

Universitätsbibliothek Kiel

850 00 301 191 7



TK
6202

Strategien zur Identifizierung von
Faktoren der
Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

CHRISTIAN SIEVERT

Kiel, 2012

Strategien zur Identifizierung von Faktoren der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

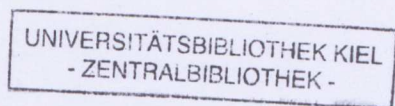
an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

CHRISTIAN SIEVERT

Kiel, 2012



Zusammenfassung

Pyrrolizidinalkaloide (PAs) werden von zahlreichen Arten der Angiospermen als chemische Barriere gegen Herbivorie gebildet. Auf welche Weise sich ein kompletter Stoffwechselweg wie die PA-Biosynthese im Verlauf der Evolution etablieren konnte, ist ein derzeit noch kaum verstandenes Phänomen. Da bis auf die Homospermidin-Synthase (HSS) keine weiteren spezifischen Faktoren der PA-Biosynthese bekannt sind, wurde cDNA codierend für Proteine, die mit der HSS koreguliert werden, durch subtraktive Hybridisierungen angereichert. Im Zuge der Etablierung einer verlässlichen Transkriptquantifizierung wurde cDNA der Haushaltsgene Aktin, Elongationsfaktor-1- α und Ubiquitin von verschiedenen PA-produzierenden Organismen identifiziert. Transkripte dieser Haushaltsgene zeigten bei vergleichenden Analysen einen relativ stabilen Gehalt und wurde daher als Referenz für semiquantitative und quantitative Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktionen verwendet. Mit dem Pflanzenhormon Methyljasmonat wurde versucht, die PA-Biosynthese zu induzieren und anschließend die erhöht exprimierten Gene zu identifizieren. Es ließ sich jedoch keine Induzierbarkeit feststellen. In Blättern der Indischen Sonnenwende (*Heliotropium indicum* L.) wird HSS hochspezifisch in Zellen der unteren Epidermis exprimiert. Diese Zellen wurden daher mithilfe der laserunterstützten Mikrodissektion isoliert und mit Zellen der oberen Epidermis durch subtraktive Hybridisierungen verglichen. Zusätzlich zur Analyse mit zellulärer Auflösung wurden subtraktiv hybridisierte cDNA-Banken aus HSS-exprimierenden Blättern des Echten Beinwells (*Symphytum officinale* L.) und Luftwurzeln der Mondorchidee (*Phalaenopsis amabilis* L.) hergestellt. Durch Pyrosequenzierung der cDNA-Banken wurden 85 322 *Heliotropium*-, 97 217 *Symphytum*- und 20 042 *Phalaenopsis*-Rohsequenzen ermittelt. Mehrere homologe Transkriptfragmente von Kandidatengenomen der PA-Biosynthese, die für Enzyme aus den Proteinfamilien der Diaminoxidasen, Acetohydroxysäure-Synthasen und flavinabhängige Monooxygenasen codieren, wurden nach Sequenzanalysen in den hergestellten cDNA-Banken identifiziert. Einige Diaminoxidasen von *H. indicum* und *S. officinale* werden dabei auf Transkriptebene mit der HSS koreguliert und kommen daher als Kandidaten für eine Homospermidin-Oxidase des PA-Stoffwechsels infrage. Anhand einer phylogenetischen Analyse werden mögliche Szenarien über die Evolution der Diaminoxidasen diskutiert. Mit der Vervollständigung der Kandidatensequenzen wurde begonnen, um sie in künftigen Projekten funktionell charakterisieren zu können.

Abstract

Pyrrrolizidine alkaloids (PAs) are produced by several angiosperm species as part of their chemical defence against herbivory. The first pathway specific enzyme homospermidine synthase (HSS) is a well-studied example for the emergence of a new biochemical activity by a gene duplication event. How the complete PA pathway was realised in some plant families is far from being understood. As no further genes of the PA pathway are known subtracted cDNA libraries were generated for identification of genes coexpressed with *hss*. To get reliable data from transcript quantifications of the non-model organisms under study cDNA of the housekeeping genes actin, elongation factor 1 α and ubiquitin was identified. Transcripts of these genes showed a stable level and have been used therefor as reference for semiquantitative and quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. Inducibility of PA biosynthesis by the plant hormone methyl jasmonate was analysed in order to identify induced genes. Inducibility could not be determined. Specific HSS expression was shown in lower leaf epidermic cells of indian heliotrope (*Heliotropium indicum* L.). These cells were collected via laser capture microdissection and compared with HSS non-expressing upper leaf epidermic cells by constructing a subtracted cDNA library. In addition to the analysis at cellular resolution further subtracted libraries were generated of HSS expressing leaves of comfrey (*Symphytum officinale* L.) and aerial roots of the moon orchid (*Phalaenopsis amabilis* L.). Pyrosequencing runs were done of the libraries and resulted in 85 322 reads of *H. indicum*, 97 217 reads of *S. officinale* and 20 042 reads of *P. amabilis*. Expressed sequence tags of candidate genes for PA biosynthesis belonging to the protein families of diamine oxidases, acetoxyacid synthases and flavin-containing monooxygenases have been identified in the constructed cDNA libraries. Specific diamine oxidases of *H. indicum* and *S. officinale* have been determined as candidates for a homospermidine oxidase of the PA pathway due to their coexpression with HSS at transcriptional level. Possible scenarios for the evolution of diamine oxidases are discussed. For functional characterisations cloning of full-length sequences have been initiated.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Pyrrolizidinalkaloide	2
1.1.1 Struktur und Verbreitung	2
1.1.2 Bioaktivierung und Detoxifizierung	3
1.1.3 Biosynthese	5
1.2 Homospermidin-Synthase	7
1.2.1 Gewebespezifische Expression	7
1.2.2 Molekulare Evolution	8
1.3 Biochemische Ökologie und Evolution der PAs	9
1.4 PA-produzierende Modellpflanzen	11
1.5 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Verwendete Organismen und deren Kultivierung	14
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.2 <i>Phalaenopsis amabilis</i>	15
2.1.3 <i>Cynoglossum officinale</i>	15
2.1.4 <i>Heliotropium indicum</i>	15
2.1.5 <i>Symphytum officinale</i>	16
2.1.6 <i>Eupatorium cannabinum</i>	16
2.1.7 <i>Senecio vernalis</i>	16
2.2 cDNA-Generierung	16
2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA	16
2.2.2 Reverse Transkription	18
2.3 Polymerase-Kettenreaktion	18
2.3.1 DOP-PCR	19
2.3.2 RACE-PCR	20

2.3.3	Quantitative RT-PCR	20
2.4	Klonierung	21
2.4.1	Ligation	21
2.4.2	Transformation	22
2.4.3	Restriktionsanalyse	23
2.4.4	Sequenzierung	23
2.5	Bioinformatische Sequenzanalysen	24
2.5.1	Sequenzvergleiche	24
2.5.2	Berechnung phylogenetischer Distanzen	25
2.6	Induktionsversuche	26
2.6.1	Hormonbehandlung	26
2.6.2	PA-Analytik	26
2.7	Laserunterstützte Mikrodissektion von Blattepidermiszellen	28
2.7.1	Kryosektionierung	28
2.7.2	Mikrodissektion	28
2.7.3	Herstellung von cDNA	29
2.8	Analyse von Gewebeabdrücken	29
2.8.1	Gewebeabdruck	29
2.8.2	Affinitätsreinigung eines spezifischen Antikörpers	30
2.8.3	Immunodetektion	31
2.9	Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken	32
2.9.1	cDNA-Synthese und subtraktive Hybridisierung	32
2.9.2	Klonierung und SANGER-Sequenzierung	33
2.9.3	Pyrosequenzierung	34
2.9.4	<i>Macroarray</i>	35
3	Ergebnisse	38
3.1	Identifizierung von Referenzgenen	38
3.2	Induktionsversuche der PA-Biosynthese durch Methyljasmonat	44
3.2.1	PA-Gehalt	45
3.2.2	Quantifizierung von HSS-codierenden Transkripten	47
3.3	Generierung zellspezifischer cDNA aus <i>H. indicum</i>	49
3.3.1	Epidermisabzug	49
3.3.2	Laserunterstützte Mikrodissektion von Epidermiszellen	50
3.4	Gewebespezifische subtraktive cDNA-Banken	53
3.4.1	Subtraktive cDNA-Bank von <i>H. indicum</i>	56
3.4.2	Subtraktive cDNA-Bank von <i>S. officinale</i>	68
3.4.3	Subtraktive cDNA-Bank von <i>P. amabilis</i>	74

3.5	Identifizierung von Kandidatensequenzen	80
3.5.1	DAOs von <i>H. indicum</i>	80
3.5.2	DAOs von <i>S. officinale</i>	84
3.5.3	Phylogenetische Analyse von identifizierten DAO-codierenden Sequenzen	87
3.5.4	Vorhersage der subzellulären Lokalisation von identifizierten DAO-codierenden Sequenzen	91
3.5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zu identifizierten Kandida- tensequenzen	93
4	Diskussion	94
4.1	Referenzgene für Transkriptquantifizierungen	95
4.2	Induzierbarkeit der PA-Biosynthese	98
4.3	HSS-Expression	100
4.3.1	Zellspezifische Analyse von <i>Heliotropium</i> -Epidermiszellen durch LCM	100
4.3.2	<i>Symphytum</i> -Blätter	102
4.3.3	<i>Phalaenopsis</i> -Wurzeln	103
4.4	Identifizierung von Kandidatengenen	104
4.4.1	Evaluierung der Strategie	104
4.4.2	Putative homospermidinspezifische DAOs	108
4.4.3	Weitere putative Faktoren der PA-Biosynthese	110
4.4.4	Kompartimentierung der PA-Biosynthese	111
4.5	Ausblick	113
	Danksagung	115
	Literaturverzeichnis	144
	Lebenslauf	145
	Erklärung	146
	A Anhang	147

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturtypen von PAs.	2
1.2	Bioaktivierung von PAs.	4
1.3	Schematische Darstellung der PA-Biosynthese.	6
1.4	PA-produzierende Modellpflanzen.	12
3.1	Amplifizierung der Aktin-codierenden cDNA von <i>H. indicum</i>	39
3.2	Phylogenetischer Baum von cDNA-Sequenzen verschiedener Aktin-Homologe.	40
3.3	Phylogenetische Analyse von EF1a-codierenden Sequenzen.	42
3.4	Phylogenetische Analyse von Ubiquitin-codierenden Sequenzen.	43
3.5	Gaschromatografische Analysen von PA-Extrakten aus Wurzelorgan- kulturen von <i>C. officinale</i>	46
3.6	PA-Gehalt in <i>C. officinale</i> nach Methyljasmonat-Behandlung.	47
3.7	sqRT-PCR nach Behandlung mit Methyljasmonat.	48
3.8	Analysen zur Gewebereinheit von Epidermisabzügen.	50
3.9	Laserunterstützte Mikrodisektion (LCM) der Blattepidermis von <i>H. in- dicum</i>	52
3.10	Schematische Darstellung der entstehenden DNA-Hybride während der Generierung einer SSH-Bank.	55
3.11	Amplifizierung von cDNA aus Epidermiszellen.	58
3.12	Analyse der SSH-cDNA-Bank aus der <i>Heliotropium</i> -Blattepidermis.	60
3.13	Exemplarischer <i>Macroarray</i> mit Klonen der SSH-Bank von <i>H. indicum</i>	62
3.14	Kastengrafik zur Evaluierung von <i>Macroarray</i> -Daten.	63
3.15	Häufigkeitsverteilung der <i>Contig</i> -Größen von <i>H. indicum</i>	64
3.16	<i>Alignment</i> HSS-codierender <i>Contig</i> -Sequenzen von <i>H. indicum</i>	65
3.17	Histogramme zur Annotierung von <i>Heliotropium</i> -Sequenzen der SSH- Bank.	67
3.18	Relative Mengen HSS-codierender Transkripte in Blättern von <i>S. of- ficinale</i>	68

3.19	Isolierung der polyadenylierten RNA-Fraktion aus Blättern von <i>S. officinale</i>	69
3.20	Analyse der SSH-Bank aus Blatt-cDNA von <i>S. officinale</i>	70
3.21	Häufigkeitsverteilung von <i>Contig</i> -Größen der SSH-Bank aus <i>S. officinale</i>	72
3.22	Histogramme zur Annotierung von Sequenzen der SSH-cDNA-Bank aus <i>S. officinale</i>	73
3.23	Gewebeabdrücke von <i>Phalaenopsis</i> -Wurzelspitzen.	75
3.24	Analyse der subtraktiven cDNA-Bank aus Wurzelspitzen von <i>P. amabilis</i>	76
3.25	Grafische Darstellung der Anzahl verschiedener <i>Contig</i> -Größen von <i>P. amabilis</i>	78
3.26	Histogramme zur Annotierung von Sequenzen der SSH-cDNA-Bank aus <i>P. amabilis</i>	79
3.27	Vervollständigung eines identifizierten DAO-codierenden cDNA-Fragments von <i>H. indicum</i>	81
3.28	Relative Quantifizierung von DAO-codierenden cDNA-Fragmenten aus <i>H. indicum</i>	83
3.29	Vervollständigung der identifizierten DAO-codierenden cDNA-Fragmente von <i>S. officinale</i>	85
3.30	Relative Quantifizierung von DAO-codierenden cDNA-Fragmenten aus <i>S. officinale</i>	86
3.31	Phylogenie von DAO-codierenden cDNA-Sequenzen.	89
A.1	ACT-Sequenzen.	147
A.2	EF1a-Sequenzen.	149
A.3	UBQ-Sequenzen.	149

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Aktin
AHAS	Acetohydroxysäure-Synthase
BLAST	Suchalgorithmus für lokale Sequenz-Alignments (<i>basic local alignment search tool</i>)
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
C _q	Quantifizierungs-Zyklus (<i>quantification cycle</i>)
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
DAO	Diaminoxidase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DHS	Desoxyhypusin-Synthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOP	degenerierter Oligonukleotid- <i>Primer</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1a	Elongationsfaktor-1- α
eIF5A	eukaryotischer Initiationsfaktor 5A
E _n	Extinktion bei Wellenlänge n
EST	exprimiertes Sequenzfragment (<i>expressed sequence tag</i>)
E-Wert	Erwartungswert
FID	Flammenionisationsdetektor
FMO	flavinabhängige Monooxygenase
FTD	flammenthermoionischer Detektor

GC	Gaschromatograf
GO	Gen-Ontologie
HSS	Homospermidin-Synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
JAZ	Jasmonat-ZIM-Domäne-Protein
LB	Bakterien-Nährmedium mit definierter Zusammensetzung (<i>lysogeny broth</i>)
LCM	laserunterstützte Mikrodisektion (<i>laser capture microdissection</i>)
MPO	Methylputrescinoxidase
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MS	MURASHIGE & SKOOG oder Massenspektrometrie
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRQ	normalisierte relative Quantitäten
NTA	Nitrilotriacetat
PA	Pyrrolizidinalkaloid
PBS-Lösung	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PPFD	Photosynthetische Photonenfluss-Dichte
PVP	Polyvinylpyrrolidon
P-Wert	Wahrscheinlichkeitswert (<i>probability</i> -Wert)
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkription-PCR
RACE	schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
SAGE	serielle Analyse der Genexpression
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFCA	tensidfreies Cellulose-Acetat (<i>surfactant-free cellulose acetate</i>)

SSC-Lösung	salzige Natriumcitrat-Lösung (<i>saline sodium-citrate</i>)
SSH	unterdrückende subtraktive Hybridisierung (<i>suppression subtractive hybridisation</i>)
SOC	optimiertes Bakterien-Nährmedium (<i>super optimal broth</i>)
SOP	PCR mit unterdrückendem Effekt (<i>step-out PCR</i>)
sqRT-PCR	semiquantitative Reverse-Transkription-PCR
STET-Lösung	Saccharose-Triton-X-100-EDTA-Tris-Lösung
TAE-Lösung	Tis-Acetat-EDTA-Lösung
TBS-T-Lösung	Tris-gepufferte, salzige Tween-Lösung (<i>Tris buffered saline Tween</i>)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSP	Matrizen-Wechsel-Primer (<i>template-switch primer</i>)
UBQ	Ubiquitin
UTR	untranslatierte Region
UV/VIS	ultraviolett/sichtbar (<i>ultraviolet/visible</i>)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid

Entsprechend einer verbreiteten Praxis wurden im Folgenden zur besseren Unterscheidung die Bezeichnungen für Proteine mit Großbuchstaben und für Gene mit kleinen kursiven Buchstaben abgekürzt. Der Übersicht halber wurden zum Teil die Abkürzungen für Aminosäure- und Gensequenzen der verschiedenen untersuchten Spezies mit einem entsprechenden Präfix aus dem jeweiligen ersten Buchstaben der Gattungs- und Artbezeichnung ergänzt: zum Beispiel *Hi*HSS für die Homospermidin-Synthase von *Heliotropium indicum* L. Abgesehen von Fachbegriffen wurden gemäß den Empfehlungen des Dudens aus anderen Sprachen entlehene Begriffe mit einer kursiven Schreibweise gekennzeichnet und gemäß der deutschen Rechtschreibung verwendet.

1 Einleitung

In Lebewesen haben sich im Verlauf der Evolution zahlreiche Möglichkeiten entwickelt, um mit der Umwelt effizient interagieren zu können. Während im Tierreich komplexe Verhaltensweisen einen großen Stellenwert haben, übernehmen bei sessil lebenden Organismen wie Pflanzen eine Fülle von chemischen Verbindungen diese Aufgabe. Sie können als Produkte des Sekundärstoffwechsels aufgefasst werden, wenn sie nicht unmittelbar für die Aufrechterhaltung lebensnotwendiger Prozesse essenziell sind.

Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten wird in der Regel durch die konzertierte Expression mehrerer Gene ermöglicht. In der Gattung *Berberis* (Berberidaceae) werden zum Beispiel elf Enzyme benötigt, um aus der Aminosäure Tyrosin das Berberin herzustellen, das erste Alkaloid, für das der komplette Biosyntheseweg aufgeklärt wurde (CROTEAU *et al.* 2000). Für viele andere sekundäre Biosynthesewege sind die verantwortlichen Gene noch unbekannt, weil sie nur punktuell in bestimmten Arten, Gattungen oder Familien vorkommen, von denen keine Genomdaten verfügbar sind. Eine Identifizierung der entsprechenden Gene ist daher mit einem höheren instrumentellen Aufwand verbunden als bei Modellpflanzen mit abgeschlossenen Genomprojekten. Erst mit Kenntnis der genetischen Information ist jedoch eine genaue Rekonstruktion der Evolution möglich. Es ist daher im Detail noch kaum verstanden, welche Prozesse bei der Entstehung sekundärer Stoffwechselwege eine Rolle spielen.

Alkaloide wie Berberin sind eine bestimmte Substanzklasse von Sekundärstoffen. Charakteristisch für Alkaloide ist ihr vereinzelt Auftreten im Pflanzenreich. Es handelt sich in der Regel um Verbindungen mit heterozyklisch gebundenem Stickstoff, die alkalisch reagieren (PELLETIER 1983). Der Name leitet sich vom arabischen Wort *al-quali* ab, das die Pflanze benennt, aus der erstmals Soda gewonnen wurde (KUTCHAN 1995). Pyrrolizidinalkaloide (PAs) sind typische Vertreter dieser Substanzklasse. Zahlreiche Ergebnisse deuten an, dass für deren Biosynthese mehrere Gene nötig sind. Obwohl nur wenig von dem entsprechenden genetischen Code bekannt ist, hat sich das System der PAs in der Vergangenheit bereits zur Erforschung von evolutionären Mechanismen bewährt.

1.1 Pyrrolizidinalkaloide

1.1.1 Struktur und Verbreitung

Über 400 verschiedene PA-Derivate wurden aus etwa 6 000 Pflanzenarten isoliert (CHOU & FU 2006). Mehr als 95% dieser Spezies zählen zu den Pflanzenfamilien Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae und Orchidaceae (LANGEL *et al.* 2011), wobei die Gattung der Sonnenwenden (*Heliotropium*) von HILGER als eigene Familie, die Heliotropiaceae, klassifiziert und nicht mehr zu den Boraginaceae gezählt wird (BÖHLE & HILGER 1997, DIANE *et al.* 2002). Wie von LANGEL *et al.* (2011) in einem Übersichtsartikel zusammengefasst, sind in der Literatur auch vereinzelte Vorkommen von PAs in Spezies der Apocynaceae, Celastraceae, Convolvulaceae, Lamiaceae, Poaceae, Ranunculaceae, Santalaceae und Sapotaceae beschrieben. In Süßgräsern wurden PAs erst 2008 von KOULMAN *et al.* nachgewiesen und kommen dort als Zucker-Konjugate vor. Abgesehen von diesem erst kürzlich identifizierten Poaceae-Typ und Strukturen, die nur in einzelnen Spezies vorkommen, können die PA-Verbindungen einem der in Abbildung 1.1 gezeigten Strukturtypen zugeordnet

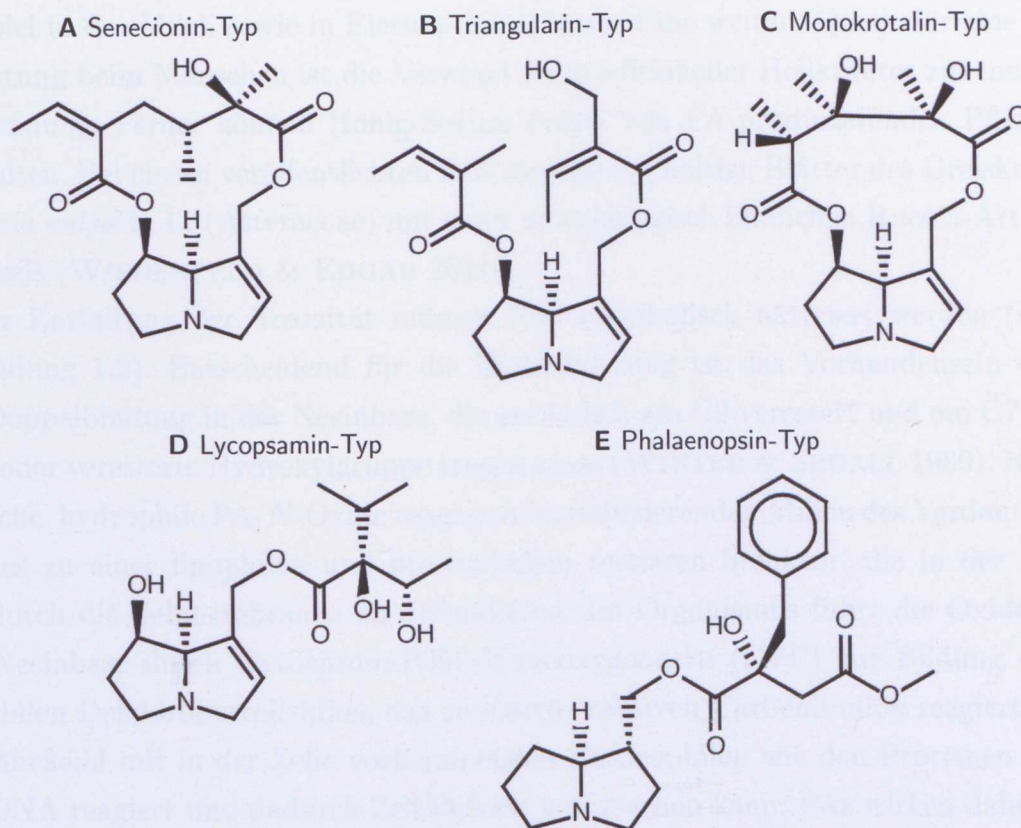


Abbildung 1.1 Strukturtypen von PAs. Eine Klassifizierung von PA-Derivaten ist modifiziert nach LANGEL *et al.* (2011) angegeben. Dargestellt ist jeweils das namensgebende Derivat.

werden.

Allen Derivaten gemeinsam ist ein Grundgerüst aus einem stickstoffhaltigen Bizyklus, der Necinbase, welche mit einer oder auch mehreren Necinsäuren verestert ist; sie werden daher auch Ester-Alkaloide genannt. Gespeichert und transportiert werden PAs meistens in einer polaren und wasserlöslichen *N*-Oxid-Form (EHMKE *et al.* 1988, HARTMANN *et al.* 1989). Ausnahmen sind von Arten der Gattung *Crotalaria* (Fabaceae) bekannt, die in Samen vorwiegend tertiäre PAs speichern (ANJOS *et al.* 2010, CHANG & HARTMANN 1998).

1.1.2 Bioaktivierung und Detoxifizierung

Pyrrolizidinalkaloide gelten als Schutz vor Herbivorie. Zum einen wirken sie vermutlich durch ihren bitteren Geschmack auf viele Pflanzenfresser als Repellent, zum anderen sind ungefähr die Hälfte der bekannten PAs toxisch (CHEN *et al.* 2010). Sie sind verantwortlich für Intoxikationen beim Menschen und dessen Nutztieren, weshalb die Wirkungsweise bei Vertebraten gut untersucht ist. Verwendete Futtermittel wie Heu und Silage beziehungsweise Weiden selbst können mit PA-haltigen Kräutern verunreinigt sein. Dies führt dazu, dass auch in der menschlichen Nahrungskette PAs zum Beispiel in der Milch sowie in Eiern akkumulieren. Eine weitere Quelle für eine PA-Belastung beim Menschen ist die Verwendung traditioneller Heilkräuter zur inneren Anwendung. Ferner können Honig-Sorten Pollen von PA-produzierenden Pflanzen enthalten. Bei einem veröffentlichten Fall wurden PA-haltige Blätter des Greiskrauts *Senecio vulgaris* L. (Asteraceae) mit einer morphologisch ähnlichen Rucola-Art verwechselt (WIEDENFELD & EDGAR 2011).

Zur Entfaltung der Toxizität müssen PAs metabolisch aktiviert werden (siehe Abbildung 1.2). Entscheidend für die Bioaktivierung ist das Vorhandensein einer 1,2-Doppelbindung in der Necinbase, die zusätzlich am C9 verestert und am C7 eine freie oder veresterte Hydroxylgruppe tragen muss (WINTER & SEGALL 1989). Nicht-toxische, hydrophile PA-*N*-Oxide reagieren im reduzierenden Milieu des Verdauungstraktes zu einer lipophilen und pro-toxischen tertiären Struktur, die in der Lage ist, durch die Zellmembranen zu diffundieren. Im Organismus führt die Oxidation der Necinbase durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP) zur Bildung eines instabilen Dehydropyrrolizidins, das zu einem reaktiven Carbeniumion reagiert und anschließend mit in der Zelle vorkommenden Nukleophilen wie den Proteinen oder der DNA reagiert und dadurch Zellschäden verursachen kann. PAs wirken daher ab einer bestimmten Dosis akut zytotoxisch. Darüber hinaus sind sie kanzerogen, sodass eine Population auch bei einer niedrig dosierten, chronischen Belastung durch PAs langfristig geschwächt wird (CHOU *et al.* 2003, FU *et al.* 2004, MATTOCKS & WHITE

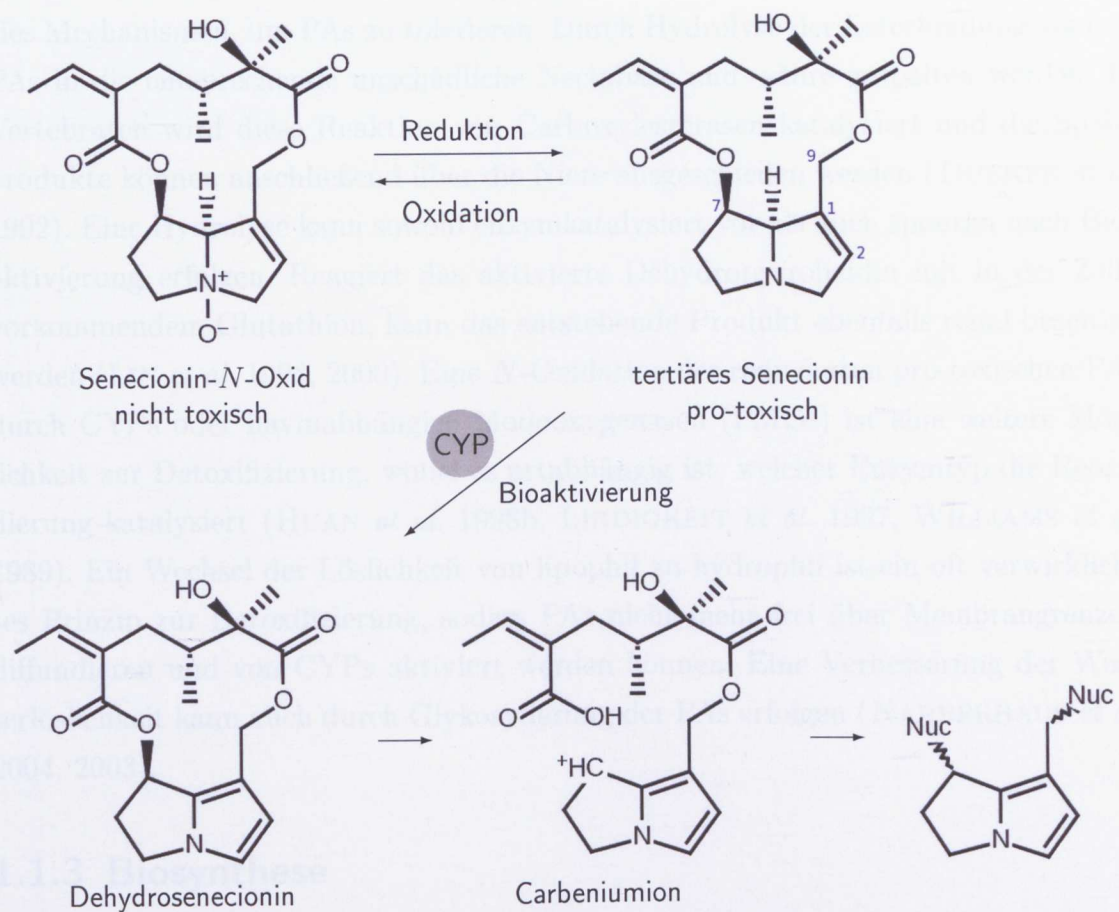


Abbildung 1.2 Bioaktivierung von PAs. Reaktionen, die eine Toxizität von PAs in Vertebraten hervorrufen, sind am Beispiel von Senecionin dargestellt. In Pflanzen werden PAs als hydrophiles *N*-Oxid gespeichert. Im Verdauungstrakt von Herbivoren werden diese in die pro-toxische lipophile Form reduziert und durch mikrosomale Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP), CYP2B und CYP3A, in Leberzellen aktiviert. Das entstehende instabile Dehydrosenecionin, ein Dehydropyrrolizidin, reagiert zu einem reaktiven Carbeniumion, das kovalente Bindungen zu in der Zelle vorhandenen Nucleophilen (Nuc) eingeht. Mögliche Nucleophile sind Wasser, Glutathion, Proteine und DNA. Geändert nach LANGE & OBER (2011).

1971, WANG *et al.* 2005b,c).

Die für die Bioaktivierung verantwortlichen Monooxygenasen CYP2B und CYP3A sind bei Vertebraten in Mikrosomen von Leberzellen anzutreffen und erklären hier die Lebertoxizität der PAs (HUAN *et al.* 1998a, MATTOCKS & WHITE 1971, WANG *et al.* 2005d). Eine Toxizität der PAs für Insekten wurde an der Taufliege *Drosophila melanogaster* MEIGEN und dem Seidenspinner *Philosamia ricini* gezeigt (FREI *et al.* 1992, NARBERHAUS *et al.* 2005). Insekten enthalten ebenfalls CYP-Enzyme für einen xenobiotischen Stoffwechsel, sodass eine Bioaktivierung in dieser Tierklasse vermutlich nach einem ähnlichen Mechanismus abläuft (BRATTSTEN 1992, GLENDINNING 2002, GLENDINNING & SLANSKY 1995, SCOTT *et al.* 1998).

Neben einer Bioaktivierung durch CYP-Enzyme entwickelten sich in diversen Spe-

zies Mechanismen, um PAs zu tolerieren. Durch Hydrolyse der Esterbindung können PAs in die entsprechende unschädliche Necinbase und -säure gespalten werden. In Vertebraten wird diese Reaktion von Carboxylesterasen katalysiert und die Spaltprodukte können anschließend über die Niere ausgeschieden werden (DUEKER *et al.* 1992). Eine Hydrolyse kann sowohl enzymkatalysiert vor als auch spontan nach Bioaktivierung erfolgen. Reagiert das aktivierte Dehydropyrrolizidin mit in der Zelle vorkommendem Glutathion, kann das entstehende Produkt ebenfalls renal beseitigt werden (LIN *et al.* 1998, 2000). Eine *N*-Oxidation der reduzierten pro-toxischen PAs durch CYPs oder flavinabhängige Monooxygenasen (FMOs) ist eine weitere Möglichkeit zur Detoxifizierung, wobei es artabhängig ist, welcher Enzymtyp die Reoxidierung katalysiert (HUAN *et al.* 1998b, LINDIGKEIT *et al.* 1997, WILLIAMS *et al.* 1989). Ein Wechsel der Löslichkeit von lipophil zu hydrophil ist ein oft verwirklichtes Prinzip zur Detoxifizierung, sodass PAs nicht mehr frei über Membrangrenzen diffundieren und von CYPs aktiviert werden können. Eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit kann auch durch Glykosylierung der PAs erfolgen (NARBERHAUS *et al.* 2004, 2003).

1.1.3 Biosynthese

Die Biosynthese von PAs ist irreversibel. Einmal gebildet akkumulieren sie stabil in den Vakuolen pflanzlicher Zellen (FRÖLICH *et al.* 2006, 2007, HARTMANN 2007, HARTMANN & DIERICH 1998). Die erforderlichen Substrate stammen aus dem Aminosäurestoffwechsel, woraus unter anderem der zelluläre Polyaminpool generiert wird (siehe Abb. 1.3). Die Necinbase wird ausgehend von dem Diamin Putrescin und dem Triamin Spermidin gebildet. Beide Polyamine reagieren durch die Katalyse der Homospermidin-Synthase (HSS) zu Homospermidin (BÖTTCHER *et al.* 1993, 1994). Homospermidin wird anschließend auf noch unbekannte Weise zyklisiert, sodass die Necinbase entsteht, welche mit einer oder mehreren Necinsäuren zu einem Makrozyklus verestert wird (ROBINS 1989, SPENSER 1985). Alle aliphatischen Necinsäuren stammen von dem verzweigt-kettigen Aminosäurestoffwechsel ab (HARTMANN & WITTE 1995, WEBER *et al.* 1999).

Die oxidierte Form des PA-Grundgerüsts, das *N*-Oxid, gelangt als Transport- und Speicherform in die verschiedenen Pflanzenorgane (HARTMANN & TOPPEL 1987, HARTMANN *et al.* 1989, WITTE *et al.* 1990). Eine PA-*N*-Oxygenase wurde in Keimlingen von *Crotalaria scassellatii* CHIOV. identifiziert (CHANG & HARTMANN 1998). Protein- und Transkriptsequenzen sind allerdings noch nicht bekannt. PA-*N*-Oxide werden gegebenenfalls weiter chemisch modifiziert, wodurch eine gewebe- und art-spezifische PA-Zusammensetzung generiert wird. Dies umfasst Ein- bis Zweischritt

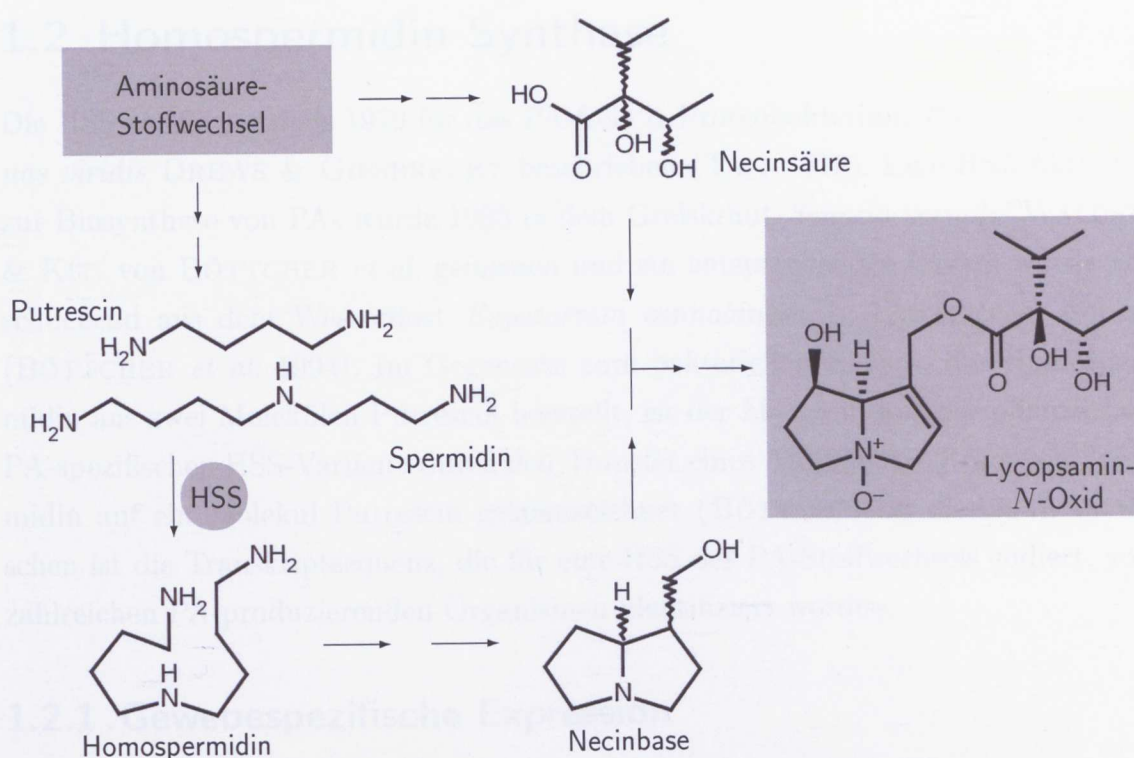


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der PA-Biosynthese. Als Endprodukt ist exemplarisch Lycoposamin-N-Oxid abgebildet. HSS: Homospermidin-Synthase. Geändert nach LANGEL (2008).

Reaktionen wie Hydroxylierungen, Epoxidierungen und *O*-Acetylierungen (HARTMANN 2007, HARTMANN & DIERICH 1998).

Als besonders schützenswertes Gewebe lässt sich in Infloreszenzen der höchste PA-Gehalt messen. In *S. vulgaris* (Asteraceae) akkumulieren 60–80% der PAs in den Blüten, in *H. indicum* (Heliotropiaceae) circa 70% und in *Phalaenopsis amabilis* L. (Orchidaceae) circa 50% (FRÖLICH *et al.* 2006, 2007, HARTMANN & ZIMMER 1986). In Asteraceae-Arten werden PAs von der Wurzel, in der sie synthetisiert werden, über das Phloem im gesamten Pflanzenkormus verteilt (HARTMANN *et al.* 1989). Diese Beobachtungen lassen auf einen selektiven Transportmechanismus schließen, damit sich PAs in entsprechende Gewebe wie in Blüten anreichern können. Dabei wird hierfür vermutlich ein PA-spezifischer Transporter exprimiert, da PA-freie Pflanzen von außen zugeführte PAs nicht translozieren können (HARTMANN *et al.* 1989). EHMKE *et al.* (1988) konnten mit Wurzelorgankulturen von *S. vulgaris* biochemisch eine enzymkatalysierte Transportaktivität von PAs an der Zellmembran und Speicherung in Vakuolen nachweisen. Die Isolierung eines PA-Transporterproteins oder entsprechenden Transkripts steht aber bislang noch aus.

1.2 Homospermidin-Synthase

Die HSS wurde erstmals 1979 für das PA-freie α -Proteobakterium *Rhodopseudomonas viridis* DREWS & GIESBRECHT beschrieben (TAIT 1979). Eine HSS-Aktivität zur Biosynthese von PAs wurde 1993 in dem Greiskraut *Senecio vernalis* WALDST. & KIT. von BÖTTCHER *et al.* gemessen und ein entsprechendes Enzym wurde anschließend aus dem Wasserdost *Eupatorium cannabinum* L. (Asteraceae) isoliert (BÖTTCHER *et al.* 1994). Im Gegensatz zum bakteriellen Enzym, das Homospermidin aus zwei Molekülen Putrescin herstellt, ist der Mechanismus der pflanzlichen PA-spezifischen HSS-Variante durch den Transfer eines Aminobutyl-Rests von Spermidin auf ein Molekül Putrescin gekennzeichnet (BÖTTCHER *et al.* 1994). Inzwischen ist die Transkriptsequenz, die für eine HSS des PA-Stoffwechsels codiert, von zahlreichen PA-produzierenden Organismen identifiziert worden.

1.2.1 Gewebespezifische Expression

Untersuchungen zur Expression der HSS zeigen, dass das Protein abhängig vom Organismus exklusiv in bestimmten Zelltypen vorkommt. In PA-haltigen Spezies der Asteraceae ist eine HSS-Expression auf Wurzeln beschränkt, dort entweder im gesamten Rindenparenchym wie in der Linie der Eupatorieae, zum Beispiel *E. cannabinum*, oder nur in einigen spezialisierten Rindenparenchym- und Endodermiszellen gegenüber des Phloems wie in der Linie der Senecioneae, zum Beispiel *S. vernalis* und *Jacobaea vulgaris* L. (ANKE *et al.* 2004, MOLL *et al.* 2002, NIEMÜLLER *et al.* 2012). In Boraginales-Arten wird neben einer HSS-Expression in Wurzeln auch eine Expression im Spross beobachtet, wobei in *H. indicum* nur das Sprossystem HSS enthält. Hier kann das Protein durch Immunomarkierungen ausschließlich in Epidermiszellen, im Blatt beschränkt auf die untere Epidermis, detektiert werden. In der Hundszunge *Cynoglossum officinale* L. befindet sich die HSS in der Endodermis und im Bereich der Wurzelhaarzone auch im Perizykel. In dem Beinwell *Symphytum officinale* L. wird HSS dagegen in der Wurzel nur in der Endodermis exprimiert. Von *S. officinale* wurde HSS auch in Blättern unterhalb von Infloreszenzen mit noch geschlossenen Blütenknospen detektiert (NIEMÜLLER *et al.* 2012). In der monokotylen Orchidee *P. amabilis* wird neben den Zellen in der Nähe des Apikalmeristems von Luftwurzeln auch eine Expression in Blütenknospen beschrieben (ANKE *et al.* 2008). Neuere Untersuchungen zu PA-produzierenden Spezies der Apocynaceae, *Parsonsia laevigata* (MOON) ALSTON, und Convolvulaceae, *Ipomoea neei* (SPRENG.) O'DONELL und *I. hederifolia* L., zeigen, dass HSS in diesen Vertretern ebenfalls sowohl in der Wurzel als auch im Spross enthalten ist. Von *I. neei*

konnte mittels Immunolokalisierung die Hypodermis der Wurzel als Expressionsort bestimmt werden (KALTENEGGER 2009).

Alle beschriebenen Ergebnisse zur Lokalisation der HSS basieren auf den Nachweis des Proteins. Analysen, ob eine zellspezifische Expression auch für das Transkript gilt, erfolgten bislang noch nicht. Im selben Gewebe, in dem HSS-exprimierende Zellen nachgewiesen wurden, wurde aber stets auch das korrespondierende Transkript detektiert. Entsprechend wurde in Geweben, in denen kein HSS-Protein nachzuweisen war, auch nicht das codierende Transkript detektiert. Dies legt nahe, dass auch das Transkript exklusiv in bestimmten Zellen gebildet wird.

Die PA-Biosynthese korreliert mit dem Wachstum, um einen konstanten PA-Gehalt im Pflanzenkormus zu gewährleisten (FRISCHKNECHT *et al.* 2001). Entsprechend ist die HSS-Expression meistens am stärksten in jungen, sich schnell entwickelnden Geweben. Darüber hinaus wurde eine transiente Expression zeitgleich mit der Entwicklung von reproduktiven Geweben beobachtet (ANKE *et al.* 2008, 2004, MOLL *et al.* 2002, NIEMÜLLER *et al.* 2012).

1.2.2 Molekulare Evolution

Mit Kenntnis der HSS-codierenden Sequenz von *S. vernalis* konnte auch die dazu paraloge Desoxyhypusin-Synthase (DHS) identifiziert werden (OBER & HARTMANN 1999). Die DHS ist in den Reichen Eukarya und Archaea ubiquitär verbreitet und katalysiert die erste von zwei Reaktionen zur posttranslationalen Aktivierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A, CHEN & LIU 1997, PARK *et al.* 1997). In Pflanzen beeinflusst der aktivierte Initiationsfaktor die Samenkeimung, Seneszenz und Apoptose (HOPKINS *et al.* 2007, MOLL *et al.* 2002, THOMPSON *et al.* 2004, WANG *et al.* 2005a).

Die Aminosäuresequenzen der HSS und DHS sind zueinander zu etwa 80 % identisch (OBER & HARTMANN 1999). Neben den Sequenzdaten unterstützen auch die biochemischen Eigenschaften eine phylogenetische Verwandtschaft und deuten eine Entstehung beider Gene durch Duplikation an. Trotz der unterschiedlichen biologischen Funktion katalysieren beide Enzyme verschiedene Reaktionen nach einem ähnlichen Mechanismus, bei dem in einer NAD⁺-abhängigen Reaktion der Aminobutylrest von Spermidin auf ein Substrat übertragen wird. Im Falle der DHS ist das Substrat ein Lysinrest des inaktiven eIF5A-Vorstufenproteins und im Falle der HSS dient Putrescin als Akzeptor. Die DHS kann ebenfalls Putrescin binden und als Nebenreaktion die Bildung von Homospermidin katalysieren. Ein hypothetisches ursprünglicheres Protein war daher vermutlich eine DHS. Nach Genduplikation konnte eine Kopie für eine HSS-Aktivität selektiert werden, sodass infolgedessen die Fähig-

keit, das eIF5A-Vorstufenprotein zu akzeptieren, verloren gegangen ist (OBER & HARTMANN 2000, OBER *et al.* 2003).

Inzwischen sind DHS- und HSS-codierende Sequenzen aus weiteren PA-haltigen Organismen bekannt. Die Transkriptsequenzen weisen darauf hin, dass ein Duplikationsereignis für die Entstehung der HSS mindestens fünfmal unabhängig voneinander während der pflanzlichen Stammesgeschichte eingetreten sein muss (KALTENEGGER 2009, REIMANN *et al.* 2004). Dies weist auf das Vorhandensein von repetitiven Elementen hin, die die Wahrscheinlichkeit für eine Genduplikation durch Crossing-Over und Retroposition erhöhen. Folge von Retroposition sind Pseudogene ohne Introns. In *P. amabilis* konnten mehrere Pseudogene der *hss* identifiziert werden. Introns im funktionellen *hss*-Gen weisen auf eine Duplikation durch Crossing-Over während der Meiose hin (NURHAYATI *et al.* 2009, OBER 2010).

Eine Regulation der HSS hat sich nach Duplikation in den verschiedenen Spezies beziehungsweise Familien äußerst divers entwickelt, wobei immer eine zellspezifische HSS-Expression realisiert wurde (siehe vorheriges Kapitel). Es wird diskutiert, ob dieses zellspezifische Expressionsmuster eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Etablierung der HSS in den zellulären Stoffwechsel ist. Zur Aktivierung von eIF5A müssen sich vier DHS-Monomere zu einem Homotetramer verbinden. Ein leicht verändertes Monomer, wie die HSS, könnte diese Interaktion negativ beeinflussen und das Protein inaktivieren. Erst eine Begrenzung der Expression des einen Duplikats auf einige bestimmte Zellen könnte möglicherweise einen solchen negativen Effekt ausgeschlossen haben. Diese Entwicklungen müssten dann vor Trennung der Boraginales-Arten erfolgt sein, um die artspezifische HSS-Expression erklären zu können (NIEMÜLLER *et al.* 2012, KALTENEGGER 2009).

1.3 Biochemische Ökologie und Evolution der PAs

Trotz der toxischen Wirkung der PAs sind einige Herbivoren an diese Alkaloide angepasst. Einige Vertebraten wie Schafe, Kaninchen, Meerschweinchen, Hamster, Wüstenrennmäuse und Japanische Wachteln vertragen PA-haltige Nahrung und zeigen keine der bekannten Vergiftungserscheinungen. Je nach Relation der toxisierenden CYP-Aktivität und detoxifizierenden Prozesse, wie *N*-Oxidation, Hydrolyse und Glutathion-Konjugation (siehe Kap. 1.1.2) scheint dabei eine Toleranz oder Anfälligkeit gegenüber PAs ausgeprägt zu sein (HUAN *et al.* 1998b,a, MIRANDA *et al.* 1991). Daneben wird auch eine Detoxifizierung von gastrointestinalen Mikroorganismen diskutiert (WACHENHEIM *et al.* 1992).

In einigen Insekten haben sich verschiedene Grade der Adaptation an PAs entwi-

ckelt LANGEL & OBER (2011). Der Schmetterling *Spodoptera littoralis* BOISDUVAL, dessen Larve als Generalist unter anderem PA-haltige Pflanzen als Nahrungsquelle nutzt, kann PAs effizient ausscheiden, sodass keine Bioaktivierung und Intoxikation erfolgt (APLIN & ROTHSCHILD 1972, LINDIGKEIT *et al.* 1997). Eine höhere Stufe der Anpassung erfolgte in der Form, dass einige spezialisierte Insekten dazu befähigt sind, ihrerseits PAs als Schutz vor Prädatoren zu akkumulieren. Der Nachtfalter *Tyria jacobaeae* L., die Heuschrecke *Zonocerus variegatus* L. und einige Schmetterlinge wie *Idea leuconoe* ERICHSON und *Mechanitis polymnia casabranca* HAENSCH reoxidieren reduzierte pro-toxische PAs, sobald diese vom Verdauungstrakt in die Hämolymphe resorbiert wurden. Eine N-Oxidation wird dabei von FMOs katalysiert (APLIN *et al.* 1968, BRÜCKMANN *et al.* 2000, EHMKE *et al.* 1990, LINDIGKEIT *et al.* 1997). In einigen Käfern der Gattung *Platyphora*, *Oreina* und *Longitarsus* werden aufgenommene PAs nicht in der Hämolymphe gespeichert, sondern in spezielle Wehrdrüsen transportiert, aus denen nach einem entsprechenden Reiz PA-haltige Tropfen abgegeben werden. Eine Detoxifizierung erfolgt entweder durch N-Oxidation oder Glykosylierung (HARTMANN *et al.* 1999, 2001, NARBERHAUS *et al.* 2004, 2003, PASTEELS *et al.* 2001). Neben relativ einfachen Reaktionen zur Akkumulation der über die Nahrung aufgenommenen PAs werden diese von Insekten zum Teil umfangreich modifiziert. Die resultierenden Strukturen werden dann als Insekten-PAs bezeichnet (HARTMANN *et al.* 2003a,b). Dieser PA-Typ wird von adulten Männchen einiger Nachtfalter und Schmetterlinge als Pheromon eingesetzt, um Weibchen anzulocken. Dabei werden PAs über die Spermatophore auf das Weibchen übertragen, welches die Eier wiederum zu deren Schutz mit PAs imprägniert. Je größer die aufgenommene PA-Menge des Männchens, desto größer ist daher vermutlich auch der Reproduktionserfolg. Das Beispiel lässt klar den Selektionsvorteil dieser Adaptation erkennen (BEZZERIDES *et al.* 2004, DUSSOURD *et al.* 1989, EISNER & MEINWALD 1995, HARTMANN *et al.* 2004). Da PAs hierbei von einigen Insekten gezielt und nicht zusammen mit der Nahrung aufgenommen werden, wird dieser Vorgang als Pharmakophagie bezeichnet (BOPPRÉ 1984, BREHM *et al.* 2007, BROWN 1984, TRIGO *et al.* 1996a, WELLER *et al.* 1999). Eine Wirksamkeit der PAs in Insekten auf deren Räuber konnte am Beispiel der Spinne *Nephila clavipes* L. gezeigt werden, die gezielt PA-haltige Insekten aus ihrem Netz befreit (BROWN 1984, TRIGO *et al.* 1993, 1996b, VASCONCELLOS-NETO & LEWINSOHN 2008).

In dem Jakobs-Greiskraut, *J. vulgaris*, können mindestens sieben unterschiedliche PA-Derivate gemessen werden (HARTMANN & WITTE 1995). Wie für die PA-Derivate Senecionin und Senkirkin gezeigt wurde, ist die biologische Aktivität sowohl von der Struktur als auch von der Spezies abhängig, auf die das entsprechende De-

riyat wirkt (MACEL *et al.* 2005). Infolgedessen können PAs Generalisten abhalten, aber auch zugleich Spezialisten anlocken (BENTLEY *et al.* 1984, DAM *et al.* 1995, DREYER *et al.* 1985, HÄGELE & ROWELL-RAHIER 2000, MACEL & VRIELING 2003, MACEL *et al.* 2005). Eine heterogene Population von Herbivoren übt daher einen zum Teil entgegengesetzten Selektionsdruck auf verschiedene PA-Derivate aus und könnte die strukturelle Vielfalt dieser Alkaloide erklären (MACEL 2011). Auch ein synergistischer Effekt aller PAs auf Generalisten wird von MACEL in diesem Zusammenhang in Betracht gezogen.

Des Weiteren spielen komplexe Interaktion auf mehreren trophischen Ebenen eine Rolle in der PA-Zusammensetzung. *Jacobaea*-Individuen auf denen die Blattlaus *Aphis jacobaeae* SCHRANK in Symbiose mit der Ameise *Lasius niger* L. lebt, haben einen geringeren PA-Gehalt als Individuen ohne diese Gemeinschaft. Die Ameise verteidigt dabei die Pflanze vor anderen Herbivoren wie *T. jacobaeae* (VRIELING *et al.* 1991). Ohne schützende Ameisen wird die *Aphis*-Population vermutlich durch den Marienkäfer *Coccinella septempunctata* L. reguliert, der ebenfalls an PAs angepasst ist und diese Alkaloide akkumuliert (WITTE *et al.* 1990). Ein ähnliches Phänomen von pflanzenschützenden Ameisen wurde auch von Vertretern der Gattung *Acacia* (Fabaceae) beschrieben. Der pflanzliche Stoffwechsel von Akazien ist an diese Interaktion angepasst, indem ein extrafloraler Nektar zur Anlockung von Ameisen produziert wird (HEIL *et al.* 2004).

Monokotyle *Phalaenopsis*-Arten produzieren dagegen jeweils nur ein bis zwei ungiftige PA-Derivate (HARTMANN & WITTE 1995). Nicht toxische PAs der monokotylen Arten könnten als eine erst kürzlich entwickelte Form interpretiert werden, die noch nicht bis zur Giftigkeit optimiert wurden. Molekulare Daten zur *Phalaenopsis*-HSS weisen aber auf eine frühe Entstehung des Gens hin und sind daher konträr zu diesem Modell. Bestimmte Faktoren könnten stattdessen zur Selektion dieses nicht giftigen PA-Typs geführt haben. Durch die Entdeckung von PAs in Süßgräsern wird außerdem diskutiert, ob PAs möglicherweise einen noch nicht beachteten positiven Einfluss auf die Physiologie der Pflanze haben, sodass die Alkaloide in den von Menschen genutzten Süßgräsern durch Züchtung unwissentlich mit selektiert wurden (KOULMAN *et al.* 2008, NURHAYATI *et al.* 2009).

1.4 PA-produzierende Modellpflanzen

Als Modellpflanzen zur Analyse der PA-Biosynthese eignen sich unter anderem die Pflanzen *H. indicum* (Indische Sonnenwende, Heliotropiaceae), *S. officinale* (Echter Beinwell, Boraginaceae) und *P. amabilis*, (Mondorchidee, Orchidaceae). In Abbil-

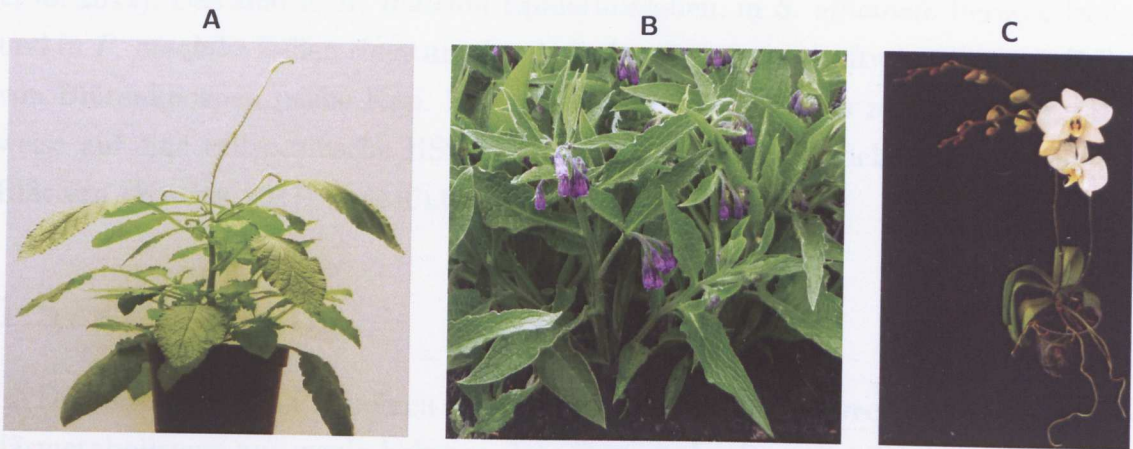


Abbildung 1.4 PA-produzierende Modellpflanzen. (A) *Heliotropium indicum*, (B) *Symphytum officinale*, (C) *Phalaenopsis amabilis*. (A) und (C) sind Gewächshauskulturen und (B) ist eine Freilandpopulation des Botanischen Gartens der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Abbildung 1.4 sind exemplarisch einige Individuen des Botanischen Gartens der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel dargestellt.

H. indicum ist als einjährige Pflanze im asiatischen Raum sowie auf Madagaskar und den vorgelagerten Inseln Mauritius und Rodrigues verbreitet (ROEDER & WIEDENFELD 2011). In der Traditionellen Chinesischen Medizin ist die Pflanze als Heilkraut gegen diverse Symptome bekannt. Extrakte werden sowohl äußerlich als auch innerlich angewendet (ROEDER 2000). In den 70er bis 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde das in dieser Pflanze vorkommende PA-Alkaloid Indicin-*N*-Oxid für die Behandlung von Leukämie und Tumoren in Betracht gezogen (KUGELMAN *et al.* 1976, OHNUMA *et al.* 1982). Wegen der Hepatoxizität wurde diese Therapieform aber nicht weiter verfolgt (COOK *et al.* 1983, LETENDRE *et al.* 1984). Eine Wirksamkeit von *Heliotropium*-Blattextrakten auf die Wundheilung konnte an Ratten gezeigt werden (DASH & MURTHY 2011).

S. officinale ist eine mehrjährige krautige Pflanze, welche in Europa und Asien endemisch ist. Neben einem Gebrauch als traditionelle Heilpflanze wird sie auch als Nahrungsquelle verwendet (ROEDER & WIEDENFELD 2011).

P. amabilis ist eine tropische Orchidee Asiens. Aufgrund der epiphytischen Lebensweise werden Luftwurzeln zur Wasseraufnahme und Substratwurzeln zur Befestigung ausgebildet. Inzwischen existieren zahlreiche Züchtungen mit unterschiedlichen Blüten. Der Wildtyp besitzt weiße Blüten.

In den Boraginales-Arten werden PAs des Lycopsamin-Typs, in *P. amabilis* des Phalaenopsin-Typs gebildet (HARTMANN & WITTE 1995). Dabei konnte in den Geweben, in denen die Biosynthese nachgewiesen wurde, auch HSS-exprimierende Zellen identifiziert werden (ANKE *et al.* 2008, FRÖLICH *et al.* 2006, 2007, NIEMÜLLER

et al. 2012). Das sind in *H. indicum* Epidermiszellen, in *S. officinale* Perizykelzellen und in *P. amabilis* Zellen rings um das Apikalmeristem von Luftwurzeln sowie Zellen von Blütenknospen (siehe Kap. 1.2.1). In *S. officinale* gibt es zusätzlich erste Hinweise auf eine zellspezifische HSS-Expression in der Leitbündelscheide von jungen Blättern (KRUSE 2011, NIEMÜLLER 2007).

1.5 Zielsetzung

Im Detail ist über das Phänomen der Rekrutierung neuer Stoffwechselwege im Sekundärmetabolismus nur wenig bekannt. Das System der Pyrrolizidinalkaloide hat sich in der Vergangenheit bereits zur Erforschung evolutionärer Mechanismen bewährt und bietet die Möglichkeit die Evolution eines Stoffwechselweges auf molekularer Ebene nachzuvollziehen. Die Homospermidin-Synthase ist ein spezifisches und gut untersuchtes Enzym der PA-Biosynthese.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die HSS in bestimmten Zellen hochspezifisch exprimiert wird (siehe Kap. 1.2.1). Um diese Spezifität zu nutzen, soll eine cDNA-Bank aus *H. indicum* hergestellt werden, bei der eine HSS-Expression im Blatt auf Zellen der unteren Epidermis beschränkt ist. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen den Zellen der oberen und unteren Blattepidermis von *H. indicum* ist zu erwarten, dass Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen den beiden Zelltypen nur bestimmte Teile des Stoffwechsels betreffen, so auch die PA-Biosynthese. Daher soll zunächst das Präparieren dieser Zellen durch einen Epidermisabzug und gegebenenfalls durch die sogenannte laserunterstützte Mikrodisektion etabliert und optimiert werden, um ausschließlich Epidermiszellen zu analysieren. Anschließend soll die cDNA von differenziell exprimierten Genen mittels subtraktiver Hybridisierung angereichert und sequenziert werden.

Neben einer zellspezifischen cDNA-Bank von *H. indicum* sollen ergänzend weitere subtraktiv hybridisierte cDNA-Banken aus Geweben mit differenzieller HSS-Expression hergestellt werden. Schließlich sollen die generierten cDNA-Banken als Datenbasis genutzt werden, um Kandidaten zu identifizieren und anschließend deren Funktion für die PA-Biosynthese zu verifizieren.

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Reagenzien und Einwegmaterialien wurden von AppliChem, Fluka, Merck, Roth, Sarstedt oder Sigma-Aldrich bezogen. Wasser wurde mittels des Arium[®] 611 (Sartorius) entionisiert und gefiltert. Das gereinigte Wasser und alle damit gelösten Chemikalien wurden vor der Verwendung 20 min bei 121 °C und 1,1 bar autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Spritzenfilter (Minisart[®] NML, Sartorius) mit einer SFCA-Membran (0,2 µm Porengröße) sterilisiert.

2.1 Verwendete Organismen und deren Kultivierung

Arbeiten mit lebenden Organismen wurden gegebenenfalls in einer Sterilbank vorgenommen, um Kontaminationen mit Schädlingen und exogenem Erbmateriale zu verhindern. Sofern möglich wurden Individuen der verwendeten Arten mit sterilen Nährmedien kultiviert. Abweichungen hiervon sind an entsprechender Stelle vermerkt.

2.1.1 *Escherichia coli*

Der Mikroorganismus *Escherichia coli* (MIGULA) CASTELLANI & CHALMERS wurde nach BERTANI (1951) in *Lysogeny-Broth*-Medium (LB-Medium: 1 % (m/v) NaCl, 1 % (m/v) Trypton, 0,5 % (m/v) Hefeextrakt, pH 7,5) über Nacht bei 37 °C schüttelnd mit 230 rpm kultiviert.

Ein Gemisch verschiedener Klone wurde vereinzelt, indem die Bakterienpopulation mittels eines Drigalski-Spatels plattiert oder mittels einer Impföse ausgestrichen und auf festem LB-Medium inklusive 1,5 % (m/v) Agar bei 37 °C inkubiert wurde. Dauerkulturen von einzelnen Klonen wurden in LB-Medium inklusive 15 % (v/v) Glycerin bei -80 °C gelagert.

2.1.2 *Phalaenopsis amabilis*

Exemplare der Mondorchidee, *Phalaenopsis amabilis* L., wurden von dem Pflanzenzüchter Roellke-Orchideen (Schloss Holte-Stukenbrock) erworben und anschließend im Gewächshaus des Botanischen Gartens der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter tropischen Bedingungen (80–90 % Luftfeuchtigkeit bei 24 °C Tages- und 20 °C Nachttemperatur) kultiviert. Als Substrat wurde Pinien-Rinde verwendet.

2.1.3 *Cynoglossum officinale*

Die Boraginaceae *Cynoglossum officinale* L. (Gewöhnliche Hundszunge) wurde als Wurzelorgankultur eingesetzt und lag bereits als etablierte Linie vor. Eine Vermehrung wurde regelmäßig vorgenommen, indem einzelne Wurzelfäden in frisches Nährmedium umgesetzt wurden. Das flüssige Nährmedium hatte in Anlehnung an MURASHIGE & SKOOG (1962) folgende Zusammensetzung: 8,2 mM NH_4NO_3 , 38 mM KNO_3 , 6 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mM KH_2PO_4 , 2 mM NaFeEDTA, 0,6 mM myo-Inositol, 0,5 mM KI, 10 μM H_3BO_3 , 6 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,8 μM Nikotinsäure, 3 μM Thiamin-Hydrochlorid, 0,5 μM Pyridoxin-Hydrochlorid, pH 6. Die Wurzeln wurden im Dunkeln bei 23 °C schüttelnd (100 rpm) inkubiert.

2.1.4 *Heliotropium indicum*

Die tropische Sonnenwende, *Heliotropium indicum* L., wurde sowohl im Gewächshaus als auch unter axenischen Bedingungen kultiviert. Zur Etablierung einer axenischen Linie wurden zunächst drei Samen zweimal mit 1 ml 35 % (v/v) H_2O_2 (Walter-CMP) 2,5 min inkubiert und anschließend dreimal mit 1 ml Wasser gespült. Zur Nährstoffversorgung wurden die Samen auf einem verdünnten Medium nach MURASHIGE & SKOOG (1962) ausgelegt. Es wurden die gleichen Nährstoffe wie auch für *C. officinale* verwendet, wobei die Mengen, ausgenommen die Eisen- und Magnesiumsalze, angepasst wurden: Von NH_4NO_3 wurde die Hälfte und von allen anderen Komponenten $\frac{1}{10}$ eingesetzt. Zur Verfestigung wurde 1 % (m/v) Agar hinzugefügt. Das Individuum wurde regelmäßig vermehrt, indem unterhalb des Sprossknotens Stecklinge mit mindestens einem Blattpaar abgeschnitten und in frisches Medium transferiert wurden. Die Kultivierung erfolgte in einer Klimakammer bei 23 °C und einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16:8 Stunden, wobei in der Lichtphase eine photosynthetische Photonenfluss-Dichte (PPFD) von mindestens 200–300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gewährleistet wurde.

2.1.5 *Symphytum officinale*

Proben des Echten Beinwells, *Symphytum officinale* L., wurden unter anderem dem Freilandbereich des Botanischen Gartens der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel entnommen. Des Weiteren lag bereits eine etablierte axenische Linie vor, die durch Stecklingsherstellung an den Sprossknoten regelmäßig vermehrt wurde. Zur Nährstoffversorgung wurde das gleiche Medium wie für *C. officinale* verwendet und diesem zur Verfestigung 1 % (m/v) Agar hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte in einer Klimakammer bei 23 °C und circa 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD. Die Tageslänge betrug 16 h und alternierte mit einer achtstündigen Nachtphase.

2.1.6 *Eupatorium cannabinum*

Der Gewöhnliche Wasserdost, *Eupatorium cannabinum* L., wurde ganzjährig im Gewächshaus des Botanischen Gartens der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel kultiviert. Als Substrat wurde Sand verwendet, welcher ständig feucht gehalten wurde, um so den natürlichen Standort zu simulieren. Die Tages- und Nachttemperatur wurde bei 22 °C beziehungsweise 19 °C gehalten.

2.1.7 *Senecio vernalis*

Das Frühlings-Greiskraut, *Senecio vernalis* WALDST. & KIT., wurde als bereits etablierte axenische Kultur analog zu der von *Symphytum officinale* gehalten. Ausgenommen davon war die Konzentration von NH_4NO_3 im Nährmedium, welche nach MURASHIGE & SKOOG (1962) mit 41 mM l^{-1} eingestellt wurde.

2.2 cDNA-Generierung

2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde abhängig vom Gewebe und anschließenden Experimenten entweder durch Extraktion und Präzipitation der Nukleinsäuren mit verschiedenen organischen Lösemitteln oder durch Adsorption an eine Silikamatrix isoliert. Zum Schutz vor Degradation durch RNase-Aktivität wurden alle Arbeiten von der Probenentnahme bis zur Applikation des ersten Extraktionspuffers unter ständiger Kühlung des verwendeten Materials mithilfe von flüssigem Stickstoff durchgeführt.

Zunächst wurde pflanzliches Gewebe mit Mörser und Pistill oder mit einer Schwingmühle MM400 (Retsch) für 2,5 min und einer Frequenz von 30 Schlägen s^{-1} pulveri-

siert. Von dem pulverisierten Material wurden jeweils 10–20 mg zur RNA-Isolierung eingesetzt.

Für die Reinigung an einer Silikamatrix wurde das RNeasy[®]-Mini-Kit von Qiagen verwendet. Dabei wurden weitgehend die Herstellerempfehlungen für Pflanzenmaterial befolgt. Als Extraktionspuffer wurde der RLT-Puffer verwendet. Eine anschließende Inkubation bei 56 °C wurde ausgelassen, um eine Reaktion des Kohlenhydratanteils zu vermeiden, der in Pflanzenzellen stark variieren kann. Eine optionale DNaseI-Behandlung und einminütige Zentrifugation vor der Elution wurde stets vorgenommen. Um die RNA-Konzentration zu erhöhen wurde RNA mit 35 µl Wasser mindestens 5 min lang gelöst, welches zuvor auf 70 °C erwärmt wurde. Dieses Eluat wurde erneut auf die Säule gegeben und der Elutionsvorgang wurde wiederholt.

Wenn durch die Silikamatrix keine ausreichende Reinheit erzielt werden konnte, wurde als alternative Methode Gesamt-RNA nach CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) mit Trizol[®] (Invitrogen) isoliert, das eine Reinigung durch eine Kombination von Phenol und dem chaotropen Salz Guanidinthiocyanat ermöglicht. Es wurde weitgehend nach den Angaben des Herstellers verfahren, jedoch wurden folgende notwendige Optimierungen vorgenommen: Der vorgesehene Reinigungsschritt mit Chloroform wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die gereinigte, präzipitierte Gesamt-RNA wurde in 35 µl Wasser gelöst.

Um genomische DNA zu beseitigen, wurden anschließend 2 µg Gesamt-RNA mit 0,25 u µl⁻¹ DNaseI (Fermentas) und 1 u µl⁻¹ Ribolock[™] (Fermentas) in dem entsprechenden vom Hersteller bereitgestellten DNaseI-Reaktionspuffer 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde durch Zugabe von 2,5 mM EDTA und einer zehnminütigen Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Zur Entfernung der Reaktionskomponenten und weiteren Reinigung der RNA von endogenen Substanzen wurde der Reaktionsansatz einer Lithium-Chlorid-Fällung unterzogen. Zu dem Produkt der DNaseI-Behandlung wurde das 0,5-fache Volumen 6 M LiCl-Lösung gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde anschließend durch eine 30-minütige Zentrifugation mit 12 000 g bei 4 °C präzipitiert und danach zweimal mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschen wurde mit 7 500 g bei 4 °C zentrifugiert und der Alkohol dekantiert. Die RNA wurde 10 min im offenen Reaktionsgefäß getrocknet und mit 12,5 µl Wasser 10 min bei 65 °C gelöst.

Nach der Reinigung wurden mithilfe des NanoDrops[®] ND-1000 (NanoDrop) photometrisch die Extinktionswerte bei 230, 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt und so gleichzeitig die Konzentration und der Grad an Verunreinigung ermittelt. Proben wurden als ausreichend rein bewertet, wenn die Quotienten $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ als Maß für Protein- und Phenolverunreinigungen und $\frac{E_{260}}{E_{230}}$ für Kontaminationen durch Zucker

oder Salze zwischen 1,8 und 2,2 lagen. Zur Überprüfung der Integrität wurden 200 ng Gesamt-RNA in Beladungspuffer (5 % (v/v) Glycerin, 40 mM MOPS, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 1,1 % (v/v) Formaldehyd, 0,25 % (m/v) Bromphenolblau, pH 7) 10 min bei 70 °C denaturiert und durch Elektrophorese in einem Agarosegel (1 % (m/v) Agarose in 40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 40 mM Essigsäure, 5×10^{-3} % (v/v) Roti[®]-Safe GelStain (Roth) oder 5×10^{-5} % (m/v) Ethidiumbromid, pH 8) analysiert. Wenn 18S und 28S rRNA als deutlich getrennte Fragmente im Gel zu sehen waren, wurde eine ausreichende Konservierung der Gesamt-RNA angenommen.

2.2.2 Reverse Transkription

Gesamt-RNA wurde zur Synthese von cDNA verwendet. Hierfür kam eine optimierte Version einer Reversen Transkriptase (RevertAid[™] Premium Reverse Transcriptase, Fermentas) aus dem Murinen Leukämievirus zum Einsatz, die sich durch ein höheres Temperaturoptimum als die native Form auszeichnet. Der Reaktionsansatz mit insgesamt 2 µg gereinigter Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben bei 50 °C 30 min inkubiert. Wenn nicht anders vermerkt, wurde die cDNA-Synthese an Poly-A-Bereichen der RNA mit 5 µM dT17-Oligonukleotiden initiiert (siehe Tab. A.2).

2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zur spezifischen Amplifizierung der cDNA ausgewählter Gene wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierfür wurde die DNA-Polymerase GoTaq[®] (Promega) oder das Enzymgemisch AccuTaq[™] (Sigma-Aldrich) eingesetzt, welches zusätzlich eine Polymerase mit Exonuklease-Aktivität enthält, um falsch eingebaute Nukleotide zu entfernen. Ein 20 µl großer Reaktionsansatz bestand aus dem jeweiligen Reaktionspuffer für die GoTaq[®] oder AccuTaq[™], je 1 µM der verwendeten *Primer* (siehe Tab. A.2), 0,2 mM dNTPs, 0,5 u DNA-Polymerase und 1 bis 2 µl cDNA. Bei PCRs mit der AccuTaq[™] wurden zusätzlich 2 % (v/v) DMSO hinzugefügt. Kontaminationen durch genomische DNA wurden detektiert, indem die gleiche Probe nicht revers transkribiert und für eine PCR verwendet wurde. Zur Überprüfung von exogenen Kontaminationen wurde parallel eine PCR mit Wasser statt cDNA angesetzt.

Für eine exponentielle Amplifizierung wurde die Reaktion mit einem sich zyklisch änderndem Temperaturprofil in einem GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) inkubiert. Im Wesentlichen wurde sich an das vom Hersteller der DNA-Polymerase empfohlene Temperaturprofil gehalten (siehe Tabelle 2.1). Die Zyklen-

Tabelle 2.1 Exemplarische Temperaturprofile für PCRs mit der GoTaq[®] und AccuTaq[™]. Zyklenzahl, Hybridisierungstemperatur und Elongationszeit wurden abhängig von den eingesetzten *Primern* und cDNA-Proben optimiert.

	GoTaq [®]	AccuTaq [™]
initiale Denaturierung	30 s 94 °C	30 s 98 °C
optimierte Anzahl Zyklen:		
Denaturierung	30 s 94 °C	15 s 94 °C
Hybridisierung	optimierte Dauer und Temperatur	
Elongation	1 min kb ⁻¹ 72 °C	20 min 68 °C
finale Elongation	5 min 72 °C	10 min 68 °C

zahl und Temperatur zur *Primer*-Hybridisierung wurden optimiert (siehe Tab. A.2), sodass die PCR noch vor Erreichen der stationären Phase gestoppt und unspezifische Produktbildung minimiert werden konnte. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert und erst in ein PCR-Gerät gestellt, wenn dieses die initiale Denaturierungstemperatur erreicht hatte (*hot start*).

Von PCR-Produkten wurden 5 µl durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Agarosekonzentration im TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 40 mM Essigsäure, pH 8) wurde dabei in Abhängigkeit der erwarteten Amplifikatgröße von 2% (m/v) für Produkte kleiner 200 bp bis 1% (m/v) für Produkte größer 1 000 bp variiert. Zur Färbung der DNA wurde dem Gel 5×10^{-3} % (v/v) Roti[®]-Safe Gel Stain (Roth) oder 5×10^{-5} % (m/v) Ethidiumbromid beigefügt. Reaktionen mit der GoTaq[®]-DNA-Polymerase wurden in einem vom Hersteller bereitgestellten grünem Reaktionspuffer mit erhöhter Dichte durchgeführt, sodass die Reaktionsansätze anschließend direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt werden konnten. Andernfalls wurden DNA-Proben mit einem Beladungspuffer (125 mg ml⁻¹ Ficoll 400, 1,25 mg ml⁻¹ Bromphenolblau, 1,25 mg ml⁻¹ Xylencyanol und 7,3 mg ml⁻¹ EDTA) versetzt. Die Auftrennung erfolgte im TAE-Puffer. Zur Größenabschätzung wurden 0,25 µg der eingesetzten DNA-Standards GeneRuler[™] 100 bp und 1 kb DNA Ladder (Fermentas) im gleichen Puffer wie die Probe gelöst und im Gel getrennt.

2.3.1 DOP-PCR

Zur Amplifizierung von cDNA-Molekülen mit unbekannter Sequenz wurde eine PCR mit degenerierten *Primern* (DOP-PCR) konzipiert. Die *Primer*-Sequenz wurde so gewählt, dass die Oligonukleotide mit einem möglichst konservierten Bereich der cDNA hybridisieren können. Zur Ermittlung eines solchen Bereichs wurden homologe Sequenzen aus der nicht redundanten Proteindatenbank des NCBI's (nr, siehe Tab.

2.2) mit ClustalW2 und den Standardeinstellungen verglichen (LARKIN *et al.* 2007). In Tabelle A.2 sind die verwendeten *Primer*-Sequenzen zusammengefasst.

2.3.2 RACE-PCR

Die Enden von cDNA-Molekülen wurden mithilfe der RACE-PCR kloniert (*rapid amplification of cDNA ends*). Bei dieser Methode findet eine PCR unter Bedingungen statt, die entweder 3'- oder 5'-cDNA-Enden amplifiziert. Für eine 3'-RACE wurde cDNA wie in Kapitel 2.2 beschrieben hergestellt und diese in einer PCR mit einem genspezifischen *Forward-Primer* und dem dT17-*Primer* als *Reverse-Primer* eingesetzt (siehe Tabelle A.2).

Eine 5'-RACE wurde nach MATZ *et al.* (1999) vorgenommen. Hierfür war es notwendig, die verwendete cDNA mit einem sogenannten Matrizen-Wechsel-*Primer* (TSP, *template-switch primer*) zu synthetisieren. Bei der reversen Transkription (siehe Kapitel 2.2.2) wurde daher statt des dT17-*Primers* ein Gemisch aus je 1,2 μM dT25- und TS-*Primer* eingesetzt. Der TS-*Primer* wurde dabei während der Erst-Strang-Synthese mit dem zum 5'-Transkriptende komplementären 3'-Ende der cDNA verbunden. Mit der so hergestellten cDNA wurde zusammen mit einem genspezifischen *Reverse-Primer* und einem *Primer*-Mix, bestehend aus 0,8 μM SOP1 und 4 μM SOP2 (siehe Tab. A.2), eine PCR mit unterdrückendem Effekt durchgeführt (siehe Kap. 2.3). SOP1 und SOP2 können dabei mit dem gebundenen TS-*Primer* hybridisieren. Es wurde mit folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 30 s 94 °C, 35 Zyklen mit 30 s 94 °C, 30 s 68 °C, 3 min 72 °C und einer finalen Elongation für 5 min bei 72 °C.

2.3.3 Quantitative RT-PCR

Zur relativen Quantifizierung einzelner Transkripte beziehungsweise der korrespondierenden cDNA wurde eine quantitative Reverse-Transkription-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Die benötigten PCRs wurden mit dem Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas) angesetzt. Dieses Produkt enthielt unter anderem eine *Hot-Start*-DNA-Polymerase und zwei Fluoreszenzfarbstoffe. Die Signalintensität des einen Farbstoffs, ROX, wurde dabei nicht von der PCR beeinflusst und daher als interner Standard verwendet, um die ermittelten cDNA-Mengen verschiedener Läufe miteinander vergleichen zu können. Mit dem in die DNA-Helix interkalierenden Farbstoff SYBR Green wurde DNA nachgewiesen.

Es wurde abweichend vom Herstellerprotokoll ein 20 μl großes Volumen unter Beibehaltung der empfohlenen Konzentration des Maxima[®]-Mixes pipettiert. Die un-

tersuchte cDNA-Probe lag im Reaktionsansatz in einer finalen 1:1 000 Verdünnung vor und die entsprechenden *Primer* (siehe Tab. A.2) hatten jeweils eine Konzentration von 0,25 μM . Die Reaktion wurde in dem 7300 *Real-Time-PCR*-System von AppliedBiosystems durchgeführt, das eine ROX-Normalisierung zulässt.

Mit einer 15-minütigen initialen Denaturierung bei 95 °C wurde die *Hot-Start*-DNA-Polymerase aktiviert, woran sich 40 Zyklen mit 15 s 95 °C, 30 s 61 °C und 30 s 72 °C pro Zyklus anschlossen. Um *Primer*-Dimere von spezifischen Produkten zu unterscheiden, wurde nach den PCR-Zyklen die Schmelzkurve der amplifizierten DNA bestimmt, indem die Temperatur von 95 °C für 15 s auf 60 °C für 30 s und wieder auf 95 °C für 15 s verändert wurde.

Von jeder Probe wurde mit dreifacher Wiederholung der zur Quantifizierung verwendete Zyklus (C_q) bestimmt, bei dem die gemessene Fluoreszenz stärker als die Hintergrundstrahlung ist, aber die PCRs noch nicht die stationäre Phase erreicht haben. Zur Berechnung der normalisierten relativen Transkriptmengen (NRQ) mit einer Normalisierungsprobe wurde nach LIVAK & SCHMITTGEN (2001) vorgegangen. Gegebenenfalls wurden für eine genauere Normalisierung die relativen Transkriptmengen von mehreren Haushaltsgenen bestimmt. In diesem Fall erfolgten die NRQ-Berechnung und statistische Auswertung nach HELLEMANS *et al.* (2007), wobei eine optimale Amplifizierungsrate mit jedem Zyklus n von 2^n angenommen wurde.

Mit einem t-Test wurde ermittelt, ob sich die Mengen eines Transkripts in den untersuchten cDNA-Proben signifikant unterscheiden. Bei einem Wahrscheinlichkeitswert (P-Wert) kleiner als 0,05 wurden Unterschiede als signifikant bewertet. Zuvor wurde mit einem Shapiro-Test eine erforderliche Normalverteilung und mit einem Levene-Test eine gleichmäßige Varianz der Daten bestätigt. Die Berechnungen erfolgten mit den normalisierten Transkriptmengen.

2.4 Klonierung

2.4.1 Ligation

Zur Ligation von DNA mit einem Klonierungsvektor wurde das pGEM[®]-T-Easy-System von Promega verwendet. Zu diesem Zweck wurden PCR-Produkte aus dem kompletten, verfügbaren Reaktionsvolumen zunächst mithilfe einer Agarosegelelektrophorese der Größe nach getrennt (siehe Kapitel 2.3). DNA-Fragmente, die im Gel die erwartete Größe aufwiesen, wurden mit einem Skalpell herausgeschnitten und durch eine Silikamatrix des NucleoSpin[®]-Extract-II-Kits (Macherey und Nagel) nach Herstellerprotokoll gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit Wasser

bei 70 °C. Das Eluat wurde erneut auf die Säule gegeben und für eine zweite Elution eingesetzt. Eine Ligation der gereinigten DNA mit dem pGEM[®]-T-Easy-Vektor wurde nach Herstellerprotokoll in modifizierter Form vorgenommen, indem von den einzusetzenden Reagenzien die Hälfte verwendet wurde. Zu klonierende DNA wurde in einem molaren Verhältnis von 3:1 mit 25 ng des pGEM-Teasy-Vektors und 1,5 µ T4-DNA-Ligase ligiert. Die Reaktion lief 1 h bei 16 °C ab.

2.4.2 Transformation

Zellen des Bakterienstamms *E. coli* TOP10 (Invitrogen) wurden mit Plasmid-DNA aus Ligationsreaktionen transformiert. Die Kompetenz zur chemischen Transformation wurde im Labor nach COHEN *et al.* (1972) hergestellt. Hierfür wurde ein einzelner Klon in Flüssigmedium vermehrt (siehe Kapitel 2.1.1) bis eine optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge zwischen 0,4 und 0,5 erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Kultur 10 min auf Eis abgekühlt. Durch zehnmütiges Zentrifugieren mit 2 130 g bei 4 °C wurden die darin befindlichen Zellen sedimentiert. Mit dem 0,5-fachen Volumen der Ausgangskultur an eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung wurde das Zellsediment resuspendiert und erneut auf gleiche Weise sedimentiert. Eine finale Resuspendierung wurde mit $\frac{1}{10}$ -Volumen der Ausgangskultur an eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung vorgenommen, die 15 % (v/v) Glycerin enthielt. Nach einer 24 h dauernden Inkubation bei 4 °C wurden Aliquots zu je 100 µl mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zu 100 µl derartig vorbereiteter *E.-coli*-Zellen wurde der komplette Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s unterzogen und erneut auf Eis für 2 min inkubiert. Der Transformationsansatz wurde mit 500 µl SOC-Medium (10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, 2 % (m/v) Trypton, 0,5 % (m/v) Hefeextrakt, pH 7,5) gemischt und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Ein Resistenzgen gegen Ampicillin sowie ein weiterer Selektionsmarker, die β -Galaktosidase, wurden von dem verwendeten Vektor codiert. Zur Vereinzellung und Selektion von erfolgreich transformierten Klonen wurde die Zellsuspension auf LB-Medium in Petrischalen mit 0,24 µg mm⁻² Ampicillin und zur sogenannten Blau-Weiß-Selektion zusätzlich mit 0,47 mg mm⁻² X-Gal und 0,38 mg mm⁻² IPTG plattiert (siehe Kapitel 2.1.1). Da die β -Galaktosidase die Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff katalysiert und klonierte DNA diesen Leserahmen unterbricht, waren positive Klone farblos. Im Gegensatz dazu waren Klone blau, wenn sie mit einem zirkulären Vektor ohne ligierte heterologe DNA-Fragmente transformiert wurden.

2.4.3 Restriktionsanalyse

Plasmid-DNA zufällig gewählter *E.-coli*-Klone wurde für Restriktionsanalysen nach HOLMES & QUIGLEY (1981) isoliert. Einzelne Klone wurden dafür über Nacht in 7 ml LB-Medium mit $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin selektiv vermehrt (siehe Kapitel 2.1.1). Zellen von 1,5 ml dieser Kultur wurden durch Zentrifugieren (1 min mit $14\,100\text{ g}$) geerntet. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellsediment mit $275 \mu\text{l}$ STET-Puffer (8% (m/v) Saccharose, 0,5% (v/v) Triton X-100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert, in das zuvor $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Lysozym gelöst wurde. Nach 3 min bei Raumtemperatur wurde 1,5 min bei 95°C inkubiert. Präzipitierte Zellbestandteile wurden anschließend durch Zentrifugieren (10 min mit $14\,100\text{ g}$) sedimentiert und mit einem Zahnstocher entfernt. Durch Zugabe von $25 \mu\text{l}$ 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung und $250 \mu\text{l}$ Isopropanol wurde die Plasmid-DNA 20 min lang bei 4°C präzipitiert und durch eine zehnminütige Zentrifugation mit $14\,100\text{ g}$ bei 4°C sedimentiert. Nach Waschen der DNA mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol und erneutem Zentrifugieren (5 min, $7\,500\text{ g}$, 4°C) wurde die so gereinigte Plasmid-DNA in $20 \mu\text{l}$ Wasser zusammen mit $10 \mu\text{g}$ RNaseA resuspendiert und 30 min bei 37°C inkubiert.

Die isolierten Plasmide wurden auf Präsenz der ligierten DNA (siehe Kapitel 2.4.1) getestet. Hierfür wurde $0,5 \mu\text{l}$ der Plasmid-Probe mit $0,25 \mu\text{l}$ der FastDigest[®]-Endonuklease *EcoRI* (Fermentas) in einem Reaktionsansatz von $5 \mu\text{l}$ 30 min lang bei 37°C hydrolysiert. Die Größe der entstandenen Fragmente wurde mittels einer Gelelektrophorese ermittelt (siehe Kapitel 2.3), indem das komplette Volumen mit einem 1% (m/v) Agarosegel aufgetrennt wurde. Proben positiver Klone enthielten ein circa 3 kb großes Fragment und mindestens ein weiteres mit entsprechender Größe der klonierten DNA. Gegebenenfalls enthielt dieses Fragment weitere Erkennungssequenzen für die Endonuklease, sodass weitere, kleinere Hydrolyseprodukte entstanden.

2.4.4 Sequenzierung

Plasmide positiver Klone wurden nach SANGER *et al.* (1977) sequenziert. Um hierfür reine Plasmid-DNA ohne chromosomale Verunreinigungen einzusetzen, wurden Flüssigkulturen unter Verwendung von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin hergestellt (siehe Kap. 2.1.1). Zellen aus 5 ml dieser Kultur wurden zur Plasmidextraktion mittels einer Silikamatrix des NucleoSpin[®]-Extract-II-Kits (Macherey und Nagel) genutzt. Die Elution der gereinigten DNA von der Silikamatrix erfolgte mit $30 \mu\text{l}$ Wasser bei 70°C . Das Eluat wurde zur Erhöhung der DNA-Konzentration erneut auf die Säule

gegeben und für eine zweite Elution eingesetzt.

Die Sequenzierung wurde entweder durch die Firma MWG oder die 1. Medizinische Klinik im Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt. Im letzteren Fall wurden 200–300 ng Plasmid-DNA zusammen mit 1,7 μM eines geeigneten *Primers* in einem Gesamtvolumen von 3 μl dem ausführenden Labor bereitgestellt. Zur Firma MWG wurden 1,5 μg an der Luft getrocknete DNA verschickt.

Mit entsprechenden *Primern* (siehe Tab. A.2) wurde ausgehend von dem im Vektor codierten T7-Promotor (T7-F) oder an der Bindestelle für einen M13-R-*Primer* in Richtung Klonierungsstelle sequenziert. Gegebenenfalls wurde ein genspezifischer *Primer* eingesetzt, welcher innerhalb der klonierten DNA hybridisierte.

2.5 Bioinformatische Sequenzanalysen

2.5.1 Sequenzvergleiche

DNA-Sequenzen wurden mithilfe des BLAST-Algorithmus (ALTSCHUL *et al.* 1990), implementiert in dem Programm-Paket BLAST+ des NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/>), unter Standardeinstellungen verglichen. Um ausgehend von einer cDNA-Sequenz Vorhersagen über das codierte Protein machen zu können, wurden homologe Sequenzen in öffentlichen Datenbanken identifiziert (siehe Tab. 2.2). Hierfür wurde ein Grenzwert für den Erwartungs-Wert (E-Wert) gesetzt, sodass *Alignments* mit einem E-Wert $> 10^{-5}$ verworfen wurden.

Eine andere Art der Annotierung nach Gen-Ontologie- (GO) Termen (ASHBURNER *et al.* 2000) erfolgte mit Blast2GO[®] (<http://www.blast2go.com/b2ghome>, CONESA & GÖTZ 2008, GÖTZ *et al.* 2008). Dabei wurden den cDNA-Sequenzen, basierend auf BLASTX-Ergebnissen mit der Swiss-Prot-Datenbank, GO-Terme der GO-Slim-Datenbank für Pflanzen zugeordnet, sodass in einem nächsten Schritt Sequenzen nach bestimmten Enzymklassen annotiert wurden. Für die Berechnungsparameter wurden die Standardeinstellungen des Programms verwendet.

Vergleiche mit der Pfam-Datenbank (siehe Tab. 2.2), die Informationen zu Proteindomänen enthält, wurden mit dem Programm PfamScan und dessen Standardeinstellungen vorgenommen (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/databases/Pfam/Tools/>, FINN *et al.* 2009). Des Weiteren wurden web-basierte Programme zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen benutzt und sind ebenfalls in der Tabelle 2.2 mit der entsprechenden URL angegeben.

2.5.2 Berechnung phylogenetischer Distanzen

Für phylogenetische Analysen von Nukleinsäuresequenzen wurden diese zunächst *in silico* translatiert und mit ClustalW2 (<http://www.clustal.org/download/2.1/>, LARKIN *et al.* 2007) unter Standardeinstellungen verglichen. Die Position und Länge der Lücken im generierten *Alignment* wurden auf das entsprechende Nukleinsäure-*Alignment* übertragen und dieses zur Ermittlung der phylogenetischen Beziehung der Sequenzen zueinander verwendet. Zur Wahl eines geeigneten Evolutionsmodells, das von allen Modellen eine realistische Phylogenie am ehesten rekonstruiert, wurden zunächst die Wahrscheinlichkeiten verschiedener Parameter berechnet. Hierfür wurde das Programm jModelTest (<http://darwin.uvigo.es/software/jmodeltest.html>, POSADA 2008) benutzt, wobei ein Modell nach dem Bayes'schen Informationskriterium gewählt wurde (SCHWARZ 1978). Anschließend wurde ein phylogenetischer Stammbaum mittels der Bayes'schen Inferenz (HUELSENBECK *et al.* 2001, LARGET & SIMON 1999, MAU & NEWTON 1997, MAU *et al.* 1999, RANNALA & YANG 1996)

Tabelle 2.2 Datenbanken und deren URL, die für bioinformatische Analysen verwendet wurden.

Datenbank	URL
Annotierung	
nr	ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/
TrEMBL_plants	ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/taxonomic_divisions/
Swiss-Prot	ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/complete/
Swiss-Prot_plants	ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/taxonomic_divisions/
Phytozome	http://www.phytozome.net/search.php
TAIR10_pep_20101214	ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/blast_datasets/TAIR10_blastsets/
Pfam	ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/databases/Pfam/current_release/
Subzelluläre Lokalisation	
BaCellO	http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/pred.htm
CELLO	http://cello.life.nctu.edu.tw/
PProwler	http://pprowler.itee.uq.edu.au/pprowler_webapp_1-2/
WoLF PSORT	http://wolffpsort.org/
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/

durch das Programm MrBayes (<http://mrbayes.sourceforge.net/>, HUELSENBECK & RONQUIST 2001, RONQUIST & HUELSENBECK 2003) modelliert. Parameter für die gewählte Substitutionsmatrix wurden, wenn sie nicht durch das entsprechende Modell determiniert waren, durch MrBayes geschätzt. Die Berechnung wurde mit so vielen Stammbaumgenerierungen vorgenommen, bis eine adäquate Konvergenz von $< 0,01$ erreicht wurde und das berechnete Verzweigungsmuster als statistisch abgesichert angesehen wurde. Der Konsensus-Stammbaum wurde mit MEGA (<http://www.megasoftware.net/>, TAMURA *et al.* 2011) grafisch dargestellt.

2.6 Induktionsversuche

2.6.1 Hormonbehandlung

Axenische Kulturen verschiedener Versuchspflanzen wurden vier bis sechs Wochen nach dem Umsetzen mit dem Pflanzenhormon Methyljasmonat (Sigma-Aldrich) behandelt, das vor dem Verwenden mit DMSO auf eine 1 M Lösung verdünnt wurde. Zu Wurzelorgankulturen von *C. officinale* wurde nach EL-MAWLA (2010) das Hormon in einer finalen Konzentration von 100 μM direkt in das Nährmedium gegeben. Den Kulturen von *S. officinale* oder *H. indicum* wurde Methyljasmonat in Anlehnung an SHOJI & HASHIMOTO (2011a) über die Gasphase appliziert. Dabei wurden für die circa 600 ml großen Glasgefäße, in denen *H. indicum* kultiviert wurde, 1 ml 100 μM Hormonlösung von einem Stück Watte adsorbiert und dieses zu der Kultur gelegt. Für *S. officinale* wurde aufgrund kleinerer Kulturgefäße die Hälfte eingesetzt.

2.6.2 PA-Analytik

Extraktion

Pyrrolizidinalkaloide wurden in Anlehnung an ENSS (2009) extrahiert. Nötige Zentrifugationsschritte wurden mit 5 230 g durchgeführt. Das zu untersuchende Pflanzenmaterial wurde zunächst mittels einer Schwingmühle MM400 (Retsch) mit 30 Schlägen min^{-1} für 2,5 min pulverisiert. Proben sowie Mahlbecher und -kugeln wurden vorher mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Zur quantitativen Extraktion der PAs wurden 500 mg Pflanzenmaterial zweimal mit 10 ml 0,1 N H_2SO_4 30 min geschüttelt, wobei zur ersten Zugabe der Schwefelsäure 30 μg Retrorsin (Sigma-Aldrich) als interner Standard gegeben wurden. Das Pflanzenmaterial wurde jeweils durch 30-minütiges Zentrifugieren sedimentiert, sodass die Extrakte anschließend dekantiert und zusammengefügt werden konnten. Mit 40 μl 96 % (v/v) H_2SO_4 wurde der pH auf

ein saures Niveau erniedrigt. Durch Zugabe von 100 mg Zink wurden PAs 4 Stunden schüttelnd reduziert und mittels einer zehnmütigen Zentrifugation wurde das Zink wieder aus dem Extrakt entfernt. Anschließend wurde mit 25 % (v/v) Ammoniak auf einen pH-Wert von 11 alkalisiert, sodass PAs durch die Reduktionsschritte schließlich als lipophiles Derivat vorlagen. Um Wasser vollständig zu binden, wurde der Extrakt auf eine Extrelut[®]-Säule gegeben (0,71 g ml⁻¹ Extrakt). Die PAs wurden zweimal mit 20 ml Dichlormethan von der Säule eluiert. Dichlormethan wurde mit einem *pro analysis* Reinheitsgrad (Rotisol[®] Pestilyse[®], Roth) bezogen und vor der Verwendung destilliert. Nach Trocknung an der Luft wurden PAs mit insgesamt 4 ml Methanol sukzessive von der Gefäßwand gelöst und in ein kleineres Gefäß transferiert. Zur Einengung des Volumens wurden die Alkaloide erneut an der Luft getrocknet und in 135 µl Methanol gelöst. Methanol wurde mit GC-geeignetem Reinheitsgrad von Merck verwendet.

Gaschromatografie

Die methanolischen PA-Extrakte wurden mittels eines Gaschromatografen GC-2010 (Shimadzu) analysiert. Die Auftrennungsmethode wurde so eingestellt, dass 1 µl der Lösung bei 250 °C verdampft und $\frac{1}{10}$ des entstandenen Gasvolumens durch eine 15 m lange mit Dimethylpolysiloxan (0,25 µm Schichtdicke) gefüllte Säule (0,25 mm Innendurchmesser, Optima-1-MS, Macherey und Nagel) geleitet wurde. Dabei wurde zur Auftrennung in der Säule folgendes Temperaturprofil eingesetzt: Beginnend bei 70 °C für 3 min wurde die Temperatur mit 6 °C min⁻¹ auf 300 °C angehoben und für 3 min gehalten. Der Druck des Trägergases Helium betrug 140,5 kPa. Die Detektion der isolierten Inhaltsstoffe erfolgte simultan durch einen Flammenionisationsdetektor (FID), welcher kohlenstoffhaltige Verbindungen nachweist, und einen flammthermoionischen Detektor (FTD), welcher ausschließlich phosphor- und stickstoffhaltige Moleküle anzeigt. *Peaks* von stickstoffhaltigen PAs wurden im Chromatogramm des FTDs identifiziert. Die simultan auftretenden Chromatogramm-*Peaks* des Kohlenstoffdetektors wurden zur Quantifizierung der einzelnen Bestandteile automatisiert integriert. Messwerte wurden mittels Retrorsin als interner Standard normalisiert.

Die transformierten Daten wurden mit einem t-Test auf signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe überprüft. Ob eine hierfür erforderliche Normalverteilung sowie gleichmäßige Varianz der Daten vorliegt, wurde mit dem Shapiro- und Levene-Test ermittelt. Eine Signifikanz wurde bei $P < 0,05$ angenommen.

2.7 Laserunterstützte Mikrodissektion von Blattepidermiszellen

2.7.1 Kryosektionierung

Zur Anfertigung von Kryoquerschnitten wurden 2×5 mm große Blattstücke von *H. indicum* in einem Tropfen Tissue-Tek[®] O.C.T.[™]-Einfriermedium (Sakura) auf Objektplatten des Kryotoms CM3050 S (Leica) eingebettet. Das Einfrieren der Präparate erfolgte mithilfe der Schnellgefriereinrichtung des auf -15 °C gekühlten Kryotoms. Alle weiteren Schritte, sollte dies nicht anders vermerkt sein, wurden in dieser Kühlkammer durchgeführt. Nach dem Entfernen überschüssigen Mediums mit einer Rasierklinge wurden 25 µm dicke Querschnitte erzeugt, indem das Kryotommesser vom Schwamm- zum Palisadenparenchym hin geführt wurde. Die Feineinstellung des Gerätes, insbesondere der einzustellende Winkel der Präparate- und Klingenhaltung, wurde so vorgenommen, dass möglichst senkrecht mit einem leicht spitzen Winkel zur Gewebeoberfläche geschnitten wurde. Um zusammenhängende Schnittreihen zu erzeugen, wurde der Abstand des Streckplättchens zum Schneidetisch gegebenenfalls variiert.

Die in einer Reihe angeordneten Querschnitte wurden auf gekühlten Objektträgern fixiert. Hierzu mussten die Objektträger mit dem Daumen kurz angewärmt und mit der unberührten Seite auf die Kryoschnitte gelegt werden, sodass das Einfriermedium kurz auftaute. Anschließend wurden die Präparate wieder zügig auf dem kalten Metall des Schneidetischs eingefroren. Um das Einfriermedium zu entfernen, wurden die Präparate 30 min in 70 % (v/v) Ethanol auf Eis gewaschen. Das Gewebe wurde mit Cresyl-Violett (1 % (m/v) in 50 % (v/v) Ethanol) in der Kryokammer gefärbt. Hierzu wurden die Querschnitte gleichmäßig mit einigen Tropfen der Färbelösung für 1 min überschichtet und durch viermaliges Eintauchen in 70 % (v/v) Ethanol entfärbt. Noch bevor sämtlicher Alkohol verdunsten konnte, wurden die Präparate in mit etwas Silikagel befüllten 50 ml großen Reagenzröhren mit flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert.

2.7.2 Mikrodissektion

Gefriergetrocknete Kryoquerschnitte wurden vor der Mikrodissektion mittels des PALM-MicroBeam-Systems (Zeiss, München) auf Raumtemperatur äquilibriert. Epidermiszellen der Blattober- und -unterseite wurden mit der RoboLPC-Funktion des Gerätes isoliert. Dabei wurde unter Verwendung des 20-fach-Objektives eine Laserenergie von 41 % zum Schneiden und von 49 % zum Katapultieren verwendet.

Mikrodissektate wurden in adhäsive Deckel von 0,5 ml großen Reaktionsgefäßen gesammelt. Nach jeder Mikrodissektionssitzung wurden die isolierten Zellen im Gefäßdeckel mit 25 µl Trizol[®] (Invitrogen) 5 min inkubiert und anschließend 30 s mit 14 100 g zentrifugiert. Das Material wurde bis zur RNA-Präparation bei -80 °C gelagert.

2.7.3 Herstellung von cDNA

Für die geringen Mengen an Probenmaterial, welche mithilfe der LCM-Technik geerntet wurden, wurde zur Extraktion der Gesamt-RNA das Reagenz Trizol[®] (Invitrogen) eingesetzt. Um ein dafür erforderliches Zellvolumen von circa 0,05 mm³ zu erreichen, wurden Einzelproben des gleichen Zelltyps vereinigt. Abweichend vom Hersteller wurde nach KERK *et al.* (2003) vorgegangen. Wesentliche Änderungen zum Herstellerprotokoll beinhalteten eine Reduzierung aller Reagenzien sowie der Einsatz von Glykogen zur Unterstützung der Nukleinsäurefällung, welche anders als bei KERK *et al.* (2003) 30 min bei -20 °C ablief. Die gereinigte RNA wurde in 15 µl Wasser 5 min bei 65 °C resuspendiert und photometrisch mit einem NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop) quantifiziert.

Gesamt-RNA wurde mithilfe des SMARTer[™]-Pico-PCR-cDNA-Synthesis-Kits von Clontech nach Herstellerangaben in cDNA revers transkribiert und anschließend amplifiziert. Dabei wurde die gereinigte cDNA nach der Erst-Strang-Synthese unverdünnt eingesetzt.

2.8 Analyse von Gewebeabdrücken

2.8.1 Gewebeabdruck

Zur Untersuchung der HSS-Expression in Wurzelspitzen von *P. amabilis* wurden Gewebeabdrücke nach CASSAB & VARNER (1987) hergestellt. Proteine wurden dabei an eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-Cextra Lifetechnologies) gebunden, welche zuvor 30 min schüttelnd in 0,2 M CaCl₂-Lösung aktiviert wurde. Nach Lufttrocknung wurden Wurzelspitzen mit einem Skalpell longitudinal halbiert. Gewebeabdrücke wurden gleich darauf durch 30 s langes Andrücken der Schnittfläche auf die Membran hergestellt.

2.8.2 Affinitätsreinigung eines spezifischen Antikörpers

Für einen immunologischen Nachweis der Homospermidin-Synthase wurde ein polyklonaler HSS-spezifischer Antikörper aus Kaninchen-Serum affinitätschromatografisch gereinigt. Die HSS-codierende cDNA von *P. amabilis* lag bereits in einen pET22b-Expressionsvektor kloniert vor. BL21(DE3)-Zellen von *E. coli* (Novagen) wurden mit diesem Vektor transformiert und in Gegenwart von Ampicillin selektiv vermehrt (siehe Kapitel 2.1.1 und 2.4.2). Einer dieser Klone wurde in 100 ml einer Flüssigkultur bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge von 0,6 kultiviert und anschließend durch 1 mM IPTG zur Überexpression der HSS induziert. Nach einer 16-stündigen Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugieren (30 min, 3 700 g, 4 °C) geerntet und mit 3 ml Lysispuffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, pH 8) resuspendiert. Die Zellen wurden 6 min unter Kühlung durch Eiswasser mit einem Sonifier[®] 250 (Branson) homogenisiert. Ultraschall wurde in Intervallen mit 30 % eingestellter Dauer pro Intervall auf Stufe 2 generiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch 20 min Zentrifugieren bei 21 000 g und 4 °C sedimentiert. Der lösliche Proteinextrakt wurde mit 100 µl Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gemischt, das zuvor dreimal mit 1 ml Lysispuffer gewaschen wurde. Hexahistidinmotive wurden während einer einstündigen über Kopf schüttelnden Inkubation bei 4 °C an die Ni²⁺-Ionen gebunden. Nachdem sechsmal mit 1,5 ml Waschpuffer (50 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM Imidazol, pH 8) gewaschen wurde, konnte mit 2,5 ml Elutionspuffer (20 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM Imidazol, pH 8) die gereinigte HSS eluiert werden. Für die Bindung der HSS an eine Sepharosematrix wurde das Protein mit einer PD-10-Säule (GE Healthcare) in Kopplungspuffer (0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃, pH 8,3) umgepuffert. Vor dem Auftragen des Eluats wurde die Säule zunächst mit 50 ml Kopplungspuffer äquilibriert und das Protein mit 3,5 ml Kopplungspuffer eluiert.

Proteine wurden anschließend nach BRADFORD (1976) quantifiziert. Hierzu wurden 20 µl der Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz (0,01 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % (v/v) Ethanol, 8,5 % (m/v) Phosphorsäure) verdünnt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem UV/VIS-Spektrophotometer Ultraspec 2001 Pro (Amersham Bioscience) bestimmt. Die Messwerte wurden durch eine Messreihe mit BSA kalibriert.

Von der gereinigten HSS wurde 1 mg an CNBr-aktivierte Sepharose[™] 4B (GE Healthcare) gekoppelt. Dazu wurde 1 g der Sepharose zunächst mit 5 ml 1 mM HCl gewaschen und gequollen. Da bei dieser Reaktion Blausäure entsteht, wurde dieser Schritt unter einem Abzug durchgeführt. Anschließend wurde die Sepharosematrix mit 3 ml Kopplungspuffer äquilibriert und daran das Antigen durch 4 h langes Über-

Kopf-Schütteln kovalent gebunden. Die Säule wurde anschließend mit Kopplungspuffer gewaschen, bis der Durchlauf eine Extinktion bei 280 nm Wellenlänge von 0,02 aufwies. Freie Protein-Bindungsstellen der Sepharose wurden durch eine einstündige Inkubation mit 4 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) über Kopf schüttelnd blockiert. Die Säule wurde nacheinander mit 10 ml Waschpuffer 1 (0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,8), 10 ml Waschpuffer 2 (0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,8) und 5 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,2) erneut gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend über Nacht mit 4 ml BSA-Lösung (1 mg BSA pro ml PBS) blockiert. Nachdem überschüssiges BSA dreimal mit 5 ml PBS von der Säule gewaschen wurde, wurden 8 ml über Glaswolle filtriertes Serum auf die Säule gegeben und 15 h schüttelnd inkubiert. Die Säule wurde dreimal mit PBS und so lange mit Waschpuffer 2 gewaschen, bis der Durchlauf eine Extinktion bei 280 nm Wellenlänge von unter 0,02 aufwies. Der so gereinigte Antikörper wurde schließlich mit Elutionspuffer (0,2 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 2,8) eluiert und in Fraktionen zu 1 ml in Gefäßen gesammelt, denen 150 µl 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) vorgelegt worden war. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch mit einem NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop) bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und Fraktionen mit einer Extinktion größer als 0,1 wurden vereinigt. Durch Zentrifugieren (11 min bei 4700 g und 4 °C) der Lösung durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa (Amicon[®] Ultra centrifugal filter device, Millipore) wurden die Antikörper konzentriert, bis die Lösung eine Extinktion von 0,85 aufwies. Zum Schutz vor mikrobieller Zersetzung der Antikörper wurden diese mit 0,02 % (v/v) NaN₃ versetzt und zu 30 µl großen Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.8.3 Immunodetektion

HSS-Protein wurde auf Gewebeabdrücken mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper detektiert. Dazu wurden freie Protein-Bindungsstellen der Membran zunächst mit 5 % (m/v) Milchpulver, gelöst in TBS-T (0,8 % (m/v) NaCl, 0,3 % (m/v) Tris-HCl, 0,02 % (m/v) KCl, 0,1 % (v/v) Tween20, pH 8), 1 h lang schüttelnd blockiert. Der HSS-spezifische Antikörper wurde mit frischer Milchpulver-Lösung (5 % (m/v) in TBS-T) 1:5 000 verdünnt und zur Ausbildung spezifischer Bindungen zum Antigen auf der Membran 1 h schüttelnd inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde zweimal durch sechsminütiges Waschen mit TBS-T entfernt. Ein zweiter gegen das Kaninchen-Immunglobulin-G gerichteter Antikörper wurde 1:3 300 mit TBS-T verdünnt und 1 h mit dem Gewebeabdruck geschüttelt. Anschließend wurde überschüssiger Antikörper dreimal mit TBS-T 6 min abgewaschen. Die an den

zweiten Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase wurde verwendet, um Lichtsignale mit dem ECL-Kit Immobilon™ Western (Millipore) nach Herstellerangaben zu erzeugen. Die Signale wurden nach 30 s Exposition von X-Omat AR-Filmen (Kodak) detektiert. Entwicklung und Fixierung der Filme wurden mit den Reagenzien von Tetenal vorgenommen. Eukobrom S/W-Papierentwickler und Superfix Plus-Fixiermittel wurden entsprechend der Herstellerangaben 1:10 verdünnt und jeweils 5 min lang eingesetzt.

Nach immunologischer Auswertung der Gewebeabdrücke wurden die gesamten Proteine auf der Membran mit *Indian-Ink* nach HANCOCK & TSANG (1983) und modifiziert nach OBER (1997) gefärbt, um deren gleichmäßigen Transfer auf die Membran zu überprüfen. Zunächst wurden die Proteine mit 0,2 M NaOH 5 min lang denaturiert. Nachdem die Natronlauge mit TBS-T abgespült wurde, wurde die Membran zweimal für 10 min in TBS-T gewaschen. Das Waschen sowie alle weiteren Inkubationen wurden schüttelnd durchgeführt. Zur Färbung wurde für 1 h in *Indian-Ink*-Lösung (0,1 % (v/v) Fount India-Tinte (Pelikan) und 1 % (v/v) Essig in TBS-T) inkubiert. Um überschüssige Tinte zu entfernen, wurde die Membran 15 min mit Wasser gewaschen, welches mehrmals ausgewechselt wurde. Anschließend wurde die Membran an der Luft getrocknet.

2.9 Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken

2.9.1 cDNA-Synthese und subtraktive Hybridisierung

Subtraktive cDNA-Banken (SSH-cDNA-Banken) wurden mithilfe des PCR-select™-cDNA-Subtraction-Kits (Clontech) hergestellt. Dabei wurde jeweils ein Transkript untersucht, in dem HSS-codierende Transkripte detektiert wurden. Die entsprechende cDNA wurde subtraktiv mit cDNA hybridisiert, in der HSS-codierende Transkripte nicht nachweisbar waren. Das vom Hersteller empfohlene Verfahren wurde durch folgend beschriebene Modifikationen ergänzt.

Gesamt-RNA wurde durch Bindung an eine Silikamatrix des RNeasy®-Midi-Kits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll für pflanzliches Gewebe isoliert. Eine optionale Inkubation bei 56 °C zur Extraktion wurde ausgelassen. Eine DNaseI-Behandlung wurde vorgenommen. Die Gesamt-RNA wurde mit 35 µl 70 °C warmem Wasser eluiert, wobei das erste Eluat für eine zweite Elution eingesetzt wurde, um die Konzentration zu erhöhen. Eine RNA-Isolierung aus einzelnen Zellen und eine anschließende cDNA-Synthese wurde wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben durchgeführt.

Aus der Gesamt-RNA wurde mRNA mittels des Oligotex®-Kits (Qiagen) angerei-

chert. Eine Anreicherung wurde dabei durch eine Hybridisierung der Poly-A-Bereiche an Oligonukleotide aus Desoxythymidinen erreicht, welche an Latex-Nanopartikel kovalent gebunden waren. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

Wenn die erforderliche mRNA-Menge von 2 µg nicht isoliert werden konnte, wurde cDNA unter Zuhilfenahme des SMARTer™-Pico-PCR-cDNA-Synthesis-Kits (Clontech) amplifiziert. Dabei wurde sich an das Herstellerprotokoll für eine anschließende subtraktive Hybridisierung gehalten und alle Angaben bis zur Restriktion durch die Endonuklease *RsaI* eingehalten. Nach der Restriktion wurde die DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, wie sie im PCR-select™-cDNA-Subtraction-Kit angegeben ist. Die Volumina wurden entsprechend des durch die Amplifizierung bedingten größeren Reaktionsvolumens angepasst. Vor Beginn der Extraktion wurden 20 µg Glykogen hinzugefügt. Anschließend wurde die DNA mit 400 µl einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung und ein zweites Mal mit 400 µl einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung extrahiert. Eine Phasentrennung nach den Extraktionsschritten erfolgte durch Zentrifugieren (10 min, 13 100 g). Jeweils die obere wässrige Phase wurde weiterverwendet. Mit 115 µl 7,5 M NH₄-Acetat-Lösung und 1,5 ml 100 % (v/v) Ethanol wurde die DNA präzipitiert und durch eine zehninminütige Zentrifugation mit 13 100 g sedimentiert. Das entstandene Präzipitat wurde mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und, um das Ethanol durch Dekantieren entfernen zu können, 5 min mit 13 100 g zentrifugiert. Nach Lufttrocknung wurde die gereinigte DNA in 6 µl Wasser resuspendiert. Davon wurden 0,6 µl 1:10 verdünnt, um damit die DNA mit einem NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop) zu quantifizieren und gelelektrophoretisch zu analysieren (siehe Kapitel 2.3).

Alle weiteren Schritte wurden nach Bedienungsanleitung des Kits zur Subtraktion vorgenommen. Eine abschließende Amplifizierung durch zwei aufeinanderfolgende PCRs erfolgte nach der subtraktiven Hybridisierung, wobei die erste PCR mit 27 Zyklen und mit den 1:10 verdünnten Produkten der ersten PCR eine zweite *nested* PCR mit 10 Zyklen durchgeführt wurde.

2.9.2 Klonierung und Sanger-Sequenzierung

Zur Klonierung von SSH-Banken wurden die doppelsträngigen cDNA-Fragmente mithilfe einer Silikamatrix des NucleoSpin®-Extract-II-Kits (Macherey und Nagel) nach Herstellerprotokoll gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte zweimal mit 25 µl Wasser bei 70 °C, wobei das erste Eluat für eine zweite Elution eingesetzt wurde.

Um die DNA-Enden mit Desoxyadenosin zu versehen, wurden 250 ng cDNA mit 1,5 µl GoTaq® (Promega), 2,5 µl des von der Firma bereitgestellten Reaktionspuffers und 0,2 mM dATP 30 min bei 70 °C inkubiert. Die so vorbereitete DNA wurde mit

dem pGEM[®]-T-Easy-Vektor (Promega) in einem molaren Verhältnis von 3:1 ligiert. Damit auch cDNA-Fragmente dieser Größe in ausreichender Zahl vorhanden sind, wurde zur Berechnung eine Größe von 1 kb angenommen. Das Herstellerprotokoll wurde wie folgt modifiziert: Für die Reaktion wurde das angegebene Reaktionsvolumen halbiert und für eine maximale Anzahl an ligierten DNA-Enden wurde der Ansatz 1 h bei 16 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben wurden die Produkte in Zellen des *E.-coli*-Stamms TOP10 transformiert. Nach Plattieren der gesamten Zellsuspension wurden positive, weiße Klone in Mikrotiterplatten mit 96 Gefäßen einzeln in 100 µl LB-Medium inklusive Ampicillin über Nacht schüttelnd (200 rpm) vermehrt. Eine Langzeitlagerung erfolgte als Dauerkultur bei -80 °C (siehe Kapitel 2.1.1).

Klone der SSH-Bank wurden zur Plasmidpräparation und anschließenden Sequenzierung nach SANGER *et al.* (1977) durch LGC Genomics oder der 1. Medizinischen Klinik im Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in jeweils 96 Probenbehältern einer Mikrotiterplatte vermehrt. Im ersten Fall wurden Klone auf festem LB-Medium mit 1,5 % (m/v) Agar über Nacht oder für das Klinikum in 1,25 ml Flüssigmedium für 24 h kultiviert. Bei beiden Varianten wurde mit 50 µg ml⁻¹ Ampicillin selektiert. Plasmide wurden mit dem T7-F-*Primer* (siehe Tab. A.2) sequenziert.

Sequenzen wurden von den ausführenden Laboratorien im ABI-Format zur Verfügung gestellt. Das Programm Phred (<http://www.phrap.com/>, EWING & GREEN 1998, EWING *et al.* 1998) wurde mit Standardeinstellungen verwendet, um aus den ABI-Dateien FASTA-formatierte Sequenzdateien und die dazugehörigen Qualitätswerte zu generieren. Anschließend wurden die Rohsequenzen unter Einbeziehung der Qualitätswerte mit dem Computerprogramm SeqClean (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/>) und dessen Voreinstellungen bearbeitet, um Adaptersequenzen der subtraktiven Hybridisierung, Poly-A-Bereiche und Sequenzen mit niedriger Qualität zu entfernen.

2.9.3 Pyrosequenzierung

SSH-cDNA wurde durch MWG mit einem GS-FLX-System-Sequenzierer und den GS-FLX-Titanium-Reagenzien (Roche) pyrosequenziert. Die Größe der DNA wurde dabei eingeschränkt, indem die SSH-cDNA über ein Agarosegel nach Größe getrennt wurde (siehe 2.3) und daraus ausschließlich DNA, welche zwischen 50 und 750 bp groß war, mithilfe des NucleoSpin[®]-Extract-II-*Kits* (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben extrahiert wurde. Von der Silikamatrix wurde DNA mit 50 µl 70 °C warmen Wasser eluiert und das Eluat wurde danach für eine zweite Elution einge-

setzt. Nach Quantifizierung mit einem NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop) wurden 5 µg DNA versendet und zur Generierung von 80 000 bis 100 000 Sequenzen durch Emulsions-PCRs in $\frac{1}{8}$ der Behälter einer Picotiterplatte verwendet.

Rohsequenzen aus einer Pyrosequenzierung und deren Qualitätswerte wurden von der Firma MWG in einer FASTA-formatierten Datei bereitgestellt, wobei die Adaptersequenzen der Sequenzierungsreaktion von der ausführenden Firma bereits entfernt wurden. Zunächst wurden Sequenzen durch SnoWhite (<http://evopipes.net/snowwhite.html>, BARKER *et al.* 2010) modifiziert. Abweichend von den Standardeinstellungen wurden weniger als 70 nt umfassende Sequenzen von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Adaptersequenzen der subtraktiven Hybridisierung sowie Poly-A-Bereiche, welche mindestens 20 aufeinanderfolgende Adenosine innerhalb der Sequenz aufwiesen und bis zu 25 nt hinter den 5'- beziehungsweise 3'-Enden anfangen, wurden entfernt. Eine Analyse mit TagDust (<http://genome.gsc.riken.jp/osc/english/software/src/tagdust.tgz>, LASSMANN *et al.* 2009) zur Eliminierung von *Primer*-Dimersequenzen wurde durchgeführt. Danach noch vorhandene Adaptersequenzen wurden mit SSAHA2 (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub4/resources/software/ssaha2/>, NING *et al.* 2001) entfernt. Dabei wurde das Programm mit den Optionen verwendet, wie sie nach der Bedienungsanleitung für das Programm MIRA empfohlen werden. Die Befehlszeile zum Aufruf des Programms wurde daher in einer UNIX-Umgebung wie folgt formuliert: `ssaha2 -kmer 8 -skip 1 -seeds 1 -score 12 -cmatch 9 -ckmer 6 -output ssaha2 [Adaptersequenzen] [Rohsequenzen] >[Zieldatei]`.

Die so modifizierten Rohsequenzen wurden mit den Programmen MIRA (http://chevreux.org/projects_mira.html, CHEVREUX *et al.* 1999) oder PAVE (<http://www.agcol.arizona.edu/software/pave/>, SODERLUND *et al.* 2009) zusammengefügt. Nach SANGER *et al.* (1977) generierte Sequenzen (siehe Kapitel 2.9.2) wurden in die Berechnung einbezogen. MIRA wurde dabei mit Optionen durchgeführt, um Chimären-Sequenzen zu identifizieren und nur einmal vorhandene Sequenzen nicht auszusortieren. Gegebenenfalls wurde die Stringenz erniedrigt, indem keine Extra-Strafpunkte für Lücken im *Alignment* verteilt wurden und die für ein Zusammenfügen akzeptierte minimale Identität zwischen zwei Sequenzen verringert wurde. PAVE wurde mit den Standardeinstellungen ausgeführt.

2.9.4 *Macroarray*

Subtrahierte cDNA wurde mittels eines sogenannten *Macroarrays* analysiert, um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren. Als Sonden wurde SSH-cDNA und die cDNA einer invers durchgeführten Subtraktion eingesetzt, in der die gleichen

Ausgangspalten umgekehrt subtraktiv hybridisiert wurden.

Sonden-Generierung

Zur Sondenherstellung wurde die SSH-cDNA wie zur Klonierung gereinigt (siehe Kap. 2.9.2) und radioaktiv mit [α - 32 P]dCTP nach den Herstellerempfehlungen der verwendeten *Kits* markiert. Die Markierung wurde mit 100 ng DNA und dem DecaLabelTM-DNA-Labeling-*Kit* (Fermentas) vorgenommen. Nicht gebundene dNTPs wurden anschließend mit illustraTM MicroSpinTM G-25 Columns (GE Healthcare) entfernt. Die Radioaktivität der gereinigten Sonde wurde ermittelt, indem 1 μ l der 1:100 verdünnten Sonde mit 2,5 ml eines Scintillators (Optiphase HiSafe 3, PerkinElmer) vermischt wurde und die generierten Lichtsignale mit einem WinSpectralTM 1414 Liquid Scintillation Counter (Wallac) detektiert wurden.

Koloniehybridisierung

Klone der SSH-Bank wurden mit einer radioaktiven Sonde markiert. Ein Tropfen der als Dauerkultur vorliegenden Klone wurde mit einem Replikator in Mikrotiterplattengröße gleichmäßig auf eine Nylon-Membran (Hybond-NXTM, GE Healthcare) transferiert. Die Membran wurde auf festem LB-Medium in quadratische Petrischalen mit 0,24 μ g mm⁻² Ampicillin gelegt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde die Membran nacheinander je 4 min mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5) behandelt. Dafür wurde WhatmanTM-Papier mit den entsprechenden Lösungen befeuchtet und darauf die Membran gelegt. Durch 2 h Backen bei 80 °C wurde die DNA an der Membran fixiert.

Zur Hybridisierung der Plasmid-DNA mit DNA-Sonden wurde die Membran nacheinander mit einer SSC-Salzlösung (150 mM NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat-Dihydrat, pH 7) verschiedener Molarität und Zusätze behandelt. Zunächst wurde pro Membran 7,5 ml Hybridisierungslösung (5-fach konzentrierte SSC, 0,1 % Ficoll (m/v) 400 000, 0,1 % (m/v) PVP-10, 0,1 % (m/v) BSA, 0,5 % (m/v) SDS) hergestellt und zum Blockieren mit 1,5 mg DNA aus Fisch-Sperma (Serva) und je 2 nmol vier verschiedener Oligonukleotide versetzt, welche vor Gebrauch durch eine fünfminütige Inkubation bei 95 °C denaturiert wurden. Die Sequenzen der Oligonukleotide glichen den Adaptersequenzen der SSH-cDNA und deren Komplement. Die Wahrscheinlichkeit für auftretende Adapterhybridisierungen zwischen der SSH-cDNA der Klone und der Sonde wurde so verringert. Die Membran wurde 1 h blockiert. Anschließend wurde 10⁷ cpm frisch denaturierte Sonde hinzugegeben und über Nacht hybridisiert. Blockierung und Sondenhybridisierung fanden in einem Hybridisierungssofen (HERAhy-

brid, Thermo Scientific) bei 72 °C statt. Am nächsten Tag wurde die Membran jeweils 20 min mit 100 ml Waschlösung pro Membran in einer Metallbox in einem 68 °C warmen Schüttelwasserbad (Typ 1083, GFL) mit steigender Stringenz gewaschen. Die Waschlösungen enthielten 0,5 % (m/v) SDS und SSC in abnehmender Konzentration. Zweimal wurde mit 2-fach konzentrierter SSC, zweimal mit einfach konzentrierter SSC und zweimal mit 1:10 verdünnter SSC gewaschen.

Radioaktive Signale der gebundenen Sonde wurden mit einem wiederbeschreibbaren Film (Imaging-Plate BAS-IP MS 2025, Fujifilm) für 72 h detektiert und von dort mit einem Image Reader FLA-5000 (Fujifilm) bei 635 nm Wellenlänge und einer 50 µm großen Auflösung digitalisiert. Zur densitometrischen Quantifizierung wurde mit dem Programm AlphaEase[®] FC (AlphaInnotech Corporation) die integrierte Punktdichte der Signale von einer bei allen Messpunkten gleich groß definierten Fläche bestimmt. Daten wurden mit denen von UBQ-codierenden Fragmenten normalisiert und in Relation zu den Messwerten der Koloniehybridisierung mit der revers subtrahierten cDNA gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von Referenzgenen

Zur Identifizierung weiterer Faktoren der PA-Biosynthese wurde auf transkriptioneller Ebene untersucht, welche Gene mit dem *hss*-Gen koreguliert sind. Bis auf rRNA-Gene der Sonnenwende existierten von PA-produzierenden Organismen keine weiteren Sequenzdaten, die sich als interner Standard für Transkriptquantifizierungen mittels semiquantitativer oder quantitativer RT-PCR nutzen ließen. Damit diese Art der Expressionsanalyse auch für die untersuchten PA-haltigen Pflanzen anwendbar ist, wurden Transkriptfragmente von verschiedenen Haushaltsgenen identifiziert.

Zur Identifizierung eines ACT-codierenden Transkripts von *H. indicum*, wurde zunächst Gesamt-RNA aus Blattgewebe extrahiert (siehe Kap. 2.2.1). Abbildung 3.1 zeigt die Auftrennung in einem Agarosegel. Eine Degradierung der RNA durch RNasen ist auf diese Weise nicht erkennbar. Gesamt-RNA wurde daraufhin zur Synthese von cDNA mit der SuperScriptII™ von Invitrogen und der dafür vorgesehenen Reaktionstemperatur eingesetzt (siehe Kap. 2.2.2), sodass eine Matrize für nachfolgende PCRs generiert wurde.

Um eine PCR mit einem cDNA-Molekül unbekannter Sequenz zu initiieren, wurden degenerierte *Primer* benutzt (siehe Kap. 2.3.1), die entsprechend des degenerierten Codes (NC-IUB 1985) aus einem Gemisch von Oligonukleotiden mit unterschiedlicher Nukleotidzusammensetzung bestehen. Zur Ermittlung der degenerierten *Primer*-Sequenz wurden ACT-homologe Sequenzen aus der nicht redundanten Proteinindatenbank (nr, siehe Tab. 2.2) des NCBI verglichen (siehe Kapitel 2.5.2). Ein Sequenz-*Alignment* ist im Anhang dargestellt (siehe Abb. A.1). Positionen mit gleichen Aminosäuren unter allen verglichenen Sequenzen sind grau schattiert und stellen konservierte Bereiche dar. Konservierte Sequenzabschnitte, mit denen *Primer*-Sequenzen erzeugt wurden, sind blau unterlegt. Charakteristisch für diese den degenerierten *Primern* entsprechenden Bereiche ist eine im Vergleich zur restlichen Sequenz größere Anzahl von Aminosäuren, die von maximal zwei verschiedenen Codon-Triplets codiert werden. So kommen in den 14 verwendeten *Alignment*-Positionen nur vier vor, in denen mehr als zwei verschiedene Codon-Triplets möglich sind. Me-

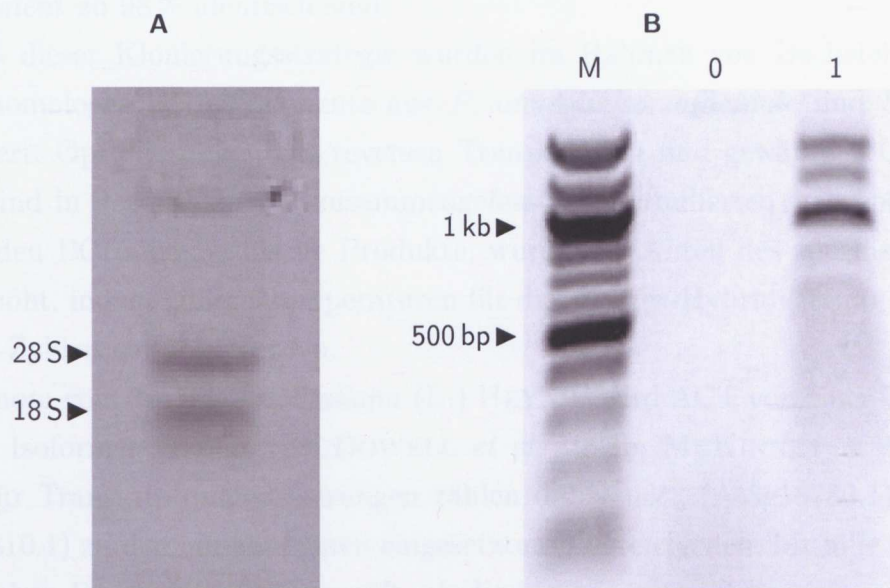


Abbildung 3.1 Amplifizierung der Aktin-codierenden cDNA von *H. indicum*. Gesamt-RNA und PCR-Produkte wurden mit einer Agarosegelelektrophorese analysiert. (A) Die deutlich voneinander getrennten 18 S und 28 S rRNA-Moleküle lassen auf eine ausreichende Integrität der RNA schließen. (B) PCR-Produkte bestehen aus mehreren verschieden langen DNA-Fragmenten (Spur 1). Das Fragment mit der stärksten Signalintensität wurde isoliert und kloniert. Die erwartete Größe beträgt 854 bp. M: DNA-Marker, 0: Nullkontrolle.

thionin und Tryptophan, die genetisch nicht redundant codiert werden, kommen an insgesamt vier Positionen vor.

Die degenerierten *Primer* wurden zur Amplifizierung der ACT-codierenden cDNA verwendet. Die gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte ist in Abbildung 3.1 zu sehen. Es sind fünf DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Größe zu erkennen. Die erwartete Größe für das Amplifikat der ACT-codierenden cDNA beträgt 854 bp. Diese Größe weist das Fragment mit der zugleich stärksten Signalintensität auf und wurde daher aus dem Gel extrahiert und mit dem pGEM[®]-T-Easy-Vektor ligiert (siehe Kap. 2.4). *E.-coli*-Zellen wurden mit den entstandenen DNA-Konstrukten transformiert. Zellen aus erfolgreichen Transformationsereignissen wurden selektiv vermehrt. Hierdurch konnten farblose Klone identifiziert werden, deren Plasmide Produkte aus der Reaktion zwischen Vektor-DNA und dem PCR-Amplifikat sind. Durch eine Testrestriktion der Plasmid-DNA solcher Zellen wurde ein Bakterien-Klon ermittelt, der ein kloniertes DNA-Fragment mit erwarteter Größe enthält. Die heterologe DNA dieses Klons wurde nach SANGER *et al.* (1977) sequenziert und von der Rohsequenz wurden Vektorreste und nicht eindeutige Sequenzbereiche entfernt. Die daraus resultierende 855 nt lange Sequenz wurde mit BLASTX analysiert (siehe Kap. 2.5.1). Der beste Treffer wird in der nr-Datenbank mit der ACT-Sequenz der Erbse (*Pisum sativum*) und einem E-Wert von 2×10^{-159} erzielt, wobei die Sequenzen

im *Alignment* zu 98% identisch sind.

Gemäß dieser Klonierungsstrategie wurden im Rahmen von Bachelorprojekten weitere homologe cDNA-Fragmente aus *P. amabilis*, *S. officinale* und *S. vernalis* identifiziert. Optimierungen zur reversen Transkription und gewählte PCR-Bedingungen sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst. Akkumulierten während der entsprechenden PCRs unspezifische Produkte, wurde der Anteil des spezifischen Produkts erhöht, indem höhere Temperaturen für die *Primer*-Hybridisierung und weniger PCR-Zyklen gewählt wurden.

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. wird ACT von einer Genfamilie mit acht Isoformen codiert (MCDOWELL *et al.* 1996b, MCKINNEY & MEAGHER 1998). Für Transkriptquantifizierungen zählen dabei *act2* (At3g18780.1) und *act7* (At5g09810.1) zu den am häufigsten eingesetzten Referenzgenen. Mithilfe eines phylogenetischen Baums wurde überprüft, ob die identifizierten Sequenzen ortholog zu eines der *Arabidopsis*-Isoformen sind (siehe Kapitel 2.5.2). Bei Annahme einer Konservierung der Regulationselemente lässt sich so deren Expressionsmuster vorher-sagen. In Abbildung 3.2 ist ein Stammbaum dargestellt. Der Verzweigungspunkt zur *Phalaenopsis*-cDNA teilt sämtliche dargestellten Sequenzen in zwei Gruppen.

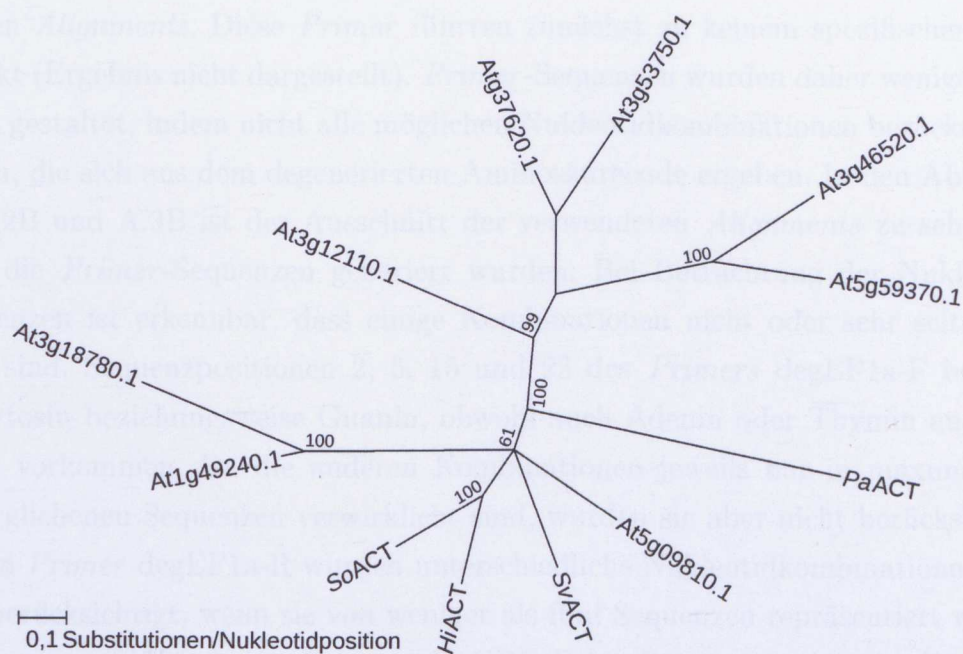


Abbildung 3.2 Phylogenetischer Baum von cDNA-Sequenzen verschiedener Aktin-Homologe. ACT wurde aus den PA-produzierenden Spezies *H. indicum*, *P. amabilis*, *S. officinale* und *S. vernalis* identifiziert. Die dadurch ermittelten Nukleinsäuresequenzen wurden zusammen mit denen der *Arabidopsis*-Gene phylogenetisch durch die Bayes'sche Inferenz analysiert. Die Berechnung erfolgte nach dem *Symmetrical Model* von ZHARKIKH (1994) und einem geschätzten Anteil invariabler Sequenzpositionen sowie einer geschätzten sogenannten Gamma-Verteilung der Substitutionsraten.

Eine Gruppe enthält ausschließlich *Arabidopsis*-Sequenzen und die andere Gruppe zusätzlich die identifizierten Sequenzen von PA-produzierenden Arten. Das beobachtete Verzweigungsmuster ist dabei im Einklang mit aktuellen Phylogenien der Angiospermen. Alle Gene, zu denen im Rahmen dieses Projekts ACT-codierende cDNA-Sequenzen identifiziert wurden, scheinen von allen *Arabidopsis*-Orthologen am nächsten mit *act7* verwandt zu sein.

Eine stabile Expression von den gewählten Referenzgenen in allen untersuchten Proben ist für eine reproduzierbare Transkriptquantifizierung ein entscheidender Faktor. Um natürlich auftretende Schwankungen im Transkriptgehalt gegebenenfalls nivellieren zu können, wurden weitere Haushaltsgene identifiziert. Ubiquitin- (UBQ) und Elongationsfaktor-1- α - (EF1a) codierende cDNA-Fragmente wurden daher auf gleiche Art und Weise von *C. officinale*, *E. cannabinum*, *H. indicum*, *P. amabilis*, *S. officinale* sowie *S. vernalis* kloniert. Die jeweilige Referenz ist in Tabelle 3.1 vermerkt. Optimierungen zur reversen Transkription und die gewählten PCR-Bedingungen sind ebenfalls in der Tabelle zu sehen.

Degenerierte *Primer* zur Amplifizierung der Fragmente codierend für EF1a und UBQ wurden ebenfalls wie für ACT ausgehend von einem Aminosäure-*Alignment* konzipiert (siehe Kapitel 2.5.2). Die Abbildungen A.2A und A.3A zeigen die entsprechenden *Alignments*. Diese *Primer* führten zunächst zu keinem spezifischen PCR-Produkt (Ergebnis nicht dargestellt). *Primer*-Sequenzen wurden daher weniger degeneriert gestaltet, indem nicht alle möglichen Nukleotidkombinationen berücksichtigt wurden, die sich aus dem degenerierten Aminosäurecode ergeben. In den Abbildungen A.2B und A.3B ist der Ausschnitt der verwendeten *Alignments* zu sehen, mit denen die *Primer*-Sequenzen generiert wurden. Bei Betrachtung der Nukleinsäuresequenzen ist erkennbar, dass einige Kombinationen nicht oder sehr selten vertreten sind. Sequenzpositionen 2, 5, 15 und 23 des *Primers* degEF1a-F bestehen aus Cytosin beziehungsweise Guanin, obwohl auch Adenin oder Thymin an diesen Stellen vorkommen. Da die anderen Kombinationen jeweils nur in maximal zwei der verglichenen Sequenzen verwirklicht sind, wurden sie aber nicht berücksichtigt. Für den *Primer* degEF1a-R wurden unterschiedliche Nukleotidkombinationen nicht mehr berücksichtigt, wenn sie von weniger als fünf Sequenzen repräsentiert werden. Für Sequenzposition 6 des *Primers* degUBQ-F ist Guanin notiert, da die andere mögliche Alternative Adenin in dem *Alignment* nicht vertreten ist. In Tabelle A.2 sind die verwendeten *Primer*-Sequenzen zusammengefasst, mit denen schließlich die Spezifität der PCR so weit erhöht wurde, dass EF1a- respektive UBQ-codierende cDNA kloniert werden konnte.

In Abbildung 3.3 und 3.4 ist ein Stammbaum durch Berechnung der Bayes'schen

Inferenz von den klonierten EF1a- respektive UBQ-codierenden cDNA-Fragmenten und den homologen Transkripten von *A. thaliana* gezeigt (siehe Kapitel 2.5.2). EF1a-codierende Sequenzen sind entsprechend der Familienzugehörigkeit und geltenden Systematik gruppiert. Vier EF1a-codierende Transkripte der Brassicaceae *A. thaliana*, zwei der Heliotropiaceae *H. indicum*, je ein Homolog der Asteraceae *E. cannabinum* und *S. vernalis* und der Boraginaceae *C. officinale* und *S. officinale* sind jeweils in einer Gruppe mit einem gemeinsamen Knoten angeordnet. Da sich eine Ausbildung zur Genfamilie mit mehreren Isoformen anscheinend erst nach Trennung der gezeigten Arten ereignete, können die identifizierten cDNA-Fragmente jedoch nicht einer der *Arabidopsis*-Isoformen zugeordnet werden.

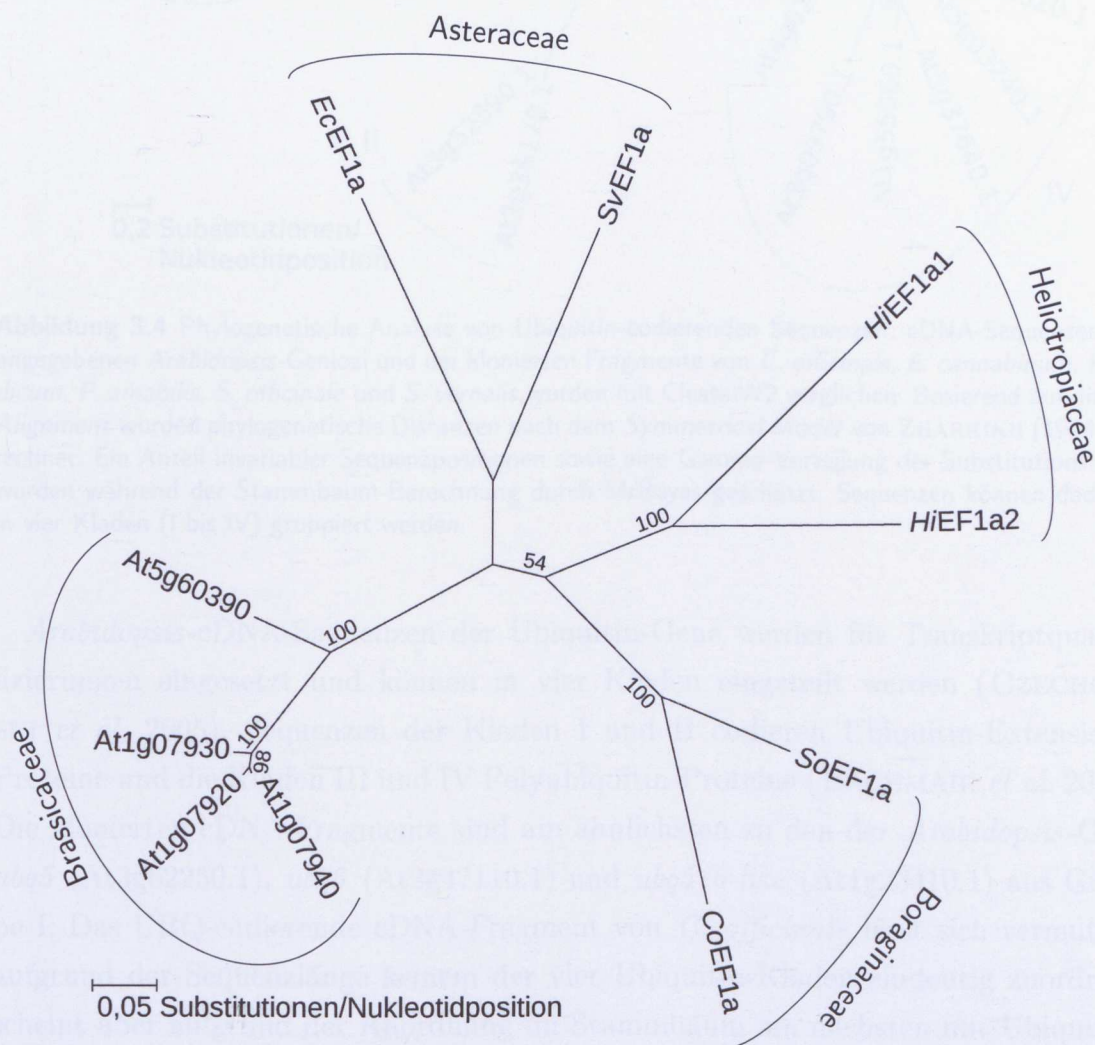


Abbildung 3.3 Phylogenetische Analyse von EF1a-codierenden Sequenzen. Für die Stammbaumberechnung wurden Sequenzen der *Arabidopsis*-Genlozi und von *C. officinale*, *E. cannabinum*, *H. indicum*, *S. officinale* und *S. vernalis* mit MrBayes und dem *Symmetrical Model* von ZHARKIKH (1994) analysiert. Ein Anteil invariabler Sequenzpositionen sowie eine Gamma-Verteilung der Substitutionsraten wurden durch MrBayes geschätzt.

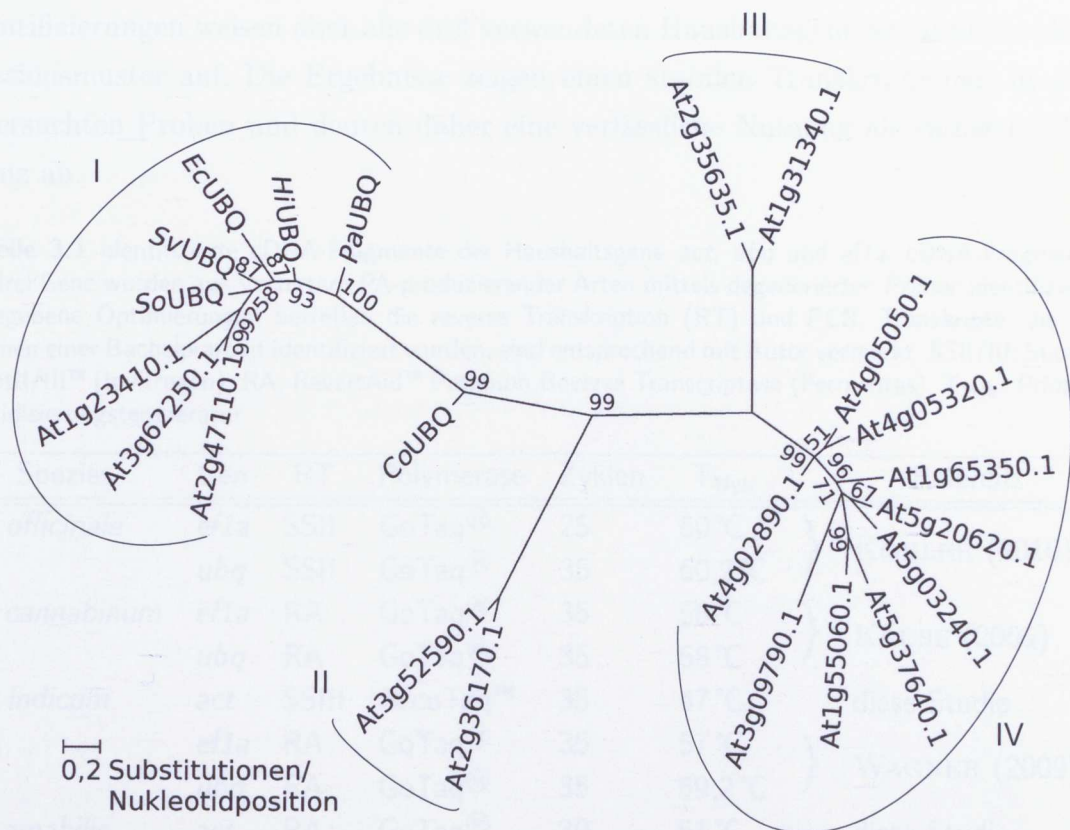


Abbildung 3.4 Phylogenetische Analyse von Ubiquitin-codierenden Sequenzen. cDNA-Sequenzen der angegebenen *Arabidopsis*-Genlozi und der klonierten Fragmente von *C. officinale*, *E. cannabinum*, *H. indicum*, *P. amabilis*, *S. officinale* und *S. vernalis* wurden mit ClustalW2 verglichen. Basierend auf diesem Alignment wurden phylogenetische Distanzen nach dem *Symmetrical Model* von ZHARKIKH (1994) berechnet. Ein Anteil invariabler Sequenzpositionen sowie eine Gamma-Verteilung der Substitutionsraten wurden während der Stammbaum-Berechnung durch MrBayes geschätzt. Sequenzen können dadurch in vier Kladen (I bis IV) gruppiert werden.

Arabidopsis-cDNA-Sequenzen der Ubiquitin-Gene werden für Transkriptquantifizierungen eingesetzt und können in vier Kladen eingeteilt werden (CZECHOWSKI *et al.* 2005). Sequenzen der Kladen I und II codieren Ubiquitin-Extensions-Proteine und die Kladen III und IV Polyubiquitin-Proteine (BACHMAIR *et al.* 2001). Die klonierten cDNA-Fragmente sind am ähnlichsten zu den der *Arabidopsis*-Gene *ubq5* (At3g62250.1), *ubq6* (At2g47110.1) und *ubq5/6-like* (At1g23410.1) aus Gruppe I. Das UBQ-codierende cDNA-Fragment von *C. officinale* lässt sich vermutlich aufgrund der Sequenzlänge keinem der vier Ubiquitin-Kladen eindeutig zuordnen, scheint aber aufgrund der Anordnung im Stammbaum am nächsten mit Ubiquitin-Extensions-Proteinen verwandt zu sein.

Im Allgemeinen ist eine Vorhersage der Expression nur bedingt verlässlich, da orthologe Gene im Verlauf der Evolution eventuell umfunktionalisiert wurden. Vergleiche mit den *Arabidopsis*-Orthologen geben daher nur Hinweise auf das Expressionsmuster der identifizierten Transkripte. Bei weiter unten gezeigten Transkript-

quantifizierungen weisen aber alle drei verwendeten Haushaltsgene ein ähnliches Expressionsmuster auf. Die Ergebnisse zeigen einen stabilen Transkriptgehalt in den untersuchten Proben und deuten daher eine verlässliche Nutzung als endogene Referenz an.

Tabelle 3.1 Identifizierte cDNA-Fragmente der Haushaltsgene *act*, *ubq* und *ef1a*. cDNA-Fragmente der drei Gene wurden aus Vertretern PA-produzierender Arten mittels degenerierter *Primer* identifiziert. Angegebene Optimierungen betreffen die reverse Transkription (RT) und PCR. Transkripte, die im Rahmen einer Bachelorarbeit identifiziert wurden, sind entsprechend mit Autor vermerkt. SSII/III: SuperScriptII/III™ (Invitrogen), RA: RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (Fermentas), T_{Hyb} : *Primer*-Hybridisierungstemperatur

Spezies	Gen	RT	Polymerase	Zyklen	T_{Hyb}	Referenz
<i>C. officinale</i>	<i>ef1a</i>	SSII	GoTaq®	25	60 °C	} KÖHLER (2010)
	<i>ubq</i>	SSII	GoTaq®	35	60,2 °C	
<i>E. cannabinum</i>	<i>ef1a</i>	RA	GoTaq®	35	56 °C	} KRUSE (2009)
	<i>ubq</i>	RA	GoTaq®	35	58 °C	
<i>H. indicum</i>	<i>act</i>	SSIII	AccuTaq™	35	47 °C	diese Studie
	<i>ef1a</i>	RA	GoTaq®	35	57 °C	} WAGNER (2009)
	<i>ubq</i>	RA	GoTaq®	35	59,2 °C	
<i>P. amabilis</i>	<i>act</i>	RA	GoTaq®	30	51 °C	diese Studie
	<i>ubq</i>	RA	GoTaq®	35	58 °C	} BAUR (2009)
<i>S. officinale</i>	<i>act</i>	RA	GoTaq®	35	47 °C	
	<i>ef1a</i>	RA	GoTaq®	35	56 °C	
	<i>ubq</i>	RA	GoTaq®	35	58 °C	
<i>S. vernalis</i>	<i>act</i>	RA	GoTaq®	35	47 °C	} KRUSE (2009)
	<i>ef1a</i>	RA	GoTaq®	35	56 °C	
	<i>ubq</i>	RA	GoTaq®	35	58 °C	

3.2 Induktionsversuche der PA-Biosynthese durch Methyljasmonat

In transgenen *Hairy-Root*-Kulturen der Boraginales-Art *Echium rawolfii* DELILE kann die PA-Biosynthese durch das Pflanzenhormon Methyljasmonat induziert werden (EL-MAWLA 2010). Um zu überprüfen, ob die PA-Biosynthese auch in den Boraginales-Vertretern dieses Projekts wie bei *E. rawolfii* durch Methyljasmonat induziert werden kann, wurden PAs und HSS-codierende Transkripte von *Cynoglossum*-Wurzelorgankulturen vor und nach Hormonbehandlung quantifiziert. Zusätzlich wurde ermittelt, ob eine durch Methyljasmonat hervorgerufene Reaktion auf die Transkriptmenge des *hss*-Gens bei zwei weiteren Versuchspflanzen, *H. indicum* und

S. officinale, eintritt. Die Hormonapplikation erfolgte jeweils an axenischen Kulturen vier bis sechs Wochen nach Umsetzen auf frisches Medium. Als Nullkontrolle wurde das gleiche Volumen DMSO appliziert, das als Lösungsmittel für Methyljasmonat verwendet wurde (siehe Kap. 2.6.1).

3.2.1 PA-Gehalt

Als direktes Maß für die PA-Biosyntheserate wurde der PA-Gehalt in *C. officinale* ermittelt. Nach ein bis zwei Tagen langen Inkubationen mit Methyljasmonat wurden PAs extrahiert und gaschromatografisch quantifiziert (siehe Kap. 2.6.2). Dabei wurden zwei unterschiedliche Sensoren eingesetzt, von denen einer kohlenstoffhaltige (FID) und einer stickstoff- sowie phosphorhaltige Verbindungen (FTD) detektiert. Ein typisches Chromatogramm beider Detektoren ist exemplarisch in Abbildung 3.5C und D zu sehen.

Peaks der stickstoffhaltigen PAs wurden anhand des Chromatogramms vom FTD identifiziert und mit dem vom FID quantifiziert. Kontaminationen durch Weichmacher aus dem verwendeten Plastikmaterial wurden mit einer Nullkontrolle identifiziert (siehe Abb. 3.5B). Eine genauere Zuordnung der *Peaks* von PAs erfolgte freundlicherweise durch Till Beuerle an der TU Braunschweig mittels GC-MS-Analyse und anschließendem Vergleich mit Datenbankeinträgen von bekannten PA-Derivaten. Zwei PA-Derivate des Lycopsamin-Typs haben eine Retentionszeit von 29,1 beziehungsweise 29,9 min. Als interner Standard diente das PA Retrorsin (Retentionszeit: 33,9 min, siehe Abb. 3.5A). Abbildung 3.6 zeigt auf das Frischgewicht bezogene PA-Gehalte. Der PA-Gehalt in Wurzelorgankulturen von *C. officinale* hat sich durch die Behandlung mit dem Pflanzenhormon innerhalb von zwei Tagen nicht signifikant geändert.

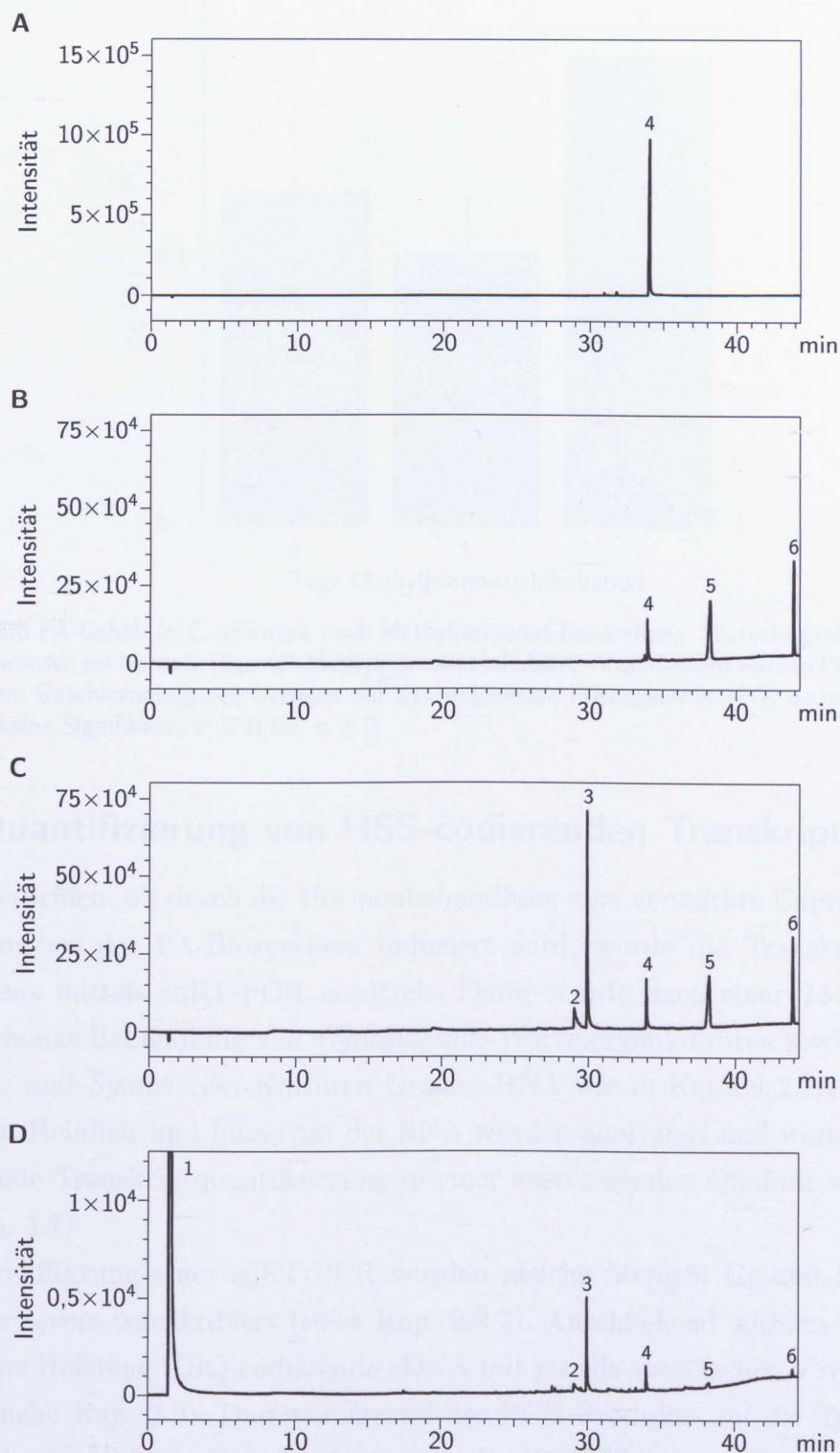


Abbildung 3.5 Gaschromatografische Analysen von PA-Extrakten aus Wurzelorgankulturen von *C. of ficinale*. Gezeigt sind die Chromatogramme des FTDs für phosphor- und stickstoffhaltige Verbindungen von (A) einer methanolischen Lösung des internen Standards Retrorsin, (B) einer Nullkontrolle für die Extraktion und (C) dem PA-Extrakt einer *Cynoglossum*-Wurzelorgankultur jeweils inklusive Retrorsin. Kohlenstoffhaltige Verbindungen der gleichen Wurzelextrakte wurden mit einem simultan erstellten Chromatogramm des FIDs quantifiziert (D). 1: Methanol, 2: Lycopsamin-Typ-PA Indicin oder Intermidin, 3: 3'-Acetyl-Lycopsamin-Typ-PA, 4: Retrorsin, 5 und 6: kontaminierende Substanzen.

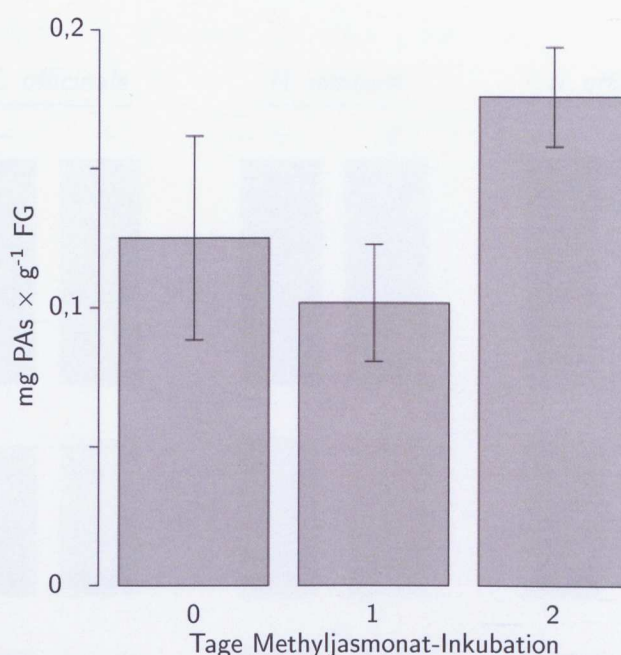


Abbildung 3.6 PA-Gehalt in *C. officinale* nach Methyljasmonat-Behandlung. Wurzelorgankulturen von *C. officinale* wurden ein bis zwei Tage mit Methyljasmonat inkubiert. Anschließend wurden PAs extrahiert und mit einem Gaschromatografen bezogen auf das eingesetzte Frischgewicht (FG) quantifiziert. Ein t-Test zeigt keine Signifikanz: $P > 0,05$, $n \geq 3$.

3.2.2 Quantifizierung von HSS-codierenden Transkripten

Um zu überprüfen, ob durch die Hormonbehandlung eine verstärkte Expression des Eingangsenzyms der PA-Biosynthese induziert wird, wurde die Transkriptmenge des *hss*-Gens mittels sqRT-PCR ermittelt. Dafür wurde nach einer 24-stündigen Methyljasmonat-Behandlung von *Cynoglossum*-Wurzelorgankulturen sowie von *Heliotropium*- und *Symphytum*-Kulturen Gesamt-RNA wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben isoliert. Reinheit und Integrität der RNA wurden analysiert und waren für eine anschließende Transkriptquantifizierung in einer ausreichenden Qualität vorhanden (siehe Abb. 3.7).

Zur Durchführung einer sqRT-PCR wurden gleiche Mengen Gesamt-RNA beider Proben revers transkribiert (siehe Kap. 2.2.2). Anschließend wurden HSS- und als endogene Referenz UBQ-codierende cDNA mit jeweils spezifischen *Primern* amplifiziert (siehe Kap. 2.3). Damit aufgrund der PCR-Produkte auf die Transkriptkonzentration geschlossen werden kann, wurde die PCR optimiert. Die *Primer*-Hybridisierungstemperatur wurde so weit erhöht bis das spezifische PCR-Produkt den größten Anteil ausmachte und der Anteil unspezifischer Produkte minimiert wurde. Des Weiteren wurde sichergestellt, dass die PCR noch vor Erreichen der stationären Phase gestoppt wurde, in der sich die Amplifikat-Konzentrationen von verschiedenen Proben angleichen. Die entsprechenden Parameter sind in Tabelle A.2

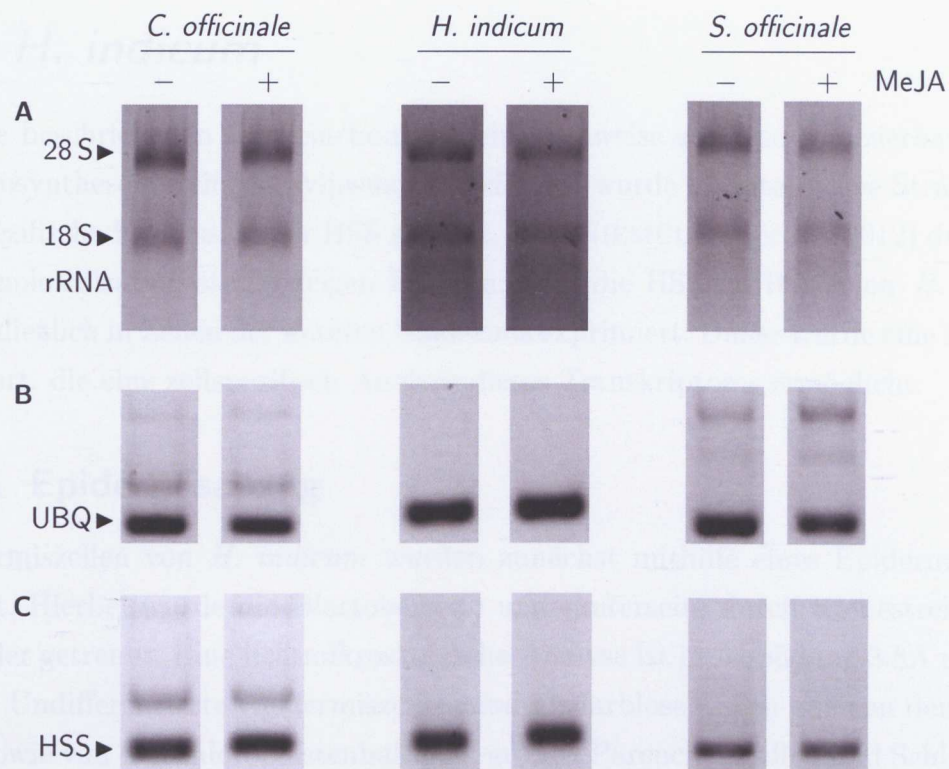


Abbildung 3.7 sqRT-PCR nach Behandlung mit Methyljasmonat. Axenische Kulturen von *C. officinale*, *H. indicum* und *S. officinale* wurden 24 h mit Methyljasmonat (MeJA) inkubiert. Daraus isolierte Gesamt-RNA enthält zwei deutlich trennbare rRNA-Fractionen (18S und 28S) und weist daher eine ausreichende Integrität auf (A). HSS-codierende Transkripte der unbehandelten Kontrollgruppen (-) und die mit Methyljasmonat behandelten Individuen (+) wurden mittels sqRT-PCR quantifiziert (C). Als interne Referenz wurden UBQ-codierende Transkripte verwendet (B). RNA und DNA wurden mit einer Agarosegelelektrophorese analysiert.

zusammengefasst.

Wie in der Abbildung 3.7 zu sehen ist, bilden die PCRs mit *Primern* für UBQ-codierende cDNA ungefähr gleich viel spezifisches Produkt, sodass eine annähernd gleiche Menge an Gesamt-cDNA in den zu vergleichenden Proben angenommen werden kann. HSS-codierende Transkripte sind in den untersuchten Proben ebenfalls ungefähr gleich konzentriert. Die 24-stündige Methyljasmonat-Inkubation hat demnach auch auf die Transkriptkonzentration keinen messbaren Effekt in den untersuchten Spezies der Ordnung Boraginales.

3.3 Generierung zellspezifischer cDNA aus *H. indicum*

Da die beschriebenen Untersuchungen keine Hinweise auf eine Induzierbarkeit der PA-Biosynthese durch Methyljasmonat lieferten, wurde als alternative Strategie die zellspezifische Expression der HSS genutzt. Wie NIEMÜLLER *et al.* (2012) durch eine Immunlokalisationsstudie zeigen konnten, wird die HSS im Blatt von *H. indicum* ausschließlich in Zellen der unteren Epidermis exprimiert. Daher wurde eine Methode etabliert, die eine zellspezifische Analyse dieses Transkriptoms ermöglicht.

3.3.1 Epidermisabzug

Epidermiszellen von *H. indicum* wurden zunächst mithilfe eines Epidermisabzugs isoliert. Hierbei wurde die Blattoberseite und -unterseite durch Klebestreifen voneinander getrennt. Eine lichtmikroskopische Analyse ist in Abbildung 3.8A und B zu sehen. Undifferenzierte Epidermiszellen sind als farblose Zellen gut von den Trichomen sowie von den chloroplastenhaltigen, grünen Parenchymzellen und Schließzellen der Stomata zu unterscheiden.

Zur Überprüfung eines differentiellen Gehalts an HSS-codierenden Transkripten wurde in beiden Proben die korrespondierende cDNA mittels sqRT-PCR quantifiziert (siehe Kap. 2.2 und 2.3). Dafür wurden die in Tabelle A.2 angegebenen Primer *HiHSS-F2* und *-R2* verwendet. Als endogene Referenz wurde die cDNA codierend für ACT mit den Primern *HiACT-F1* und *-R1* amplifiziert. Das Ergebnis der PCRs ist in Abbildung 3.8C und D gezeigt. ACT-codierende cDNA scheint in beiden Proben in etwa gleich stark konzentriert zu sein. HSS-codierende Transkripte sind in der Probe mit der unteren Blattepidermis deutlich stärker konzentriert als in der Probe mit der oberen Blattepidermis.

Obwohl in der oberen Blattepidermis kein HSS-Protein vorhanden ist (NIEMÜLLER *et al.* 2012), kann das Transkript hier detektiert werden. Eine Kontamination während der Probenentnahme durch Zellen der unteren Blattepidermis könnte diese Beobachtung erklären. Da die mikroskopische Analyse der Epidermisabzüge zeigt, dass eine Isolierung ohne angrenzendes Parenchym und vermutlich auch Epidermisgewebe der gegenüberliegenden Seite auf diese Weise nicht möglich ist, kann eine solche Kontamination nicht ausgeschlossen werden.

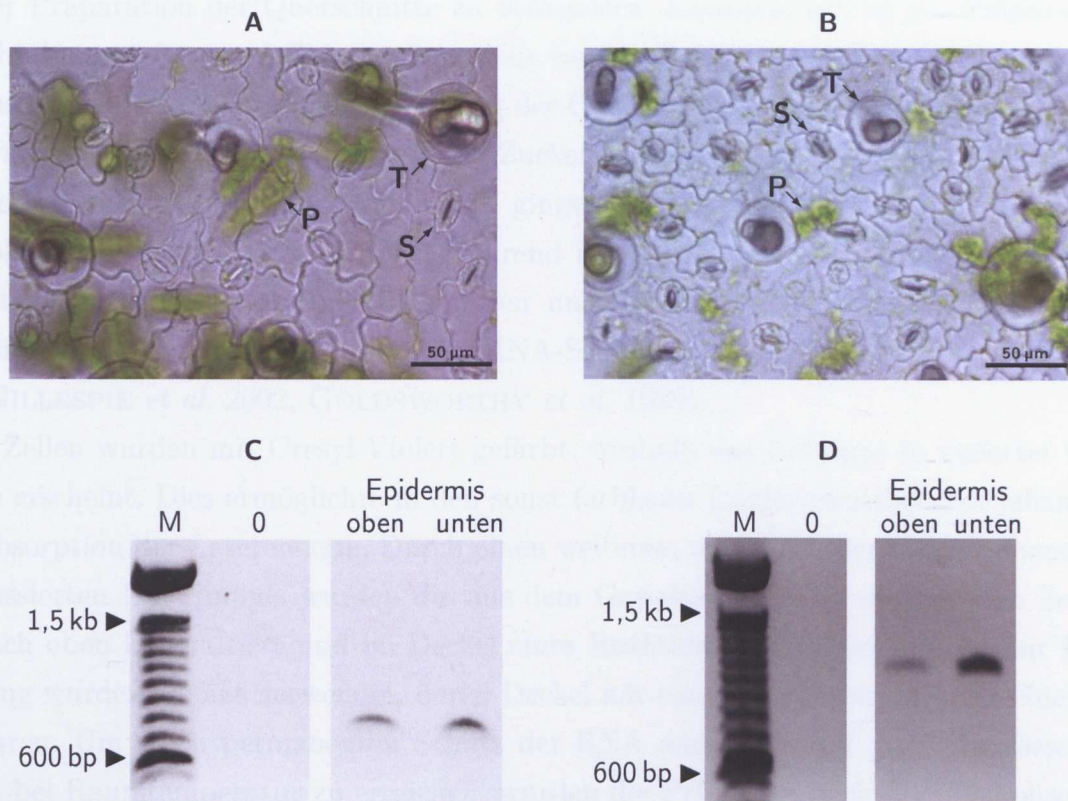


Abbildung 3.8 Analysen zur Gewebereinheit von Epidermisabzügen. Obere (A) und untere (B) Blatt-epidermen von *H. indicum* wurden mit einem Klebestreifen abgezogen und lichtmikroskopisch analysiert. Neben dem Epidermisgewebe samt Trichom- (T) und Schließzellen (S) sind auch Parenchymzellen (P) zu sehen. Vergleichend wurden aus den Epidermisproben ACT- (C) und HSS-codierende cDNA (D) in einer PCR amplifiziert und die Produkte gelelektrophoretisch untersucht. Spezifische Produkte mit erwarteter Größe für ACT- (854 bp) und HSS-codierende cDNA (1095 bp) wurden in der oberen und unteren Epidermis detektiert. M: DNA-Marker, 0: Nullkontrolle.

3.3.2 Laserunterstützte Mikrodisektion von Epidermiszellen

Um Epidermiszellen zellspezifischer als durch einen Abzug mit Klebestreifen zu isolieren, wurde die laserunterstützte Mikrodisektion (LCM) für *Heliotropium*-Blattpräparate etabliert (siehe Kap. 2.7). Durch diese Technik können am mikroskopischen Präparat einzelne Zellen mittels Laserenergie aus dem Gewebeverband gelöst und in ein darüber befindliches Reaktionsgefäß katapultiert werden. Hierdurch können zellspezifische Proben generiert werden, die sich mit anschließenden molekularbiologischen Methoden für Transkriptomanalysen nutzen lassen.

Zunächst wurden 25 µm dicke Blattquerschnitte hergestellt. Diese Schnittdicke entspricht in etwa der durchschnittlichen Größe einer Epidermiszelle, sodass die Wahrscheinlichkeit der Kontamination durch Parenchymzellen aus darunter liegenden, nicht sichtbaren Zellschichten verringert wurde. Zur Erzeugung der Querschnitte wurde ein Kryotom verwendet, um einerseits eine reproduzierbare Schnittdicke zu gewährleisten und vor allem eine RNA-Degradierung durch RNasen während

der Präparation der Querschnitte zu verhindern. Exemplarisch ist ein Präparat in Abbildung 3.9A vor LCM zu sehen. Nur wenige Zellen sind deformiert oder durch das Einfrieren geplatzt. Eine Fixierung des Gewebes durch eine saure Alkohollösung (Farmers Fixativ) und anschließende Zuckerinfiltrierung verbesserten eine Konservierung der Morphologie zwar leicht, gingen aber vermutlich als Folge der nicht vollständig inaktivierten RNasen während der Infiltrationen zu Lasten der RNA-Integrität. Quervernetzende Reagenzien und Kunststoffe zur Gewebe-Einbettung wurden nicht verwendet, da sie die RNA-Stabilität ebenfalls negativ beeinflussen (GILLESPIE *et al.* 2002, GOLDSWORTHY *et al.* 1999).

Zellen wurden mit Cresyl-Violett gefärbt, weshalb das Präparat in violetter Farbe erscheint. Dies ermöglichte in den sonst farblosen Epidermiszellen eine effiziente Absorption der Laserenergie. Durch einen weiteren, unterhalb der Gewebeebe fokussierten Laserimpuls wurden die aus dem Gewebeverband herausgelösten Zellen nach oben katapultiert und im Deckel eines Reaktionsgefäßes gesammelt. Zur Haftung wurden Gefäße verwendet, deren Deckel mit einem adhäsiven Film beschichtet waren. Um einen permanenten Schutz der RNA auch während der Mikrodissektion bei Raumtemperatur zu erreichen, wurden die Präparate nach der alkoholischen Färbung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Weil der Alkohol durch das schnelle Einfrieren nicht verdunsten konnte, verbesserte dieser Schritt zusätzlich auch erheblich den Erhalt der Morphologie. Das Verdunsten des Alkohols führte sonst in der Regel zum Kollabieren der zellulären Strukturen.

In Abbildung 3.9B ist exemplarisch ein Blattquerschnitt nach LCM zu sehen. In mehreren Mikrodissektionsrunden wurden aus solchen Querschnitten insgesamt jeweils 4000 bis 6000 Zellen der oberen und unteren Blattepidermis gesammelt. Stomata und Trichome wurden dabei ausgelassen oder zuvor mit einem Laserimpuls zerstört. Abbildung 3.9C zeigt das Innere eines Deckels mit einer Zellprobe. Ein Mikrodissektat aus dieser Abbildung wird vergrößert in Abbildung 3.9D dargestellt und zeigt eindeutig Epidermiszellen.

Um die histologisch gezeigte Zellspezifität der Probengenerierung auch molekularbiologisch zu bestätigen, wurde aus den isolierten Epidermiszellen Gesamt-RNA mit Trizol isoliert. Da die daraus resultierende Menge für eine Agarosegelelektrophorese unterhalb der Nachweisgrenze lag, wurde zur Kontrolle der RNA-Integrität eine dritte Probe aus dem verbliebenen, hauptsächlich aus Parenchymzellen bestehenden Zellmaterial isoliert. Die Auftrennung dieser Gesamt-RNA während einer Agarosegelelektrophorese ist in Abbildung 3.9E zu sehen. Es sind zwei größere Fraktionen, die 18S und 28S rRNA, erkennbar, die klar voneinander getrennt sind und eine ausreichende Qualität für nachfolgende Experimente indizieren. Nach cDNA-Synthese

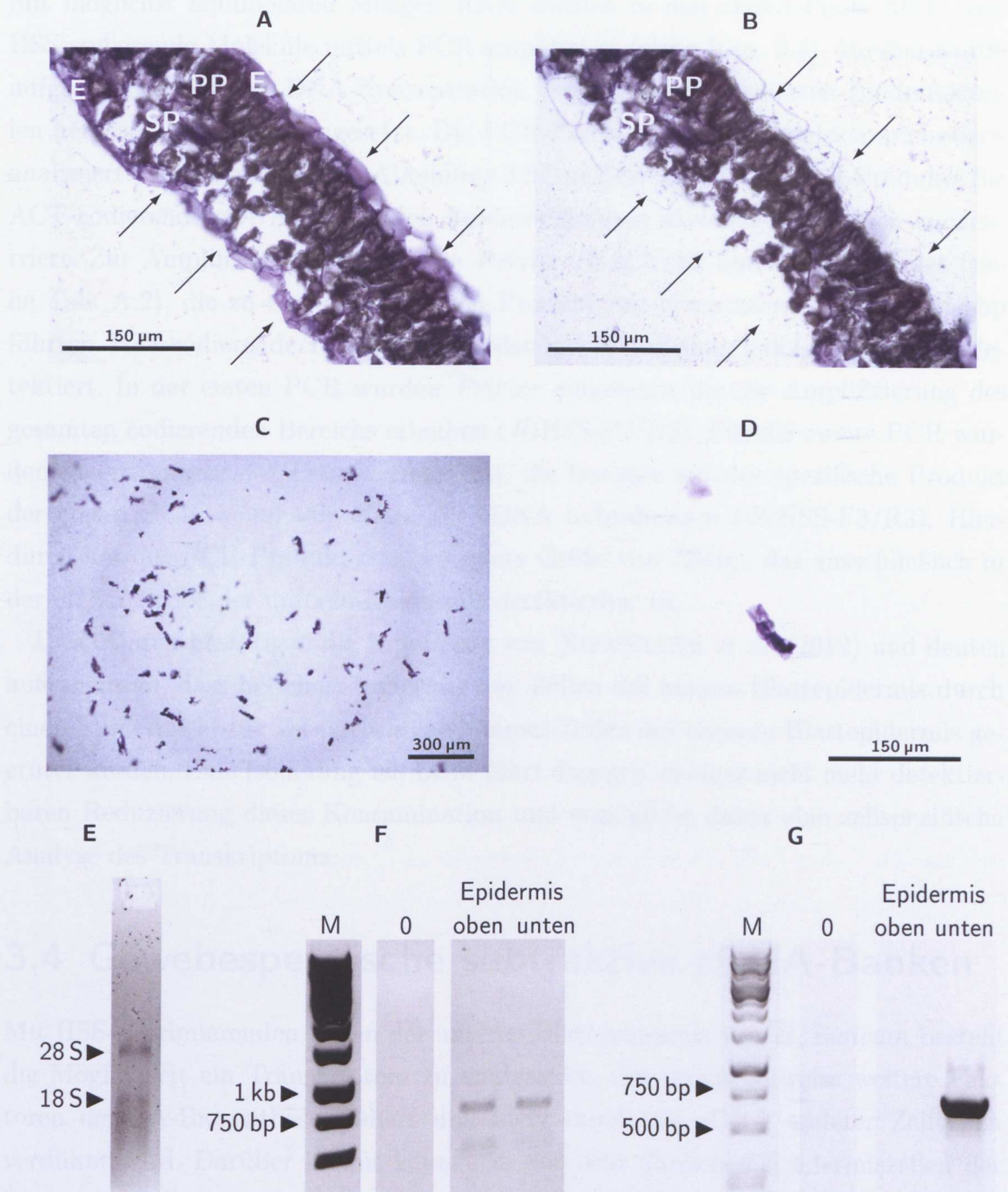


Abbildung 3.9 Laserunterstützte Mikrodissektion (LCM) der Blattepidermis von *H. indicum*. (A)-(D) sind lichtmikroskopische Aufnahmen. (A) Kryoquerschnitte von Blättern nach Färbung durch Cresyl-Violett (20-fach-Objektiv). (B) Querschnitt aus (A) nach LCM der oberen und unteren Epidermis. Der mikrodissizierte Bereich ist mit Pfeilen gekennzeichnet. (C) Isolierte Epidermiszellen im Auffangdeckel (5-fach Objektiv). (D) Mit einem 20-fach-Objektiv vergrößerter Ausschnitt von (C). E: Epidermis, SP: Schwammparenchym, PP: Palisadenparenchym. (E)-(G) stellen Ergebnisse nach einer Agarosegelelektrophorese dar. (E) Gesamt-RNA des Blattparenchyms nach erfolgter LCM mit erkennbaren rRNA-Fractionen (18S und 28S) und PCR-Produkte nach Amplifizierung eines (F) ACT- (854 bp) und (G) HSS-codierenden Fragments (750 bp) aus cDNA der oberen und unteren Epidermis. M: DNA-Marker, 0: Nullkontrolle.

mit möglichst äquimolaren Mengen RNA wurden in den cDNA-Pools ACT- und HSS-codierende Moleküle mittels PCR amplifiziert (siehe Kap. 2.3). Hierbei wurde aufgrund der geringen DNA-Konzentration $\frac{1}{5}$ der aus allen isolierten Epidermiszellen hergestellten cDNA eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.9F und G dargestellt. PCR-Produkte für ACT-codierende cDNA von beiden Epidermisproben sind ungefähr gleich konzentriert. Zur Amplifizierung wurden die *Primer HiACT-F1* und *-R1* verwendet (siehe Tab. A.2), die zu einem spezifischen Produkt mit erwarteter Größe von 854 bp führten. HSS-codierende Transkripte wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCRs detektiert. In der ersten PCR wurden *Primer* eingesetzt, die die Amplifizierung des gesamten codierenden Bereichs erlauben (*HiHSS-F2/R2*). Für die zweite PCR wurden sogenannte *nested Primer* eingesetzt, die bezogen auf das spezifische Produkt der ersten PCR weiter zur Mitte der cDNA hybridisieren (*HiHSS-F3/R3*). Hierdurch hat das PCR-Produkt eine erwartete Größe von 750 bp, das ausschließlich in der cDNA-Probe der unteren Epidermis detektierbar ist.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von NIEMÜLLER *et al.* (2012) und deuten außerdem an, dass bei einer Isolierung von Zellen der oberen Blattepidermis durch einen Epidermisabzug vermutlich auch immer Zellen der unteren Blattepidermis geerntet werden. Eine Isolierung *via* LCM führt dagegen zu einer nicht mehr detektierbaren Reduzierung dieser Kontamination und ermöglicht daher eine zellspezifische Analyse des Transkriptoms.

3.4 Gewebespezifische subtraktive cDNA-Banken

Mit HSS-exprimierenden Zellen der unteren Blattepidermis von *H. indicum* besteht die Möglichkeit ein Transkriptom zu analysieren, das möglicherweise weitere Faktoren der PA-Biosynthese codiert und nicht durch die cDNA anderer Zelltypen verdünnt wird. Darüber hinaus können in den sehr ähnlichen Epidermiszellen der Blattoberseite weder die HSS-codierende cDNA noch das Protein selbst detektiert werden. Bei einem Vergleich der Transkriptome beider Epidermen ist daher zu erwarten, dass ein Großteil der cDNA gleich oder sehr ähnlich exprimierte Gene repräsentiert und dass Expressionsunterschiede von Faktoren der PA-Biosynthese sich in einem deutlich unterschiedlichen Transkriptgehalt widerspiegeln. Aufgrund dessen wurde eine subtraktive (SSH) cDNA-Bank aus der unteren Blattepidermis von *H. indicum* hergestellt. Dabei wurden durch eine subtraktive Hybridisierung mit cDNA der oberen Epidermis die cDNA-Moleküle abgereichert, die von gleich stark exprimierten Genen transkribiert werden. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass die

cDNA aller im Vergleich zur oberen Epidermis stärker exprimierten Gene, wie z. B. die *hss*, angereichert wurde. Ergänzend dazu wurden organ- und gewebespezifische SSH-cDNA-Banken aus *S. officinale* und *P. amabilis* konstruiert, bei denen ebenfalls eine differenzielle HSS-Expression beobachtet wurde (siehe Kap. 3.4.2 und 3.4.3).

Die Herstellung erfolgte jeweils mit dem PCR-select™-cDNA-Subtraction-Kit von Clontech (siehe Abb. 3.10). Die zu analysierende doppelsträngige cDNA wurde dabei als *Tester*-cDNA bezeichnet und stammte von Pflanzenmaterial, in dem eine starke HSS-Expression gemessen wurde. Die *Tester*-cDNA wurde in zwei Aliquots geteilt und deren DNA-Enden wurden am 5'-Ende mit zwei verschiedenen Adaptermolekülen ligiert: Adapter 1 und 2R. Beide Aliquots wurden mit adapterloser, sogenannter *Driver*-cDNA im Überschuss hybridisiert, die von einer Vergleichsprobe mit keiner detektierbaren HSS-Expression isoliert wurde. Die cDNA von gleich stark exprimierten Genen wurde dadurch zum Teil mit einem DNA-Strang ohne Adapter kombiniert und dadurch während anschließender PCR-Läufe nicht exponentiell amplifiziert (Typ c in Abb. 3.10). Im Gegensatz dazu wurde dieser Typ mit cDNA von Genen, die in der *Tester*-Probe stärker exprimiert werden, je nach Expressionsunterschied weniger bis gar nicht ausgebildet, sodass entsprechend mehr cDNA-Moleküle solcher Gene im einzelsträngigen Zustand (Typ a) blieben. Ausschließlich dieser einzelsträngige Teil hybridisierte in einer anschließenden zweiten subtraktiven Hybridisierung mit demselben cDNA-Anteil des zweiten Aliquots. Da diese DNA-Moleküle einen anderen Adapter am 5'-Ende hatten, wurde durch diese Hybridisierung die cDNA von stärker exprimierten Genen mit zwei verschiedenen DNA-Enden versehen (Typ e). Die Adaptersequenzen wurden anschließend benutzt, um diesen cDNA-Anteil mittels PCR exponentiell zu amplifizieren und dadurch anzureichern. Sequenzen der daraus resultierenden SSH-cDNA-Bank wurden nach SANGER *et al.* (1977) und mittels Pyrosequenzierung ermittelt.

Verschiedene Zwischenschritte wurden kontrolliert und werden im Folgenden detailliert am Beispiel der SSH-Bank aus *H. indicum* beschrieben. Für die anderen SSH-Banken wurden diese Kontrollanalysen ebenfalls durchgeführt, deren Resultate jedoch nicht gesondert dargestellt werden.

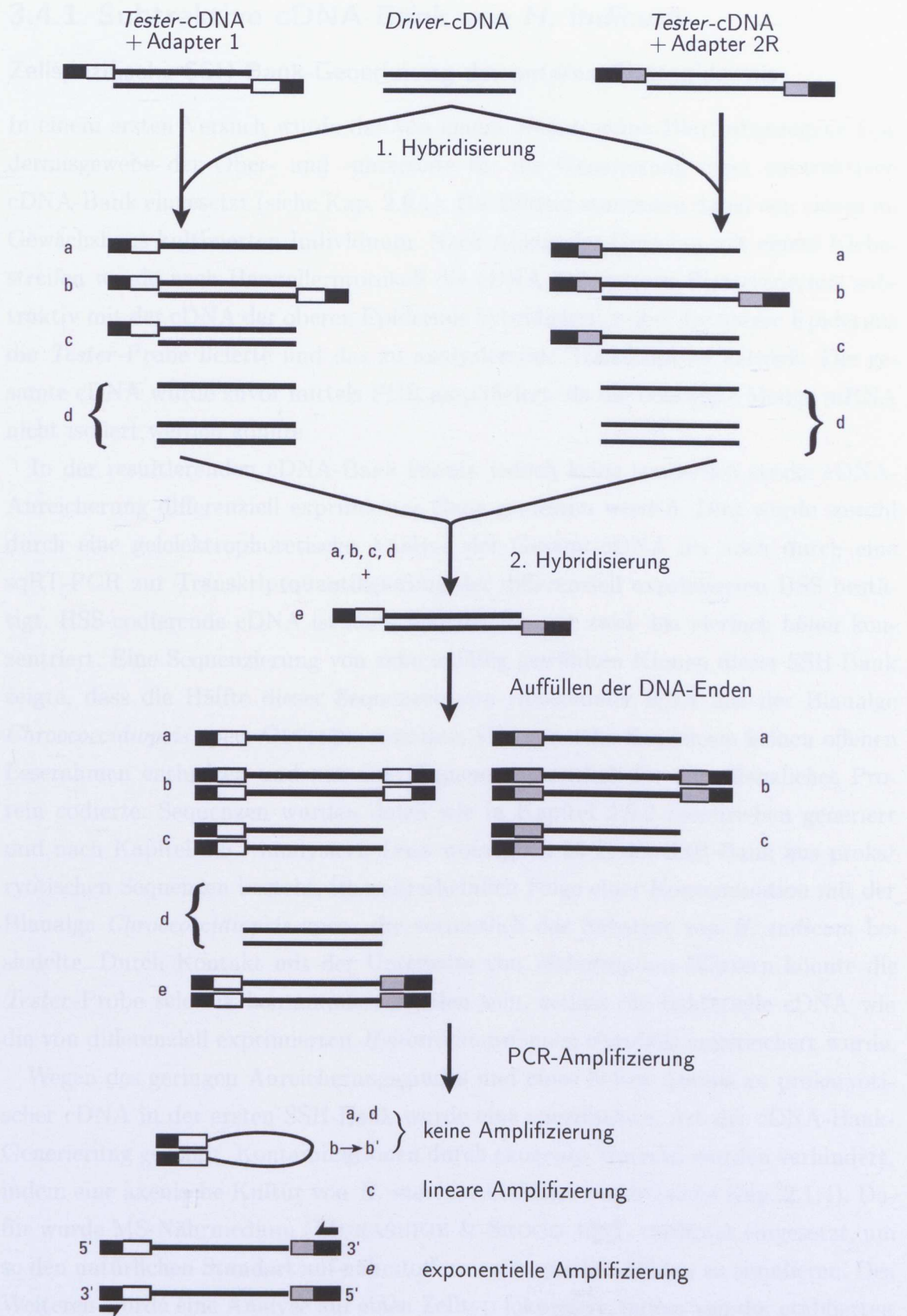


Abbildung 3.10 Schematische Darstellung der entstehenden DNA-Hybride während der Generierung einer SSH-Bank. Geändert nach DIATCHENKO *et al.* (1996).

3.4.1 Subtraktive cDNA-Bank von *H. indicum*

Zellspezifische SSH-Bank-Generierung der unteren Blattepidermis

In einem ersten Versuch wurde das von einem *Heliotropium*-Blatt abgezogene Epidermisgewebe der Ober- und -unterseite für die Generierung einer subtraktiven cDNA-Bank eingesetzt (siehe Kap. 2.9.1). Die Blätter stammten dabei von einem im Gewächshaus kultivierten Individuum. Nach Abzug des Gewebes mit einem Klebestreifen wurde nach Herstellerprotokoll die cDNA der unteren Blattepidermis subtraktiv mit der cDNA der oberen Epidermis hybridisiert, wobei die untere Epidermis die *Tester*-Probe lieferte und das zu analysierende Transkriptom enthielt. Die gesamte cDNA wurde zuvor mittels PCR amplifiziert, da die benötigte Menge mRNA nicht isoliert werden konnte.

In der resultierenden cDNA-Bank konnte jedoch keine sonderlich starke cDNA-Anreicherung differenziell exprimierter Gene gemessen werden. Dies wurde sowohl durch eine gelelektrophoretische Analyse der Gesamt-cDNA als auch durch eine sqRT-PCR zur Transkriptquantifizierung der differenziell exprimierten HSS bestätigt. HSS-codierende cDNA ist nach Subtraktion nur zwei- bis vierfach höher konzentriert. Eine Sequenzierung von zehn zufällig gewählten Klonen dieser SSH-Bank zeigte, dass die Hälfte dieser Sequenzen von ribosomaler RNA aus der Blaualge *Chroococcidiopsis* spec. GEITLER stammte, vier von zehn Sequenzen keinen offenen Leserahmen enthielten und nur eine Sequenz vermutlich für ein pflanzliches Protein codierte. Sequenzen wurden dabei wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben generiert und nach Kapitel 2.5.1 analysiert. Dass womöglich 50% der SSH-Bank aus prokaryotischen Sequenzen besteht, ist wahrscheinlich Folge einer Kontamination mit der Blaualge *Chroococcidiopsis* spec., die vermutlich das Substrat von *H. indicum* besiedelte. Durch Kontakt mit der Unterseite von *Heliotropium*-Blättern könnte die *Tester*-Probe selektiv kontaminiert worden sein, sodass die bakterielle cDNA wie die von differenziell exprimierten *Heliotropium*-Genen ebenfalls angereichert wurde.

Wegen des geringen Anreicherungsgrades und eines hohen Anteils an prokaryotischer cDNA in der ersten SSH-Bank wurde eine spezifischere Art der cDNA-Bank-Generierung gewählt. Kontaminationen durch exogenes Material wurden verhindert, indem eine axenische Kultur von *H. indicum* etabliert wurde (siehe Kap. 2.1.4). Dafür wurde MS-Nährmedium (MURASHIGE & SKOOG 1962) verdünnt eingesetzt, um so den natürlichen Standort auf nährstoffarmen tropischen Böden zu simulieren. Des Weiteren wurde eine Analyse auf einen Zelltyp fokussiert, indem von der etablierten axenischen Kultur einzelne Blattepidermiszellen mittels LCM isoliert wurden.

Um erneut cDNA der unteren Blattepidermis mit cDNA der oberen Epidermis

subtraktiv zu hybridisieren (siehe Kap. 2.9.1), wurden die jeweiligen Epidermiszellen mittels LCM präpariert (siehe Kap. 2.7). Die daraus generierte cDNA beider Proben wurde unabhängig von deren Sequenz in ihrer gesamten Länge mit einer PCR amplifiziert. Da die PCR-Methode insbesondere während der stationären Phase anfällig für die Bildung von unspezifischen Produkten und Verfälschung der Mengenverhältnisse verschiedener cDNA-Moleküle ist, wurde der PCR-Zyklus ermittelt, bei dem der Übergang in die stationäre Phase erfolgt. Hierfür wurden Aliquots der PCR nach 15, 20, 25, 27 und 30 Zyklen gelelektrophoretisch untersucht (siehe Abb. 3.11). Bis 27 Zyklen ist noch eine Zunahme der DNA-Menge zu erkennen. Um sicher zu stellen, dass die PCR sich noch in der exponentiellen Phase befindet, wurde die restliche cDNA mit 26 Zyklen amplifiziert. Beide Proben ergeben pro analysiertem Zyklus ungefähr gleich starke Signalintensitäten, sodass gleich konzentrierte cDNA als Ausgangsmenge angenommen werden kann. PCR-Produkte sind dabei zwischen 0,25 und 10 kb mit einem Maximum bei 1 kb im Gel verteilt. Von *Hordeum vulgare* L. ist bekannt, dass amplifizierte RNA dieser Spezies zwischen 300 und 2 000 nt groß ist, mit einem Maximum zwischen 500 und 1 000 nt (THIEL *et al.* 2008). Die Größenverteilung der amplifizierten cDNA von *H. indicum* kann daher wie beobachtet erwartet werden und deutet eine vollständige Repräsentation des untersuchten Transkriptoms an. Das Vorhandensein von cDNA-Fragmenten, die bis zu 10 kb groß sind, bestätigt außerdem eine ausreichende Konservierung des Transkriptoms während der Kryosektionierung und laserunterstützten Mikrodisektion, sodass Transkripte durch RNasen oder Laserenergie anscheinend nicht degradiert wurden.

Die derartig amplifizierte cDNA wurde gereinigt und mit *RsaI* hydrolysiert. Eine subtraktive Hybridisierung wurde mit kleineren hydrolysierten cDNA-Fragmenten vorgenommen, weil hierdurch sterische Hinderungen weniger zum Tragen kommen und eine unspezifische Hybridisierung von ähnlichen cDNA-Molekülen einer Genfamilie unwahrscheinlicher wird. Nach einer Agarosegelelektrophorese (siehe Abb. 3.12A) ist eine durch die Restriktion resultierende Verschiebung der Größenverteilung zu sehen. Fragmente weisen erwartungsgemäß eine deutlich kleinere Größe auf.

Für die folgenden Schritte diente die cDNA der unteren Epidermis als *Tester*-Probe für die Subtraktion. Deren DNA-Enden wurden am 5'-Ende mit verschiedenen Adaptern ligiert. Die Präsenz der Adaptermoleküle an den 5'-Enden der *RsaI*-Fragmente wurde mit einer PCR überprüft. Hierfür wurde exemplarisch ACT-codierende cDNA amplifiziert, wobei ein *Forward-Primer* am Adapter 1 beziehungsweise 2R (siehe Abb. 3.10) und ein *Reverse-Primer* (HiACT-R2, siehe Tab. A.2) genspezifisch hybridisierte. Nach gelelektrophoretischer Analyse sind Produkte mit erwarteter Größe zu erkennen: 593 bp für ein ACT-codierendes Fragment mit Adap-

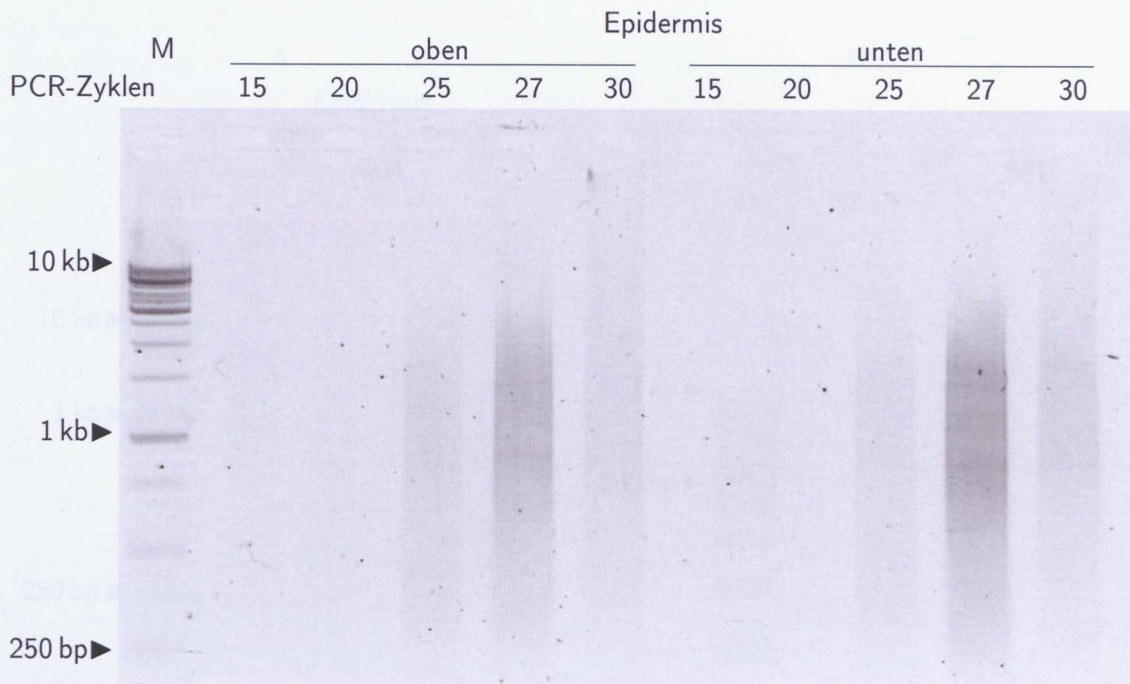


Abbildung 3.11 Amplifizierung von cDNA aus Epidermiszellen. Epidermiszellen der Blattober- und -unterseite von *H. indicum* wurden durch LCM isoliert. Nach Reinigung der Gesamt-RNA wurde daraus cDNA hergestellt und mittels PCR amplifiziert. Damit die PCR vor dem Erreichen der stationären Phase abgebrochen werden konnte, wurde nach 15, 20, 25, 27 und 30 Zyklen ein Aliquot der Produkte mit einem Agarosegel analysiert. M: DNA-Marker.

ter 1 (siehe Abb. 3.12B) und 545 bp für dasselbe Fragment mit Adapter 2R (siehe Abb. 3.12C). Adapter 2R konnte erst mit einer zweiten *nested* PCR und dem *Primer* HiACT-R3 detektiert werden, weshalb dieses PCR-Produkt kleiner ist als das für Adapter 1. Die PCRs zeigen eine erfolgreiche Ligation beider Adapter. Beide Aliquots wurden daraufhin mit der adapterlosen, amplifizierten cDNA der oberen Blattepidermis als *Driver*-Probe subtraktiv hybridisiert.

Nach zwei Hybridisierungsrunden wurde die cDNA der in der unteren Epidermis stärker exprimierten Gene mit zwei aufeinanderfolgenden PCRs amplifiziert, wobei die zweite PCR als eine *nested* PCR mit Produkten der ersten PCR konzipiert wurde. Als Referenz wurde die gleiche cDNA-Probe der unteren Blattepidermis bis auf die subtraktive Hybridisierung identisch behandelt. Nach der ersten PCR sehen die Produkte beider Proben nach einer Agarosegelelektrophorese mehr oder weniger gleich aus (siehe Abb. 3.12D). Unterschiede betreffen hauptsächlich die Größenverteilung der DNA-Fragmente, die in der subtraktiv hybridisierten Probe eine kürzere Maximallänge und längere Minimallänge aufweisen. Nach der zweiten PCR ist eine Ab- beziehungsweise Anreicherung einiger DNA-Fragmente im gezeigten Agarosegel zu erkennen (siehe Abb. 3.12E), das als Folge der Subtraktion interpretiert werden kann und eine höhere Subtraktionseffizienz als bei der ersten SSH-Bank andeutet.

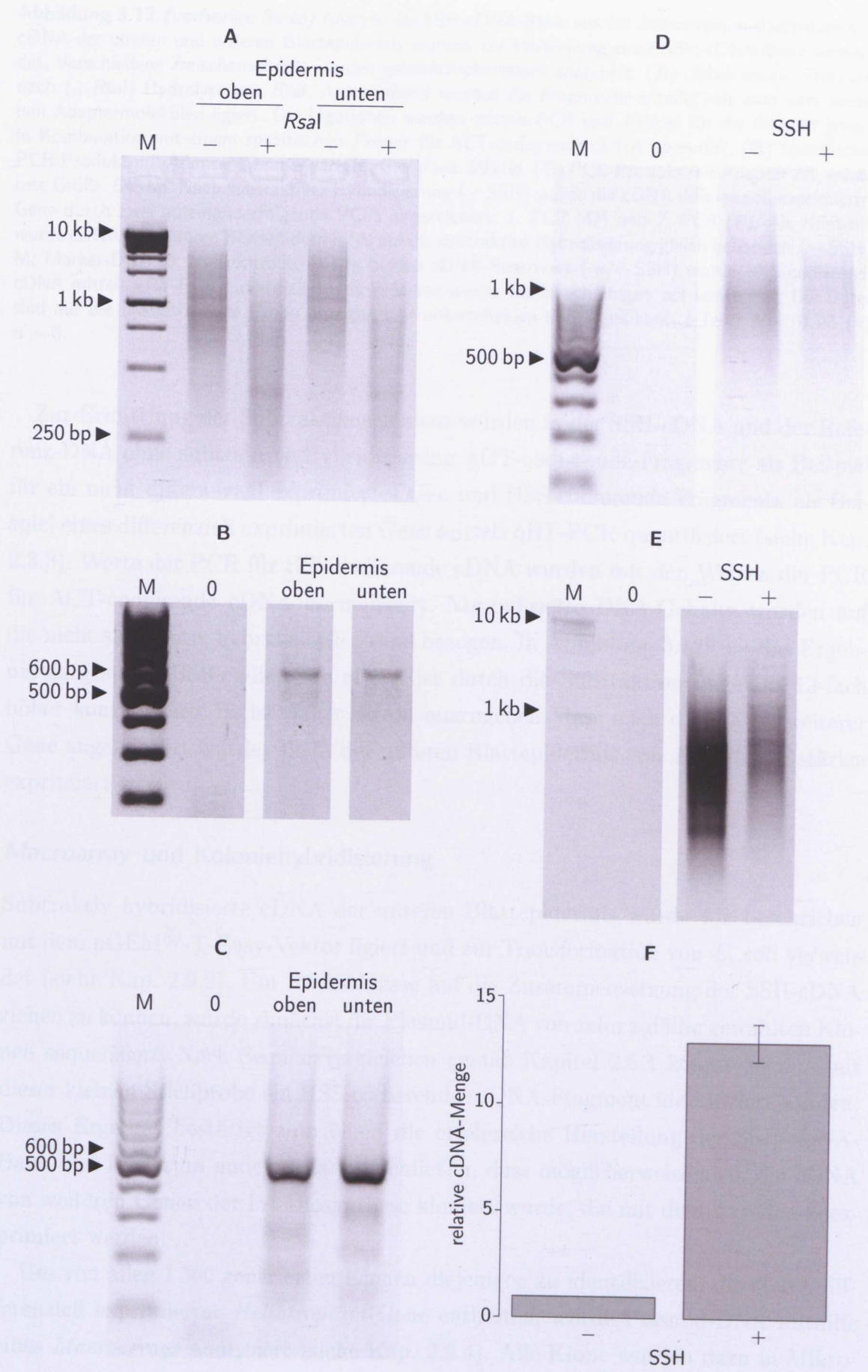


Abbildung 3.12 (vorherige Seite) Analyse der SSH-cDNA-Bank aus der *Heliotropium*-Blattepidermis. cDNA der oberen und unteren Blattepidermis wurden zur Herstellung einer SSH-cDNA-Bank verwendet. Verschiedene Zwischenschritte wurden gelelektrophoretisch analysiert. (A) cDNA vor ($-$ *Rsa*I) und nach ($+$ *Rsa*I) Hydrolyse mit *Rsa*I. Anschließend wurden die Fragmente anteilig mit zwei verschiedenen Adaptermolekülen ligiert. Die Ligationen wurden mittels PCR und *Primer* für die Adapter jeweils in Kombination mit einem spezifischen *Primer* für ACT-codierende cDNA überprüft. (B) Spezifisches PCR-Produkt mit Adapter 1 und erwarteter Größe von 593 bp. (C) PCR-Produkt mit Adapter 2R, erwartete Größe: 545 bp. Nach subtraktiver Hybridisierung ($+$ SSH) wurde die cDNA differenziell exprimierter Gene durch zwei aufeinanderfolgende PCRs angereichert: 1. PCR (D) und 2. PCR (E). Als Kontrolle wurde cDNA der unteren Blattepidermis bis auf die subtraktive Hybridisierung gleich behandelt ($-$ SSH), M: Marker-DNA, 0: Nullkontrolle. (F) In beiden cDNA-Reservoirs ($+/ -$ SSH) wurde HSS-codierende cDNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Als Referenz wurde das Haushaltsgen *act* verwendet. Die Daten sind auf die unsubtrahierte Probe bezogen und unterscheiden sich signifikant, t-Test: $P < 0,05$ (*), $n = 3$.

Zur Ermittlung der Subtraktionseffizienz wurden in der SSH-cDNA und der Referenz-DNA ohne subtraktive Hybridisierung ACT-codierende Fragmente als Beispiel für ein nicht differenziell exprimiertes Gen und HSS-codierende Fragmente als Beispiel eines differenziell exprimierten Gens mittels qRT-PCR quantifiziert (siehe Kap. 2.3.3). Werte der PCR für HSS-codierende cDNA wurden mit den Werten der PCR für ACT-codierende cDNA normalisiert. Normalisierte DNA-Gehalte wurden auf die nicht subtraktiv hybridisierte Probe bezogen. In Abbildung 3.12F ist das Ergebnis dargestellt. HSS-codierende cDNA ist durch die Subtraktion ungefähr 13-fach höher konzentriert. Es ist daher davon auszugehen, dass auch die cDNA weiterer Gene angereichert wurde, die in der unteren Blattepidermis von *H. indicum* stärker exprimiert werden.

Macroarray und Koloniehybridisierung

Subtraktiv hybridisierte cDNA der unteren Blattepidermis wurde wie beschrieben mit dem pGEM[®]-T-Easy-Vektor ligiert und zur Transformation von *E. coli* verwendet (siehe Kap. 2.9.2). Um Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der SSH-cDNA ziehen zu können, wurde zunächst die Plasmid-DNA von zehn zufällig gewählten Klonen sequenziert. Nach Sequenzvergleichen gemäß Kapitel 2.5.1 konnte bereits mit dieser kleinen Stichprobe ein HSS-codierendes cDNA-Fragment identifiziert werden. Dieses Ergebnis bestätigt zum einen die erfolgreiche Herstellung der SSH-cDNA-Bank und lässt zum anderen darauf schließen, dass möglicherweise auch die cDNA von weiteren Genen der PA-Biosynthese kloniert wurde, die mit dem *hss*-Gen koexprimiert werden.

Um von allen 1350 generierten Klonen diejenigen zu identifizieren, die cDNA differenziell exprimierter *Heliotropium*-Gene enthalten, wurde Plasmid-DNA mithilfe eines *Macroarrays* analysiert (siehe Kap. 2.9.4). Alle Klone wurden dazu in Mikro-

titerplatten kultiviert. Jede Platte enthielt 75 Klone der SSH-Bank und zusätzlich je einen Klon mit *Heliotropium*-cDNA codierend für ACT, EF1a, HSS, UBQ und einen Klon mit leerem pGEM[®]-T-Easy-Vektor ohne Fremd-DNA. In diesem Format wurden alle Klone nacheinander auf je zwei Membranen pro Platte transferiert. Nach Fixierung der Plasmid-DNA wurde je eine Membran mit subtrahierter oder revers-subtrahierter cDNA hybridisiert. Bei der reversen SSH wurden während der Herstellung der SSH-Bank die *Driver*- und *Tester*-Proben vertauscht und analog zur SSH behandelt. In diesem Fall lag cDNA der oberen Blattepidermis vor, in der HSS-codierende Transkripte nicht messbar sind. Die reverse SSH diente daher als Referenzansatz. Die cDNA wurde vor der Hybridisierung mit [α -³²P]dCTP markiert, sodass gebundene Sonden-DNA detektiert werden konnte.

Exemplarisch ist in Abbildung 3.13 das Ergebnis einer Koloniehybridisierung der Klone eines *Macroarrays* gezeigt. Signale aus den Positionen F2, E3 und F10 sind bei Hybridisierung mit SSH-cDNA der unteren Blattepidermis deutlich intensiver als bei Hybridisierung mit SSH-cDNA der oberen Blattepidermis (reverse SSH). Dies deutet darauf hin, dass diese Klone cDNA differenziell exprimierter Gene enthalten. Bei einem Klon mit nachweislich HSS-codierender cDNA (Position H10) sind solche deutlichen Signalunterschiede entgegen der Erwartung jedoch nicht zu beobachten. Dies indiziert, dass unspezifische Hintergrundsignale eventuell vorhandene Unterschiede nivellieren.

Um auch kleinere Unterschiede objektiv als solche zu erkennen, wurden daher die detektierten Signale densitometrisch quantifiziert. Die Daten wurden mit denen von UBQ-codierender cDNA normalisiert und in Relation zu den Werten der Koloniehybridisierung mit SSH-cDNA der oberen Epidermis gesetzt. Quotienten > 1 bezeichnen daher Klone, die möglicherweise *Heliotropium*-cDNA-Fragmente von in der unteren Blattepidermis höher exprimierten Genen enthalten. Dies ist im gezeigten Beispiel bei 22 Klonen der Fall. Darunter befindet sich auch der leere pGEM[®]-T-Easy-Vektor in Position H6. Im Falle der Kontrollen mit den klonierten cDNA-Fragmenten der Haushaltsgene *act*, *ef1a* und *ubq* liegen die Werte zwischen 0,96 und 1 und mit dem differenziell exprimierten *hss*-Gen bei 1,02. Die Kontrollen deuten demnach an, dass die Messwerte keine Relevanz haben.

Zur genaueren Evaluierung der *Macroarray*-Daten wurden die Plasmide aller 1 350 Klone nach SANGER *et al.* (1977) sequenziert, woraus 1 225 Rohsequenzen hervorgingen. Vektor- und Adaptersequenzbereiche wurden wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben entfernt. Anschließend wurden zu den prozessierten Sequenzdaten homologe Sequenzeinträge in der Swiss-Prot-Proteindatenbank mittels BLASTX identifiziert (E-Wert $\leq 10^{-5}$, siehe Kap. 2.5.1). Auf diese Weise wurde die heterologe DNA eini-

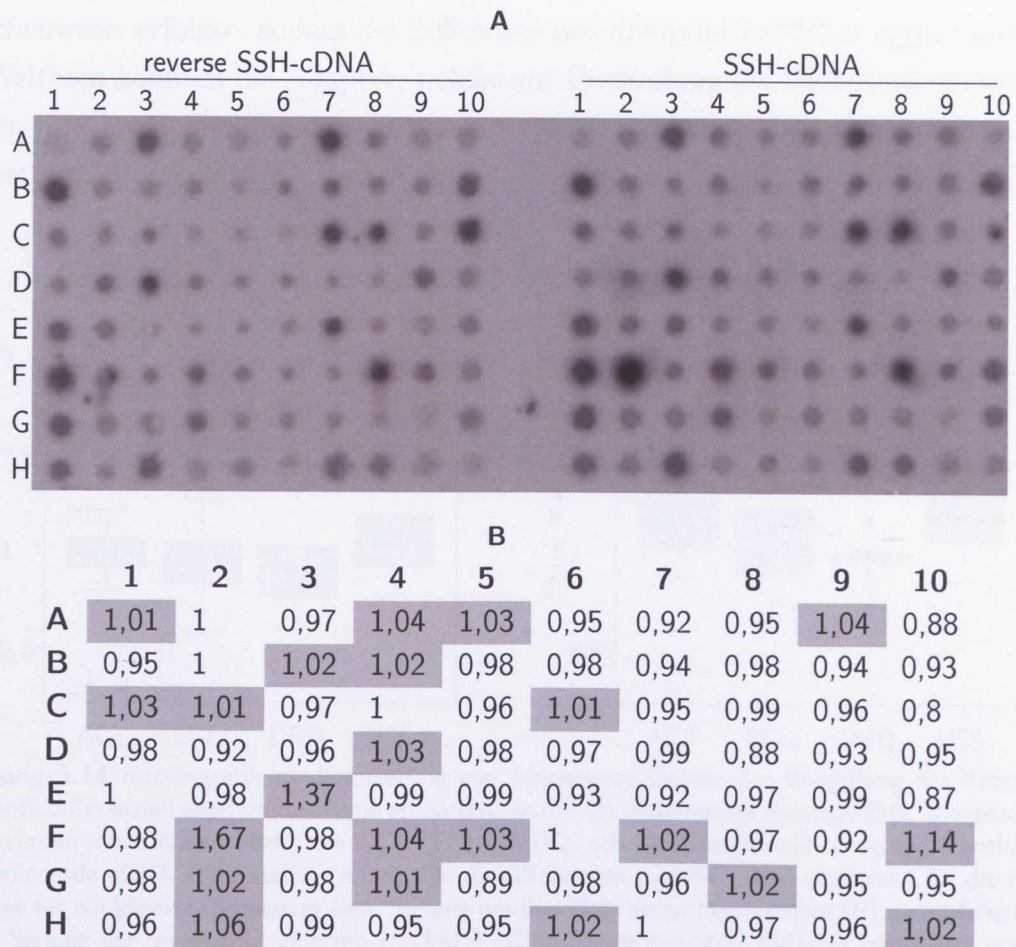


Abbildung 3.13 Exemplarischer *Macroarray* mit Klonen der SSH-Bank von *H. indicum*. **(A)** Zur Ermittlung der Klone, die Fragmente differenziell exprimierter *Heliotropium*-Gene enthalten, wurden Klone in zufälliger Reihenfolge auf zwei Membranen identisch angeordnet. Nach Fixierung ihrer Plasmid-DNA wurde je eine Membran mit subtrahierter oder revers-subtrahierter cDNA hybridisiert, die mit [α - 32 P]dCTP markiert wurde. Bei der reversen SSH wurden die Proben vertauscht und analog zur SSH behandelt, sodass in diesem Fall cDNA der oberen Blattepidermis vorliegt, in der keine HSS-codierende Transkripte zu erwarten sind. An Position H6 ist ein Klon mit leerem Klonierungsvektor, an Position H7 bis H9 sind Klone, die dieser Reihe nach UBQ-, EF1a- und ACT-codierende cDNA-Fragmente enthalten, an Position H10 ist ein Klon mit der kompletten HSS-codierenden cDNA. **(B)** Relative Punktdichte der Signale von dem in **(A)** gezeigten *Macroarray*. Daten wurden gemäß Kapitel 2.9.4 ausgewertet. Werte > 1 deuten daher eine in Relation zur reversen SSH-Bank erhöhte Konzentration in der SSH-Bank an.

ger Klone mit einer putativen Genfunktion annotiert. *Macroarray*-Daten aller Klone mit cDNA codierend für ACT, EF1a, UBQ und HSS wurden aus diesem Datensatz extrahiert und sind vor und nach Normalisierung in Abbildung 3.14 als Kastengrafik dargestellt. Zur Normalisierung wurden die Daten von Klonen mit UBQ-codierenden Fragmenten verwendet. In beiden Fällen sind die Mittelwerte der Signale zwischen den nicht differenziell exprimierten Haushaltsgenen und der differenziell exprimierten *hss* so ähnlich, dass mit der gegebenen Varianz eine verlässliche Kategorisierung einzelner Klone in „gleich“ oder „differenziell exprimiert“ nicht möglich ist. Eine mögliche Ursache könnte in dem Transfer der Klone auf die Membranen liegen, welcher

tröpfchenweise erfolgte, sodass die Zelldichte pro analysiertem Klon stark variierte. Des Weiteren könnten die Adapter, welche zur Herstellung der SSH-Bank verwendet wurden und bei beiden Sonden vorhanden waren, die Koloniehybridisierung unkontrolliert beeinflusst haben.

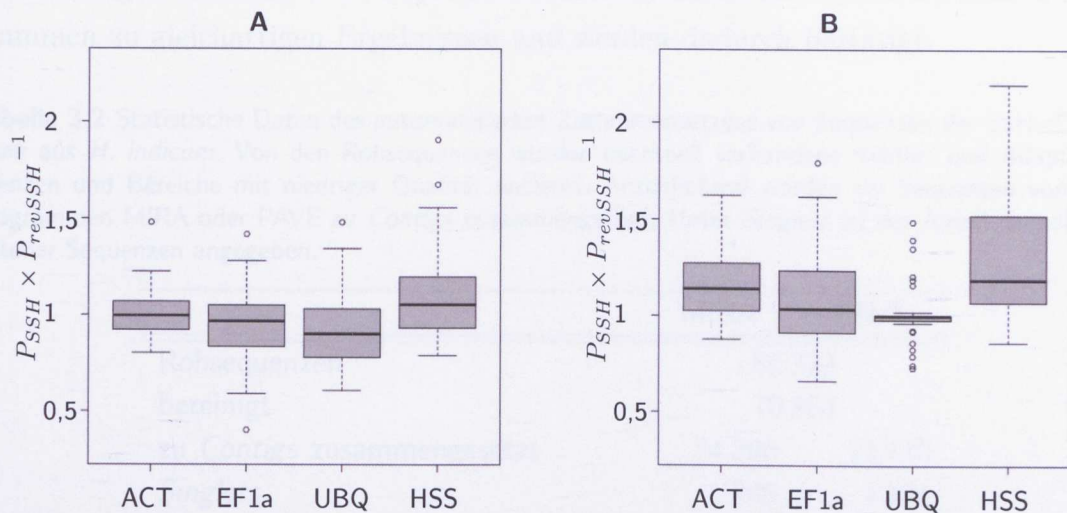


Abbildung 3.14 Kastengrafik zur Evaluierung von *Macroarray*-Daten. Zur Ermittlung der Klone, die Fragmente differenziell exprimierter Gene enthalten, wurde ein *Macroarray* durchgeführt. Die gezeigten Daten wurden mit Klonen erstellt, die ACT-, EF1a-, UBQ- oder HSS-codierende Fragmente enthalten. HSS-codierende cDNA steht stellvertretend für ein differenziell und die cDNA codierend für die Haushaltsgene für ein gleich exprimiertes Gen. Signale wurden über deren Punktdichte (P) quantifiziert und auf die Signale der revers-subtrahierten (revSSH) cDNA-Sonde bezogen. Relative Messwerte vor (A) und nach (B) Normalisierung mit den Daten für das Referenzgen *ubq*. $n \geq 25$.

Sequenzierung

Neben den Sequenzdaten der *E.-coli*-Klone wurden durch Pyrosequenzierung der SSH-cDNA weitere 84 097 Sequenzen generiert (siehe Kapitel 2.9.3). Die Rohsequenzen wurden mit Computer-Programmen automatisiert modifiziert, wodurch Vektor-, Adapter- und Poly-A/T-Sequenzbereiche sowie Bereiche mit niedriger Qualität größtenteils entfernt wurden. Anschließend wurden die Sequenzen mit MIRA oder PAVE zu sogenannten *Contigs* zusammengesetzt.

Die Ergebnisse der verschiedenen Algorithmen unterscheiden sich ein wenig (siehe Tab. 3.2). PAVE berechnet 992 *Contig*-Sequenzen weniger und verwendet dafür auch weniger der bereinigten Rohsequenzen (circa 91%). MIRA benutzt dagegen circa 94,2% der Rohsequenzen. HSS-codierende *Contigs* werden analog dazu ebenfalls weniger von PAVE generiert. Der bedeutendste Unterschied ist bei der Anzahl der nicht zusammengeführten Sequenzen (*Singlets*) zu sehen, welche durch MIRA mit 745 *Singlets* ungefähr zehnmal kleiner ist als durch PAVE. Etwa 4,8% der Sequenzen wurden von MIRA aussortiert, die unter anderem repetitive Elemente enthalten

und ein automatisiertes Zusammenfügen stören würden. Zusammengenommen weisen diese Zahlen auf einen weniger stringenten Algorithmus von PAVE hin. Die *Contig*-Größen erstrecken sich von 70 bis 1461 Nukleotiden und weisen unabhängig vom verwendeten Programm eine normale Verteilung auf (siehe Abb. 3.15). Die Berechnungen der Konsensus-Sequenzen führen demnach mit unterschiedlichen Programmen zu gleichartigen Ergebnissen und werden dadurch bestätigt.

Tabelle 3.2 Statistische Daten des automatisierten Zusammensetzens von Sequenzen der SSH-cDNA-Bank aus *H. indicum*. Von den Rohsequenzen wurden eventuell vorhandene Vektor- und Adaptersequenzen und Bereiche mit niedriger Qualität entfernt. Anschließend wurden die Sequenzen von den Programmen MIRA oder PAVE zu *Contigs* zusammengesetzt. Unter *Singlets* ist der Anteil einmal vortretener Sequenzen angegeben.

	MIRA	PAVE
Rohsequenzen	85 322	
bereinigt	78 864	
zu <i>Contigs</i> zusammengesetzt	74 296	71 730
<i>Singlets</i>	745	7 134
<i>Contigs</i>	8 757	7 765
durchschnittliche <i>Contig</i> -Größe [nt]	396	396
kleinstes <i>Contig</i> [nt]	70	93
größtes <i>Contig</i> [nt]	1 461	1 436
Gesamt- <i>Contig</i> -Konsensus [nt]	3 468 827	3 075 151
Gesamt-Konsensus [nt]	3 678 726	4 740 555
Gesamt-Sequenzen	9 502	14 899
HSS-codierende <i>Contigs</i>	16	6

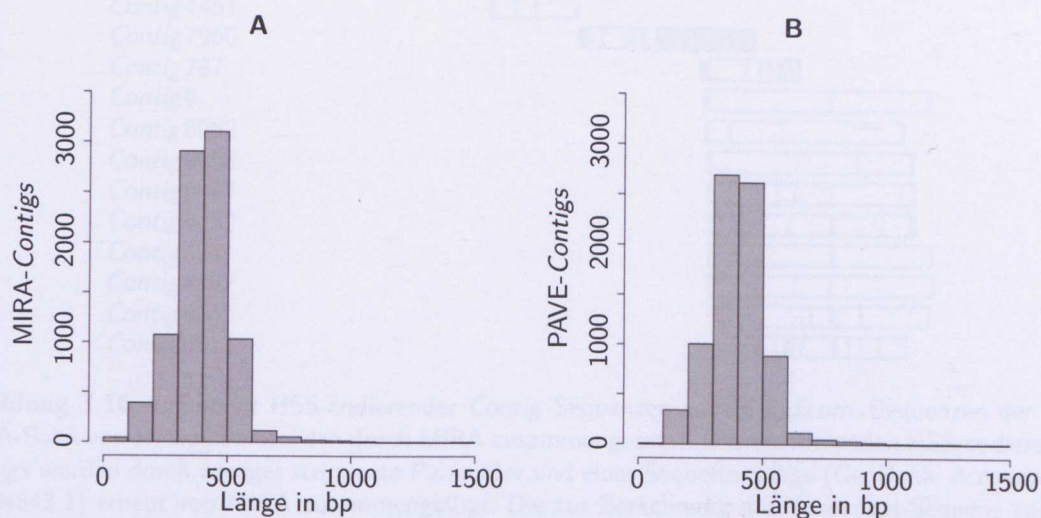


Abbildung 3.15 Häufigkeitsverteilung der *Contig*-Größen von *H. indicum*. Nach Pyrosequenzierung der SSH-cDNA-Bank von *H. indicum* wurden Sequenzen mit MIRA (A) oder PAVE (B) zu *Contigs* zusammengesetzt. Dargestellt sind die Häufigkeiten der verschiedenen *Contig*-Größen.

Um das automatisierte Zusammenfügen von Sequenzen an einem konkreten Beispiel zu überprüfen, wurden *Contig*-Sequenzen mit der publizierten HSS- (*Accession*-Nr. AJ704843.1) und der zu ihr paralogen DHS-codierenden (*Accession*-Nr. AJ704844.1) cDNA-Sequenz von *H. indicum* verglichen (REIMANN *et al.* 2004). Insgesamt 16 MIRA-generierte Sequenzen wurden durch BLASTN identifiziert (E-Wert $\leq 10^{-20}$, siehe Kap. 2.5.1), die alle eine größere Ähnlichkeit zur HSS- (89,9–100%) als zur DHS-codierenden (78,2–84,6%) Datenbank-Sequenz aus *H. indicum* aufweisen. Diese identifizierten Fragmente scheinen demnach alle für ein Protein mit HSS-Aktivität zu codieren und sind entweder Produkte desselben Genlokus oder einer Genfamilie. Um Hinweise auf die Ursache eines nicht erfolgten Zusammenfügens dieser ähnlichen, vermutlich HSS-codierenden Sequenzen zu bekommen, wurden diese *Contigs* mit der HSS-codierenden GenBank-Sequenz als Vorlage unter weniger stringenten Parametern erneut mit dem MIRA-Algorithmus zusammengefügt. Das Ergebnis ist in *Abbildung 3.16* schematisch dargestellt und zeigt, dass zum einen fehlende überlappende Sequenzbereiche und zum anderen unterschiedliche Nukleotide an einigen *Alignment*-Positionen ein stringentes Zusammenfügen ohne Sequenzvorlage verhindern.

Eine unterschiedliche Nukleotidzusammensetzung der HSS-codierenden Sequen-

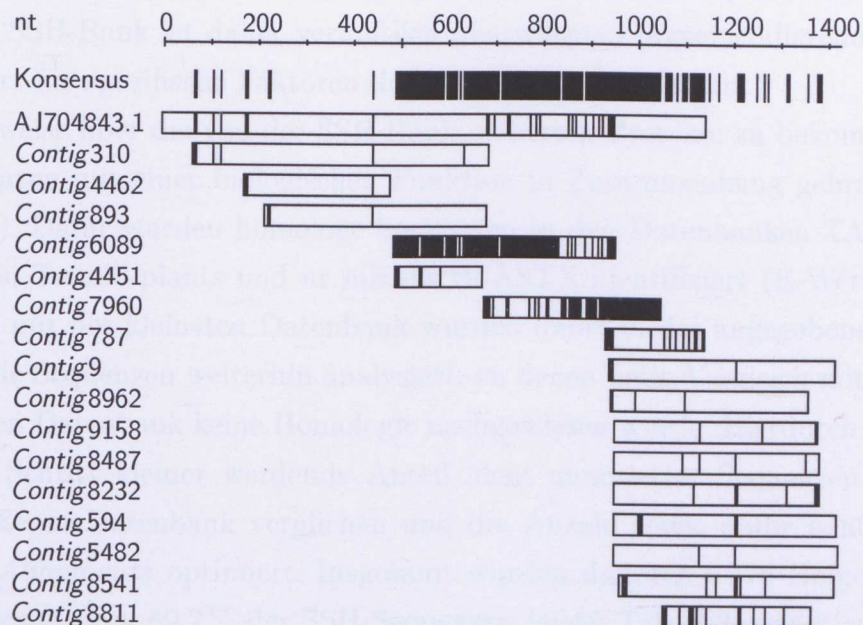


Abbildung 3.16 *Alignment* HSS-codierender *Contig*-Sequenzen aus *H. indicum*. Sequenzen der SSH-cDNA-Bank von *H. indicum* wurden durch MIRA zusammengesetzt. Die resultierenden HSS-codierenden *Contigs* wurden durch weniger stringente Parameter und einer Sequenzvorlage (GenBank-*Accession*-Nr. AJ704843.1) erneut von MIRA zusammengefügt. Die zur Berechnung der Konsensus-Sequenz zugrundeliegenden *Alignments* sind schematisch dargestellt. *Alignment*-Positionen mit unterschiedlichen Nukleotiden zur Konsensus-Sequenz sind durch schwarze Linien symbolisiert.

zen könnte bedingt durch die Methoden zur Herstellung der SSH-Bank durchaus artifiziellen Ursprungs sein: UV-Mutagenese durch die LCM, unspezifische polymerasekatalysierte Reaktionen, eine Ligation zwischen zwei cDNA-Fragmenten statt mit je einem cDNA- und Adaptermolekül (vermutlich die Ursache für *Contig6089* und *Contig7960*), noch vorhandene kurze Sequenzreste der Adapter und unterschiedlich lange Poly-A-Bereiche hervorgerufen durch Sequenzierfehler der untranslatierten Region (UTR) des 3'-Endes. Ab welchem Grad Unterschied ein artifizieller Ursprung ausgeschlossen werden kann, erscheint dabei willkürlich, sodass die beobachteten Unterschiede auch nativen Ursprungs von Isoformen einer Genfamilie sein könnten. Damit natürlich vorkommende Sequenzunterschiede von den Daten repräsentiert werden, wurde für weitere Analysen auf ein Zusammenfügen mit weniger stringenter Parametern verzichtet.

Alle HSS-codierenden *Contig*-Sequenzen sind in der hergestellten SSH-cDNA-Bank mit 266 Rohsequenzen vertreten, DHS-codierende Sequenzen sind dagegen nicht vorhanden. Da die DHS als relativ stabil exprimiert angesehen werden kann (siehe Diskussion in Kapitel 4.4.1), deutet dies erneut eine erwartete cDNA-Anreicherung eines differenziell (*hss*) und eine Abreicherung eines indifferent exprimierten Gens (*dhs*) in der SSH-Bank an. Außerdem zeigt Abbildung 3.16, dass auch der 5'-Transkriptbereich durch die *Contigs* 310, 4462, 893 und 4451 repräsentiert wird. Die cDNA der SSH-Bank ist daher vermutlich überwiegend proteincodierend und zwar angereichert für spezifische Faktoren der unteren Blattepidermis.

Um Hinweise über die von der SSH-Bank codierten Proteine zu bekommen, wurden Sequenzen mit einer biologischen Funktion in Zusammenhang gebracht (siehe Kap. 2.5.1). Dafür wurden homologe Sequenzen in den Datenbanken TAIR, Swiss-Prot-plants, Trembl-plants und nr mittels BLASTX identifiziert ($E\text{-Wert} \leq 10^{-5}$). Beginnend mit der kleinsten Datenbank wurden dabei in der angegebenen Reihenfolge nur die Sequenzen weiterhin analysiert, zu denen beim Vergleich mit der zuvor verwendeten Datenbank keine Homologie nachgewiesen wurde. Hierdurch wurde der bei jedem Schritt kleiner werdende Anteil nicht annotierter Sequenzen mit einer immer größeren Datenbank verglichen und die Anzahl sowie dafür benötigte Zeit sinnvoller *Alignments* optimiert. Insgesamt wurden dadurch 6576 Homologe identifiziert, sodass circa 69,2% der SSH-Sequenzen (siehe Tab. 3.2) annotiert wurden. Die meisten BLASTX-Treffer haben dabei einen E-Wert zwischen 10^{-20} und 10^{-40} und die meisten BLASTX-*Alignments* weisen eine Identität von 70 bis 75% auf (siehe Abb. 3.17A und B), sodass BLAST-Treffer tatsächlich und nicht zufällig von homologen Sequenzen zu stammen scheinen.

Des Weiteren wurden SSH-Sequenzen für eine funktionelle Kategorisierung nach

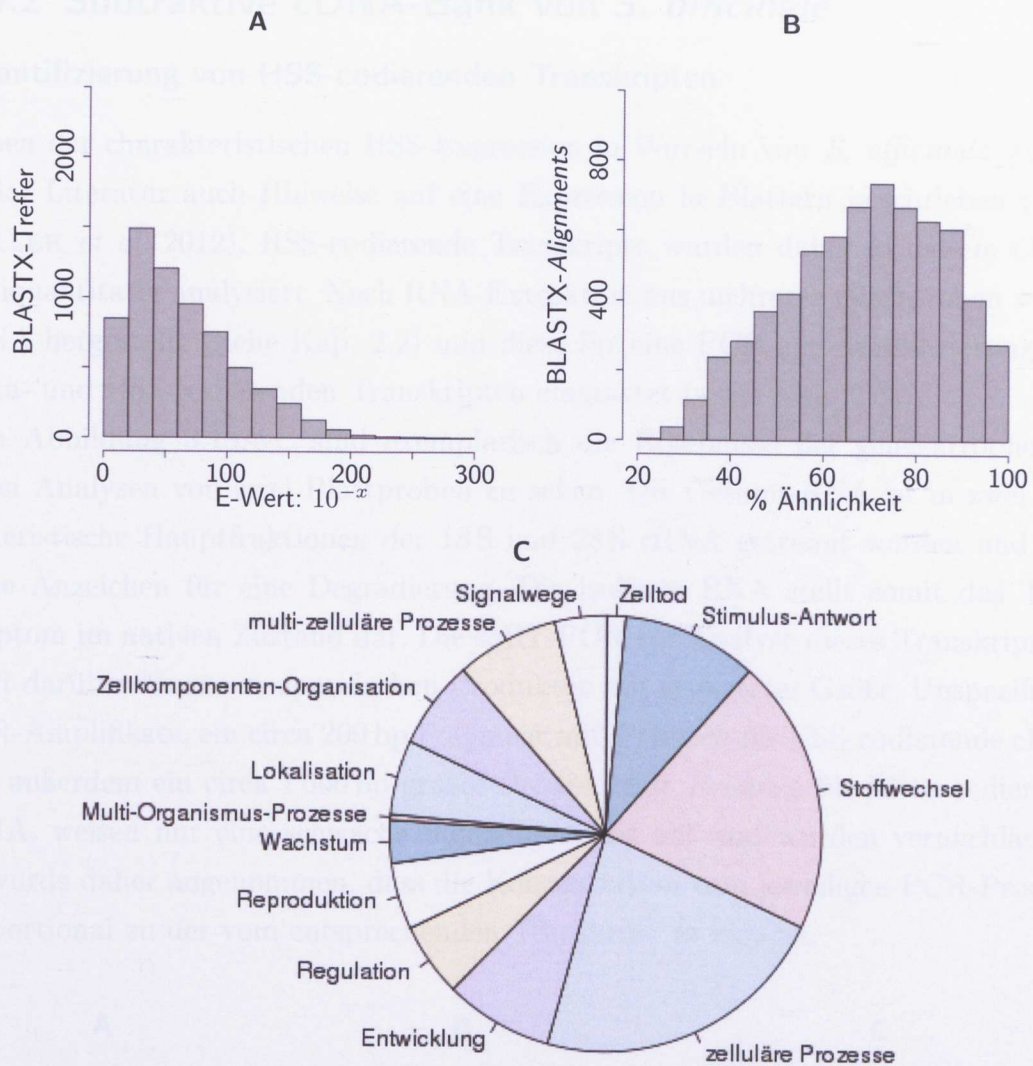


Abbildung 3.17 Histogramme zur Annotierung von *Heliotropium*-Sequenzen der SSH-Bank. Sequenzen einer subtraktiven cDNA-Bank, hergestellt aus der unteren Blattepidermis von *H. indicum*, wurden mit BLASTX und Blast2GO[®] analysiert. (A) Anzahl der jeweils signifikantesten BLASTX-Treffer mit einem bestimmten E-Wert. (B) Anzahl der BLASTX-Alignments mit einer bestimmten Identität. (C) Anzahl GO-Terme, denen biologische Prozesse zugeordnet werden.

der Gen-Ontologie von ASHBURNER *et al.* (2000) mit Blast2GO[®] annotiert, wodurch die von der SSH-Bank repräsentierten biologischen Funktionen übersichtlich dargestellt werden können. Insgesamt wurden dabei 49,5% mit GO-Termen assoziiert. Eine Verteilung der GO-Terme für biologische Prozesse ist in Abbildung 3.17C gezeigt. Die meisten Sequenzen der SSH-Bank scheinen Stoffwechselprozesse und zelluläre Prozesse zu betreffen.

3.4.2 Subtraktive cDNA-Bank von *S. officinale*

Quantifizierung von HSS-codierenden Transkripten

Neben der charakteristischen HSS-Expression in Wurzeln von *S. officinale* werden in der Literatur auch Hinweise auf eine Expression in Blättern beschrieben (NIE-MÜLLER *et al.* 2012). HSS-codierende Transkripte wurden daher in diesem Organ semiquantitativ analysiert. Nach RNA-Extraktion aus mehreren Blattproben wurde cDNA hergestellt (siehe Kap. 2.2) und diese für eine PCR zur Amplifizierung von EF1a- und HSS-codierenden Transkripten eingesetzt (siehe Kap. 2.3).

In Abbildung 3.18A-C sind exemplarisch die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Analysen von zwei Blattproben zu sehen. Die Gesamt-RNA ist in zwei charakteristische Hauptfraktionen der 18S und 28S rRNA getrennt worden und gibt keine Anzeichen für eine Degradierung. Die isolierte RNA stellt somit das Transkriptom im nativen Zustand dar. Die sqRT-PCR zur Analyse dieses Transkriptoms führt darüber hinaus zu spezifischen Produkten mit erwarteter Größe. Unspezifische PCR-Amplifikate, ein circa 200 bp Fragment mit *Primern* für HSS-codierende cDNA und außerdem ein circa 1 000 bp großes Produkt mit *Primern* für EF1a-codierende cDNA, weisen nur eine schwache Signalintensität auf und wurden vernachlässigt. Es wurde daher angenommen, dass die Konzentration vom jeweiligen PCR-Produkt proportional zu der vom entsprechenden Transkript *in vivo* ist.



Abbildung 3.18 Relative Mengen HSS-codierender Transkripte in Blättern von *S. officinale*. Beispielhaft sind die Analysen zweier Blattproben (1) und (2) mittels Agarosegelelektrophorese gezeigt. (A) Gesamt-RNA enthält klar voneinander getrennte 18S und 28S rRNA. (B) EF1a-codierende PCR-Produkte (145 bp) zeigen annähernd gleich starke Signale. (C) HSS-codierende Amplifikate (543 bp) sind dagegen nur in einer der gezeigten Proben (2) detektierbar. M: DNA-Marker, 0: Nullkontrolle.

Die Ergebnisse zeigen einen ähnlichen Gehalt EF1a-codierender Transkripte in allen Proben. Leichte Schwankungen, die im Agarosegel vor allem bei der Gesamt-RNA zu sehen sind, lassen auf nur leicht unterschiedlich eingesetzte Ausgangsmengen schließen. HSS-codierende Transkripte lassen sich dagegen nicht in allen gezeigten

Proben detektieren. Dabei enthielten Blätter, die sich direkt unterhalb einer Infloreszenz mit noch geschlossenen Blütenknospen befanden, mehrheitlich HSS-codierende Transkripte. Abgebildet sind die beiden Proben mit dem stärksten gemessenen Unterschied. Da dieser Unterschied sehr deutlich und konsistent zu den Beschreibungen von NIEMÜLLER *et al.* (2012) ist, wurden leichte Ungenauigkeiten der Ausgangsmengen und PCR-Spezifität nicht weiter beachtet.

Herstellung einer organspezifischen SSH-Bank aus Blatt-cDNA

Von HSS-exprimierenden *Symphytum*-Blättern wurde eine organspezifische SSH-cDNA-Bank generiert (siehe Kap. 2.9.1). Dabei wurde Blatt-cDNA der sogenannten *Tester*-Probe mit HSS-Expression subtraktiv mit cDNA der *Driver*-Probe hybridisiert, in denen keine HSS-codierenden Transkripte zu detektieren waren (siehe Kap. 3.4).

Symphytum-Blattproben, die während einer sqRT-PCR den höchsten oder keinen detektierbaren Gehalt HSS-codierender Transkripte aufwiesen, wurden zu einer *Driver* beziehungsweise *Tester*-Probe vereinigt. Gesamt-RNA wurde extrahiert und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Die abgebildete RNA (siehe Abb. 3.19A) ähnelt der RNA bereits untersuchter Blattproben aus *S. officinale* (siehe Abb. 3.18) und lässt keine Degradierung der RNA erkennen. Der Anteil der polyadenylierten Fraktion wurde durch Affinitätsreinigung an magnetisch fixierten Polythymidin-Oligonukleotiden erhöht, sodass die abundante rRNA, wie in Abbildung 3.19B zu erkennen, abgereichert und proteincodierende mRNA angereichert wurde.



Abbildung 3.19 Isolierung der polyadenylierten RNA-Fraktion aus Blättern von *S. officinale*. Blattproben, die zur Herstellung einer subtraktiven cDNA-Bank verwendet wurden, sind als *Driver* und *Tester* bezeichnet. Nach Isolierung der Gesamt-RNA (A) wurde die proteincodierende mRNA mit Polythymidin-Oligonukleotiden in beiden Proben angereichert, sodass der Gehalt an 18S und 28S rRNA verringert wurde (B).

Aus der angereicherten mRNA wurde cDNA synthetisiert und diese, wie für die SSH-cDNA-Bank aus der *Heliotropium*-Blattepidermis bereits ausführlich beschrieben, subtraktiv hybridisiert (vergleiche Kap. 3.4.1). Eine *RsaI*-Restriktion zur Verbesserung der Hybridisierungskinetik und anschließende Adapterligation wurden wie für die *Heliotropium*-Bank überprüft und als ausreichend befunden. Schließlich wurden die Adaptermoleküle genutzt, um die cDNA differenziell exprimierter Gene selektiv mit zwei PCRs zu amplifizieren, wobei die zweite PCR als eine *nested* PCR mit Produkten der ersten PCR konzipiert wurde. Das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese beider PCR-Produkte ist in Abbildung 3.20 zu sehen. Als Referenz wurde cDNA der HSS-exprimierenden Blätter bis auf die subtraktiven Hybridisierungen gleich behandelt. Amplifizierte cDNA-Fragmente sind sowohl mit als auch ohne subtraktive Hybridisierung nach beiden PCRs zwischen 0,25 und 3 kb groß. Die meisten Fragmente sind etwas kleiner als 0,75 kb. Dies entspricht einer sinnvollen cDNA-Größe wie sie auch mit ähnlicher Dimension bei anderen Organismen wie zum Beispiel *H. indicum* (siehe Kap. 3.4.1) oder *H. vulgare* (THIEL *et al.* 2008) beobachtet wurde. Unterschiedliche Größen sind dabei in der subtraktiv hybridisierten cDNA als Resultat eines Normalisierungseffekts der SSH-PCRs gleichmäßiger vertreten als in der cDNA ohne subtraktive Hybridisierung.

Mit der gelelektrophoretischen Analyse kann bereits eine Abreicherung bestimmter cDNA-Moleküle durch die subtraktive Hybridisierung erahnt werden, da cDNA-Größen in ihrer jeweiligen Häufigkeit bei beiden Proben anders verteilt sind. Zur ge-



Abbildung 3.20 Analyse der SSH-Bank aus Blatt-cDNA von *S. officinale*. Blattproben, in denen HSS-codierende Transkripte entweder vorhanden oder nicht detektierbar sind, wurden zur Herstellung einer subtraktiven cDNA-Bank verwendet. Nach subtraktiver Hybridisierung (+ SSH) wurde die cDNA differenziell exprimierter Gene spezifisch in zwei aufeinanderfolgenden PCRs (A) und (B) amplifiziert. Eine gleich behandelte Kontrolle (- SSH) wurde nicht subtraktiv hybridisiert. HSS-codierende cDNA wurde anschließend mittels qRT-PCR relativ quantifiziert (C). Als Referenz wurde die unsubtrahierte Probe verwendet, welche den rechnerischen Wert 1 erhält. Die Daten sind auf die Transkriptmenge des Haushaltgens *act* normalisiert, t-Test: $P < 0,05$ (*), $n = 3$. M: Marker-DNA, 0: Nullkontrolle.

naueren Analyse wurden HSS-codierende Fragmente mittels qRT-PCR relativ quantifiziert, wobei die cDNA-Menge ACT-codierender Transkripte zur Standardisierung verwendet wurde (siehe Kap. 2.3.3). HSS-spezifische cDNA konnte als Beispiel für ein differenziell exprimiertes Gen durch die Subtraktion um den Faktor von etwa 1 500 angereichert werden.

Sequenzierung

Die SSH-cDNA wurde zunächst stichprobenartig nach SANGER *et al.* (1977) sequenziert. Die cDNA-Fragmente wurden dafür in den pGEM[®]-T-Easy-Vektor kloniert und von 115 zufällig gewählten Klonen sequenziert (siehe Kap. 2.9.2). Aus einer BLASTX-Analyse gingen 83 Treffer zu pflanzlichen Homologen aus der Swiss-Prot-Datenbank hervor (E-Wert $\leq 10^{-5}$, siehe Kap. 2.5.1). Extrapoliert für die gesamte SSH-Bank bedeutet das einen Anteil proteincodierender Sequenzen von ungefähr 72%, zu denen in Datenbanken Homologe identifiziert werden können. Unter diesen Proteinen befinden sich wahrscheinlich auch Faktoren des PA-Stoffwechsels. Um möglichst alle unterschiedlichen cDNA-Sequenzen zu identifizieren, wurde die SSH-cDNA durch die sogenannte 454-Technik mit einer höheren Abdeckung sequenziert, als es durch die SANGER-Technik erreichbar wäre (siehe Kapitel 2.9.3).

Die 97 217 Rohsequenzen der *Symphytum*-Bank wurden analog zu den SSH-Sequenzen der *Heliotropium*-Bank bereinigt. Hierdurch wurden Vektor-, Adapter- und Poly-A/T-Sequenzbereiche sowie Bereiche mit niedriger Qualität größtenteils entfernt. Anschließend wurden 92,6% der bereinigten Sequenzen mit dem Programm MIRA zu 5 802 *Contigs* zusammengefügt (siehe Tab. 3.3). Die Größen sind mit einem Maximum von 1 294 nt und einer durchschnittlichen Größe von 444 nt normal verteilt (siehe Abb. 3.21). 2 125 Sequenzen sind in dem Datensatz mit nur einer Rohsequenz vertreten. Demnach wurden 4 317 (circa 5%) der bereinigten Rohsequenzen aussortiert, die die gesetzten Standard-Qualitätskriterien von MIRA nicht erfüllten. Darunter befinden sich Sequenzen, die unter anderem repetitive Elemente artifizialen oder nativen Ursprungs enthalten und sich auf ein automatisiertes Zusammenfügen störend auswirken.

Um das Ergebnis des automatisierten Zusammenfügens besser beurteilen zu können, wurden wie für die Sequenzen von *H. indicum* die gereinigten Rohsequenzen mit dem alternativen Algorithmus von PAVE zusammengesetzt. Die unterschiedlichen Berechnungsmethoden machen sich ähnlich bemerkbar wie bei *H. indicum* (siehe Kap. 3.4.1). Es entstehen durch PAVE weniger *Contigs* sowie mehr *Singlets* als durch MIRA und die *Contig*-Größen sind ähnlich normal verteilt (siehe Tab. 3.3 und Abb. 3.21). Dies weist erneut auf eine weniger stringente Berechnung durch

Tabelle 3.3 Statistische Daten des Zusammenfügens von Sequenzen der SSH-cDNA-Bank aus *S. officinale*. Von den Rohsequenzen wurden eventuell vorhandene Vektor- und Adaptersequenzen und Bereiche mit niedriger Qualität in mehreren Schritten entfernt. Anschließend wurden die Sequenzen von den Programmen MIRA oder PAVE zu *Contigs* zusammengefügt. Sequenzen ohne Ähnlichkeiten zu anderen sind als *Singlets* bezeichnet.

	MIRA	PAVE
Rohsequenzen	97 217	
bereinigt	87 563	
zu <i>Contigs</i> zusammengesetzt	81 121	82 642
<i>Singlets</i>	2 125	4 921
<i>Contigs</i>	5 802	4 538
durchschnittliche <i>Contig</i> -Größe [nt]	444	440
kleinstes <i>Contig</i> [nt]	71	95
größtes <i>Contig</i> [nt]	1 294	1 348
Gesamt- <i>Contig</i> -Konsensus [nt]	2 573 218	1 998 552
Gesamt-Konsensus [nt]	3 272 253	3 005 709
Gesamt-Sequenzen	7 927	9 459
HSS-codierende <i>Contigs</i>	4	2

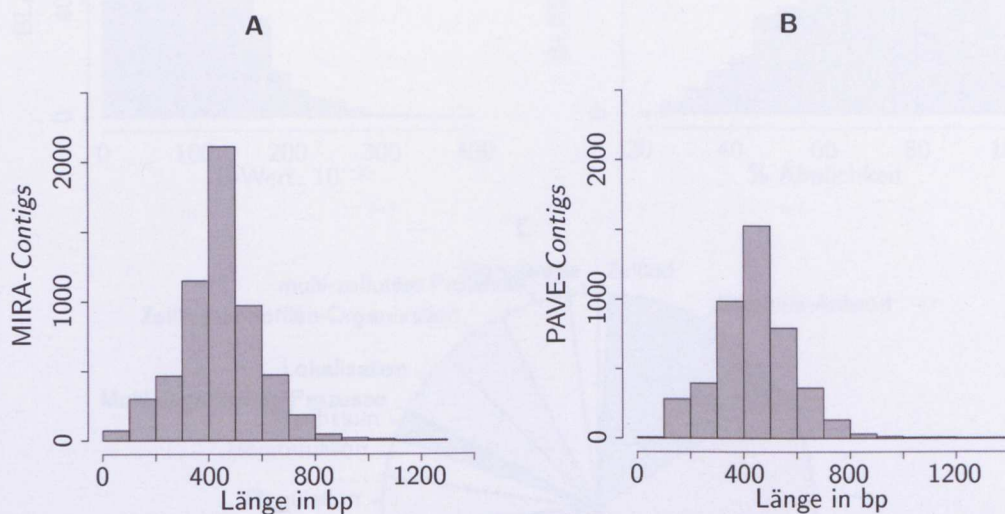


Abbildung 3.21 Häufigkeitsverteilung von *Contig*-Größen der SSH-Bank aus *S. officinale*. Sequenzen einer SSH-cDNA-Bank wurden mit MIRA (A) oder PAVE (B) zu *Contigs* zusammengefügt. Dargestellt sind die Häufigkeiten der verschiedenen *Contig*-Größen.

PAVE hin, sodass ähnliche Sequenzen mit einem niedrigeren Identitätswert schon zu *Contigs* zusammengefügt wurden. Weil durch einen zu niedrigen Schwellenwert für die Minimum-Identität, ab dem zwei Sequenzen zusammengefügt werden, die Information über Isoformen verloren gehen könnte und dieser Wert aufgrund fehlender Vorlage-Sequenzen, zum Beispiel aus einer Genomdatenbank, nicht optimiert werden kann, wurden für weitere Analysen stringent zusammengefügte Sequenzen

verwendet.

Mittels BLASTX wurden Homologe in den Datenbanken TAIR, Swiss-Prot-plants, Trembl-plants und nr identifiziert (siehe Kap. 2.5.1). Der E-Wert und die Identität der meisten Aminosäure-Alignments weisen auf sinnvolle BLASTX-Treffer hin (siehe Abbildung 3.22A und B). Auf diese Weise wurden 83,1% der *Contigs* und *Singlets* mit einer putativen Funktion annotiert. Durch eine Annotierung mittels Blast2GO[®] wurden 70,2% der Sequenzen mit Termen der Gen-Ontologie (ASHBURNER *et al.* 2000) assoziiert. Eine grafische Darstellung der Häufigkeit verschiedener Terme ist in Abbildung 3.22C gezeigt und gibt einen Überblick über die Art und Anzahl der in

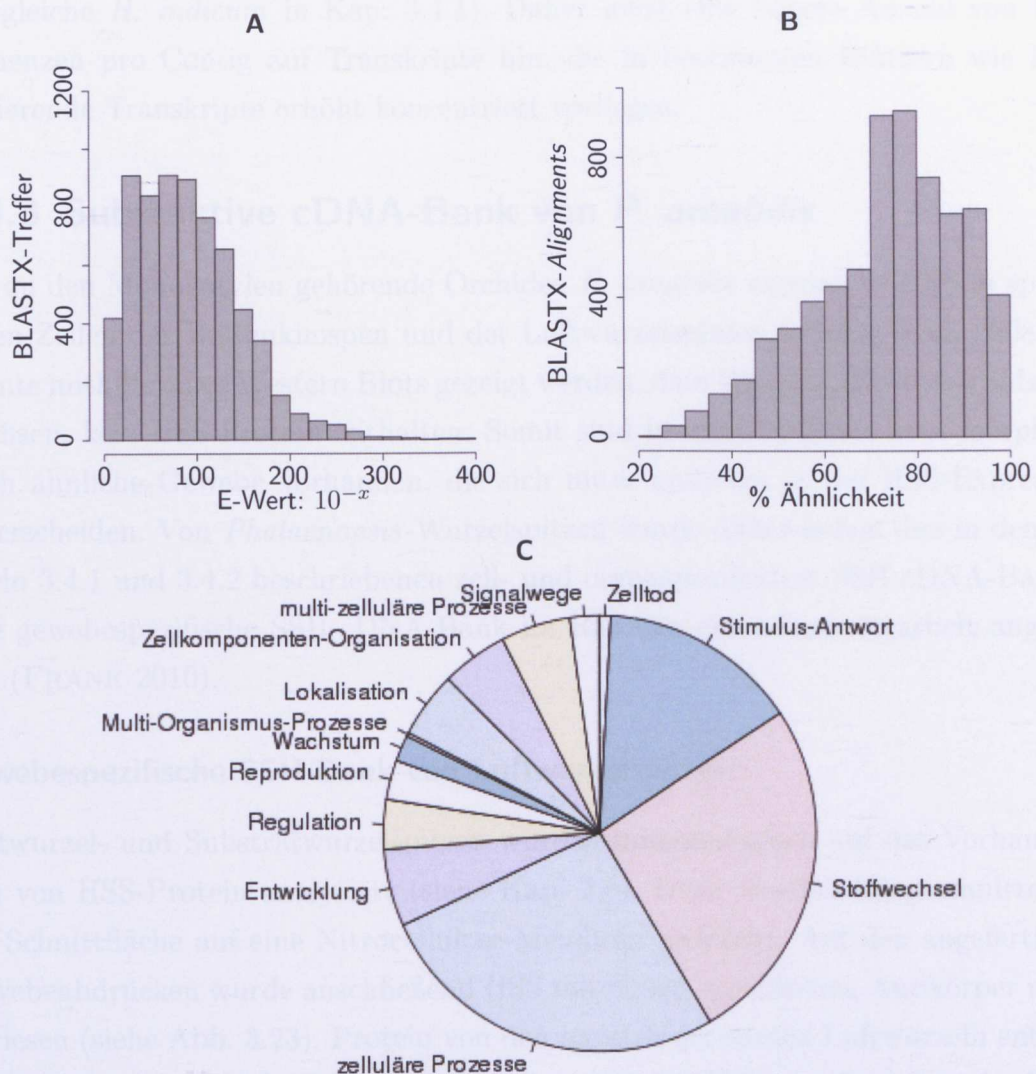


Abbildung 3.22 Histogramme zur Annotierung von Sequenzen der SSH-cDNA-Bank aus *S. officinale*. Sequenzen von subtraktiv hybridisierter Blatt-cDNA wurden mit MIRA zusammengesetzt und anschließend mittels BLASTX-Analysen und mit Gen-Ontologie-Termen annotiert. (A) Anzahl der jeweils signifikantesten BLASTX-Treffer mit einem bestimmten E-Wert. (B) Anzahl der BLASTX-Alignments mit einer bestimmten Identität. (C) Anzahl GO-Terme, denen biologische Prozesse zugeordnet werden.

der SSH-Bank repräsentierten biologischen Prozesse. Den meisten Sequenzen werden dabei putative Funktionen im Stoffwechsel und bei zellulären Prozessen zugeschrieben.

Die Anzahl der Rohsequenzen ist proportional zur Konzentration der jeweiligen cDNA und damit auch zum Grad der Anreicherung in der SSH-Bank. Exemplarisch für differenziell und gleich exprimierte Gene wurden alle HSS- und DHS-codierenden *Contigs* genauer untersucht. Vier HSS-codierende *Contigs* werden von insgesamt 230 Rohsequenzen gebildet, während DHS-codierende Sequenzen nicht identifiziert werden konnten. Dies bestätigt die mittels qRT-PCR ermittelte Subtraktionseffizienz und weist auf eine cDNA-Anreicherung von differenziell exprimierten Genen hin (vergleiche *H. indicum* in Kap. 3.4.1). Daher weist eine höhere Anzahl von Rohsequenzen pro *Contig* auf Transkripte hin, die in bestimmten Blättern wie HSS-codierende Transkripte erhöht konzentriert vorliegen.

3.4.3 Subtraktive cDNA-Bank von *P. amabilis*

Die zu den Monokotylen gehörende Orchidee *P. amabilis* exprimiert HSS in spezifischen Zellen der Blütenknospen und der Luftwurzelspitzen (ANKE *et al.* 2008). Es konnte mithilfe eines Western Blots gezeigt werden, dass Wurzeln, die in das Substrat wachsen, kein HSS-Protein enthalten. Somit sind in dieser Pflanze zwei morphologisch ähnliche Gewebe vorhanden, die sich unter anderem in der HSS-Expression unterscheiden. Von *Phalaenopsis*-Wurzelspitzen wurde daher neben den in den Kapiteln 3.4.1 und 3.4.2 beschriebenen zell- und organspezifischen SSH-cDNA-Banken eine gewebespezifische SSH-cDNA-Bank im Rahmen einer Bachelorarbeit angefertigt (FRANK 2010).

Gewebespezifische SSH-Bank von Luftwurzelspitzen

Luftwurzelspitzen und Substratwurzelspitzen wurden immunologisch auf das Vorhandensein von HSS-Protein analysiert (siehe Kap. 2.8). Dazu wurden Längsschnitte mit der Schnittfläche auf eine Nitrocellulose-Membran gedrückt. Auf den angefertigten Gewebeabdrücken wurde anschließend HSS mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen (siehe Abb. 3.23). Protein von den meisten getesteten Luftwurzeln enthielt dabei erwartungsgemäß HSS; in Substratwurzelspitzen hingegen konnte in der Regel kein HSS-Protein detektiert werden.

Auf diese Weise wurden Wurzelspitzen mit beziehungsweise ohne HSS-Protein identifiziert und entsprechend dieser Kategorisierung vereinigt. Gesamt-RNA wurde extrahiert und daraus die mRNA isoliert (siehe Kap. 2.9.1). Eine sqRT-PCR

bestätigte eine differenzielle HSS-Expression auch auf Transkriptebene, bevor eine SSH-cDNA-Bank konstruiert wurde. Weil die im *Kit* zur SSH-Bank-Herstellung erforderliche mRNA-Menge nicht vorlag, wurde die aus der mRNA erhaltene cDNA durch eine PCR mit 13 Zyklen amplifiziert. Anschließend wurde die amplifizierte cDNA der Luftwurzeln mit der von Substratwurzeln subtraktiv hybridisiert und mit zwei PCRs selektiv amplifiziert, sodass die cDNA differenziell exprimierter Gene angereichert wurde. Das Agarosegel nach Elektrophorese der PCR-Produkte der SSH- sowie der nicht subtraktiv hybridisierten Luftwurzeln-cDNA ist in Abbildung 3.24A gezeigt. Da zahlreiche zwischen 0,6 und 2,5 kb große cDNA-Moleküle nach SSH im Agarosegel nicht mehr nachweisbar sind, deutet bereits die gelelektrophoretische Analyse einen starken Grad der Subtraktion an.

Die Subtraktionseffizienz wurde durch eine PCR-Amplifizierung von HSS- und UBQ-codierenden cDNA-Fragmenten abgeschätzt (siehe Kap. 2.3). Im Gegensatz zu den SSH-Banken von *H. indicum* und *S. officinale* wurde die DNA hierbei mittels semiquantitativer statt quantitativer RT-PCR quantifiziert. Dabei wurde festgestellt, dass bei einem Unterschied von etwa zehn Zyklen ungefähr gleich viele UBQ-codierende Amplifikate von cDNA vor und nach subtraktiver Hybridisierung

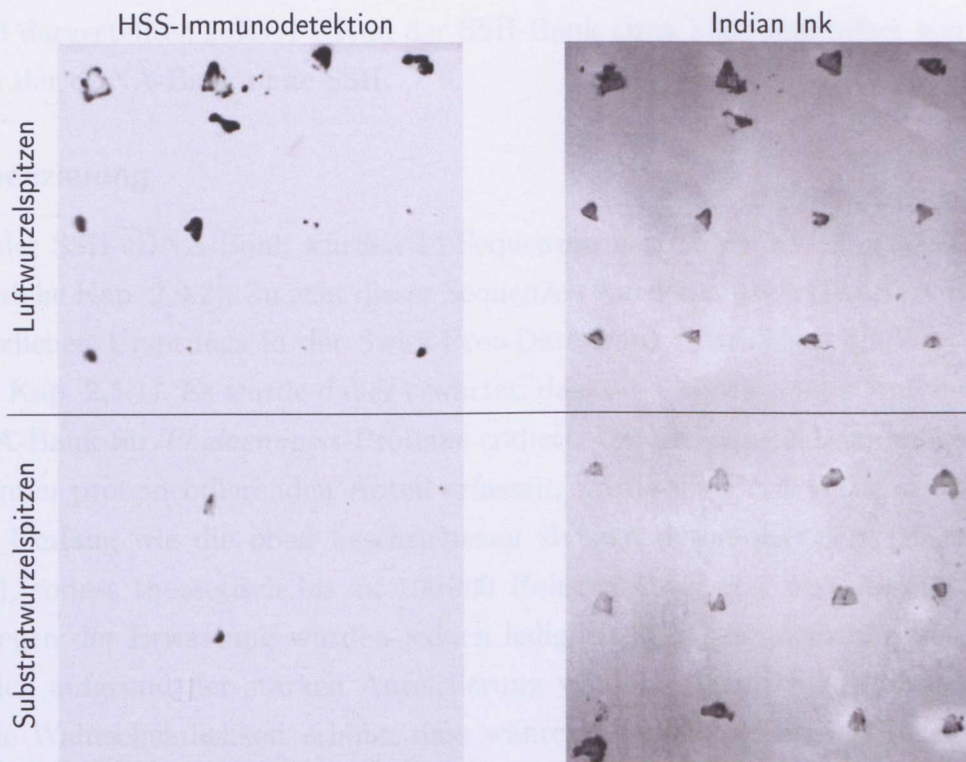


Abbildung 3.23 Gewebeabdrücke von *Phalaenopsis*-Wurzelspitzen. Längsschnittabdrücke von Luft- und Substratwurzelspitzen wurden auf einer Nitrocellulose-Membran angefertigt. Die darauf fixierten Proteine wurden immunologisch mit einem HSS-spezifischen Antikörper und anschließend mit *Indian-Ink* zur Beladungskontrolle inkubiert. Geändert nach FRANK (2010).

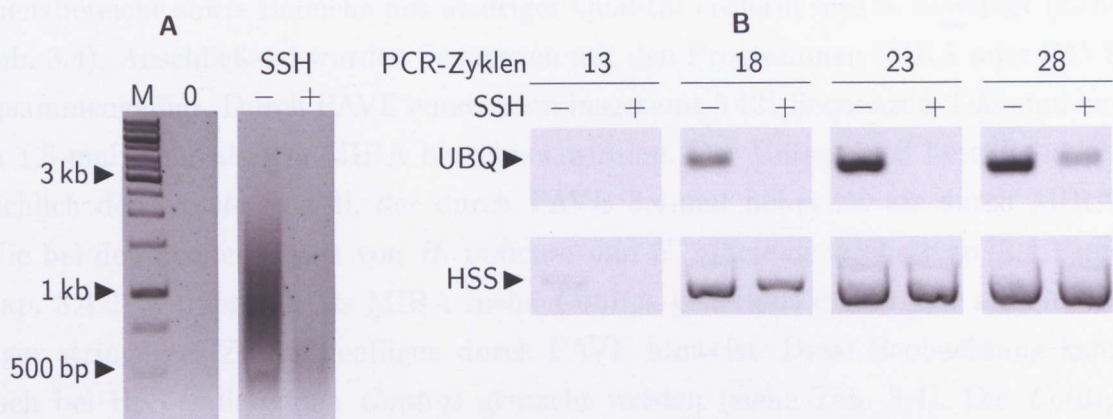


Abbildung 3.24 Analyse der subtraktiven cDNA-Bank aus Wurzelspitzen von *P. amabilis*. cDNA der Luftwurzelspitzen wurde subtraktiv mit der aus Substratwurzelspitzen hybridisiert (+ SSH) und durch zwei PCRs amplifiziert. (A) Die Produkte der zweiten PCR wurden mit einer Agarosegelelektrophorese getrennt. Eine Kontrolle wurde bis auf die subtraktive Hybridisierung gleich behandelt (- SSH). M: Marker-DNA, 0: Nullkontrolle. (B) In beiden Proben wurde HSS-codierende cDNA mittels sqRT-PCR quantifiziert. Als Referenz wurde UBQ-codierende cDNA verwendet. Aliquots der PCRs wurden nach 13, 18, 23 und 28 Zyklen mit einer Agarosegelelektrophorese analysiert. Geändert nach FRANK (2010).

entstehen. Wird eine optimale Amplifizierungsrate mit jedem Zyklus n von 2^n vorausgesetzt, dann sind HSS-codierende cDNA-Fragmente gemäß der in Abbildung 3.24B dargestellten sqRT-PCR in der SSH-Bank circa 1 000-mal höher konzentriert als in der cDNA-Bank ohne SSH.

Sequenzierung

Von der SSH-cDNA-Bank wurden 14 Sequenzen nach SANGER *et al.* (1977) ermittelt (siehe Kap. 2.9.2). Zu acht dieser Sequenzen wurden mittels BLASTX Homologe pflanzlichen Ursprungs in der Swiss-Prot-Datenbank identifiziert (E-Wert $\leq 10^{-5}$, siehe Kap. 2.5.1). Es wurde daher erwartet, dass ein überwiegender Anteil der SSH-cDNA-Bank für *Phalaenopsis*-Proteine codiert. Damit Sequenzdaten möglichst den gesamten proteincodierenden Anteil erfassen, wurde die DNA-Bank in einem gleichen Umfang wie die oben beschriebenen Banken pyrosequenziert (siehe Kapitel 2.9.3), sodass theoretisch bis zu 100 000 Rohsequenzen generiert werden könnten. Entgegen der Erwartung wurden jedoch lediglich 20 042 Sequenzen generiert. Vermutlich aufgrund der starken Anreicherung während der cDNA-Subtraktion wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass während der Sequenzierung gleiche cDNA-Moleküle in benachbarten, picolitergroßen Reaktionsräumen vorliegen, sodass identische Signale nicht weiter aufgelöst werden konnten (persönliche Absprache mit Regina Dick, MWG).

Von den erzeugten Rohsequenzen wurden Vektor-, Adapter- und Poly-A/T-Se-

quenzbereiche sowie Bereiche mit niedriger Qualität entfernt und so bereinigt (siehe Tab. 3.4). Anschließend wurden Sequenzen mit den Programmen MIRA oder PAVE zusammengefügt. Durch PAVE entstanden insgesamt 5 421 Sequenzen. Das sind circa 1,8-mal mehr als von MIRA berechnet wurden. Der Unterschied betrifft hauptsächlich den *Singlet*-Anteil, der durch PAVE 3,4-mal höher ist als durch MIRA. Wie bei den Sequenzdaten von *H. indicum* und *S. officinale* (siehe Kap. 3.4.1 und Kap. 3.4.2) wurden mittels MIRA mehr *Contigs* generiert, das erneut auf ein weniger stringentes Zusammenfügen durch PAVE hinweist. Diese Beobachtung kann auch bei HSS-codierenden *Contigs* gemacht werden (siehe Tab. 3.4). Die *Contig*-Konsensus-Sequenzen wurden entweder mit insgesamt 82,9 % (MIRA) oder 77,3 % (PAVE) der gereinigten Rohsequenzen berechnet. Die Berechnungsmethode scheint dabei keinen starken Einfluss auf die durch beide Methoden ähnlich normal verteilte Größenzusammensetzung zu haben (siehe Abb. 3.25).

Tabelle 3.4 Statistische Daten des Zusammenfügens von Sequenzen der SSH-cDNA-Bank aus *P. amabilis*. Von den Rohsequenzen wurden eventuell vorhandene Vektor- und Adaptersequenzen und Bereiche mit niedriger Qualität in mehreren Schritten entfernt. Bereinigte ähnliche Sequenzen wurden mit den Programmen MIRA und PAVE zu *Contigs* zusammengesetzt. Restliche Sequenzen stellen *Singlets* dar.

	MIRA	PAVE
Rohsequenzen	20 042	
bereinigt	16 449	
zu <i>Contigs</i> zusammengesetzt	13 633	12 714
<i>Singlets</i>	1 089	3 735
<i>Contigs</i>	1 858	1 733
durchschnittliche <i>Contig</i> -Größe [nt]	302	306
kleinstes <i>Contig</i> [nt]	72	96
größtes <i>Contig</i> [nt]	650	628
Gesamt- <i>Contig</i> -Konsensus [nt]	561 991	529 652
Gesamt-Konsensus [nt]	840 717	1 286 480
Gesamt-Sequenzen	2 947	5 468
HSS-codierende <i>Contigs</i>	8	3

Um auch Isoformen identifizieren zu können, wurden die durch MIRA stringenter zusammengeführten Sequenzen durch BLASTX-Analysen mit den Datenbanken TAIR, Swiss-Prot-plants, Trembl-plants und nr annotiert (E-Wert $\leq 10^{-5}$, siehe Kap. 2.5.1). Eine Verteilung der E-Werte der BLASTX-Treffer und der prozentualen Identität der BLASTX-Alignments sind in Abbildung 3.26A und B zu sehen und bestätigen eine Homologie der verglichenen Sequenzen. Einem Anteil von 31,4 % der Sequenzen wurde so eine biologische Funktion zugeordnet. Mögliche Ursachen für die geringe Annotierungsrate der SSH-cDNA können fehlende homologe Sequenzen

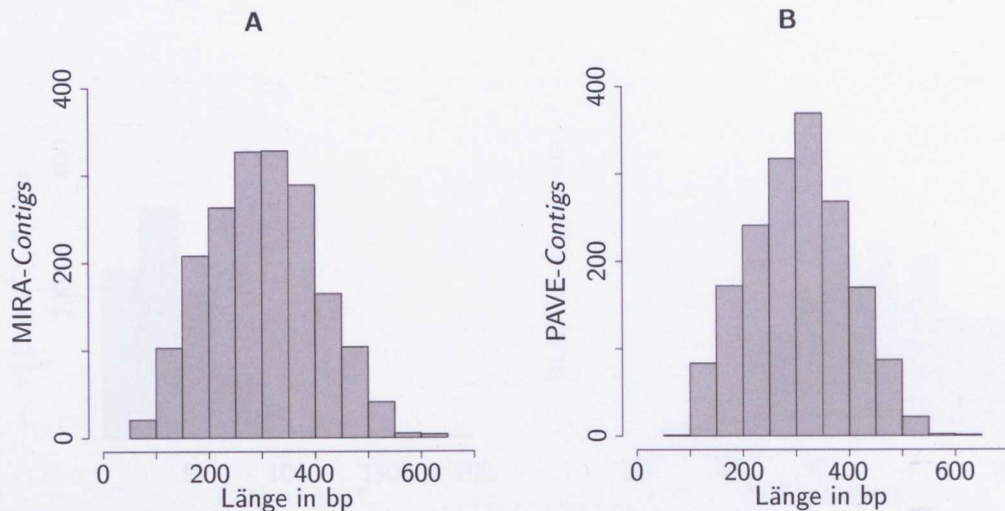


Abbildung 3.25 Grafische Darstellung der Anzahl verschiedener *Contig*-Größen von *P. amabilis*. *Contig*-Sequenzen der SSH-cDNA-Bank wurden mittels MIRA (A) oder PAVE (B) berechnet.

in den Datenbanken und eine hohe Abbruchrate während der reversen Transkription sein. Wird bei der am polyadenylierten Ende initiierten reversen Transkription der proteincodierende Sequenzbereich nicht erreicht, können folglich auch keine Homologien zu Proteinen aus Datenbanken festgestellt werden. Eine Analyse HSS-codierender *Contigs* bestätigt diese Ursache, denn nur vier Rohsequenzen gleichen dem Bereich, welcher sich ungefähr vom 3'-Ende bis zur Hälfte des 1116 nt großen Transkripts erstreckt. Alle anderen 241 HSS-codierende Rohsequenzen reichen maximal 182 Nukleotide in den codierenden Bereich hinein.

Dieselbe Problematik der geringen Annotierungsrate wiederholt sich bei einer BLAST2GO-Analyse. Nur 21,6% der 2947 Sequenzen wurden mit GO-Termen versehen. Die dargestellte Häufigkeiten verschiedener Terme für biologische Prozesse lassen daher nur bedingt Rückschlüsse auf die differenziell exprimierten Gene in *Phalaenopsis*-Wurzeln zu (siehe Abb. 3.26C). Wie bei den subtraktiven cDNA-Banken aus *H. indicum* und *S. officinale* werden aber auch die *Phalaenopsis*-Sequenzen überwiegend mit dem Stoffwechsel und zellulären Prozessen in Zusammenhang gebracht.

DHS-codierende Sequenzen sind in der SSH-Bank nicht vorhanden beziehungsweise werden von den Sequenzdaten nicht repräsentiert. Alle HSS-codierenden *Contigs* wurden von insgesamt 245 Rohsequenzen gebildet. Damit ist ein in den untersuchten Luftwurzeln stark exprimiertes Gen mit relativ vielen Rohsequenzen vertreten und ein, zumindest im Falle der *dhs* (siehe Diskussion in Kap. 4.4.1), nicht differenziell exprimiertes Gen nicht mehr detektierbar. Es ist daher davon auszugehen, dass auch weitere differenziell exprimierte Gene, wie möglicherweise auch Gene für den

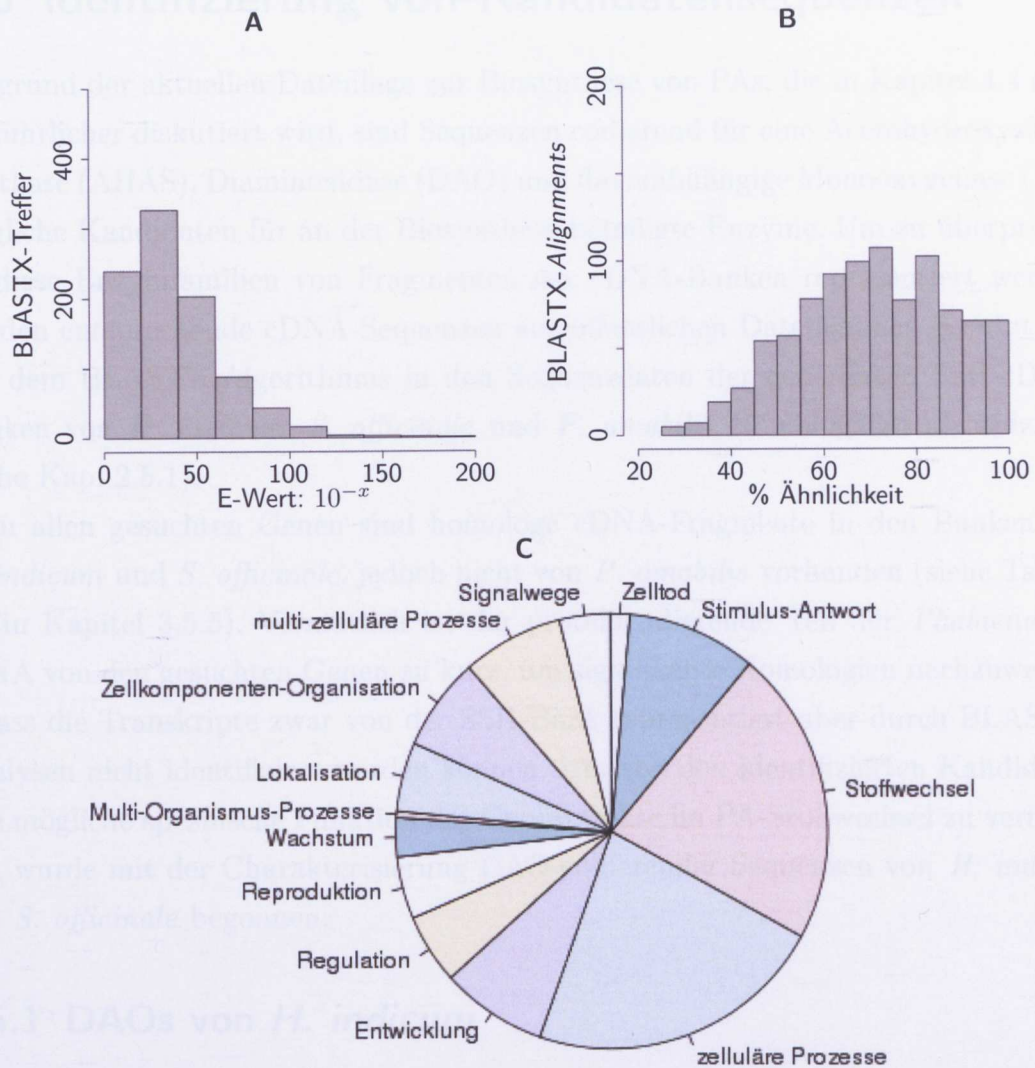


Abbildung 3.26 Histogramme zur Annotierung von Sequenzen der SSH-cDNA-Bank aus *P. amabilis*. Sequenzen wurden mit MIRA zusammengefügt und anschließend durch BLASTX mit den Datenbankeinträgen von TAIR, Swiss-Prot-plants, Trembl-plants und nr verglichen ($E\text{-Wert} \leq 10^{-5}$). **(A)** Anzahl der jeweils signifikantesten BLASTX-Treffer mit einem bestimmten E-Wert. **(B)** Anzahl der BLASTX-Alignments mit einer bestimmten Identität. **(C)** Anzahl der durch eine BLAST2GO-Analyse ermittelten GO-Terme für biologische Prozesse.

PA-Stoffwechsel, von mehreren Rohsequenzen repräsentiert werden.

3.5 Identifizierung von Kandidatensequenzen

Aufgrund der aktuellen Datenlage zur Biosynthese von PAs, die in Kapitel 4.4 noch ausführlicher diskutiert wird, sind Sequenzen codierend für eine Acetohydroxysäure-Synthase (AHAS), Diaminoxidase (DAO) und flavinabhängige Monooxygenase (FMO) mögliche Kandidaten für an der Biosynthese beteiligte Enzyme. Um zu überprüfen, ob diese Enzymfamilien von Fragmenten der cDNA-Banken repräsentiert werden, wurden entsprechende cDNA-Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken genutzt, um mit dem BLASTX-Algorithmus in den Sequenzdaten der generierten SSH-cDNA-Banken von *H. indicum*, *S. officinale* und *P. amabilis* Homologe zu identifizieren (siehe Kap. 2.5.1).

Zu allen gesuchten Genen sind homologe cDNA-Fragmente in den Banken von *H. indicum* und *S. officinale*, jedoch nicht von *P. amabilis* vorhanden (siehe Tabelle 3.6 in Kapitel 3.5.5). Vermutlich ist der proteincodierende Teil der *Phalaenopsis*-cDNA von den gesuchten Genen zu kurz, um signifikante Homologien nachzuweisen, sodass die Transkripte zwar von der SSH-Bank repräsentiert aber durch BLASTX-Analysen nicht identifiziert werden können. Um von den identifizierten Kandidaten eine mögliche spezifische Funktion der Genprodukte im PA-Stoffwechsel zu verifizieren, wurde mit der Charakterisierung DAO-codierender Sequenzen von *H. indicum* und *S. officinale* begonnen.

3.5.1 DAOs von *H. indicum*

Sequenzvervollständigung

Insgesamt wurden nach einem automatisierten Zusammenfügen der Rohsequenzen 14 DAO-codierende Fragmente in der subtraktiv hybridisierten cDNA von *H. indicum* identifiziert. Davon ist ein Sequenzfragment, codierend für *HiDAO1*, mit den meisten Rohsequenzen vertreten und wurde daher vervollständigt.

Für eine 3'-RACE wurde aufgrund von Sequenzvergleichen mit bekannten DAOs aus Datenbanken eine Produktgröße von circa 2 kb zusätzlich der nichtcodierenden Nukleotide am 3'-Ende vorhergesagt. Gesamt-cDNA wurde daraufhin aus *Heliotropium*-Blättern hergestellt (siehe Kapitel 2.2), um hiermit *HiDAO1*-codierende cDNA mit den *Primern HiDAO1-F1* und *dT17* durch eine PCR zu amplifizieren (siehe Kap. 2.3.2 und Tab. A.2). Das spezifische PCR-Produkt von 2083 bp Größe wurde kloniert (siehe Abb. 3.27), sequenziert und mit einer BLASTX-Analyse mit der nr-Datenbank verglichen (siehe Kap. 2.4 und Kap. 2.5.1). Dabei zeigt das Fragment Homologien zu DAOs anderer Organismen. Mit dieser Sequenz als Vorlage konnten fünf *Contigs* der SSH-Bank zu einer 2177 nt großen Sequenz zusammengefügt

werden, in dem ein 1986 nt großer *HiDAO1*-codierender Leserahmen enthalten ist (siehe Abb. 3.27C). Ein mögliches 5'-Ende wurde durch eine *Contig*-Sequenz der SSH-Bank identifiziert.

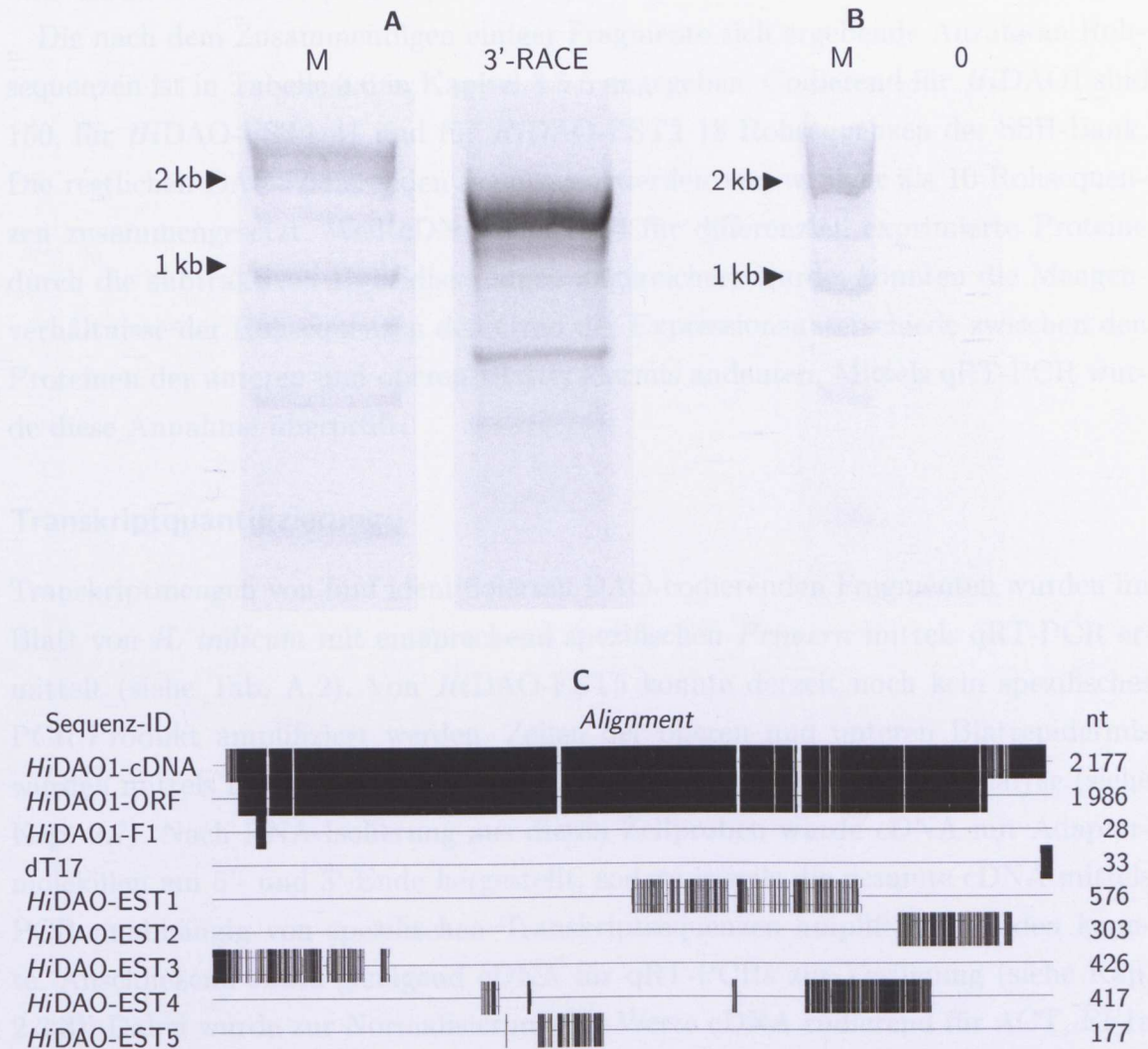


Abbildung 3.27 Vervollständigung eines identifizierten DAO-codierenden cDNA-Fragments von *H. indicum*. **(A)** Produkt einer 3'-RACE-PCR nach erfolgter Agarosegelelektrophorese. Aus der Gesamt-cDNA eines *Heliotropium*-Blatts wurde mit den *Primern* *HiDAO1*-F1 und dT17 ein 2083 bp großes *HiDAO1*-codierendes Fragment durch eine PCR amplifiziert. **(B)** Nullkontrolle für die in **(A)** gezeigte PCR. M: DNA-Marker. **(C)** Sequenz-Alignment von DAO-codierenden Fragmenten. Mit der Sequenz des klonierten PCR-Amplifikats aus **(A)** als Vorlage wurden fünf *Contig*-Sequenzen der *Heliotropium*-SSH-Bank zu einer 2177 nt großen Sequenz (*HiDAO1*-cDNA) mit einem offenen Leserahmen (*HiDAO1*-ORF) zusammengefügt. Weitere DAO-codierende Fragmente der cDNA-Bank wurden wie angegeben durchnummeriert und mittels ClustalW2 verglichen. Sequenzen sind der Übersichtlichkeit halber schematisch dargestellt. Schwarze Linien symbolisieren *Alignment*-Positionen mit gleichen Nukleotiden.

Weitere DAO-codierende Fragmente wurden zu einer Sequenz zusammengefasst, sofern die Teilsequenzen mindestens 98% identisch zueinander sind. Hierdurch wurde die Anzahl der cDNA-Fragmente, die Homologien zu DAOs zeigen, auf sechs reduziert. Diese sechs Fragmente zeigen auf Nukleinsäureebene eine maximale Iden-

tität von 23% zueinander und codieren daher eindeutig verschiedene Proteine beziehungsweise Proteinbereiche. Fünf der Fragmente weisen keinen überlappenden Sequenzbereich auf und wurden vorläufig mit *Hi*DAO-EST1, -EST2, -EST3, -EST4 und -EST5 bezeichnet (siehe Abb. 3.27C).

Die nach dem Zusammenfügen einiger Fragmente sich ergebende Anzahl an Rohsequenzen ist in Tabelle 3.6 in Kapitel 3.5.5 angegeben. Codierend für *Hi*DAO1 sind 150, für *Hi*DAO-EST1 41 und für *Hi*DAO-EST2 18 Rohsequenzen der SSH-Bank. Die restlichen DAO-codierenden Sequenzen werden von weniger als 10 Rohsequenzen zusammengesetzt. Weil cDNA codierend für differenziell exprimierte Proteine durch die subtraktiven Hybridisierungen angereichert wurde, könnten die Mengenverhältnisse der Rohsequenzen den Grad der Expressionsunterschiede zwischen den Proteinen der unteren und oberen Blattepidermis andeuten. Mittels qRT-PCR wurde diese Annahme überprüft.

Transkriptquantifizierung

Transkriptmengen von fünf identifizierten DAO-codierenden Fragmenten wurden im Blatt von *H. indicum* mit entsprechend spezifischen *Primern* mittels qRT-PCR ermittelt (siehe Tab. A.2). Von *Hi*DAO-EST5 konnte derzeit noch kein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden. Zellen der oberen und unteren Blattepidermis wurden mittels LCM isoliert und ermöglichten so eine zellspezifische Analyse (siehe Kap. 2.7). Nach RNA-Isolierung aus diesen Zellproben wurde cDNA mit Adaptermolekülen am 5'- und 3'-Ende hergestellt, sodass jeweils die gesamte cDNA mittels PCR unabhängig von spezifischen Transkriptsequenzen amplifiziert werden konnte. Anschließend stand genügend cDNA für qRT-PCRs zur Verfügung (siehe Kap. 2.3.3). Dabei wurde zur Normalisierung der Werte cDNA codierend für ACT, EF1a und UBQ unter gleichen Bedingungen amplifiziert. Die normalisierten Ergebnisse für die verschiedenen DAOs der unteren Epidermis wurden auf die der oberen Epidermis bezogen, sodass die relativen Werte den Faktor angeben, um den sich die Transkriptkonzentrationen in der unteren von denen der oberen Blattepidermis unterscheiden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.28 grafisch dargestellt.

Die cDNA codierend für *Hi*DAO1 signalisiert von allen untersuchten DAO-codierenden Fragmenten den größten Expressionsunterschied auf Transkriptebene und ist in der unteren Epidermis circa 6,9-fach erhöht. Die Transkripte codierend für die übrigen DAO-codierenden Fragmente sind nur leicht bis maximal 2,2-fach stärker konzentriert, wobei sich für die *Hi*DAO-EST3- und *Hi*DAO-EST4-codierenden Fragmente kein signifikanter Unterschied der Transkriptmengen zwischen der oberen und unteren Epidermis feststellen lässt. Damit korreliert der Grad der differenziellen

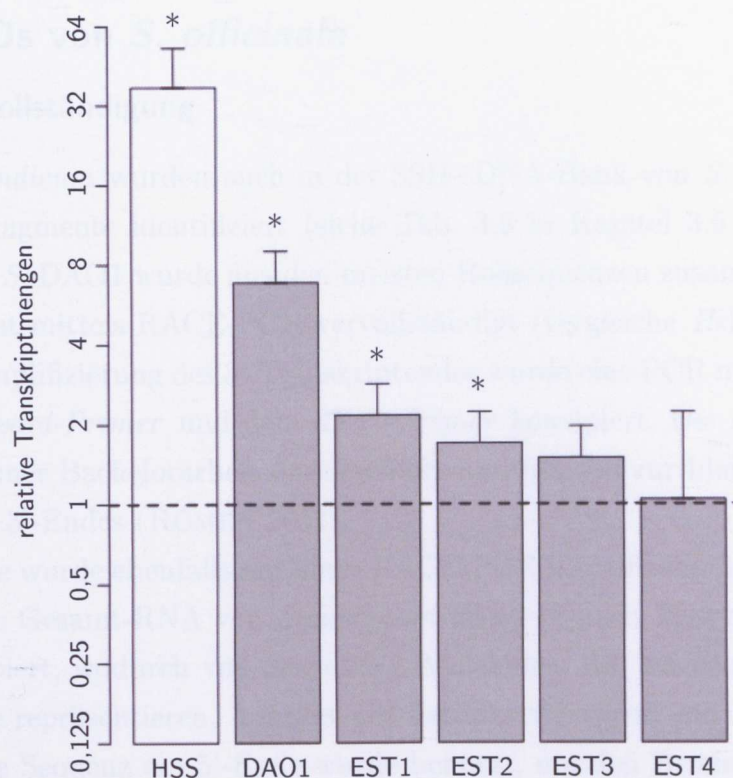


Abbildung 3.28 Relative Quantifizierung von DAO-codierenden cDNA-Fragmenten aus *H. indicum*. Epidermiszellen wurden mittels LCM isoliert und deren gesamte cDNA wurde in einer PCR amplifiziert. Mit spezifischen *Primern* wurden DAO-codierende Transkripte in der unteren relativ zur oberen Blattepidermis durch qRT-PCR quantifiziert. Werte > 1 weisen daher auf höhere Transkriptmengen in der unteren Blattepidermis hin. Zur Normalisierung wurde ACT-, EF1a- und UBQ-codierende cDNA verwendet. Relative Transkriptmengen sind mit einer logarithmischen Skalierung angegeben. Mit einem t-Test wurde überprüft, ob sich die normalisierten Transkriptmengen in der oberen und unteren Epidermis signifikant unterscheiden, $P < 0,05$ (*), $n = 3$.

Expression mit der Anzahl an Rohsequenzen der SSH-Bank (vergleiche Tabelle 3.6 in Kapitel 3.5.5).

HSS-codierende cDNA wurde in denselben Proben quantifiziert. Wie in früheren Experimenten wurden HSS-codierende Transkripte ausschließlich in der unteren Blattepidermis detektiert. Um dennoch relative Werte für dieses Transkript berechnen zu können, wurde angenommen, dass mit dem letzten PCR-Zyklus HSS-codierende Transkripte auch in der oberen Epidermis detektiert wurden. Hierdurch ergibt sich eine 37,4-fach erhöhte Konzentration von HSS-codierenden Transkripten in der unteren Epidermis im Vergleich zur oberen. Dieser Wert ist aber unterschätzt und *in vivo* höher. Nach diesen Ergebnissen korreliert auf Transkriptebene die HSS-Expression am stärksten mit der *Hi*DAO1-Expression, die daher funktionell für die PA-Biosynthese sein könnte.

3.5.2 DAOs von *S. officinale*

Sequenzvervollständigung

Wie von *H. indicum* wurden auch in der SSH-cDNA-Bank von *S. officinale* DAO-codierende Fragmente identifiziert (siehe Tab. 3.6 in Kapitel 3.5.5). Die Sequenz codierend für *SoDAO1* wurde aus den meisten Rohsequenzen zusammengesetzt und daher zunächst mittels RACE-PCR vervollständigt (vergleiche *HiDAO1* in Kapitel 3.5.1). Zur Amplifizierung des 3'-Transkriptendes wurde eine PCR mit einem genspezifischen *Forward-Primer* und dem *dT17-Primer* konzipiert. Die Arbeiten wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt und führten zur Identifizierung eines 607 nt großen 3'-Endes (RÖMER 2011).

Das 5'-Ende wurde ebenfalls mit einer RACE-PCR identifiziert (siehe Kap. 2.3.2). Hierfür wurde Gesamt-RNA von *Symphytum*-Blättern nach MATZ *et al.* (1999) revers transkribiert, wodurch von den cDNA-Molekülen, die Transkripte in ihrer gesamten Länge repräsentieren, Adapter mit bekannter Sequenz am 5'-Ende angefügt wurden. Diese Sequenz am 5'-Ende wurde benutzt, um den Bereich bis zu der Hybridisierungsstelle eines genspezifischen *Reverse-Primers* (*SoDAO1-R*, siehe Tab. A.2) in Richtung 3'-Ende zu amplifizieren. Aufgrund eines *Alignments* mit *Arabidopsis*-Orthologen wurde für das spezifische 5'-RACE-Produkt eine Größe von über 2 kb angenommen. In Abbildung 3.29 sind die amplifizierten Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu sehen. Das Fragment mit erwarteter Größe wurde aus dem Gel extrahiert und für eine Sequenzierung nach SANGER *et al.* (1977) in den pGEM[®]-T-Easy-Vektor kloniert (siehe Kap. 2.4). Hierdurch konnte ein 1 872 nt großer Bereich des *SoDAO1*-codierenden 5'-Transkriptendes identifiziert werden. Nach Zusammenfügen der 5'- und 3'-Sequenzen enthält das 2 323 nt große Produkt einen 2 025 nt großen für die *SoDAO1*-codierenden Leserahmen. Ob die ermittelte Transkriptsequenz vollständig ist, kann noch nicht abschließend geklärt werden, da das 5'-Ende bei vielen homologen Transkripten anderer Spezies unterschiedlich lang ist und eine Vorhersage der Größe dieses wenig konservierten Bereichs unverlässlich scheint.

Vier der DAO-codierenden Fragmente, welche mit der SSH-cDNA-Bank identifiziert wurden, weisen Identitäten von 98–100 % zu der *SoDAO1*-codierenden Sequenz auf und wurden daher zu einem *Contig* zusammengesetzt (siehe Abb. 3.29B). Eine weitere *Contig*-Sequenz der SSH-cDNA-Bank codiert für eine paraloge *SoDAO2*, die im Rahmen einer Masterarbeit bereits identifiziert und vervollständigt wurde (KRUSE 2011). Dabei wurde auch die cDNA codierend für eine *SoDAO3* (KRUSE 2011) und bei einer weiteren Studie die cDNA für *SoDAO4* (WESSELING, unpubliziert)

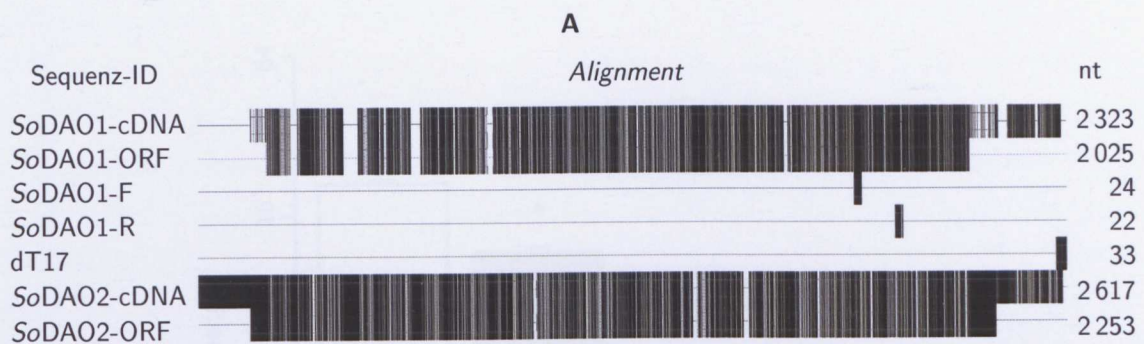
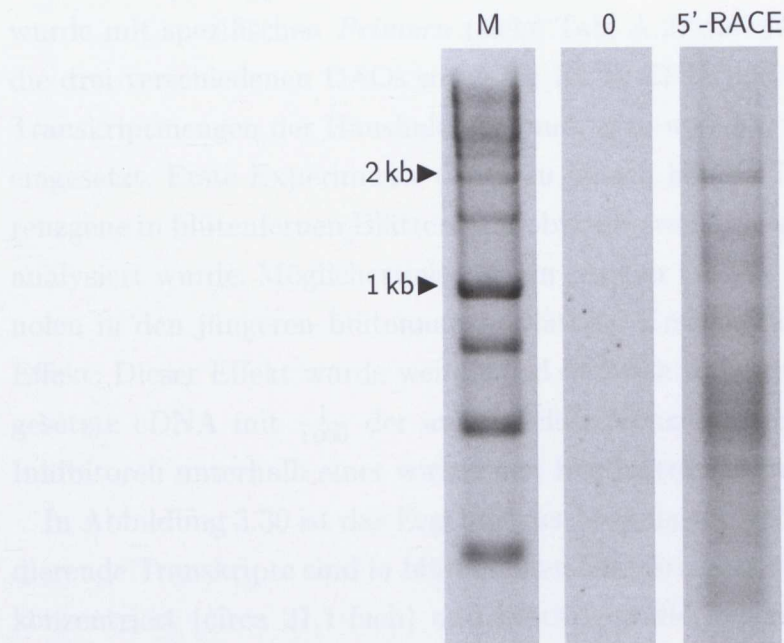


Abbildung 3.29 Vervollständigung der identifizierten DAO-codierenden cDNA-Fragmente von *S. officinale*. **(A)** Produkte einer 5'-RACE wurden mit einem Agarosegel analysiert. Das SoDAO1-codierende Fragment mit einer Größe von circa 2 kb wurde extrahiert und kloniert. 0: PCR-Nullkontrolle. M: DNA-Marker. **(B)** Schematische Darstellung von Sequenzvergleichen zwischen den identifizierten SoDAO1- und SoDAO2-codierenden Sequenzen einer SSH-Bank, welche mit den Sequenzen der RACE-Produkte zusammengefügt und mit dem Suffix „-cDNA“ gekennzeichnet wurden. Sie enthalten jeweils einen proteincodierenden Leserahmen (Suffix: „-ORF“). Schwarze Linien symbolisieren dabei *Alignment*-Positionen mit gleichen Nukleotiden.

identifiziert.

Transkriptquantifizierung

Von jungen *Symphytum*-Blättern, die direkt unterhalb einer Infloreszenz mit noch geschlossenen Blütenknospen wuchsen, wurden mittels qRT-PCR die Transkripte codierend für SoDAO1, SoDAO2 und SoDAO3 wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben relativ quantifiziert. Von SoDAO4 lagen noch keine genspezifischen *Primer* vor. Als Referenz wurden ältere Blätter von der Sprossbasis gewählt. Von beiden Blattproben wurde Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert (siehe Kap. 2.2). Anschließend

wurde mit spezifischen *Primern* (siehe Tab. A.2) die cDNA codierend für HSS, für die drei verschiedenen DAOs sowie für ACT, EF1a und UBQ amplifiziert. Relative Transkriptmengen der Haushaltsgene *act*, *ef1a* und *ubq* wurden zur Normalisierung eingesetzt. Erste Experimente deuteten jedoch höhere Transkriptmengen der Referenzgene in blütenfernen Blättern an, obwohl jeweils die gleiche Menge Gesamt-RNA analysiert wurde. Möglicherweise ist ein höherer Gehalt von beispielsweise Polyphenolen in den jüngeren blütennahen Blättern Ursache für einen PCR-inhibierenden Effekt. Dieser Effekt wurde weitgehend dadurch reduziert, dass die als Matrize eingesetzte cDNA mit $\frac{1}{1000}$ der anfänglichen Konzentration eingesetzt wurde, sodass Inhibitoren unterhalb einer wirksamen Konzentration verdünnt wurden.

In Abbildung 3.30 ist das Ergebnis der optimierten qRT-PCR dargestellt. HSS-codierende Transkripte sind in blütennahen Blättern höher als in blütenfernen Blättern konzentriert (circa 21,1-fach) und bestätigen die Annahme einer von der Infloreszenz abhängigen HSS-Expression. Ebenfalls erhöht sind die Mengen von *SoDAO1*-

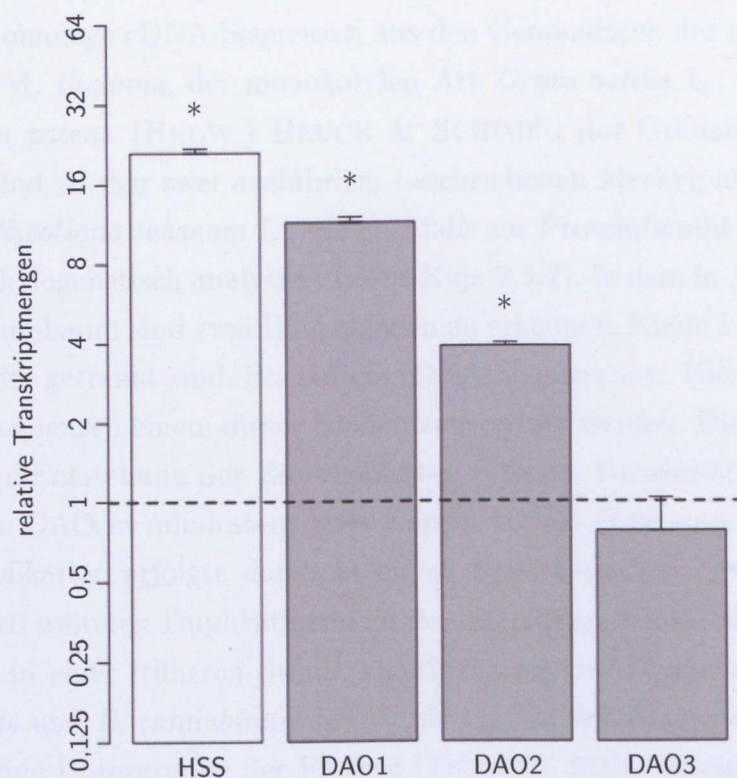


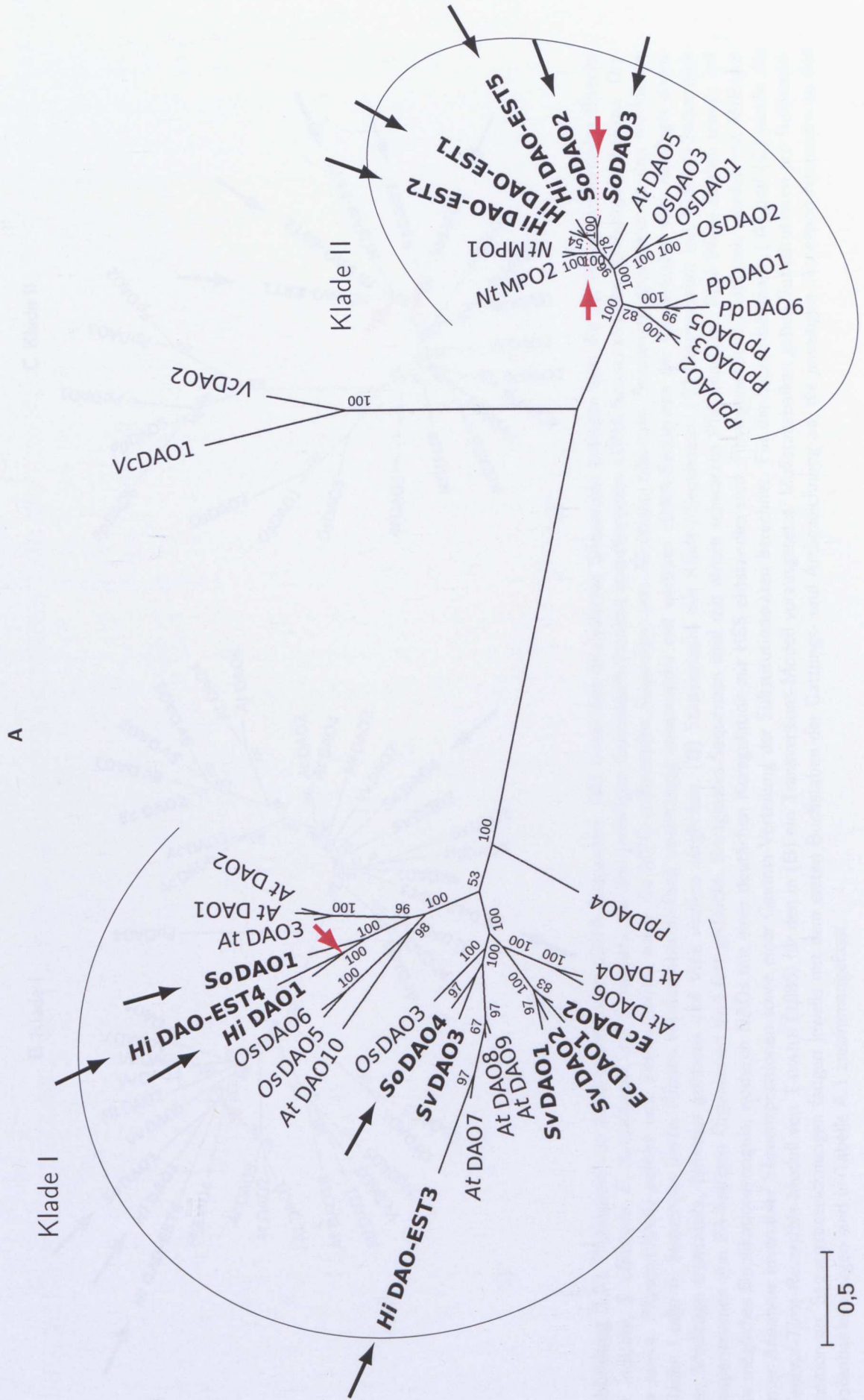
Abbildung 3.30 Relative Quantifizierung von DAO-codierenden cDNA-Fragmenten aus *S. officinale*. Junge Blätter aus der Nähe einer Infloreszenz und Blätter aus der Nähe der Sprossbasis wurden für eine Gesamt-RNA-Extraktion mit nachfolgender cDNA-Synthese eingesetzt. In dem cDNA-Pool des jungen Gewebes wurden Transkripte codierend für HSS und drei DAOs vergleichend zu dem Pool des alten Gewebes quantifiziert. Zur Normalisierung wurde ACT-, EF1a- und UBQ-codierende cDNA verwendet. Transkriptmengen der Gene *hss*, *dao1* und *dao2* unterscheiden sich signifikant, t-Test: $P < 0,05$ (*), $n = 3$. Die Werte der relativen Transkriptmengen sind mit einer logarithmischen Skalierung angegeben.

(11,5-fach) und *SoDAO2*-codierenden Transkripten (3,9-fach). *SoDAO3*-codierende Transkripte sind in jungen Blättern ungefähr gleich beziehungsweise leicht niedriger als in älteren Blättern konzentriert. Das Ergebnis der qRT-PCR korreliert dabei mit der Anzahl DAO-codierender Rohsequenzen, die von der SSH-cDNA-Bank desselben Gewebes generiert wurden. Neben den 34 *SoDAO1*- und 19 *SoDAO2*- wurden keine *SoDAO3*-codierenden Rohsequenzen generiert. Das Ergebnis für *S. officinale* zeigt wie bei *H. indicum* eine starke Korrelation der Transkriptmengen zwischen einem DAO-codierenden Fragment (*SoDAO1*) und der HSS. *SoDAO2* wird ebenfalls mit der HSS koreguliert, sodass beide identifizierte DAO-Paraloge als Enzym der PA-Biosynthese in Betracht gezogen werden können.

3.5.3 Phylogenetische Analyse von identifizierten DAO-codierenden Sequenzen

DAO-codierende cDNA-Fragmente der Boraginales-Arten *H. indicum* und *S. officinale* sowie homologe cDNA-Sequenzen aus den Genomdaten der gut untersuchten dikotylen Art *A. thaliana*, der monokotylen Art *Oryza sativa* L., des Laubmooses *Physcomitrella patens* (HEDW.) BRUCH & SCHIMP., der Grünalge *Volvox cartieri* F. STEIN und zu den zwei ausführlich beschriebenen Methylputrescin-Oxidase (MPOs) von *Nicotiana tabacum* L., die ebenfalls zur Proteinfamilie der DAOs gehören, wurden phylogenetisch analysiert (siehe Kap. 2.5.2). In dem in Abbildung 3.31A gezeigten Stammbaum sind zwei Hauptkladen zu erkennen, Klade I und II, die deutlich voneinander getrennt sind. Bis auf die cDNA-Sequenz von *Volvox* können sämtliche cDNA-Sequenzen einem dieser Kladen zugeordnet werden. Dies bedeutet, dass bereits vor der Entstehung der Embryophyten (Moose, Farngewächse und Samenpflanzen), eine DAO in mindestens zwei Kopien vorlag. Eine stammesgeschichtlich frühe Genduplikation erfolgte daher in einem hypothetischen Urembryophyt und resultierte nach weiteren Duplikationen zu den Sequenzen beider Kladen.

Die bereits in einer früheren Studie identifizierten DAO-codierenden Sequenzen von *S. vernalis* und *E. cannabinum* bilden bis auf die *SvDAO3*-codierende Sequenz eine gemeinsame Untergruppe der Klade I (DENKER 2008). Je eine weitere Untergruppe enthält die *HiDAO-EST3*-, *SoDAO4*- sowie *SvDAO3*-codierenden Sequenzen beziehungsweise die *HiDAO1*-, *HiDAO-EST4*- und *SoDAO1*-codierenden Fragmente.



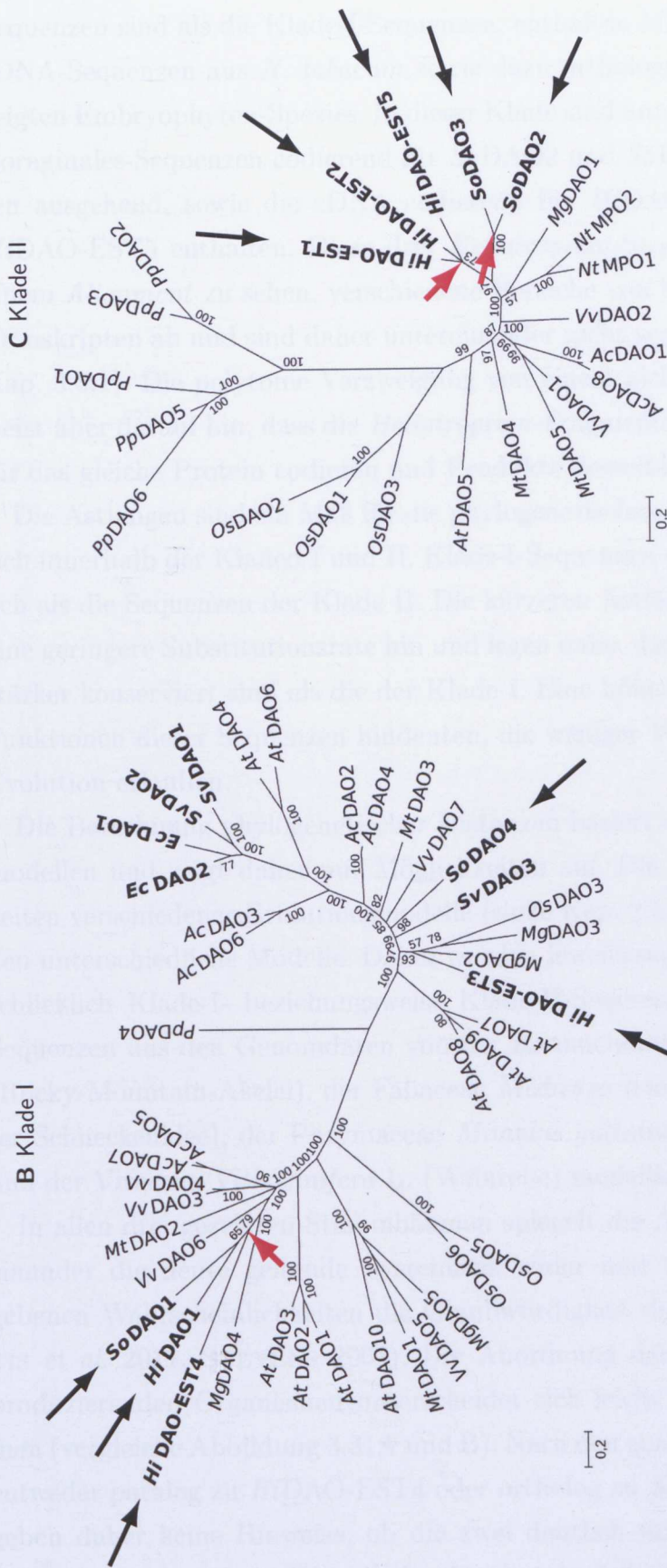


Abbildung 3.31 Phylogenie von DAO-codierenden cDNA-Sequenzen. (A) Unter den analysierten Sequenzen befinden sich die der PA-produzierenden Spezies *H. indicum*, *S. officinale*, *E. cannabinum* und *S. vernalis*, die den jeweiligen Genomdatenbanken entnommenen cDNA-Sequenzen von *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens* und *Volvox carteri* sowie die MPO-codierenden Sequenzen von *Nicotiana tabacum*. Sequenzen gruppieren in den markierten Klade I oder II. Sequenzen beider Klade wurden anschließend unabhängig voneinander mit weiteren cDNA-Sequenzen der Genomdaten von *Aquilegia coerulea*, *Medicago truncatula*, *Mimulus guttatus* und *Vitis vinifera* verglichen. (B) Stammbaum mit Klade-I-Sequenzen. (C) Stammbaum mit Klade-II-Sequenzen. Sequenznamen von PA-haltigen Organismen sind fett gedruckt. Boraginales-Sequenzen sind mit einem schwarzen Pfeil markiert. Rote Pfeile deuten jeweils auf ein mögliches Duplikationsereignis, wodurch DAOs mit einer deutlichen Koregulation zur HSS entstanden sind. Phylogenetische Distanzen wurden mit MrBayes unter Annahme invariabler Sequenzpositionen sowie einer Gamma-Verteilung der Substitutionsraten berechnet. Für die Stammbäume in (A) und (C) wurde das General-Time-Reversible-Modell von TAVARE (1986) für den in (B) ein Transversions-Modell vorausgesetzt. Maßstabsbalken geben Substitutionen pro Nukleotidposition an. Sequenzbezeichnungen fangen jeweils mit dem ersten Buchstaben der Gattungs- und Artbezeichnung an, die jeweiligen Accession-Nummern zu den Datenbankeinträgen sind in Tabelle A.1 zusammengefasst.

Sequenzen der Klade II, die phylogenetisch näher mit den DAO-codierenden Algen-Sequenzen sind als die Klade-I-Sequenzen, enthalten MPO1- und MPO2-codierende cDNA-Sequenzen aus *N. tabacum* sowie dazu orthologe Sequenzen der anderen gezeigten Embryophyten-Spezies. In dieser Klade sind unter anderem die identifizierten Boraginales-Sequenzen codierend für *SoDAO2* und *SoDAO3*, beide von einem Knoten ausgehend, sowie die cDNA codierend für *HiDAO-EST1*, *HiDAO-EST2* und *HiDAO-EST5* enthalten. Diese drei *Heliotropium*-Sequenzen decken dabei, wie in einem *Alignment* zu sehen, verschiedene Bereiche von homologen DAO-codierenden Transkripten ab und sind daher untereinander nicht vergleichbar (siehe Abb. 3.27 in Kap. 3.5.1). Die polytome Verzweigung von einem nicht weiter aufgelösten Knoten weist aber darauf hin, dass die *Heliotropium*-Fragmente der Klade II möglicherweise für das gleiche Protein codieren und Produkte desselben Gens sind.

Die Astlängen sind ein Maß für die phylogenetischen Distanzen und unterscheiden sich innerhalb der Klade I und II. Klade-I-Sequenzen sind weniger zueinander ähnlich als die Sequenzen der Klade II. Die kürzeren Astlängen der Klade II deuten auf eine geringere Substitutionsrate hin und legen nahe, dass die Sequenzen dieser Klade stärker konserviert sind als die der Klade I. Eine höhere Konserviertheit könnte auf Funktionen dieser Sequenzen hindeuten, die weniger Veränderungen im Verlauf der Evolution erlauben.

Die Berechnung phylogenetischer Distanzen basiert auf theoretischen Evolutionsmodellen und zeigt daher nur Möglichkeiten auf. Die berechneten Wahrscheinlichkeiten verschiedener Evolutionsmodelle (siehe Kap. 2.5.2) favorisieren für beide Klade unterschiedliche Modelle. Daher wurden jeweils separate Stammbäume mit ausschließlich Klade-I- beziehungsweise Klade-II-Sequenzen und zusätzlichen cDNA-Sequenzen aus den Genomdaten von der Ranunculaceae *Aquilegia coerulea* JAMES (Rocky-Mountain-Akelei), der Fabaceae *Medicago truncatula* GAERTNER (Gestutzter Schneckenklee), der Phrymaceae *Mimulus guttatus* DC. (Gelbe Gauklerblume) und der Vitaceae *Vitis vinifera* L. (Weinrebe) modelliert (siehe Abb. 3.31B und C).

In allen drei gezeigten Stammbäumen spiegelt die Anordnung der Sequenzen zueinander die heute geltende Systematik wider und unterstützt neben den angegebenen Wahrscheinlichkeiten die Glaubwürdigkeit der Verzweigungspunkte (SOLTIS *et al.* 2011, STEVENS 2001). Die Anordnung der Klade-I-Sequenzen von PA-produzierenden Organismen unterscheidet sich leicht zwischen beiden Stammbäumen (vergleiche Abbildung 3.31A und B). Nach den gezeigten Phylogenien ist *HiDAO1* entweder paralog zu *HiDAO-EST4* oder ortholog zu *SoDAO1*. Die Sequenzanalysen geben daher keine Hinweise, ob die zwei deutlich mit der HSS koregulierten Enzyme der untersuchten Boraginales-Arten polyphyletischen oder monophyletischen

Ursprungs sind. Das Verzweigungsmuster der in beiden Stammbäumen gleichen Sequenzen der Klade II unterscheidet sich nicht (vergleiche Abbildung 3.31A und C). Die ebenfalls mit der HSS koregulierten *Hi*DAO-EST1, *Hi*DAO-EST2 und *So*DAO2 sind vermutlich polyphyletischen Ursprungs.

3.5.4 Vorhersage der subzellulären Lokalisation von identifizierten DAO-codierenden Sequenzen

Diaminoxidasen katalysieren die Oxidation von primären Aminogruppen zu Aldehyden, Ammoniak und Wasserstoffperoxid. Aufgrund der Wasserstoffperoxidproduktion spielen sie unter anderem im extrazellulären Raum eine Rolle bei der Lignifizierung und Pathogenabwehr (CONA *et al.* 2006). Dagegen findet die Synthese des Triamins Homospermidin im Zytosol statt (ANKE *et al.* 2004, MOLL *et al.* 2002). Homospermidin könnte daher Substrat für eine intrazelluläre DAO des PA-Stoffwechsels sein. Das dabei frei werdende Wasserstoffperoxid könnte möglicherweise in Peroxisomen durch Katalasen abgebaut werden (PALMA *et al.* 2009). Eine subzelluläre Lokalisation einer DAO-Isoform in Peroxisomen oder im Zytosol könnte daher ein Hinweis für eine Funktion im PA-Stoffwechsel sein.

Fünf unterschiedliche Programme wurden benutzt (siehe Tab. 2.2), um die subzelluläre Lokalisation der Boraginales-DAOs vorherzusagen. Prognosen zur Lokalisation mit Teilsequenzen wurden nicht berücksichtigt, da unter Umständen die relevanten Elemente zur Proteinsortierung darin nicht enthalten sind. Als Vergleich wurden die teilweise gut charakterisierten DAOs von *A. thaliana* und *N. tabacum* in die Analyse einbezogen.

In Tabelle 3.5 ist das Ergebnis zusammengefasst. Fast alle DAO-Isoformen können nicht eindeutig lokalisiert werden, da sich das Ergebnis je nach verwendetem Algorithmus unterscheidet. Ausgenommen davon ist die Tabak-MPO1 (*Accession*-Nr: DQ873385.1), die von allen Programmen für eine Chloroplasten-Lokalisation vorgeschlagen wird. Generell werden DAOs der Klade I öfters im extrazellulären und die der Klade II im zytosolischen respektive plastidären Raum vorhergesagt. DAOs der Boraginales konnten ebenfalls nicht eindeutig einem Kompartiment zugeordnet werden. In den DAO1-Sequenzen von *H. indicum* und *S. officinale* werden jedoch von den Programmen mehrheitlich Signalsequenzen zur Einleitung in den sekretorischen Weg identifiziert und bis auf eine abweichende Berechnung wird die *So*DAO3 in Chloroplasten erwartet.

Tabelle 3.5 Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Diaminoxidasen. DAOs von *A. thaliana* und *N. tabacum* (GenBank-Nummer: AB289457.1 und DQ873385.1) sowie der PA-produzierenden *E. cannabinum*, *H. indicum*, *S. vernalis* und *S. officinale* wurden mit den angegebenen Programmen analysiert. Folgende Kompartimente wurden dabei unterschieden: Chloroplasten (Cp), Zytosol (Zyt), extrazellulär (E), Mitochondrien (M), Nukleus (N), Peroxisomen (Per), Plasmamembran (PM), Vakuole (V). *Arabidopsis*-DAOs sind mit den entsprechenden Genlozi angegeben. Die Ergebnisse für die DAOs der Boraginales sind grau unterlegt.

Sequenz	Klade	BaCelLo	CELLO	PProwler	WoLF	TargetP
At1g31670.1	I	E	Zyt	E	Cp	E
At1g31690.1	I	Cp	Cyt	E	E	E
At1g31710.1	I	E	Zyt	E	Cp	E
At1g62810.1	I	E	Zyt	E	Cp/V	E
At2g42490.1	II	N	M	Per	Zyt/Per	Cp
At3g43670.1	I	E	Zyt	E	Cp	E
At4g12270.1	I	E	Cp	E	Cp/V	E
At4g12280.1	I	N	Zyt	Zyt	Zyt	Zyt
At4g12290.1	I	N	Zyt	E	Cp	E
At4g14940.1	I	E	PM	E	Cp	E
AB289457.1	II	Cp	M	Cp	Cp	Cp
DQ873385.1	II	Cp	Cp	Cp	Cp	Cp
<i>Ec</i> DAO1	I	N	PM	E	Cp	E
<i>Hi</i> DAO1	I	E	Zyt	E	Cp	E
<i>So</i> DAO1	I	E	Zyt	E	V	E
<i>So</i> DAO2	II	Cp	Zyt	Zyt	Per	Cp
<i>So</i> DAO3	II	Cp	Cp	Cp	Zyt	Cp
<i>Sv</i> DAO1	I	N	PM	E	Cp	E
<i>Sv</i> DAO2	I	E	PM	E	Cp	E
<i>Sv</i> DAO3	I	E	Zyt	E	Zyt	E

3.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zu identifizierten Kandidatensequenzen

Tabelle 3.6 Identifizierte Kandidatensequenzen der subtraktiven cDNA-Banken von *H. indicum* und *S. officinale*. Eine Vorhersage der Funktion erfolgte durch Sequenzvergleiche mit der nr-Datenbank mittels BLASTX. Der jeweils beste Treffer ist mit der *Accession*-Nummer, der Spezies und dem E-Wert angegeben. Kandidatensequenzen sind mit der Anzahl der dazugehörigen Rohsequenzen (Rohseq.) aufgelistet, welche von den jeweiligen SSH-Banken generiert wurden. Die Transkriptsequenzen codierend für *HiDAO1*, *SoDAO1* und *SoDAO2* wurde mittels RACE-PCR vervollständigt und sind mit der Länge des offenen Leserahmens angegeben.

Sequenz-ID	bester BLASTX-Treffer		Länge	Roh-	
	<i>Accession</i> -Nr.	Spezies	E-Wert	seq.	
Acetohydroxysäure-Synthase					
<i>HiAHAS-EST1</i>	AAN16903.1	<i>Amaranthus blitoides</i>	3×10^{-17}	189	16
<i>HiAHAS-EST2</i>	CAN61470.1	<i>Vitis vinifera</i>	2×10^{-48}	390	7
<i>HiAHAS-EST3</i>	XP_002511176.1	<i>Ricinus communis</i>	1×10^{-20}	192	2
<i>SoAHAS-EST1</i>	AAL93236.1	<i>Amaranthus retroflexus</i>	9×10^{-53}	300	17
<i>SoAHAS-EST2</i>	AAL93236.1	<i>Amaranthus retroflexus</i>	1×10^{-51}	297	14
<i>SoAHAS-EST3</i>	AEK97542.1	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	1×10^{-5}	71	2
Diaminoxidase					
<i>HiDAO1</i>	XP_002278244.1	<i>Vitis vinifera</i>	0	1986	150
<i>HiDAO-EST1</i>	NP_001169559.1	<i>Zea mays</i>	3×10^{-123}	576	41
<i>HiDAO-EST2</i>	XP_003601196.1	<i>Medicago truncatula</i>	5×10^{-50}	303	18
<i>HiDAO-EST3</i>	AAD49420.1	<i>Canavalia lineata</i>	2×10^{-31}	427	13
<i>HiDAO-EST4</i>	XP_002516782.1	<i>Ricinus communis</i>	6×10^{-55}	417	7
<i>HiDAO-EST5</i>	BAD95322.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7×10^{-28}	177	7
<i>SoDAO1</i>	XP_002278244.1	<i>Vitis vinifera</i>	0	2025	34
<i>SoDAO2</i>	XP_002511334.1	<i>Ricinus communis</i>	0	2253	19
flavinabhängige Monooxygenase					
<i>HiFMO-EST1</i>	AAV91887.1	<i>Gossypium bickii</i>	1×10^{-66}	440	18
<i>HiFMO-EST2</i>	XP_002467524.1	<i>Sorghum bicolor</i>	3×10^{-33}	235	3
<i>HiFMO-EST3</i>	XP_002265316.2	<i>Vitis vinifera</i>	3×10^{-58}	398	2
<i>HiFMO-EST4</i>	AAV91887.1	<i>Gossypium bickii</i>	2×10^{-66}	452	8
<i>SoFMO-EST1</i>	XP_002329910.1	<i>Populus trichocarpa</i>	3×10^{-29}	240	13
<i>SoFMO-EST2</i>	XP_002329910.1	<i>Populus trichocarpa</i>	4×10^{-28}	252	10

4 Diskussion

Komplexe sekundäre Stoffwechselwege etablierten sich im Verlauf der Evolution in weiten Teilen des Pflanzenreichs, wie zum Beispiel die Flavonoid-Biosynthese oder, nur vereinzelt in wenigen Spezies, die Biosynthese des Nikotins (KOES *et al.* 2005, WINK 2003). Die über 200 000 bekannten Sekundärstoffe sind für die Pflanze ein wichtiger Bestandteil, um mit der biotischen und abiotischen Umwelt effizient interagieren zu können (HARTMANN *et al.* 2005). Diese enorme Vielfalt wird daher auch als Folge eines Wettrüstens zwischen den interagierenden Arten interpretiert (EHRlich & RAVEN 1964).

Interaktionen, wie die zwischen einem Pathogen und seinem Wirt, werden vermutlich von beiden Akteuren durch eine komplementäre Genetik determiniert und sind genotypspezifisch (FLOR & DEMEREC 1956). Infolgedessen werden Pathogene selektiert, die häufig vertretene Wirtsgenotypen befallen können, sodass seltene Wirtsgenotypen einen Selektionsvorteil bekommen. Solche extrem artspezifischen Interaktionen üben womöglich den entscheidenden Selektionsdruck aus, wodurch genetische Vielfalt durch sexuelle Rekombination aufrechterhalten wird. Nach dieser sogenannten *Red-Queen*-Hypothese werden eine ständige Veränderung des Erbguts und permanente Anpassungsvorgänge zur Notwendigkeit, um während der Evolution nicht ausselektiert zu werden (BELL 1982). Dieser Hypothese folgend könnten Sekundärmetabolite und die dadurch bedingten, zum Teil sehr spezifischen Interaktionen einen ähnlichen Effekt auf die Evolution der genetischen Vielfalt haben.

Genduplikationen erhöhen die Variabilität von Genomen und sind Möglichkeiten, wie neue Stoffwechselwege entstehen können. Sie resultieren aus Fehlern während der Meiose, zum Beispiel ungleiche Crossing-Over-Ereignisse, und aus Retroposition, bei der revers transkribierte mRNA wieder in das Genom integriert wird. Neue Metabolite können außerdem entstehen, wenn zuvor isoliert exprimierte Enzyme nach Veränderung der jeweiligen Regulationselemente zeitgleich in einer Zelle zusammenwirken oder wenn ein Gen bifunktional wird (OBER 2010, PIATIGORSKY *et al.* 1988, PICHERSKY & GANG 2000). Ferner können artfremde Gene durch horizontalen Gentransfer in einen Organismus gelangen (TALIANOVA & JANOUSEK 2011). Ein neues Enzym muss dabei einen Selektionsvorteil bewirken, noch bevor

der komplette Stoffwechselweg etabliert ist (HOROWITZ 1945). Dies wirft generell Fragen auf, wie sich komplette Stoffwechselwege im Verlauf der Evolution etablieren konnten.

Mit dem bisherigen Kenntnisstand bietet das System der PAs einen detaillierten Einblick in Funktionsweisen bis auf Molekülebene. Die molekulare Evolution der HSS ist ein Beispiel, wie neue Enzyme durch Genduplikation und anschließende Subfunktionalisierung entstehen können (siehe Kap. 1.2.2). Für die komplette Biosynthese von PAs können zahlreiche weitere Gene postuliert werden, deren Kenntnis Grundvoraussetzung für eine genaue Rekonstruktion der PA-Evolution ist. Frühere Projekte zur Identifizierung weiterer Gene der PA-Biosynthese waren erfolglos. Verschiedene Kandidaten wurden zwar durch Bestimmung einer enzymatischen Aktivität oder cDNA-Sequenzierung identifiziert, aber entsprechende Proteinsequenzen konnten nicht ermittelt beziehungsweise eine spezifische Funktion für die PA-Biosynthese konnte nicht nachgewiesen werden (CHANG & HARTMANN 1998, DENKER 2008, EHMKE *et al.* 1988, ENSS 2009).

Im Rahmen dieser Studie wurde das Transkriptom von drei ausgewählten PA-produzierenden Pflanzen, *H. indicum*, *S. officinale* und *P. amabilis*, in einem subtraktiven Ansatz untersucht. Dabei wurde die zellspezifische HSS-Expression unter der Annahme genutzt, dass in HSS-exprimierenden Zellen noch weitere Syntheseschritte für die PA-Produktion katalysiert werden. *Vice versa* werden in Zellen, die HSS nicht exprimieren, auch keine beziehungsweise eine verringerte Expression von Faktoren der PA-Biosynthese erwartet. Mithilfe einer solchen Vergleichsprobe wurden Transkripte von Genen identifiziert, die mit dem *hss*-Gen koexprimiert werden und unter denen vermutlich einige für weitere Faktoren der PA-Biosynthese codieren.

4.1 Referenzgene für Transkriptquantifizierungen

Da für die Identifizierung von cDNA-Sequenzen, die für spezifische Faktoren der PA-Biosynthese codieren, ein Ansatz auf transkriptioneller Ebene gewählt wurde, war eine genaue Transkriptquantifizierung eine wichtige Voraussetzung für dieses Projekt. Übliche Methoden hierfür sind die semiquantitative oder die quantitative RT-PCR. Beiden relativen Methoden liegt ein Vergleich der Messwerte mit einer Vergleichsprobe und eine Normalisierung mit einer endogenen Referenz zugrunde, die einen möglichst stabilen Transkriptgehalt aufweisen sollte. Da von den untersuchten Versuchspflanzen keine Sequenzdaten über verlässliche Referenzgene existieren, wurden Transkripte der konservierten Haushaltsgene *act*, *ef1a* und *ubq* aufgrund der elementaren Prozesse, in die sie eingreifen, identifiziert (siehe Kap. 3.1) und als

Referenzen für relative Transkriptquantifizierungen verwendet.

Alle drei Proteine gehören jeweils Proteinfamilien mit mehreren Isoformen an. Von *A. thaliana* und *Populus trichocarpa* HOOK. existieren jeweils acht ACT-Isoformen, die ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen (MCDOWELL *et al.* 1996b, ZHANG *et al.* 2010). MCDOWELL *et al.* konnten dabei zeigen, dass die ACT-Isoformen von *A. thaliana* am ähnlichsten exprimiert werden, wenn sie von gleichen Duplikationsereignissen stammen, und schlussfolgerten daraus, dass Regulationselemente ähnlich konserviert sind wie die proteincodierenden Sequenzen. Rückschlüsse auf die Expression auf Basis einer rekonstruierten Phylogenie und Vergleiche mit der gut untersuchten *A. thaliana* können daher bei der Beurteilung helfen, ob die identifizierte ACT-codierende cDNA sich für eine Datennormalisierung eignet.

Die identifizierten ACT-codierenden cDNA-Fragmente sind bis auf die Sequenz der Orchidee zu dem *Arabidopsis*-Transkript des *act7*-Gens am nächsten verwandt. Transkripte der *Arabidopsis*-Gene *act7* (At5g09810.1) sowie *act2* (At3g18780.1) weisen den stabilsten Gehalt auf und werden daher oft zur Normalisierung eingesetzt (CZECHOWSKI *et al.* 2005). Von *act7* wurde jedoch auch eine erhöhte Expression in jungen, sich schnell entwickelnden Geweben gezeigt (MCDOWELL *et al.* 1996a). qRT-PCRs mit cDNA von *S. officinale* deuteten in frühen Experimenten dieser Studie ebenfalls eine unterschiedliche Konzentration von ACT- wie auch von EF1a- und UBQ-codierenden Transkripten an, wenn Daten auf die Menge an Gesamt-RNA bezogen wurden. Eine scheinbar erhöhte Konzentration in alten statt in jungen *Symphytum*-Blättern ist jedoch gegensätzlich zu dem Expressionsmuster bei *A. thaliana*. Des Weiteren konnte dieser Unterschied nach Verdünnung der cDNA nicht mehr beobachtet werden und ist daher vermutlich auf Polymerase-inhibierenden Substanzen in den *Symphytum*-Proben zurückzuführen. Polysaccharide und Sekundärmetabolite wie Polyphenole können in PCRs als Inhibitoren wirken (KOONJUL *et al.* 1999) und kommen daher als wahrscheinliche Ursache für den gemessenen unterschiedlichen Transkriptgehalt in den *Symphytum*-Proben infrage. In Proben von *H. indicum* wiesen die ACT-codierenden Transkripte keine signifikanten Konzentrationsunterschiede auf.

Auch für EF1a werden Isoformen mit konstanter und differenzieller Expression beschrieben, wobei eine Isoform bei den Gräsern *Lolium perenne* L. und *Brachiaria brizantha* (HOCHST. EX A. RICH.) STAPF von Transkripten mit dem stabilsten gemessenen Gehalt codiert wird (GU *et al.* 2011, LEE *et al.* 2010, POKALSKY *et al.* 1989, RANSOM-HODGKINS 2009, SILVEIRA *et al.* 2009, URSIN *et al.* 1991). Eine Zuordnung EF1a-codierender Fragmente von PA-produzierenden Arten zu den *Arabidopsis*-Orthologen war mittels eines Stammbaums wie für ACT-codierende cDNA

allerdings nicht möglich, da die verschiedenen Isoformen in den analysierten Arten unabhängig entstanden sind.

Die identifizierten UBQ-codierenden Fragmente sind bis auf das *Cynoglossum*-Fragment am nächsten mit der Gruppe der Ubiquitin-Extensions-Proteine verwandt. Transkripte codierend für diese wie auch für ubiquitinkonjugierende Enzyme, eine weitere am Proteinabbau beteiligte Proteinfamilie, werden vielfach zur Normalisierung eingesetzt und weisen eine relativ stabile Konzentration auf (BRUNNER *et al.* 2004, CZECHOWSKI *et al.* 2005, PAOLACCI *et al.* 2009, SILVEIRA *et al.* 2009). Ausgenommen cDNA codierend für das Polyubiquitin UBQ5 erwies sich beim Reis als weniger stabil konzentriert (JAIN *et al.* 2006). Die identifizierten, für Ubiquitin-Extensions-Proteine codierenden Sequenzen von PA-produzierenden Spezies eignen sich daher womöglich besser zur Datennormalisierung als cDNA, die für Proteine der Polyubiquitin-Familie codiert.

Wie für die homologen Haushaltsgene anderer Spezies in der Literatur beschrieben wurde, können deren Transkripte codierend für bestimmte Isoformen in ihrem Gehalt schwanken, obwohl sie zu relativ stabil exprimierten Genfamilien gehören. Um solche Unsicherheiten zu berücksichtigen, wurde zur Quantifizierung von Transkripten mittels qRT-PCR wie von VANDESOMPELE *et al.* (2002) vorgeschlagen mit mehreren Referenzen normalisiert. Daten der genutzten Referenzgene *act*, *ef1a* und *ubq* unterschieden sich dabei statistisch nicht signifikant und bestätigen eine konstante Expression und Eignung zur Transkriptnormalisierung bei den dargestellten Experimenten.

Von mehreren Autoren wird eine alternative Strategie vorgeschlagen, bei der *Primer* verwendet werden, die mit einem bei allen Isoformen konservierten cDNA-Bereich hybridisieren. Dieses Vorgehen kann jedoch nur erfolgreich sein, wenn ein entsprechendes Protein durch die verschiedenen Isoformen ausbalanciert exprimiert wird (BRUNNER *et al.* 2004, CZECHOWSKI *et al.* 2005). Für *act2* und *act8* von *A. thaliana* wurde ein solches komplementäres Expressionsmuster beschrieben und die kombinierte quasikonstitutive Transkriptmenge wurde als geeignete Referenz bei qRT-PCRs eingesetzt (AN *et al.* 1996, CHARRIER *et al.* 2002). Für Organismen, von denen nicht alle Isoformen bekannt sind, ist diese Strategie allerdings keine Möglichkeit.

4.2 Induzierbarkeit der PA-Biosynthese

Jasmonsäure und ihre Derivate wie Methyljasmonat sind bekannt, Entwicklungsprozesse und vor allem Verteidigungsreaktionen von vielen Pflanzen zu regulieren. Als Antwort auf Verwundung aktivieren Jasmonat-Derivate zum Beispiel Gene, die eine Resistenz gegenüber Herbivoren und Pathogenen erhöhen (CREELMAN & MULLETT 1997, GEYTER *et al.* 2012). In diesem Zusammenhang werden je nach Spezies unter anderem bestimmte Sekundärstoffe vermehrt gebildet wie beispielsweise Terpenoid-Indol-Alkaloide in *Catharanthus roseus* (L.) G. DON, Phenylpropanalkaloide in *Medicago truncatula*, Monolignole in *Arabidopsis* oder Nikotin in Tabak (BALDWIN *et al.* 1994, PAUWELS *et al.* 2008, RISCHER *et al.* 2006, SUZUKI *et al.* 2005). Das leicht flüchtige Methyljasmonat gilt darüber hinaus als mögliche Komponente, die ein Verletzungssignal zu benachbarten, nicht über das Vaskularsystem in Verbindung stehenden Blättern oder Individuen transportieren kann (HEIL & TON 2008). Es ist daher denkbar, dass auch die PA-Biosyntheserate als Teil einer Abwehrstrategie nach Verletzung einer Pflanze über dieses System gesteigert wird, sodass anschließend ein erhöhter Fraßschutz gegeben ist.

Eine erhöhte Jasmonat-Konzentration kommt bei vielen Organismen außer in verletzten Geweben auch in kohlenstoff- und stickstoffverbrauchenden Zellen vor: in jungen sich schnell entwickelnden Geweben, während der Samen- und Fruchtentwicklung sowie in vegetativen Speichergeweben. Des Weiteren scheint Jasmonat Gene des Photosyntheseapparats zu inhibieren (CREELMAN & MULLETT 1995, 1997). Die HSS des PA-Stoffwechsels wird ebenfalls in jungen Geweben und Blüten exprimiert, jeweils in Zellen, in denen keine Chloroplasten vorkommen (ANKE *et al.* 2004, 2008, MOLL *et al.* 2002, NIEMÜLLER *et al.* 2012). Im Spross der Sojabohne wird das Vegetative-Speicherprotein als Antwort der Jasmonat-Signaltransduktion in Leitgewebezellen, in den zum Leitgewebe benachbarten Zellen und in der Epidermis exprimiert (HUANG *et al.* 1991). In PA-produzierenden Boraginales-Arten kann HSS in einigen dieser Zelltypen nachgewiesen werden (NIEMÜLLER *et al.* 2012). Eine Induktion der HSS durch Jasmonsäure und deren Derivate wurde bislang aber noch nicht untersucht. EL-MAWLA (2010) zeigten erstmals eine Korrelation zwischen dem Pflanzenhormon Methyljasmonat und dem PA-Gehalt einer transgenen *Hairy-Root*-Kultur von *Echium rauwolfii* (Boraginaceae). Es wurde daher überprüft, ob sich auch der PA-Gehalt der Boraginales-Arten *C. officinale*, *H. indicum* und *S. officinale* in Folge einer Methyljasmonat-Behandlung ändert (siehe Kap. 3.2). Ein ähnlicher Effekt wie bei *E. rauwolfii* konnte jedoch nicht beobachtet werden. Mehrere Gründe könnten diese Beobachtung erklären.

Fehler bei der Applikation sind angesichts der Perzeption des Hormons über die Gasphase und der Verwendung luftdichter Gefäße schwer vorzustellen. Bislang liegen jedoch keine geeigneten Kontrollen vor, um eine erfolgreiche Applikation zu überprüfen. Transkripte codierend für *Pathogenesis-related-1-b*-Proteine, einen Proteinase-Inhibitor-II, ein Jasmonat-ZIM-Domäne-Protein- (JAZ) 10 und Vegetatives-Speicherprotein-2, deren Gehalt sich in verschiedenen Pflanzen abhängig von Methyljasmonat ändert (CHUNG *et al.* 2008, FARMER & RYAN 1990, MITSUHARA *et al.* 2008, SHOJI & HASHIMOTO 2011b), könnten nach Hormoninkubation als Kontrolle vergleichend quantifiziert werden. Entsprechende Sequenzen von den untersuchten Boraginales-Arten müssen jedoch zunächst identifiziert werden. Des Weiteren befinden sich die in dieser Studie untersuchten Wurzelorgankulturen von *C. officinale* in einem künstlichen Zustand. In Versuchen hatte sich gezeigt, dass Leitgewebe bedingt durch eine optimale Nährstoffversorgung und das Fehlen von oberirdischen Organen nur rudimentär angelegt wird. Da in der Endodermis und dem Perizykel der Wurzel aber die HSS exprimiert wird, könnten morphologische Veränderungen im Leitgewebe auch die Regulation der PA-Biosynthese betreffen. Dennoch zeigen selbst die Jasmonat-Behandlungen von *H. indicum* und *S. officinale*, von denen komplette Individuen mit allen drei Organtypen kultiviert wurden, keine Effekte auf die HSS-codierenden Transkripte und weisen auf einen möglicherweise grundlegend anderen Regulationsmechanismus der PA-Biosynthese im Vergleich zu *E. rauwolfii* hin.

Wie das äußerst diverse HSS-Expressionsmuster in Pflanzen dieser Ordnung andeutet, trennten sich die Arten vor Modifizierung der entsprechenden Regulations-elemente (siehe Kap. 1.2). Eine Induzierbarkeit durch Methyljasmonat könnte daher ebenfalls nach Trennung der Arten spezifisch in *E. rauwolfii* aber nicht in *C. officinale*, *H. indicum* und *S. officinale* entstanden oder aufrechterhalten worden sein. Ein entscheidender Selektionsvorteil für die Pflanze könnte hierbei durch unterschiedlich ausgeprägte Umweltbedingungen hervorgerufen werden.

Eine generelle hormonelle Feinregulierung der PA-Biosynthese ist aber nicht auszuschließen und könnte sich in PA-produzierenden Organismen auf verschiedene Weisen entwickelt haben. In *Jacobaea vulgaris* hat Herbivorie einen nachgewiesenen Effekt auf PAs. Nach Verletzung findet zwar keine Steigerung der Biosyntheserate statt, PAs werden aber abhängig vom Genotyp im Kormus umverteilt (HOL *et al.* 2004). In dazu befähigten Individuen könnte eine veränderte Genexpression durch Methyljasmonat nicht Biosynthesegene betreffen sondern Gene, die für die Allokation von PAs verantwortlich sind.

Sollte eine Induzierbarkeit unter Boraginales-Arten auf *E. rauwolfii* beschränkt sein, wäre das ein weiteres Beispiel für die vielfältige Evolution der PA-Biosynthese

innerhalb dieser Pflanzenordnung und ermöglichte weitere Ansätze zur Identifizierung von Faktoren der PA-Biosynthese. Um dies zu überprüfen, müsste jedoch zunächst ein Effekt durch Methyljasmonat auf den PA-Gehalt des *E.-rawolfii*-Wildtyps bestätigt werden, um auszuschließen, dass eine Induzierbarkeit in der transgenen *Hairy-Root*-Kultur nicht künstlich hervorgerufen wurde. Damit besteht derzeit noch kein induktives System, das sich zur Identifizierung von Faktoren der PA-Biosynthese eignet.

4.3 HSS-Expression

In allen untersuchten PA-haltigen Pflanzen wurde eine zellspezifische Expression der HSS festgestellt (siehe Kap. 1.2.1). Mit dem Hintergrund geeignetes Pflanzenmaterial mit einer differenziellen HSS-Expression zur Herstellung einer subtraktiven cDNA-Bank zu identifizieren, wurden in *H. indicum*, *S. officinale* und *P. amabilis* verschiedene Gewebe und Entwicklungsstadien hinsichtlich unterschiedlich starker HSS-Transkriptmengen analysiert.

4.3.1 Zellspezifische Analyse von *Heliotropium*-Epidermiszellen durch LCM

In *Heliotropium*-Blättern wurde HSS mittels Immunolokalisation ausschließlich in Zellen der unteren Epidermis detektiert (NIEMÜLLER *et al.* 2012). Trotz der Ähnlichkeit ist eine HSS-Expression in der oberen Epidermis nicht nachzuweisen. Beide Zelltypen boten sich daher für eine subtraktive Analyse an, um weitere Faktoren der PA-Biosynthese zu identifizieren. Eine Isolierung der Zellen durch einen Epidermisabzug war aufgrund der relativ kompakten Struktur der Blätter ohne Kontamination durch Gewebe der gegenüberliegenden Seite jedoch nicht möglich (siehe Kap. 3.3.1). Wie in Kapitel 3.3.2 gezeigt wird erst mithilfe der laserunterstützten Mikrodissektion (LCM) eine genügend hohe Genauigkeit bei der Probenisolierung erreicht, wodurch eine Kontamination durch andere Zelltypen ausgeschlossen werden kann.

Die LCM-Technik wurde bereits erfolgreich bei einigen Pflanzenarten für eine Transkriptomanalyse mit zellulärer Auflösung eingesetzt (zum Beispiel CAI & LASHBROOK 2006, CHANDRAN *et al.* 2010, DEEKEN *et al.* 2008, DEMBINSKY *et al.* 2007, NAKAZONO *et al.* 2003, OHTSU *et al.* 2007, YU *et al.* 2007). Einzelne Zellen können durch diese Methode aus mikroskopischen Schnitten isoliert und molekularbiologisch analysiert werden. Besondere Schwierigkeiten bei der Transkriptquantifizierung ergeben sich dabei unter anderem während der Probenpräparation, da RNA in den

angeschnittenen Zellen leicht zugänglich für RNasen ist und degradiert werden kann. Verschiedene Strategien zur Konservierung der RNA werden in der Literatur und im Folgenden diskutiert (DAY *et al.* 2005, 2007).

Für eine geeignete Probenvorbereitung, die entscheidend für eine erfolgreiche LCM ist, können unter anderem mikroskopische Schnitte mittels Kryosektionierung oder Kunststoffeinbettung generiert werden. Eine Kunststoffeinbettung mit Paraffin führt zu einem optimalen Erhalt der Morphologie. Aufgrund der quervernetzenden Reagenzien und Inkubationen über 0 °C ist diese Methode aber anfälliger für eine Fragmentierung der RNA (GOLDSWORTHY *et al.* 1999). Eine Kryosektionierung bietet dagegen einen ständigen Schutz vor RNasen während der Präparation (GILLESPIE *et al.* 2002) und wurde daher zur Anfertigung von Querschnitten der *Heliotropium*-Blätter einer Kunststoffeinbettung vorgezogen. Durch das Einfrieren und Trocknen steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass zelluläre Strukturen zerstört werden (NAKAZONO *et al.* 2003). Ein Schockgefrieren durch flüssigen Stickstoff und anschließendes Gefriertrocknen wirkten diesem Phänomen entgegen und sorgten für einen ausreichenden Gewebeerhalt der *Heliotropium*-Blattquerschnitte.

Aufgrund der geringen Menge an Material, das mittels LCM isoliert werden kann, wurde die gesamte Epidermis-cDNA aus *H. indicum* mittels PCR amplifiziert. Weil bei Erreichen der stationären Phase einer PCR sich Mengenverhältnisse unterschiedlicher cDNA-Moleküle jedoch angleichen (DAY *et al.* 2007), wurde der optimale PCR-Zyklus für die Amplifikation ermittelt. Hierdurch wurde sichergestellt, dass die PCR noch in der exponentiellen Wachstumsphase gestoppt wurde und PCR-vermittelte Artefakte auf ein Minimum reduziert wurden. Eine alternative Methode, die *In-vitro*-Transkription, gilt als weniger anfällig für eine Verschiebung der Mengenverhältnisse, jedoch sind die Ausbeuten aufgrund der linearen Amplifizierung geringer und es besteht die Gefahr einer Degradierung durch RNasen (EBERWINE *et al.* 1992, GELDER *et al.* 1990). SUBKHANKULOVA & LIVESEY (2006) verglichen beide Methoden mit RNA aus Maus-Zelllinien und zeigten, dass eine PCR-basierte Amplifizierung reproduzierbarer als eine *In-vitro*-Transkription ist. Allerdings werden Expressionsunterschiede reduziert, sodass leicht unterschiedliche Transkriptgehalte eventuell nicht mehr detektiert werden können. Aufgrund der zellspezifischen HSS-Expression werden vermutlich auch weitere Gene der PA-Biosynthese nur in bestimmten Zelltypen exprimiert (siehe Diskussion in Kap. 4.4.1). Ein Vergleich mit Zellen, in denen die PA-Biosynthese ausgeschaltet ist, lässt daher deutliche Expressionsunterschiede erwarten.

Mittels LCM isolierte Zellen von *H. indicum* bestätigen zum einen die bereits auf Proteinebene gezeigte exklusive HSS-Expression in der unteren Blattepidermis auch

auf Transkriptebene. Zum anderen zeigen die Ergebnisse, dass die Methode geeignet ist, um sortenreine Zellproben zu generieren. Eine solche Präzision der LCM wurde ebenfalls an Blättern von *A. thaliana* gezeigt. Ein epidermis- und mesophyllspezifisches Transkript wurde ausschließlich in den entsprechenden Zellen detektiert (INADA & WILDERMUTH 2005).

4.3.2 *Symphytum*-Blätter

In *S. officinale* werden PAs in der Wurzel hergestellt und von dort im gesamten Kormus verteilt (FRÖLICH *et al.* 2007). In Zellen der Endodermis findet sich die stärkste HSS-Expression. Auch eine oberirdische HSS-Expression wurde in Blättern beobachtet, die direkt unterhalb von Infloreszenzen mit noch geschlossenen Blütenknospen stehen (KRUSE 2011, NIEMÜLLER *et al.* 2012). Blätter von *S. officinale* wurden daher untersucht, ob sie eine differenzielle HSS-Expression aufweisen und sich für eine subtraktive Analyse eignen.

In *Symphytum*-Blättern wurden deutlich unterschiedliche Konzentrationen HSS-codierender Transkripte gemessen (siehe Kap. 3.4.2). Die meisten beprobten Blätter mit der höchsten Menge an HSS-codierenden Transkripten wuchsen wie in der Literatur beschrieben ebenfalls direkt unterhalb von Blütenständen mit noch geschlossenen Blütenknospen. Dabei war diese Beobachtung nicht immer reproduzierbar. Eine HSS-Expression ist in diesem Organ daher womöglich noch von weiteren Faktoren abhängig. Neben der Position des Blattes zu einem noch jungen Blütenstand könnte ein bislang nicht beachteter jahreszeitlicher Faktor das Fehlen HSS-codierender Transkripte in einigen Proben erklären. Dieser Zusammenhang wurde bereits von NIEMÜLLER (2007) vermutet. Da die untersuchten Blätter von Pflanzen aus dem Freiland gesammelt wurden, sind auch weitere Faktoren nicht auszuschließen. Obwohl es für die PA-Biosynthese noch keine Hinweise dafür gibt, könnten Herbivoren ähnlich wie bei der Nikotinbiosynthese im Tabak eine Induktion der Alkaloidbiosynthese bewirken (BALDWIN 1989). In diesem Zusammenhang könnte eine Nähe der Blätter zu jungen Infloreszenzen bloß eine Voraussetzung für eine Induzierbarkeit und nicht Ursache der HSS-Expression sein. Interessanterweise ließ sich in einer Gewächshauskultur möglicherweise als Folge von deutlich weniger Fraßfeinden bislang keine oberirdische HSS-Expression feststellen (KRUSE, unpubliziert).

Fütterungsversuche mit radioaktiven Substraten deuten an, dass die komplette PA-Biosynthese in HSS-exprimierenden Blättern von *S. officinale* abläuft (REIMANN 2008). Eine erhöhte PA-Produktion ist daher auch in den hier untersuchten *Symphytum*-Blättern zu erwarten und bewirkt wahrscheinlich einen verbesserten Schutz der generativen Gewebe vor Herbivorie wie bereits von KRUSE (2011) und NIEMÜLLER

LER *et al.* (2012) vermutet wurde. Dieses Phänomen wurde ebenfalls in anderen PA-produzierenden Spezies beobachtet. Bei der Asteraceae *E. cannabinum* geht die Bildung generativer Gewebe mit einer erhöhten HSS-Expression in Wurzeln einher und bei der monokotylen *P. amabilis* wurde zusätzlich zu den vegetativen Geweben der Luftwurzeln eine starke HSS-Expression in Blütenknospen gemessen (ANKE *et al.* 2004, 2008).

4.3.3 *Phalaenopsis*-Wurzeln

Neben der HSS-Expression in Blütenknospen der Orchidee *P. amabilis* wird auch eine Expression in den Zellen rings um das Apikalmeristem der Wurzel beschrieben (ANKE *et al.* 2008). Wie dabei ein Western Blot zeigt, wird in Wurzeln, die in das Substrat wachsen, kein HSS-Protein exprimiert. Damit sind von *P. amabilis* ähnliche Gewebe verfügbar, die eine differenzielle HSS-Expression aufweisen.

Die HSS-Expression in Wurzelspitzen wurde im Rahmen eines Bachelorprojekts auf Transkript- und Proteinebene untersucht (FRANK 2010). HSS-Protein wurde dabei mithilfe von Gewebeabdrücken nachgewiesen (siehe Kap. 3.4.3). Eine strikte Trennung in HSS-exprimierende Luftwurzeln und Substratwurzeln ohne HSS-Expression war nicht immer möglich. Weitere Faktoren, zum Beispiel Licht, könnten wie von ANKE (2004) vermutet eine Ursache für diese Beobachtung sein. ANKE wies aufgrund der HSS-Expression in der Wachstumszone der Wurzel auch auf eine wachstumsregulierte Expression hin, wie sie bei anderen PA-produzierenden Spezies zu beobachten ist. Dafür spricht auch, dass die Substrate der PA-Biosynthese Spermidin und Putrescin, deren höchste Konzentrationen in meristematischen und wachsenden Geweben vorkommen (HOUGAARD 1992), Wachstum und Entwicklung von Pflanzen regulieren (EVANS & MALMBERG 1989). Eine am Wachstum gekoppelte Regulation der PA-Biosynthese würde zudem erklären, warum isolierte Luftwurzelspitzen nicht zur Alkaloidbiosynthese fähig sind, da diesen Zellen eventuell nötige Faktoren aus der Wachstumszone fehlen (FRÖLICH 1996). Bisher ist allerdings noch kein eindeutiger Zusammenhang belegt.

Eine Analyse der Wurzelproben mit und ohne HSS-Protein mittels sqRT-PCR deutet eine geringe Konzentration HSS-codierender Transkripte in der cDNA aus Substratwurzeln an, obwohl darin das Protein nicht detektiert wurde. In einer Studie von NURHAYATI (2004) zeigen Quantifizierungen HSS-codierender Transkripte in Substratwurzeln ebenfalls Signale bei sqRT-PCR- und Northern-Blot-Analysen. Pseudogene ohne Introns wurden im Genom von *P. amabilis* nachgewiesen und ergeben bei einer PCR ein gleich großes Amplifikat wie HSS-codierende cDNA (NURHAYATI *et al.* 2009). Eine Kontamination der cDNA-Proben durch genomische DNA

könnte daher die beobachtete Diskrepanz zwischen Protein- und Transkriptgehalt erklären. Eine unterschiedliche Sensitivität zwischen den Analysemethoden für Transkripte und Proteine könnte ebenfalls Ursache dafür sein. Trotz des Nachweises von HSS-codierenden Transkripten in Luft- und Substratwurzeln von *P. amabilis* konnte eine deutliche differenzielle HSS-Expression gemessen werden, sodass beide Gewebe subtraktiv analysiert wurden.

4.4 Identifizierung von Kandidatengen

Die Biosynthese der kompletten Struktur von PAs läuft vermutlich über mehrere enzymkatalysierte Reaktionsfolgen ab. So können Pflanzen keine PAs mehr synthetisieren, wenn sie mit Hemmstoffen für verschiedene Enzymklassen behandelt werden, zum Beispiel mit β -Hydroxyethylhydrazin für Diaminoxidasen oder Chlorsulfuron für Acetohydroxysäure-Synthasen (BÖTTCHER *et al.* 1993, FRÖLICH *et al.* 2006, 2007, TOPPEL 1987). Neben der HSS, welche den ersten Schritt zur Biosynthese der Necinbase katalysiert (siehe Kap. 1.1.3), sind jedoch noch keine weiteren Enzyme oder Regulationsfaktoren der PA-Biosynthese charakterisiert.

4.4.1 Evaluierung der Strategie

In allen untersuchten PA-produzierenden Arten wird HSS in bestimmten Zellen hochspezifisch exprimiert. Verschiedene Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass in den gleichen Zellen weitere Reaktionsschritte des PA-Stoffwechsels enzymatisch katalysiert werden: 1. Das hydrophile und inaktive PA-*N*-Oxid ist die Transportform für das Leitgewebe (HARTMANN & TOPPEL 1987, HARTMANN *et al.* 1989, WITTE *et al.* 1990). HSS-exprimierende Zellen von *S. vernalis* und *J. vulgaris* befinden sich direkt angrenzend zum Phloem, das eine Biosynthese bis zu diesem Metaboliten in derselben Zelle nahelegt (MOLL *et al.* 2002, NIEMÜLLER *et al.* 2012). 2. In Geweben, in denen HSS-exprimierende Zellen vorhanden sind, wurde die komplette PA-Biosynthese durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markierten Substraten lokalisiert (FRÖLICH *et al.* 2006, 2007). 3. Die Biosynthese von anderen Sekundärmetaboliten findet ebenfalls in einem einzigen Zelltyp statt. Beispielsweise sind alle Enzyme der Monoterpenoid-Biosynthese von Minze-Arten in spezialisierten, drüsigem Trichomen zu finden, in denen die Alkaloide auch gespeichert werden (GERSHENZON *et al.* 1992, MCCASKILL *et al.* 1992). Unter der Annahme, dass weitere Faktoren der PA-Biosynthese mit der HSS koexprimiert werden, können unter den differenziell exprimierten Genen folglich auch weitere der PA-Biosynthese erwartet

werden.

Zahlreiche Methoden sind zur Identifizierung von differenziell exprimierten Genen anwendbar. Auf dem Proteom und Transkriptom basierende Methoden bieten den Vorteil die Gesamtheit aller exprimierten Gene zu analysieren. Eine besondere Schwierigkeit stellen dabei gering konzentrierte Transkripte oder Proteine dar, weil ihre Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegen kann. Transkriptomanalysen haben eine der geringsten Nachweisgrenze und erlauben die Detektion von einzelnen DNA-Molekülen (PALMER *et al.* 2003).

Trotz der rasch steigenden Zahl vollständig sequenzierter Genome und Transkriptome liegen von PA-produzierenden Pflanzen solche Daten nicht vor. Eine Identifizierung von differenziell exprimierten Genen durch Transkriptquantifizierungen von Kandidatensequenzen aus Datenbanken mittels *Microarrays* oder quantitativer beziehungsweise semiquantitativer RT-PCR war daher nicht möglich. Die sogenannte *Differential-Display-RT-PCR* liefert Ergebnisse unabhängig von einer cDNA-Sequenz, da Transkripte mit einem Gemisch aus etwa zehn Nukleotiden großen *Primern*, welche zufällig gewählte Sequenzen aufweisen, mittels PCR amplifiziert werden (LIANG & PARDEE 1992). Anschließend sind unterschiedlich konzentrierte Transkripte gegebenenfalls nach gelelektrophoretischer Analyse der PCR-Produkte zweier cDNA-Proben erkennbar. BERTIOLI *et al.* (1995) zeigten jedoch, dass diese Methode abundante mRNAs präferiert und zur Identifizierung seltener Transkripte eher ungeeignet ist. Durch SAGE (serielle Analyse der Genexpression) können ebenfalls Transkripte mit unbekannter Sequenz quantifiziert werden. Als Ergebnis werden kurze Sequenzen (9–11 nt) des 3'-Transkriptendes generiert, deren Anzahl proportional zur Transkriptkonzentration im untersuchten Material ist. Aufgrund der kurzen Länge ist jedoch eine Referenzdatenbank nötig, um die SAGE-Sequenzen eindeutig einem Transkript zuzuordnen zu können (TUTEJA & TUTEJA 2004, VELCULESCU *et al.* 1995).

Pyrosequenzierung erlaubt inzwischen die Sequenzierung längerer Bereiche sowohl der cDNA als auch der mRNA in einer kürzeren Zeit und mit weniger Kosten als die SANGER-Technik. Trotzdem bedeutet eine vollständige Abdeckung des Transkriptoms, die auch die Identifizierung von seltenen Transkripten erlaubt, immer noch einen enormen Aufwand und könnte im Identifizierungsprozess zu einem zeitlich limitierenden Faktor werden. In verschiedenen, publizierten Studien wurde daher die Anzahl unterschiedlicher Transkripte pro analysiertem Transkriptom reduziert, indem Proben nur eines Zelltyps sequenziert wurden (EMRICH *et al.* 2007, OHTSU *et al.* 2007). Durch die Verringerung der Komplexität des Transkriptoms erhöht sich automatisch die Konzentration jeder einzelnen mRNA-Spezies, sodass sich die

Wahrscheinlichkeit erhöht, auch gering konzentrierte Transkripte zu identifizieren. Eine Kombination aus der Analyse eines einzigen Zelltyps und cDNA-Anreicherung mittels subtraktiver Hybridisierung wurde mit Perizykel-Zellen aus Mais-Wurzeln von DEMBINSKY *et al.* (2007) durchgeführt. Eine subtraktive Hybridisierung erhöht die cDNA-Konzentration von differenziell exprimierten Genen, wodurch die Komplexität des Transkriptoms noch weiter verringert wird. Mit einer solchen Strategie der zellspezifischen Analyse und cDNA-Anreicherung durch subtraktive Hybridisierung wurde die PA-produzierende Pflanze *H. indicum* analysiert, deren HSS-Expression im Blatt auf Zellen der unteren Epidermis beschränkt ist (siehe Diskussion in Kapitel 4.3.1). Da morphologisch sehr ähnliche Zellen der oberen Epidermis keine HSS-Expression zeigen, wurde cDNA dieser Zellen als Vergleichsprobe eingesetzt, um differenziell exprimierte Gene identifizieren zu können.

Neben einzelnen Zellen zur Alkaloidproduktion, sogenannte „Zellfabriken“ (LUCA & LAFLAMME 2001), gibt es auch Beispiele für eine Beteiligung von mehreren Zelltypen an der Biosynthese von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Monoterpenoid-Indol- und Benzylisochinolinalkaloide werden zum Beispiel durch das Zusammenspiel von Zellen des Phloemparenchyms, der Milchröhren und Epidermis synthetisiert (BIRD *et al.* 2003, KUTCHAN 2005, MURATA *et al.* 2008). Trotz fehlender Hinweise kann theoretisch nicht ausgeschlossen werden, dass auch Gene der PA-Biosynthese in mehreren Zelltypen exprimiert werden. Ergänzend zu der Analyse eines Zelltyps von *H. indicum*, wurden daher zusätzlich HSS-exprimierende Blätter von *S. officinale* und Luftwurzelspitzen von *P. amabilis* mit allen darin befindlichen Zelltypen untersucht. *Symphytum*-Blätter und *Phalaenopsis*-Substratwurzeln, die keine Expression des *hss*-Gens zeigen, wurden als Vergleichsprobe zu den morphologisch ähnlichen HSS-exprimierenden Geweben der jeweiligen Spezies für eine subtraktive Analyse eingesetzt.

Für die subtraktiven Analysen wurden cDNA-Banken mithilfe einer unterdrückenden subtraktiven Hybridisierung (SSH, *suppression subtractive hybridisation*) nach DIATCHENKO *et al.* (1996) hergestellt (siehe Kap. 3.4). Die SSH-Methode basiert auf einer subtraktiven Hybridisierung und Anreicherung der cDNA, die für differenziell exprimierte Proteine codiert. Mittels SSH wurden bereits differenziell exprimierte Gene unter anderem von pflanzlichen sekundären Stoffwechselwegen wie die Biosynthese von Betalain-Pigmenten in Arten der Caryophyllales oder von Chinolizidinalkaloiden der Lupinen, *Lupinus spec.*, identifiziert (BUNSUPA *et al.* 2011, CHRISTINET *et al.* 2004, OK *et al.* 2003).

Neben der SSH-Methode wurde eine subtraktive Hybridisierung nach MISHRA *et al.* (2005) im Rahmen dieser Studie erfolglos durchgeführt. Dabei wurde cDNA

einer Vergleichsprobe mit dem komplementären Strang an magnetische Kugeln gebunden und mit der zu analysierenden Probe hybridisiert. Große cDNA-Moleküle könnten dabei Bindungsstellen blockiert und eine effektive Subtraktion verhindert haben. Die SSH-Methode beinhaltet eine Restriktion der cDNA, wodurch sterische Hinderungen minimiert werden. Darüber hinaus wird die Wahrscheinlichkeit verringert, dass verschiedene aber ähnliche cDNA-Spezies einer Genfamilie durch Hybridisierungen mit konservierten Bereichen fälschlicherweise abgereichert werden (DIATCHENKO *et al.* 1996). Im Gegensatz zur Methode nach MISHRA *et al.* (2005) führte die SSH zu einer Anreicherung der cDNA codierend für differenziell exprimierte Proteine, wie anhand der HSS-codierenden cDNA belegt werden konnte.

Die Menge einer cDNA-Spezies ist in einer SSH-Bank nicht nur von dem Grad der Anreicherung sondern auch von der Transkriptkonzentration vor der subtraktiven Hybridisierung abhängig. Vor allem abundante Transkripte können daher noch in einer SSH-Bank präsent sein, obwohl sie für gleich exprimierte Proteine codieren und im Zuge der SSH abgereichert wurden (REBRIKOV *et al.* 2000). Ein *Macroarray* in Anlehnung an WANG *et al.* (2006) sollte daher als Testsystem etabliert werden, um eine differenzielle Expression zu überprüfen (siehe Kap. 3.4.1). Die Methode erwies sich allerdings nicht als geeignet, sodass eine alternative Strategie gewählt wurde.

Um möglichst viele unterschiedliche Sequenzen zu identifizieren, wurde die subtraktiv hybridisierte cDNA pyrosequenziert. Darüber hinaus erlauben die Daten der Pyrosequenzierung eine grobe Abschätzung über die Konzentration der verschiedenen cDNA-Spezies in der SSH-Bank. Eine Korrelation zwischen der Anzahl Rohsequenzen und der cDNA-Konzentration einer Probe konnte mehrfach gezeigt werden und gilt als relativ verlässlich (EMRICH *et al.* 2007, METZKER 2009, WALL *et al.* 2009, WEBER *et al.* 2007). Inwieweit mit der gewählten Stichprobengröße alle Gene erfasst wurden, die mit dem *hss*-Gen koexprimiert werden, lässt sich nicht sicher beantworten. Nur mit einer Rohsequenz vertretene Transkripte sind Hinweise dafür, dass noch nicht alle unterschiedlichen Sequenzen identifiziert wurden. Aufgrund der Abreicherung durch die SSH könnte es sich hierbei aber um Transkripte von gleich exprimierten Genen handeln. Eine Abreicherung bis zu einer Konzentration, ab der cDNA mittels Sequenzierung nicht mehr detektiert wurde, konnte für DHS-codierende Transkripte gezeigt werden, deren Konzentrationen in denselben untersuchten Geweben bei Studien von NIEMÜLLER *et al.* (2012) und NURHAYATI (2004) relativ stabil waren. Von HSS-codierenden Transkripten wurden als Folge der 13- bis 1 500-fachen Anreicherung dagegen 230–266 Rohsequenzen generiert. Wie die Anzahl der HSS- und DHS-codierenden Transkripte in der SSH-Bank andeuten und wie die Agoresegelelektrophorese der gesamten SSH-cDNA nahelegt, hat

eine signifikante An- beziehungsweise Abreicherung von cDNA stattgefunden. Des Weiteren bestätigen qRT-PCR-Experimente zur Quantifizierung von identifizierten DAO-codierenden Transkripten, dass der Grad eines Expressionsunterschieds mit der Anzahl entsprechender Rohsequenzen der SSH-Banken korreliert (siehe Kap. 3.5.1 und 3.5.2).

4.4.2 Putative homospermidinspezifische DAOs

Eine Beteiligung einer DAO an der Biosynthese von PAs wird seit den 80er Jahren von ROBINS postuliert (KHAN & ROBINS 1981, ROBINS 1982). DAOs stellen eine relativ große Proteinfamilie dar, deren Mitglieder eine Desaminierung von primären Aminogruppen katalysieren. (CONA *et al.* 2006). Rein hypothetische Überlegungen legen daher den Schluss nahe, dass eine DAO auch die primären Aminogruppen des Homospermidins oxidiert, sodass eine Zyklisierung zur Necinbase erfolgen kann. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch von der Biosynthese anderer Sekundärmetabolite bekannt. Nikotin und Tropanalkaloide werden von dem Diamin Putrescin ausgehend gebildet, das methyliert und anschließend durch eine DAO, in diesem Fall eine Methylputrescin-Oxidase, oxidiert wird. Anschließend reagiert das gebildete Aldehyd spontan zu einem Pyrrol-Ring (HASHIMOTO *et al.* 1990, HEIM & JELESKO 2004, KATOH *et al.* 2007, McLAUHLAN *et al.* 1993, MIZUSAKI *et al.* 1972, WALTON & McLAUHLAN 1990). Zur Bildung des Grundgerüsts von Benzylisochinolinalkaloiden wie Morphin ist eine DAO an der oxidativen Desaminierung von Tyramin beteiligt (BILKOVA *et al.* 2005, HASHIMOTO & YAMADA 1994). Für die Biosynthese des Chinolizidinalkaloids Lupinin wird eine DAO zur Oxidierung des Cadaverins postuliert und ein entsprechendes Kandidatengenes konnte kürzlich von der Lupine *Lupinus angustifolius* L. identifiziert werden (BUNSUPA *et al.* 2011).

Erste Hinweise für die Beteiligung einer DAO an der Biosynthese von PAs stammen von ROBINS (1982), der das PA Trachelanthamidin aus Homospermidin mithilfe einer Erbsen-DAO enzymatisch herstellte. BÖTTCHER *et al.* (1993) behandelten *S. vulgaris* mit β -Hydroxyethylhydrazin, einem spezifischen Hemmstoff für Diaminoxidasen, und beobachteten eine Akkumulation von Homospermidin, das nicht weiter in die PA-Biosynthese einging. Diese Beobachtung konnte auch bei anderen PA-produzierenden Arten gemacht werden (FRÖLICH *et al.* 2006, 2007). Dabei könnten DAOs des Primärstoffwechsels inhibiert worden sein, die als promiskuitive Enzyme unterschiedliche Amine als Substrat akzeptieren (MEDDA *et al.* 1995). Transgener Tabak, der HSS heterolog überexprimiert, akkumuliert Homospermidin aber keine Oxidationsprodukte oder weiteren Intermediate der PA-Biosynthese (ABDELHADY *et al.* 2009). Daher wird eine homospermidinspezifische DAO postuliert, die sich

in PA-produzierenden Organismen entwickelte und in anderen Pflanzen wie Tabak fehlt.

Von den in diesem Projekt untersuchten PA-haltigen Boraginales-Arten wurden mehrere DAO-codierende Fragmente mithilfe der SSH-cDNA-Banken identifiziert (siehe Kap. 3.5). Wie qRT-PCR-Experimente zeigen, codieren einige davon für Proteine (*HiDAO1*, *HiDAO-EST1*, *HiDAO-EST2*, *SoDAO1* und *SoDAO2*), die mit der HSS auf Transkriptebene koreguliert werden. Transkripte codierend für *HiDAO-EST1* und *HiDAO-EST2* sind dabei lediglich in etwa doppelt so hoch in HSS-exprimierenden Zellen erhöht. Eine biologische Relevanz für die PA-Biosynthese erscheint daher fragwürdig. Wie eine phylogenetische Analyse andeutet, ist *SoDAO2* nah verwandt mit *HiDAO-EST1* und *HiDAO-EST2*, sodass diese Proteine möglicherweise dieselbe Funktion erfüllen. Eine beobachtete Koregulation von *SoDAO2* mit HSS ist daher eventuell irrelevant für die PA-Biosynthese. Stattdessen ist dieses DAO-Homolog möglicherweise wichtig für die Blattentwicklung, da eine erhöhte Expression auf Transkriptebene in jungen Blättern gemessen wurde. Das homologe Gen *atao1* von *A. thaliana* wird ebenfalls in jungen Blättern altersabhängig exprimiert (MØLLER & MCPHERSON 1998). Die nah verwandten *HiDAO1* und *SoDAO1* werden dagegen beide deutlich mit der HSS auf Transkriptebene koreguliert und sind deshalb vorerst die wahrscheinlichsten Kandidaten für eine Homospermidin-Oxidase.

Das Verzweigungsmuster zu den homologen *HiDAO1* und *SoDAO1* deutet in verschiedenen Stammbäumen entweder einen monophyletischen oder polyphyletischen Ursprung innerhalb der Boraginales an. Die HSS ist in Arten der Boraginales als Folge einer Genduplikation monophyletischen Ursprungs (NIEMÜLLER *et al.* 2012, OBER & KALTENEGGER 2009). Dabei wird das vielfältige Expressionsmuster der HSS als eine Entwicklung gedeutet, die nach Ausbildung der Boraginales-Arten erfolgte und eine Vorbedingung für eine Modifizierung der Genkopie zur HSS war. Erst mit Optimierung der HSS-Funktion konnten vermutlich größere Mengen an Homospermidin akkumulieren, sodass die Entstehung einer dafür spezifischen DAO einen entsprechenden Selektionsvorteil bewirken kann. Der Vorteil war zunächst eventuell die Bereitstellung des im Homospermidin gebundenen Stickstoffs. Erst später mit Entstehung weiterer Enzyme wurde das oxidierte Homospermidin vermutlich für die PA-Biosynthese verwendet. Es wäre daher nicht verwunderlich, wenn die Fähigkeit zur Oxidation von Homospermidin wie vermutlich auch die HSS-Regulation polyphyletischen Ursprungs ist.

Aufgrund einer phylogenetischen Analyse können DAO-codierende Sequenzen in zwei Hauptkladen eingeteilt werden, die deutlich voneinander getrennt sind. Die im Stammbaum zu erkennenden kürzeren Astlängen zwischen den Sequenzen der Klade

II gegenüber denen der Klade I lassen auf eine stärkere Konservierung der Klade-II-Sequenzen und womöglich auch deren Funktion schließen. Interessanterweise sind die Sequenzen der Klade II nah verwandt zu den Methylputrescin-Oxidase von Tabak. Die MPOs verschiedener Solanaceae-Arten werden für die Biosynthese von Nikotin- und Tropanalkaloiden benötigt (BOSWELL *et al.* 1999, HASHIMOTO *et al.* 1990, HASLAM & YOUNG 1992, KATOH *et al.* 2007, MIZUSAKI *et al.* 1972, WALTON & MCLAUCHLAN 1990). Ob DAOs aus der Klade II auch für andere Sekundärstoffwechselwege rekrutiert wurden und womöglich aufgrund einer veränderten Substrataffinität stärker konserviert werden, bleibt eine spannende Frage. Kandidaten für eine Homospermidin-Oxidase wurden aus beiden Kladen identifiziert. Bisherige Daten favorisieren zwar DAOs der Klade I als Kandidaten für eine Homospermidin-Oxidase, aber erst eine funktionelle Charakterisierung der Kandidatensequenzen kann zeigen, ob und aus welchem der DAO-Kladen eventuell ein Protein für die PA-Biosynthese rekrutiert wurde.

4.4.3 Weitere putative Faktoren der PA-Biosynthese

Weitere Kandidatengene werden für die PA-Biosynthese postuliert. Die Biosynthese der Necinsäure von Lycopsamin-Typ-PAs wurde mit ^{13}C und ^{14}C markierten Substraten analysiert (CROUT 1966, WEBER *et al.* 1999). Die Daten lassen darauf schließen, dass ein aktivierter Acetaldehyd auf 2-Oxoisovaleriansäure übertragen wird. Eine ähnliche Reaktion wird bei der Valin- und Isoleucin-Biosynthese von einer Acetohydroxysäure-Synthase (AHAS) katalysiert (RADHAKRISHNAN & SNELL 1960, UMBARGER & BROWN 1958). Hierbei unterscheidet sich das Substrat Pyruvat und 2-Oxobutyrat lediglich um ein bis zwei Methylgruppen zu dem postulierten Necinsäure-Substrat 2-Oxoisovaleriansäure. Für die Biosynthese von Necinsäuren wird daher eine Beteiligung eines AHAS-homologen Enzyms angenommen. Insgesamt wurden je drei unterschiedliche cDNA-Fragmente von *H. indicum* und *S. officinale* identifiziert, die für eine putative AHAS codieren. Ein identifiziertes putatives AHAS-Homolog von *H. indicum* wird vermutlich sehr ähnlich wie die HSS reguliert. Transkripte codierend für AHAS-EST1 konnten wie HSS-codierende Transkripte im Blatt von *H. indicum* ausschließlich in der unteren Epidermis detektiert werden (MUHS, unpubliziert). Wie die DAO-Kandidaten kommt AHAS-EST1 im Vergleich zu den identifizierten Homologen mit den meisten Rohsequenzen der SSH-cDNA-Bank vor (vergleiche Tabelle 3.6 in Kapitel 3.5.5) und ist daher womöglich eine Necinsäure-Synthase.

PAs werden als *N*-Oxide transportiert und gespeichert (siehe Kap. 1.1.3). Daher ist davon auszugehen, dass PAs während der Biosynthese am Stickstoff der Necinbase

oxidiert werden müssen. Eine enzymatische PA-*N*-Oxygenase-Aktivität wurde von CHANG & HARTMANN (1998) in Keimlingen von *Crotalaria scassellatii* nachgewiesen. Eine PA-*N*-Oxygenase oxidiert in diesen Keimlingen vermutlich die im Samen gespeicherten tertiären PAs, sodass sie nach einem Polaritätswechsel effizient über das Leitgewebe remobilisiert werden können. Eine biochemische Charakterisierung der PA-*N*-Oxygenase aus *C. scassellatii* ließ dabei darauf schließen, dass es sich um eine FMO handelt. FMOs werden auch von vielen an PAs adaptierte Herbivoren zur *N*-Oxidation von inkorporierten tertiären PAs exprimiert, um die Alkaloide in die ungiftige *N*-Oxid-Form überführen zu können (siehe Kap. 1.3). Da die PA-*N*-Oxygenase ähnlich wie die tierischen FMOs eine hohe Affinität zu pro-toxischen PAs hat, verhindert das pflanzliche Enzym möglicherweise eine Selbstvergiftung der Pflanzen durch tertiäre PAs (CHANG & HARTMANN 1998). Mithilfe der SSH-Banken wurden von *H. indicum* vier und von *S. officinale* zwei putative FMO-codierende Transkriptfragmente identifiziert (siehe Tabelle 3.6 in Kapitel 3.5.5). Eine Transkriptquantifizierung mittels qRT-PCR könnte zunächst zeigen, welches Homolog mit der HSS koexprimiert wird und eine potentielle PA-*N*-Oxygenase darstellt.

Welche der identifizierten Kandidatensequenzen tatsächlich eine homospermidin-spezifische DAO, Necinsäure-Synthase und PA-*N*-Oxygenase codieren, können erst weitere Experimente klären. Die beobachtete Koregulation der Kandidaten mit der HSS deuten eine spezifische Funktion in der PA-Biosynthese an und zeigen, dass die Herstellung der SSH-cDNA-Bank funktioniert hat. Bestätigt sich die vorhergesagte Funktion der Kandidaten, ist zu erwarten, dass möglicherweise noch weitere Faktoren der PA-Biosynthese von den Sequenzen der SSH-Banken codiert werden.

4.4.4 Kompartimentierung der PA-Biosynthese

Damit in einer Pflanze ein bestimmtes Metabolitenprofil generiert werden kann, muss der Fluss von Stoffwechselprodukten zellulär reguliert werden. Die Substrate einiger Sekundärmetabolite werden zum Beispiel dem Primärstoffwechsel in subzellulären Bereichen entzogen. Proteine der Flavonoid-Biosynthese assoziieren zu einem größeren Proteinkomplex, welcher zum Teil membrangebunden ist und in dem Zwischenprodukte nacheinander kanalisiert umgesetzt werden, bevor sie freigesetzt werden (SASLOWSKY & WINKEL-SHIRLEY 2001). Monoterpene der Minzen, *Mentha spec.*, werden in sekretorischen Zellen gebildet. Enzyme dieses Stoffwechselweges wurden in Leukoplasten, Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Zytosol lokalisiert (TURNER & CROTEAU 2004, TURNER *et al.* 1999).

Eine Kompartimentierung der PA-Biosynthese wurde bereits von BÖTTCHER *et al.* (1993) vermutet. Bei Hemmung von Aminoxidasen akkumuliert das Triamin Homo-

spermidin stabil im pflanzlichen Gewebe, während exogen zugeführtes Homospermidin degradiert wird. Nach Beseitigung des Hemmstoffs geht das akkumulierte Homospermidin zu 100% in die PA-Biosynthese ein, sodass scheinbar eine Kanalisierung diesesamins hin zu den Enzymen des PA-Biosyntheseweges und weg von anderen aminabhängigen Proteinen erfolgte. Da die HSS ein zytosolisches Enzym ist, können zwei mögliche Szenarien diese Beobachtung erklären. Entweder bleibt Homospermidin bis zur weiteren Umsetzung in einem zytosolischen Enzymkomplex gebunden oder wird vom Zytosol in andere Zellkompartimente transportiert. Frühere Versuche zur Isolierung eines Enzymkomplexes schlugen fehl. Homospermidin könnte stattdessen spezifisch in „PA-Vesikel“ transportiert werden.

Aus *C. scassellatii* wurde eine membrangebundene PA-N-Oxygenase identifiziert, die vermutlich an der Remobilisierung von tertiären PAs aus dem Samen beteiligt ist (siehe Diskussion in Kap. 4.4.3). Möglicherweise oxidiert dasselbe Enzym auch tertiäre PAs, die während der Biosynthese entstehen. Tertiäre PAs können durch tierische CYPs toxisch werden. Pflanzliche CYPs bioaktivieren eventuell ebenfalls tertiäre PAs. Eine PA-N-Oxygenase könnte daher in der Membran von hypothetischen „PA-Vesikeln“ als Barriere für lipophile tertiäre PAs fungieren, sodass während der Biosynthese auftretende Mengen nicht in das Zytosol diffundieren und dort irreversible Schäden anrichten können.

In „PA-Vesikeln“ könnten theoretisch alle Reaktionsschritte vom Homospermidin an bis zum N-Oxid erfolgen. Eine homospermidinspezifische DAO müsste dann ebenfalls in diesen Vesikeln lokalisiert sein. Drei von fünf Programmen sagen für die DAO1-Homologe von *H. indicum* und *S. officinale* eine extrazelluläre Lokalisation vorher (siehe Kap. 3.5.4). Eine Einleitung in den sekretorischen Weg würde das Vorhandensein eines Signalpeptids voraussetzen und für einen Transport in das Endoplasmatische Reticulum sorgen (VITALE & DENECKE 1999). Von dort oder dem Golgi-Apparat, der über Vesikel mit dem Endoplasmatischen Reticulum in Verbindung steht, könnten „PA-Vesikel“ mit enthaltenden DAOs zur Homospermidin-Umsetzung entstehen. Spezielle Alkaloid-Vesikel sind auch von der Isochinolinalkaloid-Biosynthese bekannt. Darin enthalten ist unter anderem das Berberin-Brückenprotein, das ein Signalpeptid aufweist und vermutlich über das Trans-Golgi-Netzwerk sortiert wird (HASHIMOTO & YAMADA 1994). Da eine spezifische Transportaktivität für PA-N-Oxide in der Plasmamembran und dem Tonoplast identifiziert wurde (EHMKE *et al.* 1988), erfolgt eine Verteilung der PAs aus den Vesikeln vermutlich nicht über eine Fusionierung mit der Vakuole oder der Plasmamembran sondern über das Zytosol. Weitere Faktoren könnten dabei eine Fusionierung der Membranen verhindern.

Wie für die HSS-Evolution bereits vermutet wird, könnte neben den Fraßfeinden der endogene Stoffwechsel einen entscheidenden Selektionsdruck auf Gene der PA-Biosynthese ausüben und deren Evolution beeinflussen. Eine HSS konnte sich womöglich erst entwickeln, nachdem die Expression lokal begrenzt wurde und HSS-DHS-Interaktionen eine DHS-Aktivität nicht störten (siehe Kap. 1.2.2). Eine Kompartimentierung des Stoffwechsels war eventuell eine weitere Voraussetzung, bevor eine leistungsfähige PA-Biosynthese selektiert werden konnte.

4.5 Ausblick

Die hergestellten SSH-cDNA-Banken stellen einen Informationspool über differenziell exprimierte Gene in Geweben und einzelnen Zellen dar, in denen HSS spezifisch exprimiert wird. Mittels der identifizierten Transkripte der Kandidatengene *ahas*, *dao* und *fmo* kann die Biosynthese der Necinbase und -säure sowie eine Oxidierung von PAs zu *N*-Oxiden hypothetisch erklärt werden. Weitere Enzyme wie zum Beispiel Acetyltransferasen, Dehydrogenasen, Epoxidasen und Hydroxylasen könnten unter Berücksichtigung der strukturellen Vielfalt an der PA-Produktion beteiligt sein (HARTMANN & DIERICH 1998). Des Weiteren wird jedes Enzym vermutlich in dessen Expression reguliert, sodass entsprechende Regulationsfaktoren der HSS und der Kandidaten postuliert werden. Aus den Sequenzdaten der SSH-Banken lassen sich daher vermutlich noch weitere Kandidatengene der PA-Biosynthese ableiten.

Expressionsdaten könnten zeigen, welche der identifizierten Transkripte für Proteine codieren, die mit der HSS koreguliert sind. Eine mögliche Methode ist hierfür die qRT-PCR zur Untersuchung von einzelnen Kandidaten wie in dieser Studie. Die gesamten ermittelten Sequenzdaten könnten des Weiteren mittels *Microarrays* oder SAGE genutzt werden. Alternativ um methodisch bedingte Manipulationen auf ein Minimum zu reduzieren und den nativen Zustand möglichst exakt abzubilden, könnten Transkripte mittels Pyrosequenzierung der cDNA oder der mRNA direkt ohne cDNA-Synthese quantifiziert werden (EMRICH *et al.* 2007, METZKER 2009, OZSOLAK *et al.* 2009, WALL *et al.* 2009, WANG *et al.* 2009, WEBER *et al.* 2007). Insbesondere eine Analyse von spezifisch HSS-exprimierenden Zellen aus verschiedenen Organismen bietet sich hierfür an. Eine vergleichende Analyse der ermittelten Sequenzdaten von PA-produzierenden Organismen, die nah miteinander verwandt sind und in denen die Biosynthese vermutlich von denselben Enzymtypen katalysiert wird, bietet anschließend zusammen mit Expressionsdaten die Möglichkeit, zielgerichtet Kandidaten der PA-Biosynthese zu identifizieren und sie möglicherweise leicht von Sequenzen zu unterscheiden, die eine andere Funktion erfüllen.

Neben einem transkriptombasierten Ansatz könnten Proteine mit einer zweidimensionalen SDS-PAGE untersucht werden. DEMBINSKY *et al.* (2007) zeigten, dass *via* LCM isolierte Proben sich für eine solche Methode eignen. Auf diese Weise könnten Faktoren identifiziert werden, die auf Proteinebene mit der HSS koreguliert werden.

Transkriptionsfaktoren können mit einem Promotorbereich zielgerichtet identifiziert werden. Für das *hss*-Gen ist von einigen Organismen der stromaufwärtsliegende Bereich bekannt (REIMANN 2008). Promotorstudien könnten zunächst den entscheidenden Bereich eingrenzen und diesen zum Beispiel für einen Hefe-Hybrid-System verwenden (CHIEN *et al.* 1991, FIELDS & SONG 1989). Hefe-Hybrid-Systeme eignen sich auch für die Identifizierung von Regulationsfaktoren der Transkript- und Proteinebene (LOPATO *et al.* 2006).

Neben diesen ergänzenden Methoden, um weitere Kandidatengene zu identifizieren, muss in einem nächsten Schritt eine Funktion der codierten Faktoren für den PA-Stoffwechsel verifiziert oder falsifiziert werden. Enzyme können biochemisch charakterisiert werden, um die Affinität und Reaktionskinetik zu bestimmten Substraten zu überprüfen. Alternativ und zusätzlich geeignet, um Regulationsfaktoren zu charakterisieren, wäre ein *Knock-out* oder *-down* durch RNAi sowie einer Überexpression der entsprechenden Kandidatengene. Bisher wurde zu diesem Zweck als einzige PA-haltige Pflanze *S. vernalis* mittels *Agrobacterium rhizogenes* (A. J. RIKER) CONN transformiert (ENSS 2009). Ergänzend könnte daher eine leicht transformierbare Pflanze genutzt werden, um mit identifizierten Kandidatengenen Reaktionsschritte der PA-Biosynthese in einem PA-freien Organismus zu etablieren. Dass es generell möglich ist, einen kompletten artfremden Stoffwechselweg heterolog in transgenen Pflanzen zu exprimieren, zeigt die Transformation von *A. thaliana* mit drei Genen von *Sorghum bicolor* (L.) MOENCH, die für die Biosynthese des cyanogenen Glucosids Dhurrin nötig sind (TATTERSALL *et al.* 2001). Die transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen akkumulieren das toxische Dhurrin und weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber Herbivoren auf. HSS wird bereits von einem transgenen Tabak überexprimiert, in dem Homospermidin akkumuliert (ABDELHADY *et al.* 2009). Der leicht zu transformierende Tabak bietet sich daher an, um eine putative Funktion der identifizierten DAOs zu überprüfen.

Die in diesem Projekt hergestellten cDNA-Banken sind eine fundierte Datenbasis zur Identifizierung von Faktoren der PA-Biosynthese für die Boraginales-Arten *H. indicum* und *S. officinale* sowie für die monokotyle *P. amabilis*. Die Kenntnis der entsprechenden Gene kann dazu beitragen, die noch kaum verstandene Evolution der PA-Biosynthese als Beispiel für einen sekundären Stoffwechselweg zu rekonstruieren.

Danksagung

Eine Vielzahl von Menschen haben mich auf meinem Weg begleitet und zum Gelingen dieser Studie beigetragen. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dietrich Ober für die Unterstützung zur Planung und Finanzierung dieser Studie. Seine stetige Diskussionsbereitschaft half mir dabei, das Thema zu fokussieren und immer wieder neue Motivation zu schöpfen. Sehr dazu beigetragen hat das mir entgegengebrachte Vertrauen und die eingeräumten Freiheiten bei der wissenschaftlichen Arbeit. Ebenfalls für eine finanzielle aber vor allem für die ideelle Förderung bin ich dem evangelischen Studienwerk Villigst zu großem Dank verpflichtet. Für inspirierende Gespräche und eine angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich allen früheren und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danken. Danke für die gemeinsame Zeit und den wertvollen Austausch! Ein besonderer Dank gilt Brigitte Schemmerling für die praktischen Hilfen im Labor in jeder Notlage. Für die erfahrenen Ratschläge während der Etablierung der LCM-Technik bedanke ich mich bei Frau Dr. Maria Mulisch, Dr. Christine Desel und Dr. Johannes Thiel. Ein großer Dank geht an Julien Hollmann für die Hilfe am Computer. Zur Untersuchung einer Induzierbarkeit war unter anderem maßgeblich Dr. Till Beuerle beteiligt. Vielen Dank für die Identifizierung der PAs! Dr. Dorothee Langel bin ich dankbar für eine Einweisung in die Gaschromatografie der PAs. Aber vor allem danke ich ihr für die gemeinsam verbrachte Zeit im Büro, die guten Gespräche und ihren unermüdlichen und herzlichen Einsatz in der AG. Durch die Pflege und Kultivierung PA-haltiger Sterilkulturen und Extraktion von deren PAs waren mir Margret Doose eine große Hilfe. Dem Team des Botanischen Gartens danke ich für die Kultivierung der Versuchspflanzen aus den Gewächshäusern und dem Freiland. Danke für die Unterstützung! Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Professor Dr. Wolfgang Blaschek dankbar. Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mir außerhalb des Instituts eine wichtige Unterstützung beim Erstellen dieser Studie waren. Vielen Dank für Halt und willkommene Abwechslung! Die wohl liebevollste Unterstützung erhielt ich von meiner geliebten Ehefrau. Ihre Hilfe, nicht nur für das unermüdliche Korrekturlesen, sondern vor allem für das gemeinsame Erfahren der Promotionszeit sind für mich unverzichtbar. Danke Anna!

Literaturverzeichnis

- ABDELHADY, M., BEUERLE, T., OBER, D. (2009): Homospermidine in transgenic tobacco results in considerably reduced spermidine levels but is not converted to pyrrolizidine alkaloid precursors. *Plant Molecular Biology*, 71: 145–155.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410.
- AN, Y., MCDOWELL, J.M., HUANG, S., MCKINNEY, E.C., CHAMBLISS, S., MEAGHER, R.B. (1996): Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal*, 10: 107–121.
- ANJOS, B.L., NOBRE, V.M., DANTAS, A.F., MEDEIROS, R.M., NETO, T.S.O., MOLYNEUX, R.J., RIET-CORREA, F. (2010): Poisoning of sheep by seeds of *Crotalaria retusa*: acquired resistance by continuous administration of low doses. *Toxicicon*, 55: 28–32.
- ANKE, S. (2004): Molekularbiologische und immunologische Untersuchungen zur gewebe- und zellspezifischen Lokalisation der Homospermidin-Synthase, des Eingangsenzyms der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae) und *Phalaenopsis* Species (Orchidaceae). Dissertation, Fakultät für Lebenswissenschaften, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- ANKE, S., GONDÉ, D., KALTENEGGER, E., HANSCH, R., THEURING, C., 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.
- ANKE, S., NIEMULLER, D., MOLL, S., HANSCH, R., OBER, D. (2004): Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiology*, 136: 4037–4047.
- APLIN, R.T., BENN, M.H., ROTHSCHILD, M. (1968): Poisonous alkaloids in the body tissues of the cinnabar moth (*Callimorpha jacobaeae* L.). *Nature*, 219: 747–748.

- APLIN, R.T., ROTHSCHILD, M. (1972): Poisonous alkaloids in the body tissue of the garden tiger moth (*Arctia caja* L.) and the cinnabar moth (*Tyria* (= *Callimorpha*) *jacobaeae* L.) (Lepidoptera). In: VRIES, A.D., KOCHVA, E. (Hrsg.), *Toxins of Animal and Plant Origin*. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- ASHBURNER, M., BALL, C.A., BLAKE, J.A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J.M., DAVIS, A.P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S.S., EPPIG, J.T., HARRIS, M.A., HILL, D.P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J.C., RICHARDSON, J.E., RINGWALD, M., RUBIN, G.M., SHERLOCK, G. (2000): Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25: 25–29.
- BACHMAIR, A., NOVATCHKOVA, M., POTUSCHAK, T., EISENHABER, F. (2001): Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends in Plant Science*, 6: 463–470.
- BALDWIN, I.T. (1989): Mechanism of damage-induced alkaloid production in wild tobacco. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 1661–1680.
- BALDWIN, I.T., SCHMELZ, E.A., OHNMEISS, T.E. (1994): Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* ssp. *spagazzini* and *comes*. *Journal of Chemical Ecology*, 20: 2139–2157.
- BARKER, M.S., DLUGOSCH, K.M., DINH, L., CHALLA, R.S., KANE, N.C., KING, M.G., RIESEBERG, L.H. (2010): EvoPipes.net: bioinformatic tools for ecological and evolutionary genomics. *Evolutionary Bioinformatics*, 6: 143–149.
- BAUR, J. (2009): Identifizierung und Etablierung von Referenzsequenzen für In-vitro-Transkriptionsanalysen aus *Symphytum officinale* und *Phalaenopsis amabilis*. Bachelorthesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- BELL, G. (1982): *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. University of California Press, Berkeley.
- BENTLEY, M.D., LEONARD, D.E., STODDARD, W.F., ZALKOW, L.H. (1984): Pyrrolizidine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Cancer Treatment Reports*, 77: 393–397.
- BERTANI, G. (1951): Studies on lysogeny. *Journal of Bacteriology*, 62: 293–300.

- BERTIOLI, D.J., SCHLICHTER, U.H., ADAMS, M.J., BURROWS, P.R., STEINBISS, H.H., ANTONIW, J.F. (1995): An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 23: 4520–4523.
- BEZZERIDES, A., YONG, T., BEZZERIDES, J., HUSSEINI, J., LADAU, J., EISNER, M., EISNER, T. (2004): Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protects eggs of a moth (*Utetheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostriniae*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 9029–9032.
- BILKOVA, A., BEZAKOVA, L., BILKA, F., PSENAK, M. (2005): An amine oxidase in seedlings of *Papaver somniferum* L. *Biologia Plantarum*, 49: 389–394.
- BIRD, D.A., FRANCESCHI, V.R., FACCHINI, P.J. (2003): A tale of three cell types: Alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell*, 15: 2626–2635.
- BÖHLE, U., HILGER, H.H. (1997): Chloroplast DNA systematics of “Boraginaceae” and related families: a goodbye to the old familiar concept of 5 subfamilies. *Scripta Botanica Belgica*, 15: 30.
- BÖTTCHER, F., ADOLPH, R., HARTMANN, T. (1993): Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 32: 679–689.
- BÖTTCHER, F., OBER, D., HARTMANN, T. (1994): Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation. *Canadian Journal of Chemistry*, 72: 80–85.
- BOPPRÉ, M. (1984): Redefining “pharmacophagy”. *Journal of Chemical Ecology*, 10: 1151–1154.
- BOSWELL, H.D., DRÄGER, B., MCCLAUCHLAN, W., PORTSTEFFEN, A., ROBINS, D.J., ROBINS, R.J., WALTON, N.J. (1999): Specificities of the enzymes of *N*-alkyltropane biosynthesis in *Brugmansia* and *Datura*. *Phytochemistry*, 52: 871–878.
- BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.

- BRATTSTEN, L.B. (1992): Metabolic defenses against plant allelochemicals. *In*: ROSENTHAL, G.A., BERENBAUM, M.R. (Hrsg.), *Herbivores: their interactions with secondary metabolites*. Academic Press, San Diego.
- BREHM, G., HARTMANN, T., WILLMOTT, K. (2007): Pyrrolizidine alkaloids and pharmacophagous Lepidoptera visitors of *Prestonia amabilis* (Apocynaceae) in a montane rainforest in Ecuador. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 94: 463–473.
- BROWN, K.S. (1984): Adult-obtained pyrrolizidine alkaloids defend ithomiine butterflies against a spider predator. *Nature*, 309: 707–709.
- BRÜCKMANN, M., TRIGO, J.R., FOGLIO, M.A., HARTMANN, T. (2000): Storage and metabolism of radioactively labeled pyrrolizidine alkaloids by butterflies and larvae of *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae, Ithomiinae). *Chemoecology*, 10: 25–32.
- BRUNNER, A.M., YAKOVLEV, I.A., STRAUSS, S.H. (2004): Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BioMed Central Plant Biology*, 4: 14.1–14.7.
- BUNSUPA, S., OKADA, T., SAITO, K., YAMAZAKI, M. (2011): An acyltransferase-like gene obtained by differential gene expression profiles of quinolizidine alkaloid-producing and nonproducing cultivars of *Lupinus angustifolius*. *Plant Biotechnology*, 28: 89–94.
- CAI, S., LASHBROOK, C.C. (2006): Laser capture microdissection of plant cells from tape-transferred paraffin sections promotes recovery of structurally intact RNA for global gene profiling. *The Plant Journal*, 48: 628–637.
- CASSAB, G.I., VARNER, J.E. (1987): Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *The Journal of Cell Biology*, 105: 2581–2588.
- CHANDRAN, D., INADA, N., HATHER, G., KLEINDT, C.K., WILDERMUTH, M.C. (2010): Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 460–465.
- CHANG, A., HARTMANN, T. (1998): Solubilization and characterization of a senechionine *N*-oxygenase from *Crotalaria scassellatii* seedlings. *Phytochemistry*, 49: 1859–1866.

- CHARRIER, B., CHAMPION, A., HENRY, Y., KREIS, M. (2002): Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiology*, 130: 577–590.
- CHEN, K.Y., LIU, A.Y. (1997): Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5a. *Biological Signals*, 6: 105–109.
- CHEN, T., MEI, N., FU, P.P. (2010): Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Applied Toxicology*, 30: 183–196.
- CHEVREUX, B., WETTER, T., SANDOR, S. (1999): Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *In: German Conference on Bioinformatics*.
- CHIEN, C.T., BARTEL, P.L., STERNGLANZ, R., FIELDS, S. (1991): The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 9578–9582.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156–159.
- CHOU, M.W., 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.
- CHOU, M.W., WANG, Y., YAN, J., YANG, Y., BEGER, R.D., WILLIAMS, L.D., DOERGE, D.R., FU, P.P. (2003): Riddelliine *N*-oxid is a phytochemical and mammalian metabolite with genotoxic activity that is comparable to the parent pyrrolizidine alkaloid riddelliine. *Toxicology Letters*, 145: 239–247.
- CHRISTINET, L., BURDET, F.X., ZAIKO, M., HINZ, U., ZRYD, J. (2004): Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiology*, 134: 265–274.
- CHUNG, H.S., KOO, A.J., GAO, X., JAYANTY, S., THINES, B., JONES, A.D., HOWE, G.A. (2008): Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, 146: 952–964.

- COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y., HSU, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 69: 2110–2114.
- CONA, A., REA, G., ANGELINI, R., FEDERICO, R., TAVLADORAKI, P. (2006): Functions of amine oxidases in plant development and defence. Trends in Plant Science, 11: 80–88.
- CONESA, A., GÖTZ, S. (2008): Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. International Journal of Plant Genomics, 2008: 1–12.
- COOK, B.A., SINNHUBER, J.R., THOMAS, P.J., OLSON, T.A., SILVERMAN, T.A., JONES, R., WHITEHEAD, V.M., RUYMANN, F.B. (1983): Hepatic failure secondary to indicine *N*-oxide toxicity. A pediatric oncology group study. Cancer, 52: 61–63.
- CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. (1995): Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 4114–4119.
- CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. (1997): Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 355–381.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. (2000): Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. (Hrsg.), Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- CROUT, D.H.G. (1966): Pyrrolizidine alkaloids. The biosynthesis of echimidinic acid. Journal of the Chemical Society C: Organic, 1968–1972.
- CZECHOWSKI, T., STITT, M., ALTMANN, T., UDVARDI, M.K., SCHEIBLE, W. (2005): Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 139: 5–17.
- DAM, N.M.V., VUISTER, L., BERGSHOEFF, C., VOS, H.D., MEIJDEN, E.V.D. (1995): The “raison d’être” of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: deterrent effects against generalist herbivores. Journal of Chemical Ecology, 21: 507–523.

- DASH, G.K., MURTHY, P.N. (2011): Studies on wound healing activity of *Heliotropium indicum* Linn. leaves on rats. International Scholarly Research Network Pharmacology, 2011: 1–8.
- DAY, R.C., GROSSNIKLAUS, U., MACKNIGHT, R.C. (2005): Be more specific! Laser-assisted microdissection of plant cells. Trends in Plant Science, 10: 397–406.
- DAY, R.C., MCNOE, L.A., MACKNIGHT, R.C. (2007): Transcript analysis of laser microdissected plant cells. Physiologia Plantarum, 129: 267–282.
- DEEKEN, R., ACHE, P., KAJAHN, I., KLINKENBERG, J., BRINGMANN, G., HEDRICH, R. (2008): Identification of *Arabidopsis thaliana* phloem RNAs provides a search criterion for phloem-based transcripts hidden in complex datasets of microarray experiments. The Plant Journal, 55: 746–759.
- DEMBINSKY, D., WOLL, K., SALEEM, M., LIU, Y., FU, Y., BORSUK, L.A., LAMKEMEYER, T., FLADERER, C., MADLUNG, J., BARBAZUK, B., NORDHEIM, A., NETTLETON, D., SCHNABLE, P.S., HOCHHOLDINGER, F. (2007): Transcriptomic and proteomic analyses of pericycle cells of the maize primary root. Plant Physiology, 145: 575–588.
- DENKER, S.E. (2008): Untersuchung von kupferhaltigen Aminoxidasen aus Pyrrolizidin-Alkaloid-produzierenden Pflanzen. Dissertation, Fakultät für Lebenswissenschaften, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- DIANE, N., FÖRTHNER, H., HILGER, H.H. (2002): A systematic analysis of *Heliotropium*, *Tournefortia*, and allied taxa of the Heliotropiaceae (Boraginales) based on ITS1 sequences and morphological data. American Journal of Botany, 89: 287–295.
- DIATCHENKO, L., LAU, Y.F., CAMPBELL, A.P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E.D., SIEBERT, P.D. (1996): Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 6025–6030.
- DREYER, D.L., JONES, K.C., MOLYNEUX, R.J. (1985): Feeding deterrence of some pyrrolizidine, indolizidine, and quinolizidine alkaloids towards pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and evidence for phloem transport of indolizidine alkaloid swainsonine. Journal of Chemical Ecology, 11: 1045–1051.

- DUEKER, S.R., LAMÉ, M.W., SEGALL, H. (1992): Hydrolysis of pyrrolizidine alkaloids by guinea pig hepatic carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 117: 116–121.
- DUSSOURD, D.E., HARVIS, C.A., MEINWALD, J., EISNER, T. (1989): Paternal allocation of sequestered plant pyrrolizidine alkaloid to eggs in the danaine butterfly, *Danaus gilippus*. *Experientia*, 45: 896–898.
- EBERWINE, J., YEH, H., MIYASHIRO, K., CAO, Y., NAIR, S., FINNELL, R., ZETTEL, M., COLEMAN, P. (1992): Analysis of gene expression in single live neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 3010–3014.
- EHMKE, A., BORSTEL, K., HARTMANN, T. (1988): Alkaloid *N*-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta*, 176: 83–90.
- EHMKE, A., WITTE, L., BILLER, A., HARTMANN, T. (1990): Sequestration, *N*-oxidation and transformation of plant pyrrolizidine alkaloids by the arctiid moth *Tyria jacobaeae* L. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*, 45: 1185–1192.
- EHRlich, P.R., RAVEN, P.H. (1964): Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18: 586–608.
- EISNER, T., MEINWALD, J. (1995): The chemistry of sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 50–55.
- EL-MAWLA, A.A. (2010): Effect of certain elicitors on production of pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Echium rawolfii*. *Pharmazie*, 65: 224–226.
- EMRICH, S.J., BARBAZUK, W.B., LI, L., SCHNABLE, P.S. (2007): Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Research*, 17: 69–73.
- ENSS, D. (2009): Untersuchung von putativen Diaminoxidasen für die Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese in *Senecio vernalis*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- EVANS, P.T., MALMBERG, R.L. (1989): Do polyamines have roles in plant development? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 235–269.

- EWING, B., GREEN, P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8: 186–194.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C., GREEN, P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8: 175–185.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. (1990): Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 7713–7716.
- FIELDS, S., SONG, O.K. (1989): A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, 340: 245–246.
- FINN, R.D., MISTRY, J., TATE, J., COGGILL, P., HEGER, A., POLLINGTON, J.E., GAVIN, O.L., GUNASEKARAN, P., CERIC, G., FORSLUND, K., HOLM, L., SONNHAMMER, E.L.L., EDDY, S.R., BATEMAN, A. (2009): The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 38: D211–D222.
- FLOR, H.H., DEMEREC, M. (1956): The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics*, 8: 29–54.
- FRANK, S. (2010): Untersuchungen zur Expression der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese in Orchideen. Bachelorthesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- FREI, H., LÜTHY, J., BRAUCHLI, J., ZWEIFEL, U., WÜRGLER, F.E., 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.
- FRISCHKNECHT, P.M., SCHUHMACHER, K., MÜLLER-SCHÄRER, H., BAUMANN, T.W. (2001): Phenotypic plasticity of *Senecio vulgaris* from contrasting habitat types: growth and pyrrolizidine alkaloid formation. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 343–358.
- FRÖLICH, C. (1996): Vorkommen, Verteilung und Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden in Boraginaceae und Orchidaceae. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.

- FRÖLICH, C., HARTMANN, T., 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., HARTMANN, T. (2007): Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. *Phytochemistry*, 68: 1026–1037.
- FU, P.P., XIA, Q., LIN, G., CHOU, M.W. (2004): Pyrrolizidine alkaloids—genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metabolism Reviews*, 36: 1–55.
- GELDER, R.N.V., ZASTROW, M.E.V., YOOL, A., DEMENT, W.C., BARCHAS, J.D., EBERWINE, J.H. (1990): Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 1663–1667.
- GERSHENZON, J., MCCASKILL, D., RAJAONARIVONY, J.I.M., MIHALIAK, C., KARP, F., CROTEAU, R. (1992): Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Analytical Biochemistry*, 200: 130–138.
- GEYTER, N.D., GHOLAMI, A., GOORMACHTIG, S., GOOSSENS, A. (2012): Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*. *Im Druck*.
- GILLESPIE, J.W., BEST, C.J., BICHSEL, V.E., COLE, K.A., GREENHUT, S.F., HEWITT, S.M., AHRAM, M., GATHRIGHT, Y.B., MERINO, M.J., STRAUSBERG, R.L., EPSTEIN, J.I., HAMILTON, S.R., GANNOT, G., BAIBAKOVA, G.V., CALVERT, V.S., FLAIG, M.J., CHUAQUI, R.F., HERRING, J.C., PFEIFER, J., PETRICOIN, E.F., LINEHAN, W.M., DURAY, P.H., BOVA, G.S., EMMERT-BUCK, M.R. (2002): Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *The American Journal of Pathology*, 160: 449–457.
- GLENDINNING, J.I. (2002): How do herbivorous insects cope with noxious secondary plant compounds in their diet? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104: 15–25.
- GLENDINNING, J.I., SLANSKY, F. (1995): Consumption of a toxic food by caterpillars increases with dietary exposure: support for a role of induced detoxification

- enzymes. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 176: 337–345.
- GÖTZ, S., GARCIA-GOMEZ, J.M., TEROL, J., WILLIAMS, T.D., NAGARAJ, S.H., NUEDA, M.J., ROBLES, M., TALON, M., DOPAZO, J., CONESA, A. (2008): High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36: 3420–3435.
- GOLDSWORTHY, S.M., STOCKTON, P.S., TREMPUS, C.S., FOLEY, J.F., MARONPOT, R.R. (1999): Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Molecular Carcinogenesis*, 25: 86–91.
- GOODSTEIN, D.M., SHU, S., HOWSON, R., NEUPANE, R., HAYES, R.D., FAZO, J., MITROS, T., DIRKS, W., HELLSTEN, U., PUTNAM, N., ROKHSAR, D.S. (2012): Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40: D1178–D1186.
- GU, C., CHEN, S., LIU, Z., SHAN, H., LUO, H., GUAN, Z., CHEN, F. (2011): Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Chrysanthemum* subjected to biotic and abiotic stress. *Molecular Biotechnology*, 49: 192–197.
- HÄGELE, B.F., ROWELL-RAHIER, M. (2000): Choice, performance and heritability of performance of specialist and generalist insect herbivores towards cacalol and seneciphylline, two allelochemicals of *Adenostyles alpina* (Asteraceae). *Journal of Evolutionary Biology*, 13: 131–142.
- HANCOCK, K., TSANG, V.C. (1983): India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Analytical Biochemistry*, 133: 157–162.
- HARTMANN, T. (2007): From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68: 2831–2846.
- HARTMANN, T., DIERICH, B. (1998): Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta*, 206: 443–451.
- HARTMANN, T., EHMKE, A., EILERT, U., BORSTEL, K., THEURING, C. (1989): Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta*, 177: 98–107.
- HARTMANN, T., KUTCHAN, T.M., STRACK, D. (2005): Evolution of metabolic diversity. *Phytochemistry*, 66: 1198–1199.

- HARTMANN, T., THEURING, C., BERNAYS, E.A. (2003a): Are insect-synthesized retronecine esters (creatonotines) the precursors of the male courtship pheromone in the arctiid moth *Estigmene acrea*? *Journal of Chemical Ecology*, 29: 2603–2608.
- HARTMANN, T., THEURING, C., BEUERLE, T., BERNAYS, E.A. (2004): Phenological fate of plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Chemoecology*, 14: 207–216.
- HARTMANN, T., THEURING, C., SCHMIDT, J., RAHIER, M., PASTEELS, J.M. (1999): Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *Journal of Insect Physiology*, 45: 1085–1095.
- HARTMANN, T., THEURING, C., WITTE, L., PASTEELS, J.M. (2001): Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 1041–1056.
- HARTMANN, T., THEURING, C., WITTE, L., SCHULZ, S., PASTEELS, J.M. (2003b): Biochemical processing of plant acquired pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 515–523.
- HARTMANN, T., 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., WITTE, L. (1995): Chemistry, biology and chemoecology of PAs. *In*: PELLETIER, S.W. (Hrsg.), *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Pergamon Press, Oxford.
- HARTMANN, T., ZIMMER, M. (1986): Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. *Journal of Plant Physiology*, 122: 67–80.
- HASHIMOTO, T., MITANI, A., YAMADA, Y. (1990): Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*: its function in tropane alkaloid biosynthesis. *Plant Physiology*, 93: 216–221.
- HASHIMOTO, T., YAMADA, Y. (1994): Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 257–285.

- HASLAM, S.C., YOUNG, T.W. (1992): Purification of *N*-methylputrescine oxidase from *Nicotiana rustica*. *Phytochemistry*, 31: 4075–4079.
- HEIL, M., GREINER, S., MEIMBERG, H., KRÜGER, R., NOYER, J., HEUBL, G., LINSENMAIR, K.E., BOLAND, W. (2004): Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature*, 430: 205–208.
- HEIL, M., TON, J. (2008): Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science*, 13: 264–272.
- HEIM, W.G., JELESKO, J.G. (2004): Association of diamine oxidase and *S*-adenosylhomocysteine hydrolase in *Nicotiana tabacum* extracts. *Plant Molecular Biology*, 56: 299–308.
- HELLEMANS, J., MORTIER, G., PAEPE, A.D., SPELEMAN, F., VANDESOMPELE, J. (2007): qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8: R19.1–R19.14.
- HOL, W.H.G., MACEL, M., VEEN, J.A.V., MEIJDEN, E.V.D. (2004): Root damage and aboveground herbivory change concentration and composition of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio jacobaea*. *Basic and Applied Ecology*, 5: 253–260.
- HOLMES, D.S., QUIGLEY, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114: 193–197.
- HOPKINS, M., TAYLOR, C., LIU, Z., MA, F., MCNAMARA, L., WANG, T., THOMPSON, J.E. (2007): Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *The New Phytologist*, 175: 201–214.
- HOROWITZ, N.H. (1945): On the evolution of biochemical synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 31: 153–157.
- HOUGAARD, D.M. (1992): Polyamine cytochemistry: localization and possible functions of polyamines. *International Review of Cytology*, 138: 51–88.
- HUAN, J., MIRANDA, C.L., BUHLER, D.R., CHEEKE, P.R. (1998a): The roles of CYP3A and CYP2B isoforms in hepatic bioactivation and detoxification of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in sheep and hamsters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 151: 229–235.

- HUAN, J., MIRANDA, C.L., BUHLER, D.R., CHEEKE, P.R. (1998b): Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. *Toxicology Letters*, 99: 127–137.
- HUANG, J., BANTROCH, D.J., GREENWOOD, J.S., STASWICK, P.E. (1991): Methyl jasmonate treatment eliminates cell-specific expression of vegetative storage protein genes in soybean leaves. *Plant Physiology*, 97: 1512–1520.
- HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F., NIELSEN, R., BOLLBACK, J.P. (2001): Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294: 2310–2314.
- INADA, N., WILDERMUTH, M.C. (2005): Novel tissue preparation method and cell-specific marker for laser microdissection of *Arabidopsis* mature leaf. *Planta*, 221: 9–16.
- JAIN, M., NIJHAWAN, A., TYAGI, A.K., KHURANA, J.P. (2006): Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345: 646–651.
- KALTENEGER, E. (2009): Evolution der Homospermidin-Synthase in den Convolvulaceae und Apocynaceae. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- KATOH, A., SHOJI, T., HASHIMOTO, T. (2007): Molecular cloning of *N*-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant and Cell Physiology*, 48: 550–554.
- KERK, N.M., CESERANI, T., TAUSTA, S.L., SUSSEX, I.M., NELSON, T.M. (2003): Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiology*, 132: 27–35.
- KHAN, H.A., ROBINS, D.J. (1981): Pyrrolizidine alkaloids: evidence for *N*-(4-aminobutyl)-1,4-diaminobutane (homospermidine) as an intermediate in retronecine biosynthesis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 554–556.
- KÖHLER, U. (2010): Identifizierung von Haushaltsgenen aus *Cynoglossum officinale*. Bachelorthesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

- KOES, R.E., QUATTROCCHIO, F., MOL, J.N.M. (2005): The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16: 123–132.
- KOONJUL, P.K., BRANDT, W.F., LINDSEY, G.G., FARRANT, J.M. (1999): Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Research*, 27: 915–916.
- KOULMAN, A., SEELIGER, C., EDWARDS, P.J.B., FRASER, K., SIMPSON, W., JOHNSON, L., CAO, M., RASMUSSEN, S., LANE, G.A. (2008): E/Z-Thesinine-O-4'-alpha-rhamnoside, pyrrolizidine conjugates produced by grasses (Poaceae). *Phytochemistry*, 69: 1927–1932.
- KRUSE, L.H. (2009): Identifizierung von Aktin, Elongationsfaktor 1-Alpha und Ubiquitin aus pyrrolizidinalkaloid-produzierenden Asteraceen. Bachelorthesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- KRUSE, L.H. (2011): Untersuchungen zur Biochemie und Molekularbiologie der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese in *Symphytum officinale*, Boraginaceae. Masterthesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- KUGELMAN, M., LIU, W.C., AXELROD, M., MCBRIDE, T.J., RAO, K.V. (1976): Indicine-N-oxide: the antitumor principle of *Heliotropium indicum*. *Lloydia*, 39: 125–128.
- KUTCHAN, T.M. (1995): Alkaloid biosynthesis—the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell*, 7: 1059–1070.
- KUTCHAN, T.M. (2005): A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 292–300.
- LANGEL, D. (2008): Biosynthesis of the unique necic acid moiety in lycopsamine type pyrrolizidine alkaloids - a molecular approach -. Dissertation, Fakultät für Lebenswissenschaften, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- LANGEL, D., OBER, D. (2011): Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for stabilization of sequestered pyrrolizidine alkaloids in arctiids. *Phytochemistry*, 72: 1576–1584.

- LANGEL, D., OBER, D., PELSER, P.B. (2011): The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the Senecioneae. *Phytochemistry Reviews*, 10: 3–74.
- LARGET, B., SIMON, D. (1999): Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 750–759.
- LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947–2948.
- LASSMANN, T., HAYASHIZAKI, Y., DAUB, C.O. (2009): TagDust – a program to eliminate artifacts from next generation sequencing data. *Bioinformatics*, 25: 2839–2840.
- LEE, J.M., ROCHE, J.R., DONAGHY, D.J., THRUSH, A., SATHISH, P. (2010): Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BioMed Central Molecular Biology*, 11: 8.1–8.14.
- LETENDRE, L., LUDWIG, J., PERRAULT, J., SMITHSON, W.A., KOVACH, J.S. (1984): Hepatocellular toxicity during the treatment of refractory acute leukemia with indicine *N*-oxide. *Cancer*, 54: 1256–1259.
- LIANG, P., PARDEE, A.B. (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967–971.
- LIN, G., CUI, Y., HAWES, E.M. (1998): Microsomal formation of a pyrrolic alcohol glutathione conjugate of clivorine: firm evidence for the formation of a pyrrolic metabolite of an otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. *Drug Metabolism and Disposition*, 26: 181–184.
- LIN, G., CUI, Y., HAWES, E.M. (2000): Characterization of rat liver microsomal metabolites of clivorine, an hepatotoxic otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. *Drug Metabolism and Disposition*, 28: 1475–1483.
- LINDIGKEIT, R., BILLER, A., BUCH, M., SCHIEBEL, H., BOPPRÉ, M., 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.

- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402–408.
- LOPATO, S., BAZANOVA, N., MORRAN, S., MILLIGAN, A.S., SHIRLEY, N., LANGRIDGE, P. (2006): Isolation of plant transcription factors using a modified yeast one-hybrid system. *Plant Methods*, 2: 3–3.
- LUCA, V.D., LAFLAMME, P. (2001): The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 225–233.
- MACEL, M. (2011): Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Phytochemistry Reviews*, 10: 75–82.
- MACEL, M., BRUINSMA, M., DIJKSTRA, S.M., OOIJENDIJK, T., NIEMEYER, H.M., KLINKHAMER, P.G.L. (2005): Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect herbivore species. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 1493–1508.
- MACEL, M., VRIELING, K. (2003): Pyrrolizidine alkaloids as oviposition stimulants for the cinnabar moth, *Tyria jacobaeae*. *Journal of Chemical Ecology*, 29: 1435–1446.
- MATTOCKS, A., WHITE, I. (1971): The conversion of pyrrolizidine alkaloids to *N*-oxides and to dihydropyrrolizine derivatives by rat-liver microsomes *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions*, 3: 383–396.
- MATZ, M., SHAGIN, D., BOGDANOVA, E., BRITANOVA, O., LUKYANOV, S., DIAT-CHENKO, L., CHENCHIK, A. (1999): Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Research*, 27: 1558–1560.
- MAU, B., NEWTON, M.A. (1997): Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov Chain Monte Carlo. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 6: 122–131.
- MAU, B., NEWTON, M.A., LARGET, B. (1999): Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*, 55: 1–12.
- MCCASKILL, D., GERSHENZON, J., CROTEAU, R. (1992): Morphology and monoterpane biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta*, 187: 445–454.

- MCDOWELL, J.M., AN, Y.Q., HUANG, S., MCKINNEY, E.C., MEAGHER, R.B. (1996a): The *Arabidopsis* ACT7 actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiology*, 111: 699–711.
- MCDOWELL, J.M., HUANG, S., MCKINNEY, E.C., AN, Y.Q., MEAGHER, R.B. (1996b): Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 142: 587–602.
- MCKINNEY, E.C., MEAGHER, R.B. (1998): Members of the *Arabidopsis* actin gene family are widely dispersed in the genome. *Genetics*, 149: 663–675.
- MCLAUCHLAN, W.R., MCKEE, R.A., 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.
- MEDDA, R., PADIGLIA, A., FLORIS, G. (1995): Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, 39: 1–9.
- METZKER, M.L. (2009): Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11: 31–46.
- MIRANDA, C.L., CHUNG, W., REED, R.E., ZHAO, X., HENDERSON, M.C., WANG, J.L., WILLIAMS, D.E., 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.
- MISHRA, R., RAMESHA, A., KAUL, T., NAIR, S., SOPORY, S., REDDY, M. (2005): A modified cDNA subtraction to identify differentially expressed genes from plants with universal application to other eukaryotes. *Analytical Biochemistry*, 345: 149–157.
- MITSUHARA, I., IWAI, T., SEO, S., YANAGAWA, Y., KAWAHIGASI, H., HIROSE, S., OHKAWA, Y., OHASHI, Y. (2008): Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics*, 279: 415–427.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., NOGUCHI, M., TAMAKI, E. (1972): *N*-methylputrescine oxidase from tobacco roots. *Phytochemistry*, 11: 2757–2762.
- MOLL, S., ANKE, S., KAHMANN, U., HANSCH, R., HARTMANN, T., 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.
- MØLLER, S.G., MCPHERSON, M.J. (1998): Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis* *atao1* gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *The Plant Journal*, 13: 781–791.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
- MURATA, J., ROEPKE, J., GORDON, H., LUCA, V.D. (2008): The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *The Plant Cell*, 20: 524–542.
- NAKAZONO, M., QIU, F., BORSUK, L.A., SCHNABLE, P.S. (2003): Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell*, 15: 583–596.
- NARBERHAUS, I., THEURING, C., HARTMANN, T., DOBLER, S. (2003): Uptake and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in *Longitarsus* flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) adapted and non-adapted to alkaloid-containing host plants. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 173: 483–491.
- NARBERHAUS, I., PAPKE, U., THEURING, C., BEUERLE, T., HARTMANN, T., DOBLER, S. (2004): Direct evidence for membrane transport of host-plant-derived pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in two leaf beetle genera. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 2003–2022.
- NARBERHAUS, I., ZINTGRAF, V., DOBLER, S. (2005): Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels – evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. *Chemoecology*, 15: 121–125.
- NC-IUB (1985): Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *European Journal of Biochemistry*, 150: 1–5.
- NIEMÜLLER, D.H. (2007): Vergleichende Lokalisation der Homospermidin-Synthase, Eingangsenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in verschiedenen Vertretern der Boraginaceae. Dissertation, Fakultät für Lebenswissenschaften, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.

- NIEMÜLLER, D.H., REIMANN, A., OBER, D. (2012): Distinct cell-specific expression of homospermidine synthase involved in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in three species of the Boraginales. *Plant Physiology*. *Im Druck*.
- NING, Z., COX, A.J., MULLIKIN, J.C. (2001): SSAHA: a fast search method for large DNA databases. *Genome Research*, 11: 1725–1729.
- NURHAYATI, N. (2004): Identification, molecular cloning and characterisation of homospermidine synthase and deoxyhypusine synthase from *Phalaenopsis* and *Crotalaria* species. Dissertation, Naturwissenschaftliche-Fakultät, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- NURHAYATI, N., GONDÉ, D., 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 molekularbiologischen Untersuchung der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese. Dissertation, Naturwissenschaftliche-Fakultät, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- OBER, D. (2010): Gene duplications and the time thereafter – examples from plant secondary metabolism. *Plant Biology*, 12: 570–577.
- OBER, D., HARMS, R., WITTE, L., HARTMANN, T. (2003): 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.
- OBER, D., HARTMANN, T. (1999): 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., HARTMANN, T. (2000): Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Molecular Biology*, 44: 445–450.
- OBER, D., KALTENEGER, E. (2009): Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 70: 1687–1695.

- OHNUMA, T., SRIDHAR, K.S., RATNER, L.H., HOLLAND, J.F. (1982): Phase I study of indicine *N*-oxide in patients with advanced cancer. *Cancer Treatment Reports*, 66: 1509–1515.
- OHTSU, K., SMITH, M.B., EMRICH, S.J., BORSUK, L.A., ZHOU, R., CHEN, T., ZHANG, X., TIMMERMANS, M.C.P., BECK, J., BUCKNER, B., JANICK-BUCKNER, D., NETTLETON, D., SCANLON, M.J., SCHNABLE, P.S. (2007): Global gene expression analysis of the shoot apical meristem of maize (*Zea mays* L.). *The Plant Journal*, 52: 391–404.
- OK, S.H., PARK, H.M., KIM, J.Y., BAHN, S.C., BAE, J.M., SUH, M.C., JEUNG, J., KIM, K., SHIN, J.S. (2003): Identification of differentially expressed genes during flower development in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Science*, 165: 291–297.
- OZSOLAK, F., PLATT, A.R., JONES, D.R., REIFENBERGER, J.G., SASS, L.E., MCINERNEY, P., THOMPSON, J.F., BOWERS, J., JAROSZ, M., MILOS, P.M. (2009): Direct RNA sequencing. *Nature*, 461: 814–818.
- PALMA, J.M., CORPAS, F.J., RIO, L.A.D. (2009): Proteome of plant peroxisomes: new perspectives on the role of these organelles in cell biology. *PROTEOMICS*, 9: 2301–2312.
- PALMER, S., WIEGAND, A.P., MALDARELLI, F., BAZMI, H., MICAN, J.M., POLIS, M., DEWAR, R.L., PLANTA, A., LIU, S., METCALF, J.A., MELLORS, J.W., COFFIN, J.M. (2003): New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4531–4536.
- PAOLACCI, A.R., TANZARELLA, O.A., PORCEDDU, E., CIAFFI, M. (2009): Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BioMed Central Molecular Biology*, 10: 11.1–11.27.
- PARK, M.H., LEE, Y.B., JOE, Y.A. (1997): Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biological Signals*, 6: 115–123.
- PASTEELS, J.M., TERMONIA, A., WINDSOR, D.M., WITTE, L., THEURING, C., HARTMANN, T. (2001): Pyrrolizidine alkaloids and pentacyclic triterpene saponins in the defensive secretions of *Platyphora* leaf beetles. *Chemoecology*, 11: 113–120.

- PAUWELS, L., MORREEL, K., WITTE, E.D., LAMMERTYN, F., MONTAGU, M.V., BOERJAN, W., INZÉ, D., GOOSSENS, A. (2008): Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 1380–1385.
- PELLETIER, S.W. (1983): The nature and definition of an alkaloid. *In*: PELLETIER, S.W. (Hrsg.), *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. Wiley-VCH, New York.
- PIATIGORSKY, J., O'BRIEN, W.E., NORMAN, B.L., KALUMUCK, K., WISTOW, G.J., BORRAS, T., NICKERSON, J.M., WAWROUSEK, E.F. (1988): Gene sharing by delta-crystallin and argininosuccinate lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 3479–3483.
- PICHERSKY, E., GANG, D.R. (2000): Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 5: 439–445.
- POKALSKY, A.R., HIATT, W.R., RIDGE, N., RASMUSSEN, R., HOUCK, C.M., SHEWMAKER, C.K. (1989): Structure and expression of elongation factor 1 alpha in tomato. *Nucleic Acids Research*, 17: 4661–4673.
- POSADA, D. (2008): jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256.
- RADHAKRISHNAN, A.N., SNELL, E.E. (1960): Biosynthesis of valine and isoleucine. II. Formation of α -acetolactate and α -aceto- α -hydroxybutyrate in *Neurospora crassa* and *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 235: 2316–2322.
- RANNALA, B., YANG, Z. (1996): Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 304–311.
- RANSOM-HODGKINS, W. (2009): The application of expression analysis in elucidating the eukaryotic elongation factor one alpha gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 281: 391–405.
- REBRIKOV, D.V., BRITANOVA, O.V., GURSKAYA, N.G., LUKYANOV, K.A., TARABYKIN, V.S., LUKYANOV, S.A. (2000): Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Research*, 28: 90–94.

- REIMANN, A. (2008): Evolution der Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese - Untersuchungen an Vertretern der Boraginaceae. Dissertation, Fakultät für Lebenswissenschaften, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- REIMANN, A., NURHAYATI, N., BACKENKÖHLER, A., OBER, D. (2004): Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. *The Plant Cell*, 16: 2772–2784.
- RISCHER, H., OREŠIČ, M., SEPPÄNEN-LAAKSO, T., KATAJAMAA, M., LAMMERTYN, F., ARDILES-DIAZ, W., MONTAGU, M.C.E.V., INZÉ, D., OKSMAN-CALDENTEY, K., GOOSSENS, A. (2006): Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 5614–5619.
- 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.
- ROEDER, E. (2000): Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. *Die Pharmazie*, 55: 711–726.
- ROEDER, E., WIEDENFELD, H. (2011): Pyrrolizidine alkaloids in plants used in the traditional medicine of Madagascar and the Mascarene islands. *Die Pharmazie*, 66: 637–647.
- RÖMER, R. (2011): Sequenzanalysen einer putativen Diaminoxidase aus *Symphytum officinale*. Bachelorthesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463–5467.
- SASLOWSKY, D., WINKEL-SHIRLEY, B. (2001): Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 27: 37–48.

- SCHWARZ, G. (1978): Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6: 461–464.
- SCOTT, J.G., LIU, N., WEN, Z. (1998): Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121: 147–155.
- SHOJI, T., HASHIMOTO, T. (2011a): Recruitment of a duplicated primary metabolism gene into the nicotine biosynthesis regulon in tobacco. *The Plant Journal*, 67: 949–959.
- SHOJI, T., HASHIMOTO, T. (2011b): Tobacco MYC2 regulates jasmonate-inducible nicotine biosynthesis genes directly and by way of the *NIC2*-locus *ERF* genes. *Plant & Cell Physiology*, 52: 1117–1130.
- SILVEIRA, E., ALVES-FERREIRA, M., GUIMARAES, L., DA SILVA, F., CARNEIRO, V. (2009): Selection of reference genes for quantitative real time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. *BioMed Central Plant Biology*, 9: 84.1–84.10.
- SODERLUND, C., JOHNSON, E., BOMHOFF, M., DESCOUR, A. (2009): PAVE: Program for assembling and viewing ESTs. *BioMed Central Genomics*, 10: 400.1–400.10.
- SOLTIS, D.E., SMITH, S.A., CELLINESE, N., WURDACK, K.J., TANK, D.C., BROCKINGTON, S.F., REFULIO-RODRIGUEZ, N.F., WALKER, J.B., MOORE, M.J., CARLSWARD, B.S., BELL, C.D., LATVIS, M., CRAWLEY, S., BLACK, C., DIOUF, D., XI, Z., RUSHWORTH, C.A., GITZENDANNER, M.A., SYTSMA, K.J., QIU, Y., HILU, K.W., DAVIS, C.C., SANDERSON, M.J., BEAMAN, R.S., OLMS-TEAD, R.G., JUDD, W.S., DONOGHUE, M.J., SOLTIS, P.S. (2011): Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa. *American Journal of Botany*, 98: 704–730.
- 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.
- STEVENS, P.F. (2001): Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008. <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>.
- SUBKHANKULOVA, T., LIVESEY, F.J. (2006): Comparative evaluation of linear and exponential amplification techniques for expression profiling at the single-cell level. *Genome Biology*, 7: R18.1–R18.16.

- SUZUKI, H., REDDY, M.S.S., NAOUMKINA, M., AZIZ, N., MAY, G.D., HUHMANN, D.V., SUMNER, L.W., BLOUNT, J.W., MENDES, P., DIXON, R.A. (2005): Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 220: 696–707.
- TAIT, G.H. (1979): The formation of homospermidine by an enzyme from *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochemical Society Transactions*, 7: 199–201.
- TALIANOVA, M., JANOUSEK, B. (2011): What can we learn from tobacco and other Solanaceae about horizontal DNA transfer? *American Journal of Botany*, 98: 1231–1242.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- TATTERSALL, D.B., BAK, S., JONES, P.R., OLSEN, C.E., NIELSEN, J.K., HANSEN, M.L., HØJ, P.B., MØLLER, B.L. (2001): Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science*, 293: 1826–1828.
- TAVARE, S. (1986): Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17: 57–86.
- THIEL, J., WEIER, D., SREENIVASULU, N., STRICKERT, M., WEICHERT, N., MELZER, M., CZAUDERNA, T., WOBUS, U., WEBER, H., WESCHKE, W. (2008): Different hormonal regulation of cellular differentiation and function in nucellar projection and endosperm transfer cells: a microdissection-based transcriptome study of young barley grains. *Plant Physiology*, 148: 1436–1452.
- THOMPSON, J.E., HOPKINS, M.T., TAYLOR, C., WANG, T. (2004): Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implications for plant growth and development. *Trends in Plant Science*, 9: 174–179.
- TOPPEL, G. (1987): Bildung von Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxiden in Wurzelorgan-kulturen verschiedener *Senecio*-Arten und *Crotalaria scassellatii* Keimpflanzen. Dissertation, Naturwissenschaftliche-Fakultät, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.

- TRIGO, J.R., BROWN, K.S., HENRIQUES, S.A., BARATA, L.E.S. (1996a): Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae butterflies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24: 181–188.
- TRIGO, J.R., BROWN, K.S., WITTE, L., HARTMANN, T., ERNST, L., BARATA, L.E.S. (1996b): Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 99–123.
- TRIGO, J.R., WITTE, L., BROWN, K.S., HARTMANN, T., BARATA, L.E.S. (1993): Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 669–679.
- TURNER, G., GERSHENZON, J., NIELSON, E.E., FROEHLICH, J.E., CROTEAU, R. (1999): Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology*, 120: 879–886.
- TURNER, G.W., CROTEAU, R. (2004): Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiology*, 136: 4215–4227.
- TUTEJA, R., TUTEJA, N. (2004): Serial analysis of gene expression: applications in malaria parasite, yeast, plant, and animal studies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004: 106–112.
- UMBARGER, H.E., BROWN, B. (1958): Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VIII. The formation of acetolactate. *Journal of Biological Chemistry*, 233: 1156–1160.
- URSIN, V.M., IRVINE, J.M., HIATT, W.R., SHEWMAKER, C.K. (1991): Developmental analysis of elongation factor-1 α expression in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 3: 583–591.
- VANDESOMPELE, J., PRETER, K.D., PATTYN, F., POPPE, B., ROY, N.V., PAEPE, A.D., SPELEMAN, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3: 1–12.

- VASCONCELLOS-NETO, J., LEWINSOHN, T.M. (2008): Discrimination and release of unpalatable butterflies by *Nephila clavipes*, a neotropical orb-weaving spider. *Ecological Entomology*, 9: 337–344.
- VELCULESCU, V.E., ZHANG, L., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W. (1995): Serial analysis of gene expression. *Science*, 270: 484–487.
- VITALE, A., DENECKE, J. (1999): The endoplasmic reticulum–gateway of the secretory pathway. *The Plant Cell*, 11: 615–628.
- VRIELING, K., SMIT, W., MEIJDEN, E.V.D. (1991): Tritrophic interactions between aphids (*Aphis jacobaeae* Schrank), ant species, *Tyria jacobaeae* L., and *Senecio jacobaea* L. lead to maintenance of genetic variation in pyrrolizidine alkaloid concentration. *Oecologia*, 86: 177–182.
- WACHENHEIM, D.E., BLYTHE, L.L., CRAIG, A.M. (1992): Effects of antibacterial agents on *in vitro* ovine ruminal biotransformation of the hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid jacobine. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2559–2564.
- WAGNER, M. (2009): Identifizierung von Haushaltsgenen ausgewählter Vertreter Pyrrrolizidin-Alkaloid produzierender Boraginaceae. Bachelorthesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- WALL, P.K., LEEBENS-MACK, J., CHANDERBALI, A.S., BARAKAT, A., WOLCOTT, E., LIANG, H., LANDHERR, L., TOMSHO, L.P., HU, Y., CARLSON, J.E., MA, H., SCHUSTER, S.C., SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S., ALTMAN, N., PAMPHILIS, C.W.D. (2009): Comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome characterization. *BioMed Central Genomics*, 10: 347.1–347.19.
- WALTON, N.J., MCCLAUCHLAN, W. (1990): Diamine oxidation and alkaloid production in transformed root cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 29: 1455–1457.
- WANG, H.T., MA, F.L., MA, X.B., HAN, R.F., ZHANG, Y.B., CHANG, J.W. (2006): Differential gene expression profiling in aggressive bladder transitional cell carcinoma compared to the adjacent microscopically normal urothelium by microdissection-smart cDNA PCR-SSH. *Cancer Biology & Therapy*, 5: 104–110.
- WANG, T., ZHANG, C., WU, W., NOWACK, L.M., MADEY, E., 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, Y., FU, P.P., CHOU, M.W. (2005b): Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, retrorsine, leading to DNA adduct formation *in vivo*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2: 74–79.
- WANG, Y., YAN, J., BEGER, R.D., FU, P.P., CHOU, M.W. (2005c): Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, leading to DNA adduct formation *in vivo*. Cancer Letters, 226: 27–35.
- WANG, Y., YAN, J., FU, P.P., CHOU, M.W. (2005d): Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. Toxicology Letters, 155: 411–420.
- WANG, Z., GERSTEIN, M., SNYDER, M. (2009): RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics, 10: 57–63.
- WEBER, A.P., WEBER, K.L., CARR, K., WILKERSON, C., OHLROGGE, J.B. (2007): Sampling the *Arabidopsis* transcriptome with massively parallel pyrosequencing. Plant Physiology, 144: 32–42.
- WEBER, S., EISENREICH, W., BACHER, A., HARTMANN, T. (1999): Pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type: biosynthesis of trachelanthic acid. Phytochemistry, 50: 1005–1014.
- WELLER, S.J., JACOBSON, N.L., CONNER, W.E. (1999): The evolution of chemical defences and mating systems in tiger moths (Lepidoptera: Arctiidae). Biological Journal of the Linnean Society, 68: 557–578.
- WIEDENFELD, H., EDGAR, J. (2011): Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. Phytochemistry Reviews, 10: 137–151.
- WILLIAMS, D.E., REED, R.L., KEDZIERSKI, B., ZIEGLER, D.M., BUHLER, D.R. (1989): The role of flavin-containing monooxygenase in the *N*-oxidation of the pyrrolizidine alkaloid senecionine. Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals, 17: 380–386.
- WINK, M. (2003): Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry, 64: 3–19.
- WINTER, C.K., SEGALL, H.J. (1989): Metabolism of pyrrolizidine alkaloids. In: CHEEKE, P.R. (Hrsg.), Toxicants of Plant Origin. CRS Press, Boca Raton.
- WITTE, L., EHMKE, A., HARTMANN, T. (1990): Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids. from plants via aphids to ladybirds. Naturwissenschaften, 77: 540–543.

- YU, Y., LASHBROOK, C., HANNAPEL, D. (2007): Tissue integrity and RNA quality of laser microdissected phloem of potato. *Planta*, 226: 797–803.
- ZHANG, D., DU, Q., XU, B., ZHANG, Z., LI, B. (2010): The actin multigene family in *Populus*: organization, expression and phylogenetic analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, 284: 105–119.
- ZHARKIKH, A. (1994): Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 39: 315–329.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	22. Juni 1981
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

1987 – 1991	Grundschule am Heidenberger Teich in Kiel
1991 – 2000	Gymnasium im Bildungszentrum Mettenhof in Kiel mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

2000 – 2001	Individuelle-Schwerstbehinderten-Betreuung an der Rudolf-Steiner-Schule in Kiel
-------------	---------------------------------------------------------------------------------

Studium

jeweils an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel:

10/2001 – 9/2002	Magister-Studium mit Hauptfach Indologie, 1. Nebenfach: Klassische Archäologie, 2. Nebenfach: Anglistik
10/2002 – 6/2008	Diplom-Studium der Biologie
seit 10/2008	Promotionsstudium unter der Betreuung von Professor Dr. Dietrich Ober im Botanischen Institut

Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde.

Ferner versichere ich an Eides statt, dass ich die Inanspruchnahme fremder Hilfen aufgeführt habe, sowie, dass ich die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Teilergebnisse wurden durch folgende Tagungsbeiträge veröffentlicht:

SIEVERT, C., NIEMÜLLER, D.H., OBER, D. (2009): Subtraktive Hybridisierung zur Identifizierung von Enzymen und Regulationsfaktoren der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese. 22. Tagung Pflanzenmolekularbiologie, 17. – 20. Februar 2009, Dabringhausen.

SIEVERT, C., OBER, D. (2011): Evolution of a secondary pathway. IMPRS retreat, 30. März – 1. April 2011, Plön.

SIEVERT, C., OBER, D. (2011): Evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. Botanikertagung 2011, 18. – 23. September 2011, Berlin.

SIEVERT, C., KRUSE, L.H., HOLLMANN, J., OBER, D. (2012): A cell-specific subtractive approach to identify genes of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. 24. Irseer Naturstofftage, 22. – 24. Februar 2012, Irsee.

Kiel, 13. Juni 2012

(Christian Sievert)

A Anhang

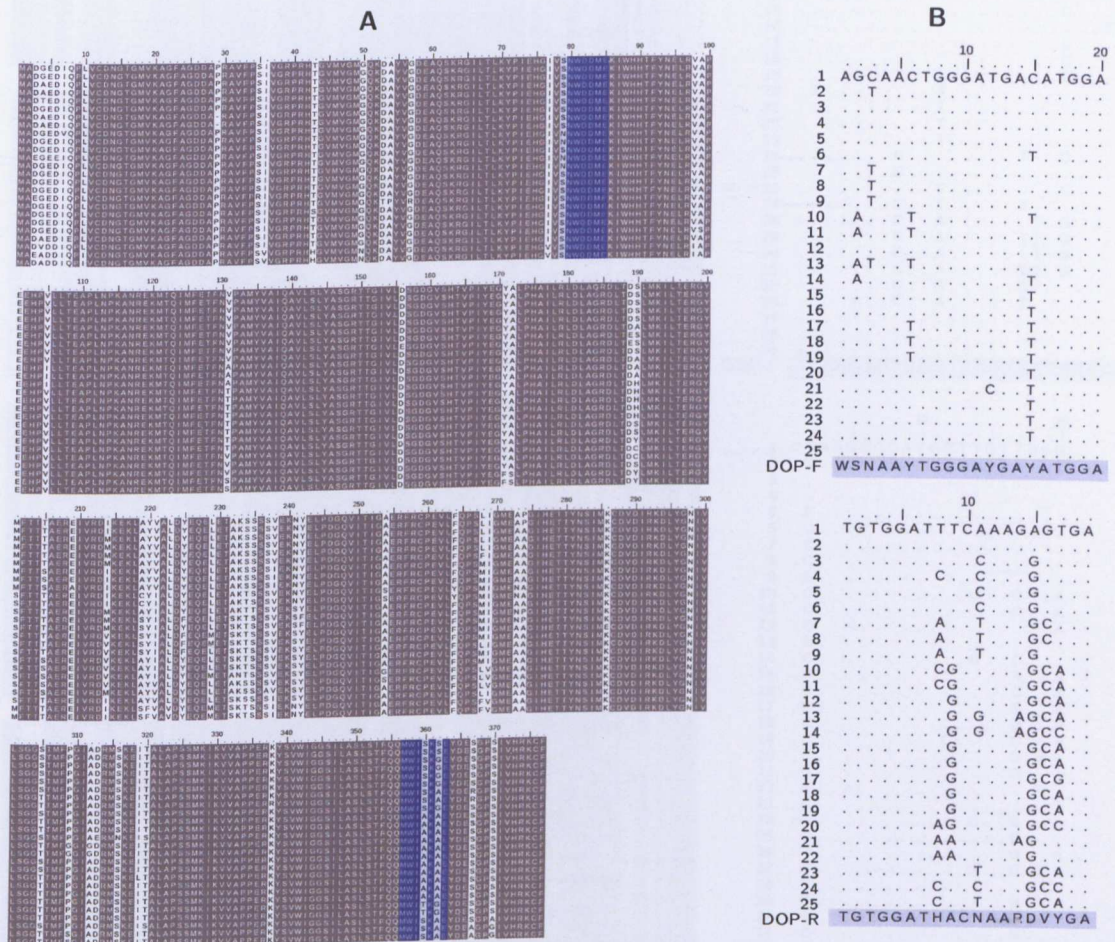


Abbildung A.1 ACT-Sequenzen. (A) Transkriptsequenzen von GenBank wurden *in silico* translatiert und verglichen. Konservierte Bereiche sind grau schattiert; degenerierte *Primer*-Sequenzen wurden mit dem blau unterlegten Bereich kopiert. (B) Blau unterlegte Bereiche aus (A) mit Nukleinsäuresequenzen. Gleiche Nukleotide im Vergleich zur Sequenz (1) sind mit einem Punkt symbolisiert. 1: XM_002871340.1, 2: AY096397.1, 3: FJ487620.1, 4: FJ487621.1, 5: AF548026.1, 6: AY305724.1, 7: X67666.1, 8: X68649.1, 9: EU190972.1, 10: NM_115235.3, 11: NM_179953.2, 12: AF246714.1, 13: NM_125328.3, 14: NM_114519.2, 15: EU938079.1, 16: X63603.1, 17: X55749.1, 18: DQ252512.1, 19: X55751.1, 20: NM_112046.3, 21: AB158612.1, 22: X55752.1, 23: AF246715.1, 24: AK317305.1, 25: NM_103814.3, DOP-F/R: *Forward/Reverse* degenerierter *Primer*. Zur Darstellung von degenerierten Positionen wurden die Empfehlungen von NC-IUB (1985) verwendet: R=AG, W=AT, S=GC, Y=CT, V=AGC, H=ACT, D=AGT, N=AGCT.

A

B

DOP-F TCAAGTATGCCTGGGTGGCTTGAC

DOP-R CCAAGCCCATGVTGTGKAR

Abbildung A.2 (vorherige Seite) EF1a-Sequenzen. (A) Transkriptsequenzen von GenBank wurden *in silico* translatiert und verglichen. Konservierte Bereiche sind grau schattiert; degenerierte *Primer*-Sequenzen wurden mit dem blau unterlegten Bereich konzipiert. (B) Blau unterlegte Bereiche aus (A) mit Nukleinsäuresequenzen. Gleiche Nukleotide im Vergleich zur Sequenz (1) sind mit einem Punkt symbolisiert. 1: DQ268854.1, 2: AB061263.1, 3: DQ252511.1, 4: DQ228347.1, 5: DQ284495.1, 6: DQ294264.1, 7: U04632.1, 8: D63396.1, 9: AB019427.1, 10: X96555.1, 11: AJ222579.1, 12: EU790565.1, 13: AJ223969.1, 14: D12709.1, 15: DQ174252.1, 16: DQ174257.1, 17: DQ174256.1, 18: DQ174254.1, 19: DQ174258.1, 20: DQ174250.1, 21: DQ174251.1, 22: DQ174255.1, 23: XM_002527982.1, 24: DQ407753.1, 25: FJ267653.1, 26: AB106676.1, 27: AB073630.1, 28: NM_125432.3, 29: NM_100666.3, 30: NM_100667.3, 31: NM_100668.2, 32: EU126916.1, 33: AY157315.1, 34: AJ536671.1, 35: X53043.1, 36: AF242732.1, DOP-F/R: *Forward/Reverse degenerierter Primer*. Zur Darstellung von degenerierten Positionen wurden die Empfehlungen von NC-IUB (1985) verwendet: R=AG, Y=CT, K=GT, V=AGC, B=GCT.

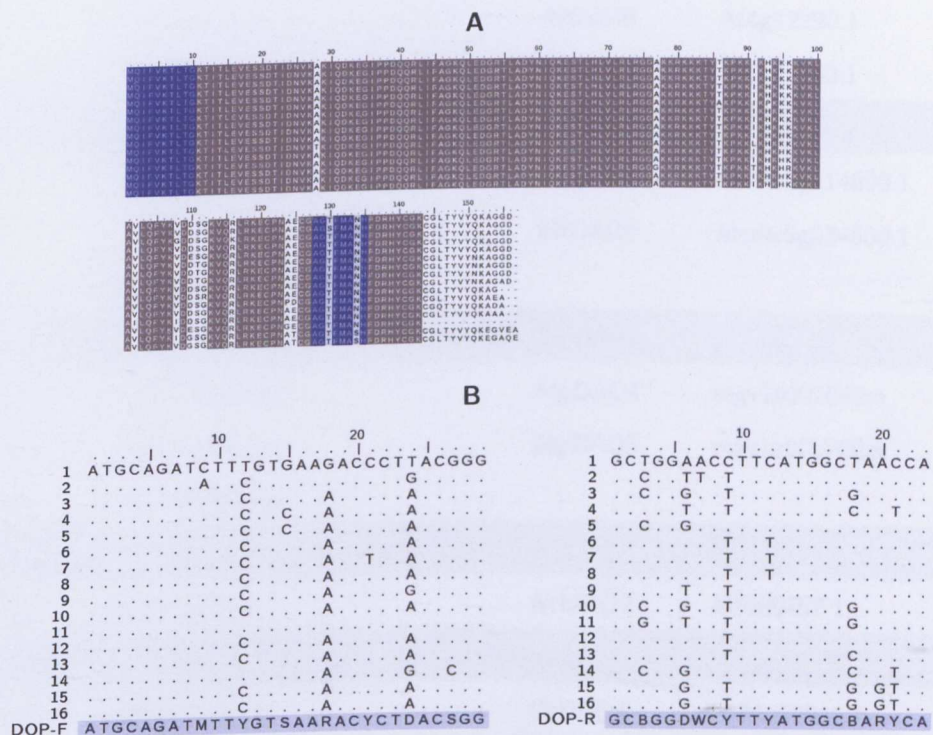


Abbildung A.3 UBQ-Sequenzen. (A) Transkriptsequenzen von GenBank wurden *in silico* translatiert und verglichen. Konservierte Bereiche sind grau schattiert; degenerierte *Primer*-Sequenzen wurden mit dem blau unterlegten Bereich konzipiert. (B) Blau unterlegte Bereiche aus (A) mit Nukleinsäuresequenzen. Gleiche Nukleotide im Vergleich zur Sequenz (1) sind mit einem Punkt symbolisiert. 1: Y10024.1, 2: DQ138111.1, 3: AF298826.1, 4: EF120638.1, 5: DQ116441.1, 6: EU294350.1, 7: Z11669.1, 8: X58253.1, 9: AJ223329.1, 10: AF386524.1, 11: XM_001754212.1, 12: Z22613, 13: DQ887087.1, 14: U68751.1, 15: NM_116090.2, 16: NM_130278.3, DOP-F/R: *Forward/Reverse degenerierter Primer*. Zur Darstellung von degenerierten Positionen wurden die Empfehlungen von NC-IUB (1985) verwendet: M=AC, R=AG, W=AT, S=GC, Y=CT, D=AGT, B=GCT.

Tabelle A.1 Phylogenetisch analysierte Transkriptsequenzen. Sequenzen wurden von den Genomdaten der Phytozome-Datenbank abgeleitet (GOODSTEIN *et al.* 2012). Die Sequenzen von *N. tabacum* stammen von GenBank. Die jeweiligen *Accession*-Nummern sind angegeben.

Sequenz-ID	<i>Accession</i> -Nummer	Sequenz-ID	<i>Accession</i> -Nummer
<i>Aquilegia coerulea</i>			
AcDAO1	AcoGoldSmith_v1.001084m	AcDAO5	AcoGoldSmith_v1.001918m
AcDAO2	AcoGoldSmith_v1.001370m	AcDAO6	AcoGoldSmith_v1.018113m
AcDAO3	AcoGoldSmith_v1.001533m	AcDAO7	AcoGoldSmith_v1.022090m
AcDAO4	AcoGoldSmith_v1.001613m	AcDAO8	AcoGoldSmith_v1.025612m
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
AtDAO1	At1g31670.1	AtDAO6	At3g43670.1
AtDAO2	At1g31690.1	AtDAO7	At4g12270.1
AtDAO3	At1g31710.1	AtDAO8	At4g12280.1
AtDAO4	At1g62810.1	AtDAO9	At4g12290.1
AtDAO5	At2g42490.1	AtDAO10	At4g14940.1
<i>Medicago truncatula</i>			
MtDAO1	Medtr1g132530.1	MtDAO4	Medtr3g114690.1
MtDAO2	Medtr1g132560.1	MtDAO5	Medtr5g034500.1
MtDAO3	Medtr3g109760.1		
<i>Mimulus guttatus</i>			
MgDAO1	mgv1a001639m	MgDAO4	mgv1a002849m
MgDAO2	mgv1a002006m	MgDAO5	mgv1a025706m
MgDAO3	mgv1a002018m		
<i>Nicotiana tabacum</i>			
NtMPO1	DQ873385.1	NtMPO2	AB289457.1
<i>Oryza sativa</i>			
OsDAO1	Os02g38010.1	OsDAO4	Os04g40040.1
OsDAO2	Os04g04950.1	OsDAO5	Os06g23114.1
OsDAO3	Os04g20164.1	OsDAO6	Os06g23140.1
<i>Physcomitrella patens</i>			
PpDAO1	Pp1s9_129V6.1	PpDAO4	Pp1s152_72V6.1
PpDAO2	Pp1s26_107V6.1	PpDAO5	Pp1s178_54V6.1
PpDAO3	Pp1s36_16V6.1	PpDAO6	Pp1s363_39V6.1

Sequenz-ID	Accession-Nummer	Sequenz-ID	Accession-Nummer
<i>Volvox carteri</i>			
VcDAO1	Vc_84774	VcDAO2	Vc_118485
<i>Vitis vinifera</i>			
VvDAO1	GSVIVT01004079001	VvDAO5	GSVIVT01017958001
VvDAO2	GSVIVT01007669001	VvDAO6	GSVIVT01017959001
VvDAO3	GSVIVT01017952001	VvDAO7	GSVIVT01019873001
VvDAO4	GSVIVT01017954001		

Tabelle A.2 Tabelle mit allen verwendeten Oligonukleotiden. Genspezifische *Primer* wurden zum Teil für eine Transkriptquantifizierung mittels semiquantitativer (sq) oder quantitativer RT-PCR (q) eingesetzt. Hier nicht angegebene *Primer*-Hybridisierungstemperaturen (T_{Hyb}) und PCR-Zyklusanzahl wurden standardmäßig wie im Methodik-Teil beschrieben eingestellt. Zur Darstellung von degenerierten Positionen wurden die Empfehlungen von NC-IUB (1985) verwendet: M=AC, R=AG, W=AT, S=GC, Y=CT, K=GT, V=AGC, H=ACT, D=AGT, B=GCT, N=AGCT. Ribonukleotide wurden mit einem „r“ gekennzeichnet. F: *Forward-Primer*, R: *Reverse-Primer*, TSP: *Matrizen-Wechsel-Primer*, SOP: *Step-out-PCR-Primer*, deg: degeneriert.

<i>Primer</i>	Sequenz	RT-PCR	T_{Hyb}	Zyklen
<i>RT-Primer</i>				
dT17	5'-GTC GAC TCG AGA ATT C(T) ₁₇ -3'			
<i>Degenerierte Primer</i>				
degACT-F	5'-WSN AAY TGG GAY GAY ATG GA-3'			
degACT-R	5'-TCR BHY TTN GTD ATC CAC A-3'			
degUBQ-F	5'-ATG CAG ATM TTY GTS AAR ACY CTD ACS GG-3'			
degUBQ-R	5'-TGR YTV GCC ATR AAR GWH CCV GC-3'			
degEF1a-F	5'-TCA AGT AYG CVT GGG TKY TBG AC-3'			
degEF1a-R	5'-TYT CMA CAR BCA TGG GCT TGG-3'			
<i>5'-RACE-Primer</i>				
dT25	5'-(T) ₂₅ VN-3'			
TSP	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC (GGG) _r -3'			
SOP1	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT-3'			

<i>Primer</i>	Sequenz	RT-PCR	T _{Hyb}	Zyklen
SOP2	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'			
<i>Sequenzier-Primer</i>				
T7-F	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'			
M13-R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'			
<i>Genspezifische Primer</i>				
CoHSS-F	5'-TTT GGA CAA GAT GTT AGA AGA GCA AAT ATC T-3'	sq	63 °C	30
CoHSS-R	5'-CAT TGA CTG ACT CAT CGT CCA TAG CAC ATA-3'	sq	63 °C	30
CoUBQ-F	5'-GTG GTT GCT GAA TCA TGT CCT GA-3'	sq	60 °C	18
CoUBQ-R	5'-ACT TTC ATC ATC CCA AGA CAA CTG A-3'	sq	60 °C	18
HiACT-F1	5'-ACT GGG ATG ATA TGG AGA AGA TCT G-3'	sq	61 °C	30
HiACT-F2	5'-ATT CAC GAG ACC ACC TAT AAC TCC-3'	q		
HiACT-R1	5'-TGG AAG GTG CTG AGG GAT GC-3'	sq	61 °C	30
HiACT-R2	5'-CAA CCA CCT TGA TCT TCA TGC TGC-3'		58 °C	35
HiACT-R3	5'-CTC ATA CGG TCA GCA ATA CCA G-3'	q		
HiDAO1-F1	5'-TCC ATT GCT TCA TCC AAT GAT CAA TAC A-3'		60 °C	30
HiDAO1-F2	5'-GTC AAG ACA AAA ATG CAA ACC AAA AGA GTG-5'	q		
HiDAO1-R	5'-TAA TAA CGG TCC AAC CAC GTT TCC T-3'	q	60 °C	30
HiDAO-EST1-F	5'-CGG CTA ACC ATT TCT TTC ATG TGC-3'	q		
HiDAO-EST1-R	5'-ACT TTC TTG TTT CTC CAG GTT GTA GA-3'	q		
HiDAO-EST2-F	5'-CAT GGG TTA AGC AAA ATC GGT CTC-3'	q		
HiDAO-EST2-R	5'-GAA GCA TAA AAC CGA CGT GTT CC-3'	q		
HiDAO-EST4-F	5'-GGA GGT TTA CGG CGC AAT TAT AG-3'	q		
HiDAO-EST4-R	5'-CTC TTC CTT TTT GAT CCA TTG CCA-3'	q		
HiDAO-EST3-F	5'-AAC AGA GTC CGT GAC ATC ATC AAA-3'	q		
HiDAO-EST3-R	5'-CTA AAA CCA CAG GCT TGT CAG G-3'	q		
HiEF1a-F	5'-CTA CTG CAC TGT GAT TGA TGC TC-3'	q		

<i>Primer</i>	Sequenz	RT-PCR	T _{Hyb}	Zyklen
<i>HiEF1a-R</i>	5'-CAA ATC ATT TGT TTG ACA CCA AGA GTG-3'	q		
<i>HiHSS-F1</i>	5'-CAA CAA AGG TGT AAA TTA TGC GGA G-3'	sq/q	60 °C	30
<i>HiHSS-F2</i>	5'-ATA TAC ATA TGG GAG AGG TAG CCA CAA ATG CT-3	sq	60 °C	30
<i>HiHSS-F3</i>	5'-ATG GGA GAG GTA GCC ACA AAT GC-3'	sq	60 °C	30
<i>HiHSS-R1</i>	5'-TGT GAC AAT CTC CAT TTC AAC ATG TC-3'	sq/q	60 °C	30
<i>HiHSS-R2</i>	5'-ATT GGA TCC TTA ACT TGA TTT CTT CAC CTT TGC AAA-3'	sq	60 °C	30
<i>HiHSS-R3</i>	5'-GTT GTT AGC ATG CAA GTA GAG CAT G-5'	sq	60 °C	30
<i>HiUBQ-F</i>	5'-CTA GCT GAC TAC AAC ATC CAG AAG-3'	sq/q	62 °C	25
<i>HiUBQ-R</i>	5'-CCG GAA TCA TCA ACC TTA TAG AAC TG-3'	sq/q	62 °C	25
<i>SoACT-F</i>	5'-CAA GGC TAA CAG GGA GAA AAT GAC-3'	q		
<i>SoACT-R</i>	5'-ATC ACC AGA ATC CAG CAC AAT ACC-3'	q		
<i>SoDAO1-F</i>	5'-TTT GTA TCC AGG TTC GAA TGT TGG-3'	q		
<i>SoDAO1-R</i>	5'-ATG GCT CCG ATC AGC ATA CAA G-3'	q		
<i>SoDAO2-F</i>	5'-TTC ATG CTC CAG CCA CAT GGT-3'	q		
<i>SoDAO2-R</i>	5'-TTC TCC CTG ACT TCA AGC TCA C-3'	q		
<i>SoEF1a-F1</i>	5-GTT GGA TAT AAC CCT GAG AAG ATC C- 3'	sq	61 °C	22
<i>SoEF1a-F2</i>	5-CCA CCA CCC CAA AAT ATT CCA AG-3'	q		
<i>SoEF1a-R1</i>	5-CCT CTT AGG CTC TGA GAT TTG ATC-3'	sq	61 °C	22
<i>SoEF1a-R2</i>	5-CAG TCC AGG TTG GTG GAC CT-3'	q		
<i>SoHSS-F1</i>	5'-CTT CTC ATC TTG GAG ATG CCA TCC AAA T-3'	sq	62 °C	31-35
<i>SoHSS-F2</i>	5'-AGT GCT ATG GAC AAT GAA TCA GTG A-3'	q		
<i>SoHSS-R1</i>	5'-AGC ATA GCT CCA GGT AAG GCA AAA T-3'	sq	62 °C	31-35
<i>SoHSS-R2</i>	5'-CAG CAA AAT CAG CGC CTC CA-3'	q		
<i>SoUBQ-F</i>	5'-CTA CAA CAT CCA GAA GGA GTC AAC-3'	sq/q	62 °C	28

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>RT-PCR</i>	<i>T_{Hyb}</i>	<i>Zyklen</i>
SoUBQ-R	5'-CTG CAA AAC CGC GAG CTT CAC-3'	sq/q	62 °C	28
<i>Macroarray-Oligonukleotide</i>				
SSH-Oligo1	5'-TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T-3'			
SSH-Oligo2	5'-ACC TGC CCG GGC GGC CGC TCG A-3'			
SSH-Oligo3	5'-AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT-3'			
SSH-Oligo4	5'-ACC TCG GCC GCG ACC ACG CT-3'			

