

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie

Etablierung einer RNAi-Methode zur funktionellen Genomik in Erdbeeren

Gregor Konstantin Kalinowski

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 25.06.2009 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.09.2009
angenommen.

Etablierung einer RNAi-Methode zur funktionellen Genomik in Erdbeeren

Gregor Konstantin Kalinowski

Meiner Familie

Dissertation

Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie der TU München,

Freising im Juni 2009

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation "Etablierung einer RNAi-Methode zur funktionellen Genomik in Erdbeeren" wurde von November 2004 bis Dezember 2007 am Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie an der Technischen Universität München durchgeführt.

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht oder als Manuskript eingereicht:

Originalartikel

Hoffmann, T., Kalinowski, G. und Schwab, W. (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration. A rapid assay for gene function analysis. *Plant J.* **48**, 818-826

Kalinowski, G., Hoffmann, T., Schwab, W. (2007) Studien zur schnellen Herabregulation reifekorrelierter Gene in Erdbeerfrüchten. *Lebensmittelchemie* **61**, 151-152

Vortrag

Kalinowski, G., Hoffmann, T., Schwab, W. Studien zur schnellen Herabregulation reifekorrelierter Gene in Erdbeerfrüchten. 58. Arbeitstagung Regionalverband Bayern, Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Universität Würzburg, 13. März 2007

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die vielfältige Unterstützung, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, mich in Spanien molekularbiologisch weiterzubilden.

Herrn Dr. Thomas Hoffmann gilt mein herzlicher Dank für die förderlichen fachlichen Diskussionen und die Unterstützung bei den RNAi Experimenten und der statistischen Auswertung der Messergebnisse.

Bei Herrn Prof. Dr. Victoriano Valpuesta möchte ich mich für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis an der Universidad de Málaga, Spanien, arbeiten zu können, bedanken.

Herrn Dr. Thilo Fischer vom Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TU München, danke ich für die Unterstützung bei den CHS Enzym Assays.

Frau Dr. Ingrid Schmöller und Herrn Nico Gebhardt vom Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, TU München, bin ich für die Unterstützung bei den qPCR Messungen der FaOMT Expression dankbar.

Herrn Dr. Robert Ludwig, University of California, Santa Cruz, USA, gilt mein Dank für die Bereitstellung des *A. tumefaciens* Stamms AGL0.

Frau Dr. Elma Salentijn, Plant Research International, Wageningen, Niederlande, danke ich für die Bereitstellung des Vektors pBINPlusCHSas und der Nukleotidsequenz des *DBP*.

Herrn Prof. Dr. Erwin Grill von Lehrstuhl für Botanik, TU München, danke ich für das GUS Kontroll Konstrukt und einige andere Vektoren.

Allen Kollegen am Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie gilt mein herzlicher Dank für die gute Zusammenarbeit und die hervorragende Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich Barbara Fink, Hannelore Meckl, und Robert Kurtzer für ihre ausgezeichnete Arbeit als technische Assistenten danken.

Für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen von Studentendarbeiten möchte ich mich bedanken bei: Marie-Louise Cezanne, Eva Evgenieva Chervenkova, Alexandra Dangel, Viktoria Doll und Johannes Polz.

Bei der Degussa AG bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung und die Möglichkeit ihre Räumlichkeiten und Geräte zu nutzen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Förderung dieses Projekts (SCHW 634/10-1).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	4
1 Einleitung	6
1.1 Die Erdbeere.....	6
1.1.1 Botanische Sicht.....	7
1.1.2 Inhaltsstoffe der Erdbeere	11
1.2 Phenylpropanoidstoffwechsel	17
1.3 Ligninbiosynthese	20
1.4 Chalconsynthase (CHS).....	23
1.5 O-Methyltransferase (OMT)	28
1.6 Untersuchungen des Sekundärstoffwechsels reifender Erdbeerfrüchte	32
1.6.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten <i>in vitro</i>	32
1.6.2 Analyse von Genexpressionen verschiedener Enzyme des Sekundärstoffwechsels.....	33
1.6.3 Untersuchungen an rekombinanten Enzymen.....	35
1.6.4 Studien von Genfunktionen <i>in planta</i>	36
1.7 RNA Interferenz (RNAi).....	37
1.8 Aufgabenstellung	44
2 Ergebnisse	48
2.1 Analysegrundlagen und genetische Modifikationen	48
2.1.1 Transfektion der Erdbeerfrüchte.....	50
2.1.2 pBI-Intron als Kontrolle	51
2.1.2.1 Expression des β -D-Glucuronidase-Gens in pBI-Intron Früchten	51
2.1.2.2 β -D-Glucuronidase Aktivität in transfizierten Erdbeeren	52
2.2 Herabregulation der <i>FaCHS</i> durch <i>intron-hairpin</i> -Konstrukte.....	53
2.2.1 Expressionsanalyse der herabregulierten <i>FaCHS</i> Früchte.....	55
2.2.2 Metabolitanalyse der herabregulierten <i>FaCHS</i> Früchte.....	58
2.2.3 Ligninbestimmung in den herabregulierten <i>FaCHS</i> Früchten	62
2.2.3.1 Festigkeitsbestimmung der herabregulierten <i>FaCHS</i> Früchte	63

2.2.3.2	Gesamtligningehalt in den herabregulierten <i>FaCHS</i> Früchten	65
2.2.3.3	Ligninzusammensetzung in den herabregulierten <i>FaCHS</i> Früchten	66
2.3	Einfluss der Nukleotidsequenz auf die RNA Interferenz und transitive Genstilllegung	71
2.3.1	Herabregulation der <i>FaOMT</i> durch die Sequenzabschnitte A bis E.....	72
2.3.1.1	Expressionsanalyse der herabregulierten <i>FaOMT</i> Früchte A bis E.....	73
2.3.1.2	Metabolitanalyse der herabregulierten <i>FaOMT</i> Früchte A bis E.....	75
2.3.2	Herabregulation der <i>FaCHS</i> durch die Sequenzabschnitte A bis E.....	79
2.3.2.1	Phänotypen der herabregulierten <i>FaCHS</i> Früchte A bis E....	80
2.3.2.2	Expressionsanalyse der herabregulierten <i>FaCHS</i> Früchte A bis E	81
3.	Diskussion.....	84
3.1	RNA Interferenz als Methode zur gezielten Herabregulation reifekorrelierter Gene in Erdbeerfrüchten	84
3.1.1	Transfektion der Erdbeerfrüchte.....	87
3.1.2	Kontrolle der Transformation durch transiente Expression einer β -D-Glucuronidase	88
3.2	RNAi-induzierte Herabregulation der <i>FaCHS</i>	89
3.3	Auswirkungen des durch transiente Stilllegung der <i>FaCHS</i> veränderten Stoffwechsels am Beispiel des Lignins der Erdbeerfrüchte	96
3.4	Einfluss der Nukleotidsequenz auf die RNA Interferenz und transitive Genstilllegung	103
3.4.1	Herabregulation der <i>FaOMT</i> durch unterschiedliche Abschnitte der Nukleotidsequenz	106
3.4.2	Herabregulation der <i>FaCHS</i> durch unterschiedliche Abschnitte der Nukleotidsequenz	111
3.5	Ausblick.....	113

4	Material und Methoden	116
4.1	Material	116
4.1.1	Chemikalien.....	116
4.1.2	Pflanzen	116
4.1.3	Bakterienstämme.....	116
4.1.4	Vektoren	117
4.1.4.1	pBI-Intron.....	117
4.1.5	Enzyme	118
4.1.6	Primer	119
4.1.7	Kommerzielle Kits.....	121
4.1.8	Medien, Puffer und sonstige Lösungen	121
4.2	Geräte	125
4.2.1	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations- Massenspektrometrie (LC-ESI-MS).....	125
4.2.2	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)	126
4.2.3	Real-Time PCR Systeme	127
4.2.4	Sonstige Geräte.....	127
4.2.5	Software und Internetressourcen.....	128
4.3	Methoden	129
4.3.1	Grundlegende molekularbiologische Arbeitstechniken	129
4.3.1.1	Isolierung von RNA	129
4.3.1.2	DNase Verdau	130
4.3.1.3	Quantifizierung der RNA	130
4.3.1.4	cDNA Synthese	131
4.3.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	132
4.3.1.6	Agarosegelelektrophorese und Dokumentation.....	133
4.3.1.7	DNA Präparationen	134
4.3.1.8	Klonieren von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten	134
4.3.1.9	Restriktionsverdau und Auffüllen klebriger Enden.....	135
4.3.1.10	Vektor-Dephosphorylierung.....	135
4.3.1.11	Phosphorylierung der PCR-Produkte	136
4.3.1.12	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	136
4.3.1.13	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	136
4.3.1.14	Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen	137
4.3.1.15	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	137

4.3.1.16	Kolonie-PCR.....	137
4.3.1.17	DNA-Fällung und Sequenzierung.....	137
4.3.1.18	Anlegen von Glycerinkulturen.....	138
4.3.2	Klonierungsstrategien für <i>intron-hairpin</i> -Konstrukte	138
4.3.3	Einteilung der Nukleotidsequenzen in überlappende Abschnitte	142
4.3.3.1	Gesamtabdeckung der mRNA Sequenz der <i>FaOMT</i>	142
4.3.3.2	Gesamtabdeckung der mRNA Sequenz der <i>FaCHS</i>	143
4.3.4	Transfektion der Erdbeerfrüchte mit <i>A. tumefaciens</i> AGL0	144
4.3.5	GUS-Assay.....	145
4.3.5.1	Histochemische Färbung.....	145
4.3.5.2	Fluorometrische Aktivitätsbestimmung	145
4.3.6	Genexpressionsanalyse	146
4.3.6.1	Semiquantitative PCR	146
4.3.6.2	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	147
4.3.7	Quantifizierung von Metaboliten durch LC-ESI-MS ⁿ	148
4.3.7.1	Extraktion der pBI- <i>CHSi</i> Früchte	150
4.3.7.2	Ethylacetatextrakte <i>FaOMT</i>	150
4.3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	151
4.3.9	Bestimmung der Proteinaktivität.....	151
4.3.10	Texture Analyser	152
4.3.11	Bestimmung des Ligningehalts der Erdbeerfrüchte	153
4.3.11.1	Zellwandpräparation einzelner Erdbeerfrüchte.....	153
4.3.11.2	Bestimmung von Gesamtlignin durch Thioglycolsäurereaktion	154
4.3.12	<i>Derivatization Followed by Reductive Cleavage</i> (DFRC) Methode zur Bestimmung der Monolignole	155
4.3.12.1	Isolierung von Lignin aus Erdbeerfrüchten	155
4.3.12.2	Acetylierungsreaktion DFRC-Methode	156
4.3.12.3	Darstellung der Alkohole für DFRC als Standard	157
4.3.12.4	Analyse der Monolignole mittels GC-MS.....	158
4.3.13	Datenauswertung	159
4.3.13.1	Box Plots	159
4.3.13.2	Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test.....	159
5	Literatur	160
6	Anhang.....	184

Abkürzungsverzeichnis

4CL	p-Cumarsäure-CoA-Ligase
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
Ac	Acetat
A260	Absorption bei 260 nm
AEVD	Aromaextraktverdünnungsanalyse
AGO	Proteine aus der Argonaute Familie
amiRNA	<i>artificial microRNA</i> (künstliche miRNA)
ANR	Anthocyanidinreduktase
ANS	Anthocyanidinsynthase
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Box-Plot	Box-Whiskers-Plot
C3H	p-Cumarsäure-3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CT	<i>cycle threshold</i>
CAD	Zimtalkohol Dehydrogenase
CCR	Zimtsäure-CoA-Reduktase
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CHI	Chalconisomerase
CHS	Chalconsynthase
CIP	<i>Calf Intestine Phosphatase</i> (Kalb Darm Phosphatase)
CCoA3H	p-Cumarsäure-CoA-3-Hydroxylase
CCOMT	Kaffeesäure-CoA-O-Methyltransferase
COMT	Kaffeesäure-O-Methyltransferase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv.	Cultivar
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DBP	DNA Bindeprotein
DC	Dünnschichtchromatographie
DCL	Dicer-like Enzyme
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DICER	(engl. Zerschneider) RNaseIII ähnliches Enzym
DMMF	2,5-Dimethyl-4-methoxy-3[2H]-furanon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsRNA	<i>double stranded</i> RNA (doppelsträngige RNA)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Eppendorf [®] Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg)
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i> (transkribierte Nukleotidsequenzen eines Gewebes in einer cDNA Bibliothek)
F3GT	Flavonoid-3-glucosyltransferase
F5H	Ferulasäure-5-Hydroxylase
F7GT	Flavonoid-7-glucosyltransferase
<i>FaCHS</i>	<i>Fragaria x ananassa</i> Chalconsynthase
<i>FaGT1</i>	<i>Fragaria x ananassa</i> Anthocyanidin-Glycosyltransferase
<i>FaGT2</i>	<i>Fragaria x ananassa</i> Glycosyltransferase
<i>FaOMT</i>	<i>Fragaria x ananassa</i> O-Methyltransferase
<i>FaQR</i>	<i>Fragaria x ananassa</i> Chinon-Oxidoreduktase
FGT	Flavonoid-glycosyltransferase
FHT	Flavanon-3-Hydroxylase
FLS	Flavonol Synthase
for	<i>forward</i> (Vorwärts)
g	Erdbeschleunigung
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>)
Glc	Glucose
GUS	β-D-Glucuronidase
HDMF	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)-furanon
HEN1	sRNA spezifische Methyltransferase
hpRNA	<i>hairpin</i> RNA (Haarnadelstruktur der RNA)

HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HYL1	dsRNA <i>binding protein</i> (dsRNA Bindeprotein)
ihpRNA	<i>intron-hairpin</i> -RNA (Intron separierte Haarnadelstruktur der RNA)
IR	<i>inverted repeat</i> (selbstkomplementäre Nukleotidsequenz)
kb	Kilobase(n)
LAR	Leukoanthocyanidin-4-Reduktase
LB	Luria-Bertani
LC-ESI-MS	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
MES	2-Morpholinethansulfonsäure
miRNA	<i>micro</i> RNA (kurze endogene ssRNA)
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
MS-Salze	Murashige and Skoog Basal Salzmischung
nt	Nukleotid(e)
<i>o</i>	<i>ortho</i>
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
OMT	O-Methyltransferase
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
<i>p</i>	<i>para</i>
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Pektinesterase
PEG	Polyethylenglycol
PEL	Pektatlyase
PG	Polygalacturonidase
PGIP	<i>polygalacturonase-inhibiting protein</i> (Polygalacturonidase inhibierendes Protein)
POD	zellwandgebundene Peroxidase
PTGS	<i>post-transcriptional gene silencing</i> (Posttranskriptionelle Herabregulierung einer Genexpression)
PVP	Poly(vinylpolypyrrolidon)
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion

rev	<i>reverse</i> (Rückwärts)
RdRP	RNA <i>dependent</i> RNA polymerase (RNA-abhängige RNA Polymerase)
RISC	RNA- <i>induced silencing complex</i> (RNA induzierter <i>silencing</i> Komplex)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	<i>reverse transcription</i> (reverse Transkription)
SAAT	<i>strawberry alcohol acyltransferase</i> (Erdbeer Alkohol-Acyl-CoA-Transferase)
SAH	S-Adenosyl-homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDE3	mutmaßliche RNA Helicase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGS3	<i>coiled-coil</i> Protein unbekannter Funktion aus <i>Arabidopsis</i>
sRNA	<i>short</i> RNA (20-26 nt lange dsRNA)
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA (21 nt lange Haarnadelstruktur der RNA)
siRNA	<i>short interfering</i> RNA (kurze beeinflussende RNA)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (einzelne Veränderung der Basensequenz der DNA)
ssRNA	<i>single stranded</i> RNA (einzelsträngige RNA)
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGS	<i>transcriptional gene silencing</i> (Transkriptionale Genstilllegung)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDPGFT	UDP-Glucose:Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase
U-Test	Wilcoxon-Mann-Whitney <i>U</i> -Test
UV	Ultraviolett
VIGS	<i>virus induced gene silencing</i> (virusinduzierte Genstilllegung)
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid

Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode
Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginsäure	Asp
Cystein	Cys
Glutamin	Gln
Glutaminsäure	Glu
Glycin	Gly
Histidin	His
Isoleucin	Ile
Leucin	Leu
Lysin	Lys
Methionin	Met
Phenylalanin	Phe
Prolin	Pro
Serin	Ser
Threonin	Thr
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr
Valin	Val

Datenbankeinträge der Nukleotidsequenzen GenBank[®] Accession Number

FaCHS AI795154 (Aharoni *et al.* 2000).

FaCHS Volllänge PP4_C5 (s. Anhang)

CHSA partielle cDNA Sequenz (s. Anhang)

OMT AF220491

Actin AB116565

FaQR AY158836 Intron 1 und 2

DBP Sequenz aus Schaart *et al.* (2002)

Zusammenfassung

Das Einschleusen von doppelsträngiger Ribonukleinsäure (dsRNA), die korrespondierend zu spezifischen endogenen Gensequenzen ist, führt in vielen Organismen zur Inhibierung der entsprechenden Genfunktion. Dieser Effekt, auch RNA-Interferenz (RNAi) genannt, hat sich schon bald nach seiner Entdeckung als wichtiges Werkzeug der Genomforschung bewährt und die Genfunktionsanalyse revolutioniert. Mit relativ geringem Aufwand kann nun gezielt und sehr wirksam die Aktivität von einzelnen Genen abgeschaltet werden, um die resultierenden Effekte zu studieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer RNAi-Methode zur Funktionsanalyse von Genen bei der Erdbeerfruchtreifung.

Dazu wurden reife Erdbeerfrüchte (*Fragaria x ananassa* cv. Elsanta) durch die Infiltration von *Agrobacterium tumefaciens* Zellen mit selbstkomplementären *intron-hairpin* (ihp) Konstrukten der Zielgene *FaCHS* (*Fragaria x ananassa* Chalconsynthase) und *FaOMT* (*Fragaria x ananassa* O-Methyltransferase) transfiziert. Die Expression von ihpRNAs in den Zellen der Erdbeerfrüchte löste eine RNA-Interferenz aus, die zu einer spezifischen Verringerung des mRNA Transkripts und der jeweiligen Enzymaktivität führte. Diese transiente Genstilllegung (*silencing*) konnte durch die Analyse der korrespondierenden Metabolite bestätigt werden. Die Herabregulation der FaCHS Aktivität führte zu einem verminderten Pelargonidingehalt, daraus resultierte ein sichtbar hellerer Phänotyp der reifen Erdbeerfrüchte. Die Stilllegung der Genfunktion der FaOMT führte zu einem verringerten Gehalt an 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3[2H]-furanon (DMMF). Die Effekte waren mit denen in stabil transgen herabregulierten Erdbeerpflanzen vergleichbar.

Die Ausprägung der Herabregulation war von dem verwendeten Sequenzabschnitt des Zielgens unabhängig, alle eingesetzten Nukleotidsequenzen über die gesamten Vollängen beider Zielgene, mit Längen von 219 bis 303 Basenpaaren, führten zu einer signifikanten Herabregulation der jeweiligen Genexpression.

Aufgrund der Untersuchungen zum Einfluss der Zielstruktur kann ein transitiver Effekt der Signalfortpflanzung auf die transiente Genstilllegung mittels Expression von ihpRNAs vermutet werden. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass für beide Gene über die gesamte Volllänge eine gleichmäßige Herabregulierung erreicht wurde.

Weiterhin konnte kein Einfluss der verwendeten Nukleotidsequenzen auf die Effizienz der Genstilllegung festgestellt werden. Die Mediane der relativen Genexpressionen und der analysierten Metabolite lagen für alle untersuchten Teilabschnitte der Volllänge der *FaOMT* auf etwa demselben Niveau, so dass keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten. Somit besteht auch keine Korrelation zwischen den herabregulierten Genaktivitäten und den relativen Zugänglichkeiten der Zielstrukturen. Auch für die Expression der *FaCHS* konnte für die Effizienz der Stilllegung der Genfunktion kein Unterschied zwischen den verschiedenen Nukleotidsequenzen ermittelt werden.

Die signifikant verringerte Enzymaktivität der *FaCHS* durch eine Stilllegung der Genfunktion und die entsprechend signifikante Verschiebung der betroffenen Metabolite lässt außerdem die Herabregulation von homologen Allelen des Zielgens im Blütenboden vermuten. Die denkbare RNAi-induzierte Stilllegung von Genen mit homologen Nukleotidsequenzen (*cross-silencing*) war unwahrscheinlich, konnte jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Ein für die Stilllegung der *FaCHS* beobachteter *off target* Effekt war die signifikant erhöhte Festigkeit der Erdbeerfrüchte mit herabregulierter Genfunktion. Durch die verminderte *FaCHS* Aktivität akkumulierten die Vorläufermoleküle der Flavonoidbiosynthese. In Folge wurden diese Phenylpropanoide anstatt in den Flavonoid- in den Ligninstoffwechsel umgeleitet. Daraus resultierte eine vermehrte Bildung von Lignin in den Früchten mit herabregulierter *FaCHS*, das zu der erhöhten Festigkeit führte.

Durch den Einsatz einer entsprechenden Transfektionskontrolle (pBI-Intron) konnten bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen methodisch bedingte Veränderungen ausgeschlossen werden. Insgesamt sind auch unter Berücksichtigung eventueller *off-target* Effekte die Genfunktionen spezifisch herabreguliert.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Methode der transienten RNAi zur Genstilllegung in Erdbeerfrüchten ist ein für die funktionelle Analyse reifekorrelierter Gene *in planta* sehr gut geeignetes System. Verglichen mit der Methode des stabil transgenen *silencing* benötigt dieses hier vorgestellte transiente System wesentlich weniger Zeit. Dieser Vorteil und die leichte Übertragbarkeit durch die Agrobakterieninfiltration macht es auch für die Anwendung in anderen Früchten interessant.

Summary

The introduction of doublestranded ribonucleic acid (dsRNA) that corresponds to specific endogenous gene sequences results in the inhibition of the homologous gene function in many organisms. Soon after its discovery, this effect — called RNA interference (RNAi) — was established as an important tool in genomics research. This is because the specific and efficient shutdown of the activity of single genes is possible with relatively little effort. The goal of the present study is to establish a RNAi-method to analyse the function of genes related to the ripening of strawberry fruits.

To this end, ripening strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* cv. Elsanta) were transfected by infiltrating them with *Agrobacterium tumefaciens* cells carrying self-complimentary *intron-hairpin* (ihp) constructs of the target genes *FaCHS* (*Fragaria x ananassa* Chalcone synthase) and *FaOMT* (*Fragaria x ananassa* O-methyltransferase). Expression of ihpRNAs in the fruit cells triggered RNA interference, causing specific lowering of the mRNA transcript and associated enzyme activity. This transient gene silencing was confirmed by analyzing the corresponding metabolites. Downregulation of the FaCHS activity led to reduced levels of pelargonidin, thus resulting in a more pale phenotype of the ripe fruits, while silencing of the FaOMT gene function led to a reduced level of 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (DMMF). The effects were comparable to those seen in strawberry plants with stable transgenic silencing.

The occurrence of silencing was independent of the nucleotide section of the target gene that was used. That is, all sequences along the full lengths of both target genes (219 to 303 bp) resulted in a significant silencing of the respective gene expression.

Analysis of the influence of the target structure on transient gene silencing through expression of ihpRNAs suggests a transitive propagation of the silencing signal. This hypothesis is supported by uniform downregulation along the full lengths of both genes.

Furthermore, nucleotide sequence did not influence silencing efficiency. Median relative gene expression and metabolite levels were approximately the same for all examined nucleotide sequence sections of the *FaOMT*. Hence no correlation exists between the downregulated gene activities and the relative accessibility of the target structures. Finally, silencing efficiency of *FaCHS* expression was also independent of nucleotide sequence.

The significantly reduced enzyme activity of the *FaCHS* caused by the silencing of the gene function and the corresponding significant shift in the respective metabolite levels suggests that homologous alleles of the target gene in the receptacle are silenced. However, RNAi-induced cross silencing could not be ruled out completely.

An observed off-target effect of *FaCHS* silencing was the significantly increased firmness of the strawberry fruit with downregulated gene function. The decreased *FaCHS* activity resulted in the accumulation of precursor molecules to flavonoid biosynthesis. As a consequence, these phenylpropanoids were redirected from flavonoid to lignin metabolism. Strawberry fruit with downregulated *FaCHS* showed an increased lignin synthesis, thus resulting in an increase in firmness.

As a consequence of the application of an appropriate transfection control (pBI-Intron) in this study, methodological effects could be excluded. Even when possible off-target effects are taken into account, the evidence points to specific downregulation of gene function.

The method of transient RNAi in strawberry fruit presented in this study is a useful system for the functional analysis of ripening-related genes *in planta*. Compared to the method of stable transgenic silencing, the presented method of transient RNAi requires less time. This advantage and the good transferability through agroinfiltration suggest that it may also be applicable to other fruits.

1 Einleitung

1.1 Die Erdbeere

Schon von den Römern wurde die Erdbeere im Garten und als Nutzpflanze kultiviert. Dabei handelte es sich um die Walderdbeere *Fragaria vesca*, deren natürliches Verbreitungsgebiet mit Ausnahme von Portugal und dem nördlichsten Skandinavien ganz Europa umfasst. *F. vesca* ist die weltweit verbreitetste *Fragaria*-Art und auch in Algerien, sowie weiten Teilen Asiens, ganz Nord- und Südamerika und den Inseln des Pazifiks heimisch.

Im Mittelalter wurden in Europa Erdbeeren großflächig angebaut, ertragsoptimiert und auch der Erntezeitpunkt wurde züchterisch beeinflusst. Die Fruchtgröße konnte allerdings nicht gesteigert werden. Dies gelang erst durch die Sorten der neuen Welt, die nordamerikanische Scharlacherdbeere *Fragaria virginiana*, die aufgrund ihrer größeren wohlschmeckenden Frucht lange Zeit in Europa kultiviert wurde und die südamerikanische Chileerdbeere *Fragaria chileensis*, welche hauptsächlich in botanischen Gärten gezogen wurde. Da die Chileerdbeere häufig zweihäusig ist, wird ein Pollenspender benötigt. In der Bretagne, wie auch in Amsterdam wurden daher Scharlach- und Chileerdbeeren in Mischkultur angebaut. Beide Arten sind octoploid und besitzen einen achtfachen Chromosomensatz ($2n = 8x = 56$).

Eine Kreuzung ist möglich und es entstehen fertile Nachkommen. Diese neue Art, entstanden durch die Bestäubung aus *F. chiloensis* und *F. virginiana* zeichnet sich durch große Früchte und besonders guten Geschmack aus. Die Holländer gaben der neuen Erdbeere aufgrund ihrer Form und ihrem Geschmack den Namen „Ananas-Erdbeere“. Ein Gärtner aus Schloss Trianon, Antoine Nicholas Duchesne, erkannte die Entstehung und den Hybridcharakter, weshalb die heutige Gartenerdbeere den Namen *Fragaria x ananassa* Duch. trägt (Naumann und Seipp 1989).

Die Erdbeere ist das erste frische Obst im Jahr und aufgrund ihrer vielseitigen Verwendung eine der bedeutendsten Obstsorten auf dem Weltmarkt. Der Anbau in Deutschland hat im letzten Jahrzehnt stark zugenommen. Im Jahr 2006 wurden auf 14 391 ha (Freiland und unter Glas) 173 230 t geerntet (Statistisches Bundesamt 2008). Darüberhinaus werden Erdbeeren importiert um den Bedarf zu decken, 2002 rund 118 500 t (Statistisches Bundesamt Pressestelle 2008).

1.1.1 Botanische Sicht

Erdbeerfrüchte (im folgenden auch als Erdbeeren abgekürzt) sind botanisch gesehen Sammelnussfrüchte. Die Gattung *Fragaria* gehört zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*). In dieser Arbeit wird ausschließlich die octoploide Gartenerdbeere *Fragaria x ananassa* Duch. behandelt. Die Erdbeerpflanze ist eine mehrjährige Rosettenpflanze (Abbildung 1). Aus einem zentralen Vegetationskegel gehen Blätter, Wurzeln und Blütenstände hervor. Dieser als „Krone“ bezeichnete Teil der Pflanze bildet in seinem basalen Teil das Rhizom. Die Blätter sind, im Abstand von zwei Fünftel des Umfangs, spiralförmig um den Spross herum angesetzt. Jedes Blatt ist mit dem Gefäßzylinder über drei Leitbündel verbunden, welche etwa drei Fünftel des Umfangs umschließen. Dieser Aufbau sorgt für eine gute Wasserversorgung innerhalb der gesamten Pflanze. In jeder Blattachsel wird eine Knospe, die sich je nach Entwicklungsstadium der Pflanze in einen Ausläufer, eine Seitenkrone oder einen Blütenstand entwickeln kann, angelegt. Viele dieser Blattachselknospen werden jedoch nicht entwickelt. Ausgehend von den Blattachselknospen der Mutterpflanze entstehen mit zunehmender Tageslänge und Temperatur, in Deutschland ab Ende Mai, Ausläufer die oberirdisch in horizontaler Richtung wachsen.

Nach der Ausbildung von zwei langen Internodien wird am Ende des zweiten Nodium eine Tochterpflanze mit sprossbürtigen Wurzeln gebildet. Diese neue Pflanze kann sofort wieder Ausläufer hervorbringen. Die Mutterpflanze produziert auf diesem Wege der vegetativen Vermehrung im Laufe des Jahres eine Vielzahl von Tochterpflanzen, welche ein stark verzweigtes Netz bilden.

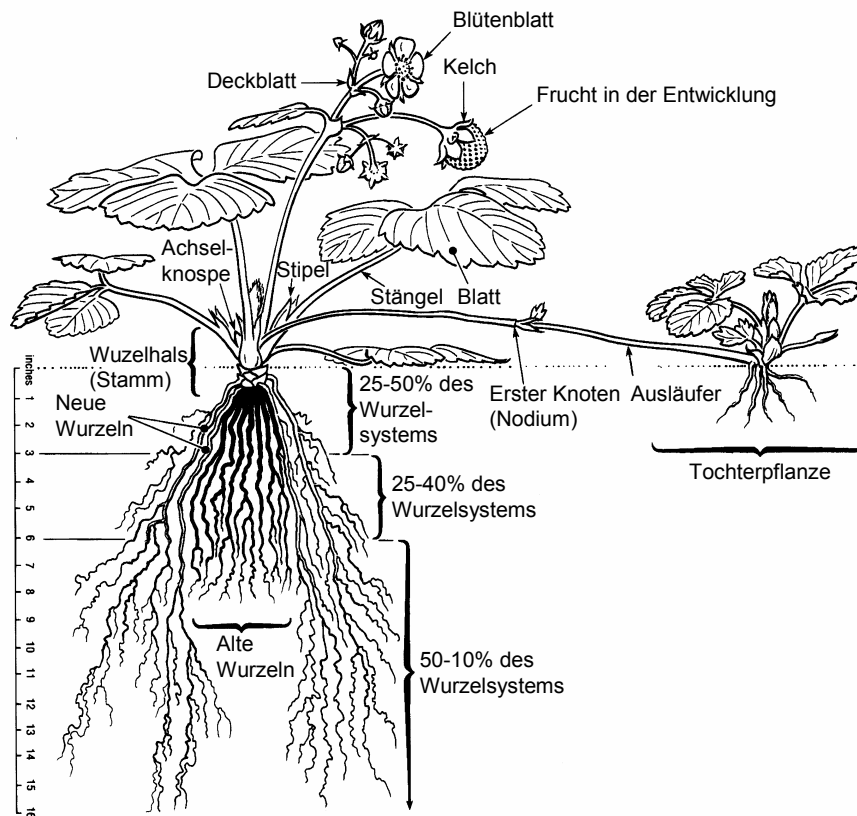


Abbildung 1 Erdbeerpflanze (Hancock 1999).

Die apikalen Meristeme entwickeln ständig neue Blattanlagen unter Verlängerung der Sprossachse oder neue Infloreszenzen. Die Blütenstände der Erdbeere werden im Herbst für das folgende Jahr angelegt. Nach der Induktion, die von den Licht- und Temperaturverhältnissen im Kurztag hervorgerufen wird, werden schon ab Ende September die Blütenknospen ausdifferenziert. Diese sind als Aufwölbung des Meristems an der Sproßspitze zu erkennen. Sie bilden im darauf folgenden Jahr die Primärblüte. In Deutschland entwickeln sich ab Oktober auch die Anlagen der Sekundärblüte und mit fortschreitender Differenzierung werden die einzelnen Blütenorgane angelegt. Je länger eine Pflanze Zeit zur Differenzierung hat, desto mehr Blütenanlagen werden angelegt.

In Mitteleuropa wird diese Entwicklung im Winter durch den Temperaturabfall unterbrochen, jedoch bei steigenden Temperaturen wieder fortgesetzt. Eine Differenzierung der Blüten findet daher auch während der vegetativen Winterruhe statt.

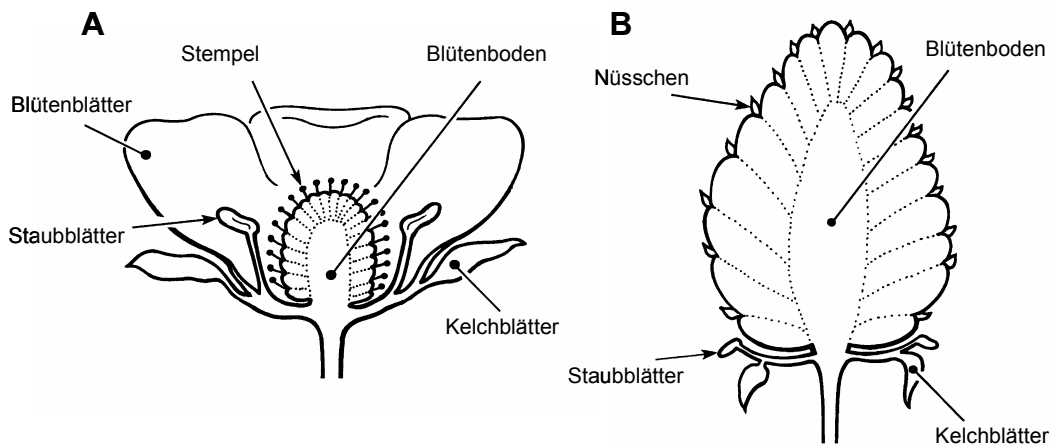


Abbildung 2 Blüte (A) und Frucht (B) der Erdbeere (Hancock 1999).

Die Blüten besitzen 2 x 5 Kelchblätter, die von Sorte zu Sorte stark variieren können (Abbildung 2 A). Über diesen stehen 5 weiße Blütenblätter, die bei zwittrigen Sorten zahlreiche, aber immer fünfzählige, Staubblätter umschließen. In der Mitte befindet sich der Blütenboden (Receptaculum), auf dem sich spiralförmig die Samenanlagen (Nüsschen) anordnen. Je früher die Blüte ausdifferenziert wurde, desto höher ist ihre Anzahl, bei primären Blüten ist sie also am höchsten. Bestäubt werden die Blüten durch Insekten, vor allem von Honigbienen (*Apis mellifera*). Ein bis zwei Tage später werden die Blüten befruchtet.

Nach der Befruchtung der Samenanlagen geben diese Phytohormone an die Blütenachse ab, welche das Wachstum anregen und zur Vergrößerung des Blütenbodens führen. Dieser unterteilt sich in einen weißlichen Zentralzylinder und die umgebende durch Anthocyane rot gefärbte Rinde. Die Nüsschen werden über Leitbündel mit Nährstoffen versorgt. Nüsschen und Leitbündel sind lignifiziert (Suutarinen *et al.* 1998). Die Anzahl der Samenanlagen beeinflusst die endgültige Größe der Erdbeere. Je höher ihre Zahl, desto größer und schwerer wird die reife Frucht. Der umgangssprachlich als Erdbeerfrucht bezeichnete Teil der Pflanze ist also der vergrößerte Fruchtboden (Receptaculum) der Erdbeere mit den darauf befindlichen Samenanlagen (Nüsschen). In dieser Arbeit wird aus Gründen der Vereinfachung von der Erdbeerfrucht (Abbildung 2 B) gesprochen. Die Entwicklung der Samenanlagen ist vor der des Blütenbodens abgeschlossen. Erst nach dem Ausreifen der

Embryos steigt das Volumen des Blütenbodens stark an. Die 15-20% initiale Zunahme der Erdbeerfrucht ist auf Wachstum durch Zellteilung zurückzuführen. Die weitere Zunahme wird durch Vergrößerung des Zellvolumens erreicht (Hancock 1999, White 2002). Die Zellteilung in grünen Früchten wird dabei durch das in den Nüsschen gebildete Phytohormon Auxin angeregt. Der höchste Gehalt an Auxin wird in Nüsschen und Blütenboden von fast weißen Früchten detektiert. In der weiteren Reife fällt dieser Gehalt im Blütenboden stark ab. Der Konzentrationsabfall des Auxins markiert den Beginn der Reifung der Erdbeerfrucht (Given *et al.* 1988a, Perkins-Veazie 1995). Ein solcher Abfall induziert die Expression vieler reifekorrelierter Gene in Erdbeerfrüchten (Medina-Escobar *et al.* 1997, Moyano *et al.* 1998, Manning 1998, Blanco-Portales *et al.* 2002).

Der nun folgende Transport von Assimilaten aus dem vegetativen Teil der Pflanze in die Erdbeerfrucht funktioniert dabei nach dem Prinzip einer Senke (*sink tissue*) für die in der Pflanze synthetisierten Verbindungen (Perkins-Veazie 1995). Die Stoffe werden verstärkt in die Frucht, aber nicht in die Nüsschen, transportiert und dort akkumuliert. Das Hauptassimilat ist Saccharose. Mit fortlaufendem Reifeprozess der Erdbeerfrucht werden in der Frucht die farbgebenden Anthocyane und die Aromastoffe gebildet, außerdem beginnt die Textur der Frucht unter Einfluss reifekorrelierter Enzyme wie der Pektatlyase (PEL), Pektinesterase (PE) oder Polygalacturonidase (PG) zu erweichen (White 2002). Maximale Größe und Gewicht erreicht die Erdbeerfrucht im roten, reifen Zustand (Perkins-Veazie 1995). Grundsätzlich wird die Fruchtreifung durch verschiedene Pflanzenhormone wie Ethylen, Gibbereline, Cytokinin, Ascisinsäure oder Auxin gesteuert. Diese bremsen oder beschleunigen den Prozess. Allgemein unterscheidet man zwischen klimakterischen Früchten, z.B. Bananen, Äpfeln oder Tomaten, und nichtklimakterischen, z. B. Weintrauben oder Erdbeeren. Klimakterische Früchte zeichnen sich aus durch einen deutlichen Anstieg der Atmung und der Ethylenproduktion über den Reifeverlauf. Nichtklimakterische Früchte hingegen zeigen einen Abfall der Atmung und keinen Anstieg der Ethylenproduktion (Giovannoni 2001). Diese Unterscheidung ist für den Handel in Bezug auf den Zeitpunkt der Ernte, die Transport- und Lagerstabilität, wie auch den spezifischen Umgang mit den Früchten von Bedeutung.

Bei der Untersuchung von 80 reifekorrelierten cDNAs in Erdbeeren konnte gezeigt werden, dass über 60% (48) nicht auxinkorreliert exprimiert werden (Aharoni *et al.* 2002b). Durch photoakustische Spektroskopie wurde auch in Erdbeeren eine geringe Zunahme der Atmung und ein mit der Tomate vergleichbares Muster der Ethylenproduktion nachgewiesen (Iannetta *et al.* 2006). Weiterhin konnten die zwei Ethylenbiosynthesegene *FaACO1* und *FaACO2* mit dem Anstieg der Ethylenproduktion der Erdbeeren in Verbindung gebracht werden (Trainotti *et al.* 2005). Die Autoren deuten den Anstieg des Ethylenrezeptores *FaEtr2* über die Reifedauer der Erdbeerfrucht als Indikator einer ethyleninduzierten Reifung bzw. einzelner ethylenabhängiger Gene. Es muss also von zusätzlichen ethylenabhängigen Regulationsmechanismen auch in nichtklimakterischen Früchten ausgegangen werden (Giovannoni 2001). Somit besteht die Möglichkeit gemeinsamer regulatorischer Kaskaden in klimakterischen und nichtklimakterischen Früchten (White 2002).

1.1.2 Inhaltsstoffe der Erdbeere

Frische, reife Erdbeerfrüchte bestehen etwa zu 90% aus Wasser. Die restlichen 10% setzen sich hauptsächlich aus Zuckern zusammen, hier vor allen Saccharose, D-Glucose und D-Fructose (Hancock 1999). Die bedeutendsten Fruchtsäuren sind Zitronen- und Äpfelsäure. Die in Tabelle 1 angegebenen Gehalte der einzelnen Bestandteile unterliegen je nach Sorte und Reifegrad der Früchte den natürlichen Schwankungen.

Der Brennwert von Erdbeeren liegt bei unter 100 kJ/100 g, bei einem relativ hohen Gehalt an Vitamin C. Für den Verbraucher sind darüber hinaus auch das Aussehen und das Aroma der Erdbeerfrucht von besonderer Bedeutung.

Tabelle 1 Durchschnittliche Zusammensetzung reifer Erdbeerfrüchte. Die Angaben beziehen sich auf 100 g Frischgewicht (Perkins-Veazie 1995, Hancock 1999, Souci *et al.* 2000).

Bestandteil	Gehalt pro 100 g
Wasser	92 g
Protein	0,6 g
Gesamtfett	0,4 g
Kohlenhydrate	7 g
Fructose	1,7 – 3,5 g
Glucose	1,4 – 3,1 g
Saccharose	0,2 -2,5 g
Pektin	500 – 1360 mg
Mineralstoffe	
Ca	14 mg
Fe	0,4 mg
Mg	10 mg
P	19 mg
K	166 mg
Na	1 mg
Zn, Cu, Mn	< 0,5 mg
Vitamine	
Vitamin C	26 - 120 mg
Andere	< 0,5 mg
Organische Säuren	
Zitronensäure	420 – 1240 mg
Äpfelsäure	90 - 680 mg
Bernsteinsäure	100 mg
Oxalsäure	24 mg
Weinsäure	17 mg
Brenztraubensäure	5 mg
Chinasäure	2 mg
Gesamtphenole	58 - 210 mg
Gesamt Anthocyane	55 - 145 mg
Pelargonidin-3-glucosid	88%
Cyanidin-3-glucosid	12%
Flavonoide	
Kämpferol	1,2 mg
Quercitin	860 µg

Das Aroma der Erdbeere setzt sich aus mehr als 360 flüchtigen Verbindungen zusammen (Schieberle und Hofmann 1997). Hiervon tragen aber nur fünf bis zehn aufgrund ihrer hohen Aromaverdünnungsfaktoren zum charakteristischen Erdbeeraroma bei (Tabelle 2).

Tabelle 2 Aromaverdünnungsfaktoren (FD) geruchsaktiver flüchtiger Verbindungen eines frischen Erdbeersaftes (Schieberle und Hofmann 1997).

Verbindung	Geruchsqualität	FD Faktor	Strukturformel
HDMF	karamell	4096	
(Z)-3-Hexenal	grün	1024	
Buttersäuremethylester	fruchtig	256	
Buttersäureethylester	fruchtig	512	
2-Methylbuttersäureethylester	fruchtig	128	
3-Methylbuttersäureethylester	fruchtig	128	
2-Methylbuttersäuremethylester	fruchtig	256	
3-Methylbuttersäuremethylester	fruchtig	256	
Essigsäure	sauer	1024	
2,3-Butandion	butterig	256	
Buttersäure	schweißig	2048	
3-Methylbuttersäure	schweißig	256	
2-Methylbuttersäure	schweißig	256	
2-Methylpropansäureethylester	fruchtig	128	
DMMF	karamell, verbrannt	64	

Durch Aromaextraktverdünnungsanalysen und Rekonstitutionsexperimente, bei denen das Erdbeeraroma durch Mischen der wichtigen Aromstoffe nachgestellt wurde, konnte ein entscheidender Beitrag insbesondere des 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)-furanon (HDMF) für das spezifische Erdbeeraroma gezeigt werden (Schieberle und Hofmann 1997).

Neben den nutritiven Bestandteilen und Aromen wurden in Erdbeeren auch weitere bioaktive Substanzen beschrieben. Diese umfassen vornehmlich Sekundärmetabolite wie Anthocyane, Catechine, Flavonole, Tannine und phenolische Säuren, sowie deren Derivate. Diese Verbindungen lassen sich aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel (Kapitel 1.2) ableiten und liegen meist in glycosylierter oder glucuronidierter Form in den Früchten vor. In Erdbeeren sind die Anthocyanidine (Abbildung 3) Pelargonidin und Cyanidin mit Glucose und Rutinose oder weiter mit Malonsäure verknüpft (Määttä-Rhinnen *et al.* 2004). Außerdem wurden in Erdbeerfrüchten dimere Anthocyane, die aus Pelargonidin und vier verschiedenen Flavanolen (Catechin, Epicatechin, Afzelechin und Epiafzelechin) bestehen, nachgewiesen. Sie sind über Position 4 des Flavanols und Position 8 des Anthocyanidins miteinander verbunden (Fossen *et al.* 2004).

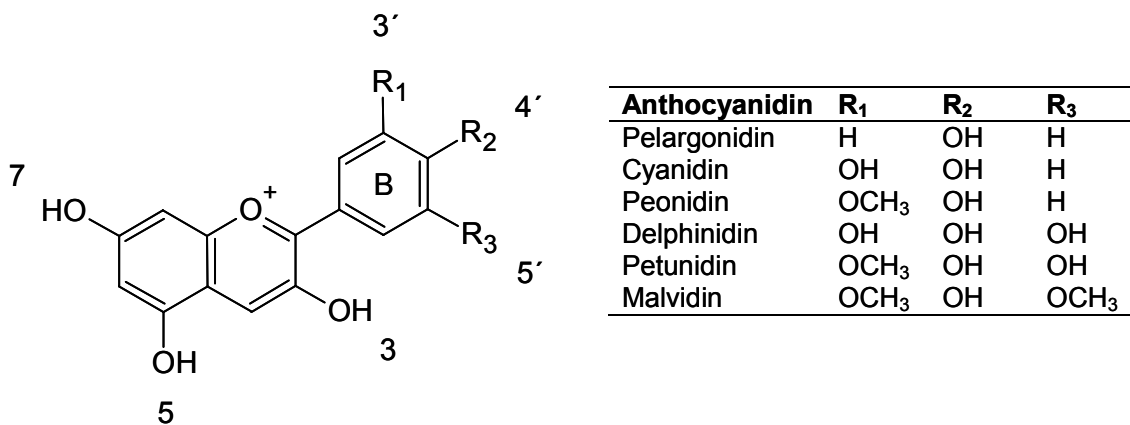


Abbildung 3 Strukturformel und Substitutionsmuster der Anthocyanidine.

Der bedeutenste Farbstoff der Erdbeerfrucht ist Pelargonidin-3-O-glucosid mit einem ungefähren Anteil von 90% am Gesamtanthocyangehalt (Tabelle 1). Die Zusammensetzung der Anthocyane in Blütenboden und Nüsschen unterscheidet sich deutlich. Im Blütenboden dominiert Pelargonidin-3-O-glucosid, in den Nüsschen hingegen wurden fast gleiche Anteile an Pelargonidin-3-O-glucosid und Cyanidin-3-O-glucosid bestimmt (Aaby

et al. 2005; Yoshida und Tamura 2005). In den Nüsschen ist außerdem der Gehalt an malonylierten Anthocyanen deutlich erhöht. In unreifen grünen und weißen Früchten sind Anthocyane nicht nachweisbar (Cheng und Breen 1991), ihr Gehalt nimmt erst in der letzten Reifephase stark zu und erreicht den höchsten Wert in roten, reifen Erdbeeren.

Als bedeutenste Flavonol-Aglyca sind in Erdbeeren Quercetin und Kämpferol identifiziert worden (Häkinnen *et al.* 1999). Der Gehalt an Flavonolen (Abbildung 4) in Erdbeeren unterliegt in verschiedenen Sorten starken Schwankungen (Mikkonen *et al.* 2002). Die Autoren bestimmten in sechs Kultivaren den Gehalt an Kämpferol mit 0,2 bis 0,9 mg/100 g Frischgewicht und für Quercetin 0,3 bis 0,5 mg/100 g Frischgewicht. Im Kultivar Honeyone wurde außerdem ein relativ hoher Gehalt an Myricetin (1,7 mg/100 g Frischgewicht) nachgewiesen. Wie die Anthocyanidine liegen auch die Flavonole in Erdbeeren meist in konjugierter Form, vorwiegend als 3-glucuronid oder -glucosid vor (Määttä-Riihinen *et al.* 2004). Der relative Gehalt an Flavonolen in den Nüsschen ist höher als im Blütenboden (Aaby *et al.* 2005). Allgemein zeigen Sorten mit höheren Flavonol-Gehalten eine erhöhte Resistenz gegenüber pilzlichen Erkrankungen. Der Konzentrationsverlauf über die Reife zeigt für Tannine, nicht-Tannin Flavonide und nicht-Flavonoid Phenole ein Maximum in grünen Früchten, mit darauffolgender stetiger Abnahme (Cheng und Breen, 1991; Wang und Lin, 2000).

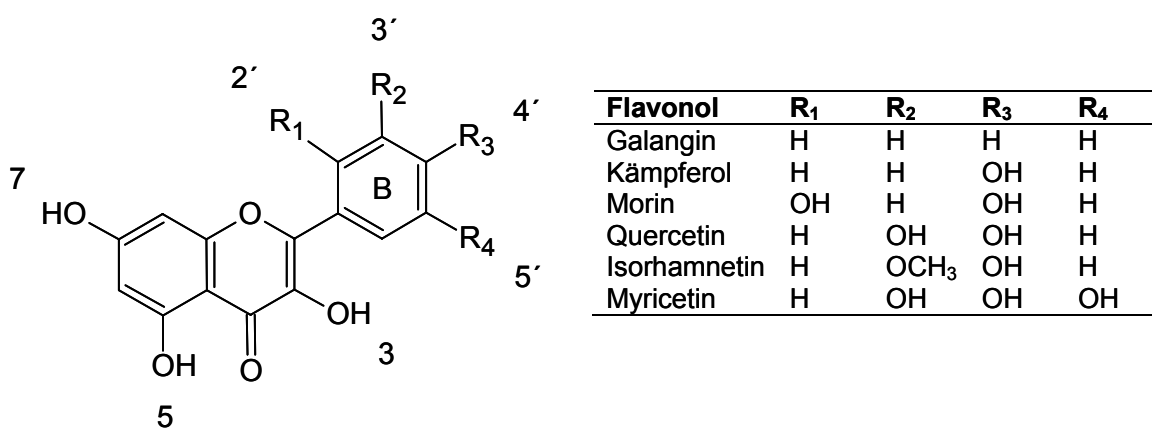
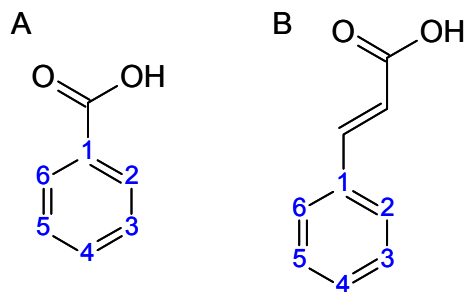


Abbildung 4 Strukturformel und Substitutionsmuster der Flavonole.

Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren sind die bedeutendsten phenolischen Säuren in der Erdbeerfrucht (Abbildung 5). Diese kommen meist als Konjugate mit D-Glucose vor. Mengenmäßig ist *p*-Cumarsäure-glucoseester die wichtigste Verbindung in Erdbeerfrüchten (Herrmann 1989). An Hydroxybenzoesäure-Derivaten ist vor allem *p*-Hydroxybenzoesäure-glucosid nachgewiesen worden. Außerdem konnten Zimtsäure- und Sinapinsäure-glucoseester in Erdbeerfrüchten identifiziert werden (Lunkenbein *et al.* 2006a). Die Autoren zeigten zudem einen Anstieg der Konzentrationen der Glucoseester von Zimtsäure, *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure und *p*-Hydroxybenzoesäure während der Fruchtreifung.



Benzoessäuren (A)	Zimtsäuren (B)	2	3	4	5
Salicylsäure	<i>o</i> -Cumarsäure	OH	H	H	H
3-Hydroxybenzoesäure	<i>m</i> -Cumarsäure	H	OH	H	H
4-Hydroxybenzoesäure	<i>p</i> -Cumarsäure	H	H	OH	H
3,4-Dihydroxybenzoesäure	Kaffeesäure	H	OH	OH	H
Vanilinsäure	Ferulasäure	H	OCH ₃	OH	H
Gentisinsäure	-	OH	H	H	OH
Gallussäure	-	H	OH	OH	OH
-	Sinapinsäure	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Abbildung 5 Strukturformeln von Benzoesäure (A) und Zimtsäure (B) mit den Substitutionsmustern der entsprechenden Derivate.

Das wissenschaftliche Interesse an den Substanzen des Sekundärmetabolismus ist auf ihren möglichen positiven Einfluss auf die menschliche Gesundheit zurückzuführen. Erdbeeren enthalten hohe Konzentrationen an antioxidativem Vitamin C (Tabelle 1). In Erdbeerfrüchten wurden auch hohe Gehalte an Polyphenolen festgestellt, besonders der Gehalt an der antikanzerogen wirksamen Ellagsäure ist mit über 500 mg/kg (Törrönen und Määttä 2002) relativ bedeutend.

Es besteht eine Korrelation zwischen dem Gesamtphenolgehalt und der antioxidativen Aktivität (Wang und Lin 2000). Die höchsten Werte wurden in

kleinen grünen Erdbeerfrüchten festgestellt. Zwar wurde auch in reifen, roten Früchten ein erneuter Anstieg der antioxidativen Aktivität gemessen, aber die Anthocyane der Erdbeerfrucht scheinen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da das vorherrschende Pelargonidin-3-O-glucosid ein schwächeres antioxidatives Potential besitzt als die in Himbeeren und Brombeeren dominierenden Cyanidin-glycoside. Durch Inhibierung der Oxidation von *low density* Lipoproteinen sollen die Antioxidantien das Risiko von Herz-Kreislaufkrankungen senken (Heinonen *et al.* 1998).

Weiterhin wird vermutet, dass die östrogenen und antikanzerogenen Effekte von Isoflavonoiden und Lignanen, eine vorbeugende Wirkung gegen Arterienverkalkung haben, außerdem auch einen positiven Einfluss auf die Knochenmasse (Dixon 1999). Erdbeerfrüchte enthalten relativ hohe Gehalte an Lignanen. Kürzlich wurde der positive Einfluss der Aufnahme von phytoöstrogenen Lignanen, speziell auf die Gesundheit von Frauen in der Menopause, beschrieben (Cornwell *et al.* 2004).

1.2 Phenylpropanoidstoffwechsel

Vor rund 450 Millionen Jahren verliessen die ersten Pionierpflanzen den Lebensraum Wasser und begannen das trockene Land zu besiedeln. Dieser Schritt wurde durch verschiedene physiologische Anpassungen ermöglicht, einschließlich der Entwicklung vollkommen neuer, hoch spezialisierter Stoffwechselwege. In der Erdbeerfrucht sind eine Vielzahl der potentiell bioaktiven Verbindungen Produkte des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, z. B. die Anthocyane, die Flavonoide und die Polyphenole.

Viele dieser evolutionär neuen Substanzen lassen sich auf die Aminosäure Phenylalanin aus dem Primärstoffwechsel zurückführen. Durch Desaminierung des primären Metabolits wird die namensgebende C6-C3 Struktur (Phenylpropansäure) gebildet. Von diesem in modernen Pflanzen ubiquitären Grundgerüst der Phenylpropanoide wird nachfolgend eine große Zahl unterschiedlicher Sekundärmetabolite abgeleitet. Diese übernehmen lebensnotwendige Funktionen. Sie ermöglichen feste Strukturen innerhalb der Pflanzen, bieten Schutz vor UV-Strahlung, dienen der Reproduktion und internen Regulation der Zellphysiologie, sowie als Signalmoleküle (Ferrer *et al.* 2008).

Durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) wird Phenylalanin zunächst desaminiert und in Zimtsäure überführt (Abbildung 6). Nachfolgend wird diese durch eine Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase, die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H), in p-Cumarsäure umgewandelt. Anschließend wird durch die p-Cumarsäure-CoA-Ligase (4CL), ein Enzym aus der Familie der *AMP-producing adenylating superfamily of enzymes* (AAE), die Aktivierung zu p-Cumarsäure-CoA vorgenommen (Ferrer *et al.* 2008). Dieses Substrat kann nun durch die Chalconsynthase (CHS) in die Flavonoidbiosynthese oder durch die Zimtsäure-CoA-Reduktase (CCR) in die Monolignolbiosynthese abgeleitet werden.

Darüberhinaus ist der Phenylpropanoidstoffwechsel auch ein wichtiger Teil der pflanzlichen Pathogenabwehr. In der Literatur wird übereinstimmend eine induzierbare Hochregulation des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Kontakt mit Pathogenen angegeben. Eine solche Zunahme führt zu einer erhöhten PAL Aktivität. In Untersuchungen zur Resistenz von Gerste (*Hordeum vulgare*) gegenüber dem Mehltau (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) konnte der signifikante Einfluss der PAL gezeigt werden (Zeyen *et al.* 1995). Vor der Manifestation eines erhöhten Penetrationswiderstands gegenüber *E. graminis* stieg die PAL Aktivität ebenfalls signifikant an (Clark *et al.* 1994; Shiraishi *et al.* 1995). Auf die spezifische Bedeutung der Ligninbiosynthese im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr von Pflanzen wird im folgenden Kapitel 1.3 eingegangen.

Jedoch trägt nicht allein eine vermehrte PAL Expression zur Abwehr der Pflanzen bei. Eine Steigerung des Phenylpropanoidstoffwechsels durch eine Überexpression der PAL führte zwar zu einer stärkeren Resistenz gegenüber mikrobiellen Pathogenen, verringerte aber die Resistenz gegenüber herbivoren Larven (Felton *et al.* 1999). Vermutlich spielen auch andere Gene des Phenylpropanoidstoffwechsels eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr. Ebenfalls in *H. vulgare* konnte eine durch *E. graminis* induzierbare Aktivität der CHS als Reaktion der Pflanze auf den Elizitor gezeigt werden (Christensen *et al.* 1998). Vermutlich ist diese pathogeninduzierte CHS an der Bildung von methylierten Phytoalexinen auf Flavonoidbasis beteiligt.

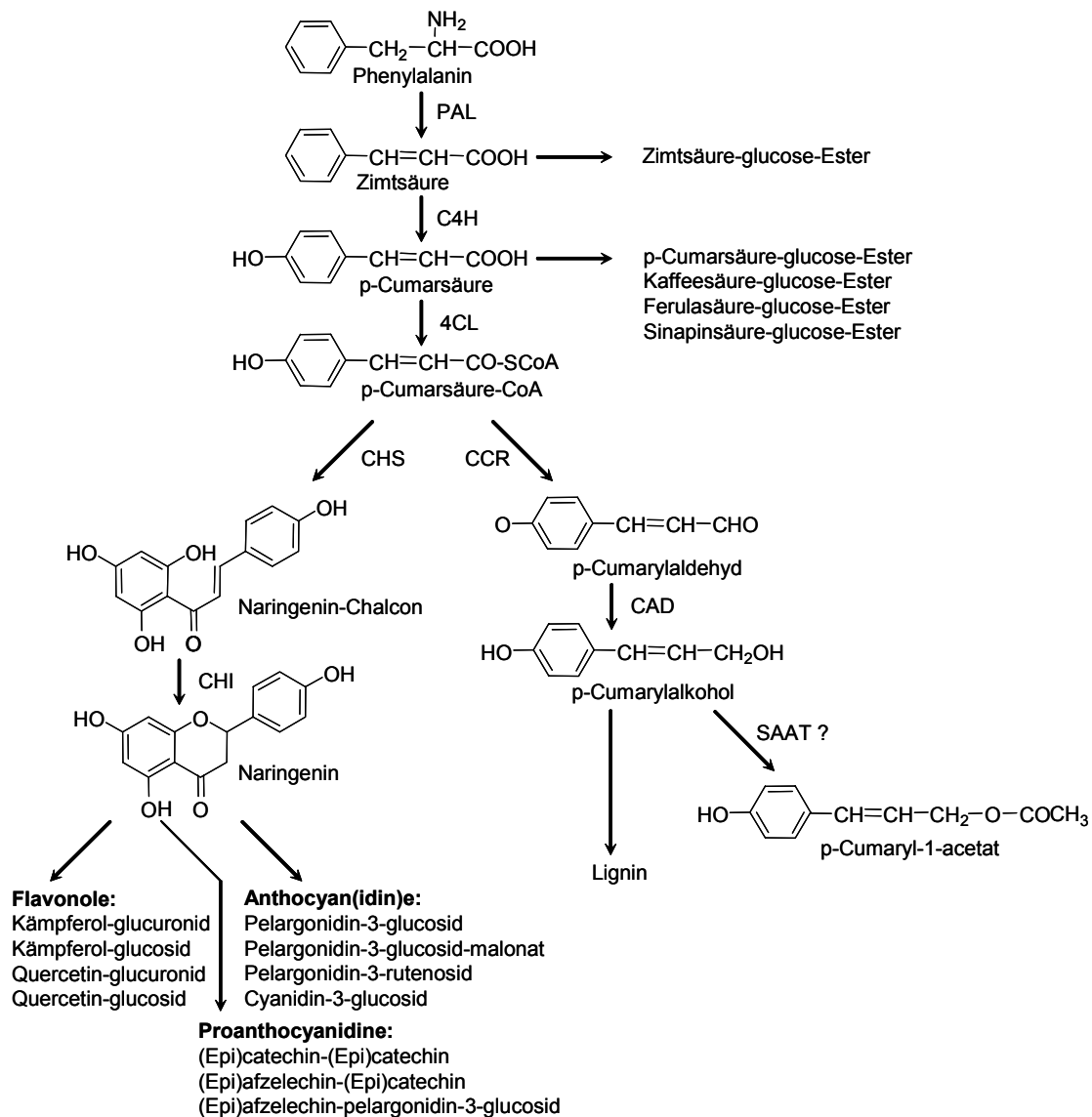


Abbildung 6 Biosyntheseweg der Phenylpropanoide (Richter 1996; Holton und Cornish 1995; Wink 1999, Lunkenbein 2006d) Die dargestellten Enzyme sind PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase), C₄H (Zimtsäure-4-Hydroxylase), 4CL (p-Cumarsäure-CoA-Ligase), CHS (Chalconsynthase), CHI (Chalconisomerase), CCR (Zimtsäure-CoA-Reduktase), CAD (Zimtalkohol-Dehydrogenase) und SAAT (Erdbeer-Alkohol-Acyl-CoA-Transferase).

Die Resistenz einer Pflanze wird unter anderem durch die phenolischen Verbindungen beeinflusst. Dabei muss zwischen induzierten und präformierten Verbindungen unterschieden werden. Induzierte Verbindungen sind eine direkte Reaktion der Pflanze auf biotischen und abiotischen Stress. Sie werden durch Stress, Pathogene oder Beschädigungen beeinflusst, können in geringerem Maß aber auch konstitutiv gebildet werden. Präformierte Substanzen werden in der normalen Pflanzenentwicklung gebildet und sind oft in strategisch wichtigen Geweben eingelagert, wo sie als Signal- oder Abwehrstoffe dienen (Treutter

2005). In Blüten und Früchten von *F. x ananassa* cv. Elsanta konnten solche konstitutiven wie auch induzierbare Verbindungen mit einer fungiziden Wirkung gegenüber Grauschimmel (*Botrytis cinera*) nachgewiesen werden (Terry *et al.* 2004). Insbesondere für Proanthocyanidine und Catechine aus Erdbeeren wurde eine solche *Botrytis* hemmende Wirkung gezeigt (Jersch *et al.* 1989, Hébert *et al.* 2002).

1.3 Ligninbiosynthese

Lignin ist ein Bestandteil der Zellwände von Pflanzen und bildet zusammen mit Cellulose das stabilisierende Gerüst höherer Pflanzen. Es wird bei der Ausbildung pflanzlicher Zellwände in das Cellulosegerüst eingelagert und ist mit der Cellulose und anderen Zellwandbestandteilen kovalent verknüpft. Das komplexe Ligninpolymer besteht aus den drei Monolignolen p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol. Diese können untereinander durch verschiedene Bindungsarten, wie Etherbrücken oder kovalente Kohlenstoffbindungen, zu einer verzweigten Struktur, dem Ligningerüst, verknüpft werden. Das natürliche Polymer wirkt außerdem durch seine Eigenschaft eine induzierbare Barriere als Antwort auf mikrobiellen Befall zu bilden (Lawton und Lamb 1987; Christensen *et al.* 1998; Felton *et al.* 1999; Ferrer *et al.* 2008). Neben den stützenden Eigenschaften und der Pathogenabwehr trägt Lignin auch als hydrophober Teil der vasculären Phloem- und der Xylem-Zellen zum Wassertransport innerhalb der Pflanzen bei.

Die Monolignole werden über die Phenylpropanoide in einem mehrstufigen Prozess aus Phenylalanin synthetisiert (Abbildung 7). Im klassischen Modell der Ligninbiosynthese folgen nach der Desaminierung von Phenylalanin zur freien Zimtsäure durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) sukzessive Hydroxylierungen und Methylierungen. Die einzelnen Zimtsäurederivate werden anschliessend durch die Abfolge 4-Cumarsäure-CoA-Ligase (4CL), Zimtsäure-CoA-Reduktase (CCR) und Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD) in die entsprechenden Alkohole überführt.

Diese werden als lösliche β -D-Glucopyranoside aus der Zelle transportiert und im Zellwandbereich durch β -Glucosidasen enzymatisch freigesetzt. Der Aufbau des Lignins erfolgt durch die Polymerisation aktivierter Monolignolradikale, welche durch zellwandgebundene Peroxidasen (POD) gebildet werden (Strasburger *et al.* 2002).

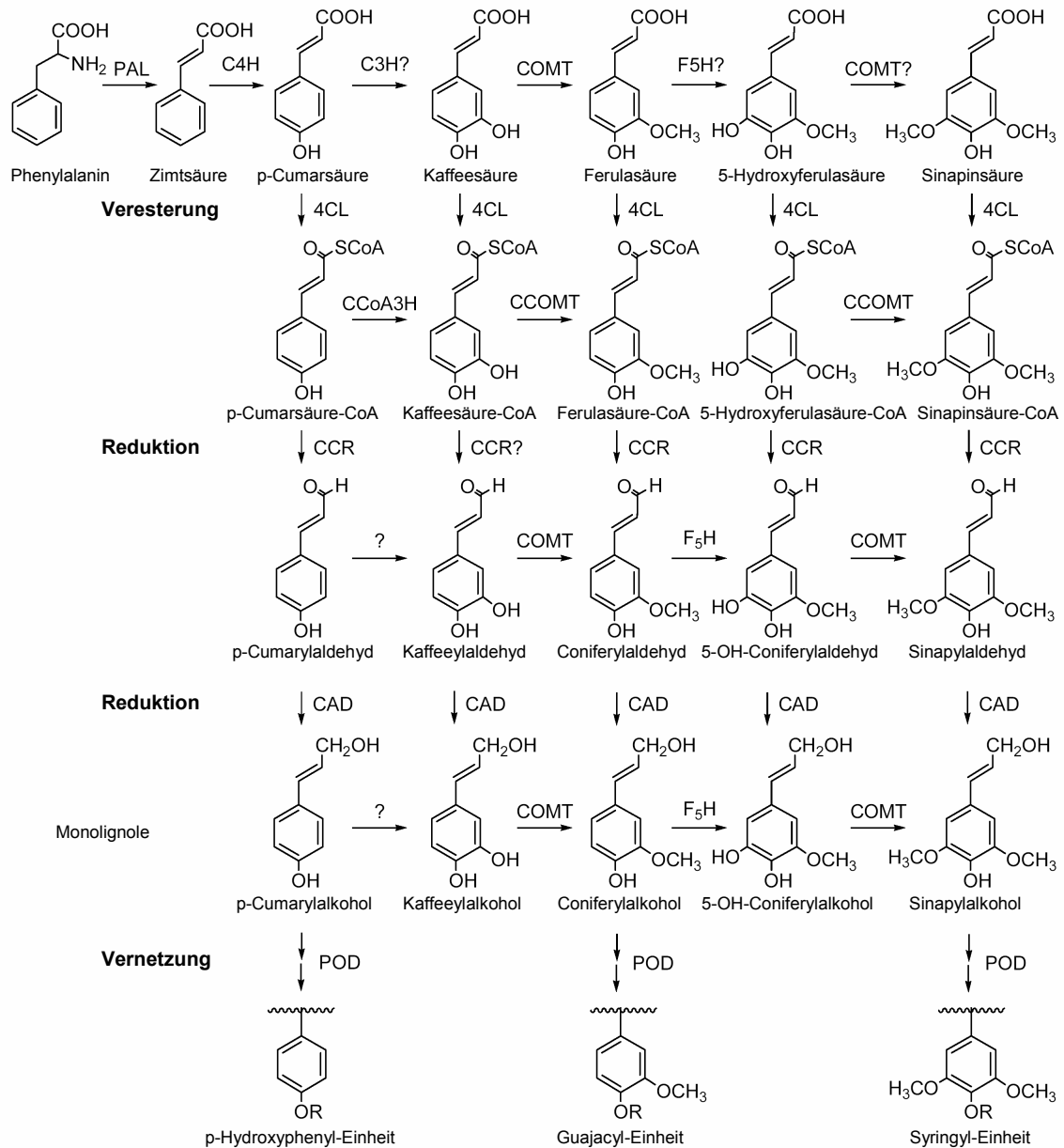


Abbildung 7 Reaktionsschema der Ligninbiosynthese (Dixon *et al.* 2001). PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase), C4H (Zimtsäure-4-Hydroxylase), C3H (p-Cumarsäure-3-Hydroxylase), COMT (Kaffeensäure-O-Methyltransferase), CCoA3H (p-Cumarsäure-CoA-3-Hydroxylase), F5H (Ferulasäure-5-Hydroxylase), 4CL (p-Cumarsäure-CoA-Ligase), CCR (Zimtsäure-CoA-Reduktase), CAD (Zimtalkohol Dehydrogenase), POD (zellwandgebundene Peroxidase).

Die Hydroxylase-Enzyme fungieren als Abzweigungstellen, welche die relativen Verhältnisse der Monolignole regulieren. Das Verhältnis von p-Hydroxyphenyl- zu Guajacyl-Einheiten wird durch die p-Cumarsäure-3-Hydroxylase (C3H) reguliert, das Verhältnis der Guajacyl- zu Syringyl-Einheiten von der Ferulasäure-5-Hydroxylase (F5H) (Whetten und Sederoff 1995). Durch Überexpression der F5H in *Arabidopsis* konnte ein ausschließlich aus Syringyl-Einheiten bestehendes Lignin erzeugt werden (Meyer *et al.* 1998).

Neuere Studien zeigen jedoch eine bevorzugte Umsetzung der jeweiligen Intermediate in die entsprechenden hydroxylierten und methylierten Derivate (Whetten *et al.* 1998, Dixon *et al.* 2001; Strasburger *et al.* 2002; Humphreys und Chappel 2002, Boerjan *et al.* 2003). Ein Teil der beteiligten Enzyme weist somit eine höhere Affinität gegenüber den Säurederivaten auf, als zu den entsprechenden freien Säuren.

Die Substratspezifität der CAD ist letztendlich entscheidend für die Zusammensetzung des Lignins. Bei Angiospermen (Bedecktsamer) wie der Erdbeere reduziert das Enzym alle drei Zimtaldehyd-Derivate (Strasburger *et al.* 2002). In Dikotyledonenlignin (Zweikeimblättrige) ist Coniferyl- und Sinapylalkohol in etwa gleichen Mengen im Lignin vertreten, Cumarylalkohol aber nur in Spuren.

Aufgrund der Instabilität und ihrer relativen Toxizität liegen die Monolignole in pflanzlichen Zellen größtenteils gebunden und nie in hoher Konzentration als freie Säuren vor. Eine Glucosylierung stabilisiert die Moleküle, erhöht die Löslichkeit und nimmt ihnen die toxischen Eigenschaften. Die glycosylierten Formen der Monolignole besitzen daher sowohl eine Transport- wie auch eine Speicherfunktion (Whetten und Sederoff 1995).

Die Bedeutung des Lignins als Barriere der pflanzlichen Abwehr gegenüber mikrobiellem Befall konnte anhand der Interaktion von *E. graminis* mit *H. vulgare* gezeigt werden. Eine Hemmung der PAL und der CAD Aktivität resultierte in hyperempfindlichen Pflanzen (Zeyen *et al.* 1995).

1.4 Chalconsynthase (CHS)

Eines der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene kodiert für eine Chalconsynthase (CHS) [EC 2.3.1.74]. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von Chalconen, den Vorläufersubstanzen der Flavonoide. Aus einem Molekül p-Cumarsäure-CoA und drei Molekülen Malonsäure-CoA generieren sie ein Tetraketid, das unter Ringbildung ein Chalcon ausbildet (Abbildung 8).

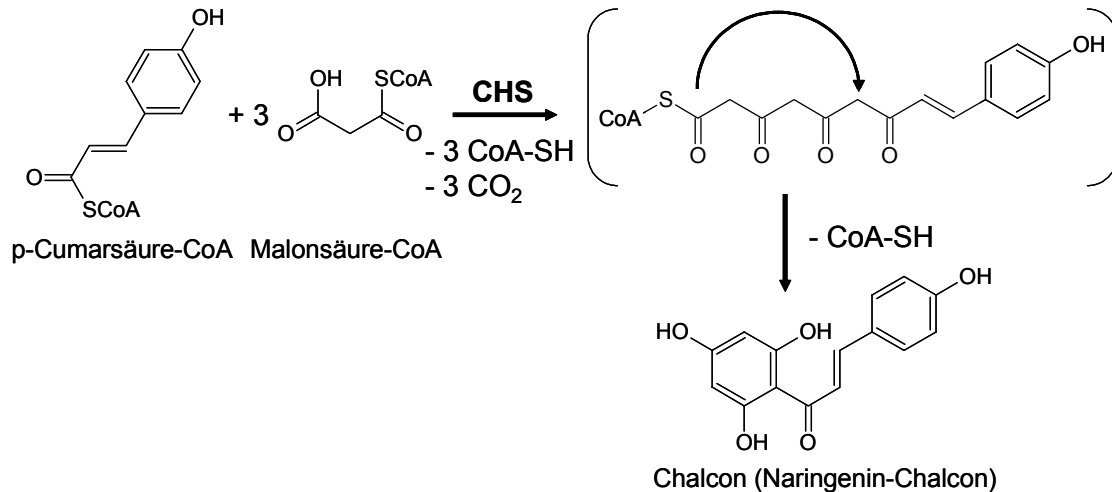


Abbildung 8 Reaktionsschema für die Chalconsynthase-katalysierte Bildung eines Chalcons (Naringenin-Chalcon) aus einem Molekül p-Cumarsäure-CoA und drei Molekülen Malonsäure-CoA unter Freisetzung von je drei Molekülen CoA-SH und CO₂. Die Klammer umschließt das postulierte Intermediat Tetraketid. Dieses wird anschließend zu einem aromatischen Ringsystem gefaltet, wobei ein weiteres Molekül CoA-SH freigesetzt wird (Tropf *et al.* 1995).

CHS gehören zusammen mit Stilbensynthase und Acridonsynthase zur Familie der Polyketidsynthasen (Tropf *et al.* 1993 und 1995; Martin 1993; Dixon 1999). Die Kondensationsreaktion der Chalconsynthasen verläuft grundsätzlich analog zur Fettsäurebiosynthese. Es gibt jedoch signifikante Unterschiede. So nutzt die CHS die CoA-Ester direkt, während die Bereitstellung der Substrate für die Kondensationsreaktion der Fettsäurebiosynthese über Acylcarrierproteine erfolgt (Schröder 1997).

Das funktionelle Enzym der CHS ist ein Homodimer, dessen zwei Untereinheiten eine Größe von etwa 43 kDa aufweisen (Tropf *et al.* 1995; Ferrer *et al.* 1999).

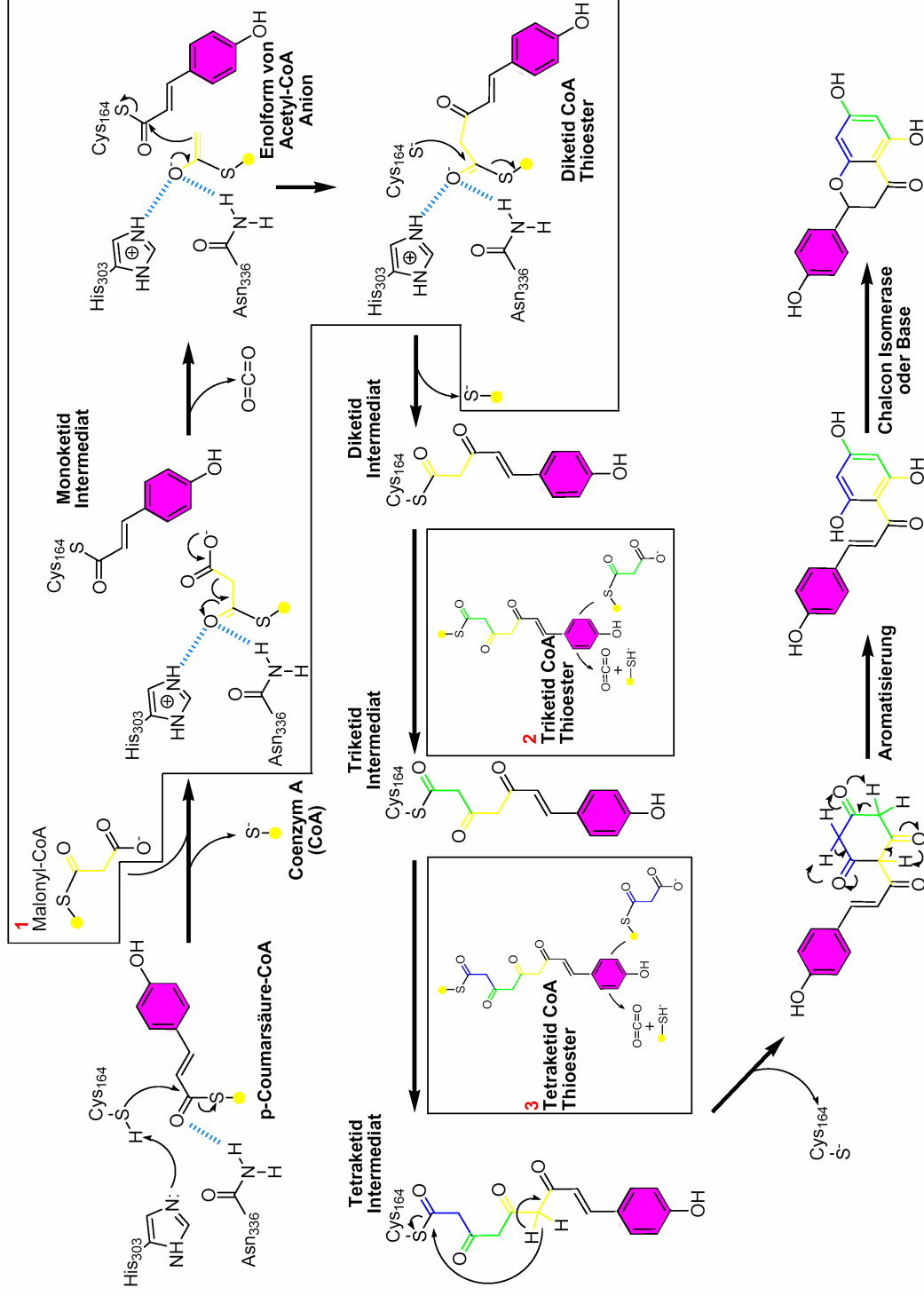


Abbildung 9 Reaktionsmechanismus der CHS, abgeleitet aus den Kristallstrukturen von Alfalfa CHS2. Die drei umrahmten Abschnitte mit den Bezeichnungen 1, 2 und 3 markieren die Addition der Acetyl-CoA, die während der Elongation der Polyketid-Intermediäre aus dem Malonsäure-CoA abgeleitet wurden. Die anschließende Cyclisierung und Aromatisierung des enzymgebundenen Tetraketids führt zur Bildung von Chalcon (Ferrer *et al.* 1999).

Der Reaktionsmechanismus der CHS konnte über Kristallstrukturanalysen aufgeklärt werden (Abbildung 9) (Ferrer *et al.* 1999). In allen CHS sind die Aminosäurereste Cys164, Phe215, His303 und Asn336 konserviert, sie definieren das aktive Zentrum. Die Bindung eines Moleküls p-Cumarsäure-CoA initiiert die CHS Reaktion. Dabei wird der p-Cumarsäurerest unter Abspaltung von CoA auf die SH-Gruppe des Cys164 übertragen. Der p-Cumaroylthioester am Cys164 reagiert anschließend mit einem enzymstabilisierten Acetyl-CoA Carbanion, das aus der Decarboxylierung von Malonsäure-CoA entstanden ist. Dabei wird das Thiolatanion von Cys164 freigesetzt und die p-Cumaroylgruppe auf den CoA-Thioester übertragen. Das Kondensationsprodukt ist ein Diketid-CoA-Thioester. Nachdem der Diketidrest (bzw. Triketid-) unter Freisetzung des CoA erneut an das Cys164 gebunden wurde, erfolgen noch zwei weitere Kondensationsreaktionen nach dem gleichen Prinzip, bei denen durch Kettenverlängerung ein Tetraketid erzeugt wird. Dieses Intermediat geht dann durch Ausbildung eines aromatischen Ringsystems in ein Chalcon über.

Die *CHS* Gene bilden eine Multigenfamilie. Die Anzahl der Kopien variiert dabei zwischen den Pflanzenspezies (Ferrer *et al.* 1999; Jez *et al.* 2000a und 2000 b). Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und Petersilie (*Petroselinum crispum*) besitzen das *CHS* Gen als Einzelkopien. In der Zwiebel (*Allium cepa* L.) wurden zwei *CHS* Genkopien auf verschiedenen Chromosomen nachgewiesen (Masuzaki *et al.* 2006), in anderen Pflanzenspezies (*Glycine max* L., *Cicer arietinum*) wurden Genfamilien mit 6-8 Mitgliedern ermittelt (Wingender *et al.* 1989; Richter 1996). Die genaue Anzahl der *CHS* Allele von *Fragaria x ananassa* ist noch unbekannt. Es konnte aber bereits eine organspezifische Regulation verschiedener Allele der *CHS* in *Fragaria x ananassa* während der Fruchtreifung in den Blütenblättern und der roten Erdbeerfrucht nachgewiesen werden (Almeida *et al.* 2007). Die unterschiedliche Substratspezifität zweier *CHS* Allele wurde in Gerste festgestellt (Christensen *et al.* 1998). Durch Pyrosequencing von *reverse transcription* (RT) PCR Produkten eines *polygalacturonase-inhibiting protein gene* (PGIP) konnte die Bedeutung der allelspezifischen Expression für die Genregulation und phänotypische Diversität gezeigt werden (Schaart *et al.* 2005). Die Autoren gehen von einer generellen allelspezifischen Expression bei Genen mit *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in der kodierenden Region aus.

Die Expression der *CHS* Gene im Fruchtgewebe der Erdbeere zeigt eine starke Korrelation mit zunehmender Reife und Farbbildung (Manning 1998; Aharoni und O'Connell 2002). Halbwirth *et al.* (2006) beschreiben für die CHS in Erdbeerfrüchten ein Maximum der Aktivität in kleinen grünen Früchten, die bis zur weißen Phase abnimmt um in der letzten Reifephase nochmals anzusteigen. Almeida *et al.* (2007) bestätigen diese Ergebnis durch Analysen des *CHS* Transkripts. Ähnliche Expressionsmuster wurden für die verwandten *Rosaceae* Himbeere (*Rubus idaeus*) (Kumar und Ellis 2003) und Apfel (*Malus domestica*) (Honda *et al.* 2002) gefunden und auch für Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus*) (Jaakola *et al.* 2002) und Weintrauben (*Vitis vinifera*) (Goto-Yamamoto *et al.* 2002) bestätigt. Die CHS und die im Flavonoidstoffwechsel nachfolgende Chalconisomerase (CHI) sind essentielle Enzyme in der Entwicklung der Pflanzen. Während der Keimung von *Arabidopsis* Sämlingen wurden über eine kurze Periode, die der Akkumulation von Flavonoiden vorrausgeht, hohe Proteingehalte der CHS und CHI nachgewiesen, wobei diese Proteinexpression jedoch nur über einen Zeitraum von wenigen Tagen messbar war und danach wieder abnahm (Cain *et al.* 1997). Allgemein ist in pflanzlichen Geweben aufgrund der Rolle der Chalconsynthase als Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese (Knogge *et al.* 1986; Martin 1993) von einem niedrigen Minimal- oder Grundgehalt auszugehen, der jedoch bedarfsreguliert starken Schwankungen unterliegen kann. Die Chalconsynthase bildet dabei einen regulatorischer Scheidepunkt des Substratflusses im Phenylpropanoidstoffwechsel (Abbildung 6).

Die Aktivität der Phenylpropanoidbiosynthese wird von der Aktivität des ersten Enzyms der Reaktionskette, der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), bestimmt. Analog zum Expressionsmuster der CHS wurde auch der zeitliche Verlauf der PAL Aktivität bestimmt. Es konnte ein Anstieg der Aktivität in grünen Früchten, mit anschließender Abnahme bis zur weißen Phase und einer starken Zunahme in der letzten Reifephase ermittelt werden (Halbwirth *et al.* 2006). Das Substrat der CHS wird in Form von Phenylalanin von der PAL aus dem Primärstoffwechsel bezogen und über Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) und p-Cumarsäure-CoA-Ligase (4CL) in das benötigte p-Cumarsäure-CoA umgewandelt (Abbildung 6). CHI setzt das von der CHS gebildete Naringenin-chalcon zu Naringenin um.

Ausgehend vom Naringenin wird ein breites Spektrum unterschiedlicher Verbindungen gebildet. Die daraus abgeleiteten Metabolitmuster oder einzelne Verbindungen können spezifisch für bestimmte Pflanzenspezies sein. Innerhalb der Pflanze erfüllen diese sekundären Metabolite verschiedene Funktionen. Sie dienen der Pigmentierung, schützen vor UV Strahlung, wirken als Phytoalexine und Signalmoleküle in der Pflanzen-Mikroben-Interaktion, wehren Pathogene ab und sind essentiell für die Pollenfertilität und die Bildung der Samenanlage (Martin 1993; Christensen *et al.* 1998; Strasburger *et al.* 2002; Schijlen *et al.* 2007).

Eine Herabregulation der *CHS* in Petunien (*Petunia hybrida* L.) führte zu einer Abnahme der Pigmentierung der Blüten (Napoli *et al.* 1990; Chen *et al.* 2004). Stabil transgene Tomatenpflanzen, in denen durch RNA-Interferenz die Expression von *CHS* herabreguliert worden war, bildeten nach initialer Bestäubung der Pflanzen parthenokarpe Früchte (Schijlen *et al.* 2007). Die stabil transgene *antisense* Herabregulation einer *CHS* in *Fragaria x ananassa* (*FaCHS*) führte durch einen verringerten Anthocyangehalt zu einer starken Reduktion der Pigmentierung in den Früchten (Lunkenbein *et al.* 2006b). Der Gehalt an Kämpferol, dem Hauptflavonol in Erdbeerfrüchten, wurde halbiert. Da der größte Anteil der phenolischen Säuren in Erdbeerfrüchten als Konjugate vorliegt (Määttä-Rhihinen *et al.* 2004), wurde eine Akkumulation der Substrate der *CHS* über die Quantifizierung der entsprechenden Glucose-Ester nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen erhöhte Gehalte an p-Cumarsäure-, Kaffeesäure- und Ferulasäure-D-glucose-Ester. Die mit der *CHS* um das p-Cumarsäure-CoA konkurrierende Zimtsäure-CoA-Reduktase (CCR) und Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD) leiten den Metabolitfluss in Richtung der Ligninbiosynthese. Die Gehalte an p-Cumarylalkohol und dem nachfolgend gebildeten p-Cumaryl-1-acetat waren in den herabregulierten Früchten signifikant erhöht.

1.5 O-Methyltransferase (OMT)

Das zweite in dieser Studie verwendete Gen kodiert das Enzym O-Methyltransferase (OMT). Methyltransferasen sind Enzyme, die CH₃-Gruppen von einem Co-Faktor auf geeignete Akzeptormoleküle übertragen können. Die in Pflanzen bedeutenden OMTs übertragen dabei Methylgruppen auf Sauerstoff. Diese Reaktion dient zum einen der enzymatischen Inaktivierung reaktiver Hydroxy- und Carboxygruppen, verändert aber auch die Löslichkeit und bewirkt so eine Steuerung und Kompartimentierung des Metabolitenstroms innerhalb der Pflanze (Ibrahim und Muzac 2000). Methyltransferasen sind essentiell in der pflanzlichen Biosynthese von Phenylpropanoiden, Lignin, Phytoalexinen oder Alkaloiden.

Nach Ibrahim *et al.* (1998) werden die pflanzlichen OMTs anhand ihrer Substratspezifität in vier verschiedene Klassen eingeteilt. Klasse A umfasst OMTs, die an der Methylierung von Phenylpropanoiden und den daraus abgeleiteten Derivaten beteiligt sind. Klasse B enthält die Enzyme, die die Methylierung von Flavonoiden katalysieren. Zur Klasse C gehören OMTs, die Alkaloide umsetzen können und Klasse D umfasst die OMTs, die als Substrate sonstige nicht näher charakterisierte aliphatische Verbindungen umsetzen.

Die OMTs der Klasse A stellen die in Pflanzen am besten charakterisierte Klasse dar, da sie unter anderem an der Ligninbiosynthese beteiligt sind (Abbildung 7). Das Stützgerüst der pflanzlichen Zellwand ist ein quervernetztes hochpolymeres Material, das aus drei monomeren Bausteinen, den drei Phenylpropanen p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol besteht. Die OMTs dienen dabei zur Übertragung der Methylgruppen auf die Hydroxygruppen der Zimtsäurederivate.

Dabei wurde ursprünglich eine Umsetzung der Kaffeesäure zur Ferulasäure durch sogenannte Kaffeesäure-OMTs Caffeic-acid-O-Methyltransferase (COMTs) angenommen, sowie die Umsetzung der entsprechenden CoA-Ester durch Kaffeesäure-CoA-OMTs Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase (CCOMT). Nach heutigen Erkenntnissen ist dieses Modell nicht korrekt, da beispielsweise die COMT in vielen Fällen 5-Hydroxyferulasäure als Substrat bevorzugt und auch die entsprechenden Aldehyde gegenüber ihren Phenylpropansäuren schneller umgesetzt werden. Das bisherige Biosyntheschema muss daher um alternative und neue Verzweigungen erweitert werden (Dixon *et al.* 2001).

Trotz der großen Anzahl verschiedener OMTs wird von allen OMTs ausschließlich ein Co-Substrat, S-Adenosyl-L-methionin (SAM), als Methyl donor genutzt. Diese SAM-abhängigen Methyltransferasen [EC 2.1.1.N] übertragen die Methylgruppe von SAM auf ein Akzeptormolekül, wobei das korrespondierende Methoxyderivat entsteht und S-Adenosyl-homocystein (SAH) freigesetzt wird.

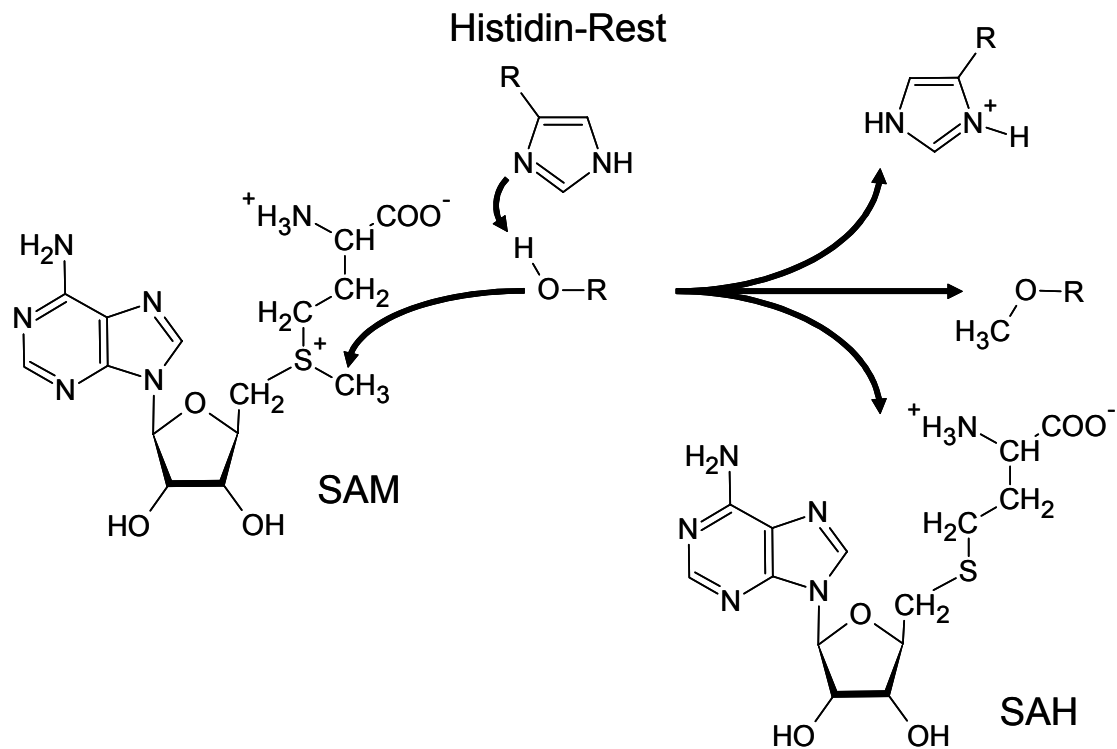


Abbildung 10 Reaktionsschema für O-Methyltransferasen. Der Histidinrest im aktiven Zentrum der OMT deprotoniert die Hydroxylgruppe des Substrates. Dadurch wird der Angriff des Alkoholat-Anions auf die reaktive Methylgruppe von S-Adenosyl-L-methionin (SAM) ermöglicht und der Methylrest auf das Substrat übertragen. Unter Freisetzung von S-Adenosyl-homocystein (SAH) wird das entsprechende O-Methylderivat gebildet.

Obwohl große Unterschiede hinsichtlich der Substratspezifität bestehen konnten in 56 verschiedenen SAM-abhängigen pflanzlichen OMTs drei konservierte Regionen aufgezeigt werden, die vermutlich die SAM-bindenden Domänen darstellen (Joshi und Chiang 1998). Diese bilden das aktive Zentrum des Enzyms. Der katalytische Mechanismus pflanzlicher OMTs (Abbildung 10) wurde anhand von Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt (Zubieta *et al.* 2001 und 2002). Ein Histidinrest (His) im aktiven Zentrum dient als Base zur Deprotonierung der Hydroxylgruppe des Substrates, worauf das Alkoholat-Anion

die reaktive Methylgruppe von SAM angreift und diese auf das Molekül transferiert wird. Mutationen des His-Rests zu Leucin, Alanin, Glutamin, Lysin oder Asparagin eliminierten die Methyltransferase-Aktivität vollständig, was die essentielle Bedeutung des Histidin-Rests für die katalytische Aktivität zeigt.

Pflanzliche OMTs finden sich unter anderem im Phenylpropanoidstoffwechsel. Methylierte Phenylpropanoide werden in der Lignifizierung (Pilate *et al.* 2002, Rastogi und Dwivedi 2006) oder auch für die Synthese von Abwehrsubstanzen verwendet. Beispielsweise konnte in *H. vulgare* die pathogeninduzierte Hochregulation einer O-Methyltransferase nach Inokulation mit *E. graminis* gezeigt werden (Gregersen *et al.* 1994). Die Autoren vermuten in diesem Fall einen Zusammenhang mit der Flavonoidbiosynthese. Eine verstärkte oder auch veränderte Synthese von Phenylpropanoiden ist somit eine Abwehrreaktion der Pflanze auf den eindringenden Pilz.

Das in dieser Arbeit verwendete O-Methyltransferase-Gen aus *Fragaria x ananassa* (*FaOMT*) wurde von Wein *et al.* (2002) aus der mRNA reifer Erdbeerfrüchte kloniert. Das kodierende Enzym ist an der Biosynthese von 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3[2H]-furanon (DMMF), einer der Hauptkomponenten des Erdbeeraromas, beteiligt. In Tests zur Substratspezifität von rekombinanter *FaOMT* konnte diese neben 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanon (HDMF) auch 3,4-Dihydroxy-benzaldehyd, Kaffeesäure, Brenzcatechin und Kaffeeoyl-CoA umsetzen. Eine identische partielle Nukleotidsequenz (FAN R1) wurde von Manning (1998) isoliert. Ihre Expression wurde während der Fruchtreifung bestimmt und als mutmaßliche OMT identifiziert.

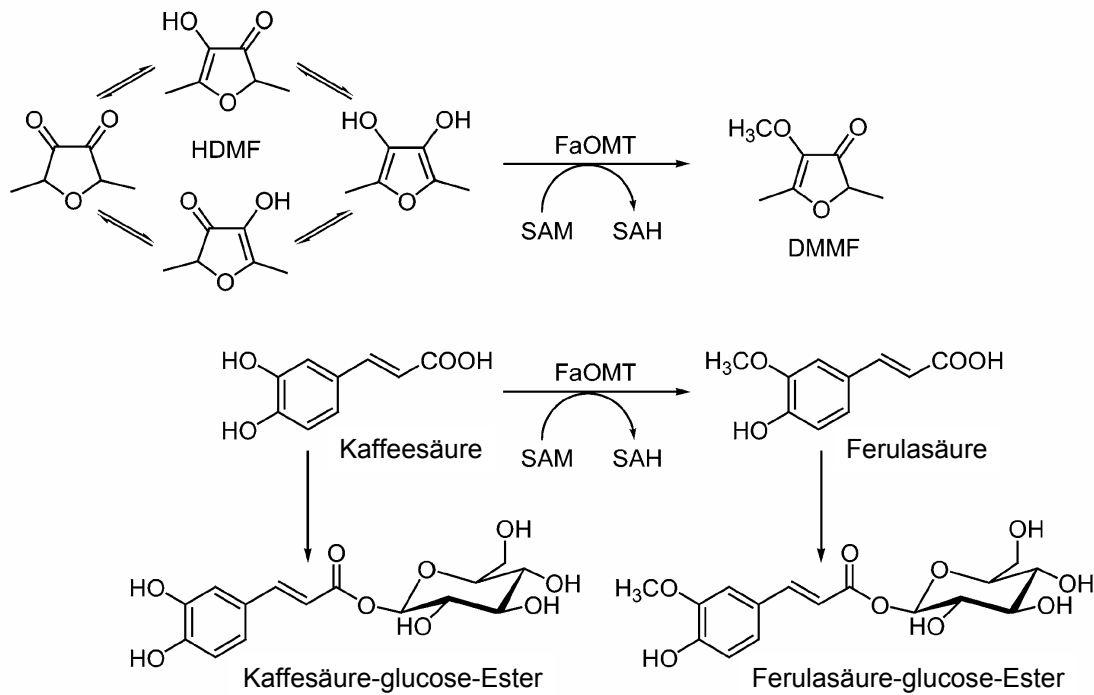


Abbildung 11 Enzymatische Reaktionen die durch die *Fragaria x ananassa* O-Methyltransferase (*FaOMT*) *in planta* katalysiert werden. HDMF 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-[2H]-furanon; DMMF 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3[2H]-fuanon; SAM S-Adenosyl-L-Methionin; SAH S-Adenosyl-L-Homocystein (Lunkenbein *et al.* 2006c).

In der Erdbeerfrucht katalysiert FaOMT die Methylierung von HDMF zu DMMF, sowie die Methylierung von Kaffeesäure zu Ferulasäure (Abbildung 11) (Wein *et al.* 2002). Die Herabregulation *in planta* in stabil transgenen Erdbeerpflanzen mit *antisense* Konstrukten der *FaOMT* bestätigte dieses Ergebnis (Lunkenbein *et al.* 2006c). Kaffee- wie Ferulasäure liegen in der Erdbeerfrucht nicht als freie phenolische Säuren vor (Määttä-Rhihinen *et al.* 2004) und wurden deshalb über die jeweiligen Glucose-Ester quantifiziert. Die Untersuchungen zur stabil transgenen Herabregulation der *FaOMT* ergaben zwar eine vollständige Unterdrückung der Methylierung von HDMF, aber gleichzeitig zeigte sich, dass eine vollständige Eliminierung der Ferulasäurederivate nicht möglich war. Die Autoren begründen dies mit der Bevorzugung der Kaffeesäure als Substrat der FaOMT, so dass bei verringerter enzymatischer Aktivität das präferierte Substrat zu einem höheren Anteil umgesetzt wird. Der Effekt der Herabregulation wirkt sich stärker auf die Umsetzung von HDMF aus, die in geringerem Maß katalysierte Reaktion. Alternativ ist auch die Expression einer unabhängigen weiteren OMT denkbar, die Kaffeesäure umsetzt. Möglicherweise

eine CCOMT, die auf struktureller Ebene nur geringe Ähnlichkeit mit der FaOMT aufweist. Untersuchungen in *H. vulgare* lassen die Existenz weiterer ortho-Diphenol-OMTs vermuten (Gregersen *et al.* 1994).

FaOMT wird reifekorreliert exprimiert. Erst ab dem 19. Tag nach dem Öffnen der Blüten können *FaOMT* Transkripte nachgewiesen werden, deren Gehalte anschließend stark zunehmen (Maning 1998; Wein *et al.* 2002). Diese Expressionsdaten decken sich mit der postulierten Funktion der *FaOMT in planta*, der Methylierung von DMMF, einer der Hauptaromenkomponenten der Erdbeerfrucht, und der Umsetzung von Kaffeesäure zu Ferulasäure im Phenylpropanoidstoffwechsel.

1.6 Untersuchungen des Sekundärstoffwechsels reifender Erdbeerfrüchte

Die Erdbeere eignet sich als Mitglied der für den Obstbau bedeutenden Familie der *Rosaceae* als Modellorganismus zur Untersuchung von Vorgängen der Fruchtreifung. Während der Fruchtentwicklung und Reife finden innerhalb der Frucht ständige Veränderungen von Proteinkonzentrationen und Enzymaktivitäten statt, deren Auslöser oft Verschiebungen des mRNA-Profiles sind. Phänotypisch zeigt sich diese Regulation in morphologischen Änderungen von Form, Größe, Farbe, Aroma und Textur der Frucht. Die Mechanismen der Fruchtreifung wurden aufgrund des starken Interesses an einer verbesserten Fruchtqualität in den vergangenen Jahren vermehrt untersucht.

1.6.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten *in vitro*

Bereits 1988 konnte mittels *in vitro* Enzymassays die Aktivität der PAL und UDP-Glucose:Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase (UDPGFT) in Erdbeerfrüchten bestimmt werden (Given *et al.* 1988b). Untersuchungen bei verschiedenen Wachstums- und Reifestadien zeigten eine Zunahme der Aktivität beider Enzyme, die mit dem steigenden Anthocyangehalt der Erdbeerfrüchte korreliert.

Bei weiteren Studien zur Aktivität der PAL in reifenden Erdbeeren konnten zwei Maxima ermittelt werden (Cheng und Breen 1991). Die Analyse von Proteinrohextrakt aus Erdbeerfrüchten ergab ein frühes PAL-Aktivitätsmaximum, fünf Tage nach der Anthese in grünen Früchten. Gleichzeitig wurden die höchsten Konzentrationen an löslichen Polyphenolen

bestimmt. Anschließend nahm die PAL Aktivität ab. Die zweite Aktivitätszunahme der PAL setzte nach etwa 23 Tagen in fast reifen Früchten ein. Die zunehmende Enzymaktivität korrelierte mit der einsetzenden Bildung der Anthocyane.

Halbwirth *et al.* (2006) analysierten die Aktivitäten verschiedener Schlüsselenzyme der Flavonoid-Biosynthese während der Erdbeerfruchtreifung: PAL, Flavanon-3-Hydroxylase (FHT), Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR), Flavonol Synthase (FLS), Flavonoid-3-glucosyltransferase (F3GT) und Flavonoid-7-glucosyltransferase (F7GT). Mit Ausnahme der FLS konnten für alle Gene jeweils zwei Aktivitätsmaxima ermittelt werden. Eines in der frühen Phase und ein zweites in der späten Phase der Fruchtreifung. Der erste Peak korrespondiert mit der Bildung der Flavanole, der zweite Peak mit der Akkumulation von Anthocyanen und Flavonolen. Auch für die Aktivität der Chalcon-Synthase (CHS) und der Chalcon-Isomerase (CHI) wurde ein schwaches zweites Aktivitätsmaximum in der reifen Erdbeerfrucht gezeigt. Es wird deshalb vermutet, dass die Biosynthese der Flavonoide in Erdbeerfrüchten in zwei Phasen abläuft.

1.6.2 Analyse von Genexpressionen verschiedener Enzyme des Sekundärstoffwechsels

Die Bestimmung der Expression von Genen, die ausgewählte Enzyme des Sekundärstoffwechsels kodieren, ist ein weiterer Weg um die Vorgänge während der Fruchtreifung zu analysieren. Eine Möglichkeit zur Identifizierung von unbekanntem Genen ist dabei die Isolierung von mRNA und die anschließende Konstruktion einer cDNA Bibliothek.

Um reifekorrelierte Gene verschiedener Stoffwechselwege zu klonieren wurde die Technik der differentiellen Durchmusterung einer substraktiven cDNA-Bibliothek mit *Southern Blots* kombiniert (Medina-Escobar *et al.* 1997).

Ebenfalls eine cDNA Bibliothek in Kombination mit *Northern Blots* wurde zur Untersuchung der reifekorrelierten Expression von 26 verschiedenen *Expressed Sequence Tags* (ESTs) in der Erdbeerfrucht verwendet (Manning 1998). Dabei konnten unter anderem die ESTs einer OMT, zwei CHS, vier Flavonoid-3-Hydroxylasen (F3H) und einer UDP-Glucose:Flavonol-3-O-glucosyltransferase (UFGT) zugeordnet werden.

Durch die Analyse mit Northern Blots wurden für ein potentielles DFR-Gen zwei Expressionsmaxima ermittelt (Moyano *et al.* 1998). Die Expression steigt in grünen Erdbeerfrüchten an, fällt anschließend ab und nimmt in der weißen Phase der Fruchtreifung wieder stark zu. Dieses zweite Expressionsmaximum verläuft parallel zu der Akkumulation der Anthocyane. Die Genexpression der DFR konnte in unreifen grünen Früchten durch das Entfernen der Nüsschen induziert werden. Die Induktion wurde jedoch durch die Behandlung mit einer Auxin-Paste wieder inhibiert. Dieses Ergebnis lässt auf eine hormonale Regulation der DFR durch das Pflanzenhormon Auxin schließen.

Mit der fortschreitenden Entwicklung der Analysemethoden wurden Bestimmungen des Expressionsprofils auch mit quantitativer PCR (qPCR) durchgeführt. Bei der Untersuchung einer mit der Lignifizierung assoziierten CAD in Erdbeeren konnte eine Zunahme der Genexpression während der Reifung ermittelt werden (Blanco-Portales *et al.* 2002). Diese steht vermutlich mit der Zunahme des Leitbündelgewebes des wachsenden Receptaculums in Zusammenhang. Die Analyse mit *Southern Blots* zeigte, dass mehr als eine Kopie der CAD in *Fragaria x ananassa* vorhanden ist, möglicherweise eine kleine Genfamilie. Die Induktion der CAD Aktivität durch Entfernen der Nüsschen konnte durch eine nachfolgende Applikation von Auxin nicht aufgehoben werden.

Eine größere Datenbank mit insgesamt 1701 cDNAs wurden von Aharoni und O'Connell (2002) mittels Microarrays auf Veränderungen während der Fruchtreife untersucht. Insgesamt konnten 537 verschiedene cDNAs identifiziert werden, die in unterschiedlichen Reifephasen und/oder in Nüsschen und Blütenboden unterschiedlich exprimiert waren. Dadurch konnte ein wichtiger Einblick in die Veränderungen der Genexpression im Verlauf der Fruchtreifung gewonnen werden.

Korrespondierend zu den Ergebnissen der Enzymaktivität (Halbwirth *et al.* 2006) konnte die Expression von Genen der Flavonoid- und Proanthocyanbiosynthese in reifenden Erdbeerfrüchten nachgewiesen werden (Almeida *et al.* 2007). Die Bestimmung der Genexpressionen ergab für die Gene des Phenylpropanoidstoffwechsels (PAL, C4H, 4CL) ebenfalls eine zweiphasige Expression mit einem Maximum in der frühen Entwicklungsphase und einem zweiten in der späten Reife. Auch für vier CHS Allele konnte ein solches Expressionsprofil mit einer maximalen Genexpression kurz vor der

letzten Reifephase nachgewiesen werden. Eine vergleichbare zweiphasige Expression wurde ebenfalls für einige Gene des Flavonoidstoffwechsel bestimmt. CHI, FHT, Anthocyanidinsynthase (ANS) Anthocyanidinreduktase (ANR) und Leukoanthocyanidin-4-Reduktase (LAR) zeigten ein Maximum in grünen Früchten und ein zweites in der späten weißen Phase. Für einige weitere Gene des Flavonoidstoffwechsel hingegen wurde eine einphasige Expression ermittelt. DFR und eine Flavonoid-glycosyltransferase (FGT) zeigten eine Zunahme der Expression mit fortschreitender Reife der Früchte. Die Expression der FLS fiel in der letzten Reifephase deutlich ab.

1.6.3 Untersuchungen an rekombinanten Enzymen

Die heterologe Expression von Enzymen und anschließende Charakterisierung ist eine weitere Möglichkeit zur Analyse von Genfunktionen. Dabei werden Gene des zu untersuchenden Organismus subkloniert und die entsprechenden rekombinanten Enzyme in geeigneten Wirtsorganismen exprimiert.

Zur Charakterisierung einer Alkohol-Acyltransferase (SAAT) aus Erdbeeren, welche durch cDNA Microarrays identifiziert wurde, wurde das Protein heterolog in *Escherichia coli* exprimiert (Aharoni *et al.* 2000). Das so erzeugte rekombinante Enzym katalysierte *in vitro* die Bildung einer Reihe flüchtiger Ester, welche eine wichtige Rolle für das Aroma der reifen Erdbeerfrucht spielen.

Die funktionelle Charakterisierung und die Analyse der Substratspezifität der FaOMT wurde auch an heterolog exprimiertem Protein durchgeführt (Wein *et al.* 2002). Das in Erdbeerfrüchten reifekorreliert gebildete Enzym katalysiert unter anderem die Bildung von DMMF, einer wichtigen Komponente des Erdbeeraromas.

Weiterhin wurde bei der Untersuchung der Genfunktion einer CAD aus Erdbeeren zur Charakterisierung und Bestimmung der Enzymaktivität rekombinantes Protein verwendet (Blanco-Portales *et al.* 2002).

An der Biosynthese der Schlüsselverbindung HDMF des Erdbeeraromas ist eine Chinon-Oxidoreduktase aus Erdbeerfrüchten (FaQR) beteiligt. An heterolog exprimiertem Protein konnte die enzymatische Aktivität anhand der Bildung von HDMF nachgewiesen werden (Raab *et al.* 2006).

Bei der Charakterisierung der Glycosyltransferase FaGT2 wurde diese Methode ebenfalls verwendet (Lunkenbein *et al.* 2006a). Als Substrate akzeptierte das

rekombinante Enzym Benzoe- und Zimtsäure sowie deren Derivate und wandelte diese in die entsprechenden Glucose-Ester um, dabei überträgt sie den Zuckerrest aus UDP-aktivierter D-Glucose. Die energiereichen Produkte können Vorläufersubstanzen anderer Sekundärmetabolite, beispielsweise von Aromastoffen, sein. Die Expression der FaGT2 korreliert mit der zunehmenden Reife der Erdbeerfrüchte und ist negativ reguliert durch Auxin, sowie induzierbar durch Hydroxyzimtsäuren.

Neben den Untersuchungen zur Genexpression verwendeten Almeida *et al.* (2007) zur Charakterisierung der wichtigsten Enzyme der Flavonoid- und Proanthocyanbiosynthese zusätzlich heterolog exprimierte Proteine von ANR, ANS, DFR, FGT, FHT, FLS and LAR um diese auf ihre Aktivität sowie Substratspezifität hin zu testen.

Die Charakterisierung der Anthocyanidin-Glycosyltransferase FaGT1 wurde ebenfalls an heterolog exprimiertem Enzym durchgeführt (Griesser *et al.* 2008). Aktuell wird bei Genfunktionsanalysen, entsprechend dem Stand der Technik, eine Kombination von cDNA Datenbanken und Proteinassays mit rekombinantem Protein eingesetzt, in Verbindung mit Expressionsanalysen durch quantitative PCR.

1.6.4 Studien von Genfunktionen *in planta*

Während alle in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Methoden zur Genfunktionsanalyse *in vitro* durchgeführt werden kann die Untersuchung *in planta* für die endgültige Feststellung einer Genfunktion insbesondere bei unbekanntem Genen sehr wichtig sein. Einflüsse die ausschließlich in Pflanzen auftreten können sind beispielsweise eine spezifische Lokalisation von Enzymen in der Zelle, unterschiedliche pH Werte in verschiedenen Geweben, Rückwirkungen auf benachbarte Stoffwechselwege oder auch Reaktionen auf Umwelteinflüsse oder bestimmte Co-Faktoren. Um eine Genfunktion sicher zuzuordnen, muss diese unter Umständen *in planta* untersucht werden. Meist werden diese Experimente an sogenannten *loss-of-function* Mutanten mit einer verringerten Genfunktion durchgeführt.

Dazu gibt es prinzipiell zwei Arbeitsweisen. Erstens ist es möglich eine stabil transgene Pflanze zu erzeugen. Außerdem besteht, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, die Möglichkeit eine transiente Stilllegung zu induzieren.

Durch die Expression einer *antisense* Sequenz einer Pektatlyase konnte die Expression des entsprechenden Gens in transgenen Erdbeerpflanzen herabreguliert werden (Jiménez-Bermúdez *et al.* 2002). Die Erdbeerfrüchte unterschieden sich von den nativen Kontrollen weder in Farbe, Größe, Gewicht noch Form, wiesen aber eine deutlich festere Textur auf. Außerdem war die Erweichung der Früchte nach der Ernte deutlich verlangsamt.

Lunkenbein *et al.* (2006a, 2006b, 2006c) induzierten ebenfalls durch stabil transgene Expression von *antisense* Transkripten ein *silencing* und untersuchten die Funktionen der reifekorrelierten Gene FaGT2, FaCHS (Kapitel 1.4) und FaOMT (Kapitel 1.5) *in planta*.

Zur funktionellen Analyse homologer und heterologer Promotoren in Erdbeerfrüchten wurde die transiente Expression mit einer biolistischen Methode zur Transformation kombiniert (Agius *et al.* 2005). Jedoch wurden die Früchte dabei für die Experimente von der Pflanze getrennt.

In der verwandten Walderdbeere *Fragaria vesca* wurde ein *sense* Konstrukt einer Methylesterase zur *Co-Suppression* eingesetzt (Osorio *et al.* 2008).

Die kürzlich veröffentlichte Genfunktionsanalyse der FaGT1 wurde mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode des agrobakterienvermittelten transienten *silencing* ergänzt (Griesser *et al.* 2008).

1.7 RNA Interferenz (RNAi)

Die klassische Sicht, dass DNA in RNA transkribiert und diese in Protein translatiert wird, weist der RNA die alleinige Rolle eines Informationsträgers, aber keine regulatorische Funktion zu (Brodersen und Voinnet 2006). Daneben wurden nicht-kodierende Bereiche der DNA lange Zeit als Ballast ohne Funktion wahrgenommen. Diese Ansichten müssen nach der Entdeckung der RNA Interferenz neu überdacht werden, denn die Erkenntnisse der letzten 20 Jahre zeigen ein ganz anderes Bild mit vielfältigsten regulatorischen Aufgaben der RNA. In dieser Arbeit wird näher auf die sogenannte Posttranskriptionale Genstilllegung (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) und die Nutzung des Effektes zur spezifischen Herabregulation der Genexpression (*silencing*) in Pflanzen eingegangen.

Die Möglichkeit der Auslöschung einer *messenger* RNA (mRNA) durch Einbringen einer komplementären (*antisense*) RNA ist schon seit Anfang der 80er Jahre bekannt und wurde vielfältig für Genfunktionsanalysen genutzt. Da

der Abbau nach der Transkription der mRNA erfolgt, wurde dieser Vorgang als PTGS bezeichnet (Kuhlmann und Nellen 2004).

Eine weitere Möglichkeit PTGS zu induzieren ist durch die Arbeitsgruppe um Napoli *et al.* (1990) entdeckt worden, die in transgenen Petunien zusätzliche Kopien eines CHS-Gens einbrachten. Entgegen der ursprünglichen Annahme einer Intensivierung der Blütenfarbe resultierte daraus eine Abnahme derselben. Das zusätzliche Gen löste eine Blockade der Anthocyanbiosynthese aus. Die Blüten einzelner Linien waren vollständig weiß. Bei Untersuchungen zur Genexpression der CHS wurde dann eine 50fache Reduktion der mRNA der CHS festgestellt. Dieses Phänomen wurde von den Autoren *Co-Suppression* genannt.

Unabhängig von dieser Beobachtung ist für dasselbe Phänomen im Brotschimmelpilz *Neurospora crassa* der Begriff *Quelling* eingeführt worden. Entgegen der ursprünglichen Annahme einer Zunahme wurde, ebenfalls durch eine zusätzlich eingebrachte Genkopie, die Expression eines Enzyms für einen Farbstoff herabgesetzt (Kuhlmann und Nellen 2004).

In beiden Fällen wird die Herabregulation möglicherweise durch die imperfekte Integration des transgenen Locus und der daraus resultierenden Translation von doppelsträngiger RNA (dsRNA) hervorgerufen (Brodersen und Voinnet 2006).

Der Begriff RNA-Interferenz (RNAi) wurde zum ersten Mal von Fire *et al.* (1998) im Zusammenhang mit der Auslöschung der mRNA durch doppelsträngige RNA im Nematoden *Caenorhabditis elegans* verwendet.

Alle diese Begriffe beschreiben im Prinzip die Beobachtung der Auslöschung der mRNA durch einen zelleigenen Abbaumechanismus. In dieser Arbeit wird deshalb als Oberbegriff die Bezeichnung RNA-Interferenz (RNAi) verwendet.

Verschiedene Methoden können ein PTGS in Pflanzen induzieren (Ossowski *et al.* 2008, Abbildung 12). Die Expression von doppelsträngiger RNA (dsRNA) durch selbstkomplementäre Nukleotidsequenzen, sogenannte *inverted repeats* (IR) kann zur Induktion der RNAi genutzt werden. Die resultierende RNA faltet sich nach Expression zu einem Doppelstrang und besitzt dann eine als *hairpin* (hp) oder Haarnadel bezeichnete Struktur. Auf dem hpRNAi Weg wird durch eine durchgehende Transkription eines Sinn- und eines Gegensinnabschnitts des Zielgens eine solche hpRNA gebildet. Diese dsRNA wird nun von RNaseIII ähnlichen Enzymen, den Dicer-like (DCL) Enzymen in sogenannte *short*

interfering RNAs (siRNAs) prozessiert. Jedes der DCL Enzyme interagiert mit einem spezifischen dsRNA Bindeprotein, beispielhaft ist HYL1 für DCL1 in Abbildung 12 dargestellt. Die DCL Enzyme, wie auch der Wirkungsort der gesamten RNAi Maschinerie, sind im Cytoplasma außerhalb des Zellkerns lokalisiert (Kent und MacMillan 2004). Moissard und Voinnet (2006) beschreiben vier unterschiedliche Dicer-like Proteine in *Arabidopsis*. Die kurzen siRNA Moleküle liegen als Doppelstrang vor und haben jeweils am 3'-Terminus einen Überhang von zwei bis drei Nukleotiden, das 5'-Ende trägt eine Phosphatgruppe und das 3'-Ende eine Hydroxylgruppe (Kuhlmann und Nellen 2004). Die Länge beträgt zwischen 20 und 26 Nukleotide, wobei die am häufigsten auftretende Form eine Länge von 21 nt aufweist und als Haupteffektor der RNAi gilt. Dicer-like 4 (DCL4) bildet die 21 nt langen siRNAs aus dsRNA, welche durch die siRNA-spezifische Methyltransferase HEN1 an ihren 3'-Termini methyliert werden (Dunoyer *et al.* 2005). Anschließend binden die Moleküle als einzelsträngige RNA (ssRNA) an Ribonuklease H-ähnliche Proteine aus der Argonaut Familie (AGO) in einem als *RNA-induced silencing complex* (RISC) bezeichneten Komplex. Der RISC Komplex bindet, geleitet von dem siRNA-Template, gezielt an komplementäre RNA Sequenzen über Watson-Crick Basenpaarung (Baulcombe 2007). Diese Ziel-RNA wird durch den RISC Komplex an der Position gegenüber dem Phosphatrest zwischen der 10. und 11. Base von 5' Ende des siRNA-Templates gespalten (Tolia und Joshua-Tor 2007). Die mRNA wird durch Restriktion abgebaut und somit ausgelöscht. Dabei ist eine vollständige Übereinstimmung des siRNA-Templates und der komplementären Zielstruktur notwendig. Der Prozess des PTGS ist stark selektiv.

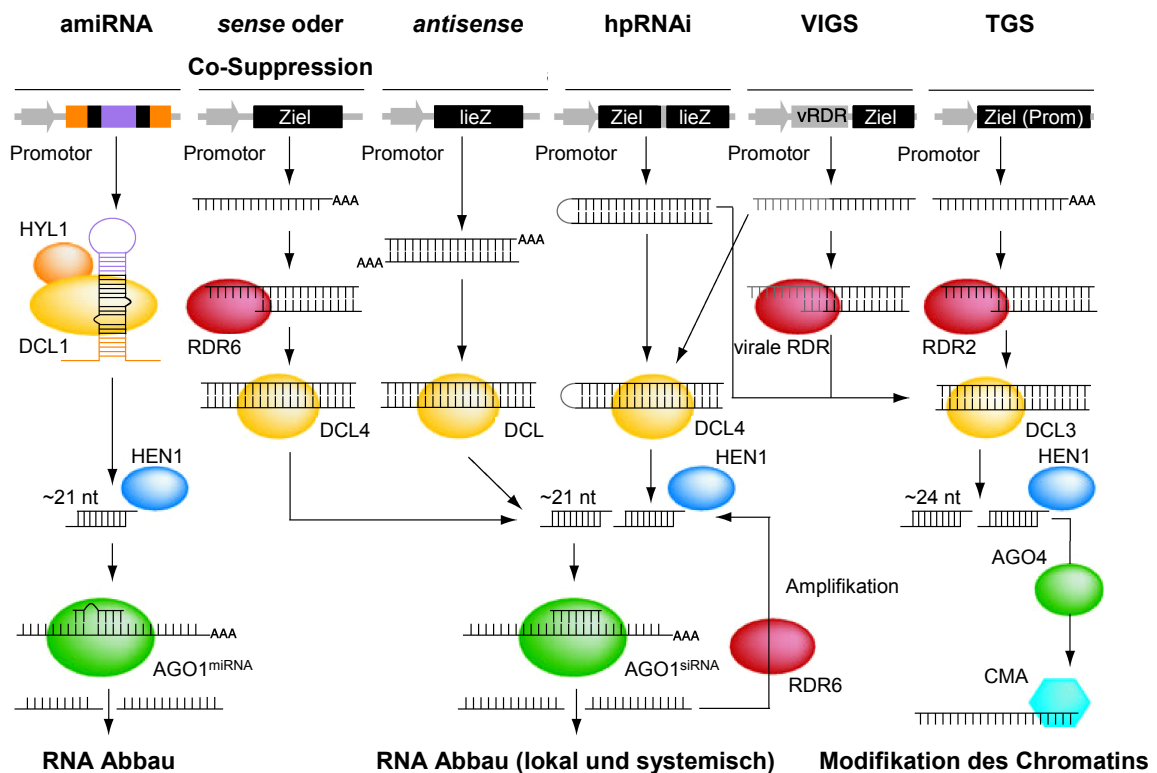


Abbildung 12 Unterschiedlichen Methoden um ein PTGS in Pflanzen zu induzieren (Ossowski *et al.* 2008). Dargestellt sind künstliche microRNAs (amiRNA), Co-Suppression, *antisense*-Weg, Haarnadelstrukturen (hpRNAi), Virus-induzierte Genstilllegung (VIGS) und die transkriptionale Genstilllegung (TGS). Ausgehend von nichtkodierenden Genen werden amRNAs transkribiert und durch Dicer-like 1 (DCL1) Enzyme in 21 nt lange siRNAs prozessiert. Lange dsRNAs aus hp-Konstrukten und VIGS, oder synthetisiert aus ssRNA durch Mitglieder der RNA-dependent RNA Polymerasen (RDR2 und RDR6), werden durch DCL Enzyme wie DCL4 und DCL3 in 21 bis 24 nt lange siRNAs prozessiert. Jedes DCL Protein interagiert dabei mit einem spezifischen dsRNA Bindeprotein. Stellvertretend ist hier HYL1 für DCL1 dargestellt. Die 21nt lange siRNAs und miRNAs leiten den spezifischen Abbau des Zieltranskripts durch ein Protein der Argonaute Familie (AGO1) ein, während die 24 nt langen siRNAs, vermittelt durch AGO4, an Modifikationen des Chromatins (CMA) beteiligt sind. miRNA und siRNA Duplexe werden durch die Methyltransferase HEN1 am 3'-Ende O-methyliert. vRDR ist das Gen für die virale RdRP, die den dsRNA Strang des VIGS Transkripts synthetisiert.

Dicer-like 3 (DCL3) erzeugt aus der dsRNA 24 nt lange siRNAs (Dunoyer *et al.* 2005) die anschließend zu einer transkriptionellen Stilllegung des Chromatins führen. Dieses erfolgt durch die Methylierung von Cytosin und von spezifischen Lysinresten der Histone (Brodersen und Voinnet 2006).

Eine weitere Methode RNAi zu induzieren ist der als *sense* oder *Co-Suppression* bezeichnete Weg. Dieser wird durch eine als fehlerhaft (aberrant) erkannte mRNA ausgelöst. Eine solche aberrante mRNA kann durch

unvollständige Transkription entstehen oder andere Defekte aufweisen. Merkmal könnte auch ein fehlender Poly(A)-Schwanz oder ein fehlendes 5'-Cap sein. Diese beiden Möglichkeiten führen im Regelfall zu einem Abbau des Transkripts durch eine 5'-3' Exonuklease, beispielsweise XRN4 (Brodersen und Voinnet 2006). Wird das Transkript als aberrant erkannt, synthetisiert RDR6, eine RNA-abhängige RNA Polymerase (*RNA dependent RNA polymerase*, RdRP), den komplementären Strang. Die RdRP Aktivität benötigt in *Arabidopsis* noch ein *coiled-coil* Protein unbekannter Funktion (SGS3) und eine mutmaßliche RNA Helicase (SDE3) (Brodersen und Voinnet 2006). Die entstandene dsRNA wird dem Abbau durch einen DCL Enzymkomplex zugeführt. Es ist nicht abschließend geklärt, welcher Dicer-Typ RDR6 Produkte prozessieren kann, wahrscheinlich DCL4. Die erzeugten siRNAs können nun den Abbau durch den RISC Komplex initiieren.

Die gebildeten siRNAs können aber auch als ssRNA eine Primerfunktion für die RdRP übernehmen und an eine komplementäre mRNA binden. Durch eine positive Rückkopplung werden so weitere dsRNAs des Transkripts erzeugt. Die Synthese des RNA Doppelstrang durch die RDR6 kann in beide Richtungen des RNA Stranges erfolgen. Von einem siRNA-Template ausgehend in 5'-Richtung des Transkripts als primerabhängige Synthese der dsRNA, oder in 3'-Richtung des Transkripts als primerunabhängige Synthese der dsRNA. Die Prozessierung der dsRNA durch DCL4 erzeugt somit neue, sekundäre siRNAs die außerhalb der ursprünglichen Zielregion der zum *silencing* eingesetzten dsRNA liegen. Diese *de novo* Synthese ermöglicht eine Ausbreitung des Signals über die gesamte Transkriptlänge. Abbildung 13 zeigt diesen als *transitives silencing* bezeichneten Effekt. Vermittelndes Element sind dabei die 21 nt großen siRNAs, die auf diese Weise verstärkt gebildet werden und somit für eine wirksame Ausbreitung und die nötige Amplifikation des Signals in Pflanzen sorgen.

RNAi kann auch durch die Expression von *antisense* (Klahre *et al.* 2002, Meister und Tuschl 2004, Watson *et al.* 2005) Transkripten in der Zelle ausgelöst werden. Dabei wird durch die Zusammenlagerung des *sense* Transkripts mit einer komplementären *antisense* RNA ebenfalls eine dsRNA gebildet. Die durch *antisense* Transkripte ausgelöste *de novo* Synthese von dsRNAs ist, verglichen mit der Bildung sekundärer dsRNAs bei der Induktion

der RNAi durch eine dsRNA Struktur, ein langsamer Prozess (Tang und Gad 2004).

Virus-induzierte Genstilllegung (*virus induced gene silencing*, VIGS) beruht auf der Fähigkeit der Pflanzen virale dsRNA durch den RNAi Mechanismus abzubauen (Ossowski et al. 2008). Zur Replikation verwenden die eingesetzten Virusderivate eine virale RdRP (virale RDR), wodurch dsRNA des gesamten Konstrukts erzeugt wird, die entweder durch die von DCL4 generierten 21 nt langen siRNAs in den RNA-Abbau überführt werden können, oder durch die 24 bis 26 nt großen siRNAs von DCL3 zu einem *silencing* durch die Modifikation des Chromatins führen.

Die transkriptionale Genstilllegung (*transcriptional gene silencing*, TGS) bewirkt durch die Klasse der 24 bis 26 nt langen von DCL3 prozessierten siRNAs eine Methylierung der DNA und Modifikationen am Chromatin. Als Zielstrukturen werden dabei Promotorsequenzen eingesetzt.

Ein weiterer, kürzlich beschriebener Weg um ein PTGS auszulösen ist die Verwendung sogenannter künstlicher microRNAs (*artificial microRNAs*, amiRNAs). In Pflanzen werden miRNAs als ssRNAs von 20 bis 24 nt Länge aus endogenen nichtkodierenden Abschnitten prozessiert (Brodersen und Voinnet 2006). Im Gegensatz zu siRNAs besitzen miRNAs kein vollständiges Komplement der jeweiligen Zielsequenz. Sie können sowohl Methylierungen der DNA als auch den zielgerichteten Abbau eines Transkripts bewirken. In der biologischen Entwicklung von Pflanzen und Tieren ist die Kontrolle der Genexpressionen durch miRNAs ein wichtiger Teil der zelleigenen Regulation. Die meisten bisher identifizierten pflanzlichen miRNAs besitzen ein fast perfektes Komplement der jeweiligen Zielstruktur und führen zu deren Abbau durch Proteine der Argonaut Familie. Jedoch ist auch eine Kombination von Abbau des Transkripts und einer Herabregulation der Transkription durch Methylierung, wie bei tierischen Zellen, möglich. Bei der amiRNA Methode wird eine künstliche miRNA Struktur exprimiert, die prinzipiell kurzen *short hairpin* RNAs (shRNAs) ähnelt, mit dem entscheidenden Unterschied des unvollständigen Komplements. Mit Hilfe der AGO^{miRNA} Proteine wird das komplementäre Transkript anschließend spezifisch abgebaut (Ossowski et al. 2008).

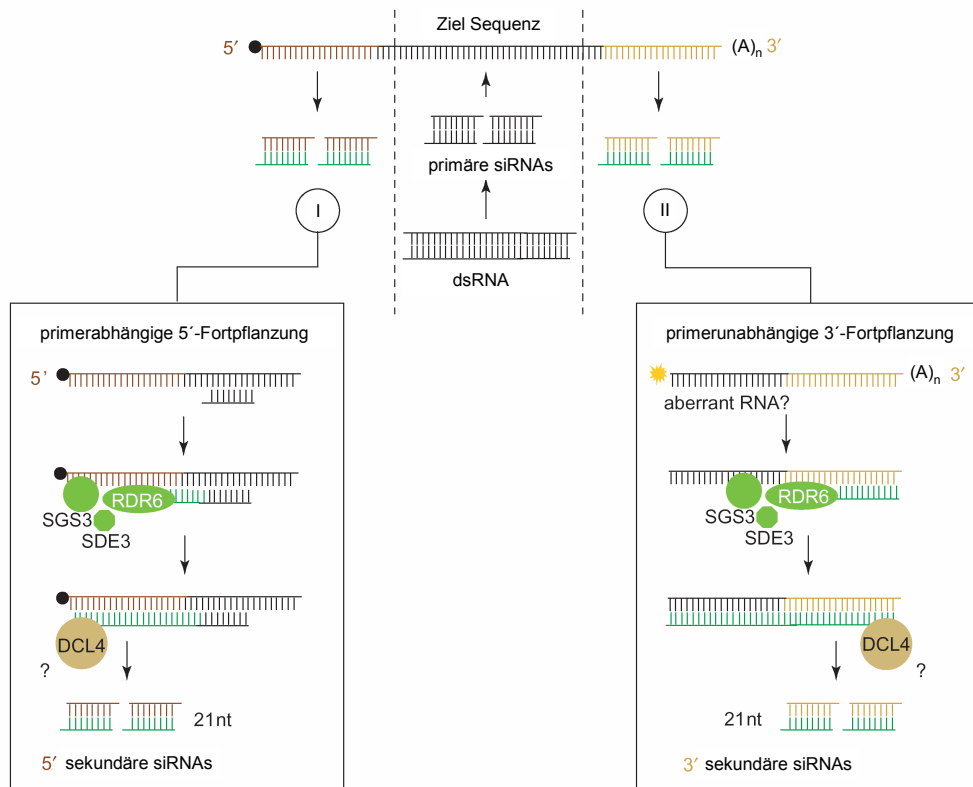


Abbildung 13 Transitives *silencing* in Pflanzen (Brodersen und Voinnet 2006) – Eine Quelle primärer siRNAs verursacht die Bildung von sekundären siRNAs 5' und 3' der ursprünglichen Zielregion der dsRNA. Die primerabhängige 5'-Fortpflanzung (I) kann, durch die Synthese des komplementären RNA-Strangs durch eine RNA *dependent* RNA Polymerase (RDR6), als eine von einer siRNA ausgehende primerinduzierte Reaktion erklärt werden. An dieser Synthese der dsRNA sind außerdem ein *coiled-coil* Protein (SGS3) und RNA Helicase (SDE3) beteiligt. Die primerunabhängige 3'-Fortpflanzung (II) kann nicht durch eine primerinduzierte Reaktion erklärt werden. Möglicherweise wird das RNA Fragment als aberrant erkannt und anschließend eine, der *sense* induzierten Herabregulation vergleichbaren, dsRNA Synthese induziert. Die resultierende dsRNA wird durch ein DCL4 in 21 nt lange siRNAs prozessiert. Sekundäre siRNAs bestehen ausschließlich aus 21 nt.

Die Verbreitung des *silencing* Signals innerhalb der Pflanze erfolgt über zwei Mechanismen, einen direkten über kurze Distanzen und einen zur Überbrückung längerer Strecken. Ausgehend von Untersuchungen zur transienten Herabregulation eines *green fluorescent protein* (GFP) an Tabak (*Nicotiana benthamiana*) und *Arabidopsis* wurde ein Modell beschrieben, bei dem die Verbreitung des *silencing* durch den Übertritt primärer 21 nt siRNAs aus einer Zelle über eine Distanz von etwa 10 bis 15 benachbarten Zellen durch sogenanntes *cell-to-cell signaling* erfolgt (Himber *et al.* 2003). Diese lösen dann

wiederum die siRNA-induzierte *de novo* Synthese neuer dsRNA aus. Über einen längeren Zeitraum kann sich der *silencing* Effekt so über das pflanzliche Gewebe ausbreiten. Eine Verbreitung des *silencing* über lange Distanzen innerhalb der Pflanze wurde durch Pfropfungsversuche mit transgenen Tabaklinien nachgewiesen, dabei wurde eine Strecke von bis zu 30 cm überbrückt (Paulaqui *et al.* 1997). Die Autoren vermuten einen Transport des Signals durch Makromoleküle innerhalb des Plasmodesmata bzw. der vaskulären Gefäße. Im Kürbis (*Curcubita maxima*) wurde das *Small RNA Binding Protein1* CmSRBP1, welches 25 nt ssRNA bindet, nachgewiesen (Yoo *et al.* 2004). Dieses Molekül unterstützt die Signaltransduktion durch das Phloem. Diese Ausbreitung des Signals erfolgt immer gerichtet entlang des Stroms durch Phloem und Plasmodesmata von der Quelle zur Senke (Voinnet 2005).

RNA-Interferenz in der Pflanze ist zum einen ein Abwehrmechanismus gegen fremde oder aberrante RNAs, beispielsweise Viren (Waterhouse *et al.* 2001) und Retrotransposons (Waterhouse *et al.* 2001; Hamilton *et al.* 2002). Neuere Erkenntnisse betonen aber immer mehr die Bedeutung der RNAi als fundamentalen Teil der Genexpression und als wichtigen Mechanismus zur endogenen Genregulation (Brodersen und Voinnet 2006, Bazzini *et al.* 2007, Ossowski *et al.* 2008). Aufgrund der Aktualität sind viele Details zum PTGS noch nicht abschließend geklärt. Die meisten Arbeiten im pflanzlichen Bereich wurden in *Arabidopsis* und *Nicotiana* durchgeführt. Dabei wurden hauptsächlich *antisense* RNA, *inverted repeats* oder hpRNAs und VIGS Systeme verwendet.

1.8 Aufgabenstellung

Die ursprüngliche „ein Gen - ein Protein“ Hypothese ist schon lange nicht mehr haltbar. Mit zunehmender Forschung wird die enge Vernetzung im Stoffwechsel und die Bedeutung sekundärer Modifikationen immer deutlicher. Auch für die Metabolitbiosynthese zeichnet sich ein Bild mit starker Quervernetzung und vielen unterschiedlichsten sekundären Modifikationen ab. Zum Verständnis der Biosynthese der einzelnen Metabolite ist die Aufklärung spezifischer Genfunktionen in der Erdbeerfrucht ein wichtiger Schritt.

Die Funktion eines pflanzlichen Gens kann *in vitro* mit Proteinextrakten oder *in vivo* in Bakterienkulturen getestet werden. Die definitive Bestätigung der Funktion *in planta* kann aufgrund der regulatorischen Einbindung des Gens in

den Stoffwechsel und eine mögliche zelluläre Kompartimentierung aber nur in der Pflanze erfolgen.

Gene der Fruchtreifung sind interessant, da sie für die Bildung wichtiger Aromakomponenten und ernährungsphysiologisch relevanter Stoffe (z.B. Antioxidantien) kodieren. Der neue Markt für Lebensmittelinhaltsstoffe und die stark wachsende Biotechnologiebranche zeigen großes Interesse an der biotechnologischen Produktion einzelner bioaktiver Naturstoffe.

Bisher ist die Regulation der an der Fruchtreifung beteiligten Gene in Erdbeeren nur unzureichend untersucht. Auf Basis von Metabolituntersuchungen und cDNA Microarrays wurden in den letzten Jahren verschiedene reifekorrelierte Gene und Metabolite entdeckt (Aharoni und O'Connell 2002; Aharoni *et al.* 2002a). Die Funktionen einiger dieser Gene konnten, über geeignete Assays oder Homologie mit bekannten Genen anderer Organismen, zugeordnet werden (Manning 1998; Aharoni *et al.* 2000, Wein *et al.* 2002). Durch eine stabil transgene Herabregulation *in planta* wurden die Funktionen einiger reifekorrelierte Gene analysiert (Jiménez-Bermúdez *et al.* 2002; Lunkenbein *et al.* 2006a, 2006b, 2006c; Osorio *et al.* 2008).

Weitere Arbeiten in Früchten wurden bisher hauptsächlich in stabil transgenen Tomaten (*Solanum lycopersicum*) durchgeführt. Endogene Gene wurden durch RNAi entweder als *sense* Konstrukt über *Co-Suppression* (Han und Grierson 2002) oder durch *inverted repeats* (IR) (Davuluri *et al.* 2005; Schijlen *et al.* 2007) herabreguliert. Eine Studie in Äpfeln (*Malus domestica*) zeigte die erfolgreiche Herabregulation der Mal d1 Expression (Majorallergen des Apfels) in stabilen Transformanten mit einem *intron-hairpin*-Konstrukt (Gilissen *et al.* 2005). Nachteile der stabil transgenen Methode sind der hohe Zeitaufwand zur Regeneration der Pflanzen und die teilweise extrem geringe Transformationsausbeute an funktionalen transgenen Linien, beispielsweise 5 von 3000 Pflanzen bei Gilissen *et al.* (2005). Außerdem ist für jede Pflanze ein spezifisches Transformationsprotokoll notwendig.

In der vorliegenden Arbeit sollte für die Früchte von *Fragaria x ananassa* eine RNAi basierte Methode zur Herabregulation von Genfunktionen *in planta* etabliert werden. Diese Methode zur funktionellen Genomik sollte sich auch durch eine möglichst schnelle Umsetzbarkeit auszeichnen. Ein alternativer Ansatz zur stabil transgenen Herabregulation, der diese Anforderung erfüllt, könnte durch die transiente Expression des *silencing* Locus erfolgen.

Spalore *et al.* (2001) demonstrierten die transiente Expression einer β -D-Glucuronidase (GUS) durch eine Agrobakterieninfiltration frischer reifer Früchte. Agius *et al.* (2005) entwickelten eine transiente Methode zur funktionellen Analyse homologer und heterologer Promotoren in Erdbeerfrüchten mit einem biolistischen Protokoll. Untersuchungen zu agrobakterienvermittelter transientser Expression und VIGS in Tomatenfrüchten ergaben hohe Transformations- und Expressionsraten der infiltrierten Früchte (Orzaez *et al.* 2006). In *N. benthamiana* konnte für eine transiente Expression durch Co-Transfektion eines grünen Fluoreszenz-Proteins (*green fluorescent protein*, GFP) und einer entsprechenden dsRNA des GFP die Herabregulation des Reporters gezeigt werden (Johansen und Carrington 2001).

Auf Basis dieser Ergebnisse war durch die transiente Expression eines *silencing* Locus eine ausreichende Transkriptmenge zur Induktion einer RNAi zu erwarten.

RNAi, induziert durch *inverted repeat* beziehungsweise *hairpin* Strukturen, ist eine neue attraktive Technik zur Untersuchung von Genfunktionen in Pflanzen (Waterhouse und Helliwell 2003, Brodersen und Voinnet 2006; Ossowski *et al.* 2008). Für die transiente Herabregulation der Genexpression durch eine gezielte Genstilllegung werden sogenannte Intron-Haarnadel (*intron-hairpin*, ihp) Konstrukte verwendet. Diese erzeugen durch die Transkription von Sinn- und Gegensinnabschnitt einer Zielsequenz hpRNAs. Wird dabei als Spacer ein Intron gewählt, so bezeichnet man diese als ihpRNAs.

Vermittelt durch *Agrobacterium tumefaciens* sollten in dieser Arbeit die Zellen reifender Erdbeerfrüchte mit den ihp Konstrukten der Zielgene transfiziert werden, um dort durch die Expression von dsRNA eine RNAi auszulösen. Bisher war eine solche transiente Stilllegung für endogene Gene in Früchten nicht durchgeführt worden.

Zur Etablierung der Methode wurde zunächst eine Chalconsynthase aus *Fragaria x ananassa* (*FaCHS*) (Aharoni *et al.* 2000) eingesetzt, deren herabregulierter Phänotyp als Aufhellen durch verminderte Anthocyanbiosynthese erkennbar sein sollte (Lunkenbein *et al.* 2006b). In einer zweiten Stufe sollte mit einer O-Methyltransferase aus *Fragaria x ananassa* (*FaOMT*) (Mannig 1998; Wein *et al.* 2002) ein Gen ohne phänotypische Auswirkung ausgeschaltet werden. Eine verminderte Aktivität der *FaOMT* sollte

sich in einem veränderten Aromaprofil der Frucht zeigen (Lunkenbein *et al.* 2006c).

Die Untersuchung der Erdbeerfrüchte erfolgte durch die Bestimmung der mRNA Expression und der Proteinaktivität, sowie einer Bestimmung der korrespondierenden Metabolite durch LC-ESI-MSⁿ. Daraus ergibt sich ein weitgehend vollständiges Bild der Genfunktionen *in planta*.

2 Ergebnisse

2.1 Analysegrundlagen und genetische Modifikationen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer schnellen und effizienten Methode zur spezifischen Herabregulation von reifekorrelierten Genen in der Erdbeerfrucht. Da kein geeigneter Virus für ein VIGS in Erdbeeren bekannt war, wurde für die Arbeit eine Methode der Genstilllegung über IR entwickelt. Zur Induktion der RNAi durch die IR wurden Konstrukte benutzt, die sogenannte ihpRNAs generieren. Diese Strukturen zeichnen sich durch eine hohe Stilllegungseffizienz der Zielgene aus (Filichkin *et al.* 2007; Ossowski *et al.* 2008).

Es wurde dazu ein kurzes Intron einer Chinon-Oxidoreduktase aus *Fragaria x ananassa* (Gene bank accession number AY158836 nt 4886-4993) verwendet. Das Intron wurde zwischen der *sense* und *antisense* Sequenz des Zielgens in ein ihp-Konstrukt auf Basis des binären Vektors pBI121 (Jefferson 1987) eingefügt. Diese zur Genstilllegung verwendete *intron-hairpin*-Kassette (Abbildung 14) wird durch den konstitutiven 35S Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und den NOS Terminator begrenzt (Kapitel 4.3.2).

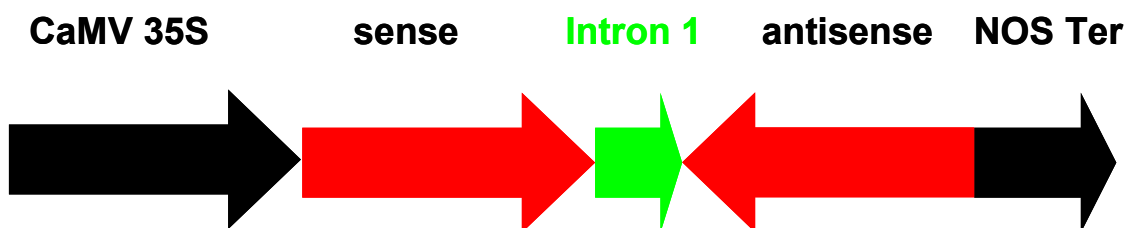


Abbildung 14 Aufbau der *intron-hairpin*-Kassette. Die Zielgenesequenz ist in Sinn- (*sense*) und Gegensinnorientierung (*antisense*) um ein Intron angeordnet. Die Kassette steht unter Kontrolle des konstitutiven *Cauliflower mosaic virus* 35S Promotors und eines NOS Terminators.

Das binäre Genstilllegungskonstrukt (Abbildung 15) wurde in *A. tumefaciens* Zellen eingeschleust, durch Agrobakterien-vermittelte Transformation in die Zellen der Erdbeerfrüchte eingebracht und damit durch die Expression der ihpRNAs eine Herabregulation des Zielgens induziert. Verglichen mit einem stabil transgenen Ansatz liefert diese neue Methode der transienten RNAi schneller ein Ergebnis, die Zeitdauer des Experiments verkürzt sich deutlich. Bei der transienten RNAi-Methode können auswertbare Ergebnisse innerhalb

von drei bis sechs Monaten erhalten werden, für die stabil transgenen Pflanzen muss aufgrund der langen Regenerationsphase mit einer Zeitspanne von 18 bis 24 Monaten gerechnet werden. Außerdem ist der Arbeitsaufwand im Labor geringer, da keine Zellkulturen, Regeneration des Kallus, Selektion der transgenen Linien etc. notwendig sind.

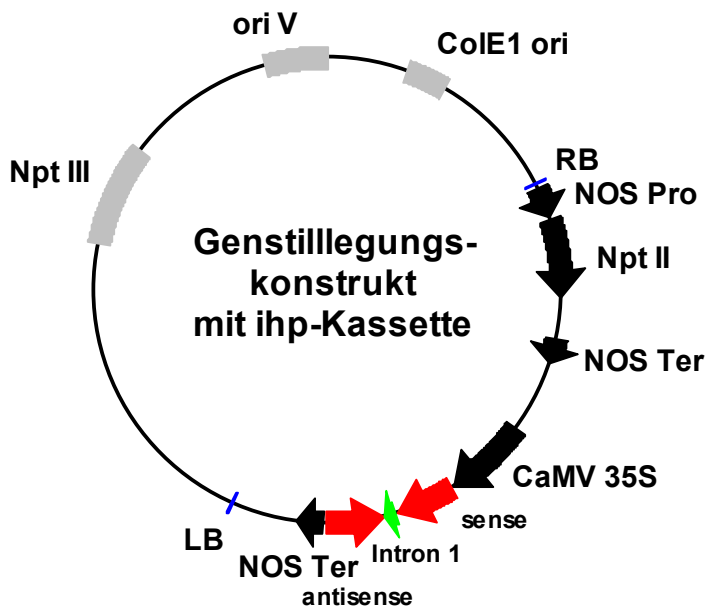


Abbildung 15 Modell eines Genstilllegungskonstrukts für die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte ihpRNA Generierung in Erdbeerfrüchten.

Als Zielgene wurden *FaCHS* und *FaOMT* verwendet und die Effekte nach der transienten Herabregulation mit Daten aus Untersuchungen an stabil transgenen Früchten verglichen (Lunkenbein *et al.* 2006b und 2006c). Zu Kontrollzwecken wurde ein identisches Vektorsystem mit einem β -D-Glucuronidase-Gen (GUS) verwendet, das mögliche methodisch bedingte Veränderungen in den injizierten Erdbeerfrüchten zeigen sollte.

In den behandelten Erdbeerfrüchten wurden die Transkriptgehalte der Zielgene mittels semiquantitativer PCR und quantitativer Real-Time PCR, die Enzymaktivitäten und die Metabolitmuster mittels LC-ESI-MSⁿ und GC-MS untersucht.

2.1.1 Transfektion der Erdbeerfrüchte

Aufgrund ihrer Bedeutung unter den kommerziell genutzten Erdbeersorten in Nordeuropa und ihren genetisch interessanten Eigenschaften wurde in dieser Arbeit die Sorte *F. x ananassa* cv. Elsanta verwendet.

Für die Transfektion der Erdbeerfrüchte wurde eine Suspension aus *A. tumefaciens* Zellen injiziert, die ein Transformationskonstrukt mit einer ihp-Kassette (Kapitel 4.3.2) zur Herabregulation eines Zielgens trugen. Zur Agrobakterien-vermittelten Transformation wurde der für die Transformation von Erdbeeren schon erfolgreich verwendete Stamm *A. tumefaciens* AGL0 (Lazo *et al.* 1991; Lunkenbein *et al.* 2006a, 2006b, 2006c) eingesetzt. Die anschließende Expression von selbstkomplementären ihpRNAs des Zielgens sollte zum gezielten Abbau der entsprechenden Transkripte und somit zur Herabregulation der Genfunktion führen. Die Injektion der Agrobakterienlösung (Kapitel 4.3.4) in die reifenden Erdbeerfrüchte erfolgte erst in der Umschlagsphase von weiß nach rot (*turning phase*), weil das bis dahin feste und sehr dichte Gewebe der noch grünen Früchte die Infiltration zwischen den Zellen verhinderte (Abbildung 16).



Abbildung 16 Infiltration einer Erdbeerfrucht mit Agrobakterien. Man erkennt den durch die Bakteriensuspension dunkel verfärbten Fruchtboden und durch die Leitbündel austretende Flüssigkeit.

Erst ab der weißen Reifephase war eine ausreichende Verteilung der Bakteriensuspension innerhalb des gesamten Fruchtbodens möglich. Die Erdbeerfrüchte blieben anschließend bis zum gewünschten Reifestadium an den Pflanzen. Der natürliche Reifeprozess der Früchte wurde, abgesehen von der Injektion, nicht beeinflusst. Die erreichte, weitgehend vollständige, Infiltration des Interzellularraums der Erdbeerfrüchte durch die Agrobaktériensuspension in Verbindung mit der Verbreitung durch die Zelle zu Zelle Genstilllegung (*cell to cell silencing*, Himber *et al.* 2003) ermöglichte anschließend die signifikante Herabregulation der Genfunktion über den gesamten Zellverbund. Für gesunde virus- und stressfreie Erdbeerpflanzen wurde dabei eine Induktion der transienten Herabregulation von annähernd 100% erreicht.

2.1.2 pBI-Intron als Kontrolle

Zur Kontrolle der Transformationseffizienz und der Expression des eingebrachten Vektors in den Erdbeerfrüchten wurde zunächst eine identische Vektorkonstruktion mit einem Intron-separierten β -D-Glucuronidase-Gen (Vancanneyt *et al.* 1990) anstelle der *ihp*-Kassette verwendet, im Folgenden pBI-Intron bezeichnet (Kapitel 4.1.4.1). Die Einfügung des Introns verschiebt den Leserahmen des Gens und nur durch das Herausschneiden (*splicing*) des Introns kann eine funktionsfähige mRNA gebildet werden. Dieser Vorgang findet ausschließlich in pflanzlichen Zellen statt. Der Vektor pBI-Intron diene als Kontrollvektor, um die Effekte zu ermitteln, die durch die Verletzung bei der Injektion der Erdbeerfrüchte und durch Agrobakterien ausgelöst werden. Alle transfizierten Erdbeeren wurden identisch behandelt, somit sollten Effekte, die aus der Transfektion herrühren, in allen Früchten gleich sein. Die mit pBI-Intron infiltrierten Früchte zeigten, wie erwartet, keinen sichtbaren Phänotyp.

2.1.2.1 Expression des β -D-Glucuronidase-Gens in pBI-Intron Früchten

Die transiente Expression des β -D-Glucuronidase-Gens und das Herausschneiden des Introns wurden durch PCR-Amplifikation bestätigt. Dazu wurde das Primerpaar GUS-F2 und GUS-R2 (Kapitel 4.1.6) verwendet, um die Nukleotidsequenz um das Intron zu amplifizieren.

Ausgehend von der Total-RNA einer Erdbeerfrucht (Kapitel 4.3.1.1) wurde durch reverse Transkription (RT) die entsprechende cDNA (Kapitel 4.3.1.4) gewonnen. Daraus konnten PCR-Produkte von 724 bp mit Intron und 269 bp ohne Intron (Spur cDNA) amplifiziert werden (Abbildung 17). Die Amplifikation eines 269 bp langen PCR-Produkts aus einer mit pBI-Intron transfizierten Erdbeere (Spur cDNA) und eines 724 bp PCR-Produkts aus einer verdünnten Lösung des Vektors selbst (Spur pBI-Intron) bestätigte das korrekte Ausschneiden des Introns in den transformierten Zellen der Erdbeerfrucht.

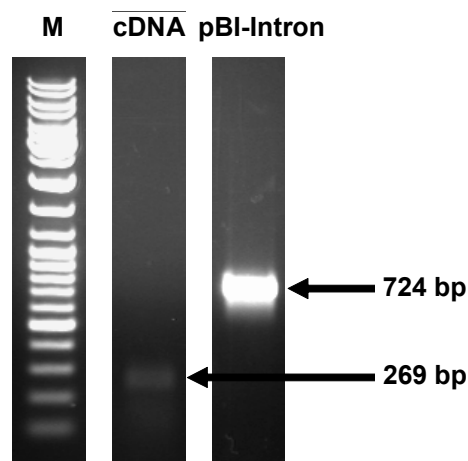


Abbildung 17 Amplifikation von GUS-Fragmenten zur Kontrolle des Intron-*splicing* von pBI-Intron. Die Abbildung zeigt links den Größenstandard (M) (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas), in der Mitte die Amplifikation eines 269bp großen GUS-Fragments (ohne Intron) aus cDNA einer mit pBI-Intron transfizierten Erdbeere (17 Tage nach Injektion) und rechts aus dem Vektor pBI-Intron ein Produkt von 724 bp (GUS-Fragment mit Intron).

2.1.2.2 β -D-Glucuronidase Aktivität in transfizierten Erdbeeren

Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde außerdem die Enzymaktivität der β -D-Glucuronidase (GUS) bestimmt. Aufgrund des niedrigen pH-Werts ($\text{pH} < 3,0$) und der stark inhibierenden Bestandteile in den Erdbeerfrüchten musste dazu ein veränderter Puffer nach Jefferson (1987) mit erhöhter Pufferkapazität (500 mM Na_2HPO_4 ; $\text{pH} = 7,0$) und 5% PVPP verwendet werden, der eine messbare Aktivität der β -D-Glucuronidase ermöglichte.

Hierzu wurden Erdbeerscheiben mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid-Lösung (X-Gluc) behandelt (Kapitel 4.3.5.1, Abbildung 18). Deutlich erkennbar

sind die blau gefärbten Regionen entlang des äußeren Randes der Frucht. Diese teilweise Blaufärbung der Scheibe ist durch eine unterschiedlich starke Expression der β -D-Glucuronidase in den Zellen der Erdbeerfrucht zu erklären. Nur in Bereichen hoher Enzymaktivität war ein histochemischer Nachweis möglich. Eine sensitivere Methode ist die fluorometrische Bestimmung der GUS-Aktivität über die Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG) (Kapitel 4.3.5.2). In der Abbildung 18 ist die Aktivität in $\text{fmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ über einen Zeitraum von 0 bis 16 Tagen nach Injektion dargestellt. Schon nach zwei Tagen konnte eine messbare Enzymaktivität festgestellt werden.

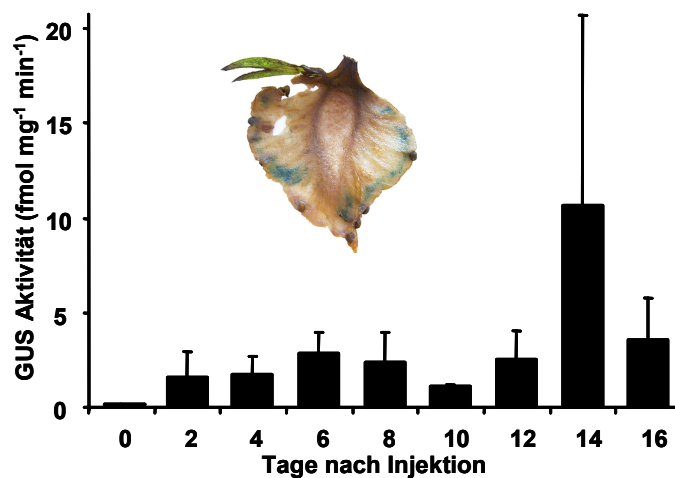


Abbildung 18 β -D-Glucuronidase Aktivität in mit pBI-Intron transformierten Erdbeerfrüchten. Die Abbildung zeigt eine mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid (X-Gluc) angefärbte Scheibe einer Erdbeerfrucht mit deutlich sichtbarer Blaufärbung. Die Zeitreihe zeigt die fluorometrische Bestimmung der β -D-Glucuronidase Aktivität von Proteinextrakten über die Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG). Die einzelnen Balken zeigen den Mittelwert von jeweils 3 unabhängigen Extraktionen je Zeitpunkt und die Standardabweichung.

2.2 Herabregulation der *FaCHS* durch *intron-hairpin*-Konstrukte

Zur Etablierung der Methode wurde ein reifekorreliertes Chalconsynthase-Gen (*FaCHS*) aus Erdbeerfrüchten von *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta (AI795154) eingesetzt (Aharoni *et al.* 2000; Aharoni und O'Connell 2002). Die gleiche Sequenz ist bereits für die Charakterisierung einer stabil transgenen Herabregulation der Chalconsynthase *in planta* verwendet worden (Lunkenbein *et al.* 2006b). Aufgrund des schon mit bloßem Auge erkennbaren helleren Phänotyps in Pflanzen mit herabreguliertem Expressionslevel eignet sich die

CHS gut als Reporter eines PTGS und wurde daher schon mehrmals verwendet (Napoli *et al.* 1990; Chen *et al.* 2004; Lunkenbein *et al.* 2006b).

Der vermutete Effekt der RNAi des *FaCHS* Gens ist eine Herabregulation der Enzymaktivität in den Erdbeerfrüchten. Daraus würde eine Verringerung des Anthocyangehalts resultieren und, damit verbunden, ein hellerer Phänotyp der Früchte (Lunkenbein *et al.* 2006b). Zu diesem Zweck wurde ein entsprechendes Genstilllegungskonstrukt (Abbildung 15) mit einer partiellen Nukleotidsequenz der *FaCHS* hergestellt. Dazu ist ein 303 bp großes SpeI/BamHI Restriktionsfragment, entsprechend den Nukleotiden 10022-10325 des Vektors pBINPlusCHSas (Lunkenbein *et al.* 2006b) verwendet worden. Diese Sequenz wurde in *sense* und *antisense* Orientierung in 5' und 3' Position um das Intron herum in den Vektor eingesetzt. Die detaillierte Konstruktion des ihp-Vektors ist in Kapitel 4.3.2 angegeben. Das resultierende Genstilllegungskonstrukt wird im Folgenden mit pBI-CHSi bezeichnet.

Durch die Agrobakterien-vermittelte Transformation (Kapitel 2.1.1) der Früchte mit dem ihp-Konstrukt wurde ein Stilllegen der *FaCHS* ausgelöst. Die Abbildung 19 zeigt die herabregulierten *FaCHS* Phänotypen von mit pBI-CHSi transfizierten Erdbeeren und von Kontrollfrüchten. Entscheidend war hierbei der Zeitpunkt der Injektion der Agrobakteriensuspension in die reifenden Erdbeerfrüchte. Die Transformation der Zellen und die damit verbundene Synthese von dsRNA der *FaCHS* musste vor der Hochregulation der *FaCHS*-Expression erfolgen, denn nach der vermehrten *FaCHS*-Transkript-Bildung setzt sofort die Translation und damit die Bildung der Anthocyane ein. Zusätzlich ist eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Bakteriensuspension erforderlich, da an Stellen die nicht erreicht werden keine Genstilllegung möglich ist (Abbildung 19 a, d, e).

Eine Länge der Zielsequenz von 303 bp erwies sich als effektiv, um in der etwa 14tägigen Reifezeit der Früchte, eine Effizienz der transienten Herabregulation von annähernd 100% zu erreichen. Das heißt, fast alle mit dem ihp-Konstrukt behandelten Früchte zeigten einen sichtbaren Phänotyp (Abbildung 19).

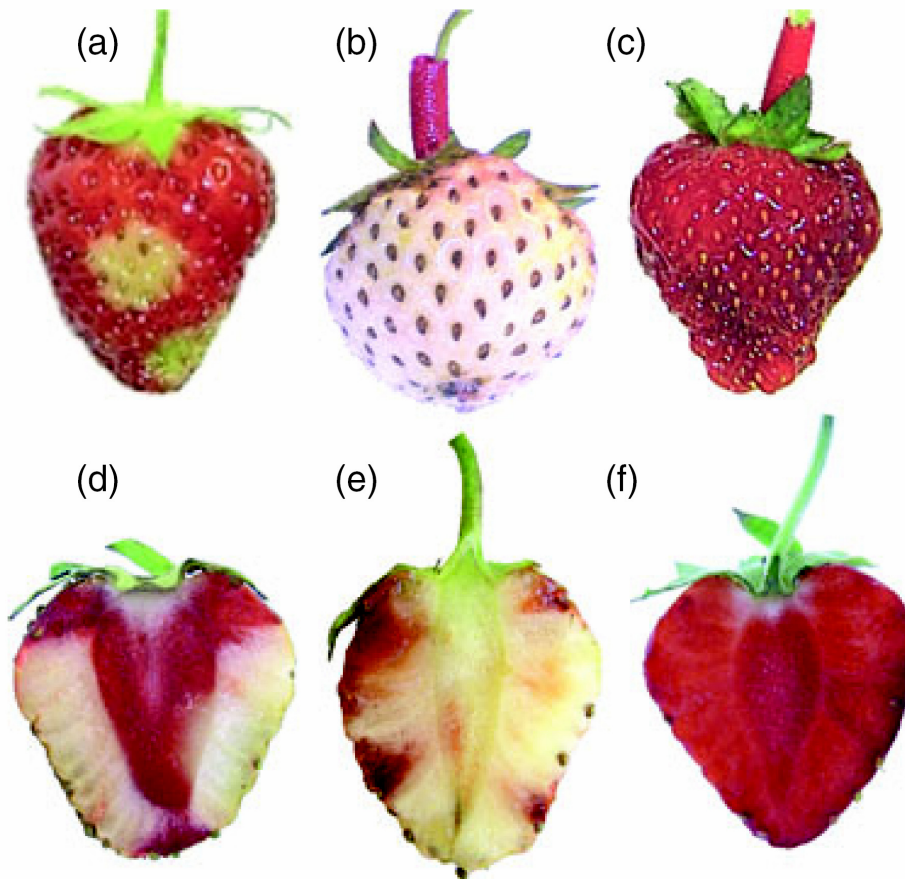


Abbildung 19 Herabregulierter Phänotyp der *FaCHS* von mit pBI-CHSi transformierten Erdbeeren und Kontrollfrüchten. (a) Ein chimärer Phänotyp mit weißen Sektionen in der Region der Agrobakterieninfiltration. (b) Die fast gänzliche weiße Frucht wurde durch mehrmaliges injizieren an aufeinanderfolgenden Tagen erzielt. (c) Reife rote Erdbeerfrucht, die mit dem Kontrollkonstrukt pBI-Intron transformiert wurde. Die Abbildungen (d) und (e) zeigen vertikale Schnitte durch chimäre Phänotypen, Abbildung (f) den Schnitt einer Kontrollfrucht.

2.2.1 Expressionsanalyse der herabregulierten *FaCHS* Früchte

Die Analyse der Genexpression nach Herabregulation mit pBI-CHSi wurde über eine semiquantitative PCR (Kapitel 4.3.6.1) durchgeführt, da zu dieser Zeit keine quantitative PCR zur Verfügung stand.

Für den Nachweis der Expression der *FaCHS* (AI795154) wurden die Primer CHS-for und CHS-rev (Kapitel 4.1.6) verwendet, die ein PCR-Produkt mit der Produktgröße von 245 bp erzeugten. Der *forward* Primer bindet außerhalb der Zielregion des Vektors pBI-CHSi, um den Nachweis des endogenen Transkripts sicherzustellen. Als Referenzgen wurde die Sequenz eines DNA-Bindeproteins (*DBP*) eingesetzt (Schaart *et al.* 2002). Die verwendeten Primer DBP-for und

DBP-rev (Kapitel 4.1.6) amplifizierten ein PCR-Produkt mit einer Länge von 247 bp.

Um eine Herabregulation der Chalconsynthase in den Erdbeerfrüchten zu bestätigen wurde auf mRNA-Ebene eine semiquantitative *reverse transcription* PCR der Total-RNA durchgeführt (Abbildung 20 a). Die Untersuchung zeigte für die mit pBI-*CHSi* transfizierten Früchte, verglichen mit den unbehandelten und den mit pBI-Intron transfizierten, eine deutliche Reduktion der *FaCHS*-Expression. Die Auswertung der relativen Intensitäten der Agarosegelbanden (t/c) ergibt dabei eine Abnahme um den Faktor fünf.

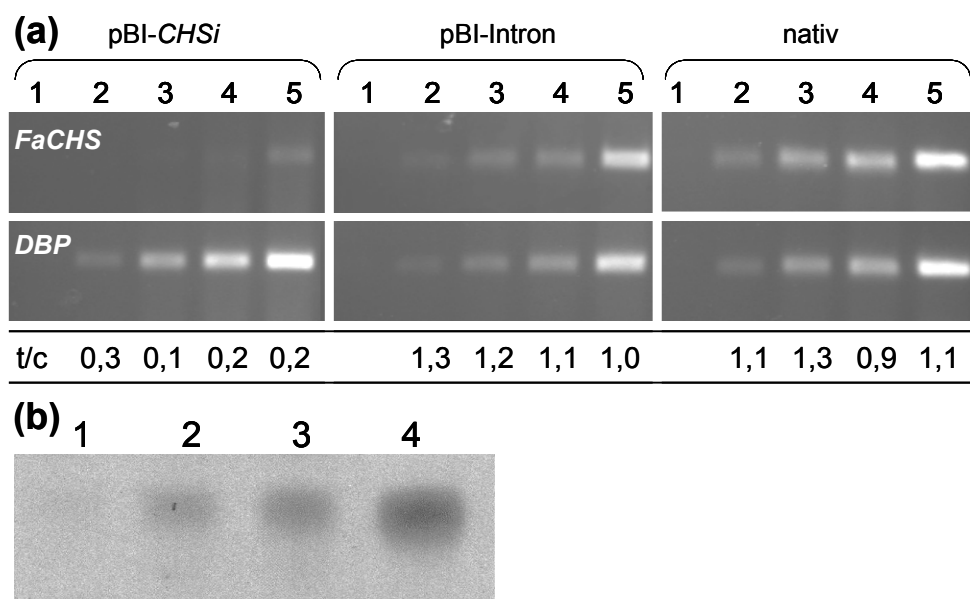


Abbildung 20 Effekte der durch *intron-hairpin*-RNA induzierten Herabregulation der *FaCHS* in Erdbeerfrüchten (a) *reverse transcription* PCR der *FaCHS* und *DBP* Transkripte in durch pBI-*CHSi* herabregulierten Erdbeerfrüchten und Kontrollfrüchten. Die Total-RNA der Erdbeerfrüchte wurde mit Oligo-(dT) Primer zu cDNA umgesetzt und mit genspezifischen Primern für *FaCHS* und *DBP* amplifiziert. Die Spuren 1 bis 5 entsprechen den Zyklenanzahlen 20, 25, 30, 35 und 40 nach denen die jeweilige Reaktion abgebrochen wurde. Das Verhältnis der mit Ethidiumbromid gefärbten PCR Produkte ist angegeben als relative Intensität, ausgedrückt als Target/Control (t/c). (b) Nachweis der Naringeninbildung durch CHS/CHI-Aktivität nach Umsetzung von Proteinrohextrakten mit radioaktiv markierter Malonsäure-CoA und Cumaroyl-CoA und anschließender Autoradiographie der zur Trennung der Produkte verwendeten Dünnschichtchromatographie-Platte. Spur 1 zeigt die Produktbildung durch pBI-*CHSi* Früchte, Spur 2 die Naringeninbildung durch Extrakte von Früchten die mit dem Kontrollvektor pBI-Intron behandelt wurden, Spur 3 die Produktbildung durch ein native Frucht und Spur 4 den Standard Naringenin.

Das von der Chalconsynthase gebildete Naringenin-Chalcon wird in der Flavonoidbiosynthese nachfolgend durch eine Chalconisomerase (CHI) in Naringenin umgewandelt (Abbildung 6). Eine Messung der CHS/CHI Aktivität im Proteinrohextrakt durch Dünnschichtchromatographie (DC) (Kapitel 4.3.9) des synthetisierten Naringenins (Abbildung 20 b) zeigt eine deutlich verringerte Aktivität des Extrakts aus pBI-*CHSi* Früchten. Diese Abnahme korreliert mit den Ergebnissen der Genexpression der *FaCHS*.

Aufgrund der deutlichen Herabregulation der Transkriptmengen und der Enzymaktivität ist von einer effektiven Genstilllegung durch die Transfektion mit pBI-*CHSi* auszugehen. Die Ergebnisse der semiquantitativen PCR-Methode konnten in mehreren Wiederholungsmessungen bestätigt werden.

Eine vollständige Unterdrückung des CHS-Signals war jedoch nicht möglich. Es konnten, auch in den Erdbeerfrüchten mit stark herabregulierter Genfunktion, *FaCHS* Transkript und eine enzymatische Restaktivität nachgewiesen werden. Die Expression der *FaCHS* war meist ungleichmäßig über die gesamte Erdbeerfrucht verteilt, dies zeigte sich häufig durch einen chimären Phänotyp, der hellere (Anthocyangehalt verringert) und stark rot (Anthocyangehalt nicht verringert) gefärbte Bereiche auswies (Abbildung 19). Die Ausprägung hängt von der Intensität der Herabregulation der Expression des *FaCHS* Enzyms ab. Unabdingbare Voraussetzung für eine uniforme Herabregulation der *FaCHS* ist, wie bereits erwähnt, eine gleichmäßige Verteilung der für die Induktion der RNAi injizierten Agrobakteriensuspension. Eine weitere mögliche Quelle der durch PCR noch nachgewiesenen CHS-Transkripte in den mit *ihp*-Konstrukten behandelten Früchten sind die Nüsschen, da die transiente Herabregulation nur im Fruchtgewebe wirkt und keine Verbreitung über die gesamte Pflanze gezeigt werden konnte. Trotz der Herabregulation der CHS im Gewebe des Blütenbodens wurde eine intensive Färbung der Nüsschen beobachtet. Vereinzelt waren die Nüsschen auch von rötlich gefärbten Höfen umgeben (Abbildung 21), möglicherweise bedingt durch den Übertritt von Anthocyanen oder funktionellem Enzym aus den Nüsschen in das Fruchtgewebe. Außerdem war durch den PCR-Nachweis aufgrund der minimalen Unterschiede der *CHS*-Allele der Erdbeere, oft nur wenige Nukleotide (Dangel 2007), keine Unterscheidung zwischen *CHS*-Transkripten aus der Frucht und solchen aus Nüsschen möglich. Für die Untersuchungen wurde jeweils eine ganze Frucht homogenisiert (Kapitel 4.3.1.1 und 4.3.9), so daß die Bestimmungen immer als

Mittel über eine Erdbeere angegeben werden. Trotz dieser Mittelung über das gesamte Gewebe zeigte sich insgesamt eine deutliche Herabregulation.



Abbildung 21 Mit pBI-*CHSi*-Konstrukten behandelte Erdbeerfrüchte. Um die Nüsschen ist die Ausbildung rötlich gefärbter Höfe zu erkennen.

2.2.2 Metabolitanalyse der herabregulierten *FaCHS* Früchte

Die Analyse der Metabolite erfolgte durch LC-ESI-MSⁿ von Rohextrakten aus den Erdbeerfrüchten (Kapitel 4.3.7). Alle Früchte wurden im gleichen Entwicklungsstadium geerntet, um reifebedingte Unterschiede in den Metabolitkonzentrationen so gering wie möglich zu halten. Die mit pBI-*CHSi*-Konstrukte infiltrierten Früchte zeigten den erwarteten helleren Phänotyp, während die mit pBI-Intron transfizierten Erdbeeren sich visuell nicht von den nativen Kontrollfrüchten unterschieden. Da die Extrakte nicht stabil waren, mussten sie sofort vermessen werden, um mögliche enzymatische Veränderungen als Fehlerquelle zu vermeiden. Eine nichtlineare Datenaufnahme durch Überladen der Ionenfalle wurde durch entsprechende vorausgehende Untersuchungen ausgeschlossen. Die Ergebnisse der Transkriptlevel, wie auch die der Metabolitenanalyse in stabil transformierten Erdbeerfrüchten sind nicht normal verteilt (Lunkenbein *et al.* 2006b), daher erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse durch Box-Plots (Kapitel

4.3.13.1). Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test für nicht-normalverteilte Wertemengen herangezogen (Kapitel 4.3.13.2). Pelargonidin-3-glucosid ist das mengenmäßig bedeutendste Anthocyan in Erdbeerfrüchten (Määttä-Rhihinen *et al.* 2004; Lopes da Silva *et al.* 2007), etwa 70% liegen dabei als freies Pelargonidin-3-glucosid vor. Unter Berücksichtigung der weiteren Metabolite Pelargonidin-3-glucosid-malonat, Pelargonidin-3-glucosid-succinat und Pelargonidin-3-rutenosid ergibt sich ein Anteil des Pelargonidins von über 90% an der Gesamtmenge der Anthocyanidine in der Erdbeerfrucht. Wie aufgrund des hellen Phänotyps erwartet, war der Gehalt an Pelargonidin-haltigen Verbindungen in den mit pBI-*CHSi* infiltrierten Früchten statistisch signifikant verringert (Abbildung 22 und Tabelle 3).

Der Vergleich der Wertegruppen der Metabolitanalysen (Tabelle 3) zwischen nativen und mit pBI-Intron infiltrierten Kontrollfrüchten zeigte, dass die Konzentrationen aller gezeigten Metabolite keine signifikanten statistischen Unterschiede aufwiesen ($p \geq 1,7 \text{ E-}2$). Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen unbehandelten Erdbeerfrüchten und mit pBI-*CHSi* infiltrierten Früchten für den Gehalt an Pelargonidin-3-glucosid ($p = 6,4 \text{ E-}5$), Pelargonidin-3-glucosid-malonat ($p = 6,4 \text{ E-}5$), (Epi)-Afzelechin-Pelargonidin-3-glucosid ($p = 1,6 \text{ E-}4$), sowie den Phenylpropanoiden Kaffeesäure-glucose-Ester ($p = 2,4 \text{ E-}7$) und Ferulasäure-glucose-Ester ($p = 4,5 \text{ E-}6$). Ein ähnliches Resultat ergab sich im statistischen Vergleich der Metabolite von mit pBI-Intron und mit pBI-*CHSi* infiltrierten Früchten (Tabelle 3).

Außerdem zeigte der Gehalt an Kämpferol-glucosid in den mit pBI-Intron behandelten Erdbeeren eine signifikanten Zunahme gegenüber den mit pBI-*CHSi* behandelten Früchten ($p = 1,3 \text{ E-}4$), ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich bei der Analyse des Gehalts an Quercetin-glucosid ($p = 8,0 \text{ E-}3$). Auch für das Proanthocyanidin (Epi)afzelechin- \rightarrow (Epi)catechin (Isomer 1) konnte ein solcher Unterschied gezeigt werden ($p = 2,2 \text{ E-}3$). Weiterhin konnte im Vergleich von unbehandelten nativen Früchten mit den mit pBI-*CHSi* transfizierten Erdbeeren für (Epi)catechin- \rightarrow (Epi)catechin (Isomer 1) ein signifikanter erhöhter Gehalt ermittelt werden ($p = 4,7 \text{ E-}3$).

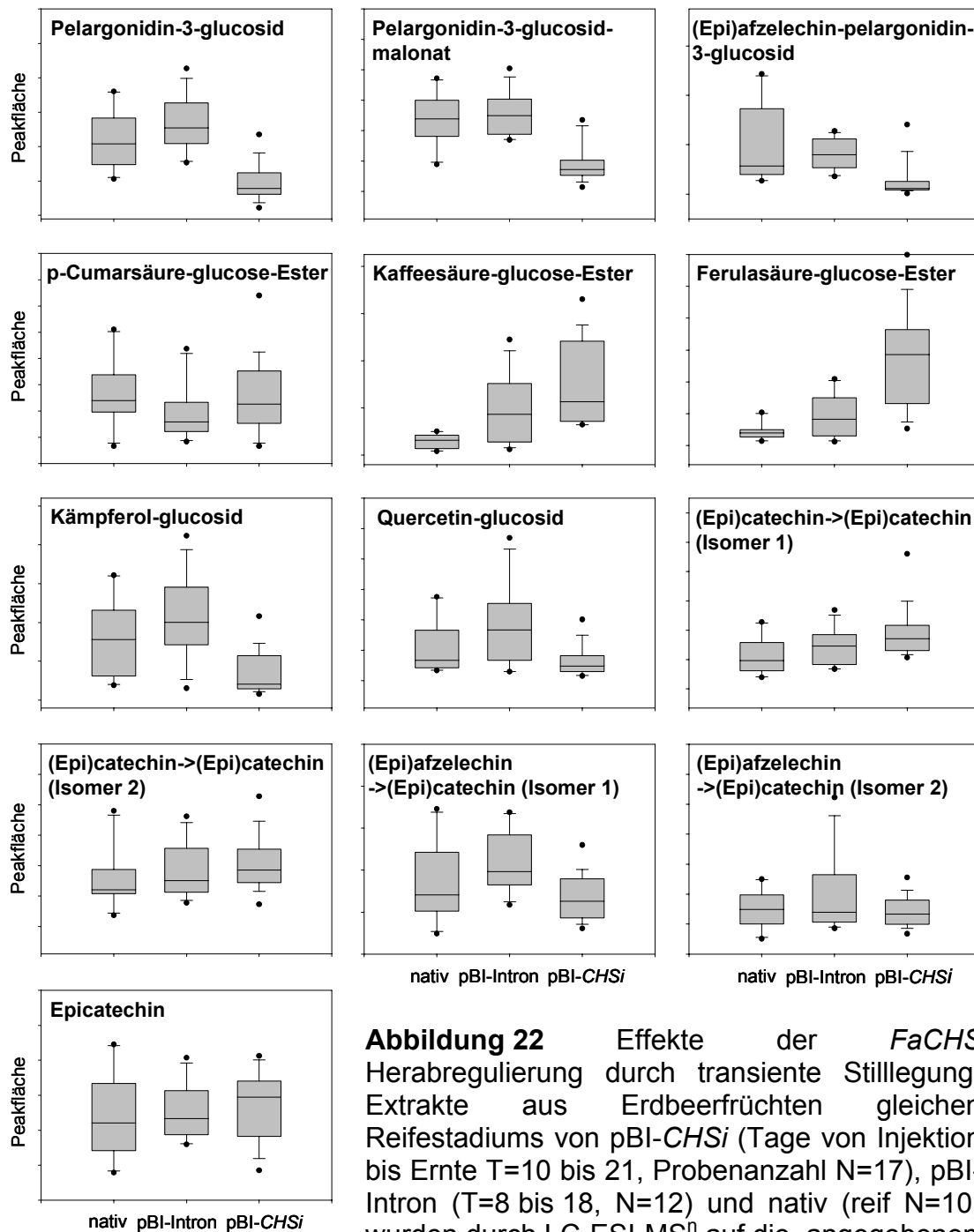


Abbildung 22 Effekte der *FaCHS* Herabregulierung durch transiente Stilllegung. Extrakte aus Erdbeerfrüchten gleichen Reifestadiums von pBI-*CHSi* (Tage von Injektion bis Ernte T=10 bis 21, Probenanzahl N=17), pBI-Intron (T=8 bis 18, N=12) und nativ (reif N=10) wurden durch LC-ESI-MSⁿ auf die angegebenen Metabolite untersucht. Die Identität der Verbindungen wurde durch Referenzen und Literaturangaben bestätigt. Box-Plots zeigen die Peakflächen für ausgewählte Pelargonidin-haltige Metabolite (obere Zeile) mit signifikant verringerten Gehalten, die Phenylpropanoid-glucose-Ester (zweite Zeile), sowie Kämpferol- und Quercetin-glucosid (dritte Zeile), die Epicatechin-haltigen Proanthocyanidine (dritte und vierte Zeile) und das nicht veränderte Epicatechin (untere Zeile) in den herabregulierten Früchten.

Tabelle 3 Signifikanztest der Wertegruppen der nativen, der mit pBI-*CHSi* und der mit pBI-Intron infiltrierten Erdbeerfrüchte durch Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test. Statistische signifikante Unterschiede sind für $p < 1,0 \text{ E-}2$ hervorgehoben.

Verbindung	nativ – pBI-Intron	nativ – pBI <i>CHSi</i>	pBI-Intron – pBI-<i>CHSi</i>
Kämpferol-glucuronid	7,5 E-1	2,9 E-2	1,6 E-2
Kämpferol-glucosid	2,8 E-1	1,1 E-2	1,3 E-4
Quercetin-glucuronid	4,2 E-1	8,1 E-1	4,0 E-1
Quercetin-glucosid	2,3 E-1	1,4 E-1	8,0 E-3
Pelargonidin-3-glucosid	3,1 E-1	6,4 E-5	1,7 E-6
Pelargonidin-3-glucosid-malonat	6,7 E-1	6,4 E-5	3,7 E-6
Epicatechin	4,3 E-1	3,9 E-1	6,4 E-1
(Epi)catechin->(Epi)catechin (Isomer 1)	2,8 E-1	4,7 E-3	1,8 E-1
(Epi)catechin->(Epi)catechin (Isomer 2)	3,8 E-1	4,6 E-2	5,6 E-1
(Epi)afzelechin->(Epi)catechin (Isomer 1)	1,4 E-1	4,4 E-1	2,2 E-3
(Epi)afzelechin->(Epi)catechin (Isomer 2)	7,7 E-1	7,5 E-1	5,0 E-1
(Epi)afzelechin-pelargonidin-3-glucosid	6,7 E-1	1,6 E-4	3,5 E-5
p-Cumarsäure-glucose-Ester	6,9 E-2	7,8 E-1	2,1 E-1
Kaffeensäure-glucose-Ester	1,7 E-2	2,4 E-7	1,5 E-1
Ferulasäure-glucose-Ester	8,0 E-2	4,5 E-6	4,9 E-4

Aufgrund der Herabregulation der FaCHS wurde eine Akkumulation von Phenylpropanoiden durch den Rückstau der Metabolite festgestellt. Da der größte Anteil der phenolischen Säuren in Erdbeerfrüchten als Glucose-Ester vorliegt (Määttä-Rhihinen *et al.* 2004), wurden Kaffee- und Ferulasäure über die Quantifizierung der entsprechenden Glucose-Ester nachgewiesen. Im Vergleich von nativen und mit pBI-*CHSi* infiltrierten Früchten waren signifikant erhöhte Gehalte an Kaffeesäure-glucose-Ester ($p = 2,4 \text{ E-}7$) und Ferulasäure-glucose-Ester ($p = 4,5 \text{ E-}6$) zu erkennen. Der Gehalt von Kaffeesäure-glucose-Ester zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit pBI-Intron und den mit pBI-*CHSi* infiltrierten Früchten ($p = 1,5 \text{ E-}1$). Eine ähnliche Verteilung zeigte Ferulasäure-glucose-Ester, wobei ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit pBI-Intron und den mit pBI-*CHSi* infiltrierten Früchten immer noch gegeben war ($p = 4,9 \text{ E-}4$). Für den Gehalt an

p-Cumarsäure-glucose-Ester wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt ($p = 2,1 \text{ E-}1$ pBI-Intron vs. pBI-*CHSi*).

Bedingt durch den relativ späten Eingriff in den Fruchtreifungsstoffwechsel wurden viele Substanzen schon (eigene Untersuchungen und Halbwirth *et al.* 2006) vor der Herabregulation der *FaCHS* biosynthetisiert. Daher waren nur die nach der Injektion der Früchte (Kapitel 2.1.1) gebildeten Substanzen von der Genstilllegung betroffen. Neben den Pelargonidin-haltigen Verbindungen konnten daher nur die Gehalte an Kämpferol- und Quercetin-glucosid durch eine Stilllegung der *FaCHS* verringert werden.

Im Vergleich zwischen unbehandelten und mit pBI-Intron behandelten Erdbeeren deuten die Daten auf eine Zunahme der Gehalte an Kämpferol- und Quercetin-glucosid, (Epi)catechin->(Epi)catechin, (Epi)afzelechin->(Epi)catechin durch die Injektion hin. In Verbindung mit den Lignifikanzdaten (Kapitel 2.3.3) weisen auch die erhöhten Gehalte an Kaffeesäure- und Ferulasäure-glucose-Ester nach agrobakterienvermittelter Transfektion von pBI-Intron Konstrukten auf eine solche Induktion hin. Diese gesteigerte Synthese von Phenylpropanoiden und Flavonoiden ist vermutlich eine Abwehrreaktion der Pflanze auf die Verletzung der Früchte (Felton *et al.* 1999, Treutter 2005, Zabala *et al.* 2006).

2.2.3 Ligninbestimmung in den herabregulierten *FaCHS* Früchten

Bei den Untersuchungen der Erdbeeren war manuell eine erhöhte Festigkeit der mit pBI-*CHSi* infiltrierten Früchte festgestellt worden, manche Früchte erreichten eine fast korkartige Konsistenz.

Da *FaCHS* ein Schlüsselenzym in der Flavonoidbiosynthese darstellt und durch die Stilllegung die Stoffwechselprodukte *upstream* zwar akkumuliert wurden (Abbildung 22, Kaffesäure-D-glucoseester $p = 2,4 \text{ E-}7$ und Ferulasäure-D-glucoseester $p = 4,5 \text{ E-}6$ pBI-*CHSi* verglichen mit nativen Früchten), aber auch metabolisiert werden könnten, wurde vermutet, dass diese Verbindungen des Phenylpropanoidstoffwechsels oberhalb der *FaCHS*-Reaktion in den Ligninstoffwechsel eingehen. Somit könnten diese umgeleiteten Vorläufermoleküle den Ligningehalt der Erdbeerfrüchte erhöhen. Diese These würde eine erhöhte Festigkeit der Früchte erklären.

Die bisher publizierten Lignin-Analysemethoden liefern keine absoluten Ligningehalte sondern nur relative Werte innerhalb der jeweiligen Methode.

Durch die Anwendung nur einer Methode für alle Bestimmungen ist es jedoch möglich, in sich konsistente vergleichbare Werte zu erhalten (Hatfield und Fukushima 2005).

Im Folgenden wurde zum Einen der Gesamtgehalt an Lignin in den Erdbeerfrüchten mit der Thioglycolsäure-Methode bestimmt, da diese Analyse auch sehr sensitiv gegenüber kleinen Mengen ist, und zum Anderen wurde die Zusammensetzung der Monolignole durch die sogenannte *Derivatization Followed by Reductive Cleavage* (DFRC) Methode von Lu und Ralph (1997) bestimmt.

2.2.3.1 Festigkeitsbestimmung der herabregulierten *FaCHS* Früchte

Um eine objektive Festigkeitsbestimmung der Erdbeerfrüchte zu erhalten wurde ein Kompressionstest (Kapitel 4.3.10) mit dem TA-XT2i Texture Analyser (Stable Microsystems, England) durchgeführt.

Bestimmt wird hierbei der sogenannte *bio-yield point* (Bourne 2002, Singh und Reddy 2006). Dies ist der Punkt, an dem die Verformung der Frucht unter Kompression in einen permanenten Zustand übergeht. Dieser schnell und einfach zu bestimmende Wert eignet sich gut zur Abschätzung der Festigkeit der verschiedenen Erdbeerfrüchte. In Untersuchungen zur Festigkeit unterschiedlicher Erdbeerkultivare in Kombination mit DNA Microarrays wurde, neben einer Bonitur, die hier verwendete Methodik zur Bestimmung der Festigkeit von Erdbeerfrüchten verwendet (Salentijn *et al.* 2003). Aufgrund der starken biologischen Schwankungen der Festigkeit der einzelnen Früchte wurde die Darstellung als Box-Plot gewählt (Abbildung 23), die statistische Auswertung (Tabelle 4) erfolgte wiederum durch den Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test.

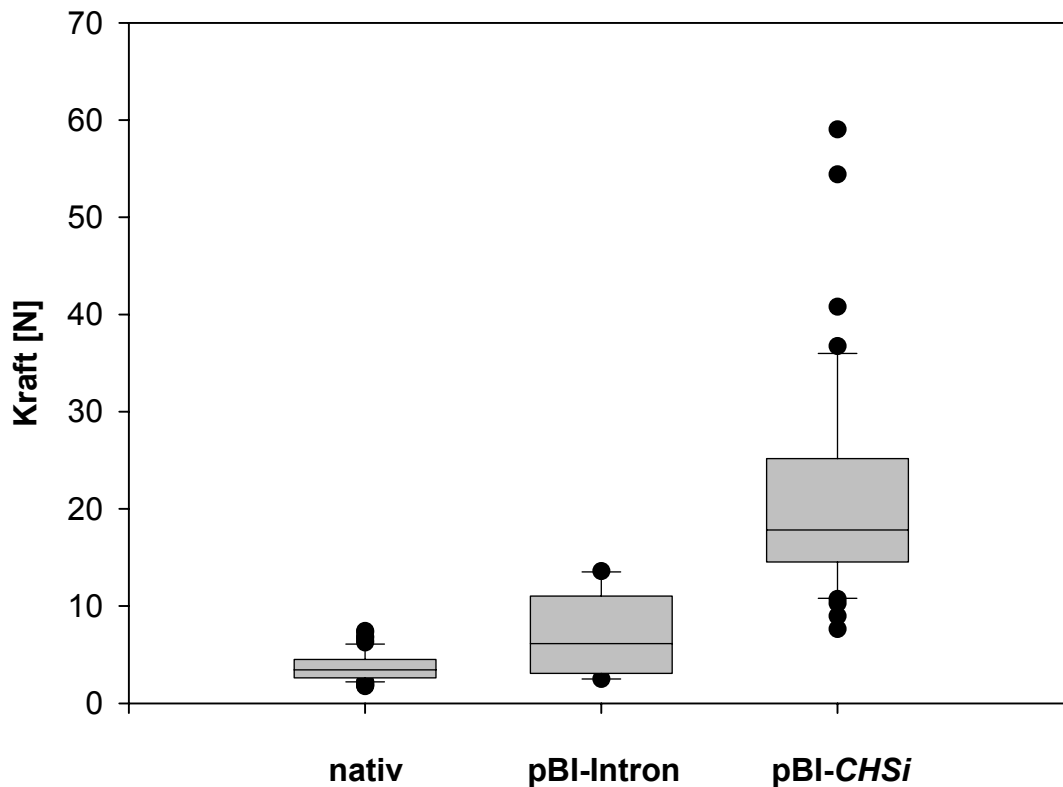


Abbildung 23 Box-Whiskers Auftragung des *bio-yield point* der Kompressionsmessung der Erdbeerfrüchte. Probenanzahlen: nativ N=67, pBI-Intron (Tage von Injektion bis Ernte T=13 bis 18, N=10), pBI-CHSi (T=12 bis 18, N=42).

Tabelle 4 Signifikanztest der Wertegruppen des Texture-Analysers durch Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test. Statistische signifikante Unterschiede sind für $p < 1,0E-2$ hervorgehoben.

Wertegruppen	p-Wert
nativ vs. pBI-Intron	1,8 E-2
nativ vs. pBI-CHSi	2,2 E-16
pBI-Intron vs. pBI-CHSi	4,9 E-7

Ingesamt konnte eine stark erhöhte Festigkeit in den pBI-CHSi Früchten im Vergleich zu den nativen Früchten festgestellt werden ($p = 2,2 E-16$). Die zur Transformationskontrolle verwendeten, mit pBI-Intron infiltrierten Erdbeeren zeigten durch die Vernarbung des Fruchtgewebes ebenfalls eine leicht erhöhte Festigkeit des Fruchtgewebes ($p = 1,8 E-2$), die sich aber nicht signifikant von der nativen Frucht unterschied. Zwischen den mit pBI-Intron und den mit pBI-CHSi infiltrierten Früchten bestand jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 4,9 E-7$).

2.2.3.2 Gesamtligningehalt in den herabregulierten *FaCHS* Früchten

Der Gesamtligningehalt wurde mit Hilfe des Thioglycolsäure-Assay (Kapitel 4.3.11) photometrisch bestimmt. Dazu wurden die Erdbeeren von den Nüsschen befreit, um das Messergebnis nicht zu verfälschen, da mögliche Genstilllegungseffekte nur den Fruchtboden betreffen sollten. Der hohe Ligningehalt der nicht veränderten Nüsschen hätte einen eventuellen höheren Ligningehalt der infiltrierten Früchte überdeckt.

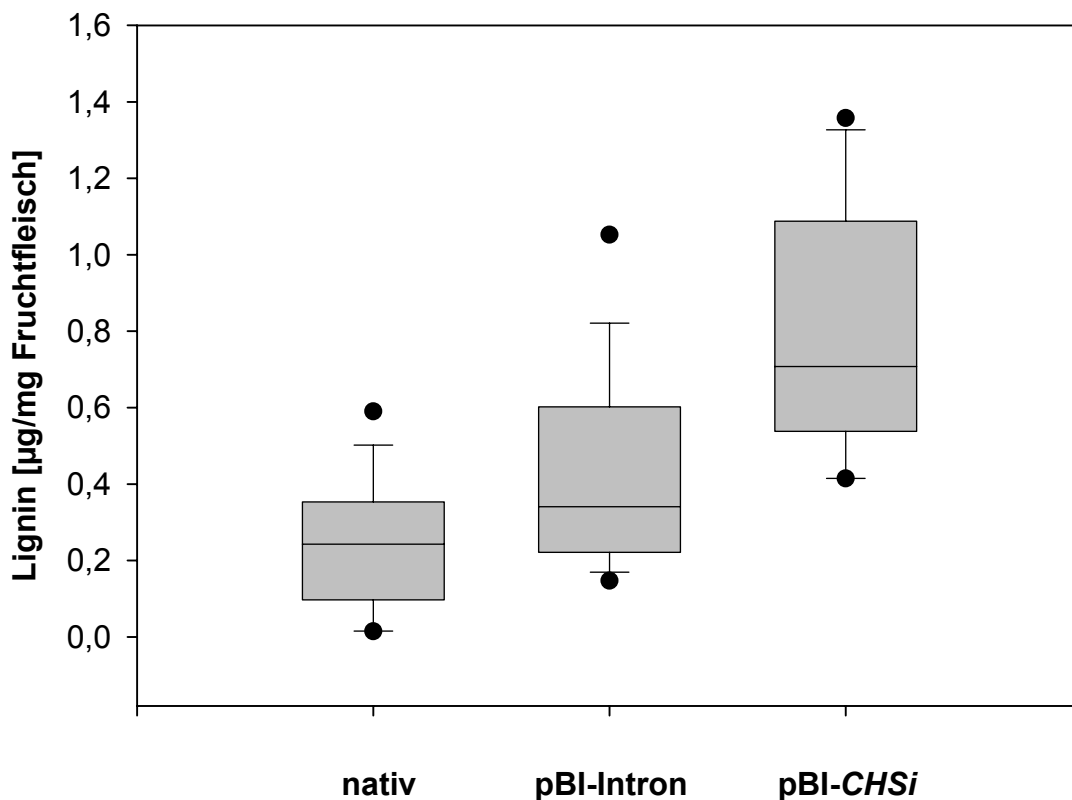


Abbildung 24 Gesamtligninbestimmung mittels Thioglycolsäure-Assay (Lignin in μg pro mg Fruchtfleisch). Probenanzahlen der Erdbeeren: nativ $N=12$, pBI-Intron (Tage von Injektion bis Ernte $T=7$ bis 15 , $N=7$), pBI-*CHSi* ($T=12$ bis 25 , $N=10$). Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung.

Tabelle 5 Signifikanztest der Wertegruppen des Thioglycolsäure-Assay durch Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test. Statistische signifikante Unterschiede sind für $p < 1,0 \text{ E-}2$ hervorgehoben.

Wertegruppen	p-Wert
nativ vs. pBI-Intron	7,5 E-4
nativ vs. pBI- <i>CHSi</i>	3,3 E-16
pBI-Intron vs. pBI- <i>CHSi</i>	1,6 E-5

Das Ergebnis aus den Thioglykolsäure-Assays zeigt im Vergleich von nativen Früchten mit den pBI-Intron Kontrollen eine signifikante, aber geringe, Zunahme des Ligningehalts ($p = 7,5 \text{ E-}4$) (Abbildung 24, Tabelle 5). Diese Steigerung ist vermutlich auf eine erhöhte Lignifizierung des vernarbten Fruchtgewebes entlang des Einstichkanals zurückzuführen. Zwischen den Ligninkonzentrationen der nativen und mit pBI-*CHSi* infiltrierten Früchte besteht ein starker Unterschied ($p = 3,3 \text{ E-}16$), der auch beim Vergleich von pBI-Intron mit den pBI-*CHSi*-Früchten signifikant ist ($p = 1,6 \text{ E-}5$). Die mit pBI-*CHSi* infiltrierten Erdbeerfrüchte enthalten eine stark erhöhte Menge an Lignin, das wahrscheinlich aus den akkumulierten Phenylpropanoiden aufgrund der Herabregulation der *FaCHS* Aktivität gebildet wurde.

2.2.3.3 Ligninzusammensetzung in den herabregulierten *FaCHS* Früchten

Um einen tieferen Einblick in den veränderten Ligninstoffwechsel zu erhalten, wurde in weiteren Untersuchungen die qualitative Zusammensetzung der Monolignole im Lignin massenspektrometrisch über die sogenannte *Derivatization followed reductive cleavage* (DFRC) Methode (Lu und Ralph 1997) ermittelt (Kapitel 4.3.12). Dabei wurden nach weitgehend vollständiger Spaltung des Lignins und Acetylierung die drei Monolignole p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol als Hauptbestandteile des Lignins relativ quantifiziert (Abbildung 25).

Die Identifizierung der Monolignole erfolgte dabei mittels GC-MS über den Vergleich mit synthetisierten Referenzsubstanzen (Kapitel 4.3.13.3) und den entsprechenden Fragmentierungsmustern nach Lu und Ralph (1998) (Abbildung 26 bis 28). Die acetylierten Alkohole wurden anhand der Intensitäten der Hauptfragmente quantifiziert. Dabei wurden *cis*- und *trans*-Isomere zu einer Größe zusammengefasst. Die Angabe erfolgte als relativer Anteil am Gesamtlignin (Summe aller drei Monolignole), weitere Sekundärmodifikationen der Ligninreste wurden nicht berücksichtigt.

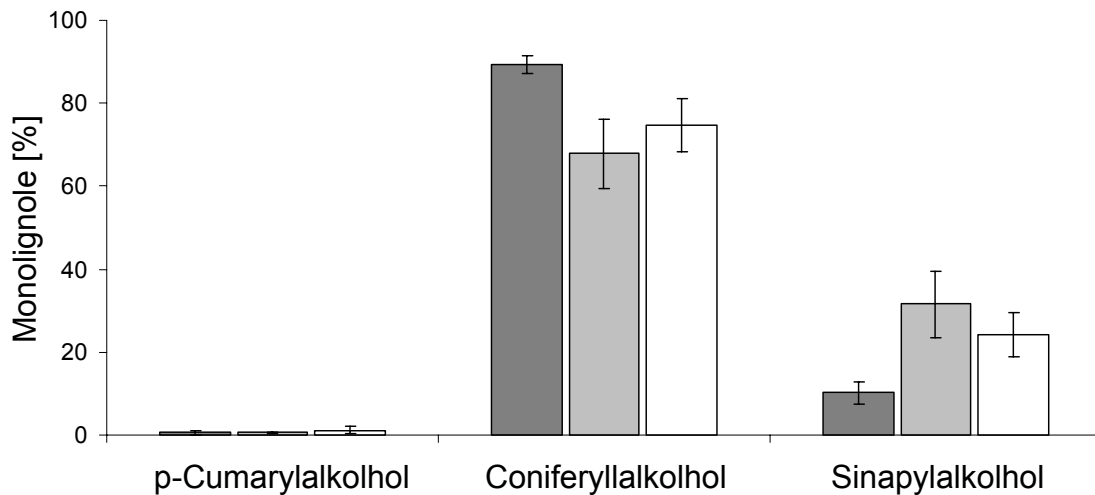


Abbildung 25 Relative Anteile der Monolignole am Lignin der Erdbeerfrüchte mit der jeweiligen Standardabweichung, ermittelt durch DFRC Analyse (Lu und Ralph 1998) (dunkelgrau: nativ, hellgrau: mit pBI-Intron behandelt, weiss: mit pBI-CHSi behandelt). Es wurden jeweils zwei Bestimmungen mit etwa 100 g Probenmaterial (M) durchgeführt. Probenanzahlen: nativ $M_1=110,5$ g $M_2=102,4$ g; pBI-Intron: $M_1=106,9$ g (Tage von Injektion bis Ernte T=6 bis 17, Probenanzahl N=29); pBI-Intron: $M_2=108,3$ g (T=6 bis 17, N=31); pBI-CHSi: $M_1=103,6$ g (T=10 bis 16, N=20); pBI-CHSi: $M_2=106,3$ g (T=7 bis 17, N=25).

Wie erwartet, besteht das Lignin der Erdbeeren größtenteils aus Guajacyl- (Coniferyllalkohol) und Syringyl- (Sinapylalkohol) Einheiten und nur zu einem geringen Anteil aus p-Hydroxyphenyl- (p-Cumarylalkohol) Einheiten (Abbildung 25). Die qualitative Analyse ergab im Vergleich zu nativen Früchten, sowohl für die mit pBI-Intron- wie auch die mit pBI-CHSi-Konstrukten infiltrierten Erdbeeren, eine Verschiebung des Syringyl-/ Guajacyl-Verhältnisses (S/G-Verhältnis) hin zu den Syringyl-Einheiten. Da die Standardabweichungen stark überlappen ist kein Unterschied zwischen den mit pBI-Intron und den mit pBI-CHSi behandelten Früchten festzustellen. Da nur zwei unabhängige Messungen erfolgten, wurden keine Signifikanztests durchgeführt. Durch die hohe Anzahl von 20 und 31 Früchten pro Messung war, in Bezug auf die Vergleichsgruppe der nativen Erdbeeren, trotzdem eine klare Aussage über die Verschiebung des S/G-Verhältnis möglich.

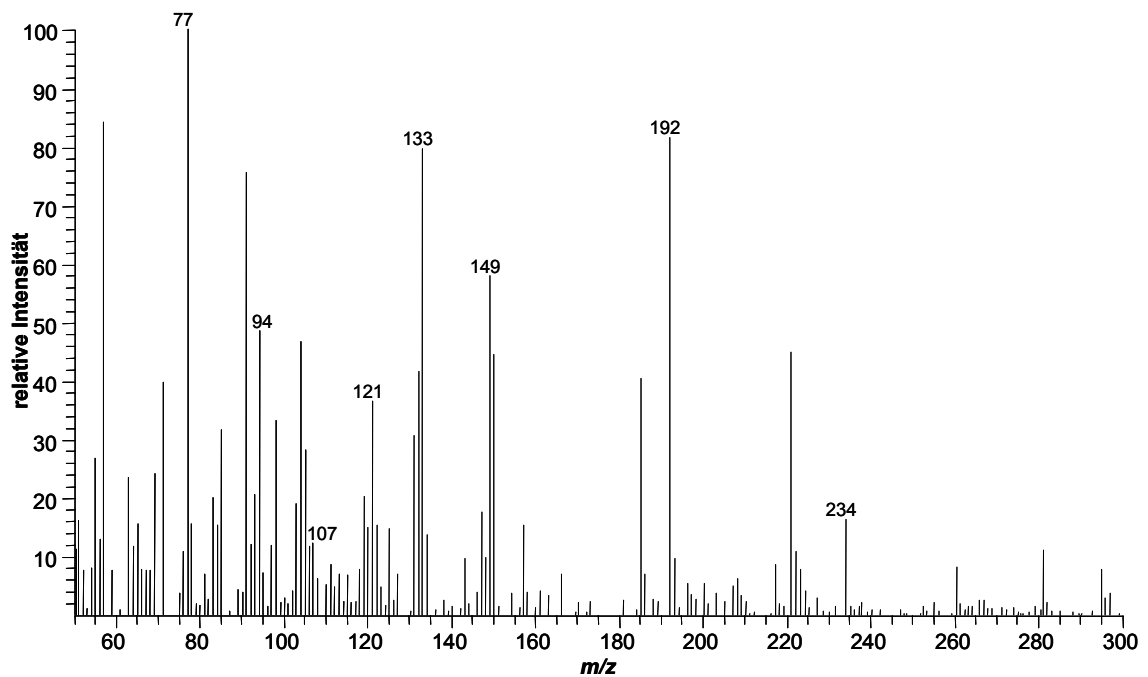
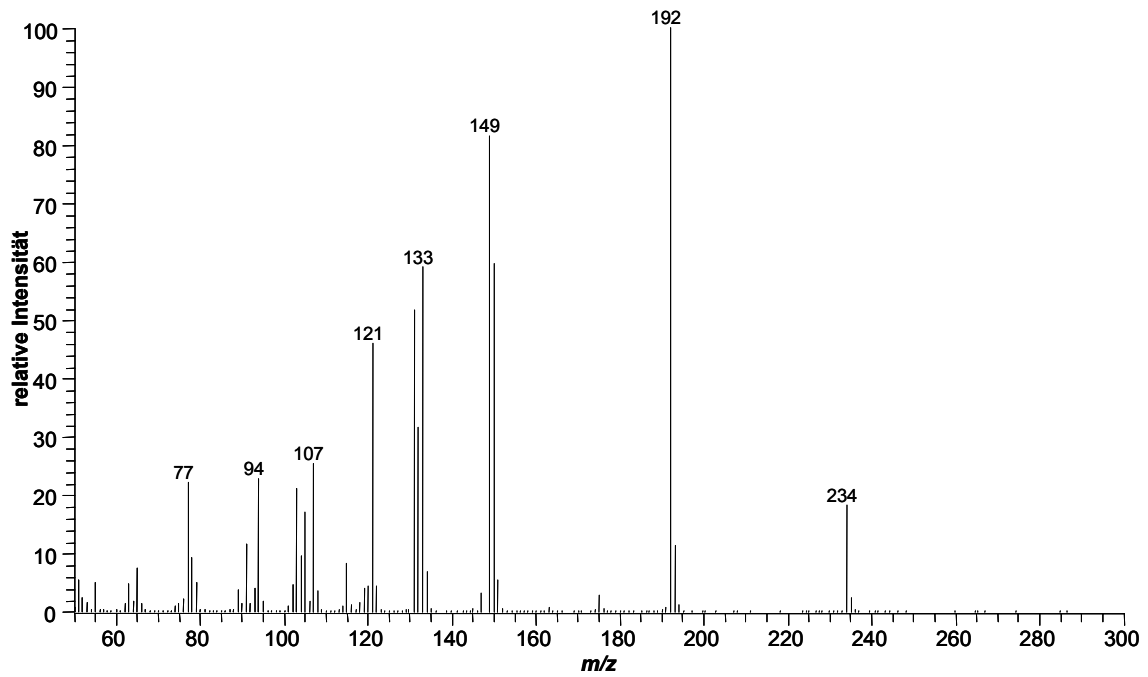


Abbildung 26 Massenspektrum des acetylierten p-Cumarylalkohols (Referenz) (oben) und der entsprechenden Verbindung im Extrakt aus unbehandelten Erdbeerrüchten (unten). Von Lu und Ralph (1998) wird das Fragmentierungsmuster m/z (%) wie folgt angegeben 234 (19), 192 (100), 149 (85), 133 (54), 121 (44), 107 (28), 94 (29), 77 (24).

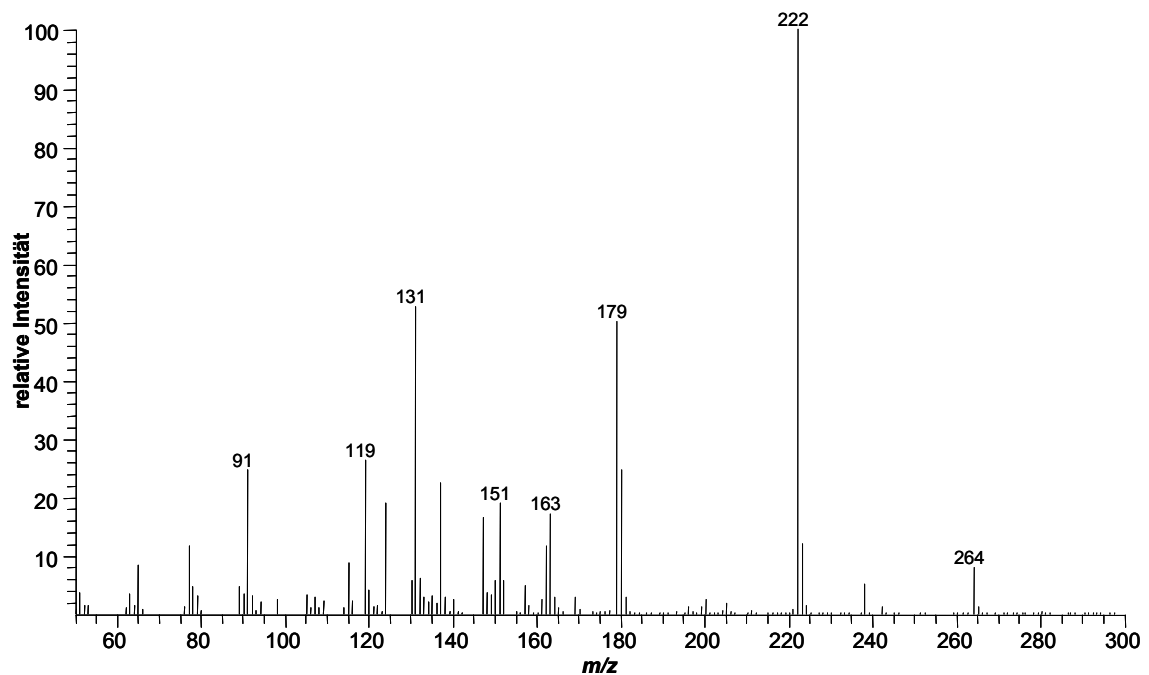
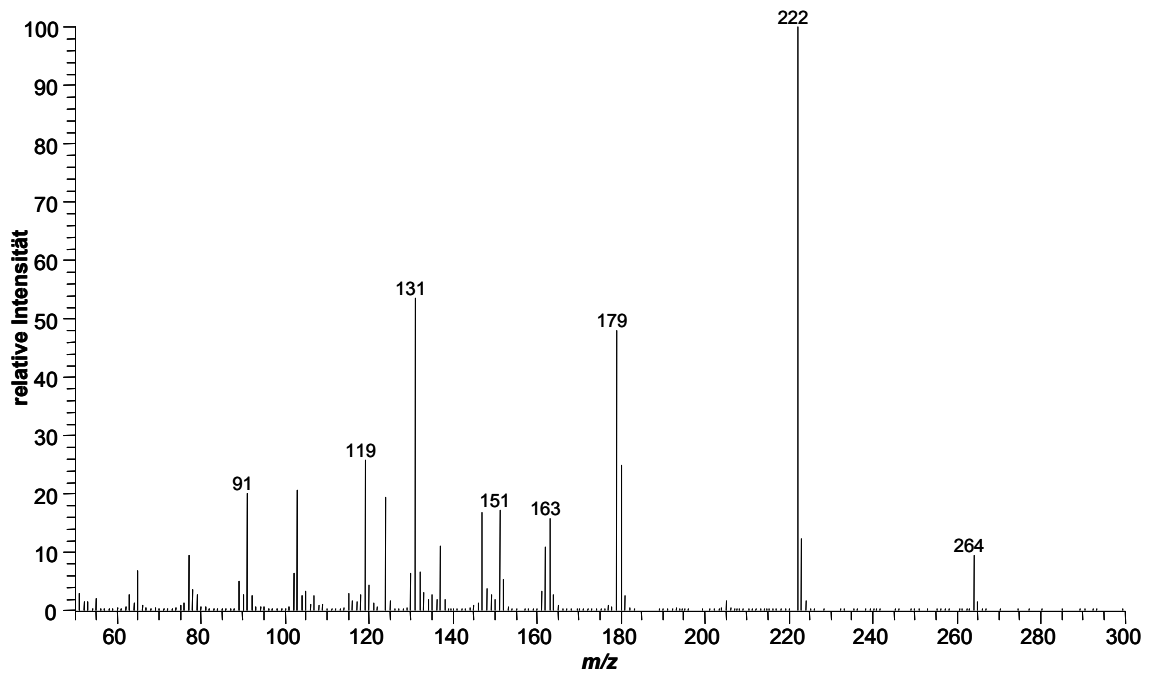


Abbildung 27 Massenspektrum des acetylierten Coniferylalkohols (Referenz) (oben) und der entsprechenden Verbindung im Extrakt aus unbehandelten Erdbeerfrüchten (unten). Von Lu und Ralph (1998) wird das Fragmentierungsmuster m/z (%) wie folgt angegeben 264 (11), 222 (100), 179 (37), 163 (9), 151 (12), 131 (27), 119 (15), 91 (14).

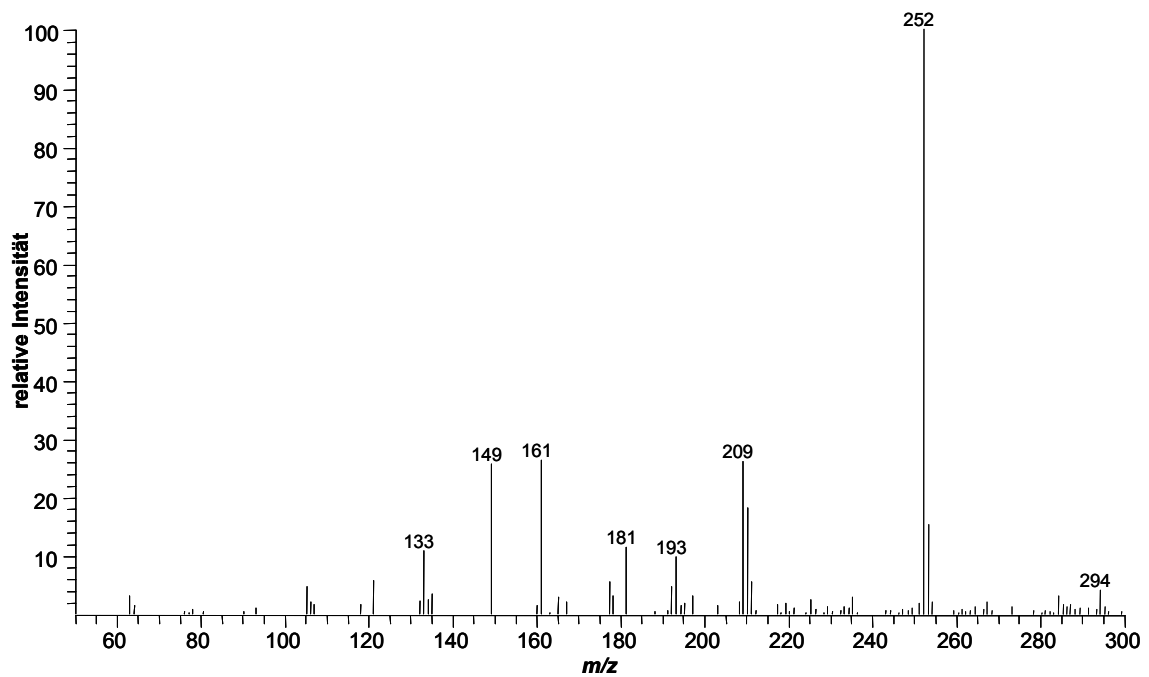
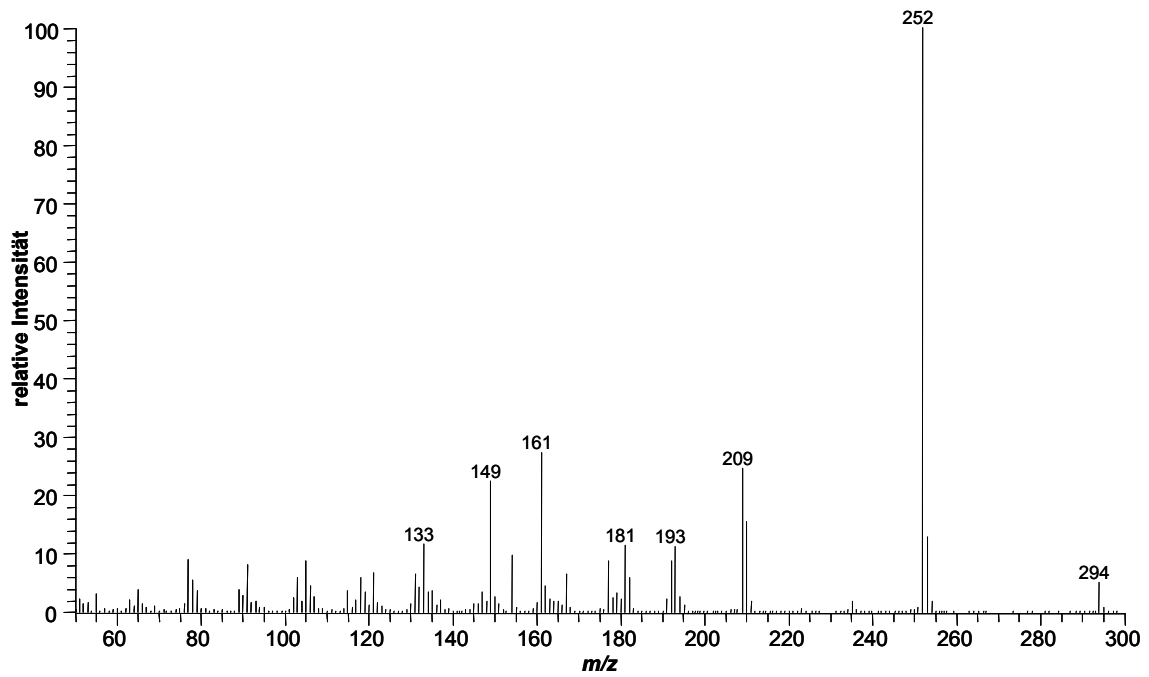


Abbildung 28 Massenspektrum des acetylierten Sinapylalkohols (Referenz) (oben) und der entsprechenden Verbindung im Extrakt aus unbehandelten Erdbeerfrüchten (unten). Von Lu und Ralph (1998) wird das Fragmentierungsmuster m/z (%) wie folgt angegeben 294 (8), 252 (100), 209 (24), 193 (10), 181 (8), 161 (17), 149 (13), 133 (6).

2.3 Einfluss der Nukleotidsequenz auf die RNA Interferenz und transitive Genstilllegung

Der Einfluss der Nukleotidsequenz der gewählten Zielstruktur auf die RNAi-induzierte Herabregulation des Gens wurde mit Hilfe der *FaCHS* und *FaOMT* genauer untersucht. Zur Induktion der RNAi wurden Vollängenklone der beiden Gene in gleichmäßige Abschnitte unterteilt und diese für die Herstellung der ihp-Konstrukte verwendet. Beide Gene wurden in 5 Abschnitte (A bis E) mit jeweils 20 Basenpaaren Überlapp eingeteilt. Auf Basis einer angenommenen siRNA-Länge von 21 Nukleotiden wurde somit jede mögliche siRNA-Sequenz der gesamten mRNA des Gens abgedeckt.

Die verschiedenen Sequenzabschnitte der Gene könnten aufgrund der aus den dsRNAs hervorgehenden siRNAs ein unterschiedliches Stilllegungspotential aufweisen. Außerdem könnte die Faltung der jeweiligen Zielstruktur die Herabregulation mittels RNAi beeinflussen (Overhoff *et al.* 2005, Schubert *et al.* 2005). Dazu wurden die relativen Zugänglichkeiten der Sequenzabschnitte A bis E der *FaCHS* und der *FaOMT* durch *in silico* Faltungen der Vollängen der Nukleotidsequenzen mit dem Programm mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>; Mathews *et al.* 1999, Zuker 2003) ermittelt, wobei die mfold Oberfläche mit den Grundeinstellungen verwendet wurde. Die Software dient der Vorhersage von Sekundärstrukturen der RNA aufgrund der freien Energien, hauptsächlich unter Verwendung thermodynamischer Methoden. Für die untersuchten Nukleotidsequenzen ergab sich jeweils eine Vielzahl möglicher Randstrukturen bei der Faltung der RNA. Die ermittelten Faltungen wurden anschließend einzeln auf ungepaarte Nukleotide analysiert. Auffällig war für beide Gene eine hohe Anzahl ungepaarter Nukleotide, die über viele der Randstrukturen immer an derselben Stelle lokalisiert waren. Daraus kann – als These - auf real konservierte ungepaarte Sequenzabschnitte geschlossen werden. Als für RNAi zugängliche Bereiche definieren Overhoff *et al.* (2005) Segmente von mehr als 10 ungepaarten Nukleotiden. Daher wurde für die Analyse eine Zuordnung der zugänglichen Bereiche zum jeweiligen Sequenzabschnitt verwendet. F ist die relative Zugänglichkeit und ist definiert als:

$$F = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \text{ungepaarte Bereiche}_i \quad (1)$$

n = Anzahl der durch mfold berechneten Randstrukturen

Es wurde anhand der *FaOMT* (Kapitel 2.3.1) und der *FaCHS* (Kapitel 2.3.2) untersucht, ob Unterschiede hinsichtlich der Effizienz der unterschiedlichen Sequenzabschnitte für eine RNAi-induzierte Herabregulation bestehen. Außerdem war festzustellen, ob ein transitiver Effekt der RNAi vorliegt und wenn ja, in welcher Richtung sich das Stilllegungssignal fortpflanzt.

2.3.1 Herabregulation der *FaOMT* durch die Sequenzabschnitte A bis E

Die *FaOMT* wurde zur Demonstration der Herabregulation eines endogenen Gens ohne sichtbare phänotypische Ausprägung ausgewählt (Wein *et al.* 2002). Die Methylierung von HDMF und Kaffeesäure durch *FaOMT* konnte *in planta* bereits gezeigt werden (Lunkenbein *et al.* 2006c). Im Folgenden soll die transiente Methode im Vergleich zu diesen Ergebnissen untersucht werden. Ein *ihp*-Konstrukt mit 582 bp von insgesamt 1098 bp der *FaOMT* (Position 407 - 988) konnte in vorangegangenen eigenen Untersuchungen keine Genstilllegung induzieren.

Das *FaOMT* Gen wurde für die Untersuchung der Sequenzabhängigkeit des RNAi-Prozesses in fünf Abschnitte A bis E aufgeteilt (Abbildung 29). Weiterhin ist die jeweilige relative Zugänglichkeit *F* der einzelnen Sequenzabschnitte der *FaOMT* berechnet nach (1) für die einzelnen Segmente angegeben. Für die *in silico* Faltungen der RNA der *FaOMT* mit dem Programm *mfold* ergaben sich dabei insgesamt 31 Randstrukturen. Die detaillierte Konstruktion und die verwendeten Oligonukleotide die für die Herstellung der einzelnen *ihp*-Konstrukte OMT A bis OMT E benutzt wurden sind in Kapitel 4.3.3.1 angegeben.

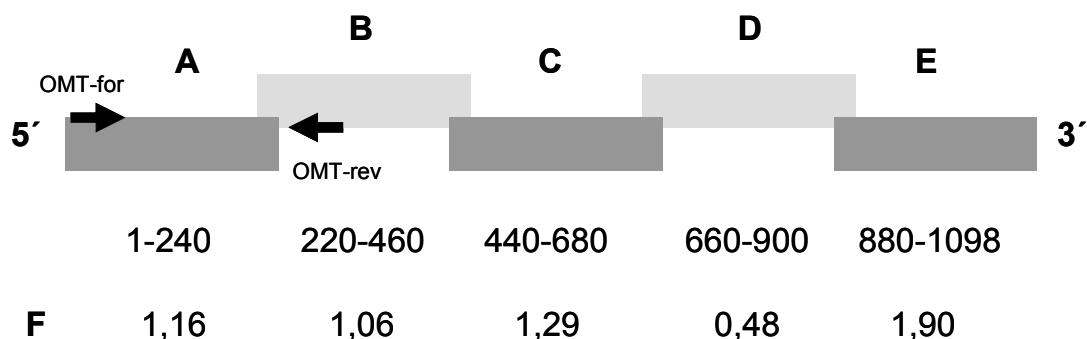


Abbildung 29 Einteilung der *FaOMT* in die Abschnitte A bis E mit Angabe der Nukleinsäurepositionen. *F* ist die relative Zugänglichkeit der einzelnen Abschnitte, zusätzlich ist die relative Position des PCR-Amplifikats mit OMT-for und OMT-rev schematisch angegeben.

2.3.1.1 Expressionsanalyse der herabregulierten *FaOMT* Früchte A bis E

Der Nachweis der Expression der *FaOMT* in den behandelten Früchten erfolgte mit Hilfe quantitativer PCR (Kapitel 4.3.6.2). Dazu wurden Total-RNA Präparationen der einzelnen Erdbeerfrüchte mit einem Random-Hexamer-Primer revers in cDNA transkribiert (Kapitel 4.3.1.4). Das Primerpaar OMT-for (Position 10 - 29 in *FaOMT*) und OMT-rev (Position 253 - 274 in *FaOMT*) ergab in der PCR Reaktion ein Amplifikat von 265 bp. Das Produkt liegt in den Abschnitten A und B der *FaOMT* Sequenz (Abbildung 29). Als endogene Kontrolle wurde ein konstitutiv exprimiertes Actin Gen aus *Fragaria x ananassa* (AB116565) genutzt (Almeida et al. 2007).

Abbildung 30 zeigt die Genexpression von *FaOMT* in mit pBI-Intron und den ihp-Konstrukten OMT A bis OMT E transfizierten Erdbeerfrüchten als Box-Plot. Die angegebenen relativen Expressionen wurden auf eine mittlere Expression der *FaOMT* in nativen Erdbeeren bezogen. Dieser rechnerische Wert wurde über 17 unabhängige Messungen gemittelt und besitzt selbst eine Standardabweichung von 18% für den CT-Wert der *FaOMT* Expression. Tabelle 6 zeigt die statistische Auswertung des Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Tests. Es ist eine signifikante Verringerung des *FaOMT*-Transkripts in allen mit OMT A bis OMT E injizierten Erdbeerfrüchten zu erkennen ($p < 1,0 \text{ E-}2$). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den nativen und den mit pBI-Intron behandelten Erdbeerfrüchten ($p = 7,2 \text{ E-}1$). Zwar zeigen die mit pBI-Intron behandelten Früchte starke Schwankungen der *FaOMT*-Expression, der Median jedoch liegt fast exakt bei einer relativen Expression von 1,0, entspricht also der *FaOMT*-Expression von nativen Erdbeeren. Auch die Werte der relativen Expression bei der Herabregulation durch die verschiedenen OMT Abschnitte zeigen starke Schwankungen, liegen jedoch deutlich unter denen von pBI-Intron. Die verwendeten Längen der einzelnen Sequenzabschnitte von 219 bp und 240 bp zeigten eine vergleichbar effiziente Stilllegung der *FaOMT*. Aufgrund der starken Schwankungen und unter Berücksichtigung der Mediane von OMT A bis OMT E war hinsichtlich der Expression kein Unterschied zwischen den einzelnen Abschnitten bei der Herabregulation der *FaOMT* zu erkennen. Folglich induzieren alle verwendeten Konstrukte effektiv den RNAi-Prozess. Unterschiede in der Herabregulation aufgrund der relativen Zugänglichkeit sind nicht zu erkennen.

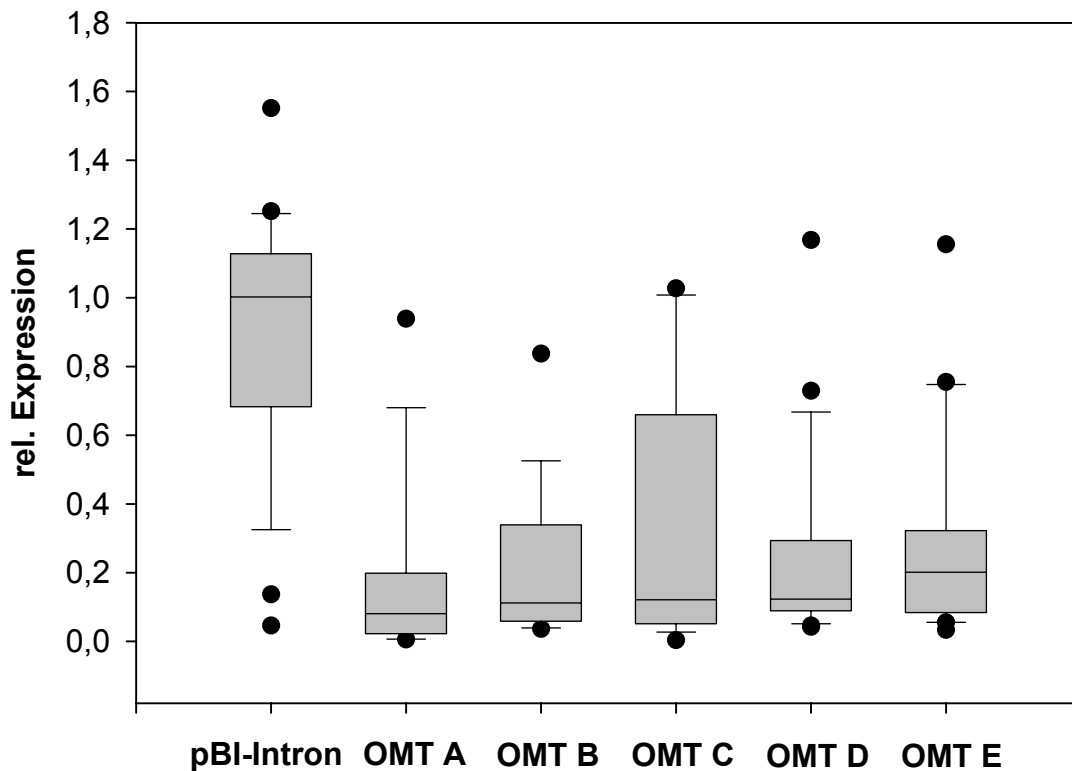


Abbildung 30 Relative Genexpression von *FaOMT* in mit pBI-Intron und den ihp-Konstrukten OMT A bis OMT E transfizierten Erdbeerfrüchten bezogen auf die mittlere Expression nativer Erdbeeren (Probenanzahl N=17). Probenanzahlen: pBI-Intron (Tage von Injektion bis Ernte T=8 bis 16, N=27), OMT A (T=8 bis 15, N=14), OMT B (T=8 bis 20, N=18), OMT C (T=9 bis 18, N=18), OMT D (T=8 bis 18, N=21), OMT E (T=9 bis 18, N=21).

Tabelle 6 Signifikanztest der Wertegruppen der relativen Genexpression der *FaOMT* durch Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test. Statistische signifikante Unterschiede sind für $p < 1,0 \text{ E-}2$ hervorgehoben.

Wertegruppen	p-Wert
nativ vs. pBI-Intron	7,2 E-1
nativ vs. OMT A	1,5 E-6
nativ vs. OMT B	8,6 E-8
nativ vs. OMT C	9,8 E-5
nativ vs. OMT D	1,9 E-7
nativ vs. OMT E	1,0 E-6
pBI-Intron vs. OMT A	7,9 E-6
pBI-Intron vs. OMT B	2,2 E-6
pBI-Intron vs. OMT C	3,5 E-5
pBI-Intron vs. OMT D	3,4 E-6
pBI-Intron vs. OMT E	1,2 E-5

2.3.1.2 Metabolitanalyse der herabregulierten *FaOMT* Früchte A bis E

Für die Analyse der von der *FaOMT* umgesetzten Metabolite wurde parallel zu den RNA Präparationen ein Auszug mit Ethylacetat durchgeführt (Kapitel 4.3.7.2). Die aus den einzelnen Früchten gewonnenen Extrakte wurden in Wasser überführt und anschließend mit LC-ESI-MSⁿ vermessen. Durch die Extraktionsmethode mit Ethylacetat wurde eine Anreicherung insbesondere der Aromastoffe HDMF und DMMF, aber auch der Phenylpropanoid-glucoseester erreicht. Aufgrund der gewählten Extraktionsmethode war es nicht möglich Anthocyane zu bestimmen. Auch der für die Ligninbiosynthese interessante Sinapyl-glucose-Ester war, wie erwartet (Määttä-Rhihinen *et al.* 2004), aufgrund nicht ausreichender Konzentrationen nicht zu detektieren. Die Stabilität in wässriger Lösung liegt für HDMF bei einer Halbwertszeit von einigen Tagen bis Wochen, abhängig vom jeweiligen pH Wert. Für DMMF liegt sie bei einigen Monaten (Roscher *et al.* 1997). Die Bestimmungen konnten in diesem Zeitraum problemlos vorgenommen werden.

Abbildung 31 zeigt die normalisierte Darstellung des HDMF Gehaltes in Erdbeerfrüchten, angegeben als Verhältnis von HDMF zur Gesamtmenge von HDMF plus der methylierten Form DMMF. Eine Herabregulation der *FaOMT* Aktivität führte zu einem verringerten Gehalt an DMMF in den Erdbeeren. Das Verhältnis von HDMF zur Gesamtmenge von HDMF plus DMMF verschob sich in Richtung eins. Tabelle 7 zeigt die dazugehörigen p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Tests. Der Vergleich der p-Werte zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit pBI-Intron injizierten und den nativen, unbehandelten Erdbeeren ($p = 6,4 \text{ E-}1$). Das Verhältnis von HDMF zur Gesamtmenge von HDMF plus DMMF in mit pBI-Intron behandelten Erdbeeren entspricht dem in unbehandelten Früchten. Daher werden in der folgenden Ergebnisdarstellung alle weiteren Signifikanztests auf die nativen Früchte bezogen. Alle eingesetzten OMT-Konstrukte zeigen in der statistischen Auswertung signifikante Unterschiede zur nativen Frucht ($p \leq 3,6 \text{ E-}3$). Ein entsprechendes Ergebnis ergibt auch der Vergleich von mit ihp-OMT-Konstrukten behandelten Früchten mit der mit pBI-Intron injizierten Kontrollgruppe.

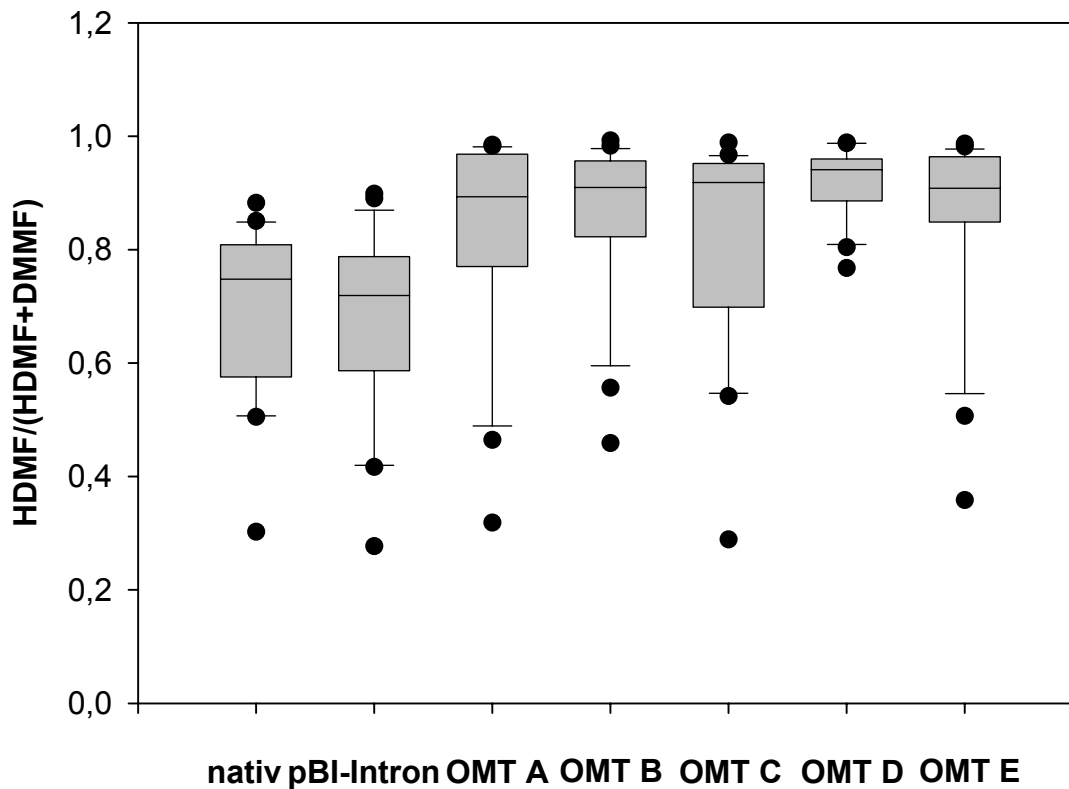


Abbildung 31 Normalisierte Darstellung des HDMF Gehaltes in Erdbeerfrüchten, angegeben ist das Verhältnis von HDMF zur Gesamtmenge von HDMF + DMMF. Probenanzahlen: nativ N=22; pBI-Intron (Tage von Injektion bis Ernte T=8 bis 16, N=26); OMT A (T=8 bis 15, N=22); OMT B (T=8 bis 20, N=23); OMT C (T=9 bis 18, N=21); OMT D (T=8 bis 18, N=21); OMT E (T=7 bis 18, N=23).

Tabelle 7 Signifikanztest der Wertegruppen des Verhältnisses HDMF/(HDMF+DMMF) durch Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test. Statistisch signifikante Unterschiede sind für $p < 1,0 \text{ E-}2$ hervorgehoben.

Wertegruppen	p-Wert
nativ vs. pBI-Intron	6,4 E-1
nativ vs. OMT A	1,8 E-3
nativ vs. OMT B	1,2 E-5
nativ vs. OMT C	3,6 E-3
nativ vs. OMT D	6,6 E-9
nativ vs. OMT E	4,2 E-5
pBI-Intron vs. OMT A	7,0 E-4
pBI-Intron vs. OMT B	8,0 E-6
pBI-Intron vs. OMT C	2,0 E-3
pBI-Intron vs. OMT D	1,3 E-9
pBI-Intron vs. OMT E	3,9 E-5

Die ermittelte breite Streuung der Werte in der Box-Plot Auftragung liegt an Messergebnissen einzelner Früchte, die trotz Herabregulation immer noch große Mengen an DMMF enthielten. Die Stilllegung der FaOMT zeigte keinen sichtbaren Phänotyp. Alle in der Auftragung enthaltenen Analysen wurden mit willkürlich ausgewählten Früchten durchgeführt. Die unterschiedliche Ausprägung der Stilllegung der FaOMT im Fruchtkörper führte vermutlich zu einem chimären Phänotyp vieler Erdbeeren. Bei der Aufarbeitung wurden jedoch Homogenisate ganzer Früchte beprobt. Eine Restaktivität des FaOMT Enzyms ist folglich wahrscheinlich. Insgesamt war anhand der relativ ähnlichen Mediane der OMT-Behandlungen eine deutliche Herabregulation der Methylierung von HDMF zu erkennen, die über alle eingesetzten Abschnitte des Zielgens eine vergleichbare Effizienz zeigte.

Einzelne Früchte aller fünf OMT-Konstrukte zeigten ein Verhältnis von HDMF zur Gesamtmenge HDMF plus DMMF von 0,98 und darüber. Diese fast vollständige Unterdrückung der Methylierung von HDMF zu DMMF demonstriert das Potenzial der Herabregulation durch transiente RNAi in Erdbeerfrüchten.

Abbildung 32 zeigt die normalisierte Darstellung des Kaffeesäure-glucose-Ester Gehaltes in Erdbeerfrüchten. Angegeben ist das Verhältnis von Kaffeesäure-glucose-Ester zur Gesamtmenge von Kaffeesäure-glucose-Ester und Ferulasäure-glucose-Ester. Die Analyten wurden hier als Glucose-Ester quantifiziert, da sie hauptsächlich in gebundener Form vorliegen. Die zugehörige Tabelle 8 enthält die p-Werte des Vergleichs der Wertegruppen durch den Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test.

Die Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten nativen und den mit pBI-Intron injizierten Früchten ($p = 3,0 \text{ E-}3$). Der Median des Verhältnisses der Metabolite fällt für die Behandlung mit pBI-Intron. Der Vergleich zwischen mit pBI-Intron behandelten und mit OMT C transfizierten Früchten ergab ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 2,2 \text{ E-}4$). Das Verhältnis von Kaffeesäure-glucose-Ester zur Gesamtmenge von Kaffeesäure- und Ferulasäure-glucose-Ester von mit OMT C injizierten Früchten entspricht jedoch dem nativer unbehandelter Erdbeerfrüchte ($p = 4,2 \text{ E-}1$).

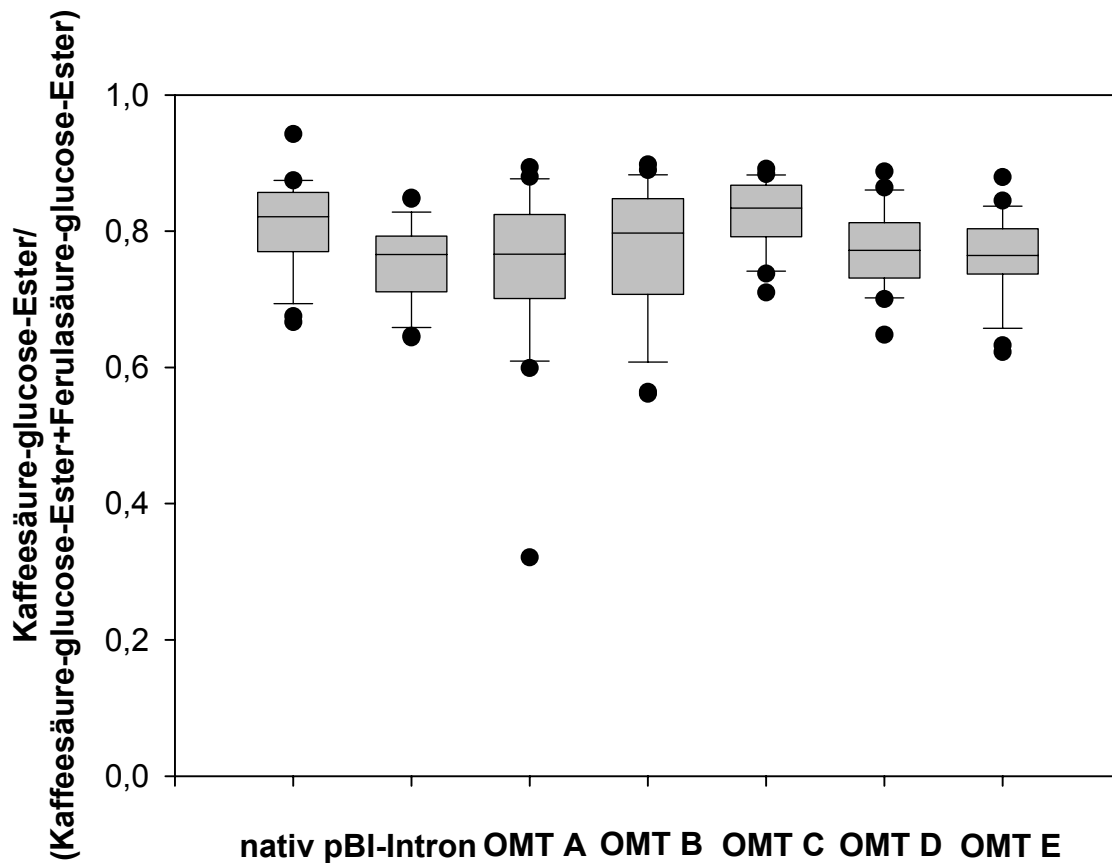


Abbildung 32 Normalisierte Darstellung des Kaffeensäure-glucose-Ester Gehaltes in Erdbeerfrüchten, angegeben ist das Verhältnis von Kaffeensäure-glucose-Ester zur Gesamtmenge von Kaffeensäure-glucose-Ester und Ferulasäure-glucose-Ester. Die Analyten wurden hier als Glucose-Ester quantifiziert, da sie hauptsächlich in gebundener Form vorliegen. Probenanzahlen: nativ N=22; pBI-Intron (Tage von Injektion bis Ernte T=8 bis 16, N=26); OMT A (T=8 bis 15; N=22); OMT B (T=8 bis 20, N=23); OMT C (T=8 bis 18, N=21); OMT D (T=8 bis 18, N=21); OMT E (T=7 bis 18, N=23).

Tabelle 8 Signifikanztest der Wertegruppen des Verhältnisses Kaffeensäure-glucose-Ester/(Kaffeensäure-glucose-Ester+Ferulasäure-glucose-Ester) durch Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test. Statistische signifikante Unterschiede sind für $p < 1,0 \text{ E-}2$ hervorgehoben.

Wertegruppen	p-Wert
nativ vs. pBI-Intron	3,0 E-3
nativ vs. OMT A	4,2 E-2
nativ vs. OMT B	2,7 E-1
nativ vs. OMT C	4,2 E-1
nativ vs. OMT D	3,7 E-2
nativ vs. OMT E	1,8 E-2
pBI-Intron vs. OMT A	8,3 E-1
pBI-Intron vs. OMT B	1,3 E-1
pBI-Intron vs. OMT C	2,2 E-4
pBI-Intron vs. OMT D	3,9 E-1
pBI-Intron vs. OMT E	8,8 E-1

Insgesamt sind anhand der Mediane aufgrund der Streuung keine Unterschiede durch eine Behandlung mit ihp-OMT-Konstrukten zu erkennen. Möglicherweise wurde durch die Injektion der Agrobakteriensuspension eine erhöhte Biosynthese von Phenylpropanoiden ausgelöst, die zu einer Verschiebung im Metabolitverhältnis führte. Mit der Ausnahme von OMT C ist eine leichte Verringerung der Mediane durch eine Injektion von pBI-Intron oder ihp-OMT-Konstrukten zu erkennen.

2.3.2 Herabregulation der *FaCHS* durch die Sequenzabschnitte A bis E

Auch das *FaCHS* Gen wurde zur Untersuchung des Einflusses der jeweils verwendeten Zielsequenz auf die Herabregulation herangezogen. Dazu wurde der *FaCHS* Vollängenklon PP4_C5 (Dangel 2007; Sequenz s. Anhang) verwendet. Die 1172 bp Sequenz weist eine große Homologie zu der partiellen cDNA AI795154 (Aharoni *et al.* 2000) (Kapitel 2.2) auf. Sie wurde aus DNA von *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta gewonnen. Der 240 bp lange Abschnitt CHS A (Sequenz s. Anhang) musste aufgrund eines Introns aus der cDNA reifer roter Früchte von *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta amplifiziert werden und weist gegenüber *FaCHS* PP4_C5 fünf Nukleotidaustausche auf.

Die Unterteilung der Volllänge der *FaCHS* in die fünf Abschnitte A bis E zeigt die Abbildung 33. Für die jeweiligen Sequenzabschnitte A bis E der *FaCHS* ist die jeweilige relative Zugänglichkeit F, berechnet nach (1), angegeben (Kapitel 2.3.).

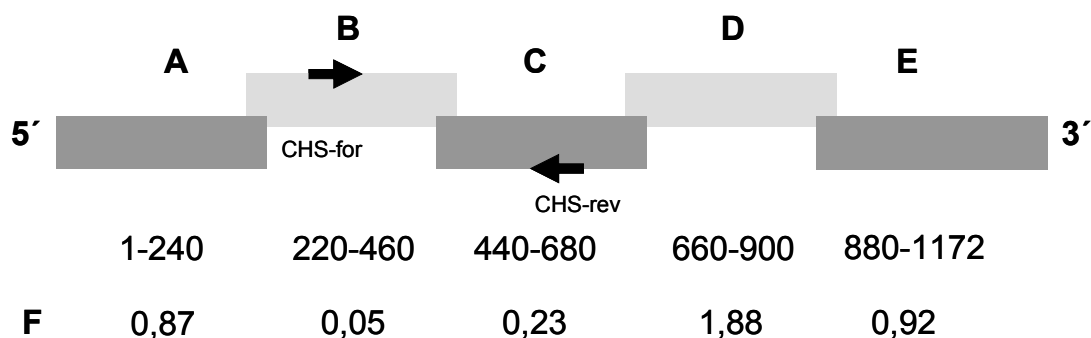


Abbildung 33 Einteilung der *FaCHS* in die Abschnitte A bis E mit Angabe der Nukleinsäurepositionen. F ist die relative Zugänglichkeit der einzelnen Abschnitte, zusätzlich ist die relative Position des PCR-Amplifikats mit CHS-for und CHS-rev schematisch angegeben.

Für die RNA der *FaCHS* wurden durch die *in silico* Faltungen insgesamt 39 Randstrukturen ermittelt. Die detaillierte Konstruktion der einzelnen ihp-Konstrukte CHS A bis CHS E und die verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 4.3.3.2 angegeben.

2.3.2.1 Phänotypen der herabregulierten *FaCHS* Früchte A bis E

Alle fünf als Zielregion verwendeten Abschnitte der *FaCHS* zeigten in den mit ihp-Konstrukten infiltrierten Früchten erwartungsgemäß den Phänotyp weißer Erdbeerfrüchte (Abbildung 34).

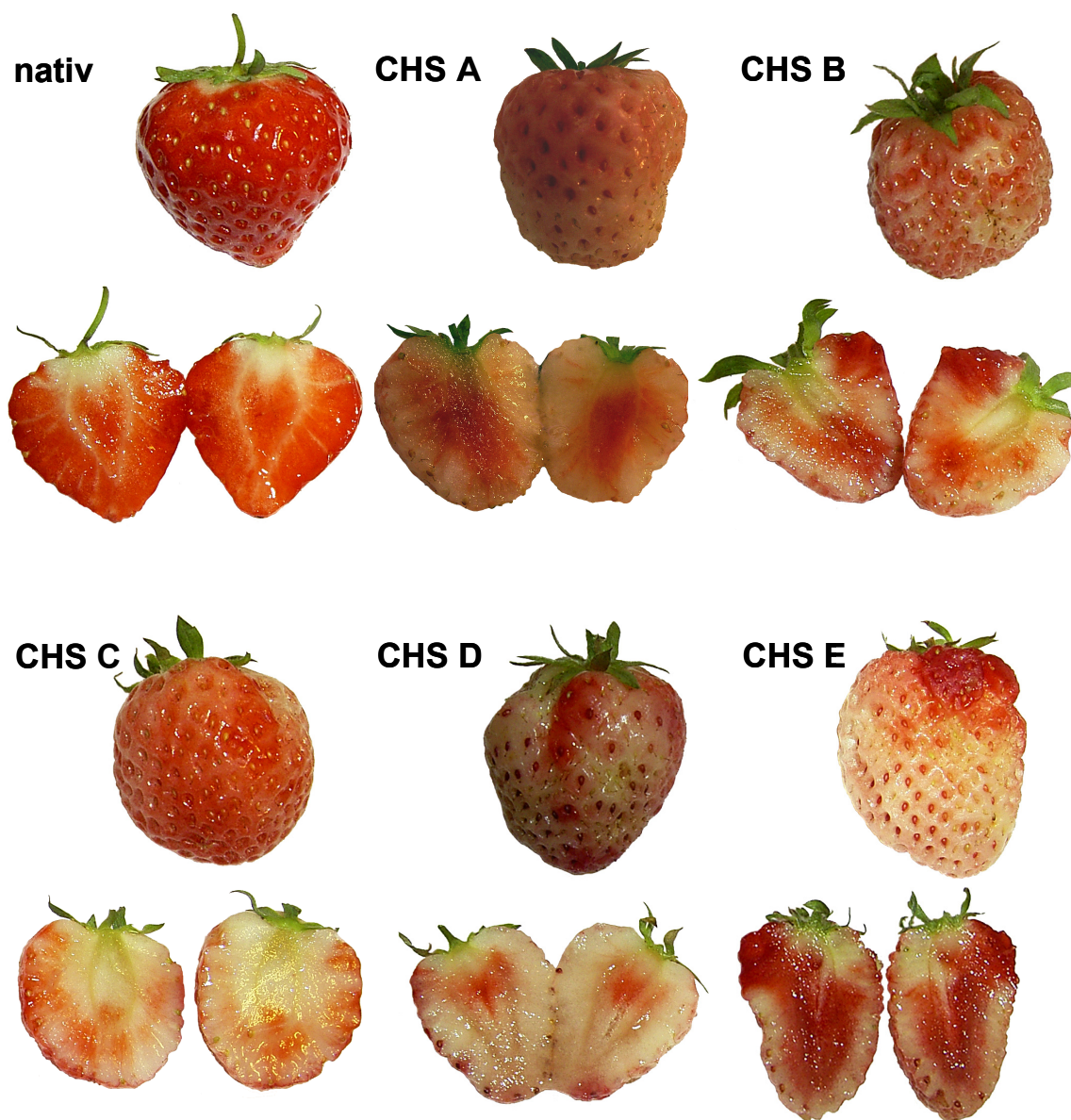


Abbildung 34 Unterschiedliche Phänotypen der einzelnen CHS Abschnitte: native Frucht; CHS A (Tage von Injektion bis Ernte T=16); CHS B (T=16); CHS C (T=9); CHS D (T=16); CHS E (T=16).

2.3.2.2 Expressionsanalyse der herabregulierten *FaCHS* Früchte A bis E

Der Nachweis der *FaCHS* Expression erfolgte durch die Analyse von Total-RNA Präparationen der einzelnen Erdbeerfrüchte über quantitative PCR (Kapitel 4.3.6.2). Diese wurden mit einem Oligo-Hexamer 5'-NNNNNN-3' revers in cDNA transkribiert (Kapitel 4.3.1.4). Die PCR-Reaktion zielte auf die Abschnitte B und C der mRNA des *FaCHS* Gens. Das zum Nachweis der *FaCHS* verwendete Primerpaar CHS-for (Position 328 - 347 in *FaCHS* PP4_C5) und CHS-rev (Position 553 - 572 in *FaCHS* PP4_C5) ergab ein Amplifikat von 245 bp. Als Haushaltsgen (*housekeeping gene*) wurde wiederum das konstitutiv exprimierte Actin Gen aus *Fragaria x ananassa* (AB116565) genutzt (Almeida *et al.* 2007).

Die Genexpression der *FaCHS* in mit pBI-Intron und in den mit den ihp-Konstrukten CHS A bis CHS E transfizierten Erdbeerfrüchten ist in Abbildung 35 dargestellt. Tabelle 9 gibt die entsprechenden p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Tests an.

Die angegebenen relativen Expressionen wurde auf eine mittlere Expression des *FaCHS* Gens in nativen Erdbeeren bezogen. Sie ergibt sich als Mittelwert aus 23 unabhängigen Messungen, die Standardabweichung beträgt in diesem Fall 36% für den CT-Wert der *FaCHS* Expression.

Zwar schwanken die Werte um ein Mehrfaches der gemittelten relativen *FaCHS* Expression, aber die Lage der Mediane aller mit CHS A bis CHS E transfizierten Erdbeeren zeigte eine deutlich niedrigere Expression im Vergleich zu den mit pBI-Intron transfizierten Früchten. Deren Median liegt in etwa bei eins, entspricht also der *FaCHS* Expression in nativen Erdbeerfrüchten. Mit den jeweils verwendeten Insertgrößen von 240 bp und 293 bp konnte eine effiziente Herabregulation der *FaCHS* induziert werden.

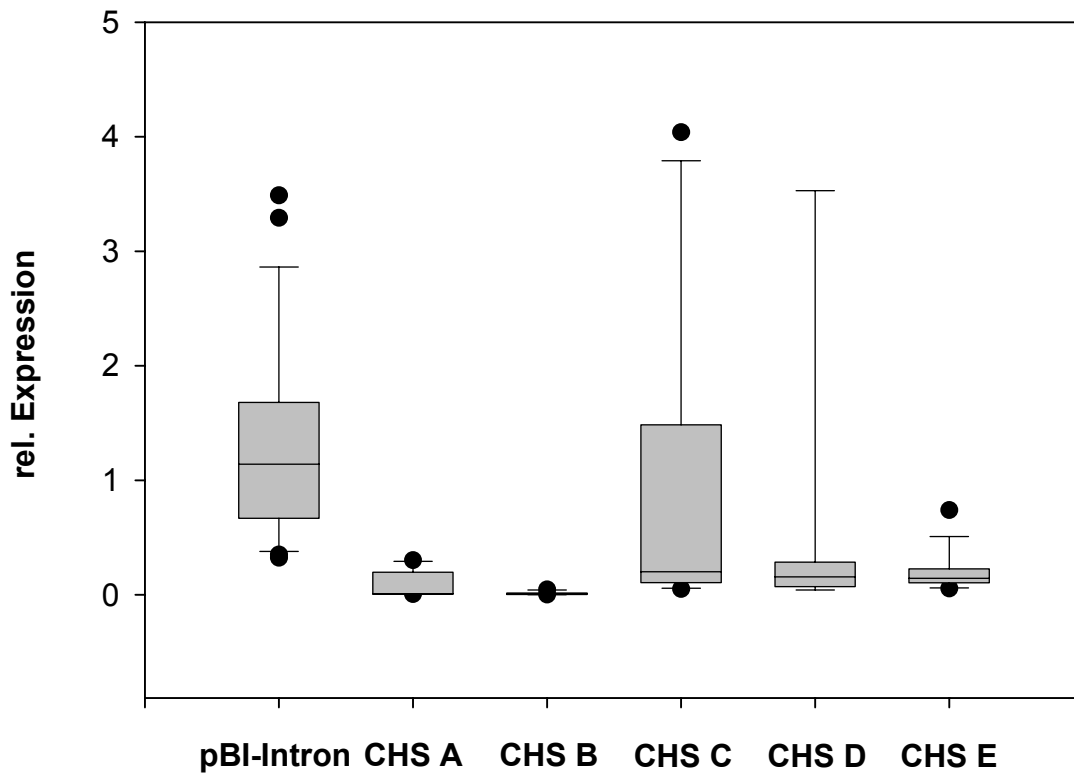


Abbildung 35 Relative Genexpression von FaCHS in mit pBI-Intron und den ihp-Konstrukten CHS A bis CHS E transfizierten Erdbeerfrüchten, bezogen auf die mittlere Expression nativer Erdbeeren (Probenanzahl N=23). Probenanzahlen: pBI-Intron (Tage von Injektion bis Ernte T=8 bis 16, N=26), CHS A (T=12 bis 19, N=10), CHS B (T=14 bis 19, N=10), CHS C (T=9 bis 16, N=10), CHS D (T=12 bis 16, N=9), CHS E (T=9 bis 19, N=15).

Tabelle 9 Signifikanztest der Wertegruppen der relativen Genexpression der FaCHS durch Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test. Statistische signifikante Unterschiede sind für $p < 1,0 \text{ E-}2$ hervorgehoben.

Wertegruppen	p-Wert
nativ vs. pBI-Intron	5,7 E-1
nativ vs. CHS A	5,9 E-5
nativ vs. CHS B	2,2 E-8
nativ vs. CHS C	4,2 E-2
nativ vs. CHS D	1,8 E-3
nativ vs. CHS E	3,5 E-6
pBI-Intron vs. CHS A	4,8 E-6
pBI-Intron vs. CHS B	7,9 E-9
pBI-Intron vs. CHS C	1,5 E-2
pBI-Intron vs. CHS D	3,5 E-4
pBI-Intron vs. CHS E	3,1 E-9

Die statistische Auswertung zeigt eine signifikante Verringerung der *FaCHS* Expression für CHS A, CHS B, CHS D und CHS E ($p < 1,0 \text{ E-}2$). Für CHS C kann aufgrund der stärkeren Schwankungen, im Vergleich mit den unbehandelten Früchten, kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die Größenordnung übertrifft die Schwankungen bei der Herabregulation der *FaOMT*. Die Mediane der *FaCHS* Expression liegen jedoch alle auf ungefähr gleicher Höhe, was auf eine gleichmäßige Herabregulation durch alle *ihp*-CHS-Konstrukte schließen lässt. Möglicherweise kann dieses Ergebnis auf die etwas geringere Probenanzahl, verglichen mit der Analyse der *ihp*-OMT-Konstrukte, zurückgeführt werden.

Trotz der großen Differenzen der berechneten relativen Zugänglichkeit (Abbildung 33) kann keine Korrelation mit der Genstilllegungseffizienz der verschiedenen *ihp*-Konstrukte festgestellt werden (Abbildung 35).

3. Diskussion

3.1 RNA Interferenz als Methode zur gezielten Herabregulation reifekorrelierter Gene in Erdbeerfrüchten

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung eines transienten Systems zur spezifischen Herabregulation von reifekorrelierten Genen in Erdbeerfrüchten. Der in dieser Arbeit verwendete transiente Ansatz stellt im Vergleich mit der Erzeugung stabil transgener Pflanzen eine schnellere Alternative zur gezielten Herabregulation reifekorrelierter Gene in Erdbeerfrüchten dar. Durch den Verzicht auf stabil transgene Pflanzen konnte der Zeit- und Materialaufwand je Experiment wesentlich verringert werden.

Die hierbei verwendete Technik basiert auf dem Effekt der durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelösten RNA-Interferenz in pflanzlichen Zellen. Dazu wurden selbstkomplementäre Abschnitte des Zielgens, sogenannte *inverted repeats* (IR), welche durch ein Intron separiert wurden, als *intron-hairpin*-RNA (ihpRNA) in den Zellen der Erdbeerfrüchte exprimiert. Dabei erzeugt die Verwendung eines kurzen Introns zur Generierung des terminalen Loops der dsRNA die wirkungsvollste Form eines *hairpin*-Konstrukts (Filichkin *et al.* 2007; Ossowski *et al.* 2008). Eine Suspension aus *Agrobacterium tumefaciens* Zellen mit einem binären Vektorkonstrukt (pBI121), das eine solche ihp-Kassette (Abbildung 14) enthielt, wurde durch Injektion in den Interzellularraum reifender Erdbeerfrüchte infiltriert. Nach erfolgreicher Transformation der pflanzlichen Zellen durch *A. tumefaciens* erfolgte in den Zellen der Erdbeerfrüchte die Expression der ihpRNAs unter Kontrolle eines konstitutiven 35S-Promotors. Diese transiente – nicht stabil transgene - Expression der ihpRNAs in den transfizierten Zellen der Erdbeerfrüchte induzierte schließlich die RNA-Interferenz durch dsRNAs und löste damit die gewünschte Herabregulation der Transkripte der Zielgene *FaCHS* und *FaOMT* aus.

Eine Interferonantwort durch die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR), die zur Apoptose führt, wie dsRNA über 25 nt Länge sie in Säugerzellen auslösen kann, ist in Pflanzen nicht möglich (Kuhlmann und Nellen 2004). Diese Tatsache ermöglicht die Induktion des pflanzlichen RNAi Systems mit einem längeren Abschnitt der Zielsequenz. Das Genstilllegungspotential der aus dem dsRNA Template gebildeten siRNAs kann stark variieren (Overhoff *et al.* 2005,

Schubert *et al.* 2005, Ossowski *et al.* 2008). Dabei wurden bisher hauptsächlich Unterschiede aufgrund von thermodynamischen Charakteristika der siRNAs festgestellt. Die Stabilität an beiden Enden der Duplexe der siRNAs hat Einfluss auf das Maß mit dem ein Strang ssRNA in den RNAi Weg eingeht. Weiterhin wurde bestimmten Motiven in der Nukleotidsequenz ein Einfluss auf die Effizienz nachgewiesen. Außerdem konnten die lokalen freien Energien der Zielstruktur mit einer verbesserten Genstilllegung derselben korreliert werden (Schubert *et al.* 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit generierten 219-303 bp langen dsRNAs der verwendeten Gene decken weite Bereiche des jeweiligen Transkripts ab und sorgen so statistisch für eine hohe Wahrscheinlichkeit einer effektiv wirksamen siRNA. In dieser Arbeit konnte eine signifikante Herabregulation für jeden eingesetzten Sequenzabschnitt sowohl der *FaCHS* (Kapitel 2.2 und 2.3.2) als auch der *FaOMT* (Kapitel 2.3.1) ermittelt werden.

Die im pflanzlichen RNAi Modell vorliegende RdRP vermittelt möglicherweise eine transitive Ausbreitung der Genstilllegung durch *de novo* Synthese von siRNAs (Ossowski *et al.* 2008) über die gesamte Transkriptlänge und sorgt zusätzlich für eine Verstärkung des Signals. Wahrscheinlich wird auch durch die *antisense* Technologie eine RNA-Interferenz ausgelöst (Meister und Tuschl 2004, Watson *et al.* 2005). Der bedeutendste Unterschied zwischen *antisense* RNA und der mittels dsRNA induzierten RNAi ist jedoch, dass die zweite Methode effizient dsRNAs zum Abbau der korrespondierenden mRNA liefert, während die Bildung von dsRNAs nach der ersten Methode ein langsamer Prozess ist (Tang und Gad 2004).

Die RNAi-induzierte Genstilllegung durch komplementäre siRNAs kann auch unerwünschte Folgen haben. Homologien von der Größe einer siRNA bestehen auch über nicht miteinander verwandte Nukleotidsequenzen, die durch das als *cross-* oder *off-target silencing* bezeichnete Phänomen der Herabregulation homologer Transkripte beeinflusst werden könnten.

Eine solche *off-target* Herabregulation, verursacht durch eine RNAi-vermittelte Genstilllegung, konnte für einigen Zielsequenzen sowohl in *Arabidopsis*, als auch in *Nicotiana benthamiana*, gezeigt werden (Xu *et al.* 2006). Studien zum *hairpin RNA mediated silencing* des *Tomato leaf curl virus* mit stabil transformierten Tomaten ergaben, dass die Integration einer 21 bp langen *short hairpin RNA* (shRNA) zu einer effizienten Herabregulation der viralen

Transkripte führte, aber gleichzeitig zeigten die Pflanzen einen morphologisch abnormen Phänotyp (Ramesh *et al.* 2007). Dieser Effekt wurde auf ein *cross-silencing* des Tomatengenoms durch die shRNA zurückgeführt.

Im Gegensatz dazu steht das Ergebnis einer Studie zur stabil transgenen Genstilllegung von endogenen Genen in *Arabidopsis* (Filichkin *et al.* 2007). Dabei wurden sowohl bei der Herabregulation durch IR-Strukturen, wie auch bei der Verwendung von Vektoren zur Induktion einer transitiven Genstilllegung, keine signifikanten *off-target* Effekte festgestellt. Begründet wurde dieses Ergebnis mit der geringen Überlappung der Zielsequenzen mit dem weiteren *Arabidopsis*genom. Aufgrund der geringen Anzahl veröffentlichter ESTs von *F. x ananassa* und ohne sequenziertes Genom, war zum Zeitpunkt der Untersuchungen ein solcher computergestützter Vergleich der in dieser Studie eingesetzten Nukleotidsequenzen nicht sinnvoll. Ein mögliches *cross-silencing* wird in der Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt.

Die stabil transgenen *antisense* Pflanzen der *FaCHS* (Lunkenbein *et al.* 2006b) und *FaOMT* (Lunkenbein *et al.* 2006c) zeigten jeweils eine starke Herabregulation der Genfunktion. *Fragaria x ananassa* ist eine octoploide Pflanze. In beiden Fällen wurden heterozygote Transgene für die Analysen verwendet. Bei der Integration von DNA durch *A. tumefaciens* vermittelte Transformation sind mögliche Positionseffekte im Genom zu berücksichtigen, welche die Expression des Konstrukts beeinflussen. Ferner sind Effekte auf Endogene durch die Insertion des Konstrukts im Genom zu beachten. Ein Vorteil der transienten Genstilllegung durch dsRNA ist möglicherweise eine über die gesamte Frucht ungleichmäßige Integration des Transformationskonstruktes in das Genom der einzelnen Zellen der Erdbeerfrucht. Daraus ergibt sich eine breitere Variation der Expression der Endogene, wie auch des Genstilllegungskonstrukts. Jedoch führt nur die dsRNA induzierte RNAi zu einer Herabregulation der Genaktivität. Die sich daraus ergebende chimäre Ausprägung der transfizierten Erdbeerfrüchte war folglich bei allen durchgeführten Analysen zu beobachten.

Verglichen mit den Ergebnissen des stabil transgenen *silencing* führt auch der transiente Ansatz dieser Arbeit erwartungsgemäß zu einer starken Herabregulation der *FaCHS* und *FaOMT* Transkripte. Zusätzlich zu den Untersuchungen auf Transkriptebene der jeweiligen mRNAs wurden die

korrespondierenden Enzymaktivitäten und die jeweils regulierten Metabolite untersucht.

3.1.1 Transfektion der Erdbeerfrüchte

Die Transfektion der Erdbeerfrüchte wurde durch die Injektion mit *A. tumefaciens* Zellen, die einen binären Vektor mit einer *ihp*-Kassette tragen, durchgeführt. Der für den Transformationserfolg bedeutendste Punkt ist die gleichmäßige Infiltration der Agrobakteriensuspension in die Erdbeerfrucht. Durch eine weitgehend homogene Verteilung über den gesamten Interzellularraum der Erdbeere wurde ein Maximum an Zellen erreicht. Die Verwendung von *F. x ananassa* cv. Elsanta Pflanzen ergab keine Schwierigkeiten bei der Transformationseffizienz der Zellen. Die in der Literatur beschriebenen Probleme aufgrund geringer Regenerationsraten transgener *F. x ananassa* cv. Elsanta (Passey *et al.* 2003) wurde durch den transienten Ansatz experimentell umgangen. Bereits wenige doppelsträngige RNA Moleküle (dsRNA) pro Zelle reichen, um die RNAi zu induzieren (Fire *et al.* 1998). Insgesamt konnte mit allen verwendeten Konstrukten eine transiente Expression beziehungsweise eine effiziente Genstilllegung demonstriert werden. Wahrscheinlich fand weiterhin eine begrenzte Zelle zu Zelle Genstilllegung statt (Himber *et al.* 2003). Dieser zelleigene Mechanismus könnte in Kombination mit der vollständigen Infiltration der Agrobakteriensuspension zu einer besonders effektiven Fortpflanzung des Induktionssignals der RNAi beigetragen haben.

Wichtig war außerdem der Zeitpunkt der Injektion. Erst ab dem vorletzten Entwicklungsstadium der Erdbeerfrucht, der Phase zwischen grün und weiß, war der Apoplast locker genug, um die Bakteriensuspension in den Interzellularraum des Fruchtkörpers einzubringen. Daher war auch erst ab diesem Zeitpunkt eine Herabregulation der Gentranskripte möglich. Gene, deren Transkripte und korrespondierende Enzyme, die schon vor diesem Zeitpunkt hochreguliert wurden, könnten zwar auf der Transkriptebene herabreguliert werden, aber aufgrund der Latenzzeiten wären keine oder kaum messbare Auswirkungen auf die entsprechenden Metabolite zu erwarten. CHS und CHI Proteine wurden auch einige Tage nachdem keine korrespondierenden mRNA Transkripte mehr detektiert werden konnten nachgewiesen (Cain *et al.* 1997). Unter der Annahme einer weiterhin bestehenden enzymatischen Aktivität wären

messbare Effekte auf die umgesetzten Metabolite dementsprechend gering. Auch auf Proteinebene wäre folglich mit einer geringen, oder sogar überhaupt nicht detektierbaren, Herabregulation zu rechnen.

Das Ausreifen der Früchte am Stock unter kontrollierten Bedingungen war unproblematisch. Hinsichtlich der durch die Injektion verursachten Verletzung und einer möglichen Kontamination durch die Eintrittsstelle war auf gesunde Pflanzen und eine pathogenfreie Umgebung zu achten. Allgemein sind gesunde, pathogen- und stressfreie Pflanzen Voraussetzung für eine effiziente Genstilllegung mittels transient induzierter RNAi.

3.1.2 Kontrolle der Transformation durch transiente Expression einer β -D-Glucuronidase

Zur Überprüfung der Expression in den transformierten Zellen wurde ein Intron-separiertes GUS-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors verwendet. Das eingesetzte Intron verhindert die Expression funktionaler β -D-Glucuronidase in den prokaryotischen *A. tumefaciens* Zellen, während in den Zellen der Erdbeerfrucht durch Herausschneiden (*splicing*) des Introns funktionale mRNA exprimiert werden kann. Ein *splicing* des Intron in den transformierten Zellen der Erdbeere wurde über RT-PCR nachgewiesen (Kapitel 2.1.2.1). Eine messbare Proteinaktivität der β -D-Glucuronidase wurde ab dem zweiten Tag nach der Infiltration gezeigt (Kapitel 2.1.2.2). Die gezeigte teilweise Blaufärbung einer Scheibe aus einer Erdbeerfrucht in der histochemisch die GUS-Aktivität demonstriert wurde, ist durch unterschiedlich starke Expression der β -D-Glucuronidase in den Zellen der Erdbeerfrucht zu erklären (Abbildung 18). Möglicherweise wurde dieses Ergebnis durch die uneinheitliche Struktur bei der Transformation der Zellen mit dem Vektor pBI-Intron verursacht. Eine vollständige Farbreaktion der Erdbeerfrüchte war aufgrund der geringen Enzymmengen, die bei einer transienten Expression gebildet werden, auch nicht zu erwarten. Die transiente Expression einer β -D-Glucuronidase in Erdbeerfrüchten lieferte ein vergleichbares Ergebnis (Spolaore *et al.* 2001). Ob eine chimäre Ausprägung der GUS Expression oder nur die Nachweisgrenze der enzymkatalysierten Reaktion ursächlich waren konnte hier nicht unterschieden werden. Die benötigte Kopienzahl an ihpRNA-Molekülen zur Induzierung der Genstilllegung liegt jedoch schon bei einigen wenigen Kopien pro Zelle. Diese Voraussetzung kann aufgrund der fluorometrisch bestimmten

β -D-Glucuronidase-Aktivität als erfüllt angesehen werden. Die messbare GUS-Aktivität ab dem zweiten Tag blieb über einen Zeitraum von 16 Tagen, entsprechend der Reifezeit von Injektion bis Ernte, bestehen. In dieser Zeit kann auch von einer kontinuierlichen Expression transient eingebrachter *ihp*-Konstrukte zur Induktion der RNAi eines Zielgens ausgegangen werden.

3.2 RNAi-induzierte Herabregulation der *FaCHS*

Zur Demonstration einer RNAi-induzierten Herabregulation in Erdbeerfrüchten wurde in dieser Arbeit eine Chalconsynthase (AI795154) aus einer cDNA Datenbank reifer Erdbeerfrüchte von *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta (*FaCHS*) verwendet. Das gleiche Gen wurde bereits für die Charakterisierung einer stabil transgenen Herabregulation der *FaCHS in planta* benutzt (Lunkenbein *et al.* 2006b).

Die Herabregulation der *FaCHS* durch transiente Genstilllegung konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden (Kapitel 2.2). Diese beruht auf der Expression einer *ihp*RNA der *FaCHS* durch die Agrobakterien-vermittelte Transformation (Kapitel 2.1.1) in den Erdbeerfrüchten. Die dsRNA der *FaCHS* induzierte die RNAi in den Zellen der Erdbeerfrucht. Die *FaCHS* Transkripte wurden abgebaut. Entscheidend für die erfolgreiche Herabregulation der *FaCHS* war der Zeitpunkt der Transfektion, die vor der Hochregulation der *FaCHS*-Expression in der reifenden Erdbeerfrucht erfolgen musste. RNAi greift nur auf der Ebene der mRNA Transkripte ein und beeinflusst nicht die schon translatierten Enzyme. Diese können weiterhin aktiv bleiben. Das CHS-Protein zeigte eine mehrtägige Latenzphase. Nach der initialen Expression der *CHS* konnte zwar CHS-Protein, aber kein korrespondierendes Transkript mehr nachgewiesen werden (Cain *et al.* 1997).

Neben dem Zeitpunkt war auch die Art der Infiltration für den Erfolg der Transformation möglichst vieler Zellen der Erdbeerfrucht (Kapitel 3.1.1) und der resultierenden Genstilllegung von entscheidender Bedeutung. Die gleichmäßige Verteilung der Agrobakteriensuspension war ausschlaggebend, da an Stellen die nicht erreicht wurden keine Transformation stattfindet und dadurch die Chimärenbildung gefördert wurde (Abbildung 19). Experimentell wurde ein großer Anteil Chimären festgestellt. Zusätzlich zu der biologischen Variabilität der nativen Erdbeeren beeinflussten auch diese chimären Früchte die Schwankungsbreite der Messwerte, so dass größere Probenzahlen zur

Absicherung der Ergebnisse erforderlich waren. Bestimmt wurden die korrespondierenden Transkriptmengen, Enzymaktivitäten, sowie die Metabolitprofile durch relative Quantifizierung über LC-ESI-MSⁿ. Aufgrund der deutlichen Herabregulation der FaCHS (Kapitel 2.2.1) auf Transkriptebene (Abbildung 20) ist von einer effektiven Genstilllegung durch die Transfektion mit dem Vektor pBI-*CHSi* auszugehen. Der Nachweis der FaCHS Enzymaktivität erfolgte indirekt über das durch die enzymkatalysierte Reaktionen der CHS und der nachfolgenden Chalconisomerase (CHI) gebildete Naringenin (Abbildung 20). Die deutlich verminderte Produktbildung der mit pBI-*CHSi* transfizierten Erdbeeren diente hier als Nachweis einer verringerten CHS und CHI Aktivität.

Die verwendete partielle Sequenz des *FaCHS*-Gens von 303 bp deckte nur einen Teil der Volllänge ab. Aufgrund großer Sequenzhomologien innerhalb der Genfamilie der Chalconsynthasen mit wenigen Nukleotidunterschieden ist dennoch eine RNAi-induzierte Herabregulation aller im Blütenboden exprimierten CHS Allele wahrscheinlich. Dazu wäre minimal eine homologe Sequenz von 21 Nukleotiden Länge, entsprechend einer siRNA, nötig. Ein allelspezifischer Nachweis der einzelnen *CHS* Expressionen konnte jedoch nicht geführt werden.

Trotz der starken Herabregulation und des vollständig weißen Phänotyps im Einzelfall dieser Erdbeeren war eine vollständige Unterdrückung der Enzymaktivität nicht möglich. Die FaCHS ist ein entscheidendes Enzym in der Flavonoidbiosynthese (Knogge *et al.* 1986; Martin 1993). Unter Berücksichtigung ihrer essentiellen Rolle in der Pollenfertilität, bei der Bildung der Samenanlage und der Entwicklung der Pflanze (Cain *et al.* 1997) wäre ein vollständiger Funktionsverlust wahrscheinlich letal. Eine solche stabil transgene *loss of function* Mutante wäre vermutlich nicht lebensfähig. Der chimäre Phänotyp der Erdbeeren mit herabregulierter *FaCHS* Expression brachte durch die nicht oder nur gering herabregulierten Bereiche dieser Früchte vermehrt Transkript oder Protein in das Homogenisat ein und verursachte so einen Anstieg der Messwerte der Probe.

Da methodisch bedingt jeweils ganze Erdbeeren mit den Nüsschen für die Extraktionen verwendet wurden, sind diese als weitere mögliche Quelle der nachgewiesenen *FaCHS*-Transkripte zu berücksichtigen. Das Fruchtgewebe ist ein sogenanntes „*sink tissue*“ (Perkins-Veazie 1995), das bedeutet, ein Transport von Assimilaten der Pflanze findet immer nur in Richtung der Frucht

statt, nicht aus der Frucht heraus. Unter der Annahme, dass diese Beobachtung auch auf die mögliche Ausbreitung eines PTGS Signals zutrifft, da diese den Transport von siRNAs bzw. Carriermolekül-gebundenen siRNAs erfordert, wirkt die transiente Herabregulation nur im Blütenboden und zeigt keine Verbreitung über die gesamte Pflanze. Die Annahme einer CHS Aktivität in den Nüsschen trotz der Herabregulation der *FaCHS* im Gewebe des Blütenbodens wurde indirekt durch die intensive rote oder bräunliche Färbung der reifen Nüsschen bestätigt (Abbildung 19 b). Da die *CHS*-Allele der Erdbeere oft nur wenige Nukleotide abweichen (Dangel 2007), unterschied der PCR-Nachweis des *CHS*-Transkripts nicht zwischen *CHS* aus dem Blütenboden und dem aus den Nüsschen. Die nicht herabregulierten *CHS*-Transkripte der Nüsschen führten bei der Homogenisierung von jeweils einer gesamten Erdbeere für die Analyse zu einer Erhöhung der ermittelten Gehalte an mRNA in den Proben. Vereinzelt waren die Nüsschen auch von rötlich gefärbten Höfen umgeben (Abbildung 21). Diese wurden eventuell durch Diffusion von Anthocyanen oder auch von funktionellem Enzym aus den Nüsschen in das Gewebe des Fruchtbodens verursacht. Eine mögliche Auswirkung des denkbaren Übertritts von CHS Protein, welches dieselbe Reaktion wie die *FaCHS* katalysiert, wäre eine lokale Synthese von Anthocyanen. Diese Vermutung konnte jedoch nicht näher untersucht werden. Ein solcher „Transport“ von Enzym oder Anthocyanen aus den Nüsschen in den Blütenboden der Erdbeeren ist eine weitere mögliche Erklärung für die festgestellte Restaktivität der *FaCHS* in den durch *pBI-CHSi* herabregulierten Früchten.

Eine Standardisierung der Herabregulation des *FaCHS* Transkripts in den mit *pBI-CHSi* transfizierten Erdbeerfrüchten ist aufgrund der Tatsache, dass jede Frucht ein unabhängiges Experiment darstellt, schwierig.

Durch die Verwendung von Box-Plots (Kapitel 4.3.13.1) für die nicht-normalverteilten Ergebnisse konnten belastbare Aussagen getroffen werden. Insgesamt sind die Ergebnisse mit denen der stabil transgenen herabregulierten Erdbeerfrüchte (Lunkenbein *et al.* 2006b) vergleichbar. Eine reduzierte Pigmentierung trat erst bei einer Reduktion des *FaCHS* Transkripts auf unter 25% des Expressionslevels der Kontrollen auf. Die transiente Herabregulation der mRNA der *FaCHS* um den Faktor fünf (Kapitel 2.2.1), also auf etwa 20%, für die Total-RNA der Früchte inklusive Nüsschen und unter Berücksichtigung des chimären Phänotyps, deutet auf eine stark ausgeprägte

Genstilllegung hin. Der für die stabil herabregulierten Erdbeeren (Lunkenbein *et al.* 2006b) beschriebene Phänotyp einer pinken Färbung der Früchte, selbst bei einer Reduktion des *FaCHS* Transkripts auf 2%, läßt auf eine Restaktivität der *FaCHS* schließen. Aufgrund des fast rein weißen Phänotyps, der in dieser Arbeit durch Infiltration mit pBI-*CHSi* gezeigt wurde (Abbildung 19 b), kann eine noch stärker verringerte *FaCHS* Aktivität in dem entsprechenden Gewebe vermutet werden. Dieser mögliche Effekt wurde aber durch die Aufarbeitung der gesamten Frucht mit Nüsschen zu einer gemittelten Total-RNA maskiert.

Transgene Tomatenpflanzen mit herabregulierter CHS bildeten parthenokarpe Früchte (Schijlen *et al.* 2007). Diese Fruchtbildung wurde durch veränderte Synthese, Stabilität oder Verteilung pflanzlicher Hormone wie z.B. Auxine oder Gibberelline, verursacht, da die Auxin-bindenden Flavonoide herabreguliert waren. Auch ein *cross-silencing* Effekt ist nach Meinung der Autoren nicht auszuschließen, obwohl solche unspezifischen Reaktionen durch siRNAs der CHS für unwahrscheinlich gehalten wurden.

Alternativ zur Herabregulation der CHS bringt auch eine Überexpression der Stilbensynthase (*STS*) aus *Vitis vinifera* in *Nicotiana tabacum* sterile männliche Pollen hervor (Fischer *et al.* 1997). Begründet wurde dieser Effekt mit einer kompetitiven Hemmung, da beide Enzyme die Präkursormoleküle p-Cumarsäure-CoA und Malonsäure-CoA umsetzen. Die Verringerung der Biosyntheseleistung der CHS führt zu einer Limitierung der Stoffwechselprodukte *downstream* der CHS und wirkt so auf Metabolitebene wie eine Herabregulation der Genaktivität selbst. Möglicherweise war die Ursache aber ein verdeckter *cross-silencing* Effekt der endogenen CHS durch die Expression des Fremdgens *STS*. Durch die Expression einer *STS* aus *Vitis riparia* wurde in Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) ein solches *cross-silencing* der endogenen CHS ausgelöst (Hanhineva 2008). Obwohl die Nukleotidsequenzen nur eine Übereinstimmung von 69% besaßen, wurden bei einem Vergleich der Nukleotidsequenzen sieben Abschnitte mit einer Länge von 11 bis 19 aufeinanderfolgenden Nukleotiden in beiden Genen gefunden, deren Größe für eine effektive siRNA ausreichen. Dabei wurde vermutlich eine RNAi-induzierte Genstilllegung durch das *STS* Transkript ausgelöst, welche durch komplementäre siRNAs auf die endogene *CHS* übertragen wurde. Aufgrund der Überexpression war jedoch ein möglicher Abbau des *STS* Transkripts im quantitativen PCR-Nachweis nicht bestimmbar. *STS*-Gene sind

nach bisherigem Wissen auf wenige Species begrenzt, wie z.B. Wein (*Vitaceae*), Erdnuss (*Cyperaceous*) und Pinie (*Pinus*). Zwar wurden in vielen Pflanzen nah verwandte Enzyme charakterisiert und die Zahl der Pflanzen, in denen stilbenhaltige Substanzen entdeckt wurden, steigt (Hanhineva 2008), aber in Erdbeeren wurde eine STS bis zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen. Jedoch wurde kürzlich Resveratrol, das Produkt der von der STS katalysierten Reaktion, in geringen Mengen in Nüsschen und Fruchtboden von Erdbeeren gefunden (Wang *et al.* 2007), daher kann die Existenz einer STS in Erdbeeren nicht ausgeschlossen werden.

Ein endogenes Gen für ein potentiell *cross-silencing* wäre die *CHI*. *CHS* und *CHI* gehören zur Multigenfamilie der Polyketidsynthasen (Tropf *et al.* 1993, 1995; Dixon 1999) und weisen eine hohe Sequenzhomologie (Schröder und Schröder 1990; Tropf *et al.* 1993) auf. Die *CHI* katalysiert im nachfolgenden Schritt die Umsetzung des von der *CHS* gebildeten Naringenin-Chalcons zu Naringenin. Der Nachweis des Naringenins unterscheidet nicht zwischen den beiden Enzyme, wurde aber in der vorliegenden Arbeit als Indikator für eine verminderte Gesamtaktivität von *FaCHS* und *CHI* auf Proteinebene genutzt (Abbildung 20 b). Aufgrund des Reaktionsschemas sollten sich die phänotypischen Auswirkungen einer verminderten *CHI* Aktivität nicht von denen einer Herabregulation der voranstehenden *FaCHS* unterscheiden. Ein mögliches *cross-silencing* der *CHI* durch die RNAi-basierte Herabregulation der *FaCHS* war nicht vollständig auszuschließen. Hier könnten weitere Untersuchungen Klarheit bringen.

Zur Bestimmung der durch *FaCHS* umgesetzten und durch eine Genstilllegung möglicherweise beeinflussten Metabolite (Kapitel 2.2.2) wurden Extrakte der Früchte mit LC-ESI-MSⁿ untersucht. Der hellere Phänotyp der Erdbeerfrüchte bei herabregulierter *FaCHS* (Abbildung 19) korrelierte mit signifikant verringerten Gehalten des Anthocyans Pelargonidin-3-glucosid, sowie Pelargonidin-3-glucosid-malonat und (Epi)-Afzelechin-Pelargonidin-3-glucosid (Abbildung 22). Außerdem wurde eine Akkumulation von Phenylpropanoiden festgestellt. Kaffeesäure-Glucose-Ester und Ferulasäure-Glucose-Ester zeigten beide signifikant erhöhte Werte in den mit pBI-*CHSi* behandelten Früchten verglichen mit den nativen Kontrollen. Der Vergleich von mit pBI-Intron und mit pBI-*CHSi* transfizierten Früchten zeigte für Kaffeesäure-, im Gegensatz zu Ferulasäure-Glucose-Ester, jedoch keinen signifikanten Unterschied.

In Erdbeerfrüchten mit stabil transgen herabregulierter FaCHS wurden für die Glucose-Ester der Phenylpropanoide folgende Zunahmen ermittelt: 1092% für Ferulasäure- sowie 816% für Kaffeesäure- und 174% für p-Cumarsäure-glucoseester, jeweils bezogen auf die Konzentrationen der nativen Erdbeerfrüchte (Lunkenbein *et al.* 2006b).

Diese Verteilung mit der größten Zunahme für das methylierte Derivat ergab sich in schwächer ausgeprägter Form auch für die Erdbeeren mit transient herabregulierter FaCHS. Für Kaffeesäure- und Ferulasäure-Glucose-Ester nahmen beide Mediane leicht zu durch die Behandlung mit pBI-Intron und noch stärker durch die Transfektion mit pBI-*CHSi*. Dieser Anstieg wurde durch die verringerte FaCHS Aktivität verursacht (Lunkenbein *et al.* 2006b), aber vermutlich auch durch die Injektion der Agrobakteriensuspension. Für den Gehalt an p-Cumarsäure-glucose-Ester ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen.

Möglicherweise wurde als Antwort der pflanzlichen Pathogenabwehr (Clark *et al.* 1994; Gregersen *et al.* 1994; Shiraishi *et al.* 1995; Zeyen *et al.* 1995; Christensen *et al.* 1998; Felton *et al.* 1999) auf die Infiltration mit Agrobakterien, beziehungsweise die Verletzung der Frucht, eine erhöhte Biosynthese von Phenylpropanoiden induziert. Auch für Flavonoide wie Kämpferol und Quercetin, Catechine und Proanthocyanidine ist eine solche Induzierbarkeit durch pflanzliche Pathogene beschrieben (Treutter 2005).

Eine durch die Injektion bzw. die Agrobakterien induzierte Reaktion der Erdbeerpflanzen könnte somit auch die beobachteten geringen Zunahmen der Gehalte an Kämpferol-, Quercetin-glucosid und (Epi)afzelechin->(Epi)catechin bei der Behandlung der Erdbeerfrüchte mit pBI-Intron erklären (Abbildung 22). Da in den Früchten mit herabregulierter FaCHS die Biosynthese dieser Substanzen verringert ist ergaben sich daraus die ermittelten signifikanten Unterschiede zwischen den mit pBI-Intron und den mit pBI-*CHSi* injizierten Erdbeeren (Tabelle 3).

Die Zunahme für (Epi)catechin->(Epi)catechin im Vergleich zwischen unbehandelten und mit pBI-*CHSi* transfizierten Früchten lässt auch auf eine durch die Transfektionsmethode induzierte Bildung schließen, wobei für diese Substanzen von einer Bildung aus bereits vorhandenen Vorläufersubstanzen ausgegangen werden muss. Entsprechend dieser Vermutung zeigt die Analyse

des Epicatechingehaltes auch keine signifikanten Veränderungen durch eine Injektion (Abbildung 22).

Aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Transfektion durch Injektion einer Agrobakteriensuspension konnte der Eingriff in den Stoffwechsel in Bezug auf die Fruchtentwicklung erst relativ spät durchgeführt werden. Diese Limitierung bedingte, dass viele Substanzen schon biosynthetisiert waren (eigene Untersuchungen und Halbwirth *et al.* 2006) bevor eine Herabregulation der *FaCHS* stattfinden konnte. Nur Substanzen deren Biosynthese erst nach diesem Zeitpunkt in signifikanten Mengen erfolgte können in messbarem Ausmaß von einer Genstilllegung betroffen sein. Die Bestimmung von Proanthocyanidinen und monomeren Flavan 3-olen in Erdbeeren zeigte die jeweils höchsten Konzentrationen in den frühen Reifestadien der Früchte (Jersch *et al.* 1989, Terry *et al.* 2004). Die Biosynthese dieser Verbindungen nimmt danach vermutlich stark ab. Entsprechende Untersuchungen der relativen Konzentrationen von Pelargonidin-3-glucosid, Pelargonidin-3-glucosid-malonat (Epi)-Afzelechin-Pelargonidin-3-glucosid und Kämpferol-glucosid ergaben einen starken Anstieg in der letzten Reifephase (Griesser *et al.* 2008). Folglich wurden während der letzten Reifephase neben den Pelargonidin-haltigen Verbindungen nur Kämpferol- und Quercetin-glucosid in signifikanten Mengen gebildet.

Die Veränderungen der Gehalte an Epicatechin-haltigen Proanthocyanidinen wurden vermutlich durch eine pathogeninduzierte Reaktion der Erdbeerpflanzen auf die Injektion mit Agrobakterien ausgelöst. Durch den Vergleich mit der pBI-Intron Kontrollgruppe ist jedoch eine Interpretation und Korrektur solcher methodisch bedingter *off target* Effekte bei der transienten Genstilllegung mittels Agrobakterieninfiltration möglich.

Eine weitere Möglichkeit für die Interpretation der Ergebnisse der Stilllegung der *FaCHS* wäre ein restriktiveres Signifikanzniveau von $p < 5,0 \cdot 10^{-4}$ anzuwenden. Für diese hoch signifikante Grenze zeigen sich ausschließlich Effekte die direkt der Herabregulation der *FaCHS* Aktivität zuzuordnen sind.

Die stabil transgene *FaCHS antisense* Erdbeeren (Lunkenbein *et al.* 2006b) enthielten im Gegensatz zu den mit pBI-*CHSi* transfizierten Früchten niedrigere Gehalte an Flavonoiden als die jeweiligen nativen Kontrollfrüchte. Diese Pflanzen unterscheiden sich von denen mit transient herabregulierter *FaCHS* durch eine dauerhaft verringerte Enzymaktivität. Dieses Ergebnis lässt auf eine

Biosynthese oder die Bildung entsprechender Vorläufermoleküle in früheren Stadien der Fruchtreifung schließen. Diese Feststellung deckt sich mit Untersuchungen zur Enzymaktivität in Erdbeeren, wonach die CHS in Erdbeerfrüchten ein Maximum der Aktivität in kleinen grünen Früchten zeigte, welche anschließend abnahm und erst in der letzten Reifephase nochmals anstieg (Halbwirth *et al.* 2006).

Für die Expression von mRNA und Protein der FaCHS wurde eine effektive transiente Stilllegung durch die Transfektion der reifenden Erdbeerfrüchte mit pBI-*CHSi* gezeigt. Dabei blieb die Herabregulation des Gens auf den als Erdbeerfrucht bezeichneten Blütenboden begrenzt. Vermutlich wurden alle Allele der *FaCHS* im Gewebe des Blütenbodens ebenfalls RNAi induziert herabreguliert. Jedoch waren aufgrund des relativ späten Eingriffs Auswirkungen auf die umgesetzten Metabolite nur für die in der letzten Reifephase in signifikanten Mengen gebildete Verbindungen zu erkennen. Das Auftreten von *cross-silencing* durch homologe RNA-Sequenzen wurde für die Herabregulation der *FaCHS* nicht beobachtet, sollte aber immer in die Analyse der Resultate mit einbezogen werden, da es nicht vollständig auszuschließen ist. Mögliche weitere *off-target* Effekte, hervorgerufen durch die Agrobakterieninfiltration, beispielsweise die Bildung von Phytoalexinen und Lipoxygenasen-gebildete Oxylipide (Orzaez *et al.* 2006) müssen berücksichtigt werden. Unbeeinflusst davon konnte eine Bestätigung der spezifischen Genfunktion der FaCHS *in planta* durch transiente Genstilllegung mittels Agrobakterieninfiltration gezeigt werden.

3.3 Auswirkungen des durch transiente Stilllegung der *FaCHS* veränderten Stoffwechsels am Beispiel des Lignins der Erdbeerfrüchte

Die transiente Genstilllegung über Agrobakterieninfiltration kann zu *off-target* Effekten führen (Orzaez *et al.* 2006, Zabala *et al.* 2006). Beispielsweise könnte sich durch den verschobenen Metabolitspiegel die Aktivität regulatorisch verbundener Gene ändern, oder es könnten durch die verwendeten Agrobakterien weitere Modifikationen des Stoffwechsels ausgelöst werden.

Ein außergewöhnlicher Effekt war die stark erhöhte Festigkeit der mit pBI-*CHSi* transfizierten Erdbeerfrüchte. Vermutlich wurden aufgrund der Akkumulation von Phenylpropanoiden *upstream* der *FaCHS* diese Vorläufermoleküle in den

Ligninstoffwechsel umgeleitet. Um diese These zu untersuchen wurden die Erdbeeren auf ihre Festigkeit (Kapitel 2.2.3.1), den Gehalt (Kapitel 2.2.3.2) und die Zusammensetzung des Lignins (Kapitel 2.2.3.3) analysiert.

Die mit pBI-*CHSi* transfizierten Früchte zeigten eine signifikant höhere Festigkeit, sowohl gegenüber den nativen Erdbeeren, wie auch gegenüber den mit pBI-Intron infiltrierten Kontrollen (Abbildung 23). Jedoch wiesen alle mit Agrobakterien infiltrierten Früchte entlang des Einstichkanals der Injektionsnadel eine Vernarbung auf. Die mit pBI-Intron behandelten Erdbeeren wiesen dadurch eine ebenfalls leicht erhöhte Festigkeit des Fruchtgewebes auf, die sich aber nicht signifikant von der der nativen Frucht unterschied. Die Verletzung der Frucht induzierte wahrscheinlich eine erhöhte Lignifizierung des betroffenen Gewebes. Die starken Schwankungen der Festigkeit, speziell die der mit pBI-*CHSi* transfizierten Früchte, ist auf große Unterschiede der einzelnen Erdbeeren zurückzuführen. Einerseits ist eine natürliche biologische Variabilität von Frucht zu Frucht gegeben, welche jedoch vergleichsweise klein war. Von weit größerem Einfluss war die Transfektion und die damit zusammenhängende Effizienz der Herabregulation. Dabei wurde durch den chimären Phänotyp der Genstilllegung eine breite Streuung verursacht. Die Vernarbung des Fruchtgewebes entlang des Einstichs war eine weitere nicht zu vernachlässigende Größe, die maßgeblich zur Schwankung der Werte bei den mit pBI-Intron behandelten Früchten beitrug. Auch die unterschiedliche Geometrie der Früchte war zu beachten, konnte aber wegen einer hohen Probenanzahl und aufgrund der deutlichen Unterschiede in der Festigkeit als vernachlässigbar betrachtet werden.

Die festgestellte erhöhte Festigkeit des Fruchtgewebes ließ eine deutliche Veränderung des Lignins vermuten. Die Früchte mit herabregulierter *FaCHS* enthielten signifikant mehr Lignin als die nativen und auch die mit pBI-Intron behandelten Kontrollen (Abbildung 24). Auch die mit pBI-Intron transfizierten Erdbeeren wiesen einen leicht erhöhten Ligningehalt auf, dieser ließ sich jedoch auf das vernarbte Gewebe entlang des Einstichs zurückzuführen. Dieses machte nur einen geringen Teil der gesamten Frucht aus, so dass ein Einfluss dieser Lignifizierung auf die gesamte Erdbeerfrucht zu vernachlässigen war. Im Falle der mit pBI-*CHSi* behandelten Erdbeerfrüchte korrelierten die Ergebnisse der Festigkeitsbestimmung (Abbildung 23) mit den ermittelten Ligningehalten.

Die These einer Umleitung der Phenylpropanoide durch eine Stilllegung der *FaCHS* konnte somit bestätigt werden. Die Herabregulation des Flavonoidstoffwechsels führte zu einer Akkumulation der Phenylpropanoide *upstream* der *FaCHS*, die nun in den Ligninstoffwechsel abgeleitet wurden.

Wie für Dikotyledonen zu erwarten, bestand das Lignin der Erdbeerfrüchte größtenteils aus Guajacyl- und Syringyl- und nur zu einem geringen Anteil aus p-Hydroxyphenyl-Einheiten (Abbildung 25). Im Vergleich mit den nativen Kontrollen zeigten die behandelten Erdbeerfrüchte, sowohl die mit pBI-Intron wie auch die mit pBI-*CHSi* infiltrierten, eine deutliche Verschiebung des Syringyl/Guajacyl-Verhältnisses (S/G-Verhältnis) hin zu den Syringyl-Einheiten. Die Injektion der Agrobakteriensuspension führte daher zu einer Verschiebung des Syringyl/Guajacyl-Verhältnisses der behandelten Erdbeerfrüchte hin zu einem höheren Syringyl-Anteil. Diese Reaktion war womöglich wundinduziert, aber auch die massive Präsenz von *A. tumefaciens* Zellen in den transfizierten Erdbeeren muss als Ursache in Betracht gezogen werden (Orzaez *et al.* 2006). Die stabil transgenen *FaCHS antisense* Erdbeeren zeigten trotz einer vergleichbaren Akkumulation von Phenylpropanoiden *upstream* der *FaCHS* keine merklich erhöhte Festigkeit (eigene Beobachtungen). Die Gehalte des potentiellen Ligninvorläufers p-Cumarylalkohol und dessen Metaboliten p-Cumaryl-1-acetat (Abbildung 6) waren im Vergleich zu nativen Kontrollen mit 363% beziehungsweise 1079% signifikant erhöht (Lunkenbein *et al.* 2006b). Folglich muss für die signifikant erhöhte Festigkeit des Fruchtgewebes und den höheren Ligningehalt der Früchte mit transient herabregulierter *FaCHS* neben der festgestellten Akkumulation von Intermediaten des Phenylpropanoidstoffwechsels noch eine zusätzlich Induktion der Lignifizierung erfolgt sein.

Diese Induktion könnte durch die Injektion der *A. tumefaciens* Zellen ausgelöst worden sein. Die erste Reaktion auf die Injektion der Agrobakteriensuspension war vermutlich eine allgemeine Hochregulation von Genen, die an der Phenylpropanoidbiosynthese beteiligt sind. Der Phenylpropanoidstoffwechsel (Kapitel 1.2) und ist auch Teil der pflanzlichen Pathogenabwehr (Clark *et al.* 1994; Gregersen *et al.* 1994; Shiraishi *et al.* 1995; Zeyen *et al.* 1995; Christensen *et al.* 1998; Felton *et al.* 1999). In der Bohne (*Phaseolus vulgaris* L.) konnte innerhalb von fünf Minuten eine stressinduzierte Hochregulation und Aktivitätszunahme von PAL und CHS als Reaktion auf den

Kontakt mit einem Elizitor nachgewiesen werden (Lawton und Lamb 1987; Winegate *et al.* 1988). Eine Zunahme von mRNA der CHS durch mechanische Reize und eine systemische Verbreitung der Reaktion konnte in der Weiß-Fichte (*Picea glauca*) gezeigt werden (Richard *et al.* 2000). In der Sojabohne (*Glycine max*) wurde eine pathogeninduzierte Abwehrreaktion durch Hochregulation der CHS und der Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD) demonstriert (Zabala *et al.* 2006). Eine solche vermutete Induktion von Genen des Phenylpropanoidstoffwechsels konnte mittlerweile auch bestätigt werden. Für PAL konnte kürzlich eine erhöhte Aktivität in den mit pBI-*CHSi* transfizierten Erdbeeren gezeigt werden (Preuß 2009).

Auf Metabolitebene wurde für Intermediate des Phenylpropanoidstoffwechsels eine Zunahme durch die Injektion von Agrobakterien festgestellt. Kaffeesäure- und Ferulasäure-Glucose-Ester zeigten in den Medianen eine leichte Zunahme durch die Behandlung mit pBI-Intron und eine noch stärkere durch die Transfektion mit pBI-*CHSi* (Abbildung 22). Eine vergleichbare Zunahme war auch in den stabil transgenen *FaCHS antisense* Früchten zu erkennen. Jedoch wurde in den stabil transgenen Erdbeeren für Zimtsäure und Zimtsäure-Glucose-Ester eine Abnahme durch *FaCHS*-Stilllegung festgestellt (Lunkenbein 2006d). Vermutlich ist durch die Akkumulation der Intermediate eine Rückkopplungshemmung der PAL ausgelöst worden (Blount *et al.* 2000), die dann zu einer verringerter Synthese von Zimtsäure führte. In den stabil transgenen *antisense* Pflanzen war die *FaCHS* Aktivität dauerhaft verringert. Daher kann von einer ebenso verlaufenden Hemmung der PAL Aktivität durch die Intermediate ausgegangen werden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine Hemmung des Phenylpropanoidstoffwechsels durch eine Herabregulation der PAL Aktivität induziert wurde und so die weitere Biosynthese stark verringert wird.

In den transient herabregulierten Erdbeeren fand diese Stoffwechsellimitierung aber erst nach der Stilllegung der *FaCHS* statt. Die vorher gebildeten Verbindungen standen dem Metabolismus aber zur Verfügung. Außerdem konnte entsprechend der *sink tissue* Theorie (Perkins-Veazie 1995) von einer auf die Früchte beschränkten Genstilllegung ausgegangen werden. Daher könnten, selbst im Falle einer Rückkopplungshemmung der PAL Aktivität, immer noch Vorstufen der Monolignole aus den vegetativen Teilen der Pflanze in die Früchte transportiert worden sein, da diese weiterhin synthetisiert wurden.

Im Fall der transienten Herabregulation konnten die in den mit pBI-*CHSi* transfizierten Früchten gebildeten Phenylpropanoide in die durch *A. tumefaciens* induzierte Ligninbiosynthese abfließen. Einen hemmender Effekt der Intermediate auf die PAL kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Lignifizierung in den mit pBI-Intron behandelten Erdbeeren wurde ebenfalls induziert, aber ohne eine Stilllegung der *FaCHS* standen Phenylpropanoide nur in weit geringerem Maß zur Verfügung. Deshalb fand in diesen Erdbeeren keine signifikant erhöhte Lignifizierung statt.

Ursache der verstärkten Lignifizierung war vermutlich eine erhöhte Aktivität der an der Ligninbiosynthese beteiligten CAD (Abbildung 7). Die CHS ist nicht direkt an der Ligninbiosynthese beteiligt, aber das Enzym konkurriert mit der Zimtsäure-CoA-Reduktase (CCR) um das Substrat p-Cumarsäure-CoA. Die Reaktionsabfolge CCR und CAD überführt die Phenylpropanoide in ihre entsprechenden Alkohole, die Monolignole. In Erdbeerfrüchten wurde eine an der Lignifizierung beteiligte CAD nachgewiesen (Blanco-Portales *et al.* 2002). Das entsprechende Protein ist ausschließlich in Zellen die einer Lignifizierung unterliegen, wie Xylem- und Phloem-assoziierten Sklerenchymzellen, immunodetektiert worden.

In *Glycine max* L. konnte eine erhöhte CAD Aktivität nur durch die Präsenz von Pathogenen aufrechterhalten werden, ausschließlich verletzungsinduziert nahm die CAD Aktivität nach kurzer Zeit wieder ab (Zabala *et al.* 2006). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass durch Anwesenheit der Agrobakterien eine erhöhte CAD Aktivität induziert wurde, die in Kombination mit den akkumulierten Phenylpropanoiden zu der verstärkten Lignifizierung führte. Prinzipiell hat die PAL als der entscheidende Regulator am Eingang zur Phenylpropanoidbiosynthese die Kontrolle über den gesamten Metabolitfluss. Somit zeigte eine Herabregulation der PAL Aktivität auch den größten Einfluss auf die Lignifizierung (MacKay *et al.* 1997; Whetten *et al.* 1998), während eine Herabregulation der CAD einen vergleichsweise geringen Einfluss auf den Ligningehalt in der Weihrauch-Kiefer (*Pinus taeda* L.) (MacKay *et al.* 1997) hatte. Beim Vergleich der Festigkeit unterschiedlicher Kultivare von Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) wurde aber für die festeren Sorten eine deutlich erhöhte CAD Expression festgestellt (Salentijn *et al.* 2003; Carbone *et al.* 2006), während in den weicheren Sorten die Expression der CCR deutlich stärker war. Die Substratspezifität der CCR beziehungsweise der CAD bestimmt

möglicherweise die Zusammensetzung des Lignins. Die verringerte CAD Aktivität in Erdbeeren der weicheren Kultivare könnte durch eine veränderte Zusammensetzung und Struktur zu einem enzymatisch leichter abbaubaren Lignin geführt haben (Salentijn *et al.* 2003). Untersuchungen zur Expression von CCR und CAD konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr angefertigt werden.

Die festgestellte Veränderung des S/G Verhältnisses des Lignins in den mit Agrobakterien infiltrierten Erdbeeren deckt sich mit Beobachtungen einer veränderten Lignifizierung in Tomaten (*Lycopersicon esculentum*) (Millar *et al.* 2007). Durch eine Überexpression von C4H in Tomaten konnte ebenfalls eine Verschiebung des S/G Verhältnisses der Ligninzusammensetzung in Richtung Syringyl-Einheiten bei allen transgenen Linien beobachtet werden. Die C4H befindet sich in der Biosynthese zwei Reaktionen *upstream* der CHS. Die transgenen Tomatenpflanzen entwickelten vier unterschiedliche Phänotypen, die sowohl erhöhte, wie auch verringerte Gehalte an Flavonoiden, phenolischen Verbindungen und Carotenoiden zeigten. In fast allen Linien war außerdem das Gesamtlignin bezogen auf die nativen Pflanzen verringert. Ursache war vermutlich ein lokaler *Co-Suppressions* Effekt durch die Überexpression der C4H in den Bereichen mit natürlicher hoher Expression der C4H, wie z.B. dem Stammgewebe der Tomaten. Daraus abgeleitet wurde die These einer Limitierung von Intermediaten innerhalb des Stoffwechsels, nach der diese am Ende des jeweiligen Reaktionsflusses am stärksten akkumulieren (Millar *et al.* 2007).

Im vorliegenden Fall der RNAi Erdbeerfrüchte führte die Stilllegung des *FaCHS*-Gens jedoch zu einer Anreicherung von Lignin, aber ebenfalls zu einer Verschiebung des S/G-Verhältnisses hin zu den Syringyl-Einheiten. Manipulationen des Phenylpropanoid-Stoffwechsels, die zu verringerten Lignin-Gehalten geführt hatten zeigten mit wenigen Ausnahmen jedoch immer höhere Anteile an Guajacyl-Einheiten (Kajita *et al.* 1996, Sewalt *et al.* 1997, Blee *et al.* 2001, Abdulrazzak *et al.* 2006). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die mit Agrobakterien infiltrierten Erdbeeren eine starke Akkumulation von Kaffeesäure-glucose-Ester und eine noch deutlichere Steigerung des methylierten Derivats Ferulasäure-glucose-Ester zeigten (Abbildung 22). Auch für die stabil transgenen *FaCHS antisense* Früchte konnte eine Steigerung der relativen Zunahmen der akkumulierten Phenylpropanoide

zum Ende der Biosynthesekette hin festgestellt werden (Lunkenbein *et al.* 2006b).

Eine stabil transgene Stilllegung der CHS in *Glycine max* L. führte ebenfalls zu einer Akkumulation der löslichen phenolischen Säuren (Lozovaya *et al.* 2007). Im Gegensatz zu den vorangehend zitierten Arbeiten und auch den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde aber ein verstärkter Einbau der nicht methylierten Monolignole in die Zellwandstruktur festgestellt. Im Vergleich mit der Methode der transienten Stilllegung der FaCHS durch Agrobakterieninfiltration fehlte dabei der Induktionsreiz für eine erhöhte Lignifizierung. Zudem unterschied sich das untersuchte Wurzelgewebe stark von dem in der vorliegenden Arbeit analysierten Gewebe der Erdbeerfrüchte.

Zusammenfassend kann von einer Verschiebung des Stoffwechsels, sowohl durch die Stilllegung der *FaCHS*, wie auch durch die injizierten Agrobakterien ausgegangen werden. Beides löst Veränderungen und Limitierungen innerhalb der Biosynthese aus. Eine daraus resultierende Fluß-determinierte Steigerung der Akkumulation der Metabolite zum Ende der Biosynthesekette, bei gleichbleibenden Pools der Intermediate führt vermutlich im Falle des Lignins zur Zunahme der höher methylierten Monolignole, der Syringyleinheiten. Weitergehende Untersuchungen des Lignins der *FaCHS antisense* Früchte wären interessant.

Der erhöhte Ligningehalt der mit pBI-*CHSi* infiltrierten Erdbeeren war auf die Umleitung von Intermediaten des Phenylpropanoidstoffwechsels in die Ligninbiosynthese zurückzuführen. Diese wurde durch eine, im Rahmen der pflanzlichen Pathogenabwehr, zusätzlich induzierte Lignifizierung als Reaktion auf die Injektion der Agrobaktériensuspension verstärkt. Für die festgestellte Zunahme der Festigkeit der Erdbeerfrüchte hatte die erhöhte Einbaurrate der Syringyl-Einheiten, die eventuell auch eine veränderte Verknüpfung aufgrund der Methylgruppen der Monolignole bedingt, vermutlich keine Bedeutung, da auch die mit dem pBI-Intron Konstrukt behandelten Früchte diese Veränderung aufwiesen und nur geringfügig fester waren. Einzig der signifikant höhere Gesamtligningehalt bestimmte den festeren Phänotyp der mit pBI-*CHSi* transfizierten Erdbeerfrüchte. Leider konnte die Expression von PAL und CAD in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Auch eine Beeinflussung weiterer Gene des Phenylpropanoidstoffwechsels kann insbesondere unter

Berücksichtigung einer möglichen Stressinduktion oder Pathogenantwort nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse bestätigen eine spezifische und effiziente Herabregulation der *FaCHS* durch Agrobakterieninfiltration *in planta*. Diese war ursächlich für die Umleitung der Phenylpropanoide aus der Flavonoid- in die Ligninbiosynthese. Auch unter Berücksichtigung eventueller *off-target* Effekte wurde die Genfunktion spezifisch herabreguliert. Geringe Auswirkungen auf die Lignifizierung durch die Agrobakterien waren in den mit pBI-Intron behandelten Kontrollen zwar zu erkennen, diese konnten jedoch vernachlässigt werden. Bei Verwendung solcher Kontrollen ist die Methode als geeignet für die Funktionsanalyse von unbekanntem Genen anzusehen. Es wäre interessant, den verschobenen Stoffwechsel genauer zu charakterisieren. Da aber in Erdbeeren, speziell in *Fragaria x ananassa*, keine ausreichenden EST Datenbanken zur Verfügung standen, war eine entsprechende Suche nach Genen, die in der Ligninbiosynthese herauf- oder herabreguliert sind, noch nicht möglich.

3.4 Einfluss der Nukleotidsequenz auf die RNA Interferenz und transitive Genstilllegung

Um mögliche Unterschiede hinsichtlich einer RNAi-vermittelten Genstilllegung durch die in den ihp-Konstrukten eingesetzten Nukleotidsequenzen zu ermitteln, wurden unterschiedliche Abschnitte zweier Zielgene getestet. Der RNAi-induzierte Abbau des korrespondierenden Transkripts könnte durch den Einfluss der verwendeten Zielstruktur, wie auch durch ein unterschiedliches Stilllegungspotential der aus den dsRNAs hervorgehenden siRNAs beeinflusst werden (Overhoff *et al.* 2005, Schubert *et al.* 2005).

In COS-7 Zellen (*African green monkey kidney fibroblasts*) wurde durch Cotransfektion einer 21 nt langen siRNA und eines konstitutiv exprimierten *green fluorescent protein* (GFP) mit der vorangesetzten Zielstruktur *rat vanilloid receptor subtype 1* eine Stilllegung des GFP ausgelöst. Der komplementäre Sequenzabschnitt zu der 21 bp siRNA VsiRNA1 wurde experimentell so verändert, dass jeweils eine unterschiedliche Anzahl ungepaarter Nukleotide vorlag. Je höher der Anteil der ungepaarten Nukleotide, desto stärker war die Herabregulation des Kontrollkonstrukts. Ergänzend besteht die Möglichkeit der *in silico* Vorhersage solcher ungepaarter Strukturen (Overhoff *et al.* 2005). Die

Analyse der Faltungen der mRNA wurde mit dem Programm mfold (Mathews *et al.* 1999, Zuker 2003) durchgeführt (Kapitel 2.3). Als zugänglich wurden in dem Modell Segmente von ungepaarten Nukleotiden ≥ 10 nt (Overhoff *et al.* 2005) gewertet. Die Anzahl der Segmente mit mehr als 10 ungepaarten Nukleotiden wurde zur Berechnung der relativen Zugänglichkeit F verwendet (1) und für die jeweiligen getesteten Sequenzabschnitte ermittelt. Im Vergleich mit dem sogenannten *RNaseH mapping* erwies sich die *in silico* Ermittlung als eher konservativ (Overhoff *et al.* 2005). Eine gute Korrelation der *in silico* Ergebnisse mit dem mfold Modell konnte auch durch *RNA solution Structure Mapping* einer viralen RNA des *Tomato bushy blunt virus* bestätigt werden (Fabian und White 2008).

Eine Korrelation von berechneter relativer Zugänglichkeit F der Transkripte und beobachteter Effizienz der Genstilllegung durch die vorgestellte RNAi Methode wurde nicht festgestellt. Eine mögliche Erklärung könnte eine transitive Genstilllegung liefern, die zur Amplifikation der siRNAs führt. In Pflanzen ist die Aktivität der RdRP, welche ausgehend von der initialen Zielsequenz der dsRNA die *de novo* Synthese von siRNAs entlang der Transkripte katalysiert, für die transitive Fortpflanzung der Genstilllegung verantwortlich. Aus der Bildung dieser sekundären siRNAs resultiert eine breitere Abdeckung der Zielsequenz und homologer Sequenzen durch neue siRNAs, welche über die ursprüngliche Zielregion hinaus reicht. Eine zentrale Frage war, ob ein solcher transitiver Effekt bei der verwendeten transienten Methode des *silencing* eintreten kann, und wenn ja, wie weit sich das Signal fortpflanzt. Die Literaturrecherche zeigt, dass eine mögliche Ausbreitung des transitiven Signals sowohl in 5'- wie in 3'-Richtung erfolgen kann, durch primerabhängige und -unabhängige RdRP Aktivität (Vaistij *et al.* 2002, Klahre *et al.* 2002; Brodersen und Voinnet 2006). Vorzugsweise findet die transitive Signalausbreitung vom 5'- in Richtung 3'-Ende statt (Shimamura *et al.* 2006). VIGS in *N. benthamiana* zeigte ein transitives Ausbreiten des Stilllegungssignals (Braunstein *et al.* 2002). Ausgehend von 3'-Abschnitt eines GUS-Gens führte der transitive Effekt zu einer Ausbreitung des Signals vom 5'- zum 3'-Ende durch RdRP katalysierte *unprimed* (ohne Primer) Synthese entlang des dsRNA Strangs. Dabei traten vermehrt siRNAs auf, deren Sequenzen dem 3'-Ende des GUS Transkripts komplementär waren. Allerdings wurde für die Herabregulation des GUS-Gens nach drei Wochen in allen untersuchten Abschnitten, sowohl 5'-Ende, Mittelteil

als auch 3'-Ende, überall ein gleich starker Effekt nachgewiesen. Eine Bestätigung dieser *unprimed* Synthese und der transitiven Ausbreitung vom 5'- zum 3'-Ende konnte durch die Herabregulation von GUS in transgenen *N. benthamiana* geführt werden (Petersen und Albrechtsen 2005). Eine vollständige transitive Genstilllegung würde vermutlich keine Unterschiede aufgrund der in den ihp-Konstrukten eingesetzten Nukleotidsequenzen erkennen lassen.

Untersuchungen zur transitiven Genstilllegung durch ein Fusionskonstrukt aus endogenem Gen und GUS in transgenen *Arabidopsis thaliana* ergaben eine optimale Länge der Zielsequenz von 500 bp und eine Zeitdauer von vier bis acht Wochen zur effektiven Herabregulation eines endogenen Katalase-Gens (Bleys *et al.* 2006). Nach acht Wochen war die Enzymaktivität durch ein 98 bp Fragment und ein 250 bp Fragment desselben Gens, um 0% bzw. 35% herabreguliert. Die Effizienz der Herabregulation hängt vermutlich von der Zeitdauer der Amplifikation der siRNAs ab, da deren Akkumulation einen unteren Schwellenwert überschreiten muss, um eine messbare Stilllegung hervorzurufen. Die Länge der homologen Sequenz bestimmte dabei die Menge der generierten siRNAs. Ebenfalls in stabil transgenen *A. thaliana* wurde gezeigt, dass der Effekt der transitiven Genstilllegung zwar vorhanden, aber vier mal schwächer als der der direkten Verwendung von komplementären IR-Strukturen war (Filichkin *et al.* 2007). Die Autoren schlagen daher die Methode der transitiven Genstilllegung für die Untersuchung von Genen vor, bei denen 100%ige *loss-of-function* Mutanten lethal wären.

Untersuchungen zur Effizienz einer Genstilllegung in transgenen *N. benthamiana* mittels biolistischer Transfektion mit komplementärer RNA ergaben, dass die wirkungsvollsten Konstrukte jeweils die vollständige dsRNA von GUS (75% der Pflanzen herabreguliert) und GFP (38% der Pflanzen herabreguliert) bildeten (Klahre *et al.* 2002). Die Verwendung von spezifischen siRNAs erreichte ein Niveau von 50% herabregulierten Pflanzen für GUS und 38% im Fall des GFP. Kürzere dsRNA Abschnitte zeigten für beide untersuchten Gene geringere Effizienz (4 bis 22% Genstilllegung). In dieser Untersuchung wurden aber Reporterkonstrukte, GUS bzw. GFP, jedoch kein endogenes Gen verwendet. Ein weiterer wichtiger Punkt waren die Unterschiede hinsichtlich des Schwellenwertes zur Induktion einer Stilllegung

bei verschiedenen Genen. Sie waren vermutlich von der jeweiligen Transkriptionsrate abhängig (Bleys *et al.* 2006).

3.4.1 Herabregulation der *FaOMT* durch unterschiedliche Abschnitte der Nukleotidsequenz

Um das Potential der Methode der transienten Genstilllegung durch Agrobakterieninfiltration zu zeigen, wurde für diese Untersuchung ein Gen eingesetzt, welches im Fall einer Herabregulation keinen sichtbaren Phänotyp zeigte. Das verwendete Gen war eine O-Methyltransferase aus *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta (*FaOMT*) aus der mRNA reifer Erdbeerfrüchte (Wein *et al.* 2002).

Die Nukleotidsequenz der *FaOMT* ist in unterschiedlichen Erdbeerkultivaren hoch konserviert. Eine identische Sequenz konnte sowohl in *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta und *F. x ananassa* cv. Calypso (Wein *et al.* (2002), als auch in *F. x ananassa* cv. Brighton (Manning 1998) und in *F. x ananassa* cv. Mara des Bois nachgewiesen werden (eigene Ergebnisse, nicht dargestellt). Die Methylierung von HDMF und Kaffeesäure durch die *FaOMT* konnte *in planta* durch eine stabil transgene Herabregulation bestätigt werden (Lunkenbein *et al.* 2006c).

Die Herabregulation der *FaOMT* erfolgte durch unterschiedliche Abschnitte der Nukleotidsequenz, die als ihp-Konstrukte über Agrobakterieninfiltration transfiziert wurden. Dazu wurde der vollständige Leserahmen der *FaOMT* in fünf überlappende Abschnitte A bis E mit einer Länge von 219 bp und 240 bp eingeteilt (Kapitel 2.3.1). Der quantitative PCR Nachweis der Expression der *FaOMT* wurde mit dem Primerpaar OMT-for und OMT-rev durchgeführt, welches ein Produkt aus den Abschnitten A und B amplifizierte (Kapitel 2.3.1). Eine Stilllegung der *FaOMT* Expression war mit allen verwendeten Nukleotidsequenzen über die Volllänge des Gens erfolgreich (Abbildung 30). Trotz der starken Messwertstreuung liegen die Mediane sehr ähnlich, so dass keine Unterschiede hinsichtlich der Expression der herabregulierten *FaOMT* zwischen den einzelnen Abschnitten zu erkennen sind. Obwohl die relative Zugänglichkeit große Unterschiede aufweist (Abbildung 29) zeigten auch die Abschnitte OMT D (0,48) und OMT E (1,90) in etwa die gleiche relative Expression (Abbildung 30). Somit besteht kein Zusammenhang zwischen einer unterschiedlichen Effizienz der Herabregulation und den *in silico* ermittelten

relativen Zugänglichkeiten dieser Abschnitte der *FaOMT*. Auch ein möglicher Einfluss auf die Genstilllegung durch Unterschiede der exprimierten dsRNAs wird dadurch ausgeschlossen. Unter der Annahme eines nur teilweisen Abbaus der mRNA des Zielgens durch die RNAi im jeweils korrespondierenden Sequenzabschnitt hätte der PCR Nachweis unterschiedliche Expressionen für die verschiedenen Abschnitte ergeben müssen. Eine mögliche Erklärung ist eine transitive Fortpflanzung des *silencing* Signals über das Transkript, sowohl in 5'- wie auch in 3'-Richtung. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass für alle verwendeten Abschnitte der *FaOMT* eine vergleichbare Herabregulation erreicht wurde. Jedes Teilstück der Nukleotidsequenz, unabhängig von seiner Position im Leserahmen, erzielt dabei eine ähnlich effiziente Genstilllegung. Die Mediane der relativen Genexpressionen der *FaOMT* liegen trotz größerer Schwankungen auf einem gemeinsamen Niveau.

Andererseits könnte auch die Einschleußung der teilprozessierten mRNAs des Zielgens in den Abbauprozess durch die regulären Transkriptionsmechanismen dieses Ergebnis erklären. Unter der Annahme eines teilweisen Abbaus der mRNAs an den jeweils komplementären Abschnitten durch die RNAi könnten diese unvollständigen mRNAs als aberrante Transkripte erkannt werden und dem endgültigen Abbau durch Exonukleasen der normalen Transkriptregulation wie XRN4 (Brodersen und Voinnet 2006) zugeführt werden. Der Effekt wäre eine vollständige Eliminierung auf Transkriptebene, obwohl keine transitive Signalfortpflanzung über die gesamte Transkriptlänge stattgefunden hat.

Mit beiden Thesen lässt sich das Ergebnis der annähernd gleichen relativen Expression erklären. Entscheidend für den Nachweis einer transitiven Signalfortpflanzung wäre der Nachweis von sekundären siRNAs der Zielgene aus anderen als den zur Induktion der Genstilllegung eingesetzten Abschnitten (Braunstein *et al.* 2002; Petersen und Albrechtsen 2005; Bleys *et al.* 2006). Diese definitive Bestätigung eines transienten Effekts war im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht mehr möglich.

Die in den *ihp*-Konstrukten eingesetzten komplementären Transkripte mit Längen von 219 bp und 240 bp erzielten alle eine relativ starke Herabregulation der *FaOMT*. In einem ersten Experiment erzeugte die Expression eines 582 bp langen Teilstücks der *FaOMT* (Nukleotide 407 bis 988), jedoch nicht die erwünschte Genstilllegungseffizienz (vorangehende eigene Untersuchungen, Ergebnisse nicht dargestellt). Daher wurden für die weiteren Konstrukte kürzere

Abschnitte der einzelnen Gene eingesetzt. Diese sollten bei gleichem Umsatz aufgrund der kürzeren ihp-Kassetten höhere Transkriptionsraten aufweisen. Die daraus resultierende höhere Anzahl an synthetisierten siRNAs würde die Induktion der RNAi verstärken. Vermutlich ist die Effizienz der kürzeren Zielsequenzen im Vergleich zu der Verwendung von 582 bp der *FaOMT* aus diesem Grund höher. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Beobachtung einer transienten Genstilllegung in transgenen *N. benthamiana*, wobei die stärkste Herabregulation für die dsRNA der Volllänge beobachtet wurde (Klahre *et al.* 2002). Allerdings verwendeten die Autoren eine biolistische Methode um die RNAs direkt in die Pflanzen einzubringen. Die transiente Methode durch Agrobakterieninfiltration beruht aber auf der Synthese von dsRNAs innerhalb der Zellen und ist daher auch von der Transkriptionsgeschwindigkeit der verwendeten ihp-Kassette abhängig.

Bei näherer Betrachtung zeigte sich eine mögliche transitive Genstilllegung sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung entlang des mRNA Transkripts. Der Nachweis der quantitativen PCR erfolgte durch ein Amplifikat aus den Abschnitten OMT A und OMT B. Daher kann für die Abschnitte C bis E ein transitives Fortpflanzen des Signals durch eine primerabhängige Synthese der dsRNA vom 3'- in Richtung 5'-Ende des Transkripts vermutet werden. Untersuchungen zum Verlauf der transitiven Stilllegung durch eine solche primerabhängige Synthese von siRNAs ergaben eine transitive Ausbreitung des Stilllegungssignals über mindestens 1 kb (Petersen und Albrechtsen 2005). Für den umgekehrten Fall der primerunabhängigen Ausbreitung in 5'-Richtung wurde eine maximale Distanz weniger als 600bp ermittelt (Petersen und Albrechtsen 2005), beziehungsweise bei einer längerfristigen Inkubation auch eine weitere Ausbreitung vermutet (Bleys *et al.* 2006). Die Distanz vom letzten Abschnitt OMT E (ab Nukleotid 880) bis zum Primer OMT-rev (letztes Nukleotid 274) betrug etwa 600 bp. Die postulierten Voraussetzungen für eine mögliche transitive Genstilllegung sind also erfüllt.

Ein Argument gegen eine transitive Genstilllegung ist die relativ kurze Zeitdauer von der Injektion bis zur Ernte der Früchte. Für signifikante Effekte wurden zwischen elf Tagen und einem Monat angegeben (Braunstein *et al.* 2002; Klahre *et al.* 2002; Bleys *et al.* 2006). Für VIGS in *N. benthamiana* konnten sekundäre siRNAs und eine messbare Herabregulation der GUS Aktivität nach etwa 2 bis 4 Wochen nachgewiesen werden (Braunstein *et al.* 2002). Diese

Größenordnung entspricht in etwa der Zeit, die für die Methode der transienten Genstilllegung durch Agrobakterieninfiltration benötigt wurde. Von der Injektion der Agrobaktériensuspension bis zur Ernte der Erdbeerfrucht vergingen zwischen einer und drei Wochen. Jedoch konnte teilweise schon nach minimal acht Tagen eine deutliche Herabregulation der relativen *FAOMT* Expression auf Transkriptebene festgestellt werden. Insgesamt könnte die zur Reife der Früchte benötigte Zeit gerade schon ausreichen um eine transitive Ausbreitung der RNAi zu ermöglichen.

Zu den Metaboliten, die von *FaOMT* umgesetzt werden (Kapitel 2.3.1.2), gehören HDMF und Kaffeesäure (Lunkenbein *et al.* 2006c). Mit abnehmender Methylierung strebt das HDMF/(HDMF+DMMF) Verhältnis gegen eins. Die mit pBI-Intron transfizierten Erdbeeren unterschieden sich bezüglich dieses Verhältnisses nicht von den nativen Früchten (Abbildung 31). Die Auswertung ergab jedoch eine deutliche Herabregulation der Methylierung von HDMF durch alle für die RNAi verwendeten Abschnitte der *FaOMT*. Aufgrund der chimären Ausprägung der RNAi ergibt die Herabregulation der *FaOMT* Genaktivität stark variierende Ergebnisse für die einzelnen Früchte. Unter Berücksichtigung der Mediane ist für alle Abschnitte der mRNA eine vergleichbare Verringerung des DMMF Gehaltes zu erkennen. Interessant ist das Potential der hier verwendeten transienten Genstilllegungsmethode. Einzelne Erdbeeren wiesen HDMF/(HDMF+DMMF) Verhältnisse von 0,98 auf. DMMF wurde fast nicht gebildet. Diese Werte entsprachen denen der stabil transgenen *FaOMT antisense* Erdbeeren (Lunkenbein *et al.* 2006c). Insgesamt korrespondiert dieses Ergebnis in seiner Qualität mit der Expression der mRNA der *FaOMT* (Kapitel 2.3.1.1).

In Bezug auf die Genexpression der Abschnitte OMT A bis OMT E wurde das Ergebnis in dieser Form auch erwartet, da die Konzentration der Furanone, in freier wie in glucosylierter Form, mit der Reifung stark ansteigt. DMMF konnte in signifikanten Mengen erst ab der späten weißen Reifungsphase nachgewiesen werden (Perez *et al.* 1996). In den stabil transgenen *FaOMT antisense* Erdbeeren war DMMF fast nicht nachweisbar (Lunkenbein *et al.* 2006c). Der Vergleich mit den transient herabregulierten Früchten zeigt, dass aufgrund der chimären Ausprägung der Genstilllegung in Verbindung mit dem gewählten Ansatz einer homogenen Probe jeder einzelnen Frucht, eine Restaktivität der *FaOMT* vermutet werden muss.

Die zweite von der FaOMT katalysierte Reaktion ist die Umsetzung von Kaffee- zu Ferulasäure. Beide Verbindungen wurden über ihre korrespondierenden Glucose-Ester quantifiziert (Lunkenbein *et al.* 2006c) und sind als Verhältnis von Kaffeesäure- zu Kaffeesäure- und Ferulasäure-glucose-Ester dargestellt (Abbildung 32). Die Behandlung mit pBI-Intron führte vermutlich zu einer erhöhten Biosynthese von Phenylpropanoiden (Kapitel 2.2.2). Für Ferulasäure-glucose-Ester war in diesem Fall eine stärkere relative Zunahme als für Kaffeesäure-glucose-Ester zu beobachten. Aus dieser höheren Steigerung resultierte die beobachtete signifikante Abnahme des Medians für das ermittelte Metabolitverhältnis von Kaffeesäure- und Ferulasäure-glucose-Ester bei der Behandlung mit pBI-Intron (Tabelle 8). Für Behandlung mit ihp-OMT-Konstrukten kann von einer vergleichbaren Induktion des Phenylpropanoidstoffwechsels ausgegangen werden. Durch die Herabregulation der FaOMT Aktivität wurde jedoch die Bildung von Ferulasäure verringert, wodurch das dargestellte Verhältnis wieder auf das Niveau nativer unbehandelter Erdbeerfrüchte steigt. Aufgrund der starken Schwankungen sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich dieser Ester zwischen den mit ihp-OMT-Konstrukten transfizierten Früchten erkennbar.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Metabolituntersuchungen in den stabil transgenen *antisense FaOMT* Erdbeeren (Lunkenbein *et al.* 2006c) kann dieses Ergebnis auch durch eine geringer ausgeprägte Herabregulation der FaOMT Aktivität erklärt werden. Insgesamt war der Effekt auf die Methylierung von Kaffeesäure auch in den stabil transgenen Erdbeerfrüchten geringer als für die Furanone. Ein vollständiges Verschieben des Verhältnisses hin zu Kaffeesäure war nicht möglich. Begründet wurde dieses Ergebnis mit einer bevorzugten Umsetzung von Kaffeesäure, und nicht HDMF, als Substrat der FaOMT (Lunkenbein *et al.* 2006c). Eine Reduktion der Enzymaktivität wird sich folglich zuerst beim HDMF/DMMF Verhältnis bemerkbar machen. Vermutlich bestand durch den chimären Phänotyp der transient behandelten Früchte eine unvollständige Herabregulation der Genexpression und Proteinaktivität. In Folge dessen setzte die vorhandene geringe Menge an FaOMT Enzym bevorzugt Kaffeesäure als Substrat um. Somit wird der Effekt einer verringerten FaOMT Aktivität für diese Reaktion maskiert.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Expression einer weiteren OMT in der Erdbeerfrucht mit der Fähigkeit Kaffeesäure zu methylieren, die sich auf

Nukleotidebene stark von der *FaOMT* unterscheidet. Möglicherweise sind in der Pflanze auch mehrere Isoenzyme an der Umsetzung der Phenylpropanoide in jeweils unterschiedlichen Kompartimenten beteiligt. So wird beispielsweise in *H. vulgare* die Existenz weiterer ortho-diphenol-OMTs, speziell für die Ligninbiosynthese, vermutet (Gregersen *et al.* 1994). Es ist bekannt, dass die unterschiedlichen OMTs des Phenylpropanoidstoffwechsels zum Teil eine hohe Regiospezifität aufweisen (Dixon 1999).

Zu der nicht signifikant herabregulierten *FaOMT*-Aktivität bei der Umsetzung von Kaffeesäure kann auch ein Zusammenspiel der oben angeführten Gründe geführt haben.

Wie erwartet, konnten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten sichtbaren Auswirkungen der transienten Stilllegung der *FaOMT* auf den Phänotyp der Erdbeerfrüchte ermittelt werden. Es wurden keine Unterschiede in der Effizienz der Herabregulation zwischen den verwendeten Zielstrukturen festgestellt. Ein transitiver Effekt der RNAi-induzierten Genstilllegung ist daher nicht auszuschliessen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit der vorgestellten Methode, wie vorangehend mit der *FaCHS* demonstriert (Kapitel 3.2), eine effektive und spezifische Herabregulation der *FaOMT*-Genfunktion *in planta* möglich ist.

3.4.2 Herabregulation der *FaCHS* durch unterschiedliche Abschnitte der Nukleotidsequenz

Die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der RNAi durch die unterschiedliche Nukleotidsequenz verschiedener Abschnitte des Zielgens erfolgte auch an dem bereits erfolgreich herabregulierten Gen *FaCHS* (Kapitel 3.2). In einer parallel geführten Untersuchung zur Expression der reifekorrelierten *FaCHS* wurden mehrere Allele dieses Gens mit wenigen Nukleotidunterschieden amplifiziert. Die vollständige Anzahl der *FaCHS* Allele in der *F. x ananassa* konnte jedoch nicht beziffert werden (Dangel 2007). Ein Volllängeklon (PP4 C5) und ein entsprechendes Amplifikat der cDNA für den Abschnitt CHS A wurden für die Tests eingesetzt (Kapitel 2.3.2).

Die Herabregulation der *FaCHS* erfolgte durch fünf überlappende Abschnitte A bis E mit einer Länge von 240 bp und 293 bp (Abbildung 33). Alle verwendeten Abschnitte des Zielgens führten zu einem hellen Phänotyp, der bei herabregulierter *FaCHS* Aktivität sichtbar wird (Kapitel 2.3.2.1). Der quantitative

PCR Nachweis der Expression der *FaCHS* wurde mit dem Primerpaar CHS-for und CHS-rev durchgeführt, welches ein Produkt von 245 bp aus den Abschnitten B und C amplifizierte (Kapitel 2.3.2.2). Die Genexpression der *FaCHS* konnte mit allen verwendeten Nukleotidsequenzen des Zielgens herabreguliert werden (Abbildung 35). Die Mediane der ermittelten Expressionen zeigten keinen Unterschied für die Behandlung mit verschiedenen Abschnitten des Zielgens. Folglich konnte mit jeder verwendeten Nukleotidsequenz des Transkripts eine vergleichbar effiziente Genstilllegung der *FaCHS* induziert werden. Ein Einfluss auf die RNAi durch Unterschiede der exprimierten dsRNAs ergibt sich somit nicht. Entsprechend den Ergebnissen für die *FaOMT* (Kapitel 3.4.1) bestand auch hier kein Zusammenhang zwischen der Effizienz der Herabregulation und den *in silico* ermittelten relativen Zugänglichkeiten der einzelnen Zielstrukturen.

Aufgrund der Eigenschaft des RNAi Mechanismus, homologe Transkripte durch korrespondierende siRNAs anzugreifen, wird eine Herabregulation aller exprimierten *FaCHS* Allele angenommen. Diese Feststellung könnte mit einem transitiven Effekt des Genstilllegungssignals zusammenhängen. Eine solche Signalfortpflanzung kann sowohl in 5'- wie auch in 3'-Richtung vermutet werden, da die amplifizierte Region in den Abschnitten CHS B und CHS C liegt. Bei der Analyse der relativen Expression der *FaCHS* ergaben sich keine Unterschiede, auch für Abschnitte wie CHS B mit einer extrem geringen relativen Zugänglichkeit von 0.05 (Abbildung 33). Dieses Ergebnis könnte ein Indiz für einen transitiven Effekt bei der RNAi-induzierten Herabregulation von Genen in Erdbeerfrüchten sein. Für eine so geringe relative Zugänglichkeit wäre eine viel schlechtere Effizienz zu erwarten.

Die zweite Möglichkeit wäre der im vorangehenden Kapitel 3.4.1 ausgeführte endgültige Abbau der teilprozessierten mRNAs durch Exonukleasen der normalen Transkriptregulation wie XRN4 (Brodersen und Voinnet 2006). Analog zu der Untersuchung der *FaOMT* wurden aber nur PCR-Produkte analysiert. Die endgültige Klärung, ob eine transitive Stilllegung stattgefunden hat, müsste in weiteren Untersuchungen durch den Nachweis sekundärer siRNAs des *FaCHS* Transkripts erfolgen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass vermutlich dieselben Gründe zur Stilllegung der *FaCHS* geführt haben, wie im Fall der *FaOMT* (Kapitel 3.4.1). Auch in dieser Untersuchung ist ein transitiver Effekt der

RNAi-induzierten Genstilllegung nicht auszuschliessen, müsste aber noch endgültig bestätigt werden. Mit allen Abschnitten der eingesetzten Nukleotidsequenz konnte eine Herabregulation der *FaCHS* induziert werden.

3.5 Ausblick

Die transiente Herabregulation durch RNAi-induzierte Genstilllegung konnte in dieser Arbeit an zwei reifekorrelierten Genen des Sekundärstoffwechsels in Erdbeerfrüchten (*Fragaria x ananassa*) demonstriert werden. Das Potential der Methode zeigte sich bei der erfolgreichen Herabregulation der *FaOMT* (Kapitel 3.4.1), wobei die resultierenden Früchte keinen sichtbaren Phänotyp lieferten.

Die Effizienz der Herabregulation in Erdbeeren scheint die in Tomaten (*Solanum lycopersicum*) sogar zu übertreffen. Besonders unter dem Gesichtspunkt einer uniformen Transformation ist der Anteil an herabreguliertem Gewebe in den Erdbeerfrüchten höher als in den untersuchten Tomatenfrüchten (Orzaez *et al.* 2006).

Die Erdbeere könnte ein gutes Modell für fleischige Früchte darstellen. Bei der Verwendung von Frigopflanzen unter kontrollierten Bedingungen trägt die Erdbeere mit geringem Aufwand fast rund um das Jahr Früchte und zeichnet sich durch eine gute Kultivierbarkeit aus. Die Regenerationszeit transgener Pflanzen fällt für die transiente Herabregulation weg, im optimalen Fall ist eine Zeitdauer von etwa drei Monaten vom Beginn der Arbeiten bis zu den ersten Ergebnissen anzusetzen. Allgemein ist die Kulturerdbeere *Fragaria x ananassa* schon aufgrund der botanischen Verwandtschaft innerhalb der Familie der *Rosaceae* als geeignetes Modell für die Untersuchung von Genen der Fruchtreifung anzusehen. Eine mögliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse ergibt sich mit anderen wirtschaftlich bedeutenden Vertretern der *Rosaceae* wie Apfel (*Malus*), Birne (*Pyrus*), Süß- oder Sauerkirsche (*Prunus avium* bzw. *P. serasus*), Pflaume (*P. domestica*), Pfirsich (*P. persica*), Aprikose (*P. armeniaca*), Himbeere (*Rubus idaeus*) oder Brombeere (*R. fruticosus*), deren Generationszeiten jedoch wesentlich länger dauern.

Darüber hinaus ist die räumlich begrenzte Herabregulation von Genen innerhalb des Fruchtbodens möglich. Diese Besonderheit ist vor allem für die Untersuchung von Genen wichtig, deren totale Herabregulation in transgenen Pflanzen die Entwicklung verändern kann oder für die ein vollständiger Funktionsverlust letal ist. Beispielsweise zeigten die stabil herabregulierten

FaOMT Erdbeerpflanzen einen verringerten Wuchs (Lunkenbein *et al.* 2006c). Auch für die *FaCHS* wird eine essentielle Rolle in der pflanzlichen Entwicklung vermutet.

Verschiedene Autoren schlagen aufgrund der Bedeutung der CHS weitere Studien mit induzierbaren Promotoren der RNAi-Konstrukte vor, um so die gezielte Herabregulation der CHS in einer bestimmten Wachstumsphase zu untersuchen (Schijlen *et al.* 2007). Diese Möglichkeit könnte um den Einsatz der schnelleren transienten RNAi ergänzt werden. Beispielsweise könnte eine Veränderung der Resistenzen von Pflanzen durch *genetical engineering* der CHS unter Berücksichtigung ihrer essentiellen Rolle in der Pollenfertilität und Bildung der Samenanlage (Martin 1993; Christensen *et al.* 1998; Schijlen *et al.* 2007) so näher untersucht werden. Eine allgemeine Hochregulation der Phenylpropanoidbiosynthese durch Hochregulation der L-Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) bringt zwar eine erhöhte Resistenz gegen mikrobiellen Befall, aber eine Verringerung der Resistenz gegen pflanzenfressenden Insektenbefall. Dies zeigt den wichtigen Punkt des *cross-talks* bei der genetischen Manipulation des Stoffwechsels auf (Dixon 1999).

Insgesamt konnten die bisherigen Ergebnisse der Herabregulation der Genfunktionen bestätigt werden, sowohl für die *FaCHS* (Lunkenbein *et al.* 2006b) als auch für die *FaOMT* (Lunkenbein *et al.* 2006c). Die Abnahme der Genaktivität in dieser Studie zeigt aber eine schwächere Ausprägung als in den stabil transgenen Pflanzen. Dies liegt wahrscheinlich an einer Restaktivität der jeweiligen Enzyme, die vermutlich durch die chimäre Ausprägung der transient herabregulierten Früchte bedingt wird.

Die Bestätigung der Funktion eines Gens *in planta* ist für die Zuordnung der Genfunktion entscheidend. Das System wurde bereits für Untersuchungen zur *Fragaria x ananassa* Anthocyanidin-Glycosyltransferase (*FaGT1*) erfolgreich verwendet (Griesser *et al.* 2008). Der relativ späte Eingriff in die Biosynthese kann auch vorteilhaft sein, wenn man spezifische in den Früchten gebildete Metabolite untersuchen will, um sicherzugehen, dass diese nicht aus anderen Geweben oder Entwicklungsstadien stammen. Um eine andere Sicht zu gewinnen, können außerdem mit den zur transienten Genstilllegung verwendeten Konstrukten auch direkt stabil transgene Pflanzen erzeugt werden, die eine Herabregulation des Zielgens über alle Entwicklungsstadien zeigen. Die in dieser Arbeit etablierten Methoden, speziell die Erkenntnisse zum

Lignin der Erdbeerfrucht, könnten auch zur Untersuchung spezifischer Gene in der konventionellen Züchtung verwendet werden. Selbst eine Mischung verschiedener Konstrukte bei der Transfektion durch Agrobakterien ist denkbar. So könnten durch Herabregulation und Überexpression mehrerer Gene gleichzeitig eine Verschiebungen im Stoffwechsel oder auch die *de novo* Synthese erdbeerfremder Verbindungen in den Früchten erzielt werden. Ein interessanter neuer Ansatz ist die direkte PCR-Amplifikation von ihpRNAs (Wen *et al.* 2008). Dieser könnte, in Kombination mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode, die Konstruktion der ihp-Vektoren noch effizienter gestalten.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Methode der agrobakterienvermittelten Transfektion mit ihp-Konstrukten ein schnelles und effizientes System zur spezifischen Herabregulation reifekorrelierter Gene in Früchten ist. Mit der Einschränkung der relativ späten Injektion der Agrobaktériensuspension ist das transiente System als ein für den Hochdurchsatz geeignetes System anzusehen. Die Verwendung entsprechender Kontrollen für die Methode (pBI-Intron) ermöglicht die Auswertung der Ergebnisse hinsichtlich des spezifischen Effektes der Genstilllegung vor dem Hintergrund möglicher *off-target* Effekte. Die Kombination der Expressionsdaten mit den durchgeführten Analysen zur Proteinaktivität und den Metaboliten ergibt ein umfassendes Bild der Funktion der Zielgene reifender Erdbeerfrüchte. Die transiente Methode der Herabregulation durch RNAi-induzierte Genstilllegung ist daher zur Erforschung und endgültigen Bestätigung von Genfunktionen in *planta* hervorragend geeignet. Sie kann als neuer Baustein bei Studien zur funktionellen Genomik der Fruchtreifung verwendet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Studie verwendeten Chemikalien entsprachen p.a. Qualität und wurden von Sigma Aldrich (Schnelldorf) bzw. Fluka (Schnelldorf) beschafft, wenn nicht anders angegeben.

4.1.2 Pflanzen

In dieser Arbeit wurde die octoploide Kulturerdbeere *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta benutzt. Die Wachstumsbedingungen waren 25°C und eine 16-stündige Photoperiode mit $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ Bestrahlung durch Osram Fluora Lampen (Osram, München).

Das Pflanzenmaterial wurde von kommerziellen Anbietern (Kraege Beerenobst Spezialkulturen, Telgte) in Form von sogenannten Frigopflanzen bezogen. Die Wurzelstöcke dieser Pflanzen werden ab November in der Vegetationsruhe geerntet, vom Laub und der anhaftenden Erde befreit und bei -2°C eingelagert. Die Pflanzen treiben direkt nach dem Ausbringen Blüten, somit konzentriert sich die Reife der Erdbeerfrüchte auf einen definierten gemeinsamen Zeitpunkt.

Zu Analysezwecken wurden die Früchte 14 Tage nach der Bestäubung, im weißen Stadium, injiziert und zwischen 3 bis 24 Tagen nach der Injektion geerntet. Zu Kontrollzwecken wurden Früchte 28 Tage nach der Bestäubung geerntet.

4.1.3 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

Escherichia coli Dh5 α (Invitrogen, Karlsruhe)

Escherichia coli JM109 (Promega, Mannheim)

Escherichia coli MACH1 (Invitrogen, Karlsruhe)

Agrobacterium tumefaciens AGL0 (Lazo *et al.*, 1991)

4.1.4 Vektoren

In dieser Arbeit wurden folgende Vektoren und vektorspezifischen Primer (Kapitel 4.1.6) verwendet. Die Selektion transformierter Organismen erfolgte durch die angegebenen Antibiotika-Resistenzen.

pBI121 (Jefferson 1987) mit Kanamycin-Resistenz (50 mg/l).

Verwendete vektorspezifische Primer: T3, T7

pBI221 (Jefferson 1987) mit Ampicillin-Resistenz (100 mg/l).

pBIAscl (Hoffmann 2001) mit Kanamycin-Resistenz (50 mg/l).

Verwendete vektorspezifische Primer: T3, T7

pSKAscl (Hoffmann 2001) mit Ampicillin-Resistenz (100 mg/l).

Verwendete vektorspezifische Primer: T3, T7,

pBluescriptII SK+. (Stratagene, Heidelberg) mit Ampicillin-Resistenz (100 mg/l).

Verwendete vektorspezifische Primer: T3, T7,

pGEM[®]-T Vector System (Promega, Mannheim) mit Ampicillin-Resistenz (100 mg/l). Verwendete vektorspezifische Primer: T7, SP6

4.1.4.1 pBI-Intron

Zur Überprüfung der Transfektion der Erdbeerfrüchte und als Negativkontrolle der Methode wurde ein Intron-separiertes Gen für β -D-Glucuronidase (GUS) (Vancanneyt *et al.* 1990) im Vektor pBI121 (Jefferson 1987) integriert. Dieser neuen Vektor wird im Folgenden als pBI-Intron bezeichnet (Abbildung 36). Das erste Intron des Chinon-Oxidoreduktase Gens (AY158836, Nukleotide 4107–4561) wurde mit den Primern FaQRIntron-for und FaQRIntron-rev mittels PCR amplifiziert und in die Restriktionsschnittstelle SnaBI eingefügt (Vancanneyt *et al.* 1990). Durch den Einbau entstand eine Verschiebung des Leserahmens. Nur durch ein *splicing* des Introns konnte eine funktionelle mRNA des GUS Gens gebildet werden.

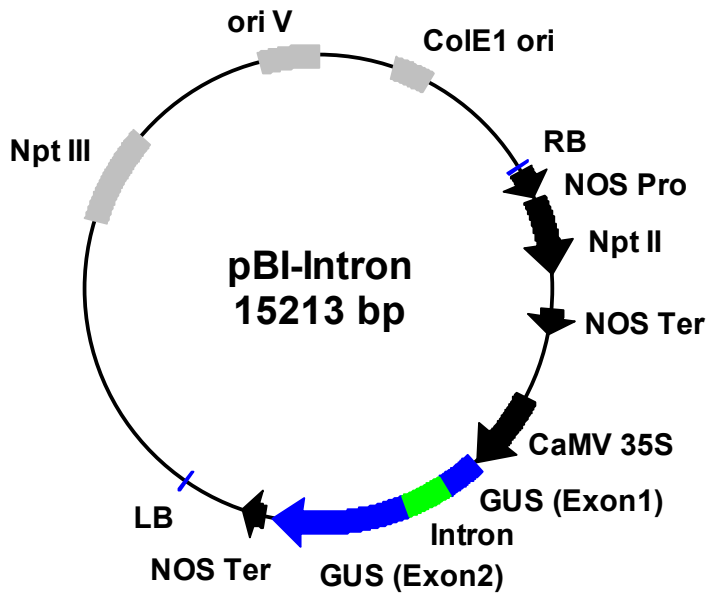


Abbildung 36 pBI-Intron.

4.1.5 Enzyme

Reverse

- Transkriptasen:
- Superscript[®] III (Invitrogen, Karlsruhe)
 - M-MLV (Invitrogen, Karlsruhe)
 - iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München)

- DNA Polymerasen:
- REDTaq Ready Mix (Sigma)
 - Taq Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)
 - PCR Master Mix (Promega, Mannheim)
 - Deep Vent_R[™] (New England Biolabs)
 - Pfu (Promega, Mannheim)
 - Phusion[™] (Finnzymes, Espoo, Finnland)
 - DYNAmo[™] Flash SYBR[®] Green qPCR Mix (Finnzymes, Espoo, Finnland)
 - Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt)

Restriktionsenzyme: - EcoRI, BamHI, XhoI, NotI (New England Biolabs)
- SpeI, XbaI, NheI, Ecl136II (Fermentas, St. Leon-Rot)

Weitere Enzyme: - DNase I (Amersham Bioscience)
- DNase I (Fermentas)
- RNaseH (New England Biolabs)
- RNaseA (New England Biolabs)
- CIP *Calf Intestine Phosphatase* (New England Biolabs)
- T4 DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot)

4.1.6 Primer

Alle aufgeführten Primer wurden, soweit nicht anders angegeben, in der Verdünnung 10 pmol/μl verwendet. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind rot hervorgehoben.

Vektorspezifische Primer

T3: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

SP6 5'-CATTTAGGTGACACTATAG-3'

cDNA Synthese

Oligo(dT)₁₈ (50 pmol/μl):

5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

Random-Hexamer (100 pmol/μl): 5'-NNNNNN-3'

Klonierung der Transformationskonstrukte

FaQR (AY158836)

FaQRIntron-for: 5'-GTGAGTTCCTCCCTCTTTCT-3'

FaQRIntron-rev: 5'-CTGCAAACGAAAATGAAAATAAATGA-3'

FaQRIntron1-for: 5'-GAAGATCTGCTAGCAGGTACATTCTGATTTTCATTATCC-3'

FaQRIntron1-rev: 5'-CTCACTAGTGCAAGCTGCATCACATAAAAGTACAC-3'

GUS (Jefferson 1987)

GUS-F2: 5'-TTCGATGCGGTCACTCATTA-3'

GUS-R2: 5'-TAGAGCATTACGCTGCGATG-3'

Klonierung der FaCHS Fragmente

CHS A-E Konstruktionen (PP4_5 full ORF)

CHSA-for: 5'-GACTAGTATGGTGACCGTTGAGGAAGT-3'
 CHSA-rev: 5'-GCTCTAGAATTCTCTTTGAGAATTTCTTCAG-3'
 CHSB-for: 5'-GACTAGTGAAGAAATTCTCAAAGAGAATCC-3'
 CHSBNhe-for: 5'-CTAGCTAGCGAAGAAATTCTCAAAGAGAATCC-3'
 CHSB-rev: 5'-GCTCTAGACGGACGAGCGGAGACCCA-3'
 CHSC-for: 5'-GACTAGTTCTTGGGTCTCCGCTCGTC-3'
 CHSC-rev: 5'-GCTCTAGATCGGACCCAACAATAATGGC-3'
 CHSD-for: 5'-GACTAGTGGCCATTATTGTTGGGTCCG-3'
 CHSD-rev: 5'-GCTCTAGACCAGAAAAGTGAGTTCCAGTC-3'
 CHSE-for: 5'-GACTAGTGACTGGAACACTTTTTCTGG-3'
 CHSE-rev: 5'-GCTCTAGATTTCAAGCAGCCACACTGTG-3'

Klonierung der FaOMT Fragmente

OMT A-E Konstruktionen (AF220491)

OMTA-for: 5'-CTAGCTAGCATGGGTTCCACCGGCGAG-3'
 OMTA-rev: 5'-GCTCTAGACATACGGTCGAGCATGACC-3'
 OMTB-for: 5'-CTAGCTAGCCCGGTCATGCTCGACCGT-3'
 OMTB-rev: 5'-GCTCTAGAATGGAATCCCACCATCAAGAA-3'
 OMTC-for: 5'-CTAGCTAGCTTCTTGATGGTGGGATTCCAT-3'
 OMTC-rev: 5'-GCTCTAGACCCTTGATCGAAGGGTACTT-3'
 OMTD-for: 5'-CTAGCTAGCCAAGTACCCTTCGATCAAGG-3'
 OMTD-rev: 5'-GCTCTAGAAAGAATGCACTCAGCAAGAATC-3'
 OMTE-for: 5'-CTAGCTAGCATTCTTGCTGAGTGCATTCTTC-3'
 OMTE-rev: 5'-GCTCTAGATCAGATCTTCTTAAGAAACTCAAT-3'

quantitative PCR (qPCR)

Actin (AB116565)

Actin-for: 5'-TCGTGTTGCCCCAGAAGAG-3'
 Actin-rev: 5'-CACGATTAGCCTTGGGATTCA-3'

DNA-Bindeprotein (Schaart *et al.* 2002)

DBP-for: 5'-GGCATCGGAGATGGTACTGT-3'
 DBP-rev: 5'-CCAGCATTCCGAACCTTCTTT-3'

FaCHS (AI795154)

CHS-for: 5' -GCTGTCAAGGCCATTAAGGA-3'

CHS-rev: 5' -GAGCAAACAACGAGAACACG-3'

FaOMT (AF220491)

OMT-for: 5' -ACCGGCGAGACTCAGATGAC-3'

OMT-rev: 5' -AGGTTAGAATGGAGTAGCTGGC-3'

4.1.7 Kommerzielle Kits

Kommerzielle Kits zur Aufreinigung und Extraktion von Nukleinsäuren wurden gemäß den Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet.

Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen:

Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg)

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *A. tumefaciens* Zellen:

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim)

NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey und Nagel, Düren)

Isolierung von Nukleinsäuren aus enzymatischen Reaktionen:

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

Isolierung von DNA aus Erdbeerblättern:

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden)

4.1.8 Medien, Puffer und sonstige Lösungen*Medien*

LB-Medium	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl
	pH 7,0

LB-Agar	LB-Medium
	1,5 % Agar

MMA-Medium	10 mM MES 4,3 g/l MS-Salze 20 g/l Saccharose pH 5,6
SOC-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 2,5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 2 mM Glucose (separat steril filtrieren [0,22 µm])
<i>Puffer</i>	
CTAB-Puffer	100 mM Tris (Stocklösung pH 8,2) 1,4 M NaCl 20 mM EDTA (Stocklösung pH 8,0) 2 % CTAB bei 65 °C lösen, abkühlen lassen und 1 µl/ml β-Mercaptoethanol zugeben
Dellus Puffer	0,1 M HEPES (pH 7,5) aufkochen auf Eis unter Stickstoffatmosphäre abkühlen und 1,5 % PEG 1500 10 % Saccharose 1mM DTE (Dithioerythritol) 100 mM Na-Ascorbat 25 mM Calciumchlorid unter Stickstoff in den Puffer einrühren
GUS-Extraktionspuffer	500 mM Na ₂ HPO ₄ (pH=7,0) 10 mM β-Mercapto-Ethanol 10 mM Na ₂ -EDTA 0,1 % Natrium-Lauryl-Sarcosin 0,1 % Triton X-100 5 % PVPP

GUS-Assaypuffer	500 mM Na ₂ HPO ₄ (pH=7,0) 10 mM β-Mercapto-Ethanol 10 mM Na ₂ -EDTA 0,1 % Natrium-Lauryl-Sarcosin 0,1 % Triton X-100 1 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid
10× Ladepuffer	0,21 % Orange G 0,1 M EDTA 50 % Glycerin pH 8,0
10× TAE-Puffer	0,4 M Tris 0,2 M Essigsäure 0,01 M EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0
TFB1-Puffer	30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl 15 % Glycerin pH 5,8 einstellen (1 M Essigsäure) und steril filtrieren (0,45 μm)
TFB2-Puffer	100 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15 % Glycerin pH 6,5 einstellen (1 M KOH) und steril filtrieren (0,45 μm)

sonstige Lösungen

Acetylbromidlösung	Acetylbromid/Essigsäure 20/80 (v/v)
Bradford-Lösung	50 mg Coomassie in 25 ml Ethanol lösen 50 ml 85 % Phosphorsäure zugeben mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen
CAW	Chloroform/Eisessig/H ₂ O 10/9/1 (v/v/v)
Glycerin für Cryostocks	65 % Glycerin (v/v) 0,1 M MgSO ₄ 25 mM Tris/HCl pH 8,0 (einstellen mit HCl)
GUS-Färbelösung	500 mM Na ₂ HPO ₄ (pH=7,0) 1 mM 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronid 0,5 % Dimethylformamid
Lösungsmittel	Dioxan/H ₂ O 9:1 (v/v)
Ligninisolation	mit 0,2 M HCl
saures Reduktionsmedium	Dioxan/Essigsäure/H ₂ O 5/4/1 (v/v/v)
Tetracosan-Stocklösung	10 mg/ml in CH ₂ Cl ₂

4.2 Geräte

4.2.1 Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)

HPLC:	Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn)
Pumpe:	Agilent 1100 Quarternäre Pumpe
Injektor:	Agilent Sample Injector Model G1313A ALS
Injektionsvolumen:	5 µl
Trennsäule:	Luna C-18 (150 mm lang, 2 mm Innendurchmesser, Partikelgröße 5 µm) (Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäule:	Security Guard Cartridges (Phenomenex, Aschaffenburg)
Säulentemperatur:	25 °C
Fließmittel:	A: H ₂ O (Merck) mit 0,1 % Ameisensäure (Roth) B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (Riedel de Haën)
Flussrate:	0,2 ml/min
Untersuchung der Erdbeerextrakte:	0-40 min: 0-40 % B, 40-45 min: 40-100 % B, 45-66 min: 100% B
UV-Detektor:	Agilent G 1314A VWD UV Variable Wavelength Detector (Wellenlänge 280 nm)
Massenspektrometer:	Bruker Daltonics esquire 3000 ^{plus} Ionenfalle (Bruker Daltonics, Bremen)
Spraygas:	Stickstoff (30,0 psi)
Trockengas:	Stickstoff (330 °C, 9 l/min)
Scan-Bereich:	<i>m/z</i> 30 bis 800
Polarität:	positiv/negativ
ICC Target:	30 000 oder 200 ms
Zielmasse (SPS):	<i>m/z</i> 400
Ionisierungsspannung:	+/- 4000 V
Endplattenspannung:	+/- 500 V
MS/MS:	AutoMS2
Kollisionsgas:	Helium (3,56 E-6 mbar)
Kollisionsenergie:	1,0 V

Einstellung Ionenfalle:

Skimmer:	$\pm 40,0$ V
Cap Exit:	± 121 V
Oct 1 DC:	-12,0 V
Oct 2 DC:	$\pm 1,7$ V
Trap Drive:	49,4
Oct RF:	112,2 V
Lens 1:	$\pm 5,0$ V
Lens 2:	$\pm 60,0$ V

Die Datenaufnahme erfolgte mit Bruker Daltonics Esquire 5.1 Software, die Auswertung mit DataAnalysis 3.1 und QuantAnalysis 1.5 Softwarepaket (Bruker Daltonics, Bremen).

4.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

GC:	Thermo Finnigan Trace GC 2000 ultra (Thermo Finnigan, Egelsbach)
Autosampler:	Thermo Finnigan AI 3000 (Thermo Finnigan, Egelsbach)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor
Trennsäule:	BPX5 (30 m x 0,25mm, $d_f=0,25\mu\text{m}$) (SGE,Darmstadt)
Massenspektrometer:	Thermo Finnigan Trace DSQ (Thermo Finnigan, Egelsbach)
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI positiv), 70 eV
Temperatur:	Ionenquelle 200°C, Transferline 280°C
Photomultiplier:	1195 V
Scanrate:	500 amu/s
Injektor:	Temperatur 200°C, 2 μl Split injection
Trägergas:	Helium 5.0, konstanter Druck 75 kPa
Scanbereich:	30 bis 550 m/z
Temperaturprogramm:	40°C (5 min isotherm) 4°C/min bis 240°C (25 min isotherm)
Datenaufnahme und -auswertung:	Xcalibur für Windows 1.4 (Thermo Electron, San Jose, USA) und NIST MS Search 2.0a

4.2.3 Real-Time PCR Systeme

qPCR system 1:	StepOnePlus™ mit Softwarepaket StepOne™ Software V. 2.0.1 (Applied Biosystems Appera Deutschland GmbH, Darmstadt)
qPCR System2:	Mastercycler® ep realplex mit Softwarepaket realplex 1.5 (Eppendorf AG, Hamburg) mit Eppendorf semi-skirted 96er Well-Plates

4.2.4 Sonstige Geräte

Autoklav:	HST 4-5-7 (Zirbus Technology, Bad Grund)
Durchlaufkühler:	RK 20 RKS Lauda (Lauda, Königshofen)
Geldokumentations- system:	SYNGENE G:BOX (Syngene, Cambridge, UK) mit Software GeneSnap Version 6.07.04
Gelelektrophorese:	Netzteil und Kammern (Biorad Laboratories GmbH, München)
Mikroplattenreader:	Tecan Safire (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)
pH-Meter:	CG 820 (Ingold, Hofheim)
Rotationsverdampfer:	Laborota 4000 mit VAC control automatic und ROTAVAC Vakuumpumpe (Heidolph Instruments, Schwabach)
Schüttelinkubatoren:	GFL3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) GFL3032 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Spannungsquelle:	Consort E 835 (Consort, Turnhout, Belgien)
Speed-Vac:	Christ RVC 2-18 (Christ, Osterode)
Spektralphotometer:	Nicolet evolution 100 (Thermo, Cambridge, England)
Sterile Werkbank:	Waldner FAZ 3 (Waldner Laboreinrichtung, Wangen)
Texture Analyser	TA-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, England)
Thermocycler:	Primus 96 advanced (Peqlab, Erlangen)
TLC Analyser:	Bio-Image Analyzer Fuji BAS 1000 (Raytest, Straubenhaurdt, Germany)
Thermomixer:	Eppendorf Comfort 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
Ultraschallbad:	RK103H (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraturrax:	T18 basic (IKA® Works Inc. Wilmington, NC, USA)
Vortex:	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)

Waagen:	Sartorius 1702 (Sartorius, Göttingen) Scout Pro SP U 4001 (Ohaus, Pine Brook, USA)
Wasserbad:	HC 5/6 (Julabo Labortechnik, Seelbach)
Zentrifugen:	Sorvall RC 5B Plus (Kendro, Hamburg) Sigma 4K15 (Sigma, Osterode) Eppendorf 5415R (Eppendorf AG, Hamburg)

4.2.5 Software und Internetressourcen

- mfold Version 3.2 (Mathews *et al.* 1999, Zuker 2003):
<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>
- BioEdit V 7.0.1 (Hall 1999)
- SigmaPlot 8.0 (Systat Software, Erkrath)
- ACD/ChemSketch Version 5.12
(Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada)
- BLAST (Altschul *et al.*, 1990): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Clustal W (Thompson *et al.*, 1994): <http://www.ebi.ac.uk/clustaw/>
- The R project for statistical computing (R Development Core Team 2008):
<http://www.r-project.org/>

4.3 Methoden

4.3.1 Grundlegende molekularbiologische Arbeitstechniken

4.3.1.1 Isolierung von RNA

Die verwendete Methode basiert auf einem Protokoll für die Isolierung von RNA aus Bananen (Asif *et al.* 2000). Das gefrorene Probenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert. 1g Pflanzenmaterial wurde mit 10 ml frisch hergestelltem CTAB-Puffer gemischt und für 1 h bei 65°C inkubiert, dabei wurde die Lösung alle 15 Minuten durchmischt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 10 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und für 3 Minuten gevortext. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugieren bei 15000 x g getrennt. Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und nochmals mit derselben Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 15000 x g wurde die verbliebene wässrige Phase mit LiCl auf eine Endkonzentration von 3 M gebracht und die RNA bei 4°C über Nacht ausgefällt. Zur Abtrennung der RNA wurde 30 Minuten bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Das verbliebene Pellet wurde in 2x 100 µl H₂O aufgenommen und schrittweise in ein Eppendorf® Reaktionsgefäß (ERG) überführt. Zur Lösung wurden 200 µl Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (25/24/1) hinzugegeben, 15 Minuten mit dem Vortex gemischt und 15 Minuten bei 16100 x g zentrifugiert. Die Wasserphase wurde in ein neues ERG überführt und nochmals mit derselben Menge Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (25/24/1) extrahiert. Die verbliebene wässrige Phase wurde mit 1/30 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 1/10 Volumen Ethanol versetzt. Durch eine Inkubation von 1 h auf Eis wurden Poly- und Oligosaccharide ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch 30 Minuten Zentrifugieren bei 4°C und 16100 x g abgetrennt. Die verbliebene Wasserphase wurde mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 3 Volumen Ethanol vermengt und die RNA bei -20°C über Nacht ausgefällt. Die Nukleinsäuren wurden durch 30 Minuten Zentrifugieren bei 16100 x g und 4°C als festes Pellet gewonnen. Das Pellet wurde mit 70% und 100% Ethanol gewaschen, bei 37°C für 8 Minuten getrocknet, anschließend in 80 µl H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

4.3.1.2 DNase Verdau

Zu 80 µl Lösung aus der RNA-Isolierung wurden 10 µl Puffer und 10 µl DNase I (Fermentas) gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch zweifache Extraktion mit Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (25/24/1) abgetrennt und die RNA mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 3 Volumen Ethanol bei -20°C über Nacht ausgefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugieren bei 16100 x g und 4°C gewonnen. Das Pellet wurde mit 70% und 100% Ethanol gewaschen, bei 37°C für 8 Minuten getrocknet, anschließend in 20 µl H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

4.3.1.3 Quantifizierung der RNA

Der Gehalt an Nucleinsäuren wurde photometrisch über die Absorption der Lösung bei 260 nm und das Verhältnis der Absorptionen 260/280 (Glasel 1995) bestimmt (Tabelle 10).

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \times [\%] \text{ Nucleinsäuren} \quad (2)$$

Tabelle 10 Verhältnis von Protein/Nucleinsäuren einer wässrigen Lösung bestimmt durch das Absorptionsverhältnis 260/280 nm.

% Protein	% Nuclein-säuren	OD260:OD280	% Protein	% Nuclein-säuren	OD260:OD280
100	0	0,57	45	55	1,89
95	5	1,06	40	60	1,91
90	10	1,32	35	65	1,93
85	15	1,48	30	70	1,94
80	20	1,59	25	75	1,95
75	25	1,67	20	80	1,97
70	30	1,73	15	85	1,98
65	35	1,78	10	90	1,98
60	40	1,81	5	95	1,99
55	45	1,84	0	100	2,00
50	50	1,87			

Die Konformität / Sauberkeit der Präparation wurde durch eine Gelelektrophorese von 500 ng RNA bestätigt. Dabei galt ein Verhältnis von eins zu zwei der Bandenintensitäten der ribosomalen 18S und 28S rRNA als intakte Probe.

4.3.1.4 cDNA Synthese

Zur Herstellung von cDNA wurde jeweils 1 µg RNA entweder mit SuperScript® III und einem Oligo(dT)18 Primer oder M-MLV und einem Random-Hexamer Primer revers transkribiert (beide Transkriptasen Invitrogen, Karlsruhe).

SuperScript® III Protokoll

Die Lösung aus

- 1 µg RNA
- 1 µl Oligo(dT)18 Primer (50 pmol/µl)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- ad 13 µl H₂O

wurde hergestellt, 5 Minuten bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Dann wurden

- 4 µl 5x SuperScript® III Puffer
- 1 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl RNase Inhibitor Gold (Peqlab, Erlangen)
- 1 µl SuperScript® III

zugeben, für 50 Minuten bei 50°C die reverse Transkription durchgeführt und anschließend für 15 Minuten bei 70°C die Reaktion abgestoppt. Daraufhin wurde 1 µl RNase H (NEB) zugegeben und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert um den mRNA Strang abzubauen.

M-MLV Protokoll

Folgende Lösung aus

- 1 µg RNA
- 1 µl Random-Hexamer Primer (100 pmol/µl)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- ad 12 µl H₂O

wurde hergestellt, 5 Minuten bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Dann wurden

- 4 µl 5x First Strand Puffer
- 2 µl DTT (0,1M)
- 1 µl RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Karlsruhe)

zugegeben und für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl reverse Transkriptase M-MLV zugegeben, 10 Minuten bei 25°C und 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Erhitzung auf 70°C für 15 Minuten. Abschließend wurde 1 µl RNase H (NEB) zugegeben und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert um den mRNA Strang abzubauen.

4.3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Für Standardanwendungen z.B. einfache Nachweisreaktionen wurden kommerzielle *Ready Mix* Mischungen aus Puffer, *Taq* Polymerase, und dNTPs (RED-Taq Sigma oder PCR Master Mix Promega) oder *Taq* Polymerase (NEB, Frankfurt) eingesetzt. Bei erhöhter Lesegenauigkeit z.B. für Klonierungen wurde eine sogenannte *proof-reading Taq* Polymerase verwendet (Deep Vent_RTM NEB oder PhusionTM Finnzymes). Die Pippetierschemata sind in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11 Pippetierschema der Polymerasekettenreaktionen.

- Ready Mix	- <i>Taq</i> Polymerase - Deep Vent _R TM	- Phusion TM
12,5 µl 2x Ready Mix (RED-Taq) bzw. Master Mix (Promega)	2,5 µl 10x Thermopol Puffer	5 µl 5x HF Puffer
-	1 µl dNTPs	1 µl dNTPs
1 µl <i>for</i> Primer (10 µM)	1 µl <i>for</i> Primer (10 µM)	1 µl <i>for</i> Primer (10 µM)
1 µl <i>rev</i> Primer (10 µM)	1 µl <i>rev</i> Primer (10 µM)	1 µl <i>rev</i> Primer (10 µM)
1 µl <i>Template</i>	1 µl <i>Template</i>	1 µl <i>Template</i>
-	0,5 µl Polymerase	0,5 µl Polymerase
ad 25 µl H ₂ O	ad 25 µl H ₂ O	ad 25 µl H ₂ O

Die PCR wurde anschließend mit den im Folgenden genannten Temperaturprogrammen durchgeführt. Die spezifischen Annealingtemperaturen der einzelnen Primerpaare wurden durch Temperatur-Gradienten-PCR jeweils separat ermittelt und eingehalten.

Ready Mix Taq und Deep Vent_RTM Polymerasen

	4'	94°C Vordenaturierung
45x	⎧	10''-30'' 94°C Denaturierung des Doppelstranges
		10''-30'' 45-65°C Annealingtemperatur
		10''-2' 72°C Elongation
	5'	72°C finale Elongationszeit

Für *Taq* und Deep Vent_RTM Polymerasen galt eine Syntheserate von 1 kb/Minute (Mülhardt 2000).

PhusionTM Polymerase

	4'	98°C Vordenaturierung
45x	⎧	15'' 98°C Denaturierung des Doppelstranges
		15'' 55-60°C Annealingtemperatur
		7''-2' 72°C Elongation
	5'	72°C finale Elongationszeit

Für Phusion Polymerase galt laut Hersteller eine Syntheserate von 1 kb/15-30s (PhusionTM Hot Start Manual).

4.3.1.6 Agarosegelelektrophorese und Dokumentation

Zur Visualisierung der PCR-Ergebnisse wurden die Ansätze durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die Gele mit Ethidiumbromid angefärbt (Sharp *et al.* 1973) und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. Dazu wurde der PCR-Ansatz pro angefangene 10 µl mit 1 µl 10x Ladepuffer vermischt. Die Elektrophorese fand bei 4 bis 4,5 V/cm statt (Sambrook *et al.* 2001). Sowohl zur Visualisierung von PCR-Produkten wie auch zur Aufreinigung der PCR-Reaktionen wurden TAE-Gele eingesetzt. Die verwendeten Gele enthielten zwischen 0,6 % und 2,0 % Agarose (w/v). Sollte ein PCR-Produkt für Ligationen eingesetzt werden, wurde die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Dabei wurde auf eine minimale Belichtungszeit unter dem UV-Licht geachtet. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Gele wurden mit einem Geldokumentationssystem belichtet, fotografiert und mit der Software GeneSnap Version 6.07.04 (Syngene, Cambridge, UK) bearbeitet und ausgewertet.

4.3.1.7 DNA Präparationen

Die Präparation von DNA erfolgte mit kommerziellen Extraktionskits, die nach den Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet wurden. Je nach benötigter DNA-Menge wurden für *E. coli* und *A. tumefaciens* das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim) oder das NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey und Nagel, Düren) verwendet. Für pflanzliche DNA wurde das DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) genutzt.

4.3.1.8 Klonieren von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten

Die Subklonierung von PCR Produkten erfolgte entweder direkt in kommerzielle Vektoren für A/T-cloning (pGEM®-T Vector System; Promega, Mannheim) oder *blunt end* in pSK pBluescriptII SK+ (Stratagene, Heidelberg) der entsprechend vorbereitet war. Alle weiteren Klonierungen wurden entsprechend der Restriktionsschnittstellen sowohl *sticky* wie auch *blunt end* vorgenommen. Die nötigen Ligationen zur Vektorerstellung wurden mit 50 ng bzw. 100 ng Vektor durchgeführt. Die dabei einzusetzende DNA-Menge an Insert wurde mit Formel 3 unter Berücksichtigung der Größenverhältnisse ermittelt. Die Ligation erfolgte für 3 Stunden bei RT, oder bei 14°C über Nacht. Die Ligation von PCR-Produkten *blunt end* erfolgte bei 4°C ebenfalls über Nacht.

$$\text{Insertmenge (ng)} = \frac{\text{Vektormenge (ng)} \times \text{Insertgröße (bp)}}{\text{Vektorgröße (bp)}} \quad (3)$$

$$\times \text{Molares Verhältnis } \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$$

Für die Ligationen wurde folgendes Standardpipettierschema genutzt.

1,0	µl	10 x Puffer für T4-DNA-Ligase
1,0	µl	T4-DNA-Ligase (1 Weiss U/ µl)
X	µl	Vektor (50 ng bzw. 100 ng)
Y	µl	Insert (entsprechend der Mengenformel)
ad 10	µl	H ₂ O

4.3.1.9 Restriktionsverdau und Auffüllen klebriger Enden

Das Schneiden der DNA an spezifischen Restriktionsschnittstellen wurde mit den entsprechendem Restriktionsendonukleasen in dem vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Bei Bedarf wurden nach Möglichkeit Doppelverdau kompatibelere Enzyme verwendet. Es wurde mindestens eine Unit Restriktionsenzym pro μg DNA eingesetzt und der Ansatz für mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurde das Restriktionsenzym durch 15 Minuten Inkubation bei 70°C inaktiviert. Der Restriktionsansatz wurde über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und, wenn benötigt, die zu verwendende Bande ausgeschnitten und mit einem kommerziellen Kit extrahiert.

Für die Konstruktion der ihp-Vektoren mussten unter Umständen die Enden der PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente nachträglich *blunt end* modifiziert werden. Die aufgereinigte DNA wurde dazu mit einer *proof-reading* DNA-Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität für 20 Minuten bei 72°C inkubiert.

Für die *blunt end* Modifikation wurde folgendes Standardpipettierschema genutzt. Das Volumen wurde durch die eingesetzte DNA Menge bestimmt.

X	μl	Aufgereinigte und geschnittene DNA
Y	μl	10 x Thermopol Puffer (New England Biolabs)
1	μl	dNTPs (10 mM)
0,5	μl	Deep Vent _R TM (New England Biolabs)

4.3.1.10 Vektor-Dephosphorylierung

Linearisierte Vektoren mit kompatiblen Enden wurden vor der Ligation dephosphoryliert, um ein Religieren des Vektors mit sich selbst zu verhindern. Durch das Enzym *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP) wurden die Phosphatgruppen an den Enden der DNA abgetrennt. Der Restriktionansatz des Vektors wurde nach der Nukleinsäurerestriktion mit 1 μl CIP versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Verdau durch eine Agarosegelelektrophorese nach Größe getrennt und die entsprechenden Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Der geschnittene und dephosphorylierte Vektor konnte dann mit dem entsprechenden Insert ligiert werden (Kapitel 4.3.1.8).

4.3.1.11 Phosphorylierung der PCR-Produkte

Um PCR Produkte zur direkten Ligation ohne A/T Cloning zu verwenden mussten die Nukleotide am Ende des DNA-Strangs phosphoryliert werden. Dazu wurde das aufgereinigte PCR Produkt mit T4 Polynucleotid Kinase (Fermentas, St. Leon Roth) nach dem unten angegebenen Schema für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde der Ansatz über ein Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte Fragment isoliert.

Für die Phosphorylierung wurde folgendes Standardpipettierschema genutzt.

X	µl	Aufgereinigtes PCR Produkt
2	µl	10 x Puffer PNK A
0,5	µl	ATP (10mM)
1	µl	PNK (T4 Polnucleotid Kinase, Fermentas, St. Leon Roth)
ad 20	µl	H ₂ O

4.3.1.12 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode verwendet (Hanahan 1985), da Rubidiumchlorid bessere Transformationseffizienzen erzielt als Calciumchlorid. Eine 1%ige Subkultur einer frischen Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stammes wurde in LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 herangezogen. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 4500 x g und 4°C pelletiert, in 0,4 Volumen eiskaltem Puffer TFB1 resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen wieder für 5 Minuten bei 4500 x g und 4°C abzentrifugiert, anschließend in 1/25 Volumen eiskaltem Puffer TFB2 resuspendiert und mindestens 30 Minuten auf Eis gelagert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.3.1.13 Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformation wurden 100 µl der kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock von 42°C für 90 Sekunden und eine Inkubation von 5 Minuten auf Eis. Anschließend wurde 1 ml SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen unter schütteln bei 37°C für eine Stunde herangezogen. Nach

dem Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika wuchsen die Kolonien über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

4.3.1.14 Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

Kompetente *Agrobacterium tumefaciens* Zellen wurden nach einem Protokoll von Weigel und Glazebrook (2002) hergestellt. Für die sogenannte *Freeze-Thaw Method* wurde eine 0,5%ige Subkultur einer frischen Übernachtskultur des *A. tumefaciens* Stammes AGL0 in LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 herangezogen. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 4000 x g pelletiert, in sterilem TE-Puffer resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,1 Volumen LB-Medium aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.3.1.15 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation wurden 100 µl der kompetenten *A. tumefaciens* AGL0 auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Plasmidlösung vermischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für 5 Minuten bei 37°C wieder erwärmt. Mit 1 ml LB-Medium wurden die Zellen für 4 Stunden bei 28°C herangezogen und schließlich auf LB-Agarplatten mit Rifampicin und den entsprechend selektiven Antibiotika ausplattiert. Die Kolonien wuchsen zwei Tage bei 28°C im Brutschrank.

4.3.1.16 Kolonie-PCR

Zum Screening der Transformanten wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde von den gewachsenen Kolonien jeweils ein Teil in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, kurz angetrocknet, und mit einem PCR-Master-Mix mit spezifischen Primern (Kapitel 3.1.6) versetzt. Die Amplifikation des entsprechenden PCR-Fragments bestätigte die korrekte Transformation.

4.3.1.17 DNA-Fällung und Sequenzierung

Zur Sequenzierung bei MWG Biotech AG (Martinsried) sowie zur Konzentrierung der Plasmidlösungen wurde die DNA mit Ethanol und Natriumacetat gefällt. Ein Volumen Plasmid-DNA wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat vermischt und bei -20°C über

Nacht (alternativ bei -80°C für 2 h) gefällt. Das Pellet wurde für 45 Minuten bei 4°C und $16100 \times g$ abzentrifugiert, anschließend in 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals abzentrifugiert, mit absolutem Ethanol gewaschen und an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet.

Weitere Sequenzierungen wurden bei der Microsynth AG (Balgach, Schweiz) in Auftrag gegeben, dazu mussten keine Nukleinsäurefällungen vorgenommen werden.

4.3.1.18 Anlegen von Glycerinkulturen

Die Archivierung der Organismen erfolgte als Glycerinkulturen, die bei -80°C gelagert wurden. $700 \mu\text{l}$ durch Zentrifugieren ankonzentrierte frische Kultur wurden mit $700 \mu\text{l}$ Glycerin für Cryostocks (Mülhardt 2006) gemischt und anschließend eingefroren.

4.3.2 Klonierungsstrategien für *intron-hairpin*-Konstrukte

Als Ausgangsbasis für die Konstruktion der *intron-hairpin*-Konstrukte (ihp-Konstrukte), dienten die Vektoren pBI121 und pBI221 (Jefferson 1987), sowie die modifizierte Variante pBIAscl (Abbildung 40) mit dem dazugehörigen Transfervektor pSKAscl (Abbildung 38), einem modifizierten pSK⁺ (Stratagene, Heidelberg) (Hoffmann 2001).

Für die Generierung einer Haarnadelstruktur nach der RNA-Translation wurde ein komplementärer Aufbau mit Sinn- und Gegensinnstrang, getrennt durch eine kurze Spacerserquenz, benötigt (Abbildung 14).

Für die Konstruktion einer solchen *intron-hairpin*-Kassette wurde zunächst die Glucuronidasesequenz im Vektor pBI221 (Abbildung 37) durch das zweite Intron aus der Chinon-Oxidoreduktase (AY158836) ausgetauscht. Dazu wurde das Intron aus genomischer DNA mit den Primern FaQRIntron1-for und FaQRIntron1-rev durch PCR amplifiziert. Vermittelt durch Überhänge der Oligonukleotide wurden *downstream* eine BglII- und eine NheI-Restriktionsschnittstelle sowie *upstream* eine SpeI- und eine halbe Ecl136II-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde mit BglII verdaut und als BglII-Ecl136II-Fragment in den mit BamHI und Ecl136II verdauten pBI221 ligiert. Dieser Vektor wurde als pBI221-Intron bezeichnet.

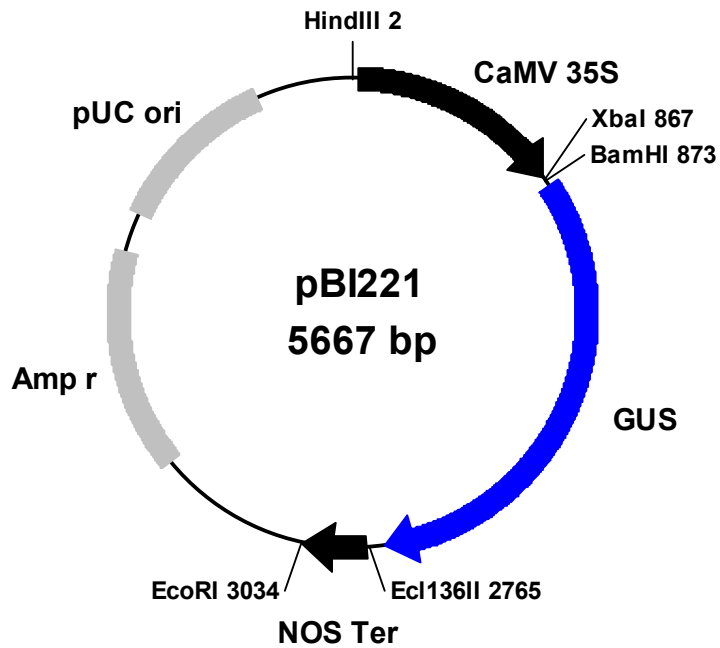


Abbildung 37 pBI221 (Jefferson 1987).

Die Kasette wurde mit HindIII und EcoRI aus dem Vektor herausgeschnitten und die überhängenden Enden wurden aufgefüllt. Der Vektor pSKAscl (Abbildung 38, Hoffmann 2001) wurde in der *multiple cloning site* mit NotI und XhoI verdaut und die Enden wurden ebenfalls aufgefüllt. Die 35S-Intron-Terminator-Kasette wurde nun *blunt end* in den *blunt end* vorbereiteten Vektor pSKAscl eingesetzt. Der resultierende Vektor wurde pSKAscl35SIntTER (Abbildung 39) benannt.

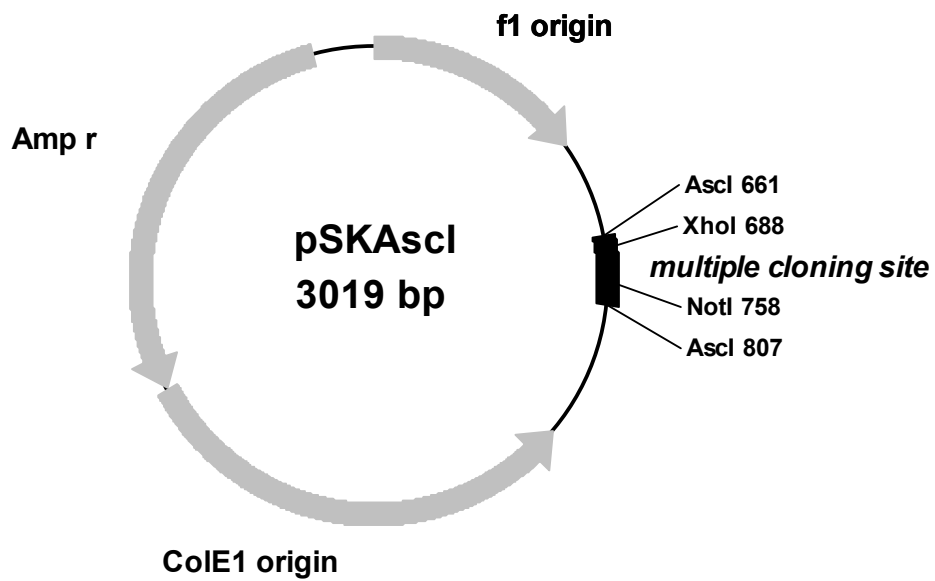


Abbildung 38 Vektor pSKAscI (Hoffmann 2001).

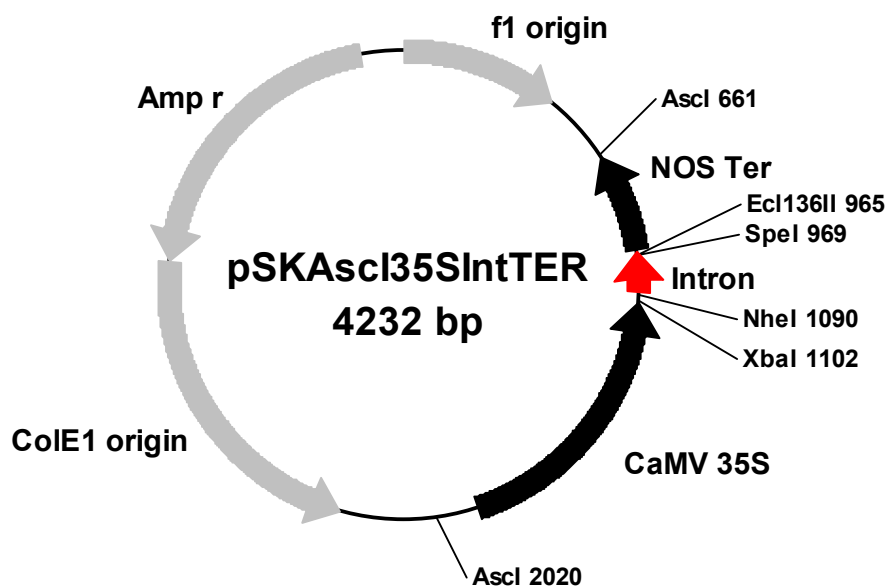


Abbildung 39 Leerer Konstruktionsvektor pSKAscI35SIntTER. Angegeben sind die Schnittstellen AscI zum Transfer in den Vektor pBIAscI und die spezifischen Restriktionsschnittstellen zur gerichteten Integration der Zielgenfragmente.

Über die mit den Intron eingeführten NheI- und SpeI-Restriktionsschnittstellen und die XbaI- und Ecl136II-Restriktionsschnittstelle des Vektors konnten nun Zielfragmente gerichtet als im Gegensinn angeordnete Kopien um das Intron herum integriert werden.

Um kompatible Enden für die Ligation zu erhalten wurden die Fragmente entweder mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut oder mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden durch Oligonukleotide mit angehängten Restriktionsschnittstellen kompatible Enden zu dem 3'-Überhang CTAG im Konstruktionsvektor pSKAscl35SIntTER eingeführt.

Die dazu gewählten Restriktionsschnittstellen NheI, XbaI und SpeI in den jeweiligen Primern sind im Einzelnen in Kapitel 4.1.6 angegeben. Die Restriktionsschnittstellen wurden mit den Schnittstellen des Vektors pSKAscl35SIntTER *sticky end* (XbaI, NheI und SpeI) oder *blunt end* (Ecl136II) ligiert. Dabei war darauf zu achten, dass bei der *sticky end* Ligation immer zwei verschiedene Restriktionsschnittstellen ineinander ligiert werden. Aufgrund der Kompatibilität der überhängenden Enden konnten diese Fragmente ligiert werden, die jeweiligen Restriktionsschnittstellen wurden bei einer Ligation in der gewünschten Orientierung eliminiert. Vektoren mit anders orientierten Fragmenten wurden durch Nachschneiden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym vor der Transformation wieder linearisiert. In die Ecl136II Schnittstelle wurde das jeweilige PCR- oder Restriktionsprodukt direkt *blunt end* ligiert.

Die gesamte Kasette konnte durch Restriktion mit Ascl herausgetrennt werden und in die Ascl-Restriktionsschnittstelle des Vektors pBIAscl (Abbildung 40) transferiert werden. Abbildung 15 zeigt das resultierende Modell eines Genstilllegungskonstruktes für die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte ihpRNA Generierung in Erdbeerfrüchten (Kapitel 2.1).

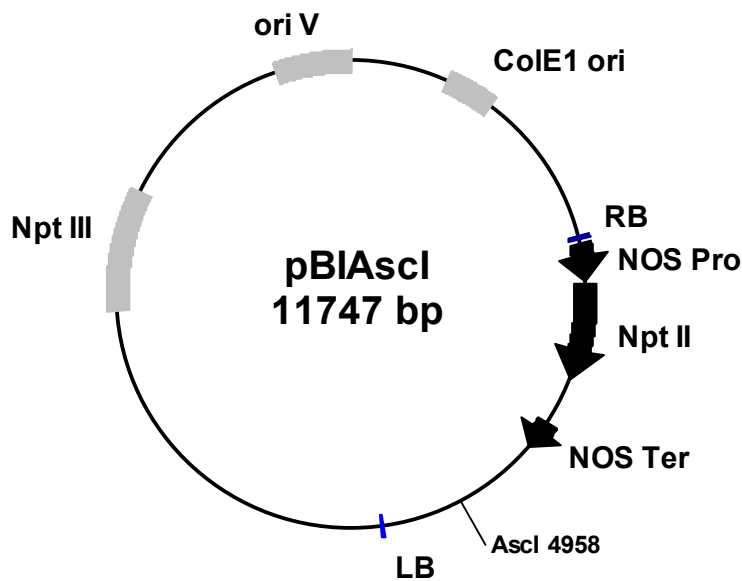


Abbildung 40 Leervektor pBIAscl (Hoffmann 2001).

4.3.3 Einteilung der Nukleotidsequenzen in überlappende Abschnitte

Zur Untersuchung des Einflusses der Nukleotidsequenz auf die Herabregulation eines Gens wurden Vollständigklone der Chalconsynthase (*FaCHS*) PP4 C5 (s. Anhang) und der *FaOMT* (Wein *et al.* 2002) aus *Fragaria x ananassa* in gleichmäßige Abschnitte unterteilt und diese für die ihp-Konstrukte verwendet. Beide Gene wurden in 5 Abschnitte (A bis E) mit jeweils 20 Basenpaaren Überlapp eingeteilt. Auf Basis einer angenommenen siRNA-Länge von 21 nt wurde somit die gesamte mRNA des Gens für jedes mögliche Bruchstück abgedeckt.

Die ersten 4 Abschnitte umfassten die Basenpaare 1-240 (A), 220-460 (B), 440-680 (C) und 660-900 (D). Der letzte Abschnitt der *FaCHS* bestand aus den Basenpaaren 880-1172 (E), im Fall der *FaOMT* umfasste er die Basenpaare 880-1098 (E).

4.3.3.1 Gesamtabdeckung der mRNA Sequenz der *FaOMT*

Die unterteilten Abschnitte A bis E der *FaOMT* wurden durch PCR amplifiziert und über Primer mit überhängenden Nukleotiden wurden in 5'-Position die Restriktionsschnittstelle *NheI* und in 3'-Position die Restriktionsschnittstelle

XbaI eingebracht (Kapitel 2.3.1). Die verwendeten Primer sind in Kapitel 4.1.6 angegeben, die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind farblich hervorgehoben. Die überhängenden Enden ermöglichten die gerichtete Ligation in den Vektor pBIAscI35SIntTER in *sense* und *antisense* Orientierung. Die Restriktionsschnittstellen eliminierten sich bei der Ligation wie in Abbildung 41 angegeben.

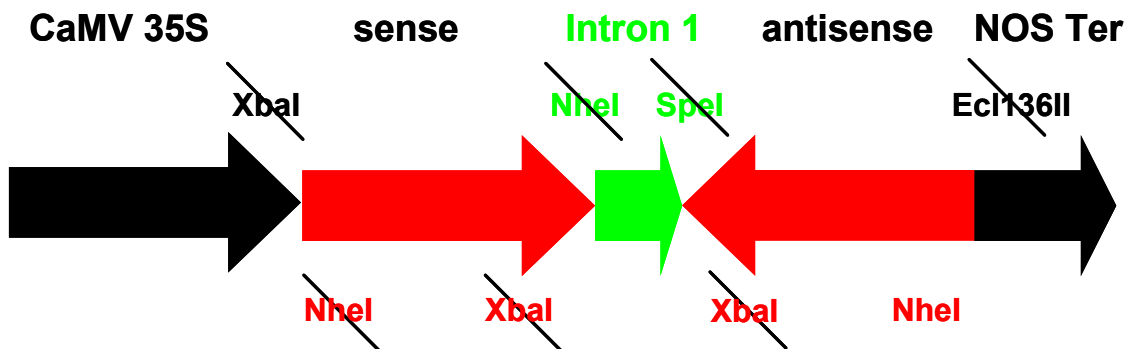


Abbildung 41 Gerichtete Ligation der *FaOMT*-Fragmente in pSKAscl35SIntTER. Die durchgestrichenen Restriktionsschnittstellen fallen weg.

4.3.3.2 Gesamtabdeckung der mRNA Sequenz der *FaCHS*

Die überlappenden Abschnitte A bis E der *FaCHS* (PP4_C5) wurden mittels PCR amplifiziert und über die Primer mit überhängenden Nukleotiden wurden in 5'-Position die Restriktionsschnittstelle NheI und in 3'-Position die Restriktionsschnittstelle XbaI eingebracht (Kapitel 2.3.2). Detaillierte Angaben zu den verwendeten Primern und den eingeführten Restriktionsschnittstellen stehen in Kapitel 4.1.6, die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind farblich hervorgehoben.

Für den Abschnitt CHS A wurde aufgrund eines Introns eine entsprechende Nukleotidsequenz ohne dieses aus cDNA amplifiziert. Die mit den Primern eingeführten überhängenden Enden ermöglichten die gerichtete Ligation in den Vektor pBIAscI35SIntTER in *sense* und *antisense* Orientierung. Da im Abschnitt CHS B eine SpeI Restriktionsschnittstelle vorhanden war, wurde das in *sense* Orientierung eingebrachte CHS B-Fragment mit dem Primerpaar CHSBNhe-for und CHSB-rev amplifiziert. Die Restriktionsschnittstellen eliminierten sich bei der Ligation wie in Abbildung 42 angegeben.

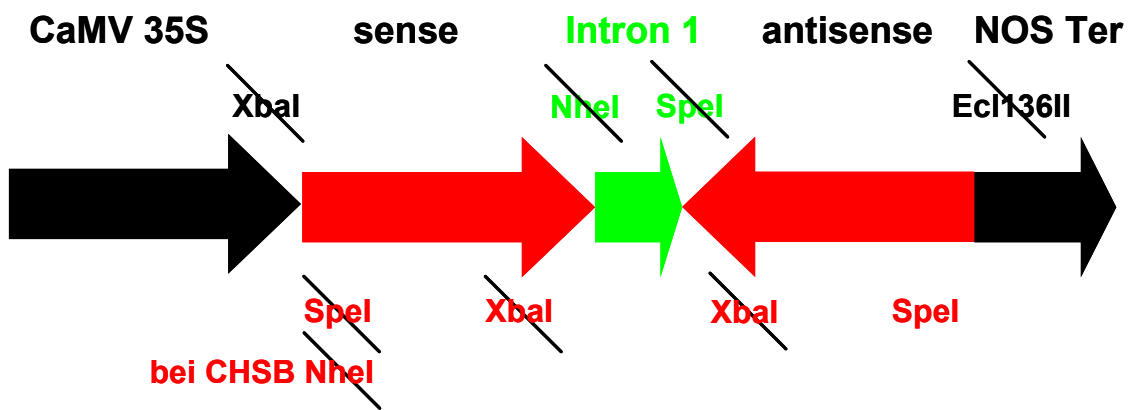


Abbildung 42 Gerichtete Ligation der *FaCHS*-Fragmente in pSKAscI35SIntTER. Die durchgestrichenen Restriktionsschnittstellen fallen weg.

4.3.4 Transfektion der Erdbeerfrüchte mit *A. tumefaciens* AGL0

Eine Kultur von *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 mit einem pBI-Konstrukt wurde im Schüttler in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 herangezogen. Die Zellen wurden bei 4000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert und anschließend in 0,5 Volumen MMA-Medium (Hoffmann *et al.* 2006; Spolaore *et al.* 2001) resuspendiert. Die Lösung wurde erneut abzentrifugiert und das Zellpellet in 0,1 Volumen MMA-Medium aufgenommen. Diese Lösung wurde mit einer 1 ml Spritze durch eine 27 Gauge Kanüle (0,4 x 20 mm; Braun) in die an der Pflanze reife Erdbeerfrucht (Stadium weiß etwa 14 Tage nach der Bestäubung) injiziert (Kapitel 2.1.1). Dabei war auf eine gleichmäßige Verteilung der Bakteriensuspension in der gesamten Frucht zu achten (Abbildung 16). Der Fruchtkörper verfärbte sich dunkel und es konnten einzelne Tropfen an den Leitbündeln unterhalb der Nüsschen austreten. Die Pflanzen mit den injizierten Früchten wuchsen unter kontrollierten Bedingungen bis zur Ernte. Reife Früchte mit dunkel gefärbten Nüsschen wurden etwa 14 Tage nach der Injektion geerntet und bei -80°C gelagert.

4.3.5 GUS-Assay

4.3.5.1 Histochemische Färbung

Zur visuellen Bestimmung der β -Glucuronidaseaktivität wurde eine histochemische Färbung der transfizierten GUS-Erdbeerfrüchte mit X-Gluc durchgeführt. Dazu wurden die Früchte in dünne Scheiben geschnitten, mit einer GUS-Färbelösung überschichtet und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Scheiben zur besseren Detektion mit 70%igem Ethanol gewaschen, wodurch alkohollösliche Substanzen entfernt wurden.

4.3.5.2 Fluorometrische Aktivitätsbestimmung

Für die fluorometrische Bestimmung der β -Glucuronidaseaktivität wurden die gefrorenen Erdbeeren in flüssigem Stickstoff gemörsert. Jeweils 75 μ l eines modifizierten GUS-Extraktionspuffers (Jefferson 1987) mit 5 % PVPP wurden in 1,5 ml ERGs vorgelegt. In die Gefäße wurde jeweils eine Spatelspitze von etwa 100 mg Erdbeerpulver zugegeben. Die Proben wurden 30 Sekunden gevortext und anschließend für 30 Minuten bei 4 °C und 12000 x g abzentrifugiert. 50 μ l Überstand wurden abpipettiert und in eine schwarze Mikrotiterplatte überführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 μ l eines modifizierten GUS-Assay-Puffers (Jefferson 1987).

Das freiwerdende 4-Methylumbelliferon (4-MU) wurde mit einem Mikroplattenreader (Tecan Safire) quantifiziert. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 365 nm und die Fluoreszenzemission bei 460 nm. Die Mikrotiterplatte wurde jeweils kurz vor der Messung geschüttelt und alle 120 Sekunden vermessen, bis die Plateauphase (maximale Fluoreszenz) erreicht war. Die lineare Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit wurde über eine Kalibriergerade (Abbildung 43) auf die Menge freiwerdendes 4-MU bezogen und die Aktivität als $\text{fmol 4-MU min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Frischgewicht angegeben.

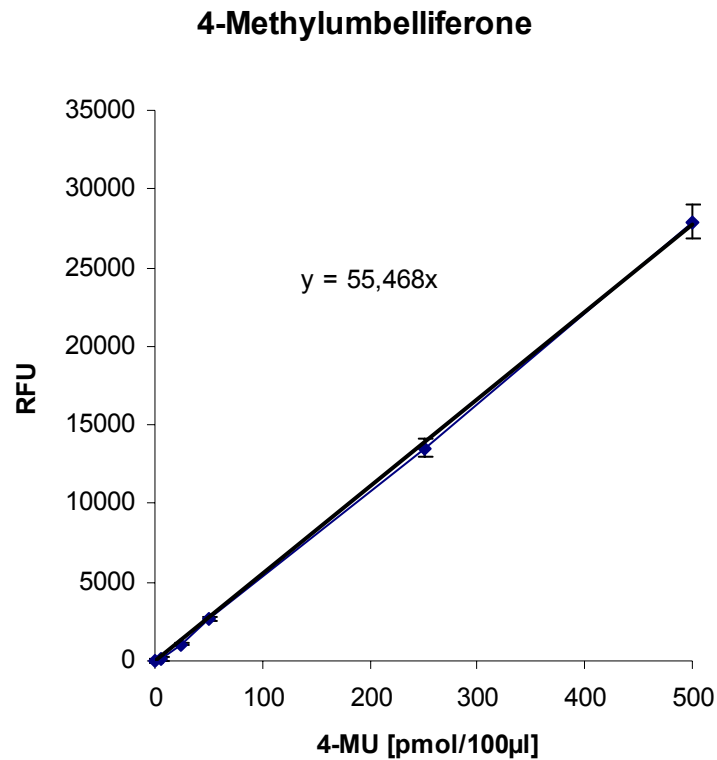


Abbildung 43 Kalibriergerade für 4-Methylumbelliferon (4-MU).

4.3.6 Genexpressionsanalyse

4.3.6.1 Semiquantitative PCR

Da für die Genexpressionsanalyse der mit pBI-*CHSi* transfizierten Früchte (Kapitel 2.2.1) kein Thermocycler mit Fluoreszenz-Detektion verfügbar war, wurden diese mit einer semiquantitativen Methode analysiert. Dazu wurde ein PCR-Mastermix in fünf gleiche Teile aufgeteilt, die nach jeweils 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen aus den Thermocycler entnommen wurden. Die Produkte dieser Abbruchreaktionen wurden dann über ein Agarose-Gel ausgewertet. Als Referenzgen wurde ein nicht reguliertes DNA-Bindeprotein (*DBP*) (Schaart *et al.* 2002) eingesetzt. Die verwendeten Primer DBP-for und DBP-rev amplifizierten ein PCR-Produkt mit einer Länge von 247 bp.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

	4'	94°C Vordenaturierung
40x	20''	94°C Denaturierung des Doppelstranges
	20''	57°C Annealingtemperatur
	16''	72°C Kettenverlängerungszeit
	5'	72°C finale Elongationszeit

4.3.6.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Bei den Untersuchungen zum Einfluss der Zugänglichkeit der gewählten Zielstruktur auf die RNA Interferenz (Kapitel 2.3) wurde der Nachweis der Transkripte der herabregulierten Gene durch quantitative Real-Time PCR geführt. Die Untersuchungen der *FaOMT* Expression (Kapitel 2.3.1.1) erfolgten auf dem Mastercycler® ep realplex mit dem Softwarepaket realplex 1.5 (Eppendorf AG, Hamburg). Verwendet wurden der DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR Kit (Finnzymes, Espoo, Finnland) mit Eppendorf semi-skirted 96er Well-Plates (Eppendorf AG, Hamburg). Die Analyse der *FaCHS* Expression (Kapitel 2.3.2.2) wurde auf dem StepOnePlus™ mit dem Softwarepaket StepOne™ Software V. 2.0.1 unter Verwendung von Power SYBR® Green Master Mix mit 96er Well-Plates (alle Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Die jeweiligen qPCR Reagenzien wurden in 20 µl Ansätzen gemäß den Vorgaben der Hersteller verwendet.

Die quantitative PCR ist eine Methode zur exakten Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen in einer Probe. Dazu wurde zunächst die RNA in cDNA revers transkribiert (Kapitel 4.3.1.4) und diese dann als Template in der PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz der PCR enthielt den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green der in die Struktur der neu gebildeten doppelsträngigen DNA interkaliert. Über diesen Fluoreszenzfarbstoff kann quantitativ auf die vorhandene DNA-Menge in der Probe geschlossen werden. Nach jedem Kettenverlängerungszyklus wurde die Fluoreszenz gemessen und die PCR-Amplifikation konnte so in Echtzeit verfolgt werden (Real-Time-PCR). Man geht davon aus, dass die DNA-Menge mit jedem PCR-Zyklus im Wesentlichen verdoppelt wird.

In dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung der Genexpressionen über die $\Delta\Delta CT$ -Methode verwendet. Die relative Expression wurde über den Vergleich des Zielgens mit einem nicht regulierten *housekeeping gene*, in

diesem Falle ein Actin Gen aus *Fragaria x ananassa* (AB116565), ermittelt (Almeida *et al.* 2007). Die verwendeten Primer Actin-for und Actin-rev amplifizierten ein 68 bp großes PCR Produkt. Zur Bestimmung der relativen Expression wurde das Reportersignal (Fluoreszenz) logarithmisch über die Zyklenzahl aufgetragen. Im linearen Bereich wurde ein fester Schwellenwert gesetzt, dieser entspricht einem konstanten Fluoreszenzniveau für alle Messungen. In allen Reaktionsgefäßen war die gleiche Menge neu synthetisierter DNA enthalten. Die zugehörige Zyklenzahl der Kurve beim Erreichen des Schwellenwerts ist der sogenannte CT-Wert. Der Δ CT-Wert ist der CT-Wert des Zielgens abzüglich des CT-Werts eines konstitutiv exprimierten *housekeeping gene*. Die Differenz des Δ CT-Werts der Behandlung und des Δ CT-Werts der Kontrolle ergibt den $\Delta\Delta$ CT-Wert. Die relative Expression ergibt sich daraus mit $2^{-\Delta\Delta CT}$.

$$\Delta CT = CT (\text{Zielgen}) - CT (\textit{housekeeping gene}) \quad (4)$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Behandlung}) - \Delta CT (\text{Kontrolle}) \quad (5)$$

$$\text{rel. Expression} = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (6)$$

Die Messungen wurden im Duplikat ausgeführt, bei Abweichungen $> 0,5$ CT wurde die entsprechende Messung verworfen.

4.3.7 Quantifizierung von Metaboliten durch LC-ESI-MSⁿ

Die in dieser Arbeit verwendeten massenspektrometrischen Analysen und Quantifizierungen von Metaboliten der Erdbeerfrucht wurden mittels LC-ESI-MSⁿ durchgeführt.

Die verwendete Gerätekonfiguration ist in Kapitel 4.2.1 angegeben. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte bei alternierender Ionisierung mit der Einstellung Auto-MS². Die Verbindungen wurden über ihre Retentionszeiten, Molekülionen und MS²-Spektren identifiziert, mit Referenzsubstanzen und Literaturdaten abgeglichen. Die Ionenspur $[M]^+$, $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ wurde zur relativen Quantifizierung der jeweiligen Substanz verwendet. Die Auswertung erfolgt anhand der Retentionszeiten und Ionenspuren mit den Programmen QuantAnalysis 1.5 und DataAnalysis 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen). Die relative Quantifizierung der Metabolite war wegen Überlagerungseffekten aus der Matrix in den Extrakten nur über die Ionenspur möglich. Tabelle 12 zeigt die

nachgewiesenen Verbindungen mit der jeweiligen Retentionszeit, Ionenmasse, relativen Intensität und MS²-Fragmenten.

Tabelle 12 Fragmentierungsmuster der über LC-ESI-MSⁿ analysierten Verbindungen. Angegeben sind die Namen, die Retentionszeit und die Fragmentionen mit den Intensitäten, die bei den MS und MS² Experimenten erhalten wurden.

Verbindung	RT [min]	MS [<i>m/z</i>]	MS ² [<i>m/z</i>]
p-Cumarsäure-glucose-Ester	21,7	325 [M-H]-	163 [Aglykon]- 187, 145
Kaffeesäure-glucose-Ester	19,0	341 [M-H]-	179 [Aglykon]- 203, 161
Ferulasäure-glucose-Ester	21,6	355 [M-H]-	193, [Aglykon]- 217, 175
Kämpferol-glucuronid	32,7	461 [M-H]-	285 [Aglykon]-
Kämpferol-glucosid	31,7	447 [M-H]-	285 [Aglykon]- 447, 327, 255
Quercetin-glucuronid	30,8	477 [M-H]-	301 [Aglykon]-
Quercetin-glucosid	29,6	463 [M-H]-	301 [Aglykon]-
Pelargonidin-3-glucosid	20,6	433 [M+H] ⁺	271 [Aglykon] ⁺
Pelargonidin-3-glucosid-malonat	24,8	519 [M+H] ⁺	271 [Aglykon] ⁺ 475, 433
Epicatechin	24,1	291 [M+H] ⁺	-
(Epi)catechin->(Epi)catechin (Isomer 1)	19,9	577 [M-H]-	289 [Aglykon]- 560, 451, 425
(Epi)catechin->(Epi)catechin (Isomer 2)	20,8	577 [M-H]-	289 [Aglykon]- 560, 451, 425
(Epi)afzelechin->(Epi)catechin (Isomer 1)	22,3	561 [M-H]-	289 [Aglykon]-
(Epi)afzelechin->(Epi)catechin (Isomer 2)	23,6	561 [M-H]-	289 [Aglykon]-
(Epi)afzelechin-pelargonidin-3-glucosid	19,6	705 [M+H] ⁺	543
HDMF	15,2	129 [M] ⁺	-
DMMF	21,5	143 [M] ⁺	-

Die als Referenzsubstanzen verwendeten Phenylpropanoid-Glucose-Ester wurden mit der Glycosyltransferase FaGT2 (Lunkenbein *et al.* 2006a) enzymatisch synthetisiert. HDMF, DMMF (beide Sigma Aldrich, Schnelldorf), Pelargonidin-3-glucosid, Quercetin-glucuronid, Quercetin-glucosid, Kämpferol-glucuronid, Kämpferol-glucosid, Catechin und Epicatechin wurden kommerziell erworben (Roth, Karlsruhe). Proanthocyanidine und Pelargonidin-3-glucosid-

malonat wurden aus Erdbeeren isoliert und nach Fossen *et al.* (2004) und Gu *et al.* (2003) identifiziert.

4.3.7.1 Extraktion der pBI-CHSi Früchte

Die Metabolitanalyse der mit pBI-CHSi herabregulierten *FaCHS* Erdbeeren (Kapitel 2.2.2) erfolgte direkt aus dem Saft der Erdbeerfrüchte. Dazu wurden die Erdbeeren in flüssigem Stickstoff gemörsert und etwa 200 mg Material in ein ERG überführt. Das Fruchtpüree wurde aufgetaut und bei 16100 x g abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde direkt für die LC-ESI-MSⁿ Analyse (Kapitel 4.3.7) eingesetzt.

4.3.7.2 Ethylacetatextrakte *FaOMT*

Die Metabolit-Extraktion der Erdbeerfrüchte mit herabregulierter *FaOMT* (Kapitel 2.3.1.2) wurde parallel zur Extraktion der jeweiligen RNA durchgeführt. Etwa 0,5 bis 1,0 g der in flüssigem Stickstoff homogenisierten Erdbeerfrüchte wurde in ein 2 ml ERG eingewogen. 40 µl in Ethylacetat gelöstes Norfuraneol mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml wurden als interner Standard zugesetzt. Dann wurde als Extraktionsmittel 500 µl Ethylacetat hinzugegeben und die ERGs für 15 Minuten auf dem Vortex Schüttler gemischt. Die anschließende Phasentrennung erfolgte durch 15minütiges Zentrifugieren bei 16100 x g. Die obere organische Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein 1,5 ml ERG überführt. Die untere Phase wurde nochmals mit 500 µl Ethylacetat extrahiert. Die organischen Überstände wurden vereint und 20 µl bidest. H₂O hinzugegeben. Das Lösungsmittel wurde in 35 Minuten bei 40°C im Speed-Vac entfernt und dabei wurden die gelösten Substanzen in das zurückbleibende H₂O überführt. Die verbliebene Wasserphase wurde anschließend auf 40 µl aufgefüllt und die ERGs wurden zum Lösen für 15 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Die ungelösten Bestandteile wurden durch 45 Minuten Zentrifugation bei 16100 x g entfernt. Der klare wässrige Überstand wurde direkt für die Analyse per LC-ESI-MSⁿ (Kapitel 4.3.7) eingesetzt.

4.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Die verdünnten Proben (100 µl) wurden mit 1 ml Bradford-Lösung vermischt und nach frühestens 2 Minuten photometrisch bei 595 nm vermessen. Eine Kalibriergerade mit BSA als Standard diente als Referenz. Die Proteinkonzentration der Probe wurde mit Formel 7 berechnet.

$$\text{Protein } [\mu\text{g}] = (A_{595} - 0,0009) / 0,0364 \quad (7)$$

4.3.9 Bestimmung der Proteinaktivität

Die Proteinaktivität der Chalconsynthase (*FaCHS*) und der nachfolgenden Chalconisomerase (*CHI*) (Kapitel 2.2.1) wurde über die Umsetzung von radioaktiv markiertem [2-¹⁴C] Malonsäure-CoA mit p-Cumarsäure-CoA (Punyasiri *et al.* 2004) bestimmt. Dazu wurde ein Proteinrohextrakt (Dellus *et al.* 1997) aus gefrorenen Erdbeerfrüchten hergestellt.

0,5 g des gefrorenen Pflanzenmaterials wurden in flüssigem Stickstoff unter Zugabe von 0,5 g PVP fein gemörsert und anschließend mit 3 ml Dellus Puffer versetzt. Wenn die Mischung auftaute und zähflüssig wurde (nach ca. 30 Minuten), wurde der Ansatz auf ERGs verteilt und bei 4°C und 16100 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Währenddessen wurde 0,5 g DOWEX im Dellus Puffer äquilibriert und in einem neuen Gefäß vorgelegt. Der Überstand der Extraktion wurde in das Gefäß gegeben und unter Stickstoffatmosphäre mit einem Magnetrührer 15 Minuten in Bewegung gehalten. Anschließend wurde das Gemisch wieder auf ERGs verteilt und bei 4°C und 16100 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand diente als Enzymquelle, er wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Kapitel 4.3.8) bestimmt und der Rohextrakt jeweils entsprechend verdünnt für die Bestimmung der Proteinaktivität eingesetzt. [2-¹⁴C]-Malonsäure-CoA (3 nmol, spezifische Aktivität 2222 Bq nmol⁻¹), 4-Cumarsäure-CoA (1 nmol) und die Proteinpräparation (2 µg Protein) wurden für 30 Minuten bei 30°C in einen Gesamtvolumen von 100µl in 100mM Tris-HCl (pH 7,5) inkubiert.

Die Reaktionsprodukte wurden zweimal mit je 200 µl Ethylacetat extrahiert und anschließend durch Dünnschichtchromatographie (DC) auf Zellulose (Merck GmbH, Darmstadt) getrennt. Das verwendete Laufmittelgemisch war

Chloroform/Eisessig/H₂O 10/9/1 (CAW). Die vollständig getrockneten DC-Platten wurden über Autoradiographie mit einem TLC Analyser (Fuji BAS 1000, Raytest, Straubenhaurdt) ausgewertet.

4.3.10 Texture Analyser

Zur objektiven Bestimmung der Festigkeit der Erdbeerfrüchte mit herabregulierter *FaCHS* (Kapitel 2.2.3.1) wurde ein Kompressionstest mit dem TA-XT2i Texture Analyser (Stable Microsystems, Godalming, England) durchgeführt. Bestimmt wurde der so genannte *bio-yield point* (Bourne 2002, Singh und Reddy 2006), der Punkt an dem die Verformung der Frucht unter Kompression in einen permanenten Zustand übergeht.

Die Erdbeerfrüchte wurden mit einem Skalpell der Längsachse nach in zwei Hälften geteilt und diese jeweils mit der Schnittfläche nach unten auf den Probenstisch des TA-XT2i Texture Analyser gelegt. Mit der SMSP/0-5 Hartkunststoffsonde (Durchmesser 0,5 Inch) wurde bei einer Kompressionsgeschwindigkeit von 1 mm s^{-1} ein Weg von 10 mm abgeschritten und die resultierende Kraft in Newton aufgezeichnet (Abbildung 44).

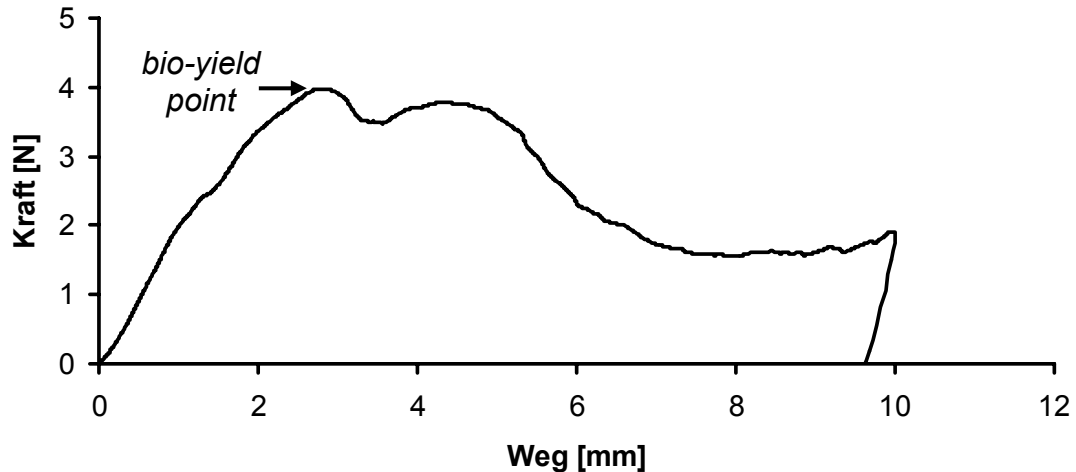


Abbildung 44 Eine typische Kraft-Deformationskurve für eine native Erdbeerfrucht der Sorte *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta unter Kompressionseinfluss (Geschwindigkeit 1 mm s^{-1}), der *bio-yield point* ist markiert.

4.3.11 Bestimmung des Ligningehalts der Erdbeerfrüchte

4.3.11.1 Zellwandpräparation einzelner Erdbeerfrüchte

Das hier verwendete Protokoll zur Zellwandpräparation aus Erdbeerfrüchten ist angelehnt an die so genannte *Uppsala method* (Theander und Westerlund 1986, Theander 1991) und die Protokolle von Franke *et al.* (2002) und Meyer *et al.* (1998).

Die gefrorenen Erdbeerfrüchte wurden von Kelchblättern und Nüsschen befreit und mit flüssigem Stickstoff im Mörser homogenisiert. Für eine einzelne Erdbeerfrucht wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt, dazu wurden jeweils 250 mg des Pulvers in ein 2 ml ERG eingewogen. Im folgenden Protokoll sind die weiteren Schritte exemplarisch für eine Probe beschrieben.

Es folgte eine zweifache Extraktion mit 1,5 ml 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH = 7,2). Die Probe wurde dabei zum Lösen 3 Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend im Schüttler für 30 Minuten bei 40°C mit 500 U/min⁻¹ inkubiert. Der Überstand wurde nach 10 Minuten Zentrifugation bei 16100 x g verworfen. Danach erfolgte eine zweifache Extraktion mit 1,5 ml 80%igem Ethanol. Nach dreiminütiger Ultraschallbehandlung zum Lösen der Probe wurde diese im Schüttler für 10 Minuten bei 80°C mit 500 U/min⁻¹ inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 16100 x g wurde der Überstand verworfen und es folgte ein Waschschrift mit 1,5 ml Aceton. Zum Lösen wurde die Probe erneut für 3 bis 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt und dann der Rückstand für 30 Minuten bei 16100 x g abzentrifugiert.

Zur Hydrolyse der Phenolester wurde das Pellet mit 0,95 ml Natronlauge (1 M) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde 0,95 ml Salzsäure (1 M) zum Neutralisieren zugegeben. Die Probe wurde anschließend bei 16100 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Der verbliebene Rückstand wurde dreifach mit bidest. H₂O gewaschen, wobei die Probe zum Lösen für jeweils 3 Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend für 10 Minuten bei 16100 x g abzentrifugiert wurde.

4.3.11.2 Bestimmung von Gesamtlignin durch Thioglycolsäurereaktion

Für die photometrische Bestimmung des Gesamtligningehaltes wurde die Farbreaktion von Lignin mit Thioglycolsäure ausgenutzt (Browning 1967, Fukushima und Hatfield 2004). Die Analysen wurden ausgehend von den Zellwandpräparationen (Kapitel 4.3.11.1) als Dreifachbestimmung einer einzelnen Erdbeerfrucht ausgeführt.

Dazu wurden zu einer Zellwandpräparation 0,75 ml bidest. H₂O, 0,25 ml konzentrierte 32%ige HCl und 0,1 ml Mercaptoessigsäure zugegeben, vermischt und für 3 Stunden bei 80°C inkubiert. Die Probe wurde anschließend bei 16100 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und dem Rückstand 1,5 ml bidest. H₂O zugegeben. Zum Waschen wurde die Probe für 3 Minuten im Ultraschallbad gelöst und wieder bei 16100 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum gewonnenen Rückstand wurde 1 ml NaOH (1 M) zugegeben und im Schüttler über Nacht bei Raumtemperatur und 450 min⁻¹ inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 16100 x g wurde der Überstand in ein frisches 2,0 ml ERG überführt und mit 0,2 ml konzentrierter 32%iger HCl versetzt. Die Probe wurde unter Schütteln bei 4°C für 4 Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation der Probe für 10 Minuten bei 16100 x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand in 1 ml NaOH (1 M) gelöst.

Die Ansätze wurden am Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm vermessen. Um im Linearitätsbereich des Geräts zu bleiben, wurden die Proben oberhalb einer Extinktion von 1 entsprechend mit NaOH (1 M) verdünnt. Die Konzentration des Lignins wurde über eine Kalibriergerade (Abbildung 45) auf kommerziell erworbenes hydrolytisches Lignin als Standard bezogen und in mg pro mg Fruchtfleisch angegeben. Messwerte wurden durch entsprechende Verdünnung des Assays hauptsächlich im unteren Bereich der Kalibriergeraden aufgenommen.

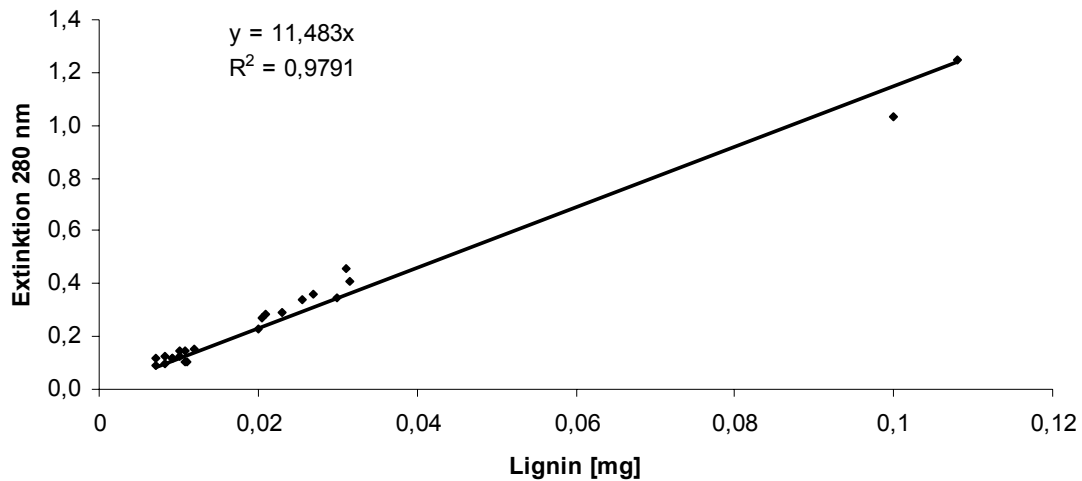


Abbildung 45 Kalibriergerade Thioglycolsäure-Assay für hydrolytischen Ligninstandard.

4.3.12 *Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC) Methode zur Bestimmung der Monolignole*

4.3.12.1 Isolierung von Lignin aus Erdbeerfrüchten

Die Isolierung von Lignin aus Erdbeerfrüchten erfolgte mit einem modifizierten Protokoll für Dioxan-Lignin aus Holz (Evtuguin *et al.* 2001). 100 g Erdbeerfrüchte, deren Kelchblätter und Nüsschen entfernt wurden, wurden mit 100 ml bidest. H₂O versetzt und mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Die Probe wurde für 15 Minuten bei 5525 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieses „Waschen“ der Zellbestandteile wurde bis zur Neutralität (pH=7,0 bestimmt mit pH-Papier) des Überstandes vier- bis fünfmal wiederholt. In einem zweiten Schritt wurde das Pellet in gleicher Weise mit 80%igem Ethanol gewaschen und der unlösliche Anteil (Theander und Westerlund 1986, Theander 1991) anschließend über Nacht bei 37°C getrocknet.

Der „gewaschene“ Rückstand wurde für die alkalische Vorextraktion mit 100 ml 0,075 M NaOH versetzt und unter Stickstoffatmosphäre, unter Rückfluss für eine Stunde gekocht. Das extrahierte Material wurde über einen holzfreien Papierfilter abfiltriert und mit heißem bidest. H₂O gewaschen bis das Filtrat neutral war. Diese Rohpräparation wurde über Nacht bei 37°C getrocknet.

Die Isolation des Lignins aus den extrahierten Zellwandbestandteilen erfolgte durch 40 Minuten Kochen unter Rückfluss bei 90 bis 95°C unter Stickstoffatmosphäre mit 25 ml Lösungsmittel (Dioxan/H₂O 9:1 v/v mit

0,2 M HCl). Danach wurde die Probe auf etwa 50°C abgekühlt und die flüssige Phase dekantiert. Der verbliebene Feststoff wurde noch zweimal mit je 20 ml Lösungsmittel (s.o.) für 30 Minuten extrahiert. Abschließend wurde mit 20 ml Dioxan/H₂O (9/1 v/v) für 30 Minuten extrahiert. Alle flüssigen Phasen wurden vereint und am Rotationsverdampfer auf etwa 4 ml Gesamtvolumen eingeeengt. Um das Lignin auszufällen wurde zu dem Extraktionsgemisch etwa 160 ml eiskaltes bidest. H₂O zugegeben und sofort über ein Glasfaserfilter (Schleicher und Schuell GF6 Glasfaser Rundfilter Ø 55mm Ref No. 10370003) abfiltriert. Die auf dem Filter verbliebene Ligninpräparation wurde mit etwa 10 ml Diethylether extrahiert, nochmals mit eiskaltem bidest. H₂O gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

4.3.12.2 Acetylierungsreaktion DFRC-Methode

Um flüchtige Peracetate zur Detektion in der GC-MS zu erzeugen wurde die *Derivatization Followed by Reductive Cleavage* (DFRC) Methode verwendet (Lu und Ralph 1997). Um die Monolignole aus dem isolierten Lignin zu gewinnen mussten diese zunächst bromiert werden. Dazu wurde der Rückstand aus der Dioxan-Extraktion (Kapitel 4.3.12.2) in einen 10 ml Rundkolben überführt und mit 3 ml Acetylbromidlösung (Acetylbromid/Essigsäure 20/80 v/v) versetzt. Das Gemisch wurde für 3 Stunden bei 50°C unter leichtem Rühren gelöst. Das Lösungsmittel wurde anschließend durch Rotationsverdampfung bei 40°C entfernt.

Der trockene Rückstand wurde in 3 ml saurem Reduktionsmedium (Dioxan/Essigsäure/H₂O 5/4/1 v/v/v) gelöst. Zur gut gerührten Lösung wurde 50 mg Zinkstaub zugegeben und für 30 Minuten gerührt. Die Mischung wurde in einen Scheidetrichter mit 10 ml CH₂Cl₂ überführt und mit 10 ml gesättigter NH₄Cl-Lösung, sowie 10 µl Tetracosan-Stocklösung (10 mg/ml in CH₂Cl₂ als internen Standard) versetzt. Der pH-Wert der wässrigen Phase wurde mittels 3%iger Salzsäure auf unter pH 3,0 eingestellt. Die Mischung wurde ausgeschüttelt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde anschließend noch zweimal mit jeweils 5 ml CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die CH₂Cl₂-Fraktionen wurden vereint, durch Zugabe von wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und in einen 100 ml Rundkolben filtriert. Das Lösungsmittel wurde durch Abrotieren bei 40°C aus dem Filtrat entfernt.

Der Rückstand wurde in 1,5 ml CH_2Cl_2 gelöst, mit 0,2 ml Essigsäureanhydrid und 0,2 ml Pyridin versetzt und unter Rühren für 40 Minuten acetyliert. Das Pyridin wurde anschließend mit gesättigter CuSO_4 -Lösung dreifach extrahiert. Dafür wurde die Lösung kurz bei 16000 x g abzentrifugiert und die CuSO_4 -Phase abgenommen und verworfen. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Filtrat wurde bei 40°C erneut abrotiert und der Rückstand, gelöst in 0,2 ml CH_2Cl_2 , über die GC-MS analysiert. Nötigenfalls wurden die Proben für die Messungen aufkonzentriert.

4.3.12.3 Darstellung der Alkohole für DFRC als Standard

Als Referenzen zur Identifikation der Monolignole wurden die einzelnen Alkohole aus den jeweiligen Säuren synthetisiert (Quideau und Ralph 1992). p-Cumar- (0,2080 g), Ferula- (0,2127 g) und Sinapinsäure (0,2019 g) wurden jeweils mit 10 ml Ethanol und 1 ml Acetylchlorid in einen 50 ml Rundkolben gegeben und über Nacht unter ständigem Rühren gemischt.

Im folgenden Protokoll sind die weiteren Schritte exemplarisch für eine Probe beschrieben. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C abgezogen und der Rückstand in 10 ml Toluol resuspendiert. Anschließend wurde durch das Einblasen von Stickstoff der Sauerstoff aus den Rundkolben verdrängt. Der Rundkolben wurde in ein Eis-Wasser-Bad gestellt und unter ständigem Rühren wurde 2,4 ml Diisobutylaluminium (1,7 M in Toluol gelöst) langsam mit einer Spritze dazugeben. Die Lösung wurde 1 Stunde unter ständigem Rühren im Eis-Wasser-Bad inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurde dem Gemisch 0,5 bis 1 ml Ethanol zugegeben. Danach wurde die Lösung am Rotationsverdampfer bei 40°C auf etwa die Hälfte des Volumens eingengt und der Rückstand mit 5 ml H_2O versetzt. Die gelartige wässrige Phase wurde viermal mit je 15 ml Ethylacetat über einem Filterpapier gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereint, mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer bei 35°C eingengt.

Die verbliebene gelblich ölige Flüssigkeit wurde in Ethylacetat aufgenommen und über Dünnschichtchromatographie gereinigt. Zur Identifizierung der Produkte wurden p-Cumar-, Ferula- und Sinapinsäure als Referenzsubstanzen aufgetragen. Als Laufmittel diente ein Pentan-Ether-Gemisch (1/1), die Laufzeit betrug etwa 1 Stunde. Nach vollständiger Trocknung wurden die Produkte unter UV-Licht nachgewiesen, die jeweiligen Bereiche abgekratzt in ERGs überführt

und die Alkohole mit 700 μl Ether herausgelöst. Dazu wurden die Suspensionen auf dem Vortex gemischt und anschließend für 5 Minuten bei 16100 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einen 50 ml Spitzkolben überführt. Das verbliebene Pellet wurde nochmals mit 200 μl Ether extrahiert und die Überstände vereint. Der Ether wurde durch Rotationsverdampfung abgezogen. Die so erhaltenen Alkohole wurden gemäß dem Acetylierungsprotokoll der DFRC-Methode (Kapitel 4.3.12.2) (Lu und Ralph 1997) umgesetzt und als Referenzsubstanzen eingesetzt.

4.3.12.4 Analyse der Monolignole mittels GC-MS

Über die gaschromatographische Auftrennung und anschließende massenspektrometrische Analyse wurde die Zusammensetzung der Proben untersucht. Dazu wurden die Lignin-Monomere p-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol nach der DFRC-Methode vollständig acetyliert. Die flüchtigen Produkte p-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylperacetat wurden als relative Anteile bestimmt. Der Rückstand der DFRC-Methode (Kapitel 4.3.12.2) wurde in 0,2 ml CH_2Cl_2 gelöst und an der GC-MS analysiert. Für die Messungen wurden folgende Einstellungen verwendet:

Tabelle 13 Temperaturprogramm zur Messung der Monolignole mittels GC-MS.

Zyklus	Einstellungen
Starttemperatur	140°C
Haltezeit	1 min
Zwischentemperatur	240°C, 3°C·min ⁻¹
Haltezeit	1 min
Endtemperatur	310°C, 30°C·min ⁻¹
Haltezeit	12 min
Gesamtlaufzeit	50 min

4.3.13 Datenauswertung

4.3.13.1 Box Plots

Aufgrund der nicht normalverteilten Messwerte wurde in dieser Arbeit die Darstellung durch sogenannte Box-Whiskers-Plots, kurz Box-Plots, gewählt. Zur Erstellung der Box-Plots wurde das Programm Sigma Plot 8.0 verwendet. In dieser Auftragsung wird die Verteilung einer Werte wie folgt dargestellt: die dem Nullpunkt am nächsten gelegene Begrenzung der Box stellt das 25. Perzentil dar, die Linie in der Box markiert den Median, den Abschluss der Box bezeichnet das 75. Perzentil. Die beiden *Whiskers* unter und über der Box markieren das 10. und das 90. Perzentil. Es werden außerdem alle „Ausreisser“ aufgetragen.

4.3.13.2 Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test

In Ergänzung zu den Box-Plot Darstellungen wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-Test für nicht normalverteilte Wertemengen verwendet. Man vergleicht zwei unabhängige Stichproben einer stetig verteilten Grundgesamtheit über Rangsummenbildung auf ihre Übereinstimmung. Die Irrtumswahrscheinlichkeit ist ein Maß für die Gleichheit der Verteilungen, im vorliegenden Fall wird sie zu $\alpha = 1\%$ gewählt. Das Maß ist der p-Wert, der angibt, wie weit das gewählte Signifikanzniveau über- oder unterschritten wird. Gesucht wird in den hier betrachteten Fällen die Nichtübereinstimmung, d. h. sehr kleine p-Werte zur vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%. Als statistisch signifikanter Unterschied wurden p-Werte $p < 1,0 \text{ E-}2$ betrachtet. Die Berechnung (Hart 2001) erfolgte mit dem Statistikprogramm „R“ (R Development Core Team 2008; <http://www.r-project.org>).

5 Literatur

Aaby, K., Skrede, G., Wrolstad, R.E. (2005) Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4032-4040

Abdulrazzak, N., Pollet, B., Ehling, J., Larsen, K., Asnaghi, C., Ronseau, S., Proux, C., Erhardt, M., Seltzer, V., Renou, J-P., Ullmann, P., Pauly, M., Lapierre, C., Werck-Reichhart, D. (2006) A coumaroyl ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth. *Plant Physiology* **140**, 30–48

Agius, F., Amaya, I., Botella, M. A., Valpuesta, V. (2005) Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression. *Journal of Experimental Botany* **56**, 37–46

Aharoni, A., Keizer, L. C. P., Bouwmeester, H. J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H. A., Blaas, J., Van Houwelingen, A. M. M. L., De Vos, R. C. H., Van der Voet, H., Jansen, R. C., Guis, M., Mol, J., Davis, R. W., Schena, M., van Tunen, A. J., O'Connell, A. P. O. (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *The Plant Cell* **12**, 647-662

Aharoni, A., O'Connell, A. P. (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2073–2087

Aharoni, A., De Vos, C. H. R., Verhoeven, H. A., Maliepaard, C. A., Kruppa, G., Bino, R. and Goodenowe, D. B. (2002a) Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **6**, 217–234

Aharoni, A., Keizer, L. C. P., van den Broeck, H. C., Blanco-Portales, R., Munoz-Blanco, J., Bois, G., Smit, P., de Vos, R. C. H. O'Connell, A.P. (2002b) Novel insights into vascular, stress, and auxin-dependent and-independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiology* **129**, 1019-1031

Almeida, J. R. M., D'Amico, E., Preuss, A., Carbone, F., de Vos, C. H. R., Deiml, B., Mourgues, F., Perrotta, G., Fischer, T. C., Bovy, A. G., Martens, S., Rosati, C. (2007) Characterization of major enzymes in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**, 61-71

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. Lipman, D. J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410

Asif, M. H., Dhawan, P. und Nath, P. (2000) A Simple Procedure for the Isolation of High Quality RNA from Ripening Banana Fruit. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**, 109–115

Baulcombe, D. C. (2007) Amplified silencing. *Science* **315**, 199-200

Bazzini, A. A., Mongelli, V. C., Hopp, H. E., del Vas, M., Asurmendi, S. (2007) A practical approach to the understanding and teaching of RNA silencing in plants. *Electronic Journal of Biotechnology* **10**, 179-190

Blanco-Portales, R., Medina-Escobar, N., López-Ráez, J. A., González-Reyes, J. A., Villalba, J. M., Moyano, E., Caballero, J. L., Munoz-Blanco, J. (2002) Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany* **53**, 1723-1734

Blee, K. A., Choi, J.W., O'Connell, A. P., Jupe, S. C., Schuch, W., Lewis, N. G., Bolwell, G. P. (2001) Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. *Phytochemistry* **57**, 1159–1166

Bleys, A., Vermeersch, L., Van Houdt, H., Depicker, A. (2006) The Frequency and efficiency of endogene suppression by transitive silencing signals is influenced by the length of sequence homology. *Plant Physiology* **142**, 788-796

Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C., Dixon, R. A. (2000) Altering expression of cinnamic acid 4-hydrolase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* **122**, 107-116

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 519-54

Bourne, M. (2002) Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. Geneva, New York, London, Academic Press

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254

Braunstein, T. H., Moury, B., Johannessen, M., Albrechtsen, M. (2002) Specific degradation of 3' regions of GUS mRNA in posttranscriptionally silenced tobacco lines may be related to 5'-3' spreading of silencing. *RNA* **8**, 1034-1044

Brodersen, P., Voinnet, O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* **22**, 268-280

Browning B. L. (1967) Methods of wood chemistry. Wiley Interscience, New York, USA

Cain, C., Saslowsky, d. E., Walker, R. A., Shirley, B. W. (1997) Expression of chalcone synthase and chalcone isomerase proteins in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Molecular Biology* **35**, 377-381

Carbone, F., Mourgues, F., Biasioli, F., Gaspari, F., Mäk, T. D., Rosati, C., Gaetano P. (2006) Development of molecular and biochemical tools to investigate fruit quality traits in strawberry elite genotypes. *Molecular Breeding* **18**, 127-142

Chen, J.C. Jiang, C.Z., Gookin, T. E., Hunter, D. A, Clark, D. G., Reid, M. S. (2004) Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Molecular Biology* **55**, 521-530

Cheng, G. W., Breen, P. J. (1991) Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentration of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**, 865-869

Christensen, A. B., Gregersen, P. L., Schröder, J., Collinge, D. B. (1998) A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Molecular Biology* **37**, 849-857

Clark, T. A., Zeyen, R. J., Smith, A. G., Carver, T. L. W., Vance, C. P. (1994) Phenylalanine ammonia lyase mRNA accumulation, enzyme activity and cytoplasmic responses in barley isolines, differing at *MI-a* and *MI-o* loci, attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44**, 171-185

Cornwell, T., Cohick, W., Raskin, I. (2004) Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* **65**, 995-1016

Dangel, A. (2007) Charakterisierung der Chalkonsynthase-Allele in der Erdbeerfrucht *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta/Mara des Bois *Fragaria vesca*. Masterthesis, Technischen Universität München

Davuluri, G. R., van Tuinen, A., Fraser, P. D., Manfredonia, A., Newman, R., Burgess, D., Brummell, D. A., King, S. R., Palys, J., Uhlig, J., Bramley, P. M., Pennings, H. M. J., Bowler, C. (2005) Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology* **23**, 890-895

Dellus, V., Heller, W., Sandermann, H., Scalbert, J. R., Scalbert A. (1997) Dihydroflavonol 4-reductase activity in lignocellulosic tissues. *Phytochemistry* **45**, 1415-1418

Dixon, R. A. (1999) Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 192-197

Dixon, R. A., Chen, F., Guo, D. J., Parvathi, K. (2001) The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* **57**, 1069-1084

Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O. (2005) CICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics* **37**, 1356-1360

Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Silva, A. M. S., Domingues, P. M., Amado, F. M. L., Robert, D., Faix O. (2001) Comprehensive study on the chemical structure of dioxane lignin from plantation *Eucalyptus globulus* wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4252-4261

Fabian, M. R., White, K. A. (2008) Solution Structure Probing of RNA Structures. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 451, Plant Virology Protocols: From Viral Sequence to Protein Function. Foster, G. D. (Hrsg.), Johansen, I. E. (Hrsg.), Hong, Y. (Hrsg.), Nagy, P. D. (Hrsg.), Totowa, NJ, USA, Humana Press

Felton, G. W., Korth, K. L., Wesley, S. V., Huhman, D. V., Mathews, M. C., Murphy, J. B., Lamb, C., Dixon, R. A. (1999) Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. *Current Biology* **9**, 317-320

Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., und Noel, J. P. (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural & Molecular Biology* **6**, 775-784

Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart, C., Noel, J. P. (2008) Structure and functions of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 356-370

Filichkin, S. A., DiFazio, S. P., Brunner, A. M., Davis, J. M., Yang, Z. K., Kalluri, U. C., Arias, R. S., Etherington, E., Tuskan, G. A., Strauss, S. H. (2007) Efficiency of gene silencing in *Arabidopsis*: direct inverted repeats vs. transitive RNAi vectors. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 615-626

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Craig C. Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811

Fischer, R., Budde, I., Hain, R. (1997) Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. *The Plant Journal* **11**, 489-498

Fossen, T., Rayyan, S., Andersen, O. M. (2004) Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry* **65**, 1421–1428

Franke, R., Hemm, M. R., Denault J. W., Ruegger, M. O., Humphreys J. M., Chapple, C. (2002) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **30**, 47-59

Fukushima, R. S., Hatfield, R. D. (2004) Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3713–3720

Gilissen, L. J. W., Bolhaar, S. T. H. P., Matos, C. I., Rouwendal, G. J. A., Boone, M. J., Krens, F. A., Zuidmeer, L., van Leeuwen, A., Akkerdas, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A. C., Bosch, D., van de Weg, W. E., van Ree, R. (2005) Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115**, 364-369

Giovannoni, J. (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 725-749

Given, N. K., Venis, M. A., Grierson, D. (1988a) Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* **174**, 402-406

Given, N. K., Venis, M. A., Grierson, D. (1988b) Phenylalanine ammonia lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *Journal of Plant Physiology* **133**, 25-30

Glasel, J. A. (1995) Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm Absorbance Ratios. *Biotechniques* **18**, 62-3

Goto-Yamamoto, N., Wan, G. H., Masaki, K., Kobayashi, S. (2002) Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Science* **162**, 867-872

Gregersen, P. L., Christensen, A. B., Sommer-Knudsen, J., Collinge, D. B. (1994) A putative O-methyltransferase from barley is induced by fungal pathogens and UV light. *Plant Molecular Biology* **26**, 1797-1806

Griesser, M., Hoffmann, T., Bellido, M. L., Rosati, C., Fink, B., Kurtzer, R., Aharoni, A., Munoz-Blanco, J., Schwab, W. (2008) Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glycosyltransferase in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* **146**, 1528-1539

Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Prior, R. L. (2003) Screening of food containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7513–7521

Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., Törrönen, A. R. (1999) Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 2274-2279

Halbwirth, H., Puhl, I., Haas, U., Jezik, K., Treutter, D., Stich, K. (2006) Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1479–1485

Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98

Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal* **21**, 4671-4679

Hanahan, D. (1985) DNA Cloning. Volume 1, London, IRL Press

Han, Y., Grierson, D. (2002) Relationship between small antisense RNAs and aberrant RNAs associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato. *The Plant Journal* **29**, 509-519

Hancock, J. F. (1999) Strawberries. CABI Publishing, New York, USA

Hanhineva, K. (2008) Metabolic Engineering of Phenolic Biosynthesis Pathway and Metabolite Profiling of Strawberry (*Fragaria x ananassa*). Dissertation, University of Kuopio, Finland

Hart, A. (2001) Mann-Whitney test is not just a test of medians: Differences in spread can be important. *British Medical Journal* **323**, 391-393

Hatfield, R., Fukushima, R. S. (2005) Can lignin be accurately measured? *Crop Science* **45**, 832-839

Heinonen, I. M., Meyer, A. S., Frankel, E. N. (1998) Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4107-4112

Hébert, C., Charles M. T., Gauthier, L., Willemot, C., Khanizadeh, S., Cousineau, J. (2002) Strawberry proanthocyanidins: biochemical markers for Botrytis cinerea resistance and shelf-life predictability. *Acta Horticulturae* **567**, 659-661

Herrmann, K. (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **28**, 315-347

Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler C., Voinnet, O. (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *The EMBO Journal* **22**, 4523-4533

Hoffmann T. (2001) Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*: Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem. Dissertation, Technischen Universität München

Hoffmann, T., Kalinowski, G. Schwab, W. (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration. A rapid assay for gene function analysis. *The Plant Journal* **48**, 818-826

Holton, T. A., Cornish, E. C. (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 1071-1083

Honda, C., Kotoda, N., Wada, M., Kondo, S., Kobayashi, S., Soejima, J., Zhang, Z. L., Tsuda, T., Moriguchi, T. (2002) Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 955-962

Humphreys, J. M., Chapple, C. (2002) Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 224-229

Iannetta, P. P. M., Laarhoven, L.J., Medina-Escobar, N., James, E. K., McManus, M. T., Davies, H. C., Harren, F. J. M. (2006) Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum* **127**, 247-259

Ibrahim, R. K., Bruneau, A., Bantignies, B. (1998). Plant O-Methyltransferases: Molecular Analysis, Common Signature and Classification. *Plant Molecular Biology* **36**, 1-10

Ibrahim, R. K., Muzac I. (2000). The Methyltransferase Gene Superfamily: A tree with multiple branches. In: *Recent Advances in Phytochemistry (Evolution of Metabolic Pathways)* **34**, 349-384

Jaakola, L., Määttä, K., Pirttilä, A. M., Törrönen, R., Kärenlampi, S. O., Hohtola, A. (2002) Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology* **130**, 729-739

Jefferson, A.R. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* **5**, 387-405

Jersch, S., Scherer, C., Huth, G., Schlösser, E. (1989) Proanthocyanidins as basis for quiescence of *Botrytis cinerea* in immature strawberry fruits. *Pflanzenkrankheiten* **96**, 365-378

Jez, J. M., Austin, M. B., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Schroder, J., and Noel, J. P. (2000a) Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chemistry & Biology* **7**, 919-930

Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A., and Noel, J. P. (2000b) Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890-902

Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J. L., Lopez-Aranda, J. M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A. and Mercado, J.A. (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology* **128**, 751–759

Johansen, L. K., Carrington, C. (2001) Silencing on the Spot. Induction and Suppression of RNA Silencing in the Agrobacterium-Mediated Transient Expression System. *Plant Physiology* **126**, 930-938

Joshi, C. P., Chiang, V. L. (1998) Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Molecular Biology* **37**, 663-674

Kajita, S., Katayama, Y., Omori, S. (1996) Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate: coenzyme A ligase. *Plant and Cell Physiology* **37**, 957–965

Kent, O. A., MacMillan A. M. (2004) RNAi: running for the cell. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2**, 1957-1961

Klahre, U., Crété, P., Leuenberger, S. A., Iglesias, V. A., Meins, Jr., F. (2002) High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 11981-11986

Knogge, W., Schmelzer, E., Weissenböck, G. (1986) The Role of Chalcone Synthase in the Regulation of Flavonoid Biosynthesis in Developing Oat Primary Leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **250**, 364-372

Kuhlmann, M., Nellen, W. (2004) Gen, sei still! RNAinterferenz. *Biologie in unserer Zeit*. **34**, 142-150

Kumar, A., Ellis, B. E. (2003) A family of polyketide synthase genes expressed ripening Rubus fruits. *Phytochemistry* **62**, 513-526

Lawton, M. A., Lamb, C. J. (1987) Transcriptional Activation of Plant Defense Genes by Fungal Elicitor, Wounding, and Infection. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 335-341

Lazo, G. R., Pascal, A. S., Ludwig, R.A. (1991) A DNA transformation competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Biotechnology* **9**, 963-967

Lopes da Silva, F., Escribano-Bailón, M. T., Alonso, J. J. P., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. (2007) Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 374-382

Lozovaya, V. V., Lygin, A. V., Zernova, O. V., Ulanov, A. V., Li, S., Hartman, G. L., Widholm, J. M. (2007) Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase. *Planta* **225**, 665-679

Lu, F., Ralph, J. (1997) Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC Method), a new method for lignin analysis: Protocol for analysis of DFRC monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2590-2592

Lu F., Ralph J. (1998) The DFRC Method for Lignin Analysis. 2. Monomers from Isolated Lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 547-552

Lunkenbein, S., Bellido, M., Aharoni, A., Salentijn, E. M. J., Kaldenhoff, R., Coiner, H. A., Muñoz-Blanco, J., Schwab, W. (2006a) Cinnamate metabolism in ripening fruit. characterization of a UDP-glucose: cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant Physiology* **140**, 1047–1058

Lunkenbein, S., Coiner, H. A., Ric de Vos, C. H., Schaart, J. G., Boone, M. J., Krens, F. A., Schwab, W., Salentijn, E. M. J. (2006b) Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2145-2153

Lunkenbein, S., Salentijn, E. M. J., Coiner, H. A., Boone, M. J., Krens, F. A., Schwab, W. (2006c) Up- and down-regulation of *Fragaria x ananassa* O-methyltransferase: impacts on furanone and phenylpropanoid metabolism. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2445–2453

Lunkenbein (2006d) Reifekorrelierte Enzyme des Sekundärstoffwechsels von Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) Expression und Funktion. Dissertation, Technischen Universität München

Määttä-Rhihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Törrönen, A. R. (2004) Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family *Rosaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6178-6187

MacKay, J. J., O'Malley, D. M., Presnell, T., Booker, F. L., Campbell, M. M., Whetten, R. W., Sederoff, R. R. (1997) Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 8255-8260

Manning, K. (1998) Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* **205**, 622–631

Martin, C. R. (1993) Structure, Function, and Regulation of the Chalcone Synthase. *International Review of Cytology* **147**, 233-284

Masuzaki, S., Shigyo, M., Yamauchi, N. (2006) Complete assignment of structural genes involved in flavonoid biosynthesis influencing bulb color to individual chromosomes of the shallot (*Allium cepa* L.). *Genes & Genetic Systems* **81**, 255-263

Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M., Turner D. H. (1999) Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. *Journal of Molecular Biology* **288**, 911-940

Medina-Escobar, N., Cárdenas, J., Valpuesta, V., Munoz-Blanco, J., Caballero, J. L. (1997) Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MASTPCR-SBDS method. *Analytical Biochemistry* **248**, 288-296.

Meister G., Tuschl T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349

Meyer, K., Shirley A. M., Cusumano J. C., Bell-Lelong, D. A., Chapple C. (1998) Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 6619-6623

Mikkonen, T. P., Hukkanen, K. R., Määttä, K. R., Kokko, H. I., Törrönen, A. R., Kärenlampi, S. O., Karjalainen, R. O. (2002) Flavonoid content in strawberry cultivars. *Acta Horticulturae* **567**, 815-818

Millar, D. J., Long, M., Donovan, G., Fraser, P. D., Boudet, AM., Danoun, S., Bramley, P. M., Bolwell, G. P. (2007) Introduction of sense constructs of cinnamate 4-hydrolase (CYP73A24) in transgenic tomato plants shows opposite effects on flux into stem lignin and fruit flavonoids. *Phytochemistry* **68**, 1497-1509

Moissard, G., Voinnet, O. (2006) RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19593-19598

Moyano, E., Portero-Robles, I., Medina-Escobar, N., Valpuesta, V., Munoz-Blanco, J., Caballero, J. L. (1998) A fruit specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiology* **117**, 711-716

Mülhardt, C. (2006) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Napoli, C., Lemieux, C. Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of Homologous Genes *in trans*. *The Plant Cell* **2**, 279-289

Naumann, WD., Seipp, D. (1989) *Erdbeeren: Grundlagen für Anbau und Vermarktung*. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer

Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W.H., Granell, A. (2006) Agroinfiltration of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology* **140**, 3–11

Osorio, S., Castillejo, C., Quesada, M. A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G J., Suau, R., Heredia, A., Botella, M. A., Valpuesta, V. (2008) Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *The Plant Journal* **54**, 43–55

Ossowski, S., Schwab, R., Weigel, D. (2008) Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal* **53**, 674-690

Overhoff, M., Alken, M., Far, R.K.K., Lemaitre, M., Lebleu, B., Sczakiel, G., Robbins I. (2005) Local RNA target structure influences siRNA efficacy: A systematic global analysis. *Journal of Molecular Biology* **348**, 871–881

Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M., Vaucheret, H. (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO Journal* **16**, 4738–4745

Passey, A. J., Barrett, K. J., James, D. J. (2003) Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explant types. *The Plant Cell Reports* **21**, 397-401

Pérez, A. G., Olías, R., Sanz, C., Olías J. M. (1996) Furanones in Strawberries: Evolution during Ripening and Postharvest Shelf Life. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 3620-3624

Perkins-Veazie, P. (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews* **17**, 267-297

Petersen, B. O., Albrechtsen, M. (2005) Evidence implying only unprimed RdRP activity during transitive gene silencing in plants. *Plant Molecular Biology* **58**, 575-583

Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leplé, JC, Pollet, B., Mila, I., Webster, E. A., Marstorp, H. G., Hopkins, D. W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch, W., Cornu, D., Halpin, C. (2002) Field and pulping performance of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnology* **20**, 607-612

Preuß, A. (2009) Persönliche Kommunikation Anja Preuß, FG Biomolekulare Lebensmitteltechnologie, TU München 19.01.2009

Punyasiri, P. A. N., Abeysinghe, I. S. B., Kumar, V., Treutter, D., Duy, D., Gosch, C., Martens, S., Forkmann, G., Fischer, T. C. (2004) Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **431**, 22–30

R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing Vienna, Austria <http://www.R-project.org>

Raab, T., López-Ráez, J. A., Klein, D., Caballero, J. L., Moyano, E., Schwab, W., Munoz-Blanco, J. (2006) *FaQR*, Required for the Biosynthesis of the Strawberry Flavor Compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, Encodes an Enone Oxidoreductase. *The Plant Cell* **18**, 1023-1037

Ramesh, S. V., Mishra, A. K., Praveen, S. (2007) Hairpin RNA-mediated strategies for silencing of tomato leaf curl virus AC1 and AC4 genes for effective resistance in plants. *Oligonucleotides* **17**, 251-257

Rastogi, S., Dwivedi, U. N. (2006) Down-regulation of lignin biosynthesis in transgenic *Leucaena leucocephala* harbouring *O*-Methyltransferase gene. *Biotechnology Progress* **22**, 609-616

Richard, S., Lapointe, G., Rutledge, R. G., Séguin, A. (2000) Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. *Plant and Cell Physiology* **41**, 982-987

Richter, G. (1996) *Biochemie der Pflanzen*. Thieme, Stuttgart, New York

Roscher, R., Schwab, W., Schreier, P. (1997) Stability of naturally occurring 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone derivatives. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **204**, 438-441

Salentijn, E. M. J., Aharoni, A., Schaart, J. G., Boone, M. J., Krens, F. A. (2003) Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiologia Plantarum* **118**, 571-578

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (2001) Molecular cloning a laboratory manual (3. Edition), Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA

Schaart, J. G., Salentijn, E. M. J., Krens, F. A. (2002) Tissue-specific expression of the β -glucuronidase reporter gene in transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants. *The Plant Cell Reports* **21**, 313-319

Schaart, J. G., Mehli, L., Schouten, H. J. (2005) Quantification of allele-specific expression of a gene encoding strawberry polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) using Pyrosequencing. *The Plant Journal* **41**, 493-500

Schieberle, P., Hofmann, T. (1997) Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 227-232

Schijlen, E. G. W. M., Ric de Vos, C. H., Martens, S., Jonker, H. H., Rosin, F. M., Molthoff, J. W., Tikunov, Y. M., Angenent, G. C., van Tunen, A. J., Bovy, A. G. (2007) RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiology* **144**, 1520–1530

Schröder, J., Schröder, G. (1990) Stilbene and chalcone synthases: Related enzymes with key functions in plant-specific pathways. *Zeitschrift für Naturforschung* **45c**, 1-8

Schröder, J. (1997) A family of plant-specific polyketide synthases: Facts and predictions *Trends in Plant Science* **2**, 373-378

Schubert, S., Grünweller, A., Erdmann V. A., Kurreck, J. (2005) Local RNA target structure influences siRNA efficacy: Systematic analysis of intentionally designed binding regions. *Journal of Molecular Biology* **348**, 883–893

Sewalt, V. J. H., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., Lamb, C. J., Dixon, R. A. (1997) Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology* **115**, 41–50

Sharp, P. A., Sugden, B., Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**, 3055

Shimamura, K., Oka, S., Shimotori, Y., Ohmori, T., Kodama, H. (2006) Generation of secondary small interfering RNA in cell-autonomous and non-cell autonomous RNA silencing in tobacco. *Plant Molecular Biology* **63**, 803–813

Shiraishi, T., Yamada, T, Nicholson, R. L., Kunoh, H. (1995) Phenylalanine ammonia-lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (race1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **46**, 153-162

Singh, K. K., Reddy, B. S. (2006) Post-harvest physico-mechanical properties of orange peel and fruit. *Journal of food engineering*. **73**, 112-120

Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H. (2000) Die Zusammensetzung der Lebensmittel – Nährwert-Tabellen. Medpharm Scientific Publication, Stuttgart

Spolaore, S., Trainotti, L. und Casadoro, G. (2001) A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Experimental Botany* **52**, 845-50

Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A. F. W. (2002) Lehrbuch der Botanik. Sitte, P. (Hrsg.), Weiler, J. W. (Hrsg.), Bresinsky, A. (Hrsg.), Körner, C. (Hrsg.) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Statistisches Bundesamt (2008) Fachserie 3, Reihe 3.2.1, Obst 2007. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden

Statistisches Bundesamt Pressestelle (2008) Zahl der Woche Nr. 24 vom 15.06.2004 Deutsche Erdbeeren: wachsende Anbaufläche – sinkende Erträge. http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/zdw/2004/PD04__024__p002.psml Stand 17.04.2008

Suutarinen, J., Änäkäinen, L. Autio, K. (1998) Comparison of light microscopy and spatially resolved fourier transform infrared (FT-IR) microscopy in the examination of cell wall components of strawberries. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **31**, 595-601

Tang G., Gad, G. (2004) Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. *TRENDS in Biotechnology* **22**, 463-469

Terry L. A., Joyce D. C., Adikaram N. K. B., Khambay B. P. S. (2004) Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biology and Technology* **31**, 201-212

Theander, O., Westerlund E. A. (1986) Studies on Dietary Fiber. 3. Improved Procedures for Analysis of Dietary Fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **34**, 330-336

Theander, O. (1991) Chemical analysis of lignocellulose materials. *Animal Feed Science and Technology* **32**, 35-44

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680

Törrönen, R., Määttä, K. (2002) Bioactive substances and health benefits of strawberries. *Acta Horticulturae* **567**, 797-803

Tolia, N. H., Josua-Tor, L. (2007) Slicer and Argonauts. *Nature Chemical Biology* **3**, 36-43

Trainotti, L., Pavanello, A., Casadoro, G. (2005) Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these nonclimacteric fruits? *Journal of Experimental Botany* **56**, 2037-2046

Treutter, D. (2005) Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of their Biosynthesis. *Plant Biology* **7**, 581-591

Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S. A., Schröder, J., Schröder, G. (1993) Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *Journal of Molecular Evolution* **38**, 610-618

Tropf, S., Karcher, B., Schröder, G., Schröder, J. (1995) Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthase (stilbenes and chalcone synthase). A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcone. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 7922-7928

Quideau, S., Ralph, J. (1992) Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl and p-coumaryl alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1108-1110

Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., Rocha-Sosa, M. (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular Genetics and Genomics* **220**, 245-250

Vaistij, F. E., Jones, L., Baulcombe D. C. (2002) Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *The Plant Cell* **14**, 857-867

Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., Rocha-Sosa, M. (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular Genetics and Genomics* **220**, 245–250

Voinnet, O. (2005) Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Letters* **579**, 5858–5871

Wang, S. Y., Lin, HS. (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 140-146

Wang S. Y., Chen C. T., Wang C. Y., Chen P. (2007) Resveratrol content in strawberry fruit is affected by preharvest conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 8269–8274

Waterhouse, P. M., Wang, MB., Lough, T. (2001) Gene silencing as adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-842

Waterhouse, P., Helliwell, C.A. (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews* **4**, 29–38

Watson J. M., Fusaro A. F., Wang M., Waterhouse P. M. (2005) RNA silencing platforms in plants. *FEBS Letters* **579**, 5982-5987

Weigel, D., Glazebrook, J. (2002) *Arabidopsis. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA

Wein, M., Lavid, N., Lunkenbein, S., Lewinsohn, E., Schwab, W., Kaldenhoff R. (2002) Isolation, cloning and expression of a multifunctional O-methyltransferase capable of forming 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits. *The Plant Journal* **31**, 755-765

Wen, CM., Cai, PZ., Xu, ZJ., Zhong, WF. (2008) A Novel Approach Obtaining Intron-Containing Hairpin RNA Constructs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**, 615–617

Whetten, R., Sederoff, R. (1995) Lignin biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 1001-1013

Whetten, R. W., MacKay, J. J., Sederoff, R. R. (1998) Recent Advantages in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **49**, 585-609

White, P.J. (2002) Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1995-2000

Winegate, V. P. M., Lawton, M. A., Lamb, C. (1988) Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiology* **87**, 206-210

Wingender, R., Rohrig, H., Horicke, C., Wing, D., und Schell, J. (1989) Differential regulation of soybean chalcone synthase genes in plant defense, symbiosis and upon environmental stimuli. *Molecular Genetics and Genomics* **218**, 315-322

Wink, M. (1999) Biochemistry of plant secondary metabolism - Annual plant reviews, part 2. CRC Press, London

Xu P., Zhang Y., Kang L., Roossinck M. J., Mysore K. S. (2006) Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiology* **142**, 429–440

Yoo, B C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y. M., Lough, T. J., Lucas, W. J. (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *The Plant Cell* **16**, 1979–2000

Yoshida, Y., Tamura, H. (2005) Variation in concentration and composition of anthocyanins among strawberry cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **74**, 36-41

Zabala, G., Zou, J., Tuteja, J., O Gonzalez, D., Clough, S. J., O Vodkin L. (2006) Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biology* **6**, 26 doi:10.1186/1471-2229-6-26

Zeyen, R. J., Bushnell, W. R., Carver, T. L. W., Robbins, M. P., Clark, T. A., Boyles, D. A., Vance, C. P. (1995) Inhibiting phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase suppresses *Mla1* (HR) but not *mlo5* (non-HR) barley powdery mildew resistances. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **47**, 119-140

Zubieta, C., He, X. Z., Dixon, R. A., Noel, J. P. (2001) Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases. *Nature Structural & Molecular Biology* **8**, 271-279

Zubieta, C., Kota, P., Ferrer, J.-L., Dixon, R. A., Noel, J.P. (2002) Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. *The Plant Cell* **14**, 1265-1277

Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* **31**, 3406-15

6 Anhang

CHS PP4_C5 ORF genomische DNA *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta 1172 bp
ATGGTGACCGTTGAGGAAGTCCGCAAGGCTCAACGTGCCGAGGGTCCGG
CCACCGTCTTGCCATCGGGACTGCAACTCCTCCCAACTGTATTGACCAG
AGCACGTACCCCGACTACTACTTCCGTATCACCAACAGCGAGCACAAGGC
TGAGCTCAAGGAGAAATTCCAGCGCATGTGTGACAAATCTATGATCAAGAA
GCGTTACATGTATTTGACTGAAGAAATTCTCAAAGAGAATCCTAGCATGTG
TGAGTACATGGCACCTTCACTTGATGCAAGACAAGACATGGTGGTGGTTG
AAATTCCAAAGCTTGGAAGAGAGGCCGCTGTCAAGGCCATTAAGGAATGG
GGTCAGCCCAAGTCCAAAATCACTCACTTGGTCTTTTGTACCACTAGTGGT
GTCGACATGCCCGGTGCCGATTACCAGCTCACGAAGCTCTTGGGTCTCCG
CTCGTCCGTCAAGCGTCTCATGATGTACCAGCAAGGCTGTTTCGCCGGAG
GCACGGTGCTCTGGTTGGCAAAGACTTGGCTGAGAACAACCGGGGGGC
ACGTGTTCTAGTTGTTTGGCTCTGAGATCACTGTCGTGACCTTCCGTGGGCC
TAGCGACACCCATCTCGATAGTCTTGTGGGCCAAGCCTTGTTCCGGTGATG
GTGCCGCGGCCATTATTGTTGGGTCCGACCCATTGCCTGAGGTTGAGAGG
CCTTTGTTTGAGCTGGTCTCAGCGGCCCAAACCTATCCTTCCCGATAGTGAC
GGGGCCATCGACGGGCATCTTCGTGAAGTTGGGCTCACATTTACCTCCT
CAAAGATGTTCCCGGGCTGATTTCGAAGAACATCGAGAAGAGCCTCAACG
AGGCCTTCAAGCCTTTGAACATTACCGACTGGAACCTCACTTTTCTGGATTG
CACACCCCGGTGGCCCAGCAATTCTGGACCAAGTTGAGGCTAAATTGGCC
CTCAAGCCTGAGAAGTTAGAAGCCACGAGGCATATCCTATCTGAGTATGG
AAACATGTCTAGTGCTTGTGTGTTGTTTATTTTGGACGAGGTGAGGAGGAG
GTCTGCAGCTAATGGGCACAAGACCACCGGAGAGGGAAAGGAGTGGGGT
GTTCTGTTTGGGTTCCGGCCTGGGCTCACCGTCGAGACCGTTGTGCTTCA
CAGTGTGGCTGCTTGAAA

Sequenz CHSA partielle cDNA aus *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta 240 bp
ATGGTGACCGTTGAGGAAGTCCGCAAGGCTCAACGCGCTGAGGGTCCGG
CCACCGTCTTGCCATCGGGACCGCAACTCCTCCCAACTGTATTGACCAG
AGCACGTACCCCGACTACTACTTTCGTATCACCAACAGCGAGCACAAGGC
TGAGCTCAAGGAGAAATTCCAGCGCATGTGTGACAAATCTATGATCAAGAA
GCGTTACATGTATTTGACTGAAGAAATTCTCAAAGAGAAT

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Gregor Konstantin Kalinowski
Geburtsdatum 28.07.1977
Geburtsort Ludwigshafen
Staatsangehörigkeit deutsch
Anschrift Erdinger Str. 56a
85356 Freising

Hochschulausbildung

2004-2007 Promotion am Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmittel-
technologie der Technischen Universität München bei
Univ.-Prof. Dr. W. Schwab. Thema der Dissertation:
„Etablierung einer RNAi-Methode zur funktionellen
Genomik in Erdbeeren“

2002-2004 Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel an der
Technischen Universität München.
Abschluss: Master of Science

1997-2002 Fachhochschulstudiengang Lebensmitteltechnologie mit
Vertiefung in der Fachrichtung Biotechnologie an der
Technischen Universität München.
Abschluss: Dipl.-Ing. (FH)

Schulbildung

1991-1996 Theodor-Heuss-Gymnasium Wolfenbüttel
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1987-1991 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Hamm

1983-1987 Grundschule

Wehrdienst

1996-1997 PZLBTL 93, Munster