

Die Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase
aus *Brassica napus*



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Diana Weier, geb. Schmidt

geb. am 26.08.1974 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter:

1. Prof. Dr. K. Humbeck
2. Prof. Dr. D. Strack
3. Prof. Dr. U. Sonnewald

verteidigt am 02.11.2006 in Halle (Saale)

urn:nbn:de:gbv:3-000011015

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011015>]

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Metabolismus der Sinapatester	2
1.2. Akkumulation der Sinapatester und Enzymaktivitäten	4
1.3. Die Gene der Sinapatesterbiosynthese	5
1.4. Serin-Carboxypeptidase-ähnliche Acyltransferasen	7
1.5. Das Genom von <i>Brassica napus</i>	9
1.6. Zielstellung der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Material	12
2.1.1. Pflanzen	12
2.1.2. Mikroorganismen	13
2.1.3. Oligonucleotide	14
2.1.4. Plasmide	15
2.1.5. Chemikalien und Enzyme	17
2.1.6. Antikörper	17
2.1.7. Geräte	18
2.2. Kultivierung, Transformation und Selektion von Pflanzen	18
2.2.1. <i>A. thaliana</i>	18
2.2.2. <i>B. napus</i>	19
2.2.3. <i>N. tabacum</i>	19
2.3. Kultivierung, Transformation und Selektion von Mikroorganismen	20
2.3.1. <i>E. coli</i>	20
2.3.2. <i>S. cerevisiae</i>	21
2.3.3. <i>A. tumefaciens</i>	21
2.4. Isolierung und Auftrennung von Nukleinsäuren	21
2.4.1. Isolierung von RNA	21
2.4.2. Isolierung von genomischer DNA	22
2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA	22
2.4.4. Isolierung von BAC-DNA	23
2.4.5. Trennung von DNA und RNA über Agarose-Gele	23
2.4.6. Trennung von RNA über Formaldehydgel	23

2.4.7.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	24
2.4.8.	Reinigung von DNA	24
2.5.	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	24
2.5.1.	Restriktionsanalyse	24
2.5.2.	Ligation	24
2.5.3.	Dephosphorylierung	25
2.5.4.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.5.5.	Radioaktive DNA-Markierung	26
2.5.6.	Nicht-radioaktive DNA-Markierung	27
2.5.7.	Sequenzierung und Analyse der DNA	27
2.6.	Immobilisierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren	27
2.6.1.	Blotaufbau	27
2.6.2.	Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde	28
2.6.3.	Hybridisierung mit einer nicht-radioaktiven Sonde	28
2.6.4.	Southern-Analyse	29
2.6.5.	Northern-Analyse	29
2.6.6.	Isolation von BAC-Klonen durch Screening von Macroarrays	29
2.6.7.	Koloniehybridisierung	30
2.7.	Biochemische Methoden und Analytik	30
2.7.1.	Proteinextraktion	30
2.7.2.	Aufkonzentrierung von Proteinen	32
2.7.3.	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	32
2.7.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese(SDS-PAGE)	32
2.7.5.	Färbung von Proteinen	32
2.7.6.	Western Blot-Analyse	33
2.7.7.	SCT-Aktivitätstest	34
2.7.8.	Extraktion der Sinapatester	34
2.7.9.	Analytische HPLC	34
2.8.	Screening einer cDNA-Bank	34
2.9.	5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	35
2.10.	Genome walking	36
2.11.	Screening einer genomischen Bank von <i>B. napus</i>	36
2.12.	Analyse von Promotoraktivitäten in Pflanzen	37
2.13.	Heterologe Proteinexpression	37
2.13.1.	Expression in <i>E. coli</i>	37
2.13.2.	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	38
2.13.3.	Expression in <i>N. tabacum</i>	39
2.14.	Cytologische Methoden	39
2.14.1.	Lichtmikroskopische Methoden	39
2.14.2.	Elektronenmikroskopische Methoden	42

2.15. Statistische Auswertungen	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Klonierung einer <i>BnSCT</i> -cDNA und Sequenzanalysen	44
3.2. Komplementation einer SCT-defizienten Mutante	47
3.3. Heterologe Expression von <i>BnSCT1</i>	49
3.3.1. Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	49
3.3.2. Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	52
3.3.3. Heterologe Expression in <i>N. tabacum</i>	53
3.4. Molekulare Charakterisierung der <i>BnSCT</i> -Gene	55
3.4.1. Transkriptakkumulation im Verlauf der Samenentwicklung	55
3.4.2. Genomische Struktur der <i>BnSCT</i> -Gene	56
3.4.3. Analyse der Promotoraktivität	62
3.5. Reduktion des Sinapingehaltes durch PTGS	64
3.6. Immunlokalisierung der BnSCT	67
3.6.1. Herstellung eines Peptidantikörpers	67
3.6.2. Lokalisierung der BnSCT mittels Lichtmikroskopie	70
3.6.3. Lokalisierung der BnSCT mittels Elektronenmikroskopie	75
4. Diskussion	77
4.1. Gene und Sequenzanalysen	77
4.2. Heterologe Expression von <i>BnSCT1</i>	80
4.3. Reduktion des Sinapingehaltes	83
4.4. Immunlokalisierung der BnSCT in <i>B. napus</i>	85
4.5. Weiterführende Arbeiten	90
5. Zusammenfassung	91
6. Literaturverzeichnis	93
A. Anhang	105

Abbildungsverzeichnis

1.1. Biosynthese der Sinapatester in Brassicaceen	3
1.2. Samenstadien <i>B. napus</i>	4
1.3. Akkumulation der Sinapatester und Enzymaktivitäten in <i>B. napus</i>	4
1.4. Reaktionsmechanismus der katalytische Triade	8
1.5. Zusammensetzung der Genome von <i>Brassica</i> -Arten	9
3.1. Sequenzvergleich der 5'-unvollständigen putativen <i>BnSCT</i> -cDNAs	45
3.2. Nukleotidsequenz des 5'Race-Fragments	45
3.3. Sequenzvergleich der abgeleiteten SCT-Proteine	46
3.4. Sequenzvergleich der <i>BnSCT1</i> mit anderen SCPL-Proteinen	47
3.5. Expressionskonstrukt für die Komplementation in <i>A. thaliana</i>	48
3.6. Komplementation der SCT-defizienten <i>A. thaliana</i> -Mutante SALK 002255	49
3.7. Heterologe Expression von <i>BnSCT1</i> in pQE60/M15[pRep4]	50
3.8. Heterologe Expression von <i>BnSCT1</i> in pET28a/BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	51
3.9. Heterologe Expression von <i>BnSCT1</i> in <i>S. cerevisiae</i>	52
3.10. Nachweis des <i>BnSCT1</i> -Transkripts in <i>S. cerevisiae</i>	53
3.11. Heterologe Expression von <i>BnSCT1</i> in <i>N. tabacum</i>	54
3.12. Transkriptakkumulation von <i>BnSCT</i>	55
3.13. Southern-Analyse der <i>SCT</i>	56
3.14. Exon-Intron-Struktur von <i>BnSCT1</i> und <i>SNG2</i>	57
3.15. Schematische Darstellung der 5'Region der SCT-Gene	58
3.16. PCR-Analyse der BAC-Klone aus <i>B. napus</i>	60
3.17. Schematische Darstellung des BAC-Subfragmentes aus Klon 5	61
3.18. Schematische Darstellung der BAC-Subfragmente aus Klon 4	62
3.19. Promotor:GUS-Fusionskonstrukt	62
3.20. Analyse der Promotoraktivität	63
3.21. Zelluläre Verteilung der GUS-Aktivität	64
3.22. RNAi-Konstrukt für die SCT-Suppression	65
3.23. Sequenzidentität des <i>BnSCT</i> -RNAi-Fragments zu <i>SNG2</i>	65
3.24. Reduktion des Sinapingehaltes in <i>A. thaliana</i>	67
3.25. Abgeleitete Proteinsequenz von <i>BnSCT1</i> aus <i>B. napus</i>	68
3.26. Enzymaktivität der <i>BnSCT</i> während der Samenentwicklung	68

3.27. Test des Peptidantikörpers im Western Blot	69
3.28. Immunlokalisierung der BnSCT	70
3.29. Spezifitätstest des Anti-BnSCT-Antikörpers in reifen Samen	71
3.30. Identifizierung der Zellorganellen im Samen von <i>B. napus</i>	72
3.31. Lokalisierung der BnSCT und Oleosin	73
3.32. Kolokalisierung der BnSCT und Plastiden-Stärke	74
3.33. Zelle	75
3.34. Elektronenmikroskopische Lokalisierung der BnSCT	76
4.1. Schematische Darstellung des Phenylpropanoid-Stoffwechsels in <i>A. thaliana</i>	86
A.1. Nukleotidsequenzen der cDNA-Klone SCP1, SCP2 und SCP3	105
A.2. Sequenzvergleich der <i>full length BnSCT</i> -cDNAs	106
A.3. Genomische Sequenz von <i>BnSCT1</i> aus <i>B. napus</i>	107
A.4. Genomische Sequenz von <i>BnSCT2</i> aus <i>B. napus</i>	108
A.5. Genomische Sequenz von <i>BoSCT</i> aus <i>B. oleracea</i>	109
A.6. Genomische Sequenz von <i>BrSCT</i> aus <i>B. rapa</i>	110
A.7. Nukleotidsequenz von 5' <i>BnSCT1</i> aus <i>B. napus</i>	111
A.8. Nukleotidsequenz von 5' <i>BrSCT</i> aus <i>B. rapa</i>	111
A.9. Nukleotidsequenz von 5' <i>BoSCT1</i> aus <i>B. oleracea</i>	112
A.10. Nukleotidsequenz von 5' <i>BoSCT2</i> aus <i>B. oleracea</i>	113
A.11. Sequenzvergleich der genomischen 5'-Bereiche	114
A.12. Nukleotidsequenz von 3' <i>BnSCT1</i> aus <i>B. napus</i>	115
A.13. Nukleotidsequenz von 3' <i>BnSCT2</i> aus <i>B. napus</i>	115
A.14. Nukleotidsequenz von 3' <i>BrSCT</i> aus <i>B. rapa</i>	115
A.15. Nukleotidsequenz von 3' <i>BoSCT1</i> aus <i>B. oleracea</i>	116
A.16. Nukleotidsequenz von 3' <i>BoSCT2</i> aus <i>B. oleracea</i>	116
A.17. Nukleotidsequenz des BAC5-Subfragmentes	117
A.18. Nukleotidsequenz des 3'BAC4-Subfragmentes	119
A.19. Nukleotidsequenz des 5'BAC4-Subfragmentes	121

Tabellenverzeichnis

2.2. Generelles Schema für PCR	26
2.3. Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele	33
2.4. Fixierung und Einbettung in PEG	40
2.5. Kanalbelegung am Konfokalmikroskop	42
2.6. Fixierung und Einbettung in LRWhite	43
4.1. Übersicht der isolierten Sequenzen	79

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bn	<i>Brassica napus</i>
Bo	<i>Brassica oleracea</i>
bp	Basenpaare
Br	<i>Brassica rapa</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	konfokales Laserscanningmikroskop
kDa	Kilodalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -galactopyranosid
Kat	Katal (Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
kb	Kilobasenpaare
kJ	Kilojoule
LB	Luria-Bertani Medium
M	molar

μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	millimolar
μM	mikromolar
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NaPi	Natriumphosphatpuffer
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIS	Präimmunserum
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % (v/v) Tween-20
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumeneinheiten
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Einheit der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

Raps (*Brassica napus*) nimmt unter den zehn wichtigsten Ölsaaten der Welt hinter der Sojabohne den zweiten Platz ein und stellt somit einen bedeutenden Rohstoff für den Ernährungssektor, die Futtermittelindustrie sowie für die Biodiesel-Produktion und Oleochemie dar (FAO¹, 2005). Durch Züchtung erucasäurefreier und glucosinolatärmer Sorten (sog. 00-Qualität) hat Raps weltweit eine große Anbaubedeutung erlangt. Dies beruht neben den züchterischen Qualitätsverbesserungen auch auf der Tatsache, dass verschiedene Sorten von Sommer- und Winterraps an unterschiedlichen Standorten der Welt gedeihen. In Deutschland dominiert der Winterrapsanbau, bedingt durch das hohe Ertragsvermögen, das insbesondere den Winterraps unter nord- und mitteleuropäischen Klimaverhältnissen auszeichnet.

Im Gegensatz zur Sojabohne wird Raps in erster Linie als Öllieferant angebaut. Der größte Teil des angebauten Rapses wird dabei zu ernährungsphysiologisch empfohlenen, hochwertigen Speiseölen verarbeitet. Durch die züchterische Reduktion des Glucosinolatgehaltes wurde jedoch auch die Verwertung des proteinreichen Rückstandes der Ölextraktion, des sogenannten Rapsschrots bzw. Rapsmehls, in der Futtermittelindustrie ermöglicht (Downey und Bell, 1990). Das Rapsprotein ist reich an essentiellen Aminosäuren und daher quantitativ und qualitativ vergleichbar mit dem Sojaprotein (Ohlson, 1978). Die Verwendung als Futtermittelzusatz ist jedoch limitiert durch antinutritive Stoffe wie Tannine (Polyphenole), Phytate und phenolische Ester (Bell, 1993; Griffiths et al., 1998). Den Hauptanteil der phenolischen Ester liefert das Sinapoylcholin (Sinapin), das während der Samenentwicklung in großen Mengen akkumuliert und dessen Gehalt im Rapsmehl durchschnittlich bei 1-2 % liegt (Bell, 1993). Neben der durch Komplexbildung hervorgerufenen Minderung der Proteinverdaulichkeit sind die phenolischen Ester für den bitteren Geschmack und die adstringierenden Eigenschaften sowie die dunkle Farbe von Rapsschrotprodukten verantwortlich (Blair und Reichert, 1984; Bouchereau et al., 1991; Naczek et al., 1998). Ein spezifisches Problem ergibt sich bei der Fütterung von Geflügel mit Rapsschrot. Bestimmte Legehennen-Rassen sind aufgrund eines genetischen Defekts nicht in der Lage Trimethylamin, ein Abbauprodukt des Sinapins zu metabolisieren (Pearson et al., 1980). Diese Verbindung gelangt in die Eier und wirkt stark antinutritiv in dem sie Fischgeruch verursacht (Bell, 1993). Um Raps als Proteinpflanze in vollem Umfang nutzbar zu machen, ist demnach eine Reduktion des Sinapingehaltes notwendig. Die Untersuchung von

¹http://www.fao.org/es/esc/en/20953/21017/highlight_27527en.html

549 genotypisch divergenten Winterraps-Samenproben ergab eine natürliche Variation des Sinapingehaltes zwischen 3,5 und 13 mg/g Samen, die jedoch nicht stabil vererbt wurde (Zum Felde et al., 2003). Da der Metabolismus der Sinapatester bekannt ist, könnte auf biotechnologischem Wege eine stabile Reduktion des Sinapingehaltes erreicht werden.

1.1. Metabolismus der Sinapatester

Die Biosynthese der meisten pflanzlichen Phenole geht von der Aminosäure L-Phenylalanin aus, die durch den Shikimisäure-Soffwechselweg gebildet wird (Herrmann und Weaver, 1999). Im Verlaufe des sogenannten generellen Phenylpropanstoffwechsels wird diese Aminosäure in Zimtsäure bzw. 4-Cumarsäure umgewandelt. Ausgehend von der 4-Cumarsäure wird über ein komplexes metabolisches Netzwerk Sinapinsäure gebildet (Ruegger und Chapple, 2001; Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002b; Nair et al., 2004). Die verschiedenen Hydroxyzimtsäuren sind zentrale Zwischenprodukte des phenolischen Stoffwechsels und dienen in verschiedenen Stoffwechselwegen als Ausgangsprodukt für die Synthese weiterer phenolischer Verbindungen. In vielen Pflanzen akkumulieren sie jedoch auch in Form verschiedener Konjugate als Endprodukte (Strack und Mock, 1993). Für die Familie der *Brassicaceae* (Kreuzblütler) ist das Auftreten löslicher Sinapatester typisch. In den meisten Brassicaceen akkumulieren drei Hauptprodukte des Phenylpropanstoffwechsels, Sinapin, Sinapoyl-L-malat (Sinapoylmalat) und deren gemeinsamer Vorläufer 1-O-Sinapoyl- β -D-glucose (Sinapoylglucose). Die Biosynthese der Sinapatester wurde in der Vergangenheit durch Analysen in Modellorganismen wie *Raphanus sativus*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa* und *Brassica napus* aufgeklärt.

Sinapoylglucose, Sinapoylmalat und Sinapin sind Bestandteile eines gemeinsamen Stoffwechselweges (Abbildung 1.1), in den vier Enzyme involviert sind, eine Glucosyltransferase [UDP-Glucose:Sinapinsäure Glucosyltransferase (SGT)], zwei Acyltransferasen [1-O-Sinapoyl- β -D-glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT) und 1-O-Sinapoyl- β -D-glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (SMT)] sowie eine Sinapinesterase (SCE). Ausgangsprodukt des Stoffwechselweges ist die Sinapinsäure. Diese wird durch die SGT unter Verbrauch von UDP-Glucose zu Sinapoylglucose verestert (Strack, 1980; Nurmman und Strack, 1981; Wang und Ellis, 1998; Milkowski et al., 2000a). Das hohe Gruppenübertragungspotential energiereicher β -Acetalesters für den Sinapolyrest (-35,7 kJ/Mol) wird durch spezifische Acyltransferasen in nachfolgenden Umesterungsreaktionen genutzt (Mock und Strack, 1993). Während der Samenentwicklung katalysiert die SCT die Transacylierung von Sinapoylglucose zu Sinapin (Strack et al., 1983; Regenbrecht und Strack, 1985; Shirley et al., 2001). Sinapin akkumuliert in den Embryos und wird während der Keimung durch die Sinapinesterase gespalten (Nurmman und Strack, 1979; Strack, 1980). Während das dabei entstehende Cholin zu etwa 50 % in die Synthese von Phosphatidycholin eingeht (Strack, 1981), wird die freigesetzte Sinapinsäure über Sinapoylglucose (Strack, 1980; Nurmman

und Strack, 1981) durch die SMT zu Sinapoylmalat konjugiert (Tktotz und Strack, 1980; Strack, 1982; Chapple et al., 1992; Mock et al., 1992; Lehfeldd et al., 2000). Sinapoylmalat akkumuliert in den Vakuolen der Mesophyll- und Epidermiszellen der Blätter (Strack et al., 1985; Hause et al., 2002) und spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Schutz vor schädigender UV-Strahlung (Li et al., 1993; Landry et al., 1995; Sheahan, 1996; Booij-James et al., 2000).

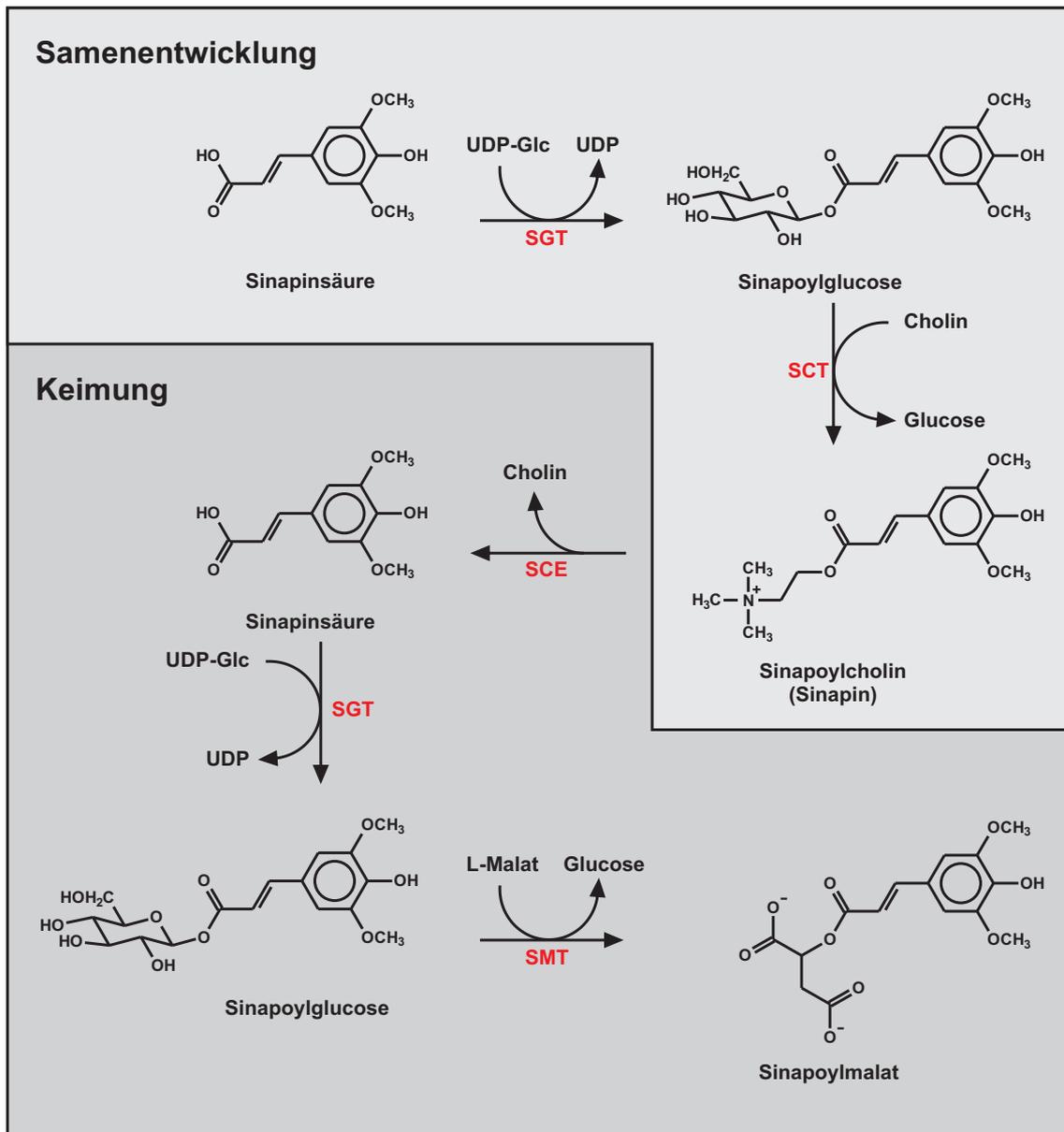


Abbildung 1.1.: Biosynthese der Sinapatester in Brassicaceen (Milkowski et al., 2004; modifiziert). SGT: UDP-Glucose:Sinapinsäure Glucosyltransferase (EC 2.4.1.120), SCT: 1-O-Sinapoyl- β -D-glucose:Cholin-Sinapoyltransferase, (EC 2.3.1.91), SMT: 1-O-Sinapoyl- β -D-glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.92), SCE: Sinapinesterase (EC 3.1.1.49).

1.2. Akkumulation der Sinapatester und Enzymaktivitäten

Die Samenentwicklung in höheren Pflanzen ist in drei Hauptphasen unterteilt (Goldberg et al., 1989; Thomas, 1993; vgl. Abbildung 1.2). Während der frühen Embryogenese durchläuft der Embryo eine Reihe von Zellteilungen, und alle Grundstrukturen des Embryos werden angelegt (Mayer et al., 1991). Nach einer Wachstumsphase stoppt die Zellteilung (Goldberg et al., 1994) und der Samen tritt in die Reifephase ein. Während der Reifephase kommt es zur Akkumulation von Reservestoffen wie Speicherproteinen, Kohlenhydraten und Fetten. Zuletzt wird der Samen dormant und tolerant gegenüber Austrocknung.

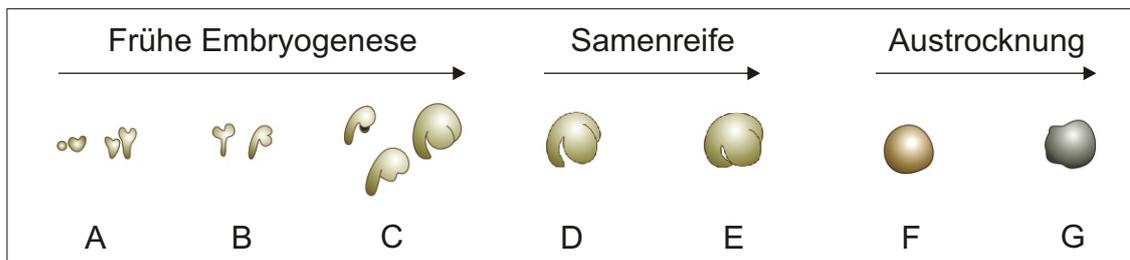


Abbildung 1.2.: Stadien der Samenentwicklung über zwei Monate: A, globuläres und Torpedostadium; B, frühes Kotyledonenstadium bis zum „walking stick“; C, mittleres Kotyledonenstadium; D, voll ausgebildetes Kotyledonenstadium, weiche Samenschale; E, voll ausgebildeter Embryo, Beginn der Austrocknung, harte Samenschale; F, Samen mit brauner Schale, Embryo gelb; G, trocknete Samen, Samenschale schwarz

Die Akkumulation der Sinapatester sowie die Aktivität der involvierten Biosynthese-Enzyme wurde während der Samen- und Keimlingsentwicklung in *B. napus* von Milkowski et al. (2004) untersucht (Abbildung 1.3).

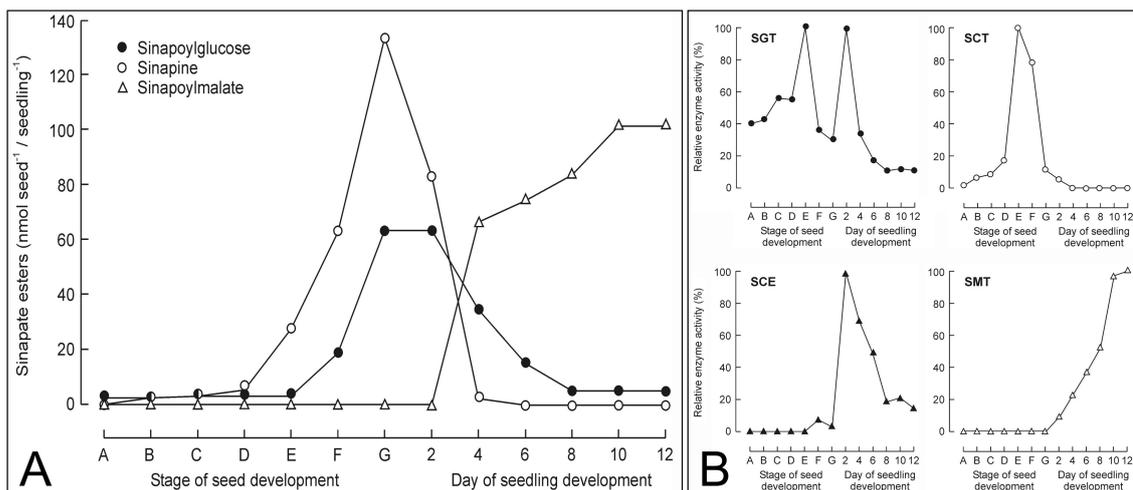


Abbildung 1.3.: Akkumulation der Sinapatester und Enzymaktivitäten in *B. napus* (Milkowski et al., 2004). SGT: UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.120), SCT: 1-O-Sinapoyl- β -D-glucose:Cholin-Sinapoyltransferase, (EC 2.3.1.91), SMT: 1-O-Sinapoyl- β -D-glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.92), SCE: Sinapinesterase (EC 3.1.1.49).

In den frühen Stadien der Embryogenese (Stadium A) wurde ausschließlich Sinapoylglucose in Spuren nachgewiesen. Die Sinapinsynthese beginnt hingegen erst im frühen Kotyledonenstadium (Stadium B). Während der Differenzierung der Keimblätter (Stadium B und C) steigt der Gehalt an Sinapoylglucose und Sinapin an, einhergehend mit einer raschen Größenzunahme der Keimblätter. Im voll entwickelten Embryo (Stadium D) beginnt Sinapin zu akkumulieren. Diese Akkumulation geht in den folgenden Samenstadien mit einem Anstieg an Sinapoylglucose einher (Stadium E bis G). Sinapoylmalat konnte während der gesamten Samenentwicklung nicht gefunden werden. Die frühe Keimlingsentwicklung ist durch eine schnelle Sinapinabnahme charakterisiert, worauf eine Akkumulation von Sinapoylmalat folgt. Die durch die Sinapinesterase (SCE) aus Sinapin im Keimling freigesetzte Sinapinsäure wird unmittelbar durch die SGT mit Glucose zu Sinapoylglucose umgesetzt und fließt in die SMT-katalysierte Bildung von Sinapoylmalat ein. Im sechs Tage alten Keimling ist kein Sinapin mehr nachweisbar.

Alle Enzymaktivitäten, die in diese Biosynthese involviert sind, korrelieren mit dem Akkumulationsmuster der Sinapatester. Die höchste Enzymaktivität der SGT und SCT wurde in voll entwickelten grünen Embryos zu Beginn der Austrocknung gefunden (Stadium E). Während der Samenentwicklung wurde nur eine sehr geringe Sinapinesterase-Aktivität detektiert. Diese steigt jedoch während der Keimung schnell an und erreicht ihren Höhepunkt zwei Tage nach der Aussaat. Danach sinkt sie wieder auf ein niedriges Niveau. Die Aktivität der SMT, welche für die Bildung von Sinapoylmalat verantwortlich ist, wurde erstmals in zwei Tage alten Keimlingen nachgewiesen, wenn die SGT ihr zweites Aktivitätsmaximum erreicht hat. Danach sinkt die SGT-Aktivität, während die Aktivität der SMT kontinuierlich bis zum zehnten Tag steigt und sich dann auf ein relativ konstantes Niveau einstellt.

1.3. Die Gene der Sinapatesterbiosynthese

Im Gegensatz zu dem vielfältigen Wissen über die biochemischen Aspekte des Stoffwechsels der Sinapatester war über die involvierten Gene und ihre Regulation lange Zeit nichts bekannt. In den letzten Jahren konnten jedoch einige Gene identifiziert werden. So wurden durch Methoden der reversen Genetik cDNAs isoliert, die für die SGT aus *B. napus* (Milkowski et al., 2000a) und *A. thaliana* (Milkowski et al., 2000b; Lim et al., 2001) codieren. Da keine N-terminalen Signalsequenzen identifizieren werden konnten, geht man davon aus, dass das Enzym in Analogie zu anderen Glucosyltransferasen im Cytoplasma lokalisiert ist (Wang und Ellis, 1998)

Für die Isolierung der Gene, die die Acyltransferasen SMT und SCT codieren, hatte die Analyse von Mutanten große Bedeutung. Durch Screening von chemisch mutagenisierten *A. thaliana*-Mutanten wurden anhand einer veränderten Fluoreszenz der methanolischen

Blattextrakte zwei Linien identifiziert, die in ihren Blättern Sinapoylglucose anstelle von Sinapoylmalat akkumulieren (Lorenzen et al., 1996). Das für diese Mutation verantwortliche Gen wurde *Sinapoylglucose Accumulator 1 (SNG1)* genannt. Die Klonierung des Gens gelang durch inverse PCR ausgehend von einer T-DNA-Insertionsmutante, die den oben beschriebenen Phänotyp aufweist (Lehfeldt et al., 2000). Sequenzanalysen zeigten sechs mögliche N-Glykosilierungsstellen entsprechend der Consensussequenz N-X-S/T, sowie eine N-terminale Signalsequenz, welche eine subzelluläre Lokalisation der SMT in der Vakuole vermuten läßt. Diese Annahme wurde später durch Immunlokalisierung bestätigt (Hause et al., 2002). Durch die hohe Sequenzidentität zu Serincarboxypeptidasen wurde die SMT in die Klasse der SCPL-Proteine (*serine carboxypeptidase like proteins*) eingeordnet (Abschnitt 1.4).

Erste Sequenzinformationen über die SCT lieferte die Reinigung des Enzyms aus dunkelgrünen voll entwickelten Samen von *B. napus* (Vogt et al., 1993). Ein 28-kDa Peptid wurde als eine Untereinheit des SCT-Proteins identifiziert, welches, so die Annahme, in der Pflanze als Dimer vorliegt. Ausgehend von dieser Untereinheit wurden vier Peptidsequenzen erhalten (IDGES; NLYLEDPAQ; IVPGAAQQILLGNRK und GYVLGNPAV). Das erste vollständige für die SCT codierende Gen wurde aus *A. thaliana* isoliert (Shirley et al., 2001). Hierbei kam ein ähnliches Verfahren, wie bei der Identifizierung des SMT-Gens zur Anwendung. Durch die Analyse von methanolischen Samenextrakten chemisch mutagenisierter *A. thaliana* Mutanten konnte eine Linie identifiziert werden, welche im Samen Sinapoylglucose anstelle von Sinapin akkumuliert. Das verantwortliche Gen wurde *Sinapoylglucose Accumulator 2 (SNG2)* genannt. Da die SMT und die SCT ähnliche Transacylierungen katalysieren, ging man davon aus, dass es sich bei der SCT ebenfalls um ein SCPL-Protein handeln könnte. Durch eine Kombination aus Karten-gestützter Klonierung (*map-based cloning*) und Kandidaten-Gen Analyse gelang es, das *SNG2*-Gen zu identifizieren. Sequenzanalysen zeigten auch für die SCT putative Glykosilierungsstellen und eine N-terminale sekretorische Signalsequenz für die post-translationale Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum. Dies läßt, wie bei der SMT, eine subzelluläre Lokalisation in der Vakuole vermuten. Weiterhin wurde bestätigt, dass es sich bei der SCT um ein SCPL-Protein handelt. Shirley und Chapple (2003) beschreiben, dass das Enzym in der Pflanze als Heterodimer, bestehend aus einer 30 kDa und einer 17 kDa Untereinheit, vorliegt.

Über das letzte fehlende Glied in der Kette des Stoffwechsels der Sinapatester, die Sinapinesterase (SCE), liegen derzeit keine Sequenzinformationen oder Hinweise auf deren Lokalisierung vor. Die Sinapinesterase aus *Raphanus sativus* wurde in einigen frühen Arbeiten in Protein-Rohextrakten charakterisiert (Nurmann und Strack, 1979; Strack, 1980).

1.4. Serin-Carboxypeptidase-ähnliche Acyltransferasen

Im pflanzlichen Phenylpropanstoffwechsel katalysieren Acyltransferasen die Bildung eines breiten Spektrums von Hydroxyzimtsäurekonjugaten (Ester und Amide), die in höheren Pflanzen akkumulieren und für eine Vielzahl ökologisch relevanter Funktionen wie z. B. UV-Schutz oder Pathogenabwehr essentiell sind (Hahlbrock und Sheel, 1989; Strack und Mock, 1993). Es wurden Acyltransferasen nachgewiesen, die anstelle von Coenzym A-aktivierten Substraten das hohe Gruppenübertragungspotential von 1-O-Glucoseestern der Hydroxyzimtsäuren (-35,7 kJ/Mol) für den Acyltransfer nutzen (Mock und Strack, 1993). Molekulare Daten zeigen hohe Sequenzähnlichkeiten derartiger Transferasen zu Serin-Carboxypeptidasen (SCP). Zu diesen hydrolytischen Enzymen des Primärstoffwechsels zählen z.B. die Carboxypeptidasen I und II aus Gerste (Sorensen et al., 1986, 1987), die Serin-Carboxypeptidase II aus Weizen (Liao und Remington, 1990) und die Carboxypeptidase Y aus Hefe, (Hayashi und Stein, 1973). Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit wurden diese Acyltransferasen als SCPL-Proteine bezeichnet.

Serin-Carboxypeptidasen sind Exopeptidasen, die einzelne Aminosäurereste vom C-Terminus eines Proteins hydrolytisch abspalten. Sie gehören zur hoch divergenten Familie der α/β -Hydrolasen (Ollis et al., 1992). Durch Inhibitor- und Mutagenese-Studien (Hayashi und Stein, 1973; Hayashi et al., 1975; Bech und Breddam, 1989) und durch Kristallisationsanalysen (Liao und Remington, 1990; Liao et al., 1992) konnte die für die Enzymaktivität essentielle katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Histidin, Serin und Aspartat, identifiziert werden. Der Reaktionsmechanismus der katalytischen Triade ist zusammenfassend von Dodson und Wlodawer (1998) beschrieben worden (Abbildung 1.4).

Durch die Interaktion mit dem Imidazol-Stickstoff des Histidins wird das Sauerstoffatom (O_γ) des Serylrestes stark nucleophil und attackiert den Carbonyl-Kohlenstoff des Peptid-Substrates. Dadurch wird die Peptidbindung gespalten und die Aminokomponente freigesetzt. Das dadurch gebildete kovalente Acyl-Enzym-Intermediat wird durch den nucleophilen Angriff von Wasser gespalten, wobei die Peptidkomponente freigesetzt und der reaktive Serylrest des Enzyms regeneriert wird. Dem Aspartylrest der katalytischen Triade wird aufgrund seiner negativen Ladung eine stabilisierende Wirkung zugeschrieben.

Obwohl die SCPL-Acyltransferasen für den Acyltransfer möglicherweise dieselbe katalytische Triade (Ser, His, Asp) wie die Serin-Carboxypeptidasen nutzen (Li und Steffens, 2000; Lehfeldt et al., 2000), zeigen sie keinerlei hydrolytische Aktivität. Derzeit werden zwei alternative Modellvorstellungen zum Reaktionsmechanismus der SCPL-Acyltransferasen diskutiert (Shirley et al., 2001). Zum einen könnte in Analogie zur Hydrolase-Reaktion der Carboxypeptidasen der nucleophile Angriff des aktiven Serylrestes auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Esterbindung erfolgen und zur Ausbildung eines Acyl-Enzym-Intermediates führen. Im Gegensatz zu den Hydrolasen muß in diesem Fall von den Transacylasen der nucleophile Angriff des Wassers auf das Intermediat verhindert werden. Dies könnte durch

den Ausschluss von Wassermolekülen über eine hydrophobe Abschirmung des katalytischen Zentrums erfolgen. Dafür binden diese Enzyme einen zweiten Reaktionspartner, z.B. Malat (SMT) oder Cholin (SCT), der den Intermediat-Komplex angreift. Andererseits werden Mechanismen diskutiert, die der Hydroxylgruppe des zweiten Reaktionspartners einen stärker nucleophilen Charakter als Wasser verleihen, so dass dieser direkt die Esterbindung des Glucoseesters angreifen kann. Ein derartiger Reaktionsmechanismus wurde kürzlich für eine C-C-Hydrolase aus *E. coli* beschrieben, die ebenfalls eine katalytische Triade nutzt (Fleming et al., 2000).

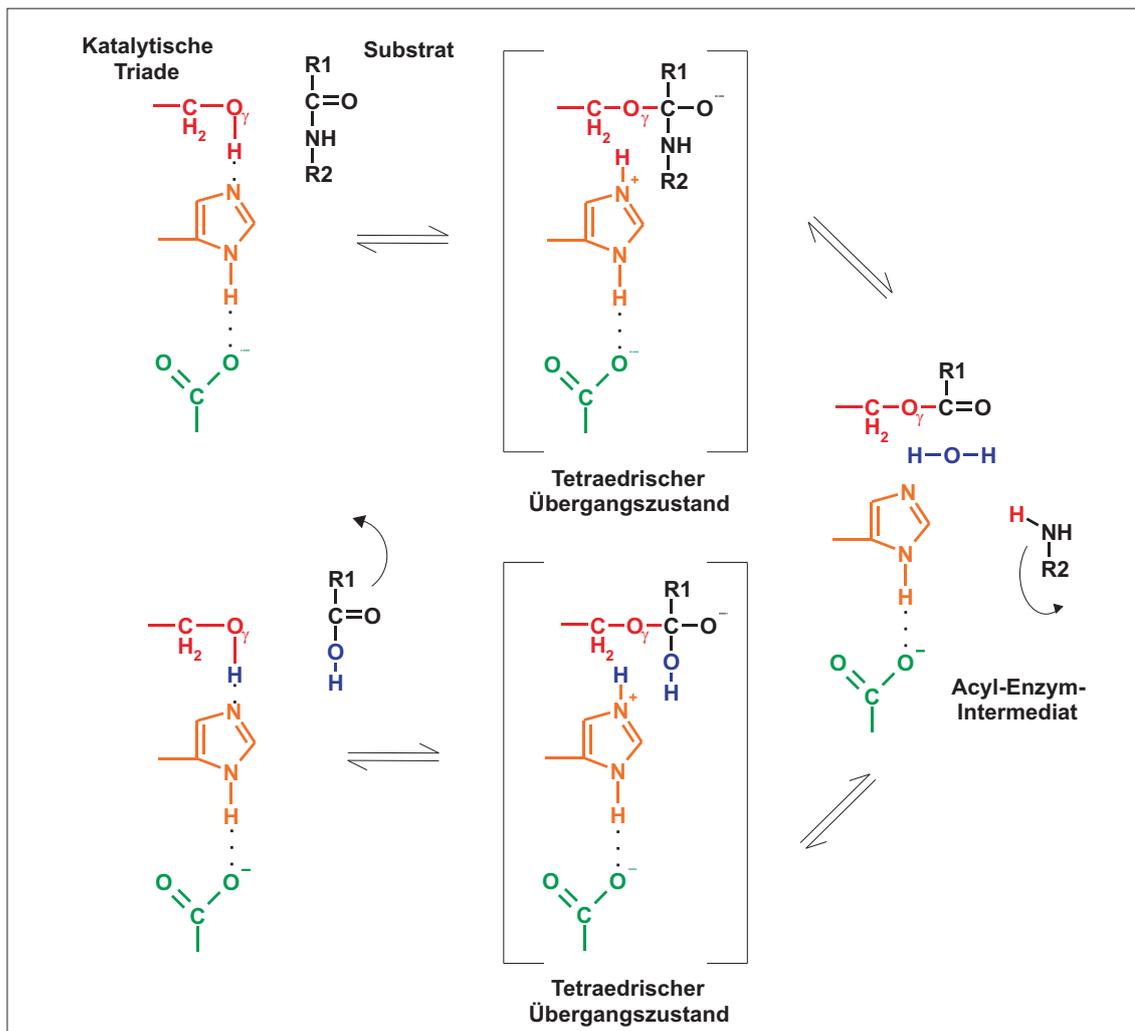


Abbildung 1.4.: Nukleophiler Angriff auf eine Peptidbindung durch die katalytische Triade (Dodson und Wlodawer, 1998; modifiziert). Rot: Serylrest (Nucleophiles Atom: O_γ), Orange: Histidin, Grün: Carboxylgruppe des Aspartats, Blau: Wassermolekül

Erste Sequenzinformationen zu β -Acetalester-abhängigen Acyltransferasen wurden durch die Reinigung und molekulare Charakterisierung einer Isobutyryltransferase aus der Wildtomate (*Lycopersicon penellii*) zugänglich, welche als SCPL-Protein beschrieben wurde (Li et al., 1999; Li und Steffens, 2000). Mit der Klonierung der SMT und SCT aus

A. thaliana wurden zwei weitere Glucoseester-abhängige Acyltransferasen isoliert und als SCPL-Proteine eingeordnet (Lehfeldt et al., 2000; Shirley et al., 2001; Shirley und Chapple, 2003). Kürzlich wurden mit Hilfe computergestützter Methoden anhand von Sequenzhomologien 49 weitere SCPLs aus *A. thaliana* (Milkowski und Strack, 2004; Fraser et al., 2005) und 71 SCPLs aus *O.sativa* (Feng und Xue, 2006) identifiziert.

1.5. Das Genom von *Brassica napus*

Raps (*Brassica napus*) ist eine amphidiploide Art, die durch spontane Hybridisierung von Rübsen [*Brassica rapa* (syn. *campestris*)] und Kohl (*Brassica oleracea*) entstanden ist (U, 1935; vgl. Abbildung 1.5).

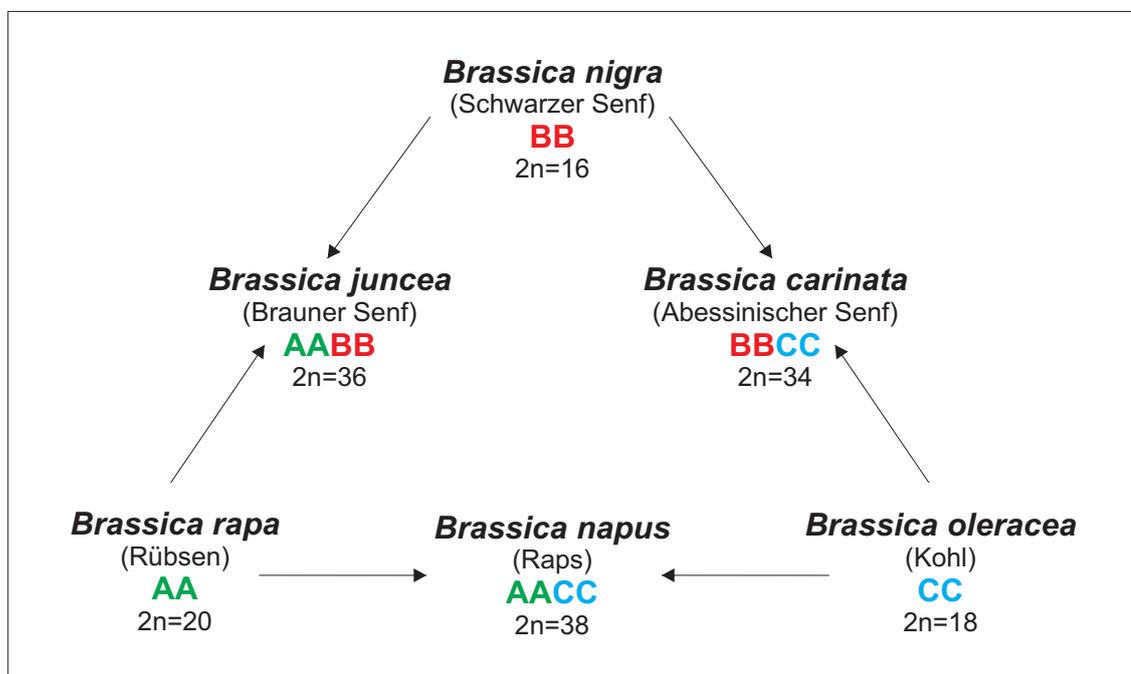


Abbildung 1.5.: Zusammensetzung der Genome von *Brassica*-Arten (U, 1935; modifiziert).

Amphidiploidie (Allotetraploidie) beschreibt eine spezielle Form der Polyploidie, bei der zwei diploide Eltern Genome ein neues Genom bilden. Es wird davon ausgegangen, dass die spontane Bastardierung zwischen Rübsen und Kohl und die nachfolgende Diploidisierung nur wenige Jahrhunderte zurückliegt. Die ältesten archäologischen Funde und urkundlichen Belege für Raps als Ölpflanze datieren in das 16. Jahrhundert zurück (Kroll, 1994). Die Nutzung der diploiden Ausgangsformen *B. rapa* und *B. oleracea* ist durch schriftliche Quellen und prähistorische Funde seit vorchristlicher Zeit belegt (Übersicht bei Körber-Grohne, 1995). Es ist sehr wahrscheinlich, dass *B. napus* seinen Ursprung im Mittelmeerraum, dem gemeinsamen Verbreitungsgebiet der beiden diploiden Ursprungsarten *B. rapa* und *B. oleracea*, hat. Eine weitere Vermutung ist, dass Rapsformen auch in Nordwesteuropa

entstanden sind, denn beide Elternarten kamen früher wild an den Küsten des Atlantiks und der Nordsee vor (Körber-Grohne, 1995). Schließlich weisen verschiedene neuere Befunde darauf hin, dass amphidiploide Rapsformen aus der Kreuzung von *B. rapa* und *B. oleracea* nicht nur einmal, sondern mehrfach an verschiedenen Standorten und mit verschiedenen Formen der diploiden Eltern entstanden sind (Song und Osborn, 1992).

Das amphidiploide Genom von *B. napus* ($2n = 38$, AACCC) enthält den kompletten diploiden Chromosomensatz von *B. rapa* ($2n = 20$, AA) und von *B. oleracea* ($2n = 18$, CC). Die genetisch diploiden *Brassica*-Genome haben sich durch mehrere Polyploidisierungen entwickelt (Lagercrantz und Lydiate, 1996; O'Neill und Bancroft, 2000). Polyploidisierung ist von entscheidender Bedeutung für die Evolution pflanzlicher Genome. 50-70 % der Pflanzengenome sind durch frühere Polyploidisierungen gekennzeichnet, d. h. sie weisen duplizierte oder vervielfachte chromosomale Segmente auf (Wendel, 2000; Adams und Wendel, 2005a,b). Die Analyse der Divergenz duplizierter Genom-Segmente in *A. thaliana* zeigte, dass sowohl die Veränderung der Makrostruktur durch Duplikation und Neuordnung von Chromosomen, als auch die Veränderung der Mikrostruktur durch Translokation, Duplikation oder Verlust von einzelnen Genen oder kleinen Gruppen von Genen, kennzeichnend für die Evolution pflanzlicher Genome ist (Bancroft, 2000).

Das haploide *Brassica*-Genom ist nahezu vollständig aus verdreifachten Segmenten (*triplicated loci*) zusammengesetzt, was auf einen hexaploiden gemeinsamen Vorfahren aller *Brassica*-Arten schließen lässt (Lagercrantz und Lydiate, 1996; Lagercrantz et al., 1996). Vergleichende Untersuchungen mit *A. thaliana* zeigten, dass die *Arabidopsis*-Segmente drei- bis fünffach im *Brassica*-Genom vorhanden sind (O'Neill und Bancroft, 2000). Die chromosomalen Segmente im *Brassica*-Genom weisen im allgemeinen Kolinearität mit den homologen Segmenten aus *Arabidopsis* auf. Sie sind jedoch in ihrer Mikrostruktur durch Genverlust, Translokation und Inversion stark verändert (O'Neill und Bancroft, 2000). Die vergleichende Strukturanalyse der Genome von *B. napus*, *B. rapa* und *B. oleracea* zeigte, dass durch die Hybridisierung im *B. napus*-Genom keine genomische Umstrukturierung erfolgt ist, so dass in *B. napus* die Struktur der Genome von *B. rapa* und *B. oleracea* im wesentlichen konserviert ist (Rana et al., 2004). Die Ergebnisse vergleichender Feinkartierungen weisen andererseits darauf hin, dass in *B. napus* Rekombinationsereignisse zwischen A- und C-Genom in begrenztem Umfang vorkommen und zu einer Veränderung der Mikrostruktur der Genome führen können (Udall et al., 2004).

1.6. Zielstellung der Arbeit

Die Reduktion des Sinapingehaltes in der Rapssaat ist eine Voraussetzung für die wirtschaftliche Verwertbarkeit von Rapsschrotprodukten im Lebensmittelbereich. Dies kann durch die Suppression von Genen, die an der Sinapinsynthese beteiligt sind, erreicht werden. Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem letzten Schritt dieser Biosynthese, der durch das Enzym Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT) katalysiert wird.

Das primäre Ziel war die Klonierung und molekulare Charakterisierung einer BnSCT aus Samen von *B. napus*. Auf dieser Grundlage sollten Strategien zur Hemmung der Sinapinsynthese durch RNAi-vermittelte samenspezifische Suppression der BnSCT-Genexpression erarbeitet und deren Auswirkung auf die Akkumulation von Sinapatestern untersucht werden. Da die BnSCT streng samenspezifisch exprimiert wird, sollte der Promotor des codierenden Gens isoliert und auf Induzierbarkeit im Samen untersucht werden. Samenspezifische Promotoren sind wichtige Elemente für die gentechnische Veränderung der Sameninhaltsstoffe durch molekulare Züchtungsansätze.

Glucoseester-abhängige Acyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels sind zu den hydrolytischen Serin-Carboxypeptidasen homolog (Abschnitt 1.4). Für das Verständnis der molekularen Mechanismen, die den Funktionswechsel dieser Enzyme von Hydrolyse zum Acyltransfer bewirken, ist die Kenntnis der Proteinstruktur einer SCPL-Acyltransferase unerlässlich. In diesem Zusammenhang sollten pro- und eukaryotische Expressionssysteme für die BnSCT getestet werden, um Voraussetzungen für eine spätere Kristallisierung dieses Enzyms zu schaffen.

Über den Ort der Sinapatesterbiosynthese ist bisher wenig bekannt. Abgesehen von der SMT, die als reifes Protein in Vakuolen gefunden wurde (Hause et al., 2002), konnte bisher keines der beteiligten Enzyme einem Zellkompartiment zugeordnet werden. Die Lokalisierung der BnSCT im Samen von *B. napus* könnte neue Aspekte für das Verständnis des komplexen Sinapatester-Metabolismus in der Pflanze liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Pflanzen

Arabidopsis

Als pflanzlicher Modellorganismus diente *Arabidopsis thaliana* L., Ökotyp Columbia. Für die Komplementationsanalysen wurde die im Ökotyp Columbia durch T-DNA Insertion erzeugte Mutante SALK 002255 verwendet. Diese Mutante trägt eine Insertion im *SNG2*-Gens (AT5G09640), welches für das Enzym Sinapoylglucose:Cholin Sinapoyltransferase (SCT) codiert. Durch das Fehlen einer funktionellen SCT ist die Mutante nicht in der Lage Sinapin zu bilden und akkumuliert stattdessen Sinapoylglucose, die neben Cholin als Substrat der SCT fungiert. Diese Eigenschaft ist verantwortlich für die Bezeichnung des Gens [*SNG2*: Sinapoylglucose Akkumulator 2; Shirley et al. (2001)].

Brassica

Die Suppression der *BnSCT* durch RNAi wurde mit der Sommerrapssorte *B. napus* L. cv. Lisora durchgeführt. Das Saatgut wurde freundlicherweise von der Deutschen Saatveredelung AG (DSV, Lippstadt) zur Verfügung gestellt. Für alle molekularbiologischen, biochemischen und immunocytologischen Analysen wurde die Sommerrapssorte *B. napus* L. var. *napus* cv. Drakkar verwendet. Weiterhin kamen für molekularbiologische Analysen die Kohlsorte *B. oleracea* L. var. *medullosa* cv. Markola und die Rübensorte *B. rapa* L. var. *silvestris* cv. Rex zum Einsatz. Das Saatgut wurde freundlicherweise von der Norddeutschen Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ Lembke, Hohenlieth) zur Verfügung gestellt.

Nicotiana

Die Untersuchungen zur heterologen Expression der *BnSCT* in Pflanzen und die Immunlokalisierung des heterologen Enzyms wurden in der Tabak Sorte *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun durchgeführt.

2.1.2. Mikroorganismen

Allgemeine Klonierungsarbeiten (*Escherichia coli*)

XL1 Blue (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proABlacIq^ZΔM15 Tn10 (Tetr^r)]</i>
TOP10 (Invitrogen)	<i>recA1 endA1 F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15ΔlacX74 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r)nupG</i>

Heterologe Expression (*Escherichia coli*)

M15p[Rep4] (Qiagen)	<i>Nal^S Str^S Rif^S Thi⁻ Lac⁻ Ara⁺ Gal⁺ Mtl⁻ F⁻ RecA⁺ Uvr⁺ Lon⁺</i>
BL21-CodonPlus(D3)-RIL (Stratagene)	<i>F⁻ amp^r hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(D3) endA Hte [argU proL leuW Cam^r]</i>

Screening der cDNA-Bank (*Escherichia coli*)

XL1 Blue MRF' (Stratagene)	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
SOLR (Stratagene)	<i>e14⁻(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ^R [F' proAB lacI^qZΔM15] Su⁻ (nonsuppressing)</i>

Heterologe Expression (*Saccharomyces cerevisiae*)

INVSc1 (Invitrogen)	<i>MATa his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52/MATαhis3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>
---------------------	---

Transformation von Pflanzen (*Agrobacterium tumefaciens*)

EHA105 (Hood et al., 1993)	pEHA105 (pTiBo542ΔT-DNA) in C58C1; Rif ^r
C58C1/pMP90 (Koncz und Schell, 1986)	pMP90 (pTiBo542ΔT-DNA) in C58C1; Rif ^r , Gent ^r
GV2260 (McBride und Summerfelt, 1990)	pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA) in C58C1; Rif ^r , Carb ^r
GV3101/pMP90, pSOUP (Koncz und Schell, 1986; Hellens et al., 2000)	pMP90 (pTiBo542ΔT-DNA) und pSOUP in C58C1; Rif ^r , Gent ^r , Tet ^r

2.1.3. Oligonucleotide

Alle benötigte Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Nachfolgend sind die Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Bezeichnung:	Nukleotidsequenz von 5' nach 3':
5'SCTBn	ATGAGAAATCTTTACTTTCTAGTC
3'SCTBn	TCAGAGAGATTACCATCAATCC
5'Sma-Kompl	TATCCCGGGCGGAGAAAATGAGAA
3'Bam-Kompl	TATGGATCCTCAGAGAGATTACCATCAA
5'GeneRacer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
3'GSP1	CCCTTCTTCACGCCTAAAGCTCTGC
5'NestGeneRacer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
3'NestGSP1	GCAGCTTGGAGGAGGTAACGATGATG
5'Nco-RNAi(as)	GTACCATGGATGAGAAATCTTTACTTTCTAGTC
3'Sma-RNAi(as)	GTACCCGGGAGCTCTAAAGGAGGC
5'Nhe-RNAi(s)	GTAGCTAGCATGAGAAATCTTTACTTTCTAGTC
3'Bam-RNAi(s)	GTAGGATCCAGCTCTAAAGGAGGCAGTGTC
5'Bar	ATGGGCCAGAACGACGCC
3'Bar	GCGTGATCTCAGATCTCGGT
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
3'Genwalk	GAGGACCTTCAAGACCAGGAAGATACT
5'Genwalk	ATAATCCAGACCAATGCTCACTTATG
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
3'NestGenwalk	TCAACCAAATCAAGATGCTCAACGGAAA
5'NestGenwalk	GTTCAAAGATGGATTGATGGTGAATCTC
5'Nco-Expr	TATTATCCATGGCTTCTTTGCATGTGAAGTATCTTCC
3'Sma-Expr	TATTATCCCGGGGAGAGATTACCATCAATCCATC
5'Hind-pYES	TATAAGCTTAAAATGGGAAATCTTTACTTTCTAGTC
3'Bam-pYES	TATGGATCCTCATCAATGATGATGATGATGATGGAGAG ATTCACCATCAATCC
5'Nco-pImp	AGTCCATGGCTAGAAATCTTTACTTTCTAGTCTTATTTCCG
3'Not-pImp	AGTTGCGGCCGCGAGAGATTACCATCAATCCATCTTTTG
5'Xho-pSCT	CTCGAGTAGATCATGTGCAAGGTGTTG
3'Bam-pSCTBn	GGATCCTTTCTCCGCTTCTTGG
3'Bam-pSCTBr	GGATCCTTTCTCTGCTTCTTGGTGTC
5'PromWalk	GGCGTTGCACGCTCAGAAAG
3'UTR1	TATAAAAGGGCATTGTTATTATTAATTTTTTTAC
3'UTR2	AATAAAAGGTTATTATTATTTTAAATTTTTTGAC
5'Term	ATGGATTGATGGTGAATCTC
3'Term	AGACTACAAGATCCCAGATG
5'BAC	GATCTAGTGGGCATTCCACC
3'BAC	ACAATGTACAGGGGTTGGTC

2.1.4. Plasmide

pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison WI, USA): Ein 3 kb großer Klonierungsvektor welcher als linearisiertes Plasmid mit 3'-T-Überhängen vorliegt und somit zur T/A-Klonierung von PCR-Produkten genutzt werden kann. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenz und erlaubt Blau-/Weiß-Selektion.

pCR[®]4 Blunt-TOPO[®] und **pCR[®]-BluntII-TOPO[®]** (Invitrogen, Karlsruhe): Klonierungsplasmide (3,9 und 3,5 kb) die für die „Blunt end“-Klonierung von PCR-Produkten verwendet wurden. Diese Vektoren werden linearisiert und mit einer kovalent an seine 3'-Enden gebundenen Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus geliefert. Diese Topoisomerase I besitzt eine zusätzliche Ligaseaktivität, die es ermöglicht, PCR-Produkte innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur in den Vektor zu ligieren. Beide Vektoren tragen eine Kanamycin-Resistenz und erlauben zusätzlich die direkte Selektion rekombinanter Klone durch die Ligation in das für *E. coli* letale *ccdB*-Gen. Zellen, die den nichtrekombinanten Vektor enthalten, sterben somit ab.

pBlueScript[®]S/K (+) (Stratagene, LaJolla CA, USA): Ein ca. 2,9 kb großes Klonierungsphagemid, das bei der „in vivo excision“ der λ -ZAP-Phagen einer cDNA-Bank entsteht. Das Plasmid vermittelt Ampicillin-Resistenz und ermöglicht die Blau-/Weiß-Selektion.

pQE-60 (Qiagen, Hilden): Ca. 3,4 kb großes Expressionsplasmid für die heterologe rekombinante Proteinexpression in *E. coli*. Die multiple Klonierungsstelle wird flankiert von einer C-terminalen 6xHistidinsequenz. Das Plasmid vermittelt Ampicillin-Resistenz.

pET-28a(+) (Novagen, Darmstadt): Ein ca. 5,3 kb großes Plasmid für die heterologe rekombinante Proteinexpression in *E. coli*. Die multiple Klonierungsstelle wird flankiert von einer C- und einer N-terminalen 6xHistidinsequenz. Das Plasmid trägt eine Kanamycin-Resistenz.

pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe): Ein 5,9 kb großes Expressionsplasmid für die heterologe rekombinante Proteinexpression in *S. cerevisiae*. Das Expressionskonstrukt enthält den induzierbaren GAL1-Promotor für eine hohe Proteinexpression in Hefe durch Galaktose und Repression durch Glukose. Die Selektion in *E. coli* erfolgt durch Ampicillin-Resistenz und in Hefe durch die Komplementation des *ura3*-Genotyps auf Uracil-Mangelmedium.

pImpact1.1, pImpact1.1-tag (Plant Research International, Wageningen, NL): Ca. 4,6 kb große Plasmide für die Subklonierung von Expressionskonstrukten für die heterologe Proteinexpression in Pflanzengewebe mit oder ohne c-terminalem myc- bzw. 6xHis-tag. Die Variante 1.1 ist für die cytoplasmatische Expression bzw. für die Expression unter dem eigenen Signalpeptid vorgesehen. Die Expressionskassette enthält den lichtregulierten Promoter der kleinen Rubisco Untereinheit (RbcS1) und deren Terminator von *Asteraceae chrysanthemum*. Die Multiple Klonierungsstelle erlaubt die *in-frame*-Klonierung über ei-

ne *NcoI*- und eine *NotI*-Schnittstelle. Das Plasmid vermittelt Ampicillin-Resistenz. Die gesamte Kasette kann über *AscI* und *PacI* in den binären Vektor pBINPLUS kloniert werden.

pBINPLUS (Plant Research International, Wageningen, NL): Ein ca. 12,4 kb großer binärer Vektor für die Pflanzentransformation, basierend auf dem Vektor pBIN19 (van Engelen et al., 1995). Die Integration der Expressionskasette erfolgt über die beiden Schnittstellen *AscI* und *PacI*. Die Selektion erfolgt mit Hilfe der Plasmid-vermittelten Kanamycin-Resistenz.

pBNN (AG Prof. E. Heinz, Uni Hamburg): Ein ca. 3,8 kb großes Plasmid für die Subklonierung von Expressionskonstrukten basierend auf dem Vektor pBlueScript (Stratagene, LaJolla CA, USA). Zwischen dem samenspezifischen *napi590*-Promotor (*B. napus*) und dem *nos*-Terminator (*A. tumefaciens*) liegt die multiple Klonierungsstelle mit den Schnittstellen *SmaI*, *NcoI*, *BamHI* und *XbaI*. Die gesamte Kasette kann über *SpeI* und *HindIII* ausgeschnitten und in den binären Vektor pLH7000 übertragen werden. Das Plasmid vermittelt Ampicillin-Resistenz.

pBNGUS (Dr. C. Milkowski, IPB Halle): Ein ca. 4,8 kb großes Plasmid für die Subklonierung von RNAi-Konstrukten basierend auf dem Vektor pBlueScript (Stratagene, LaJolla CA, USA). Zwischen dem samenspezifischen *napi590*-Promotor (*B. napus*) und dem *nos*-Terminator (*A. tumefaciens*) befindet sich ein Subfragment des bakteriellen *gusA*-Gens als *spacer*-Element. Dieses *spacer*-Element wird *upstream* von den Schnittstellen für *SmaI* und *NcoI* und *downstream* von *NheI* und *BamHI* flankiert. Dies erlaubt die Klonierung eines *NcoI/SmaI*-Subfragmentes in *antisense*- und eines *NheI/BamHI*-Subfragmentes in *sense*-Richtung. Die gesamte Kasette kann über *SpeI* und *HindIII* in den binären Vektor pLH7000 übertragen werden. Das Plasmid vermittelt Ampicillin-Resistenz.

pLH7000 (Hausmann und Töpfer, 1999): Ein ca. 9 kb großer binärer Vektor für die Transformation in Pflanzen. Das Plasmid trägt eine Spectinomycin-Resistenz für die bakterielle Selektion und das *bar*-Gen für die Selektion transgener Pflanzen mit Basta[®]. Die Integration der RNAi- bzw. Expressionskasette erfolgt über die Schnittstellen *SpeI* und *HindIII*.

35SGUSpGREEN (Dr. Irene Stenzel, IPB Halle): Ein binärer Vektor für die Pflanzentransformation, welcher auf den Vektor pGREEN zurückgeht (Hellens et al., 2000). Die Replikation des pGREEN-Vektors in *A. tumefaciens* ist von der Anwesenheit eines weiteren Plasmids abhängig. Dieses Helferplasmid (pSOUP) codiert die zur Replikation erforderliche ReplikaseA. Das modifizierte Plasmid 35SGUSpGREEN enthält das bakterielle GUS-Gen zwischen dem 35S-Promotor und dem *nos*-Terminator. Es wurde verwendet, um die Promotoraktivität der *upstream*-Bereiche der SCT zu testen. Dazu wurde der 35S-Promotor nach *XhoI/BamHI*-Restriktion deletiert und durch die SCT-Promotoren ersetzt. Das Plasmid vermittelt Kanamycin-Resistenz.

NapinLucpCambia (AG Prof. E. Heinz, Uni Hamburg): Ein ca. 11,3 kB großer binärer Vektor, der für die Promotorstudie in *B. napus* eingesetzt wurde. Das Plasmid enthält das *LUC2*-Gen, welches für die Luciferase in Leuchtkäfern codiert. Diese Sequenz wird flankiert vom napin590-Promotor aus Raps und vom bakteriellen *nos*-Terminator. Mittels *KpnI*/*SmaI*-Restriktion wurde der napin590-Promotor gegen die SCT-Promotorkonstrukte ausgetauscht. Das Plasmid trägt Kanamycin-Resistenz.

2.1.5. Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (München) und Merck (Darmstadt) bezogen. Für molekularbiologische Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, Enzyme von Roche (Mannheim), New England Biolabs (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden) und Stratagene (LaJolla CA, USA) verwendet. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt entsalztem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt.

2.1.6. Antikörper

Für Western Blot-Analysen wurden als primäre Antikörper zum einen ein monoklonaler Anti-6xHis-tag Antikörper aus Maus (Novagen, Darmstadt) und zum anderen ein Peptidantikörper gegen die SCT aus *B. napus* verwendet. Der Peptidantikörper (Kaninchen Anti-BnSCT IgG) wurde durch Koinjektion von zwei Peptiden der SCT [Pep1: H2N-CAKTRRAAETSDTK-CONH₂, Pep2: H2N-DELHESLERNCGGK-CONH₂], die an das Glykoprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelt wurden, in Kaninchen durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Die verwendeten Sekundärantikörper waren für die enzymatisch-colorimetrische Detektion mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert. Die FAB-spezifischen Anti-Maus-IgG bzw. Anti-Kaninchen-IgG AP-Konjugate wurden von der Firma Sigma (München) bezogen.

In den immuncytologischen Untersuchungen kam neben dem Anti-BnSCT Peptidantikörper ein Antikörper gegen Oleosin, dem Hauptprotein der Lipidkörpermembran, zum Einsatz. Dieser Antikörper (Huhn Anti-Oleosin IgY) wurde gegen das 20 kDa-Protein aus *B. napus* hergestellt und wurde freundlicherweise von Prof. Anthony Huang (Universität Kalifornien) zur Verfügung gestellt (Tzen et al., 1990). Als sekundäre Antikörper wurden die Fluoreszenz-konjugierten Antikörper Ziege Anti-Kaninchen-IgG -Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 546 sowie Ziege Anti-Huhn-IgG-Alexa Fluor 488 der Firma Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Alexa 488 fluoresziert bei Blauanregung grün (Absorbtion 495 nm, Emmission 541 nm), Alexa 546 zeigt nach Grünanregung eine rote Fluoreszenz (Absorbtion 556 nm, Emmission 573 nm).

2.1.7. Geräte

Zentrifugen:	5417R-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) Sorvall Super T21 (DuPont, Bad Homburg) 5810R-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
Thermocycler:	Eppendorf MasterCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)
Thermomixer:	Eppendorf comfort (Eppendorf, Hamburg)
Geldokumentation:	BioDocAnalyze (Whatmann Biometra, Göttingen)
Phosphor Imager:	Storm 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA)
Elektrophoresen:	Mini-PROTEAN II (BioRAD, München) XCell SureLock [®] Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe)
Spektrophotometer:	Beckman DU 640
Mikrotom:	HM335E (Microm, Walldorf)
Mikroskope:	Zeiss Axioskop II (Carl Zeiss, Jena) Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Jena) Zeiss Semi 2000-C (Carl Zeiss, Jena) Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena)
Bead Beater:	Biospec. Products, Bartelsville, OK, USA
HPLC:	Waters [™] Millipore System (Waters, Eschborn)
pH-Meter:	inoLab pH Level 1 (WTW)
Spannungsgerät:	Power Supply EPS 301 (GE Healthcare Life Sciences, München)
Ultraschall:	UW 2070 (Bandelin, Berlin)
Ultraturrax:	IKA Werke GmbH & Co. KG
Elektroporator:	Micropulser [™] (BioRad, München)

2.2. Kultivierung, Transformation und Selektion von Pflanzen

2.2.1. *A. thaliana*

Die Anzucht von *A. thaliana* erfolgte bei 23°C und 16 h Licht bei einer Lichtstärke von ca. 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ in Klimaschränken der Firma CLF Plant Climatics. Das Kultursubstrat bestand aus einem Gemisch aus Erde und Vermiculite (2-3 mm Körnung).

Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte durch den *A. tumefaciens*-Stamm EHA105 (Hood et al., 1993) nach der Blütentauchmethode (*floral dip*; Clough und Bent, 1998). Dafür wurden zunächst 400 ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium; Sambrook et al., 1989) mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Zellen wurden bei 28°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,8 kultiviert. Anschließend wurden die Agrobakterien abzentrifugiert (10 min, 4000

x g) und das Bakterienpellet in 200 ml 5 % (w/v) Saccharose-Lösung mit 0,05 % (w/v) Silwet L-77 aufgenommen. In dieser Suspension wurden Blütenstände mit gut entwickelten Knospen 2 min inkubiert. Die behandelten Pflanzen wurden anschließend für 3 Tage mit geschlossener Gewächshaushaube und danach offen unter Langtagbedingungen bis zum Reifen der Samen im Klimaschrank kultiviert.

Für die Selektion transgener Pflanzen mit dem *bar*-Gen als Resistenzmarker wurden die Samen auf Erde ausgesät und die Pflanzen im Keimblattstadium mit einer 1:5000-Verdünnung des Herbizids Basta[®] (Hoechst Schering AgrEvo GmbH) besprüht. Diese Behandlung wurde im Abstand von 5-10 Tagen wiederholt, bis eine ausreichende Selektion der transgenen Pflanzen erkennbar war.

Die Selektion transgener Pflanzen mit dem *NptII*-Gen, welches Kanamycin-Resistenz vermittelt, erfolgte durch Aussaat auf modifiziertem MS-Medium [1 Liter: 0,5 g MES (pH 5,7), 4,4 g MS (Duchefa, Harlem, NL), 10 g Saccharose, 8 g Agar] mit 500 µg/ml Carbenicillin (zum Abtöten der Agrobakterien) und 25 µg/ml Kanamycin. Vor der Aussaat mußten die Samen sterilisiert werden. Dazu wurden sie 2 min in 70 % (v/v) Ethanol und 10 min in Bleichlösung [12 % Natriumhypochloridlösung, 0,15 % (v/v) Tween[®]20] inkubiert und anschließend 8 mal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samen wurden anschließend zum Quellen über Nacht in Wasser bei 4°C inkubiert und anschließend auf dem oben beschriebenen Medium ausgelegt. Nach ca. zwei Wochen konnten die transgenen Pflanzen in Erde überführt werden.

2.2.2. *B. napus*

Zur Anzucht der Pflanzen wurden Samen von *B. napus* auf Erde ausgelegt und bei 20°C für 5 Tage im Dauerlicht inkubiert. Die Pflanzen wuchsen im Gewächshaus bei 12-18°C und 16 h Licht.

Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation, Selektion und Pflanzenregeneration von *B. napus* var. *napus* cv. *Lisora* wurde durch das Saatenunion-Resistenzlabor in Leopoldshöhe nach einem modifizierten Protokoll von De Block et al. (1989) durchgeführt. Für die Transformation wurde der *A. tumefaciens*-Stamm C58C1/pMP90 (Koncz und Schell, 1986) verwendet.

2.2.3. *N. tabacum*

N. tabacum wurde im Gewächshaus in Erde bei 23°C und 16 h Licht kultiviert. Die *Agrobacterium*-vermittelte transiente Transformation erfolgte durch Infiltration etwa 10 Wochen alter Blätter nach einem modifizierten Protokoll von Kapila et al. (1997) mit dem Stamm GV2260 (McBride und Summerfelt, 1990). Dafür wurden 5 ml YEB-Medium [0,1

% (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Fleischextrakt, 0,5 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Saccharose, 2 mM MgSO₄; (pH 7,0)] mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit einer *Agrobacterium* Glycerolkultur angeimpft und über Nacht bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte die Zugabe von 20 µM Acetosyringon, 10 mM Glucose und 10 mM MES (pH 5,6). Nach weiterer Inkubation bei den oben angegebenen Bedingungen sollten die Bakterien am dritten Tag etwa eine OD₆₀₀ von ungefähr 3 haben. Die Kultur wurde dann durch die Zugabe von 2 x Infiltrationsmedium [10 % Saccharose, 20 mM Glucose, 8,6g/l MS; pH 5,6] und Wasser auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Nach der Zugabe von 200 µM Acetosyringon erfolgte die Infiltration der Blätter mit Hilfe einer 1 ml-Spritze durch die Spaltöffnungen auf der Unterseite der Blätter. Die infiltrierten Pflanzen wurden für einige Stunden dunkel gestellt und anschließend für mindestens drei Tage bei 23°C und 16 h Licht inkubiert. Die infizierten Bereiche der Blätter konnten optisch von den nicht-infizierten Bereichen unterschieden werden und wurden für weitere Analysen verwendet.

2.3. Kultivierung, Transformation und Selektion von Mikroorganismen

2.3.1. *E. coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder auf Agarplatten oder als Suspensionsschüttelkultur (180-200 rpm) in LB-Medium bei 37 °C. Die Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit folgenden Endkonzentrationen, sofern nicht anders angegeben: Carbenicillin (50 bzw. 100 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Spectinomycin (100 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml). Die Transformation mit Plasmiden erfolgte durch Elektroporation elektrokompenter Zellen.

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit einer Übernachts-Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen 15 min abgekühlt und anschließend bei 3000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert. Es folgten mehrere Resuspensions- und Zentrifugationsschritte (40 ml eiskaltes H₂O, 20 ml eiskaltes H₂O, 10 ml eiskaltes 10 % (v/v) Glycerin, 1 ml 10 % (v/v) Glycerin). Die Zellen wurden in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1 bis 2 µl Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationskuvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem MicropulserTM (BioRad, München) nach den Herstellerangaben. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz

1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C.

2.3.2. *S. cerevisiae*

Die Anzucht der Hefen erfolgte entweder auf Agarplatten oder als Suspensionsschüttelkultur (180-200 rpm) in Vollmedium [YEP: 2 % (w/v) Pepton (Difco), 1 % (w/v) Hefeextrakt (Gibco), 2 % (w/v) Glucose, 2 % (w/v) Agar für Platten (pH 5,7)] bei 30 °C, sofern nicht anders angegeben.

Kompetente Hefe-Zellen wurden mit Hilfe des EasyComp™ Transformation Kits der Firma Invitrogen gemäß Anleitung hergestellt und transformiert. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Minimalmedium nach den Herstellerangaben des „Yeast Synthetic Drop-out Media Supplement without Uracil“ der Firma SIGMA (München) bei 30°C für zwei bis drei Tage.

2.3.3. *A. tumefaciens*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Medium bei 28°C. Die Herstellung elektrokompenter *A. tumefaciens*-Zellen und die Transformation wurde nach dem *E. coli*-Protokoll durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für mindestens 2 h bei 28°C inkubiert. Für die Selektion wurden 20 bzw. 50 µl auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und für 2 bis 3 Tage bei 28°C inkubiert.

2.4. Isolierung und Auftrennung von Nukleinsäuren

2.4.1. Isolierung von RNA

Pflanzen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenteilen oder Zellsuspensionskulturen erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden). Dazu wurden 100 mg Pflanzenmaterial bzw. Zellen der Suspensionskultur, die durch Vakuumfiltration vom Nährmedium getrennt wurden, in einen vorgekühlten Glashomogenisator (VWR International, Wien) überführt. Nach Zugabe von 500 µl Extraktionspuffer RLT wurde das Gewebe homogenisiert. Anschließend wurden 450 µl der aufgeschlossenen Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt und nach Herstellerangaben weiter bearbeitet. Während der Aufarbeitung wurde ein DNA-Verdau mit der RNase-freien DNase I (Qiagen, Hilden) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Hefen

Die Isolierung von RNA aus Hefen erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini-Kit der Firma Qiagen. Dazu wurden ca. 2×10^7 Hefezellen mechanisch mit Glasbeads (Roth) aufgeschlossen. Die Zellen wurden in $600 \mu\text{l}$ Puffer RLT resuspendiert und nach Zugabe von ca. $600 \mu\text{g}$ Glasbeads [0,25 mm - 0,5 mm (Roth, Karlsruhe) 4 mal für je 1 min stark geschüttelt und zwischendurch auf Eis abgekühlt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurden die Zellen nach dem Protokoll für die Isolation von RNA aus Hefe weiterverarbeitet. Um eventuelle Kontaminationen mit Plasmid-DNA zu entfernen, wurde anschließend ein DNA-Verdau mit der RNase-freien DNase I (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die isolierte RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.2. Isolierung von genomischer DNA

Pflanzen

Die Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenteilen oder Zellsuspensionskulturen erfolgte mit dem DNeasy Plant Mini- bzw. Maxi-Kit der Firma Qiagen (Hilden). Dazu wurden 100 mg bzw. 1 g Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff eingefroren, anschließend gemörsert und nach den Herstellerangaben weiterverarbeitet. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA

E. coli

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 5 ml *E. coli* Übernachtskultur erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden). Die Plasmide wurden aus 2 ml der Kultur nach der Vorschrift des Herstellers isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C bzw. für längere Aufbewahrung bei -20°C gelagert.

S. cerevisiae

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 3 ml *S. cerevisiae* Übernachtskultur erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden). Die Hefezellen wurden sedimentiert und anschließend in $300 \mu\text{l}$ Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von ca. $100 \mu\text{l}$ Glasbeads (0,25 mm - 0,5 mm, Roth) wurden die Zellen zum Aufschluß 5 min stark geschüttelt. Nachdem die Glasbeads sich am Boden abgesetzt hatten, wurden $250 \mu\text{l}$ vom Überstand abgenommen und nach den Herstellerangaben weiterverarbeitet.

A. tumefaciens

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* wurden die Zellen aus einer 4 ml Übernachtskultur sedimentiert und anschließend mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) aufgearbeitet. Da die DNA-Ausbeute aus *A. tumefaciens* sehr gering ist, wurden 16 μl DNA in einem 20 μl Restriktionsansatz bzw. 5 μl DNA in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

2.4.4. Isolierung von BAC-DNA

Die Isolierung von BAC-DNA erfolgte mit dem BACMAX DNA Purification Kit [Epicentre (Madison, WI, USA)] nach den Herstellerangaben ausgehend von einer 1,5 bzw. 40 ml Übernachtskultur.

2.4.5. Trennung von DNA und RNA über Agarose-Gele

Die Auftrennung von DNA und RNA erfolgte zu analytischen Zwecken, sofern nicht anders angegeben, in 1 % (w/v) Agarosegelen in 1 x TBE-Puffer [0,45 M TrisHCl, (pH 8,0), 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA]. Der aufgeschmolzenen Gellösung wurde vor dem Gießen 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 10 x DNA-Ladepuffer [20 % (v/v) Glycerin, 0,1 M EDTA, 1 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF] versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 80-120 Volt. Es wurden auch Fertiggele (E-Gel single comb; Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, wobei die Auftrennung mittels E-Gel PowerBase v.4 (Invitrogen) innerhalb von 15 bzw. 30 min erfolgte. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem BiodocAnalyse (Whatmann Biometra, Göttingen) unter UV-Anregung fotografiert. Als Größenstandard wurde ein definiertes Fragmentgemisch (Smart Ladder) der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) verwendet.

2.4.6. Trennung von RNA über Formaldehydgele

Zur Auftrennung von RNA kamen denaturierende Agarosegele zum Einsatz: [1 % (w/v) Agarose in 20 mM MOPS (pH 7,0), 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 0,74 % (v/v) Formaldehyd]. Die RNA-Proben wurden vor der Beladung in 5 x RNA-Ladepuffer [80 mM MOPS (pH 7,0), 20 mM Natriumacetat, 8 mM EDTA, 2,6 % (v/v) Formaldehyd, 30 % (v/v) Formamid, 20 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau] überführt, mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid versetzt und 5 min bei 65 °C denaturiert.

2.4.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde auf dem UV-Leuchttisch des Geldokumentationssystem BiodocAnalyse (Whatmann Biometra, Göttingen) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm detektiert. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit (Fragmente bis 4 kb) bzw. des QIAquick GelExtraction Kit (Fragmente über 4 kb) der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix eluiert.

2.4.8. Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA nach Restriktionsspaltungen, Polymerase-Kettenreaktionen oder Dephosphorylierung erfolgte einerseits mit dem Quick-Clean-Kit der Firma Bioline (Ludwigshafen) nach den Herstellerangaben. Andererseits kam auch die Ethanol-Natriumacetat-Fällung zum Einsatz. Dabei wurde die zu fällende DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und 1 h bei -20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in Wasser aufgenommen.

2.5. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.5.1. Restriktionsanalyse

Für Restriktionsanalysen zur Kontrolle von Insertgrößen nach einer Klonierung wurde $1\ \mu\text{l}$ (ca. 0,2 bis 0,5 μg) Plasmid-DNA mit 5 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Endvolumen von $10\ \mu\text{l}$ eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei optimaler Arbeitstemperatur des entsprechenden Enzyms. Bei präparativen Restriktionsansätzen wurden entsprechend größere Mengen DNA (2-5 μg) eingesetzt. Restriktion genomischer DNA wurde über Nacht mit 10 μg DNA und 50 U des jeweiligen Enzyms bei optimaler Arbeitstemperatur des Enzyms durchgeführt.

2.5.2. Ligation

Mit dem Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen, Karlsruhe) amplifizierte PCR-Fragmente (Abschnitt 2.5.4) wurden unter Verwendung des pGEM[®]-T-Easy-Kit (Promega, Mannheim) in den Vektor pGEM[®]-T Easy ligiert. Ein typischer Ligationsansatz in einem Endvolumen von $10\ \mu\text{l}$ mit 3 U T4-DNA-Ligase wurde über Nacht bei $14\ ^{\circ}\text{C}$ inkubiert und enthielt die dreifache molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragmentes

gegenüber dem eingesetzten Vektor. 1 μl des Ligationsansatzes wurde in elektrokompente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert. Transformierte Zellen wurden auf LB-Agar mit Carbenecillin selektiert.

Die T4 Ligase aus dem pGEM[®]-T Easy-Kit wurde auch bei einfachen Subklonierungen nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei Klonierungen mit einer Vektorgröße über 6 kb und bei der Subklonierung der BAC-Fragmente kam eine modifizierte Ligationsmethode zum Einsatz:

Restriktion des Vektors:

3 μl Plasmid
1 μl 10 x Restriktasepuffer
0,5 μl Restriktase 1 (10 U/ μl)
0,5 μl Restriktase 2 (10 U/ μl)
5 μl dd H₂O

Restriktion zur Gewinnung des Inserts:

20 μl rekombinantes Plasmid
5 μl 10 x Restriktasepuffer
3 μl Restriktase 1 (10 U/ μl)
3 μl Restriktase 2 (10 U/ μl)
19 μl dd H₂O

Die Restriktionsansätze wurde 2 h bei der optimalen Arbeitstemperatur der Enzyme inkubiert. Anschließend folgte die Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme durch 15 minütige Inkubation bei 65°C. Nach der Dephosphorylierung des Vektors in einem 30 μl Ansatz wurden beide Ansätze vereinigt. Nach der Reinigung der DNA (Abschnitt 2.4.8), wurde das DNA-Pellet in einem 20 μl Ligationsansatz aufgenommen und über Nacht bei 14°C inkubiert. 1 μl des Ligationsansatzes wurde in elektrokompente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert. Die Selektion der gewünschten Vektor-Fragment-Kombination erfolgte mit Hilfe der Antibiotikaresistenz des neuen Vektors und wurde anschließend nach der Plasmidisolation durch Restriktionsanalyse überprüft.

2.5.3. Dephosphorylierung

Um die Selbstligation von Vektoren zu verringern wurde eine Dephosphorylierung mit der SAP (Shrimp alkaline phosphatase) der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Zu einem 20 μl Restriktionsansatz wurden 3 μl 10 x SAP-Puffer, 3 μl SAP (1 U/ μl) und 4 μl dd H₂O gegeben. Die Dephosphorylierung erfolgte in 15 min bei 37°C. Anschließend wurde das Enzym durch 15 minütiges Inkubieren bei 65°C inaktiviert.

2.5.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Abschnitten aus einem DNA-Strang (*template*) (Mullis et al., 1986). Der Prozess besteht aus der zyklischen Abfolge von Strangtrennung, Primeranlagerung und Elongation und wird 25 bis

35 mal durchlaufen. Für analytische Zwecke wurde die GoTaq DNA Polymerase mit 5 X Green GoTaq Reaction Buffer der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Für präparative PCR-Reaktionen wurde, wegen der höheren Exaktheit und der hervorragenden Ausbeute ohne vorherige Protokolloptimierung, der Platinum PCR SuperMix High Fidelity der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Nachfolgend ist ein generelles Schema für eine PCR aufgeführt.

Schritt:	Prozess:	Zeit:	Temperatur:
1	Denaturierung	2 min	94°C
2 - 30	Denaturierung	30 sek	94°C
	Primeranlagerung	30 sek	T _m -5°C
	Elongation	1 min/kb	68/72°C*
31	Elongation	10 min	68/72°C*

Tabelle 2.2.: Generelles Schema für Polymerasekettenreaktionen (PCR). * Platinum PCR SuperMix High Fidelity: 68°C, GoTaq DNA Polymerase: 72°C.

Semiquantitative RT-PCR

Für die cDNA-Synthese mit Oligo-dT-Primern wurden 2 µg RNA und der Omniscript[®] RT Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde strikt nach Herstellerangaben verfahren. Zur Amplifizierung cDNA-Fragmente wurden als 2 µl des RT-Ansatzes in eine Standard-PCR eingesetzt.

2.5.5. Radioaktive DNA-Markierung

Die radioaktive Markierung von DNA-Molekülen, die als Sonden in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt wurden, erfolgte mit dem MegaPrime-DNA Labeling System der Firma GE Healthcare Life Sciences (München) unter Verwendung von 25 ng des Fragment-DNA und radioaktiv markiertem α -³²P-dATP bzw. α -³³P-dATP [3000 Ci/mmol (ICN Biomedicals, Eschwege)]. Die Markierung erfolgte nach Anlagerung von Hexanukleotiden als Zufallsprimer an die denaturierte Fragment-DNA durch Kettenverlängerung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I unter Einbau von α -³²P-dATP bzw. α -³³P-dATP. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie mit ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare Life Sciences, München) abgetrennt. Die radioaktive Sonde wurde vor Zugabe zum Hybridisierungsansatz für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.5.6. Nicht-radioaktive DNA-Markierung

Die nichtradioaktive DNA-Markierung erfolgte mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim). Dazu wurden 30 ng DNA-Fragment nach Herstellerangaben in einer PCR durch Einbau von Digoxigenin-dUTP markiert. Diese DIG-markierte DNA konnte anschließend als Sonde in der nicht-radioaktiven DNA-Hybridisierung eingesetzt werden (Abschnitt 2.6.3). Die Sonde wurde vor Zugabe zum Hybridisierungsansatz durch Inkubation für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.5.7. Sequenzierung und Analyse der DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte als externe Auftragsarbeit durch die Firmen MWG Biotech (Ebersberg). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager Suite (Sci Ed Software, Durham, USA) analysiert. Datenbankabfragen erfolgten über die Internetseite der GenBank¹ mit den Standardeinstellungen des BLAST Programms. Die Vorhersage möglicher Transitpeptide und putativer N-Glycosilierungsstellen erfolgte mit den Programmen SignalP 3.0 und NetN Glyc 1.0 des CBS Prediction Servers². Die Datenbank PLACE³ erlaubt die Suche nach bekannten *cis*-Elementen innerhalb eines Promotors.

2.6. Immobilisierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren

2.6.1. Blotaufbau

Der Transfer von aufgetrennter DNA oder RNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillarblottechnik. Hierzu wurden in einer Wanne mit 2 x SSC [30 mM Natriumcitrat (pH 7,0), 0,3 M NaCl] drei Lagen Whatman 3MM-Papier auf einer Glasplatte so angeordnet, daß die Enden der Papierlagen in den SSC-Puffer getaucht waren. Darauf wurde das Gel gelegt, auf das Gel luftblasenfrei die Nylonmembran und auf diese wiederum drei Lagen Whatman 3MM-Papier in den Abmessungen des Gels. Diese Anordnung wurde mit einem Stapel Zellstoff überschichtet und einem Gewicht beschwert. Durch die Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit durch das Gel gesaugt, wodurch die Nukleinsäuren unter Erhalt des Elektrophorese-Musters auf die Membran übertragen wurden. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Beendigung des Transfers

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

²<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

³<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>

wurden die Nukleinsäuren durch UV-vermittelte kovalente Vernetzung mit Hilfe des UV Stratalinker 1800 (Stratagene, LaJolla CA, USA) auf der Membran fixiert.

2.6.2. Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde

Für die Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde wurden die Nukleinsäuren wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben auf Hybond-N⁺ Nylonmembranen (GE Healthcare Life Sciences, München) geblottet. Die Herstellung der Sonde ist in Abschnitt 2.5.5 beschrieben. Die Membran mit dem fixierten Nukleinsäure-Muster wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt und für mindestens 2 h bei 60 °C in Hybridisierungspuffer [250 mM NaPi (pH 7,0), 7 % (w/v) SDS, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA] vorhybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde nach der Denaturierung durch Inkubation für 5 min bei 95°C zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60 °C. Unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch Waschen der Membran (2 x 30 min) mit 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei 60°C entfernt. Die Membran wurde in Frischhaltefolie luftblasenfrei verpackt und zur Detektion der radioaktiven Signale mit Röntgenfilm (GE Healthcare Life Sciences, München) bei -80 °C in einer lichtdichten Kassette mit Verstärkerfolie exponiert.

2.6.3. Hybridisierung mit einer nicht-radioaktiven Sonde

Für die Hybridisierung mit einer nicht-radioaktiven Sonde wurden die Nukleinsäuren auf nicht geladene Hybond-N Nylonmembranen (GE Healthcare Life Sciences, München) übertragen (Abschnitt 2.6.1). Die Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde ist in Abschnitt 2.5.6 beschrieben. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt und für 2 h bei 42 °C im Hybridisierungspuffer DIG Easy Hyb der Firma Roche (Mannheim) vorhybridisiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde wurde nach Denaturierung durch Inkubation für 5 min bei 95°C zum Hybridisierungsansatz zugegeben. Die Hybridisierung der Membran erfolgte über Nacht bei 42°C. Danach folgten verschiedene Waschschritte zur Entfernung unspezifisch gebundener Nukleotide [2 x 5 min in 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei RT; 2 x 15 min in 0,5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei 68°C] und die Äquilibration der Membran für 1 min [0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3 % (v/v) Tween[®]20]. Die Detektion der markierten Nukleinsäuren erfolgte mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche, Mannheim) nach den Herstellerangaben. Die Membran wurde in Frischhaltefolie luftblasenfrei verpackt und zur Detektion mit einem Röntgenfilm (GE Healthcare Life Sciences, München) für 1 h bei 37 °C in einer lichtdichten Kassette exponiert.

2.6.4. Southern-Analyse

Für Southern-Analysen wurde genomische DNA aus 5 Tage alten Keimlingen mit dem DNeasy Plant Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. 5 μg genomische DNA wurden mit 50 Units der entsprechenden Restriktionsendonukleasen über Nacht verdaut und anschließend in einem 0,8 % Agarosegel bei 25 Volt elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde vor dem Blotting für 15 min mit 0,25 N HCl behandelt und anschließend 30 min denaturiert [0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl], 30 min neutralisiert [1 M Tris (pH 7,5), 2 M NaCl] und abschließend zweimal kurz in 2 x SSC gespült. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran und die Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde (α - ^{32}P -dATP) sind in den Abschnitten 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben.

2.6.5. Northern-Analyse

Für Northern-Analysen wurde RNA aus verschiedenen Samen- und Keimlingsstadien mit Hilfe des RNeasy Plant Mini-Kit der Firma Qiagen isoliert (Abschnitt 2.4.1). 10 μg Gesamt-RNA wurden in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch getrennt (Abschnitt 2.4.6). Der Transfer der RNA auf eine Hybond-N⁺ Nylonmembranen (GE Healthcare Life Sciences, München) und die Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde (α - ^{32}P -dATP markierte *BnSCT1*-cDNA) sind in den Abschnitten 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben. Für die Beladungskontrolle wurde die spezifische Sonde durch kurzes Aufkochen in 0,1 x SSC und 0,1 % (w/v) SDS entfernt und anschließend mit einer 364 bp Sonde gegen die 18S rRNA hybridisiert. Die Quantifizierung der Signalstärke erfolgte durch Exposition im PhosphorImager. Die relative Signalstärke ist als Quotient der spezifischen Intensität und der Beladungskontrolle angegeben.

2.6.6. Isolation von BAC-Klonen durch Screening von Macroarrays

Die Prähybridisierung der Filter erfolgte für 5 h bei 65°C in 100 ml Hybridisierungspuffer [500 mM NaPi (pH 7,2), 7 % (w/v) SDS, 10 mM EDTA]. Die Hybridisierung wurde mit 50 ng radioaktiv markierter DNA über Nacht in 15 ml Hybridisierungspuffer bei 65°C durchgeführt. Anschließend wurde unspezifisch gebundene Radioaktivität durch zweimaliges Waschen in Waschpuffer [40 mM NaPi (pH 7,2), 1 % (w/v) SDS] bei 65°C entfernt. Die Membran wurde kurz zwischen Whatman-Papier getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und zur Detektion der radioaktiven Signale mit Röntgenfilm (GE Healthcare Life Sciences, München) bei -80 °C in einer lichtdichten Kassette mit Verstärkerfolie zwei Tage exponiert. Die Auswertung der Signale (Spot-Duplikate) und die Zuordnung zu den entsprechenden BAC-Klonen erfolgte nach den Angaben des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (www.rzpd.de/info/protocols/). Die Sonden wurden nachfolgend von der Membran entfernt, um die Wiederverwendbarkeit der Membranen zu gewährleisten. Dazu

wurden die hybridisierten Membranen in kochenden Ablösepuffer [0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS] überführt und unter Schütteln auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.6.7. Koloniehybridisierung

Um eine große Anzahl von Kolonien auf das richtige Insert zu überprüfen (z.B. bei der Subklonierung der *BnSCT*-BAC-Fragmente) kam die Methode der Kolonie-Hybridisierung zum Einsatz. 500 μ l eines Transformationsansatzes wurden auf einen Hybond-N⁺ Nylonrundfilter [Durchmesser 100 mm (GE Healthcare Life Sciences, München)] ausplattiert, der sich auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum befand. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde der Filter von der Platte entfernt und mit den Kolonien nach oben auf Filterpapier gelegt. Durch zweiminütiges Andrücken eines zweiten Filters und zweistündige Inkubation bei -20°C wurde ein Replika-Filter erstellt. Nach kurzem Antauen und Markierung der Filter wurden beide zügig voneinander getrennt und zur Regeneration der Kolonien für ca. 6 h auf einer Agarplatte bei 37°C inkubiert. Einer der beiden Filter wurde anschließend mit einer DIG-markierten *BnSCT1*-cDNA als Sonde hybridisiert (Abschnitt 2.6.3). Nach Entwicklung des Films konnten mit Hilfe des Replika-Filters die positiven Signale den entsprechenden Kolonien zugeordnet werden. Diese wurden direkt vom Filter in eine Flüssigkultur überimpft und nach Plasmidisolierung durch PCR und Restriktionsanalyse überprüft.

2.7. Biochemische Methoden und Analytik

2.7.1. Proteinextraktion

E. coli

Um lösliche Proteinextrakte zu gewinnen, wurden frisch geerntete bzw. pelletierte und bei -80°C gelagerte Bakterienkulturen in Extraktionspuffer [100 mM NaPi (pH 7,0), 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin] resuspendiert. Dabei wurde ein Volumenverhältnis von 1:100 (bezogen auf das Originalkulturvolumen der Bakterienkultur) eingehalten. Die resuspendierten Zellen wurden mit 100 μ g/ml Lysozym (Roth, Karlsruhe) für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Ultraschallaufschluss (3 x 45 sec 60 % Duty 65 % Power) auf Eis lysiert. Der durch Zentrifugation (23.000 x g bei 4 °C) gewonnene Überstand wurde als löslicher Protein-Rohextrakt verwendet.

Zur Isolierung unlöslicher Proteine aus *E. coli*-Zellen wurde das Zellpellet (für Gesamt-Proteinextraktion) bzw. der Rückstand nach der löslichen Proteinextraktion (für denaturierende Proteinextraktion) in einem denaturierenden Extraktionspuffer [100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff (pH 8,0)] resuspendiert. Nach Ultraschallbehandlung (3 x 45

sec, 60 % Duty, 65 % Power) wurde die Suspension zentrifugiert (20 min 20.000 x g bei RT) und der Überstand als unlösliche Proteinfraction verwendet.

S. cerevisiae

Die geernteten und pelletierten Hefezellen wurde in Extraktionspuffer [100 mM NaPi (pH 7,0), 150 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM Cholin, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT] resuspendiert (1/100 des Kulturvolumens). Die Zellen wurden nach Zugabe von Glasperlen [0,25 mm - 0,5 mm (Roth, Karlsruhe)] sechsmal für 1 min stark geschüttelt und zwischendurch auf Eis abgekühlt. Nach der Zentrifugation (5 min, 3000 x g, 4°C) wurde Überstand als löslicher Proteinextrakt verwendet.

Pflanzen

Die Proteinextraktion aus Pflanzengewebe erfolgte durch Aufschluß des Gewebes in 100 mM NaPi (pH 7,0) mit Hilfe eines Glashomogenisators (VWR International, Wien), bzw. durch Zellaufschluß im Ultra-Turrax bei größeren Mengen. Der Überstand der nachfolgenden Zentrifugation (5 min, 3000 x g, 4°C) wurde entweder direkt für weiterfolgende Analysen verwendet oder nach einer Protaminsulfat- und einer Ammoniumsulfatfällung, wie nachfolgend beschrieben, über eine PD-10 Säule (GE Healthcare Life Sciences, München) nach den Herstellerangaben entsalzt.

Protaminsulfatfällung

Zur Entfernung von Nukleinsäuren aus dem Proteinrohextrakt wurde dieser mit einer 4 % (w/v) Protaminsulfatlösung auf eine Endkonzentration von 0,05 % (w/v) Protaminsulfat eingestellt, 5 min im Eisbad gerührt und zentrifugiert. Durch diesen Fällungsschritt wurde die Viskosität des Proteinextraktes herabgesetzt.

Ammoniumsulfatfällung

Der Überstand der Protaminsulfatfällung wurde mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 80 % versetzt, 30 min im Eisbad gerührt und anschließend 25 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 100 mM NaPi aufgenommen und über eine PD-10 Säule (GE Healthcare Life Sciences, München) nach Herstellerangaben entsalzt.

2.7.2. Aufkonzentrierung von Proteinen

Verdünnte Proteinlösungen wurden durch Ultrafiltration mit Amicon Ultra-4-Filtrationseinheiten (Ausschlußgröße 10.000 Da; Millipore, Schwalbach) aufkonzentriert.

2.7.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2-20 μ l Proteinlösung wurden nach der Methode von Bradford (1976) mit 1 ml Bradford Reagenz [0,065 % (w/v) Coomassie G-250 in 5 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Phosphorsäure] versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gegen einen entsprechenden Leerwert im Spektralphotometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer BSA-Eichkurve ermittelt.

2.7.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese(SDS-PAGE)

Durch SDS-PAGE wird eine Auftrennung von Proteinen in denaturierter Form nach ihrem Molekulargewicht erreicht (Laemmli, 1970). Entsprechend des Molekulargewichts der zu analysierenden Proteine wurden Trenngele mit 11- oder 14 % Acrylamid verwendet. Die Tabelle 2.3 zeigt die Zusammensetzung der Gele. Die Proteinproben wurden vor dem Beladen mit Proteinprobenpuffer [0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 5 mM EDTA, 15 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol] im Verhältnis 1:1 gemischt. Für die nicht-reduzierende SDS-PAGE wurde Probenpuffer ohne 2-Mercaptoethanol verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA für 50-60 min durchgeführt. Darüber hinaus kamen NuPAGE® Novex 10 % bzw. 12 % Bis-Tris-Fertiggele (Invitrogen, Karlsruhe) zum Einsatz, wobei die Auftrennung bei 200 V und 100 mA pro Gel erfolgte.

2.7.5. Färbung von Proteinen

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder zur Immobilisierung der Proteinbanden für nachfolgende Westernanalysen verwendet (Abschnitt 2.7.6) oder mit Coomassie-Lösung [0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol] durch Kochen für 2-3 min in der Mikrowelle zur Visualisierung der Banden gefärbt. Nach Entfärbung des Hintergrundes durch mehrmaliges Aufkochen in 7 % (v/v) Essigsäure wurden die Gele im Geldokumentationssystem BioDocAnalyze (Whatmann Biometra, Göttingen) unter Weißlicht fotografiert oder mit einem Scanner (HP ScanJet 3970) eingelesen.

Lösung	Sammelgel	Trenngel (11 %)	Trenngel (14 %)
Acrylamid-Lsg.	0,7 ml	3,7 ml	4,7 ml
0,5 M Tris HCL (pH 6,8)	1,25 ml	-	-
1,5 M Tris HCL (pH 8,8)	-	2,5 ml	2,5 ml
Wasser	3 ml	3,8 ml	2,8 ml
10 % APS	25 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l

Tabelle 2.3.: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele (Angaben für 2 Gele)

2.7.6. Western Blot-Analyse

Elektrophoretisch getrennte Proteine wurden nach einem Nass-Blotverfahren auf Nitrocellulosemembran mit Hilfe des XCell II Blot-Moduls (Invitrogen) nach Herstellerangaben übertragen. Der Proteintransfer erfolgte für ca. 1 h bei konstant 30 V. Nach Ende des Transfers wurde die Membran kurz in TBS [100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl] gespült und anschließend für 1 h bei RT in Blockierungslösung [5 % (w/v) Trockenmilchpulver (BioRad) in TBS] inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, der 1:1000 in Blockierungslösung verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 min) in TTBS [TBS (pH 7,5) mit 0,05 % (v/v) Tween-20] entfernt. Nach Waschen der Membran in TBS (3 x 5 min) wurde mit dem Sekundärantikörper, der ebenfalls 1:1000 in Blockierungslösung verdünnt vorlag, für 2 h bei RT inkubiert. Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um Anti-IgG1-Konjugate mit alkalischer Phosphatase (AP) zur enzymatischen colorimetrischen Detektion. Nach erneutem Waschen mit TTBS (3 x 5 min) wurde die Membran 5 min in TBS (pH 9,5) inkubiert und anschließend mit AP-Substratpuffer [TBS (pH 9,5), 50 mM MgCl₂] äquilibriert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,16 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und 0,32 mg/ml p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) gestartet. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Waschen der Membran in TE-Puffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA] gestoppt. Das Signalmuster wurde zur Dokumentation mit einem Scanner (HP ScanJet 3970) eingelesen. Die verwendeten Antikörper sind in Abschnitt 2.1.6 aufgelistet.

2.7.7. SCT-Aktivitätstest

Um die Enzymaktivität der pflanzlichen bzw. rekombinanten SCT zu bestimmen, wurden 2 mM Sinapoylglucose und 10 mM Cholin in 100 mM NaPi (pH 7,0) mit dem Protein in einem Assay mit einem Endvolumen von 100 μl für 1 h bei 30°C unter leichtem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Als Stammlösung dienten 20 mM Sinapoylglucose (MW: 386 g/mol) in 40 % (v/v) DMSO und 100 mM Cholinchlorid (MW: 139,6 g/mol) in 100 mM NaPi (pH 7,0). Die Isolation von Sinapoylglucose erfolgte aus den Blättern der *A. thaliana* Mutante *sng1* nach Lorenzen et al. (1996). Das Präparat wurde freundlicherweise von Dr. A. Baumert und F. Stehle (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt. Nach der Inkubation wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 10 μl Trifluoressigsäure abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand mittels HPLC auf die enzymatische Bildung von Sinapoylcholin analysiert (Abschnitt 2.7.9).

2.7.8. Extraktion der Sinapatester

Die Sinapatester Sinapoylglucose und Sinapoylcholin können im Samen mittels analytischer HPLC nachgewiesen werden. Die Proben wurden in 80 % Methanol (v/v) mit Hilfe von Zirkonia beads [1 mm, (Biospec Products; Bartlesville OK, USA)] für 2 min am Bead beater (Biospec Products, Bartlesville, USA) homogenisiert. Nach der Zentrifugation wurde ein Aliquot des Überstandes für die Analyse und Quantifizierung in der HPLC eingesetzt (Abschnitt 2.7.9).

2.7.9. Analytische HPLC

Zur HPLC-Analyse wurde ein System der Firma Waters Millipore Waters (Eschborn) verwendet. Die Chromatographie erfolgte an einer 5 μm Nucleosil C18-Säule (250 mm x 4 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren). Dabei wurde ein 20-minütiger linearer Gradient eingesetzt, bei einer Flußrate von 1 ml/ min⁻¹ von 10 bis 50 % Lösung B (Acetonitril) in Lösung A (1,5 % (v/v) Phosphorsäure in Wasser). Die Komponenten wurden photometrisch bei 330 nm detektiert und mit Hilfe externer Standards quantifiziert.

2.8. Screening einer cDNA-Bank

Für die Isolierung einer „full-length“ cDNA für die SCT stand eine λ -ZAP cDNA-Bank von grünen Rapssamen zur Verfügung die mit dem ZAP-cDNA Synthesis Kit der Firma Stratagene (LaJolla CA, USA) hergestellt wurde. Für den Primärscreen wurden ca. 180.000 Klone dieser Bank nach Herstellerangaben ausplattiert und auf Hybond-Nylonrundfilter [Durchmesser 100 mm, GE Healthcare Life Sciences (München)] übertragen. Die Filter

wurden 2 x 2 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) und anschließend 2 x 2 min in Neutralisierungslösung [0,5 M Tris HCl (pH 8,0), 1,5 M NaCl] inkubiert. Dazu wurden die Filter mit der Phagenseite nach oben auf je 2 ml der Lösungen gelegt, 2 min inkubiert und zwischen den einzelnen Schritten auf Whatman-Papier getrocknet. Die DNA wurde anschließend durch UV-vermittelte kovalente Vernetzung mit Hilfe des UV Stratalinker 1800 (Stratagene, LaJolla CA, USA) fixiert. Die Hybridisierung der Filter mit einer homologen radioaktiv markierten Sonde ist im Abschnitt 2.6.2 beschrieben. Nach der Filmentwicklung konnten die Phagen mit positivem Signal (Primärklone) identifiziert und isoliert werden. Die Phagenkolonien wurden aus den Platten isoliert, in 1 ml SM-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0,01 % (w/v) Gelatine] gelöst und erneut ausplattiert. Der zweite Isolierungsschritt verlief analog zum ersten, jedoch wurden hier kleine Petrischalen (82 mm) und die entsprechend kleineren Nylonfilter verwendet. Die isolierten Sekundärklone wurden gemäß der Stratagene-Anleitung durch in vivo Excision in pBlueScript[®]-Phagemide überführt. Durch Restriktionsanalysen mit *EcoRI* und *XhoI* wurden rekombinante Phagemide anhand der Insertgrößen für die Sequenzierung ausgesucht.

2.9. 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Das SCT-homologe Produkt des cDNA-Bank Screenings wurde mit Hilfe der RACE-PCR am 5' Ende vervollständigt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des Gene Racer Kits von Invitrogen.

Die 5'RACE-PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen ausgehend von einem *full length* mRNA-*templates* mit Hilfe eines Primers gegen eine interne bekannte Gensequenz und eines Primers gegen eine am 5'Ende der mRNA durch Ligation angefügte Adaptersequenz. 5 µg Gesamt-RNA von grünen *B. napus*-Samen (Stadium E, siehe Abbildung 1.2) wurden zunächst dephosphoryliert um abgebaute RNA bzw. „nicht-mRNA's“ von den nachfolgenden Ligationen auszuschließen. Intakte mRNA ist während dieses Schrittes durch die 5'Kappe vor der Dephosphorylierung geschützt. Anschließend wird die dephosphorylierte RNA einer TAP- (*tobacco acid pyrophosphatase*) Behandlung unterzogen um die 5'Kappe der mRNA zu entfernen. Nach der Ligation des Gene Racer Oligonukleotids und der Umschreibung der mRNA in cDNA wurde eine PCR mit einem genspezifischen Primer (3'GSP1) und dem 5'GeneRacer Primer durchgeführt. Um die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte zu erhöhen, wurde anschließend eine PCR mit Primern (3'NestGSP1 und 5'NestGeneRacer), die innerhalb des ersten PCR-Produkts binden durchgeführt (*nested* PCR). Als Polymerase wurde die Platinum Pfx Polymerase von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Das erhaltene Fragment wurde anschließend mit Hilfe des Zero Blunt TOPO[®] PCR Cloning Kit für Sequenzierung (Invitrogen, Karlsruhe) in den pCR[®]4Blunt-TOPO[®] Vektor kloniert und sequenziert.

2.10. Genome walking

Um die Gene *upstream* und *downstream* der *BnSCT* inklusive der Promotorsequenz zu identifizieren, wurde ein „Genome walking“ mit dem GenomeWalker Kit der Firma Clontech nach den Herstellerangaben durchgeführt. Diese Technik ermöglicht die Isolierung unbekannter genomischer Sequenzen ausgehend von einer bekannten Nukleotidsequenz. Zu Beginn steht die Herstellung einer GenomeWalker-Bank. 25 μg genomische DNA wurden über Nacht bei 37°C mit Restriktasen, die glatte Fragmentenden generieren (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* und *SspI*), inkubiert. Nach der Reinigung der DNA und der Ligation des GenomeWalker Adapters an das 5' und 3' Ende der genomischen DNA-Fragmente, kann eine PCR mit einem genspezifischen Primer (3'GenWalk für 5'Genome walking und 5'GenWalk für 3'Genome walking) und einem Primer gegen den GenomeWalker Adapter (AP1) durchgeführt werden. Um die Spezifität zu erhöhen wurde eine *nested* PCR durchgeführt (Primer: 3'NestedGenWalk und AP2 bzw. 5'NestedGenWalk und AP2). Für die PCR wurde der Platinum PCR SuperMix High Fidelity der Firma Invitrogen verwendet. Die größten der erhaltenen Fragmente wurden aus dem Gel eluiert (Abschnitt 2.4.7), in den Vektor pGEM[®]T Easy kloniert (Abschnitt 2.5.2) und über Sequenzanalyse verifiziert.

2.11. Screening einer genomischen Bank von *B. napus*

Das Screening der genomischen Bank erfolgte in Kooperation mit Dr. Rod Snowdon vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Justus-Liebig-Universität Gießen. drei Macroarrays, die insgesamt mehr als 80.000 BAC-Klone enthielten wurden wie in Abschnitt 2.6.6 mit einer radioaktiv markierten Sonde (α -³³P-dATP markierte *BnSCT*-cDNA) hybridisiert. Die erhaltenen Signale wurden anhand ihre Koordinaten den entsprechenden BAC-Klonen zugeordnet. Aus diesen Klonen wurde wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben ist, die BAC-DNA isoliert. Zur näheren Charakterisierung wurden verschiedene PCRs durchgeführt, die in Abschnitt 3.4.2 näher erläutert werden. Interessante DNA-Fragmente wurden für die Sequenzierung subkloniert. Dazu wurde die BAC-DNA mit *EcoRI*-verdaut und die erhaltenen Fragmente mit Hilfe der modifizierten Ligationsmethode, die in Abschnitt 2.5.2 beschrieben ist, in den ebenfalls *EcoRI*-gespaltenen Vektor pYES2 der Firma Invitrogen ligiert. Die Klone mit dem gewünschten Insert wurden durch Koloniehybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *BnSCT*-cDNA als Sonde identifiziert (Abschnitt 2.6.7). Dies wurde nach Plasmidisolierung durch eine PCR mit Primern gegen die *BnSCT* (5'SCTBn und 3'SCTBn) und der anschließenden Sequenzierung überprüft.

2.12. Analyse von Promotoraktivitäten in Pflanzen

Um die putativen Promotorregionen auf transkriptionale Funktion zu testen, wurden Fusionskonstrukte mit dem promotorlosen GUS-Gen (*uidA*) aus *E. coli*, das für eine β -Glucuronidase codiert, hergestellt. 729 bp *upstream* von *BnSCT1* aus *B. napus* (pBnSCT1) und 722 bp *upstream* von *BrSCT1* aus *B. rapa* (pBrSCT1) wurden mittels PCR (Primer 5'Xho-pSCT und 3'Bam-pSCTBn bzw. 3'Bam-pSCTBr) unter Insertion der Schnittstellen *XhoI* und *BamHI* amplifiziert und durch die modifizierte Ligationsmethode (Abschnitt 2.5.2) anstelle des 35S-Promotors in den Vektor 35SGUSpGREEN überführt. Durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer wurden die Fusionskonstrukte in *A. thaliana* transformiert.

Die enzymatische Aktivität der β -Glucuronidase lässt sich im Gewebe der Pflanze histochemisch mittels einer Farbreaktion nachweisen, wobei das Substrat 5-Brom-4-chlorindolyl- β -D-Glucoronid (X-Gluc) zu dem schwer löslichen Indigo-Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo umgesetzt wird, der an den Orten der Enzymaktivität ausfällt (Jefferson et al., 1987). Für die Analysen wurden die Schale von reifen Samen der transgenen *A. thaliana*-Linien mit einer Rasierklinge geöffnet. Nach Vakuuminfiltration der perforierten Samen erfolgte eine Inkubation in der GUS-Färbelösung [100 mM NaPi (pH 7,0), 0,5 mM X-Gluc, 1 mM EDTA, 0,05 % (v/v) Triton X-100, 0,1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$] für 2 Tage bei 37°C. Anschließend wurden die Proben in 70 % (v/v) Ethanol überführt, am Stereomikroskop ausgewertet und fotografiert.

Für die zellulären Analysen war eine Fixierung der perforierten Samen notwendig (30 min, 0,3 % (w/v) Formaldehyd in 50 mM NaPi (pH 7,0), 1 mM EDTA). Nachdem die Proben kurz in Natriumphosphatpuffer gewaschen wurden, folgte die Inkubation in der GUS-Färbelösung für 2 Tage bei 37°C. Die GUS-gefärbten Proben wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und in PEG eingebettet (Abschnitt 2.14.1). Die Auswertung der 4 μ m dicken Schnitte erfolgte anschließend am Lichtmikroskop.

2.13. Heterologe Proteinexpression

2.13.1. Expression in *E. coli*

Für die bakterielle Expression von *BnSCT1* kamen das pQE60-Vektorsystem (Qiagen) und das pET28a(+)-Vektorsystem (Novagen, Darmstadt) zum Einsatz. Dazu wurde die Sequenz der *BnSCT1*-cDNA ohne das putative Signalpeptid durch PCR mit der Primerkombination 5'Nco-Expr/3'Sma-Expr amplifiziert, in den Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison WI, USA) subkloniert und sequenziert. Der korrekte Leserahmen wurde über *NcoI* und *SmaI* in den Vektor pIVEX 2.3d (Roche, Mannheim) subkloniert, wodurch die Sequenz mit einer C-terminalen 6 x Histidinsequenz (His-tag) fusioniert wurde.

Über die Schnittstellen *NcoI* und *BamHI* wurde die *BnSCT1*-cDNA inklusive des His-tags ausgeschnitten und in den Vektor pQE60, der mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde, ligiert und in den Expressionsstamm M15[pRep4] (Qiagen, Hilden) transformiert.

Weiterhin wurde eine Expression mit dem Vektor in pET28a(+) (Novagen, Darmstadt) durchgeführt. Die Klonierung erfolgte wie beim pQE-Vektorsystem. Nach der Subklonierung in den Vektor pIVEX 2.3d (Roche, Mannheim), wodurch wiederum ein C-terminaler 6 x His-tag eingefügt wurde, erfolgte die Klonierung in den pET28a(+)-Vektor über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* und die Transformation in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen (Stratagene, LaJolla CA, USA).

Für die Proteinexpression wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression durch Zugabe von IPTG, einem nicht metabolisierbaren Analogon zu Galactose, das den *lac*-Repressor bindet und somit die *lac*-Operatorsequenzen auf dem Expressionsplasmid freigibt, induziert. Die Zellen wurden bei 37°C für weitere 4 h inkubiert und nachfolgend durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 5000 x g) vom Medium getrennt. Die Proteinextraktion erfolgte wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben ist.

2.13.2. Expression in *S. cerevisiae*

Die heterologe Expression von *BnSCT1* in *S. cerevisiae* erfolgte mit Hilfe des Vektorsystems pYES2/INVSc1 (Invitrogen, Karlsruhe). Der vollständige codierende Bereich der *BnSCT1*-cDNA wurde mit Hilfe der Primer 5'Hind-pYES und 3'Bam-pYES unter Insertion der Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *BamHI*, der Kozak-Sequenz [ANNATGGG, (Kozak, 1987, 1990, 1991, 1997)] und eines C-terminalen 6 x His-tag durch PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison WI, USA) subkloniert. Nach Sequenzierung erfolgte die Klonierung in den Vektor pYES2 und die Transformation in die *S. cerevisiae*-Zellen INVSc1 (Abschnitt 2.3.2). Weiterhin wurde nach dem selben Schema ein Expressionskonstrukt ohne His-tag mit Hilfe des 3'Primers 3'Bam-Kompl hergestellt. Die erfolgreiche Transformation wurde durch eine Plasmidisolation und Restriktionsverdau überprüft.

Für die heterologe Expression wurden 50 ml SC-Uracil-Medium mit 2 % (w/v) Raffinose mit dem jeweiligen rekombinanten Hefestamm beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1500 x g für 5 min pelletiert, in 50 ml Induktionsmedium [SC-Uracil, 2 % (w/v) Galactose] resuspendiert und bei 30 °C geschüttelt. Für die Analyse der Expression wurden Proben 2, 4, 8, 12 und 24 h nach der Induktion entnommen. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1500 x g für 5 min sedimentiert und mit sterilem Wasser gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung

erfolgte eine Lagerung bei -80 °C. Die Proteinextraktion erfolgte wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben ist.

2.13.3. Expression in *N. tabacum*

Die heterologe Expression von BnSCT1 in Tabak erfolgte unter der Kontrolle des lichtregulierten Promotors der kleinen Rubisco Untereinheit (RbcS1) aus *Asteraceous chrysanthemum* in Vektoren der pImpact-Serie (Plant Research International, Wageningen, NL). Es wurde ein Konstrukt mit einem C-terminalen His-tag sowie ein alternatives ohne His-tag hergestellt. Für das Expressionskonstrukt mit His-tag wurde der Leserahmen und 8 Nukleotide der 5'UTR unter Insertion der Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* über PCR amplifiziert [Primer: 5'Nco-pImp, 3'Not-pImp], in den Vektor pGEM[®]T Easy subkloniert und sequenziert. Die korrekte Sequenz wurde über *NcoI* und *NotI* in pImpact1.1-tag subkloniert. Die gesamte Expressionskassette wurde nach Restriktionsverdau mit *AscI* und *PacI* in den Vektor pBINPLUS überführt und in *A. tumefaciens* GV2260 transformiert. Für das Expressionskonstrukt ohne His-tag wurde das Fragment, welches für die Komplementation in pGEM-TEasy subkloniert wurde (Abschnitt 3.2), verwendet. Der Leserahmen von *BnSCT1* wurde aus diesem Konstrukt durch *NotI*-Restriktion isoliert und in den durch *NotI* linearisierten Vektor pImpact1.1 subkloniert. Aus diesem wurde wiederum die gesamte Expressionskassette nach Restriktion mit *AscI* und *PacI* in den binären Vektor pBINPLUS (Plant Research International, Wageningen, NL) überführt. Das rekombinante Plasmid wurde in den *A. tumefaciens* GV2260 transformiert.

Agrobakterien mit einem der beiden Expressionsplasmide bzw. dem Vektor pBINPLUS wurden in die Blätter von etwa 10 Wochen alten *N. tabacum*-Pflanzen transformiert (Abschnitt 2.2.3). Nach 3 bzw. 5 Tagen wurden die Blätter geerntet und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Die Proteinextraktion erfolgte durch Aufschluss des Blattmaterials in 1 ml 0,1 M NaPi (pH 7,0) je 100 mg Frischgewicht mit Hilfe des Glas-homogenisators (VWR International, Wien), gefolgt von einer 5 minütigen Zentrifugation bei 10.000 x g (4°C).

2.14. Cytologische Methoden

2.14.1. Lichtmikroskopische Methoden

Fixierung und Einbettung in Polyethylenglycol (PEG)

Die Schalen der verschiedenen Samenstadien von *B. napus* wurden vor der Fixierung mit einer Nadel perforiert um eine bessere Infiltration zu gewährleisten. Die Samen wurden im Fixativ [4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS, 0,1 % (v/v) Triton X-100] für mindestens

15 min unter Vakuum infiltriert und anschließend für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS [1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 135 mM NaCl, 3 mM KCl (pH 7,0)] wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und anschließend schrittweise mit PEG infiltriert. Es wurde ein PEG-Gemisch von PEG1500 und PEG4000 im Verhältnis 2:1 (w/w) verwendet. Ein detailliertes Ablaufschema ist in Tabelle 2.4 angegeben. Die infiltrierten Proben wurden in Einbettungsformen überführt, in PEG eingebettet und langsam abgekühlt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C.

Lösung	Inkubationszeit	Temperatur
Fixativ	3 h	RT
PBS	2 x 15 min	RT
10 % (v/v) Ethanol	30 min	RT
30 % (v/v) Ethanol	60 min	RT
50 % (v/v) Ethanol	60 min	RT
70 % (v/v) Ethanol	über Nacht	4°C
90 % (v/v) Ethanol	30 min	RT
100 % Ethanol	30 min	RT
100 % Ethanol	60 min	55°C
Ethanol:PEG [3:1 (v/v)]	2 h	55°C
Ethanol:PEG [1:1 (v/v)]	2 h	55°C
Ethanol:PEG [1:3 (v/v)]	über Nacht	55°C
PEG	4 h	55°C
PEG (offene Gefäße)	4 h	55°C

Tabelle 2.4.: Fixierung und Einbettung verschiedener Samenstadien von *B. napus* in PEG.

Poly-L-Lysin Beschichtung von Objektträgern

Die Objektträger wurden mit einem Glasstift nummeriert und die Oberseite eindeutig markiert. Danach wurden sie zur Reinigung 30 min in 70 % (v/v) Ethanol gespült und anschließend getrocknet. 60 μl Poly-L-Lysinlösung (Sigma, München) werden auf einen Objektträger pipettiert und ein zweiter umgekehrt so auf dem ersten platziert, dass sich die Poly-L-Lysinlösung blasenfrei zwischen den beiden verteilt. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Objektträger in einer Petrischale mit destilliertem Wasser vorsichtig voneinander getrennt. Sie wurden mit destilliertem Wasser gespült und über Nacht getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20°C.

Immunmarkierung

Mit einem Rotationsmikrotom wurden Schnitte von 4 μm Dicke angefertigt und mit Hilfe eines Tropfen 40 % (w/v) PEG 6000 in PBS auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger (Abschnitt 2.14.1) aufgetragen. Das Einbettungsmedium (PEG) wurde durch

zweimaliges Waschen der Schnitte mit PBS entfernt. Freie Aldehydgruppen wurden durch Behandlung mit 0,1 M NH_4Cl in PBS blockiert (5 min). Anschließend erfolgte die Blockierung freier unspezifischer Bindungsstellen durch 30-minütige Inkubation in Blockierlösung (5 % (w/v) BSA in PBS). Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C mit 250 μl des primären Antikörpers (1:1000 in Blockierlösung) in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0,1 % (w/v) BSA in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:1000 in Blockierlösung) für 60 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Dieser und alle folgenden Schritte wurden unter Lichtabschluss durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte entweder direkt in Citifluor/Glycerol (Plano, Wetzlar) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt oder für Gegenfärbungen weiterverwendet.

Cytologische Färbetechniken

DNA-Färbung mit DAPI

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid, Molecular Probes) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet und eignet sich daher zum Nachweis von Zellkernen. Ebenso wird die DNA in Plastiden und Mitochondrien sichtbar gemacht. Die Objektträger mit den Schnitten wurden für 15 min in einer dunklen Küvette in einer DAPI-Lösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) inkubiert und anschließend 2 x 10 min in PBS gewaschen, in Citifluor/PBS (Plano, Wetzlar) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte durch Anregung mit UV-Licht (350 nm).

Stärkefärbung mit LUGOLscher Lösung

LUGOLsLösung (Roth) enthält ein Gemisch von Kaliumiodid und Iod im Verhältnis 2:1 (v/v) und führt zu einer blau-schwarzen Anfärbung der Stärke in Pflanzenzellen. Die Objektträger mit den Schnitten wurden für 5 min mit LUGOLsLösung inkubiert, anschließend kurz in Wasser gespült und in PBS bzw. Citifluor/PBS (Plano, Wetzlar) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

Proteinfärbung mit Coomassie-Lösung

Die Anfärbung der Proteinkörper im Samen erfolgte durch eine Inkubation der Schnitte für 30 min in Coomassie-Lösung [0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol]. Anschließend wurde kurz in 7 % Essigsäure gespült, in Glycerol/PBS eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

Mikroskopische Analyse und Bildverarbeitung

Die immunmarkierten und gefärbten Schnitte wurden an einem Hellfeldmikroskop (Zeiss Axioplan), einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop II) und an einem Konfokalmikro-

skop (Zeiss LSM 510 Meta) ausgewertet. Die Detektion der Fluoreszenz am Axioskop II erfolgte durch Blauanregung (Alexa 488, grüne Fluoreszenz bei 495 nm), Grünanregung (Alexa 546, rote Fluoreszenz bei 556 nm) und UV-Anregung (DAPI, blaue Fluoreszenz bei 350 nm). Das Konfokalmikroskop wurde im Multitrack-Modus mit den in Tabelle 2.5 dargestellten Kanaleinstellungen betrieben. Die Verarbeitung der optischen Schnitte erfolgte mit der Zeiss LSM 510 Meta-Software sowie dem LSMIX-Programm (Zeiss). Eine weitere Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Adobe Photoshop 6.0 durchgeführt.

Kanal	Anregungswellenlänge	Emissionsfilter	Farbstoff
1 (rot)	543 nm	LP 560	Alexa546
2 (grün)	488 nm	BP 505-530	Alexa488
3 (blau)	351 nm	BP 385-470	DAPI
4 (weiß)	543 nm	-	DIC

Tabelle 2.5.: Kanaleinstellungen am LSM 510 Meta bei der Auswertung der immunmarkierten und gefärbten Samenschnitte. LP: Langpassfilter; BP: Bandpassfilter; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid; DIC: Differentieller Interferenzkontrast (nicht konfokal).

2.14.2. Elektronenmikroskopische Methoden

Fixierung und Einbettung in LRWhite

Die Keimblätter (Samenstadium E) von *B. napus* wurden aus der Samenschale präpariert und in kleine Stücke geteilt. Die Proben wurden im Fixativ [3 % (w/v) Paraformaldehyd und 0,25 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS (pH 7,0)] für mindestens 15 min unter Vakuum infiltriert und anschließend für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und anschließend durch langsames Zutropfen über einen Zeitraum von 24 h mit LRWhite infiltriert. Zuletzt wurde noch 3 x in reinem LRWhite inkubiert. Ein detailliertes Ablaufschema ist in Tabelle 2.6 angegeben. Die infiltrierten Proben wurden in Gelatine kapseln überführt, in LRWhite eingebettet und 24 h bei 60°C auspolymerisiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C.

Immunmarkierung

Mit einem Ultramikrotom wurden Ultradünnschnitte von 90 nm Dicke angefertigt und auf Formvar-beschichtete Nickelnetzobjektträger (Grids) aufgebracht. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch 30-minütige Inkubation in Blockierungslösung [1 % (w/v) actetyliertes BSA, 0,2 % (v/v) Tween[®]20 in PBS (pH 7,0)]. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper [Kaninchen-Anti-BnSCT; 1:100 in Blockierungslösung] inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit der Blockierungslösung erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper [Ziege-Anti-Kaninchen-6nm Gold, 1:50

Lösung	Inkubationszeit	Temperatur
Fixativ	3 h	RT
PBS	2 x 15 min	RT
10 % (v/v) Ethanol	60 min	RT
30 % (v/v) Ethanol	60 min	RT
50 % (v/v) Ethanol	60 min	RT
70 % (v/v) Ethanol	über Nacht	4°C
90 % (v/v) Ethanol	60 min	RT
100 % Ethanol	60 min	RT
Ethanol→LRWhite	24 h	RT
LRWhite	3 h	RT
LRWhite	12 h	RT
LRWhite	24 h	RT

Tabelle 2.6.: Fixierung und Einbettung von Kotyledonen aus *B. napus* in LRWhite.

in Blockierungslösung] für 90 min. Nach viermaligem Waschen in Wasser erfolgte die Nachkontrastierung mit 1 % (w/v) Uranylacetat und Bleicitrat für jeweils 10 min.

2.15. Statistische Auswertungen

Ob beobachtete Unterschiede zweier Meßreihen signifikant sind, wurde anhand des „Zweistichproben-t-Tests: Gleicher Varianzen“ mit Hilfe des Programms Microsoft Excel überprüft. Als hypothetische Differenz der Mittelwerte wurde 0 angenommen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5 %, (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Ist der errechnete p-Wert der Analyse kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau von 0,05, so liegt statistische Signifikanz vor. Ob es eine Beziehung zwischen zwei Eigenschaften gibt, wurde durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten mit Hilfe des Programms Microsoft Excel festgestellt. Der Korrelationskoeffizient hat einen Wert zwischen -1 und 1. Ist der errechnete Wert Null stehen die gemessenen Eigenschaften nicht in Beziehung zueinander.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung einer *BnSCT*-cDNA und Sequenzanalysen

Ausgangsmaterial für die Klonierungsarbeiten war ein 240 bp großes DNA-Fragment, das durch PCR an einer λ -ZAP cDNA-Bank aus grünen Samen von *B. napus* mit einem degenerierten Primer gegen ein konserviertes Aminosäuresequenz-Motiv von Acyltransferasen (GDHDM) und einem T7-Standardprimer amplifiziert wurde (Milkowski et al., 2004). Dieses Fragment wurde als homologe Sonde für das Screening der cDNA-Bank mittels Plaque-Hybridisierung eingesetzt (Abschnitt 2.8). Nach dreifachem Screening der Bank (ca. 500.000 Klone) konnten drei Klone mit einer Insert-Größe von 905 bp (SCP1), 920 bp (SCP2) und 874 bp (SCP3) isoliert werden, die nach Datenbankanalysen (NCBI¹, BlastX) hohe Sequenzidentitäten zu pflanzlichen Serin-Carboxypeptidasen zeigten. Die isolierten Fragmente enthielten den 3'-Bereich einer codierenden Sequenz sowie die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) einschließlich der Poly-A-Region. Sequenzvergleiche zeigten, dass die Fragmente SCP2 und SCP3 auf Nukleotidebene zu 100 % identisch sind und sich lediglich in der Länge der 3'UTR unterscheiden (Abbildung 3.1). Die Poly-A-Region von SCP2 beginnt 47 Nukleotide später als bei SCP3. Beide Fragmente zeigten 97 % Sequenzidentität zu SCP1. Auffällig ist hierbei, dass sich der Hauptteil der nicht übereinstimmenden Nukleotide in der 3'UTR befindet.

Das in Vertebraten universelle AAUAAA-Motiv für die Polyadenylierung wurde in keiner der drei Nukleotidsequenzen gefunden. Rothnie et al. (1994) zeigten durch Mutagenese-Analysen, dass Varianten dieses Motivs, die einen Nukleotidaustausch tragen, für die 3'Prozessierung in Pflanzen ausreichen. Diese Varianten einbeziehend, konnten für alle drei cDNA-Klone mehrere putative Polyadenylierungssignale gefunden werden. Diese sind in Abbildung A.1 im Anhang zusammengefasst.

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

```

SCP1      GTTCTTGAAACCCTGCAGTACGTACAACTTAGAACCAATCATAGAGTTTCATTTCGCATCGGATGGGACTTATTCAGATGAGCTCCATGAGTCACTTGAAAGAAA
SCP2      -----
SCP3      -----

SCP1      CTGTGGAGGCAAATCTTTAACGTAGATCCAAGTAATGCAAAATGTTCAAATGGGCTTCAGCTTATCATCAGTGTATCTCAGAGATATACATAGAGCAGATTTTGTTC
SCP2      -----
SCP3      -----

SCP1      CAAACTGCAAAGTAGATTATGCTTTAGCAGACATATCACAAACCTTACCAAAATATCAGAACCAGTCGAAGAAGAGAACTCAAGGAGTTTCAAGAAATGATTCATCATCG
SCP2      -----
SCP3      -----

SCP1      TTGCCTCCTCCAAGCTGCTTTACTTATAGGTATTTTCTGCTGCCTTTTGGGCAAATGATGAAAATGTACGCAGAGCTTTAGGCGTGAAGAAGGGCTTCGGAAAATGGAG
SCP2      -----
SCP3      -----

SCP1      TCGATGCAACACTCAAACATACCATATACATATGATATTACAATGCCATTCATATCACGTTAATAATAGCCGTAAGGCTTCCGCGCTCTCATCTACAGTGGTGATC
SCP2      -----
SCP3      -----

SCP1      ATGATATGATGATACCTTTCTCTTCAACTGAAGCATGGATCAAATCTCTCAACTATCCATTGTTGATGACTGGAGACCTTGGATGATGAATAGCAATCAAGTTGCTGGA
SCP2      -----
SCP3      -----

SCP1      TATACAAGGACCTATGCAAATAAGATGACATTGCAACCATCAAGGGAGGAGCACACCCGCTGAGTATAATCCAGACCAATGCTCACTTATGTTCAAAGATGGATTGA
SCP2      -----
SCP3      -----

SCP1      TGGTGAATCTCTCTGAAGTTCCCTCACTCACTTCTCTCTCTCTCTGTCAAAAGTTTCATGAGTTGCTTTTG-TTTTCGTTTATGGTTATT-AGT-CAAAAATTAATAATA
SCP2      -----
SCP3      -----

SCP1      ATAATAACCTTTTATTA-----AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
SCP2      -----
SCP3      -----

```

Abbildung 3.1.: Sequenzvergleich der 5'-unvollständigen putativen *BnSCT*-cDNAs. Nicht übereinstimmende Sequenzen sind rot dargestellt. Das putative Stopcodon ist unterstrichen.

Um eine *full length*-cDNA zu isolieren wurde eine 5'RACE-PCR durchgeführt (Abschnitt 2.9). Es konnte ein 945 bp großes Fragment amplifiziert werden (RACE1), das den fehlenden 5'-Bereich des Leserahmens der unvollständigen cDNA-Klone enthielt (Abbildung 3.2).

```

1  ATGCAAGGCTAGTGACACCAAGAAGCGGAGAAAATGAGAAATCTTTACTTTCTAGTCTTATTTCCGTTGAGCATCTTGATTTTGGTTGATGCTTCTTTGC
101 ATGTGAAGTATCTTCTGGTCTTGAAGGTCCTTCTCTTTTGAGCTCGAGACTGGGTATGTGAGTGTGGTGAATCTGGAGATGTTGAGCTCTTTACTA
201 CTTTGTGAAATCAGAGAGCAATCCAGATAAAGATCCTCTCATGATTGGCTAACGGGTGGGCTGGATGCAGCTCAATTTGGGTTTACTCTTTGCAAAAT
301 GGTCCTTTGGCTTTTAAAGGGGATGAGTATAATGGGACACTGCCTCCTTTAGAGCTAACATCTTTTCTTGGACAAAGTGGCTAACATTTATATTTGG
401 AATCTCCTGCTGGTTCTGGATATTCTTATGCCAAAACCTCGGCGTGTCTGTGAGACGAGCGACACCAACAAATTCACCAATCGACCAGTTCTCTTAGGAG
501 TTGGTTTGTGGACCACCTGAGTTTATATCCAATTCATTTACGTTGGTGGAGATTCATATCCGGGAAGATTTGCCAGGAGTTGTGCAACAGATTTCA
601 CTTGGAATGAAAAAGGTTCTCACACCCTCATAAATATTAAGGGATATGTTCTTGAAACCCCTGCAGTACGTACAACTTAGAACCAATCATAGAGTTT
701 CATTTGCCGATCGGATGGGACTTATTTAGATGAGCTCCATGAGTCACTTGAAGAAAACCTGGGAGCAAATTCCTTAAAGTATGATCCAAGTAATGCAAAA
801 ATGTTCAAATGGGCTTCTAGCTTATCATCAGTGTATCTCAGAGATATACATAGACAGATTTTGTACCAAACTGCAAAGTAGATTATGCTTTAGCAGAC
901 ATATCACAAACCTTACCAAAATATCAGAACCAGTCGAAGAAGAGAC

```

Abbildung 3.2.: Nukleotidsequenz des 5'RACE-Fragments (RACE1). Das Startcodon ist unterstrichen. Die neu dazugewonnene 5'Sequenz ist rot dargestellt.

Anhand der durch Screening und 5'RACE gewonnenen Sequenzinformation wurden zwei Primer für die Amplifizierung des kompletten Leserahmens abgeleitet (5'SCTBn, 3'SCTBn). Mit diesen Primern konnten durch RT-PCR an cDNA von grünen *B. napus* Samen vier cDNAs isoliert werden (*BnSCT1*, *BnSCT2*, *BnSCT3* und *BnSCT4*), die jeweils eine codierende Sequenz von 1401 bp umfassten. Die cDNAs zeigten eine Sequenzidentität von 99 % (Abbildung A.2). Die daraus abgeleiteten Proteine umfassen 466 Aminosäuren und sind zu 98 % identisch. Datenbankanalysen zeigten eine Sequenzidentität von 84 % zu *SNG2* (AY033947) aus *A. thaliana*. Die hohen Identitäten zu diesem Gen, das für das SCT-Protein codiert (Shirley et al., 2001) lieferten die ersten Beweise, dass es sich bei den klonierten Leserahmen um cDNAs handelt, die in *B. napus* für eine SCT codieren (Abbildung 3.3).

Die abgeleiteten Proteine haben ein Molekulargewicht von 52,5 kDa und zeigen die typischen Merkmale der SCPL-Proteine. Sie enthalten in konservierter Position die Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat, die in den Serincarboxypeptidasen (SCPs) die katalytische Triade bilden (Bech und Breddam, 1989; Hayashi und Stein, 1973; Hayashi et al., 1975; Liao und Remington, 1990; Liao et al., 1992). Laut der Peptidase-Datenbank MEROPS² können die Proteine als Nicht-Peptidase Homologe der Peptidasefamilie S10 klassifiziert werden. Innerhalb der abgeleiteten Proteinsequenzen wurden die von Vogt et al. (1993) nach der Reinigung des SCT-Proteins aus *B. napus* erhaltenen vier Peptidfragmente wiedergefunden (IDGES; NILYLEDPAQ; IVPGAAQQILLGNRK und GYVLGNPAV). Computergestützte Analysen der N-terminalen Sequenzen sagten eine putative Signalsequenz voraus, die wahrscheinlich post-translational nach der Aminosäure A20 abgespalten wird (SignalP 3.0³).

```

BnSCT1  MRNLYFLVLFPLSILI---LVDASLHVKYLPGLEGPLPFELETGYVSVGESGDVELFYFVKSESNDPKDPLMIWLTGGPGCSSICGLLFANGPLAFKGD
BnSCT2  .....-----.....R.....F.S.....N
BnSCT3  .....-----.....G.....R.....
BnSCT4  .....G.....P.....
AtSCT   ...S.I...L.TLFFIHH...L.S.F.P...I...R.EN
      ++++++D+++
BnSCT1  EYNGTLPPLLELTSFSWTKVANILYLESFAGSGYSYAKTRRAAETSDTKQIHQIDQFLRSWFDHPEFISNSFYVGGDYSYSGKIVPGVVQIISLGNEKGLT
BnSCT2  .....-----.....A
BnSCT3  .....-----.....
BnSCT4  .....-----.....
AtSCT   ...V.....A.....F.S.....M.....K.....P.....A.....
      ++++++++
BnSCT1  PLINIKGYVLGNPAVRTNLEPNHRVSAFARMGLISDELHESLERNCGGKFFNVDPNSNAKCSNGLLAYHQICISEIYIEQIILLPNCKVDYVLADISQTLFNI
BnSCT2  .....Q.....
BnSCT3  .....Q.....R.....N.S.....
BnSCT4  .....Q.....VTDK.I.T.Y..P.G...F.S.....R.N.Q.DH.M.S.H..R.---
AtSCT   ...Q.....VTDK.I.T.Y..P.G...F.S.....R.N.Q.DH.M.S.H..R.---
      ++++++
BnSCT1  RTSRRRELKEFSRNDSSSLPSPCFYTRYFLSAFANDENVRRALGVKKGFGKWSRCNTQNIPTYTDIHNAIPYHVNNSRKGFRALIYSGDHEMMIPFSS
BnSCT2  .....-----.....
BnSCT3  .....-----.....
BnSCT4  .....-----.....
AtSCT   ...D.VM.V.....V.N.S...FE.F.V.L.S.S.V.....
      ++++++
BnSCT1  TEAWIKSLNYSIVDDWRPMMNSNQVAGYTRTYANKMTFATIKGGGTAEYNPDQCSLMFKRWIDGESL*
BnSCT2  .....T.....*
BnSCT3  .....S.....*
BnSCT4  .....S.....*
AtSCT   .Q...RA...S.....T...R...P.*

```

Abbildung 3.3.: Sequenzvergleich der abgeleiteten BnSCT-Proteine mit der SCT aus *A. thaliana*. Unterschiedliche AS sind rot und ähnliche grün dargestellt. Die N-terminale Signalsequenz ist eingerahmt. Die katalytische Triade der SCPs ist blau hinterlegt. Putative N-Glykosilierungsstellen sind unterstrichen. Peptidfragmente nach Vogt et al. (1993) sind markiert (+).

Shirley und Chapple (2003) beschreiben für die SCT aus *A. thaliana* anhand von Sequenzanalysen und Expressionsexperimenten in *S. cerevisiae* eine heterodimere Struktur des Proteins, die durch das Herausspalten eines Endopeptids entsteht. Durch Kristallisationsanalysen wurde die dimere Struktur der Serin-Carboxypeptidase II (CPDWII) aus Weizen aufgeklärt (Liao und Remington, 1990; Liao et al., 1992). Die in der Datenbank annotierte 5'-unvollständige cDNA der CPDWII (P08819) zeigt 21 AS, die post-translational herausgeschnitten werden, um das reife Protein zu bilden. Für die SMT aus *A. thaliana* (AF275313) wurde dagegen eine monomere Struktur beschrieben (Hause et al., 2002). Der

²<http://merops.sanger.ac.uk>

³<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteine der klonierten *BnSCT*-cDNAs mit der CPDWII aus Weizen und der SMT bzw. SCT aus *A. thaliana* läßt vermuten, dass die *BnSCT* endoproteolytisch gespalten wird (Abbildung 3.4). Das bedeutet, dass das Protein wahrscheinlich als ein Heterodimer vorliegt, dessen Untereinheiten ein Molekulargewicht von 29 und 18 kDa haben könnten. Dies korreliert mit der Größe der für die SCT aus *A. thaliana* beschriebenen Untereinheiten (Shirley und Chapple, 2003). Weiterhin konnten vier putative N-Glykosilierungsstellen vorhergesagt werden (NetNGlyc 1.0⁴).

```

BnSCT1 MRNLYFLVLFPEISILI---LVDSALH---VKYLPGLGGLPPELETGYVSVGESGDVLFYFYFKSESNPKDKDPLMIWLTGGPGCSSICGLLFANGPLAFKGDENYNGT--LPE---LELTSFSWTKVA
AtSCT  MRNLSFIVLFLTLFFIHHLVDSALL---VKSLLPGFEGPLPPELETGYVSVGESGDVLFYFYFKSESNPKDKDPLMIWLTGGPGCSSICGLLFANGPLAFKGDENYNGT--VPE---LELTSFSWTKVA
AtSMT  -MSLKIKFLLLVLYH---HVDASAI---VKFLPGFEGPLPPELETGYIGIDENWQFFYFYFKSESNPKDKDPLMIWLTGGPGCSSICGLLIFENGVLKGFVFNYS--AES---LFTSYSWTKVA
CPDWII -----VFPSGHAADRIRLFG-QPAVDFDMYSGYITVDEGAGRSLLFYLLQEAPEDAQPAPELVLWLNNGPGCSSV-----AYGASBELGAFRVKPRGAGLVINEYRWKVA

BnSCT1 NLLYLESPAGSGYSVARTRAAETS-DTKQIHQIDQFLRSWFVDHPEFISNSFYVCGDSVSGKIVPGVQVQISLGNKGLTPLINIKGYVLGNPAVRTNLEFNHRVSPFAHMGILSDELHESLERNCGEK
AtSCT  NLLYLEAPAGSGYSVARTRAAFES-DTKQVHQIDQFLRSWFVHPEFISNPFYVCGDSVSGKIVPGVQVQISLGNKGLTPLINIQGYVLGNPVTDKNIETNYRVFPAHMGILSDELHESLERSGEGK
AtSMT  NLLIFLDQVPGSGYSKTP-IDKTC-DISEVKRTHPELQKWLRRHPQYFSPNPLVYVGDVSGMIVPALVQVQISLGNKGLTPLINIQGYVLGNPVYDMDFQNFRIPIYAVCMGILSDEIYEPMKRICNNG
CPDWII NVLFLDSEAGVGFSTYNTSSDIYTSQNRTHDSYAFLLAKWFERFPHYKRYDFIAGESYAGHYVLESQLV---HRKSNPVINLKGFMVGNGLIDDYHDYVGTFFVWNHGIVSDTYRRKEALDLD

BnSCT1 FENVDPNSA-KCSNGLLAHQCISEYVIEQILLNCKVYDVLADISQTLNPIRTRRELKEFERNDSLSLPPSCFTYRYFLSAFANDENVRALGVKGF-GK---WNRCSNTQNIPTTYDI-HNAIF
AtSCT  FENVDPNSA-RCSNNLQADHRCMSEIYSEHILLRNCKVYDVLAD---TPNIRTRDRRYMKEFVNDSSLSLPPSCFTYRYFLSAFANDENVRALGVKGF-GK---WNRCSNTQNIPTTYDI-FNAVF
AtSMT  YYNVDPNSNT-QCLKLTETVHKCTAKINIHHILTPDC-----DVTNVTSPDQYYPYHLIECWANDESREALHIEKSGSKG---WARCNRTPYNHDI-VSSIP
CPDWII SE-IHESPACDAATDVATAEQGNIDMY--SLYTPVCNITSSSSSSSSLSQQRSSCRYPWLTGSYD-----P-C-TERY--STAYNRRDVMQALHANVTG-AMNYTWTQSDTINTHDAPRSMLE

BnSCT1 YHVNNSRKGFRALYSGDHDMMIPFESSTEAWIKSLNYSIVDDWRPMMNSNOVAGYTRTYANKMTFATIKGGHTAE-YNPDCSLMFKRWIDGESL*-----
AtSCT  YHVNNSLKGFRSLYSGDHDMMIPFESSTEAWIRALNYSIVDDWRPMMNSNOVAGYTRTYANKMTFATIKGGHTAE-YTPDCSLMFKRWIDGESL*-----
AtSMT  YHMNNSISGYRSLYSGDHDIAVPELATQAWIRSLNYSPIHNWRPWIN-NQIAGYTRAYSNMKTFATIKGGHTAE-YRNETFIMFORWISGOPL*-----
CPDWII IYRELTAAGLRWVFSGDVAVVELATRYSGALGLPTTTSWYWPY-DDQEVGGWSQVWKG-LTLVSVRGAGHEVPLHREARALVLFQYFLQKPKMPGQTKNAT

```

Abbildung 3.4.: Sequenzvergleich des abgeleiteten *BnSCT1*-Proteins aus *B. napus* mit der SCT (*AtSCT*) und SMT (*AtSMT*) aus *A. thaliana*, sowie der Serin-Carboxypeptidase II (*CPDWII*) aus *T. aestivum*. Identische AS sind grün hinterlegt. Das Endopeptid der *CPDWII* ist unterstrichen. Das putative Endopeptid der *BnSCT1* ist durch Pfeilspitzen eingegrenzt.

3.2. Komplementation einer SCT-defizienten Mutante

Um die Funktionalität der klonierten cDNAs zu testen, wurde eine *A. thaliana*-Mutante (*SALK 002255*), die eine T-DNA-Insertion im *SN2*-Gen trägt, komplementiert. Im Gegensatz zum Wildtyp, in dem Sinapin als Hauptkomponente im Samen akkumuliert, ist die Mutante aufgrund des Fehlens der funktionellen SCT nicht in der Lage Sinapin zu bilden. Stattdessen akkumuliert Sinapoylglucose, ein Substrat der SCT. Nach Transformation der Mutante mit einer der klonierten cDNAs sollte diese wieder Sinapin bilden können. Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten wurde die Komplementation nur mit der *BnSCT1*-cDNA durchgeführt. Als Basis für die Konstruktion des Komplementationskonstruktes diente der binäre Vektor pLH7000 (Hausmann und Töpfer, 1999; Abbildung 3.5).

Der codierende Bereich der *BnSCT1*-cDNA, einschließlich der acht Nukleotide *upstream* des Startcodons, wurde mit Hilfe spezifischer Primer (5'Sma-Kompl und 3'Bam-Kompl) unter Insertion der Restriktionsschnittstellen *SmaI* und *BamHI* amplifiziert. Nach Subklonierung in den Vektor pGEM[®]-TEasy wurde das Fragment über die *SmaI* und *BamHI* Schnittstellen in den Vektor pBNN zwischen den *napin590*-Promotor und den *nos*-Terminator ligiert. Die Insertion der Expressionskassette in den binären Vektor pLH7000 erfolgte über die Schnittstellen *SpeI* und *HindIII*. Das Expressionskonstrukt pLHBnSCT1 und der Vektor pLH7000 wurden in die *A. thaliana*-Mutante *SALK 002255* und in den *A. thaliana*

⁴<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

Wildtyp Columbia transformiert. Nach der Selektion der T1-Generation im Keimlingsstadium auf Herbizidresistenz gegen Basta® wurden jeweils 20 positive T1-Pflanzen weitergeführt. Die Überprüfung der Integration der Expressionskassette in das Pflanzengenom erfolgte durch PCR an genomischer DNA aus Blättern mit Primern gegen das *bar*-Gen (5'Bar und 3'Bar). Die PCR- Ergebnisse bestätigten die erfolgreiche Integration des Transgens in alle selektierten Pflanzen. Die T2-Samen wurden geerntet und nach methanolischer Extraktion auf den Sinapingehalt untersucht (Abschnitt 2.7.8).

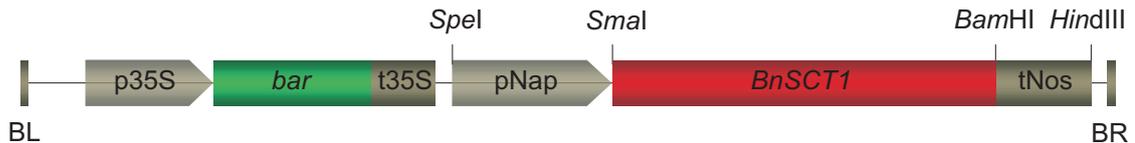


Abbildung 3.5.: Konstrukt für die Komplementation der *A. thaliana*-Mutante SALK 002255. BL und BR: Linke und rechte Bordersequenz, p35S und t35S: 35S-Promotor bzw. -Terminator aus dem Blumenkohlmosaikvirus, *bar*: Phosphinotricin-Acetyltransferase (J02798) aus *Streptomyces hygroscopicus*, vermittelt Basta®-Resistenz), pNap: samenspezifischer Promoter des *napA*-Gens aus *B. napus* (J02798), *BnSCT1*: Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase aus *B. napus* (AY383718), tNos: Terminator der Nopalinsynthase (JO1541) aus *A. tumefaciens*. Ferner sind die zur Klonierung genutzten Schnittstellen angegeben.

Die Analyse der methanolischen Samenextrakte zeigte, dass durch die Integration der *BnSCT1*-cDNA in das *A. thaliana*-Genom der Phänotyp von SALK 002255 komplementiert wird (Abbildung 3.6). Aus der Tatsache, dass die Mutante nach der Transformation wieder in der Lage ist Sinapin zu bilden, kann geschlossen werden, dass die klonierte *BnSCT1*-cDNA für eine funktionelle SCT codiert. Für das Konstrukt pLHBnSCT1 konnten in den SALK 002255-Pflanzen Sinapingehalte zwischen 3,5 und 13,0 mg/g Samen gemessen werden. Dem gegenüber stehen Sinapingehalte zwischen 8,5 und 11,7 mg/g Samen von Wildtyp-Pflanzen die mit dem Vektor pLH7000 transformiert wurden. Der Sinapoylglucosegehalt in den komplementierten Mutanten zeigte ebenfalls eine hohe Variabilität (2,6 bis 10,3 mg/g Samen), lag aber in allen Fällen über dem der pLH7000/Wildtyp-Pflanzen (0,3 bis 1,8 mg/g Samen). Durch Überexpression von *BnSCT1* im *A. thaliana* Wildtyp konnte eine leichte Erhöhung des Sinapingehaltes gemessen werden, die bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant war ($p=0,02$).

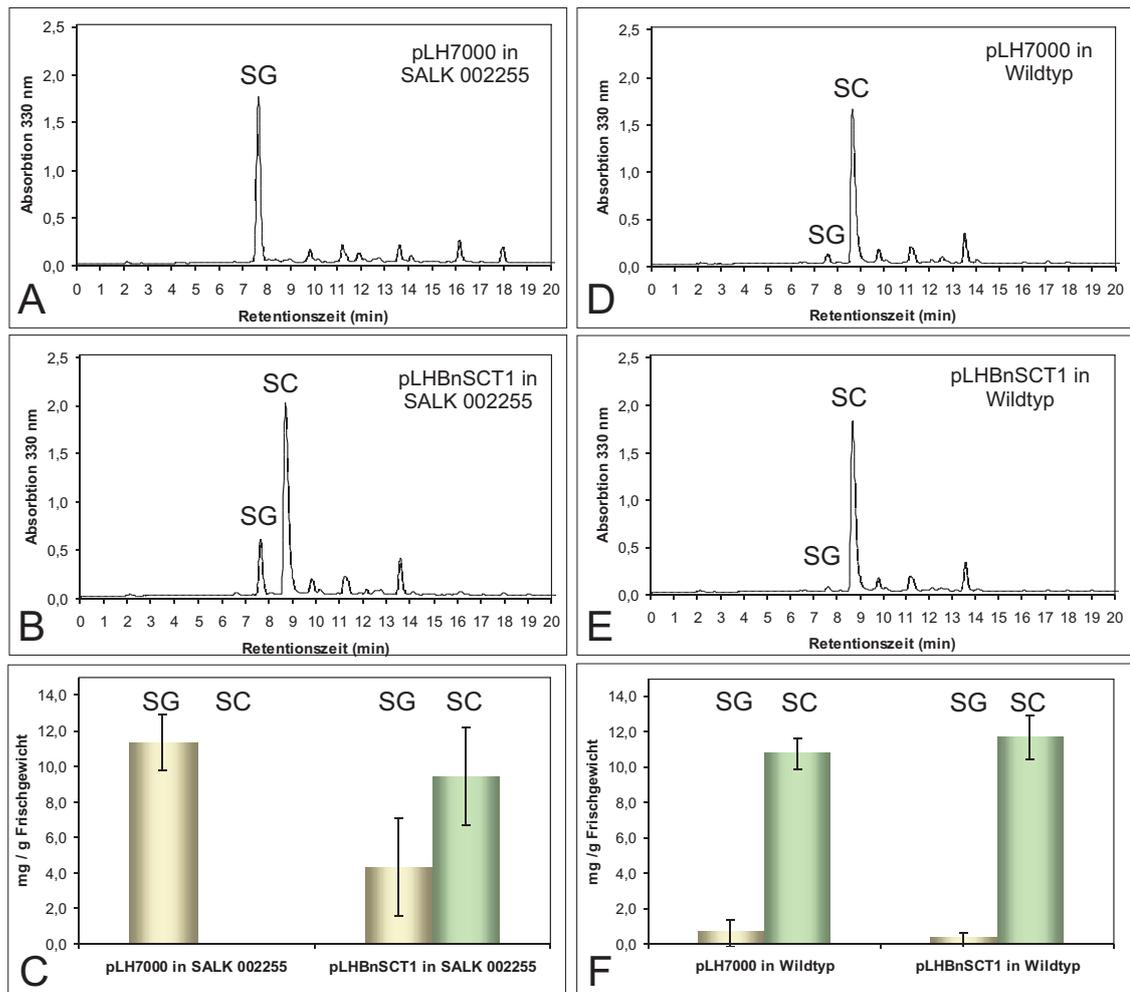


Abbildung 3.6.: Komplementation der SCT-defizienten *A. thaliana*-Mutante SALK 002255 mit der *BnSCT1*-cDNA. Dargestellt sind repräsentative HPLC-Diagramme methanolischer Samenextrakte der Mutante (A und B) und des Wildtyps (D und E), die mit dem Vektor pLH7000 (A und D) bzw. mit pLHBnSCT1 (B und E) transformiert wurden. In Abbildung C und F ist der mittlere Gehalt an Sinapoylglucose (SG) und Sinapin (SC) der transgenen Pflanzen angegeben (n = 20).

3.3. Heterologe Expression von *BnSCT1*

3.3.1. Heterologe Expression in *E. coli*

Die funktionelle Expression von *BnSCT1* sollte zunächst in *E. coli* erfolgen. Um eine spätere Reinigung des heterolog exprimierten Proteins mittels Metallaffinitätschromatographie zu ermöglichen, wurde die codierende Sequenz der *BnSCT1*-cDNA ohne das putative Signalpeptid unter Hinzufügen eines c-terminalen 6 x His-tag in den Expressionsvektor pQE60 (Quiagen, Hilden) kloniert und in den Expressionsstamm M15[pREP4] transformiert (Abschnitt 2.13.1).

Die Expression rekombinanter Proteine ist in dem System M15[pREP4]/pQE mit Hilfe von IPTG induzierbar. IPTG ist ein nichtmetabolisierbares Analogon zu Galaktose, das den lac-Repressor bindet und somit die lac-Operator-Sequenzen auf dem Expressionsplasmid freigibt. Das heißt, theoretisch sollte nur bei Anwesenheit einer bestimmten Menge an Galaktose bzw. IPTG die Expression des heterologen Proteins erfolgen. Die Expression des rekombinanten Proteins ist auch von äußeren Faktoren, insbesondere Kulturtemperatur und Dauer der Expression, abhängig. Diese Faktoren müssen von Fall zu Fall immer wieder neu empirisch bestimmt werden. Zur Ermittlung der optimalen Parameter für die heterologe Expression der BnSCT1 wurden zunächst zwei Temperaturen (30°C und 37°C), sowie verschiedene IPTG-Konzentrationen (0, 0,2, 0,5 und 1 mM IPTG) bei einer Induktionsdauer von vier Stunden getestet. Dazu wurden 5 ml-Kulturen angesetzt, aus denen nach der Induktionsphase die löslichen und nicht-löslichen Proteine extrahiert wurden. Nach Auftrennung der Proteinextrakte auf einem SDS-PAGE-Gel und der Immobilisierung der aufgetrennten Proteine auf einer Nitrocellulose-Membran wurde das rekombinante Protein durch einen monoklonalen Anti-His-tag-Antikörper nachgewiesen. Es konnte lediglich im nicht-löslichen Proteinextrakt rekombinantes Protein nachgewiesen werden (Abbildung 3.7). Unter keiner der getesteten Bedingungen war im SDS-Gel nach Coomassie-Färbung eine Proteinbande der SCT erkennbar. Eine Enzymaktivität der BnSCT1 konnte nicht nachgewiesen werden.

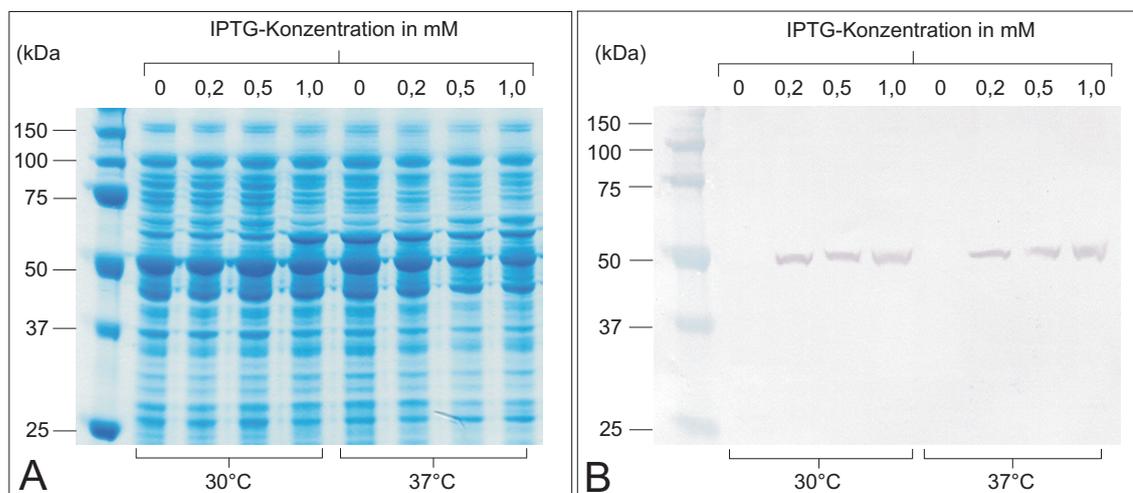


Abbildung 3.7.: Heterologe Expression von *BnSCT1* im *E. coli*-System pQE60/M15[pRep4]. Dargestellt ist eine SDS-PAGE (A) und eine Western Blot-Analyse mit einem Anti-His-tag Antikörper (B) von nicht-löslichen Proteinextrakten aus *E. coli* nach 4 h Inkubation bei verschiedenen Induktionsbedingungen. Je Spur sind 20 μg Protein aufgetragen.

Als Alternative zum pQE-Expressionssystem wurde die Klonierung in den pET28a(+)-Vektor (Novagen, Darmstadt) gewählt (Abschnitt 2.13.1). Das BnSCT1-pET28a-Konstrukt wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen (Stratagene, LaJolla CA, USA) transformiert. Dieser Stamm enthält zusätzliche Genkopien für die in *E. coli* seltenen tRNAs argU (AGA, AGG), ileY (AUA), leuW (CUA), die häufig den Translationsprozess rekomb-

binanter Proteine in *E. coli* limitieren. Die Untersuchung unterschiedlicher Expressionsbedingungen zeigte, dass auch in diesem Expressionssystem kein SCT-Protein in der löslichen Fraktion produziert wird. Die Abbildung 3.8 zeigt exemplarisch die Expression der BnSCT bei einer Induktion mit 1 mM IPTG und einer Induktionsdauer von 2 h bei 37°C. Aufgrund der zusätzlichen Genkopien für die seltenen tRNAs des Expressionsstammes konnte jedoch verglichen mit dem pQE/M15[pRep4]-Expressionssystem eine wesentlich höhere Menge an SCT-Protein in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden. Sowohl im SDS-Gel als auch im Western Blot konnte eine SCT-Proteinbande mit einer Größe von ca. 50 KDa detektiert werden. Eine Enzymaktivität der BnSCT1 war nicht nachweisbar.

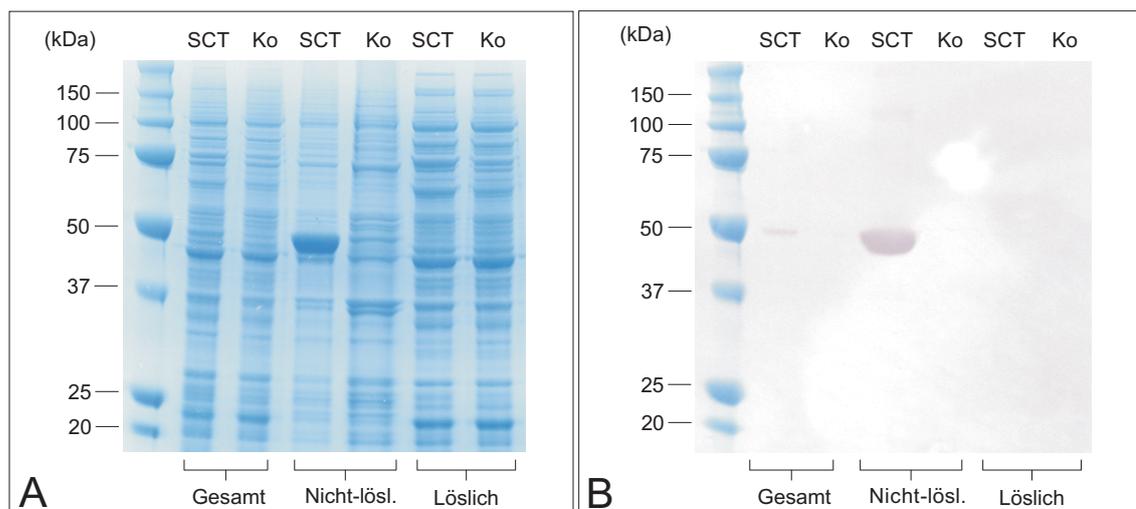


Abbildung 3.8.: Heterologe Expression von *BnSCT1* im *E. coli*-System pET28a/BL21-CodonPlus (DE3)-RIL. Dargestellt ist eine SDS-PAGE (A) und eine Western Blot-Analyse mit einem Anti-His-tag Antikörper (B) von Proteinextrakten aus *E. coli* mit dem Expressionskonstrukt BnSCT1-pET28a (SCT) bzw. dem Vektor pET28a (Ko) nach zweistündiger Induktion bei 37°C mit 1 mM IPTG. Je Spur sind 20 μ g Protein des Gesamt-, des nicht-löslichen und des löslichen Extraktes aufgetragen.

Für die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen die BnSCT wurde die unlösliche Fraktion unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert und mittels Metallaffinitätschromatographie angereinigt. Die durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellten Antikörper gegen das unlösliche SCT-Protein erwiesen sich jedoch in der Western Blot-Analyse, bei Einsatz der löslichen Proteinfraction aus *B. napus*-Samen, sowie in der Immunlokalisierung als immunologisch nicht aktiv. Mit der Herstellung eines Peptidantikörpers gegen die BnSCT wurde eine alternative Strategie gewählt (Abschnitt 3.6.1).

3.3.2. Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erläutert, konnte *BnSCT1* in *E. coli* nicht funktionell exprimiert werden. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein genetisch gut charakterisierter, eukaryotischer Organismus, der vielfach für die Expression eukaryotischer Proteine genutzt wird. Im Gegensatz zu *E. coli* ist *S. cerevisiae* in der Lage posttranslationale Modifikationen und Prozessierungen von Proteinen ähnlich wie in anderen eukaryotischen Organismen auszuführen. Der Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe) erlaubt die heterologe Expression von Proteinen unter der Kontrolle des starken Galaktose-induzierbaren GAL1-Promotors.

Dazu wurde der vollständige codierende Bereich der *BnSCT1*-cDNA unter Insertion einer Kozak-Sequenz [ANNATGG, (Kozak, 1987, 1990, 1991, 1997)] und eines C-terminalen 6 x His-tag in den Expressionsvektor pYES2 kloniert und in *S. cerevisiae* INVSc1 transformiert (Abschnitt 2.13.2). Die Einführung der Kozak-Sequenz machte es erforderlich, die erste Aminosäure des Proteins zu verändern. Das in *BnSCT1* vorhandene Codon für Arginin (AGA) wurde durch das Triplet für Glycin (GGA) ersetzt. Weiterhin wurde ein zweites Konstrukt ohne einen 6 x His-tag hergestellt. Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden 50 ml Induktionsmedium mit Übernachtskulturen beider Konstrukte und des Vektors pYES2 angesetzt, aus denen nach der Induktionsphase die löslichen Proteine extrahiert wurden. Zur Ermittlung der optimalen Parameter für die heterologe Expression wurden verschiedene Induktionszeiten getestet (2, 4, 6, 8 und 12 h). Für das Konstrukt BnSCT1(tag)-pYES konnte unter keiner der getesteten Bedingungen eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, konnte für das Konstrukt ohne His-tag (BnSCT1-pYES) eine, wenn auch geringe, SCT-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 3.9).

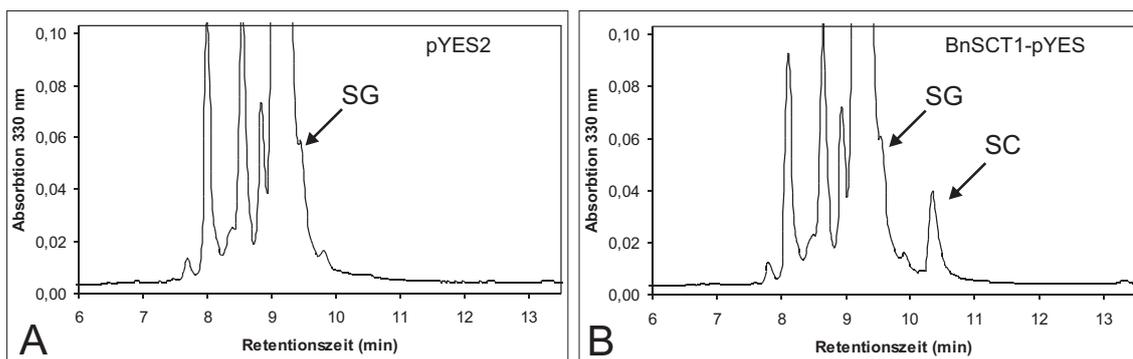


Abbildung 3.9.: Heterologe Expression von *BnSCT1* im *S. cerevisiae*-System pYES2/INVSc1. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der HPLC-Chromatogramme für die Umsetzung von Sinapoylglucose (SG) zu Sinapin (SC) mit Protein-Rohextrakten aus mit pYES2 (A) und BnSCT1-pYES (B) nach vierstündiger Induktion. Es wurden 150 μg Protein eingesetzt.

Die Bildung von Sinapin wurde dabei ausschließlich nach vierstündiger Induktion mit Galactose beobachtet. Die spezifische Aktivität betrug 1 pkat/mg Protein. Zu früheren oder späteren Zeitpunkten der Induktion konnte durch den Enzymassay keine SCT-Aktivität nachgewiesen werden. In Western Blot-Analysen mit dem Anti-BnSCT-Antikörper (Abschnitt 3.6.1) wurden keine spezifische Signale detektiert.

Eine mögliche Ursache für den niedrigen bzw. fehlenden Gehalt an BnSCT1-Protein könnte eine ineffiziente Transkription sein. Um dies zu überprüfen, wurde aus den Expressionskulturen nach vierstündiger Induktion RNA isoliert und in einer RT-PCR mit den für die Klonierung verwendeten Primern eingesetzt (Abschnitt 2.5.4). Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass die niedrige BnSCT1-Proteinexpression nicht auf fehlende Transkription zurückzuführen ist, da sowohl für BnSCT1-pYES, als auch für BnSCT1(tag)-pYES Transkripte nachgewiesen werden konnten.

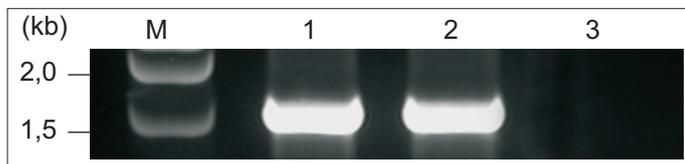


Abbildung 3.10: RT-PCR zum Nachweis des *BnSCT1*-Transkripts. 1: BnSCT1-pYES, 2: BnSCT1(tag)-pYES, 3: pYES2, M: Smart Ladder (Eurogentec; Searing, Belgien).

3.3.3. Heterologe Expression in *N. tabacum*

Da die heterologe Expression von *BnSCT1* in bakteriellen Systemen nicht erfolgreich und in *S. cerevisiae* nur sehr gering war, wurde mit *N. tabacum* ein pflanzliches Expressionssystem gewählt. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass das pflanzliche BnSCT-Enzym in korrekter Weise post-translational modifiziert wird. Die transiente Expression in den Blättern von *N. tabacum* durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer liefert hierbei eine einfache und schnell durchzuführende Methode, um zu prüfen, ob eine funktionale Expression eines Gens in diesem System möglich ist. Die heterologe Expression von *BnSCT1* in Tabak erfolgte unter der Kontrolle des lichtregulierten Promotors der kleinen Rubisco Untereinheit (RbcS1) aus *Asteraceous chrysanthemum*, da für dieses System eine sehr hohe Expressionsrate in Pflanzen beschrieben ist (Outchkourov et al., 2003).

In zwei verschiedenen Ansätzen sollte getestet werden, ob *BnSCT1* in den Blättern von *N. tabacum* funktionell exprimiert wird und ob ein C-terminaler 6 x His-tag einen Einfluß auf die Expressionsrate bzw. auf die Funktionalität des heterolog exprimierten Enzyms hat. Zu diesem Zweck wurden zwei Expressionskonstrukte basierend auf dem binären Vektor pBINPLUS hergestellt (Abschnitt 2.2.3). Die Infiltration der Tabakblätter erfolgte mit dem *A. tumefaciens*-Stamm GV2260 nach einem modifizierten Protokoll von Kapila et al. (1997). Nach drei- bis fünftägiger Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus wurden Proteinextrakte aus den infizierten Blattbereichen hergestellt.

Durch den Einsatz von Proteinrohextrakten im Enzymassay konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle Expression von *BnSCT1* in Blättern von *N. tabacum* möglich ist (Abbildung 3.11). Die spezifische katalytische Aktivität des BnSCT-Proteins ohne His-tag (pBIN-BnSCT1) betrug drei Tage nach Infiltration im Durchschnitt 13,0 pkat/mg Protein und nach fünf Tagen 20,6 pkat/mg Protein. Die Expression von *BnSCT1* als His-tag-Fusionsprotein [pBIN-BnSCT1(tag)] ergab dagegen mit durchschnittlich 0,4 pkat/mg Protein nach drei Tagen bzw. 1,4 pkat/mg Protein nach fünf Tagen eine Reduktion der spezifischen Aktivität um ca. 95 %. In einer Western Blot-Analyse der Proteinextrakte mit dem Anti-BnSCT-Antikörper konnten für beide Expressionskonstrukte keine spezifischen Signale detektiert werden.

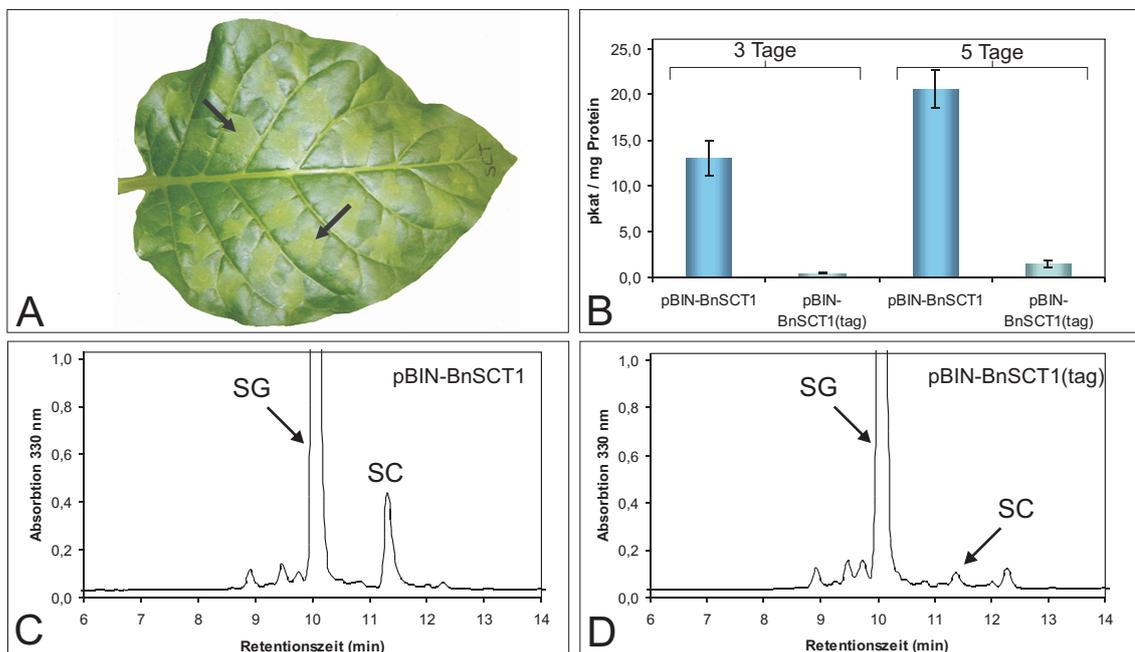


Abbildung 3.11.: Heterologe Expression von *BnSCT1* in *N. tabacum*. Infiltrierte Pflanzen wurden nach drei bzw. fünf Tagen geerntet und im Enzymassay getestet. A: Infiltrierte Bereiche (Pfeile) eines Tabakblattes nach fünftägiger Inkubation bei 23°C und 16 h Licht. B: Vergleich der spezifischen katalytischen Aktivität des heterolog exprimierten *BnSCT1*-Gens mit [pBIN-BnSCT1(tag)] und ohne 6 x His-tag (pBIN-BnSCT1) nach drei bzw. fünf Tagen. Aufgetragen sind die Mittelwerte von je fünf Messungen. C-D: Repräsentative Ausschnitte der HPLC-Chromatogramme nach Umsetzung von Sinapoylglucose (SG) zu Sinapin (SC) mit pflanzlichen Rohextrakten von BnSCT1 (D) und BnSCT1(tag) (E). Es wurden 150 µg Protein eingesetzt.

3.4. Molekulare Charakterisierung der *BnSCT*-Gene

3.4.1. Transkriptakkumulation im Verlauf der Samenentwicklung

Durch Northern-Analyse sollte die *BnSCT*-Transkriptakkumulation in *B. napus* untersucht werden. Es sollte die Frage beantwortet werden, in welchem Samenstadium das Transkript hauptsächlich akkumuliert. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus den verschiedenen Samenstadien isoliert, auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit einer radioaktiv markierten *BnSCT1*-cDNA hybridisiert. Die Auswertung der Northern Blots zeigte, dass in allen Samenstadien Transkripte nachgewiesen werden können (Abbildung 3.12). Obwohl im Samenstadium A augenscheinlich kein Signal zu erkennen war, konnte durch Quantifizierung mit Hilfe des PhosphorImagers eine sehr geringe Transkriptabundanz nachgewiesen werden. Im Verlauf der Samenentwicklung kommt es zu einem Anstieg des *BnSCT*-Transkripts, das sein Maximum im Samenstadium E erreicht, wenn die Entwicklung des Embryos abgeschlossen ist. Während der Austrocknung des Samens nimmt die Transkriptmenge rapide ab, sodass in den Stadien F und G nur noch 20 % des Transkripts im Vergleich zum vorhergehenden Stadium E nachweisbar sind. Die Akkumulation der Transkripte korreliert mit der nachgewiesenen *BnSCT*-Enzymaktivität (vgl. Abbildung 1.3). In Keimlingen, Blättern, Knospen und Blüten konnten keine *BnSCT*-Transkripte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

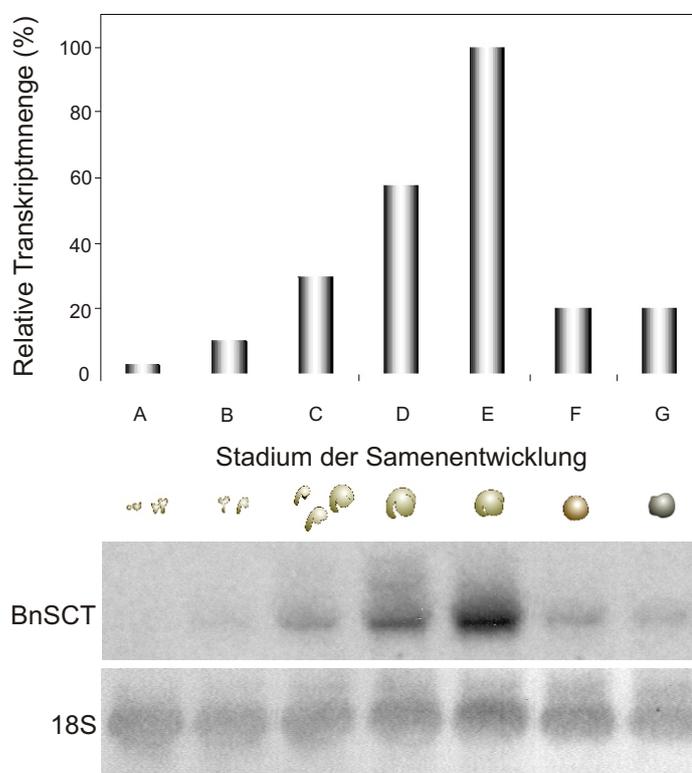


Abbildung 3.12: Northern-Analyse der Abundanz des *BnSCT*-Transkripts im Verlauf der Samenentwicklung.

10 μ g Gesamt-RNA wurden mit der radioaktiv-markierten *BnSCT1*-cDNA hybridisiert. Die Beladungskontrolle wurde durch Hybridisierung mit einer 364 bp Sonde gegen die 18S rRNA durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch die Exposition beider Hybridisierungen mit dem PhosphorImager. Die relative Signalstärke ist als Quotient der spezifischen Intensität und der Ladekontrolle angegeben (100 % *BnSCT1*/18S RNA entspricht 0,5). Die Stadien der Samenentwicklung sind in Abbildung 1.2 beschrieben.

3.4.2. Genomische Struktur der *BnSCT*-Gene

Genomische DNA-Blot-Analyse

Durch Southern-Analysen sollte überprüft werden, wie viele homologe Isoformen der SCT im Genom von *B. napus* vorhanden sind. Aufgrund der Amphidiploidie von *B. napus* ist das *BnSCT*-Gen in zwei ähnlichen genomischen Varianten zu erwarten, wobei jeweils eine Variante von einem der beiden Vorfahren *B. oleracea* (Kohl) und *B. rapa* (Rübsen) stammen sollte (Abschnitt 1.5).

Die Restriktion der genomischen DNA erfolgte mit der Restriktase *Xho*I. Diese schneidet die *BnSCT*-cDNA genau einmal, in der Nähe des 5'-Endes (112 bp nach dem Startcodon). Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten *BnSCT1*-cDNA als Sonde. Nach Auswertung der Southern Blots wurden, wie erwartet, zwei Isoformen des *BnSCT*-Gens in *B. napus* detektiert (Abbildung 3.13). Die größere Bande von etwa 10 kb korrespondiert mit dem Signal, welches in *B. oleracea* gefunden wurde. In *B. rapa* wurde wie in *B. oleracea* ebenfalls nur ein Signal detektiert. Dieses war allerdings mit einer Größe von etwa 7 kb größer als das entsprechende Fragment aus *B. napus*, das ein Molekulargewicht von etwa 5,9 kb hatte.

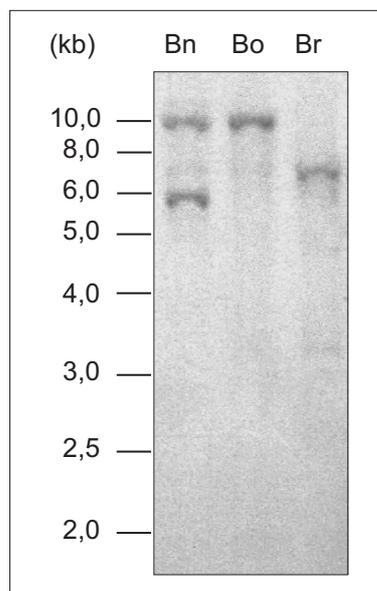


Abbildung 3.13: Genomische Southern-Analyse in *B. napus* (Bn), *B. oleracea* (Bo) und *B. rapa* (Br).

5 μ g genomische DNA aus Keimlingen wurde mit dem Restriktionsenzym *Xho*I über Nacht bei 37°C inkubiert, elektrophoretisch getrennt und auf einer Nylon-Membran immobilisiert. Die Hybridisierung wurde unter stringenten Bedingungen mit der kompletten radioaktiv-markierten *BnSCT1*-cDNA durchgeführt. Die Exposition erfolgte für drei Tage bei -80°C.

Die Ergebnisse der Southern-Analyse deuten darauf hin, dass die in *B. napus* gefundenen zwei *BnSCT*-Isoformen sehr wahrscheinlich von den Vorgängern *B. oleracea* und *B. rapa* abstammen. Die unterschiedlich großen Signale zwischen *B. napus* und *B. rapa* lassen eine Umgestaltung im Genom einer der beiden Spezies vermuten. Eine Aussage darüber, ob und wie viele paraloge Formen der SCT in *B. napus* bzw. in jedem der beiden Elterngenome vorhanden sind, lässt sich durch diese Southern-Analyse nicht treffen.

Amplifizierung genomischer Fragmente

Mit Hilfe der Primer, die bereits bei der Klonierung der *full length* cDNAs zum Einsatz kamen (5'SCTBn und 3'SCTBn), konnten genomische Fragmente aus *B. napus*, *B. oleracea* und *B. rapa* durch PCR amplifiziert werden. Alle vier Fragmente hatten eine Größe von ca. 2900 bp und enthielten 13 Introns (Abbildung A.3 bis A.6). Die aus *B. napus* klonierten Fragmente *BnSCT1* und *BnSCT2* waren auf Nukleotidebene 97 % identisch. Sequenzvergleiche ergaben weiterhin 99 % Identität von *BnSCT1* zu *BoSCT* aus *B. oleracea* und ebenfalls 99 % Identität von *BnSCT2* zu *BrSCT* aus *B. rapa*. Dies deutet darauf hin, dass *BnSCT1* wahrscheinlich dem C-Genom von *B. oleracea* und *BnSCT2* dem A-Genom von *B. rapa* entstammt.

Alle klonierten genomischen *Brassica*-Fragmente zeigten das gleiche Exon-Intron Muster. Dieses ist in Anordnung und Größe dem des genomischen Bereichs des SCT-Gens (*SNG2*) aus *A. thaliana* sehr ähnlich (Abbildung 3.14). Der auffälligste Unterschied wurde im zweiten Intron beobachtet. Dieses war in allen vier *Brassica*-Genen mehr als doppelt so groß im Vergleich zum *Arabidopsis*-Gen.

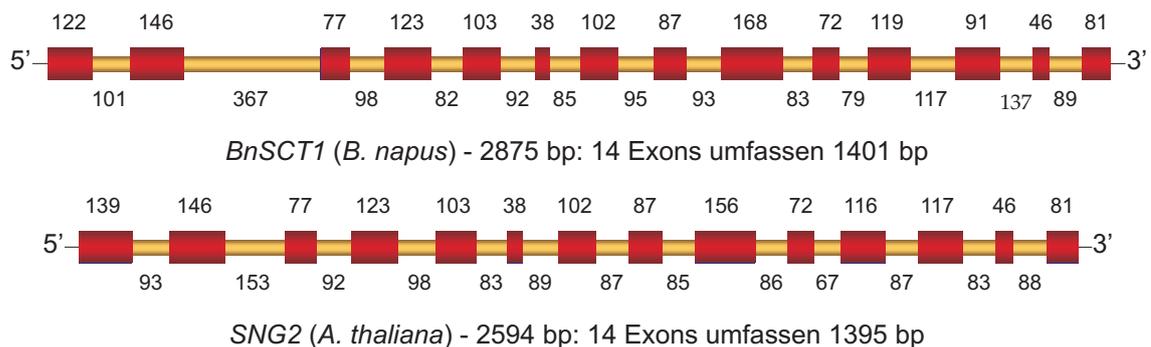


Abbildung 3.14.: Exon-Intron-Struktur von *BnSCT1* aus *B. napus* und *SNG2* aus *A. thaliana*. Die Anordnung und Größe (in bp) der Exons (rot) und Introns (gelb) der *Brassica*-Gene (exemplarisch *BnSCT1*, oben im Bild) sind vergleichend zu *A. thaliana* (*SNG2*, unten im Bild) dargestellt.

Amplifizierung 5' und 3' genomischer Bereiche durch *Genome Walking*

Beim *Genome Walking* wird genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen, die glatte Enden generieren, geschnitten. An die 5'- bzw. 3'-Enden der Restriktionsfragmente wird ein DNA-Adaptor mit bekannter Sequenz ligiert. Der Bereich zwischen diesem Adaptor und einer bereits bekannten Sequenz des Zielgens kann dann durch PCR amplifiziert werden (Abschnitt 2.10).

Für die Klonierung des 5'-gelegenen Bereiches von *BnSCT1* und *BnSCT2* wurde eine PCR mit den Primern AP1 und 3'Genwalk, gefolgt von einer Nested-PCR mit den Primern AP2 und 3'NestGenwalk durchgeführt. Ausgehend von *EcoRV* geschnittener DNA konnte eine

Sequenz von 1980 bp aus der genomischen Region eines *BnSCT*-Gens in 5'-Richtung des Startcodons amplifiziert werden (Abbildung A.7). Datenbankanalysen dieses Fragmentes ergaben Regionen mit hoher Sequenzidentität zu zwei Genen, die sich in *A. thaliana* in *upstream*-Richtung von *SNG2* auf dem Chromosom 5 befinden. Die Nukleotide 1 bis 380 der *B. napus*-Sequenz (*5'BnSCT1*) zeigten 85 % Identität zum 3'-Bereich des für ein Hitzeschockprotein codierenden Gens *mtHSC70-2* (NM120996; Sung et al., 2001). Darüber hinaus wurde zwei kurze Regionen mit einer Identität von 89 % (Nukleotide 843 bis 954) bzw. 86 % (Nukleotide 1029 bis 1081) zum *SDH3*-Gen gefunden (NM120997). *SDH3* codiert für eine Succinatdehydrogenase Cytochrom B Untereinheit, die Teil des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes II ist (Figueroa et al., 2002).

Um eine Zuordnung von *5'BnSCT1* zum A- bzw C-Genom zu ermöglichen, sollten die entsprechenden Regionen aus *B. rapa* und *B. oleracea* kloniert werden. Mit Hilfe eines abgeleiteten 5'Primers (5'PromWalk) und des 3'NestGenwalk Primers konnten durch PCR an genomischer DNA von *B. oleracea* zwei Fragmente amplifiziert werden (*5'BoSCT1* und *5'BoSCT2*, Abbildung A.9 und A.10), die untereinander eine Identität von 97 % auf Nukleotidebene aufwiesen. In beiden Sequenzen wurden wiederum hohe Sequenzidentitäten zu *mtHSC70-2* und *SDH3* gefunden. Ausgehend von genomischer DNA aus *B. rapa* wurde eine Sequenz isoliert (*5'BrSCT*), die etwa 500 Nukleotide weniger enthielt, als die bisher bereits analysierten Regionen (Abbildung A.8). Sequenzvergleiche zeigten das die Verkürzung von *5'BrSCT* auf eine Deletion des 3'-Bereiches von *mtHSC70-2* zurückzuführen ist (Abbildung 3.15 und A.11).

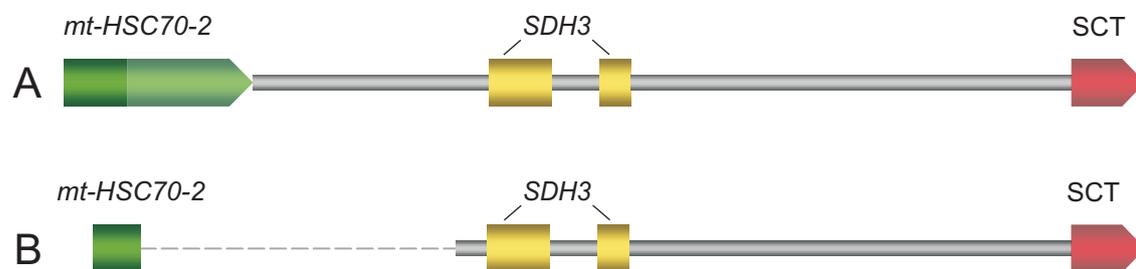


Abbildung 3.15.: Schematische Darstellung der dem C-Genom entsprechende 5'Region von *5'BnSCT1*, *5'BoSCT1* und *5'BoSCT2* (A) im Vergleich zu *5'BrSCT* des A-Genoms (B). Dargestellt sind der 3'-Bereich eines Gens mit hoher Sequenzidentität zu *mtHSC70-2*, zwei Regionen mit Identität zu *SDH3* sowie der Beginn des *SCT*-Gens. Die gestrichelte Linie (B) zeigt den fehlenden Sequenzbereich von *5'BrSCT*.

Durch die Klonierung der 5'-Regionen beider Eltern Genome von *B. napus* und deren Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass *5'BnSCT1* die höchste Identität zu *5'BoSCT1* aufweist und somit auf das C-Genom von *B. oleracea* zurückzuführen ist. Durch diverse PCR- und *Walking*-Ansätze wurde versucht, eine dem A-Genom entsprechende Sequenz aus *B. napus* zu erhalten. Es gelang jedoch in keinem dieser Ansätze, die 5'Region des *BnSCT2*-Gens zu klonieren.

Durch *Genome Walking* kann neben der 5'-Region einer bekannten Sequenz auch der Bereich in 3'-Richtung dieser Sequenz amplifiziert werden. Ausgehend von *DraI* und *StuI* geschnittener DNA aus *B. napus* wurden durch PCR mit Hilfe genspezifischer Primer (5'Genwalk und 5'NestGenwalk) und der Primer AP1 bzw. AP2 zwei Fragmente mit einer Größe von 906 (3'*BnSCT1*) bzw. 544 bp (3'*BnSCT2*) isoliert (Abbildung A.12 und A.13). Die Sequenzidentität der ersten 500 bp beider Fragmente beträgt 78 %. Datenbankanalysen lassen vermuten, dass das Gen in 3'-Richtung von *BnSCT1* und *BnSCT2* für eine anorganische Pyrophosphatase codiert, da die entsprechende Region sehr hohe Sequenzidentität zu *PPa* (AY551439; Schulze et al., 2004) aus *A. thaliana* aufweist.

Für die Zuordnung der beiden amplifizierten Sequenzen zum A- bzw. C-Genom wurde eine PCR mit den abgeleiteten Primern 5'Term und 3'Term an genomischer DNA von *B. rapa* und *B. oleracea* durchgeführt. Aus *B. oleracea* konnten zwei Fragmente mit einer Länge von 555 (3'*BoSCT1*) und 539 bp (3'*BoSCT2*) und aus *B. rapa* ein Fragment mit einer Länge von 510 bp (3'*BrSCT*) amplifiziert werden (Abbildung A.14 bis A.16). Durch Sequenzvergleiche zeigte sich, dass 3'*BnSCT1* dem C-Genom von *B. oleracea* und 3'*BnSCT2* dem A-Genom von *B. rapa* zuzuordnen ist.

Screening einer genomischen Bank aus *B. napus*

Dank einer Kooperation mit Dr. Rod Snowdon vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Justus-Liebig-Universität Gießen stand eine genomische Bank von *B. napus* zur Verfügung. Mit Hilfe dieser Bank sollte der genomische 5'-Bereich des *BnSCT2*-Gens kloniert werden.

Durch die Hybridisierung von drei Macroarrays mit einer radioaktiv markierten *BnSCT1*-cDNA konnten 47 Signale identifiziert werden (Abschnitt 2.6.6). Die aus den entsprechenden Klonen isolierte BAC-DNA wurde in einer PCR mit Primern gegen das *BnSCT*-Gen (5'SCTBn und 3'SCTBn) eingesetzt. Die dadurch identifizierten neun Klone, die ein ca. 3 kb großes genomisches *BnSCT*-Fragment enthielten, wurden anschließend in drei weiteren PCRs eingesetzt (Abbildung 3.16).

Die erste PCR wurde mit Primern gegen die 5'-Region der SCT durchgeführt (5'PromWalk und 3'NestGenWalk). Aus fünf Klonen (Nummer 1, 5, 7, 8 und 9) konnte ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 2 kb amplifiziert werden. Diese Größe korreliert mit 5'*BnSCT1*. Bei einem Klon hingegen (Nummer 4) wurde ein schwaches Signal mit einer Größe von ca. 1,5 kb sichtbar. Dies entspricht der Größe des klonierten 5'-Bereiches aus *B. rapa* (5'*BrSCT*). Ob dieser Klon den entsprechenden genomischen Bereich des A-Genoms trägt, wurde durch zwei weitere PCRs mit Primern gegen die 3'-Region der SCT untersucht. Dazu wurden zwei Primer aus den 5'-unvollständigen cDNAs SCP1 und SCP2 abgeleitet (Abschnitt 3.1), da Sequenzvergleiche zeigten, dass SCP1 wahrscheinlich dem C- und SCP2 dem A-Genom entstammt. Die Primer (3'UTR1 und 3'UTR2) wurden dabei so gewählt, dass sie spezifisch

nur eines der beiden *BnSCT*-Gene erkennen. In Kombination mit dem 5'NestGenWalk Primer zeigte sich, dass die Klone 1, 2, 5, 7, 8 und 9 den 3'-Bereich von *BnSCT1* (C-Genom) und die Klone 3 und 4 den 3'-Bereich von *BnSCT2* (A-Genom) enthielten. Für weitere Untersuchungen wurde, repräsentativ für das C-Genom, Klon 5 ausgewählt. Da nur bei Klon 4 ein Signal für die 5'-Region detektiert werden konnte, wurden die nachfolgenden Analysen hinsichtlich des A-Genoms mit diesem BAC durchgeführt.

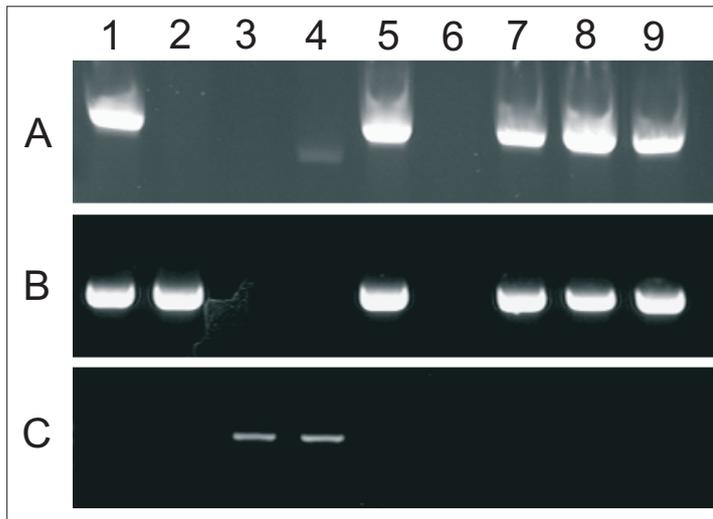


Abbildung 3.16: PCR-Analyse der BAC-Klone aus *B. napus* mit Primern gegen die 5'- (A) und 3'-Region (B und C) von *BnSCT*.

A: 5'PromWalk, 3'NestGenWalk

B: 5'NestGenWalk, 3'UTR1

C: 5'NestGenWalk, 3'UTR2

Die interessanten Sequenzen beider Klone sollten für die Sequenzierung subkloniert werden. Dazu wurden zunächst *EcoRI*-Restriktionsfragmente hergestellt und in den Vektor pYES2 der Firma Invitrogen (Karlsruhe) subkloniert (Abschnitt 2.11). Die Identifizierung der Klone mit dem gewünschten Insert erfolgte durch Koloniehybridisierung mit einer Digoxigeninmarkierten *BnSCT1*-cDNA als Sonde. Dies wurde nach Plasmidisolierung mittels PCR mit Primern gegen das *BnSCT*-Gen (5'SCTBn und 3'SCTBn) überprüft.

Durch die Subklonierung eines *EcoRI*-BAC-Fragmentes aus Klon 5 konnte eine 6969 bp umfassende Sequenz des *BnSCT1*-Gens gewonnen werden, die sich aus 2876 bp von *BnSCT1* sowie 2134 bp *upstream* und 1959 bp *downstream* des Gens zusammensetzt (Abbildung A.17). Es wurden wiederum die bekannten Sequenzidentitäten zu *mtHSC70-2*, *SDH3* und *PPA* aus *A. thaliana* gefunden. Hinzu kommt eine hohe Sequenzidentität (98 %) der letzten 100 bp des 3'-Endes zum *Mdh*-Gen aus *B. napus* (AJ242712), das für eine Malatdehydrogenase codiert. Die Abbildung 3.17 zeigt zusammenfassend die Struktur des klonierten BAC 5-Subfragmentes und stellt diese der genomischen Struktur im Bereich des *SNG2* Locus auf Chromosom 5 in *A. thaliana* gegenüber. Es wird deutlich, dass die in *B. napus* gefunden Gene in *A. thaliana* in ähnlichen Regionen zu finden sind. Im Gegensatz zu *B. napus* ist im *Arabidopsis*-Genom die vollständige Sequenz des *SDH3*-Gens vorhanden. Die drei noch nicht charakterisierten Gene aus *A. thaliana*, die zwischen *SDH3* und *SNG2* liegen, wurden in *B. napus* in dieser Region nicht gefunden.

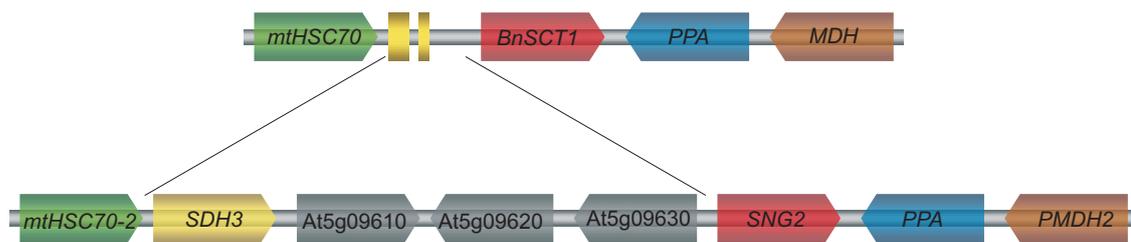


Abbildung 3.17.: Schematische Darstellung des BAC-Subfragmentes aus Klon 5 (oben) im Vergleich zur genomischen Region des *SNG2*-Locus auf Chromosom 5 von *A. thaliana* (unten). Dargestellt sind die putativen Gene *upstream* und *downstream* von *BnSCT1*. Die Gene des *SNG2*-Locus wurden vom BAC-Klon F17I14 (AL353994) übernommen. Grau dargestellt sind noch nicht näher charakterisierte Gene. Die Abbildung ist nicht maßstabgerecht.

Trotz mehrfacher Versuche gelang die Subklonierung eines *BnSCT2*-Fragments aus Klon 4 auf diesem Wege nicht. Um dennoch an entsprechende Sequenzinformationen zu gelangen, wurden mehrere PCR-Ansätze durchgeführt. Dazu wurden zunächst zwei Primer aus dem Subfragment von Klon 5 abgeleitet, die die gesamte Sequenz einschließen (5'BAC und 3'BAC). Mit diesen Primern konnte jedoch kein Fragment amplifiziert werden. In zwei sich anschließenden PCRs wurden zwei neue Primerkombinationen getestet. Dabei wurde der 5'BAC-Primer mit 3'SCTBn und der 3'BAC-Primer mit 5'SCTBn eingesetzt. Durch diese Kombinationen sollten ein 5'- und ein 3'-Fragment amplifiziert werden, die beide die genomische Sequenz von *BnSCT2* einschließen.

Mit Hilfe der Primer 5'SCTBn und 3'BAC konnte ein Fragment mit einer Größe von 4910 bp amplifiziert werden (3'BAC4, Abbildung 3.18 B und A.18). Dieses enthält den gesamten codierenden Bereich von *BnSCT2* (2865 bp) und die sich anschließende 3'-Region mit dem putativen *PPA*- und *MDH*-Gen. Diese Anordnung entspricht der in Klon 5 gefundenen genomischen Struktur der 3'-Region (Abbildung 3.17). Durch PCR mit den Primern 5'BAC und 3'BnSCT wurde ein 5638 bp großes Fragment isoliert (5'BAC4, Abbildung 3.18 A und A.19). Die erhaltene Nukleotidsequenz trägt die 5'-Region des putativen *mtHSC70*-Gens sowie die beiden Regionen mit hoher Sequenzidentität zu *SDH3*, die auch in Klon 5 gefunden wurden (Abbildung A.19). Weiterhin waren drei Bereiche mit 84 - 93 % Identität zu *BnSCT2* vorhanden. Innerhalb dieser *BnSCT2*-Sequenzen befanden sich jedoch zwei Regionen, die nach Datenbankanalysen hohe Identität zu Sequenzabschnitten des genomischen BAC-Klons KBrH070I10 aus *B. rapa* L. ssp. *pekinensis* (AC172879) aufwiesen. Der Vergleich von 5'BAC4 mit der genomischen *BnSCT2*-Sequenz zeigte, dass die putative *BnSCT*-Sequenz nicht für eine funktionale SCT codiert. Die Sequenz ist durch zwei Insertionen mit Identität zu KBrH070I10 unterbrochen. Während sich die erste Insertion innerhalb des zweiten Introns befindet und somit keine Auswirkung auf die codierende Sequenz hat, liegt die zweite Insertion im vierten Exon und verursacht mehrere Stopcodons.



Abbildung 3.18.: Schematische Darstellung der BAC-Subfragmente aus Klon 4. Dargestellt sind die identifizierten Bereiche von 5'BAC4 (A) und 3'BAC4 (B). Weiterhin sind die für die Klonierung verwendeten Primer angegeben. Die Abbildung ist nicht maßstabgerecht.

3.4.3. Analyse der Promotoraktivität

Promotoren sind genomische Sequenzbereiche, an denen die Transkription eines Gens initiiert wird. Oftmals enthalten sie regulatorische Sequenzmotive, die sogenannten *cis*-aktiven Elemente. Durch komplexe molekulare Wechselwirkungen mit *trans*-aktiven Faktoren wird bestimmt, wann und wie häufig die nachfolgende Nukleotidsequenz abgelesen wird. Durch Fusion mit Reportergenen, deren Expression leicht zu quantifizieren ist, kann die Promotoraktivität eines bestimmten Gens in der intakten Pflanze untersucht werden. Als Reportergen wurde das, in Pflanzen nicht enthaltene, für die β -Glucuronidase (GUS) codierende *uidA*-Gen aus *E. coli* verwendet. Die β -Glucuronidase katalysiert die hydrolytische Spaltung eines großen Spektrums von β -Glucuroniden und β -Galakturoniden. Die enzymatische Aktivität lässt sich im Gewebe der Pflanze, histochemisch mittels einer Farbreaktion nachweisen (Blaufärbung).

Die Identifizierung der Promotorsequenz des streng samenspezifisch exprimierten *BnSCT*-Gens ist für die biotechnologische Modifizierung der Rapssaat von großem Interesse. Deshalb wurden Promotor-GUS-Fusionskonstrukte basierend auf dem Vektor pGREEN hergestellt (Abschnitt 2.12). Da zu Beginn der Analysen keine Sequenzinformation über die putative Promotorregion des *BnSCT2*-Gens vorlag, wurde neben dem genomischen 5' Bereich von *BnSCT1* (pBnSCT1), die durch PCR amplifizierte *upstream*-Region aus *B. rapa* (pBrSCT) verwendet. Durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation wurden die Expressionskassetten (Abbildung 3.19) in das Genom von *A. thaliana* integriert.

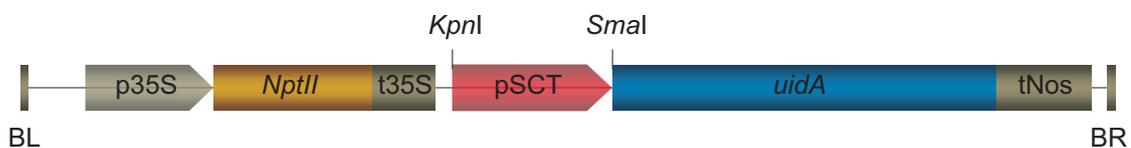


Abbildung 3.19.: Promotor:GUS-Fusionskonstrukt. BL und BR: Linke und rechte Bordersequenz, p35S und t35S: 35S-Promotor bzw. -Terminator, *NptII*: Neomycin-Phosphotransferase (Kanamycin-Resistenz), pSCT: putative Promotorsequenzen der SCT aus *B. napus* (pBnSCT1: 729 bp) bzw. *B. rapa* (pBrSCT: 722 bp), (*uidA*): β -Glucuronidase (GUS), tNos: Terminator der Nopalinsynthetase. Ferner sind die zur Klonierung genutzten Schnittstellen angegeben.

Für die Analyse der Promotoraktivität wurden je Konstrukt sechs unabhängige transgene T2-Promotor:GUS-Linien in *A. thaliana* erzeugt und auf die Enzymaktivität der β -Glucuronidase getestet (Abschnitt 2.12). Wie die Abbildung 3.20 zeigt, konnte für beide Promoter-GUS-Fusionskonstrukte durch die Blaufärbung, die die GUS-Aktivität anzeigt, eine Promotoraktivität nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die getesteten *upstream*-Regionen von *B. napus* und *B. rapa* die notwendigen *cis*-Elemente für eine Transkription im Samen enthalten. Für beide Sequenzen wurde eine Blaufärbung im Embryo und in der Samenschale beobachtet. Unterschiede in der Farbintensität zwischen beiden getesteten Promotor-GUS-Konstrukten waren nicht erkennbar (Abbildung 3.20 B und C).

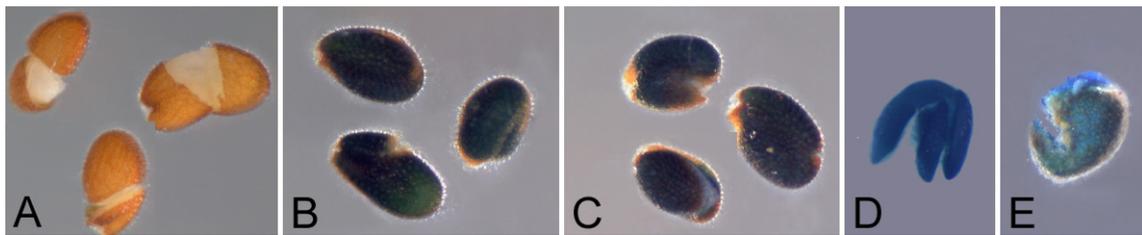


Abbildung 3.20.: Analyse der Promotoraktivität durch Nachweis der GUS-Aktivität der Konstrukte pGREEN (A) BnSCT1GUSpGREEN (B) und BrSCTGUSpGREEN (C) in geöffneten T2-Samen von *A. thaliana*. Die Isolierung des Embryos (D) aus der Schale (E) zeigte eine Blaufärbung in beiden Geweben.

Um die zelluläre Verteilung der SCT-Transkripte zu untersuchen, wurden T2-Samen von *A. thaliana* fixiert und nach Inkubation in der GUS-Färbelösung in PEG eingebettet (Abschnitt 2.12). Die lichtmikroskopische Auswertung 4 μ m dicker Semidünnschnitte zeigte für beide Konstrukte eine gleichmäßige Farbverteilung in den Zellen der Kotyledonen und des Hypokotyls (Abbildung 3.21). Die in der Samenschale beobachtete Blaufärbung ist auf eine GUS-Aktivität in der Aleuronschicht zurückzuführen. Die Aleuronschicht ist kein Bestandteil der Samenschale sondern gehört zum Endosperms und ist somit embryonalen und nicht maternalen Ursprungs (Groot und Van Caesele, 1993).

Für die Quantifizierung der Promotoraktivität bietet sich die Luciferase (EC 1.13.12.7) aus *Photinus pyralis* („Firefly“) als Reportergen an. Die Luciferase katalysiert die ATP- und Mg^{2+} -abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von 562 nm. Diese Lichtemission kann gemessen werden und dient als Maß für die Stärke eines Promotors. Für die im Rahmen des Forschungsprojektes „NAPUS 2000“ durchgeführte Promotorstudie in *B. napus* wurden die beiden Sequenzen pBnSCT1 und pBrSCT durch Restriktionsverdau (*Kpn*I, *Sma*I) aus den GUS-Fusionsvektoren isoliert und in den binären Vektor NapinLucpCambia gegen den napin590-Promotor ausgetauscht. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation der Konstrukte wurde durch das Saatunion-Resistenzlabor in Leopoldshöhe durchgeführt. Für beide Konstrukte konnten transgene Pflanzen regeneriert werden, die derzeit im Rahmen der Promotorstudie von Kooperationspartnern analysiert werden.

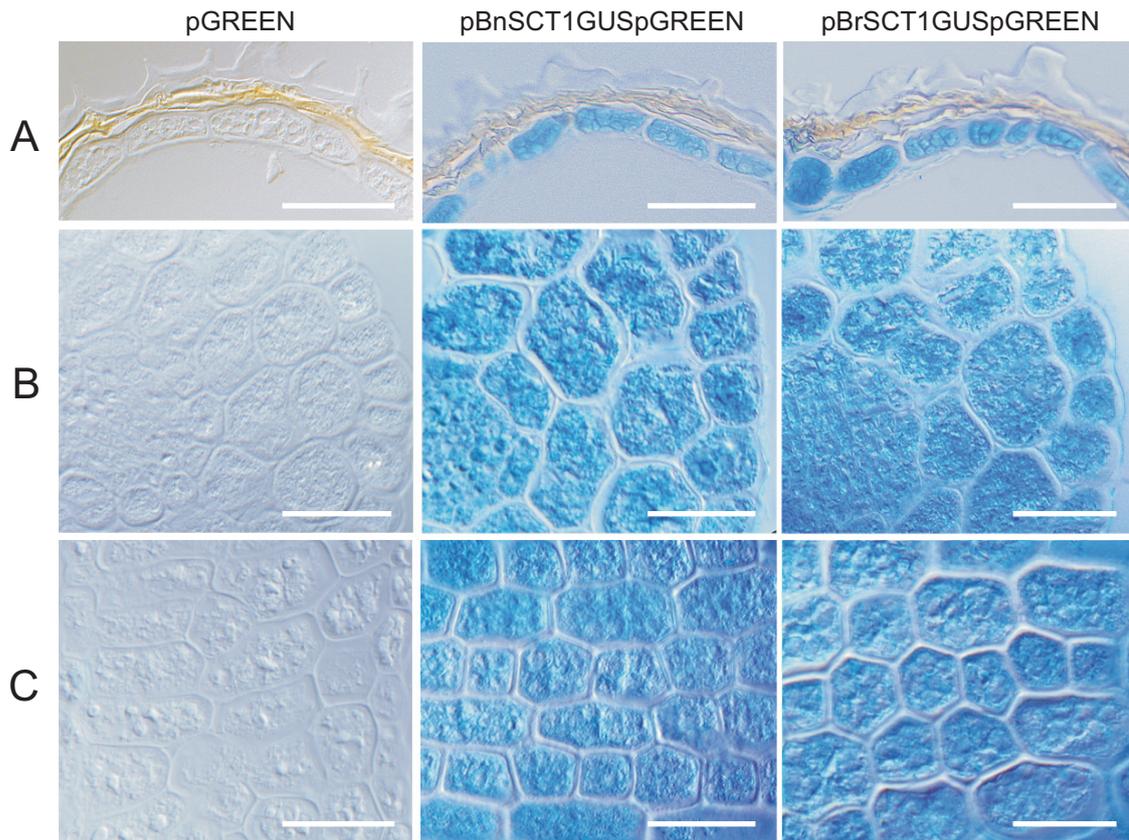


Abbildung 3.21.: Zelluläre Verteilung der GUS-Aktivität in T2-Samen von *A. thaliana*. Für die Konstrukte pBnSCT1GUSpGREEN und pBrSCT1GUSpGREEN konnte eine Blaufärbung in der Aleuronschicht (A), im Hypokotyl (B) und in den Kotyledonen (C) nachgewiesen werden. Balken entspricht 20 μm .

3.5. Reduktion des Sinapingehaltes durch PTGS

Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war zu prüfen, ob eine Reduktion des Sinapingehaltes in der Rapssaat durch die Suppression des *BnSCT*-Gens erreicht werden kann. Zu diesem Zweck wurde die für Pflanzen beschriebene Methode des *Post Transcriptional Gene Silencing* (PTGS) angewendet. Dieser Mechanismus, der durch sequenzspezifische, doppelsträngige RNA (dsRNA) induziert wird, ist auch in anderen Eukaryoten vorhanden und wird in Tieren als *RNA interference* (RNAi; Fire et al., 1998) und in Pilzen als *quelling* bezeichnet (Cogoni und G, 2000). Das Modell zum zentralen Mechanismus des RNA-Silencings wurde in *Drosophila melanogaster* beschrieben und basiert darauf, dass in die Zelle eingebrachte dsRNA als fremd erkannt und die dazu homologe mRNA des Zielgens in einem sequenzspezifischen Mechanismus abgebaut wird. Dabei wird die dsRNA von einem Proteinkomplex (Dicer), der u.a. ein RNaseIII-Homolog fusioniert mit einer Helikasedomäne enthält, in *small interfering* (si)RNAs zerteilt (21-26 Nukleotide), die in den *RNA Induced Silencing Complex* (RISC) eingelagert werden (Bernstein et al., 2001; Hammond et al., 2000). Dieser Komplex vermittelt die Bindung von siRNA und mRNA

des Zielgens, wodurch letztere für den Abbau markiert wird. In der Pflanzenforschung wird PTGS als Methode verwendet, um einzelne Gene oder Gruppen von einander ähnlichen Genen gezielt abzuschalten (u.a. Smith et al., 2000; Wesley et al., 2001). Die biologische Funktion des PTGS liegt wahrscheinlich in der Abwehr von viralen Infektionen und der Inaktivierung von Retrotransposons (Übersicht u.a. in Baulcombe, 2004).

Zur Erzeugung eines RNAi-Konstruktes wurde ein 332 bp Fragment der *BnSCT1*-cDNA, beginnend mit dem Startcodon, durch PCR mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *NcoI* und *SmaI* [Primer: 5'*Nco*-RNAi(as), 3'*Sma*-RNAi(as)] bzw. *NheI* und *BamHI* [Primer: 5'*Nhe*-RNAi(s), 3'*Bam*-RNAi(s)] versehen. Die Subklonierung erfolgte über die eingefügten Schnittstellen in den Vektor pBNGUS. Dieser enthält zwischen dem samen-spezifischen napin590-Promotor aus *B. napus* und dem nos-Terminator aus *A. tumefaciens* ein Subfragment des bakteriellen *uidA*-Gens, welches als Spacer dient. Die gesamte Expressionskassette wurde über *HindIII*- und *SpeI*-Restriktion in den binären Vektor pLH7000 transferiert (Abbildung 3.22) und durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in *A. thaliana* und *B. napus* L. cv. Lisora transformiert.

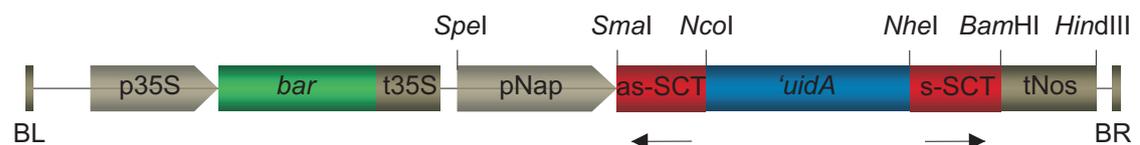


Abbildung 3.22.: RNAi-Konstrukt für die Suppression der SCT (pLH-SCT-GUS). BL und BR: Linke und rechte Bordersequenz, p35S und t35S: 35S-Promotor bzw. -Terminator aus dem Blumenkohlmosaikvirus, *Bar*: Phosphinotricin-Acetyltransferase (Basta[®]-Resistenz), pNap: samen-spezifischer Promotor des *napA*-Gens aus *B. napus*, asSCT: antisense-*BnSCT1* (332 bp), s-SCT: sense-*BnSCT1* (332 bp), *uidA*: GUS-Spacer (1023 bp) tNos: Terminator der Nopalinsynthetase. Ferner sind die zur Klonierung genutzten Schnittstellen angegeben.

Ein RNAi-Ansatz in *A. thaliana* wurde gewählt, da die Modellpflanze der pflanzlichen Molekularbiologie, im Gegensatz zu *B. napus*, nur einen etwa sechswöchigen Lebenszyklus von der Aussaat bis zur Samenreife hat und sehr einfach und effizient mit *A. tumefaciens* durch *floral dip* zu transformieren ist (Clough und Bent, 1998). Die hohe Identität des gewählten RNAi-Fragmentes von 84 % zum *SNG2*-Gen aus *A. thaliana* machten einen Erfolg dieses Ansatzes wahrscheinlich (Abbildung 3.23).

```

ATGAGAAATCTTTACTTTCTAGTCTTATTTCCGTTGAG-----CATCTTGATTTTGGTTGATGCTTCTTTGCATGTGAAGTATCTTCCTGGT
.....C...AG...CA.C...TA...CCCTCTTCTTCATT-----.-.-.-.TA...C.....
CTTGAAGGTCTCTTCTTTTGTAGCTAGAGACTGGGTATGTGAGTGTGGTGAATCTGGAGATGTTGAGCTCTTTACTACTTTGTGAAATCAGAGAGCA
T.....C.....A.....A.....G.....
ATCCAGATAAAGATCCTCTCATGATTGGCTAACTGGTGGCCCTGGATGCAGCTCAATTTGTGGTTTACTCTTTGCAAATGGTCCCTTTGGCTTTAAAGG
.....A.T.....C.....A.....C.....C.C.....A.G.....C.....C.....A.....
GGATGAGTATAATGGGACACTGCCTCCTTTAGAGCT
.....G.A.....C.....T.....

```

Abbildung 3.23.: Nukleotidsequenz des *BnSCT*-RNAi-Fragments und Sequenzidentität zu *SNG2* aus *A. thaliana*. Nukleotidsubstitutionen in *SNG2* sind in rot dargestellt.

In den Transformationsexperimenten zur samenspezifischen Sinapatesterreduktion unter Verwendung des pLH-SCT-GUS Konstruktes in *A. tumefaciens* EHA 105 wurden 50 Pflanzen selektiert. Die Überprüfung der Integration der Suppressionskassette erfolgte durch PCR an genomischer DNA mit Primern gegen das *Bar*-Gen (5'Bar und 3'Bar). Als Kontrolle dienten 50 Pflanzen, die mit dem Vektor pLH7000 transformiert wurden. Nach Analyse der T2-Samen mittels HPLC auf den Sinapin- und Sinapoylglucosegehalt konnten zwischen den RNAi-Pflanzen und den Kontrollpflanzen hinsichtlich dieser beiden Inhaltsstoffe große Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 3.24). In den T2-Samen der Pflanzen, die das Suppressionskonstrukt enthielten wurden Sinapingehalte zwischen 4,43 mg/g und 10,17 mg/g Samen gemessen. In den Kontrollen dagegen lagen die Gehalte zwischen 8,52 und 14,93 mg/g Samen. Der gemessene Sinapoylglucosegehalt lag in den RNAi-Pflanzen zwischen 0,17 mg/g und 6,89 mg/g Samen und war somit deutlich erhöht im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, die Werte zwischen 0,51 mg/g und 2,89 mg/g Samen zeigten. Der Sinapingehalt war hoch negativ korreliert mit dem Gehalt an Sinapoylglucose ($r = -0,78$). In den Kontrollpflanzen wurde ebenfalls eine, wenn auch geringere, negative Korrelation beider Inhaltsstoffe beobachtet ($r = -0,37$).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion des Sinapingehaltes um 48 %, verglichen mit der niedrigsten Kontrollpflanze, durch die Suppression des *SNG2*-Gens möglich ist. Die Blockierung der SCT erzeugt den gleichen Phänotyp, d.h. die Akkumulation von Sinapoylglucose anstelle von Sinapin, wie die SCT-defiziente Mutante SALK 002255 (Abschnitt 3.2). Die Effizienz dieses Ansatzes, angegeben als der prozentuale Anteil der Pflanzen, die einen geringeren Sinapingehalt als die niedrigste Kontrollpflanze zeigen, liegt bei 88 % (44 von 50 Pflanzen). Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse den RNAi-Ansatzes aus *A. thaliana* auf *B. napus* zu überprüfen, wurde das gleiche pLH-SCT-GUS-Konstrukt mit Hilfe des *A. tumefaciens* Stammes C58C1/pMP90 durch Infektion von Hypokotylsegmenten in die Sommerrapsorte Lisora transformiert. Die Transformation erfolgte durch das Saatenunion-Resistenzlabor in Leopoldshöhe nach einem modifizierten Protokoll von De Block et al. (1989). Leider konnten im Rahmen der vorliegenden Dissertation nur zwei transgene Rapspflanzen regeneriert werden. Nach Einzelkornanalyse von jeweils 20 T2-Samen mittels HPLC zeigte sich, dass keine der beiden Pflanzen im Sinapingehalt reduziert war. Die gemessenen Werte variierten zwischen 4,62 mg/g und 9,91 mg/g Samen und lagen somit im Bereich der Kontrollpflanzen ($n=5$), für die ein Gehalt zwischen 4,86 und 13,0 mg/g Samen ermittelt wurde.

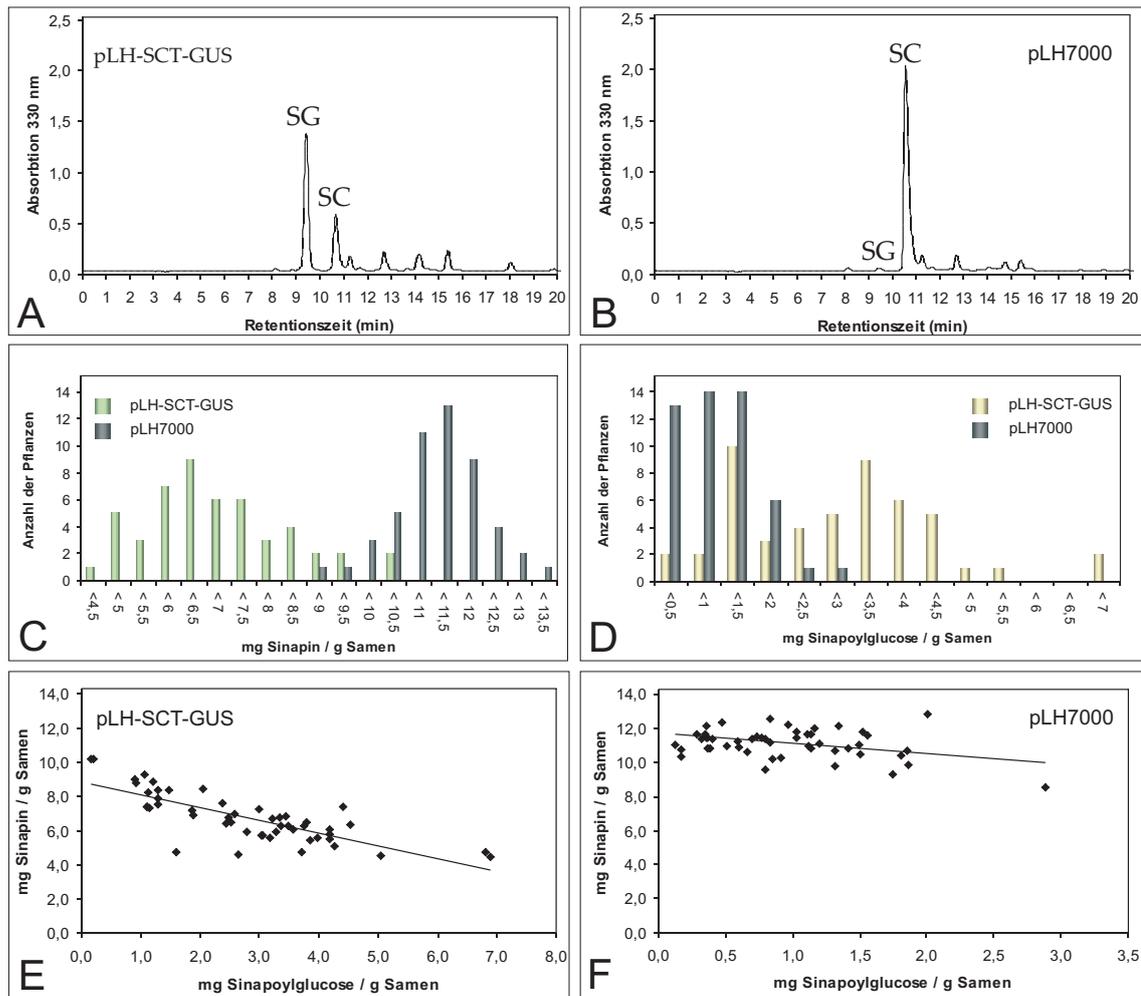


Abbildung 3.24.: Reduktion des Sinapingehaltes in *A. thaliana* durch Suppression des *SNG2*-Gens. Dargestellt sind repräsentative HPLC-Diagramme methanolischer Samenextrakte der T2 einer *A. thaliana*-Pflanze, die mit dem Suppressionskonstrukt pLH-SCT-GUS (A) bzw. dem Vektor pLH7000 (B) transformiert wurde. Weiterhin ist die Verteilung des Sinapin- (C) bzw. Sinapoylglucosegehaltes (D) innerhalb der Suppressions- und Kontrollpflanzen ($n=50$) angegeben. Der Gehalt an Sinapin (SC) und Sinapoylglucose (SG) zeigte für pLH-SCT-GUS (E) und pLH7000 (F) eine negative Korrelation (siehe Text).

3.6. Immunlokalisierung der BnSCT

3.6.1. Herstellung eines Peptidantikörpers

Für die Immunlokalisierung der BnSCT in den Samen von *B. napus* wurde ein Peptidantikörper in Kaninchen durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Für die Immunisierung wurden zwei hydrophile Peptidsequenzen von 12 und 14 Aminosäuren Länge gewählt, die eine geeignete Antigenizität versprachen (Abbildung 3.25). Beide Peptide wurden an das Glykoprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelt und koinjiziert.

Wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben wurde, besteht aufgrund von Sequenzvergleichen die Annahme, dass die BnSCT verschiedene posttranslationale Modifizierungen erfährt. Dazu zählen das Abspalten einer Signalsequenz und das Herausschneiden eines Endopeptides. Daraus resultiert heterodimeres Protein mit einem theoretisch berechnete Molekulargewicht von ca. 47 kDa, dessen Untereinheiten eine Größe von ca. 29 kDa und 18 kDa haben und durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Weiterhin wurden vier putative N-Glykosilierungsstellen vorrausgesagt, von denen eine in der 29 kDa- und zwei in der 18 kDa-Untereinheit liegen. Die vierte befindet sich innerhalb des Endopeptids. Die Peptidsequenzen, gegen die der Antikörper gerichtet ist, befinden sich beide in der 29 kDa-Untereinheit (Abbildung 3.25), sodass im Western Blot Signale in dieser Größe zu erwarten sind.

```

1  MRNLYFLVLEPLSILLIVDASLHVKYLPGLEGLPFELETGYVSVGESGDVELFYFVKSESNDKDLPLMIWLTGGPGCS
81  SICGLLFANGPLAFKGDEYNGTLPPLELTSFSWTKVANILYLESPAGSGYSYAKTRRAETSSDTKQIHQIDQFLRSWFVD
161 HPEFISNSFYVGGDSYSGKIVPGVVQQISLGNEKGLTPLINIKGYVLGNPAVRTNLEPNHRVSFAHRMGLISDELHESLE
241 RNCGGKFFNVDPSNAKCSNGLLAYHQCISEIYIEQILLPCKVDYVLADISOTLPNIRTSRRRELKEFSRNDSSSLPPPS
321 CFTYRYFLSAFWANDENVRRALGVKKGFGKWSRCNTQNIPYTYDIHNAIPYHVINNSSRKGFRALIYSGDHDMMIPFSSTEA
401 WIKSILNYSIVDDWRPMMNSNQVAGYTRTYANKMTFATIKGGGHTAEYNPDQCCLMFKRWIDGESL

```

Abbildung 3.25.: Abgeleitete Proteinsequenz von *BnSCT1* aus *B. napus*. Die Signalsequenz und das Endopeptid sind grau hinterlegt. Putative N-Glykosilierungsstellen sind eingerahmt. Die für die Antikörperproduktion verwendeten Peptidsequenzen sind rot unterstrichen.

Der Peptidantikörper gegen die BnSCT wurde an Proteinextrakten aus unterschiedlichen Samenstadien getestet. Dazu wurde das lösliche Gesamtprotein aus ca. 100 mg Samen extrahiert und zunächst auf SCT-Aktivität mittels Enzymassay untersucht (Abbildung 3.26). Eine geringe Enzym-Aktivität konnte erstmals im Stadium B nachgewiesen werden. Vom Stadium C an war ein starker Anstieg zu beobachten der sein Maximum im Stadium E erreicht. Danach fällt die SCT-Aktivität wieder auf ein niedriges Niveau ab.

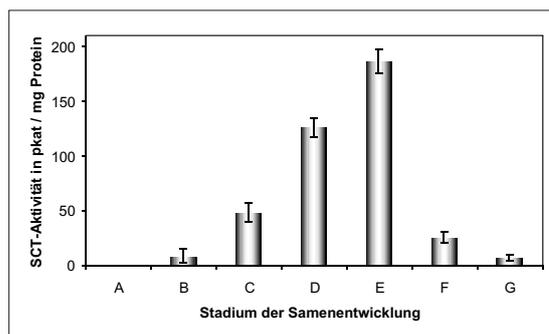


Abbildung 3.26: Verlauf der Enzymaktivität der BnSCT während der Samenentwicklung. In jeweils fünf parallelen Analysen wurden je 150 μg Protein in einem Enzym-Assay eingesetzt. Die Stadien der Samenentwicklung sind in Abbildung 1.2 beschrieben.

Für die Western Blot-Analysen wurden 20 μg Protein der Stadien B bis G sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abschnitt 2.7.4) und auf Nitrocellulose immobilisiert. In der anschließend durchgeführten Western-Analyse wurde der SCT-Antikörper (Kaninchen Anti-BnSCT-IgG) auf Spezifität getestet (Abbildung 3.27).

Nach reduzierender SDS-PAGE erkennt der Antikörper in den drei aktivsten Proteinfractionen (Stadium C, D und E) zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von 24 bzw. 29 kDa. Die Intensität beider Signale nimmt mit steigender SCT-Aktivität zu. Nach nicht-reduzierender SDS-PAGE wird in diesen drei Fraktionen eine diffuse Bande bei etwa 50 kDa sichtbar. Diese korreliert mit dem errechneten Molekulargewicht von 47 kDa für das gesamte Protein. Die 24 kDa-Bande ist in diesen Fraktionen weiterhin sichtbar und somit wahrscheinlich das Ergebnis einer unspezifischen Reaktion des Antikörpers. Die diffuse Bande bei 50 kDa könnte auf eine unterschiedliche Glykosilierung zurückzuführen sein. Dafür spricht auch das geringere Molekulargewicht des unlöslichen SCT-Proteins, das in *E. coli* exprimiert wurde. Als Prokaryot ist *E. coli* nicht in der Lage Proteine zu glykosilieren. In den beiden späten Samenstadien werden mehrere Banden mit einem Molekulargewicht zwischen 24 und 32 kDa erkannt. Da die Aktivität in diesen beiden Fraktionen allerdings nur noch gering ist und auch die Immunlokalisierung in diesen Stadien keine Signale ergaben (Abbildung 3.29), sind diese Signale ebenfalls als unspezifische Reaktion des Antikörpers anzusehen. Das Präimmunsereum zeigte keine Reaktivität gegenüber Proteinen aus *B. napus* bzw. der unlöslichen SCT aus *E. coli*.

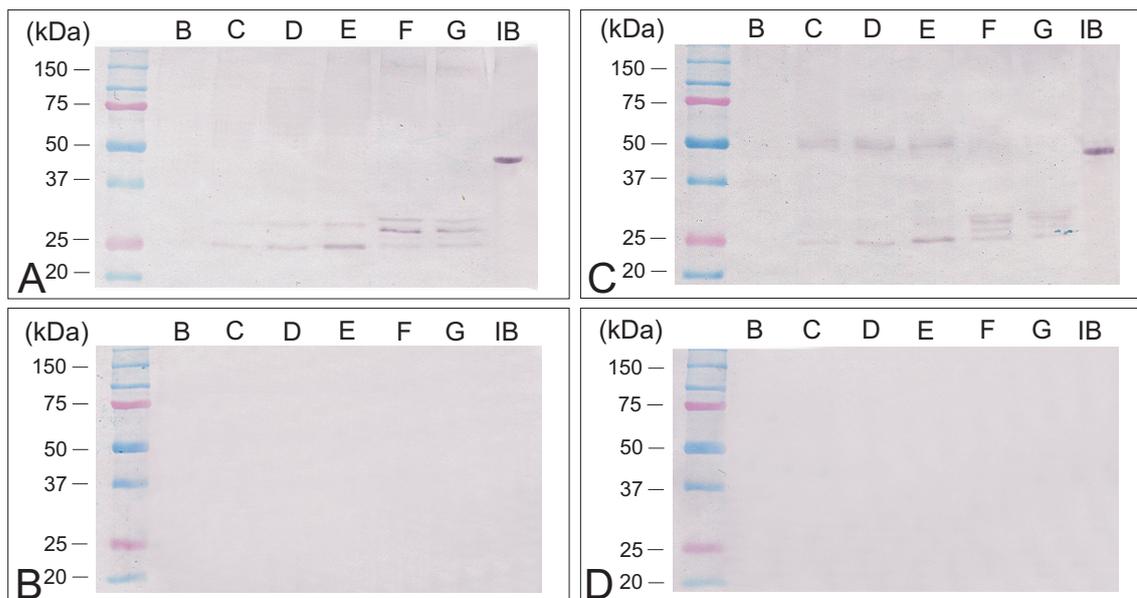


Abbildung 3.27.: Test des Peptidantikörpers im Western Blot. 20 μg lösliches Protein der Samenstadien B bis G und 200 ng rekombinanter SCT aus der nicht-löslichen *Inclusion Body*-Fraktion (IB) nach Expression in *E. coli* wurden unter reduzierenden (A und B) und nicht-reduzierenden Bedingungen (C und D) durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose immobilisiert. Die Immunreaktion erfolgte mit Kaninchen-Anti-BnSCT-IgG (A und C) bzw. mit dem Präimmunsereum (B und D) in einer Verdünnung von 1:1000.

3.6.2. Lokalisierung der BnSCT mittels Lichtmikroskopie

Lokalisierung der BnSCT

Sequenzanalysen wiesen darauf hin, dass die SCT als Vorläuferprotein synthetisiert und über eine N-terminale Signalsequenz in das ER und von dort über den sekretorischen Weg in die Vakuole transportiert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Immunmarkierung mit einem gegen die BnSCT gerichteten Peptidantikörper durchgeführt. Dazu wurden Semidünnschnitte von fixierten und in PEG eingebetteten Samen (Stadium E) von *B. napus* angefertigt und mit dem Antiserum gegen die BnSCT inkubiert, um deren Lokalisation innerhalb des Gewebes bzw. innerhalb einzelner Zellen untersuchen zu können.

Die Abbildung 3.28 zeigt die gewebespezifische Lokalisation der SCT in der Aleuronschicht und in den parenchymatischen Zellen der Kotyledonen und des Hypokotyls. Die grüne, ringförmige Fluoreszenz innerhalb der Zellen weist auf das SCT-Protein hin. Diese Fluoreszenz fehlt in den Proben, die mit dem Präimmenserum inkubiert wurden.

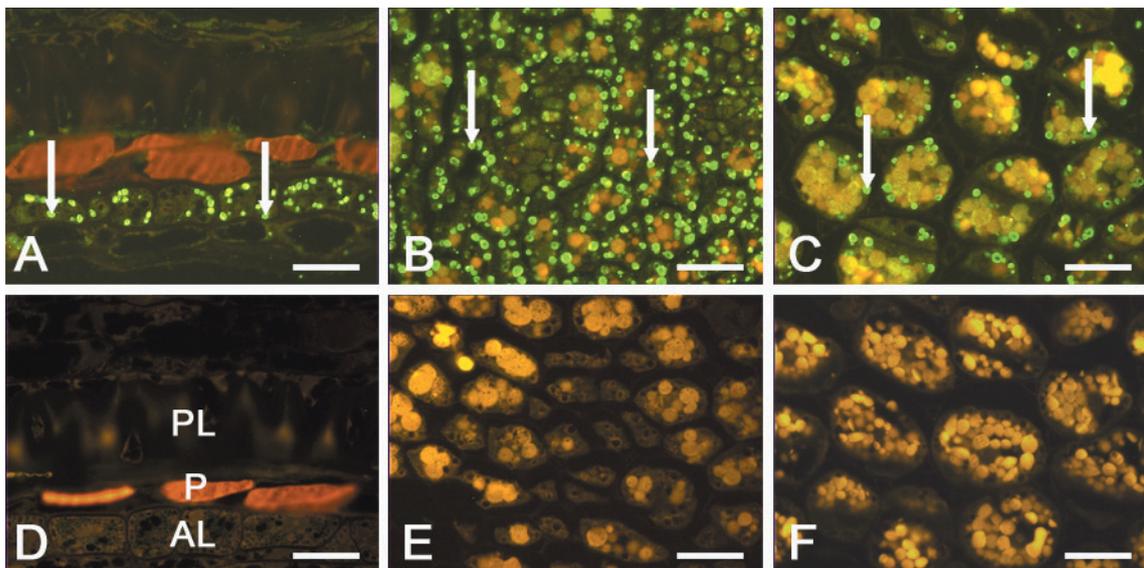


Abbildung 3.28.: Immunlokalisierung der BnSCT in Querschnitten von Samen von *B. napus* (Stadium E). 4 μm dicke Schnitte wurden mit dem Anti-BnSCT-Antikörper (A bis C) bzw. mit dem Präimmenserum (D bis F), gefolgt von einem Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488) inkubiert. Die grüne Fluoreszenz (Pfeile) weist auf SCT-Protein hin. Signale konnten in der Aleuronschicht (A), den Kotyledonen (B) und dem Hypokotyl (C) detektiert werden. PL: Palisadenschicht, P: Pigmentschicht, AL: Aleuronschicht. Die Balken entsprechen 20 μm .

Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurde die gleiche Immunmarkierung mit reifen Samen durchgeführt. Obwohl in diesem Samenstadium nur noch Spuren von SCT-Aktivität nachweisbar waren (Abbildung 3.26), wurden im Western Blot mehrere Banden durch den Antikörper detektiert (Abbildung 3.27). In der Immunlokalisierung in reifen Samen waren jedoch keine Signale des Antikörpers nachweisbar (Abbildung 3.29).

Dies zeigt, dass der Antikörper im Western Blot, bei dem die Proteine in denaturierter, entfalteter Form vorliegen, unspezifisch andere Proteine neben der SCT erkennt, diese jedoch in der Immunlokalisierung nicht mit dem Antikörper reagieren.

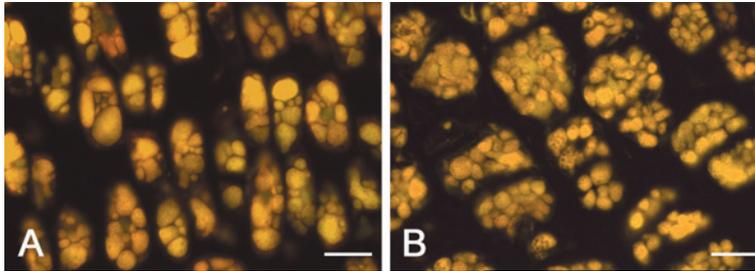


Abbildung 3.29: Test des Anti-BnSCT-Antikörpers in Querschnitten von reifen Samen aus *B. napus*. A: Kotyledonen, B: Hypokotyl. Die Balken entsprechen $10\ \mu\text{m}$.

Identifizierung der Zellorganellen

Während der Samenentwicklung werden in Pflanzen Reservestoffe für den keimenden Embryo angelegt. Im Gegensatz zu Monokotyledonen, die ihre Speicher meist in einem Endosperm anlegen, sind bei vielen Dikotyledonen die Keimblätter als Nährstoffspeicher ausgebildet. Die drei hauptsächlichen Speicherstoffe werden entweder als hochmolekulare Polymere (Proteine und Stärke) oder als lipophile Aggregate (Fette) gespeichert. Allen gemeinsam ist, dass sie in Zellorganellen auftreten: die Stärke in den Plastiden, die Proteine in den Proteinkörpern (Proteinspeichervakuolen) und die Fette in den Lipidkörpern (Oleosomen).

Die ringförmige Struktur und die Anordnung der Fluoreszenz-Signale der Immunlokalisierung (Abbildung 3.28) weisen darauf hin, dass die SCT nicht im Cytoplasma sondern in Organellen lokalisiert ist. Um einen Überblick über die räumliche und quantitative Verteilung der Zellorganellen im Rapssamen und deren Größe zu erhalten, wurden verschiedene Lokalisierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Semidünnschnitte von fixierten und in PEG eingebetteten grünen Samen (Stadium E) mit für das jeweilige Organell spezifischen Farbstoffen gefärbt (Abbildung 3.30).

Für die Visualisierung der Proteinkörper (Proteinspeichervakuolen) wurde eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gewählt. Dieser Farbstoff detektiert unspezifisch Proteine, indem er sich an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren anlagert. Die Coomassie-Färbemethode wird üblicherweise zur Visualisierung von Proteinen nach einer Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Im fixierten Gewebeschnitt werden durch diese Methode die Proteinkörper angefärbt (Abbildung 3.30 A). Sie sind als blaue 2 bis $8\ \mu\text{m}$ große Organellen sichtbar, die im Inneren der Zellen der Kotyledonen und des Hypokotyls angeordnet sind. In der Samenschale und in der Aleuronschicht wurden keine Proteinkörper detektiert.

Die ca. $0,5$ bis $2\ \mu\text{m}$ großen Lipidkörper konnten durch eine Antikörperreaktion sichtbar gemacht werden. Der verwendete Antikörper war gegen Oleosin, das Hauptprotein der Lipidkörpermembran gerichtet und wurde freundlicherweise von Prof. Anthony Huang

(Universität Kalifornien) zur Verfügung gestellt (Tzen et al., 1990). Die Immunmarkierung mit einem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488) zeigte, dass diese Organellen über den gesamten cytoplasmatischen Raum verteilt sind (Abbildung 3.30 B). Dies betrifft die Zellen der Kotyledonen, des Hypokotyls und der Aleuronschicht.

Die Identifizierung der Plastiden erfolgte mit Hilfe einer Jodreaktion, mit der die in Plastiden enthaltene Stärke angefärbt wird. Nach Inkubation in Lugolscher Lösung erscheinen diese Organellen im Schnitt blau-schwarz. Mit dieser Methode wurden die Plastiden in den äußeren Bereichen der Zellen der Aleuronschicht, der Kotyledonen und des Hypokotyls detektiert (Abbildung 3.30 C). Mit einem Durchmesser von 1 bis 4 μm liegen die Plastiden der Größe nach zwischen den Lipidkörpern und den Proteinspeichervakuolen.

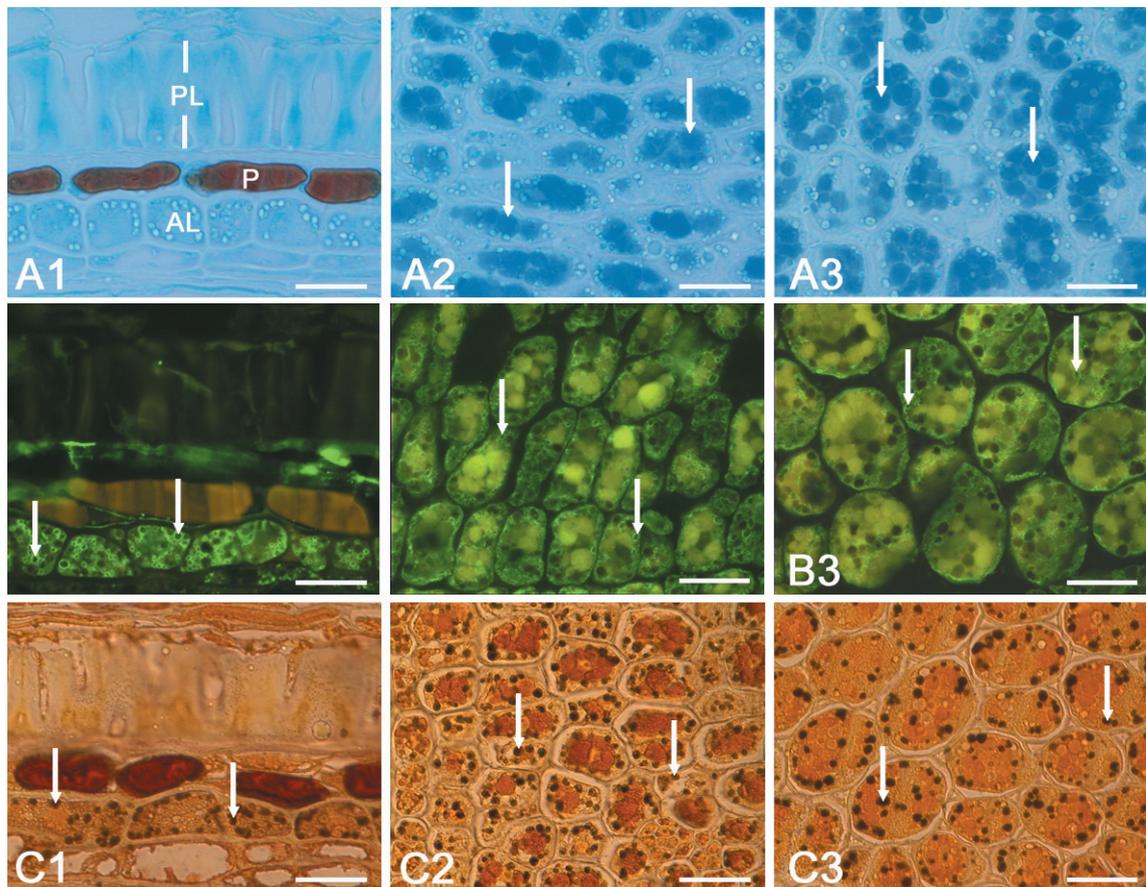


Abbildung 3.30.: Identifizierung der Zellorganellen im Samen von *B. napus*. A1 bis A3: Coomassie-Färbung zur Darstellung der Proteinkörper; B1 bis B3: Identifizierung der Lipidkörper durch Immunmarkierung von Oleosin; C1 bis C3: Stärkefärbung der Plastiden mit Lugolscher Lösung. Dargestellt sind Zellen der Samenschale und der Aleuronschicht (A1 bis C1), der Kotyledonen (A2 bis C2) und des Hypokotyls (A3 bis C3). Die Pfeile zeigen die jeweiligen markierten Organellen. AL: Aleuronschicht, P: Pigmentschicht, PL: Palisadenschicht. Die Balken entsprechen 20 μm .

Durch Vergleich der BnSCT-Immunlokalisierung (Abbildung 3.28) mit der Coomassie-Färbung der Proteinspeichervakuolen (Abbildung 3.30 A) konnte die vermutete vakuoläre Lokalisation der BnSCT ausgeschlossen werden. Beide markierte Organellen unterscheiden sich deutlich in Größe und Anordnung. Während die meist über $2\ \mu\text{m}$ großen Proteinkörper im Wesentlichen im Inneren der Zellen zu finden sind, ordnen sich die im Durchschnitt $2\ \mu\text{m}$ großen fluoreszenzmarkierten Organellen in den äußeren Bereichen um die Proteinkörper herum an. Um festzustellen, ob die SCT mit den Lipidkörpern assoziiert, oder in den Plastiden lokalisiert ist, wurden Kollokalisierungsexperimente durchgeführt.

Kollokalisierungsexperimente

Für die Kollokalisierung der BnSCT mit den Lipidkörpern wurde der Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörper in Kopplung an den Anti-Oleosin-Antikörper gewählt. Als sekundärer Antikörper für die BnSCT-Markierung bot sich ein Alexa Fluor 546-konjugierter Antikörper an, dessen Fluoreszenzcharakteristika deutlich verschieden von denen des Alexa488-Farbstoffes sind. Durch eine nach der Antikörpermarkierung durchgeführte Gegenfärbung mit DAPI wurde die DNA sichtbar gemacht. Die Auswertung der Markierung erfolgte mit Hilfe des Konfokalmikroskops (Abbildung 3.31).

Der Vergleich der BnSCT/Alexa546-Markierung (rot) mit den Oleosin/Alexa488-Signalen (grün) zeigt deutliche Unterschiede in Anordnung und Größe. Die SCT zeigte klar von einander abgegrenzte, ringförmige Signale mit einer Größe von etwa $2\ \mu\text{m}$. Die Lipidkörper, durch die Oleosinmarkierung repräsentiert, erscheinen hingegen im direkten Vergleich wesentlich kleiner und zahlenmäßig häufiger. Im Gegensatz dazu konnte eine Kollokalisierung der SCT mit DNA-Signalen der DAPI-Färbung beobachtet werden. Dies wird besonders deutlich in der Überlagerung aller Markierungen. Während sich SCT- und Oleosin-Signale einander ausschließen, werden die roten SCT-Signale von den blauen DAPI-Signalen überlagert und erscheinen pink bis lila. Dies legt die Vermutung nahe, dass die SCT in Plastiden lokalisiert ist.

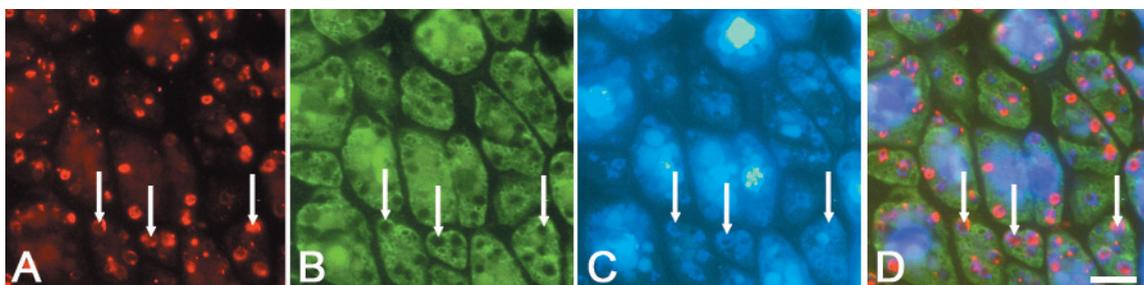


Abbildung 3.31.: Lokalisierung der BnSCT und Oleosin in den Kotyledonen von *B. napus* Samen (Stadium E). $4\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte wurden simultan mit Anti-BnSCT/Alexa546 und Anti-Oleosin/Alexa488 inkubiert und anschließend mit DAPI gefärbt. A: BnSCT/Alexa546, B: Oleosin/Alexa488, C: DAPI, D: Überlagerung. Balken entsprechen $10\ \mu\text{m}$

Um die Hypothese der Plastidenlokalisierung zu bestätigen, sollte die Immunmarkierung der SCT mit einer weiteren Markierung der Plastiden kombiniert werden. Da sich die Jodfärbung mit Lugolscher Lösung als eine geeignete Methode zur spezifischen Anfärbung der abgelagerten Stärke in den Plastiden erwiesen hat, wurde diese in einer Kolorisierung eingesetzt. Dazu wurden einige Tropfen Lugolsche Lösung auf die mit Anti-BnSCT/Alexa546 immunmarkierten Schnitte gegeben und unmittelbar am Konfokalmikroskop ausgewertet. Eine Konservierung der so behandelten Schnitte war nicht möglich, da die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers durch die Färbelösung innerhalb weniger Minuten verschwand. Eine DAPI-Fluoreszenz war unmittelbar nach dem Aufbringen der Jodlösung nicht mehr sichtbar. Wie die Abbildung 3.32 zeigt, konnte ein weiterer Hinweis geliefert werden, dass die SCT in Plastiden lokalisiert ist. Die rote Fluoreszenz des BnSCT/Alexa546-Signals zeigt wiederum ringförmige Strukturen, die um die durch die Jodlösung angefarbte Stärke der Plastiden angeordnet sind. Der endgültige Beweis für die Lokalisation der SCT sollte durch die Lokalisierung mittels Elektronenmikroskopie erbracht werden.

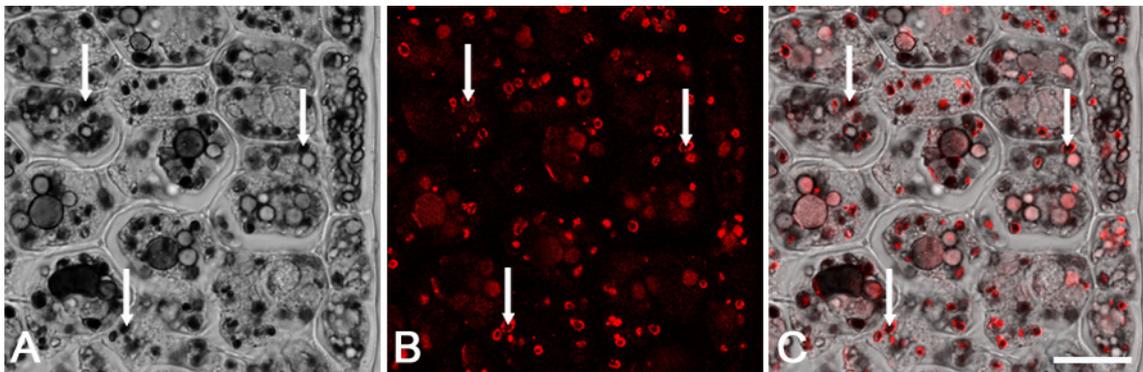


Abbildung 3.32.: Kolokalisierung der BnSCT und Plastiden-Stärke in Querschnitten von *B. napus* Samen (Stadium E). 4 µm dicke Schnitte wurden mit Kaninchen-Anti-BnSCT IgG, gefolgt von dem Fluoreszenz-markierten sek. Antikörpern Ziege-Anti-Kaninchen-Alexa546, inkubiert. Unmittelbar nach dem Aufbringen einiger Tropfen Lugolscher Lösung wurden die Schnitte am Konfokalmikroskop ausgewertet. A: Hellfeld, Plastiden-Stärke ist schwarz angefarbt. B: BnSCT/Alexa546-Signal. C: Überlagerung. Der Balken entspricht 20 µm.

3.6.3. Lokalisierung der BnSCT mittels Elektronenmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die BnSCT in den Zellen der Aleuronschicht, der Kotyledonen und des Hypokotyls mit plastidärer DNA und mit Plastidenstärke kolokalisiert. Für die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der SCT wurden Keimblätter von voll entwickelten Embryonen von *B. napus* (Stadium E), wie in Abschnitt 2.14.2 beschrieben, in einem Gemisch aus Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert und in LRWhite eingebettet. Um die Antigenizität zu erhalten, wurde auf die Zugabe von Osmiumtetroxid, welches in der Transmissionselektronenmikroskopie als Kontrastmittel eingesetzt wird, verzichtet. Die Schnitte so behandelte Proben wirken somit wesentlich weniger kontrastreich, als solche, die für reine Strukturuntersuchungen angefertigt werden. Die Auswertung der Ultradünnschnitte zeigte voll ausdifferenzierte Zellen, die ganz auf die Einlagerung von Speicherstoffen spezialisiert sind (Abbildung 3.33). Die Proteinspeichervakuolen sind als große runde Gebilde mit globulären Einschlüssen sichtbar. Sie sind um den zentral liegenden Zellkern herum angeordnet. Die Plastiden, gut zu erkennen durch die geringe Elektronendichte der enthaltenen Stärke, sind in den äußeren Regionen der Zelle zu finden. Fast der komplette übrige zelluläre Raum ist von den Lipidkörpern ausgefüllt.

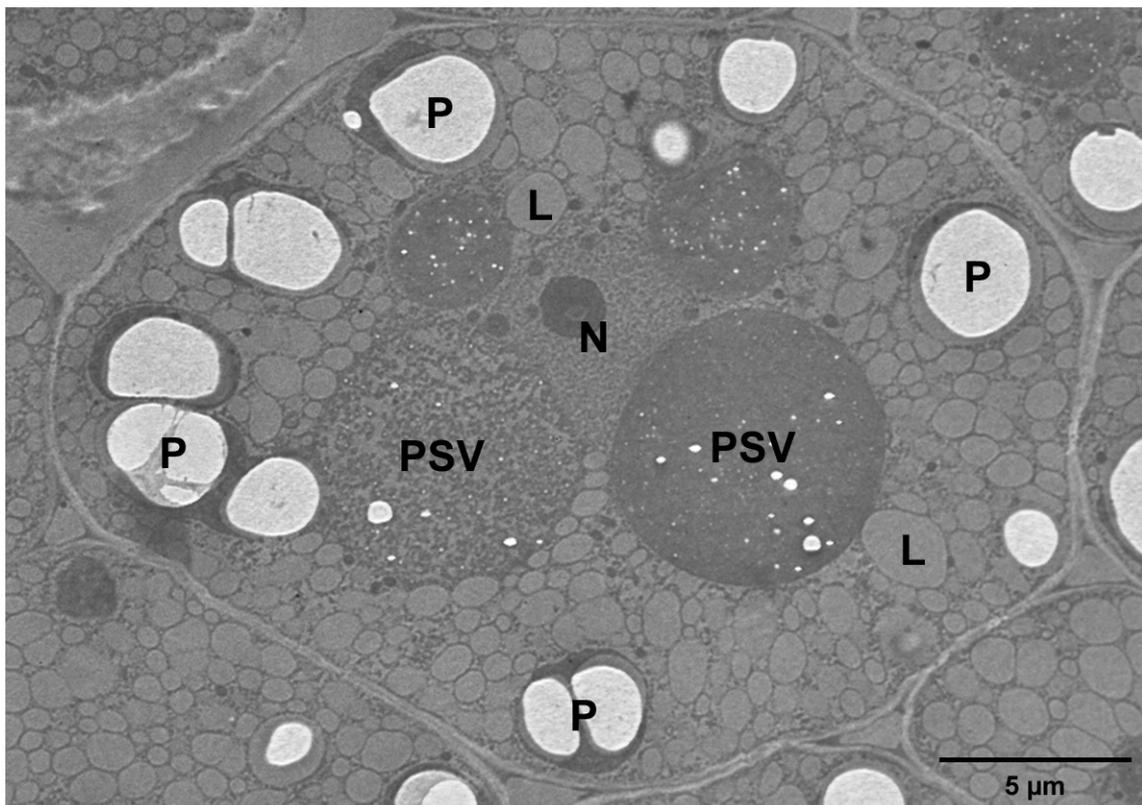


Abbildung 3.33.: Ultradünnschnitt durch ein voll entwickeltes Keimblatt (Samenstadium E) von *B. napus*. Dargestellt ist die Übersicht einer ausdifferenzierten Zelle, die auf die Einlagerung von Reservestoffen spezialisiert ist. P: Plastid, PSV: Proteinspeichervakuole, N: Nukleus, L: Lipidkörper

Mit Hilfe der Immunogoldmarkierung gelang es, die intrazelluläre Lokalisation der SCT in den Plastiden zu bestätigen. Die Abbildung 3.34 zeigt eindeutige spezifische Markierungen im Stroma der Plastiden nach Inkubation mit dem Anti-BnSCT-Antikörper. Proben, die mit dem Präimmunserum inkubiert wurden, enthielten keine Signale in den Plastiden. Die Hintergrundmarkierung der Proben war sehr gering. Lediglich in den Proteinspeichervakuolen wurden vermehrt Signale gefunden. Da diese Signale auch bei der Markierung mit dem Präimmunserum und bei Kontrollexperimenten ohne den ersten Antikörper auftraten, sind sie auf eine unspezifische Reaktion des zweiten Antikörpers zurückzuführen.

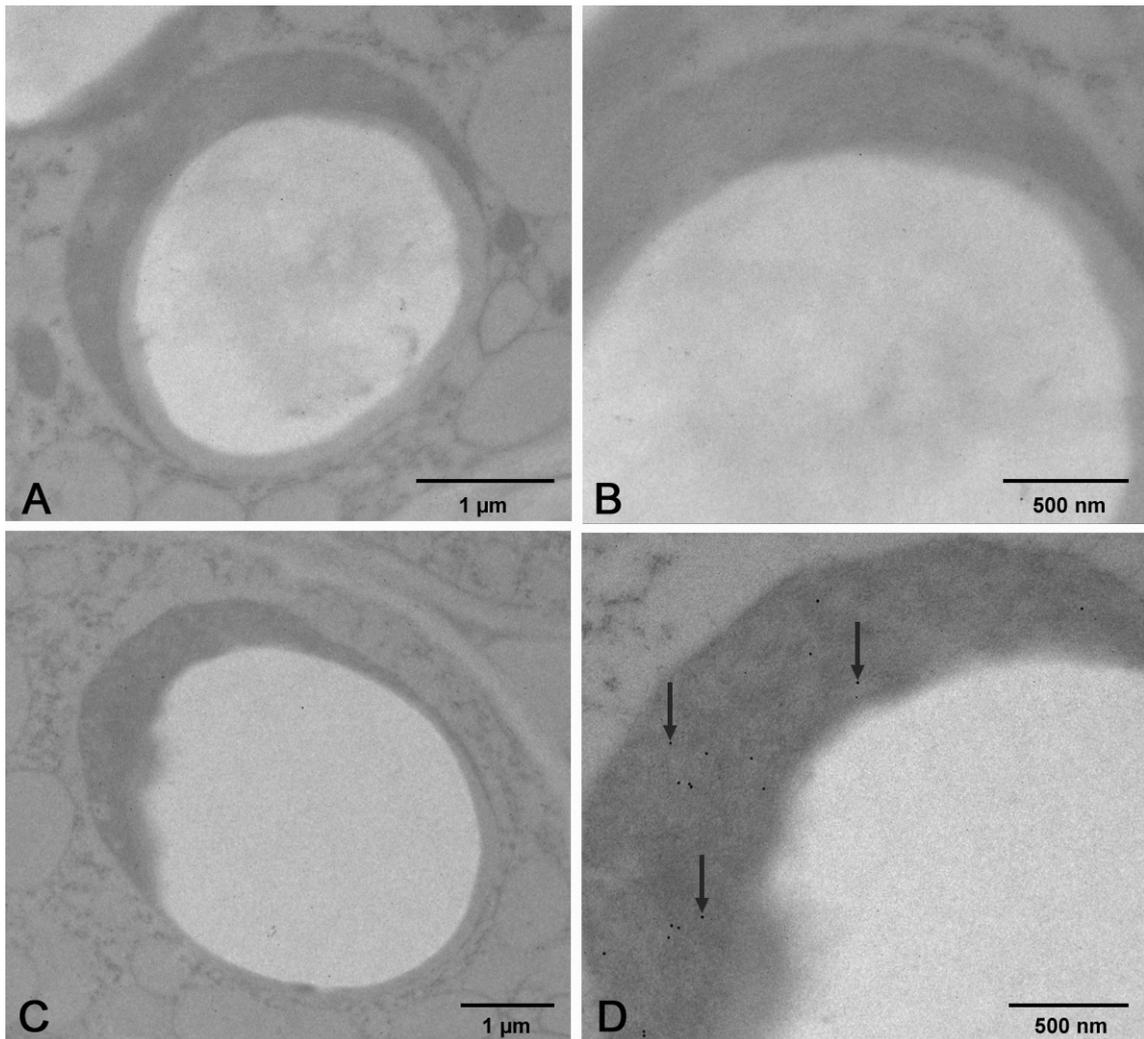


Abbildung 3.34.: Elektronenmikroskopische Lokalisierung der BnSCT. 90 nm dicke Schnitte wurden mit dem Präimmunserum (A und B) bzw. Kaninchen-Anti-BnSCT IgG (C und D), gefolgt von dem Goldmarkierten sek. Antikörpern Ziege-Anti-Kaninchen-6nm Gold, inkubiert. Spezifische Signale im Stroma der Plastiden sind durch beispielhaft durch Pfeile markiert.

4. Diskussion

4.1. Gene und Sequenzanalysen

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung einer SCT-cDNA aus Samen von *B. napus*. Durch Screening einer samenspezifischen cDNA-Bank mit einem cDNA-Fragment, das Sequenzähnlichkeit zu Acyltransferase-Genen aufwies, gelang die Isolierung von drei cDNA-Klonen mit hoher Ähnlichkeit zu pflanzlichen Serin-Carboxypeptidasen (Abschnitt 3.1). Leider enthielten alle drei Klone nur 5'-unvollständige Sequenzen. Dies ist möglicherweise auf eine unvollständige reverse Transkription bei der Erstellung der cDNA-Bank zurückzuführen. Wellenreuther et al. (2004) beschreiben den hohen Prozentsatz an 5'-verkürzten Klonen in einer cDNA-Bank durch den zu frühen Stop der reversen Transkriptase. Dies tritt besonders bei großen mRNAs auf und solchen die dazu tendieren, Sekundärstrukturen zu bilden. Die Qualität der isolierten mRNA hängt darüber hinaus auch vom extrahierten Gewebe ab. Die Isolierung von mRNA aus Samen erfordert einen größeren Aufwand als beispielsweise aus Blättern. Dies kann ebenfalls zu einem Abbau der RNA führen. Sequenzvergleiche zeigten, dass die größten Sequenzunterschiede im 3'-untranslatierten Bereich zu finden sind (Abbildung 3.1). Interessanterweise zeigten zwei Klone (SCP2 und SCP3) eine Sequenzidentität von 100 %, abgesehen von ihrer Polyadenylierungsstelle [Poly(A)-Stelle].

Über die mRNA 3'-Prozessierung in Pflanzen ist im Vergleich zu anderen Eukaryoten wenig bekannt. Eine Übersicht gibt Rothnie (1996). Demnach ist die molekulare Architektur pflanzlicher Poly(A)-Signale durch drei Motive gekennzeichnet, ein *Near upstream element* (NUE), ein *Far upstream element* (FUE) und die Spaltsstelle selbst. Das in Vertebraten universelle AAUAAA-Motiv für die Polyadenylierung (Proudfoot und Brownlee, 1976), das von U- bzw. GU-reichen *downstream*-Elementen flankiert wird, tritt in vielen pflanzlichen 3'UTRs nicht auf. Im Gegensatz zu Vertebraten, die normalerweise eine einzelne Poly(A)-Stelle besitzen, können in pflanzlichen Transkripten mehrere Spaltorte auftreten, was zur Produktion verschiedener mRNAs unterschiedlicher Länge führen kann. So wurden beispielsweise für ein kerncodiertes Chloroplasten RNA-Bindeprotein aus *Nicotiana glauca* 14 verschiedene 3'-Prozessierungsstellen identifiziert (Klahre et al., 1995). Pflanzliche Poly(A)-Signal NUEs stellen oft eine Variante des AAUAAA-Motivs dar. Durch Mutagenese-Analysen dieses Motivs im Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) wurde gezeigt, dass der Austausch eines einzelnen Nukleotids innerhalb dieser Sequenz die

Prozessierungseffizienz in Pflanzen nur um maximal 40 % senkt (Rothnie et al., 1994). In allen drei isolierten cDNA-Klonen wurden mehrere Poly(A)-Signal NUEs gefunden, die in einer unterschiedlichen Polyadenylierung resultieren (Abbildung A.1). Bisher wurden keine konservierten Sequenzmotive in pflanzlichen FUEs entdeckt (Rothnie, 1996). Ein gemeinsames Merkmal ist jedoch das Vorkommen von U- bzw. UG-reichen Sequenzen. Dies konnte auch in den klonierten cDNAs beobachtet werden. Varianten des FUE-Motivs UUUGUA, das in CaMV eine wichtige Rolle bei der Polyadenylierung spielt (Sanfacon et al., 1991; Rothnie et al., 1994), wurden hingegen nicht gefunden. Das konservierte YA-Motiv der Spaltstelle ist in allen drei Sequenzen vorhanden.

Nachdem mittels 5'Race-Technik die fehlende 5'-Region der putativen SCT-Sequenzen amplifiziert wurde, konnten mit Hilfe abgeleiteter Primer vier *BnSCT*-Gene identifiziert werden. Obwohl alle vier Sequenzen eine Identität von 99 % aufwiesen (Abbildung A.2), ist aufgrund der Anzahl der nichtübereinstimmenden Nukleotide nicht davon auszugehen, dass diese die Folge eines PCR- bzw. Sequenzierfehlers sind. Da es sich bei *B. napus* um eine amphidiploide Art handelt, die sich aus den beiden Chromosomensätzen von *B. rapa* und *B. oleracea* zusammensetzt (Abbildung 1.5) sind für jedes Gen mehrere Kopien zu erwarten. Durch die Analyse der Sequenzen konnte festgestellt werden, dass in *B. napus* für die SCT codierende Gene sowohl aus dem A-Genom als auch aus dem C-Genom transkribiert werden (Tabelle 4.1). Die Funktionalität der isolierten *BnSCT1*-cDNA wurde durch die Komplementation der *A. thaliana* SCT-Mutante SALK 002255 gezeigt. Die Fähigkeit der komplementierten Mutante, Sinapoylglucose zu Sinapoylcholin zu verestern, statt sie zu akkumulieren liefert den eindeutigen Beweis dafür, dass die klonierten cDNAs die SCT codieren. Die Expressionsstärke des Transgens wird sowohl vom Integrationsort als auch von der Anzahl der Insertionen im Genom der Pflanzen beeinflusst. Dies liefert eine mögliche Erklärung für den schwankenden Gehalt an Sinapin bzw. Sinapoylglucose. Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten der klonierten c-DNAs ist anzunehmen, dass auch *BnSCT2*, *BnSCT3* und *BnSCT4* für ein funktionales SCT-Protein codieren. Dies kann jedoch nur durch experimentelle Analysen bestätigt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden durch PCR-gestützte Klonierungstechniken, neben mehreren *BnSCT*-cDNAs, eine Vielzahl von genomischen SCT-Fragmenten aus *B. napus* isoliert. Die Zuordnung der einzelnen Regionen zum A- bzw. C-Genom erfolgte durch Sequenzvergleiche mit Fragmenten aus den beiden Ursprungsarten *B. rapa* (A-Genom) und *B. oleracea* (C-Genom), die mit Hilfe abgeleiteter Primer amplifiziert wurden. Für das Genom von *B. napus* konnten insgesamt sechs verschiedene Isoformen des *BnSCT*-Gens identifiziert werden (Tabelle 4.1). Drei davon sind dem A-Genom und die übrigen drei dem C-Genom zugehörig. Diese Ergebnisse korrelieren mit Untersuchungen, die zeigen konnten, dass sich das haploide *Brassica*-Genom fast vollständig aus verdreifachten Segmenten zusammensetzt (Lagercrantz und Lydiat, 1996; Lagercrantz et al., 1996).

Die isolierten 5'- und 3'-Regionen aus *B. oleracea* zeigen, dass auch hier mindestens zwei Genorte vorhanden sind. Durch folgende PCR-Analysen könnten weitere Sequenzbereiche aus dem Genom von *B. oleracea* amplifiziert werden, aber auch aus *B. rapa*, aus dessen Genom bisher nur ein Genort der SCT isoliert wurde.

	<i>B. napus</i>		<i>B. rapa</i>	<i>B. oleracea</i>
	A-Genom	C-Genom	A-Genom	C-Genom
cDNA-Fragmente	SCP2(3)	SCP1 RACE1		
full length cDNAs	<i>BnSCT2</i>	<i>BnSCT1</i> <i>BnSCT3</i> <i>BnSCT4</i>		
Genom. <i>BnSCT</i> -Seq.	<i>BnSCT2</i>	<i>BnSCT1</i>	<i>BrSCT</i>	<i>BoSCT</i>
Genom. 5'-Regionen		5' <i>BnSCT1</i>	5' <i>BrSCT</i>	5' <i>BoSCT1</i> 5' <i>BoSCT2</i>
Genom. 3'-Regionen	3' <i>BnSCT2</i>	3' <i>BnSCT1</i>	3' <i>BrSCT</i>	3' <i>BoSCT1</i> 3' <i>BoSCT2</i>
BAC-Subfragmente	5'BAC4 3'BAC4	BAC5		

Tabelle 4.1.: Übersicht der isolierten Nukleotidsequenzen und deren Zuordnung zum A- bzw. C-Genom. Sequenzbereiche eines Locus sind in *B. napus* in derselben Farbe markiert.

Durch vergleichende Analyse der drei *Brassica*-Genome wurde gezeigt, dass durch die Polyploidisierung keine genomische Umstrukturierung erfolgt ist und dass in Raps die Genome von Kohl und Rübsen im wesentlichen konserviert sind (Rana et al., 2004). Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise, dass im *BnSCT*-Locus eine Neuordnung stattgefunden hat. So wurden durch Southern-Analyse (Abbildung 3.13) Unterschiede im genomischen Bereich der SCT zwischen *B. napus* und *B. rapa* festgestellt. Weiterhin bedurfte es erheblichen Aufwands, um eine 5'-Region aus dem A-Genom von *B. napus* zu klonieren. Durch den Einsatz PCR-gestützter Klonierungstechniken konnte mit Hilfe einer genomischen Bank der 5'-Bereich eines *BnSCT*-Gens, das dem A-Genom angehört, isoliert werden (Abbildung 3.18). Es stellte sich jedoch heraus, dass das enthaltene *BnSCT*-Gen durch Insertionen, die zu mehreren Stop-Codons führen, unterbrochen wird. Überraschenderweise wurde am selben BAC durch PCR die genomische Sequenz einer zweiten, funktionalen *BnSCT*-Sequenz amplifiziert. Ob im *B. rapa* Genom eine ähnliche Struktur vorhanden ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Eine Sequenzierung des BAC-Klon 4 und eine weitere Analyse der BAC-Klone, die im Rahmen dieser Arbeit isoliert, jedoch nicht weiter untersucht wurden, könnte Sequenzinformationen für die Aufklärung der Unterschiede

im SCT-Locus von *B. napus* und *B. rapa* liefern. Bei gegenüberstellenden Analysen von *B. napus* und den rezenten Sorten der diploiden Ausgangsarten sollte auch stets in Betracht gezogen werden, dass die rezenten Sorten in ihrer Genomstruktur nicht mehr vollständig mit den ursprünglichen Vorfahren von *B. napus* übereinstimmen, da auch sie im Verlauf der genomischen Evolution Veränderungen erfahren haben.

Durch vergleichende Untersuchungen mit *A. thaliana* wurde gezeigt, dass die chromosomalen Segmente im *Brassica*-Genom im allgemeinen mit den homologen *Arabidopsis*-Segmenten korrelieren, jedoch in ihrer Mikrostruktur durch Genverlust, Translokation und Inversion stark verändert sind (O'Neill und Bancroft, 2000). Der Vergleich des *BnSCT1*-Locus mit dem chromosomalen Bereich von *SNG2* in *A. thaliana* spiegelt dies wider (Abbildung 3.17). Während die Gene *downstream* von *BnSCT1* in der gleichen Reihenfolge wie in *A. thaliana* angeordnet sind, konnten im *upstream*-Bereich Unterschiede festgestellt werden. So sind in *A. thaliana* vier Gene vorhanden, die in *B. napus* nicht vorkommen. Von einem dieser Gene (*SDH3*) konnten im *BnSCT1*-Locus noch Bruchstücke gefunden werden. Da Genverlust nach Verdopplung das wahrscheinlichste Ereignis im Laufe der Evolution ist (Übersicht in Adams und Wendel, 2005b), besteht die Annahme, dass der 5'-Bereich von *BnSCT1* durch Deletionen einer Neustrukturierung unterlag.

4.2. Heterologe Expression von *BnSCT1*

Da die Strukturaufklärung pflanzlicher SCPL-Acyltransferasen von großem Interesse ist (Abschnitt 1.4) wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche zur heterologen Expression der *BnSCT* aus *B. napus* unternommen. Dafür standen sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Systeme zur Verfügung.

Aufgrund vieler Vorteile ist *E. coli* eines der meist eingesetzten Expressionssysteme für die Überexpression rekombinanter Proteine. *E. coli* ist einfach genetisch zu manipulieren und kann schnell und kostengünstig zu hohen Zelldichten wachsen, wobei durch variable Wachstums- und Induktionsbedingungen eine verbesserte Expression erzielt werden kann. Aus diesem Grund wurde *E. coli* als erstes Expressionssystem gewählt. Nach heterologer Expression von *BnSCT1* ohne die putativen Signalsequenz im pQE60/M15[pRep4]-Expressionssystem wurden im Western Blot durch Markierung der C-terminalen 6 x His-Sequenz schwache Signale in der unlöslichen Proteinfraction detektiert. Für die schwache Expression in *E. coli* sind mehrere Ursachen denkbar. Eine mögliche Erklärung liefert die Analyse der Codon-Verteilung von *BnSCT1*. In jedem Organismus werden die 61 Aminosäure-Codons mit unterschiedlicher Häufigkeit verwendet. Die Codonhäufigkeit korreliert mit der Anzahl der entsprechenden tRNAs, d.h. für seltene Codons liegen nur wenige tRNAs vor (Dong et al., 1996). Dies beeinflusst entscheidend die Translationseffizienz (Kane, 1995). In *E. coli* wird Arginin beispielsweise nur selten durch die die Codons

AGA und AGG verschlüsselt. Dieses Problem kann durch die Coexpression der seltenen tRNAs mit dem Zielprotein gelöst werden (Rosenberg et al., 1993). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe des *E. coli*-Stamms BL21-CodonPlus (DE3)-RIL die heterologe Expression von *BnSCT1* um ein Vielfaches erhöht werden (Abbildung 3.8). Es konnte jedoch auch mit diesem Stamm unter keiner der getesteten Bedingungen funktionelles His-tag-Fusionsprotein von *BnSCT1* hergestellt werden. In der Literatur finden sich diesbezüglich ähnliche Angaben. So beschreiben Shirley et al. (2001) für die heterologe Expression von *SNG2*, das für die SCT in *A. thaliana* codiert, die Akkumulation des Proteins in Einschlusskörpern. Obwohl Lehfeldt et al. (2000) von der funktionellen heterologen Expression des für die SMT aus *A. thaliana* codierenden *SNG1*-Gens berichten, erscheinen diese Angaben bei näherer Betrachtung zweifelhaft, da der Enzymassay zum Nachweis der SMT-Aktivität über 14 h durchgeführt wurde. Die fehlende funktionelle Expression von *BnSCT1* ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Bakterien nicht in der Lage sind, bestimmte posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen, Glycosilierungen oder proteolytische Spaltungen, durchzuführen. Diese sind jedoch oft erforderlich, um ein aktives eukaryotisches Protein zu erhalten. Für die verwendete *BnSCT1*-Sequenz wurden mehrere posttranslationale Modifizierungen vorhergesagt (Abschnitt 3.1). Die putative Signalsequenz von *BnSCT1* war bei den Expressiononstrukturen nicht vorhanden, sodass ein negativer Einfluss dieser Region ausgeschlossen werden kann. Anhand von Sequenzvorhersagen und Literaturangaben scheint es jedoch wahrscheinlich, dass es sich bei der BnSCT um ein glykosiliertes Protein handelt, das zudem noch endoproteolytisch gespalten wird und in seiner aktiven Form als Heterodimer vorliegt, dessen Untereinheiten durch Disulfidbrücken verbunden sind (Shirley und Chapple, 2003). Ein weiteres Problem der Proteinexpression in Bakterien ist die korrekte Faltung des zu exprimierenden Proteins, da hierzu oft sogenannte Chaperone benötigt werden, die in pro- und eukaryotischen Systemen unterschiedlich sind (Hartl, 1996). Da es nicht möglich war, *BnSCT1* in Bakterien funktionell zu exprimieren, wurden mit der Hefe *S. cerevisiae* und mit *N. tabacum* zwei eukaryotische Expressionssysteme getestet.

Die Expression in Hefen kombiniert die Vorteile der schnellen und kostengünstigen Kultivierung der Zellen mit der Fähigkeit post-translationale Modifikationen durchzuführen. Hefen verfügen aufgrund eines entsprechenden sekretorischen Stoffwechselweges über die Möglichkeit der korrekten Modifikation und Sekretion heterologer Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit konnte, das *BnSCT1*-Gen in *S. cerevisiae* rekombinant exprimiert werden. Die nachgewiesene Enzymaktivität liegt mit 1 pkat/mg Protein allerdings deutlich niedriger als bei der transienten Expression im pflanzlichen System *N. tabacum*. Die Tatsache, dass eine SCT-Aktivität bei einer Induktionsdauer von mehr als vier Stunden nicht mehr festgestellt werden konnte, läßt vermuten, dass das rekombinante Protein in den Hefen sehr instabil ist, bzw. von Proteasen abgebaut wird. Die sehr geringe Aktivität kann auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. So zeigt beispielsweise die Analyse der Codonpräferenz, dass das in der *BnSCT1*-cDNA insgesamt neunmal vorkommende Codon CTC für Leucin von der

Hefe nur in 6 % aller Fälle verwendet wird¹. Weiterhin trägt das SCT-Vorläuferprotein eine N-terminale Signalsequenz, welche den Transport ins Endoplasmatische Retikulum vermittelt und dabei abgespalten wird. Dieses pflanzliche Signalpeptid ist möglicherweise nicht optimal für die Prozessierung in Hefe.

Die Expression pflanzlicher Proteine in *S. cerevisiae* ist in der Literatur mehrfach erwähnt. So wurde beispielsweise die Expression einer SCPL-Acyltransferase aus *L. pennellii* (Li und Steffens, 2000) und des für die SCT aus *A. thaliana* codierenden *SNG2*-Gens (Shirley und Chapple, 2003) in *S. cerevisiae* beschrieben. Die heterologe Expression von *SNG2* erfolgte in einem sekretorischen Hefestamm [*S. cerevisiae* W2579, (*MAT α* Δ *prc1 vpl1-1 leu2-3 leu2-112 ura3-52*)]. Dieser Stamm ist im vakuolären Transport gestört und sekretiert Proteine, die normalerweise in die Vakuole transportiert würden, ins Medium. Dies wurde sowohl für die CPY als auch für die SCT aus *A. thaliana* beschrieben (Nielsen et al., 1990; Shirley und Chapple, 2003). Für die CPY wurde zudem ein Vektor mit einem Leu2d-Marker verwendet. Dieser Marker besteht aus dem *Leu2*-Gen unter der Kontrolle des deletierten *Leu2*-Promotors (Erhart und Hollenberg, 1983). Wird dieser Marker in einem Leucin-defizienten Hefestamm wie W2579 eingesetzt, so kann die Kopienzahl des Expressionsplasmids bei Kultivierung in Leucin-Mangelmedium stark erhöht werden.

Für die Steigerung der heterologen Expression in *S. cerevisiae* wäre neben der Codon-Optimierung, der Verwendung eines sekretorischen Hefestamms und der Optimierung des Expressionsplasmides, der Austausch des nativen *BnSCT1*-Signalpeptids durch Signalsequenzen vakuolärer Hefeproteine erfolgversprechend. Dazu zählen beispielsweise die vakuoläre Zielsequenz der CPY (Nielsen et al., 1990; Jung et al., 1999) und die der Proteinase A, die durch das *Pep4*-Gen codiert wird (Ammerer et al., 1986; van den Hazel et al., 1993).

Als pflanzliches Expressionssystem wurde die *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression in *N. tabaccum* gewählt. Diese transiente Transformationsmethode hat den Vorteil, dass die Expression des rekombinanten Proteins schnell nachvollzogen werden kann. Die Pflanzen müssen nicht regeneriert werden, und das rekombinante Protein kann bereits nach wenigen Tagen aus den Blättern isoliert werden. Die heterologe Expression von *BnSCT1* in Tabak erfolgte unter der Kontrolle des lichtregulierten *RbcS1*-Promotors unter Verwendung des binären Vektors pBINPLUS. Für dieses System wurde in Pflanzen eine achtfach höhere Expressionsrate als bei Verwendung des 35S-Promotors beschrieben (Outchkourov et al., 2003). Mit Hilfe dieses Systems gelang es *BnSCT1* funktionell zu exprimieren (Abbildung 3.11). Im Proteinrohextrakt der infiltrierten Blattbereiche konnte eine SCT-Aktivität von durchschnittlich 20,6 pkat/mg Protein nachgewiesen werden. Dies erscheint gering, im Vergleich zur höchsten spezifischen Aktivität, die im Rohextrakt von Rapssamen gemessen wurde (ca. 190 pkat/mg Protein, vgl. Abbildung 3.26). Dies mag ein Grund dafür sein, dass in Western Blot-Analysen bei Einsatz gleicher Proteinmengen kein

¹<http://www.kazusa.or.jp/codon/>

rekombinantes Protein nachgewiesen werden konnte.

Eine Erhöhung der Expressionsrate könnte durch den Einsatz des viralen Silencing-Inhibitors p19 in Kombination mit der transienten Transformation in *N. benthamiana* erreicht werden (Voinnet et al., 2003). Eine andere Alternative wäre die stabile Tabak-Transformation, da dann im Gegensatz zur transienten Expression jede Zelle das Expressionskonstrukt trägt. Für die Expression von *uidA* unter transkriptioneller Kontrolle des lichtregulierten *RbcS1*-Promotors in *N. tabacum* konnte beispielsweise das rekombinante Protein mit knapp 3 % des löslichen Gesamtproteins nachgewiesen werden. (Outchkourov et al., 2003). Ob eine Akkumulation des BnSCT-Proteins in transgenen Tabakpflanzen in ähnlicher Weise erfolgt, müsste überprüft werden.

Die Ergebnisse der Expression in Tabak und in Hefe zeigen sehr deutlich, dass ein angefügter 6 x His-tag an den C-Terminus der *BnSCT1*-Sequenz zu einem dramatischen Verlust der Aktivität führt. So wurde für das BnSCT1-His-tag-Fusionsprotein in *N. tabacum* nur eine Enzymaktivität von 1,4 pkat/mg Protein gemessen, was einem Aktivitätsverlust von 95 % entspricht. In *S. cerevisiae* konnte für das Fusionsprotein keine Aktivität nachgewiesen werden. Es scheint daher, dass der angefügte Poly-Histidin-tag, möglicherweise aufgrund seiner positiven Ladung oder durch eine Veränderung der Proteinfaltung, einen negativen Einfluss auf die SCT-Enzymaktivität hat. Dies bedeutet, dass eine Reinigung des rekombinanten Proteins über Metallaffinitätschromatographie entfällt. Da allerdings ein Peptidantikörper gegen die BnSCT vorliegt, besteht die Möglichkeit, das rekombinante Protein durch Affinitätschromatographie mit Hilfe einer Antikörper-gekoppelten Matrix anzureichern.

4.3. Reduktion des Sinapingehaltes

Mit *B. napus* steht eine wertvolle Eiweißquelle zur Verfügung, die aufgrund unerwünschter phenolischer Inhaltsstoffe bislang nicht in vollem Umfang für die Ernährung genutzt werden kann. Ein Ziel des BMBF- Forschungsprojektes „NAPUS 2000“, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, war es diese Eiweißressource zu erschließen und nutzbar zu machen. Den größten Anteil an den phenolischen Komponenten nimmt das Sinapin ein (Kozłowska et al., 1983; Shahidi und Naczki, 1992), so dass eine Reduktion des Sinapingehaltes eine substantielle Voraussetzung für die Etablierung von Raps als Proteinpflanze ist. Durch klassische Züchtungsprogramme gelang es nicht, Rapspflanzen mit einem stabil niedrigen Sinapingehalt zu gewinnen (Zum Felde et al., 2003). Da der Metabolismus der Sinapatester bekannt ist, lag es nahe, einen molekularen Züchtungsansatz zu verfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Verminderung der SCT-Aktivität zu einer Sinapinreduktion führt.

Eine Möglichkeit zur Herstellung von Pflanzen mit verringerter oder abgeschalteter SCT-Aktivität ist die Nutzung von RNAi. Dieser Mechanismus basiert darauf, dass in die Pflanzenzelle eingebrachte doppelsträngige RNA als fremd erkannt und die dazu homologe mRNA abgebaut wird. Das Silencing von *BnSCT* wird dabei durch stabile Transformation eines RNAi-Konstruktes erzielt, das die Expression doppelsträngiger RNA-Fragmente in Form selbst-komplementärer *hairpin* RNA vermittelt. Diese wirken als äußerst effiziente Induktoren des PTGS und führen damit in transgenen Pflanzen zu einer wesentlich höheren Suppressionsstärke und -häufigkeit als konventionelle Co-Suppressions- und Antisensekonstrukte (Chuang und Meyerowitz, 2000; Levin et al., 2000; Smith et al., 2000; Wesley et al., 2001; Stoutjesdijk et al., 2002).

Hüsken et al. (2005) konnten zeigen, dass eine Reduktion des Sinapingehaltes in *B. napus* um 72 % im Vergleich zum Wildtyp durch Suppression der UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT) mittels RNAi möglich ist. Leider gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, transgene Rapspflanzen mit einem verminderten Sinapingehalt zu erzeugen (Abschnitt 3.5). Ein wesentlicher Grund dafür war die niedrige Regenerationsrate der transgenen Pflanzen. Es konnten nur zwei transgene Pflanzen regeneriert werden, die beide hinsichtlich ihres Sinapingehaltes mit dem Wildtyp vergleichbar waren. Für den RNAi-SGT-Ansatz ist eine Suppressionseffizienz von unter 50 % beschrieben. So zeigten lediglich 13 von 30 transgenen Pflanzen mit integrierter Suppressionskassette einen verminderten Sinapingehalt. Die Wahrscheinlichkeit bei nur zwei transgenen Linien eine supprimierte Pflanze zu erzeugen ist demnach äußerst gering.

Obwohl der RNAi-Ansatz in *B. napus* nicht zum Erfolg führte, konnte eindeutig belegt werden, daß mit Hilfe eines transgenen Ansatzes unter Verwendung eines RNAi-Konstruktes eine signifikante Abnahme des Sinapingehaltes im Samen möglich ist. Durch Transformation von *A. thaliana* mit dem pLH-SCT-GUS-Konstrukt konnte in der T2-Generation eine Reduktion des Sinapingehaltes um 48 % verglichen mit dem niedrigsten, im Wildtyp gemessenen Wert, erreicht werden. In 44 von 50 transgenen Pflanzen wurde ein geringerer Sinapingehalt als im Wildtyp gemessen. Dies entspricht einer Suppressionseffizienz von 88 %. Singh et al. (2000) beschreiben eine PTGS-Effizienz von 100 % in *A. thaliana* durch den Einsatz eines FAD2-RNAi-Konstruktes, das als Spacer ein Intron besitzt. Dieses Intron scheint für die hohe Effizienz verantwortlich zu sein, da durch das Herausspleißen eine stabilere Doppelstrang-Struktur entsteht. Das weder die in der Literatur angegebene Suppressionsstärke, noch die PTGS-Effizienz erreicht werden konnte, liegt möglicherweise aber auch in der Tatsache begründet, dass die eingesetzte Sequenz zum *Arabidopsis*-Gen nur 84 % Identität aufweist.

In diesem Zusammenhang muß ebenfalls erwähnt werden, dass aus züchterischer Sicht, die Reduktion des Sinapingehaltes durch die alleinige Suppression der SCT nicht sinnvoll ist, da die dadurch akkumulierende Sinapoylglucose dafür sorgt, dass der Gesamt-Sinapatestergehalt und somit der Gehalt an unerwünschten phenolischen Inhaltsstoffen weiterhin auf einem hohen Niveau ist. Die Identifizierung der *BnSCT*-Sequenz und der Beweis, dass eine Suppression dieses Gens zu einem verminderten Sinapingehalt führt, liefert jedoch die Voraussetzung für neue RNAi-Ansätze. So wäre durch eine gemeinsame Suppression von *SGT* und *BnSCT* eine weitere Reduktion des Sinapingehaltes in *B. napus* zu erwarten.

4.4. Immunlokalisierung der *BnSCT* in *B. napus*

Die Komplexität des pflanzlichen Phenylpropanoid-Stoffwechsels war in den letzten Jahren Thema vieler Untersuchungen. Durch die Isolierung und Charakterisierung von Arabidopsis-Mutanten mit verändertem Gehalt an Sinapatestern (Ruegger und Chapple, 2001) mußten einige grundlegende Vorstellungen über den Phenylpropanoid-Stoffwechsel in *A. thaliana* revidiert werden (Abbildung 4.1). So werden Ferulasäure und Sinapinsäure nicht quantitativ über die schrittweise Hydroxylierung und *O*-Methylierung am aromatischen Ring der freien Säuren synthetisiert, sondern vorwiegend durch Oxidation der entsprechenden Aldehyde (Nair et al., 2004). Das ursprünglich als Ferulasäure-5-hydroxylase (F5H) beschriebene Enzym setzt bevorzugt Coniferaldehyd und Coniferylalkohol zu den entsprechenden 5-Hydroxyderivaten um (Humphreys et al., 1999). Die Hydroxylierung von 4-Cumarsäure zu Caffeoesäure findet vorwiegend auf der Stufe der Shikimisäure- oder Chinasäureester statt (Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002b,a). Dies zeigt, dass der Phenylpropanoid-Stoffwechsel ein komplexes metabolisches Netzwerk ist, in dem die Metaboliten über viele, oft noch nicht untersuchte, Synthesewege miteinander in Verbindung stehen. Um dieses metabolische Netzwerk zu verstehen und für züchterische Zwecke beeinflussen zu können, ist ein detailliertes Wissen über die gewebespezifische und intrazelluläre Lokalisierung von Enzymaktivitäten und Metaboliten eine wichtige Voraussetzung, da hieraus Aussagen zur Kompartimentierung von Stoffwechselprozessen und Transportvorgängen abgeleitet werden können. Die Lokalisierung der Enzyme des Sinapin-Metabolismus wird wichtige Hinweise für die Aufklärung des metabolischen Sinapatester-Netzwerkes liefern, sodass dieses ein Schwerpunkt im Rahmen der vorliegenden Dissertation war.

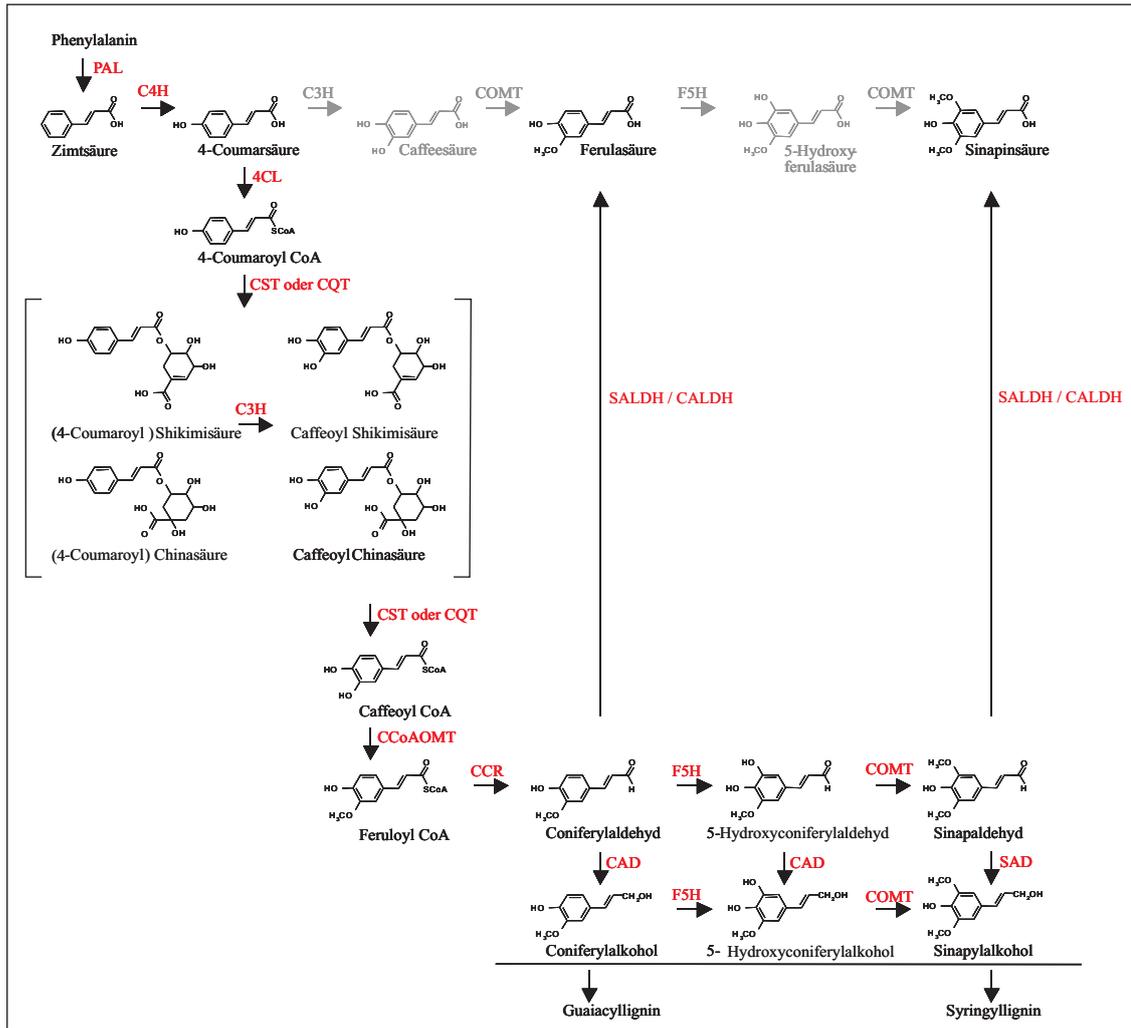


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung des Phenylpropanoid-Stoffwechsels in *A. thaliana*. Die rot gekennzeichneten Enzymaktivitäten wurden in *A. thaliana* nachgewiesen: PAL, Phenylalanin-Ammoniak-Lyase; C4H, Zimtsäure-4-hydroxylase; 4CL, 4-Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase; CQT, Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinasäure-Hydroxycinnamoyltransferase; CST, Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure-Hydroxycinnamoyltransferase; C3H, 4-Coumaroyl-3-Hydroxylase; CCoAOMT, Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase; CCR, Cinnamoyl-CoA-Reductase; CAD, Cinnamylalkohol-Dehydrogenase; F5H, Ferulasäure-5-Hydroxylase; COMT, Caffeoyl-5-Hydroxyferulasäure-O-Methyltransferase; SAD, Sinapylalkohol-Dehydrogenase; SALDH/CALDH, Sinapaldehyd-/Coniferylaldehyd-Dehydrogenase. Die in grau gehaltenen Stoffwechselschritte sind bisher in *A. thaliana* nicht nachgewiesen (nach Humphreys und Chapple, 2002; Nair et al., 2004; modifiziert).

Anhand von Sequenzvergleichen (Abbildung 3.4) bestand die Vermutung, dass die BnSCT als ein Vorläuferprotein synthetisiert und posttranslational modifiziert wird. Zu diesen Modifizierungen zählen neben der N-Glykosylierung das Abspalten einer Signalsequenz und das Herausspalten eines Endopeptids. Das Entfernen dieses Endopeptids resultiert in einer heterodimeren Struktur, bestehend aus zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 29 bzw. 18 kDa, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Gegen die 29 kDa-Untereinheit wurden Peptidantikörper hergestellt und zuerst in Western Blot-Analysen

hinsichtlich ihrer Spezifität getestet. In den Samenstadien C, D und E, in denen die höchsten SCT-Aktivitäten gemessen wurden, konnten nach reduzierender SDS-PAGE zwei Signale mit einer Größe von etwa 29 kDa und 24 kDa detektiert werden. Die Intensität beider Signale nimmt im Verlaufe dieser Entwicklungsstadien zu (Abbildung 3.27) und korreliert mit der gemessenen SCT-Aktivität (Abbildung 3.26). Die 29 kDa-Bande entspricht der erwarteten großen Untereinheit des BnSCT-Proteins gegen die der Antikörper gerichtet war. Diese Bande ist nach nichtreduzierender SDS-PAGE nicht mehr vorhanden und wird durch ein diffuses Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa ersetzt. Das unscharfe Muster des Proteins und die Tatsache, dass das detektierte Protein etwa 3 bis 5 kDa größer war als theoretisch berechnet, sind Hinweise für eine N-Glykosylierung der SCT. Die 24 kDa-Bande wurde auch nach nichtreduzierender SDS-PAGE erkannt. Dies deutet auf eine unspezifische Reaktion des Antikörpers hin. Interessanterweise beschreiben Vogt et al. (1993) in der gereinigten SCT-Fraktion aus dunkelgrünen Rapssamen die Kontamination mit einem Protein von genau dieser Größe in den gereinigten Fraktionen. Es scheint also ein Protein mit ähnlichen strukturellen Eigenschaften im Samen vorhanden zu sein, das sich bei der Aufreinigung ähnlich wie die BnSCT verhält und das auch durch den Anti-BnSCT-Antikörper erkannt wird.

Die Immunlokalisierung der BnSCT in Samen von *B. napus* lieferte ein überraschendes Ergebnis. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die SCT nicht wie vermutet in den Vakuolen, sondern in Plastiden lokalisiert ist. Nach der, von den meisten Wissenschaftlern anerkannten Endosymbionten-Hypothese sind Plastiden Abkömmlinge ehemals freilebender Einzeller, die auf einer frühen Evolutionsstufe nach Aufnahme in einen Zellkörper in diesem zunächst symbiontisch lebten und sich nach und nach zu Organellen entwickelt haben (Margulis, 1970). Als phylogenetische Vorläufer der Plastiden gelten Cyanobakterien. Plastiden besitzen eine eigene DNA (plastidäre DNA, ptDNA) deren Codierungskapazität jedoch für ein eigenständiges Überleben nicht ausreicht. Durch Genom- und Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass die meisten der endosymbiontischen Gene während der Evolution von den Vorläuferorganellen zum Wirtskern transferriert wurden (Abdallah et al., 2000; Leister, 2003). Demnach wird nur ein geringer Anteil der in den Plastiden lokalisierten Proteine innerhalb der Organellen synthetisiert. Die meisten plastidären Proteine sind kerncodiert, werden als Vorstufenproteine an den cytosolischen Ribosomen synthetisiert und post-translational in die Organellen importiert (Keegstra und Cline, 1999; Soll, 2002; Soll und Schleiff, 2004). Die Translokation der Vorstufenproteine in den Plastiden wird durch zwei Multiproteinkomplexe ermöglicht. Entsprechend ihrer Lokalisierung werden diese als Toc- (*translocon at the outer envelope of chloroplasts*) bzw. Tic-Komplex (*translocon at the inner envelope of chloroplasts*) bezeichnet (Übersicht in Gutensohn et al., 2005). Ähnlich wie Proteine, die in Mitochondrien oder in das Endoplasmatische Retikulum transportiert werden, tragen fast alle chloroplastidären Vorstufenproteine eine N-terminale, abspaltbare Extension (Transitpeptid) zur organellspezifischen Zielsteuerung (Soll, 2002; Jarvis und Soll, 2002). Dieses Transitpeptid ist verantwortlich

sowohl für den Transport der Proteine zu den Plastiden als auch für deren Transport durch die äußere und innere Hüllmembran und wird nach Erreichen des Stromas durch eine Peptidase abgespalten (Richter und Lamppa, 1998). Die meisten Proteine der äußeren plastidären Hüllmembran besitzen kein abspaltbares Transitpeptid und werden meist direkt von der cytosolischen Seite in die Membran inseriert (Soll und Tien, 1998). Proteine die innerhalb der Plastiden lokalisiert sind, müssen über beide Hüllmembranen hinweg in das Stroma und zum Teil danach in und über die Thylakoidmembran transportiert werden. Es bestand lange Zeit die Annahme, dass für den Plastidenimport das Vorhandensein einer Transitsequenz unabdingbar ist (Soll, 2002; Jarvis und Soll, 2002). Neuere Untersuchungen des Chloroplasten Proteoms von *A. thaliana* belegen jedoch den Plastidenimport von Proteinen, die kein Transitpeptid besitzen (Kleffmann et al., 2004; Friso et al., 2004). So zeigen Untersuchungen eines Proteins (*ceQORH*, *chloroplast envelope Quinone OxidoReductase Homologue*) der inneren Hüllmembran von Chloroplasten aus *Spinacia oleracea*, dass dieses trotz Fehlens einer Transitsequenz importiert wird (Miras et al., 2002). Die gleichen Ergebnisse lieferten Untersuchungen eines ebenfalls in der inneren plastidären Hüllmembran lokalisierten Proteins (*IEP32*, *inner envelope protein 32*) aus *Pisum sativum* (Nada und Soll, 2004). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Zielsteuerung der Proteine zu den Plastiden und der anschließende Import ein komplexer Prozess ist, der noch nicht in allen Einzelheiten verstanden ist.

Die Plastidenlokalisierung eines Proteins, das wie die SCT eine sekretorische Signalsequenz am N-Terminus trägt, wirkt zunächst widersprüchlich. In der jüngsten Literatur findet sich jedoch eine ausführliche Untersuchung zu diesem Phänomen (Villarejo et al., 2005). Für eine α -Carboanhydrase (CAH1) aus *A. thaliana*, die eine sekretorische N-terminale Signalsequenz trägt und die N-glykosiliert wird, wurde durch Immunlokalisierung und Importversuche mit GFP-Fusionsproteinen die ausschließliche Lokalisierung in Chloroplasten nachgewiesen. Durch *in vitro* Importstudien des *full length* CAH1-Proteins und des um das Signalpeptid verkürzten Proteins mit isolierten Mikrosomen konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Signalsequenz notwendig ist für die Aufnahme ins ER und den Transport in den Golgi-Apparat, wo die Prozessierung des Proteins, einschließlich des Abspaltens der Signalsequenz und einer N-Glykosylierung, stattfindet. Intakte Chloroplasten waren hingegen nicht in der Lage CAH1 aufzunehmen und zu prozessieren. Dies bedeutet, dass CAH1 nicht über den Toc/Tic Proteinkomplex in die Chloroplasten aufgenommen wird, obwohl das glykosilierte Protein im Stroma der Chloroplasten nachgewiesen wurde. Diese Untersuchungen wurden unterstützt durch Blockierungsexperimente des vesikulären Transports durch das Fungizid Brefeldin A (Nebenfuhr et al., 2002), das den Toc/Tic Mechanismus nicht beeinflusst. Nach Behandlung mit dem Fungizid wurde die Akkumulation von CAH1 im ER und in den Golgi-Strukturen beobachtet. Interessanterweise wurden im Chloroplastenproteom von *A. thaliana* 49 Proteine identifiziert, die laut Sequenzanalysen (TargetP) ein sekretorisches Signalpeptid tragen (Kleffmann et al., 2004). Diese Analysen und die Untersuchungen von Villarejo et al. (2005) liefern Hinweise für einen neuen sekretorischen

Protein-Transportweg zu den Chloroplasten der Pflanzen. Wie dieser neue Transportweg abläuft, ist bisher völlig ungeklärt. Im Gegensatz dazu, wurde eine α -Amylase (α Amy3) aus *Oryza sativa*, die ebenfalls ein sekretorisches Signalpeptid trägt, in der Zellwand und in Plastiden lokalisiert (Chen et al., 2004). Durch Importstudien wurde der Transport in das ER, aber auch der direkte Transport in Plastiden und das Abspalten der Signalsequenz innerhalb der Organellen nachgewiesen. Mit der BnSCT liegt nun ein Protein mit einer sekretorischen Signalsequenz aus *B. napus* vor, für das eine ausschließliche Plastidenlokalisation nachgewiesen wurde. Ob die BnSCT, wie CAH1 gezeigt über das ER und den Golgi-Apparat oder aber auf direktem Weg wie α Amy3 in die Plastiden transportiert wird, muss durch Importversuche mit Protoplasten bzw. isolierten Mikrosomen und Chloroplasten untersucht werden.

Nachdem für die SCT eine Plastidenlokalisation gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage nach der Bedeutung dieser Kompartimentierung für den Sinapin-Metabolismus. Es muß postuliert werden, dass Sinapoylglucose und Cholin, die Substrate der SCT, in den Plastiden vorhanden sind bzw. ein Transport in diese Organellen stattfindet. Zumindest für Cholin sind in der Literatur Hinweise dafür zu finden. Durch einen transgenen Ansatz zur Erhöhung der Salz und Kältetoleranz in *A. thaliana*, bei dem eine bakterielle Cholinoxidase (*codA*) in Chloroplasten exprimiert wurde, konnte eine Akkumulation von Glycinbetain in den Plastiden erreicht werden (Hayashi et al., 1997; Sakamoto et al., 2000). Die Umwandlung von Cholin zu Glycinbetain durch die Cholinoxidase in den Chloroplasten setzt also die Anwesenheit des Cholins in diesem Kompartiment voraus. Für Sinapoylglucose sind hingegen keine Daten über die subzelluläre Verteilung bekannt. Die SGT, die die Umwandlung von Sinapinsäure zu Sinapoylglucose katalysiert, wird aufgrund des Fehlens einer Signalsequenz im Cytoplasma vermutet (Wang und Ellis, 1998). Da jedoch in jüngster Zeit Proteine identifiziert wurden, die auch ohne eine Targetsequenz in Plastiden transportiert werden (Miras et al., 2002; Nada und Soll, 2004), kann auch für dieses Enzym eine plastidäre Lokalisation nicht ausgeschlossen werden.

Über die biologische Funktion des Sinapins und den Ort der Akkumulation ist bislang relativ wenig bekannt. Man weiß, dass Sinapin während der Keimung durch die Sinapinesterase zu Sinapinsäure und freiem Cholin hydrolysiert (Nurmann und Strack, 1979; Strack, 1980). Daher wurde vermutet, dass Sinapin in den Samen als Sinapinsäure- und Cholinspeicher für die, nach der Keimung einsetzende Sinapoylmalat- bzw. Membranlipidbiosynthese fungiert (Strack, 1981). Bei *A. thaliana* wurden dagegen Mutanten identifiziert (*fah1* und *sng2*), die durch eine Störung der Sinapinbiosynthese kein Sinapin, sondern freies Cholin akkumulieren (Chapple et al., 1992; Shirley et al., 2001; Shirley und Chapple, 2003). Die Charakterisierung dieser Mutanten führten jedoch nicht zu einer möglichen biologischen Funktion des Sinapins, da eine Beeinträchtigung der Vitalität dieser Mutanten nicht beobachtet wurde. Auf Grund der bitteren und adstringierenden Eigenschaften der Phenolsäuren und ihrer Ester kann eine fraßhemmende Wirkung oder eine antifungale Wirkung nicht ausgeschlos-

sen werden. Über den Ort der Sinapinakkumulation kann nur spekuliert werden, da keine Untersuchungen diesbezüglich vorliegen. Anzunehmen ist, dass das Sinapin aufgrund der proteinfällenden Wirkung phenolischer Substanzen gegen den cytoplasmatischen Raum abgegrenzt wird. Ob eine Akkumulation an den Orten der Synthese stattfindet, das heißt in den Plastiden, oder ob ein Transport in die Subkompartimente der Proteinspeichervakuolen erfolgt, in denen beispielsweise die Phytate anzutreffen sind, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Die Lokalisierung der neben der SCT am Sinapinmetabolismus beteiligten Enzyme SGT und SCE und der Metabolite Sinapoylglucose und Sinapin kann dabei zur Aufklärung des Metabolitenflusses beitragen.

4.5. Weiterführende Arbeiten

Einige Ansätze für weiterführende Experimente sind in den vorangegangenen Abschnitten bereits angedeutet worden. Im Mittelpunkt sollten dabei Untersuchungen zur Regulation, Expression und Lokalisation stehen.

Die gezielte Deletion von Promotorbereichen ist als eine effektive experimentelle Strategie zur Kartierung von regulatorischen *cis*-Elementen etabliert und könnte bei der Aufklärung der Regulationsmechanismen der samenspezifischen Expression der BnSCT helfen. Die Untersuchung der Promotoraktivität mittels Reporterfusionen in *A. thaliana*-Mutanten mit Defizienz für samenspezifische Transkriptionsfaktoren (z.B. *fus3*, *abi3*, *lec1*) könnte Hinweise auf *trans*-aktive Faktoren liefern.

Für Strukturanalysen der BnSCT ist die Erhöhung der Ausbeute an enzymatisch aktivem Protein im heterologen Expressionssystem anzustreben. Zur Optimierung der Expression in *S. cerevisiae* sollte die Nukleotidsequenz der *BnSCT1*-cDNA an die Erfordernisse des Translationsapparates der Wirtszelle angepaßt werden (Codon-Präferenz, Signalpeptid).

Durch Lokalisierungsexperimente wurde die BnSCT in Plastiden nachgewiesen. Hinweise für die molekularen Mechanismen des Plastidenimports könnten durch *in vitro* Importstudien gewonnen werden. Für die Aufklärung der Kompartimentierung der Sinapinbiosynthese und deren Metabolitenfluss, sollten Kolo-kalisierungsexperimente mit den involvierten Enzymen und Metaboliten durchgeführt werden.

Nicht zuletzt bieten die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Nukleotidsequenzen neue Möglichkeiten für molekulare Züchtungsansätze zur samenspezifischen Modifizierung in *B. napus*. So könnte ein RNAi-Konstrukt hergestellt werden, dessen Suppressionskassette durch Verwendung der 5'- und 3'-Region sowie eines Introns von *BnSCT1* als Spacer ausschließlich aus homologen Sequenzen besteht.

5. Zusammenfassung

Sinapatester akkumulieren in Samen von Brassicaceen mit Sinapin als Hauptkomponente. Durch ihren phenolischen Charakter sind sie in einigen Nutzpflanzen, wie z.B. Raps als antinutritive Substanzen unerwünscht. Eine Verringerung dieser phenolischen Samenkomponenten durch Züchtung ist in Raps wenig aussichtsreich, da innerhalb der verfügbaren Genotypen keine stabil vererbte ausreichende Varianz dieses Merkmals gefunden wurde. Eine vielversprechende Möglichkeit, Rapslinien mit verringertem Sinapatester-Gehalt zu erzeugen, besteht dagegen in der samenspezifischen Suppression der Sinapinbiosynthese. Für eine gezielte Veränderung des komplexen metabolischen Netzwerkes sind neben der Kenntnis der Gene, Informationen zu Regulation, Metabolitenfluss und Kompartimentierung notwendig. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen die Klonierung, Charakterisierung und Lokalisierung einer Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT) aus *B. napus*.

- Ausgehend von einem cDNA-Fragment, das Sequenzähnlichkeit zu Acyltransferase-Genen aufwies, konnten aus *B. napus* vier *BnSCT*-cDNAs mit einem durchgängigen Leserahmen von 1401 bp und einem abgeleiteten Protein von 466 Aminosäuren isoliert werden. Die isolierten Sequenzen zeigen die typischen Merkmale von SCPL-Proteinen. Computergestützte Analysen sagten eine N-terminale Signalsequenz und mehrere N-Glycosylierungsstellen voraus. Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten konzentrierten sich alle weiterführenden Arbeiten hauptsächlich auf *BnSCT1*. Durch Sequenzvergleiche wurde *BnSCT1* dem von *B. oleracea* stammenden C-Genom zugeordnet.
- Die Funktionalität von *BnSCT1* wurde durch die Komplementation einer SCT-defizienten *A. thaliana*-Mutante mit der *BnSCT1*-cDNA und durch die heterologe Expression in *S. cerevisiae* und *N. tabacum* gezeigt. Dabei stellte sich heraus, dass die Fusion des Proteins mit einer C-terminalen Histidinsequenz bei der Expression in *N. tabacum* zu einem Aktivitätsverlust von 95 % führt. Nach Expression in *S. cerevisiae* war das His-tag-Fusionsprotein enzymatisch inaktiv.

- Expressionsanalysen zeigten ein Zunahme der BnSCT-Transkriptakkumulation im Verlauf der Samenentwicklung, die ihr Maximum im voll entwickelten Kotyledonenstadium (Stadium E) erreicht und danach wieder auf ein niedriges Niveau abfällt. Die Transkriptabundanzen korrelieren mit den gemessenen Werten für die BnSCT-Enzymaktivität.
- Southern Blot-Analysen und PCR-gestützte Klonierungstechniken lassen in *B. napus* eine Umstrukturierung im Bereich des *BnSCT*-Locus des A-Genoms vermuten. In *B. napus* sind für das A- und das C-Genom mindestens je drei *BnSCT*-Loci vorhanden.
- Mit Hilfe einer genomischen Bank von *B. napus* gelang die Isolierung eines ca. 7 kB umfassenden Subfragmentes des *BnSCT1*-Locus. Vergleichende Analysen mit dem *SNG2*-Locus von *A. thaliana* zeigen, dass die Grundstruktur beider Genorte ähnlich ist. Dennoch wurden Unterschiede in der Mikrostruktur beider Loci festgestellt, die möglicherweise auf eine Deletion im Genom von *B. napus* zurückzuführen sind.
- Die genomische 5'-Region des *BnSCT1*-Gens wurde durch PCR-gestützte Klonierungstechniken isoliert. Durch Analyse von Promotor-Reporterfusionen konnte erfolgreich die samenspezifische Promotoraktivität dieser Region nachgewiesen werden.
- Durch stabile Transformation von *A. thaliana* mit einem *BnSCT1*-RNAi-Konstrukt konnte eine Reduktion des Sinapingehaltes um 48 % erreicht werden, die mit einer Akkumulation von Sinapoylglucose einhergeht. Die Suppressionseffizienz lag bei 88 %.
- Die immunologische Analyse der BnSCT mittels Western Blot weist darauf hin, dass das native Enzym als heterodimeres, N-glykosiliertes Protein vorliegt. Im Samen konnte die BnSCT in der Aleuronschicht und im embryonalen Gewebe nachgewiesen werden. Auf subzellulärer Ebene wurde das Enzym im Stroma der Plastiden lokalisiert.

Durch die umfassende Charakterisierung der BnSCT liefert die vorliegende Arbeit wesentliche Beiträge zum Verständnis der Sinapinbiosynthese in der Pflanze. Die weiterhin offene Frage nach der physiologischen Rolle des Sinapins sollte durch detaillierte Analyse Sinapindefizienter Mutanten sowie durch Kolo-kalisierung der an der Sinapinbiosynthese beteiligten Enzymen und Metabolite weiter untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abdallah, F, Salamini, F und Leister, D: A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis. In: *Trends Plant Sci*, Band 5:S. 141 – 142, 2000.
- Adams, KL und Wendel, JF: Novel patterns of gene expression in polyploid plants. In: *Trends Genet*, Band 21:S. 539 – 543, 2005a.
- Adams, KL und Wendel, JF: Polyploidy and genome evolution in plants. In: *Curr Opin Plant Biol*, Band 8:S. 135 – 141, 2005b.
- Ammerer, G, Hunter, CP, Rothman, JH, Saari, GC, Valls, LA und Stevens, TH: Pep4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. In: *Mol Cell Biol*, Band 6:S. 2490 – 2499, 1986.
- Bancroft, I: Insights into the structural and functional evolution of plant genomes afforded by the nucleotide sequences of chromosomes 2 and 4 of *Arabidopsis thaliana*. In: *Yeast*, Band 17:S. 1 – 5, 2000.
- Baulcombe, D: RNA silencing in plants. In: *Nature*, Band 431:S. 356 – 363, 2004.
- Bech, LM und Breddam, K: Inactivation of carboxypeptidase Y by mutational removal of the putative essential histidyl residue. In: *Carlsberg Res Commun*, Band 54:S. 165 – 171, 1989.
- Bell, JM: Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. In: *Can J Anim Sci*, Band 73:S. 679 – 697, 1993.
- Bernstein, E, Caudy, AA, Hammond, SM und Hannon, GJ: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. In: *Nature*, Band 409:S. 363–366, 2001.
- Blair, R und Reichert, RD: Carbohydrate and phenolic constituents in a comprehensive range of rapeseed and canola fractions: nutritional significance for animals. In: *J Sci Food Agric*, Band 35:S. 29 – 35, 1984.

- Booij-James, IS, Dube, SK, Jansen, MA, Edelman, M und Mattoo, AK: Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism. In: *Plant Physiol*, Band 124:S. 1275 – 84, 2000.
- Bouchereau, A, Hamelin, J, Lamour, I, Renard, M und Larher, F: Distribution of sinapine and related compounds in seeds of Brassica and allied genera. In: *Phytochemistry*, Band 30:S. 1873 – 1881, 1991.
- Bradford, MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem*, Band 72:S. 248 – 254, 1976.
- Chapple, C, Vogt, T, Ellis, BE und Somerville, CR: An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. In: *Plant Cell*, Band 4:S. 1413 – 1424, 1992.
- Chen, MH, Huang, LF, Li, HM, Chen, YR und Yu, SM.: Signal peptide-dependent targeting of a rice α -amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells. In: *Plant Physiol*, Band 135:S. 1367–1377, 2004.
- Chuang, CF und Meyerowitz, EM: Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 97:S. 4985 – 4990, 2000.
- Clough, SJ und Bent, AF: Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant J*, Band 16:S. 735 – 743, 1998.
- Cogoni, C und G, Macino: Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to rna dependent rna polymerase. In: *Nature*, Band 399:S. 166–169, 2000.
- De Block, M, De Brouwer, D und Tenning, P: Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. In: *Plant Physiol*, Band 91(2):S. 694–701, 1989.
- Dodson, G und Wlodawer, A: catalytic triads and their relatives. In: *trend Biochem Sci*, Band 23:S. 347–352, 1998.
- Dong, H, Nilsson, L und Kurland, CG: Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. In: *J Mol Biol*, Band 260:S. 649 – 663, 1996.
- Downey, RK und Bell, JM: New development in canola research. In: F., Shadidi (Hg.) *Canola and Rapeseed. Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology*, Van Nostrand Reinhold, New York, S. 211 – 220. 1990.
- Erhart, E und Hollenberg, CP: The presence of a defective LEU2 gene on 2 μ m DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. In: *J Bacteriol*, Band 156:S. 625 – 635, 1983.

- Feng, Y und Xue, Q: The serine carboxypeptidase like gene family of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). In: *Funct Integr Genomics*, Band 6:S. 14–24, 2006.
- Figuroa, P, Leon, G, Elorza, A, Holuigue, L, Araya, A und Jordana, X: The four subunits of mitochondrial respiratory complex ii are encoded by multiple nuclear genes and targeted to mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Mol Biol*, Band 50:S. 4 – 5, 2002.
- Fire, A, Xu, S, Montgomery, MK, Kostas, SA, Driver, SE und Mello, CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: , Band 391:S. 806 – 11, 1998.
- Fleming, SM, Robertson, TA, Langley, GJ und Bugg, TD: Catalytic mechanism of a C-C hydrolase enzyme: evidence for a gem-diol intermediate, not an acyl enzyme. In: *Biochemistry*, Band 39:S. 1522–1531, 2000.
- Franke, R, Hemm, MR, Denault, JW, Ruegger, MO, Humphreys, JM und Chapple, C: Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. In: *Plant J*, Band 30:S. 47 – 59, 2002a.
- Franke, R, Humphreys, JM, Hemm, MR, Denault, JW, Ruegger, MO, Cusumano, JC und Chapple, C: The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. In: *Plant J*, Band 30:S. 33 – 45, 2002b.
- Fraser, CM, Rider, LW und Chapple, C: An expression and bioinformatics analysis of the *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like gene family. In: *Plant Physiol*, Band 138:S. 1136–1148, 2005.
- Friso, G, Giacomelli, L, Ytterberg, AJ, Peltier, JB, Rudella, A, Sun, Q und Wijk, KJ: In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. In: *Plant Cell*, Band 16:S. 478 –499, 2004.
- Goldberg, RB, Barker, SJ und Perez-Grau, L: Regulation of gene expression during plant embryogenesis. In: *Cell*, Band 56:S. 149 – 160, 1989.
- Goldberg, RB, Dapaiva, G und Yadegari, R: Plant embryogenesis-zygote to seed. In: *Science*, Band 266:S. 605–616, 1994.
- Griffiths, DW, Birch, ANE und Hillmann, JR: Antinutritional compounds in the Brassicaceae: Analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. In: *J Hort Sci Biotechnol*, Band 73:S. 1–18, 1998.
- Groot, EP und Van Caesele, LA: The development of the aleurone layer in canola (*Brassica napus*). In: *Can J Bot*, Band 71:S. 1193–1201, 1993.

- Gutensohn, M, Fan, E, Frielingsdorf, S, Hanner, P, Hou, B, Hust, B und Klosgen, RB: Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. In: *J Plant Physiol*, Band 163:S. 333 – 347, 2005.
- Hahlbrock, K und Sheel, D: Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. In: *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, S. 347 – 369, 1989.
- Hammond, SM, Bernstein, E, Beach, D und Hannon, GJ: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. In: *Nature*, Band 404:S. 293–296, 2000.
- Hartl, FU: Molecular chaperones in cellular protein folding. In: *Nature*, Band 381:S. 571 – 579, 1996.
- Hause, B, Meyer, K, Viitanen, PV, Chapple, C und Strack, D: Immunolocalization of 1-O-sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. In: *Planta*, Band 215:S. 26 – 32, 2002.
- Hausmann, L und Töpfer, R: Entwicklung von Plasmid-Vektoren. In: *BioEngineering für Rapssorten nach Maß. Vorträge für Pflanzenzüchtung*. 1999, S. 155 – 173.
- Hayashi, H, Alia, Mustardy, L, Deshniun, P, Ida, M und Murata, N: Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. In: *Plant J*, Band 12:S. 133 – 142, 1997.
- Hayashi, R, Bai, Y und Hata, T: Evidence for an essential histidine in carboxypeptidase Y. reaction with the chloromethyl ketone derivative of benzyloxycarbonyl-L-phenylalanine. In: *J Biol Chem*, Band 250:S. 5221 – 5226, 1975.
- Hayashi, S, R Moore und Stein, WH: Serine at the active center of yeast carboxypeptidase. In: *J Biol Chem*, Band 248:S. 8366 – 8369, 1973.
- Hellens, RP, Edwards, EA, Leyland, NR, Bean, S und Mullineaux, PM: pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. In: *Plant Mol Biol*, Band 42:S. 819 – 832, 2000.
- Herrmann, KM und Weaver, LM: The shikimate pathway. In: *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, Band 50:S. 473 – 503, 1999.
- Hood, EE, Gelvin, SB, Melchers, LS und A, Hoekema: New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. In: *Transgenic Res*, Band 2:S. 208 – 218, 1993.
- Humphreys, JM und Chapple, C: Rewriting the lignin roadmap. In: *Curr Opin Plant Biol*, Band 5:S. 224 – 229, 2002.

- Humphreys, JM, Hemm, MR und Chapple, C: New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, Band 96:S. 10045 – 10050, 1999.
- Hüsken, A, Baumert, A, Strack, D, Becker, H, Möllers, C und Milkowski, C: Reduction of sinapate ester content in transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) by dsRNAi-based suppression of bnSGT1 gene expression. In: *Molecular Breeding*, Band 16:S. 127–138, 2005.
- Jarvis, P und Soll, J: Toc, Tic, and chloroplast protein import. In: *Biochim Biophys Acta*, Band 1590:S. 1 – 3, 2002.
- Jefferson, RA, Kavanagh, TA und Bevan, MW.: GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. In: *EMBO J*, Band 6:S. 3901–3907, 1987.
- Jung, G, Ueno, H und Hayashi, R: Carboxypeptidase Y: structural basis for protein sorting and catalytic triad. In: *J Biochem*, Band 126:S. 1 – 6, 1999.
- Kane, JF: Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. In: *Curr Opin Biotechnol*, Band 6:S. 494 – 500, 1995.
- Kapila, J, De Rycke, R, Van Montagu, M und Angenon, G: An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. In: *Plant Sci*, Band 122:S. 101–108, 1997.
- Keegstra, K und Cline, K: Protein import and routing systems of chloroplasts. In: *Plant Cell*, Band 11:S. 557 – 570, 1999.
- Klahre, U, Hemmings-Mieszczak, M und Filipowicz, W: Extreme heterogeneity of polyadenylation sites in mRNAs encoding chloroplast RNA-binding proteins in *Nicotiana glauca*. In: *Plant Mol Biol*, Band 28:S. 569 – 574, 1995.
- Kleffmann, T, Russenberger, D, von Zychlinski, A, Christopher, W, Sjolander, K, Grussem, W und Baginsky, S: The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. In: *Curr Biol*, Band 14:S. 354 – 362, 2004.
- Koncz, C und Schell, J: The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. In: *Mol Gen Genet*, Band 204:S. 383 – 396, 1986.
- Körber-Grohne, U.: *Nutzpflanzen in Deutschland - von der Vorgeschichte bis heute*, Nikol Verlagsgesellschaft. Hamburg, Kapitel Ölfrüchte, S. 149–170. 1995.
- Kozak, M: An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. In: *Nucleic Acids Res.*, Band 15:S. 8125 – 8148, 1987.

- Kozak, M: Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, Band 87:S. 8301 – 8305, 1990.
- Kozak, M: An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. In: *J Cell Biol*, Band 115:S. 887 – 903, 1991.
- Kozak, M: Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. In: *EMBO J*, Band 16:S. 2482 – 2492, 1997.
- Kozłowska, H, Rotkiewicz, DA, Zadernowski, R und Sosulski, FW: Phenolic acids in rapeseed and mustard. In: *J Am Oil Chem Soc*, Band 60:S. 119–123, 1983.
- Kroll, H: Ein archäologischer Rapsfund des 16. Jahrhunderts, entdeckt in Heide in Holstein, Norddeutschland. In: *J Agron Crop Sci*, Band 173:S. 17 – 21, 1994.
- Laemmli, UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*, Band 227:S. 680 – 685, 1970.
- Lagercrantz, U und Lydiat, DJ: Comparative genome mapping in Brassica. In: , Band 144:S. 1903 – 1910, 1996.
- Lagercrantz, U, Putterill, J, Coupland, G und Lydiat, D: Comparative mapping in Arabidopsis and Brassica, fine scale genome collinearity and congruence of genes controlling flowering time. In: *Plant J*, Band 9:S. 13 – 20, 1996.
- Landry, LG, Chapple, CC und Last, RL: Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. In: *Plant Physiol*, Band 109:S. 1159 – 1166, 1995.
- Lehfeldt, C, Shirley, AM, Meyer, K, Ruegger, MO, Cusumano, JC, Viitanen, PV, Strack, D und Chapple, C: Cloning of the SNG1 gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. In: *Plant Cell*, Band 12:S. 1295 – 1306, 2000.
- Leister, D: Chloroplast research in the genomic age. In: *Trends Genet*, Band 19:S. 47 – 56, 2003.
- Levin, JZ, de Framond, AJ, Tuttle, A, Bauer, MW und Heifetz, PB: Methods of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in Arabidopsis and their use to define an essential gene in methionine biosynthesis. In: *Plant Mol Biol*, Band 44:S. 759 – 775, 2000.
- Li, AX, Eannetta, N, Ghangas, GS und Steffens, JC: Glucose polyester biosynthesis. purification and characterization of a glucose acyltransferase. In: *Plant Physiol*, Band 121:S. 453 – 460, 1999.

- Li, AX und Steffens, JC: An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglucose is a serine carboxypeptidase-like protein. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 97:S. 6902 – 6907, 2000.
- Li, J, Ou-Lee, TM, Raba, R, Amundson, RG und Last, RL: Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to uv-b irradiation. In: *Plant Cell*, Band 5:S. 171 – 179, 1993.
- Liao, DI, Breddam, K, Sweet, RM, Bullock, T und Remington, SJ: Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2-Å resolution. In: *Biochemistry*, Band 31:S. 9796 – 9812, 1992.
- Liao, DI und Remington, SJ: Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase. In: *J Biol Chem*, Band 265:S. 6528 – 6531, 1990.
- Lim, EK, Li, Y, Parr, A, Jackson, R, Ashford, DA und Bowles, DJ: Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in Arabidopsis. In: *J Biol Chem.*, Band 276:S. 4344 – 4349, 2001.
- Lorenzen, M, Racicot, V, Strack, D und Chapple, C: Sinapic acid ester metabolism in wild type and a sinapoylglucose-accumulating mutant of Arabidopsis. In: *Plant Physiol*, Band 112:S. 1625 – 1630, 1996.
- Margulis, L: *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, 1970.
- Mayer, U, Torres Ruiz, RA, Misera, S und Jürgens, G: Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embryo. In: *Nature*, Band 353:S. 402–407, 1991.
- McBride, KE und Summerfelt, KR: Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. In: *Plant Mol Biol*, Band 14:S. 269–276, 1990.
- Milkowski, C, Baumert, A, Schmidt, D, Nehlin, L und Strack, D: Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. In: *Plant J*, Band 38:S. 80 – 92, 2004.
- Milkowski, C, Baumert, A und Strack, D: Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. In: , Band 211:S. 883 – 6, 2000a.
- Milkowski, C, Baumert, A und Strack, D: Identification of four Arabidopsis genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferases. In: *FEBS Lett*, Band 486:S. 183 – 184, 2000b.
- Milkowski, C und Strack, D: Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. In: *Phytochemistry.*, Band 65:S. 517 – 524, 2004.

- Miras, S, Salvi, D, Ferro, M, Grunwald, D, Garin, J, Joyard, J und Rolland, N: Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. In: *J Biol Chem*, Band 277:S. 47770 – 47778, 2002.
- Mock, HP und Strack, D: Energetics of uridine 5'-diphosphoglucose:hydroxycinnamic acid acyl-glycosyltransferase reaction. In: *Phytochemistry*, Band 32:S. 575 – 597, 1993.
- Mock, HP, Vogt, T und D, Strack: Sinapoylglucose:malate-sinapoyltransferase activity in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa*. In: *Z Naturforsch*, Band 47:S. 680–682, 1992.
- Naczki, M, Amarowicz, R, Sullivan, A und Shahidi, F: Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. In: *Food Chemistry*, Band 62:S. 489 – 502, 1998.
- Nada, A und Soll, J: Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. In: *J Cell Sci*, S. 3975 – 82, 2004.
- Nair, RB, Bastress, KL, Ruegger, MO, Denault, JW und Chapple, C: The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. In: *Plant Cell*, Band 16:S. 544 – 554, 2004.
- Nebenfuhr, A, Ritzenthaler, C und Robinson, DG: Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. In: *Plant Physiol*, Band 130:S. 1102 – 1108, 2002.
- Nielsen, TL, Holmberg, S und Petersen, JG: Regulated overproduction and secretion of yeast carboxypeptidase Y. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, Band 33:S. 307 – 12, 1990.
- Nurmann, G und Strack, D: Sinapine esterase. I. Characterisation of sinapine esterase from cotyledons of *Raphanus sativus*. In: *Z Naturforsch*, Band 34:S. 715–720, 1979.
- Nurmann, G und Strack, D: Formation of 1-sinapoylglucose from free sinapic acid and UDP-glucose by a cell-free system from *Raphanus sativus* seedlings. In: *Z Pflanzenphysiol*, Band 102:S. 11 – 17, 1981.
- Ohlson, R: Functional properties of rapeseed oil and protein product. In: *Proceedings 5th International Rapeseed Congress*, Malmö, Schweden, S. 152 – 167. 1978.
- Ollis, DL, Cheah, E, Cygler, M, Dijkstra, B, Frolova, F, Franken, SM, Harel, M, Remington, SJ, Silman, I, Schrag, J und Et, AL: The alpha/beta hydrolase fold. In: *Protein Eng*, Band 5:S. 197 – 211, 1992.
- O'Neill, CM und Bancroft, I: Comparative physical mapping of segments of the genome of *Brassica oleracea* var. alboglabra that are homoeologous to sequenced regions of chromosomes 4 and 5 of *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant J*, Band 23:S. 233 – 243, 2000.

- Outchkourov, NS, Peters, J, de Jong, J, Rademakers, W und Jongsma, MA: The promoter-terminator of chrysanthemum *rbcs1* directs very high expression levels in plants. In: *Planta*, Band 216:S. 1003 – 12, 2003.
- Pearson, AW, Butler, EJ und Fenwick, GR: Rapeseed meal and egg taint: the role of sinapine. In: *J Sci Food Agric*, Band 31:S. 898 – 904, 1980.
- Proudfoot, NJ und Brownlee, GG: 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. In: *Mol Cell Biol*, Band 263:S. 211 – 214, 1976.
- Rana, D, van den Boogaart, T, O'Neill, CM, Hynes, L, Bent, E, Macpherson, L, Park, JY, Lim, YP und Bancroft, I: Conservation of the microstructure of genome segments in *Brassica napus* and its diploid relatives. In: *Plant J*, Band 40:S. 725 – 733, 2004.
- Regenbrecht, J und Strack, D: Distribution of 1-sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase in Brassicaceae. In: *Phytochemistry*, Band 24:S. 407 – 410, 1985.
- Richter, S und Lamppa, GK: A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, Band 95:S. 7463 – 7468, 1998.
- Rosenberg, AH, Goldman, E, Dunn, JJ, Studier, FW und Zubay, G: Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. In: *J Bacteriol*, Band 175:S. 716 – 22, 1993.
- Rothnie, HM: Plant mRNA 3'-end formation. In: *Plant Mol Biol*, Band 32:S. 43–61, 1996.
- Rothnie, HM, Reid, J und Hohn, T: The contribution of AAUAAA and the upstream element UUUGUA to the efficiency of mRNA 3'-end formation in plants. In: *EMBO J*, Band 13:S. 2200 – 2210, 1994.
- Ruegger, M und Chapple, C: Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism. In: *Plant Cell*, Band 159:S. 1741 – 1749, 2001.
- Sakamoto, A, Valverde, R, Alia, Chen, TH und Murata, N: Transformation of *Arabidopsis* with the *codA* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. In: *Plant J*, Band 22:S. 449 – 453, 2000.
- Sambrook, J, Fritsch, EF und Maniatis, T.: *Molecular Cloning - a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press. New York, 1989.
- Sanfacon, H, Brodmann, P und Hohn, T: A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. In: *Genes Dev*, Band 5:S. 141 – 9, 1991.

- Schoch, G, Goepfert, S, Morant, M, Hehn, A, Meyer, D, Ullmann, P und Werck-Reichhart, D: CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. In: *J Biol Chem*, Band 276:S. 36566 – 36574, 2001.
- Schulze, S, Mant, A, Kossmann, J und Lloyd, R: Identification of an Arabidopsis inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplast. In: *FEBS Lett*, Band 565:S. 101 – 105, 2004.
- Shahidi, F und Naczk, M: An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional significance. In: *J Am Oil Chem Soc*, Band 69:S. 917–924, 1992.
- Sheahan, JJ: Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*). In: *Am J Bot*, Band 83:S. 679–686, 1996.
- Shirley, AM und Chapple, C: Biochemical characterisation of sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase, a serine carboxypeptidase-like protein that functions as an acyltransferase in plant secondary metabolism. In: *J Biol Chem*, Band 278:S. 19870–19877, 2003.
- Shirley, AM, McMichael, CM und Chapple, C: The *sng2* mutant of Arabidopsis is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase. In: *Plant J*, Band 28:S. 83 – 94, 2001.
- Singh, S, Green, A, Stoutjesdijk, P und Liu, Q: Inverted-repeat DNA: a new gene-silencing tool for seed lipid modification. In: *Biochem Soc Trans*, Band 28:S. 925 – 927, 2000.
- Smith, NA, Singh, SP, Wang, MB, Stoutjesdijk, PA, Green, AG und Waterhouse, PM: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. In: *Nature*, Band 407:S. 319 – 320, 2000.
- Soll, J: Protein import into chloroplasts. In: *Curr Opin Plant Biol*, Band 5:S. 529 – 535, 2002.
- Soll, J und Schleiff, E: Protein import into chloroplasts. In: *Nat Rev Mol Cell Biol.*, Band 5:S. 198 – 208, 2004.
- Song, K und Osborn, TC: Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. In: *Genome*, Band 35:S. 992–1001, 1992.
- Sorensen, SB, Breddam, K und Svensen, I: Primary structure of carboxypeptidase i from malted barley. In: *Carlsberg Res Commun*, Band 51:S. 475, 1986.
- Sorensen, SB, Svensen, I und Breddam, K: Primary structure of carboxypeptidase ii from malted barley. In: *Carlsberg Res Commun*, Band 52:S. 285, 1987.
- Stoutjesdijk, PA, Singh, SP, Liu, Q, Hurlstone, CJ, Waterhouse, PA und Green, AG: hpRNA-mediated targeting of the Arabidopsis FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. In: *Plant Physiol*, Band 129:S. 1723 – 1731, 2002.

- Strack, D: Enzymatic synthesis of 1-sinapoylglucose by UDP-glucose:sinapic acid glycosyltransferase from cotyledons of *Raphanus sativus*. In: *Z Naturforsch*, Band 35:S. 204 – 208, 1980.
- Strack, D: Sinapine as a supply of choline for the biosynthesis of phosphatidylcholine in *Raphanus sativus* seedlings. In: *Z Naturforsch*, Band 36c:S. 215–221, 1981.
- Strack, D: Development of 1-o-sinapoyl- β -d-glucose:L-malate-sinapoyltransferase activity in cotyledons of red radish (*Raphanus sativus* l. var. *sativus*). In: *Planta*, Band 155:S. 31–36, 1982.
- Strack, D, Knogge, W und Dahlbender, B: Enzymatic synthesis of sinapin from 1-O-sinapoyl-glucose and choline by a cell-free system from developing seeds of red radish (*Raphanus sativus* l. var. *sativus*). In: *Z Naturforsch*, Band 38c:S. 21–27, 1983.
- Strack, D und Mock, HP: Hydroxycinnamic acids and lignins. In: *Methods in plant biochemistry: enzymes of secondary metabolism*, S. 45 – 97, 1993.
- Strack, D, Pieroth, M, Scharf, H und Sharma, V: Tissue distribution of phenylpropanoid metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus*. In: *Planta*, Band 164:S. 507–511, 1985.
- Sung, DY, Vierling, E und Guy, CL: Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. In: *Plant Physiol*, Band 126:S. 789 – 800, 2001.
- Thomas, TL: Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. In: *Plant Cell*, Band 5:S. 1401 – 1410, 1993.
- Tkocz, N und Strack, D: Enzymatic synthesis of sinapoyl-L-malate from 1-sinapoylglucose and L-malate by a protein preparation from *Raphanus sativus* cotyledons. In: *Z Naturforsch*, Band 35c:S. 835–837, 1980.
- Tzen, JTC, Lai, YK und Huang, AHC: Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. In: *Plant Physiol*, Band 94:S. 1282 – 1289, 1990.
- U, N: Genomic analysis of Brassica with special reference to the experimental formation of *b. napus* and peculiar mode of fertilization. In: *Jpn J Bot*, Band 7:S. 389–452, 1935.
- Udall, JA, Quijada, PA und Osborn, TC: Detection of chromosomal rearrangements derived from homologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. In: *Genetics*, Band 169:S. 967 – 979, 2004.
- van den Hazel, HB, Kielland-Brandt, MC und Winther, JR: The propeptide is required for in vivo formation of stable active yeast proteinase A and can function even when not covalently linked to the mature region. In: *J Biol Chem*, Band 268:S. 18002 – 18007, 1993.

- van Engelen, FA, Molthoff, JW, Conner, AJ, Nap, JP, Pereira, A und Stiekema, WJ: pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. In: *Transgenic Res*, Band 4:S. 288 – 290, 1995.
- Villarejo, A, Buren, S, Larsson, S, Dejardin, A, Monne, M, Rudhe, C, Karlsson, J, Jansson, S, Lerouge, P, Rolland, N, von Heijne, G, Grebe, M, Bako, L und Samuelsson, G: Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. In: *Nat Cell Biol*, Band 7:S. 1224 – 1231, 2005.
- Vogt, T, Aebershold, R und Ellis, B: Purification and characterization of sinapine synthase from seeds of *Brassica napus*. In: *Arch Biochem Biophys*, Band 300:S. 622 – 628, 1993.
- Voinnet, O, Rivas, S, Mestre, P und Baulcombe, D: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. In: *Plant J*, Band 33:S. 949 – 956, 2003.
- Wang, SX und Ellis, BE: Enzymology of UDP-glucose:sinapic acid glycosyltransferase from *Brassica napus*. In: *Phytochemistry*, Band 49:S. 307 – 318, 1998.
- Wellenreuther, R, Schupp, I, cDNA Consortium, The German, Poustka, A und Wiemann, S: SMART amplification combined with cdna size fractionation in order to obtain large full-length clones. In: *BMC Genomics*, Band 5:36, 2004.
- Wendel, JF: Genome evolution in polyploids. In: *Plant Mol Biol*, Band 42:S. 225 – 249, 2000.
- Wesley, SV, Helliwell, CA, Smith, NA, Wang, MB, Rouse, DT, Liu, Q, Gooding, PS, Singh, SP, Abbott, D, Stoutjesdijk, PA, Robinson, SP, Gleave, AP, Green, AG und Waterhouse, PM: Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. In: *Plant J*, Band 27:S. 581 – 590, 2001.
- Zum Felde, T, Baumert, A, Becker, HC und Möllers, C: Genetic variation, inheritance and development of NIRS-calibrations for sinapic acid esters in oilseed rape (*Brassica napus* L. In: *Proceedings 11th International Rapeseed Congress*, Copenhagen. 2003.

A. Anhang

Abbildung A.1.: Nukleotidsequenzen der cDNA-Klone SCP1, SCP2 und SCP3 (von oben nach unten). Das putative Stopcodon ist grau hinterlegt. Die möglichen Poly(A)-Signale nach Rothnie et al. (1994) sind wie folgt angegeben: SCP1 - AATTAA (1), ATTAAA (2), AATAAT (3) und AATAAC (4), SCP2 - AGTAAA (1), AAAAAA (2, 3, 7 und 8), AATAAT (4), AATAAC (5), ACTAAA (6) und AATAGA (9) und SCP3 - AGTAAA (1), AAAAAA (2 und 3), AATAAT (4) und AATAAC (5). Die Prozessierungsstelle ist eingerahmt.

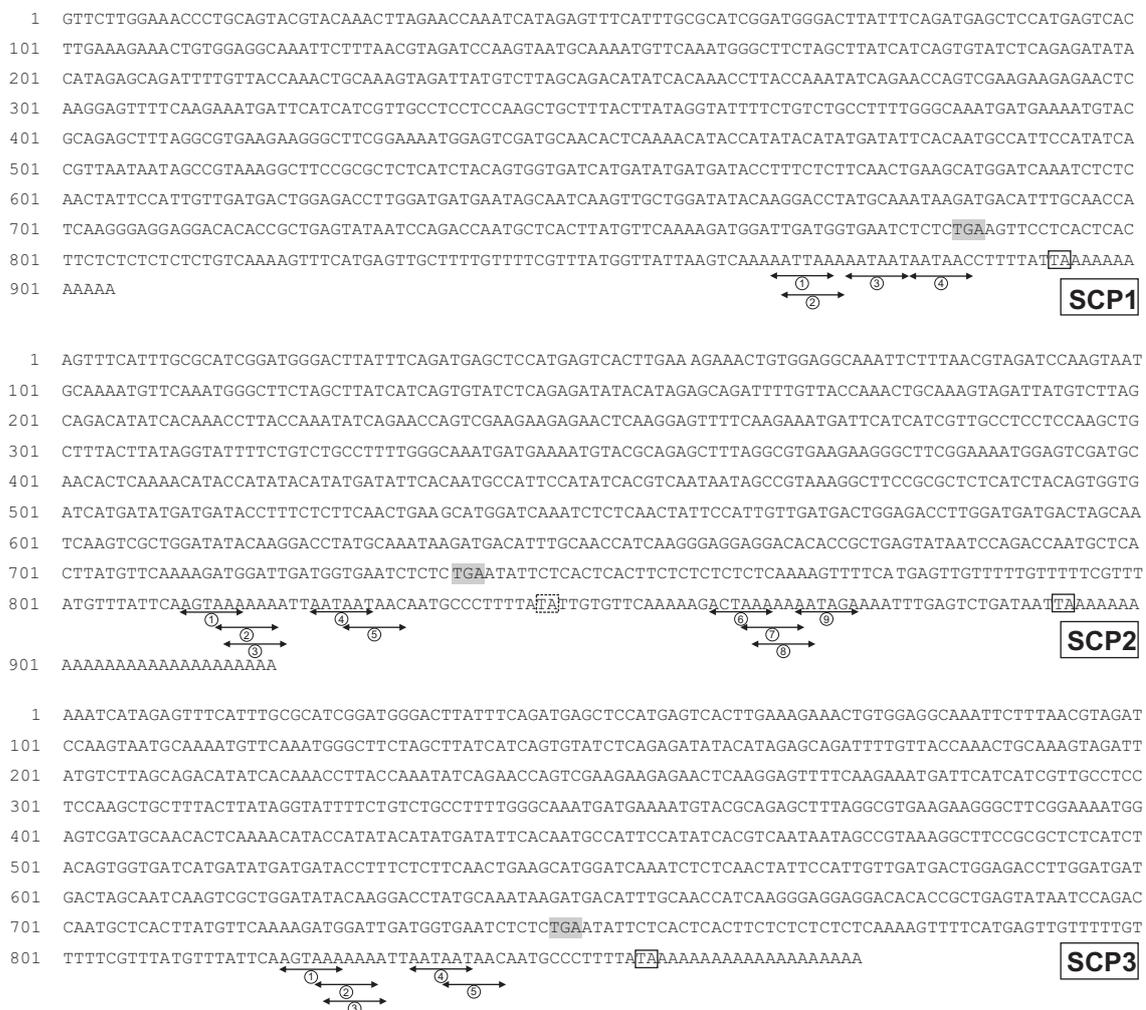


Abbildung A.2.: Sequenzvergleich der *full length BnSCT*-cDNAs. Unterschiede in der Nukleotidsequenz sind rot dargestellt.

BnSCT1	ATGAGAAATCTTTACTTTCTAGTCTTATTCCCGTTGAGCATCTTGATTTTGGTTGATGCTTTTGCATGTGAAGTATCTTCCTGGTCTTGAAGTCTCTTCCTTTTGA
BnSCT2
BnSCT3
BnSCT4G.....C.....
BnSCT1	GCTCGAGACTGGGTATGTGAGTGTGGTGAATCTGGAGATGTTGAGCTCTTTACTACTTTGTGAAATCAGAGAGCAATCCAGATAAAGATCCTCTCATGATTTGGCTAA
BnSCT2A.....
BnSCT3G.....A.....
BnSCT4A.....
BnSCT1	CTGGTGGCCTGGATGCAGCTCAATTTGCGTTACTCTTTGCAAATGGTCCTTTGGCTTTTAAAGGGATGAGTATAATGGGACACTGCCTCCTTTAGAGCTAACATCT
BnSCT2C.....T..G..C.....A.....
BnSCT3C.....C.....C.....
BnSCT4
BnSCT1	TTTTCTTGGACAAAGGTGGCTAACATTTTATATTTGGAATCTCCTGCTGGTTCTGGATATCTTATGCCAAAACCTCGGCGTGTCTGCTGAGACGAGCGACACAAAACAAAT
BnSCT2
BnSCT3
BnSCT4
BnSCT1	TCACCAATCGACCAGTTCCTTAGGAGTTGGTTTGTGGACCACCTGAGTTTATATCCAATTCATTTTACGTTGGTGAGATTCATATTCGGGAAGATTGTCCAGGAG
BnSCT2
BnSCT3
BnSCT4
BnSCT1	TTGTGCAACAGATTTCACTTGGAAATGAAAAGGCTCACACCACCTATAAATATTAAGGGATATGTTCTTGGAAACCTGCAGTACGTACAACCTAGAACCAATCAT
BnSCT2C.....
BnSCT3G.....C.....
BnSCT4
BnSCT1	AGAGTTTCAATTTGGCATCGGATGGGACTTATTTAGATGAGCTCCATGAGTCACTTGAAGAAACTGTGGAGGCAAAATCTTTAACGTAGATCCAAGTAATGCAAAATG
BnSCT2
BnSCT3
BnSCT4
BnSCT1	TTCAAATGGGCTTCTAGCTTATCATCAGTGTATCTCAGAGATATACATAGAGCAGATTTTGTACCAAACCTGCAAAGTAGATTATGTCTTAGCAGACATATCACAAACCT
BnSCT2C.....
BnSCT3G.....A.....T.....
BnSCT4
BnSCT1	TACCAAAATCAGAACAGTGAAGAAGAGAACTCAAGGAGTTTCAAGAAATGATTCATCATCGTTGCCTCCTCCAAGCTGCTTTACTTATAGGTATTTCTGTCTGCC
BnSCT2A.....
BnSCT3
BnSCT4G.....
BnSCT1	TTTTGGCAAATGATGAAATGTACGCAGAGCTTTAGCCGTGAAGAAGGCTTCGGAAAATGGAGTCGATGCAACACTCAAAACATACCATATACATATGATATTCACAA
BnSCT2
BnSCT3
BnSCT4
BnSCT1	TGCCATTCCATATCACGTTAATAATAGCCGTAAGGCTTCCGCGCTCTCATCTACAGTGGTGATGATGATGATGATACCTTTCTCTTCAACTGAAGCATGGATCAAAAT
BnSCT2C.....
BnSCT3
BnSCT4
BnSCT1	CTCTCAACTATTCATTGTTGATGACTGGAGACCTTGGATGATGAATAGCAATCAAGTTGCTGGATATACAAGGACCTATGCAAAATAGATGACATTTGCAACCATCAAG
BnSCT2C.....C.....
BnSCT3G.....C.....T.....
BnSCT4
BnSCT1	GGAGGAGGACACACCGCTGAGTATAATCCAGACCAATGCTCACTTATGTTCAAAGATGGATTGATGGTGAATCTCTCTGA
BnSCT2T.....
BnSCT3A.....
BnSCT4

Abbildung A.3.: Genomische Sequenz von *BnSCT1* aus *B. napus* (AY383719). Die Sequenz (2875 bp) enthält 14 Exons (rot hinterlegt). Diese umfassen eine codierende Sequenz von 1401 bp (1-122; 224-369; 737-813; 912-1034; 1117-1219; 1312-1349; 1435-1536; 1632-1718; 1812-1979; 2036-2134; 2214-2332; 2452-2568; 2660-2705; 2795-2875).

```

1  ATGAGAAATC TTTACTTTCT AGTCTTATTT CCGTTGAGCA TCTTGATTTT GTTTGATGCT TCTTTGCATG TGAAGTATCT TCCTGGTCTT GAAGTCTCTC
101 TTCCTTTTGA GCTCGAGACT GGGTAAAACA AAGTCCATCT CTTGCTCCA ATTTGTTATA AAAAAATCCT TAATCTAAGA CATGTCTCTT TCTTCTTTCG
201 TGCATGTGGT TTTATATAAC AAGGTATGTG AGTGTGGTG AATCTGGAGA TGTGAGCTC TTTTACTACT TTGTGAAATC AGAGAGCAAT CCAGATAAAG
301 ATCCTCTCAT GATTGGGCTA ACTGGTGGGC CTGGATGCAG CTCAAATTTG GGTTTACTCT TTGCAAATGG TAAACAAATC TTTTTTTTTT GAATTTATGT
401 TATTTAATGA GTCCTAACTA ACTAGTTTTA CTTAGGGATC CCATCTTGAA AATTATATTT TAAGGCTTAA TTAACACAT CTAAATGATA TGCATGTCTT
501 CAGTATTAAG TAGTTAATT GCATGTATGG TGTGATTCTC TTATGTTGTA AGGTTAAGA CAAGTGATT TGTGATGCTT GTTCTGTAAA AAATAGTTTA
601 GTTGCATGTG TTGTGTGATT TTTATAATGT TTGGAGGGTG AAGACAAGTC TAATTAATGC ATGTGTTCTG TGCTAAATAA TTTAGTTTAT GCATGTGTGG
701 TGTGATTTGT TTATTAATTT TAAATGTTTT TGTGAGTCC TTTGGCTTTT AAAGGGGATG AGTATAATGG GACTCTGCCT CCTTTAGAGC TAACATCTTT
801 TTCTTGAGCA AAGGCGAGAG ATTAGTTACC AATTTTATAA TGCTTCTCCT TGTAATACCA ACATCTTGCT TCTAAAGAGA ATGTGTAATA TGTATACTCA
901 ATTTTTTTC AAGTGGTAACT ATTTTATATT TGGAATCTCC TGCTGGTCTT GGATATTTCT ATGCCAAAAC TCGGCGTGTCT GCTGAGACGA GCGACACCAA
1001 ACAAATTCAC CAAATCGACC AGTTCCTTAG GAGTGTGAG TGTCTCTCTC TTCCTTATACC TTCCTTGATG ATTTTGGTTT ACTTCTTAAA ACTTTTCACT
1101 ATGTTGTTGC TTGTAGTGGT TTGTGGACCA CCCTGAGTTT ATATCCAATT CATTTTACGT TGGTGGAGAT TCATATTCGG GGAAGATGTT TCCAGGAGTT
1201 GTGCAACAGA TTTCACTTGG TATTTTAACT TTACCACTCA CTTATGCCTC TATGGTAGTT TCTTATATTT TATATCAAAT ATTTTAAATCA CATTACACAA
1301 TATCAAAAACA GAAATGAAA AAGGTCTCAC ACCACTCATA AATATTAAGG TAGCAAAACT TTAATCTCTC CTTTTTGGC TGAATACCAA TATATTTTGG
1401 ATGAGATTTA ATATAATTTA TATAAACTGA GCAGGGATAT GTTCTTGAAA ACCCTGCAGT ACGTACAAAC TTAGAACCAA ATCATAGAGT TTCATTTGCG
1501 CATCGGATGG GACTTATTTT AGATGAGCTC CATGAGGTAT ATATTTTTTT TCTTCATCAT CACCATCATC ATTATAATGA AATCTTGAG ACATTTGGTT
1601 ACAATCTTGT TTACATCACT ACTATATGCA GTCACCTGAA AGAAACTGTG GAGGCAAAAT CTTTAACTGA GATCCAAGTA ATGCAAAATG TTCAAATGGG
1701 CTTCTAGCTT ATCATCAGGT AAGGGATTAT AACTAAAAAA AAAAAACACC ACATGGGTAT CTGCATGCAAT TTCACAAAAC TAAGTTGCTT CTTTGTTTTT
1801 TGAGTCTTCA GTGTATCTCA GAGATATACA TAGAGCAGAT TTTGTTACCA AACTGCAAAG TAGATTATGT CTTAGCAGAC ATATCACAAA CCTTACAAA
1901 TATCAGAACC AGTCGAAGAA GAGAACTCAA GGAGTTTTCA AGAAATGATT CATCATCGTT GCCTCCTCCA AGCTGCTTTG TATTAATTTT CTTTTCTTTT
2001 CATTTTTGGT TATATTGTAT ATTCATAGCT TTGTGATTTT TTAACACTTA CTGTATTCTC AGACTTATAG GTATTTTCTG TCTGCCTTTT GGGCAAATGA
2101 TGAAAATGTA CGCAGAGCTT TAGGCGTGAA GAAGGTACCT ATGTGAACTT TGTTCCTTGT TCTAAATAAA AACTTAACAC AACGTTACCA ATTAATGTT
2201 AAATATTATG TAGGCTTTCG GAAAATGGAG TCGATGCAAC ACTCAAACA TACCATATAC ATATGATATT CACAATGCCA TTCCATATCA CGTTAATAAT
2301 AGCCGTAAG GCTTCCGCGC TCTCATCTAC AGCAAGATT ATACTTTATT CTTTTCTTTT TTTTGTGTTG ACTCGCAAAAT ATTAGTTAAA TGTATTCTT
2401 TGTGCATCTT GATCAAGTCA CAAGTTAAAT ATTTGCAAAAT TTTGGGAACA GTGGTGATCA TGATATGATG ATACCTTTCT CTTCAACTGA AGCATGGATC
2501 AAATCTCTCA ACTATTCCAT TGTTGATGAC TGGAGACCTT GGATGATGAA TAGCAATCAA GTTGCTGGGT AAAGCCAAAAG CCAAAAACAT CTGTTTCTAA
2601 CTCCAATCTA TCAACGTTCT AAATGATCTT TAAACACACC CAAATGTAT GTTTGTAGA TATACAAGGA CCTATGCAAA TAAGATGACA TTTGCAACCA
2701 TCAAGGCAAG AAGTTCTAAG CCCTTCTCTT CTTTCTTCTC TAGAGTTTCT ACTGGCAGAA TTAATAATGA TATAGAGGAG TTTGATTTGT GTAGGGAGGA
2801 GGACACACCG CTGAGTATAA TCCAGACCAA TGCTCACTTA TGTTCAAAG ATGGATTGAT GGTGAATCTC TCTGA

```

Abbildung A.4.: Genomische Sequenz von *BnSCT2* aus *B. napus*. Die Sequenz (2864 bp) enthält 14 Exons (rot hinterlegt). Diese umfassen eine codierende Sequenz von 1401 bp (1-122; 224-369; 737-813; 914-1036; 1119-1221; 1314-1351; 1438-1539; 1634-1720; 1810-1977; 2061-2132; 2212-2330; 2442-2558; 2656-2701; 2784-2864).

```

1  ATGAGAAATC TTTACTTTCT AGTCTTATTT CCGTTGAGCA TCTTGATTTT GTTTGATGCT TCTTTGCATG TGAAGTATCT TCCTGGTCTT GAAGTCCTC
101 TTCCTTTTGA GCTCGAGACT GGGTAAAACA AAGTCCATCT CTTCACTCCA ATTTGTTATA AAAAAATCCT TAATCTAAGA CATGTCTCTT TCTTCTTTC
201 TGCATGTGGT TTTATATAAC AAGGTATGTG AGTGTGGTG AATCTGGAGA TGTGAGCTC TTTTACTACT TTGTGAAATC AGAGAGAAAT CCAGATAAAG
301 ATCCTCTCAT GATTGGGCTA ACTGGTGGGC CTGGATGCAG CTCATTGTG GGTTCCTGTG TTGCAAATGG TAACAAATCC TTTTTTTTTG GGATTTATTG
401 TATTTACCGA GTCCTAACTA ACTAGTTTTA CTTAGGGATC CCATCTTGAA AATTATATTT TAAGGCTTAA TTAACAACAA CTAAATGATA TGCATGTCTT
501 CAGTATTAAG TAGTTAATT GCATGTATGG TGTGATTCTC TTATGTTGTA AGGGTTAAGA CAAGTGAAT TAATGCATGT GTTCTGTAAA AAATAGTTTA
601 GTTGACATAG TTGTGTGATT TTTATAATGT TTGGAGGGTT AAGACAAGTC TAATTAATGC ATGTGTTCTG TGCTAAATAA TTTAGTTTAT GCATGTGTTG
701 TGTGATTTTT TAATTAATTT TAAATGTTTT TGTGAGTCC TTTGGCTTTT AAAGGGAATG AGTATAATGG GACACTGCCT CCTTAGAGC TAACATCTTT
801 TTCTGGACA AAGGCGAGAG ATTAGTTACT AATTTTATAA TGCTTCTCCT TGTAATACCA ACATCTTGCT TCTAAAGAGA ATGTGTAATA TGTATACTCA
901 ATTTTTTTTT CAGGTGGCTA ACATTTTATA TTTGGAATCT CCGTGTGGTT CTGGATATTC TTATGCCAAA ACTCGGCGTG CTGCTGAGAC GAGCGACACC
1001 AAACAAATTC ACCAAATCGA CCAGTTCCTT AGGAGTGTG AGTGTCTCTC CTTTCTTATA CCITTCCTGA TGATTTTGGT TTTTCTTCTA AAACITTTCA
1101 CTATGTGGTT GCTTGTAGTG GTTTGTGGAC CACCCGTAGT TTATATCCAA TTCATTTTAC GTTGGTGGAG ATTCATATTC CCGGAAGATT GTTCCAGGAG
1201 TTGTGCAACA GATTTCACTT GGTATTTTTA ACTTACCACT CACTTATGCC TCTATGGTAG TTTCTTATAT TTTATATCAA ATGTTTTAAT CACATTACAC
1301 AATATCAAAA CAGGAAATGA AAAAGGTCTC ACACCACTCA TAAATATTCA GGTAACAAAA CTTTAATCTC TCCCTTTTTG GCTTAATACC AATATATTTT
1401 TGATGAGAT TTAATATAAT TTATATAAAC TGAGCAGGGA TATGTTCTTG GAAACCTGAC AGTACGTACA AACTTAGAAC CAAATCATAG AGTTTCATTT
1501 GCGCATCGGA TGGGACTTAT TTCAGATGAG CTCATGAGG TATATACTTT TTTCTTCATC ATCACCATCA TCATTATAAT GAAATCTTG AGACATTTGG
1601 TTACAATCTT GTTTACATCA CTAATATATG CAGTCACTTG AAAGAACTG TGGAGGCAAA TTCTTTAACG TAGATCCAAG TAATGCAAAA TGTTCAAATG
1701 GGCTTCTAGC TTATCATCAG GTAAGGGATT ATAACATAAA AAAACACCAC ATGGGTATCT ACATGCATTT TCACAAACTA ACTTGTCTCT TTGTTTTTTG
1801 AGTCCCTCAGT GTATCTCAGA GATATACATA GAGCAGATTT TGTTACAAA CTGCAAAGTA GATTATGCT TAGCAGACAT ATCACAAACC TTACCAATAA
1901 TCAGAACAGC TCGAAGAAGA GAACTCAAGG AGTTTTCAAG AAATGATCCA TCATCGTTGC CTCCTCCAAG CTGCTTTGTA TTAATCTCTT TTTCTTTTCA
2001 TTTTTGGTTA TATTGTATAT TCATAGGTTT GTGATTTTTT AACACTTACT GTATTCTCAG ACTTATAGGT ATTTTCTGTC TGCCTTTTGG GCAATGATG
2101 AAAATGTACG CAGAGCTTTA GCGTGAAGA AGGTACCTAT GTGAACCTTG TTTCTTGTTT TAAATAAAAA CTTAACACAA CGTTACCAAT TAAATGTTAA
2201 ATGTTATGTA GGGCTTCGGA AAATGGAGTC GATGCAACAC TCAAAACATA CCATATACAT ATGATATTCA CAATGCCATT CCATATCAGC TCAATAATAG
2301 CCGTAAAGGC TTCCGCGCTC TCATCTACAG GCAAGATAAT ACTTCATTCT TTTTTTTTTG AGTCACAAAT ATTAGTTAAA TGTATTCTT TCTGCATCTT
2401 GATCAAGTCA CAAGATAAAT ATTTGCAAAAT TTTGGGAACA GTGGTATGTA TGATATGATG ATACCTTCTT CTTCACCTGA AGCATGGATC AAATCTCTCA
2501 ACTATTCAT TGTGTATGAC TGGAGACCTT GGATGATGAC TAGCAATCAA GTCGCTGGGT AAAGCCAAAG CCAAAAACAT CTGTTTCTAA CTCCAATCTC
2601 ATCAACTTTC TAAATGATCT TTAACACAC TTAATTTGTA TCCCTTGTG TGTAGATATA CAAGGACCTA TGCAATAAAG ATGACATTTG CAACCATCAA
2701 GGCAACAAAT TCTAAACCTT TTCTGTCTTC TCTAGAGTTT CTGCTGGCAG AATTAAAAAT GATATAGTGT TTGATATGTG TAGGGAGGAG GACACACCCG
2801 TGAGTATAAT CCAGACCAAT GCTCACTTAT GTTCAAAAGA TGGATTGATG GTGAATCTCT CTGA

```

Abbildung A.5.: Genomische Sequenz von *BoSCT* aus *B. oleracea*. Die Sequenz (2861 bp) enthält 14 Exons (rot hinterlegt). Diese umfassen eine codierende Sequenz von 1401 bp (1-122; 224-369; 737-813; 912-1034; 1117-1219; 1312-1349; 1435-1536; 1632-1718; 1812-1979; 2036-2134; 2214-2332; 2452-2568; 2660-2705; 2795-2875).

```

1  ATGAGAAATC TTTACTTTCT AGTCTTATTT CCGTTGAGCA TCTTGATTTT GGTGATGCT TCTTTGCATG TGAAGTATCT TCCTGGTCTT GAAGTCTCTC
101 TTCCTTTTGA GCTCGAGACT GGGTAAAACA AAGTCCATCT CTTGCTCCA ATTTGTTATA AAAAAATCCT TAATCTAAGA CATGTCTCTT TCTTCTTTCG
201 TGCATGTGGT TTTATATAAC AAGGTATGTG AGTGTGGTG AATCTGGAGA TGTGAGCTC TTTTACTACT TTGTGAAATC AGAGAGAAAT CCAGATAAAG
301 ATCCTCTCAT GATTTGGCTA ACTGGTGGGC CTGGATGCAG CTCATTTTGT GGTTTACTCT TTGCAAATGG TAAACAAATC TTTTTTTTTT GAATTTATGT
401 TATTTAATGA GTCCTAACTA ACTAGTTTTA CTTAGGATC CCATCTTGAA AATTATATTT TAAGGCTTAA TTAACACAT CTAAATGATA TGCATGTCTT
501 CAGTATTAAG TAGTTAATT GCATGTATGG TGTGATTCTC TTATGTTGTA AGGGTTAAGA CAAGTGATTT TGATGCATGT GTTCTGTAAA AAATAGTTTA
601 GTTGCATGTG TTGTGTGATT TTTATAATGT TTGGAGGGTG AAGACAAGTC TAATTAATGC ATGTGTTCTG TGCTAAAATA TTTAGTTTAT GCATGTGTGG
701 TGTGATTTGT TTATTAATTT TAAATGTTTT TGTGAGTCC CTTGGCTTTT AAAGGGGATG AGTATAATGG GACTCTGCCT CCTTTAGAGC TAACATCTTT
801 TTCTTGGACA AAGGCGAGAG ATTAGTTACC AATTTTATAA TGCTTCTCCT TGTAATACCA ACATCTTGCT TCTAAAGAGA ATGTGTAATA TGTATACTCA
901 ATTTTTTTC AAGTGGTAACT ATTTTATATT TGGAACTCC TGCTGGTCTT GGATATTCTT ATGCCAAAAC TCGGCGTGCT GCTGAGACGA GCGACACCAA
1001 ACAAAATCAC CAAATCGACC AGTTCCTTAG GAGTGTGAG TGTCTCTCTT TTCCTTATACC TTCTTGATG ATTTTGGTTT ACTTCTTAAA ACTTTTCACT
1101 ATGTTGTTGC TTGTAGTGGT TTGTGGACCA CCCTGAGTTT ATATCCAATT CATTTTACGT TGGTGGAGAT TCATATTCGG GGAAGATGTT TCCAGGAGTT
1201 GTGCAACAGA TTTCACTTGG TATTTTAACT TTACCACTCA CTTATGCCTC TATGGTAGTT TCTTATATTT TACATCAAAT ATTTTAAATCA CATTACACAA
1301 TATCAAAAACA GAAATGAAA AAGGTCTCGC ACCACTCATA AATATTCAGG TAGCAAAACT TTAATCTCTC CTTTTTTGGC TGAATACCAA TATATTTTGG
1401 ATGAGATTTA ATATAATTTA TATAAACTGA GCAGGATAT GTTCTTGAAA ACCCTGCAGT ACGTACAAAC TTAGAACCAA ATCATAGAGT TTCATTTGCG
1501 CATCGGATGG GACTTATTTT AGATGAGCTC CATGAGGTAT ATATTTTTTT TCTTCATCAT CACCATCATC ATTATAATGA AATCTTGAG ACATTTGGTT
1601 ACAATCTTGT TTACATCACT ACTATATGCA GTCACCTGAA AGAAACTGTG GAGGCAAAAT CTTTAAACGTA GATCCAAGTA ATGCAAAATG TTCAAATGGG
1701 CTTCTAGCTT ATCATCGGGT AAGGGATTAT AACTAAAAAA AAAAAACACC ACATGGGTAT CTGCATGCAT TTTCAAAAAC TAACCTGTCT CTTTGTTTTT
1801 TGAGTCTTCA GTGTATCTCA GAGATATACA TAGAGCAGAT TTTGTTACCA AACTGCAAAG TAGATTATGT CTTATCAGAC ATATCACAAA CCTTACAAA
1901 TATCAGAACC AGTCGAAGAA GAGAACTCAA GGAGTTTTCA AGAAATGATT CATCATCGTT GCCTCCTCCT AGCTGCTTTG TATTAATTTT CTTTTCTTTT
2001 CATTTTTGGT TATATTGTAT ATTCATAGCT TTGTGATTTT TTAACACTTA CTGTATTCTC AGACTTATAG GTATTTTCTG TCTGCCTTTT GGGCAAATGA
2101 TGAAAATGTA CGCAGAGCTT TAGGCGTGAA GAAGGTACCT ATGTGAACTT TGTTCCTTGT TCTAAAATAA AACTTAACAC AACGTTACCA ATTAATGTT
2201 AAATATTATG TAGGGCTTCG GAAAATGGAG TCGATGCAAC ACTCAAACA TACCATATAC ATATGATATT CACAATGCCA TTCCATATCA CGTTAATAAT
2301 AGCCGTAAAG GCTTCCGCGC TCTCATCTAC AGCAAGATT ATACTTTATT CTTTTCTTTT TTTTGTTTTG ACTCGCAAAT ATTAGTTAAA TGTATTCTT
2401 TGTGCATCTT GATCAAGTCA CAAGTTAAAT ATTTGCAAAT TTTGGGAACA GTGGTGATCA TGATATGATG ATACCTTTCT CTTCAACTGA AGCATGGATC
2501 AAATCTCTCA ACTATTCAT TGTGATGAC TGGAGACCTT GGATGATGAG TAGCAATCAA GTCGCTGGGT AAAGCCAAAG CCAAAAACAT CTGTTTCTAA
2601 CTCCAATCTA TCAACGTCTT AAATGATCTT TAAACACACC CAAATGTAT GTTTGTAGA TATACAAGGA CTTATGCAA TAAGATGACA TTTGCAACA
2701 TCAAGGCAAG AAGTTCTAAG CCCTTCTCTT CTTTCTTCTC TAGAGTTTCT ACTGGCAGAA TTAATAATGA TATAGAGGAG TTTGATTTGT GTAGGGAGGA
2801 GGACACACAG CTGAGTATA TCCAGACCAA TGCTCACTTA TGTTCAAAA ATGGATTGAT GGTGAATCTC TCTGA

```

Abbildung A.6.: Genomische Sequenz von *BrSCT* aus *B. rapa*. Die Sequenz (2864 bp) enthält 14 Exons (rot hinterlegt). Diese umfassen eine codierende Sequenz von 1401 bp (1-122; 224-369; 737-813; 914-1036; 1119-1221; 1314-1351; 1438-1539; 1634-1720; 1810-1974; 2058-2129; 2209-2327; 2439-2555; 2653-2698; 2781-2861).

```

1  ATGAGAAATC TTTACTTTCT AGTCTTATTT CCGTTGAGCA TCTTGATTTT GTTTGATGCT TCTTTGCATG TGAAGTATCT TCCTGGTCTT GAAGTCCTC
101 TTCCTTTTGA GCTCGAGACT GGGTAAAACA AAGTCCATCT CTTCACTCCA ATTTGTTATA AAAAAATCCT TAATCTAAGA CATGTCTCTT TCTTCTTTC
201 TGCATGTGGT TTTATATAAC AAGGTATGTG AGTGTGGTG AATCTGGAGA TGTGAGCTC TTTTACTACT TTGTGAAATC AGAGAGAAAT CCAGATAAAG
301 ATCCTCTCAT GATTGGGCTA ACTGGTGGGC CTGGATGCAG CTCCATTTGT GGTTCCTGT TTGCAAATGG TAACAAATCC TTTTTTTTGG GGATTTATTG
401 TATTTACCGA GTCCTAACTA ACTAGTTTTA CTTAGGGATC CCATCTTGAA AATTATATTT TAAGGCTTAA TTAACAACAA CTAATTGATA TGCATGTCTT
501 CAGTATTAAG TAGTTAATT GCATGTATGG TGTGATTCTC TTATGTTGTA AGGGTTAAGA CAAGTGAAT TAATGCATGT GTTCTGTAAA AAATAGTTTA
601 GTTGACATAG TTGTGTGATT TTTATAATGT TTGGAGGGTT AAGACAAGTC TAATTAATGC ATGTGTTCTG TGCTAAATAA TTTAGTTTAT GCATGTGTTG
701 TGTGATTTTT TAATTAATTT TAAATGTTTT TGTCAAGTCC TTTGGCTTTT AAAGGGAATG AGTATAATGG GACACTGCCT CCTTTAGAGC TAACATCTTT
801 TTCTGGGACA AAGGCGAGAG ATTAGTTACT AATTTTATAA TGCTTTCCTC TGTAATACCA ACATCTTGCT TCTAAAGAGA ATGTGTAATA TGTATACTCA
901 ATTTTTTTTT CAGGTGGCTA ACATTTTATA TTTGGAATCT CCTGCTGGTT CTGGATATTC TTATGCCAAA ACTCGGCGTG CTGCTGAGAC GAGCGACACC
1001 AAACAAATTC ACCAAATCGA CCAGTTCCTT AGGAGTGTG AGTGTCTCTC CTTTCTTATA CCITTCCTGA TGATTTTGGT TTTTTTTCTA AAACITTTTC
1101 CTATGTGTTG CTTGTAGTG GTTTGTGGAC CACCCGTAGT TTATATCCAA TTCATTTTAC GTTGGTGGAG ATTCATATTC CGGGAAGATT GTTCCAGGAG
1201 TTGTGCAACA GATTTCACTT GGTATTTTTA ACTTACCACT CACTTATGCC TCTATGGTAG TTTCTTATAT TTTATATCAA ATGTTTTAAT CACATTACAC
1301 AATATCAAAA CAGGAAATGA AAAAGGTCTC ACACCACTCA TAAATATTCA GGTAACAAAA CTTTAATCTC TCCTTTTTTG GCTTAATACC AATATATTTT
1401 TGATGAGAT TTAATATAAT TTATATAAAC TGAGCAGGGA TATGTTCTTG GAAACCTGC AGTACGTACA AACTTAGAAC CAAATCATAG AGTTTCATTT
1501 GCGCATCGGA TGGGACTTAT TTCAGATGAG CTCCATGAGG TATATACTTT TTTCTTCATC ATCACCATCA TCATTATAAT GAAATCTTG AGACATTTGG
1601 TTACAATCTT GTTTACATCA CTAATATATG CAGTCACTTG AAAGAAACTG TGGAGGCAAA TTCTTTAAGC TAGATCCAAG TAATGCAAAA TGTTCAAATG
1701 GGCTTCTAGC TTATCATCAG GTAAGGGATT ATAACATAAA AAAACACCAC ATGGGTATCT ACATGCATTT TCACAAACTA ACTTGTCTCT TTGTTTTTTG
1801 AGTCCTTAGT GTATCTCAGA GATATACATA GAGCAGATTT TGTACCAAAA CTGCAAAGTA GATTATGCT TAGCAGACAT ATCACAACCC TTACCAATAA
1901 TCAGAACCGA TCGAAGAAGA GAACTCAAGG AGTCAAGAAA TGATTCATCA TCGTTGCCCT CTCCAAGCTG CTTTGTATTA ATTCTCTTTT CTTTTCATTT
2001 TTGGTTATAT TGTTTATTCA TAGGTTTGTG ATTTTTTAAC ACTTACTGTA TTCTCAGACG TATAGGTATT TTCTGTCTCG CTTTTGGGCA AATGATGAAA
2101 ATGTACGCAG AGCTTTAGGC GTGAAGAAGG TACCTATGTG AACTTTGTTT CTTGTTCTAA ATAAAAACTT AACACAACGT TACCAGTTAT ATGTTAAATG
2201 TTATGTAGGG CTTTCGAAAA TGGAGTCGAT GCAACACTCA AAACATACCA TATACATATG ATATTCACAA TGCCATTCCT TATCAGCTCA ATAATAGCCG
2301 TAAAGCTTTC CCGCTCTCA TCTACAGGCA AGATAAFACT TCATCTTTT TTTTTTGAGT CACAAATATT AGTTAAATGT TATCTTTCT GCATCTTGAT
2401 CAAGTCACAA GATAAATATT TGCAAAATTT GGGAACAGTG GTGATCATGA TATGATGATA CTTTCTCTT CAACTGAAGC ATGGATCAAA TCTCTCAACT
2501 ATTCCATTGT TGATGACTGG AGACCTTGGG TGATGACTAG CAATCAAGTC GCTGGGTAAA GCCAAAGCCA AAAACATCTG TTTCTAACTC CAATCTCATC
2601 AACTTTCTAA ATGATCTTTA AACACACTTA AATTGTATCC CTTGTTTTGT AGATATACAA GGACCTATGC AAATAAGATG ACATTTGCAA CCATCAAGGC
2701 AACAAATCTT AAACCCCTTC TGTCTTCTCT AGAGTTTCTG CTGGTAGAAT TAAAAATGAT TTAGTGTGTT ATATGTGTAG GGAGGAGGAC ACACCCGTGA
2801 GTATAATCCA GACCAATGCT CACTTATGTT CAAAAGATGG ATTGATGGTG AATCTCTCTG A

```

In den Abbildungen A.7 bis A.10 sind die Nukleotidsequenzen der genomischen 5'-Regionen aufgeführt. Sequenzidentitäten sind farbig markiert. Grün: *mtHSC70-2* (NM120996), Gelb: *SDH3* (NM120997), Rot: *SCT*.

Abbildung A.7.: Nukleotidsequenz von 5'*BnSCT1* (2036 bp) aus *B. napus*. 1-380: *mtHSC70-2*, 843-954 und 1029-1081: *SDH3*, 1981-2036 *BnSCT1* (AY383719).

```

1  CGACGGCCCG GGCTGGTATC CAGAAGATGG TGAGAGACGC GGCCTTGCCAC GCTCAGAAAG ACAAGGAAAG GAAAGACTTG ATCGACACCA AGAACACGGC
101 TGACACAACG ATTTACAGCA TAGAGAAGAG CTTGGGTGAG TACAGAGAGA AGATCCCTGG TGAAGTCGCC AAGGAGATTG AAGATGCTGT GCGGGATCTA
201 AGGAGCGCTT CCGCTGGAGA TGATGTTAAT GAGATTAAGG CTAAGATCGA TCGGCGGAAC AAAGCTGTTT CGAAGATAGG AGAGCACATG TCTGGTGGAG
301 GTTCTGCACC AGGAGGAGGA GCTCAGGGAG GAGGGAGTGA TCAAACCTCG GAGGCTGACT ACGAGGAAGT GAAGAAGTGA AGAGTGTTTA TTGTTTCTGG
401 TCAGTTGGGT TAAGAAGTTA GGTGGTTAGA CCATGGTTGG TTTTCATGCC TAGAAGCTTT TGCCATAAAA ACAGCGGACA GGGGATCTGT TTCTGGAATA
501 GGTTTTTTCT TTGTTGGTAA CGAAGCTTAA TGTTCTTGT TCTGCTATAA ACCCTTTTGT TATAAAAAGAG AGACGTTTCA AAATTCCTTC TCACTGCACC
601 AAATCATGTA AATTAACCGT TGAGGAGGGA GAAAGAACAT TTCTAGAAAT AATCTTAAGA TTGTTAGCAT TTTTCTTGT AATTGAAGAA AGTTGCAGTT
701 GAATTTGATG GAAAAACCGT TGGACTGAAG AAGAGAGCTC CATTCACTT TTTTTTTTTG TTTGGGCGCT TAATAAGAA CAATCACTAG GGTCTTCTTT
801 TAATTATTGA ATCTAGGCAT GGAACGTGTT TGCTTTTGT ATCTGCTCTT GAAACGTTCT TGTTCGCAGC TTGCTGGTAA TGCTCAACCT TCATGGAGTA
901 GTTCACACAC TGCTCAAAAC TATGCAAGTT TCTTCAAAGC TTTCGGGTAT GTTTCCTTTC TTCCATGGGA TGCAAAAACG TATAGTCACA CTTTGTAGTT
1001 GTGCTTTTGA CTATGTGTAT CTGTTTCC TT ATAGATCGAA ACCTGGTGTG AATGACATTG TTGGAACCGG TTGGGAACTT ACCAACACAA GCAATGCTCT
1101 TAGAGAGGCA AAAGAGTAAT AAAAGAGAGG AGAAAAGTTT TGTCAAACCT TCATTGTCTT TGAGAAAAGTA AGATCTAACC TTTTTTTTTT TTTTTTTTGG
1201 GATGTTAGGC TTTTGAAGGC TATGTTTTTT TTGCTTTCTT TTCTTTGTTT TTAGATCATG TCGAAGGTGT TGAATGTTG GATGTAATAA ATGTTATTAC
1301 TCAGTCTGTA CGTTTAACTC TTCTCTTACA AGTGTGCTTC ATGAGATTTA TGTAAAATCC ATCTTTCCTT GTAGCAATCT TATCCATTTT CTTCTGATTA
1401 ATCTGCAACG TGCAATTAGT TTGATCAAAC AATATTAGAC ATGGGGTAAA AGGAGAAAACA GAGTTGCTTA TGTGACTGT GAGGAAGATC TATCAAACAC
1501 TCTGAGTGC TGACAGGGTT TGCTTTAATA GATAAATATT AGTAGAATGA TTGTGTTTGT CTTCTTAATC ACAGAGTATT GTACAAGAGA TTAAGTTTGT
1601 AATAAAATGA CGGTTATGCT CGTGAGAGAA TCGTGCCTTA CGATGAGGAC GAATTGTAAT TTGATTGTTA TCAGGTTGTT AAAAGGTGAG ACAAACGAGA
1701 AAAAAACGAA GAACAGACTA AACAGTGTAT ATACGTTTCA CATTGGTTTG GTTGTGGAGC CTTGAAGTTC CTCTATTCAA CCGGTCCAAC CCGTCCGGTT
1801 AACAAAACAC TGAAGTAGCC GCCAACACGC TTATTACGTA AACGGTAGCC ACGTTTCGAG CACTGCGTTT GCTAATTTGT CTCTACTCAA ATTCGAGCTC
1901 TTCTTTCTTC GCTTTTGGGC TCAAGCTTCG TTGAGCTACT GTTTCGCATG CAAGGCTAGT GACACCAAGA AGCGGAGAAA ATGAGAAATC TTTACTTTCT
2001 AGTCTTATTT CCGTTGAGCA TCTTGATTTT GGTGTA

```

Abbildung A.8.: 5'-Region von *BrSCT* (1289 bp) aus *B. rapa*. 1-42: *mtHSC70-2*, 101-207 und 288-340: *SDH3*, 1234-1289: *BrSCT*).

```

1  GGCGTTGCAC GCTCAGAAAG ACAAGAAAG AAAGGACTTG AAACCTAGGGT CTTCTTTTAA TTATTGAATC TAGGCATGGA ACGTGTGTTG TTTTTGTTAT
101 CTGCTCTTGA AACGTTCTTG TTCGCAGCTC GCTGGAATG CTC AACCTTC ATGAGTAGT TCACACACTG CTC AAAACTA TGCGAGTTTC TTC AAAGCTT
201 TCGGGTATGT ATCCTTTCTT CCATGGGATG CAAAAACGT ATAGTCACAC TTTGTAGTTG TGCTTTTGAC TATGTGTATC TGTTCCTTTA TAGATCGTGA
301 CTTGGTGTGA ATGACATTGT TGGACCCGGT TTGGGAACTA CCAACACAAG CAATGCTCTT AGAGAGAGAA AAGAGTAATA AAAGAGAGGA GAAAAGTTTT
401 GTCAAACTCT CATTGTCTTT GAGAAAGTAA GATCTAATC TTTTTTTTTT TTTTTTGGGA TGTTAGGCTT TTGAAGGCTA TGTTTTTTTT TTGCTTTCTT
501 TTCTTTGTTT TTAGATCATG TCGAAGGTGT TGAAGTGTG GACGTAATAA ATGTTATTAC TCAGCTGCTA CGTTTAACTC TTCTCTTACA AGTGTGCTTC
601 ATGAGATTTA TGTA AAAATC CGCAATCTTA TCCATTTTCT TCTGATTAAT CTGCAACGTG CAATTAGTTT GATCAAATAA TATTAGAGAT GGGGTA AAAAG
701 GAGAAACAGA GTTGCTTATG TTGACTTGGG GGAAGATTTA TCAAACACTC TGAGCTGCTG AGAGGGTTTG CTTTAAATAA TATAAGTAGA ATGATTGTGT
801 TTGTCTTCTT ATAATGACAG AGTATTGTAC AAGAGATTAA GGTTTGAACG TTGTA AAAATG ACGGTTATGC TCGTGAGAGA ATCGTCCCTT GCGATAAGGA
901 CGAATTGTAA TTTGGTTGTT ATCAGTTGTG TGAAGATGA GACAAACGAG AAAAAACAA AGAACAGACT AAACAGGTGT TACGTTTCAC ATTGGTTTGG
1001 TTGTGGAGCC TTGAAGTTCC TCTATTTAAC CGGTCCAACC GGTCCGGTTG ACAAACCTCT GAAAAGGCG CCAACACGCT TGTTACGTAA ACGGTAGCCA
1101 CGTTTTGAGC ACTGCATGTG CTAATTTGTC TTCACTGAAA TTCCAGTCT TCTTTCTTCG CACTTGGGCT TAAGCTTCGT GGAACATAAT AATGATTCCG
1201 ATGCAAGGCT AGTGACACCA AGAAGCAGAG AAAATGAGAA ATCTTTACTT TCTAGTCTTA TTTCCGTTGA GCATCTTGAT TTTGGTTGA

```

Abbildung A.9.: Nukleotidsequenz von 5'BoSCT1 (1997 bp) aus *B. oleracea*). 1-340: *mtHSC70-2*, 803-914 und 989-1041: *SDH3*, 1942-1997: *BoSCT*.

```

1  GCGGTTGCAC GCTCAGAAAG ACAAGGAAAG GAAAGACTTG ATCGACACCA AGAACACGGC TGACACAACG ATTTACAGCA TAGAGAAGAG CTTGGGTGAG
101 TACAGAGAGA AGATCCCTGG TGAAGTCGCC AAGGAGATTG AAGATGCTGT GCGGATCTA AGGAGCGCTT CCGCTGGAGA TGATGTTAAT GAGATTAAGG
201 CTAAGATCGA TCGCGCGAAC AAAGCTGTTT CGAAGATAGG AGAGCACATG TCTGGTGGAG GTTCTGCACC AGGAGGAGGA GCTCAGGGAG GAGGGAGTGA
301 TCAAACCTCG GAGGCTGACT ACGAGGAAGT GAAGAAGTGA AGAGTGTTTA TTGTTTCTGG TCAGTTGGGT TAAGAAGTTA GGTGGTTAGA TCATGGTTGG
401 TTTCATGTCC TAGAAGCTTT TGCCATAAAA ACAGCGGACA GGGGATCTGT TTCGGAATA AGTTTTTCTT TTGTTGGTAA CGAAGCTTAA TGTCTTGTGT
501 TCTGCTATAA ACCCTTTTGT TATAAAAGAG AGACGTTTCA AAATTCCTTC TCACTGCACC AAATCATGTA AATTAACCGT TGAGGAGGGA GAAAGAACAT
601 TTCTAGAAAT AATCTTAAGA TTGTTAGCAT TTTTCTTGT AATTGAAGAA AGTTGCAGTT GAATTTGATG GAAAAACGT TGGACTGAAG AAGAGAGCTC
701 CATTTCACCT TTTTTTTTGG TTTGGGCGCT TAATAAGAAAT CAATCACTAG GGTCTTCTTT TAATTATTGA ATCTAGGCAT GGAACGTGTT TGCTTTTGTT
801 ATCTGCTCTT GAAACGTTCT TGTTCGCAGC TTGCTGGTAA TGCTCAACCT TCATGGAGTA GTTCACACAC TGCTCAAAAC TATGCGAGTT TCTTCAAAGC
901 TTTCCGGGTAT GTTTCCTTTC TTCCATGGGA TGCAAAAACG TATAGTCACA CTTTGTAGTT GTGCTTTTGA CTATGTGTAT CTGTTTCTTT ATAGATCGAA
1001 ACCTGGTGTG AATGACATTG TTGGAACCGG TTTGGGAAGT ACCAACACAA GCAATGCTCT TAGAGAGGCA AAAGAGTAAT AAAAGAGAGG AGAAAAGTTT
1101 TGTCAAACTC TCATTGTCTT TGAGAAAGTA AGATCTAACC TTTTTTTTTT TTTTTTTTGG GATGTTAGGC TTTTGAAGGC TATGTTTTTT TTTGCTTTCT
1201 TTTCTTGTGT CTTAGATCAT GTCGAAGGTG TTGAAATGTT GGATGTAATA AATGTTATTA CTCAGCTGCT ACGTTTAACT CTTCTCTTAC AAGTGTGCTT
1301 CATGAGATTT ATGTAAAATC CATCTTTCAC TGTAGCAATC TTATCCATTT TCTTCTGATT AATCTGCAAC GTGCAATTAG TTTGATCAAA CAATATTAGA
1401 CATGGGGTAA AAGGAGAAAC AGAGTTGCTT ATGTTGACTT GGAGGAAGAT CTATCAARCA CTCTGAGCTG CTGACAGGCT TGGCTTTAAT AGATAAATAT
1501 TAGTAGAATG ATTTGTGTTG TCTTCTTAAT CACAGAGTAT TGTACAAGAG ATTAAGGTTT GAATAAAATG ACGGTTATGC TCGTGAGAGA ATCGTCGCTT
1601 ACGATAAGGA CGAATTGTAA TTTGATTGTT ATCAGGTTGT TAAAGATGA GACAAACGAG AAAAAACGA AGAACAGACT AAACAGGTGT TATACGTTTC
1701 ACATTGGTTT GGTGTGGAG CCTTGAAGTT CCTCTATTCA ACCGGTCCAA CCGTCCGGT TAACAAAACA CTGAAGTAGC CGCCAACACG CTTATTACGT
1801 AAACGGTAGC CACGTTTCGA GCACTGCGTT TGCTAATTTG TCTTCACTCA AATTCGCAGT CTTCTTTCTT CGCTTTTGGG CTCAAGCTTC GTTGAGCTAC
1901 TGTTTCGCAT GCAAGGCTAG TGACACCAAG AAGCGGAGAA AATGAGAAAT CTTTACTTTC TAGTCTTATT TCCGTTGAGC ATCTTGATTT TGGTTGA

```

Abbildung A.10.: Nukleotidsequenz von 5'BoSCT2 (1992 bp) aus *B. oleracea*. 1-340: *mtHSC70-2*, 807-914 und 988-1040: *SDH3*. 1937-1992: *BoSCT2*-Gens (1937-1992) in Rot angegeben.

```

1  GCGGTTGCAC GCTCAGAAAG ACAAGGAAAG GAAAGACTTG ATCGATACCA AGAACACAGC GGACACAACG ATTTACAGCA TAGAGAAGAG TCTTGGTGAG
101 TACAGAGAGA AGATCCCTAG TGAAGTCGCC AAGGAGATCG AAGATGCTGT GCGGGATCTG AGGAGCGCTT CCGCTGGAGA TGATGTCAAC GAGATTAAGG
201 CTAAGATCGA TCGCGCGAAC AAAGCTGTTT CGAAGATAGG AGAGCACATG TCTGGTGGAG GTTCTGCACC AGGAGGAGGA ACTCAGGGAG GAGGGAGTGG
301 TCAAACCTCG GAGGCTGATT ACGAGGAAGT GAAGAAATGA AGAGTGTCA TTATTTCTGG TCAGTTGGGT TAAGAAGTTA GGTGGTTAGA TCATGGTTGG
401 TTTCATGTCC TAGAAGCTTT TGCCATAAAA ACAGCGAGCA GTGGATCTGT TTCGGAATA AGTTTTTCTT TTGTGGTGTG AACGAAGCTT AATGTTCTTG
501 TTTCTGTAT AAACCCCTTT GTTATACAAG ATAAACGTTT CAAAATCCCT TCTCACTGTA CCAAATCATG TAAATTAATG GTTGGAGAGG GAGAAAAGAC
601 ATTTCCGGAA ATAATCTTCA GATTGTTAGC ATTTTCTTGG TTAATGAAG AAAGTTGCAG TTGAATTTGA TGGAAAAAAC GTTGACTGA AGAAGAGAGT
701 TAGCTCCATC TCACTTTTTT TTTGTTGGG CGCTTAATAA GAATCAATCA CTAGAGTCTT CTTTTAATTA TTGAATCTAG GCATGGAACG TGTTTGTTTT
801 TGTATCTGC TCTTGAAACG TTCTTGTTCG CAGCTTGTCT GTAATGCTCA ACCTTCATGG GTTCACACAC TGCTCAAAAC TATGCGAGTT TCTTCAAAGC
901 TTTCGGGTAT GTTTCCTTTC TTCCATGGGA TGCAAAAACG TATAGTCACA CTTTGTAGTT GTGCTTTTGA CTATGTGTAT CTGTTCCTTA TAGATCGAAA
1001 CCTGGGTGTA ATGACATTGT TGGAAACCGGT TTGGGAACCTA CCAACACAAG CAATGCTCTT AGAGAGGCAA AAGAGTAATA AAAGAGAGGA GAAAAGTTTT
1101 GTCAAACTAT CATTGTCTTT GAGAAAGTAA GATCTAACTT TTTTTTGTG TTGGGATGTT AGGCTTTTGA AGGCTATGTT TTTTTTTTGC TTTCTTTTCT
1201 TTGTICTTAG ATCATGTCGA AGGTGTTGAA ATGTTGGATG TAATAAATGT TATTACTCAG CTGCTACGTT TAACCTTCTT CTTACAAGTG TGCTTCATGA
1301 GATTTATGTA AAATCCATCG TTCACTGTAT CAATCTTATC CATTTCCTTC TGATTAATCT GCAACGTGCA ATTAGTTTGA TCAACAATA TTAGACATGG
1401 GGTAAAAGGA GAAACAGAGT TGCTTATGTT GACTTGGAGG AAGATCTATC AAACACTCTG AGCTGCTGAC AGGCTTTGCT TTAATAGATA AATATTAGTA
1501 GAATGATTGT GTTTGTCTTC TTAATCACAG AGTATTGTAC AAGAGATTAA GGTTTGAATA AAATGACGGT TATGCTCGTG AGAGAATCGT CGCTTACGAT
1601 AAGGACGAAT TGTAATTTGA TTGTTATCAG GTTGTAAAA GATGAGACAA ACGAGAAAAA AACGAAGAAC AGACTAAACA GGTGTTATAC GTTTCACATT
1701 GGTTTGGTTG TGGAGCCTTG AAGTTCCTCT ATTCAACCGG TCCAACCGGT CCGGTTAACA AAACACTGAA GTAGCCGCCA ACACGCTTAT TACGTAAACG
1801 GTAGCCACGT TTCGAGCACT GCGTTTGCTA ATTTGTCTTC ACTCAAATTC GCAGTCTTCT TTCTTCGCTT TTGGGCTCAA GCTTCGTTGA GCTACTGTTT
1901 CGCATGCAAG GCTAGTGACA CCAAGAAGCG GAGAAAAATGA GAAATCTTTA CTTTCTAGTC TTATTTCCGT TGAGCATCTT GATTTTGGTT GA

```

Abbildung A.11.: Sequenzvergleich der genomischen 5' Bereiche aus *B. napus* (5'BnSCT1), *B. oleracea* (5'BoSCT1 und 5'BoSCT2) und *B. rapa* (5'BrSCT). Sequenzidentitäten sind wie in Abbildung A.7 markiert. Gestrichelte Linien zeigen fehlende Sequenzbereiche an. Der Transkriptionsstart des SCT-Gens ist grau hinterlegt.



In den Abbildungen A.12 bis A.16 sind die Nukleotidsequenzen der genomischen 3'-Regionen aufgeführt. Sequenzidentitäten zu sind farbig markiert. Blau: PPa (AY551439), Rot: *SCT*.

Abbildung A.12.: Nukleotidsequenz von 3'*BnSCT1* (906 bp) aus *B. napus*. 1-34: *BnSCT1*, 906-241: *PPa*.

```

1 GTTCAAAGA TGGATTGATG GTGAATCTCT CTGAAGTTCC TCACTCACTT CCCTCTCTCT CTGTCAAAG TTTGATGAGT TGCTTTTGTT TTCGTTTATG
101 GTTATTAAGT CAAAAATTAA AAATAATAAT AACCTTTTAT TATTTCTCAG TCATCAATGG TGAAAAACAA AATCTCATT ACAAGACAGG AAAAAACA
201 AGAATGATGA AAGGACTCTA GTCTGATAAT TATTTCTGAGC TCATAATTGA GACACTGCAA GATATCATT TGTAAAACT GTTCAGAAAA GTGAAAGGTC
301 TCCAGCATCA ACTGATCTCT TCACAAGCTT AGCCCATGAT TCATTTGTTT CATGGATTAT CTTCAATGCA TAGTCTGTG AAAAAACAC CAAACAAGAA
401 CCGTTATAGC TTCTTCAGC TTCATTACCA AACATGAAGC AGTACCACA AGACCTTACT TTGTTAGCTG GTTTGTCTCC AAGCCGAAT CTGTTAGCAG
501 GCTTCCATC TGGGATCTTG TAGTCTTTAT GTTGACGGA TAGTATCTGA GCTTCCCTTT TTTAGTGTCT TGTTAATAG GAGTGAAGC TTCATCAGTA
601 GCAACCTCCA TTTTGTCTT AGACTCTTTA GGGATTCAA CTATAAGTT GTAACCTCCA TCTCCTAAC TCAACGGTAT ATCATGCCAT GGAGAACCT
701 ATACACAATA AGCATAATCA ACCTTTTAA CAAAAAACA AACACAAAA CAGAGTAACT AATCAAAAGC ATCTTCAAAC GAAAATTCAC TAAAGAAACA
801 ATCTTTTATT TGCATAAAC AACCTAACA ACAAGAACAT TGATTGCATT GGTCTAATT TACAATGTGG GAAGATCCC AGAGCTCAGA GAGTTAAAAA
901 GCTTTA

```

Abbildung A.13.: Nukleotidsequenz von 3'*BnSCT2* (544 bp) aus *B. napus*. 1-34: *BnSCT2*, 544-198: *PPa*.

```

1 GTTCAAAGA TGGATTGATG GTGAATCTCT CTGAATATTC TCACTCACTT CTCTCTCTCT CAAAAGTTT CATGAGTTGT TTTTGTCTT CGTTTATGTT
101 TATCAAGTA AAAAAATTAA TAATAACAAT GCCCTTTTAT ATTTGTGTTA AAAAGACTAA AAAAAAGAA AATTGAGTC TGATAATTAT TCTGAGCTCA
201 TAATTGACA CTGAAGATA TGTTTGTGTT AAACTGTTT AGAAAAGTGA AAGGCTTCCA GCATCAACTG ATCTCTTAC AAGCTTAGCC CATGATTCAT
301 TTGTTTCATG GATTATCTTC AAGCATAAT CCTGTGAGAA ATTAATAAAA AAAACACTC TTCAGTACCA AACATGAAGC AGCACCACGA GAGAAATTTG
401 TATAACTGGT TTGTCTCAA GACCGAATCT GTTAGCAGC TTCCCATCTG GGATCTTGTG GTCTCTAAC CAGTCTCTAA TGGCTGTGTA ATGTACCCTG
501 ATATCACCAC ATATAAAGGT CAGTAACACA AAATCCATAT AAGG

```

Abbildung A.14.: Nukleotidsequenz von 3'*BrSCT* (510 bp) aus *B. rapa*. 1-25: *BrSCT*, 510-252: *PPa*.

```

1 ATGGATTGAT GGTGAATCTC TCTGAAGATT CTCCTCACT TCTCTCTCTC TCAAAAGTTT TATGAGTTT TATTGTTTTT CGTTTATGTT TATTAAGTAA
101 AAATTTAATA ATAATAATGA CCTTTTATTA TCATCAATGG TGAAAAACA AAATCTCTTT TAAAAGAACT AAAATCAAGA ATGACTCGA GTCTGATAAT
201 TATTTCTGAGC TCATAATTGG AGACTGCAAG ATATGAATTT GTTAAACTG TTCAGAAAAG TGAAAGGCTC CCAGTCTCGA CTGATCTCTT CACAAGCTTA
301 GCCCATGATT CATTGTTTTC ATGGATGATC TTCAAAGCAT AATCCTATTA GAAAAAACA AAAAAAACA AGAACACACT TCTTCTCAG TACCAACAT
401 GAAGCAGCAC CACAAGAGAA ATTTGTATAA AAAACAATCT TACTTTGTTA GCTGTTTTT CTCCAAGACC GAATCTGTTA GCAGGCTTCC CATCTGGGAT
501 CTTGTAGTCT

```

Abbildung A.15.: Nukleotidsequenz von 3'*BoSCT1* (555 bp) aus *B. oleracea*. 1-25: *BoSCT*, 555-312: *PPa*.

```

1  ATGGATGAT GGTGAATCTC TCTGAAGTTC CTCACCTACT TCTCTCTCTC TCTCTCTGTC AAAGTTTCAT GAGTTGCTTT TGTITTCGTT TATGGTTATT
101 AAGTCAAAAT TTAAAAATAA ATAATAAGGT TATTAAGTCA AAATTTAAAA ATAATAATAA CCTTTTATTA TTTCTCAGTC ATCAATGGTG AAAAAACAAA
201 ATCTCATTTA CAAGGCAGGA AAAAAACAAA GAATGATGAA AGGACTCTAG TCTGATAATT ATTCTGAGCT CATAATTGAG ACACCGCAAG ATATCATTTT
301 GTTAAACTG TTCAGAAAAG TGAAAGGTC CTGAGCATCA CTGATCTCTT CACAAGCTTA GCCCATGATT CATTGTGTTT ATGGATGATC TTCAAAGCAT
401 AGTCCTGTTA AAAAAACACC AAACAAGAAC TGTATAGCT TCTTTCAGTT TCATTATCAA ACATGAAGCA GTACCCACAA GACCTTACTT TGTTAGCTGG
501 TTTGTCTCCA AGACCGAATC TGTTAGCAGG CTTCCCATCT GGGATCTTGT AGTCT

```

Abbildung A.16.: Nukleotidsequenz von 3'*BoSCT2* (539 bp) aus *B. oleracea*. 1-25: *BoSCT*, 539-313: *PPa*.

```

1  ATGGATGAT GGTGAATCTC TCTGAGGTC CTCACCTACT TCTCTCTCTC TCTCTCTGTC AAAAGTTTCA TGAGTTGCTT TGTITTCGTT TTATGGTTAT
101 TAAGTCAAAA TTAAAAATAA AATAATAAGG TTATTAAGTC AAATTTAAAA AATAATAATA GCCTTTTATT ATTTCTCAGT CATCAATGGT GAAAAACAAA
201 AATCTCATTT ACAAGACAGG AAAAAAACA AGAATGATGA AAGGACTCTA GTCTGATAAT TATTCTGAGC TCATAATTGA GACACCGCAA GATATCATTT
301 TGTTAAACT GTTCAGAAA GTGAAAGTTC TCCAGCATCA ACTGATCTCT TCCCAAGCTT AGCCCATGAT TCATTGTGTT CATGGATTAT CTTCAAAGCA
401 TAATCCTGTC AGAAATTTAA AAAAAAACA CACTCTTCTAG TACCAAACAT GAAGCAGCAC CACGAGAGAA ATTTGTATAA CTGGTTTGTG TCCAAGGCCG
501 AATCTGTTAG CAGGCTTCCC ATCTGGGATC TTGTAGTCT

```

Abbildung A.17.: Nukleotidsequenz des BAC5-Subfragmentes. Sequenzidentitäten sind farbig dargestellt. 1-531 (Grün) *mtHSC70-2* (NM120996), 994-1105 und 1180-1232 (Gelb) *SDH3* (NM120997), 2135-5010 (Rot) *BnSCT1* (AY383719), 6479-5215 (Blau) *PPa* (AY551439) und 6969-6870 (Braun) *mdh1* (AJ242712).

```

1 GAATTCGATC TAGTGGGCAT TCCACCATCA CCAAGAGGCA TCCCTCAGAT CGAAGTAACG TTCGACATCG ATGCGAACGG CATTGTCACT GTTTCGCCA
101 AGGACAAGAC GACTGGCAAA GAGCAACAGA TCACGATCCG ATCATCTGGT GGACTCTCAG AGGATGATAT CCAGAAGATG GTGAGAGACG CGGAGTTGCA
201 CGCTCAGAAA GACAAGGAAA GGAAAGACTT GATCGACACC AAGAACACGG CTGACACAAC GATTTACAGC ATAGAGAAGA GCTTGGGTGA GTACAGAGAG
301 AAGATCCCTG GTGAAGTCGC CAAGGAGATT GAAGATGCTG TGGCGGATCT AAGGAGCGCT TCGGCTGGAG ATGATGTTAA TGAGATTAAG GCTAAGATCG
401 ATGCGGCGAA CAAAGCTGTT TCGAAGATAG GAGAGCACAT GTCTGGTGGG GGTCTCGCAC CAGGAGGAGG AGCTCAGGGA GGAGGGAGTG ATCAAATCC
501 GGAGGCTGAC TACGAGGAAG TGAAGAAGTG AAGAGTGTTC ATTTGTTCTG GTCAGTTGGG TTAAGAAGTT AGTGTTGTTG ATCATGTTTG GTTTCATGTC
601 CTAGAAGCTT TTGCCATAAA AACAGCGGAC AGGGGATCTG TTTCTGGAAT AAGTTTTTTC TTTGTGGTGA ACGAAGCTTA ATGTTCTTGT TTCTGCTATA
701 AACCCCTTTG TTATAAAGA GAGACGTTTC AAAATTCCTC CTCACTGCAC CAAATCATGT AAATTAACCG TTGAGGAGGG AGAAAGAACA TTCTAGAAA
801 TAATCTTAAG ATTGTTAGCA TTTTCTTGT TAATTGAAGA AAGTTGCAGT TGAATTTGAT GGAAAAACG TTGACTGAA GAAGAGAGCT CCATTTCACT
901 TTTTTTTTTT GTTTGGGCGC TTAATAAGAA TCAATCACTA GGGTCTTCTT TTAATTATTG AATCTAGGCA TGGAACGTGT TTGCTTTTGT TATCTGCTCT
1001 TGAACGGTTC TTGTTCCGAG CTTGCTGGTA ATGCTCAACC TTCATGGAGT AGTTCACACA CTGCTCAAAA CTATGCGAGT TTCTTCAAA CTTTCGGGTA
1101 TGTTCCTTTT CTCCATGGG ATGCAAAAAC GTATAGTCAC ACTTTGTAGT TGTGCTTTTG ACTATGTGTA TCTGTTCCF TATAGATCGA AACCTGGTGT
1201 GAATGACATT GTTGAACCG GTTTGGGAAC TACCAACACA AGCAATGCTC TTAGAGAGGC AAAAGAGTAA TAAAAGAGAG GAGAAAAGTT TTGTCAAACT
1301 CTCATTGTCT TTGAGAAAGT AAGATCTAAC CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GGGATGTTAG GCTTTTGAAG GCTATGTTTT TTTTTTGCTT TCTTTCTTT
1401 GTTCTTAGAT CATGTCGAAG GTGTTGAAAT GTTGGATGTA ATAAATGTTA TTAAGTACTG GCTACGTTA ACTCTTCTCF TACAAGTGTG CTTCATGAGA
1501 TTTATGTAAT ATCCATCTTT CACTGTAGCA ATCTTATCCA TTTTCTCTG ATTAATCTGC AACGTGCAAT TAGTTTGATC AAACAATATT AGACATGGGG
1601 TAAAAGGAGA AACAGAGTTG CTTATGTTGA CTGGAGGAA GATCTATCAA ACACCTGAG CTGCTGACAG GGTTTGCTTT AATAGATAAA TATTAGTAGA
1701 ATGATTGTGT TTGTCTTCTT AATCACAGAG TATTGTACAA GAGATTAAGG TTTGAATAAA ATGACGGTTA TGCTCGTGAG AGAATCGTCG CTTACAGTAA
1801 GGACGAATTG TAATTTGATT GTTATCAGGT TGTAAAAGA TGAGACAAC GAGAAAAAA CGAAGAACAG ACTAACAGG TGTATACGT TTCACATTGG
1901 TTTGGTTGTG GACGCTTGA GTTCTCTAT TCAACCGTCC CAACCGTCC GGTAAACAAA AACTGAAGT AGCCGCCAAC ACGCTTATTA CGTAAACGGT
2001 AGCCACGTTT CGAGCACTGC GTTGTCTAAT TTGCTTCC TCAAATTCGC AGTCTTCTTT CTTGCTTTT GGGCTCAAGC TTCGTTGAGC TACTGTTTCG
2101 CATGCAAGGC TAGTGACACC AAGAAGCGGA GAAAATGAGA AATCTTACT TTCTAGTCTT ATTTCCGTTG AGCATCTTGA TTTTGGTTGA TGCTTCTTTG
2201 CATGTGAAGT ATCTTCTCG TCTTGAAGT CCTCTTCTT TTGAGTCGA GACTGGGTAA AACAAAGTCC ATCTCTCGC TCCAATTTGT TATAAAAAA
2301 TCCTTAATCT AAGACATGTC TCTTCTTCT TTGCTGCATG TGGTTTTATA TAACAAGGTA TGTGAGTGT GGTGAATCTG GAGATGTTGA GCTCTTTTAC
2401 TACTTTGTGA AATCAGAGAG AAATCCAGAT AAAGATCCTC TCATGATTTG GCTAACTGGT GGGCCTGGAT CGAGCTCCAT TTGTTGTTTA CTCTTTGCAA
2501 ATGGTAAACA AATCTTTTTT TTTTGAATTT ATGTTATTTA ATGAGTCTTA ACTAAGTAGT TTTACTTAGG GATCCCATCT TGAATAATAT ATTTTAAAGC
2601 TTAATTAACA ACATCTAATT GATATGCATG TCTTCAGTAT TAAATAGTTT AATTGCATGT ATGGTGTGAT TCTCTTATGT TGTAAGGGTT AAGACAAGTG
2701 TATTTGATGC ATGTGTTCTG TAAAAATAG TTTAGTTGCA TGTGTTGTGT GATTTTTATA ATGTTTGGAG GGTGAAGACA AGTCTAATTA ATGCATGTGT
2801 TCTGTGCTAA ATAATTTAGT TTATGCATGT GTTGTGTGAT TTGTTTATTA ATTTTAAATG TTTTGTGTCAG GTCCTTGGC TTTTAAAGGG GATGAGTATA
2901 ATGGGCACT GCCTCCTTTA GAGCTAACAT CTTTTCTTG GACAAGGGC AGAGATTAGT TACCAATTTT ATAATGCTTT CCTCTGTAAT ACCAACATCT
3001 TGCTTCTAAA GAGAATGTGT AATATGTATA CTCAATTTT TTCAGGTGGC TAACATTTTA TATTTGGAAT CTCTGCTGG TTCTGGATAT TCTTATGCCA
3101 AAACCTGGCG TGCTGCTGAG ACGAGCGACA CCAACAAATC TCACAAATC GACCAGTCC TTAGGAGTGT TGAGTGTCT CTCTTTCTTA TACCTTTCTT
3201 GATGATTTTG GTTACTTTTC TAAACTTTT CACTATGTTG TTGCTGTGAG TGGTTTGTGG ACCACCTGA GTTTATATCC AATTCATTTT ACGTTGGTGG
3301 AGATTCATAT TCCGGGAAGA TTGTTCCAGG AGTTGTGCAA CAGATTTTAC TTGGTATTTT TAACTTACCA CTCACTTATG CCTCTATGTT AGTTTCTTAT
3401 ATTTTATATC AAATATTTTA ATCACAATAC ACAATATCAA AACAGGAAAT GAAAAAGTCC TCGCACCCT CATAAATATT CAGGTAGCAA AACTTTAATC
3501 TCTCCTTTTT TGCTGAATA CCAATATATT TTGGATGAGA TTTAATATA TTTATATAA CTGAGCAGGG ATATGTTCTT GGAACCTCG CAGTACGTAC
3601 AAACCTAGAA CCAAATCATA GAGTTTCATT TGCGCATCGG ATGGGACTTA TTTAGATGA GCTCCATGAG GTATATATTT TTTTCTTCA TCATCACCAT
3701 CATCATTATA ATGAAATCTT TGAGACATTT GGTTACAATC TTGTTTACAT CACTACTATA TGAGTCACT TGAAGAAGAC TGTGGAGGCA AATCTTTTAA
3801 CGTAGATCCA AGTAATGCAA AATGTTCAA TGGGCTTCTA GCTTATCATC GGTAAAGGGA TTATAACTAA AAAAAAAACC ACCACATGG GTATCTGCAT
3901 GCATTTTACC AACTAAGTCT GTCTCTTGT TTTTGTAGTC CTCAGTGTAT CTCAGAGATA TACATAGAGC AGATTTTGTG ACCAAACTCG AAAGTAGATT
4001 ATGCTTTATC AGACATATCA CAAACCTTAC CAAATATCAG AACCAGTCGA AGAAGAGAAC TCAAGGAGTT TTCAGAAAT GATTCATCAT CGTTGCTCTC

```

4101 TCCTAGCTGC TTGTATTAA TTCTCTTTC TTTTCATTTT TGGTTATATT GTATATTCAT AGCTTTGTGA TTTTTAACA CTTACTGTAT TCTCAGACTT
4201 ATAGGTATTT TCTGTCTGCC TTTTGGGCAA ATGATGAAAA TGTACGCAGA GCTTTAGCGG TGAAGAAGGT ACCTATGTGA ACTTTGTTTC TTGTTCTAAA
4301 TAAAAACTTA ACACAACGTT ACCAATTAAT TGTAAATAT TATGTAGGGC TTCGGAAAAA GGAGTCGATG CAACACTCAA AACATACCAT ATACATATGA
4401 TATTCACAAT GCCATTCCAT ATCACGTTAA TAATAGCCGT AAAGGCTTCC GCGCTCTCAT CTACAGGCAA GATTATACTT TATTCTTTC TTTTTTTTG
4501 TTTTGACTCG CAAATATTAG TTAATGTTA TTCTTTGTGC ATCTTGATCA AGTCACAAGT TAAATATTTG CAAATTTTGG GAACAGTGGT GATCATGATA
4601 TGATGATACC TTTCTCTTCA ACTGAAGCAT GGATCAAATC TCTCAACTAT TCCATTGTGG ATGACTGGAG ACCTTGGATG ATGAGTAGCA ATCAAGTCGC
4701 TGGGTAAAGC CAAAGCCAAA AACATCTGTT TCTAACTCCA ATCTATCAAC GTTCTAAATG ATCTTTAAAC ACACCCAAAT TGTATGTTTT GTAGATATAC
4801 AAGGACTTAT GCAATAAAGA TGACATTGTC AACCATCAAG GCAAGAAGTT CTAAGCCCTT TCCTTCTTTC TTCTCTAGAG TTTCTACTGG CAGAATAAA
4901 AATGATATAG AGGAGTTTGA TTTGTGTAGG GAGGAGGACA CACAGCTGAG TATAATCCAG ACCAATGCTC ACTTATGTTC AAAAGATGGA TTGATGGTGA
5001 ATCTCTCTGA ATATTCTCAC TCACCTTCTCT CTCTCTCAAA AGTTTTCATG AGTTGTTTTT GTTTTTCGTT TATGTTTATT CAAGTAAAAA AATTAATAAT
5101 AACAAATGCC TTTTATATTG TGTCAAAAA GACTAAAAAA ATAGAAAATT TGAGTCTGAT AATTATTCTG AGCTCATAAT TGGACACTGC AAGATATGGT
5201 TTTGTTAAAA CTGTTTCAAA AAGTAAAAGG TCTCCAGCAT CAACTGATCT CTTCAACAAG TTAGCCCATG ATTCATTTGT TTCATGGATT ATCTTCAAG
5301 CATAATCCTG TCAGAAATTA AAAAAAAAAA AACACTCTTC AGTACCAAAC ATGAAGCAGC ACCACGAGAG AAATTTGTAT AACTGGTTTG TCTCCAAGAC
5401 CGAATCTGTT AGCAGGCTTC CCATCTGGGA TCTTGTAGTC TCTAAACCAG TCTCTAATGG CTGTGTAATG TACCCTGATA TCACCACATA TAAAGGTCAG
5501 TAACACAAAA TCCATATAAG GCCTATAGAT CAAGTCCGGT TTAGCTCGTA CCGGGAATG CTTCTCAACA TCATCAACAT CATTGACAAG ATGAGCTTTT
5601 GGGTCATCCA ATGAGATAGC AACAATCTTC CAGTCTAGCT CTCCTTCATC AATCATAGCT AATGCAGCCA AAGACTTGAC TTTTAAAAAT TCCCCTATCT
5701 TCCTTTGAGC TTCACCAATC TCAACAACAT CAACTACAAA TCCAAAACCA AGAACAATGA GCTTAGTACA AATTCAAGTA GATAAAAAAA AAAAAAAAAA
5801 AAAAGAGTAT CAAAGATTCA TTCACCTGGA TCATTATCCC CAAAGGCTCC TTCAACTTCA GCGTTTGCTT GTGATGGATC TTCCCATGTC TGTGGAAGCA
5901 ACCCATAGTT CCAGTTTATG TTGTACGGAT AGTATCTGAG CTTTCCTTTT TTTAGTGTCT TGCTTAATAG GAGTGGAAAG TTCATCAGTA GCAACCTCCA
6001 TTTTGGCTTT AGACTCTTTA GGGATCTCAA CTATAAAGTT GAAAACCTCA TCTCCTAAG TCAACGGTAT ATCATGCCAT GGAGAACCT ATACACAACA
6101 AGCATATTCA ACCTTTTAAAC AAAAAAAAAA AAAACACAAA ACAGAGTAAC TAATCAAAAG CATCTTCAA CGAAAATTCA CTAAGAAAC AATCTTTTAT
6201 TTGCATAACC GAACCTAAAC CACAAAGAAC ATTGATTGCA TTTGGTCTAA TTTTACTATT TGGAAAGATC CTCAGAGCTC AGAGAGAGAA AACAAAGCTT
6301 TGAACCTTAA CACAGAGACA CACACACAGA GCAGAGTAAC CAATCAAAAG CATCTTCAA CGTAAATCA CAGTGATAA GATCTAAAGA AACACTCTTT
6401 CATTTGCATA AGATCACAGG TCTCCAGTTC GAACCTGGAC GAAGCCAATC TTTTTTTTTT TCACCTTCAC ACTTGTCTAT ACAGCGAGGT TTCTTCACAG
6501 GGCACGTTGT TTTATTTACA TTTTGATTTA GAAATTTGAT ACACATTGCT TCCTATATAT AATGTTTTTT TATTGATGAT GAAAGTCAA TGATGTTGCT
6601 TTGTGTCCAA TCCTACGTTG GTTCATTTTG AGAAGCTCTT GACATATGTA ATGTCGAAAC TTCACTTCAT CAAAACCCCT GGAGAAGTAG TACGTTTAAAG
6701 ACCCCACACA GTGTTGTACA GACTGATAAA AGGAATTTTT ACGAAGTTGA AGAAGAAGAA GAAAGCAGGA CATAGGCATG ATGAGTAGTA GTAGTAGTAG
6801 TAGTACACGA TCACTATGAT TTTAGGAAGC GAAGAAGATC TTATTTTTTC TCTGTGATTA TTCTTGATTT CATTTCCTGA TGAAGTCGAC ACCTTTCTGA
6901 ATGCTTCCAG CTAGTTCTTC TTTTGCTTTC TCCATGACCA ACCCTGTGAC ATGTCAAAA CAAGAATTC

Abbildung A.18.: Nukleotidsequenz des 3'BAC4-Subfragmentes. Sequenzidentitäten sind farbig dargestellt. 1-2865 (Rot) *BnSCT2*, 4192-3112 (Blau) *PPa* (AY551439) und 4910-4826 (Braun) *mdh1* (AJ242712).

```

1  ATGAGAAATC TTTACTTTCT AGTCTTATTT CCGTTGAGCA TCTTGATTTT GGTGATGCT TCTTTGCATG TGAAGTATCT TCCTGGTCTT GAAGTCTCTC
101 TTCCTTTTGA GCTCGAGACT GGGTAAAAACA AAGTCCATCT CTTCACTCCA ATTTGTTATA AAAAAATCCT TAATCTAAGA CATGTCTCTT TCTTCTTTGC
201 TGCATGTGGT TTTATATAAC AAGGTATGTG AGTGTGGTG AATCTGGAGA TGTGAGCTC TTTTACTACT TTGTGAAATC AGAGAGAAAT CCAGATAAAG
301 ATCCTCTCAT GATTGGCTA ACTGGTGGGC CTGGATGCAG CTCCATTGTG GGTTCCTGTG TTGCAAATGG TAAACAAATC CTTTTTTTTT GGGATTATTT
401 GTATTTACCG AGICCTAACT AACTAGTTTT ACTTAGGGAT CCCATCTTGA AAATATATAT TTAAGGCTTA ATTAACAAA TCTAATTGAT ATGCATGTCT
501 TCAGTATTAAT ATAGTTTAAAT TGCATGTATG GTGTGATTCT CTTATGTTGT AAGGGTTAAG ACAAGTGTA TTAATGCATG TGTTCTGTAA AAAATAGTTT
601 AGTTGCATAT GTTGTGTGAT TTTTATAATG TTTGGAGGGT TAAGACAAGT CTAATTAATG CATGTGTTCT GTGCTAAATA ATTTAGTTTA TGCATGTGTT
701 GTGTGATTTT TTAATTAATT TTAATGTTT TTGTCAGGTC CTTTGGCTTT TAAAGGGAAT GAGTATAATG GGACACTGCC TCCTTTAGAG CTAACATCTT
801 TTTCTTGGAC AAAGGCGAGA GATTAGTTAC TAATTTTATA ATGCTTTCCT CTGTAATACC AACATCTTGC TTCTAAAGAG AATGTGTAAT ATGTATACTC
901 AATTTTTTTT TCAGTGGCT AACATTTTAT ATTTGGAATC TCCTGTGTTG TCTGGATATT CTTATGCCAA AACTCGGCGT GCTGCTGAGA CGAGCGACAC
1001 CAAACAATTT CACCAATTCG ACCAGTTCCT TAGGAGTGTG GAGTGTCTC TCTTCTTAT ACCTTCTTG ATGATTTTGG TTTATTTTCT AAAACTTTTC
1101 ACTATGTTGT TGCTTGTAGT GGTTTGTGGA CCACCCGAG TTTATATCCA ATTCATTTTA CGTTGGTGA GATTTCATAT CCGGGAAGAT TGTTCAGGA
1201 GTTGTGCAAC AGATTTCACT TGGTATTTT AACTTACCAC TCACATTATG CTCTATGTTA GTTCTTATA TTTTATATCA AATGTTTTAA TCACATTACA
1301 CAATATCAAA ACAGGAAATG AAAAAGTCT CACACCACT ATAAATATTC AGGTAACAAA ACTTTAATCT CTCCTTTTTT GGCTTAATAC CAATATATTT
1401 TTGGATGAGA TTTAATATAA TTTATATAAA CTGAGCAGGG ATATGTTCTT GGAACCCTG CAGTACGTAC AAACCTAGAA CCAATCATA GAGTTTCATT
1501 TGCGCATCGG ATGGGACTTA TTTCAGATGA GCTCCATGAG GTATATACTT TTTTCTTAT CATCACCATC ATCATTATAA TGAAATTCCT GAGACATTTG
1601 GTTACAATCT TGTTTACATC ACTACTATAT GCAGTCACTT GAAAGAACT GTGGAGGCAA ATCTTTTAAAC GTAGATCCAA GTAATGCAA ATGTTCAAAT
1701 GGGCTTCTAG CTTATCATCA GGTAAGGGAT TATAACTAAA AAAAACACCA CATGGGTATC TACATGCATT TTCACAACT AACTTGCTC TTTGTTTTTT
1801 GAGTCCTTAG TGCATCTCAG AGATATACAT AGAGCAGATT TTGTTACCAA ACTGCAAAGT AGATTATGTC TTAGCAGACA TATCACAAC CTTACCAAAAT
1901 ATCAGAACCA GTCGAAGAAG AGAACTCAAG GAGTTTTCAA GAAATGATTC ATCATCGTTA CCTCCTCCAA GCTGCTTTGT ATTAATICTC TTTTCTTTTC
2001 ATTTTGGTGT ATATTGTATA TTCATAGGTT TGTGATTTTT TAACACTTAC TGTATTCTCA GACTTATAGG TATTTCTGTG CTGCCTTTTG GGCAAATGAT
2101 GAAAATGTAC GCAGAGCTTT AGGCGTGAAG AAGGTACCTA TGTGAACTTT GTTCTTGTG CTAATAAAAA ACTTAAACACA ACGTTACCAA TTAATGTTA
2201 AATGTTATGT AGGGCTTCGG AAAATGGAGT CGATGCAACA CTCAAAACAT ACCATATACA TATGATATTC ACAATGCCAT TCCATATCAC GTCAATAATA
2301 GCCGTAAAGG CTCCGCGCT CTCATCTACA GGCAAGATAA TACTTCATTC TTTTTTTTTT GAGTCACAAA TATTAGTAA ATGTTATTCT TTCTGCATCT
2401 TGATCAAGTC ACAAGATAAA TATTTGCAA TTTTGGGAAG AGTGGTGATC ATGATATGAT GATACCTTTC TCTTCAACTG AAGCATGGAT CAAATCTCTC
2501 AACTATTCCA TTGTTGATGA CTGGAGACCT TGGATGATGA CTAGCAATCA AGTCGCTGGG TAAAGCCAAA GCCAAAAACA TCTGTTTCTA ACTCCAATCT
2601 CATCAACTTT CTAATGATC TTTAACACA CTTAAATTGT ATCCCTTGTG TTGTAGATAT ACAAGGACCT ATGCAAATAA GATGACATTT GCAACCATCA
2701 AGGCAACAAA TTCTAAACCC TTTCTGTCTT CTCTAGAGTT TCTGCTGGCA GAATTAATAA TGATATAGTG TTTGATATGT GTAGGGAGGA GGACACACTG
2801 CTGAGTATAA TCCAGACCAA TGCTCACTTA TGTTCAAAAG ATGGATTGAT GGTGAATCTC TCTGAAGTTC CTCACTCACT TCTCTCTCTC TGTCAAAAGT
2901 TTCATGAGTT GCTTTTGTG TCGTTTATGG TTATTAAGTC AAAAATTAAT AATAATAATA ACCTTTTATT ATTTCTCAGT CATCAATGGT GAAAAACAAA
3001 ATCTCATTTA CAAGACAGGA AAAAAACAA GAATGATGGA AGGACTCTAG TCTGATAATT ATTCTGAGCT CATAATTGAG ACACTGCAAG ATATCATTTT
3101 GTAAAAACTG TTCAGAAAAG TGAAAGGTCT CCAGCATCAA CTGATCTCTT CACAAGCTTA GCCCATGATT CATTTGTTTC ATGGATTATC TTCAATGCAT
3201 AGTCCTGTTA AAAAAACACC AAACAAGAAC CGTTATAGCT TCTTTCAGTT TCATTACCAA ACATGAAGCA GTACCCACA GACCTTACTT TGTTAGCTGG
3301 TTTGTCTCCA AGGCCGAATC TGTAGCAGG CTTCCATCT GGGATCTTGT AGTCTTTATG TTGTACGGAT AGTATCTGAG CTTTCCTTTT TTAGTGTCTT
3401 GTTTAATAGG AGTGAAGCT TCATCAGTAG CAACCTCCAT TTTTGTCTTA GACTCTTTAG GGATTTCAAC TATAAAGTTG TAAACTCCAT CTCCTAAACT
3501 CAACGGTATA TCATGCCATG GAGAAACCTA TACACAATAA GCATATTCAA CCTTTTAAAC AAAAAAATAA ACACAAAAACA GAGTAACTAA TCAAAAGCAT
3601 CTTCAAACGA AAATTCACTA AAGAACAAT CTTTCATTG CATAAACCAA ACCTAACAC AAGAACATTG ATTGCATTGG TCTAATTTTA CAATGTGGGA
3701 AGATCCCCAG AGTCTCAGAGA GTTAAAAAGC TTTAACTTT AACACAGAGA CACAACACA GAACAGAGTA ACGAATCAAA AGCATCTTCT AAAAGAAACA
3801 ATCTCTCAT TGCATAAACC AAACCTAACC CACAAGAACA TTGATTGCAT TGCTCTAATT TAACAATGTG GAAGATCCTT CAGAGCTCAG AGAGTTAAAA
3901 AGCTTTGAAC TTTAACAGAG AGAGAGAGAG AGAGAAAAGG TACCTTCTTT CCAGAGCCAT CGAGGAAGAA GACACGATAG TCTAGTGTGTT CGGGTTGACC
4001 TTCTTCTTTA ACCTTGACCT GAGGTTGTA TATGGCACTG CAAGAGAAGG GTCGTTTCGA TTTCAACGCT AAAGCTCTTC TGTGAAGCA GAGAGCGCCG

```

```
4101 TGTGATGTTT TCGCTGGGAG GAGGAAGGCT CGTTTGGCGA GGAAACACGA GGTGGTTTGA GCTGCAGTCA TCATCACTCT TGTGGCCGCC ATTACTGTGG
4201 AGAAGCGTTT TCACTTCTT CGGACAAGAC GAATCAGTTA ACAGATCACG TGGTTTTTAT AATACCAAAT TTAATGAATA GTATAAATAT TAAAATTTTG
4301 GAAGAGTTAA CACAAAGGTT TCGTGGTGTA GTTGGTTATC ACGTCAGTCT AACACACTGA AGGTCTCCAG TTCGAACCTG GACGAAGCCA ATCATTTTTC
4401 CTTTTTTTTC CCTTCTACAC AAACCTTGCCA CTCTGCAACG ATGTTTACTA ACTGTACATG TTGTTTTATG TACTTTTTTA GCTAGAAGTT GGAAACACAC
4501 TTGCTTCCTA TAAAGTTTTC GTTCTTAATT ATTAATAAAA GTCAAAATGAA AATAATATGT TTGATCTCTC AATGTTTTGT GTCCAATCCT AAACCTGGCCG
4601 GTTTTAAGTA GCTGTTGACA TATGTAATGT CGAAACTTCA CTTTCATCAA ACCCGTGTTT AAGACACCAC AGTGTATATC AAACCTGATAA AGGAATTTT
4701 ACAAAAGTTGA AGAAGAAGAA GAAGAAAGCA GGACATGGGC ATGATGAGTA AGTAGTAGTG GTACATGACC ATATGATTTT AGGAACGAAG AAGATTTTAT
4801 TTTTCTCTG TGATTATTCT TGATTCATT TCCTGATGAA GTCGACACCT TTCTGAATAC TTCCAGCTAG TTCTTCTTTT GTTTTCTCCA GACCAACCCC
4901 TGTACATTGT
```

Abbildung A.19.: Nukleotidsequenz des 5'BAC4-Subfragmentes. Sequenzidentitäten sind farbig dargestellt. 1-525 (Grün) *mtHSC70-2* (NM120996); 800-852 und 972-1005 (Gelb) *SDH3* (NM120997); 1769-2411, 3006-3407 und 3777-5638 (Rot) *BnSCT*.

```

1   GATCTAGTGG GCATTCCACC ATCACCAAGA GGCATCCCTC AGATAGAAGT AACATTTCGAC ATCGATGCGA ACGGCATTGT CACTGTCTCT GCCAAGGACA
101 AGACGACAGG TAAGGAGCAA CAGATCACAA TCCGATCATC TGGTGGACTC TCAGAGGATG ATATCCAGAA GATGGTGAGA GACGCAGAGT TGCACGCTCA
201 GAAAGACAAA GAAAGAAAGG ACTTGATCGA TACCAAGAAC ACAGCGGACA CAACGATTTA CAGCATAGAG AAGAGTCTTG GTGAGTACAG AGAGAAGATC
301 CCTAGTGAAG TCGCCAAGGA GATTGAAGAT GCTGTGGCGG ATCTAAGGAG CGCTTCGGCT GGAGATGATG TCAATGAGAT TAAGGCTAAG ATCGATGCGA
401 CGAACAAAGC TGTTTCGAAG ATAGGAGAGC ATATGTCTGG TGGAGTTTCT GCACCAGGAG GAGGAGCAAC TCAGGGAGGG AGTGAGCAGA CTCCAGAGGC
501 TGACTIONAGG GAAGTGAAGA AGTGAAGAGT GCGACTAAAT CTTCATCTGG GTTAAGAAGT TAGATTAGAT CATGGTTGGG TTCGATGCAA CTGTGCATAA
601 AAACAGGGAG CAGTGGATCT GTTCCTGTAA TAAGTTGTTT CTGTGGCGAA CAAAACCTAA TGCTCCTCTC TCTGCTATAA AACCTTTTTG TTATATAAGA
701 GAAACGTTTC AAAATTTTCA TCTCTGTTC TCTGCTGCCT ATACCAAATC ATGTAGAGGA AGAAGAAAGA AAAGAGCTTT TGACTATGTG TCTTTTTTCT
801 TATAGATCGA AACCTGGTGT GAATGACACT GCTGGGCTTA GTTTGGGAAC TACCAACACA AGCAATGCCG TTATAGAGGA GAAAGAGGTA TGATGACATT
901 GCCCACACTT TGATTTTTTT TTTTTCATTT TAAATGTATA AGAGTAGCTT AACTTATGCT TGGTTTAGGC TGCCAAAGTC TCCAATAAGA GTTTCTTTGA
1001 GATGACAAA GAGTAATAAT GGAGAGGAGA ATCGTTTTTT CAAACTCTCA TTGTCTTTGA GAAAGTAAGA TCTAACTTTT TGTTTTGGTG TTAGGCTTTT
1101 TGAAGCTAT GTTTGTTTGC TTTTTTTTTT CTTTGTCTCT AGATCATAAT GAAGTGTTG AAATTTGGAT GTAATAAAT TTATTCCCTG CTGCCACTTT
1201 TAGTTCCTCT CTTACAAGTG TGCTTCATAA AATTCATCTT TCCACTATAG CAAACAGATC CATTTTCTTC GGATTAATAT GCAACATGCA CTACTTTTAT
1301 CAAACAAAAT AATTAGACAT GGAGTATAAG AAGAAACAGA GTTGCTTATG CTTACGTGGG GGAAGACTTG TCAAGATAAA TATAAAATAG AATGGGTGTG
1401 TTGCTCTCTT CTTCTATGCA GTCACATAGA TTAAGGTTTG AATIGATGAC GGTATGCTC GTGAGAGAAAT TGTTGGTTAC AATAAGACAA ATGTAAATTT
1501 AGTTATTATC AGCTTGTTAA AAGATAAGAC AAACGAGAGA AAAACGAAGA ACAGACAGAC CAAACAAAAC GGTCCAACCG GTCGGGTTAA CAAAACACTG
1601 AAAAAGGCGC CAACAGCCTT GTTACGTAAA CGGTAGCCAC GTTTCGAGCA CTGCGTTTGC TAATTTGTCT TCACTGAAAT TCGCAGTGT CTTCCTCGCG
1701 ATTTCCGTTT ATGTTTCGTT GAGCTACTGA TTTGCATGCA AGGCTAGTGA CACTAAGAAG CGGAGAAAAT GAGAAATATT TACTTTCTAG TCTTATTCTT
1801 GTTGAGCATC TTGATCTCCA TACATGCTTC TTTGCATGTG AAGTATCTTC CTGGTCTTGA AGGTCTCTT CCTTTGAGC TCGAGACAGG GTAAAATGAA
1901 GTCATCTCTC TCACTTCAAT TTGTTATAAA AAAATCCTTA ATCTAAGACA TGCTCTTTC TTCTTTGCTG CATGTGGTTT TATATAATAA GGTATGTGAG
2001 TGTTGGTGA TCTGGAGATG TTGAGCTCTT CTACTIONTTT GTGAAATCAG AGAGAAATCC AGATAAAGAT CCTCTCATGA TTTGGCTCAC TGGTGGCCCT
2101 GGATGCAGCT CCATTTGTGC TTTACTCTTT GGAATGGTA AACAAATCTT TTTTTTTTAA TTGTATTAA TGAGTCTTAA CTACTIONTT TACTTGGTGC
2201 ATGTGTTG TGATTTCTGT TTTCTGATTA GGGATCCCAT CTTGAAACTA TATTTTAAAG CTACTIONTT TAATTAACA CATCTAATTG ATATGCATGT
2301 CTTCACTATT AAATAGCTTA ATTGCATGTG TGGTGTGATT CTCTTATGTT TTAAGGGTTA GGACAAGTGT AACTAATGCA TCGCTTCTGT AAAAAATAGT
2401 TTAGTTGCAT GCAGTACCGT GCAAACGTTT TCGGAAGTCC GACGCGAGTT CAAAAATATA TTTTACATGA TATATTTTAA ATAATATATA TATATAACTC
2501 TCAAAAATTT TAAATTATTA CATAAACGTT TTTTAAATTT TTTTCATCAA AATTTTATAA AATAAAAATTT TTAATCATG AACAAAAAGT ATGAATTTGT
2601 AATATAATAA CAAAGATATA AATTTTGTAT TAAATGTGT ATAGCTGTAA AAAATGTAAA TCTTAACATT TAAATTAACT ATAGTAAAAA ATATATTGAA
2701 AATATTATAT TTTCTTTATC AAATCTCAT AAATATATAA AATAAATCTA ACTCATAGCA TATAAAAGAA AAGACCAATG TGATCAATAA TTTACAGTTT
2801 TTTAGAAGTC GAATCTTTAT AGTTTTATTT AAAATATAGC AAAAATAATC ACAAACCTAG TTAATTTAAA CAGAAGTCCA ATTTAAATTC AAATAAAAAA
2901 AAAAATCTAA CTAAGAGAAT ATGTAACTA CCGTGTAATA GTATTGTGTT TTGTAATTTG GAGCCCTAAA ATTTCTATAA AATTTAGGGC CTCTCTGTGT
3001 GCATGTGTTG TGTGATTTT ATAATGTTG GAGGGTTAAG ACGAGCTTAA TTAATGCATG TGTCTGTGA TATATAATTT AGTTTATGCA TGTGTAATGT
3101 GTTGTGTGAT TTTTATTAAT TTTAAATGTT TTTCTCAGGT CCATTTGCAT TTAGAGGGGA TGTGTATAAT GGGACAGTGC CTCTTTAGA GCTAACATCT
3201 TATTCTTGA CAAAGGCGAG AGATTAATTA CCAATTTTAT AATGCTTTCC TCTGTAATAC CAACATCTTG CTTCTAAAGA GAATGTGTAT ATGTATACTC
3301 AATTTTTTTT CAGGTGGCTA ACATTTTATA TTTGGAATCT CCTGCTGGTT CTGGATATTC TTATGCCAAA ACTCGGGCTG CTGCTGAGAC GAGCGACACC
3401 AAACACTIONT TAGAGATAAA TGTCCACAT CGGATATTGG AAGGATTCTT TAGCAATATA TAAGATGGAT GAGTCACTCC ACTTAGCACC AATGGTTTTT
3501 AGGTTGGAAG CCCACTTAGC TTAACATGGT ATCAGAGCCC GATCCACGCA GTCCAATCCG ATCCATTATC GATCCAGCCC AAAGTTGGCC CATCGATCTT
3601 TGCCCGAACA TTCCGAGATT GACGCTCAA GAGCCATCAT CTCGAGGAGG CGTATTAGGG AATAATGTCC CACATCGGAT ATTGGAAGGG ATCTTAGCA
3701 ATATATAAGA TGATGAGTC ACTCCACTA GCACCAATTG GTTTTAGATT GGAAGTCCAT CTAGCTTAAC AACAACTIONT CCAACTIONT CAGTTCCCTA
3801 GGAGTGTGA GTGTTCTCTC TTTATTATAG CCTAGCTTTC TTGATGATT TGGCTTTATT TTCTAAAACT TTTCACTIONT TTCTGCTGT TAGTGGTTTT
3901 TGGATCACCC TGAGTTCATA TCAAATCCAT TTTATGTTGG TGGAGATTCA TACTACGGGA AGATTGTTCC AGGAGTTGTG CAACAGATTT TACTTGGTAT
4001 TTTCACTIONT CCACCACCT ATGCCCTCTCT TGTATTTTCT TATATTTTAT ATCAAAATATT TTGATCACAT TTTCAACTIONT GAAACAGGA AATGAGAAAG

```

4101 GTCTCACACC ACTGATAAAT ATTCAGGTAA CAAAACATA TTCCTCTTT TTTCTTTAA CTGAATATAT ATATATTCGG TTGAGATTTA TTTATATAAA
4201 CTGAGCAGGG ATATGTTCTT GGAAACCCTA CGGTAAGTGC AAACCTTGAA TCAAATCATA GAGCTTCATT TCGCATCGG ATGGGACTGA TTTCAGATGA
4301 GCTCCACGAG GTATATGATT TTTCTTCTT CATCATCATC GATCATGTGA TTCTTGAGAC ATTTGGTTAC AATCTTGTTT ACATCACTAC TATATGCAGT
4401 CACTTGAAAG AAATTGTGGA GGCAAATTCT TTAACGTAGA CCCAAGTAAT GCAAAATGCT CAAATGGTCT TCAAGCTTAT GATCAGGTAA GGATTATAGT
4501 AAAAAACACC ATACGAAGTA TCTGCATGCA TTTTTCACAA ACTAACTTGT CTCTTTTTTT TTGTTTGAGT TCTTAGTGTA TCTCAGAGAT ATACATAGAG
4601 CAGATTTTGT TACCAAACTG CAAAGTAGAT TATGTCCTAC CAGACATATC ACTACCTAAC ATCAGAACCA GTAGAAGAAG AGAACTCAAG GAGTTTTCAG
4701 GAAATGATTC ATCATCATFG CCTCCTCCTA GATGCTTCGT AAGAATCTCC TTTTTTTTTT GGTATTTTG TATATTATA GGTTAATGAT AACACTTTTCG
4801 TATTCTCAGA CTTATAGTTA TTTTCTGTCT GCCTTTTGGG CAAACGATGA AAATGTACGA AGCGCTTATG GCGTGAAGAA GGTACCTATG TGAAACTTTG
4901 TTTCTTGTTT TAAATTGAAA ACTTAACACA ACCTGACCAA TTAATGTTT AAATATTATG CAGGGGTTT GAAAATGGAG TAGATGCAAC ACCCTAAACA
5001 TACCATATAC ATATGATATT CAGGATGCCA TTCCATATCA CGTTAACAAT AGCCGTAAG GCTTCCGCTC TCTCATCTAC AGGCAAGATT ATTGTTTGTT
5101 GATGCGCCAT CTTCTCTTTT TTTTGGAGTA ACAAAGCAT TCATGATTAA GTCACAACT AAATATTTGC AAAATTTTAA ACAGTGGCGA TCATGATATG
5201 ATGGTACCTT TCTCTCAAC TGAAGCATGG ATCAAATCTC TCAACTATTC CATTGTTGAT GACTGGAGAC CTTGGATGAT GACTAGCAAT CAAGTTGCTG
5301 GGTAAAGTGA AAACAAAGTC ATGTTTCACT CCTTTATCAT CAACCTTCAT ATCTCCTTCC TGAATGATCT TTAACACAC TCAGATTGTT TCCTGTGTTT
5401 TGTAGATATA CAAGGAGCTA TGCAATAAG ATGACATTG CAACCATCAA GGCAAGAAGT TCTAACCCCT TTCTTTCTTT CTTTCTTCTT TTCTTTCTTC
5501 TCTAGTGTTC TACTGGTAG AATTACAAAT GATATAGAGA GTGTTTGATA TATGTAGGGA GGAGGACACA CTGCTGAGTA TAATCAAGAC CAATGTTTAC
5601 TTATGTTCAA AAGATGGATT GATGGTGAAT CTCTCTGA

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Strack und Herrn Dr. Carsten Milkowski vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung und Beratung sowie für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Bei Frau Dr. Bettina Hause, Herrn Dr. Thomas Fester und Herrn Dr. Thomas Vogt möchte ich mich ganz herzlich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die praktischen Ratschläge bedanken und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Herrn Dr. Alfred Baumert danke ich für die Hilfe bei technischen und biochemischen Fragen, sowie für viele interessante und anregende Diskussionen.

Frau Claudia Horn möchte ich meinen Dank für die tatkräftige Unterstützung, die Durchführung von vielen Routinearbeiten und für die Bereitstellung von „Motivase“ aussprechen.

Bei Herrn Dr. Gerd Hause vom Bio-Zentrum Halle bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung am Elektronenmikroskop.

Der gesamten Abteilung Sekundärstoffwechsel möchte für die herzliche Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit danken. Für die vielfältigen, nicht nur fachlichen Gespräche und die aufmunternden Worte danke ich insbesondere Dirk, Felix, Heike und Kathleen. Ich werde euch vermissen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, die mich immer unterstützt und mir Kraft gegeben hat sowie bei meinem zukünftigen Mann Alex (bald ist es soweit...), dafür das er nie die Geduld verloren hat und es immer geschafft hat, mir ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Publikationen, Poster und Vorträge

Publikationen:

Schmidt D, Strack D, Milkowski C (2006) The final enzyme in sinapin biosynthesis: genes, regulation and localisation., in progress

Milkowski C, Baumert A, Schmidt D, Nehlin L, Strack D (2004) Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant Journal* 38(1): 80-92

Fester T, Hause B, Schmidt D, Halfmann K, Schmidt J, Wray V, Hause G, Strack D (2002) Occurrence and localisation of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol* 43(3): 256-265

Fester T, Schmidt D, Lohse S, Walter MH, Giuliano G, Bramley PM, Fraser PD, Hause B, Strack D (2002) Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Planta* 216(1): 148-154

Vorträge:

Schmidt, Diana Reduktion des Sinapingehaltes in *Brassica napus*., Abschlußveranstaltung „NAPUS 2000“, 28. Oktober 2005, Hohenlieth

Schmidt, Diana The final enzyme in sinapin biosynthesis: genes, regulation and localisation, Institutstagung des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie, 15.-16. September 2005, Wittenberg

Schmidt, Diana Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*, ISC – First IPK Student Conference, 23.-25. Juni 2005, Gatersleben

Poster:

Schmidt Diana, Strack Dieter, Milkowski Carsten Reduktion des Sinapingehaltes in der Rapssaat, Fachtagung „Wirtschaftskraft Pflanze“, 19. Oktober 2005, Hannover

Schmidt Diana, Stehle Felix, Strack Dieter, Milkowski Carsten From Hydrolases to acyltransferases: Serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plant phenylpropenoid metabolism, 5.-10. September 2004, Hannover

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Diana Schmidt
Anschrift: Wielandstr. 26
06114 Halle
Geburtsdatum: 26.08.1974
Geburtsort: Lutherstadt Eisleben

Schul- und Berufsausbildung

09/1981 - 07/1990 POS „Robert Büchner“, Lutherstadt Eisleben
09/1990 - 07/1993 „Martin-Luther-Gymnasium“, Lutherstadt Eisleben
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
09/1993 - 09/1994 Berufsausbildung, Württembergische Versicherung, Leipzig

Studium und Beruflicher Werdegang

10/1994 - 04/2000 Studium der Biologie, „Martin-Luther-Universität“, Halle
05/2000 - 05/2001 Diplomarbeit, „Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie“, Abt. Sekundärstoffwechsel, Halle: „Rolle der Carotinoidbiosynthese bei der Ausbildung der symbiontischen Interaktion zwischen *Zea mays* und *Glomus intraradices*“
06/2001 - 09/2001 Wissenschaftl. Hilfskraft, „Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie“ Halle
10/2001 - 04/2006 Promotion, „Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie“, Abt. Sekundärstoffwechsel, Halle
ab 05/2006 Wissenschaftliche Angestellte, Institut für Pflanzenzüchtung und Kulturpflanzenforschung, Abteilung Molekulare Genetik, Gatersleben

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertationsschrift erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe. Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, 28.04.2006