DNA kann allerdings nicht gemacht werden, da diese in allen Konstrukten unter der Kontrolle eigener Promotoren stand, die keinen Einfluss auf die *egfp*-Transkription hatten.

3.6.5 Analyse der transgenen *Nicotiana tabacum*-HR-Klone

Ebenso wie die *Senecio*-HR-Klone wurden auch alle Tabak-HR-Klone zuerst auf ihre Antibiotika-Empfindlichkeit (s. Kapitel 3.6.3.1) untersucht. Von allen HR-Klonen, die hygromycinresistent waren, wurde genomische DNA isoliert (s. Kapitel 2.6.1) und diese mittels PCR (s. 2.11.1) auf Integration des *rol*B-Gens, der Fremd-DNA zwischen den *attB*-Rekombinationsstellen und auf eventuelle Verunreinigungen durch persistierende Agrobakterien über das *virD1*-Gen untersucht.

Um zu überprüfen, ob die *svao1*- und *svao3*-Gene in den Tabak-HR-Klonen exprimiert wurden, wurden einige ausgewählte Klone mittels RT-PCR auf Transkripte von *svao1* und *svao3* untersucht.

Solche Tabak-HR-Klone, die sowohl das *rol*B-Gen als auch die SVAO-kodierende Fremd-DNA aufwiesen, wurden am VTT auf ein mögliches verändertes Nikotin-Alkaloid-Spektrum untersucht (s. Kapitel 3.6.5.2). Wie bereits in Kapitel 3.6 erwähnt, sollte über eine mögliche Veränderung des Nikotin-Alkaloid-Spektrums auf weitere Eigenschaften und Funktionen der heterolog exprimierten SVAOs geschlossen werden. Da Homospermidin als Ausgangsstoff der PA-Biosynthese und mögliches Substrat der gesuchten DAO in geringen Mengen auch in Tabak vorkommt (Ober et al., 2003a), wäre es darüber hinaus möglich, dass bei der heterologen Expression einer an der PA-Biosynthese beteiligten DAO eine PA-Vorstufe im transgenen Tabak gebildet wird.

3.6.5.1 Analyse der Diaminoxidase-Transkripte in einigen Tabak-HR-Klonen

Zur Überprüfung der Expression der Fremd-DNA einiger transgener Tabak-Klone wurden sechs ausgewählte Tabak-HR-Klone auf Transkripte von *svao1* und *svao3* untersucht. Dazu

wurde von zwei SVAO1-Überexpressions-Klonen, zwei SVAO3-Überexpressions-Klonen und zwei Kontroll-HR-Klonen Gesamt-RNA isoliert (s. Kapitel 2.6.2), eventuelle Verunreinigungen genomischer DNA mittels DNase abgebaut (s. Kapitel 2.6.3) und die RNA in cDNA umgeschrieben (s. Kapitel 2.6.4). Mit dieser cDNA wurden PCRs mit den in Tabelle 49 aufgeführten Primern durchgeführt. Mit dem Primerpaar DESVAO1RTfor/rev wurde versucht, in den beiden SVAO1-HR-Überexpressions-Klonen und den beiden Kontroll-HR-Klonen Transkripte der fremdexprimierten SVAO1 nachzuweisen. Mit der cDNA der beiden SVAO3-HR-Überexpressions-Klonen und zweier Kontroll-HR-Klonen wurden PCRs mit dem Primerpaar DESVAO3RTfor/rev auf Transkripte der fremdexprimierten SVAO3 durchgeführt.

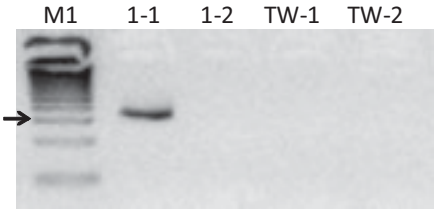


Abbildung 47: Ergebnisse der RT-PCR auf Transkripte von *svao1* in Tabak-HR-Klonen. Gezeigt sind die Ergebnisse zweier SVAO1-Überexpressions-Klone (**1-1** und **1-2**) und zweier Kontroll-HR-Klone (**TW-1** und **TW-2**). Erwartet wurde ein 343 bp großes DNA-Fragment. **M1**: DNA-Marker 100 bp (Invitrogen), **Pfeil** zeigt auf 300 bp-Fragment.

Wie Abbildung 47 zeigt, wurde cDNA-Transkript der fremdexprimierten SVAO1 im Tabak-Klon 1-1 nachgewiesen, im Klon 1-2 nicht. Das heißt, dass die Fremdgen-Expression in Tabak zumindest teilweise zu funktionieren scheint. Da auch diese beiden Kulturen durch PCR-Kontrolle auf Transkripte des *virD1*-Gens überprüft wurden (s. Kapitel 3.6.3.2), ist ein falsch-positives Ergebnis durch mögliche Verunreinigung durch persistierende Agrobakterien nicht wahrscheinlich. In den Kontroll-HR-Klonen TW-1 und TW-2 wurde erwartungsgemäß kein Transkript fremdexprimierter SVAO1 nachgewiesen. Damit wurde gezeigt, dass die verwendeten Primer an kein in Tabak vorkommendes Transkipt unspezifisch binden. In den untersuchten SVAO3-HR-Überexpressions-Klonen wurde kein Transkript fremdexprimierter SVAO3 nachgewiesen (nicht dargestellt). Die Ergebnisse dieser RT-PCRs werden in Kapitel 3.6.5.2 in Zusammenhang mit der Analyse der Nikotin-Alkaloide diskutiert.

3.6.5.2 Analyse der Alkaloide mittels ^{1}H-NMR

Alle untersuchten Tabak-HR-Klone, die bei der Untersuchung der genomischen DNA mittels PCR (s. Kapitel 3.6.3.2) sowohl das *rol*B-Gen, also auch die Fremd-DNA zwischen den *attB*-Rekombinationsstellen aufwiesen, wurden am VTT Technical Research Centre Finland, Espoo, vier Wochen lang in Flüssigkultur angezogen (s. Kapitel 2.2.3). Nach der Ernte wurden die Alkaloide nach Häkkinen et al. isoliert (Häkkinen et al., 2004) und von Petri Lackman mittels Wasserstoff-Isotopen-Kernspinresonanz-Spektroskopie (^{1}H-NMR) analysiert. Ein Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren der Überexpression-Klone und der Kontroll-HR-Klone zeigte keine Unterschiede in den Alkaloid-Spektren der Proben, auch nicht der Probe 1-1, die eine heterologe Expression der SVAO1 gezeigt hatte (s. Kapitel 3.6.5.1). Abbildung 48 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt des ^{1}H-NMR-Spektrums einer Messung eines SVAO1-Überexpressions-HR-Klons, überlagert mit dem Spektrum eines SVAO3-Überexpressions-HR-Klons und dem eines Kontroll-HR-Klons. Gezeigt ist der Ausschnitt von 6 bis 9,5 ppm. In diesem Bereich liegen Signale von etlichen aromatischen Verbindungen wie beispielsweise Nikotin, Anatabin und Chlorogensäure. Es ist deutlich zu sehen, dass dieser Ausschnitt des Spektrums der drei Proben fast identisch ist. Auch im restlichen Spektrum gab es keine auffälligen Unterschiede zwischen den drei Proben. Die Überlagerung der Spektren aller untersuchten Proben zeigte, dass die heterologe Expression von der Fremd-DNA in *N. tabacum* zu keiner Veränderung im Alkaloid-Spektrum geführt hat.

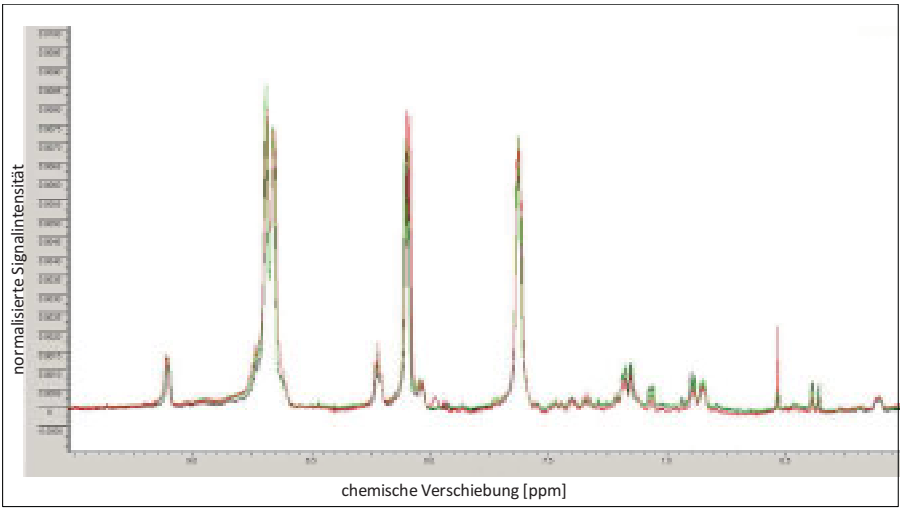


Abbildung 48: ^{1}H-NMR-Spektrum dreier Tabak-HR-Klone. Dargestellt ist das ^{1}H-NMR-Spektren eines SVAO1-Überxpressions- Klons (rot), das eines SVAO3-Überexpressions-Klons (grün) und das eines Kontroll-HR-Klons (schwarz) im Bereich von 9,5 bis 6 ppm.

Ein möglicher Grund, warum die Fremd-DNA-transkribierenden Klone wie 1-1 keine keine Veränderungen im Gegensatz zu Kontroll-HRs im Alkaloid-Spektrum aufweisen könnte sein, dass die Fremd-DNA zwar in das Tabak-Genom integriert worden ist, jedoch später durch Punkt-Mutation verändert wurde. Führt so eine Punkt-Mutation der Fremd-DNA zu einer Leserahmen-Verschiebung, so ist zwar ein Nachweis des Transkriptes der Fremd-DNA mittels PCR möglich, die Translation der cDNA kann jedoch zu einem durch Transkriptionsabbruch unvollständigen Protein führen. Desweiteren wäre eine durch Mutation veränderte Aminosäurensequenz möglich, die zu einem inaktiven Enzym führen könnte.

Für wahrscheinlicher wird jedoch die Hypothese gehalten, dass in Tabak-HR-Klonen wie dem Klon 1-1 zwar SVAO1 exprimiert wird, die Auswirkungen der Enzymaktivität aus unterschiedlichen Gründen jedoch nicht im Alkaloid-Spektrum sichtbar sind. Einer der Gründe könnte sein, dass SVAO1 zwar exprimiert, aber auf Grund nichtoptimaler Bedingungen im transgenen Klon nicht aktiv ist oder in solchen Zellbereichen vorliegt, in denen kein Substrat zur Umsetzung zur Verfügung steht. Möglich ist auch, dass SVAO1 zwar aktiv ist, jedoch zur Umsetzung von Produkten beiträgt, die durch die Alkaloid-Extraktion mit anschließender ^{1}H-NMR nicht erfasst werden. Beispielsweise könnte durch SVAO1 eine Umsetzung im Primärstoffwechsel katalysiert werden, wie zum Beispiel die Umsetzung von

Putrescin zu 4-Aminobutanal (s. Kapitel 4.1, Abbildung 4). Eine weitere Möglichkeit, warum keine Änderungen im Alkaloid-Spektrum zu sehen sind, könnte darin liegen, dass die aktiv exprimierte SVAO1 in den Tabak-HR-Klonen die Aufgabe einer tabakeigenen DAO, zum Beispiel der *N*-Methylputrescinoxidase (Katoh et al., 2007), übernimmt und damit die Synthese von Nikotin-Alkaloiden katalysiert. In diesem Fall wäre ebenfalls keine qualitative, sondern höchstens eine quantitative Änderung der Nikotin-Alkaloide im NMR-Spektrums zu erwarten. Eine quantitative Änderung durch eine erhöhte Nikotin-Synthese wäre jedoch nur dann zu erwarten, wenn die *N*-Methylputrescinoxidase eine Art „Flaschenhals“ in der Nikotin-Synthese darstellen würde und die Verfügbarkeit der Produkte der Katalyse des Enzyms damit die Geschwindigkeit der Nikotin-Synthese limitieren würden. Dazu liegen jedoch bislang keine Ergebnisse vor.

4 Diskussion

Das Gleichgewicht zwischen pflanzenfressenden Tieren und Pflanzen wurde unter anderem ermöglicht, indem Pflanzen im Laufe der Evolution mit Hilfe ihres Sekundärstoffwechsels verschiedene Fraßgifte entwickelten. Zu diesen gehören neben Tanninen, Terpenoiden und Glucosinolaten auch die Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs). Der Mechanismus, der zur Verteidigung der PA-haltigen Pflanzen führt ist seit längerer Zeit bekannt (Cheeke, 1988). Hingegen liegen die unterschiedlichen Enzyme, die an der PA-Biosynthese beteiligt sind, noch weitgehend im Dunklen. In unserer Arbeitsgruppe wurden deshalb in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um einzelne Enzyme der Synthese zu identifizieren und diese vor dem Hintergrund der Evolution zu beleuchten.

Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, gibt es zahlreiche Hinweise, dass im Rahmen der PA-Biosynthese eine Diaminoxidase (DAO) die Umsetzung von Homospermidin zu einer Vorstufe der Necinbase, dem „Metabolit x" katalysiert (Frölich et al., 2007). Dieser Metabolit wird durch weitere, noch nicht aufgeklärte Syntheseschritte zur Necinbase umgesetzt. Um diese DAO zu identifiziern, wurden PCRs mit degenerierten Primern mit der cDNA von *Eupatorium cannabinum* und *Senecio vernalis* durchgeführt (Denker, 2008). Dabei wurden in *E. cannabinum* eine und in *S. vernalis* drei diaminoxidaseähnliche Sequenzen gefunden. Diese *Senecio*-DAOs wurden SVAO1, SVAO2 und SVAO3 genannt. Zwei der drei Sequenzen wurden von Denker bereits in unterschiedlichen Systemen heterolog exprimiert. Diese Versuche brachten jedoch keinen Aufschluss über eine mögliche Beteiligung der DAOs an der PA-Biosynthese. Die vorliegende Arbeit hatte deshalb das Ziel, weitere Informationen über die Funktionen der drei DAOs zu ermitteln. Dazu wurde zunächst versucht, SVAO3, die noch nicht heterolog exprimiert wurde, in *E. coli* zu exprimieren. Anschließend wurde versucht, mit unterschiedlichen Methoden die Expressionsorte der drei DAOs in *S. vernalis* zu ermitteln. Schließlich wurden RNAi- und Überexpressions-Studien mit *S. vernalis* und *Nicotiana tabacum* durchgeführt.

4.1 Die SVAO3-Familie und deren heterologe Expression

Nach der Identifikation der drei SVAO-cDNAs aus *S. vernalis* wurden SVAO1 und SVAO2 in *E. coli* und der Hefe *Pichia pastoris* heterolog exprimiert (Denker, 2008). Die Expressionsansätze in der Hefe *Pichia pastoris* zeigten keine Expression und in *E. coli* führten sie zu

unlöslichem Protein, sogenannten *Inclusion Bodies* (IB). Es wurde versucht, diese IB durch unterschiedliche Methoden in ein lösliches, aktives Enzym zu überführen. Einer dieser Methoden war die Coexpression mit Chaperonen, die schon zuvor als Problemlösung bei IBs aus heterolog exprimierten Diaminoxidasen beschrieben wurde (Jung et al., 2003; Molnar et al., 2003). Die Coexpressionen von SVAO1 und SVAO2 mit dem Chaperon DnaK und den Co-Chaperonen DnaJ und GrpE (Plasmid pRDKJG) führte zu löslichem, aber inaktivem Protein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun auch die dritte Sequenz, SVAO3, exprimiert werden, um dieses Protein biochemisch zu charakterisieren und daraus Rückschlüsse ziehen zu können, ob es sich bei der SVAO3 um eine an der PA-Biosynthese beteiligte DAO handelt. cDNA der SVAO3 wurde dazu in den Vektor pET28a kloniert und zunächst ohne Chaperone in *E. coli* exprimiert. Die schwache Expression führte zu unlöslichem Protein in Form von IBs. Auch eine Coexpressionen mit zwei unterschiedlichen Chaperonen führte lediglich zu unlöslichem Protein.

Denker (2008) hatte im Laufe der Arbeiten festgestellt, dass es sich bei der dritten identifizierten Sequenz, SVAO3, um eine Gen-Familie handelt. Demnach exprimiert *S. vernalis* in den unterschiedlichen Pflanzenorganen (Blatt und Wurzel) mindestens drei Mitglieder dieser Familie. Diese stimmen zu 98,0 %, bzw. 99,8 % mit der zuerst aus dem Blatt identifizierten SVAO3 überein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bei folgenden Untersuchungen noch zwei weitere Vertreter dieser SVAO3-Familie identifiziert:

- Bei der Klonierung für die heterologe Expression von SVAO3 in *E. coli* wurde eine SVAO3-cDNA-Sequenz gefunden und kloniert. Diese Sequenz stimmt zu 99,3 % auf Aminosäureebene mit der SVAO3-Sequenz überein, die von Denker als SVAO3 definiert wurde.

- Der zweite neue Vertreter dieser Familie wurde bei der Klonierung der SVAO3 für die Überexpression in den Versuchspflanzen *S. vernalis* und *N. tabacum* identifiziert. Diese Sequenz stimmt auf Aminosäureebene zu 99,1 % mit der von Denker als SVAO3 definierten Sequenz überein.

Das Phänomen der Multigen-Familie bei einer Diaminoxidase wurde bereits in unterschiedlichen Pflanzen beschrieben. Bei der Identifizierung einer *N*-Methylputrescinoxidase in *N. tabacum* wurde eine kleine Multigen-Familie mit zurzeit fünf bekannten Mitgliedern gefunden (Heim und Jelesko, 2004). *N*-Methylputrescinoxidasen katalysieren die Umsetzung von *N*-Methylputrescin zu 1-Methylaminobutanal; eine Reaktion, die vermutlich analog zu der Umsetzung von Homospermidin in der PA-Biosynthese verläuft. Zwei dieser Mitglieder wurden bereits sequenziert und weisen eine Übereinstimmung auf Aminosäureebene von 98,6 % auf. Eine weitere kleine Multigen-Familie von Diaminoxidasen wurde bereits 1996 in *Pisum sativum* vermutet, aber nicht weiter untersucht (Angelini et al., 1996).

4.2 Alternative Strategien zur Untersuchung der SVAO-Funktionen

Die Expressionen und die anschließenden Charakterisierungen der drei DAOs aus *S. vernalis* führten nicht zur Beantwortung der Frage, ob eine der DAOs an der PA-Biosynthese beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde nach alternativen Methoden zur Beantwortung dieser Frage gesucht. Dabei sollten zunächst die Expressionsorte der drei DAOs lokalisiert werden, um über diese Rückschlüsse auf die Funktion der Enzyme zu ziehen.

4.2.1 Lokalisierung der HSS in *Jacobaea vulgaris* zur Etablierung der *in situ*-Hybridisierung

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Lage der Homospermidin-Synthase (HSS), Eingangsenzym der PA-Biosynthese, in unterschiedlichen PA-haltigen Pflanzen mittels Immunolokalisation identifiziert. Während die HSS beispielsweise in *S. vernalis, E. cannabinum* und *Jacobaea vulgaris* in den Wurzeln lokalisiert wurde (Moll et al., 2002; Anke et al., 2004; Niemüller, 2007), zeigte *Phalaenopsis* spec. die Expression der HSS sowohl in den Luftwurzelspitzen als auch in jungen Blütenknospen (Anke et al., 2008). *Heliotropium indicum*, ein subtropischer Vertreter der Familie der Boraginaceen, exprimiert die HSS hingegen ausschließlich in den Zellen der unteren Epidermis des Blattes und der unteren Epidermis junger Sprossachsen (Niemüller, 2007).

Anders als in den genannten Studien erscheint die Methode der Immunolokalisation für die Lokalisierung von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 aus folgenden Gründen nicht geeignet zu sein:

- Zum einen war es nicht möglich, die drei DAOs als lösliches Protein zu exprimieren. Ein lösliches, aufgereinigtes Protein ist jedoch Voraussetzung für die Herstellung von hochspezifischen, polyklonalen Antikörpern, wie sie für die Immuno-Studien in der Vergangenheit verwendet worden waren. Wird ein Protein in Form eines IBs für die Herstellung der Antikörper verwendet, so führt dies auf Grund der unphysiologischen Faltung des Antigens oft zu Antikörpern mit geringer Antigenität.

- Dazu kommt, dass die drei SVAOs eine hohe Identität auf Nukleinsäureebene aufweisen (s. Tabelle 51). Bei den Lokalisationsversuchen der HSS neben der zu ca. 74 % identischen DHS in *Heliotropium indicum* und *Cynoglossum officinale* zeigte Niemüller, dass es zu Kreuzreaktivitäten der Antikörper kam (Niemüller, 2007). Damit ist eine Unterscheidung von SVAO1 und SVAO2 mit Hilfe der Immunolokalisation schwierig. Da sich SVAO3 etwas stärker von den beiden anderen SVAOs unterscheidet, wäre eventuell eine Markierung von SVAO3 mittels polyklonaler Antikörper möglich gewesen.

Tabelle 51: Identität der drei SVAOs aus *S. vernalis* auf Nukleinsäureebene modifiziert nach Denker (2008).

	SVAO1	**SVAO2**	**SVAO3**
SVAO1	-	75,8 %	59,5 %
SVAO2	75,8 %	-	62,1 %
SVAO3	59,5 %	62,1 %	-

Um die Probleme der Kreuzreaktivität durch die hohe Identität der drei SVAO-cDNA-Sequenzen zu umgehen, wurde die Methode der *in situ*-Hybridisierung verwendet. Da diese Methode nicht in der Arbeitsgruppe etabliert war, wurde sie zunächst angewandt, um die mRNA eines Enzyms zu lokalisieren, das bereits durch Immunolokalisierung nachgewiesen wurde. Ausgewählt wurde die HSS aus *J. vulgaris*, die schon in jungen Wurzeln in spezifischen Zellen des Rindenparenchyms lokalisierte wurde (Niemüller, 2007). Andere Arbeiten zeigten, dass häufig der Lokalisationsort der mRNA und des Proteins zusammenfallen (St-Pierre et al., 1999; Suzuki et al., 1999; Mu et al., 2009). Dies erscheint sinnvoll, da mRNA üblicherweise am Expressionsort durch Transkription der DNA des Zellkerns synthetisiert wird und nach der Translation am Ribosom von endogenen RNasen abgebaut wird. Eine Ausnahme bildet eine Beobachtung bei *Papaver somniferium* (Bird et al., 2003). Während die mRNA von drei an der Benzylisochinolin-Alkaloidsynthese beteiligten

Enzymen in den Geleitzellen der Siebröhren lokalisiert wurde, detektierte man die dazu gehörigen Proteine in den Siebröhren. Begründet wird diese räumliche Trennung damit, dass Siebröhren weder Zellkerne noch Ribosomen besitzen. Proteine müssen daher in der Geleitzelle synthetisiert und dann in die Siebröhre transportiert werden. Wie dieser Transport abläuft, ist bisher ungeklärt. Da jedoch die spezialisierten Zellen des Rindenparenchyms in *J. vulgaris*, in denen die HSS lokalisiert wurde, Zellen mit einer funktionsfähigen Proteinbiosynthese sind, konnte eine Colokalisation von mRNA der HSS und vom HSS-Protein erwartet werden. Abbildung 49 bestätigt diese Annahme. Mit beiden Lokalisationsmethoden wurden dieselben Zellbereiche markiert. Diese Zellen befinden sich im Rindenparenchym und der Endodermis außerhalb des Perizykels gegenüber dem Phloem. Hartmann und Mitarbeiter zeigten mit Hilfe des „Gürtel-Versuchs", dass der Transport von PAs aus der Wurzel, dem Syntheseort, in die oberirdischen Pflanzenorgane in *Senecio vulgaris* überwiegend über das Phloem verläuft (Hartmann et al., 1989). Daher ist es naheliegend, dass die Biosynthese der PAs in solchen Gewebebereichen stattfindet, die an das Phloem angrenzen.

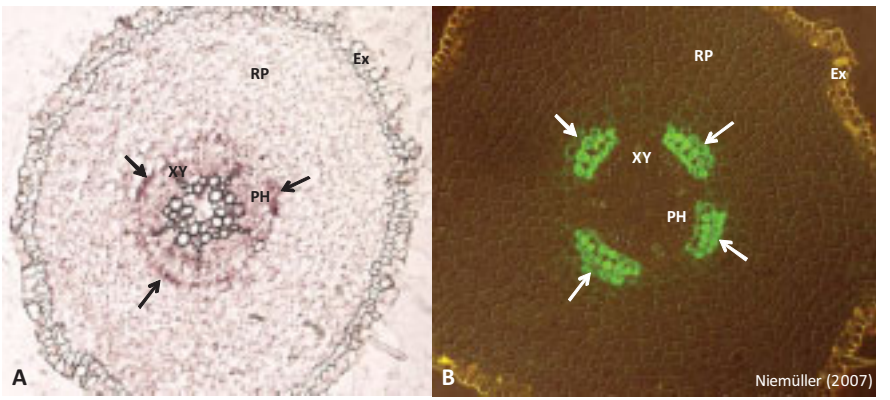


Abbildung 49: Lokalisationen der HSS in *J. vulgaris.* A: Bild der *in situ*-Hybridierung, **B:** Bild der Immunolokalisation; **EX:** Exodermis, **PH:** Phloem, **RP:** Rindenparenchym, **XY:** Xylem, **Pfeile** weisen auf die jeweiligen Markierungen.

Mit der Detektion der HSS ist das erste Enzym der PA-Biosynthese in diesen phloemnahen Zellen lokalisiert worden. Um zu wissen, ob die vollständige PA-Biosynthese in diesen Zellen stattfindet, wäre es wichtig, weitere Enzyme dieser Biosynthese nachzuweisen. Dieser Ansatz wurde bei der Markierung der mRNA der SVAOs in *S. vernalis* verfolgt, der in Kapitel 4.2.2 beschrieben und diskutiert wird.

Um auch in der besser zu handhabenden Versuchspflanze (s. Kapitel 4.2.2) *J. vulgaris* mögliche Diaminoxidasen mittels *in situ*-Hybridisierung lokalisieren zu können, wurde mit degenerierten Primern nach Diaminoxidasen mit möglicher Beteiligung an der PA-Biosynthese gesucht (s. Kapitel 3.5). Bei diesen Versuchen wurde keine diaminoxidase-ähnliche Sequenz gefunden. Dies könnte mehrere mögliche Ursachen haben:

- Die RNA, die zur Durchführung der PCRs verwendet wurde, wurde im Oktober 2005 aus einer Sterilpflanze isoliert. In der Vergangenheit wurde schon häufiger beobachtet, dass die PA-Biosynthese jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt. So ließ sich die HSS in *E. cannabinum* zur Blütezeit der Pflanze sehr gut nachweisen. Schon bei der Fruchtbildung konnte die HSS nicht mehr mittels Immunolokalisation nachgewiesen werden (Anke et al., 2004). Für *J. vulgaris* wurden solche extremen Regulationen der PA-Biosynthese bisher noch nicht beschrieben. Es ist jedoch vorstellbar, dass die Enzyme der PA-Biosynthese und damit auch eine daran beteiligte Diaminoxidase zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung nicht exprimiert wurden und daher auch keine RNA dieser Enzyme nachweisbar war. Die verwendete cDNA wurde nicht auf Transkripte der HSS untersucht. Mit solch einem Test könnte dieses Problem in Zukunft umgangen werden.

- Ein weiteres Problem bei den PCRs mit degenerierten Primern kann am Alignment liegen, auf dessen Grundlage die Primer konstruiert wurden. Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, wurde das Alignment mit DAO-cDNA-Sequenzen von *S. vernalis*, *E. cannabinum, Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea, Pisum sativum, Lens culinaris* und *Cicer arietinum* erstellt. Es wurde versucht, die Primer auf solche Sequenzbereiche zu legen, die möglichst hoch konserviert sind. Im Zweifelsfall wurden jedoch die Sequenzen von solchen Arten stärker bewertet, die ebenso wie die Versuchspflanze der Familie der Asteraceae angehören. Dazu gehören die drei Sequenzen aus *S. vernalis* und die aus *E. cannabinum*. Im Oktober 2005 wurde die Versuchspflanze *J. vulgaris* unter dem Namen *Senecio jacobaea* noch in die Gattung *Senecio* eingeordnet, so dass eine enge Verwandtschaft mit *S. vernalis* vermutet wurde. Neuere Ergebnisse zeigen allerdings, dass *J. vulgaris* nicht in diese Gattung, sondern in die Gattung der *Jacobaea* einzuordnen ist (Pelser et al., 2006). Damit wird

nun auch im Pflanzennamen deutlich, dass *J. vulgaris* weniger eng mit *S. vernalis* verwandt ist als andere zur Gattung *Senecio* gehörende Arten. Möglicherweise wurde die Gewichtung beim Primerbau zu stark auf die *Senecio*-Sequenzen gelegt.

4.2.2 Lokalisierung der drei Diaminoxidasen in *Senecio vernalis*

Von Immunolokalisationsstudien in den Wurzeln von *S. vernalis* (Moll et al., 2002) war bekannt, dass die HSS – ebenso wie in *J. vulgaris* – in klar abgegrenzten Zellen des Rindenparenchyms und der Endodermis exprimiert wird. Sucht man nach einer DAO, die den nächsten Schritt der PA-Biosynthese nach der HSS katalysiert, so liegt die Vermutung nahe, dass diese im selben oder angrenzenden Gewebe wie die HSS exprimiert wird. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass es bisher keine Hinweise auf einen interzellulären Transport von PA-Metaboliten und –Produkten in den Wurzeln unterschiedlicher *Senecio*-Arten gibt (Toppel et al., 1987; Moll, 2002). Dass Enzyme einer Biosynthese räumlich nahe beieinander liegen können, wurde im Falle zweier Tabak-Alkaloid-Biosynthese-Enzyme sehr eindrucksvoll gezeigt (Heim und Jelesko, 2004): Bei der Isolierung einer DAO aus Tabak (McLauchlan et al., 1993) wurde ein zweites Enzym der Nikotin-Synthese mitisoliert. Es handelte sich um eine *S*-Adenosylhomocysteinsynthase, die vermutlich in einem Multi-Enzym-Komplex mit der Tabak-DAO vorliegt. Es sind jedoch auch Fälle beschrieben, in denen die unterschiedlichen Enzyme eines Biosyntheseweges in unterschiedlichen Geweben lokalisiert wurden, wie beispielsweise die Enzyme der Monoterpen-Indol-Alkaloid-Synthese in *Catharantus roseus*, die in mindestens vier unterschiedlichen Geweben detektiert wurden (St-Pierre et al., 1999; Burlat et al., 2004).

Um den organspezifischen Expressionsort der drei SVAOs aus *S. vernalis* zu bestimmen, wurden zunächst RT-PCRs (s. Kapitel 3.2) und Northern-Blots mit RNA-Präparationen aus Wurzel, Spross und Blatt durchgeführt. Diese wiesen die mRNA des *svao3*-Gens in allen Pflanzenorganen nach. mRNA-Transkripte des *svao2*-Gens wurden nur mittels RT-PCR und nicht im Northern-Blot nachgewiesen. Dies lässt sich mit der höheren Empfindlichkeit der RT-PCR erklären. Aufmerksam machte jedoch das durch beide Methoden bestätigte Ergebnis, dass das *svao1*-Gen nur in der Wurzel transkribiert wurde. Zusammen mit den Ergebnissen der Lokalisation der HSS in der Wurzel und den Überlegungen über einen gemeinsamen Expressionsort der Enzyme der PA-Biosynthese, wurde SVAO1 zum „hoffnungsvollsten Kandidaten“ für eine DAO mit Beteiligung an der PA-Biosynthese.

Weitere Hinweise auf zellulärer Ebene sollte die Lokalisation der SVAOs in der Wurzel von *S. vernalis* durch *in situ*-Hybridisierung liefern. Zunächst wurden pro Schnitt nur die zwei Sonden für jeweils eine Sequenz eingesetzt. Dabei konnten keine Signale detektiert werden. Erst bei der Kombination von den Sonden gegen mRNA-Transkripte von *svao1* und *svao3* wurden Markierungen sichtbar (s. Abbildung 50). Diese liegen in Zellen des Rindenparenchyms außerhalb des Perizykels gegenüber dem Phloem. Es handelt sich um dieselben Gewebebereiche, in denen Moll et al. die HSS lokalisierte (Moll et al., 2002). Da diese Markierung nicht mit den Sonden für nur eine Sequenz erzielt werden konnte, ist so allerdings nicht eindeutig zu bestimmen, ob mRNA-Transkripte des *svao1*-Gens oder des *svao3*-Gens in denselben Zellen wie die HSS zu finden sind.

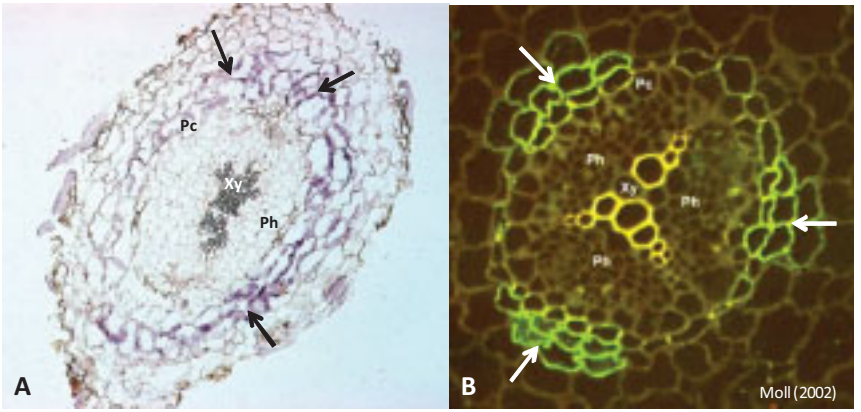


Abbildung 50: Lokalisationen der SVAOs und der HSS in *S. vernalis*. A: Lokalisation der SVAO1 und/oder SVAO3 auf mRNA-Ebene, **B:** Lokalisation der HSS auf Proteinebene; **Pc:** Perizykel, **Ph:** Phloem, **XY:** Xylem, **Pfeile** weisen auf die jeweiligen Markierungen.

Zusammenfassend können aus den Lokalisierungen der mRNA-Transkripte der *svao*-Gene folgende Schlüsse gezogen werden:

- Die mRNA des *svao2*-Gens wurde nur in oberirdischen Organen von *S. vernalis* gefunden. SVAO2 scheint deshalb nicht an der PA-Biosynthese beteiligt zu sein. Da auch Wurzelorgankulturen von *S. vernalis* PAs synthetisieren, müssen alle Biosynthese enzyme auch in der Wurzel vorkommen. Möglicherweise handelt es sich bei SVAO2 um ein Enzym des Primärstoffwechsels mit spezieller Funktion in oberirdischen Pflanzenteilen. Ein ähnliches Beispiel einer Polyaminoxidase (PAO), die nur in oberirdischen Pflanzenteilen exprimiert wird, wurde im Maiskeimling beobach-

tet: Licht führt hier zu einer hohen Auxin-Konzentration, die wiederum die Expression einer PAO anregt. Diese PAO setzt sekundäre Aminogruppen von Polyaminen um, wobei Wasserstoffperoxid frei wird. Wasserstoffperoxid wird in vielen Pflanzen in einen Zusammenhang mit einer Lignifizierung und Zellwandverstärkung gebracht, die dem wachsenden Keimling Stabilität verleiht (Laurenzi et al., 1999; Cona et al., 2003; Liszkay et al., 2004).

- mRNA-Transkripte des *svao3*-Gens wurden mit allen drei Lokalisationsmethoden in der ganzen Pflanze nachgewiesen. Möglich ist, dass es sich bei SVAO3 um eine DAO handelt, die die oxidative Desaminierung unterschiedlicher Substrate in allen Pflanzenorganen katalysiert. Dafür spricht, dass es sich wie schon in Kapitel 4.1 beschrieben bei *svao3* offensichtlich um eine kleine Gen-Familie handelt, die alle zu etwa 98 bis 99 % identisch sind (Denker, 2008). Diese Vielfalt auf Sequenzebene kann Variationen im Protein bedingen, was zu Unterschieden in der Affinität zu möglichen Substraten führen kann. Damit könnte SVAO3 verschiedene Substrate umsetzen. Bei der DAO, die Homospermidin umsetzt, handelt es sich aber vermutlich um ein hochspezialisiertes Enzym, das sich eventuell aus einer DAO des Primärstoffwechsels entwickelt hat. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, wird eine solche Entstehung durch Genduplikation und Funktionsänderung auch für die HSS, dem Eingangsenzym der PA-Biosynthese, postuliert (Ober und Hartmann, 1999a). Ein weiteres Beispiel einer solchen Funktionsänderung nach einer Genduplikation ist aus Tabak bekannt. Die *N*-Methyltransferase und die Spermidin-Synthase besitzen vermutlich ein gemeinsames Vorfahren-Gen (Hashimoto et al., 1998).

- Die mRNA des *svao1*-Gens wurde sowohl mit dem Northern-Blot, als auch mit der RT-PCR ausschließlich in der Wurzel detektiert, was sie zum „hoffnungsvollsten Kandidaten“ unter den drei SVAOs machte. Es darf jedoch auch nicht außer Acht gelassen werden, dass es noch andere Stoffwechselreaktionen mit möglicher Beteiligung einer DAO gibt, die ausschließlich in den Wurzeln einer Pflanze stattfinden, wie zum Beispiel die Mobilisierung von chemisch gebundenen Nährstoffvorräten durch Ausscheidung von Säure und Chelat-Bildnern. Bei der *in situ*-Hybridisierung konnte nur durch eine Kombination von Sonden gegen mRNA des

svao1-Gens und des *svao3*-Gens ein Signal erzeugt werden, das sich im gleichen Gewebebereich wie die HSS befand. Hieraus könnte man schließen, dass es sich bei der gesuchten PA-spezifischen DAO zwar um keine der drei bereits identifizierten SVAOs handelt, diese jedoch möglicherweise eine strukturelle Ähnlichkeit mit SVAO1 und SVAO3 besitzt. Möglicherweise handelt es sich bei der gesuchten DAO um eine „Mischform", deren Nukleinsäuresequenz den Sequenzen von *svao1*- und *svao3*-Transkripten besonders ähnelt. Dann wären Sonden beider Sequenzen notwendig, um ein deutliches Signal bei der Hybridisierung zu erzeugen.

Sowohl die heterologen Expressionen als auch die verschiedenen Lokalisationen der mRNA der drei svao-Gene brachten also keine eindeutige Aussage darüber, ob eine der drei vorliegenden SVAOs aus S. vernalis an der PA-Biosynthese beteiligt ist.

Tabelle 52: Zusammenfassung der Lokalisierungen der SVAOs. n. u.: nicht untersucht, **++:** starkes Signal nachgewiesen, **+:** mittleres Signal nachgewiesen, **-:** kein Signal nachgewiesen**, Abkürzung: *in situ*-Hyb.:** *in situ*-Hybridisierung.

	SVAO1			SVAO2			SVAO3		
Pflanzenorgan	***in situ*-Hyb.**	**Northern-Blot**	**RT-PCR**	***in situ*-Hyb.**	**Northern-Blot**	**RT-PCR**	***in situ*-Hyb.**	**Northern-Blot**	**RT-PCR**
Blatt	n. u.	-	-	n. u.	-	+	n. u.	+	+
Spross	n. u.	-	-	n. u.	-	+	n. u.	++	+
Wurzel	++	+	+	-	-	-	++	++	+

Die Ergebnisse, die in Tabelle 52 zusammengefasst sind, lassen erkennen, dass zur Gewinnung weiterer Informationen über die untersuchten Enzyme eine neue Strategie entwickelt werden musste, die andere Methoden einbeziehen sollte. Deshalb wurden die in Kapitel 3.5 beschriebenen Pflanzentransformationen eingesetzt und im Folgenden diskutiert.

4.2.3 Einfluss der Agrobakterien-vermittelten Transformation der Versuchspflanzen in Bezug auf die Pyrrolizidin-Alkaloide

Agrobakterien sind dafür bekannt, DNA auf Hefe und andere Pilze und sogar menschliche Zellen zu übertragen (Piers et al., 1996; de Groot et al., 1998; Kelly und Kado, 2002; Kunik et al., 2001). In den meisten Fällen werden sie jedoch dazu genutzt, um Fremd-DNA in Pflanzen einzuschleusen. Verwendet werden dazu überwiegend die beiden Stämme *Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium rhizogenes*. Bei infizierten Pflanzen ruft *A. rhizogenes* starkes Wurzelwachstum mit auffällig stark behaarten, stark verzweigten,

feinen Wurzeln hervor, die als *root-mat* („Wurzel-Matte“) bezeichnet werden. In der Natur werden nur einige Pflanzenspezies durch *A. rhizogenes* infiziert, wie z. B. der Apfel, die Karotte und die Gurke (Riker et al., 1959; Davioud et al., 1988; Weller et al., 2005). Unter Laborbedingungen lassen sich hingegen über 450 Spezies mittels *A. rhizogenes* transformieren (Tepfer, 1984). Bei der Transformation überträgt *A. rhizogenes* einen Teil eines agrobakterieneigenen Plasmids (*transferred DNA*, T-DNA), das *root-inducing* (R_i)-Plasmid genannt wird (s. Abbildung 51). Die T-DNA wird durch einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus ins pflanzliche Genom eingebaut (Tzfira et al., 2004).

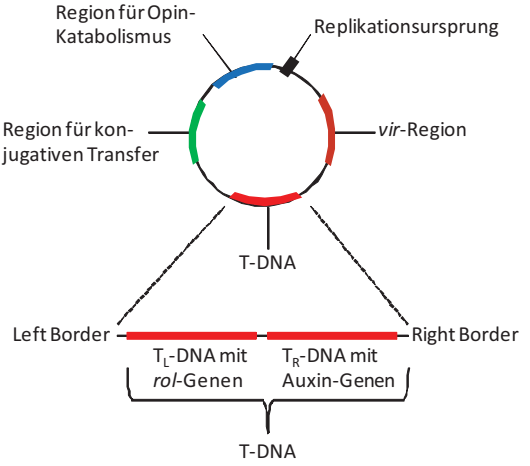


Abbildung 51: Schematische Darstellung eines R_i-Plasmids von *A. rhizogenes* des Stammes LBA9402 modifiziert nach Veena und Taylor (2007).

Für die Transformationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die beiden binären Pflanzenvektoren pK7GWIWG2D(II),0 und pH7WG2D,1 verwendet. Sie basieren auf dem Grundgerüst eines verhältnismäßig kleinen binären Vektors (Karimi et al., 2002), so dass sie im Labor gut handhabbar sind. Nach Integration der Fremd-DNA in die T-DNA der Vektoren werden diese in *A. rhizogenes* transformiert. Bei einer Infektion wird die T-DNA des binären Vektors vermutlich durch das Genprodukt der *vir*-Gene des agrobakterieneigenen R_i-Plasmides ins Wirtsgenom der Versuchspflanze integriert. Zusätzlich wird auch die T-DNA des R_i-Plasmids übertragen und integriert.

Die Methode der Transformation mit *A. rhizogenes* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Rolle der drei identifizierten SVAOs aus *S. vernalis in planta* zu untersuchen.

Um die RNAi- und Überexpressions-Klone von *S. vernalis* bezüglich der quantitativen Veränderungen bewerten zu können, wurden zunächst PAs aus HR-Klonen isoliert, die mit *A. rhizogenes* ohne einen binären Pflanzenvektor mit Fremd-DNA transformiert worden waren. Diese Klone werden im Folgenden als „Kontroll-HR-Klone" bezeichnet.

Die ersten gaschromatischen Analysen dieser PAs aus Kontroll-HR-Klonen zeigten, dass die bereits für *S. vernalis* beschriebenen PAs (Toppel et al., 1987) Senecionin, Integerrimin, Seneciovernin und Senkirkin im Chromatogramm zu finden waren (s. Kapitel 3.6.4.1.1), während die PAs Seneciphyllin und Retrorsin nur in so geringen Mengen detektiert wurden, dass eine qualitative Auswertung ungenau schien. Die Identität der zunächst über den Retentionsindex identifizierten PAs wurde anschließend mittels GC-MS bestätigt.

Nachdem einige Optimierungen des Protokolls durchgeführt worden waren, waren die Schwankungen der bestimmten PA-Gehalte für die vier PAs Senecionin, Integerrimin, Seneciovernin und Senkirkin innerhalb unterschiedlicher Extraktionen und Analysen eines HR-Klons gering. Es zeigte sich jedoch, dass der prozentuale Anteil eines jeden PAs am Gesamt-PA-Gehalt von Klon zu Klon recht stark schwankte. Der Gesamt-PA-Gehalt definiert sich durch die Summe der PA-Gehälter von Senecionin, Integerrimin, Seneciovernin und Senkirkin in Prozent und wird für die folgenden Berechnungen 100 % gleichgesetzt. Die Beobachtung der schwankenden Anteile der einzelnen PAs am Gesamt-PA-Gehalt wurde bereits bei der Untersuchung von sieben *S. vernalis*-Freilandpflanzen gemacht (von Borstel et al., 1989). Hier variierte der prozentuale Anteil von Senecionin am Gesamt-PA-Gehalt beispielsweise um 33 %. Die Untersuchungen der Kontroll-HR-Klone zeigten zwar auch größere Schwankungen im prozentualen Senecionin-Anteil am Gesamt-PA-Gehalt (14 %), jedoch nicht so stark wie bei den Freilandversuchen beobachtet worden war. Diese Differenzen lassen sich damit erklären, dass bei den Freilandpflanzen die äußeren Bedingungen nicht so gleichförmig wie bei der Anzucht der HR-Klone gewesen sein können. Dass sich diese äußeren Bedingungen stark auf die prozentuale PA-Anteile am Gesamt-PA-Gehalt auswirken, wurde auch am Beispiel von *J. vulgaris* gezeigt. Es wurde fest-

gestellt, dass verschiedene *J. vulgaris*-Klone unterschiedlich stark auf Umwelteinflüsse reagieren (Hagen, 2003). Eine weitere Reaktion ist die Erhöhung des PA-Gehalts unter starker Sonneneinstrahlung (van der Meijden et al., 1985).

Diese Ergebnisse zeigen jedoch die Notwendigkeit, sich bei der Bewertung der Ergebnisse der RNAi- und Überexpressions-HR-Klone auf den Vergleich des Gesamt-PA-Gehalts der unterschiedlichen Klone zu beschränken, da dieser bei standardisierten Kulturbedingungen weniger Schwankungen unterliegt. Zudem war eine weitere Differenzierung der prozentualen PA-Anteile am Gesamt-PA-Gehalt für die Beantwortung der Fragestellung nicht notwendig.

Eine weitere interessante Beobachtung wurde beim Vergleich der prozentualen PA-Anteile mit der Literatur gemacht. In *S. vernalis* wurden die prozentualen Anteile jedes PAs am Gesamt-PA-Gehalt getrennt in Blüte, Wurzelorgankultur (WOK), Pflanzenwurzel und Blatt gemessen (Toppel et al., 1987). Der Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der Kontroll-HR-Klone ist in Abbildung 52 dargestellt. Für beide Untersuchungen wurde dasselbe Extraktions-Protokoll und dieselbe GC-Analyse mit sehr ähnlichen Geräteeinstellungen (Hartmann und Toppel, 1987) verwendet.

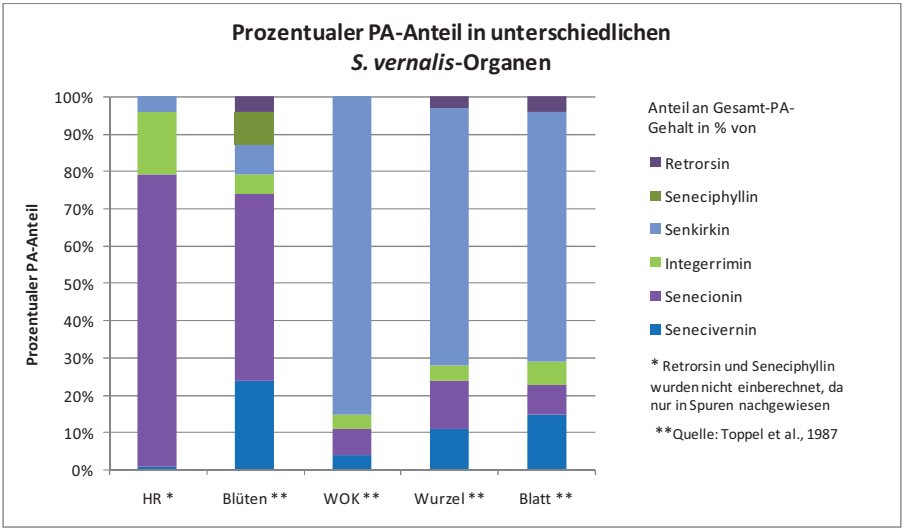


Abbildung 52: Vergleich der prozentualen PA-Anteile in unterschiedlichen *S. vernalis*-Organen. Verglichen werden die prozentualen PA-Anteile an Retrorsin, Seneciphyllin, Senkirkin, Integerrimin, Seneciovernin und Senecionin in *Hairy Root*-Klonen (**HR**, Teil dieser Arbeit), sowie in Blüten, Wurzelorgankulturen (**WOK**), Wurzel und Blatt von *S. vernalis* (Toppel et al., 1987).

Vergleicht man die Ergebnisse der Kontroll-HRs zunächst mit denen der WOK und der Pflanzenwurzel, so stellt man fest, dass die von Toppel et al. untersuchten Wurzelorgane Senkirkin mit 85 %, bzw. 69 % als Haupt-PA aufweisen, während bei den HRs Senecionin mit 78 % den größten Anteil einnimmt. Senecionin befindet sich in den von Toppel et al. (1987) untersuchten Organen nur in einem Anteil von 7 % in der WOK und 13 % in der Pflanzenwurzel; Senkirkin wurde in den HR-Klonen nur in einem Anteil von 7 % nachgewiesen. Das Blatt zeigt ein ähnliches Verteilungsspektrum wie die Pflanzenwurzel, während die Blüte eine PA-Verteilung zeigt, die der Verteilung der HRs am ähnlichsten ist. Diese weist einen Senecionin-Gehalt von 50 % auf. Senecionin stellt somit in den Blüten und den HR-Klonen das Haupt-PA dar.

Möglicherweise ist der hohe Gehalt an Senecionin und Integerrimin in den HRs auf die Eigenschaft der HRs zurückzuführen, sehr schnell zu wachsen und damit einen großen Anteil an jungem Gewebe aufzuweisen. In den Wurzeln von *J. vulgaris* wurde die Beobachtung gemacht, dass Wurzelspitzen, also junge Wurzelteile, einen hohen Anteil an „primären PAs“ (Senecionin-*N*-Oxid, Integerrimin-*N*-Oxid) besitzen (s. Abbildung 53). Diese primären PAs stellen bei der PA-Biosynthese die Grundstruktur dar. Erst nach einigen Wochen wird diese in Folge von weiteren Transformationsreaktionen zu „sekundären PAs“ wie Seneciphyllin-*N*-Oxid umgewandelt (Hartmann, 1994). Daher liegt die Vermutung nahe, dass in den HRs auf Grund der kurzen Anzuchtzeit von 28 Tagen diese Transformationen der PAs noch nicht stattgefunden haben.

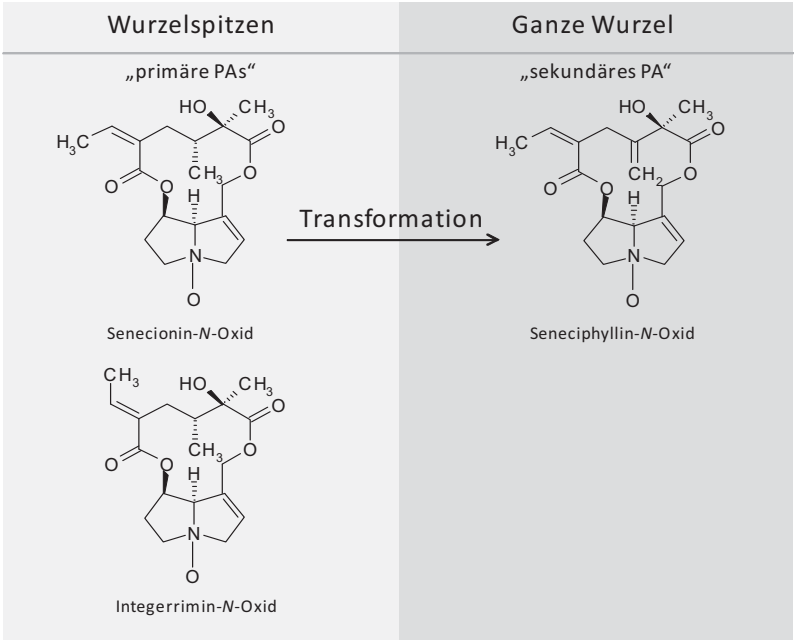


Abbildung 53: Metabolisches Verhalten der PAs in WOKs von *J. vulgaris* mod. nach Hartmann (1994).

Diese Ergebnisse zeigen, dass HRs ein völlig neues System darstellen, das nicht direkt mit dem einer intakten Pflanze oder einer herkömmlichen WOK verglichen werden kann. Mögliche Erklärungen hierfür liefern die Integration der agrobakterieneigenen *rol*-Gene (s. Abbildung 51), die nach neusten Erkenntnissen besonders in den Sekundärstoffwechsel eingreifen (Bulgakov, 2008). Während die Expression des *rol*B-Gens generell die Produktion von Sekundärstoffen anregen soll (Kiselev et al., 2007; Shkryl et al., 2008), wurde gezeigt, dass eine *rol*C-Expression positiv mit der Synthese von unterschiedlichen Alkaloiden korreliert. Nachgewiesen wurde dieser Zusammenhang unter anderem am Beispiel von Tropan-Alkaloiden in *Atropa belladonna* (Bonhomme et al., 2000), Indol-Alkaloiden in *Catharantus roseus* (Palazon et al., 1998b) und Nikotin in *N. tabacum* (Palazon et al., 1998a). Interessanterweise wurde bei der Analyse von HR-Klonen aus *J. vulgaris* eine andere Beobachtung gemacht: Diese zeigten weder in Qualität, noch in Quantität signifikant unterschiedliche PA-Spektren im Vergleich zur herkömmlichen WOK (Hartmann, 1994), wobei möglich ist, dass in dieser Untersuchung – anders als im Vergleich in Abbildung 52 - WOK und HR vom gleichen Pflanzenklon abstammen.

Abbildung 35 und Abbildung 36 zeigen die Ergebnisse der gaschromatographischen Analysen der RNAi- und Überexpressions-Klone. Statt einer Tendenz zur Ab- oder Zunahme zeigen die Klone aller RNAi-Kulturen und die der Überexpressions-Kultur von SVAO3 starke Schwankungen im Gesamt-PA-Gehalt. Solche Schwankungen in Kulturen transgener Pflanzen sind normal, da jeder Klon aus einem einzelnen Transformationsereignis hervorgegangen ist. Wie bei allen bislang etablierten Transformations-Methoden ist auch die Integration von Fremd-DNA ins pflanzliche Genom durch *A. rhizogenes* ungerichtet. Aus diesem Grunde entsteht bei jeder Transformation ein einzigartiger Klon, der sich genetisch von anderen der gleichen Kultur unterscheidet. Die festgestellten Schwankungen im PA-Gehalt, aber auch im Phänotyp der HR-Klone können unterschiedliche Gründe haben, die in folgende Gruppen kategorisiert wurden (Deng et al., 2008):

1. *Positionseffekt*: Je nachdem, an welcher Stelle die Fremd-DNA im Wirtsgenom integriert wird, kann sie in stärker oder schwächer transkribierten Genombereichen liegen. In stärker transkribierten Bereichen kann der Effekt der Fremd-DNA sehr groß sein, während dieselbe Fremd-DNA in schwach abgelesenen Bereichen des Genoms nahezu effektlos ist.

2. *Rekombinationseffekt*: Durch Rekombinations- und Reparaturmechanismen erkennt der Wirtsorganismus die Fremd-DNA und legt diese durch Deletion, Duplikation, Methylierung oder Translokation still. Um die Wahrscheinlichkeit des Eingreifens des Reparaturmechanismus´ gleich zu halten, sollte daher bei Klonen, die verglichen werden, die Zeitspanne von der Infektion bis zur Analyse in etwa gleich groß sein.
3. *Insertionseffekt*: Wird die Fremd-DNA in den Leserahmen eines endogenen Gens integriert, wird die Nukleotid-Sequenz dieses Gens unterbrochen und das Gen kann nicht mehr transkribiert und translatiert werden oder die Translation führt zu einem Nonsense-Protein. Das kann zu gravierenden Modifikationen im Stoffwechsel der Wirtspflanze führen – abhängig davon, was für ein Gen auf diese Weise ausgeschaltet wurde. Wird das Fremdgen in eine regulative Domäne eingebaut, wird diese vermutlich ausgeschaltet oder so verändert, dass dies ebenfalls Auswirkungen auf den Stoffwechsel haben kann.

4. *Induktiver Effekt*: Die Integration einer kompletten Transformationskassette in das Wirtsgenom kann dazu führen, dass ein Promotor der Transformationskassette vor solche Gene gebaut wird, die normalerweise gar nicht oder nur schwach abgelesen werden. Das kann zur starken Expression von üblicherweise schwach exprimierten Genen führen. Desweiteren ist es möglich, dass das Genprodukt der Fremd-DNA als Induktor oder Inhibitor z. B. im Sekundärstoffwechsel wirkt und damit gravierende Änderungen in diesem Stoffwechsel auftreten.

Keine der Überexpressions-Kulturen zeigte einen starken Anstieg des PA-Gehalts in allen Klonen. Bei einem starken Anstieg des PA-Gehalts in den *Senecio*-HR-Klonen in einer Kultur könnte vermutet werden, dass eine DAO mit Beteiligung an der PA-Biosynthese in dieser Kultur überexprimiert worden wäre. Dieses Ergebnis ist allerdings nur zu erwarten, wenn das Produkt der Umsetzung der DAO einen Engpass in der PA-Biosynthese darstellt und damit eine Konzentrationssteigerung dieses Produktes zu einer erhöhten PA-Syntheserate führen würde. Ob die gesuchte DAO so einen „Flaschenhals“ in der PA-Biosynthese darstellt, ist bisher noch nicht bekannt. Möglicherweise wäre es auch notwendig, mehrere Enzyme der PA-Biosynthese überzuexprimieren, um einen deutlichen Anstieg im PA-Gehalt der transgenen HRs zu registrieren. Dies zeigte jedenfalls ein Versuch in *Hyoscyamus niger* (Solanaceae). Ebenso wie die PAs gehen auch die Tropan-Alkaloide in *Hyoscyamus niger* aus dem Polyamin-Stoffwechsel hervor. So setzt eine Putrescin-*N*-Methyltransferase (PMT) Putrescin zu *N*-Methylputrescin um, das anschließend als *N*-Methyl-pyrrolinium in die Tropan-Alkaloid-Biosynthese eingeht. Am Ende dieser Tropan-Alkaloid-Synthese wird Scopolamin aus der Vorstufe Hyoscyamin gebildet. Katalysiert wird dieser Schritt durch die Hyoscyamin-6β-Hydroxylase (H6H; Hashimoto und Yamada, 1986). Um den Gehalt an Scopolamin in der Pflanze zu erhöhen, wurden sowohl PMT, als auch H6H in HRs von *Hyoscyamus niger* überexprimiert. Es zeigte sich, dass solche Wurzeln, die nur die H6H überexprimierten, nur etwa die Hälfte an Scopolamin synthetisierten, wie die HRs, die beiden Gene überexprimierten (Zhang et al., 2004). Dieser Versucht zeigt, dass zur Erhöhung des Scopolamin-Gehalts der Ausgangsmetabolit aus

dem Primärstoffwechsel durch Überexpression in die Tropan-Alkaloid-Synthese „gedrängt“ werden musste.

Die einzige Kultur, die eine Tendenz zu einem verringerten Gehalt an Gesamt-PAs zeigte, ist die Kultur der Überexpression von SVAO3. Dieses Ergebnis lässt sich eventuell durch das Phänomen der Cosuppression erklären. Dieses Phänomen wurde zuerst von Napoli et al. beobachtet. Sie versuchten die rosa Blütenfarbe von Petunien durch Integration einer zusätzlichen Kopie der Dihydroflavonol-Reduktase, einem Enzym, das maßgeblich an der Blüten-Farbstoffsynthese beteiligt ist, ins Genom der Petunie zu verstärken. Statt der erwarteten Farbvertiefung zeigten viele der transformierten Petunien hellere oder weiße Blüten (Napoli et al., 1990). Weitere Arbeiten zeigten einige Jahre später, dass die Gene nicht nur auf der Ebene der Transkription abgeschaltet wurden, sondern dass zusätzlich die von ihnen produzierte mRNA in den Zellen schnell abgebaut wurde – ein Vorgang, der *Post-Transcriptional Gene Silencing* (PTGS) genannt wurde (van Blokland et al., 1994). Ausgelöst wird PTGS grundsätzlich durch doppelsträngige RNA (dsRNA). Die dsRNA wird vom Dicer-Enzym registriert und in 21 bis 23 bp große Fragmente (*small interfering* RNA, siRNA) abgebaut, die den RNA*interference*-(RNAi)-Mechanismus starten. Die siRNAs werden an einen *RNA-induced silencing complex* (RISC) gebunden, der mRNAs mit Sequenzähnlichkeit zu den siRNAs registriert und diese und ähnliche mRNA degradiert. Ursprünglich ist dies ein Mechanismus, mit dem Pflanzen auf genetisches Material von Pflanzenviren reagieren, bei dem es sich meistens um dsRNA handelt (Qi und Hannon, 2005). Diese dsRNA kann durch unterschiedliche Gen-Konstellationen entstehen. Zum einen ist es möglich, dass bei der Transformation mehrere Kopien des Fremdgens ins Wirtsgenom integriert werden. Bei unterschiedlicher Orientierung kann die mRNA nach dem Ablesen im Bereich der Fremd-DNA zu einer Haarnadelstruktur hybridisieren, die doppelsträngige RNA enthält. Desweiteren wird solch eine dsRNA auch gebildet, wenn ein Gen durch gegensätzlich orientierte RNA-Promotoren flankiert ist und daher von beiden Seiten abgelesen wird. Diese beiden RNA-Stränge hybridisieren ebenfalls zu dsRNA (Carthew, 2001).

Möglicherweise wurde die PA-Biosynthese in den Klonen der SVAO3-Überexpressions-Kultur durch Cosuppression herunter reguliert. Träfe diese Vermutung zu, würde dies auch die schwachen oder fehlenden Banden der semiquantitativen RT-PCRs erklären, die mit den SVAO3-Überexpressions-Klonen durchgeführt wurden. Würde die mRNA des

überexprimierten *svao3*-Gens durch das Phänomen der Cosuppression abgebaut werden, so wäre diese auch nicht mehr in übermäßigem Umfang mittels RT-PCR detektierbar.

Um ein Gen durch Cosuppression herunter zu regulieren ist es nicht notwendig, dass die überexprimierte mRNA mit dem Zielgen identisch ist. Ein Bereich hoher Sequenzidentität reicht bereits aus, um das Zielgen auszuschalten. Diese Beobachtung wurde auch gemacht, als Erdbeeren mit dem Gen für eine Stilben-Synthase transformiert wurden (Hanhineva et al., 2009). Die Stilben-Synthase katalysiert die Biosynthese von Resveratrol, das für seine antioxidative Wirkung im Rotwein bekannt geworden ist. Eng verwandt mit der Stilben-Synthase ist die Chalkon-Synthase. Viele von beiden Enzymen katalysierte Reaktionsmechanismen sind gleich; auf Aminosäureebene sind beide Enyme zu 70 % identisch. Statt des erwarteten Resveratrols stieg der Gehalt an Flavonolen in den transformierten Erdbeeren. Daraus wurde gefolgert, dass die Chalkon-Synthase in einer Cosuppression ausgeschaltet wurde, da diese Flavonole umsetzt.

Daher liegt die Vermutung nahe, dass mit der Überexpression von SVAO3 ein ähnliches Gen mit Beteiligung an der PA-Biosynthese herunter reguliert wurde. Möglicherweise handelt es sich dabei um die gesuchte Diaminoxidase. Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung unterstützen diese Vermutung. Die Markierung in den Zellen, in denen auch die HSS als Enzym der PA-Biosynthese lokalisiert wurde, wurde mit Sonden erhalten, die unter anderem mit der mRNA des *svao3*-Gens hybridisieren. Dass diese Markierung jedoch nur mit dem Zusatz der Sonde auf *svao1*-mRNA erzeugt werden konnte, spricht für die Tatsache, dass die gesuchte DAO mit SVAO1 und SVAO3 Ähnlichkeiten auf Sequenzebene aufweist. Die strukturelle Ähnlichkeit von SVAO1 mit der gesuchten DAO wurde durch die Überexpressions-Versuche jedoch nicht bestätigt. In diesem Falle wären auch in der SVAO1-Überexpressions-Kultur deutlich erniedrigte PA-Gehalte zu erwarten gewesen.

Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Pflanzentransformationen zeigen, dass Eingriffe in metabolische Systeme, Transport- und Akkumulationsprozesse in Zellen auf Grund des noch fehlendem Verständnisses dieser Systeme zu unerwarteten Ergebnissen führen kann (Winkel, 2004; Dixon, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine DAO mit Beteiligung an der PA-Biosynthese identifiziert werden. Die vorliegenden Daten haben aber dazu beigetragen, neue Informationen über SVAO1, SVAO2 und SVAO3 zu erhalten und diese zu bewerten. Zusätzlich wurde mit

der Transformation von Versuchspflanzen durch *A. rhizogenes* eine wertvolle Methode in der Arbeitsgruppe etabliert, die in zahlreichen weiteren Versuchen eingesetzt werden kann.

4.3 Ausblick

Um weitere Informationen über eine mögliche DAO mit Beteiligung an der PA-Biosynthese zu erhalten, wäre es interessant, zunächst einige der im Rahmen dieser Arbeit erstellten HR-Klone weitergehend zu untersuchen. Möglich wäre eine Analyse der genomischen DNA des Überexpressions-Klons S3-5, der nur knapp 10 % der PAs im Vergleich zu Kontroll-HRs synthetisiert hat. Ebenso wäre der RNAi-Klon SD3-5, der ca. 3,6 Mal so viel Gesamt-PAs produziert wie die Kontroll-HRs, für eine solche Untersuchung interessant. Durch PCRs mit der genomischen DNA dieser Klone könnte dabei festgestellt werden, ob die Transformations-Kassette eventuell in einen für die PA-Biosynthese wichtigen Genbereich integriert wurde. Dieser Versuch könnte Informationen zu weiteren Enzymen der PA-Biosynthese und deren Regulation liefern.

Ein anderes, interessantes Experiment, das mehr Aufschluss über die drei SVAOs liefern könnte, wäre die Erstellung einer weiteren RNAi-HR-Kultur. In dieser Kultur sollte ein möglichst hoch konservierter Bereich der drei cDNA-Sequenzen der SVAOs in ein RNAi-Konstrukt integriert werden. Würden in den entstehenden transgenen HR-Klonen immer noch PAs nachgewiesen, so könnte man daraus schließen, dass die PA-Biosynthese durch keine dieser drei SVAOs katalysiert wird. Auch weitere, eventuell noch auftauchende DAOs könnten nach diesem konservierten Bereich auf ihre Beteiligung an der PA-Biosynthese hin untersucht werden.

Ein anderer Ansatz auf biochemischer Ebene wäre die Erprobung des *Yeast Two Hybrid*-Systems. Mit diesem System ist es möglich, Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen zu untersuchen. Besonders interessant wären Studien, in denen Wechselwirkungen zwischen den drei SVAOs und der HSS getestet würden. Um dieses System zu etablieren, würde sich anbieten, die Wechselwirkungen zwischen der HSS und der jüngst möglicherweise identifizierten, an der PA-Biosynthese beteiligten, Acetolactat-Synthase (Langel, 2008) zu untersuchen.

Ein weiterer Ansatz, um eine DAO mit Beteiligung an der PA-Biosynthese zu finden, baut auf die Beobachtungen auf, die bei der biochemischen Isolation einer DAO aus Tabak gemacht wurden (McLauchlan et al., 1993; Heim und Jelesko, 2004). Bei der Aufreinigung dieser DAO wurde ein an die DAO anhaftendes Enzym mit aufgereinigt. Es handelte sich um eine *S*-Adenosylhomocystein-synthase, die einen weiteren Schritt in der Nikotin-Synthese katalysiert. Es wurde vermutete, dass es sich bei beiden Enzymen um einen Teil eines Multi-Enzym-Komplexes handelt. Eventuell liegen die Enzyme der PA-Biosynthese ebenfalls in einem solchen Komplex vor. Immobilisiert man nun die HSS aus einem Pflanzenrohextrakt mittels Affinitätschromatographie, würde man damit eventuell weitere Enzyme der PA-Biosynthese isolieren.

Zum Auffinden neuer Enzyme der PA-Biosynthese und damit weiterer DAOs wird in unserer Arbeitsgruppe zurzeit die Methode des differentiellen Ansatzes in Verbindung mit Lasercapture Micodissection etabliert. Damit wird es möglich, das Transkriptom einzelner Zellen, in denen beispielsweise die HSS nachgewiesen wurde, zu isolieren und mittels einer cDNA-Bank zu analysieren. In Verbindung mit der Methode des differentiellen Ansatzes kann solche cDNA subtrahiert werden, die nicht in Verbindung mit der PA-Biosynthese steht. Diese innovative Methode führt sicherlich zu neuen, interessanten Erkenntnissen, die mit den herkömmlichen Techniken nicht erzielt werden könnten.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Aus der Pyrrolizidin-Alkaloid (PA)-haltigen Pflanze *Senecio vernalis* wurden drei Diaminoxidasen (SVAO1, SVAO2 und SVAO3) identifiziert (Denker, 2008). Um diese auf eine mögliche Beteiligung an der PA-Biosynthese zu untersuchen, wurden SVAO1 und SVAO2 bereits in der Vergangenheit heterolog exprimiert (Denker, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde SVAO3 in *E. coli* heterolog exprimiert, was zu *Inclusion bodies*-Bildung führte. Auch eine Coexpression mit Chaperonen führte nicht zur Expression löslichen Proteins. Die bisherige Vermutung, dass es sich bei SVAO3 um eine kleine Gen-Familie handeln könnte, wurde bestätigt, da zwei weitere Vertreter dieser Familie im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnten.

Um über den Expressionsort der drei SVAOs auf deren Funktion schließen zu können, wurden gewebespezifische RT-PCRs in *S. vernalis* durchgeführt. Dabei wurden Transkripte des *svao3*-Gens in allen Pflanzenorganen von *S. vernalis*, solche des *svao2*-Gens in Blatt und Spross und Transkripte des *svao1*-Gens nur in der Wurzel lokalisiert. Da sich die gesamte PA-Biosynthese in *S. vernalis* in der Wurzel befindet, wurde SVAO1 zum „hoffnungsvollsten Kandidaten“ der drei SVAOs für eine mögliche Beteiligung an der PA-Biosynthese. Ebenfalls zur Lokalisierung der mRNA der drei SVAOs wurden *in situ*-Hybridisierungen in der Wurzel von *S. vernalis* durchgeführt. Mit einer Kombination von Sonden gegen mRNA des *svao1*- und *svao3*–Gens wurde ein Signal nahe dem Expressionsort der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der PA-Biosynthese, detektiert. Daraus entstand die Vermutung, dass die gesuchte Diaminoxidase Strukturmerkmale von SVAO1 und SVAO3 besitzen könnte.

Um die Funktionen der drei SVAOs *in planta* zu untersuchen, wurden *S. vernalis* und *Nicotiana tabacum* mit Konstrukten zur Überexpression und Herunterregulation der Expression der drei SVAOs mittels *Agrobacterium rhizogenes* transformiert. Sowohl GUS-Tests, als auch PCRs mit der genomischen DNA der *Hairy Root* (HR)-Klone bestätigten die erfolgreiche Transformation beider Versuchspflanzen. Damit wurde *S. vernalis* erstmalig mit *A. rhizogenes* transformiert. PA-Analysen der *Senecio*-HRs zeigten jedoch nur in der SVAO3-Überexpressions-Kultur eine Tendenz der Herabregulation der Gesamt-PAs, die

möglicherweise durch die Cosuppression einer an der PA-Biosynthese beteiligten DAO verursacht wurde. Auch eine Analyse der Transkriptmengen der Fremd-DNA durch semi-quantitative RT-PCR konnte die Expression der integrierten SVAO-Konstrukte nicht bestätigen. Hingegen wurden Transkripte des in die Klonierungskassette integrierten *enhanced green fluorescent protein* (*egfp*)-Gens bei einigen RNAi-Klonen nachgewiesen. In den Überexpressions-HR-Kulturen wurden keine Transkripte des e*gfp*-Gens nachgewiesen. Möglicherweise ist das auf den eingesetzten *rol*D-Promotor in den Überexpressions-Konstrukten zurückzuführen.

In Tabak führte die Überexpression von SVAO1 und SVAO3 zu keiner Veränderung des Alkaloid-Spektrums, die durch ^{1}H-NMR hätte nachgewiesen werden können. RT-PCRs von einigen ausgewählten Proben zeigten jedoch, dass SVAO1 zum Teil exprimiert wurde.

5.2 Abstract

Three diamine oxidases (SVAO1, SVAO2 and SVAO3) have been identified from the pyrrolizidine alkaloid (PA) containing plant *Senecio vernalis* (Denker, 2008). In order to characterize and check them for a possible involvement PA biosynthesis SVAO1 and SVAO2 were expressed heterologously before (Denker, 2008). Part of this work was to express SVAO3 in *E. coli*. Heterologous expressions resulted in inclusion body formation. Additionally two more diamine oxidase cDNA sequences with high similarity to the sequence of SVAO3 were found. This result confirmed the assumption that all *svao3* genes belong to a small gene family.

In order to localize expression site of the SVAOs for further information about function tissue specific RT-PCRs were performed. Transcripts of *svao3* were detected in all parts of *S. vernalis*, those from *svao2* were localized in leafs and shoots and transcripts from *svao1* were detected only in roots. Because PA biosynthesis is located in roots of *S. vernalis* SVAO1 was "candidate number one" for a possible involvement in PA biosynthesis. Also for localization of the SVAOs *in situ* hybridizations in roots of *S. vernalis* were conduced. By using a mixture of probes against transcripts of *svao1* and *svao3* for *in situ* hybridization studies a signal was detected in those tissue parts where the homospermidine synthase - a key enzyme of PA biosynthesis - was shown to be localized. This result leads the hypothesis that potential diamine oxidase has some structure characteristics from SVAO1 and SVAO3.

For studying functions of SVAOs *in plant* constructs for overexpression and downregulation of the three SVAOs were transformed into *S. vernalis* and *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium rhizogenes*. GUS tests and PCRs with genomic DNA of hairy roots (HRs) approved successful transformation of both plants so that *S. vernalis* was transformed for the first time with *A. rhizogenes*. PA analysis of *Senecio*-HRs however showed only a drift of downregulation in the SVAO3 upregulation culture which was possibly caused by cosuppression of a diamine oxidase involved in PA biosynthesis. Semiquantitative RT-PCRs did not affirm expression of integrated SVAO constructs, too. On the other hand transcripts of *enhanced green fluorescent protein* (*egfp*) gene, integrated in transformation cassette, were detected in RNAi clones. In overexpression clones no

egfp transcripts were detected. Possibly these results are attributed to the *rol*D promoter that drive *egfp* gene in overexpression constructs.

Tobacco hairy root cultures overexpressing SVAO1 or SVAO3 were analyzed by ^{1}H-NMR. Even though transcripts of *svao1* were detected samples did not show any differences in the content of nicotine alkaloids.

6 Literaturverzeichnis

Abd Elhady, M.I. (2006). Transgenic plants as tool to study the evolution of pyrrolizidine alkaloids. Dissertation, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.

Adolph, R. (1991). Stoffwechsel des Putrescins, der Vorstufe von Pyrrolizidinalkaloiden, in Wurzelkulturen von *S. vulgaris*. Dissertation, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.

Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A.C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P., und Etienne, H. (2006). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. Plant Cell Reports **25,** 959-967.

Angelini, R., Rea, G., Federico, R., und Dovidio, R. (1996). Spatial distribution and temporal accumulation of mRNA encoding diamine oxidase during lentil (*Lens culinaris* Medicus) seedling development. Plant Science. **119,** 103-113.

Anke, S., Niemüller, D., Moll, S., Hänsch, R., und Ober, D. (2004). Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the *Asteraceae*. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. Plant Physiology **136,** 4037-4047.

Anke, S., Gonde, D., Kaltenegger, E., Hänsch, R., Theuring, C., und Ober, D. (2008). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in *Phalaenopsis* orchids: Developmental expression of alkaloid-specific homospermidine synthase in root tips and young flower buds. Plant Physiology **148,** 751-760.

Bird, D.A., Franceschi, V.R., und Facchini, P.J. (2003). A tale of three cell types: Alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. Plant Cell **15,** 2626-2635.

Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M.A., und Jacquin-Dubreuil, A. (2000). Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol* A, B, C genes only. Journal of Biotechnology **81,** 151-158.

Böttcher, F., Ober, D., und Hartmann, T. (1994). Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: Putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation. Canadian Journal of Chemistry **72,** 80-85.

Böttcher, F., Adolph, R.-D., Hartmann, T. (1993). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. Phytochemistry **32,** 679-689.

Buchner, J. (2002). Introduction: The cellular protein folding machinery. Cellular and Molecular Life Sciences **59,** 1587-1588.

Bulgakov, V.P. (2008). Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. Biotechnology Advances **26,** 318-324.

Burlat, V., Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M., und St-Pierre, B. (2004). Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. Plant Journal **38,** 131-141.

Cahill, R., Crout, D.H.G., Mitchell, M.B., und Müller, U.S. (1980). Isoleucine biosynthesis and metabolism: Stereochemistry of the formation of L-isoleucine and of its conversion into senecic and isatinecic acids in *Senecio* species. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications **10,** 419-421.

Carthew, R.W. (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. Current Opinion in Cell Biology **13,** 244-248.

Chang, A., und Hartmann, T. (1998). Solubilization and characterization of a senecionine *N*-oxygenase from *Crotalaria scassellatii* seedlings. Phytochemistry **49,** 1859-1866.

Cheeke, P.R. (1988). Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. Journal of Animal Science **66,** 2343-2350.

Cheeke, P.R. (1994). A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants with special reference to pyrrolizidine alkaloids. Veterinary and human toxicology **36,** 240-247.

Chou, M.W., und Fu, P.P. (2006). Formation of DHP-derived DNA adducts *in vivo* from dietary supplements and Chinese herbal plant extracts containing carcinogenic pyrrolizidine alkaloids. Toxicology and Industrial Health **22,** 321-327.

Christie, P.J., und Vogel, J.P. (2000). Bacterial type IV secretion: Conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends in Microbiology **8,** 354-360.

Cona, A., Cenci, F., Cervelli, M., Federico, R., Mariottini, P., Moreno, S., und Angelini, R. (2003). Polyamine oxidase, a hydrogen peroxide-producing enzyme, is up-regulated by light and down-regulated by auxin in the outer tissues of the maize mesocotyl. Plant Physiology **131,** 803-813.

Cornish-Bowden, A. (1985). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic-acid sequences - recommendations 1984. Nucleic Acids Research **13,** 3021-3030.

Crout, D.H.G., Benn, M.H., Imaseki, H., und Geissman, T.A. (1966). Pyrrolizidine alkaloids-biosynthesis of seneciphyllic acid. Phytochemistry **5,** 1-21.

Crout, D.H.G., Davies, N.M., Smith, E.H., und Whitehou.D. (1970). Biosynthesis of C-10 necic acids of pyrrolizidine alkaloids. Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications **11,** 635-636.

Crout, D.H.G., Davies, N.M., Whitehou.D, und Smith, E.H. (1972). Pyrrolizidine alkaloids-biosynthesis of senecic acid. Journal of the Chemical Society. Perkin transactions 1, 671-680.

Daugaard, M., Rohde, M., und Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. FEBS Letters **581,** 3702-3710.

Davioud, E., Petit, A., Tate, M.E., Ryder, M.H., und Tempe, J. (1988). Cucumopine - a new T-DNA encoded opine in hairy root and crown gall. Phytochemistry **27,** 2429-2433.

de Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J., und Beijersbergen, A.G.M. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology **16,** 839-842.

Dean, J.D., Goodwin, P.H., und Hsiang, T. (2002). Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of β-1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colletotrichum destructivus*. Plant Molecular Biology Reporter **20,** 347-356.

Deng, P.J., Zhou, X.Y., Yang, D.Y., Hou, H.L., Yang, X.K., Li, Y.H., Yang, Y.C., Wang, X.L., Fang, S.S., Wu, S.Q., und Liu, J. (2008). The definition source. manifestation of and assessment of unintended effects in genetically modified plants. Journal of the Science of Food and Agriculture **88,** 2401-2413.

Denker, S. (2008). Untersuchung von kupferhaltigen Aminoxidasen aus Pyrrolizidin-Alkaloid-produzierenden Pflanzen. Dissertation, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.

Dixon, R.A. (2005). Engineering of plant natural product pathways. Current Opinion in Plant Biology **8,** 329-336.

Dussourd, D.E., Harvis, C.A., Meinwald, J., und Eisner, T. (1991). Pheromonal advertisement of a nuptial gift by a male moth (*Utetheisa-ornatrix*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88,** 9224-9227.

Dussourd, D.E., Ubik, K., Harvis, C.A., Resch, J., Meinwald, J., und Eisner, T. (1988). Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85,** 5992-5996.

Ehmke, A., Vonborstel, K., und Hartmann, T. (1988). Alkaloid *N*-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. Planta **176,** 83-90.

Fletcher, M.T., McKenzie, R.A., Blaney, B.J., und Reichmann, K.G. (2009). Pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* taxa from Northern Australia: Risk to grazing livestock. Journal of agricultural and food chemistry **57,** 311-319.

Frei, H., Luthy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Wurgler, F.E., und Schlatter, C. (1992). Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. Chemico-Biological Interactions **83,** 1-22.

Frölich, C., Hartmann, T., und Ober, D. (2006). Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). Phytochemistry **67,** 1493-1502.

Frölich, C., Ober, D., und Hartmann, T. (2007). Tissue distribution, core blosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. Phytochemistry **68,** 1026-1037.

Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G., und Chou, M.W. (2004). Pyrrolizidine alkaloids - genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. Drug metabolism reviews **36,** 1 - 55.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., und Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research **50,** 151-158.

Goddijn, O.J.M., Lindsey, K., Vanderlee, F.M., Klap, J.C., und Sijmons, P.C. (1993). Differential gene-expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants haboring promotor *gusA* fusion constructs. Plant Journal **4,** 863-873.

Graser, G., und Hartmann, T. (1997). Biosynthetic incorporation of the aminobutyl group of spermidine into pyrrolizidine alkaloids. Phytochemistry **45,** 1591-1595.

Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M., und Gantet, P. (2006). Hairy root research: Recent scenario and exciting prospects. Current Opinion in Plant Biology **9,** 341-346.

Hagen, J. (2003). Genetische und modifikativ bedingte Variabilität der Pyrrolizidinalkaloide in *Senecio jacobaea* L.. Dissertation, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.

Häkkinen, S., Rischer, H., Laakso, I., Maaheimo, H., Seppänen-Laakso, T., und Oksman-Caldentey, K.M. (2004). Anatalline and other methyl jasmonate-inducible nicotine alkaloids from *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 cell cultures. Planta Medica **70,** 936-941.

Häkkinen, S.T., Tilleman, S., Swiatek, A., De Sutter, V., Rischer, H., Vanhoutte, I., Van Onckelen, H., Hilson, P., Inze, D., Oksman-Caldentey, K.M., und Goossens, A. (2007). Functional characterisation of genes alkaloid biosynthesis in involved in pyridine tobacco. Phytochemistry **68,** 2773-2785.

Hanhineva, K., Kokko, H., Siljanen, H., Rogachev, I., Aharoni, A., und Karenlampi, S.O. (2009). Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*). Journal of Experimental Botany **60,** 2093-2106.

Hartmann, T. (1985). Prinzipien des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Plant systematics and evolution **150,** 15-34.

Hartmann, T. (1987). Warum gibt es so viele Arzneipflanzen? Zur Rolle des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Deutsche Apotheker Zeitung **127,** 15 - 34.

Hartmann, T. (1994). *Senecio* spp.: Biochemistry of formation of pyrrolizidine alkaloids in root cultures. In: Bajaja, Y.P.S. (Hrsg.), Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants VI, 26. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, S. 339-355.

Hartmann, T. (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. Entomologia Experimentalis et Applicata **80,** 177-188.

Hartmann, T., und Zimmer, M. (1986). Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life-history of 2 annual *Senecio* species. Journal of Plant Physiology **122,** 67-80.

Hartmann, T., und Toppel, G. (1987). Senecionine *N*-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. Phytochemistry **26,** 1639-1643.

Hartmann, T., und Witte, L. (1995). Pyrrolizidine alkaloids: Chemical, biological and chemoecological aspects. In: Pelletier, S.W. (Hrsg.), Alkaloids: Chemical and biological perspectives, 9. Auflage, Pergamon Press, Oxford, S. 155-233.

Hartmann, T., und Dierich, B. (1998). Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecioninetype: Biological need or coincidence? Planta Berlin **206,** 443-451.

Hartmann, T., und Ober, D. (2000). Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In: Leeper, F.J. und Vederas, J.C. (Hrsg.), Topics in Current Chemistry, Band 209, Springer-Verlag, Heidelberg, S. 207-244.

Hartmann, T., Sander, H., Adolph, R., und Toppel, G. (1988). Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. Planta **175,** 82-90.

Hartmann, T., Ehmke, A., Eilert, U., Vonborstel, K., und Theuring, C. (1989). Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. Planta **177,** 98-107.

Hashimoto, T., und Yamada, Y. (1986). Hyoscyamine 6β-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in alkaloid-producing root cultures. Plant Physiology **81,** 619-625.

Hashimoto, T., Yukimune, Y., und Yamada, Y. (1989). Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus* .I. Biochemical studies. Planta **178,** 123-130.

Hashimoto, T., Mitani, A., und Yamada, Y. (1990). Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger* - Its function in tropane alkaloid biosynthesis. Plant Physiology **93,** 216-221.

Hashimoto T, **Tamaki K**, **Suzuki K**, **Yamada Y**. (1998). Molecular cloning of plant spermidine synthases. Plant Physiology **39,** 73-79

Heim, W.G., und Jelesko, J.G. (2004). Association of diamine oxidase and *S*-adenosylhomocysteine hydrolase in *Nicotiana tabacum* extracts. Plant Molecular Biology **56,** 299-308.

Hinchee, M.A.W., Corbin, D.R., Armstrong, C.L., Frey, J.E., Sato, S.S., DeBeor, D.L., Petersen, W.L., Armstrong, T.A., Connor-Ward, D.V., Layton, J.G., und Bosch, R.B. (1994). Plant Transformation. In: Vasil, I.K. und Thorpe, T.A. (Hrsg.), Plant cell and tissue culture, 2. Auflage, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 231-260

Holmes, D.S., und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analytical Biochemistry **114,** 193-197.

Houen, G., Struve, C., Sondergaard, R., Friis, T., Anthoni, U., Nielsen, P.H., Christophersen, C., Petersen, B.O., und Duus, J.O. (2005). Substrate specificity of the bovine serum amine oxidase and *in situ* characterisation of aminoaldehydes by NMR spectroscopy. Bioorganic & Medicinal Chemistry **13,** 3783-3796.

Hu, Z.B., und Du, M. (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of Integrative Plant Biology **48,** 121-127.

Jenett-Siems, K., Schimming, T., Kaloga, M., Eich, E., Siems, K., Gupta, M.P., Witte, L., und Hartmann, T. (1998). Phytochemistry and chemotaxonomy of the Convolvulaceae - Part 4 - Pyrrolizidine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related species. Phytochemistry **47,** 1551-1560.

Jung, S.T., Kim, M.S., Seo, J.Y., Kim, H.C., und Kim, Y. (2003). Purification of enzymatically active human lysyl oxidase und lysyl oxidase-like protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. Protein Expression and Purification **31,** 240-246.

Karimi, M., Depicker, A., und Hilson, P. (2007). Recombinational cloning with plant Gateway™ vectors. Plant Physiology **145,** 1144-1154.

Karimi, M., Inzé, D., und Depicker, A. (2007).Gateway™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends in Plant Science **7,** 193-195.

Katoh, A., Shoji, T., und Hashimoto, T. (2007). Molecular cloning of *N*-methylputrescine oxidase from tobacco. Plant and Cell Physiology **48,** 550-554.

Kelly, B.A., und Kado, C.I. (2002). *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer and integration into the chromosome of *Streptomyces lividans*. Molecular Plant Pathology **3,** 125-134.

Khan, H.A., und Robins, D.J. (1985). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis-synthesis of C-14-labeled homospermidines and their incorporation into retronecine. Journal of the Chemical Society. Perkin transactions 1, 819-824.

King, J., Haase-Pettingell, C., Robinson, A.S., Speed, M., und Mitraki, A. (1996). Thermolabile folding intermediates: Inclusion body precursors and chaperonin substrates. FASEB Journal **10,** 57-66.

Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Veselova, M.V., Bulgakov, V.P., Fedoreyev, S.A., und Zhuravlev, Y.N. (2007). The *rol*B gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. Journal of Biotechnology **128,** 681-692.

Kössel, A. (1891). Über die chemische Zusammensetzung der Zelle. Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere**,** 181-186.

Koulman, A., Seeliger, C., Edwards, P.J.B., Fraser, K., Simpson, W., Johnson, L., Cao, M., Rasmussen, S., und Lane, G.A. (2008). E/Z-thesinine-O-4 '-α-rhamnoside, pyrrolizidine conjugates produced by grasses (Poaceae). Phytochemistry **69,** 1927-1932.

Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., und Citovsky, V. (2001). Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98,** 1871-1876.

Langel, D. (2008). Biosynthesis of the unique necic acid moiety in lycopsamine type pyrrolizidine alkaloids - a molecular approach -. Dissertation, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.

Laurenzi, M., Rea, G., Federico, R., Tavladoraki, P., und Angelini, R. (1999). De-etiolation causes a phytochrome-mediated increase of polyamine oxidase expression in outer tissues of the maize mesocotyl: A role in the photomodulation of growth and cell wall differentiation. Planta **208,** 146-154.

Leete, E. (1967). Biosynthesis of the *Nicotiana* alkaloids. XI. Investigation of tautomerism in *N*-methyl-Δ_1-pyrroliniurn chloride and its incorporation into nicotine. Journal of the American Chemical Society **89,** 7081-7084.

Li, M.R., Li, H.Q., Jiang, H.W., und Wu, G.J. (2008). Establishment of a highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation method for *Broussonetia papyrifera*. Plant cell, tissue and organ culture **93,** 249-255.

Lindigkeit, R., Biller, A., Buch, M., Schiebel, H.M., Boppré, M., und Hartmann, T. (1997). The two faces of pyrrolizidine alkaloids: The role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. European Journal of Biochemistry **245,** 626-636.

Liszkay, A., van der Zalm, E., und Schopfer, P. (2004). Production of reactive oxygen intermediates ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and $^{\cdot}OH$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. Plant Physiology **136,** 3114-3123.

Luckner, M. (1990). Secondary Metabolsim in Microorganisms, Plants and Animals. 3. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, Jena.

Mankin, S.L., Hill, D.S., Olhoft, P.M., Toren, E., Wenck, A.R., Nea, L., Xing, L.Q., Brown, J.A., Fu, H.H., Ireland, L., Jia, H.M., Hillebrand, H., Jones, T., und Song, H.S. (2007). Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPPB2659) plasmid pRi2659. In vitro cellular & developmental biology **43,** 521-535.

Mattocks, A.R. (1970). Role of acid moieties in toxic actions of pyrrolizidine alkaloids on liver and lung. Nature **228,** 174-175.

Mattocks, A.R., und Legg, R.F. (1980). Anti-mitotic activity of dehydroretronecine, a pyrrolizidine alkaloid metabolite, and some analogous compounds, in a rat-liver parenchymal cell line. Chemico-Biological Interactions **30,** 325-336.

Mattocks, A.R., Driver, H.E., Barbour, R.H., und Robins, D.J. (1986). Metabolism and toxicity of synthetic analogues of macrocyclic diester pyrrolizidine alkaloids. Chemico-Biological Interactions **58,** 95-108.

McLauchlan, W.R., McKee, R.A., und Evans, D.M. (1993). The purification and immunocharacterisation of *N*-methylputrescine oxidase from transformed root cultures of *Nicotiana tabacum* L-CV-SC58. Planta **191,** 440-445.

Miranda, C.L., Chung, W.G., Reed, R.E., Zhao, X.N., Henderson, M.C., Wang, J.L., Williams, D.E., und Buhler, D.R. (1991). Flavin-containing monooxygenase - A major detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea-pig tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications **178,** 546-552.

Mizusaki, S., Kisaki, T., und Tamaki, E. (1968). Phytochemical studies on tobacco alkaloids. XII. Identification of g-methylaminobutyraldehyde and its precursor role in nicotine biosynthesis. Plant Physiology **43,** 93-98.

Mizusaki, S., Tanabe, Y., Tamaki, E., und Noguchi, M. (1972). *N*-methylputrescine oxidase from tobacco roots. Phytochemistry **11,** 2757-2762.

Moll, S. (2002). Lokalisierung der Homospermidinsynthase, dem ersten spezifischen Enzym der Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese in den Wurzeln von *Senecio vernalis*. Dissertation, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.

Moll, S., Anke, S., Kahmann, U., Hänsch, R., Hartmann, T., und Ober, D. (2002). Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhypusine synthase. Plant Physiology **130,** 47-57.

Molnar, J., Fong, K.S.K., He, Q.P., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S.F.T., Fogelgren, B., Szauter, K.M., Mink, A., und Csiszar, K. (2003). Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics **1647,** 220-224.

Mothes, K. (1955). Physiology of alkaloids. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **6,** 393-432.

Mu, H., Ke, J.H., Liu, W., Zhuang, C.X., und Yip, W.K. (2009). UDP-glucose pyrophosphorylase2 (*OsUgp2*), a pollen-preferential gene in rice, plays a critical role in starch accumulation during pollen maturation. Chinese science bulletin **54,** 234-243.

Murashige, T., und Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum **15,** 473-497.

Nap, J.P., Bijvoet, J., und Stiekema, W.J. (1992). Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. Transgenic research **1,** 239-249.

Napoli, C., Lemieux, C., und Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. Plant Cell **2,** 279-289.

Niemüller, D. (2007). Vergleichende Lokalisation der Homospermidin-Synthase, Eingangsenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in verschiedenen Vertretern der Boraginaceae. Dissertation, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.

Novel, G., und Novel, M. (1973). Mutants of *E. coli* K 12 unable to grow on methyl-β-D-glucuronide: Map location of *uid* A locus of the structural gene of β-D-glucuronidase. Molecular & General Genetics **120,** 319-335.

Nurhayati, N., Gondé, D., und Ober, D. (2009). Evolution of pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* orchids and other monocotyledons: Identification of deoxyhypusine synthase, homospermidine synthase and related pseudogenes. Phytochemistry **70,** 508-516.

Ober, D. (1997). Strategien zur immunologischen und molekularen Untersuchung der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese. Dissertation, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.

Ober, D., und Hartmann, T. (1999a). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96,** 14777-14782.

Ober, D., und Hartmann, T. (1999b). Deoxyhypusine synthase from tobacco: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of an enzyme with extended substrate specificity. Journal of Biological Chemistry **274,** 32040-32047.

Ober, D., und Hartmann, T. (2000). Phylogenetic origin of a secondary pathway: The case of pyrrolizidine alkaloids. Plant Molecular Biology **44,** 445-450.

Ober, D., Harms, R., und Hartmann, T. (2000). Cloning and expression of homospermidine synthase from *Senecio vulgaris*: A revision. Phytochemistry **55,** 305-309.

Ober, D., Tholl, D., Martin, W., und Hartmann, T. (1996). Homospermidine synthase of *Rhodopseudomonas viridis*: Substrate specificity and effects of the heterologously expressed enzyme on polyamine metabolism of *Escherichia coli*. Journal of General and Applied Microbiology **42,** 411-419.

Ober, D., Gibas, L., Witte, L., und Hartmann, T. (2003a). Evidence for general occurrence of homospermidine in plants and its supposed origin as by-product of deoxyhypusine synthase. Phytochemistry **62,** 339-344.

Ober, D., Harms, R., Witte, L., und Hartmann, T. (2003b). Molecular evolution by change of function - alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. Journal of Biological Chemistry **278,** 12805-12812.

Odell, J.T., Nagy, F., und Chua, N.H. (1985). Identification of DNA-sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus-35S promoter. Nature **313,** 810-812.

Palazon, J., Cusido, R.M., Roig, C., und Pinol, M.T. (1998a). Expression of the *rol*C gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants. Plant Cell Reports **17,** 384-390.

Palazon, J., Cusido, R.M., Gonzalo, J., Bonfill, M., Morales, C., und Pinol, M.T. (1998b). Relation between the amount of *rol*C gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* transformed root cultures. Journal of Plant Physiology **153,** 712-718.

Park, M.H., Lee, Y.B., und Joe, Y.A. (1997). Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. Biological Signals **6,** 115-123.

Pelser, P., Veldkamp, J.-F., und van der Meijden, R. (2006). New combinations in Jacobaea Mill. In: Nordenstam, B. und Nohlin, G.W. (Hrsg.), Asteraceae - Senecioneae, Compositae newsletter, Band 44, Swedish Museum of Natural History, Department of Phanerogamic Botany,Stockholm.

Persson, S., Love, J., Tsou, P.L., Robertson, D., Thompson, W.F., und Boss, W.F. (2002). When a day makes a difference. Interpreting data from endoplasmic reticulum-targeted green fluorescent protein fusions in cells grown in suspension culture. Plant Physiology **128,** 341-344.

Piers, K.L., Heath, J.D., Liang, X.Y., Stephens, K.M., und Nester, E.W. (1996). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93,** 1613-1618.

Pomponi, M., Spanò, L., Sabbadini, M.G., und Costantino, P. (1983). Restriction endonuclease mapping of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. Plasmid **10,** 119-129.

Qi, Y.J., und Hannon, G.J. (2005). Uncovering RNAi mechanisms in plants: Biochemistry enters the foray. FEBS Letters **579,** 5899-5903.

Reimann, A., Nurhayati, N., Backenköhler, A., und Ober, D. (2004). Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. Plant Cell **16,** 2772-2784.

Riker, A.J., Berbee, J.G., und Smalley, E.B. (1959). Effects of crown gall and hairy root on the growth of apple trees. Phytopathology **49,** 88-90.

Robins, D.J. (1982). A biogenetically patterned synthesis of the pyrrolizidine alkaloid trachelanthamidine. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1289-1290.

Robins, D.J. (1989). Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. Chemical Society reviews **18,** 375-408.

Robins, D.J., und Sweeney, J.R. (1979). Pyrrolizidine alkaloids: Evidence for the involvement of spermidine and spermine in the biosynthesis of retronecine. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 120-121.

Roseman, A.M., Chen, S.X., White, H., Braig, K., und Saibil, H.R. (1996). The chaperonin ATPase cycle: Mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. Cell **87,** 241-251.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239,** 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2. Auflage, Cold Spring Habor Laboratory Press, New York.

Scheiffele, P., Pansegrau, W., und Lanka, E. (1995). Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing - purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site-specific and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA *in vitro*. Journal of Biological Chemistry **270,** 1269-1276.

Schmidt, J.F., Moore, M.D., Pelcher, L.E., und Covello, P.S. (2007). High efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Saponaria vaccaria* L. (Caryophyllaceae) using fluorescence selection. Plant Cell Reports **26,** 1547-1554.

Shimomura, O., Johnson, F.H., und Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan *Aequorea*. Journal of Cellular and Comparative Physiology **59,** 223-239.

Shkryl, Y.N., Veremeichik, G.N., Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P., Fedoreyev, S.A., und Zhuravlev, Y.N. (2008). Individual and combined effects of the *rol*A, B, and C genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. Biotechnology and bioengineering **100,** 118-125.

Spenser, I.D. (1985). Stereochemical aspects of the biosynthetic routes leading to the pyrrolizidine and the quinolizidine alkaloids. Pure and Applied Chemistry **57,** 453-470.

Sriskandarajah, S., Mibus, H., und Serek, M. (2008). Regeneration and transformation in adult plants of *Campanula* species. Plant Cell Reports **27,** 1713-1720.

St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F.A., und De Luca, V. (1999). Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. Plant Cell **11,** 887-900.

Suzuki, K., Yun, D.J., Chen, X.Y., Yamada, Y., und Hashimoto, T. (1999). An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6 β-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. Plant Molecular Biology **40,** 141-152.

Swain, T. (1977). Secondary compounds as protective agents. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **28,** 479-501.

Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell **37,** 959-967.

Tholl, D., Ober, D., Martin, W., Kellermann, J., und Hartmann, T. (1996). Purification, molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of homospermidine synthase from *Rhodopseudomonas viridis*. European Journal of Biochemistry **240,** 373-379.

Thompson, J.E., Hopkins, M.T., Taylor, C., und Wang, T.W. (2004). Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: Implications for plant growth and development. Trends in plant science **9,** 174-179.

Tiburcio, A.F., Altabella, T., Borrell, A., und Masgrau, C. (1997). Polyamine metabolism and its regulation. Physiologia Plantarum **100,** 664-674.

Toppel, G., Witte, L., und Hartmann, T. (1988). *N*-oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria scassellatii*. Phytochemistry **27,** 3757-3760.

Toppel, G., Witte, L., Riebesehl, B., v. Borstel, K., und Hartmann, T. (1987). Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some alkaloid producing *Senecio* species. Plant Cell Reports **6,** 466-469.

Tzfira, T., Li, J.X., Lacroix, B., und Citovsky, V. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: Molecules and models. Trends in Genetics **20,** 375-383.

Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., und Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. Plant Cell **11,** 1743-1754.

van Blokland, R., van der Geest, N., Mol, J.N.M., und Kooter, J.M. (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. Plant Journal **6,** 861-877.

van der Meijden, E., De Jong, T.J., Klinkhamer, P.G.L., und Koori, R.E. (1985). Temporal and spatial dynamics in populations of biennal plants. In: von Haek, J. und Woeldendorp, J. W. (Hrsg.), Structure and Functioning of Plant Populations, 2. Band, North Holland Publishing Company, Amsterdam, S. 91-103

Vandam, N.M., Vuister, L.W.M., Bergshoeff, C., Devos, H., und Vandermeijden, E. (1995). The "Raison D' Être" of pyrrolizidine alkaloids in Cynoglossum officinale: Deterrent effects against generalist herbivores. Journal of Chemical Ecology **21,** 507-523.

Vanhala, L., Hiltunen, R., und Oksman-Caldentey, K.M. (1995). Virulence of different *Agrobacterium* strains on hairy root formation of *Hyoscyamus muticus*. Plant Cell Reports **14,** 236-240.

Veena, V., und Taylor, C.G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: Recent developments and promising applications. In vitro cellular & developmental biology **43,** 383-403.

von Borstel, K., Witte, L., und Hartmann, T. (1989). Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *Senecio vernalis* and their hybrids. Phytochemistry **28,** 1635-1638.

Walton, N.J., und McLauchlan, W.R. (1990). Diamine oxidation and alkaloid production in transformed root cultures of *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry **29,** 1455-1457.

Wang, B., Peng, D.X., Sun, Z.X., Zhang, N., und Gao, S.M. (2008). *In vitro* plant regeneration from seedling-derived explants of ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud]. In vitro cellular & developmental biology **44,** 105-111.

Wang, T.W., Lu, L., Wang, D., und Thompson, J.E. (2001). Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eucaryotic translation initiation factor 5A from tomato. Journal of Biological Chemistry **276,** 17541-17549.

Wang, T.W., Zhang, C.G., Wu, W., Nowack, L.M., Madey, E., und Thompson, J.E. (2005a). Antisense suppression of deoxyhypusine synthase in tomato delays fruit softening and alters growth and development. Plant Physiology **138,** 1372-1382.

Wang, T.W., Wu, W., Zhang, C.G., Nowack, L.M., Liu, Z.D., und Thompson, J.E. (2005b). Antisense suppression of deoxyhypusine synthase by vacuum-infiltration of *Agrobacterium* enhances growth and seed yield of canola. Physiologia Plantarum **124,** 493-503.

Weide, R., Koornneef, M., und Zabel, P. (1989). A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. Theoretical and Applied Genetics **78,** 169-172.

Weller, S.A., Stead, D.E., und Young, J.P.W. (2005). Induction of root-mat symptoms on cucumber plants by *Rhizobium*, but not by *Ochrobactrum* or *Sinorhizobium*, harbouring a cucumopine Ri plasmid. Plant Pathology **54,** 799-805.

White, I.N.H., Mattocks, A.R., und Butler, W.H. (1973). Conversion of pyrrolizidine alkaloid retrorsine to pyrrolic derivatives *in vivo* and *in vitro* and its acute toxicity to various animal species. Chemico-Biological Interactions **6,** 207-218.

Winkel, B.S.J. (2004). Metabolic channeling in plants. Annual review of plant biology **55,** 85-107.

Witte, L., Rubiolo, P., Bicchi, C., und Hartmann, T. (1993). Comparative-analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas-chromatography mass-spectrometry. Phytochemistry **32,** 187-196.

Zhang, H.M., Jennings, A., Barlow, P.W., und Forde, B.G. (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96,** 6529-6534.

Zhang, L., Ding, R.X., Chai, Y.R., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey, K.M., Xu, T.F., Pi, Y., Wang, Z.N., Zhang, H.M., Kai, G.Y., Liao, Z.H., Sun, X.F., und Tang, K.X. (2004). Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101,** 6786-6791.

7 Anhang

7.1 Vektorkarten

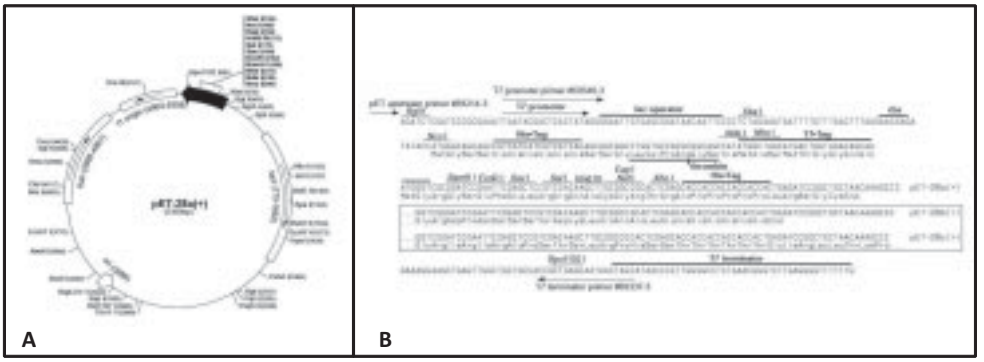


Abbildung 54: Vektor pET28a (Novagen) für die heterologe Expression in *E. coli*. A: Karte des kompletten Vektors, **B:** Ausschnitt der Multi-Cloning-Site

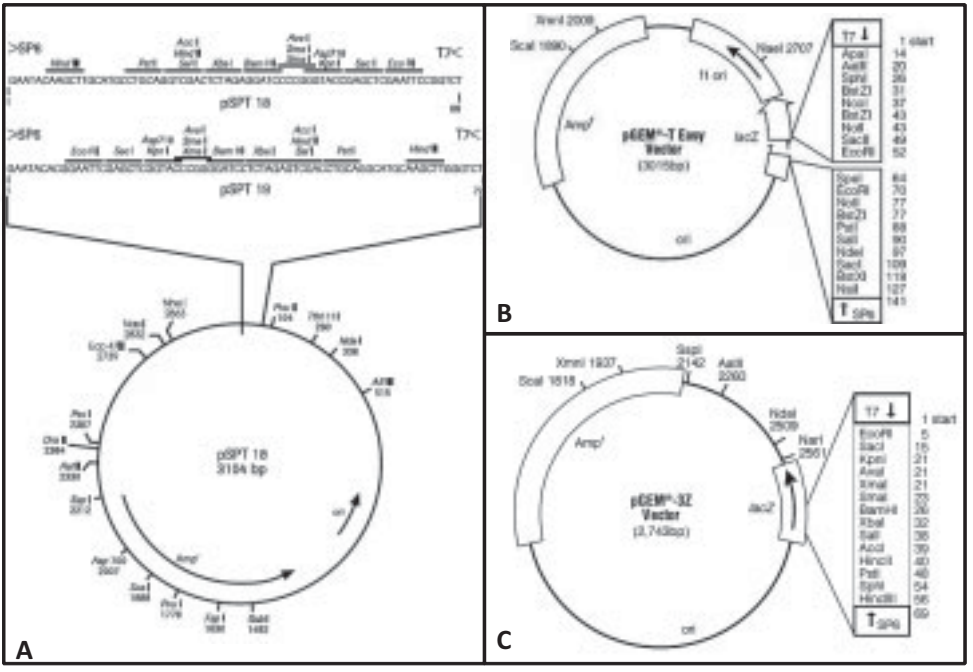


Abbildung 55: Vektoren für die Herstellung der DIG-gelabelten RNA-Sonden. A: pSPT18 und pSPT19 (Roche), **B:** pGEM®-TEasy (Promega), **C:** pGEM®-3Z (Promega)

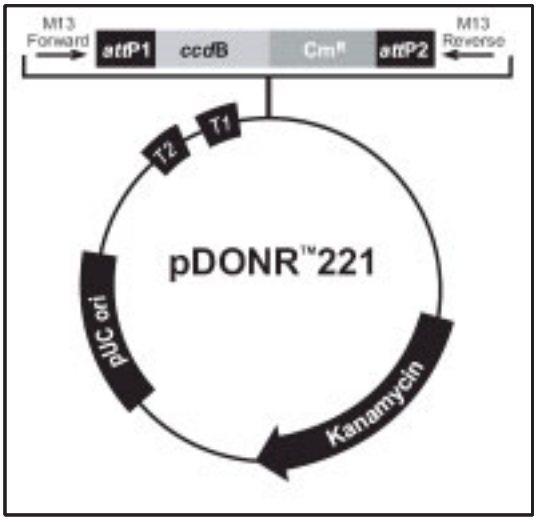


Abbildung 56: Vektor pDONR221 (Invitrogen) als Donor-Vektor für die Klonierung der Entry-Klone des Gateway®-Systems

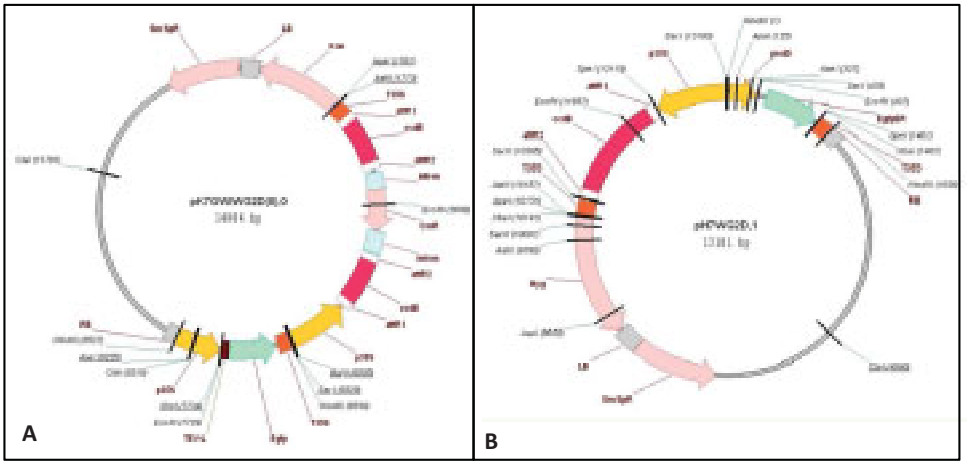


Abbildung 57: Vektoren für die Pflanzentransformationen. A: pK7GWIWG2D(II),0 (PSB) für die Erstellung der RNAi-Konstrukte, **B:** pH7WG2D,1 (PSB) für die Erstellung der Überexpressions- und GUS-Konstrukte

7.2 Konstrukte

Tabelle 53: Verwendete Konstrukte

Konstruktname	Ausgangsvektor	Beschreibung
pDE01	pSPT18	Matrix-DNA der HSS-Antisense-Sonde für *J. vulgaris*; abzulesen mit T7-RNA-Polymerase
pDE02	pSPT19	Matrix-DNA der HSS-Sense-Sonde für *J. vulgaris*; abzulesen mit T7-RNA-Polymerase
pDE08	pDONR221	Entry-Klon für RNAi-SVAO1 mit bp 1-511 von *svao1*
pDE09	pDONR221	Entry-Klon für RNAi-SVAO2 mit bp 1-536 von *svao2*
pDE10	pDONR221	Entry-Klon für RNAi-SVAO3 mit bp 1-512 von *svao3*
pDE12	pGEM®-TEasy	Konstrukt mit 1. Teil (*svao1-1*) der DAO-SVA01-Sonde; für Antisense-Sonde abzulesen mit T7-RNA-Polymerase; für Sense-Sonde abzulesen mit SP6-RNA-Polymerase
pDE13	pGEM®-TEasy	Konstrukt mit 1. Teil (*svao2-1*) der DAO-SVA02-Sonde; für Antisense-Sonde abzulesen mit SP6-RNA-Polymerase; für Sense-Sonde abzulesen mit T7-RNA-Polymerase
pDE14	pGEM®-TEasy	Konstrukt mit 1. Teil (*svao3-1*) der DAO-SVA03-Sonde; für Antisense-Sonde abzulesen mit T7-RNA-Polymerase; für Sense-Sonde abzulesen mit SP6-RNA-Polymerase
pDE15	pGEM®-TEasy	Konstrukt mit 2. Teil (*svao1-2*) der DAO-SVA01-Sonde; für Antisense-Sonde abzulesen mit SP6-RNA-Polymerase; für Sense-Sonde abzulesen mit T7-RNA-Polymerase
pDE16	pGEM®-TEasy	Konstrukt mit 2. Teil (*svao2-2*) der DAO-SVA02-Sonde; für Antisense-Sonde abzulesen mit T7-RNA-Polymerase; für Sense-Sonde abzulesen mit SP6-RNA-Polymerase
pDE17	pGEM®-TEasy	Konstrukt mit 2. Teil (*svao3-2*) der DAO-SVA03-Sonde; für Antisense-Sonde abzulesen mit SP6-RNA-Polymerase; für Sense-Sonde abzulesen mit T7-RNA-Polymerase
pDE18	pET28a	proteinkodierender Bereich von svao3 zur Expression in pET28a
pDE19	pK7GWIWG2D(II),0	Expressions-Klon für RNAi zum Ausschalten von svao1
pDE20	pK7GWIWG2D(II),0	Expressions-Klon für RNAi zum Ausschalten von svao2
pDE21	pK7GWIWG2D(II),0	Expressions-Klon für RNAi zum Ausschalten von svao3
pDE22	pH7WG2D,1	Expressions-Klon zur Überexpression von SVAO1 mit EGFP
pDE24	pH7WG2D,1	Expressions-Klon zur Überexpression von SVAO3 mit EGFP
pDE25	pDONR221	Entry-Klon für Überexpression von SVAO1
pDE27	pDONR221	Entry-Klon für Überexpression von SVAO3
GUS-Konstrukt	pH7WG2D,1	Expressions-Klon zur Überexpression von GUS mit EGFP

7.3 Ergebnisse der allgemeinen Analysen der transgenen *Hairy Root*-Klone

7.3.1 *Senecio*-Kontroll-HR-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzenklon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsdatum	vom Blatt abgeschn.	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080604-6/VTT5/A/1	DE080604-6	VTT5	A	1	keines	04.06.2008	24.06.2008				
DE080611-6b/VTT9/A/1	DE080611-6b	VTT9	A	1	keines	04.06.2008	24.06.2008				
DE080611-6b/VTT9/A/2	DE080611-6b	VTT9	A	2	keines	04.06.2008	24.06.2008	SW-5	nein	nein	ja
DE080611-6a/VTTx/A/2	DE080611-6a	VTTx	A	2	keines	04.06.2008	24.06.2008				
DE080611-6b/Dn/A/5	DE080611-6b	Dn	A	5	keines	11.06.2008	03.07.2008				
DE080611-6a/VTTx/D/2	DE080611-6a	VTTx	D	2	keines	11.06.2008	05.06.2008	SW-3	nein	nein	ja
DE080611-6a/VTTx/B/3	DE080611-6a	VTTx	B	3	keines	11.06.2008	05.06.2008				
DE080611-6a/VTTx/E/1	DE080611-6a	VTTx	E	1	keines	11.06.2008	05.06.2008	SW-2	nein	nein	ja
DE080611-6a/VTTx/F/1	DE080611-6a	VTTx	F	1	keines	11.06.2008	05.06.2008				
DE080616-4/Dn/B/4	DE080616-4	Dn	B	4	keines	16.06.2008	05.06.2008				
DE080611-6a/VTTx/B/6	DE080611-6a	VTTx	B	6	keines	11.06.2008	10.07.2008				
DE080611-6a/VTTx/B/7	DE080611-6a	VTTx	B	7	keines	11.06.2008	10.07.2008				
DE080604-6/VTT3/A/1	DE080604-6	VTT3	A	1	keines	04.06.2008	10.07.2008				
DE080616-4/VTT16/C/1	DE080616-4	VTT16	C	1	keines	16.06.2008	16.07.2008	SW-6	nein	nein	ja
DE080616-4/VTT16/C/2	DE080616-4	VTT16	C	2	keines	16.06.2008	16.07.2008				
DE080611-6a/VTTx/G/1	DE080611-6a	VTTx	G	1	keines	11.06.2008	16.07.2008				
DE080611-6b/VTT9/B/1	DE080611-6b	VTT9	B	1	keines	11.06.2008	16.07.2008				
DE080611-6a/VTTx/D/3	DE080611-6a	VTTx	D	3	keines	11.06.2008	16.07.2008	SW-1	nein	nein	ja
DE080611-6a/VTTx/D/4	DE080611-6a	VTTx	D	4	keines	11.06.2008	16.07.2008				
DE080709-4/VTT22/A/1	DE080709-4	VTT22	A	1	keines	09.07.2008	23.07.2008				
DE080709-4/VTT22/B/1	DE080709-4	VTT22	B	1	keines	09.07.2008	23.07.2008				
DE080709-4/VTT22/C/1	DE080709-4	VTT22	C	1	keines	09.07.2008	23.07.2008				
DE080709-4/VTT22/C/2	DE080709-4	VTT22	C	2	keines	09.07.2008	23.07.2008				
DE080616-4/Dn/B/6	DE080616-4	Dn	B	6	keines	16.06.2008	23.07.2008				
DE080611-6a/VTTx/G/2	DE080611-6a	VTTx	G	2	keines	11.06.2008	23.07.2008	SW-4	nein	nein	ja
DE080611-6a/Dn/A/2	DE080611-6a	Dn	A	2	keines	11.06.2008	23.07.2008				
DE080616-4/Dn/B/5	DE080616-4	Dn	B	4	keines	16.06.2008	23.07.2008				

7.3.2 *Senecio*-SVAO1-RNAi-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzen-klon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsdatum	vom Blatt abgeschn.	in 200 mg/l KAN hineingewachsen	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080604-1/VTT3/A/2	DE080604-1	VTT3	A	2	pDE19	04.06.2008	19.06.2008	nein				
DE080611-1b/VTT3/A/1	DE080611-1b	VTT3	A	1	pDE19	11.06.2008	24.06.2008	nein				
DE080611-1b/VTT3/B/1	DE080611-1b	VTT3	B	1	pDE19	11.06.2008	24.06.2008	ja	SD1-1	nein	ja	ja
DE080604-1/VTT3/A/3	DE080604-1	VTT3	A	3	pDE19	04.06.2008	04.07.2008	nein				
DE080604-1/VTT3/B/1	DE080604-1	VTT3	B	1	pDE19	04.06.2008	04.07.2008	nein				
DE080611-1b/VTT8/A/1	DE080611-1b	VTT8	A	1	pDE19	11.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080611-1b/VTT8/B/1	DE080611-1b	VTT8	B	1	pDE19	11.06.2008	07.07.2008	ja	SD1-2	nein	ja	ja
DE080611-1b/VTT8/B/2	DE080611-1b	VTT8	B	2	pDE19	11.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080611-1b/VTT3/C/1	DE080611-1b	VTT3	C	1	pDE19	11.06.2008	07.07.2008	ja	SD1-3	nein	ja	ja
DE080611-1b/VTT3/C/2	DE080611-1b	VTT3	C	2	pDE19	11.06.2008	07.07.2008	ja	SD1-4	nein	ja	ja
DE080616-1/VTT11/A/1	DE080616-1	VTT11	A	1	pDE19	16.06.2008	07.07.2008	ja	SD1-5	nein	ja	ja
DE080616-1/VTT11/A/2	DE080616-1	VTT11	A	2	pDE19	16.06.2008	07.07.2008	ja	SD1-6	nein	ja	ja
DE080611-1a/VTTx/B/1	DE080611-1a	VTTx	B	1	pDE19	16.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080625-1/VTTx/A/1	DE080625-1	VTTx	A	1	pDE19	25.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080616-1/VTT10/B/1	DE080616-1	VTT10	B	1	pDE19	16.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080625-1/VTTx/C/2	DE080625-1	VTTx	C	2	pDE19	25.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080611-1b/VTT3/B/3	DE080611-1b	VTT3	B	3	pDE19	11.06.2008	10.07.2008	ja	SD1-7	nein	ja	ja
DE080616-1/VTT11/C/1	DE080616-1	VTT11	C	1	pDE19	16.06.2008	16.07.2008	ja	SD1-8	nein	nein	ja
DE080616-1/VTT11/D/3	DE080616-1	VTT11	D	3	pDE19	16.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080616-1/VTT11/E/3	DE080616-1	VTT11	E	3	pDE19	16.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080616-1/VTT11/F/5	DE080616-1	VTT11	F	5	pDE19	16.06.2008	16.07.2008	ja	SD1-9	nein	nein	ja
DE080616-1/Dn/A/8	DE080616-1	Dn	A	8	pDE19	16.06.2008	16.07.2008	ja	SD1-10	nein	nein	ja

7.3.3 *Senecio*-SVAO2-RNAi-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzen-klon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsdatum	vom Blatt abgeschn.	in 200 mg/l KAN reingewachsen	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080604-2/VTT4/A/2	DE080604-2	VTT4	A	2	pDE20	04.06.2008	24.06.2008	nein				
DE080611-2b/VTT8/B/1	DE080611-2b	VTT8	B	1	pDE20	11.06.2008	24.06.2008	ja	SD2-1	nein	ja	ja
DE080611-2b/VTT9/A/1	DE080611-2b	VTT9	A	1	pDE20	11.06.2008	24.06.2008	ja	SD2-2	nein	ja	nein
DE080611-2a/VTTx/A/2	DE080611-2a	VTTx	A	2	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080611-2a/VTTx/A/3	DE080611-2a	VTTx	A	3	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080611-2a/VTTx/A/4	DE080611-2a	VTTx	A	4	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080611-2b/VTT8/A/2	DE080611-2b	VTT8	A	2	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	ja	SD2-3	nein	ja	ja
DE080611-2b/VTT8/A/3	DE080611-2b	VTT8	A	3	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	ja	SD2-4	nein	ja	ja
DE080611-2b/VTT8/A/4	DE080611-2b	VTT8	A	4	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	ja	SD2-5	nein	ja	nein
DE080611-2b/VTT8/A/5	DE080611-2b	VTT8	A	5	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	ja	SD2-6	nein	ja	ja
DE080611-2b/VTT9/B/1	DE080611-2b	VTT9	B	1	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080611-2b/VTT8/E/3	DE080611-2b	VTT8	E	3	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080611-2b/VTT8/F/1	DE080611-2b	VTT8	F	1	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080611-2b/VTT7/B/2	DE080611-2b	VTT7	B	2	pDE20	11.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080616-2/VTT15/A/1	DE080616-2	VTT15	A	1	pDE20	11.06.2008	07.07.2008	ja	SD2-7	nein	ja	ja
DE080616-2/VTT15/B/1	DE080616-2	VTT15	B	1	pDE20	11.06.2008	07.07.2008	ja	SD2-8	nein	ja	nein
DE080616-2/VTT15/C/1	DE080616-2	VTT15	C	1	pDE20	11.06.2008	07.07.2008	ja	SD2-9	nein	ja	ja
DE080611-2b/VTT8/E/5	DE080611-2b	VTT8	E	5	pDE20	11.06.2008	10.07.2008	ja	SD2-10	nein	ja	ja
DE080611-2b/VTT9/B/3	DE080611-2b	VTT9	B	3	pDE20	11.06.2008	10.07.2008	ja	SD2-11	nein	ja	ja
DE080625-2/VTTx/A/1	DE080625-2	VTTx	A	1	pDE20	25.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080625-2/VTTx/A/3	DE080625-2	VTTx	A	3	pDE20	25.06.2008	16.07.2008	ja	SD2-12	nein	ja	ja
DE080625-2/VTTx/A/4	DE080625-2	VTTx	A	4	pDE20	25.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080604-2/Dn/A/1	DE080604-2	Dn	A	1	pDE20	04.06.2008	16.07.2008	nein				

7.3.4 *Senecio*-SVAO3-RNAi-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzen-klon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsdatum	vom Blatt abgeschn.	auf 200 mg/l KAN gewachsen	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080616-3/VTT13/A/1	DE080616-3	VTT13	A	1	pDE21	16.06.2008	05.07.2008	ja	SD3-1	nein	ja	ja
DE080616-3/VTT13/A/2	DE080616-3	VTT13	A	2	pDE21	16.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080616-3/VTT13/B/1	DE080616-3	VTT13	B	1	pDE21	16.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080616-3/VTT13/B/2	DE080616-3	VTT13	B	2	pDE21	16.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080625-3/VTTx/A/3	DE080625-3	VTTx	A	3	pDE21	25.06.2008	16.07.2008	ja	SD3-2	nein	ja	ja
DE080625-3/VTTx/A/4	DE080625-3	VTTx	A	4	pDE21	25.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080625-3/VTTx/A/5	DE080625-3	VTTx	A	5	pDE21	25.06.2008	16.07.2008	ja	SD3-3	nein	ja	ja
DE080616-3/VTT13/A/3	DE080616-3	VTT13	A	3	pDE21	16.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080616-3/VTT13/A/4	DE080616-3	VTT13	A	4	pDE21	16.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080616-3/VTT13/B/4	DE080616-3	VTT13	B	4	pDE21	16.06.2008	16.07.2008	ja	SD3-4	nein	ja	ja
DE080616-3/VTT13/C/2	DE080616-3	VTT13	C	2	pDE21	16.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080616-3/VTT13/D/1	DE080616-3	VTT13	D	1	pDE21	16.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080616-3/VTT13/E/1	DE080616-3	VTT13	E	1	pDE21	16.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080625-3/VTTx/E/2	DE080625-3	VTTx	E	2	pDE21	25.06.2008	23.07.2008	nein				
DE080616-3/VTT13/D/2	DE080616-3	VTT13	D	2	pDE21	16.06.2008	23.07.2008	nein				
DE080616-3/VTT13/D/3	DE080616-3	VTT13	D	3	pDE21	16.06.2008	23.07.2008	ja	SD3-5	nein	ja	ja
DE080616-3/VTT13/D/4	DE080616-3	VTT13	D	4	pDE21	16.06.2008	23.07.2008	nein				

7.3.5 *Senecio*-SVAO1-Überexpressions-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzen-klon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsdatum	vom Blatt abgeschn.	auf 12,5 mg/l HYG gewachsen	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080619-1/Dn/A/1	DE080619-1	Dn	A	1	pDE22	19.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080619-1/Dn/A/3	DE080619-1	Dn	A	3	pDE22	19.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080619-1/Dn/B/2	DE080619-1	Dn	B	2	pDE22	19.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080619-1/Dn/C/2	DE080619-1	Dn	C	2	pDE22	19.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080619-1/VTT9/A/1	DE080619-1	VTT9	A	1	pDE22	19.06.2008	05.07.2008	ja	S1-1	nein	ja	ja
DE080619-1/Dn/C/3	DE080619-1	Dn	C	3	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	ja	S1-2	nein	ja	ja
DE080619-1/Dn/C/4	DE080619-1	Dn	C	4	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-1/Dn/C/6	DE080619-1	Dn	C	6	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	ja	S1-3	nein	ja	ja
DE080619-1/Dn/C/7	DE080619-1	Dn	C	7	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-1/Dn/C/8	DE080619-1	Dn	C	8	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-1/VTT20/A/3	DE080619-1	VTT20	A	3	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	ja	S1-4	nein	ja	ja
DE080619-1/VTT9/B/1	DE080619-1	VTT9	B	1	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-1/VTT20/B/1	DE080619-1	VTT20	B	1	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-1/VTT20/B/2	DE080619-1	VTT20	B	2	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	ja	S1-7	nein	ja	ja
DE080619-1/VTT20/B/3	DE080619-1	VTT20	B	3	pDE22	19.06.2008	10.07.2008	ja	S1-8	nein	ja	ja
DE080619-1/Mn/A/3	DE080619-1	Mn	A	3	pDE22	19.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080619-1/VTT9/B/4	DE080619-1	VTT9	B	4	pDE22	19.06.2008	16.07.2008	ja	S1-5	nein	ja	ja
DE080619-1/VTT20/C/4	DE080619-1	VTT20	C	4	pDE22	19.06.2008	16.07.2008	ja	S1-6	nein	ja	ja
DE080619-1/Mn/A/5	DE080619-1	Mn	A	5	pDE22	19.06.2008	23.07.2008	nein				
DE080619-1/Mn/A/6	DE080619-1	Mn	A	6	pDE22	19.06.2008	23.07.2008	nein				

7.3.6 *Senecio*-SVAO3-Überexpressions-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzen-klon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsdatum	vom Blatt abgeschn.	gewachsen auf 12,5 mg/l HYG	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080619-2/A/A/1	DE080619-2	A	A	1	pDE24	19.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080619-2/A/A/2	DE080619-2	A	A	2	pDE24	19.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080619-2/A/A/4	DE080619-2	A	A	4	pDE24	19.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080619-2/A/A/5	DE080619-2	A	A	5	pDE24	19.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080619-2/A/A/6	DE080619-2	A	A	6	pDE24	19.06.2008	07.07.2008	ja	S3-1	nein	ja	ja
DE080619-2/A/B/4	DE080619-2	A	B	4	pDE24	19.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080619-2/A/A/7	DE080619-2	A	A	7	pDE24	19.06.2008	10.07.2008	ja	S3-2	nein	ja	ja
DE080619-2/A/A/8	DE080619-2	A	A	8	pDE24	19.06.2008	10.07.2008	ja	S3-3	nein	ja	ja
DE080619-2/A/A/9	DE080619-2	A	A	9	pDE24	19.06.2008	10.07.2008	ja	S3-4	nein	ja	ja
DE080619-2/A/A/10	DE080619-2	A	A	10	pDE24	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-2/A/B/5	DE080619-2	A	B	5	pDE24	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-2/A/B/6	DE080619-2	A	B	6	pDE24	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-2/A/C/1	DE080619-2	A	C	1	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080619-2/A/C/2	DE080619-2	A	C	2	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080619-2/VTT24/A/1	DE080619-2	VTT24	A	1	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	ja	S3-5	nein	ja	ja
DE080619-2/VTT24/A/2	DE080619-2	VTT24	A	2	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	ja	S3-6	nein	ja	ja
DE080619-2/VTT24/A/4	DE080619-2	VTT24	A	4	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080619-2/VTT24/A/5	DE080619-2	VTT24	A	5	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080619-2/VTT23/A/2	DE080619-2	VTT23	A	2	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	ja	S3-7	nein	ja	ja
DE080619-2/VTT22/A/1	DE080619-2	VTT22	A	1	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	ja	S3-8	nein	ja	ja
DE080619-2/A/B/8	DE080619-2	A	B	8	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080619-2/A/B/9	DE080619-2	A	B	9	pDE24	19.06.2008	16.07.2008	ja	S3-9	nein	ja	ja
DE080619-2/VTT1/A/3	DE080619-2	VTT1	A	3	pDE24	19.06.2008	23.07.2008	nein				
DE080619-2/VTT24/A/6	DE080619-2	VTT24	A	6	pDE24	19.06.2008	23.07.2008	nein				
DE080619-2/A/B/10	DE080619-2	A	B	10	pDE24	19.06.2008	23.07.2008	ja	S3-10	nein	ja	ja
DE080619-2/A/B/12	DE080619-2	A	B	12	pDE24	19.06.2008	23.07.2008	nein				

7.3.7 *Senecio*-GUS-Überexpressions-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzen-klon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsda-tum	vom Blatt abgeschn.	auf 12,5 mg/l HYG gewachsen	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080619-3/VTT23/A/1	DE080619-3	VTT23	A	1	GUS-Konstrukt	19.06.2008	07.07.2008	ja	SG-1	nein	nein	ja
DE080619-3/VTT23/A/2	DE080619-3	VTT23	A	2	GUS-Konstrukt	19.06.2008	07.07.2008	ja	SG-2	nein	ja	ja
DE080619-3/VTT23/B/1	DE080619-3	VTT23	B	1	GUS-Konstrukt	19.06.2008	07.07.2008	ja	SG-3	nein	nein	ja
DE080619-3/VTT1/B/2	DE080619-3	VTT1	B	2	GUS-Konstrukt	19.06.2008	07.07.2008	nein				
DE080619-3/VTT1/C/3	DE080619-3	VTT1	C	3	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-3/A/A/1	DE080619-3	A	A	1	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-3/VTT23/B/3	DE080619-3	VTT23	B	3	GUS-Konstrukt	19.06.2008	16.07.2008	ja	SG-4	nein	nein	ja
DE080619-3/VTT23/B/4	DE080619-3	VTT23	B	4	GUS-Konstrukt	19.06.2008	16.07.2008	ja	SG-5	nein	nein	ja
DE080619-3/VTT23/A/3	DE080619-3	VTT23	A	3	GUS-Konstrukt	19.06.2008	16.07.2008	ja	SG-6	nein	nein	ja
DE080619-3/VTT1/B/4	DE080619-3	VTT1	B	4	GUS-Konstrukt	19.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080619-3/VTT1/D/1	DE080619-3	VTT1	D	1	GUS-Konstrukt	19.06.2008	16.07.2008	nein				
DE080619-3/A/A/3	DE080619-3	A	A	3	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	ja	SG-7	nein	nein	ja
DE080619-3/A/B/1	DE080619-3	A	B	1	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-3/A/B/2	DE080619-3	A	B	2	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-3/A/C/1	DE080619-3	A	C	1	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-3/VTT23/C/1	DE080619-3	VTT23	C	1	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-3/VTT23/D/2	DE080619-3	VTT23	D	2	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-3/VTT23/E/1	DE080619-3	VTT23	E	1	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-3/VTT23/E/2	DE080619-3	VTT23	E	2	GUS-Konstrukt	19.06.2008	10.07.2008	nein				
DE080619-3/VTT9/A/4	DE080619-3	VTT9	A	4	GUS-Konstrukt	19.06.2008	23.07.2008	nein				
DE080619-3/VTT1/C/5	DE080619-3	VTT1	C	5	GUS-Konstrukt	19.06.2008	23.07.2008	nein				
DE080619-3/A/B/3	DE080619-3	A	B	3	GUS-Konstrukt	19.06.2008	23.07.2008	nein				
DE080619-3/A/C/4	DE080619-3	A	C	4	GUS-Konstrukt	19.06.2008	23.07.2008	nein				
DE080709-3/VTT23/A/2	DE080709-3	VTT23	A	2	GUS-Konstrukt	09.07.2008	23.07.2008	nein				

7.3.8 Tabak-Kontroll-HR-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzenklon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsdatum	vom Blatt abgeschn.	Nr. bei Bearbeitung
DE080604-7/Bx/A/1	DE080604-7	Bx	A	1	keines	04.06.2008	18.06.2008	
DE080604-7/Bx/A/2	DE080604-7	Bx	A	2	keines	04.06.2008	24.06.2008	
DE080604-7/Bx/A/3	DE080604-7	Bx	A	3	keines	04.06.2008	24.06.2008	
DE080604-7/Bx/A/4	DE080604-7	Bx	A	4	keines	04.06.2008	04.07.2008	
DE080604-7/Bx/A/5	DE080604-7	Bx	A	5	keines	04.06.2008	04.07.2008	
DE080604-7/Bx/B/1	DE080604-7	Bx	B	1	keines	04.06.2008	05.07.2008	TW-1
DE080604-7/Bx/B/2	DE080604-7	Bx	B	2	keines	04.06.2008	05.07.2008	
DE080604-7/Bx/B/3	DE080604-7	Bx	B	3	keines	04.06.2008	05.07.2008	
DE080604-7/Bx/C/1	DE080604-7	Bx	C	1	keines	04.06.2008	05.07.2008	
DE080604-7/Bx/C/2	DE080604-7	Bx	C	2	keines	04.06.2008	05.07.2008	
DE080604-7/Bx/A/6	DE080604-7	Bx	A	6	keines	04.06.2008	05.07.2008	
DE080604-7/Bx/A/7	DE080604-7	Bx	A	7	keines	04.06.2008	05.07.2008	
DE080604-7/Bx/A/8	DE080604-7	Bx	A	8	keines	04.06.2008	05.07.2008	
DE080604-7/Bx/A/9	DE080604-7	Bx	A	9	keines	04.06.2008	16.07.2008	
DE080604-7/Bx/A/10	DE080604-7	Bx	A	10	keines	04.06.2008	16.07.2008	
DE080709-8/Bx/A/1	DE080709-8	Bx	A	1	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/A/2	DE080709-8	Bx	A	2	keines	09.07.2008	23.07.2008	TW-2
DE080709-8/Bx/B/1	DE080709-8	Bx	B	1	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/C/1	DE080709-8	Bx	C	1	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/C/2	DE080709-8	Bx	C	2	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/C/3	DE080709-8	Bx	C	3	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/C/4	DE080709-8	Bx	C	4	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/C/5	DE080709-8	Bx	C	5	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/C/6	DE080709-8	Bx	C	6	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/D/1	DE080709-8	Bx	D	1	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/D/2	DE080709-8	Bx	D	2	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/D/3	DE080709-8	Bx	D	3	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/E/1	DE080709-8	Bx	E	1	keines	09.07.2008	23.07.2008	
DE080709-8/Bx/E/2	DE080709-8	Bx	E	2	keines	09.07.2008	23.07.2008	

7.3.9 Tabak-SVAO1-Überexpressions-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzen-klon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsdatum	vom Blatt abgeschn.	auf 12,5 mg/l HYG gewachsen	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080520-3/Bx/A/1	DE080520/3	Bx	A	1	pDE22	20.05.2008	02.06.2008	ja	1-3	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/B/1	DE080520/3	Bx	B	1	pDE22	20.05.2008	02.06.2008	ja	1-16	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/B/2	DE080520/3	Bx	B	2	pDE22	20.05.2008	02.06.2008	ja	1-20	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/B/3	DE080520/3	Bx	B	3	pDE22	20.05.2008	02.06.2008	nein	1-4	nein	ja	nein
DE080520-3/Bx/D/1	DE080520/3	Bx	D	1	pDE22	20.05.2008	02.06.2008	ja	n.b.			
DE080520-3/Bx/D/2	DE080520/3	Bx	D	2	pDE22	20.05.2008	05.06.2008	ja	1-19	ja	ja	ja
DE080520-3/Bx/E/1	DE080520/3	Bx	E	1	pDE22	20.05.2008	05.06.2008	ja	1-11	nein	nein	ja
DE080520-3/Bx/E/2	DE080520/3	Bx	E	2	pDE22	20.05.2008	05.06.2008	ja	1-12	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/F/3	DE080520/3	Bx	F	3	pDE22	20.05.2008	05.06.2008	ja	1-5	nein	nein	ja
DE080520-3/Bx/G/1	DE080520/3	Bx	G	1	pDE22	20.05.2008	05.06.2008	ja	1-7	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/A/4	DE080520/3	Bx	A	4	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	ja	1-9	nein	nein	ja
DE080520-3/Bx/B/5	DE080520/3	Bx	B	5	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	ja	1-13	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/B/6	DE080520/3	Bx	B	6	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	ja	1-17	nein	nein	ja
DE080520-3/Bx/C/1	DE080520/3	Bx	C	1	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	ja	1-18	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/C/2	DE080520/3	Bx	C	2	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	ja	1-6	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/F/7	DE080520/3	Bx	F	7	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	ja	n.b.			
DE080520-3/Bx/H/3	DE080520/3	Bx	H	3	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	ja	n.b.			
DE080520-3/Bx/J/1	DE080520/3	Bx	J	1	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	ja	1-1	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/J/2	DE080520/3	Bx	J	2	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	ja	1-15	nein	nein	ja
DE080520-3/Bx/J/3	DE080520/3	Bx	J	3	pDE22	20.05.2008	09.06.2008	nein	1-10	nein	nein	ja
DE080520-3/Bx/J/4	DE080520/3	Bx	J	4	pDE22	20.05.2008	12.06.2008	nein	1-2	nein	ja	nein
DE080520-3/Bx/B/7	DE080520/3	Bx	B	7	pDE22	20.05.2008	12.06.2008	ja	n.b.			
DE080520-3/Bx/B/9	DE080520/3	Bx	B	9	pDE22	20.05.2008	12.06.2008	ja	n.b.			
DE080520-3/Bx/L/1	DE080520/3	Bx	L	1	pDE22	20.05.2008	12.06.2008	ja	1-8	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/L/2	DE080520/3	Bx	L	2	pDE22	20.05.2008	12.06.2008	ja	1-14	nein	ja	ja
DE080520-3/Bx/F/9	DE080520/3	Bx	F	9	pDE22	20.05.2008	18.06.2008	ja	n.b.			
DE080604-3/Bx/A/1	DE080604-3	Bx	A	1	pDE22	04.06.2008	04.07.2008	ja	n.b.			
DE080618-1/Bx/B/1	DE080618-1	Bx	B	1	pDE22	18.06.2008	05.07.2008	ja	n.b.			
DE080618-1/Bx/B/2	DE080618-1	Bx	B	2	pDE22	18.06.2008	05.07.2008	ja	n.b.			

Fortsetzung Tabak-SVAO1-Überexpressions-Klone

DE080618-1/Bx/B/3	DE080618-1	Bx	B	3	pDE22	18.06.2008	05.07.2008	ja	n.b.			
DE080618-1/Bx/C/1	DE080618-1	Bx	C	1	pDE22	18.06.2008	05.07.2008	ja	n.b.			
DE080618-1/Bx/D/1	DE080618-1	Bx	D	1	pDE22	18.06.2008	05.07.2008	ja	n.b.			
DE080618-1/Bx/E/1	DE080618-1	Bx	E	1	pDE22	18.06.2008	05.07.2008	ja	n.b			

n.b.: nicht bearbeitet, da bereits genug Proben oder im VTT nicht mehr vorhanden

7.3.10 Tabak-SVAO3-Überexpressions-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzen-klon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsdatum	vom Blatt abgeschn.	wächst auf 12,5 mg/l HYG	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080529-D/Bx/A/1	DE080529-D	Bx	A	1	pDE24	29.05.2008	16.06.2008	nein				
DE080604-4/Bx/B/1	DE080604-4	Bx	B	1	pDE24	04.06.2008	18.06.2008	ja	3-11	nein	ja	ja
DE080529-D/Bx/A/2	DE080529-D	Bx	A	2	pDE24	29.05.2008	16.06.2008	nein				
DE080529-D/Bx/A/3	DE080529-D	Bx	A	3	pDE24	29.05.2008	16.06.2008	ja	3-3	nein	ja	ja
DE080529-D/Bx/A/4	DE080529-D	Bx	A	4	pDE24	29.05.2008	16.06.2008	ja	3-4	nein	ja	ja
DE080529-D/Bx/A/5	DE080529-D	Bx	A	5	pDE24	29.05.2008	16.06.2008	ja	3-5	nein	ja	ja
DE080529-D/Bx/A/6	DE080529-D	Bx	A	6	pDE24	29.05.2008	16.06.2008	ja	3-6	nein	ja	ja
DE080529-D/Bx/A/7	DE080529-D	Bx	A	7	pDE24	29.05.2008	16.06.2008	ja	3-7	nein	ja	ja
DE080604-4/Bx/B/3	DE080604-4	Bx	B	3	pDE24	04.06.2008	04.07.2008	ja	3-8	nein	ja	ja
DE080618-2/Bx/A/1	DE080618-2	Bx	A	1	pDE24	04.06.2008	04.07.2008	nein				
DE080618-2/Bx/A/2	DE080618-2	Bx	A	2	pDE24	04.06.2008	05.07.2008	nein				
DE080618-2/Bx/B/1	DE080618-2	Bx	B	1	pDE24	04.06.2008	05.07.2008	ja	3-2	nein	ja	ja
DE080618-2/Bx/B/2	DE080618-2	Bx	B	2	pDE24	04.06.2008	05.07.2008	ja	3-1	nein	ja	ja
DE080618-2/Bx/C/3	DE080618-2	Bx	C	3	pDE24	04.06.2008	05.07.2008	ja	n.b.			
DE080618-2/Bx/D/1	DE080618-2	Bx	D	1	pDE24	04.06.2008	05.07.2008	ja	3-10	nein	ja	ja
DE080618-2/Bx/F/1	DE080618-2	Bx	F	1	pDE24	04.06.2008	05.07.2008	ja	3-9	nein	ja	ja
DE080618-2/Bx/G/3	DE080618-2	Bx	G	3	pDE24	04.06.2008	15.07.2008	ja	n.b.			
DE080618-2/Bx/H/1	DE080618-2	Bx	H	1	pDE24	04.06.2008	15.07.2008	ja	n.b.			
DE080709-7/Bx/A/2	DE080709-7	Bx	A	2	pDE24	09.07.2008	23.07.2008	ja	n.b.			
DE080709-7/Bx/B/2	DE080709-7	Bx	B	2	pDE24	09.07.2008	23.07.2008	ja	n.b.			
DE080709-7/Bx/C/1	DE080709-7	Bx	C	1	pDE24	09.07.2008	23.07.2008	ja	n.b.			
DE080709-7/Bx/C/2	DE080709-7	Bx	C	2	pDE24	09.07.2008	23.07.2008	nein				

n.b.: nicht bearbeitet, da bereits genug Proben oder im VTT nicht mehr vorhanden

7.3.11 Tabak-GUS-Überexpressions-Klone

Klonname komplett	Infektionsnr.	Pflanzen-klon	Blattnr.	Wurzelklonnr.	DNA-Konstrukt	Infektionsda-tum	vom Blatt abgeschn.	wachsen auf 12,5 mg/l HYG	Nr. bei Bearbeitung	*virD1*	Fremdgen	*rol*B
DE080529-E/Bx/A/1	DE080529-E	Bx	A	1	GUS-Konstrukt	29.05.2008	10.06.2008	ja	n.b.			
DE080604-5/Bx/A/3	DE080604-5	Bx	A	3	GUS-Konstrukt	04.06.2008	04.07.2008	nein				
DE080611-5/Bx/A/1	DE080611-5	Bx	A	1	GUS-Konstrukt	11.06.2008	05.07.2008	ja	G-2	nein	ja	ja
DE080611-5/Bx/B/1	DE080611-5	Bx	B	1	GUS-Konstrukt	11.06.2008	05.07.2008	ja	n.b.			
DE080618-3/Bx/C/1	DE080618-3	Bx	C	1	GUS-Konstrukt	18.06.2008	05.07.2008	ja	G-7	nein	ja	ja
DE080618-3/Bx/D/1	DE080618-3	Bx	D	1	GUS-Konstrukt	18.06.2008	05.07.2008	ja	G-4	nein	ja	ja
DE080618-3/Bx/E/1	DE080618-3	Bx	E	1	GUS-Konstrukt	18.06.2008	05.07.2008	ja	G-5	nein	ja	nein
DE080618-3/Bx/E/2	DE080618-3	Bx	E	2	GUS-Konstrukt	18.06.2008	05.07.2008	ja	G-1	nein	ja	ja
DE080611-5/Bx/A/2	DE080611-5	Bx	A	2	GUS-Konstrukt	11.06.2008	31.06.2008	ja	n.b.			
DE080618-3/Bx/F/1	DE080618-3	Bx	F	1	GUS-Konstrukt	18.06.2008	05.07.2008	ja	G-3	nein	ja	ja
DE080618-3/Bx/G/1	DE080618-3	Bx	G	1	GUS-Konstrukt	18.06.2008	05.07.2008	ja	G-6	nein	ja	ja
DE080618-3/Bx/G/2	DE080618-3	Bx	G	2	GUS-Konstrukt	18.06.2008	05.07.2008	ja	n.b.			
DE080618-3/Bx/H/1	DE080618-3	Bx	H	1	GUS-Konstrukt	18.06.2008	05.07.2008	ja	G-8	nein	ja	ja
DE080618-3/Bx/I/1	DE080618-3	Bx	I	1	GUS-Konstrukt	18.06.2008	16.07.2008	ja	G-9	nein	ja	ja

n.b.: nicht bearbeitet, da bereits genug Proben oder im VTT nicht mehr vorhanden

7.4 Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der transgenen *Senecio-Hairy Root*-Klone

7.4.1 Kontroll-HR-Klone

Klon	Fläche interner Standard (IS)	Fläche Senecivernin	Senecivernin/IS	Fläche Senecionin	Senecionin/IS	Fläche Integerrimin	Integerrimin/IS	Fläche Senkirkin	Senkirkin/IS	Gesamt-PA/IS		
SW-1	1056951	4561	0,0043	665961	0,6301	111916	0,1059	11621	0,0110	0,7513		0,**7554**
SW-1	1053537	3302	0,0031	672762	0,6386	114610	0,1088	40418	0,0384	0,7889		
SW-1	1134665	4748	0,0042	790333	0,6965	127768	0,1126	6532	0,0058	0,8191	0,7259*	
SW-1	1582761	5734	0,0036	851646	0,5381	135344	0,0855	8848	0,0056	0,6328		
SW-2	736591	3011	0,0041	491936	0,6679	113182	0,1537	4713	0,0064	0,8320	0,8036	
SW-2	843038	3961	0,0047	525158	0,6229	114352	0,1356	2557	0,0030	0,7663		
SW-2	1080439	5096	0,0047	715925	0,6626	154947	0,1434	1740	0,0016	0,8124		
SW-3	1305912	4536	0,0035	560743	0,4294	90954	0,0696	26493	0,0203	0,5228	0,5925	
SW-3	873227	3305	0,0038	476707	0,5459	73771	0,0845	24405	0,0279	0,6621		
SW-4	918000	5495	0,0060	965344	1,0516	202810	0,2209	8798	0,0096	1,2881	1,4527	
SW-4	856608	3494	0,0041	877715	1,0246	182750	0,2133	47801	0,0558	1,2979		
SW-4	1092188	65550	0,0600	1256330	1,1503	282178	0,2584	331473	0,3035	1,7722		
SW-5	457595	2623	0,0057	490763	1,0725	205134	0,4483	11843	0,0259	1,5524	1,1718	
SW-5	1159059	6241	0,0054	820194	0,7076	353516	0,3050	31516	0,0272	1,0452		
SW-5	739271	5019	0,0068	476323	0,6443	187927	0,2542	9128	0,0123	0,9177		
SW-6	728135	2174	0,0030	496017	0,6812	84866	0,1166	21286	0,0292	0,8300	0,8497	
SW-6	704189	5070	0,0072	586221	0,8325	101950	0,1448	67911	0,0964	1,0809		
SW-6	1526178	4752	0,0031	766645	0,5023	128099	0,0839	74318	0,0487	0,6381		
										ø	0,9376	

*: Dieser Wert entstand durch eine zweifach gaschromatographische Messung desselben Extraktes.

7.4.2 SVAO1-RNAi-Klone

Klon	Fläche interner Standard (IS)	Fläche Senecivernin	Senecivernin/IS	Fläche Senecionin	Senecionin/IS	Fläche Integerrimin	Integerrimin/IS	Fläche Senkirkin	Senkirkin/IS	Gesamt-PA/IS	
SD1-1	601438	5576	0,0093	459319	0,7637	87212	0,1450	54928	0,0913	1,0093	
SD1-2	1025497	5506	0,0054	582330	0,5679	96285	0,0939	21264	0,0207	0,6878	
SD1-2	1436674	16156	0,0112	1114031	0,7754	182193	0,1268	72310	0,0503	0,9638	0,8912
SD1-2	1214123	3721	0,0031	1034613	0,8521	167526	0,1380	34838	0,0287	1,0219	
SD1-4	714587	3318	0,0046	468288	0,6553	83547	0,1169	40404	0,0565	0,8334	
SD1-5	557740	2078	0,0037	187740	0,3366	29315	0,0526	2009	0,0036	0,3965	
SD1-5	939867	2822	0,0030	336206	0,3577	58611	0,0624	3108	0,0033	0,4264	0,4212
SD1-5	780082	1315	0,0017	282602	0,3623	42419	0,0544	17424	0,0223	0,4407	
SD1-6	416983	2440	0,0059	342486	0,8213	58116	0,1394	13597	0,0326	0,9992	
SD1-7	526497	6723	0,0128	509220	0,9672	91088	0,1730	143260	0,2721	1,4251	
SD1-7	1341606	122607	0,0914	1312677	0,9784	255524	0,1905	568519	0,4238	1,684	1,388
SD1-7	1712437	5263	0,0031	1397564	0,8161	249641	0,1458	154113	0,0900	1,055	

7.4.3 SVAO2-RNAi-Klone

Klon	Fläche interner Standard (IS)	Fläche Senecivernin	Senecivernin/IS	Fläche Senecionin	Senecionin/IS	Fläche Integerrimin	Integerrimin/IS	Fläche Senkirkin	Senkirkin/IS	Gesamt-PA/IS		
SD2-1	792352	3069	0,0039	277238	0,3499	53842	0,0680	34909	0,0441	0,4658		
SD2-1	522751	1064	0,0020	143429	0,2744	27798	0,0532	6449	0,0123	0,3419	0,3844	
SD2-1	854527	1745	0,0020	244116	0,2857	45721	0,0535	3662	0,0043	0,3455		
SD2-3	834680	574	0,0007	173921	0,2084	33043	0,0396	25869	0,0310	0,2796		
SD2-3	1388876	6418	0,0046	995530	0,7168	192013	0,1383	96313	0,0693	0,9290		
SD2-3	2420154	7878	0,0033	1050435	0,4340	206231	0,0852	95558	0,0395	0,5620	0,7455	
SD2-4	503100	899	0,0018	163391	0,3248	29870	0,0594	3308	0,0066	0,3925		
SD2-7	619413	2186	0,0035	367289	0,5930	65909	0,1064	33717	0,0544	0,7573		
SD2-8	736519	1920	0,0026	310955	0,4222	47206	0,0641	6866	0,0093	0,4982		
SD2-9	584617	2432	0,0042	469963	0,8039	75258	0,1287	29206	0,0500	0,9867		
SD2-10	546791	1716	0,0031	149264	0,2730	27227	0,0498	1005	0,0018	0,3278		
SD2-10	327398	938	0,0029	209312	0,6393	31177	0,0952	8960	0,0274	0,7648	0,5433	
SD2-10	421029	2180	0,0052	187955	0,4464	28602	0,0679	7453	0,0177	0,5372		
SD2-11	941005	9763	0,0104	1607953	1,7088	304144	0,3232	335617	0,3567	2,3990		
SD2-11	1469669	9574	0,0065	2175466	1,4802	440599	0,2998	248917	0,1694	1,9559	2,1190	
SD2-11	1075486	6836	0,0064	1560786	1,4512	316924	0,2947	268565	0,2497	2,0020		
SD2-12	529994	360	0,0007	67357	0,1271	8964	0,0169	5507	0,0104	0,1551		
SD2-12	691148	0	0,0000	65745	0,0951	9044	0,0131	11437	0,0165	0,1248	0,1399*	
SD2-12	571530	968	0,0017	175011	0,3062	20096	0,0352	3379	0,0059	0,3490		0,2745
SD2-12	819041	1755	0,0021	235875	0,2880	30787	0,0376	5744	0,0070	0,3347		

*: Dieser Wert entstand durch eine zweifach gaschromatographische Messung desselben Extraktes.

7.4.4 SVAO3-RNAi-Klone

Klon	Fläche interner Standard (IS)	Fläche Senecivernin	Senecivernin/IS	Fläche Senecionin	Senecionin/IS	Fläche Integerrimin	Integerrimin/IS	Fläche Senkirkin	Senkirkin/IS	Gesamt-PA/IS		
SD3-1	721676	2829	0,0039	357304	0,4951	73137	0,1013	9320	0,0129	0,6133		
SD3-2	593922	1411	0,0024	191084	0,3217	33563	0,0565	26037	0,0438	0,4245		
SD3-2	1038065	1920	0,0018	318845	0,3072	61944	0,0597	58125	0,0560	0,4247	0,4319	
SD3-2	996218	2292	0,0023	366025	0,3674	58963	0,0592	17590	0,0177	0,4466		
SD3-3	531191	937	0,0018	138206	0,2602	26410	0,0497	6708	0,0126	0,3243		
SD3-3	575673	1576	0,0027	156726	0,2722	30171	0,0524	8097	0,0141	0,3415	0,3329*	
SD3-3	647666	2263	0,0035	357445	0,5519	52615	0,0812	2112	0,0033	0,6399		0,5058
SD3-3	903151	2884	0,0032	426173	0,4719	61238	0,0678	1508	0,0017	0,5445		
SD3-4	717191	15284	0,0213	544968	0,7599	141401	0,1972	369236	0,5148	1,4932		
SD3-5	716287	7888	0,0110	1807377	2,5233	330565	0,4615	433106	0,6047	3,6004		
SD3-5	1486555	11248	0,0076	3581856	2,4095	684518	0,4605	581365	0,3911	3,2686	3,4052	
SD3-5	1632721	8711	0,0053	4029533	2,4680	767266	0,4699	658347	0,4032	3,3465		

*: Dieser Wert entstand durch eine zweifach gaschromatographische Messung desselben Extraktes.

7.4.5 SVAO1-Überexpressions-Klone

Klon	Fläche interner Standard (IS)	Fläche Senecivernin	Senecivernin/IS	Fläche Senecionin	Senecionin/IS	Fläche Integerrimin	Integerrimin/IS	Fläche Senkirkin	Senkirkin/IS	Gesamt-PA/IS	
S1-2	460416	542	0,0012	173571	0,3770	44479	0,0966	11495	0,0250	0,4997	0,5061
S1-2	1242417	2280	0,0018	441293	0,3552	109690	0,0883	30435	0,0245	0,4698	
S1-2	1129949	10831	0,0096	432884	0,3831	107966	0,0955	68391	0,0605	0,5488	
S1-3	473494	1559	0,0033	166895	0,3525	53313	0,1126	10962	0,0232	0,4915	
S1-5	237191	539	0,0023	85041	0,3585	38190	0,1610	7142	0,0301	0,5519	
S1-6	445437	1950	0,0044	400935	0,9001	104558	0,2347	42762	0,0960	1,2352	
S1-7	539190	1701	0,0032	633373	1,1747	136396	0,2530	287200	0,5327	1,9634	2,0097
S1-7	927848	7252	0,0078	1582995	1,7061	296011	0,3190	21428	0,0231	2,0560	
S1-7	655794	13199	0,0201	1850143	2,8212	346194	0,5279	804322	1,2265	4,5957	ausgelassen
S1-8	156140	1710	0,0110	132134	0,8463	31902	0,2043	192708	1,2342	2,2957	2,1634
S1-8	927588	6766	0,0073	1569696	1,6922	350350	0,3777	97772	0,1054	2,1826	
S1-8	1208713	5754	0,0048	1910656	1,5807	374163	0,3096	141268	0,1169	2,0119	

7.4.6 SVAO3-Überexpressions-Klone

Klon	Fläche interner Standard (IS)	Fläche Senecivernin	Senecivernin/IS	Fläche Senecionin	Senecionin/IS	Fläche Integerrimin	Integerrimin/IS	Fläche Senkirkin	Senkirkin/IS	Gesamt-PA/IS	
S3-3	672612	1787	0,0027	210226	0,3126	65659	0,0976	76255	0,1134	0,5262	
S3-4	470109	593	0,0013	63508	0,1351	19339	0,0411	2738	0,0058	0,1833	
S3-5	368997	87	0,0002	4749	0,0129	2434	0,0066	4846	0,0131	0,0328	
S3-5	786720	384	0,0005	58957	0,0749	9173	0,0117	7668	0,0097	0,0968	0,0926
S3-5	1089019	843	0,0008	102683	0,0943	18663	0,0171	39012	0,0358	0,1480	
S3-6	303923	3444	0,0113	138125	0,4545	26352	0,0867	209852	0,6905	1,2430	
S3-6	138617	4736	0,0342	155213	1,1197	25270	0,1823	5978	0,0431	1,3793	1,3112
S3-10	915741	3300	0,0036	496213	0,5419	134211	0,1466	7842	0,0086	0,7006	
S3-10	1254741	9709	0,0077	843702	0,6724	249315	0,1987	93595	0,0746	0,9534	0,8148
S3-10	1244372	4504	0,0036	722393	0,5805	202498	0,1627	54008	0,0434	0,7903	

I) Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Enß, D., Ober, D.: Strategies for identification of a diamine oxidase involved in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. PSE Young Scientists' Meeting Future Trends in Phytochemistry; Bad Herrenalb, 26. – 29. März 2008

Enß, D., Ober, D.: Which one is the right one? Strategies to find the diamine oxidase involved in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis**.** Ph.D. –Kurs "Molecular markers in Plant genetics"; Faculty of Life Sciences - Department of Agricultural Sciences, Plant and Soil Sciences laboratory; Kopenhagen, 28. Januar – 08. Februar 2008

Enß. D., Denker, S., Ober, D.: *in situ* localization of enzymes of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. 125 Years Deutsche Botanische Gesellschaft – Botanikertagung; Hamburg, 03. – 07. September 2007

Enß, D., Ober, D.: *in situ* hybridization: A tool to localize the site of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. 20. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen; Dabringhausen, 27. Februar - 02. März 2007

Enß, D., Ober, D.: *in situ*-Lokalisation von Enzymen der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese. Sektion Pflanzlicher Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft - 5. Vortragstagung; Kaub am Rhein, 01. – 03. Oktober 2006

II) Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum	27. Juni 1979
Geburtsort	Mülheim an der Ruhr
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

06/1985 – 06/1986	Grundschule Kassel-Lohfelden
06/1986 – 06/1989	Grundschule Hannover-Bemerode
08/1989 – 06/1991	Orientierungsstufe Hannover-Bemerode
08/1991 – 06/1998	Gymnasium Schillerschule Hannover, Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Studium:

10/1998 – 05/2004	Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig; Fachbereich Chemie & Pharmazie ▪ Studiengang: Pharmazie ▪ 1.Staatsexamen im März 2002 erfolgreich absolviert ▪ 2.Staatsexamen im Mai 2004 erfolgreich absolviert
23.06.2005	3. Staatsexamen zur Approbation als Apothekerin
08.06.2006	Prüfung zur Diplompharmazeutin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Berufstätigkeit:

09/2005 – 09/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen einer Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Dietrich Ober, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
10/2006 – 09/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen einer Promotion am Botanischen Institut unter der Betreuung von Prof. Dr. Dietrich Ober, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; 05/2008 – 07/2008: Forschungsaufenthalt am VTT Technical Research Centre Finland, Espoo, Finnland
Ab 11/2009	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am VTT Technical Research Centre Finland, Espoo, Finnland