

## 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 Restriktionsendonucleasen .....	26
2.6.8.2 Ligation .....	26
2.6.8.3 Klonierung in pGEM <sup>®</sup> -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	<i>in situ</i> -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 <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	38
2.7.3.1	Klonierung der DNA-Matrices zur Herstellung von RNA-Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	38
2.7.3.2	<i>in vitro</i> -Transkription der RNA-Sonden .....	38
2.7.3.3	Dot-Blot für die Quantifizierung der RNA-Sonden .....	39
2.7.4	Durchführung einer <i>in situ</i> -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 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	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 <i>Hairy Root</i> -Klone.....	52
2.11.1	PCR auf <i>roIB</i> , <i>attB</i> und <i>virD1</i> .....	52
2.11.2	GUS-Test.....	55
2.11.3	Isolierung der Pyrrolizidin-Alkaloide aus den transgenen <i>Senecio vernalis</i> - HR-Klonen .....	55
2.11.3.1	Vorbereitung der transgenen <i>Hairy Root</i> -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 <i>svao1</i> -, <i>svao2</i> - und <i>svao3</i> -Transkripten durch gewebespezifische Northern-Blots.....	65
3.4	<i>In situ</i> -Hybridisierungen zur Lokalisation der HSS in <i>Jacobaea vulgaris</i> und der drei möglichen Diaminoxidasen in <i>Senecio vernalis</i> auf Transkript-Ebene .....	67
3.4.1	Transkriptnachweis der HSS aus <i>Jacobaea vulgaris</i> durch <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	67
3.4.1.1	Klonierung und Synthese der Sonden .....	67
3.4.1.2	<i>In situ</i> -Hybridisierungen .....	70
3.4.2	Transkriptionsnachweis von drei DAOs in <i>Senecio vernalis</i> durch <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	72
3.4.2.1	Klonierung und Synthese der Sonden .....	72
3.4.2.2	<i>In situ</i> -Hybridisierungen .....	75
3.5	Suche nach diaminoxidaseartigen Sequenzen in <i>Jacobaea vulgaris</i> .....	77
3.6	Untersuchungen zum Einfluss von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 auf die PA-Biosynthese mittels transgenen <i>Hairy Root</i> -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 <i>Hairy Root</i> -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 <i>Hairy Root</i> -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 <i>Senecio</i> -HR-Klonen mittels RT-PCR .....	113
3.6.4.3	Analyse der <i>egfp</i> -Transkription mittels PCR.....	125
3.6.5	Analyse der transgenen <i>Nicotiana tabacum</i> -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 <sup>1</sup> 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 <i>Jacobaea vulgaris</i> zur Etablierung der <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	134
4.2.2	Lokalisierung der drei Diaminoxidasen in <i>Senecio vernalis</i> .....	138
4.2.3	Einfluss der Agrobakterien-vermittelten Transformation der Versuchspflanzen 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 <i>Hairy Root</i> -Klone.....	171
7.3.1	<i>Senecio</i> -Kontroll-HR-Klone .....	171
7.3.2	<i>Senecio</i> -SVAO1-RNAi-Klone .....	172
7.3.3	<i>Senecio</i> -SVAO2-RNAi-Klone .....	173
7.3.4	<i>Senecio</i> -SVAO3-RNAi-Klone .....	174
7.3.5	<i>Senecio</i> -SVAO1-Überexpressions-Klone .....	175
7.3.6	<i>Senecio</i> -SVAO3-Überexpressions-Klone .....	176
7.3.7	<i>Senecio</i> -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 <i>Senecio</i> - <i>Hairy Root</i> -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