



Bernburg
Dessau
Köthen



Hochschule Anhalt
Anhalt University of Applied Sciences

**FB Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik (BWP)**

Charakterisierung von Kartoffelpflanzen mit reduzierter THT-Genexpression

Masterarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (M.Sc)

Vorgelegt von

Hoffmann, Franz

Matrikelnummer: 4050701

Studiengang: Biotechnologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Sabine Rosahl

2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert

Abgabedatum: 03.11.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Ethyldiamintetraessigsäure.....	VI
Natriumlaurylsulfat.....	VII
Abkürzungen der verwendeten Einheiten.....	VIII
Abkürzungen der Aminosäuren.....	VIII
Zusammenfassung.....	IX
Inhaltsangabe.....	IX
Abstract.....	X
1. Einleitung.....	1
1.1 Pflanzen-Pathogen-Interaktion.....	1
1.1.1 Bedeutung der Kraut- und Knollenfäule.....	1
1.1.2 Arten der Resistenz.....	2
1.1.3 Pathogenabwehr in Pflanzen.....	3
1.2 Hydroxymzimtsäureamide.....	4
1.2.1 Biologische Bedeutung.....	5
1.2.2 Synthese.....	8
1.2.3 Eigenschaften und Diversität der THT.....	10
1.3 Zielstellung.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Verwendete Materialien.....	14
2.1.1 Chemikalien und Geräte.....	14
2.1.2 Verwendete Lösungen.....	16
2.1.3 Oligonukleotide.....	17
2.2 Anzucht von <i>Solanum tuberosum</i> cv <i>Désirée</i>	17
2.3 Anzucht von <i>P. infestans</i>	18

Inhaltsverzeichnis

2.4	Infiltration von Kartoffelblättern	18
2.5	Infizierung von Kartoffelblättern	19
2.6	Biomassebestimmung von <i>P. infestans</i>	19
2.7	Vorbereitung der Proben zum <i>Metabolite Profiling</i>	20
2.8	Isolierung genomischer Pflanzen-DNA	20
2.9	Restriktionsspaltung genomischer DNA	21
2.10	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.11	Gel-Extraktion von spezifischen Banden	22
2.12	Isolierung pflanzlicher RNA durch TRIzol	22
2.13	Formaldehyd-Gelelektrophorese	22
2.14	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.15	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	24
2.15.1	Absolute Quantifizierung	25
2.15.2	Relative Quantifizierung	25
2.16	Blotting-Experimente	25
2.16.1	Southern-Blot	25
2.16.2	Northern-Blot	26
2.16.3	Fertigung und Nachweis radioaktiv markierter Sonden	26
2.17	Klonierung amplifizierter Sequenzen	26
2.17.1	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.17.2	Präparation durch das Plasmid Midi Kit	28
2.18	Bioinformatische Auswertung	29
2.18.1	<i>In-silico-Splicing</i> präferierter Sequenzen	29
2.18.2	Drei-Dimensionale Darstellung von <i>SfTHT</i>	29
3.	Ergebnisse und Diskussion	30
3.1	Nachweis der Insertion des RNAi-Konstrukts via Southern-Blot	30
3.2	Nachweis des RNAi-Effektes via Northern-Blot	32
3.3	Einfluss der THT-Expression auf das metabolische Profil	35
3.4	Einfluss der THT-Expression auf das Wachstum von <i>P. infestans</i>	37
3.5	Phänotypische Charakterisierung der <i>SfTHT</i> -Linien	40

Inhaltsverzeichnis

4. Zusammenfassung.....	44
5. Ansätze und Ausblick	45
Literaturverzeichnis	V
5.1 Internetquellen	XI
Anhang.....	VII
SfTHT-Sequenzen	VII
Sequenz Schmidt (1999).....	VII
Sequenz Nakane et al. (2003).....	VII
Fragment SfTHT#22 und SfTHT#23.....	VIII
Fragment SfTHT#24.....	VIII
Eidesstaatliche Erklärung.....	X
Danksagung	XI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Verlauf der Infektion durch <i>Phytophthora infestans</i>	1
Abbildung 1-2 Sequenzielle Unterschiede zwischen Pep-13 und W2A.....	4
Abbildung 1-3 Einordnung der Hydroxymzimtsäureamide	7
Abbildung 1-4 Synthese von Hydroxymzimtsäureamiden	10
Abbildung 1-5 Produktbildungskaskade von Hydroxymzimtsäureamiden	12
Abbildung 1-6 Darstellung von THT	12
Abbildung 2-1 Vektorkarte des pHELLGATE-Plasmides.....	18
Abbildung 2-2 Inokulation von Kartoffelblättern mit <i>P. infestans</i>	19
Abbildung 2-3 Vektorkarte der pJET-Transformation mit THT	27
Abbildung 3-1 Untersuchung der korrekten Insertion des RNAi-Fragmentes	31
Abbildung 3-2 Darstellung zur Erfassung der Expression von THT durch qPCR	33
Abbildung 3-3 Darstellung der akkumulierten Menge an THT-mRNA	34
Abbildung 3-4 <i>p</i> -Coumaroyl-Tyramin in infizierten Blattscheiben nach einem Tag.....	35
Abbildung 3-5 HCAA in infizierten Tropfen nach einem Tag. 1	36
Abbildung 3-6 Verlauf der Infektion durch <i>P. infestans</i> an ausgewählten Linien	38
Abbildung 3-7 Relative Transkriptmenge von THT nach Befall durch <i>P. infestans</i>	39
Abbildung 3-8 Genormtes Wachstum von <i>P. infestans</i>	40
Abbildung 3-9 Phänotyp transformierter Pflanzen.....	41
Abbildung 3-10 Knollen von Kontrollpflanzen und Transformanten.....	42
Abbildung 3-11 Knollenanzahl und Knollenfrischmasse von Kontroll- und <i>StTHT</i> -Linien	43
Abbildung 5-1 Absolute Quantifizierung von THT durch die 2. Zeitkinetik	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Getreidesorten und deren hauptsächlich akkumulierten Hydroxizimtsäureamide	5
Tabelle 2-1 Verwendete Geräte.....	14
Tabelle 2-2 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsartikel.....	15
Tabelle 2-3 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.....	16
Tabelle 2-4 Verwendete Primer und deren Verwendungszweck.....	17
Tabelle 2-6 Mastermix für 1 Probe genomischer DNA zur Restriktionsspaltung	21
Tabelle 2-7 Mastermix für 1 Probe bei Verwendung zwei spezifischer Polymerasen.....	23
Tabelle 2-8 PCR-Protokoll zur Verwendung der Phusion Polymerase.....	24
Tabelle 2-9 Mastermix für 1 Probe zur qPCR	24
Tabelle 2-10 Temperaturprofil für die qPCR	25
Tabelle 2-11 pJET-Ligase-Mix-Reaktion.....	27

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
4-CL	4-Coumarat:Coenzym A Ligase
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
Ca	Calcium
CCoAMT	Caffeoyl-CoA:3-OMethyltransferase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoA	Coenzym A
CT	<i>p</i> -Coumaroyl-Tyramin
cv.	Cultivar
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i>
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	elongation factor 1 α
EF-Tu	<i>Elongation factor thermo unstable</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Et al.	Et alii / und andere
ETI	<i>Effector triggered immunity</i>
ETS	<i>Effector triggered susceptibility</i>
EV	<i>Empty Vector</i>
FT	Feruloyl-Tyramin
FW	<i>Fresh weight</i> / Frischmasse
HCAA	<i>Hydroxycinnamoyl acid amids</i> / Hydroxyzimtsäureamide
HHT	Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyanthranilat N-(hydroxycinnamoyl)Transferase
HR	Hypersensitive Reaktion
K _M	Michaeliskonstante
L	Linné
LRR	<i>Leucin-rich repeat</i>
M	Marker
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

MATE	<i>multidrug and toxic compound extrusion</i>
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i> / Minimale Hemm-Konzentration
Mont.	Montagne
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Probenzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NB	<i>Nucleotide binding site</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nsSNP	<i>Non-synonymous Single-nucleotide polymorphism</i>
<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PCT	Caffeoyl-CoA:Putrescin N-Caffeoyltransferase
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>
PVL	Prolin-Valin-Leucin
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
QTL	<i>Quantitative trait Locus</i> / Region eines quantitativen Merkmals
R-Gen	Resistenz-Gen
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
R-Protein	Resistenz-Protein
RSA	<i>Radical scavenging activity</i>
rt	<i>retention time</i>
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SGN	<i>SOL Genomics Network</i>
<i>St</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
THT	Hydroxyzimtsäure-CoA:Tyramin- <i>N</i> -(Hydroxyzimtsäure)-Transferase
TrHT	Hydroxyzimtsäure-CoA:Tryptamin- <i>N</i> -(Hydroxyzimtsäure)-Transferase
TRIS-HCL	tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloride
TyDC	Tyrosin-Decarboxylase

Abkürzungsverzeichnis

UPLC-ESI-QToF-MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Quadrupole time-of-flight – Mass spectrometer</i>
VPP	Valin-Prolin-Prolin
WT	Wildtyp

Abkürzungen der verwendeten Einheiten

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μE	Beleuchtungsstärke
bp	<i>base pairs</i> / Basenpaare
cM	centiMorgan
dpi	Days post infection
h	Stunde
hpi	<i>Hours post infection</i> [h]
kDa	Kilodalton
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
min	Minute
mL	Milliliter, entspricht 10 ⁻³ Liter
pkat	Picokatal
μg	Mikrogramm, entspricht 10 ⁻⁶ Gramm

Abkürzungen der Aminosäuren

Abkürzung	Bedeutung
A	Alanin
D	Asparaginsäure
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
P	Prolin
S	Serin
V	Valin

Zusammenfassung

Inhaltsangabe

Diese Masterarbeit wurde im Verlauf des Sommersemesters 2014 am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle angefertigt. Gegenstand dabei war die Charakterisierung von Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum cv Désirée*), welche durch RNA-Interferenz reduzierte Mengen der Tyramin-Hydroxymethyltransferase (THT) besaßen. Durch Southern- und Northern-Blot-Analysen wurden die korrekte Insertion als auch der RNAi-Effekt überprüft und bestätigt. Infizierte Blätter und die dazugehörigen Infektionstropfen wurden in Methanol gelöst und massenspektrometrisch nachgewiesen. Darauf aufbauend wurde das Wachstum von *Phytophthora infestans* auf transformierten Linien untersucht, wobei dessen Biomasse nach 3-tägiger Infektion durch qPCR bestimmt wurde. Während der Betreuung der transformierten Linien in Sterilkultur wurde ein Phänotyp ersichtlich. Nach Dokumentation der äußeren Erscheinungen und nach Prüfung auf Einfluss von Pathogenen, wurden diese Pflanzen für Knollenversuche im Gewächshaus ausgepflanzt und analysiert. Zuletzt wurde die Sequenz von THT analysiert und kloniert, woraufhin drei Fragmente generiert wurden, welche für weitere Versuche genutzt werden können.

Abstract

This master thesis was elaborated in the course of the summer term 2014 at the Leibniz Institute of Plant Biochemistry (IPB) in Halle, Germany. The topic was the characterization of potato plants (*Solanum tuberosum* cv *Désirée*), which had through RNA interference reduced amounts of tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase (THT). By Southern and Northern blot analyses, the correct insertion and the associated effect were checked and confirmed. Infected leaves and the corresponding infection droplets were dissolved in methanol and detected by mass spectrometry. The growth of *Phytophthora infestans* was tested on transformed lines, wherein the pathogen biomass was determined after three days of infection by qPCR. While taking care of the transformed lines in sterile culture, a phenotype was apparent. After documentation of the external phenomena, these plants were planted for tuber experiments in the greenhouse. At last, the sequence for THT was analyzed and cloned (2 different fragments), which can be used for further experiments.

1. Einleitung

1.1 Pflanzen-Pathogen-Interaktion

1.1.1 Bedeutung der Kraut- und Knollenfäule

Biotische und abiotische Stressfaktoren gelten als wichtigster Grund in Ernteverlusten von Kartoffeln. Die Kraut- und Knollenfäule wird dabei als biotischer Stress durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* ausgelöst und ist nach wie vor die verheerendste Kartoffelkrankheit und war für die *irish potato famine* 1845 verantwortlich. Hohe Fungizidkosten, die Weiterentwicklung des Pathogens gegen die Fungizide, die hohe Vielfalt an kultivierbaren Kartoffelsorten und das Auftreten von virulenten *P. infestans*-Stämmen macht es zu einer anspruchsvollen Aufgabe, die Kraut- und Knollenfäule unter Kontrolle zu bringen (Jacobs et al. 2010). Dieses Pathogen nutzt dabei Sporangien und Zoosporen um Blätter, Sprossachsen und Wurzeln zu befallen. Die Zoosporen und Sporangien penetrieren dabei die Blattoberfläche durch die Stomata oder direkt durch die epidermale Zellwand. Die Keimung verläuft optimal bei Temperaturen zwischen 18 und 22 °C und wird durch eine Luftfeuchtigkeit zwischen 75 und 80 % begünstigt. Sporangien und Zoosporen differenzieren zu einem Appressorium und ein Penetrations-Keil wird geformt, um durch die Zellwand der Wirtspflanze zu gelangen. Betroffenes Gewebe ist durch braune und schwarze Stellen gekennzeichnet. Nach drei bis vier Tagen werden Sporangien gebildet, welche durch die Stomata hervortreten. Mit der Übertragung durch Wind und Wasser werden neue Pflanzen oder auch weitere Bereiche der Wirtspflanze (Wurzel) infiziert. Die Kartoffel aktiviert dabei Gegenmaßnahmen in Form von einer Hochregulation von Abwehr-Genen für Abwehr-relevante Proteine und Sekundärmetaboliten.

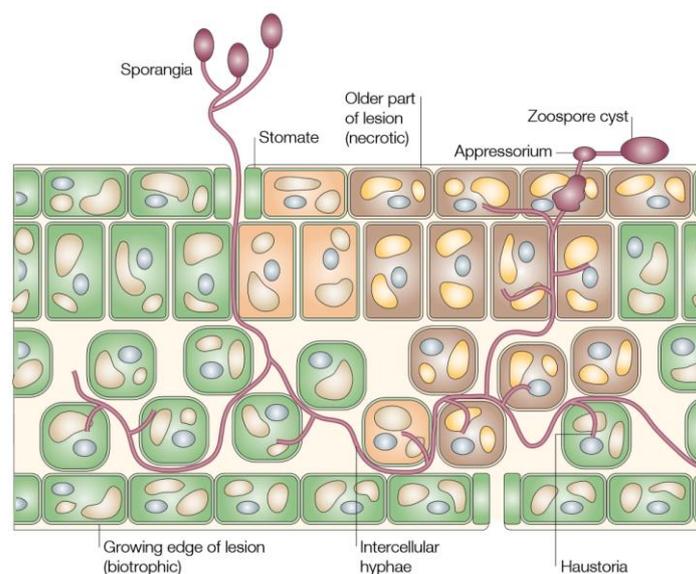


Abbildung 1-1 Verlauf der Infektion durch *Phytophthora infestans* (nach Judelson & Blanco, 2005)

1.1.2 Arten der Resistenz

Ein wichtiger Aspekt in der Pflanzen-Pathogen-Interaktion von Kartoffeln stellt die vorhandene Resistenz dar: Qualitative Resistenz ist sortenspezifisch und geht zurück auf Resistenzgene (Vleeshouwers et al., 2011). Von diesen R-Genen sind bereits 21 identifiziert und kloniert worden, u.a. *R1* (Ballvora et al., 2002), *R2* (Lokossou et al., 2009), *R3a* (Huang et al., 2005), *R3b* (Li et al., 2011), *R4* aus *Solanum demissum* (van Poppel et al., 2009), *RB* aus *Solanum bulbocastanum* (Chend & Haltermann, 2011) und *Rpi* aus *Solanum venturii* (Pel et al., 2009; Foster et al., 2009). Die Mehrheit der R-Proteine beinhaltet eine *nucleotide-binding site* (NB) und Leucin-reiche repetitive Domänen (LRR; Jupe et al., 2012). Diese Art der Resistenz ist nicht von langer Wirksamkeit und wird durch die rasche Anpassung von *P. infestans* überwunden. *Functional gene stacking* ist dabei ein Ansatz, um anfällige Sorten zu stärken (Zhu et al., 2012). Ohne das entsprechende Wissen über die jeweilige Genfunktion (Kopplung und Übertragung mit Resistenz-basierten Genen; Kushalappa & Gunnaiah, 2013) kann die Resistenz innerhalb der verschiedenen Kartoffelsorten jedoch nicht einwandfrei übertragen werden.

Die quantitative Resistenz hingegen wird über eine Vielzahl von Genen und QTLs kontrolliert, wobei mindestens ein QTL auf jedem der 12 Kartoffel-Chromosomen lokalisiert ist (Simko, 2002). Insgesamt sind nach gegenwärtigem Stand 211 QTLs identifiziert, basierend auf 29 QTL-Karten für Resistenzen (Danan et al., 2011). QTLs gegen Kraut- und Knollenfäule sind dabei stark assoziiert mit einer späteren Fruchtreife und sind gekoppelt mit nicht weiter identifizierten Genen (Kou & Wang, 2010). Ein ungerichteter *Metabolomics*-Versuch von Yogendra et al. (2014) brachte dabei in resistenten Kartoffelsorten 241 Resistenz-assoziierte Gene und 110 Resistenz-assoziierte Proteine hervor. Wichtige Vertreter von Resistenz-assoziierten Metaboliten gehören dabei zu den Phenylpropanoiden, Fettsäuren, Flavonoiden und Alkaloiden. Der unterschiedliche Gehalt an Resistenz-assoziierten-Metaboliten in resistenten Genotypen gegenüber anfälligeren Sorten geht vermutlich auf folgende Ursachen zurück: Substitutionen von Aminosäuren in Resistenz-relevanten Enzymen können durch nsSNPs hervorgerufen werden, wodurch die Enzymaktivität entscheidend beeinflusst wird. Solche Substitutionen sind im Fall von Hydroxymethylsäureamiden I131V, A158V und H298D in 4-Coumarat:Coenzym A Ligase (4-CL) und P94L, P149L und A262S in der Tyrosin-Decarboxylase (TyDC), welche in anfälligen Sorten die Proteinfunktion und -stabilität beeinflussen (Capriotti et al., 2005). Die Substitution von Alanin zu Valin in 4-CL geht mit energetischen Effekten der Tertiär-Interaktion einher und beeinflusst die helikale Struktur des Proteins (Gregoret & Sauer, 1998). Ähnliche Substitutionen und Unterschiede wurden auch in der Tyrosin-Decarboxylase (TyDC) gefunden (Ashkenazy et al., 2010). Weiterhin findet man in allen Unterschieden und Polymorphismen in Promotor-Regionen ebenso Ursachen für einen unterschiedlichen Gehalt an besagten Metaboliten, wodurch die Expression unterschiedlich ausfallen kann (Yogendra et al., 2014).

1.1.3 Pathogenabwehr in Pflanzen

Die induzierte Resistenz gegen Pathogene wird seit jeher in vielen Pflanzen-Arten untersucht (Clarke et al., 1982), ebenso wie die entsprechende Anwendung zum Schutz von Nutzpflanzen (Ku'c et al., 2001). Als Reaktion auf Pathogenbefall werden sekundäre Metaboliten gebildet, pathogen-bezogene Gene und Proteine werden exprimiert und reaktiver Sauerstoff wird gebildet (Sticher et al., 1997; Hutcherson et al., 1998). Im Bezug zur Insektenresistenz stellte sich heraus, dass Jasmonsäure (Thaler et al., 2001) und Caffeoylputrescin (Tebayashi et al. 2007) eine entscheidende Rolle spielen. Ein weiterer Aspekt der induzierten Pathogenabwehr besteht neben der lokalen Antwort (im befallenen Gewebe) auch in der systemischen Antwort, welche nicht befallene Bereiche der Pflanze einbezieht. Dabei werden bspw. Alkaloide, wie Nikotin in Tabakwurzeln, gebildet, welche in die betroffenen Bereiche transportiert werden (Dawson & Solt, 1959). Systemische Veränderungen sind von Bedeutung für die pflanzengerichtete Interaktion mit Herbivoren. Dabei wurde gezeigt, dass die Umstrukturierung in Wurzeln nach Blattbefall einen starken Einfluss auf Wurzel-Herbivoren wie Insektenfresser (Soler et al., 2007), Nematoden (Kaplan et al., 2008) und Mikroorganismen (Yang et al., 2011) hat. Umgekehrt beeinflussen Wurzel-Herbivoren die oberirdische Resistenz gegen Insekten (van Dam et al., 2005) und Pathogene (Erb et al., 2009) gleichermaßen.

Während der Pflanzen-Pathogen-Interaktion in der Kartoffel wird die Zellwand mit Lignin verstärkt und die Akkumulation von Phytoalexinen wird eingeleitet. Zellwandgebundene Phenole wie Hydroxyzimtsäureamide sollen dabei die Penetration des Pathogens eindämmen. Phenolische Komponenten der Kartoffel, welche im Zusammenhang mit erhöhter Resistenz gegen *P. infestans* stehen, umfassen dabei Chlorogensäure, Kaffeesäure, Scopoletin, Scopolin als auch *p*-Coumaroyloctopamin. Isoprenoide analog dazu umfassen Rishtitin, Phytuberin und Lubimin (Henriquez et al., 2012).

1.1.3.1 PAMP-assoziierte Immunität (PTI)

Durch die Erkennung von *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) aktivieren Pflanzen ihren Abwehrmechanismus, welcher ausreicht, um weiteren Befall einzuschränken. PAMP-assoziierte Immunität ist sehr effektiv gegen Infektionen, wobei viele Pflanzen gegen einen Großteil an Pathogenen immun sind (Jones & Dangl, 2006). PAMPs sind dabei konservierte, pathogen-basierte Strukturen, welche es dem Erreger ermöglichen zu überleben bzw. die gewohnte Lebensart fortzuführen, womit deren Verlust ein erheblicher Nachteil wäre (Gomez-Gomez & Boller, 2002). Pflanzen erkennen PAMPs wie Flagellin, Liposaccharide, Peptidolycane oder auch den Elongationsfaktor EF-Tu über entsprechende PAMP-Rezeptoren (PRR; Boller, 2005). Zu den Abwehrmechanismen, welche bei Identifikation von PAMPs eintreten, gehören die Bildung von reaktivem Sauerstoff, die Aktivierung von *mitogen-activated*

protein kinase Kaskaden (MAPK) und die Induktion der Abwehr-Gen-Expression. Das *Phytophthora*-PAMP Pep-13 ist eine hoch konservierte Struktur der *Phytophthora*-Transglutaminase (Brunner et al., 2002) und induziert in Kartoffeln die Bildung von H₂O₂, die Akkumulation von Salicylsäure und Jasmonsäure, die Expression von Abwehr-Genen und HR-ähnlichen Zelltod (Halim et al., 2012).

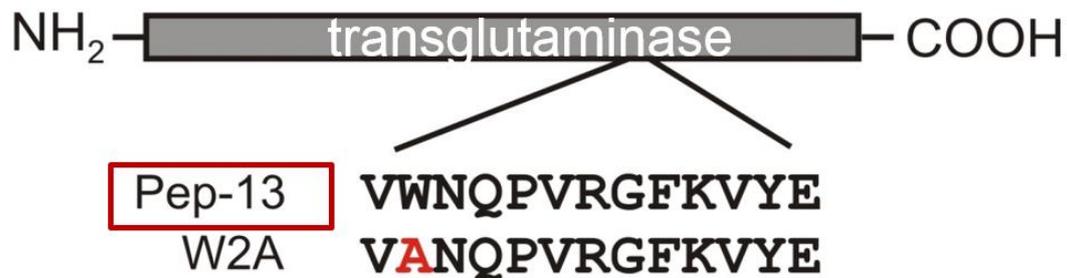


Abbildung 1-2 Sequenzielle Unterschiede zwischen Pep-13 und W2A Pep-13 ist Teil der hoch konservierten *Phytophthora*-Transglutaminase und eignet sich dadurch, um die Pathogen-induzierte Abwehr in Pflanzen zu aktivieren, welche über den benötigten PAMP-Rezeptor verfügen. W2A kann durch eine Punktmutation als Kontrolle genutzt werden, ohne, dass die Abwehrmechanismen aktiviert werden.

1.1.3.2 Effektor-assoziierte Anfälligkeit (ETS) und Immunität (ETI)

Pathogene entwickelten im Verlauf der Zeit jedoch Effektoren, welche die basale Resistenz unterdrücken können, wodurch es zum erfolgreichen Befall der Pflanze kommt (*effector triggered susceptibility* – ETS). Pflanzen-Resistenz-Gene entwickelten sich dem gegenüber ebenfalls weiter und deren gebildete Proteine waren im Stande spezifische Effektoren von verschiedenen Erregerstämmen zu erkennen (NB-LRR Proteine), wodurch die Resistenz-Aktivierung wieder eingeleitet werden konnte. Als Folge werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, welche das Pathogen an weiterer Proliferation hindern sollen. Hydroxyl-Radikale und H₂O₂ sorgen für Lipidperoxidation und Enzym-Inaktivierung, während die Induzierung von Proton-Ionenkanälen und MAP-Kinasen die Aktivierung der Abwehr-assoziierten Genexpression zur Folge hat. Es werden Sekundärmetaboliten wie Hydroxyzimtsäureamide gebildet aber auch pflanzliche Hormone wie Salicylsäure und Ethylen (Jones & Dangl, 2006).

1.2 Hydroxyzimtsäureamide

Hydroxyzimtsäureamide sind weit verbreitete sekundäre Pflanzenmetaboliten, welche von höheren Pflanzen in E- π -diastereoisomerischer Form gewonnen werden (Georgiev et al., 2012). Hydroxyzimtsäure wird dabei mit aliphatischen Di- oder Polyaminen (Meurer et al., 1986; Werner et al., 1995), aromatischen Aminosäuren (Adam et al., 1995; Correia et al., 1995) oder biogenen Aminen verbunden. Verbindungen aus biogenen Aminen, wie Putrescin, Tyramin oder auch Noradrenalin, spielen dabei eine signifikante Rolle im Pflanzenwachstum und der

Entwicklung. Die Akkumulation dieser phenolischen Verbindungen wird ausgelöst als Resonanz auf diverse Umwelteinflüsse. Dazu zählen unter anderem physische Verletzungen (Negrel et al., 1993), Schwermetallbelastung (Fink et al., 1990) als auch Pathogenbefall (Peipp et al., 1997). Über peroxidatives *crosslinking* können sie bei Pathogenbefall mit der Zellwand verbunden werden (Facchini et al., 2002). Neben Einschränkung der Zellwandverdaulichkeit setzen sie dabei durch ihre potenzielle Zytotoxizität fungales Wachstum außer Kraft (Yamamoto et al., 1991, Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Grandmaison et al., 1993; Park & Schoene, 2002). Hydroxyzimtsäureamide sind mit ihrem niedrigem Molekulargewicht und den stickstoffhaltigen Komponenten eine hoch diverse Stoffgruppe in höheren Pflanzen. Das konkrete Ausmaß der Verbreitung lässt sich daran erkennen, dass diese Verbindungen den phenolischen Hauptbestandteil reproduktiver Organe und Samen von mindestens 20 Arten und 13 verschiedenen Pflanzenfamilien darstellen (Martin-Tanguy et al., 1978).

Generell können Amine, welche eine Bindung mit Hydroxyzimtsäure eingehen, in zwei Fraktionen aufgeteilt werden. Auf der einen Seite befinden sich basischen Amine, welche wasserlöslich sind und mit einer primären Aminofunktion ausgestattet sind, zu denen sich aliphatische Di- und Polyamine wie Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin einreihen. Auf der anderen Seite befinden sich neutrale, wasserunlösliche Amine ohne ionisierbare Funktion, mit aromatischen Aminen wie Tyramin, Octopamin und Tryptamin. Durch diese Vorlage resultiert eine hohe Diversität an Amid-Konjugationen, welche am Beispiel von Getreidesorten in Tabelle 1-1 verdeutlicht werden kann (Facchini et al., 2002):

Tabelle 1-1 Getreidesorten und deren hauptsächlich akkumulierten Hydroxyzimtsäureamide

Sorte	Akkumulierte HCAA	Referenz
Mais	4-Coumaroyltryptamin Feruloyltryptamin	Ehmann, 1974
Hafer	> 40 substituierte Avenanthramide	Collins, 1989
Gerste	Konjugate aus Polyamin-Agmatin Dimere aus Hordatins A und B	Stoessl & Unwin, 1969 Smith & Best, 1978
Weizen	Amide aus 2-Hydroxyputrescin	Samborski & Rohringer, 1970

1.2.1 Biologische Bedeutung

Hydroxyzimtsäureamide sind eine weit verbreitete Stoffgruppe und kommen neben Pflanzen auch in Früchten, Gemüse und sogar Bienenharz vor (Wie et al., 2012). Die ersten wachs-

tumsinhibierenden Funktionszuordnungen – jedoch ohne ein konkretes Modell zur physiologischen Funktion von Hydroxyzimtsäureamiden, wurden im Zusammenhang mit *Solanum melongena* festgestellt (Yoshihara et al., 1978). Es folgten Erkenntnisse über antivirale Eigenschaften von 4-Coumaroylputrescin (Martin-Tanguy et al., 1978), antifungale Eigenschaften von Hordatin A und B (Stoessl & Unwin, 1969) und Zusammenhänge mit der Blütenformation (Sun et al., 1991). Die bedeutsamste Funktion jedoch steht in Korrelation mit Pathogenbefall und Verwundung. Am Beispiel der Kartoffel werden dabei Feruloyltyramin und Feruloyloctopamin kovalent mit der Zellwand verbunden, um den Abbauvorgang durch hydrolytische Enzyme herabzusetzen (Negrel et al., 1996). Feruloyltyramin und dessen Derivate wie Feruloyl-3'-methoxytyramin sind dabei hauptsächlich an der Zellwandverdickung gegen Pathogenbefall beteiligt (McLusky et al., 1999). Daneben existieren für weitere Vertreter der Stoffgruppe der Hydroxyzimtsäureamide zahlreiche Eigenschaften: Sie besitzen antioxidative, HIV-1-Integrase hemmende, antimikrobielle, thrombozytenaggregationshemmende und gegen Tuberkulose wirkende Effekte (Lee et al., 2003, 2004; Tebayashi et al., 2000; Charvat et al., 2006, Narasimhan et al., 2005; Lai et al., 2002, Yoya et al., 2009; Kang et al., 2009). Weitere Anwendungsgebiete beinhalten die Eindämmung von CO (Yokozawa et al., 2001), Melanogenesehemmung (Roh et al., 2004), antimycobakterielle Eigenschaften (Mata et al., 2004) oder auch die Cyclooxygenase-Inhibierung (Park, 2007). Hydroxyzimtsäureamide teilen dabei strukturelle Gemeinsamkeiten mit Polyamin-Toxinen von wirbellosen Organismen (Spasova et al., 2006) und Vertreter aus der Klasse von 3,4-Dihydroxyzimtsäure-Amid und 4-Dihydroxyzimtsäureamid sind antiatherosklerotisch, indem sie zelluläre Cholesterol-Ablagerungen verhindern (Lee et al., 2004). Menschen können dabei von den antioxidativen Eigenschaften profitieren, denn in diesem Zusammenhang wurden bereits Tumor-bekämpfende (Narasimhan et al., 2004), antifungale und hypocholesterolemische Effekte (Cho et al., 2004) nachgewiesen. In natürlichen, nicht verwundeten Pflanzengewebe kommt diese Stoffgruppe jedoch nur in geringen Mengen vor, weshalb sie ein potenzielles Ziel beim *Metabolic Engineering* sind (Kang et al., 2004).

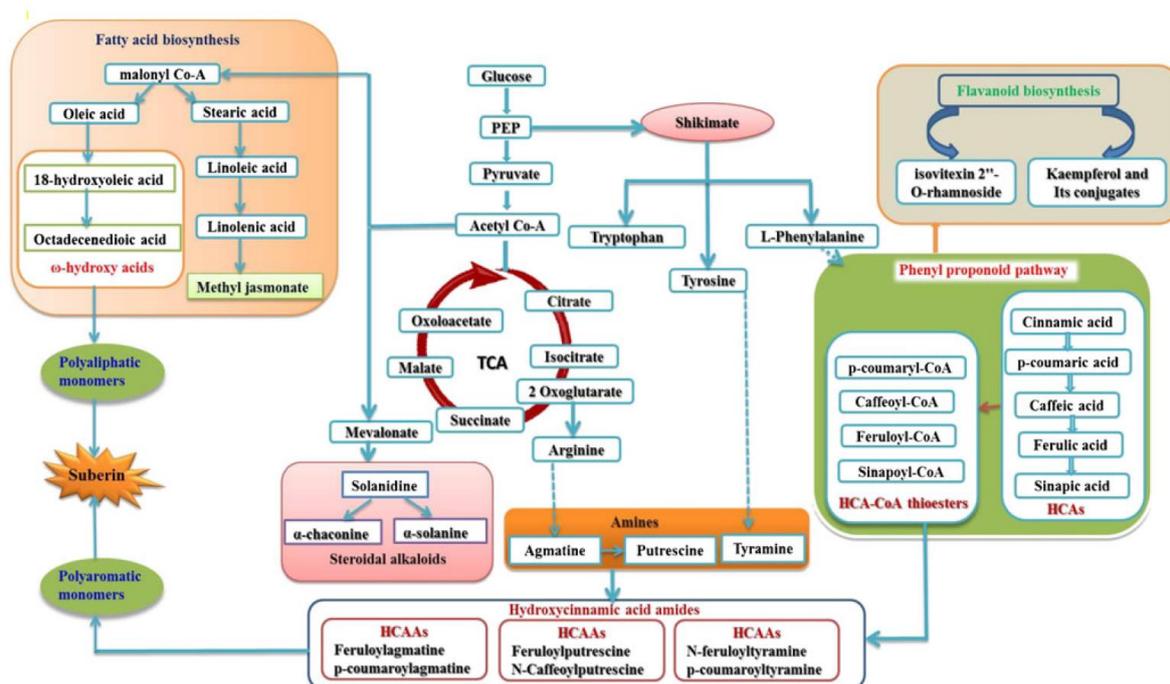


Abbildung 1-3 Einordnung der Hydroxyzimtsäureamide in den pflanzlichen Stoffwechsel nach Yogendra et al. (2014) Ausgelöst wird die Synthese der HCAA durch Verwundung oder Pathogenbefall. Über einen Peroxidasegerichteten Prozess können sie in die Zellwand integriert werden, wobei mono- oder auch dikovalente Verbindungen zwischen Tyramin mit der Zellwand-Phenol-Matrix entstehen. Trotz geringfügiger cytotoxischer Eigenschaften (Yamamoto et al., 1991) wird die Hauptfunktion der HCAA dabei in der Zellwandverdickung vermutet. **HCAA**, hydroxy cinnamic acid amides; **TCA** tricarboxylic acid cycle

1.2.1.1 Antioxidative Wirkung

Die antioxidative Wirkung der HCAA ist dabei auf den phenolischen Kern und die erweiterte Seitenkettenkonjugation zurückzuführen, welche ein resonanzstabilisiertes Phenoxy-Radikal ausbilden können. Georgiev et al. (2012) zeigten dabei mithilfe eines DPPH-Assays, dass Caffeoyldopamin und Caffeoylphenylethylamin am effektivsten als freie Radikalfänger agieren (ca. 92 % RSA nach 10 Minuten). Kaffeesäure-Derivate verdanken ihre Eigenschaften hierbei der ortho-dihydroxyl-Funktionalität im Catecholring: Die Anwesenheit einer Elektronen-Donor-Hydroxyl-Gruppe in *ortho*-Position vereinfacht den Transfer von H-Atomen zu Peroxyl-Radikalen (Lucarini et al., 2002), wodurch ein Phenoxy-Radikal gebildet werden kann. Sollte dabei eine Hydroxyl-Gruppe jedoch methoxyliert werden, wird es unmöglich Chinon-Oxidations-Produkte zu bilden, womit diese Stoffe ineffizient im Radikal-Quenching werden. In Biosystemen hängt die antioxidative Fähigkeit neben den Hydroxylgruppen außerdem auch von der Löslichkeit und der Hydrophobizität ab (Rice-Evans et al., 1996). Die Fähigkeiten als Radikalfänger werden somit mithilfe von Catechol oder Benzen als funktionelle Gruppe gesteigert, wobei

Methoxygruppen die Aktivität mindern können (bei Estergruppen um das 2-fache). Damit besitzen Hydroxyzimtsäureamide mit aromatischen Aminen einen zweifach höheren antioxidativen Stabilisierungsfaktor (Georgiev et al 2013).

1.2.1.2 Antimikrobielle Wirkung

Antifungale Eigenschaften von Hydroxyzimtsäureamiden werden in der Literatur für Dihydro-*N*-Caffeoyltyramin, *E*-Caffeoyltyramin und *Z*-Caffeoyltyramin aus *Lycium chinese* (Lee et al., 2010) als auch für diverse *N*-cinnamoyl- α -Aminosäure-ester und -amide (Narasimhan et al., 2004; Yingyongnaronkul et al., 2006; Zhu et al., 2000) beschrieben. Georgiev et al. (2012) demonstrierten zudem eine Wachstumsinhibierung von *Staphylococcus aureus* durch Feruloyltyramin, Feruloyldopamin und Sinapoyltyramin (MIC bei 62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Identische Ergebnisse wurden für *Streptococcus pyogenes* mit Synapoyltryptamin, Sinapoyltyramin und Caffeoyltryptamin generiert (MIC von 62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Caffeoyltyramin wies zudem antifungale Eigenschaften für *Candida albicans* bei einer Konzentration von 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ auf. Zur Inhibierung von fungalen Enzymen, wie Tyrosinase, ist ein *para*-hydroxylierter Phenolring bei Hydroxyzimtsäureamiden von Bedeutung, wobei weitere Hydroxygruppen oder zwei Methoxygruppen in *ortho*-Ausrichtung diese Aktivität erniedrigen (Georgiev et al 2013).

1.2.2 Synthese

Hydroxyzimtsäureamide werden vermutlich im Cytosol gebildet (Farmer et al., 1999), welche während eines Pathogenbefalls zur Zellwand transportiert werden und dort einer peroxidativen Polymerisation unterliegen (Jang et al., 2004). Durch die Inkorporation in die Zellwand werden Pathogene eingeschränkt, indem die Zellwandverdaulichkeit herabgesetzt wird und Pilzhyphen in ihrem Wachstum inhibiert werden (Negrel et al., 1993; Grandamaison et al., 1993). Die Synthese der HCAA wird dabei induziert durch Verwundung (Negrel et al., 1993), Elicitoren (Schmidt et al., 1998), Pathogene (Negrel & Martin, 1984) und auch UV-C (Back et al., 2001). Das Enzym Hydroxyzimtsäure-CoA:Tyramin-*N*-(Hydroxyzimtsäure)-Transferase (THT) spielt dabei eine besonders wichtige Rolle, indem es die letzte Stufe der Synthese katalysiert. Zur Bildung von Hydroxyzimtsäureamiden bedarf es zwei Arten von Substrat: Zum einen Hydroxyzimtsäure-CoA-Thioester wie Cinnamoyl-CoA, *p*-Coumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA, Feruloyl-CoA oder auch Sinapoyl-CoA. Sie werden aus Hydroxyzimtsäure durch eine Serie von Enzymen gebildet. Beispiele dafür beinhalten Cinnamat-4-Hydroxylase, Coumarat-3-Hydroxylase, Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase, Ferulat-5-Hydroxylase als auch Hydroxycinnamat:CoA-Ligase (Douglas, 1996). Auf der anderen Seite der genutzten Substrate stehen die aromatischen Amine, wie Tyramin, Octopamin, Dopamin, Noradrenalin und Tryptamin, welche durch die Decarboxylierung aus Tyrosin und Tryptophan entstanden sind.

Die Bildung von Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester findet in Pflanzen ubiquitär als Teil des Phenylpropan-Stoffwechsels statt (Hahlbrock & Scheel, 1989) und findet ihren Ursprung in der Deaminierung von Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL). 4-CL katalysiert anschließend die Konvertierung von 4-Coumarsäure und anderen substituierten Zimtsäuren (Kaffee- und Ferulasäure) zu Hydroxycinnamoyl-CoA-Thiol-Ester, welche zur Synthese von HCAA, Flavonoiden, Lignin, Polyphenol, Coumarin und Suberin genutzt werden (Douglas 1996; Ehltling et al., 1999). Das Enzym 4-CL besitzt die AMP-Bindedomäne PYSSGTTGLPKGCV, das GEICIRGR-Muster (Stuible & Kombrink, 2001) und die konservierten VPP und PVL-Domänen (Schneider et al., 2003). Das dazugehörigen Gen ist in der Kartoffel auf Chromosom 3 bei 66,001 cM lokalisiert (Gebhardt & Valkonen, 2001; Meyer et al., 2005). Parallel dazu findet die Decarboxylierung von *L*-Tyrosin zu Tyramin durch die Tyrosin-Decarboxylase (TyDC) statt. TyDC besitzt eine konservierte, pyridoxale Phosphat-Bindungsstelle DAAYAG, wodurch dieses Enzym zur Familie der Aminosäure-Decarboxylasen zählt (Facchini & Luca, 1994). Das entsprechende Gen für TyDC ist auf Chromosom 3 von Kartoffel lokalisiert (PGSC 2013; Yogendra et al., 2014). THT katalysiert die Kondensation von Hydroxycinnamoyl-CoA-Thioester mit Aminen wie Tyramin. Ein Teil von 11 orthologen THT-Genen für Kartoffel befindet sich auf Chromosom 10 (PGSC 2013, Schmidt et al., 1999) und gehört zur Klasse der Acetyltransferasen. Diese beinhalten eine konservierte Acetyl-CoA-Bindestelle, RKLGMGS, welche für die katalytische Aktivität verantwortlich ist (Schmidt et al., 1999). Für die Aktivität sind weiterhin Diethylcarbonat-empfindliche und *N*-ethylmaleimid-sensible Reste notwendig (Farmer et al., 1999). Als Transferase folgt THT einem bi-bi-Mechanismus, wobei ein Ternärkomplex nach erfolgreicher, sequentieller Anbindung beider Substrate gebildet wird. Sollten Substrate verwendet werden, welche nicht unter die Substratspezifität von THT fallen, wird die Kondensation folglich durch andere Transferasen übernommen (Polyamin-basierte Substrate – PCT, Hydroxyanthranilat – HHT; Facchini et al., 2002).

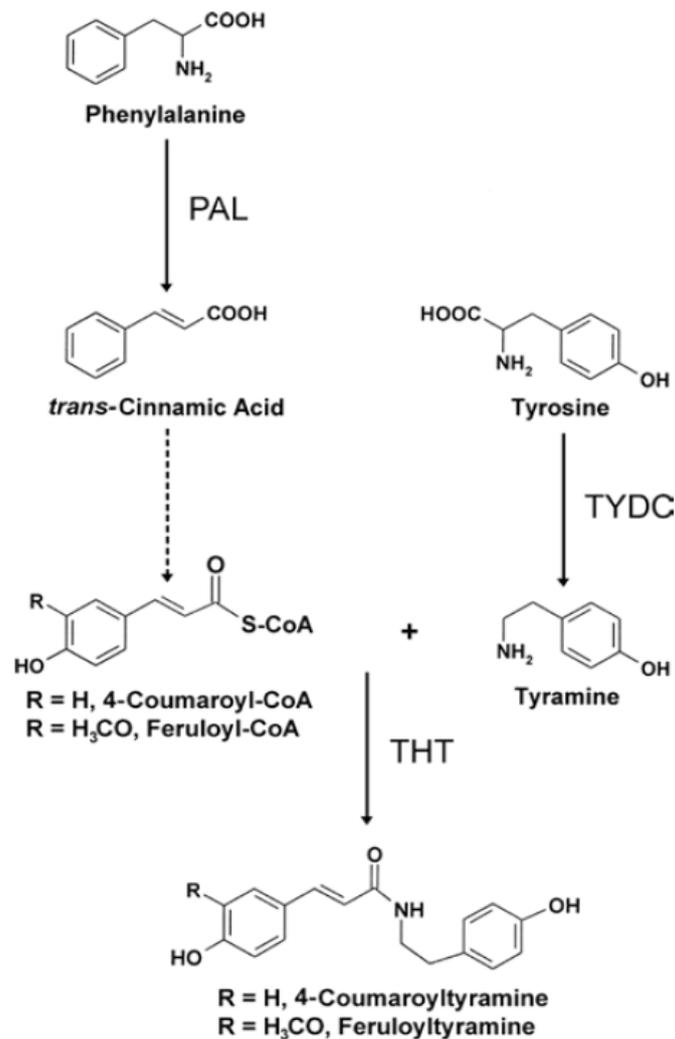


Abbildung 1-4 Synthese von Hydroxyzimtsäureaminden nach Hagel & Facchini (2005) Phenylalanin wird durch PAL zu *trans*-Zimtsäure deasminiert, welche durch 4-CL oder andere Enzyme konvertiert wird. Parallel dazu wird Tyrosin durch die TyDC decarboxiiert. Das gebildete Tyramin kondensiert unter Einwirkung von THT mit Hydroxyzimtsäure-CoA-Thioester zu einem Hydroxyzimtsäureamid. **PAL**, Phenylalanin-Ammonium-Lyase; **4-CL**, 4-Coumarat:CoenzymA-Ligase; **TyDC**, Tyrosin-Decarboxylase; **THT**, Hydroxyzimtsäure-CoA:Tyramin-*N*-(Hydroxyzimtsäure)-Transferase

1.2.3 Eigenschaften und Diversität der THT

THT wurde erstmals aus mit Tabak-Mosaik-Virus behandelten Tabakblättern isoliert (Negrel & Martin, 1984) und ist in Mais (Ishihara et al., 2000), Weizen und Gerste (Louis & Negrel, 1991) und in Zellkulturen von *Nicotiana glutinosa* und *Eschscholzia californica* (Villegas & Brodelius, 1990) nachgewiesen. Aus behandelten Zelllinien von Kartoffel (Hohlfeld et al., 1995), Tabak (Fleurence & Negrel, 1987) und Blaumohn (Yu & Facchini, 1992) wurde THT bereits isoliert und gereinigt, wohingegen cDNA-Klone aus Kartoffel (Schmidt et al. 1999), Tabak (Farmer et al., 1999) und Paprika (Back et al. 2001) existieren. Die Kondensationsreaktion der Hydroxyzimtsäureamide erfolgt dabei vermutlich im Cytosol, belegt durch fehlende Target-Signale und der Löslichkeit von THT und TyDC (Farmer et al., 1999). Zur Vernetzung mit der Zellwand bedarf es einer Peroxidase-Aktivität (Negrel et al., 1996).

THT besitzt ein aus zwei identischen Untereinheiten bestehendes Molekulargewicht von 40 kDA in Mais und 50 kDA in Tabak, Kartoffel, Paprika und Blaumohn. Im Vergleich auf Nukleotidebene besitzen die THT-Sequenzen von Kartoffel, Tabak und Paprika die höchsten Homologien. Tabak- und Kartoffel-THT können zudem durch Ca^{2+} stimuliert werden. Dieser Umstand ist den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Zellkulturen geschuldet, wobei eine Calcium-bindende Untereinheit mit der katalytischen Untereinheit der THT verbunden wird (Negrel & Javelle, 1997). Die inhibierenden Effekte von Ethanol auf THT sind auf Caffeoyl-CoA:3-OMethyltransferase (CCoAMT) zurückzuführen, welche konformationsändernd durch die Interaktion mit hydrophoben Resten wirkt. Ein ähnlicher Effekt ist unter hohen Salzkonzentrationen ebenfalls zu beobachten (Negrel & Javelle, 1997). THT aus Tabak präferiert dabei Hydroxyphenylethylamine, wobei die Affinität gegenüber Cinnamoyl-CoA-Derivaten Abweichungen aufweist. (Facchini et al., 2002). Die vielseitige Substratspezifität lässt sich jedoch nicht auf alle isolierten THT übertragen: THT aus Tabak und Schlafmohn können Caffeoyl-CoA nicht verwenden (Negrel & Martin, 1984; Yu & Facchini, 1999) und Mais-THT findet für Cinnamoyl-CoA keine Verwendung. Lediglich für Feruloyl-CoA besitzen alle Enzyme eine hohe Affinität. Auf der Seite der biogenen Amine besitzt THT gegenüber Tyramin die höchste Affinität (außer bei Mais), gefolgt von Octopamin. THT aus Kartoffel kann dazu sogar Noradrenalin binden (Schmidt et al., 1999). Hydroxizimtsäureamide aus Serotonin sind noch weitestgehend unbekannt. Solche Verbindungen besitzen jedoch nachweislich antioxidative Eigenschaften (Zhang et al., 1996) und inhibieren Reperfusionsschäden (Hotta et al., 2002) und wurden bisher nur in bestimmten Pflanzensamen oder kranken Bambuszweigen entdeckt (Pavlik et al., 2002; Tanaka et al., 2003). THT aus Paprika besitzt dabei eine höhere Affinität für Serotonin als für Tyramin. Die K_m -Werte für Serotonin liegen dabei 16-fach niedriger mit Feruloyl-CoA als Acyl-Donor. Diese Derivate werden in der Paprika dabei nur in verwundeten Fruchtgewebe gebildet.

CT und FT werden aufgrund von Verwundung in Blattsegmenten in Mais ebenfalls gebildet. Die Untersuchung von THT aus Mais zeigte, dass dessen beste Substrate Tyramin und Feruloyl-CoA sind, wobei Tryptamin und Sinapoyl-CoA ebenso effizient genutzt werden können (THT und TrHT-Aktivität). Das Molekulargewicht der Mais-THT beträgt dabei 40 kDA und ist bei einem pH-Wert von 5,5 bis 10 aktiv - mit einem Optimum bei pH 8,5 (Steigerung um das 40-fache mit $270 \text{ pkat mg}^{-1} \text{ Protein}$). THT wurde dabei in allen Maislinien festgestellt und kann ab $100 \mu\text{M}$ durch Tyramin gehemmt werden (Ishihara et al., 2000).

In Reis war bisher nur ein THT-ähnliches N-Acetyltransferase-Gen mit 227 AS und 32 % Ähnlichkeit zu Paprika-THT bekannt, welches nach heterologer Expression in *E. Coli* keine THT-Aktivität mehr aufwies (Hagel et al., 2005). Transgene Reis-Pflanzen mit einer erhöhten THT-Genexpression produzierten jedoch bereits nach 19 Wochen mehr CT und FT als vergleichbare Wildtyp-Pflanzen. Tyramin stellte als Substrat dabei ein Nadelöhr in der Synthese dar.

TyDC ist dabei ebenso als limitierender Faktor in der Biosynthese von Tyramin-basierten Sekundärmetaboliten an verwundeten Stellen zu betrachten, weil die Verfügbarkeit von Tyramin eng verbunden ist mit den Transkriptmengen und der Enzymaktivität von TyDC (Facchini & De Luca, 1994, Schmidt et al., 1999). Der Phänotyp aller transgenen Linien blieb unverändert. Die Aktivierung von THT kann dabei durch die exogene Beigabe von Tyramin als Substrat ausgelöst werden. TyDC, PAL und THT sind dabei im Cytosol lokalisiert worden, während 4-CL innerhalb der Membran des ER und in der Zellwand vorkommt (Lee et al., 2007).

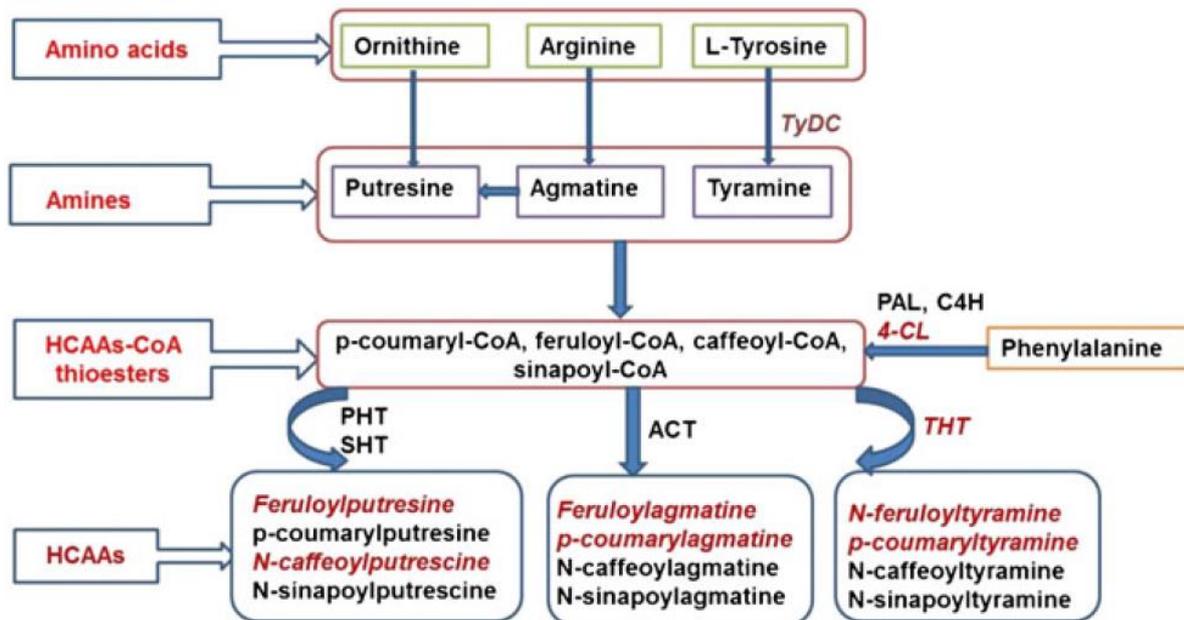


Abbildung 1-5 Produktbildungskaskade von Hydroxyzimtsäureamiden und deren alternierende Ergebnisse nach Yogendra et al (2014) Je nach Substrat- und Enzymvorlage kann eine Vielfalt an HCAA zur Pathogenabwehr gebildet werden. **HCAAs**, hydroxycinnamic acid amides; **PAL**, phenylalanine ammonia lyase; **C4H**, cinnamate 4-hydroxylase; **4-CL**, 4-coumarate: CoA ligase; **ACT**, agmatine coumaroyl transferase; **TyDC**, tyrosinedecarboxylase; **THT**, tyramine hydroxycinnamoyl transferase; **SHT**, spermidine hydroxycinnamoyl transferase; **PHT**, putrescine-hydroxycinnamoyl transferase

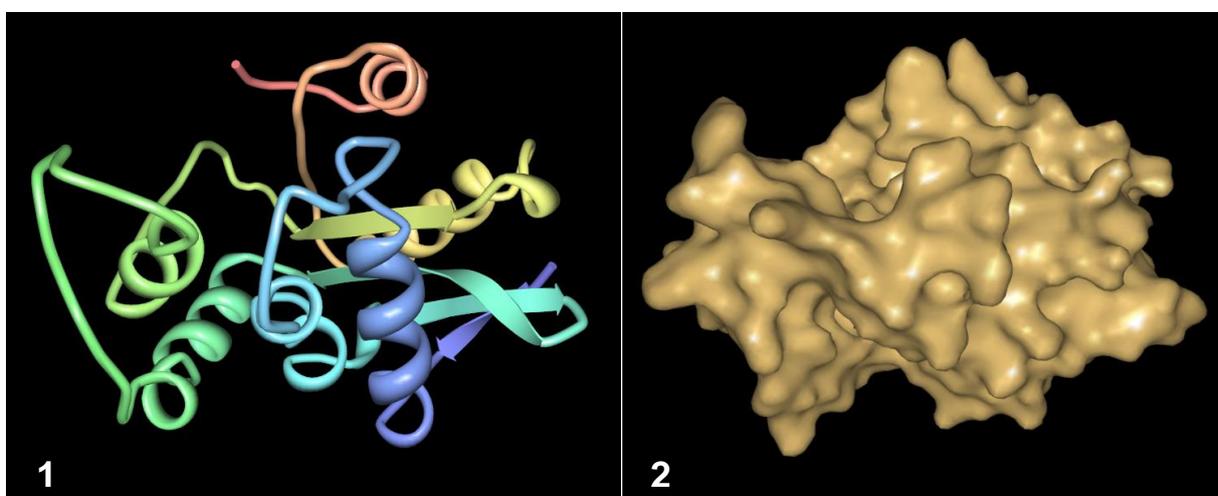


Abbildung 1-6 Darstellung von THT Durch die Verwendung der THT-Sequenz konnte die Sekundärstruktur (1) als auch die Oberfläche (2) *in silico* modelliert werden.

1.3 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Kartoffelpflanzen mit herunterregulierter Genexpression von THT. Die durch RNA-Interferenz hervorgerufene Erniedrigung im Gehalt an THT, sollte auch eine Erniedrigung in der Konzentration der HCAA zur Folge haben. Dabei war es zunächst von Bedeutung den RNAi-Effekt mit seiner korrekten Insertion nachzuweisen. Darauf aufbauende Untersuchungen sollten sich mit der Akkumulation von HCAA befassen und welchen Einfluss dies auf das Wachstum von Pathogenen hat. Diese Arbeit stellt damit die erste Dokumentation eines solchen Versuches dar. THT wurde in ähnlichen Versuchen (Campos et al., 2014) in anderen Systemen überexprimiert und führte zu einer verbesserten Resistenz. Im Umkehrschluss wird durch die Herabsetzung der THT eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen vermutet. Der Phänotyp transformierter Pflanzen blieb bei erhöhten Mengen an THT und HCAA unverändert blieb (Lee et al., 2007; Campos et al., 2014). Ob dies bei einer niedrigeren Menge von THT und HCAA ebenso der Fall ist, muss untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und Geräte

Folgende Chemikalien, Geräte und Verbrauchsgegenstände wurden während dieser Arbeit genutzt.

Tabelle 2-1 Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Gelelektrophoresekammer	
Luna Automated Cell Counter	Biozym
Mehrzweckzentrifuge 5418	Eppendorf AG
Mehrzweckzentrifuge 5804	Eppendorf AG
Mehrzweckzentrifuge 5810	Eppendorf AG
Nanodrop 8000	Thermo Fisher Scientific
Precellys 24 Homogenisator	PEQLAB Biotechnologie GmbH
TKA GenPure Reinstwasseranlage	Thermo Fisher Scientific
Transilluminator GeneGenius mit entsprechender Computersoftware (Genesnap)	Syngene
Typhoon FLA 9500	GE Healthcare Life Sciences

Tabelle 2-2 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsartikel

Verbrauchsartikel	Hersteller	Artikelnummer
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG	AE73.1
Agarose	Biozym	840004
<i>Amersham Megaprime DNA Labeling System</i>	GE Healthcare Life Sciences	RPN1604
Bacto-Agar	BD Biosciences	214050
Bacto-Trypton	BD Biosciences	211705
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG	8043.2
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	3738.2
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG	2218.4
EtOH (70%)	Carl Roth GmbH + Co. KG	7301.1
Filterpapier	VWR	CA48602-142
<i>GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit</i>	Sigma Aldrich	G2N350-1KT
Hefeextrakt	Duchefa	8013-01-3
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG	T874.2
Murashige-Skoog-Medium	Duchefa	M0409.0250
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG	5741.2
NaOH	Carl Roth GmbH + Co. KG	9356.1
Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG	6773.2
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Diagnostics GmbH	11417240001
PCI-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG	A156.1
Phosphor Screens und Lagerkassetten	GE Healthcare Life Sciences	63-0034-79
Plant-Agar	Duchefa	900-18-0
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen N.V.	28704
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG	4621.2
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG	0183.2
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	3580.3
Tris-HCL	Carl Roth GmbH + Co. KG	9090..3

2.1.2 Verwendete Lösungen

Tabelle 2-3 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Medium	Chemikalie	Endkonzentration
10x MEN/MOPS-Puffer, pH 7,0	MOPS	200 mM
	Natriumacetat	50 mM
	EDTA	10 mM
20 x SSC	NaCL	3,0 M
	Tri-Natriumcitrat Dihydrat	0,3 M
50x TAE für 1 L	EDTA, pH 8,0	0,5 M
	Tris-HCL	242 g
	Essigsäure	51,1 mL
2MS-Medium (pH 5,8) für 1 L	Saccharose	20 g
	Murashige-Skoog-Medium	4,41 g
	Plant-Agar	6,0 g
Alkalische SDS-Lösung	NaOH	0,2 N
	SDS	1 %
Denaturierungslösung für Southern Blot	NaCL	1,5 M
	NaOH	0,5 M
Extraktionspuffer zur Isolierung genomischer Pflanzen-DNA	Tris-HCL, pH 8,0	100 mM
	EDTA	50 mM
	NaCl	500 mM
	SDS	1,5 %
Kalium-Acetat-Lösung für 100 mL	Kaliumacetat	3 M
	Essigsäure	11,5 mL
LB-Medium/Agar für 1 L	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Bacto-Agar	15 g
Lysispuffer	Tris-HCL, pH 8,0	50 mM
	EDTA	50 mM
Neutralisierungslösung für Southern Blot, pH 7,0	Saccharose	15 %
	Tris-HCL	0,5 M

2.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 2-4 Verwendete Primer und deren Verwendungszweck

Art	Name	Aufbau	Ausrichtung	Zweck
Sonde	#162	TCCTGGCC	5' – 3'	Sonde EF1α
Primer	EF1_F	ACTGCCCAGGTCATCATCA	5' – 3'	EF1α Forward
Primer	EF1_R	GCACTGGAGCATATCCGTTT	3' – 5'	EF1α Reverse
Sonde	#73	GCTGAGGA	5' – 3'	NOX-Sonde
Primer	StNOX_F	TCAATGCATAGGTATGAAG- GAATC	5' – 3'	NOX-Forward
Primer	StNOX_R	TCTCTTCCTAGCTAGAGCAT- CAAAT	3' – 5'	NOX-Reverse
Sonde	#4	CGTACGGCCAATGTA	5' – 3'	<i>P. infestans</i> - Sonde
Primer	P.i._F	CAATTCGCCACCTTCTTCGA	5' – 3'	<i>P. infestans</i> For- ward
Primer	P.i._R	GCCTTCCTGCCCTCAAGAAC	3' – 5'	<i>P. infestans</i> Re- verse
Sonde	#144	CCTCTTCC	5' – 3'	THT – Sonde
Primer	StTHT_F	CCTCCTTAGAGGGCTTGCTT	5' – 3'	THT - Forward
Primer	StTHT_R	AGTACGGATGGCCCGTAGA	3' – 5'	THT - Reverse
Primer	StTHT-5	CACCATGGCTCCTGCTCCT- CAACA	5' – 3'	Primer Forward Klonierung
Primer	StTHT- 3OS	ACATGTCTCTTCCTCAATTT- TCC	3' – 5'	Primer Reverse Klonierung

2.2 Anzucht von *Solanum tuberosum* cv *Désirée*

Alle Kartoffelpflanzen wurden als sterile Meristemkultur gehalten. Von sämtlichen Linien wurden dabei jeden Monat 4 Sprossspitzen durch ein Skalpell abgetrennt und umgesetzt. In lichtdurchlässigen Plastiktöpfen wurden die Sprösslinge dabei durch 2MS-Medium versorgt, welches mit 250 µg µL⁻¹ Carbenicillin angereichert war. Somit konnte das Wachstum von *A. tumefaciens* und weiteren Pathogenen unterdrückt werden. Nach Erstellung neuer Passagen der verschiedenen Linien wurden die alten Pflanzen in ein gedämpftes Gemisch aus Erde und Sand ausgetopft. Nach zwei bis drei Wochen waren diese Pflanzen kräftig genug für Pathogen-relevante Untersuchungen. Die Phytokammern beider Kartoffelkulturen folgten dabei einem Tagesrhythmus von 16 h Licht bei 20 °C und einem Nachtzyklus von 8 h Dunkelheit bei 18 °C. Die tägliche Beleuchtungsmenge beläuft sich damit auf 200 µE.

Verarbeitung wurden die Proben durch *Precellys* homogenisiert und die RNA-Isolation mit TRIzol wurde durchgeführt.

2.5 Infizierung von Kartoffelblättern

11 Tage alte Kulturen von *Phytophthora infestans* wurden mit 4 mL Wasser benetzt und inkubierten bei 4 °C für 4 h. Die Sporen aus den Sporangien lösten sich und gingen in die Lösung über. Die Sporenlösung wurde durch eine Membran abfiltriert und mithilfe des LUNA-Cell Counter auf eine Sporen-Konzentration von $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ eingestellt. Durch Nutzung einer Eppendorf Varipette konnten somit die 3 Wochen alten Kartoffelpflanzen entsprechend infiziert werden. Dabei wurden jeweils zwei Blätter jeder Linie mit fünf Tropfen versetzt (Abbildung 2-2). Das Volumen der Tropfen betrug dabei 10 μL . Um der Austrocknung der Tropfen entgegen zu wirken, wurden über die Blätter Plastikbeutel gestülpt. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurden die betroffenen Stellen mit einem Korkbohrer ausgestochen ($\varnothing = 6 \text{ mm}$) und in flüssigen Stickstoff tiefgefroren.



Abbildung 2-2 Inokulation von Kartoffelblättern mit *P. infestans*

2.6 Biomassebestimmung von *P. infestans*

Geerntete Blattstellen wurden durch *Precellys* homogenisiert. Zu allen gemörserten Proben wurden 5 μL eines verdünnten *StNOX* Plasmid-Standards hinzugegeben (1×10^{-3}). Die Isolierung der genomischen DNA geschah anschließend durch das *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep* Kit von Sigma Aldrich und die DNA wurde danach 1:10 verdünnt und für eine qPCR vorbereitet. Ein Ansatz wurde dabei für *P. infestans* verarbeitet - Sonde, Oligonukleotide und eine Plasmid-Verdünnungsreihe, und einer für *StNOX*. Der Quotient aus den Mittelwerten der Konzentrationen erlaubt dabei Aussagen über das Wachstum von *P. infestans* und die damit einhergehende Anfälligkeit der jeweiligen Pflanze.

2.7 Vorbereitung der Proben zum *Metabolite Profiling*

Drei Wochen alte, ausgepflanzte Kartoffelpflanzen wurden mit *P. infestans* für einen Tag infiziert. Sowohl die Tropfen als auch die betroffenen Blattstellen wurden geerntet und für die metabolische Untersuchung vorbereitet.

- Die Tropfen wurden in einem Vakuum-Konzentrator 3 bis 5 h bei 30 °C und 100 mbar eingengt. Das Pellet wurde in 30 %-igem Methanol in einem Ultraschallbad für 15 min resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 24000 rcf mit 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde in 2 mL Ampullen für die Massenspektrometrie überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.
- Die Blattscheiben wurden durch *Precellys* gemörsert und zu 100 mg Blattmaterial wurden 200 µL 80 %-iges, frisches und vorgekühltes Methanol gegeben. Die Proben wurden durch kräftiges Schütteln durchmischt und inkubierten bei Raumtemperatur für 40 min. Die internen Standards Biochanin A und Kinetin wurden beigefügt (20 µL für jeweils 100 mg FW) und es folgte ein Ultraschallbad für 15 min bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation bei 24000 rcf für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt. Das Pellet wurde mit derselben Menge 80 %-igem Methanol versetzt und unter identischen Bedingungen gemörsert, im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert. Die somit akkumulierte Menge an Überstand wurde in einem Vakuum-Konzentrator bei 40 °C für mindestens 2 h eingedampft. Der Rückstand wurde mit 200 µL 30 %-igem Methanol versetzt, wurde kräftig gemischt, im Ultraschallbad resuspendiert und letztlich zentrifugiert. Die Überstände der Proben wurden in 2 mL Ampullen für die Massenspektrometrie überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Die vorbereiteten Proben wurden im UPLC-ESI-QToF-MS im positiven und negativen Modus gemessen. Dadurch konnten Aussagen über die akkumulierte Menge an HCAA innerhalb der transgenen Linien getroffen werden.

2.8 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA

Blattmaterial wurde in 2 ml Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und über *Precellys* gemörsert. Es wurde 1 mL Extraktionspuffer (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) unter stetigem mischen beigegeben. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Inkubation im Wasserbad bei 65 °C. 300 µL einer 5 M Kaliumacetat-Lösung wurden beigefügt und das Material wurde erneut für 10 min im Eisbad inkubiert. Darauf folgte die Zentrifugation der Proben für 10 min bei 15000 Upm und 4 °C. Der Überstand wurde mit 800 µL PCI-Lösung versetzt, vorsichtig vermischt

und 15 – 60 min geschwenkt. Im Anschluss wurden die Proben 5 min bei 12000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 800 µL Isopropanol wurden durch Umschwenken beigemischt. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min bei 15000 Upm. Das Pellet wurde mit 500 µL 70 %-igem Ethanol gewaschen und 5 min bei 15000 Upm zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes erfolgte abschließend die Inkubation im Trockenschrank bei 37 °C und die Resuspendierung des Pellets in 15 µL Wasser.

2.9 Restriktionsspaltung genomischer DNA

Tabelle 2-5 Mastermix für 1 Probe genomischer DNA zur Restriktionsspaltung

Komponente	Menge [µL]
Einfacher Verdau	
DNA	1,5
Wasser	5,5
Restriktionsenzym-Puffer 10x	2,5
Enzym	1,0
Dem gesamten Mastermix 1 µL RnaseA beifügen	
Doppelter Verdau	
DNA	2,0
Wasser	14,5
Restriktionsenzym-Puffer 10x	2,0
Enzym 1	1,0
Enzym 2	0,5

Die Restriktionsspaltung isolierter, genomischer DNA erfolgte nach dem Schema in Tabelle 2-5. Nach mindestens zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurden 5 µL Stopp-Puffer hinzugefügt und die darauffolgende Kontrolle im Agarose-Gel wurde vorbereitet.

2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis von DNA wurde ein 1 %-iges Agarose-Gel verwendet. Zur Herstellung wurde 1 g Agarose auf 100 ml 1x TAE-Puffer angewendet. Nach Aushärtung des Gels in den dafür vorgesehenen Kammern, wurden diese mit 1x TAE befüllt, sodass Anode und Kathode in Verbindung standen. Die Geltaschen wurden mit dem Marker λ -PST I (8 µL) und den entsprechenden Proben (max. 20 µL) befüllt. Die Proben wurden im Vorfeld mit Stopp-Puffer im Verhältnis 1:5 vermischt. Die Gelelektrophorese lief daraufhin bei 80 V für mind. 1 h. Das Gel wurde im Anschluss in einem Ethidiumbromid-Bad für 15 min gefärbt. Die somit gefärbten

Banden wurden im Transilluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht und in grafischer Form abgespeichert.

2.11 Gel-Extraktion von spezifischen Banden

Mit dem Skalpell ausgeschnittene Fragmente im Agarose-Gel wurden durch das QIAquick Gel Extraction Kit isoliert: Für 1 mg Gel wurde 3 μ L Kit-spezifischer QG-Puffer hinzugefügt. Nach Inkubation für 10 min bei 50 °C wurde für 1 mg Gel 1 μ L Isopropanol beigemischt. Die beladene 2 mL Säule wurde bei 18000 rcf für 1 min zentrifugiert. Nach Beigabe von weiteren 500 μ L QG-Puffer wurde erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet ist danach mit 750 μ L PE-Puffer gewaschen und zentrifugiert worden. Die Elution der gereinigten DNA fand durch den zentrifugalen Einsatz von 30 μ L H₂O statt.

2.12 Isolierung pflanzlicher RNA durch TRIzol

Tiefgefrorenes Pflanzengewebe wurde durch die Einwirkung von Precellys homogenisiert. Zu den gemörserten Proben wurde 1 mL TRIzol-Lösung gegeben. Die Proben wurden zur vollständigen Vermischung kräftig geschüttelt und inkubierten anschließend 5 min bei Raumtemperatur. Nach 1 min auf dem Kreisschüttler wurden 200 μ L Chloroform hinzugefügt. Die Proben wurden erneut kräftig geschüttelt und inkubierten 5 min bei Raumtemperatur. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 15000 rcf für 15 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und mit 500 μ L kalten Isopropanol versetzt. Nach der Vermischung durch Umschwenken, inkubierten die Proben für 10 min bei Raumtemperatur. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4 °C und 15000 rcf. Das Pellet wurde mit 500 μ L kaltem Ethanol gewaschen und erneut 5 min unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols, wurde das Pellet bei Raumtemperatur vollständig getrocknet und in 20 μ L Wasser aufgenommen.

2.13 Formaldehyd-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines Gels für RNA-Proben wurde ein 1%-iges Agarosegel mit Formaldehyd versetzt. Formaldehyd unterbindet dabei die Rückfaltung der RNA, wodurch das Laufverhalten im Gel nicht beeinträchtigt wird. 1% Agarose wurde mit 10 x MEN-Puffer und Reinstwasser versetzt. Das Gel wurde in der Mikrowelle zum Schmelzen gebracht und nach der Abkühlung wurde Formaldehyd hinzugefügt (1,875% v/v). Die RNA-Proben wurden auf eine Konzentration von 20 bzw. 10 μ g eingestellt und im Verhältnis 1:5 mit RNA-Probenpuffer versetzt. Nach Beigabe von 0,3 μ L Ethidiumbromid wurden die Proben für 10 min bei 65 °C denaturiert und in die Geltaschen gefüllt. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1 x MEN verwendet. Die

Proben wurden dabei für mindestens 3 h bei 80 V und 100 mA aufgetrennt. Der visuelle Nachweis der Auftrennung erfolgte anschließend im Transilluminator unter Einwirkung von UV-Licht.

2.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur reinen Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Spezifische Oligonukleotide, welche den cDNA-Strang flankieren, freie Nukleotide als auch eine DNA-Polymerase werden dabei zur Vervielfältigung benötigt. Im Thermocycler werden dabei verschiedene Etappen durchlaufen: Die PCR startet bei einer Temperatur von 95 °C und denaturiert dadurch die DNA, womit diese einzelsträngig vorliegt. Durch Herabsenken der Temperatur wird ein Milieu geschaffen, welches die Hybridisierung der Oligonukleotide ermöglicht. Diese *annealing*-Temperatur lässt sich durch die vorhandenen dNTP berechnen bzw. abschätzen. Im Anschluss kommt es zu einem Temperaturanstieg auf 72 °C, bei welchem die DNA-Polymerase am effizientesten arbeitet. Die Dauer dieses Schrittes ist dabei abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments.

Nachfolgend sind der Mastermix (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) und das entsprechende PCR-Protokoll (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) für die spezifische Polymerase aufgeführt, welche zur Amplifizierung von StTHT genutzt wurde

Tabelle 2-6 Mastermix für 1 Probe bei Verwendung zwei spezifischer Polymerasen

Komponente	Menge [μ L]
H ₂ O	32,5
10 x Phusion-Puffer	10
10 mM dNTP	1
Polymerase Phusion	0,5
100 pM Primer F	2,5
100 pM Primer R	2,5
DNA	1

Tabelle 2-7 PCR-Protokoll zur Verwendung der Phusion Polymerase

Anzahl Zyklen	Temperatur [°C]	Zeitspanne [min]	PCR-Schritt
1	98	0:30	Initial Denaturierung
40	98	0:08	Denaturierung
	52	0:30	Annealing
	72	2:00	Extension
1	72	7:00	Finale Extension
1	4	∞	Hold

2.15 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zum Nachweis der Transkriptmenge wurde die quantitative Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Zur Generierung von Sonden und genspezifischen Primern wurde dazu die *Universal ProbeLibrary* von Roche verwendet. Durch die LNA-Konfiguration der Sonde ist es möglich, dass ausgebildete Methylbrücken eine stabilere Verbindung zum cDNA-Strang herstellen können. Die Sonde selbst ist weiterhin am 5'-Ende mit Fluorescein und am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzauslöcher markiert. Während der qPCR im qPCR-Thermocycler *Stratagene Mx3005P* werden der Fluoreszenzfarbstoff und der *Quencher* abgebaut und voneinander getrennt. Das Fluoreszenzsignal wird nicht weiter unterdrückt und kann detektiert werden. Der Mastermix für die Proben (Tabelle 2-8) als auch das Temperaturprofil während der qPCR (Tabelle 2-9) können den folgenden Tabellen entnommen werden:

Tabelle 2-8 Mastermix für 1 Probe zur qPCR

Komponente	Menge [µL]
Sondenmix	
Sonde	0,05
H ₂ O	0,59
Primer F	0,18
Primer R	0,18
Mastermix	
Sondenmix	1,0
H ₂ O	6,0
2 x Fermentas Mastermix + ROX	10,0
17 µL Mastermix 3 µL DNA beifügen	

Tabelle 2-9 Temperaturprofil für die qPCR

Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Zeitspanne [min]
1	50	02:00
1	95	10:00
40	95	00:15
	60	01:00

2.15.1 Absolute Quantifizierung

Zur absoluten Quantifizierung wurde eine Verdünnungskurve (10^{-6} bis 10^{-10}) mit einem für die Proben spezifischen Plasmid erstellt. Dies stellte sogleich auch einen Test zur Sondeneffizienz dar. Durch ein ΔC_t von 3,3 zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen und einer linear abfallenden Eichkurve, war eine 100%-ige Effizienz der Sonden und Primer gegeben.

Die zu untersuchenden Proben als auch die Plasmidkurve wurden in einem Ansatz untersucht. Durch Eingabe der Plasmidkonzentration in das Programm MxPro, war es dabei möglich, dass die dazugehörige Transkriptmenge der Proben berechnet wurde.

2.15.2 Relative Quantifizierung

Zur relativen Quantifizierung der Transkriptmenge wurden die Proben zusätzlich auf das konstitutiv exprimierte Gen *EF1 α* untersucht. Demzufolge wurden zwei Ansätze vorbereitet: Die Proben wurden zum einen mit Sonden und Primern abgestimmt auf EF1 α versetzt und auf der anderen Seite ebenso mit Sonden und Primern von THT. Die Auswertung zur relativen Expression geschah dabei durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

2.16 Blotting-Experimente

2.16.1 Southern-Blot

Agarose-Gel wurde nach einer Gelelektrophorese 2 x mit H₂O gewaschen. Es erfolgte die Denaturierung in der entsprechenden Lösung für 45 min. Das Gel wurde erneut 2 x mit H₂O gewaschen und in einer Neutralisationslösung für 45 min geschwenkt. Zum Blot wurde auf ein Stapel Papierhandtücher ein in der Größe des Gels zugeschnittenes und in 20x SSC getränktes Filterpapier gelegt. Darauf positioniert war eine erst in H₂O und danach in 20x SSC angefeuchtete, positiv geladene Nyolnmembran. Das Agarose-Gel wurde luftblasenfrei darauf gelegt. Auf das Gel folgten 2 Lagen in 20x SSC getränktes Filterpapier. Ein langer Streifen Filterpapier wurde über dem Blot positioniert, dass dessen Enden in Schalen mit 20x SSC aufbewahrt sind, damit der Blot nicht austrocknet. Folie wurde über die Apparatur gelegt und über

Nacht erfolgte der Transfer der Gelbanden auf die Membran durch Schwerkraftfluss. Um eine längere Lagerzeit der Membran zu gewährleisten und freie Bindungsstellen zu blockieren, wurde die geblottete DNA auf der Membran mittels UV-Bestrahlung vernetzt (*crosslinking*).

2.16.2 Northern-Blot

Durch die denaturierende Formaldehyd-Gelelektrophorese müssen RNA-Gele nicht erst in entsprechenden Lösungen geschwenkt werden. Das Gel kommt nach der Elektrophorese direkt auf den Kapillar-Blot. Der Aufbau des Blots ist dabei identisch mit den Ausführungen aus 2.16.1. Der Transfer der Banden erfolgt über Nacht und die Nylon-Membran wird durch UV-Strahlung ebenfalls vernetzt. Die anschließende Hybridisierung und Auswertung mit radioaktiv markierten Sonden ist Absatz 2.16.2 zu entnehmen.

2.16.3 Fertigung und Nachweis radioaktiv markierter Sonden

Zum Nachweis spezifischer Banden auf einer geblotteten Membran, musste eine geeignete Sonde erstellt werden. Spezifische Restriktionsfragmente wurden über Gelelektrophorese nachgewiesen, ausgeschnitten und extrahiert. Mit Hilfe des Amersham *Megaprime DNA Labeling Kits* von GE Healthcare wurde die DNA radioaktiv markiert: 5 µg der extrahierten DNA wurden mit 5 µL einer Primerlösung zusammengebracht. Die Lösung denaturierte innerhalb von 5 min im Thermoblock bei 95 °C und verblieb bei Raumtemperatur nach einer kurzen Zentrifugation. Die Lösung wurde mit 16 µL Wasser, 5 µL ATP (α -³²P), mit je 4 µL der restlichen dNTP, 2 µL Enzym und 5 µL Reaktionspuffer versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 37 °C konnte der Reaktionsansatz auf abzentrifugierte Säulen von Amersham gegeben werden. Nach einer anschließenden Zentrifugation, um freie Nukleotide zu entfernen (3 min bei 1000 rcf), wurde das Eluat für 5 min bei 95 °C inkubiert und mit Hybridisierungspuffer zusammengebracht. Die Hybridisierung der Membran mit der radioaktiv-markierten Sonde geschah über Nacht bei 42 °C. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran mit einer Waschlösung, bestehend aus 20 x SSC und 0,1 %-igem SDS, 3 x je 20 min gewaschen. Nach Trocknung und Lagerung in Folie wurden die Membranen für mindestens 24 h in lichtgeschützten Kassetten mit einem *Phosphor-Screen* aufbewahrt. Die hybridisierten Stellen auf der Membran konnten mithilfe des Phosphor-Screens durch das *Typhoon Imaging System* nachgewiesen werden.

2.17 Klonierung amplifizierter Sequenzen

Zur Klonierung und Sequenzierung amplifizierter Sequenzen wurde das *CloneJet PCR Cloning Kit* von Thermo Fisher Scientific verwendet.

Tabelle 2-10 pJET-Ligase-Mix-Reaktion

Komponente	Endkonzentration [µL]
2 x Reaktionspuffer	10
Gereinigtes PCR-Produkt	1
pJET1.2/Klonierungsvektor	1
T4 DNA Ligase	1
Reinstwasser	7

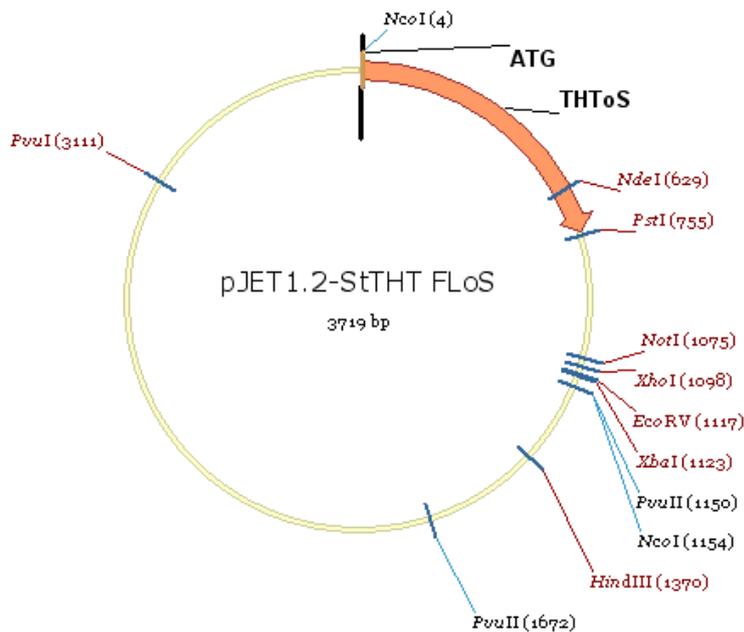


Abbildung 2-3 Vektorkarte der pJET-Transformation mit THT

Das gereinigte PCR-Produkt (Gel-Extraktion) wurde mit dem Vektor in einem Ligase-Mix zusammengeführt (Tabelle 2-10). Die Transformation mit dem pJET-Vektor funktioniert dabei jedoch nur, wenn die DNA mit glatten Enden (*blunt ends*) vorliegt. Durch den Einsatz von *Herculase II* und *Phusion* ist dies jedoch bereits der Fall. Der Ligase-Mix inkubiert daraufhin für 5 bis 30 min bei Raumtemperatur und kann direkt zur Transformation verwendet werden. Kompetente *E. coli*-Zellen (DH5α) wurden mit 2 µL Ligase-Mix benetzt und vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zellen für exakt 30 sek einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Die Zellen wurden sofort auf Eis verlagert und mit 250 µL LB-Medium versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C mit 200 rpm für mindestens 1 h. Die Zell-Suspension wurde auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Erfolgreich transformierte Zellen waren dabei durch die pJET-vermittelte Ampicillin-Resistenz im Stande über Nacht Kolonien auszubilden.

2.17.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Einzelkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher zu je 2 mL LB-Medium mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin gegeben. Zusätzlich wurde jede Kolonie auf eine neue LB-Platte überführt, um die Einzelkolonie später erneut verwenden zu können. Über Nacht inkubierte die Zell-Suspension im LB-Medium bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 200 rpm. Die herangewachsene Bakterienkultur wurde in ein neues 2 mL Eppendorfgefäß überführt und bei 15,294 rcf für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit $100 \mu\text{L}$ Lysispuffer resuspendiert. Nach Beigabe von $200 \mu\text{L}$ alkalischer SDS-Lösung inkubierten die Proben für 5 min im Eisbad. Es folgte die Beigabe von $150 \mu\text{L}$ Kaliumacetat-Lösung und eine erneute Inkubation im Eisbad für 5 min. Nachdem die Suspension für 10 min und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 20.817 rcf zentrifugiert wurde, wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und $270 \mu\text{L}$ Isopropanol wurden hinzugefügt. Die Ausfällung der DNA wurde dabei durch eine Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min bewerkstelligt. Die zentrifugierte DNA wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich zuletzt bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vollständig getrocknet und in $20 \mu\text{L}$ Reinstwasser gelöst.

Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde enzymatisch gespalten und im Agarose-Gel nachgewiesen. Durch den Einsatz der Computersoftware Vector NTI konnte die Größe der zu erwartenden Spaltprodukte ermittelt werden. Bei erfolgreicher Detektion wurde die Plasmid-DNA der betroffenen Kolonien erneut isoliert – unter diesen Umständen jedoch unter reineren Bedingungen mit dem Plasmid Midi Kit von QIAGEN, um bei der Sequenzierung eindeutige Ergebnisse zu erhalten.

2.17.2 Präparation durch das Plasmid Midi Kit

Die vereinzelt Bakterienkolonien auf der zusätzlich etablierten LB-Platte wurden mit einem sterilen Zahnstocher zu je 50 mL LB-Medium mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin gegeben. Die Inkubation im Schüttelkolben erfolgte dabei über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Von dieser Bakterienkultur wurde 1 mL mit 1 mL 50 %-igem Glycerin vermischt und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren, womit ein Glycerin-Standard für zukünftige Ausplattierungen etabliert wurde. Der Rest der Zell-Suspension wurde in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und bei 6000 rcf mit $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 mL Kit-spezifischen P1 und P2-Puffer resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 4 mL P3-Puffer hinzugefügt und die Zell-Suspension äquilibrierte auf einer Säule. Durch Druckeinwirkung (Pfropfen) löste sich ein Teil der Suspension auf eine kleinere Säule. Nach zwei Waschvorgängen wurde die Plasmid-DNA durch 5 mL Extraktionspuffer gelöst. Nach Fällung mit $3,5 \text{ mL}$ Isopropanol und der Zentrifugation bei 15000 rcf für 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$, konnte das Pellet letztlich durch 70 %-iges Ethanol 2 x gewaschen und

zentrifugiert werden. Die getrocknete DNA wurde in 80 µL Reinstwasser gelöst und die Konzentration wurde mithilfe des Nanodrop gemessen, wodurch die Proben zur Sequenzierung vorbereitet und eingeschickt werden konnten.

2.18 Bioinformatische Auswertung

2.18.1 *In-silico*-Splicing präferierter Sequenzen

Zur Fertigung weiterer Fragmente von *SfTHT* mussten zunächst Homologievergleiche bestimmter Sequenzen vorgenommen werden: Die THT-Sequenz von Nakane et al. (2003; Accession AB061243), welche auch zur Transformation der *SfTHT*-Linien genutzt wurde, führte durch eine BLAST-Analyse auf NCBI [URL-2] zu einer Sequenz (Accession XM_006365024) mit der größten Homologie. Mit dieser Sequenz wurde im *Sol Genomics Network* [URL-3] erneut eine BLAST-Analyse für kodierende DNA-Sequenzen von Kartoffelpflanzen durchgeführt. Die resultierenden Sequenz-Fragmente wurden unter Einbezug von BLAST-Ergebnissen auf NCBI *in silico* gespleißt. Die komplettierten Sequenzen wurden auf ExPASy auf die Richtigkeit des Leserasters untersucht. Entsprechende Oligopeptide wurden designt und bei Eurofins Scientific bestellt.

2.18.2 Drei-Dimensionale Darstellung von *SfTHT*

Die Sequenzen von *SfTHT* wurden durch die PHYRE²-Software [URL-4] mit bereits etablierten Protein-Sequenzen verglichen. Durch Sequenz-Homologien konnte dabei eine dreidimensionale Struktur modelliert werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren transformierte Pflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. *Désirée*). Über RNA-Interferenz sollte das Gen, welches für die Tyramin-Hydroxymethyltransferase codiert, herunterreguliert werden. Zur Verfügung standen dabei 9 unabhängige Pflanzenlinien: A, B, C1, F1, G2, U1, V, a4 und b1. Zur Kontrolle wurde die Wildtyp-Linie hinzugezogen sowie die Leervektorlinie EV, welche mit dem Hellsgate-Plasmid ebenfalls transformiert wurde, jedoch das THT-Insert nicht in sich trägt. Zur eindeutigen Charakterisierung der reduzierten Genexpression der StTHT-Linien war es dabei notwendig, die korrekte Insertion der T-DNA (3.1) sowie die Auswirkung auf die jeweiligen Pflanzen zu untersuchen (3.2). Weiterhin war das resultierende, alternierende metabolische Profil (3.3) als auch das Wachstum von Pathogenen auf transgenen Pflanzen von Bedeutung (3.3). Analog dazu wurden phänotypische Beobachtungen mit einbezogen (3.5). Zudem wurden neue Fragmente von THT aus von *S. tuberosum* kloniert, um zukünftige Arbeiten zu ermöglichen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

3.1 Nachweis der Insertion des RNAi-Konstrukts via Southern-Blot

Zum Nachweis der T-DNA-Integration wurde Blattmaterial von transformierten Pflanzen entnommen, wovon die genomische DNA isoliert wurde. Als Kontrolle wurden Wildtyp- und EV-Linien hinzugezogen. Nach anschließender Restriktionsspaltung mit dem Enzym *Bam*HI erfolgte die Auftrennung im Gel. Die Gelbanden wurden daraufhin auf eine Nylonmembran mithilfe eines Southern Blots übertragen. Im Anschluss wurde eine geeignete Sonde radioaktiv präpariert, indem Plasmid-DNA mit dem StTHT-RNAi-Insert verdaut, isoliert und mit radioaktiv markiertem ATP zusammengebracht wurde. Durch Inkubation der Membran mit der Sonde war es möglich, dass Hybridisierungen von THT auf der Membran stattfanden. Die Auswertung ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

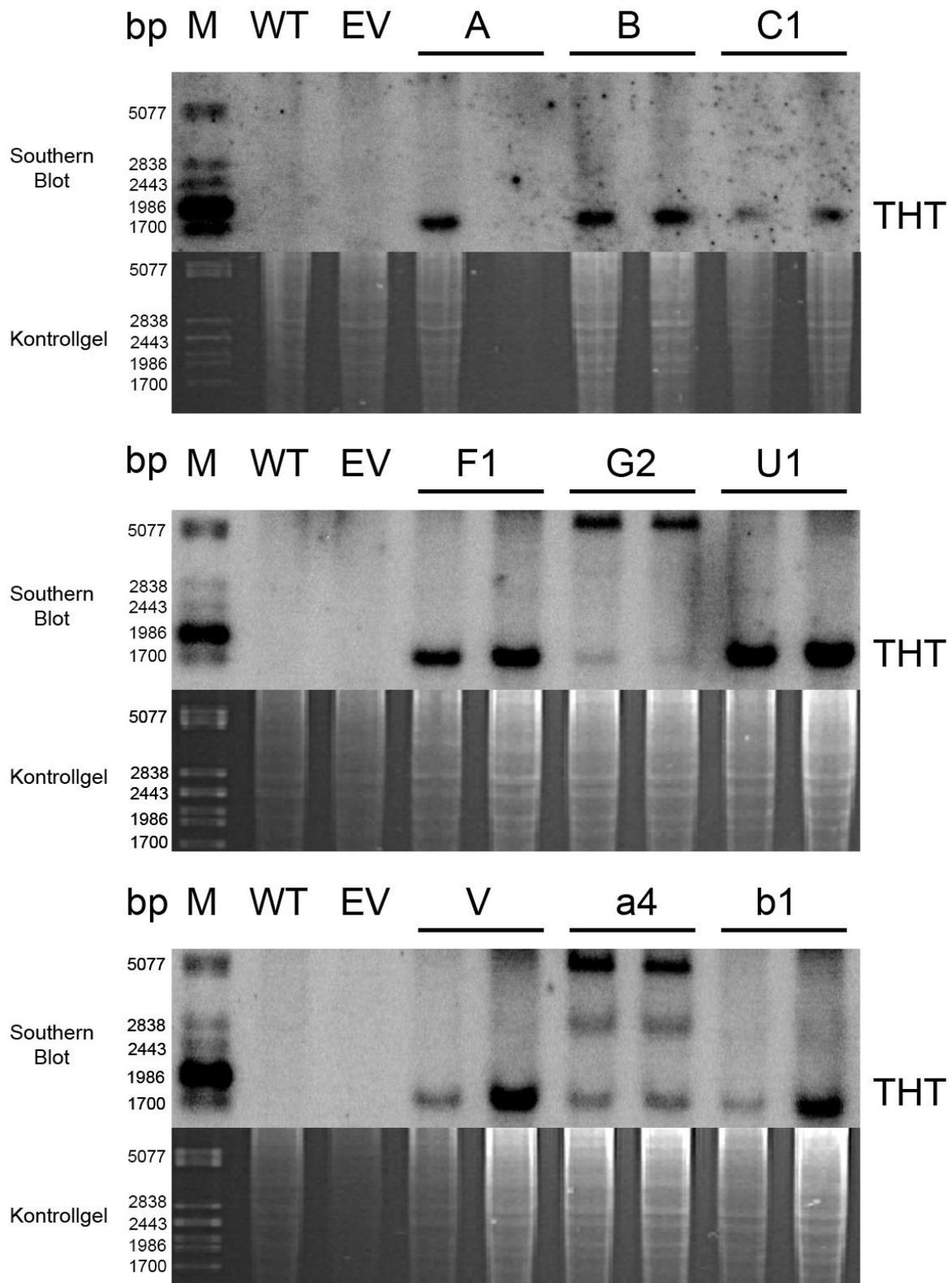


Abbildung 3-1 Untersuchung der korrekten Insertion des RNAi-Fragmentes Auf dem Kontrollgel ist die genomische DNA aufgetragen. Durch den Southern Blot hybridisierte eine radioaktiv markierte Sonde mit dem THT-Fragment auf der Nylon-Membran. Zur Durchführung wurden Duplikate der Transformanten genutzt und Triplikate der Kontrolllinien. **M**, Marker; **WT**, Wildtyp; **EV**, *Empty-Vector*; **A – V**, Bezeichnung der transformierten Linien; **THT**, Tyramin-Hydroxyczimtsäure-Transferase

Es ist in Abbildung 3-1 zu erkennen, dass die Kontrolllinien, bestehend aus WT und EV, das Insert von ca. 1700 bp nicht in sich tragen. Alle transformierten Linien hingegen weisen das Fragment, wenn auch mit unterschiedlicher Ausprägung, bei 1700 bp auf: Die Linien A, B, C1 F1, U1, V und b1 besitzen eine einzelne, eindeutige Bande im gewünschten Größenbereich. Linie G2 hingegen besitzt diese Bande auch, wenngleich deren Intensität um ein Vielfaches schwächer ausfällt und eine andere, unbekannte Bande bei 5077 bp. Die transformierte Linie a4 verfügt über die gewünschte RNAi-Bande sowie über Banden im Größenbereich von 2838 bp und 5077 bp. Trotz dieser Unterschiede ist das Fragment in allen Transformanten erfolgreich etabliert. Es musste somit nur noch getestet werden, ob der RNAi-Effekt in allen transformierten Linien zum Tragen kommt.

3.2 Nachweis des RNAi-Effektes via Northern-Blot

Um den RNAi-Effekt nachweisen zu können, war es zu Beginn nötig, einen Zeitpunkt zu charakterisieren, bei welchem die Transkriptmenge von endogenen THT am stärksten ausgeprägt war. Dafür wurde die RNA mithilfe von zwei unabhängigen Zeitkinetiken von *S. tuberosum* untersucht: Diese wurden zum einen mit dem PAMP Pep-13 aus *P. infestans* und zum anderen mit dessen Analogon W2A infiziert. W2A, mit einer Punktmutation zu einem inaktiven Elicitor degradiert, diente dabei als Kontrolle. Durch qPCR mit THT-spezifischen Sonden und Primern, war es möglich, relative und absolute Ergebnisse zur Expression von THT zu generieren. Die absolute Quantifizierung wurde dabei mithilfe einer Verdünnungsreihe des THT-Plasmides bewerkstelligt, während die relative Quantifizierung mithilfe des *House-Keeping*-Gens *EF1 α* und der $\Delta\Delta C_t$ -Methode erfolgte. Im Nachfolgenden sind beide Auswertungen in Abbildung 3-2 grafisch dargestellt.

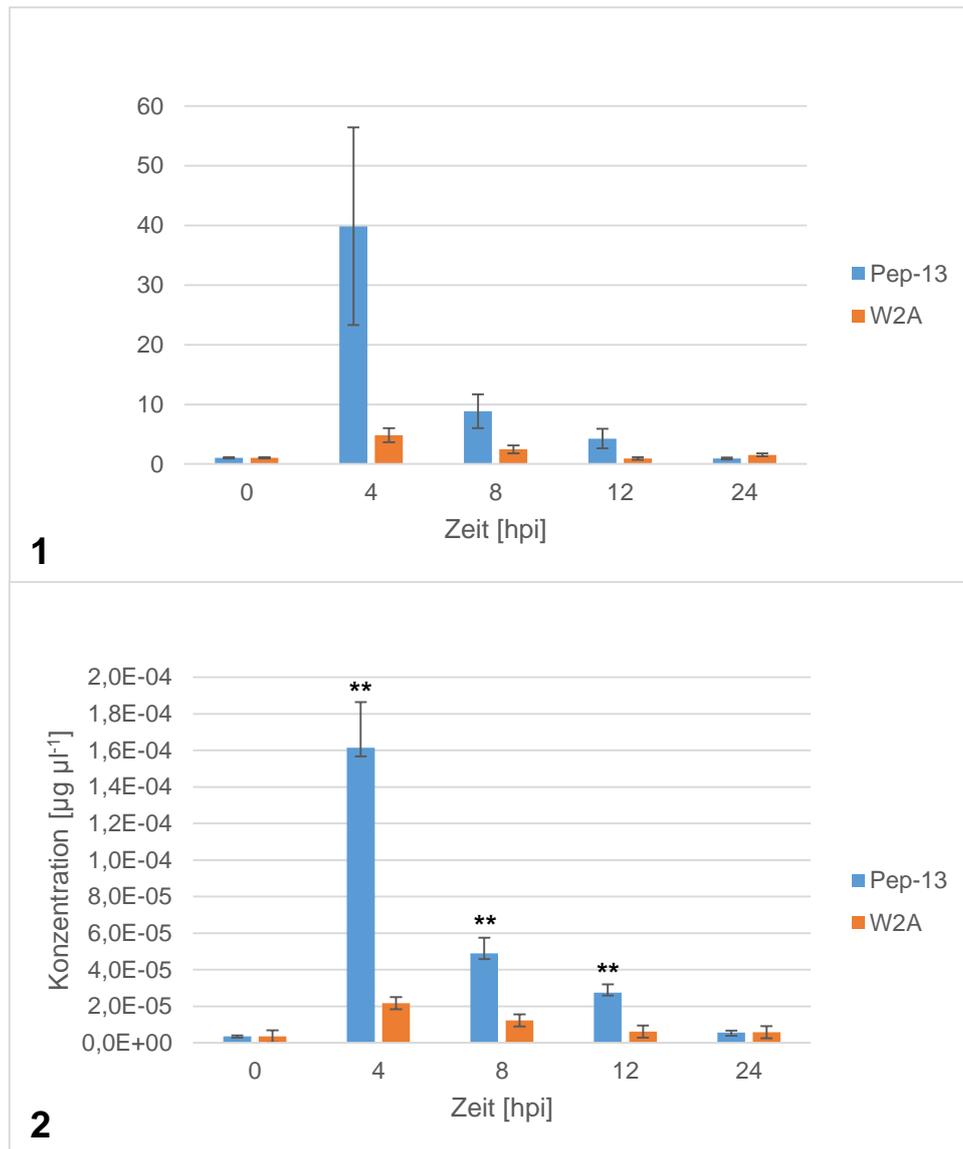


Abbildung 3-2 Darstellung zur Erfassung der Expression von THT durch qPCR: **1** Die relative Quantifizierung von THT erfolgte über den Abgleich mit *EF1α*: Jede Probe wurde mit Sonden und Primern für einen THT- und einen *EF1α*-Ansatz vorbereitet. Die Auswertung erfolgte über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit 0 hpi als Referenz. **2** Die absolute Quantifizierung von THT erfolgte über eine Eichkurve: Plasmid-DNA mit dem THT-Konstrukt wurde in einer Verdünnungsreihe parallel zu den Proben in der qPCR eingesetzt. Die Auswertung erfolgte über die resultierenden Konzentrationen. **THT**, Tyramin-Hydroxymzimtsäure-Transferase; **hpi**, hours post infection; 2-seitiger T-Test mit zwei Stichproben ungleicher Varianz (heteroskedastisch); Signifikanzbewertung der Wahrscheinlichkeiten: Schwache Signifikanz (*) $p < 0,05$, mittlere Signifikanz (**) $p < 0,01 - 0,001$, starke Signifikanz (***) $p < 0,001$; Fehlerindikatoren mittels Standardfehler des arithmetischen Mittels. Es wurden für jede Art von Quantifizierung zwei Experimente mit einer Probenzahl von $n = 6$ durchgeführt.

Die Auswertung der qPCR in Abbildung 3-2 belegt, dass die THT-Transkriptmenge bereits 4 maximale Werte aufweist. Nach weiteren vier bis acht Stunden zeigt sich, dass die gebildete Transkriptmenge bei Pep-13 immer noch signifikant höher als bei 0 Stunden nach Infizierung liegt. Jedoch erreichen diese Werte nur ein Viertel (8 hpi) bzw. ein Achtel (12 hpi) der Menge, welche bei 4 hpi anfällt. Aufgrund der Tatsache, dass beide Auswertungen dieselben Ergebnisse erbrachten, wurde zum Nachweis des RNAi-Effektes via Northern Blot eine Zeitspanne von 4 Stunden nach Infiltration gewählt.

Ergebnisse und Diskussion

Blattmaterial von transformierten Linien von *S. tuberosum* als auch von Kontroll-Linien wurde aufgrund der vorherigen Ergebnisse mit Pep-13 und W2A vier Stunden nach Infiltration geerntet. Im Anschluss erfolgte die Isolation der RNA durch die TRIzol-Methode und die entsprechende Kontrolle im RNA-Gel. Die Banden wurden durch einen Northern Blot auf eine Membran übertragen, welche anschließend mit einer radioaktiv markierten THT-Sonde inkubiert wurde. Die hybridisierten Stellen wurden letztlich durch einen Phosphoscreen erkennbar gemacht und nachfolgend dargestellt:

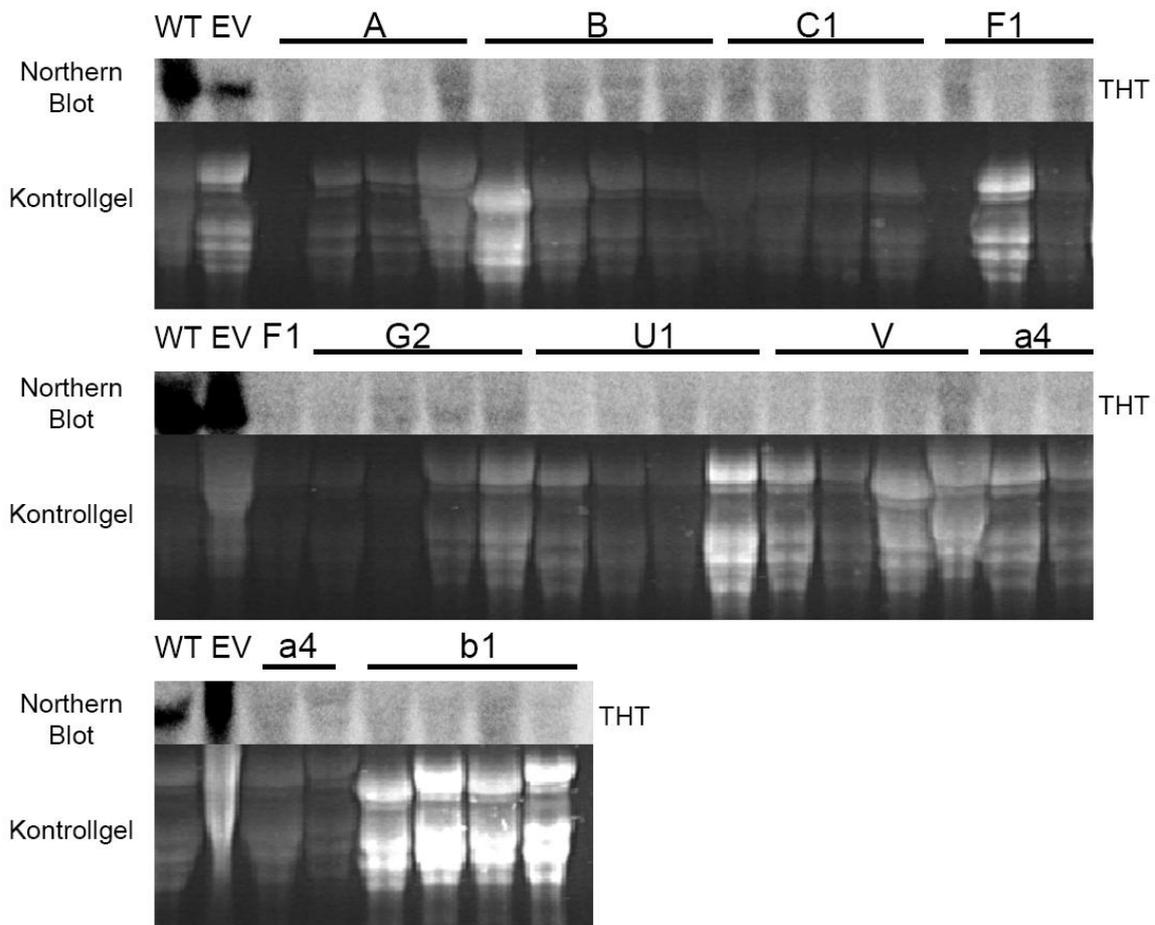


Abbildung 3-3 Darstellung der akkumulierten Menge an THT-mRNA nach 4 Stunden Wildtyp-Linien und Transformanten von *Solanum tuberosum* wurden mit Pep-13 infiltriert und inkubierten für 4 Stunden. Im Anschluss wurde RNA isoliert und auf ein Formaldehyd-Gel aufgetragen, welches durch Ethidiumbromid gefärbt wurde (Kontrollgel). Die Banden wurden via Northern Blot auf eine Membran übertragen und mit einer radioaktiv markierten THT-Sonde inkubiert. **M**, Marker; **WT**, Wildtyp; **EV**, Empty-Vector; **A – V**, Bezeichnung der transformierten Linien; **THT**, Tyramin-Hydroxymizinsäure-Transferase. Es wurde 1 Experiment durchgeführt mit einer Probenzahl von $n = 4$ für die Transformanten und $n = 6$ für die Kontrolllinien.

Der RNAi-Effekt zeichnet sich dadurch aus, dass in transformierten Linien bei den vorher ermittelten 4 hpi eine schwache Bande im Northern Blot erkennbar ist, trotz hoher Mengen an RNA im Kontrollgel (Abbildung 3-3, b1). Die Wildtyp- und EV-Linien besitzen dabei trotz schwankender RNA-Konzentration eine starke THT-Bande auf dem Blot. Bei Betrachtung von Abbildung 3-3 fällt dabei auf, dass b1 ein geeigneter Kandidat für weitere Untersuchungen ist - denn trotz hoher Konzentrationen an RNA verbleibt die Bande von THT schwach erkennbar.

Dies trifft ebenso auf die transformierten Linien V und a4 zu. Um in weiteren Experimenten einen schwächeren RNAi-Effekt als Bezug zu haben, wurde Linie C1 ebenso herausgesucht.

3.3 Einfluss der THT-Expression auf das metabolische Profil

Es war von weiterem Interesse in Erfahrung zu bringen, ob der RNAi-Effekt zu reduzierten Mengen an THT-Produktmengen führt und ob diese reduzierte Produktmenge an THT Einfluss auf Pathogene besitzt. Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass CT nach einer *P. infestans*-Infektion in betroffenen Blattsegmenten akkumuliert. Von daher war auch von Belang wie sich der Pathogenbefall auf das metabolische Profil der transgenen Linien auswirkt. Zu diesem Zweck wurden Tropfen von *P. infestans* für 24 h auf der Blattoberfläche von sämtlichen Pflanzen inkubiert. Die Tropfen wurden geerntet, eingeeengt und in Methanol resuspendiert. Gleiches geschah mit den betroffenen Blattstellen. Die Proben wurden anschließend durch UPLC-ESI-QToF-MS im positiven und negativen Modus gemessen und miteinander verglichen.

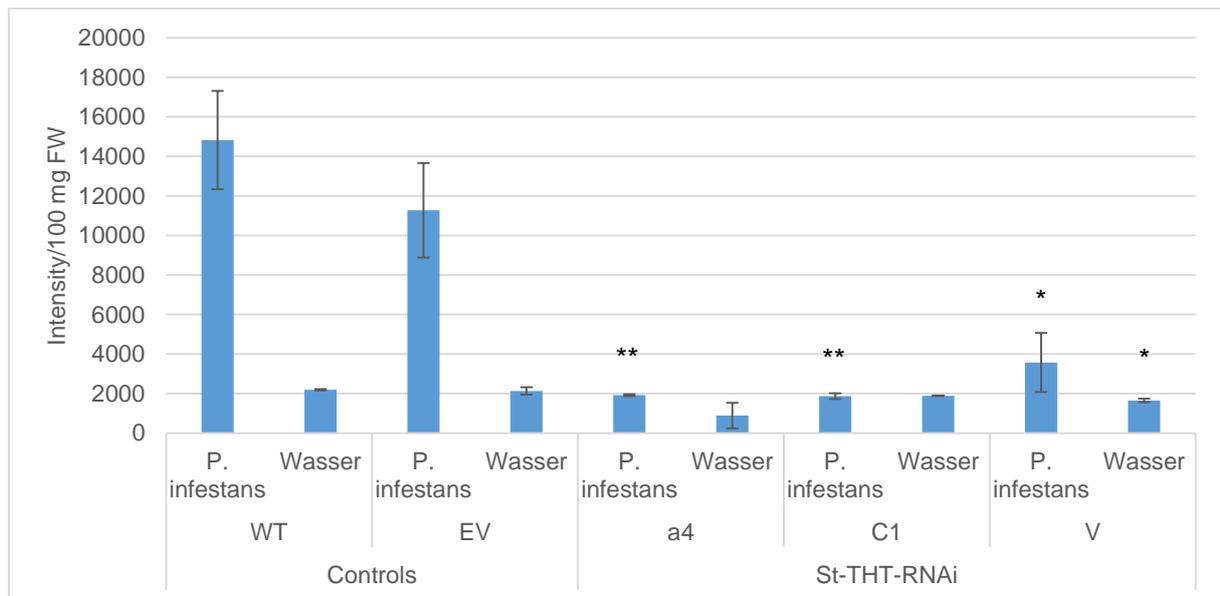


Abbildung 3-4 *p*-Coumaroyl-Tyramin in infizierten Blattscheiben nach einem Tag. *p*-Coumaroyl-Tyramin wurde im positiven Modus bei einem m/Z von 284 und einer rt von 371 detektiert; THT, Tyramin-Hydroxymethyltransferase; 2-seitiger T-Test mit zwei Stichproben ungleicher Varianz (heteroskedastisch); Signifikanzbewertung der Wahrscheinlichkeiten: Schwache Signifikanz (*) $p < 0,05$, mittlere Signifikanz (**) $p < 0,01 - 0,001$, starke Signifikanz (***) $p < 0,001$; Fehlerindikatoren mittels Standardfehler des arithmetischen Mittels. Es wurde 1 Experiment mit einer Probenzahl von $n = 2$ für Wasser und für *P. infestans* durchgeführt. Linie b1 wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt, weil die Werte für *P. infestans* nicht gemessen wurden.

In infizierten Blattscheiben wurden nach erfolgter Messung 39784 Peaks verzeichnet. Davon waren nur 59 Datensätze mit einem *Fold change* größer gleich 5 und einer T-Test-Wahrscheinlichkeit kleiner gleich 0,05. Unter diesen 59 herausstechenden Massedaten war lediglich *p*-Coumaroyl-Tyramin sowohl im positiven als auch im negativen Modus vorhanden. Die Auswertung der dazugehörigen Daten ergab, dass in transgenen Blattscheiben die Menge an *p*-Coumaroyl-Tyramin erniedrigt ist, während die Kontrolllinien mit 7-fach höheren Intensitäten

Ergebnisse und Diskussion

pro Frischgewicht vorliegen (WT *P. infestans* mit *P. infestans* von a4 und C1 verglichen). Linie V besitzt zweifach höhere Werte bei infizierten Proben als die Linien a4 und C1. Auch wenn zu diesem Ansatz nur ein Experiment durchgeführt wurde und die Statistik durch die Probenzahl mit Vorsicht zu genießen ist, zeichnet sich ein Trend ab, welchen man in zukünftigen Versuchen weiterverfolgen kann.

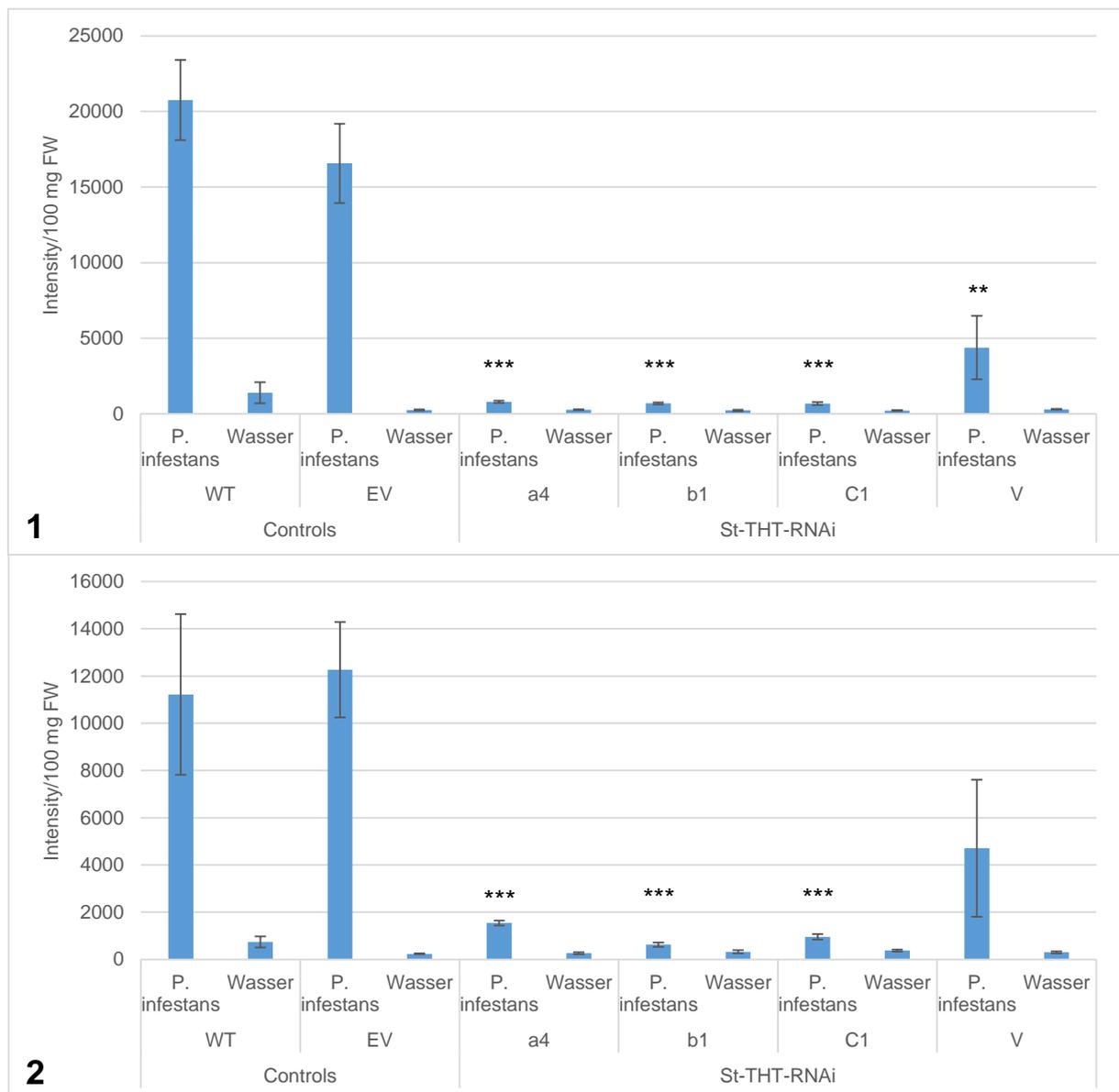


Abbildung 3-5 HCAA in infizierten Tropfen nach einem Tag. 1 *p*-Coumaroyl-Tyramin m/z 284,1 **2** Feruloyl-Tyramin m/z 312,1; **THT**, Tyramin-Hydroxymizsäure-Transferase; 2-seitiger T-Test mit zwei Stichproben ungleicher Varianz (heteroskedastisch); Signifikanzbewertung der Wahrscheinlichkeiten: Schwache Signifikanz (*) $p < 0,05$, mittlere Signifikanz (**) $p < 0,01 - 0,001$, starke Signifikanz (***) $p < 0,001$; Fehlerindikatoren mittels Standardfehler des arithmetischen Mittels. Es wurde 1 Experiment mit einer Probenzahl von $n = 2$ für Wasser und für *P. infestans* durchgeführt.

In den Tropfen von *P. infestans*, welche nach einem Tag ebenfalls in Methanol gelöst wurden, ergab sich ein ähnliches Bild zur Auswertung: Von 11817 *Peaks* besaßen 167 Stoffe einen

Fold Change größer gleich 5 mit einer T-Test-Wahrscheinlichkeit kleiner gleich 0,05. Sowohl im positiven als auch im negativen Modus wurde dabei *p*-Coumaroyl-Tyramin (Abbildung 3-5; 1) und Feruloyl-Tyramin (Abbildung 3-5; 2) detektiert. *p*-Coumaroyl-Tyramin ist somit im befallenen Blatt-Gewebe als auch außerhalb der Pflanze bei Pathogenbefall vorzufinden. Beide HCAA zeigen stark erniedrigte Intensitäten für die transgenen Linien a4, b1 und C1 (6-fach im Vergleich zu EV mit *P. infestans*). V ist in diesem Fall noch stärker ausgeprägt als bei den Blattscheiben. Auch bei diesem Fall ist anzumerken, dass lediglich ein Experiment mit einer Probenzahl von $n = 2$ stattgefunden hat.

3.4 Einfluss der THT-Expression auf das Wachstum von *P. infestans*

Nachdem gezeigt wurde, dass das RNAi-Fragment für THT in den Linien für *S. tuberosum* vorhanden ist und der daraus resultierende Effekt existent ist, sollten eventuelle Einflüsse auf Pathogene untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Tropfen einer 11 Tage alten Sporenlösung von *P. infestans* für drei Tage auf entsprechende Pflanzenlinien von *S. tuberosum* gebracht. Unter hoher Luftfeuchte bildeten sich an den infizierten Stellen Nekrosen aus, welche mithilfe eines Korkbohrers ausgestochen wurden. Das Ausmaß des Befalls schien bei den transformierten Linien offenbar größer auszufallen als bei den Kontrolllinien (Abbildung 3-6). Das geerntete Blattmaterial wurde anschließend für verschiedene Zwecke genutzt: RNA wurde isoliert, um zu zeigen, ob die relative THT-Transkriptmenge in den transgenen Linien C1, V, a4 und b1 auch nach einer Infektion durch *P. infestans* reduziert war (Abbildung 3-7). DNA wurde isoliert, um das Wachstum von *P. infestans* für die verschiedenen Linien gegenüber zu stellen, um daraus Rückschlüsse zu ziehen, ob die reduzierte Expression von THT Einfluss auf das Wachstum von Pathogenen ausübt (Abbildung 3-8).

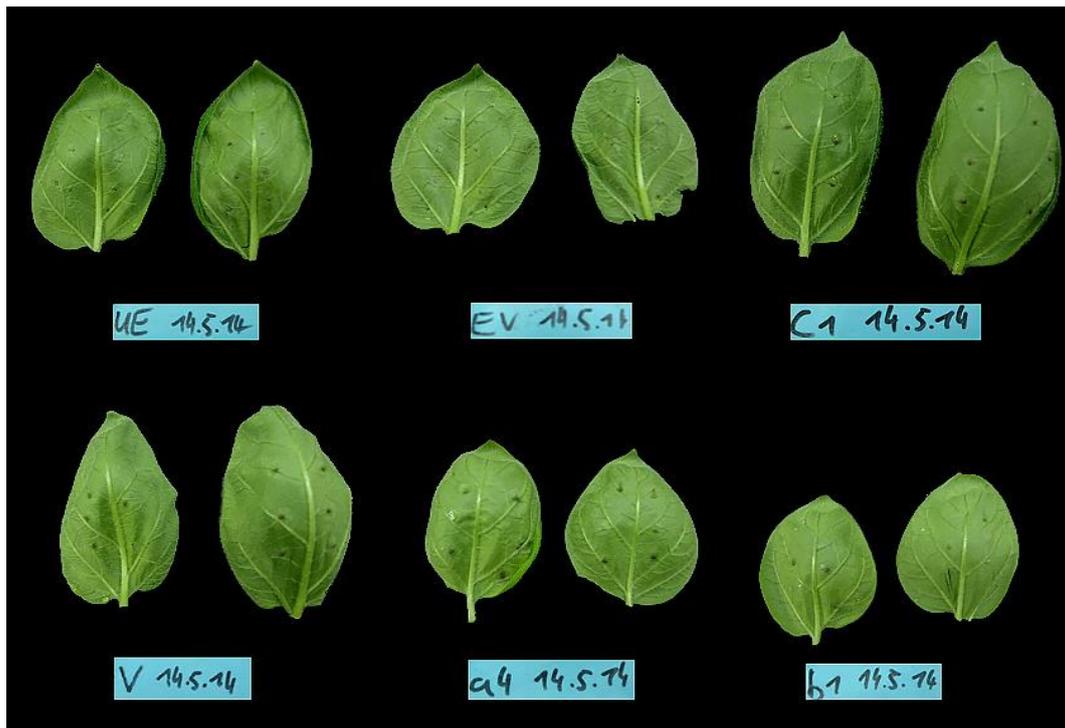


Abbildung 3-6 Verlauf der Infektion durch *P. infestans* an ausgewählten Linien Eine Sporensuspension (1×10^5 Zellen ml^{-1}) von *P. infestans* wurde dafür drei Tage auf der Blattoberfläche von *S. tuberosum* inkubiert.

Aus der isolierten RNA wurde cDNA synthetisiert und mit einer entsprechenden qPCR für THT untersucht. Die Auswertung erfolgte dabei über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit $\text{Ef1}\alpha$ als Referenz. In Abbildung 3-7 ist erkennbar, dass alle untersuchten *StTHT*-RNAi Linien reduzierte Menge an THT-mRNA enthalten, während die Kontrolllinien aus Wildtyp und EV 10 (WT) bzw. 16-fach (EV) höhere THT-Transkriptmengen aufweisen. Dabei sei zu betonen, dass der RNAi-Effekt nicht mit Knock-Out-Mutanten gleichzusetzen ist. Es können dabei, wie im vorliegenden Beispiel, immer noch reduzierte Mengen an Transkript vorhanden sein, welche dennoch eine schwache Expression hervorrufen können.

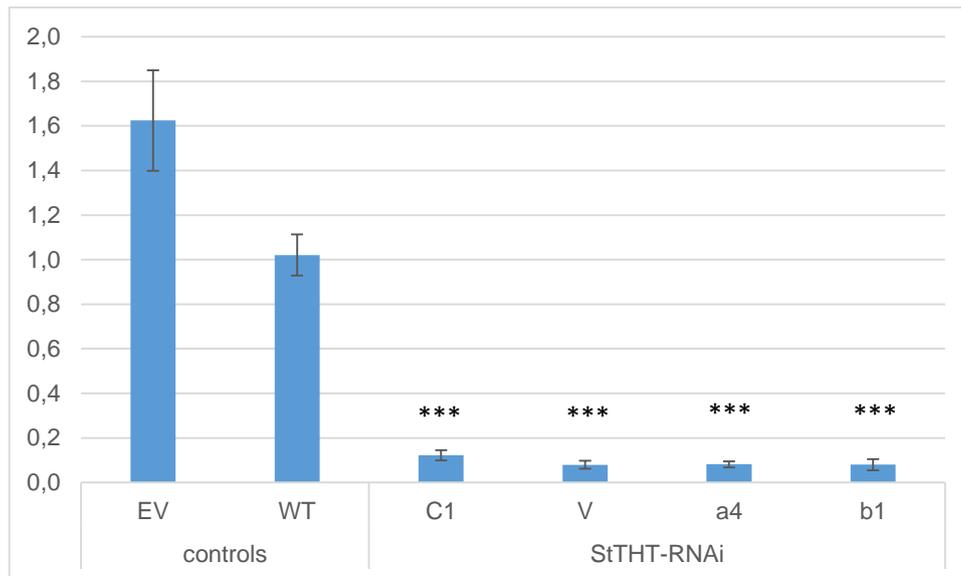


Abbildung 3-7 Relative Transkriptmenge von THT nach Befall durch *P. infestans* Tropfen 11 Tage alter Sporen von *P. infestans* wurden auf verschiedene Linien von *S. tuberosum* gebracht. Nach drei Tagen wurden die betroffenen Stellen mit einem Korkbohrer ausgestochen und RNA wurde isoliert. Durch die darauf aufbauende Synthese von cDNA und einer anschließenden qPCR, ausgelegt für THT mit EF1 α als Referenz und der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet, wurden diese Ergebnisse generiert. **St**, *Solanum tuberosum*; **WT**, Wildtyp; **EV**, Empty-Vector; **a4 – V**, Bezeichnung der transformierten Linien **THT**, Tyramin-Hydroxyzimtsäure-Transferase; 2-seitiger T-Test mit zwei Stichproben ungleicher Varianz (heteroskedastisch); Signifikanzbewertung der Wahrscheinlichkeiten: Schwache Signifikanz (*) $p < 0,05$, mittlere Signifikanz (**) $p < 0,01 - 0,001$, starke Signifikanz (***) $p < 0,001$; Fehlerindikatoren mittels Standardfehler des arithmetischen Mittels. Zur Durchführung wurde 1 Experiment mit einer Probenanzahl von $n = 4$ durchgeführt.

Die isolierte DNA aller Linien wurde einer qPCR für *P. infestans* unterzogen. Die drei unabhängig durchgeführten Experimente für die transgenen Linien a4, b1, C1 und V wiesen dabei unterschiedlich starkes Wachstum von *P. infestans* auf (Abbildung 3-8), weshalb die Kontrolllinien aus Wildtyp und EV zu 100% zusammengefasst wurden, obwohl die erniedrigten Transkriptmengen dieser vier Linien allesamt auf einem ähnlichen Niveau lagen (Abbildung 3-7). Aus der Normung des Wachstums zeigte sich, wie in Abbildung 3-7/Abbildung 3-8 kenntlich gemacht, dass das Wachstum von *P. infestans* bei den Linien V und b1 signifikant erhöht ist. Somit sind lediglich zwei von vier Linien anfälliger gegenüber *P. infestans*, wobei Linie V in den vorherigen metabolischen Analysen mehr CT enthielt als die anderen transgenen Linien.

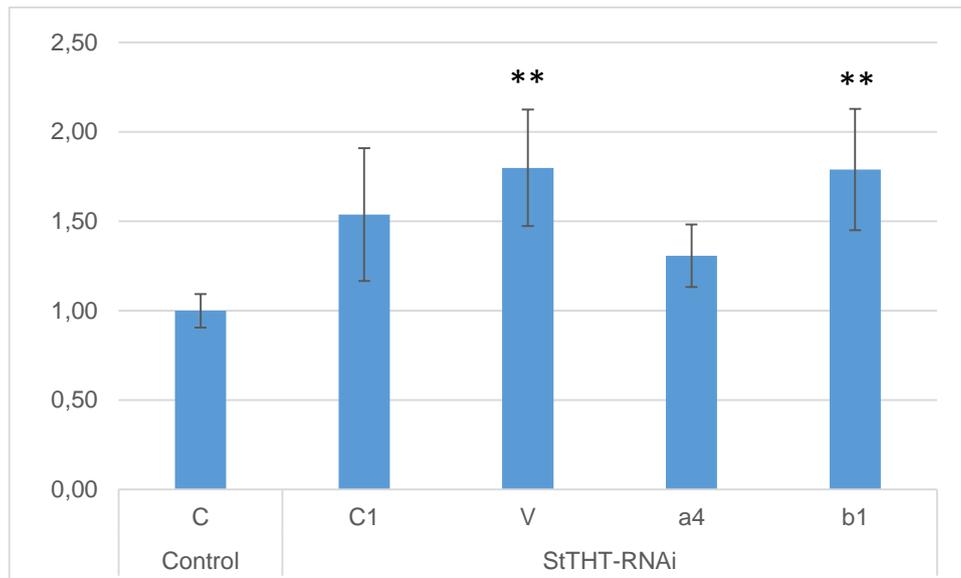


Abbildung 3-8 Genormtes Wachstum von *P. infestans* Kartoffelblätter wurden mit Sporen (Tropfen) von *P. infestans* infiziert. **St**, *Solanum tuberosum*; **C** Kontrolle bestehen aus Wildtyp und Empty Vector; **a4 – V**, Bezeichnung der transformierten Linien **THT**, Tyramin-Hydroxymizinsäure-Transferase; 2-seitiger T-Test mit zwei Stichproben ungleicher Varianz (heteroskedastisch); Signifikanzbewertung der Wahrscheinlichkeiten: Schwache Signifikanz (*) $p < 0,05$, mittlere Signifikanz (**) $p < 0,01 - 0,001$, starke Signifikanz (***) $p < 0,001$; Fehlerindikatoren mittels Standardfehler des arithmetischen Mittels. Es wurden 3 Experimente durchgeführt mit einer Probenanzahl von $n = 4$.

3.5 Phänotypische Charakterisierung der *StTHT*-Linien

Neben der vorangegangenen Charakterisierung war ein Phänotyp von gleicher Bedeutsamkeit für die Beurteilung der reduzierten Genexpression von THT. Während der gesamten Versuchszeit prägte sich dieser bereits in der Sterilkultur aus (Abbildung 3-9, 1). Die Linien C1 und V fingen an, bei den ältesten Blättern am Spross kreisrunde Läsionen auszubilden. Die komplette Pflanze war dabei zunächst selbst nie betroffen. Blätter in unmittelbarer Nähe der betroffenen Stellen bildeten dieses Phänomen nur langsam aus. Um zu untersuchen, ob *StTHT*-RNAi-Pflanzen Veränderungen in der Knollenanzahl aufweisen, wurden die Pflanzen aus der Sterilkultur in größere Töpfe umgepflanzt und im Gewächshausuntergebracht. Innerhalb der ersten drei Wochen breitete sich der Phänotyp nicht weiter aus. Im Laufe der vierten Woche zeigte sich der Phänotyp auf der kompletten Pflanze. Unter dem Mikroskop (Abbildung 3-9, 2) kam bei Betrachtung der Nekrosen der Verdacht auf, dass es sich womöglich um eine Infizierung durch *Alternaria* handeln könnte. Das Blattmaterial wurde gemörsert und genomische DNA wurde isoliert. Unter Verwendung von Primern, spezifisch für *Alternaria*, wurde eine PCR durchgeführt. Es wurden keine Banden im Agarose-Gel beobachtet, womit es keine Infektion durch *Alternaria* sein kann. Parallel wurden zur Kontrolle Proben an das Bundesumweltamt geschickt, welche durch mikroskopische Beurteilung zu dem Ergebnis kamen, dass es sich um *Botrytis* handeln könnte. Dabei sei ebenfalls anzumerken, dass die Wildtyp- und Leervektor-Linien keine derartigen Merkmale ausprägten. Unter Umständen liegt in diesem Fall ein unbekannter Stoffwechselweg vor, welcher durch die reduzierte THT-Aktivität zur einer

Ergebnisse und Diskussion

verfrühten Seneszenz der Blätter führt. Bestätigungen durch andere Arbeiten sind diesbezüglich nicht möglich, weil es sich gegenwärtig um den einzigen Versuch handelt, welcher sich mit reduzierter Genexpression von THT in *S. tuberosum* beschäftigt. Es liegen dagegen umfangreiche Ergebnisse für die THT-Überexprimierung in *Oryza sativa* (Lee et al., 2007) und *S. lycopersicum* vor (Campos et al., 2014), welche wiederum keinen Phänotyp ausprägten.

Der Phänotyp ist somit in der Sterilkultur ausgeprägt und kehrt bei ausgepflanzten Exemplaren nach knapp vier Wochen mit verstärkter Intensität zurück, weshalb dieses Phänomen bei den Experimenten mit *P. infestans* oder den RNAi-relevanten Untersuchungen nicht zum Tragen kam. Linie V wies als einzig transformierte Linie keinen besonderen Phänotyp auf und reiht sich damit zu den nicht betroffenen Kontrolllinien.



Abbildung 3-9 Phänotyp transformierter Pflanzen (1) Phänotyp in Sterilkultur (2) Mikroskopische Untersuchungen der betroffenen Stellen (3) Phänotyp Im Gewächshaus (4) Abgestorbene Blätter, gekennzeichnet mit einer Vielzahl von schwarzen Nekrosen

Trotz der auftretenden Merkmale wurde das zeitintensive Experiment zur Beurteilung der Knollen fortgeführt. Dabei zeichnete sich der Trend ab, dass die Kontrolllinien allesamt eine hohe Anzahl an Knollen ausbildeten (Abbildung 3-10, 1). Dies wirkte sich folglich auch auf die repräsentative Gesamtmasse für jede Pflanzenlinie aus (Abbildung 3-11, 1). Die Linien mit reduzierter THT-Expression wiederum wiesen eine deutlich geringere Anzahl an Knollen auf

Ergebnisse und Diskussion

(Abbildung 3-10, 2). Der Gehalt an Anthocyan innerhalb der Schale dieser Linien schien offenbar auch niedrig auszufallen: Im direkten Vergleich von Transformanten und Kontrollpflanzen fällt die kräftige Färbung von Wildtyp und Leervektor-Linien auf (Abbildung 3-10).



Abbildung 3-10 Knollen von Kontrollpflanzen und Transformanten Knollen von Wildtyp (1) und Leervektor manifestierten sich in einer besonders hohen Anzahl (bis zu 12). Pflanzen mit reduzierter Expression von THT, wie Linie C1 (2), besaßen weitaus weniger Knollen mit einer blasseren Färbung der Schale ..

Im Bereich der Knollenmasse weisen die Linien F1 und U1 signifikant niedrigere Massen auf (Abbildung 3-11, 1). Identisch verhält es sich mit den Linien B, C1, F und a4 im Bezug zur Knollenanzahl (Abbildung 3-11, 2). G2 ist dabei die einzige Linie, welche bei beiden Auswertungen keine signifikanten Unterschiede aufwies. In der Gesamtheit (Abbildung 3-11) erkennt man jedoch, dass Tendenzen existieren, wonach Pflanzen mit einer reduzierten Akkumulation von THT in reduzierten Mengen an Knollen münden. Für diese Entwicklung könnte mitunter auch der Zustand der Blätter verantwortlich sein: Das durch den Phänotyp hervorgerufene verfrühte Absterben der Blätter mindert den Ertrag durch fehlende Photosynthese-Leistung. Diesen Umständen geschuldet, könnte es sein, dass die Pflanze nur eine geringe Anzahl an Knollen produzieren (Abbildung 3-10, 2).

Ergebnisse und Diskussion

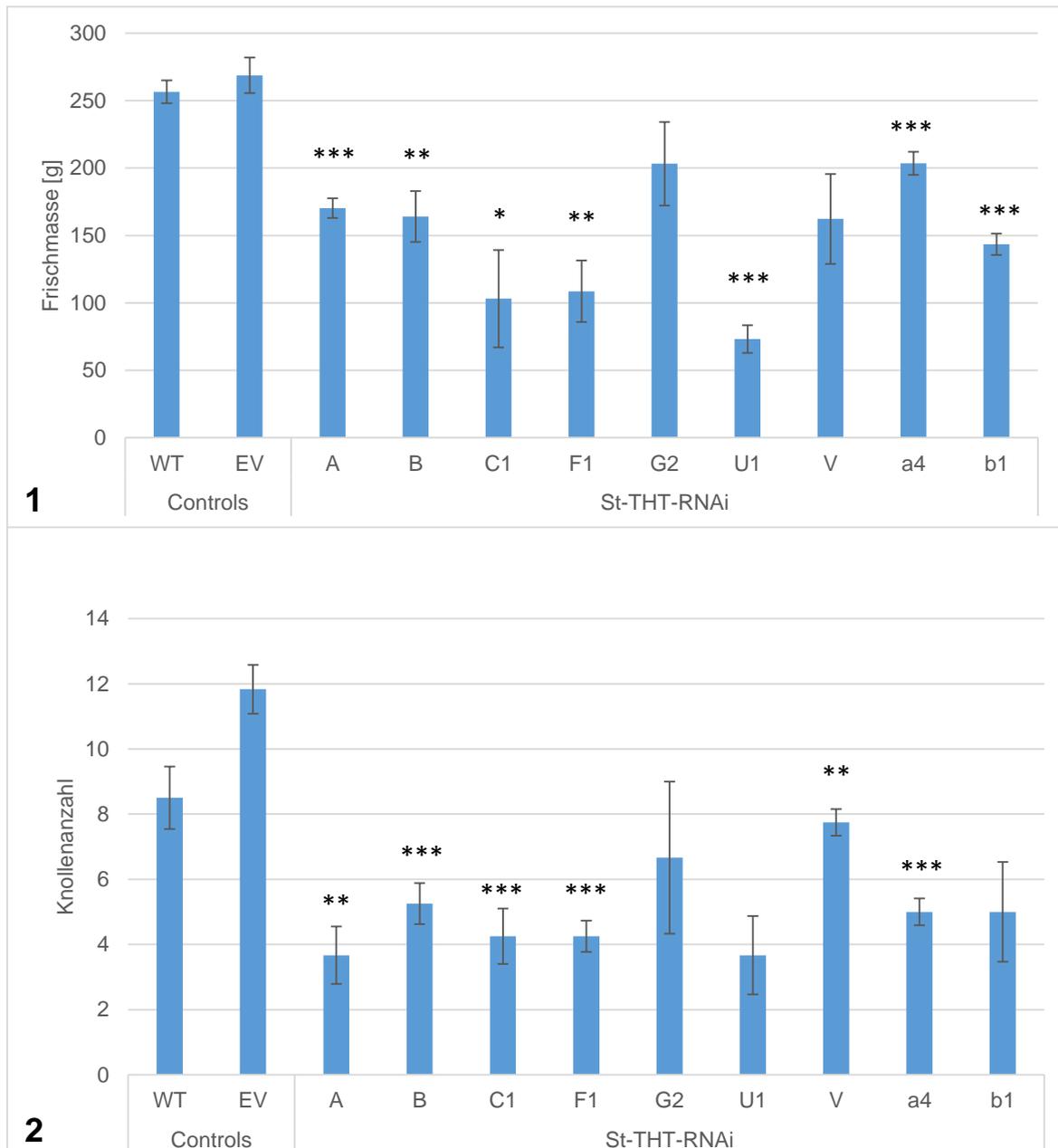


Abbildung 3-11 Knollenanzahl und Knollenfrischmasse von Kontroll- und *StTHT*-Linien Transformierte Pflanzen wurden zur Knollenbildung 3 Monate im Gewächshaus untergebracht. Die Gesamtmasse der Knollen (1) als auch die Knollenanzahl selbst (2) wurden auf ihre Signifikanz untersucht und grafisch dargestellt. *St.*, *Solanum tuberosum*; **WT**, Wildtyp; **EV**, Empty-Vector; **A – V**, Bezeichnung der transformierten Linien; **THT**, Tyramin-Hydroxymisäure-Transferase; 2-seitiger T-Test mit zwei Stichproben ungleicher Varianz (heteroskedastisch); Signifikanzbewertung der Wahrscheinlichkeiten: Schwache Signifikanz (*) $p < 0,05$, mittlere Signifikanz (**) $p < 0,01 - 0,001$, starke Signifikanz (***) $p < 0,001$; Fehlerindikatoren mittels Standardfehler des arithmetischen Mittels. Für diesen Versuch wurde 1 Experiment mit 4 (*StTHT*) bzw. 6 (Kontrolllinien) Pflanzen pro Linie angesetzt

4. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Kartoffelpflanzen mit herunterregulierter THT-Expression. Dabei zeigte sich, dass sowohl Transkriptmengen als auch für *Solanum tuberosum* typische Hydroxyzimtsäureamide, wie Feruloyl-Tyramin oder *p*-Coumaroyl-Tyramin, in ihrem Gehalt erniedrigt waren. Das darauf basierende Assay zum Pathogen-Befall, zeigte jedoch nur bei 2 von 4 RNAi-Linien eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Phytophthora infestans*. Weiterhin äußerte sich ein Phänotyp bei transformierten Linien.

Von ursprünglich 9 transformierten Linien, wurden vier (C1, V, a4, b1) ausgewählt für weitere Untersuchungen. Es zeigte sich, dass bei allen die Transkriptmengen an THT erniedrigt waren (3.4). In mit *P. infestans* infizierten Blattscheiben akkumulierte nach einem Tag in Kontrolllinien eine bis zu siebenfach höhere Menge an *p*-Coumaroyl-Tyramin als in Transformanten (Abbildung 3-4). Ähnlich verhält es sich mit infizierten Tropfen nach einem Tag: Die Menge an *p*-Coumaroyl-Tyramin in Transformanten ist in diesem Fall bis zu einem Faktor von 20 erniedrigt, während bei Feruloyl-Tyramin eine sechsfache Erniedrigung der Intensität vorliegt (Abbildung 3-5). Linie V war bei diesen Untersuchungen die einzig transformierte Linie, welche trotz geringer Transkriptmenge an THT, leicht erhöhte Mengen an HCAA gegenüber den anderen Transformanten aufwies. Bei der Untersuchung zum Pathogenwachstum von *P. infestans* zeigten sich b1 und V anfälliger als C1 und a4 (Abbildung 3-8). Dennoch zeigte V keine Anzeichen eines Phänotyps, wohingegen alle anderen transformierten Linien (alle acht) Nekrose-ähnliche Symptome ausbildeten.

5. Ansätze und Ausblick

Einige Versuche wurden durch gerätespezifische und zeitlimitierende Faktoren nur einmal durchgeführt, weshalb sie den Kern weiterer Untersuchungen bilden können. Die Experimente zum metabolischen Profil wurden einmal durchgeführt mit $n = 2$ für Wasser als auch *P. infestans*. Die Statistik ist in diesem Fall mit Vorsicht zu behandeln. In Zukunft könnten also Ansätze mit einer größeren Probenzahl, mit einer längeren Infektionszeit (1 dpi bis 3 dpi) und einer umfassenden Analyse der Metaboliten stattfinden.

Ein weiterer Ansatz versteht sich darauf, dass frühere Zeitpunkte einer nativen THT-Akkumulation gesammelt und verarbeitet werden. Bei der Auswertung der beiden vorhandenen Zeitkinetiken mit Pep-13 (3.2) existierte neben den vergleichbaren Zeitpunkten auch ein Wert von 1 hpi. Unter Einbezug von Abbildung 5-1 wird ersichtlich, dass sich bereits nach 1 Stunde höhere Mengen an THT ausgebildet haben (1,6-fach höher als 4 hpi, 5-fach höher als 8 hpi). Durch die statistische Absicherung von 4 hpi wurde jedoch diesem Zeitpunkt der Vorzug gegeben. In Kombination mit pathogenrelevanten Untersuchungen könnten sich womöglich bedeutsamere Ergebnisse herausstellen.

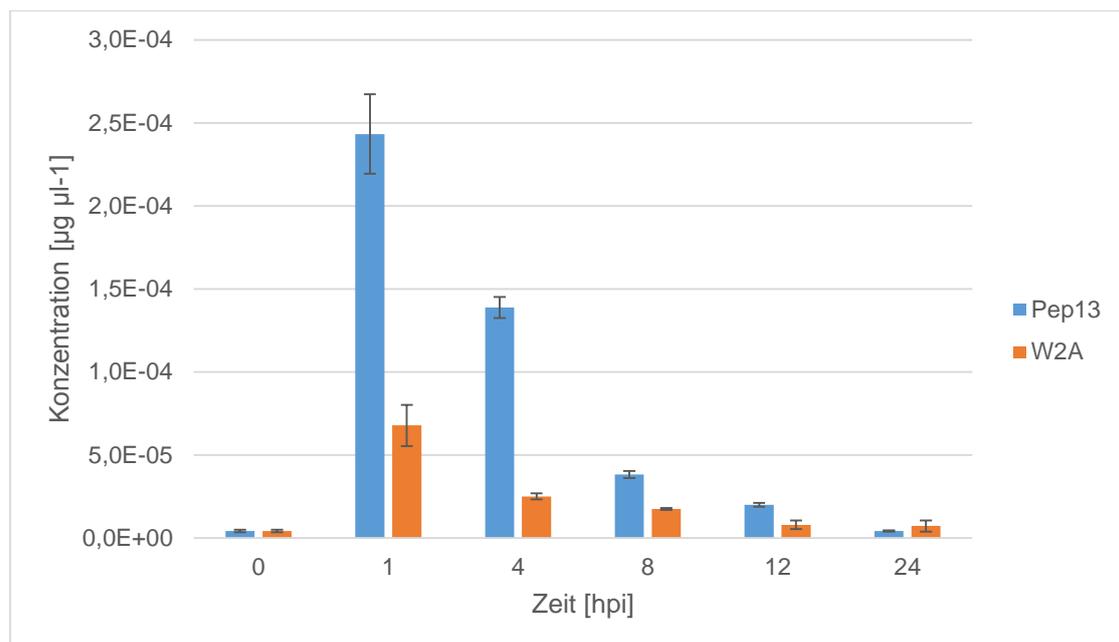


Abbildung 5-1 Absolute Quantifizierung von THT durch die 2. Zeitkinetik Die Quantifizierung von THT erfolgte über eine Eichkurve: Plasmid-DNA mit dem THT-Konstrukt wurde in einer Verdünnungsreihe parallel zu den Proben für die qRT-PCR gegeben. Die Auswertung erfolgte über die resultierenden Konzentrationen. Ein identisches Bild zeichnete sich bei der relativen Quantifizierung von THT durch die 2. Zeitkinetik ab, weshalb auf dessen Darstellung verzichtet wurde. **THT**, Tyramin-Hydroxymizimtsäure-Transferase; **hpi**, hours post infection

Zudem könnten weitere Experimente mit *Phytophthora infestans* durchgeführt werden - unter Einbezug von mehr Transformanten. Dabei sollte die Sporenlösung von *P. infestans* zu Beginn und am Ende der Versuchsreihe als Kontrolle hinzugezogen werden.

Um weiteren Arbeiten zu diesem Thema den Weg zu ebnen, wurden außerdem Fragmente von *StTHT* kloniert. Per Datenbankabfrage mit SGN und NCBI wurde verglichen, ob Homologien existieren. Dazu wurde die genomische DNA der Wildtyp-Linie aus der Sterilkultur isoliert. Die Auswahl der Primer, welche auf THT abgestimmt waren, wurde durch bereits vorhandene Sequenzanalysen aus anderen Arbeiten begünstigt. Durch die Optimierung des PCR-Protokolls konnten somit Fragmente für THT aus *S. tuberosum* isoliert werden. Die darauffolgende Klonierung der jeweiligen Fragmente in den pJET-Vektor und dessen Überführung in kompetente *E. Coli*-Zellen ermöglichte es, transformierte Plasmid-DNA für Sequenzanalysen zu generieren. Die generierten Sequenzen sind im Anhang aufgeführt

Literaturverzeichnis

- Adam, K. P. (1995): **Caffeic acid-derivatives in fronds of the lady fern (*Athyrium filix-femina*)**; *Phytochemistry* (40), 1577 – 1578
- Back, K.; Jang, S. M.; Lee, B.-C. et al. (2001) **Cloning and Characterization of a Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramine N-(Hydroxycinnamoyl)Transferase Induced in Response to UV-C and Wounding from *Capscicum annuum***; *Plant Cell Physiology* 42 (5): 475 – 481
- Barber, M. S.; McConnell V. S & DeCaux, B. S. (2000): **Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways**; *Phytochemistry*, 54: 53 – 56
- Campos, L.; Lisón, P.; López-Gresa, M. P. et al., (2014): **Transgenic Tomato Plants Overexpressing Tyramine N-Hydroxycinnamoyltransferase Exhibit Elevated Hydroxycinnamic Acid Levels and Enhanced Resistance to *Pseudomonas syringae***; *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* Vol. 27 (10): 1159 – 1169
- Cho, S.-H.; Lee, H.R.; Kim, T.H. et al. (2004): **Effects of defatted safflower seed extract and phenolic compounds in diet on plasma and liver lipid in ovariectomized rats fed highcholesterol diets**; *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* (50); 32 – 37
- Collins, F.W. (1989): **Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (37) 60–66
- Correia, A.M.N.G; Leitao, M.C.A.; Clifford M.M. (1995): **Caffeoyl-tyrosine and Angola II as characteristic markers for Angolan robusta coffees**; *Food Chemistry* (53) 309 – 313
- Ehmann, A. (1974): **N-p-(Coumaroyl)tryptamine and Nferuloyltryptamine in kernels of Zea maize**; *Phytochemistry*; (13) 1979–1983
- Facchini, P. J.; Jillian, H. & Zulak, K. G. (2002): **Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry**; *Canadian Journal of Botany*, 80 (6): 577-589
- Farmer, M. J. Czernic, P.; Michael, A. et al. (1999) **Identification and characterization of cDNA clones encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco**; *European Journal of Biochemistry* (263): 686 – 694
- Fattorusso, E.; Lanzotti, V. & Taglialatela-Scafati, O. (1999) **Antifungal N-feruloyl amides from roots of two *Allium* species**; *Plant Biosystems*, Vol. 133 (2)

- Fink, W.; Liefland, M.; Mendgen, K. (1990): **Comparison of various stress responses in oat in compatible and nonhost resistant interactions with rust fungi**; *Physiological and Molecular Plant Pathology* (37); 309 – 321
- Fleurence, J. & Negrel, J. (1987) **Partial purification of tyramine feruloyl transferase from TMV inoculated tobacco leaves**; *Phytochemistry* (28) 733–736
- Foster, S. J.; Park, T.-H.; Pel, M. et al. (2009) **Rpi-vnt1.1, a Tm-22 Homolog from *Solanum venturii*, Confers Resistance to Potato Late Blight**; *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*; Vol. 22 (5): 589 – 600
- Fu, J.; Cheng, K.; Zhang, Z. et al. (2010): **Synthesis, structure and structure–activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials**; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 45 (6), 2638 – 2643
- Georgiev, L.; Chochkova, M.; Ivanova, G.; et al. (2012): **Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines**; *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 89 (2): 91
- Georgiev L., Chochkova M., Totseva I. et al. (2013): **Anti-tyrosinase, antioxidant and antimicrobial activities of hydroxycinnamoylamides**, *Medical Chemistry Research* 22: 4173-4182
- Grandmaison, J.; Olah, G. M.; Van Calsteren M.-R. et al. (1993) **Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots**; *Mycorrhiza* (3): 155 – 164
- Grotewold, E. (2004) **The challenges of moving chemicals within and out of cells: insights into the transport of plant natural products**; *Planta* (219): 906 – 909
- Guillet, G. & De Luca, V. (2005) **Wound-Inducible Biosynthesis of Phytoalexin Hydroxycinnamic Acid Amides of Tyramine in Tryptophan and Tyrosine Decarboxylase Transgenic Tobacco Lines**; *Plant Physiology* 137 (2): 692 – 699
- Hadrami, A. E.; Adam, L. R. & Daayf, F. (2011) **Biocontrol Treatments Confer Protection against *Verticillium dahliae* Infection of Potato by Inducing Antimicrobial Metabolites**; *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, Vol. 24 (3): 328 – 335
- Hagel, J. M. & Facchini, P. J. (2005) **Elevated tyrosine decarboxylase and tyramine hydroxycinnamoyltransferase levels increase wound-induced tyramine-derived hydroxycinnamic acid amide accumulation in transgenic tobacco leaves**; *Planta* (221): 904 – 914

- Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1989): **Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism**; Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology (40); 347–369
- Halim, V. A.; Altmann, S.; Ellinger, D. et al. (2009) **PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid**; The Plant Journal (57): 230 – 242
- Henriquez, M. A.; Adam, L. R. & Daayf, F. (2012) **Alteration of secondary metabolites' profiles in potato leaves in response to weakly and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans***; Plant Physiology and Biochemistry (57): 8 – 14
- Hohlfeld, H.; Schürmann, W.; Scheel, D. et al. (1995): **Partial purification and characterization of hydroxycinnamoylcoenzyme A: tyramine hydroxycinnamoyl-transferase from cell suspension cultures of *Solanum tuberosum***; Plant Physiology (107); 545–552.
- Hotta, Y.; Nagatsu, A.; Liu, W. et al. (2002): **Protective effects of antioxidative serotonin derivatives isolated from safflower against postischemic myocardial dysfunction**; Molecular and Cellular Biochemistry (238), 151 – 162
- Ishihara, A.; Kawata, N.; Matsukawa, T. et al. (2000): **Induction of N-hydroxycinnamoyltyramine synthesis and tyramine N-hydroxycinnamoyl transferase (THT) activity by wounding in maize leaves**; Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (64); 1025 – 1031
- Judelson, H. S. & Blanco, F. A. (2005): **The spores of *Phytophthora infestans*: weapons of the plant destroyer**; Nature Reviews Microbiology (3); 47 – 58
- Jang S.-M.; Ishihara A. & Back K. (2004): **Production of Coumaroylserotonin and Feruloylserotonin in Transgenic Rice Expressing Pepper Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A: Serotonin N-(Hydroxycinnamoyl)transferase**; Plant Physiology, 135 (1): 346-56
- Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. (2006): **The plant immune system**; Nature (444); 323 – 329
- Yogendra, N. Y.; Pushpa, D.; Mosa, K. A. et al. (2014) **Quantitative resistance in potato leaves to late blight associated with induced hydroxycinnamic acid amides**; Functional & Integrative Genomics
- Kang, K.; Park, M.; Park, S. et al. (2009): **Production of plant-specific tyramine derivatives by dual expression of tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase and 4-coumarate:coenzyme A ligase in *Escherichia coli***; Biotechnology Letters 31: 1469 – 1475

- Kobayashi, Y.; Kobayashi, I.; Funaki, Y. (1997): **Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells**; *Plant Journal* (11) 525–537
- König, S.; Feussner, K.; Kaefer, A. et al. (2014) **Soluble phenylpropanoids are involved in the defense response of *Arabidopsis* against *Verticillium longisporium***; *New Phytologist*, 202: 823 – 837
- Lee, D.G.; Park, Y.; Kim, M.R. (2004) **Anti-fungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense***; *Biotechnology Letters* (26), 1125-1130
- Lee, D. E.; Kang, K.; Lee, S.-G. et al. (2007) **Enhanced synthesis of feruloyltyramine and 4-coumaroyltyramine is associated with tyramine availability in transgenic rice expressing pepper tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase**; *Plant Science* (172): 57 – 63
- López-Gresa, M. P.; Torres, C.; Campos, L. et al. (2011) **Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae***; *Environmental and Experimental Botany* 74: 216 – 228
- Louis, V. & Negrel, J. (1991): **Tyramine hydroxycinnamoyl transferase in the roots of wheat and barley seedlings**; *Phytochemistry* (30); 2519–2522.
- Marti, G.; Erb, M.; Boccard, J. et al. (2013) **Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots**; *Plant, Cell and Environment* (36): 621 – 639
- Martin-Tanguy, J.; Cabanne, F.; Perdrizet, E., et al. (1978): **The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants**; *Phytochemistry* (17); 1927–1928
- McLusky, S.R.; Bennett, M.H.; Beale, M.H. et al. (1999): **Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis**; *The Plant Journal* (17); 523–534
- Meurer, B.; Wray, V.; Grotjahn, L. et al. (1986) **Hydroxycinnamic acid spermidine amides from pollen of *Corylus avellana* L.**; *Phytochemistry*, 25: 433 – 435
- Nagatsu, A.; Zhang, H.-L.; Mizukami, H. et al. (2000): **Tyrosinase inhibitory and anti-tumor promoting activities of compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.) oil cakes**; *Natural Product Letters* (14) 153 – 158 .

- Nakane, E.; Kawakita, K.; Doke, N. et al. (2003) **Elicitation of primary and secondary metabolism during defense in the potato**; Journal of General Plant Pathology (69), 378-384
- Narasimhan, B.; Belsare, D.; Pharande, D. et al. (2004): **Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations**. European Journal of Medicinal Chemistry (39); 827 – 834
- Negrel, J. & Martin, C. (1984): **The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum***; Phytochemistry (23); 2797–2801.
- Negrel, F.; Javelle, F.; Paynot, M (1993) **Wound-Induced Tyramine Hydroxycinnamoyl Transferase in Potato (*Solanum tuberosum*) Tuber Disks**; Journal of Plant Physiology, 142: 518 – 524
- Negrel, J.; Pollet, B.; Lapierre, C. (1996): **Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber**; Phytochemistry (43) 1195–1199
- Negrel, J.; Javelle, F.; Paynot, M. (1997): **Wound- Induced Tyramine Hydroxycinnamoyl Transferase in Potato (*Solanum tuberosum*) Tuber Disks**; Journal of Plant Physiology (142); 518 – 524
- Negrel, J. & Javelle, F. (1997) **Purification, characterization and partial amino acid sequencing of hydroxy cinnamoyl-CoA: tyramine N-(hydroxycinnamoyl) transferase from tobacco cell-suspension cultures**; European Journal of Biochemistry (247): 1127 – 1135
- Negrel, J. & Javelle, F. (2001) **L-Tyrosine beta-naphthylamide is a potent competitive inhibitor of tyramine N (hydroxycinnamoyl)transferase in vitro**; Phytochemistry (56): 523 – 527
- Newman, M.-A.; Roepenack-Lahaye, E.; Parr, A. (2001): **Induction of Hydroxycinnamoyl-Tyramine Conjugates in Pepper by *Xanthomonas campestris*, a Plant Defense Response Activated by hrp Gene-Dependent and hrp Gene-Independent Mechanisms**; Molecular Plant-Microbe Interactions, Vol. 14 (6): 785 – 792
- Peipp, H.; Maier, W.; Schmidt, J. et al., (1997): **Arbuscular mycorrhizal fungusinduced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots**; Phytochemistry (44), 581 – 587
- Pfaffl, M. W. (2004) **Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung**; BIOSpektrum, 1/04, 92 – 95

- Pushba, D.; Yogendra, K. N.; Gunnaiah, R. et al. (2014) **Identification of Late Blight Resistance-Related Metabolites and Genes in Potato through Nontargeted Metabolomics**; Plant Biology Molecular Reporter 32: 584 – 595
- Rausch, C.; Zimmermann, P.; Amrhein, N. et al. (2004) **Expression analysis suggest novel roles for the plastidic phosphate transporter Pht2;1 in auto- and heterotrophic tissues in potato and *Arabidopsis***; The Plant Journal (39): 13 – 28
- Samborski, D.J. & Rohringer, R. (1970): **Abnormal metabolites of wheat: occurrence, isolation and biogenesis of 2-hydroxyputrescine amides**; Phytochemistry (9) 1939–1945
- Schmidt, A.; Grimm, R.; Schmidt, J. et al. (1999) **Cloning and Expression of a Potato cDNA Encoding Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramine *N*-(Hydroxycinnamoyl)transferase**; The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274 (7): 4273 – 4280
- Schmidt, A. (1999) **Hydroxyzimtsäureamide in Zellkulturen von Kartoffel: Isolierung und Charakterisierung eines THT cDNA-Klons aus *Solanum tuberosum***; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland
- Smith, T.A. & Best, G.R. (1978): **Distribution of the hordatines in barley**; Phytochemistry (17); 1093–1098
- Spasova, M.; Kortenska-Kancheva, V.; Totseva, I. et al. (2006) **Synthesis of cinnamoyl and hydroxycinnamoyl amino acid conjugates and evaluation of their antioxidant activity**; Journal of Peptide Science, 12: 369 – 375
- Stoessl, A. & Unwin, C.H. (1969): **The antifungal factors in barley. V. Antifungal activity of the hordatines**; Canadian Journal of Botany (48) 465–470
- Sun, L.Y.; Monneuse, M.O.; Martin-Tanguy, J. et al. (1991): **Changes in flowering and accumulation of polyamine and hydroxycinnamic acid-polyamine conjugates in tobacco plants transformed by the rolA locus from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes***; Plant Science (80) 145–146
- Tebayashi, S.-I.; Horibata, Y.; Mikagi, E. et al. (2007) **Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots**; Bioscience Biotechnology Biochemistry 71 (6): 1521 – 1526
- Villegas, M. & Brodelius, P. (1990): **Elicitor-induced hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant cell suspension cultures**; Physiologia Plantarum (78) 414–420

- Werner, C.; Hu, W.; Lorenzi-Riatsch, A, et al. (1995): **Di-coumaroylspermidines and tricoumaroylspermidines in anthers of different species of the genus *Aphelandra***; *Phytochemistry* (40), 461-465
- Wie Q.-Y., Jiang H., Zhang J.-X. et al. (2012): **Synthesis of N-hydroxycinnamoyl amino acid ester analogues and their free radical scavenging and antioxidative activities**, *Medical Chemistry Research* 21: 1905–1911
- Yingyongnarongkul, B.; Apiratikul, N.; Aroonrerk, N. et al. (2006): **Solid-phase synthesis and antibacterial activity of hydroxycinnamic acid amides and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus***; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (16), 5870 – 5873
- Yoshihara, T.; Takamatsu, S.; Sakamura, S. (1978): **Three new phenolic amides from the roots of eggplant (*Solanum melongena* L.)**; *Agricultural and Biological Chemistry* (42); 623–627
- Yu, M. & Facchini, P.J. (1999): **Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N- (hydroxycinnamoyl)transferase from opium poppy**; *Planta* (209) 33–44
- Zhao, J. & Dixon R. A. (2010) **The ‘ins’ and ‘outs’ of flavonoid transport**; *Trends in Plant Science* Volume 15 (2): 72 – 80
- Zhu, J.; Kobamoto, N.; Yasuda, M. et al. (2000): **Synthesis and fungitoxic activity of N-cinnamoyl- alpha -amino acid esters**; *Journal of Pesticide Science* (25); 259 – 262

5.1 Internetquellen

- [URL-1] Vektorkarte von pHELLSGATE 8 durch Snap Gene. Stand 10/2014
http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/plant_vectors/pHELLSGATE_8/
- [URL-2] NCBI Blast-Analyse. Stand 10/2014
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [URL-3] SOL Genomics Network für Blast-Analysen mit Kartoffelpflanzen. Stand 10/2014
<http://solgenomics.net/tools/blast/>
- [URL-4] Phyre²-Software zur Modellierung drei-dimensionaler Strukturen. Stand 10/2014
<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>

Anhang

SrTHT-Sequenzen

Sequenz Schmidt (1999)

1	TCTTTTATCT	TAAACCTCAA	TATTCCTCTC	AACTTAACT	AAACAATATC	50
51	CCATGGCTCC	TGCTCCTCAA	CTTCTACAC	CATCTGAAAC	AATAACCACC	100
101	GATGCATCAT	CGGAAAACAA	CAATGTTACC	ATCACTGAAA	AGATATACAC	150
151	ACGAGTCCGT	CTGGCTACGA	AATCTGATCT	GTCTCATATA	TACCAATTGT	200
201	TTTATCAAAT	CCATGAATAC	CATAACTATA	CTCATTTATA	CAAAGCTACT	250
251	GAGTCCTCCT	TAGCCAACTT	GCTCTTTAAA	GAAAACCCTC	TTCCCCTTTT	300
301	CTACGGGCCA	TCCGTACTTC	TACTTGAAGT	CTCTCCAACC	CCTTTTAACG	350
351	AACCCAAAAA	TACCACAAAC	GAAGGGTTCA	AGCCTGTCCT	TACAACCTTT	400
401	GACCTTAAAT	TCCCTGTGGT	GGAAGGACAA	GTTGAGGAGT	TCAGGTCCAA	450
451	ATATGACGAT	AAGAATGATG	CTTACATTGC	AGGATATGCT	TTCTTTTACG	500
501	CTAATTATTC	ATGTTTCTAT	GACAAGCCAG	GATTCTATTT	TGAGAGTCTT	550
551	TACTTCAGAG	AGAGTTATAG	AAAGTTGGGA	ATGGGGAGTT	TGTTGTTTGG	600
601	AACAGTTGCA	TCTATTGCTG	CAAACAATGG	CTTCGTATCG	GTAGAGGGAA	650
651	TAGTAGCAGT	TTGGAATAAA	AAGTCATATG	ATTTTACAT	AAATATGGGA	700
701	GTTGAAATTT	TTGATGAGTT	TAGGTATGGC	AAGTTGCATG	GTGAAAATCT	750
751	TCAAAAGTAT	GCTGATAAAA	AGGACGAAAA	CGGCGAAGGG	AGCTGTTAGT	800
801	AGAGAATGGC	TTTTTGTGTG	CCTAATTGTG	CAATTTATTA	ATTTCTATTT	850
851	GTGATTATAT	TGTA AAAACCA	GAATGCTCAT	TATATTTGTA	ATTTGAAAAT	900
901	AAAATAAAAT	TGGTAATTGT	GATATTATAT	TAAATCCA		938

Sequenze Nakane et al. (2003)

1	ATTTCTTTCC	TCTCAAACCT	AGCTAAACAA	TATCTCATGG	CTCCTGCTCC	50
51	TCAACAACCA	ACTCCATCTG	AAACAATAAT	CACCGATGCA	TCATCGGAAA	100
101	ACAATAACGT	TACCATCACC	GGAAAGATAT	ACACACGAGT	CCGTCTCGCT	150
151	ACAAAATCTG	ATCTGTCTCA	TATATACCAA	TTGTTTTACC	AAATTCATGT	200
201	CTACCATAAT	TTCACTCATT	TATACAAAGC	TACAGAGTCC	TCCTTAGAGG	250
251	GCTTGCTTTT	TAAAGAAAAT	CCTCTTCCAC	TTTTCTACGG	GCCATCCGTA	300
301	CTTCTACTTG	AAGTCTCTCC	AACCCCTTTT	AACGAACCTA	AAAATACCAC	350
351	GGACGAAGGG	TTCAACCCCG	TCCTTACAAC	GTTGACCTT	AAATTCCTG	400
401	TGGTAGAAGG	ACAAGTTGAG	GAGTTCCGGT	CCAAATATGA	TGATAAGAGT	450

451	GATGCTTACA	TTGCAGGATA	TGCTTTCTTT	TACGCTAATT	ATTCATGCTT	500
501	CAATGACAAG	CCTGGATTTT	ATTTTGAGAG	TCTTTACTTC	AGAGAGAGTT	550
551	ATAGAAAATT	GGGAATGGGG	AAATTGTTGT	TTGGAACAGT	TTCGTCCATT	600
601	GCTGCGGACA	ATGGATTCGT	ATCGGTGGAT	GGAATAGTAG	CAGTTTGGAA	650
651	TAAGAAGTCA	TATGATTTTT	ACATAAATAT	GGGAGTTGAA	ATTTTTGATG	700
701	AGTTTAGGTA	TGGCAAATTG	CATGGTGAAA	ATCTTCAAAA	GTATGCTGAT	750
751	AAGGGGAAAA	TTGAGGAAGA	GACATGTTAG	TATATAGTGT	TGTTTTATTC	800
801	TTATAATAAT	TGTGTAATTT	ATCAATTTCT	TCATATTTGC	TTTTACTAAA	850
851	AGCAGTTGTA	TTATCTTTGT	AATTGAAATT	TATTAAATTG	ATTATGTATT	900
901	AAAAAAAAAA	AAAAAAA				917

Fragment S_fTHT#22 und S_fTHT#23

1	ATGGCTCCTG	CTCCTCAACA	ACCAACTCCA	TCTGAAACAA	TAATCACCGA	50
51	TGCATCATCG	GAAAACAATA	ACGTTACCAT	CACCGGAAAG	ATATACACAC	100
101	GAGTCCGTCT	TGCTACAAAA	TCTGATCTGT	CTCATATATA	CCAATTGTTT	150
151	TACCAAATTC	ATGTCTACCA	TAATTTCACT	CATTTATACA	AAGCTACTGA	200
201	GTCCTCCTTA	GAGGGCTTGC	TTTTTAAAGA	AAATCCTCTT	CCACTTTTCT	250
251	ACGGTCCATC	CGTACTTCTA	CTCGAAGTCT	CTCCAACCCC	TTTTAACGAA	300
301	CCCAAAAATA	CCACTAACGA	AGGGTTC AAG	CCTGTCCTTA	CAATGTTCGA	350
351	CCTTAAATTC	CCTGTCATTG	AAGGAGAAGT	TGAGGAGTTC	AGGTCCAAAT	400
401	ATGATGATAA	GAGTGATGCT	TACATAGCGG	GATATGCTTT	CTTCTACGCG	450
451	AATTATTCTT	GCTTCAATGA	CAAGCCCGGA	TTTTATTTTG	AGAGTCTTTA	500
501	CTTCAGAGAG	AGTTATAGAA	AGTTGGGAAT	GGGAAAATTG	TTGTTTGGAA	550
551	CAGTTTCGTC	CATTGCTGCG	GACAATGGGT	TCGTATCGGT	GGATGGAATA	600
601	GTAGCAGTTT	GGAATAAGAA	GTCATATGAT	TTTTACATAA	ATATGGGAGT	650
651	TGAAATTTTT	GATGAATTTA	GATATGGGAA	GTTGCATGGT	GAAAATCTTC	700
701	AAAAGTATGC	TGATAAGGGG	AAAATTGAGG	AAGAGACATG	T	741

Fragment S_fTHT#24

1	ATGGCTCCTG	CTCCTCAACT	TTCTACTCCA	TCTGAAACAA	TAGCCACCGA	50
51	TGCATCATTG	GAAAGCAACA	ACGTTACCAT	TACTGGAAAG	ATATACACAC	100
101	GAGTCCGTCT	GGCTACGAAA	TCTGATCTGT	CTCATATATA	CCAATTGTTT	150
151	TATCAAATCC	ATGAATATCA	TAACTATACT	CATTTATACA	AAGCTACTGA	200
201	GTCCTCCTTA	GCTAACTTGC	TCTTTAAAGA	AAACCCTCTT	CCACTTTTCT	250
251	ATGGGCCATC	CATACTTATA	CTTGAAGTCT	CTCCAACCCC	TTTTAAAGAA	300

301	GCCAAGAATG	AAGGGTTCAA	TCCCGTCCTT	ACAACGTTTCG	ACCTTAAATT	350
351	CCCTGTGGTG	GAAGGACAAG	TTGAGGAATT	CAGATCCAAA	TATGATGATA	400
401	AGAGTGATGT	TTACATCGCG	GGATATGTTT	TCTTTTACGC	GAATTATTCA	450
451	TGCTTCAATG	ACAAGCCAGG	ATTATATTTG	GAGAGTCTTT	ACTTAAGAGA	500
501	AAGTTATAGA	AAGTTGGGTA	TGGGGAAATT	ATTGTTTGGA	ACAGTTTCAT	550
551	CCATTGCTGC	CAACAATGGG	TTCGTTTCGT	TAGAGGAAAT	AGTAGCAGTT	600
601	TGGAATAAAA	AGGCATATGA	TCTTTACATA	AATATGGGGC	TCGAAATATT	650
651	TGATGAGTTT	AGGTATGGGA	AGTTGCATGG	TGAAAATCTT	CAAAAGTATG	700
701	CTGATAATAA	GGGGAAAATT	GAGGAAGAGA	CATGT		735

Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Das bearbeitete Thema wurde nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt und/oder anderswo als Prüfungsarbeit eingereicht.

Danksagung

Zuletzt möchte ich an dieser Stelle all den Personen danken, welche mir tatkräftig zur Seite standen und durch welche diese Arbeit nie zustande gekommen wäre:

Prof. Dr. Dierk Scheel möchte ich danken, dass er es mir ermöglicht hat in der Abteilung für Stress- und Entwicklungsbiologie des IPB zu arbeiten.

Prof. Dr. Sabine Rosahl möchte ich für die umfassende Betreuung meiner Masterarbeit in Ihrer Forschungsgruppe danken und dass sie mir diesen Themenkomplex in ihren Vorlesungen auf lehrreiche Weise schmackhaft gemacht hat. Mit Ihrem umfangreichen Wissen wurden für jede Etappe dieser Arbeit neue, spannende Ansätze gefunden, welche ich umsetzen konnte.

Melanie Dobritsch möchte ich dafür danken, dass sie trotz Ihrer Dissertationsarbeiten Zeit für mich und meine Arbeit gefunden hat und dass sie mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat durch die Erstellung transgener Pflanzen im Rahmen ihrer eigenen Versuche. Es war eine lustige aber auch aufschlussreiche Zeit in deiner „Bucht“.

Ulrike Smolka möchte ich danken, dass sie Zeit und Ratschläge für all meine Fragen im Labor hatte und dass sie mich zu jeder noch so kleinen Chemikalie lotsen konnte.

Dem Laborteam der induzierten Pathogenabwehr, zu welchem neben den bereits genannten Personen auch Anderas Matern, Juliane Rausche und Linda Nietzsche zählen. Es war mir eine Freude jeden Morgen zu euch zu stoßen und mit euch zu arbeiten. Vielen Dank für die wunderbare Atmosphäre und dem ein oder anderen witzigen Moment.

Der Kaffeekunde der Stress- und Entwicklungsbiologie, zu welchen sich u.a. noch Dr. Lennart Eschen-Lippold und Martin Weyhe hinzugesellen. Es tat gut neben Laborprotokollen auch das ein oder andere Backprotokoll abzuarbeiten.