

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie
Abteilung Biochemie



seit 1558

Charakterisierung der Isopentenylidiphosphat-Isomerase
sowie Herstellung und Verifikation von transgenen Linien
in *Populus canescens*

Bachelorarbeit
zur Erlangung des Grades eines

Bachelor of Science

vorgelegt von

Anna Sorg

aus Jena

Jena, 16.02.2016

Gutachter:

Prof. Dr. Ralf Oelmüller

Dr. Axel Schmidt

Abkürzungsverzeichnis

IDI- Isopentenldiphosphatisomerase

IDP - Isopentenylidiphosphat

DMADP- Dimethylallyldiphosphat

GDP -Geranyldiphosphat

FDP - Farnesyldiphosphat

GGDP - Geranylgeranyldiphosphat

P. canescens - Populus canescens

P. nigra - Populus nigra

P. trichocarpa - Populus trichocarpa

ÜE - Überexpression

PCR-Polymerasekettenreaktion

RT- Raumtemperatur

ÜN - über Nacht

OW - über das Wochenende

pCAMGW - pCAMBIA2301

SD - Standardabweichung

Einleitung

Kurzprofil Pappeln

Die Graupappel *Populus x canescens* ist ein natürlicher Hybrid aus der Silberpappel *Populus alba* und der Zitterpappel *Populus tremula*. Wie ihre Elternspezies kommt sie in Europa und in den nördlichen Teilen Asiens vor, sie wird bis zu 35 Meter groß. Ebenso wie die haarfrüchtige Pappel *Populus trichocarpa*, die aus Nordamerika stammt. *Populus nigra*, die Schwarzpappel, ist in Europa heimisch. Die Unterart *Populus nigra* var. *betulifolia* ist durch Hybridisierung mit wirtschaftlich profitableren Pappelsorten in ihrem Bestand bedroht [1].

Das klassische Habitat der Pappeln in Mitteleuropa sind Auenwälder [2]. Viele Pappeln zählen zu den typischen Pionierpflanzen. Allgemein zeichnen sie sich durch Raschwüchsigkeit [2], weiches, wenig haltbares Holz aus, das mit einer Dichte von $0,34 \text{ g/cm}^3$ relativ leicht ist [2].

Pflanzliche Verteidigung

Samenpflanzen befinden sich als photoautotrophe Organismen am Fuße vieler terrestrischer Nahrungsketten, wo sie einen Großteil der Biomasse produzieren. Angiospermen und Gymnospermen hatten viele Millionen Jahre Zeit um im Wettlauf mit Fraßfeinden ausgefeilte Verteidigungsstrategien zu entwickeln und zu verfeinern. Einzelne Pflanzen stehen dabei in Konkurrenz zueinander: wer am ungenießbarsten ist, wird mit geringerer Wahrscheinlichkeit Herbivoren zum Opfer fallen. Einige Pflanzen bilden Dornen oder Stacheln aus, andere setzen auf eine möglichst feste Rinde oder ein zähes Gewebe, aber auch das Repertoire der chemischen Verteidigung von Samenpflanzen ist erstaunlich vielfältig.

Manche Stoffe wirken durch die schiere Menge mit der sie produziert werden, andere wie Toxine, wirken in geringen Mengen, sie sind jedoch für spezialisierte Herbivoren

keine Fraßbarriere [3].

Bei der Verteidigung von Pflanzen kann man unterscheiden zwischen verschiedenen funktionalen Stoffgruppen. Die verstärkte Bildung von Phytoalexinen wird durch einen Befall mit Pathogenen oder eine andere Schädigung induziert [4, 5]. Sie wirken antibakteriell oder gegen Pilze [4]. Es gibt auch Stoffe die durch unangenehmen oder bitteren Geschmack durch Abschreckung als Fraßschutz wirken. Toxine vergiften die Herbivoren und einige Stoffe haben die Chemie der Verdauung des Fraßfeindes als Ziel: sie können die Nahrungsverwertung beeinträchtigen [6].

Als Phytoalexine wirken zum Beispiel einige Terpene, darunter Diterpene und Sesquiterpene [4], einige phenolischen Verbindungen [4], und auch Tannine, die zu den phenolischen Verbindungen gehören [3, 4], können Phytoalexine sein [4].

Tannine schrecken viele Herbivoren ab. Einige Tannine sind giftig für Insekten, Säuger und Vögel. Bei Monogastriern inhibieren sie die Verdauungsenzyme und führen zu Verdauungsproblemen [4]. Pflanzen mit hohem Tanningehalt werden von Rindern gemieden [4].

Eine allgemeine pflanzliche Verteidigungsstrategie gegen Pathogene ist die hypersensitive Reaktion, bei der das befallene Gewebe durch programmierten Zelltod abstirbt [5]. Bei systemischen Antworten auf Schaden oder Infektion spielen die Pflanzenhormone Jasmonsäure und Salicylsäure eine wichtige Rolle [5]. Bei der systemischen Verwundungsantwort wird Jasmonsäure aktiviert [7]. Jasmonsäure und seine Derivate induzieren die Erhöhung der Expression vieler verwundungsspezifischer Gene [3] wie zum Beispiel Proteinaseinhibitoren, die für Insekten giftig sind [5]. Das Peptid Systemin, das offenbar vorwiegend in Solanaceen untersucht ist [5] erfüllt eine Signalfunktion. Es wird nach einer Verwundung gebildet und über das Phloem transportiert [5, 7]. Es induziert die Bildung von Jasmonsäure, und so kann die von Jasmonsäure hervorgerufene Verwundungsantwort von Systemin vermittelt werden [7].

Bei Infektionen werden, induziert durch Salicylsäure, sogenannte PR-Proteine (pathogenesis related) vermehrt gebildet [5]. Salicylsäure kann über das Phloem transportiert werden, sie vermittelt die systemische Immunisierung [5].

Verteidigung der Pappel

Spezifisch für das Taxon Salicaceae, zu dem auch die Pappeln gehören, sind die Phenolglycoside [8]. Auf generalistische Herbivoren, insbesondere weidegehende Säuger, sowie auf Insekten, wirken sie abschreckend [8]: Hohe Phenolglycosid-Level resultieren nachweislich in einem geringeren Konsum oder dem Vermeiden des Verzehrs dieser Pflanzen oder Pflanzenteile durch Herbivoren [8].

In einem Großteil der Fälle besitzen Phenolglycoside eine Grundstruktur aus Salicylalkohol der über eine Etherbindung mit β -D-Glucopyranose verbunden ist [8]. In Tabelle 1 werden einige Phenolglycoside, und die Pappelspezies, in der sie vorkommen, aufgelistet.

Verbreitung von Phenolglycoside in Pappelspezies	
<i>p. alba</i> und <i>p. tremula</i>	Salicin, Salicortin, Salireposid und Tremuloidin
<i>p. nigra</i>	Salicin, Salicortin und Nigracin
<i>p. trichocarpa</i>	Fragilin, Salicin, Salicortin, Salicyloylsalicyl, Salireposid, Tremulacin und Tremuloidin

Tabelle 1: Vorkommen von Phenolglycosiden in Pappelspezies [8]

In Pappeln werden Polyphenoloxidase, Trypsininhibitor und einige Chitinasen nach einer Verwundung erhöht exprimiert [6]. Pflanzliche Chitinasen gehören zu den PR-Proteinen [5]. Auf die Raupen von *Malacosoma disstria*, einer Mottenart, hat die Phenoloxidase, wenn sie verstärkt von Pappeln gebildet wird, einen negativen Effekt [6]. In der Zitterpappel werden als Folge von Verwundung oder Fraßschäden vermehrt Gene zur Flavonoidbiosynthese exprimiert [6]. Damit wird eine erhöhte Proanthocyanidinbildung in Verbindung gebracht [6]. Proanthocyanidine können als Phytoalexine funktionieren [4].

Eine Verwundung hat auch bei Pappeln eine erhöhte Bildung von Terpenoiden zur Folge [6]. Jedoch sprechen Major und Constabel Terpenoiden nur eine untergeordnete Rolle in der Verteidigung von Pappeln zu [6].

Terpene

Bislang sind mindestens 25000 [4] bekannt. Aber die wahre Anzahl liegt wahrscheinlich darüber. Dennoch sind alle Isoprenoide aus den Grundbausteinen IDP und DMADP aufgebaut [9], zwei C-5 Einheiten [4] deren chemische Konstitution sie wie geschaffen dazu macht, Ausgangspunkt einer ganzen Naturstoffklasse zu sein.

Das Addieren von IDP an DMADP geschieht durch eine 1'-4 Kondensation [10]. Katalysiert von der Dimethylallyltransferase, besser bekannt als Geranyldiphosphatsynthase [11], verläuft diese Reaktion wie folgt: Am C1'-Atom des DMADP geht die Diphosphatgruppe ab, dadurch entsteht ein Carbokation, das durch die Position der Doppelbindung im DMADP stabilisiert ist. Die π -Elektronen der Doppelbindung zwischen dem C3- und C4-Atom am Kopfende des IDP greifen das Carbokation am C1' des DMADP nukleophil an und die positive Ladung wird an das C3-Atom des IDP verschoben, sie wird eliminiert durch den Abgang eines Wasserstoffatoms am C3-Atom des IDP [12].

Aus IDP und DMADP bilden sich die Prenyldiphosphatvorläufer Geranyldiphosphat, Farnesyldiphosphat und Geranylgeranyldiphosphat. IDP und DMADP bilden durch 1'-4-Kondensation Geranyldiphosphat [10]. Farnesyldiphosphat und Geranylgeranyldiphosphat entstehen durch sukzessive Addition von IDP [9, 10]. Dies geschieht durch 1'-4-Prenyladdition [10], die dem selben Reaktionsmechanismus folgt wie die 1'-4-Kondensation.

Von den drei Prenyldiphosphat-Vorläufer leitet sich die Vielzahl von Terpenen und Terpenoiden ab (Abb. 1). Aus Geranyldiphosphat leiten sich die Monoterpene ab, Farnesyldiphosphat ist der Vorläufer von Sesqui- und Triterpenen, und aus GGDP werden die Diterpene und Tetraterpene gebildet. [4]

Die Terpenvorläufer können auf vielfältige Art und Weise modifiziert werden. Zwei klassische Reaktionen, durch die das Kohlenstoffgerüst eines Terpenvorläufermoleküls modifiziert werden kann sind Zyklisierung und Kettenverlängerung[10]. Cytochrom-P450-Enzyme können Terpenoidvorläufer oxidieren [10]. Isoprenoide, die Sauerstoffatome enthalten, werden als Terpenoide bezeichnet [4] und solche, die lediglich Kohlenwasserstoffe sind, als Terpene [4].

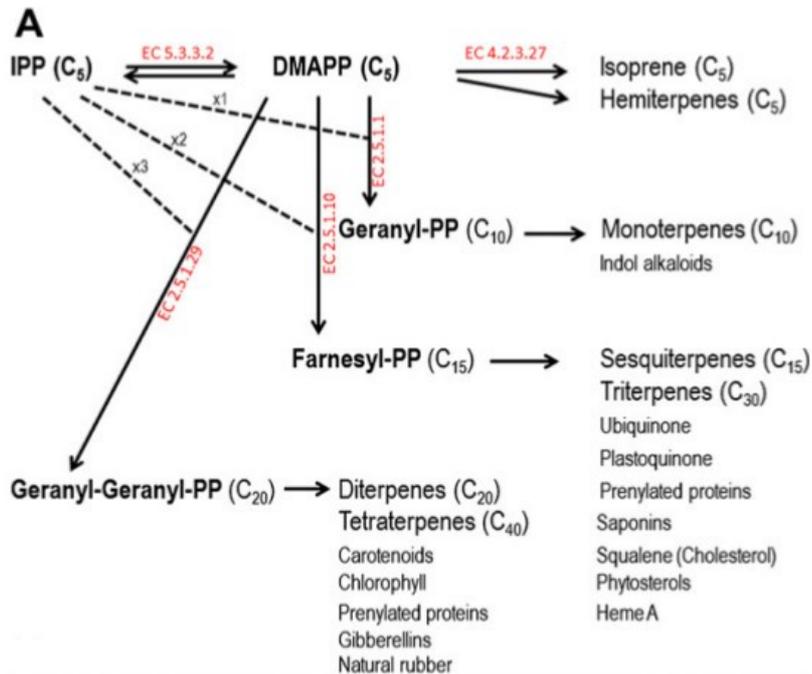


Abbildung 1: Schema der Bildung der Prenyldiphosphatvorläufer aus IDP und DMADP; Quelle: [10]

Terpene werden von Terpensynthasen aus den drei Prenyldiphosphatvorläufern gebildet [4, 9]. Sehr häufig zyklisieren Terpensynthasen ihre Substrate [4], die meisten Terpene sind zyklisch [9]. Viele Terpene sind chiral [9] und mit steigender Kettenlänge bieten sich mehr und mehr Kombinationsmöglichkeiten.

Terpene spielen eine wichtige Rolle im Primärmetabolismus:

Polyterpene [4] in den Elektronenüberträgern Plastoquinon und Ubichinon ermöglichen die Membrangängigkeit, Carotenoide sind Tetraterpene [3] und die Phytolseitenkette vieler Chlorophylle ist ein offenkettiges Diterpen [3].

Von den Terpenen abgeleitet sind auch einige pflanzliche Hormone: Gibberelline, Abscisinsäure, Brassinosteroide und Cytokinine [3, 4].

Hemi-, Mono- und viele Sesquiterpene sind flüchtig und erfüllen so eine wichtige ökologische Rolle als Signalstoffe [4]. Auch als solcher können Terpene eine Rolle in der Verteidigung von Pflanzen und auch von Pappeln spielen [13]. Als flüchtige Stoffe können sie Anziehend oder Abschreckend auf Tiere wirken [4]. Terpene und Terpenoide können auch als Insektizide und Pestizide wirken [10] oder giftig sein [4].

IDP und DMADP können in der Pflanzlichen Zelle auf zwei Wegen gebildet werden: über den Mevalonatweg (MVA-Weg), oder über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) [10]. Diese beiden Stoffwechselwege rekrutieren die Ausgangsstoffe aus dem Zuckerstoffwechsel [10]. In der pflanzlichen Zelle ist der Mevalonatweg im Cytosol lokalisiert, während der Methylerythritolphosphatweg im Plastiden lokalisiert ist [4, 10]. Beim MVA-Weg wird pro drei Acetyl-CoA-Molekülen ein Molekül IDP gebildet [4]. Traditionell wird die IDI als das letzte Enzym des MVA-Wegs [4] bezeichnet, durch sie wird ein Teil des IDP zu DMADP umgebildet. Beim MEP-Weg werden aus je einem Molekül Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat entweder ein Molekül IDP oder ein Molekül DMADP produziert. Das verantwortliche Enzym, die Hydroxymethylbutenyldiphosphatreduktase [14] produziert netto IDP und DMADP im Verhältnis von 5,6:1 [10].

IDI allgemeine Informationen

Die reversible Umwandlung von IDP in DMADP wird von der Isopentenildiphosphatisomerase (IDI) katalysiert [10], dabei ist Mg^{2+} ein essentieller Cofaktor [10]. In vitro ist das Reaktionsgleichgewicht von DMADP und IDP in Anwesenheit von IDI aus *p. trichocarpa* 2,11 :1 [15]. Dadurch, dass sie eine Verbindung zwischen den Pools von IDP und DMADP herstellt [10], ist durch die IDI gewährleistet, dass für die Terpenbiosynthese stets die benötigte Menge beider Stoffe vorhanden ist. Die bidirektionale Umwandlung von IDP in DMADP durch IDI ist für die Terpenbiosynthese höchstwahrscheinlich limitierend [15]. In der Regel wird die IDI in Pflanzen von zwei verschiedenen Genen codiert [16]

Es kommen normalerweise zwei Isoformen der IDI in Pflanzen vor, oder auch mehr [10]. Und zwar ist die längere im Plastiden und die kürzere im Cytosol. In Pflanzen findet man die IDI zusätzlich im Mitochondrium und im Peroxysom [10].

Es gibt zwei verschiedene Familien von IDI [10], die sich beide aus verschiedenen Ursprüngen entwickelt haben. In beiden Familien haben sich hochkonservierte Motive und funktionale Aminosäuresequenzen erhalten [10]. Die meisten Organismen haben eine der beiden Formen [10]. Eine Ausnahme bildet das Bakterium *Streptomyces*

griseoflavus, der beide Formen besitzt [10]. Es kommen auch Mikroorganismen vor, die keinen der beiden Typen der IDI besitzen, aber dabei handelt es sich auch um Ausnahmen [10]. Die Tatsache, dass die IDI ubiquitär vorkommt, untermauert, wie wichtig es ist, dass die Pools von IDP und DMADP durch dieses Ventil verbunden sind.

Die Typ 1 IDI kommen von Bakterien bis zu Eucaryonten in vielen Organismen vor, und somit auch in Pflanzen und Tieren [10]. Sie gehören zur NUDIX- Superfamilie[10] und benötigen Mg^{2+} für ihre katalytische Aktivität[16]. Es wird angenommen, dass Typ1 IDIs meist als Monomere vorkommen [16]. Die Sequenz von Typ 1 IDIs ist kürzer als diejenige von Typ 2 IDIs[10].

IDIs vom Typ 2 sind Flavoproteine, deshalb benötigen sie reduziertes Flavinmononukleotid (FMN H_2) und Mg^{2+} für ihre Aktivität[16]. Typ 2 IDI kommen normalerweise als Tetramere vor [10, 16] und sie gehören zur TIM-Barrel-Familie [10]. Grampositive Bakterien, einige wenige Archaeen, Proteobakterien und Cyanobakterien besitzen Typ 2 IDI [10].

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Plasmide hergestellt werden - einer der einen RNAi-Konstrukt für die IDI trägt, und einer der das IDI Gen hinter einem starken Promoter enthält – damit mit diesen Plasmiden transgene *p. canescens*-Linien hergestellt werden können. Mithilfe von qualitativer Real-Time PCR sollten die zu erwartenden Veränderungen in der IDI-Expression der transgenen Pappellinien überprüft werden.

In einem zweiten Experiment sollte die Auswirkung von Verwundung auf die Expression der IDI in *p. canescens*, *p. nigra* und *p. trichocarpa* untersucht werden. Dieses Experiment sollte ebenfalls per qualitativer Real-Time PCR ausgewertet werden.

Material:

Geräte:

Serie	Hersteller	Verwendung
T-Personal Combi	Biometra	PCR-Cycler
Mupid 21	Cosmo Bio	Elektrophoresekammer
Nanodrop 2000c	Thermo Scientific	Konzentrationsmessung
ABI Prism®-Gen-Analysator 3130xl	Applied Biosystems	Sequenziergerät
Gene Genius Bioimaging System	Syngene	Geldokumentationssystem
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories	qRT-Gerät
Centrifuge 5415 D	Eppendorf	Zentrifuge
Centrifuge 5417 R	Eppendorf	Zentrifuge
Thermomixer Comfort	Eppendorf	Thermomixer

qRT-PCR - weiteres Zubehör und Software

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
CFX Manager™ Software Version 3.1	Bio-Rad Laboratories	qRT-Software
Hard-Shell® PCR Plates 96 Well	Bio-Rad Laboratories	Mikrotiterplatte für qRT

Kits, Enzyme und Puffer

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research	Gelextraktion
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (250) Kit	strattec molecular	Plasmidaufreinigung
InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit	strattec molecular	RNA Isolation

Fortsetzung Materialliste: **Kits, Enzyme und Puffer:**

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Fast Start High Fidelity PCR System dNTPack	Roche	PCR Polymerase-Kit
Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies	qPCR
Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix	Life Technologies	Gateway Klonierung
Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix	Life Technologies	Gateway Klonierung
Superscript III® Reverse Transcriptase	Life Technologies	cDNA-Synthese
Big Dye (Version 1.1)	Applied Biosystems (Vertrieb)	Sequenzierung
GoTaq® G2 DNA Polymerase	Promega	Kolonie-PCR
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega	Kolonie-PCR
T4 DNA Ligase	New England Biolabs Inc.	Ligation
10x Buffer for T4 DNA Ligase	New England Biolabs Inc.	Ligation

Verwendete Restriktionsenzyme und Puffer für den Restriktionsverdau

Bezeichnung des Enzyms/Puffer	Hersteller
Xba I	New England Biolabs Inc.
BamH I	New England Biolabs Inc.
Avr II	New England Biolabs Inc.
Bgl II	New England Biolabs Inc.
Spe I	New England Biolabs Inc.
Hind III	New England Biolabs Inc.
CutSmart™ Buffer 10x Concentrate	New England Biolabs Inc.
NEBuffer 3 10x Concentrate	New England Biolabs Inc.

Molekulargewichtsstandards

Bezeichnung	Hersteller
1Kb DNA Ladder	Life Technologies
1 Kb Plus DNA Ladder	Life Technologies

Antibiotika

Name	Massenkonzentration der Stammlösungen
Carbenicillin	50 mg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml
Gentamicin	50 mg/ml
Kanamycin	50mg/ml

In der Arbeitslösung liegt jedes der verwendeten Antibiotika um das 1000-fache verdünnt vor, im Vergleich zur Stammlösung.

Lösungen und Nährmedien

LB-Flüssigmedium(Miller) Zusammensetzung pro Liter H₂O

10g Pepton
5g Hefextrakt
10g NaCl

LB-Agar(Lennox) Zusammensetzung pro Liter H₂O

10g Pepton
5g Hefeextrakt
5g NaCl
15g Agar

TBE ¹

108 g Tris
55 g Borsäure
40 ml 0,5M EDTA, pH 8.0
auf 1 l auffüllen mit H₂O

1 0,5x TBE wurde verwendet als Laufpuffer bei Gelelektrophoresen, sowie zum Gießen von Agarosegelen

Bromphenolblau Probenpuffer

50% Glycerin
1mM EDTA
0,25% Bromphenolblau
auffüllen mit: TBE

Orange G Probenpuffer

50% Glycerin
1mM EDTA
0,25% Orange G

Verwendete Pflanzen

Von den Spezies *Populus canescens*, *Populus nigra* und *Populus trichocarpa* wurden jeweils sechs Pflanzen für das Verwundungsexperiment verwendet.

Folgende transformierte *p. canescens*-Pflanzen wurden verwendet:

- eine IDI -ÜE Pflanze
- eine IDI-RNAi-Pflanze
- eine Vektorkontrolle des Vektors pCAMBIA2301, die mit dem leeren Vektor transformiert wurde
- drei Vektorkontrollen, die mit dem leeren pCAM1305.2-Vektor transformiert wurden
- zwei Wildtyppflanzen

Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Hersteller
One Shot® TOP10	Life Technologies
XL10-Gold Ultracompetent cells	Stratagene
BL21 Star™ (DE3)pLysS One Shot®	Life Technologies

Durchführung

ÜE-und RNAi-Experiment

Strategie zur Herstellung des RNAi-Konstrukts

Zuerst musste das Sense-, dann das Antisense-Fragment in das Konstrukt hineinkloniert werden. Dazu musste als Erstes das 300 bp lange RNAi-Fragment per PCR amplifiziert werden. Dieses Fragment erfüllte dann im jeweiligen Klonierungsschritt – abhängig davon, an welcher Stelle und in welcher Orientierung es in der Ubi-Intron-Term-Kassette von pTRAIN inseriert wird - die Rolle des Sense- oder des Antisense-Fragments. Zu Beginn jeder der beiden Klonierungen wurde, um das 300bp lange RNAi-Fragment per PCR zu amplifizieren, als Template der Plasmid pDEST15 verwendet, der das vollständige IDI Gen enthielt.

Bezüglich der Restriktionverdaus für die Klonierungen wurden für jede durchgeführte Verdaureaktion drei Ansätze mit verschiedenen Substrat - d.h. DNA-Fragment oder Vektor, und Enzymkonzentrationen - angesetzt. Der Grund dafür ist, dass die optimale Konzentration für das Substrat und auch für die Restriktionsenzyme von Reaktion zu Reaktion variiert, und somit die optimalen Bedingungen für das jeweilige Substrat von Fall zu Fall variiert.

Herstellung der Plasmide für die IDI Reprimierung

Zuerst wurde das Sensefragment per PCR aus amplifiziert, hierbei handelt es sich um pDEST15 in den das vollständige IDI Gen hineinkloniert wurde . Die verwendeten Primer waren PcIDIRNAifor und PcIDIRNAirev. Der PCR-Ansatz wurde auf ein Agarosegel geladen und nach der Gelelektrophorese erfolgte die Aufreinigung des in der ausgeschnittenen Bande enthaltenen Fragmentes aus dem Gel. Dann wurde die Verdaureaktion angesetzt; für das Eluat wurden die Restriktionsenzyme Xba1 und BamH1 verwendet, und für den pTRAIN-Vektor Avr2und Bgl2. Darauf folgte die Ligation des Fragmentes und des Vektors mithilfe der T4-DNA-Ligase. Die Reaktion fand bei 16°C ÜN statt.

Mit dem Ligationsansatz wurden TOP10-Zellen per Hitzeschock transformiert, und auf eine carb-LB-Agarplatte aufgebracht. Nach Inkubation ÜN bei 37°C, wurde mit 8 der gewachsenen Kolonien eine KoloniePCR durchgeführt. Die verwendeten Primer waren Ubiprom-360for und PcIDIRNAirev. Die Kolonien 1, 2, 5 und 6 wurden weiterverwendet. Die ausgewählten Kolonien wurden in 3ml flüssig carb-LB-Medium bei RT im Schüttler über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen noch für 2 Stunden und 35 Minuten im 37°C-Schüttler inkubiert, anschließend wurden die Plasmide via Minipräp isoliert. Anschließend wurde eine Sequenzierungs-PCR angesetzt um durch Sequenzierung sicherzugehen, dass die Klonierung erfolgreich war und das insertierte Sensefragment fehlerfrei genug ist, um mit dem hergestellten Plasmid weiterzuarbeiten. Dabei wurden die Primer Ubiprom-363for und Intron+234rev verwendet. Die Sequenzierung ergab, dass Kolonien 1 und 5 positiv sind.

Das RNAi-Fragment wurde erneut mit via PCR amplifiziert. Die dabei verwendeten Primer waren abermals PcIDI-RNAifor und PcIDI-RNAirev. Nach Gelelektrophorese wurde die Bande, die das Zielfragment enthielt, aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Dann musste das Antisensefragment zwischen Intron und Term in den bereits hergestellte pTRAIN-Vektor, der das Sensefragment trägt, kloniert werden: für den Restriktionsverdau wurden für das aufgereinigte Amplifikat die Enzyme Xba1 und BamH1 verwendet und für den pTRAIN-Vektor BamH1 und Spe1. Nach 2 stündiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurden alle Ansätze auf 1%iges Agarosegel geladen, und anschließend wurden die verdauten Antisensefragmente und der pTRAIN-Konstrukt mit den hineinklonierten Sensefragment mit dem Zymoclean-Kit aufgereinigt.

Nach Ligation über Nacht bei 18°C wurden mit diesen Ansätzen chemisch kompetente Top10-Zellen per Hitzeschock transformiert, die transformierten Zellen wurden auf eine carb-LB-Agar-Platte ausgestrichen. Nach ÜN-Inkubation bei 37°C sind auf der Agarplatte Kolonien gewachsen. Mit acht dieser Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die dafür verwendeten Primer waren Intronfor+560 und Termrev +250. Es wurde mit den Kolonien 1,2 und 5 fortgefahren. Mit diesen Kolonien wurden je 3ml carb-LB-Flüssigmedien beimpft. Nach OW-Inkubation im Schüttler bei RT wurden die Plasmide via Minipräp aufgereinigt. Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen wurde erneut eine Sequenzierungs-PCR angesetzt, wobei die Primer Intronfor+560 und Termrev+250 Verwendung fanden. Es wurde mit dem aufgereinigten Plasmid aus

Kolonie 1 fortgefahren.

Als Nächstes wurde eine Hind-Klonierung mit den aus Kolonie 1 aufgereinigten pTRAIN-Plasmiden, auf denen das vollständige RNAi-Konstrukt ist, durchgeführt. Das RNAi-Konstrukt sollte in den Vektor pCAM1305.2 kloniert werden. Sowohl für den pTRAIN-Vektor aus Kolonie 1 als auch für pCAM1305.2 wurde das Enzym Hind 3 verwendet. Die Verdauungsansätze sind bei 37°C im Wasserbad für 2 Stunden inkubiert. Dabei wird die gesamte RNAi-Kassette von dem restlichen pTRAIN-Vektor getrennt. Da dieser ungefähr so lang ist wie die RNAi-Kassette, musste die Gelelektrophorese besonders lange laufen, damit die beiden Fragmente voneinander getrennt werden konnten. Deshalb wurde für diese Gelelektrophorese ein Probenpuffer verwendet, der Bromphenolblau enthält - anstatt dem sonst verwendeten Orange G-Puffer. Die Laufzeit war mit einer Stunde und zwölf Minuten länger als gewohnt. Nach dem das Gel gelaufen ist, wurden die beiden Banden mit einem Skalpell voneinander getrennt, und jeweils die DNA mithilfe des Zymoclean-Kits daraus aufgereinigt. Die Gelelektrophorese, mit der der verdaute pCAM1305.2-Vektor aufgereinigt werden sollte, ist nur 27 Minuten gelaufen. Die Bande wurde aufgereinigt. Die Konzentrationsmessung der Produkte des Verdauens von pTRAIN hat ergeben, dass die Konzentration für die obere Bande 11,3ng/µl und für die untere Bande 17,5ng/µl ist. Aufgrund der extrem niedrigen Konzentration des Eluats aus der oberen Bande, und früheren Erfahrungen die die Arbeitsgruppe mit diesem Klonierungsschritt gemacht hat, wurde vorerst nur das Eluat aus der Gelextraktion der unteren Bande für die Ligation weiter verwendet.

Bei der Ligation wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, und den Ansatz über Nacht bei 18°C im Schüttler inkubieren lassen. Mit dem Ligationsansatz wurden *E. coli*-Zellen des Stammes XL10-Gold per Hitzeschock transformiert; die transformierten Zellen wurden auf Kan-LB-Agarplatten ausgestrichen, und für eineinhalb Tage bei 28°C im Inkubations-Schrank kultiviert. Anschließend wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern pCAMBIA2-128for und Ubiprom-609rev durchgeführt. Die Kolonien 2 und 5 wurden gepickt, und mit ihnen jeweils eine Flüssigkultur mit Kan-LB-Medium angesetzt, die im Schüttler bei 37°C über Nacht inkubiert sind.

Anschließend wurde eine Minipräp und eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt, die Primer pCAM2-128for und pCAM2+216rev kamen dabei zur Verwendung. Die RNAi-Kassette wurde bei keinem der beiden Plasmide nachgewiesen, sie wurde bei der

Ligation nicht in pCAM1305.2 kloniert.

Mit meinen Ansätzen wurde in dem Projekt nicht mehr weitergemacht, es wurden RNAi-Konstrukte für die Herstellung der transgenen Pappeln verwendet, die von einem anderen Mitglied der Arbeitsgruppe hergestellt wurden. Das Produkt des Hind3-Verdau, welches das IDI-RNAi-Konstrukt enthielt befand sich bei der Gelelektrophorese, bei der die Produkte des Hind3-Verdau, nämlich das RNAi-Konstrukt und der restliche pTRAIN-Vektor, voneinander getrennt werden sollte, letzten Endes in der unteren Bande.

Herstellung der Plasmide für die IDI Überexpression

Für die Herstellung des Überexpressionsplasmids wurde die Gatewaymethode als Klonierungsstrategie angewandt. Zunächst wurde das IDI-Gen aus *p. canescens*-cDNA per PCR amplifiziert, die dabei verwendeten Primer waren poIDIstartgateway und poIDIstopgateway. Mit dem Amplifikat der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Bande mit dem IDI-Gen wurde ausgeschnitten und mit dem Zymoclean-Kit nach Anleitung aufgereinigt. Zum Klonieren des IDI-Gens in pDONR207 wurde mit dem Eluat und dem Vektor wurde die BP-Reaktion angesetzt. Hierfür wurde die BP-Klonase 2 verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei RT wurde die Reaktion am Folgetag durch Zugabe von Proteinkinase K abgestoppt. Mit dem Produkt der BP-Klonierung wurden TOP10-Zellen per Hitzeschocktransformation transformiert, und auf Gent-LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C kultiviert. Acht der gebildeten Kolonien wurden gepickt und eine Kolonie-PCR mit ihnen durchgeführt. Die dafür verwendeten Primer waren pDONRfor und pDONRrev. Die Kolonien 1, 2, 3 und 7 wurden gepickt und jeweils in 4 ml Gent-LB-Flüssigkultur bei Raumtemperatur im Schüttler für zwei Tage inkubiert. Die Plasmide wurden aus den Kulturen aufgereinigt und mit ihnen eine Sequenzierungs-PCR angesetzt, die verwendeten Primer waren pDONR207for und pDONR207rev.

Mit den Plasmiden von Kolonie 1 wurde mit der zweiten Klonierung fortgefahren: mithilfe der LR-Klonase 2 wurde das IDI-Gen in pCAMBIA2301 kloniert. Die LR-Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend wurde das Enzym mit Proteinkinase inaktiviert. Mit den so hergestellten Plasmiden wurden BL21-Zellen via Hitzeschock transformiert. Die trans-formierten *E. coli*-Zellen wurden über

Nacht bei 37°C auf einer Kan-Chloramph-LB-Agarplatte inkubiert. Mit acht der entstandenen Kolonien wurde, unter Verwendung der Primer poIDI-startgateway und poIDIstopgateway, eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Kolonien 3 und 4 wurden weiterverwendet. Diese beiden Kolonien wurden gepickt und in 3ml Kan-Chloramph-LB-Flüssigkulturen für zwei Tage bei Raumtemperatur im Schüttler inkubiert. Aus den Flüssigkulturen wurden die Plasmide isoliert. Anschließend wurde eine Sequenzierungs-PCR mit den Plasmiden aus den Kolonien 3 und 4 angesetzt, dabei wurden wiederum die Primer poIDIstartgateway und poIDIstartgateway verwendet. Die Auswertung der Sequenzierung ergab, dass das IDI-Gen erfolgreich in die pCAMBIA2301-Plasmide, die aus Kolonie 3 aufgereinigt wurden, kloniert wurde. Diese Plasmide wurden im Anschluss für die Transformierung von *A. tumefaciens* weiterverwendet, um transgene Pappeln zu erzeugen.

Transformierung von *p. canescens*

Die im Folgenden beschriebenen Schritte, die zur die Erzeugung der transgenen Pappellinien führen, wurden nicht von mir selber, sondern von einem anderen Mitglied der Arbeitsgruppe durchgeführt.

A. tumefaciens-Zellen des Stammes GV3101(pMP90RK) wurden mit pCAM1305.2 mit IDI-RNAi-Kassette transformiert. Als Vektorkontrolle wurden ebenfalls Zellen des selben Stammes mit dem leeren pCAM1305.2 ohne RNAi-Kassette transformiert.

Für pCAMBIA2301 kam der *A. tumefaciens*-Stamm C58 MP90 zum Einsatz. Zellen dieses Stammes wurden mit den hergestellten Vektoren mit dem hineinklonierten IDI-Gen transformiert sowie mit dem leeren pCAMBIA2301-Vektor als Kontrolle. Die Transformierung geschah durch Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Zellen, wobei für die beiden *A. tumefaciens*-Stämme unterschiedliche Transformationsprozeduren durchgeführt wurden. Die transformierten

A. tumefaciens-Zellen wurden anschließend auf LB-Platten kultiviert. Die *A. tumefaciens*-Linien wurden im Flüssigmedium vermehrt, anschließend pelletiert, und in Acetosyringone und Induktionsmedium resuspendiert.

Zur Herstellung von Explantaten wurden einzelne Triebe von *p. canescens* in Blätter und Stämme getrennt. Aus den Blättern wurden kleine Kreise ausgestanzt und die

Stämme in 0,5 cm lange Stücke geschnitten. In 50ml-Reaktionsgefäßen mit dem Induktionsmedium mit den resuspendierten Zellen der entsprechenden *A. tumefaciens*-Linie wurden die Explantate eine Stunde horizontal im Schüttler inkubiert. Durch den Einsatz der erforderlichen Spezialmedien, wurde die Kallusbildung aus den Explantaten unter Lichtausschluss, und die Sprossregeneration aus den Kalli unter Licht induziert. Die so herankultivierten Einzelsprösslinge sind die Begründer der neuen transformierten *p. canescens*-Linien.

Verwundungsexperiment

Bei diesem Experiment wurde von jeweils 6 Pflanzen der Spezies *Populus canescens*, *Populus nigra* und *Populus trichocarpa* ausgegangen. Pro Spezies wurden je zwei Blätter von 3 Pflanzen verwundet, bei den anderen Dreien handelte es sich um unverwundete Kontrollpflanzen. Pro Pflanze wurden vier Blätter ausgewählt, die auf dem Hauptspross direkt benachbart waren. Diese vier Blätter waren jeweils bei jeder der 6 Pflanzen einer Spezies ungefähr im selben Entwicklungszustand. Auch speziesübergreifend wurde angestrebt das Alter der vier ausgewählten Blätter pro Pflanze konstant zu halten. Bei den drei verwundeten Pflanzen wurden die mittleren beiden der vier Blätter verwundet. Die vier Blätter der Kontrollpflanzen wurden so belassen wie sie waren.

Damit die Proben zu jedem Zeitpunkt des Experiments eindeutig der Pflanze und dem Blatt zugeordnet werden konnten, wurde jede Probe mit einer zweizifferigen Codenumber versehen, wobei die beiden Ziffern durch einen Punkt getrennt wurden.

Die erste Ziffer identifiziert die Pflanze, die zweite Ziffer das jeweilige Blatt dieser Pflanze, und zwar von oben nach unten: das oberste Blatt wird mit Eins nummeriert, das unterste mit Vier. Die Pflanzen 1 bis 3 sind die verwundeten, 4 bis 6 die unverwundeten Pflanzen von *p. nigra*. Die Pflanzen 7 bis 12 gehören zu *p. trichocarpa*; davon sind 7 bis 9 die verwundeten Pflanzen und 10 bis 12 die nichtverwundeten Kontrollpflanzen. Die Pflanzen 13 bis 15 sind die verwundeten *p. canescens* Pflanzen und 16 bis 18 die

Kontrollpflanzen von *p. canescens*.

Bei den zu verwundenden Pflanzen wurden nur die beiden Mittleren der vier Blätter verwundet. Die anderen beiden blieben unverwundet. Somit sind beispielsweise die Blätter 13.1 und 13.4 die nicht verwundeten Kontrollblätter, und 13.2 und 13.3 die beiden verwundeten Blätter der *p. canescens*-Pflanze Nummer 13.

Bei den Verwundungen wurde folgenderweise vorgegangen:

An Tag 1 um 12:20 Uhr wurden alle zu verwundenden Blätter an der Blattoberfläche mit einem Skalpell angeschabt und das Blatt mit dem Skalpell angeschnitten. Die Blätter wurden auf der Ober- oder Unterseite, möglichst zwischen den Blattadern, oberflächlich angeschabt. Das Verwunden aller Pflanzen dauerte ca. 40 Minuten. Am zweiten Tag wurde vormittags die Verwundungsprozedur wiederholt und dreieinhalb Stunden später wurde mit dem Ernten begonnen. Es wurden die vier Blätter pro Pflanze geerntet und sofort auf Stickstoff eingefroren. Die Pflanzenspezies wurden stets in der gleichen Reihenfolge behandelt.

Die Pflanzen der Spezies *p. nigra* und *p. trichocarpa* waren in der selben Inkubationskammer und die insgesamt sechs Pflanzen einer Spezies waren auch in räumlicher Nähe voneinander. Die sechs *p. canescens* Pflanzen dagegen waren in einem der großen Gewächshäuser.

Auswertung beider Experimente via qPCR

Für die Auswertung der Auswirkung der Transformation auf die IDI-Expression wurden Blattproben von acht der transformierten Pflänzchen in Agarkultur geerntet.

Dabei handelte es sich um folgende Pflanzen: eine IDI-Überexpressionspflanze, eine IDI-RNAi-Pflanze, eine Vektorkontrollpflanze des Vektors pCAMBIA2301, insgesamt drei Vektorkontrollpflanzen von pCAM1305.2, wobei von einer dieser Pflanzen zwei Blattproben entnommen wurden, sowie zwei Wildtyppflanzen.

Bei der Pflanze 1305.2-1 gab es kein Blatt was so groß war wie das der anderen.

Deshalb wurde ein jüngeres und ein älteres Blatt genommen.

Die Blätter wurden mit hitzesterilisierter Schere und Pinzette -ebenfalls hitzesterilisiert- von den Pflänzchen abgetrennt, in 1,5 ml Eppendorfgefäße gebracht und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Für *p. nigra* und *p. trichocarpa* wurden nur aus zwei Blattproben pro Pflanze die RNA isoliert. Pro Spezies wurden die Proben von jeweils eine Kontrollpflanze nicht weiterverwendet, nämlich die Proben von Pflanze Nummer 6 von *p. nigra* und die Probe der *p. trichocarpa* 12 . Die beiden Blätter der verwendeten Pflanzen waren die beiden mittleren Blätter mit den Nummern 2 und 3.

Die Proben, die weiterverwendet wurden, sind: 1.2, 1.3, 2.2, 2.3, 3.2, 3.3, 4.2, 4.3, 5.2, 5.3, 7.2, 7.3, 8.2, 8.3, 9.2, 9.3, 10.2, 10.3, 11.2 und 11.3 .

Die Proben des Verwundungsexperiments wurden im Mörser, der mit Stickstoff gekühlt wurde, zu einem feinen Pulver zerstoßen. Das Pulver wurde wieder in die Eppendorfgefäße manövriert, die dann in Stickstoff gekühlt wurden. Diese Handgriffe mussten schnell gehen, weil die Proben gefroren bleiben mussten. Für *p. nigra* und *p. trichocarpa* wurden je die beiden Blätter einer Pflanze gepoolt. Dazu wurde je Blattprobe etwas weniger als 50mg in einem, in flüssigem Stickstoff vorgekühltem, Eppendorfgefäß abgewogen und für die Probe des anderen Blattes der selben Pflanze das selbe Gewicht abgemessen, wie für die erste Probe. Die Proben wurden für diese Prozedur außer zum Abwiegen durchgehend in flüssigem N² gekühlt.

Für die RNA-Isolation für das Verwundungsexperiment und auch für das Überexpressionsexperiment wurde das InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit verwendet. Es wurden allerdings einige Änderungen von der in der Anleitung empfohlenen Prozedur vorgenommen.

Für *p. canescens* wurde die gepulverte Probe nicht abgewogen sondern immer mit dem Spatel eine möglichst konstante Menge zu entnommen - empfohlen war für 800µl Lysepuffer RP 50-100mg Probe.

Das Blattpulver der Proben von *p. canescens*, *p. nigra* und *p. trichocarpa* wurde je zu 500µl Lysepuffer RP gegeben, die in einem Eppendorfgefäß vorgelegt war, in das Eppendorfgefäß wurden 10 µl 1M DTT zugegeben, und anschließend erneut 500 µl

Lysepuffer RP zugegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass das auftauende Material durch Vortexen möglichst schnell von der Lysepuffer aufgenommen wird.

Für die RNA-Isolation der Proben des RNAi und ÜE-Experiments wurde von den geernteten und auf N² gefrorenen Blättchen der Pflänzchen, die sich in 1,5ml Eppendorftubes befanden, ausgegangen. Diese wurden in den Eppendorftubes mit Plastikstößeln im schockgefrosteten Zustand gemörsert, dann wurden 800µl Lysis Solution RP hinzugegeben und das Blattmaterial noch etwas weiter mit dem Stößel zerkleinert.

Im Thermomixer wurden die lysierenden Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Blattmaterial und die Zelltrümmer wurden für eine Minute bei höchster Geschwindigkeit herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde auf den Prefilter gegeben und zentrifugiert, um weitere unerwünschte Schwebstoffe aus dem Lysat zu filtern. 500µl wurden dem Filtrat zugegeben um die Bindebedingungen der RNA an den RTA-Spinfilter zu optimieren. Das Lysat wurde auf den RTA-Spinfilter gegeben nach einminütiger Inkubation wurde für zwei Minuten runterzentrifugiert. Nachdem das Filtrat verworfen wurde, habe ich mit 300µl R1-Puffer gewaschen. Auf den Filter wurde die DNase aufgebracht und zwar gelöst in RDD-Puffer im Verhältnis 7:1. Nach Inkubation bei RT für 15 Minuten wurde die DNasehaltige Lösung bei 10000rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde erneut mit 300µl R1-Waschpuffer und danach noch zweimal mit je 700µl R2-Waschpuffer gewaschen. Dann wurde der RTA-Spinfilter für vier Minuten und 11000g zentrifugiert, um ihn zu trocknen. Eluiert wurde mit frischem Milliporewasser (RT), nach zweiminütiger Inkubation wurde die Lösung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß zentrifugiert und sofort ins Eis gestellt. Die Eppis mit den so isolierten RNA-Proben wurden direkt auf Eis gekühlt und in den Fällen, in denen ich nicht sofort mit der cDNA-Synthese fortgefahren habe bei -80° C aufbewahrt.

CDNA-Snthese

Die Konzentration der isolierten RNA wurde gemessen. Für die c-DNA-Synthese wurde für jede Probe soviel RNA-Volumen verwendet, dass stets 1 ng RNA in cDNA umgeschrieben wird, dabei wurde das Superscript 3-Kits von Life Technologies verwendet. Zunächst wurde das benötigte RNA-Volumen mit Desoxythymidin-Oligonukleotiden und dNTPs für 5 Minuten bei 65° inkubiert, um im Anschluss die reverse Transkriptase, den vom Hersteller bereitgestellten Puffer sowie DTT

hinzuzufügen. Im PCR-Cycler wurden die Ansätze erst für eine Stunde bei 55°C, dann für 15 Minuten bei 70°C inkubiert.

Die RNA der Proben des ÜE- und RNAi-Experiments, die RNA von *p. canescens* und die RNA von *p. nigra* und *p. trichocarpa* wurden an verschiedenen Tagen in cDNA umgeschrieben.

qPCR

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	pn1	pn2	pn3	pn4	pn5	pt7	pt8	pt9	pt10	pt11	wk	
2	pn1	pn2	pn3	pn4	pn5	pt7	pt8	pt9	pt10	pt11	wk	
3	pn1	pn2	pn3	pn4	pn5	pt7	pt8	pt9	pt10	pt11	wk	
4	pn1	pn2	pn3	pn4	pn5	pt7	pt8	pt9	pt10	pt11	wk	
5												
6												
7												
8												

Abbildung 2: Beispiel eines Beladungsschema der 96-Well-Platte anhand der Messreihe von *p. nigra* und *p. trichocarpa*; gelb: Primer Ubipoplarfor und Ubipoplarrev verwendet; grün: Primer IDI1qRTfor und IDI1qRTrev verwendet; in jede senkrechten Well-Reihe wurden die 4 Ansätze einer Probe pipettiert

Für jede Probe waren vier Wells vorgesehen: zwei bei denen der Primer „ubipoplar“ verwendet wurde, um Cq-Wert* des Housekeeping-Gens in Doppelbestimmung zu ermitteln. Bei anderen beiden Wells wurden IDI-spezifische Primer eingesetzt, um den Cq-Wert (Cq= cycle of quantification) der IDI zu ermitteln.

Es wurde für die drei durchgeführten qPCRs in gleicher Weise verfahren.

Für die qRT-PCR Ansätze wurde folgende Zusammensetzung der Einfachansätze gewählt:

10 µl	2x SYBR-Green QPCR Mastermix
0,7 µl	Vorwärtsprimer
0,7 µl	Rückwärtsprimer
0,6 µl	cDNA
8 µl	ddH ₂ O

Zunächst wurde ein Mastermix mit dem im gesamten qRT-Ansatz benötigten doppeldestillierten Wasser und 2x SYBR-Green QPCR Mastermix angesetzt. Es

wurden auch für beide Primerpaare Ubipoplarfor und Ubipoplarrev und IDI1qRTfor und IDI1qRTrev je ein Mastermix angesetzt. Es wurden jeweils die gleichen Volumina des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers eingesetzt.

Dann wurde für jede einzelne zu analysierende Probe in einem Eppendorfgefäß die erforderliche Menge des zuvor angesetzten Mastermix, der Wasser und SYBR-Green QPCR-Mix enthält, vorgelegt. Die cDNA der jeweiligen Probe wurde in jedes Eppendorfgefäß zugegeben. 18,6 µl jedes so hergestellten Probenansatzes wurde in vier Wells der 96 Wellplatte vorgelegt. Anschließend wurden je 1,4 µl der erforderlichen Primer hinzugegeben. In zwei Wells die Ubipoplar-Primer und in zwei Wells die IDI1qRT-Primer.

Vier Wells wurden mit der Wasserkontrolle versehen. Außer dass keine cDNA hinzugefügt wurde, wurde mit der Wasserkontrolle ebenso verfahren wie mit den zu analysierenden der Proben: Es wurde der Mastermix mit SYBR-Green-Mix und Wasser vorgelegt, und in die Wells wurden die entsprechenden Primer hinzugefügt.

Die qPCR-Ansätze wurden in dem CFX Connect™ Real-Time-Gerät analysiert.

Folgender Heizklus war bei den drei durchgeführten qPCRs programmiert:

95 °C	3 min		
95°C	10 s		
60°C	20 s		40 Zyklen
95°C	2 min		← Fluoreszenzmessung
60°C	30 s		← Fluoreszenzmessung
95°C	0,5 s		

Ergebnisse

Verwundungsexperiment

Das qRT-Programm hat anhand der gemessenen Kurve die $\Delta \Delta C_q$ -Werte ermittelt. Diese entsprechen den relativen mRNA-Werten der IDI im Cytosol der Blätter. Da man davon ausgehen kann, dass die nachgewiesene mRNA zu Proteinen translatiert wird, handelt kann man hier von den relativen Expressionswerten der IDI sprechen.

Das qPCR-Programm hat die in den Tabellen 2, 3 und 4 dargestellten Werte als relative normalisierte Expression relativ zu Null also zur Wasserkontrolle ausgegeben. Der Standardfehler wurde von dem Programm berechnet. Er basiert auf der Doppelbestimmung und spiegelt die Pipettierfehler beim Ansetzen der qPCR wider. Bei diesem Standardfehler handelt es sich um ein technisches Replikat.

	rel. Expression, modifizierte Werte	rel. Expression, qRT-Programm	Standardfehler
13.1	1.2865127	1.5046688	0.03382
13.2	0.6488704	0.7589005	0.03168
13.3	0.7874228	0.9209474	0.01617
13.4	0.8582376	1.0037704	0.03598
14.1	0.9560306	1.1181463	0.01083
14.2	0.9347889	1.0933026	0.02403
14.3	0.6689101	0.7823383	0.03804
14.4	0.8930424	1.0444771	0.05414
15.1	0.9869272	1.1542820	0.01809
15.2	0.7708743	0.9015928	0.00708
15.3	0.7850080	0.9181232	0.03196
15.4	0.9945321	1.1631766	0.05114
16.1	0.7135837	0.8345873	0.07142
16.2	0.9483798	1.1091981	0.06220
16.3	1.1925206	1.3947383	0.03505
16.4	1.3390075	1.5660652	0.06416
17.1	1.0125276	1.1842236	0.04828
17.2	0.9456542	1.1060104	0.11661
17.3	0.7651480	0.8948955	0.03815
17.4	0.9838442	1.1506763	0.01340
18.1	0.8550139	1.0000000	0.02703
18.2	1.2484012	1.4600947	0.01985
18.3	0.8998975	1.0524946	0.06428

Tabelle 2: relative IDI-Expressionen in *p. canescens*: Pflanzen 13 - 15: verwundete Pflanzen; Pflanzen 16 - 18: nicht verwundete Kontrollpflanzen; 13.2, 13.3, 14.2, 14.3 15.2 und 15.3: verwundete Blätter; 13.1, 14.1 und 15.1: obere Blätter der verwundeten Pflanze; 16.1, 17.1, und 18.1: obere Blätter der Kontrollpflanzen; 16.2, 16.3, 17.2, 17.3 18.2 und 18.3: mittlere Blätter der Kontrollpflanzen; 13.4, 14.4 und 15.4: untere Blätter der verwundeten Pflanzen; 16.4 und 17.4: untere Blätter der Kontrollpflanzen.

In der mittleren Spalte sind die rel. IDI-Expressionen zu sehen, die das qRT-Programm ausgegeben hat. Die modifizierten Werte wurden per Dreisatz umgestellt, sodass der Mittelwert der mittleren Blätter der unverwundeten Pflanzen gleich Eins ist. Die Standardfehler wurden vom qRT-Programm ausgegeben.

	rel. Expression, modifizierte Werte	rel. Expression, qRT-Programm	Standardfehler
pn1	0.6438507	1.3323621	0.09556
pn2	0.4832400	1.0000000	0.06969
pn3	0.6346468	1.3133159	0.06315
pn4	0.9751128	2.0178643	0.04163
pn5	1.0248893	2.1208700	0.36624

Tabelle 3: relative IDI-Expressionen in *p. nigra*: pn1, pn2 und pn3: gepoolte Proben aus jeweils den beiden verwundeten Blättern der verletzten Pflanzen; pn4 und pn5: gepoolte Proben aus jeweils den beiden mittleren Bättern der unverwundeten Kontrollpflanzen.

In der mittleren Spalte sind die rel. IDI-Expressionen zu sehen, die das qRT-Programm ausgegeben hat. Die modifizierten Werte wurden per Dreisatz umgestellt, sodass der Mittelwert der unverwundeten Pflanzen gleich Eins ist. Die Standardfehler wurden vom qRT-Programm ausgegeben.

	rel. Expression, modifizierte Werte	rel. Expression, qRT-Programm	Standardfehler
pt7	0.7936065	0.3145102	0.00916
pt8	0.7098052	0.2812994	0.01737
pt9	0.7123732	0.2823171	0.01685
pt10	1.0432317	0.4134379	0.01465
pt11	0.9567751	0.3791748	0.02400

Tabelle 4: relative IDI-Expressionen in *p. trichocarpa*: pt7, pt8 und pt9: gepoolte Proben aus jeweils den beiden verwundeten Blättern der verletzten Pflanzen; pt10 und pt11: gepoolte Proben aus jeweils den beiden mittleren Bättern der unverwundeten Kontrollpflanzen.

In der mittleren Spalte sind die rel. IDI-Expressionen zu sehen, die das qRT-Programm ausgegeben hat. Die modifizierten Werte wurden per Dreisatz umgestellt, sodass der Mittelwert der unverwundeten Pflanzen gleich Eins ist. Das qRT-Programm hat die Standardfehler berechnet.

Um die Werte von *p. canescens* besser analysieren zu können, wurde der Mittelwert der beiden mittleren (X.2 und X.3) Blätter aller unverwundeten Pflanzen als Referenz definiert. Dafür habe ich die vom Programm berechneten relativen Expressionen per Dreisatz so transformiert, dass jeweils der Mittelwert der beiden mittleren (X.2 und X.3) Blätter aller unverwundeten Pflanzen einer Spezies auf Eins gesetzt wird. Durch diese Abänderung wurden die dargestellten Datenreihen erhalten. Ausgehend von diesen Datenreihen wurden alle folgenden statistischen Berechnungen durchgeführt, wie das Bestimmen des Gruppen-Mittelwertes und Standardabweichung der Werte dieser Gruppe.

<i>p. canescens</i>	Mittelwert	Standardabweichung
Unverwundete Pflanzen, mittlere Blätter	1	0,184152888
verwundete Pflanzen, mittlere,verwundete Blätter	0,76597908283	0,102449463
unverwundete Pflanzen, obere Blätter	0,86037505066	0,149544051
verwundete Pflanzen, obere Blätter	1,076490168	0,182539745
unverwundete Pflanzen, untere Blätter	1,161425815	0,251138364
verwundete Pflanzen, untere Blätter	0,91527069966	0,070814006

Tabelle 5: *p. canescens*; Mitterwerte der IDI-Expressionen der Blattgruppen sowie Standardabweichungen

<i>p. nigra</i>	Mittelwert	Standardabweichung
Unverwundete Pflanzen	1	0,035197292
Verwundete Pflanzen	0,587245858	0,090189175

Tabelle 6: *p. nigra*; Mitterwerte und Standardabweichungen der IDI-Expressionen der Blattgruppen

<i>p. trichocarpa</i>	Mittelwert	Standardabweichung
Unverwundete Pflanzen	1	0,061134002
Verwundete Pflanzen	0,738594962	0,047658667

Tabelle 7: *p. trichocarpa*; Mitterwerte und Standardabweichungen der IDI-Expressionen der Blattgruppen

Auch die Datenreihen von *p. nigra* und *p. trichocarpa* wurde jeweils per Dreisatz umgestellt sodass der Mittelwert der Proben der unverwundeten Pflanzen gleich Eins ist, und auf der Basis dieser so modifizierten Datenreihen wurde auch bei diesen beiden Spezies sämtliche weitere Berechnungen wie das Ermitteln der Mittelwerte durchgeführt. Für die Berechnung der Mittelwerte der Blattgruppen aller drei Spezies wurde der Standardfehler, den das qPCR-Programm ermittelt hat, nicht weiter mit einbezogen. Die Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen sind alleinig aus den Varianzen der Einzelwerten zustande gekommen.

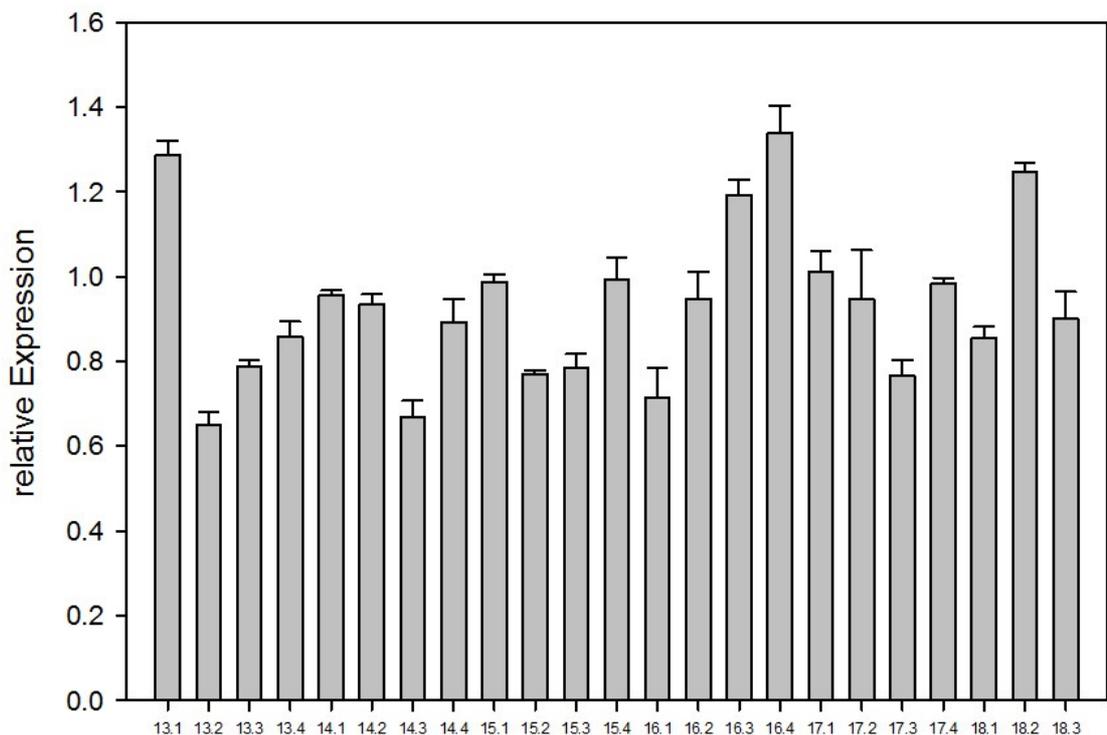


Abbildung 3: relative IDI-Expressionen in *p. canescens*: Pflanzen 13- 15: verwundete Pflanzen, Pflanzen 16- 16: nicht verwundete Kontrollpflanzen; 13.2, 13.3, 14.2, 14.3 15.2 und 15.3: verwundete Blätter; 13.1, 14.1 und 15.1: obere Blätter der verwundeten Pflanze; 16.1, 17.1, und 18.1: obere Blätter der Kontrollpflanzen; 16.2, 16.3, 17.2, 17.3 18.2 und 18.3: mittlere Blätter der Kontrollpflanzen; 13.4, 14.4 und 15.4: untere Blätter der verwundeten Pflanzen; 16.4 und 17.4: untere Blätter der Kontrollpflanzen. Das Balkendiagramm basiert auf den modifizierten Werten, bei denen der Mittelwert der mittleren Blätter der unverwundeten Pflanzen Eins ist. Die Standardfehler, die das qRT-Programm berechnet hat, sind für jeden Wert mit dargestellt.

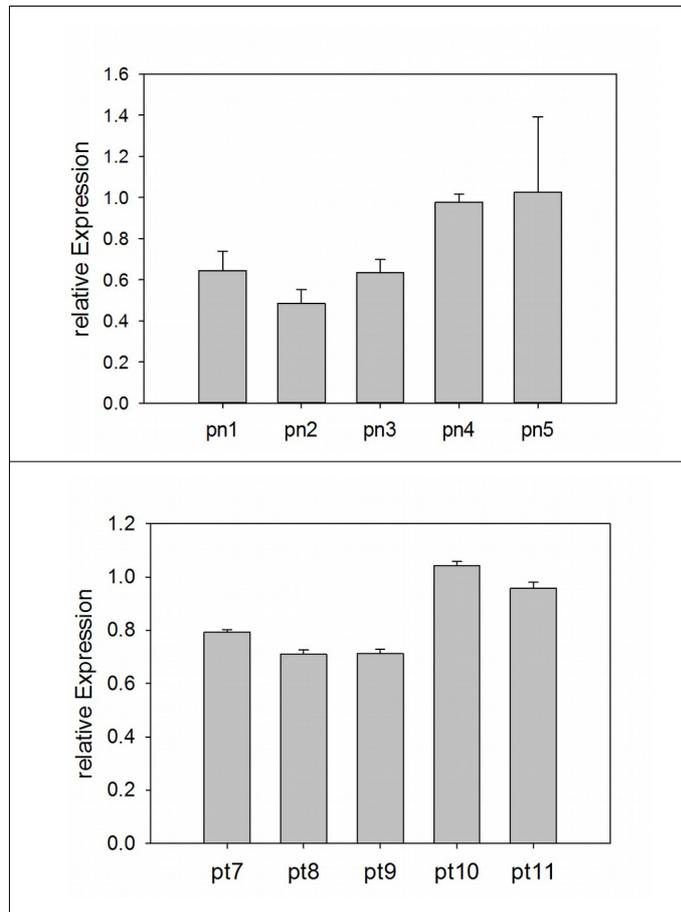


Abbildung 4: relative Expression der IDI bei *p. nigra* und *p. trichocarpa*: pn1, pn2 und pn3: gepoolte Proben aus jeweils den beiden verwundeten Blättern der verletzten Pflanzen; pn4 und pn5: gepoolte Proben aus jeweils den beiden mittleren Blättern der unverwundeten Kontrollpflanzen; pt7, pt8 und pt9: verwundeten Blättern der verletzten Pflanzen; pt10 und pt11: mittlere Blätter der unverwundeten Kontrollpflanzen auch hier wurden beide Blätter einer Pflanze gepoolt. Die IDI-Expressionswerte beider Datenreihen wurden modifiziert, so dass der Mittelwert unverwundeten Pflanzen Eins ist. Die Standardfehler, die das qRT-Programm berechnet hat, sind für jeden Wert mit dargestellt.

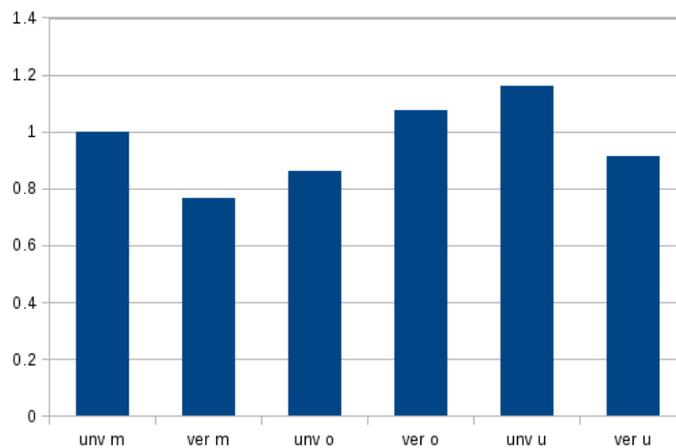


Abbildung 5: Mittelwerte der IDI-Expression der Blattgruppen von *p. canescens*; unv m: mittlere Blätter der Kontrollpflanzen; ver m: verwundete Blätter der verw. Pflanzen; unv o: obere Blätter der Kontrollpflanzen; ver o: obere Blätter der verwundeten Pflanzen; unv u: untere Blätter der Kontrollpflanzen; ver u: untere Blätter der verwundeten Pflanzen.

Zunächst werden die Werte für *p. canescens* besprochen:

Die Expressionswerte der IDI von den beiden unverwundeten Blätter von Pflanze 13 sind 1,2865 und 0,8582 und die der verwundeten Blätter 0,6489 und 0,7874. Bei Pflanze 14 sind die Werte von 0,9560 und 0,8930 für die nicht verwundeten Blätter ermittelt worden, 0,9348 und 0,6689 für die verwundeten Blätter. Bei Pflanze 15 sind 0,9869 und 0,9945 für die nicht verwundeten Blätter und 0,7709 und 0,7850 für die verwundeten Blätter herausgekommen. Die restlichen Pflanzen sind die Kontrollpflanzen, die nicht verwundet wurden. Für Pflanze 16 wurden für die IDI Expressionswerte -von oben nach unten- von 0,7136, 0,9484, 1,1925, und 1,3390 ermittelt. Für Pflanze 17 sind die Werte vom obersten Blatt abwärts 1,0125, 0,9457, 0,7652, und 0,9838 für die Expression von IDI herausgekommen und für Pflanze 18 von oben nach unten 0,8550 , 1,2484 und 0,8999 .

Die original vom qRT-Programm bestimmten Standardfehler sind für die Werte von 16.1, 16.2, 16.4 und 17.2, sind mit über 0,06 im Vergleich zu den Standardfehlern der anderen Werte relativ groß.

Die oberen, nicht verwundeten Blätter der verwundeten *p. canescens*-Pflanzen haben im Mittel eine relative IDI-Expression von 1,0765 während die relative IDI-Expression unverwundeten oberen Blätter im Mittel 0,8604 ist. Die relative Expression der IDI war in den verwundeten Blättern - also den Blättern Nummer 2 und 3 jeder verwundeten Pflanze - im Mittel 0,766 und in den mittleren Blättern der unverwundeten Pflanzen 1. Die gemittelten Werte der unteren Blätter der verwundeten Pflanzen ergaben 0,9153, während die unteren Blätter der unverwundeten Pflanzen im Mittel 1,1614 sind.

Aus der Berechnung der Mittelwerte der Blattgruppen von *p. canescens* haben sich folgende Standardabweichungen (SD) für die Blätter der Gruppen ergeben: Für die oberen Blätter der verwundeten Pflanzen wurde eine SD von 0,1825 berechnet, die oberen Blätter der unverwundeten Pflanzen ergab sich eine SD von 0,1495. Die verwundeten Blätter haben eine SD von 0,1025. Die mittleren Blätter der unverwundeten Pflanzen haben eine SD von 0,1842. Die SD der unteren Blätter der verwundeten Pflanzen ist 0,0708, und der der unteren Blätter der unverwundeten Pflanzen 0,2511.

Der Mittelwert der IDI-Expression aller Blätter der nicht verwundeten *p. canescens* -Pflanzen ist 0,9627546 mit einer Standardabweichung von 0,1824581. Und die mittlere IDI-Expression aller unverwundeten Blätter der verwundeten Pflanzen ist 0,9958804,

während die Standardabweichung 0,152091 ist.

Für *p. nigra* und *p. trichocarpa* habe ich, wie bereits in der Durchführung beschrieben, für jede Spezies hier nur 5 Proben und somit je 5 Werte. Dabei setzt sich jeder einzelne Wert aus den beiden gepoolten mittleren Blättern je einer Pflanze zusammen, also im Fall der verletzten Pflanzen aus den beiden verletzten Blättern einer Pflanze.

In dem originalen Messreihe, in der die Ansätze von *p. nigra* und *p. trichocarpa* gemeinsam analysiert wurden, sind die Werte der fünf *p. trichocarpa*-Pflanzen deutlich niedriger als die von *p. nigra* man kann das in Tabelle 3 und 4 sehen.

Die relative Expression der IDI in *p. nigra* ist für die verwundeten Blätter : 0,6439, 0,4832 und 0,6347 und für die Blätter der nicht verwundeten Pflanzen 0,9751 und 1,0249.

Mit 0,5873 ist der Durchschnitt der relativen Expression der IDI in den verwundeten Blätter niedriger als die mittlere relative IDI-Expression der Blätter der nicht verwundeten Pflanzen mit 1.

Bei *p. trichocarpa* sind die relative Expression der IDI 0,7936, 0,7098 und 0,7124 für die Proben der verwundeten Pflanzen, und 1,0432 und 0,9568 für die Proben der nicht verwundeten Pflanzen. Auch bei *p. trichocarpa* ist der Mittelwert der relativen IDI Expression der verwundeten Blätter mit 0,7386 niedriger als der der unverwundeten Blätter mit 1.

Das qRT-Programm hat für die relative IDI-Expression von pn 5 einen extrem hohen Standardfehler von 0,36624 errechnet. Die anderen Standardfehler von der Werte von *p. nigra* sind, außer bei dem Standardfehler für pn4 mit 0,04163, auch relativ hoch, zumindest, wenn man die Maßstäbe von der Messreihe von *p. canescens* anlegt. Sie sind nämlich alle höher als 0,06. Nämlich für pn1 0,09556, für pn2 0,0696 und für pn3 0,06315. Die Standardfehler, die das qRT-Programm für die Werte von *p. trichocarpa* ergeben hat, sind relativ niedrig im Vergleich zu den Standardfehler von *p. nigra*: sie befinden sich alle unterhalb von 0,025.

Signifikanzen

Es wurde mit dem Programm GNU PSPP ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die Wertegruppen signifikant voneinander

unterscheiden. Dabei wurden die Daten verwendet die das qRT-Programm ausgegeben hat und separat die Varianten der Datensätze, die per Dreisatz umgestellt wurden, wobei die Wildtypwerte mit Eins gleichgesetzt wurden. Für fast jede Fragestellung wurde der Test sowohl mit den qRT-Daten als auch mit den umgestellten Daten gemacht, und dabei kam stets das selbe Ergebnis heraus. Das Konfidenzintervall wurde auf 95% festgelegt.

Einige Ergebnisse der Signifikanzprüfung sind in folgender Tabelle aufgeführt:

	Verw oben	Verw mitte	Verw unten	Unv oben	Unv mitte	Unv unten
Verw oben	-	0,012 → signifikant	0,227 → nicht signifikant			
Verw mitte		-	0,061 → nicht signifikant			
Verw unten			-			
Unv oben	0,188 → nicht signifikant			-	0,296 → nicht signifikant	0,18 → nicht signifikant
Unv mitte		0,022 → signifikant			-	0,354 → nicht signifikant
Unv unten			0,389 → nicht signifikant			-

Tabelle 8: Ergebnisse der Signifikanzprüfungen; durchgeführter Test: t-Test für unabhängige Stichproben; mit Konfidenzintervall 95%; unv mitte: mittlere Blätter der Kontrollpflanzen; verw mitte: verwundete Blätter der verw. Pflanzen; unv oben: obere Blätter der Kontrollpflanzen; verw oben: obere Blätter der verwundeten Pflanzen; unv unten: untere Blätter der Kontrollpflanzen; verw unten: untere Blätter der verwundeten Pflanzen.

Weitere Signifikanzprüfungen für die Blattproben von *p. canescens*, die ebenfalls als t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt wurden hatten folgende Ergebnisse:

Alle nichtverwundeten Blätter auch die von den verwundeten Pfl. Unterscheiden sich mit einem P-Wert von 0,008 signifikant von den verwundeten Blättern.

Von allen Blättern der verwundeten Pflanzen unterscheiden sich alle Blätter der unverwundeten Pflanzen nicht signifikant. Der dazugehörige P-Wert ist 0,166.

Mit einem P-Wert von 0,961 unterscheiden sich die unverwundeten Blätter der verwundeten Pflanzen nicht signifikant von allen Blättern der unverwundeten Pflanzen.

Die oberen Blätter der verwundeten Pflanzen unterscheiden sich nicht signifikant von den Blättern der nicht verwundeten Pflanzen. Der ermittelte P-Wert ist 0,514.

Ebenso unterscheiden sich die IDI-Expressionswerte der unteren Blätter der verwundeten Pflanzen nicht signifikant von den IDI-Expressionswerten der Blättern der nicht verwundeten Pflanzen auch nicht. Der t-Test hat einen P-Wert von 0,533 ergeben.

Für *p. nigra* ergab der t-Test für unabhängige Stichproben, dass sich die verwundeten Blätter signifikant von den nicht verwundeten Blättern unterscheiden, was die IDI-Expression angeht. Der P-Wert für diese Konstellation ist 0,01. Auch die verwundeten Blätter von *p. trichocarpa* unterscheiden sich mit einem P-Wert von 0,012 signifikant von den nicht verwundeten Blättern.

RNAi- und ÜE-Experiment

	rel. Expression, modifizierte Werte	rel. Expression, qRT-Programm	Standardfehler
IDI+7	1.5846581	0.9635443	0.00881
IDI-5	0.0580409	0.0352915	0.00101
K2 1-1	0.6867692	0.4175869	0.03419
K2 1-2	1.7642242	1.0727286	0.01321
K2 2	0.7336132	0.4460702	0.00582
K2 6	1.3475531	0.8193736	0.02352
K1	1.0690389	0.6500243	0.01524
wt10	1.1247842	0.6839200	0.02073
wt9	0.8752158	0.5321711	0.02264

Tabelle 9: Messreihe 1; relative IDI-Expressionen; IDI+7: aus Überexpressionspflanze und IDI-5: aus RNAi-Pflanze; K2: pCAM1305.2-Vektorkontrollen; K1: pCAMBIA2301-Vektorkontrolle; wt 10 und wt 9 sind die Wildtypproben. In der mittleren Spalte sind die rel. IDI-Expressionen zu sehen, die das qRT-Programm ausgegeben hat. Die modifizierten Werte wurden per Dreisatz umgestellt, sodass der Wildtypmittelwert Eins ist. Die Standardfehler wurden vom qRT-Programm ausgegeben.

	rel. Expression, modifizierte Werte	rel. Expression, qRT-Programm	Standardfehler
IDI+2	1.7142912	1.0394390	0.03352
IDI+8	3.1527092	1.9116058	0.05908
RNAi1	0.1741257	0.1055789	0.01073
RNAi7	0.1900630	0.1152423	0.00766
RNAi8	0.1378238	0.0835677	0.00162
wt2	1.0000000	0.6063375	0.01860

Tabelle 10: Messreihe 2; relative IDI-Expressionen; IDI+: Proben von Überexpressionspflanzen; RNAi: Proben von RNAi-Pflanzen; wt 2: Wildtypprobe. In der mittleren Spalte sind die rel. IDI-Expressionen zu sehen, die das qRT-Programm ermittelt hat. Die modifizierten Werte wurden per Dreisatz umgestellt, sodass der Wildtypwert Eins ist. Die Standardfehler wurden von dem qRT-Programm berechnet.

	rel. Expression, "modifizierte Werte"	rel. Expression, qRT-Programm	Standardfehler
IDI+6	3.0907365	3.0907365	0.58708
wt3	1.0000000	1.0000000	0.02242

Tabelle 11: Messreihe 3; relative IDI-Expressionen; IDI+: Probe von Überexpressionspflanze; wt 3: Wildtypprobe. In der mittleren Spalte sind die rel. IDI-Expressionen zu sehen, die das qRT-Programm berechnet hat. Die Daten dieser Messreihe mussten nicht mehr umgestellt werden. Zur Vergleichbarkeit mit den anderen Messreihen wird hier die erste Spalte dargestellt. Das qRT-Programm hat die Standardfehler ermittelt.

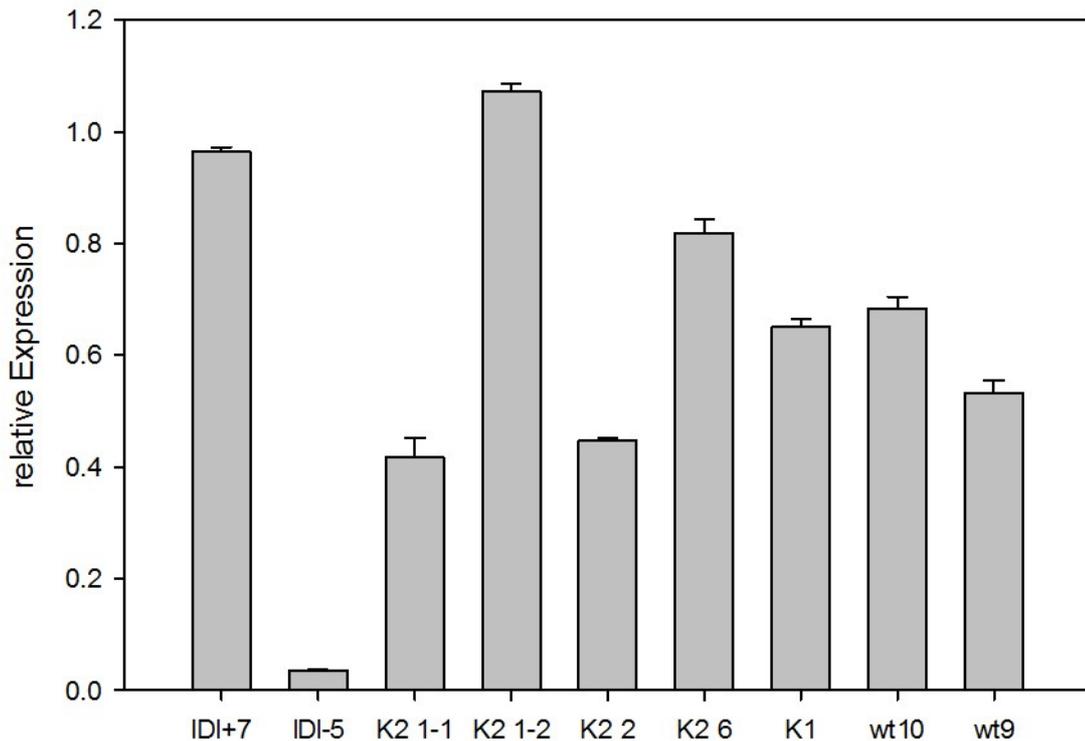


Abbildung 6: Messreihe 1; relative IDI-Expressionen die das qRT-Programm ausgegeben hat; IDI+7: Überexpressionspflanze und IDI-5: RNAi-Pflanze; K2: pCAM1305.2 Vektorkontrollen und K1 die pCAMBIA2301 Vektorkontrollen bezeichnet, wt 10 und wt 9 sind die Wildtypproben. Die Standardfehler wurden von dem qRT-Programm berechnet.

Außer der von mir erhaltenen Messreihe für das Überexpressions- und RNAi-Experiment standen mir noch andere qRT-Ergebnisse von der Arbeitsgruppe zur Verfügung, die ich für meine Arbeit verwenden durfte. Es handelt sich dabei auch um relative IDI Expressionen, also um den selben Typen von Datensatz wie meine Messwerte. Um die Vergleichbarkeit zwischen den qRT-Ergebnissen der Arbeitsgruppe und meinen Ergebnissen herzustellen, wurden der Mittelwert der Wildtypwerte beziehungsweise der jeweiligen Einzelwerte der Wildtyppflanzen² mit Eins gleichgesetzt und die restlichen Werte Messreihen wurden per Dreisatz transformiert,

² Im meiner Messreihe wurden zwei Wildtypwerte ermittelt und im Falle der Messreihen der Arbeitsgruppe wurde pro Messreihe nur ein Wildtypwert ermittelt.

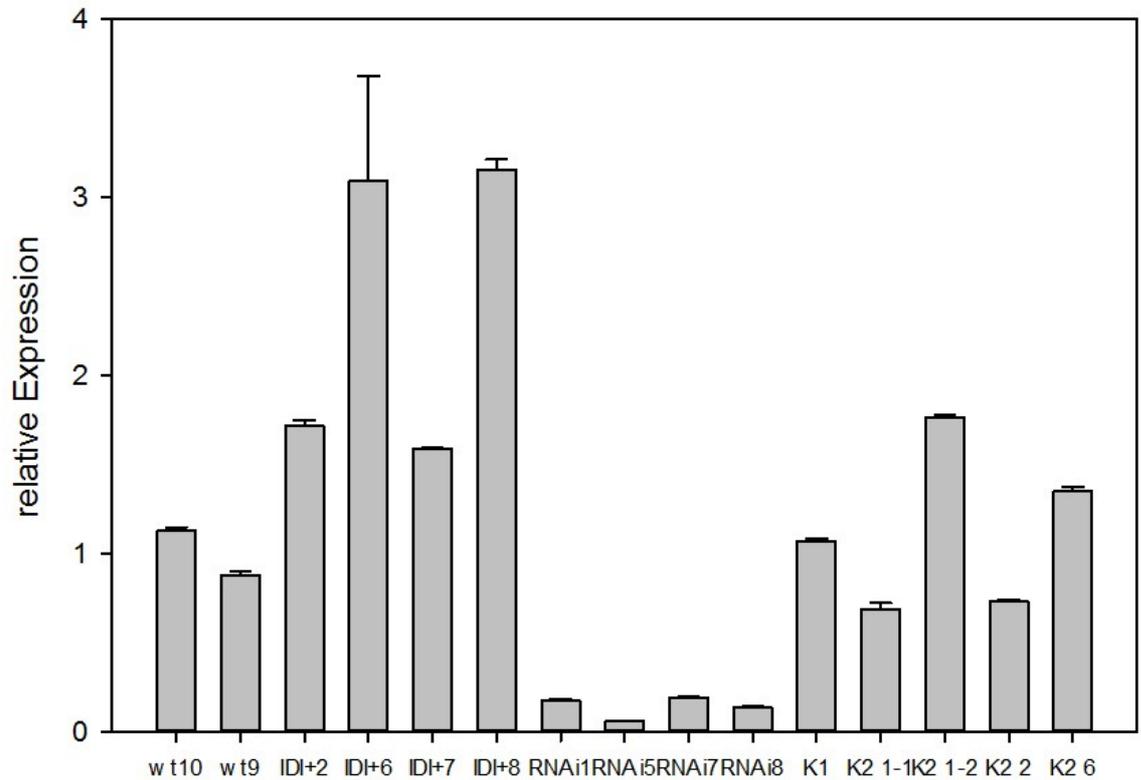


Abbildung 7: relative Expression von IDI; in dieser Graphik sind die Werte aus allen drei Messreihen gemeinsam dargestellt; die IDI-Expressionwerte jeder Messreihe sind die per Dreisatz umgestellten Werte bei denen der jeweilige Wildtpwert oder der Wildtypmittelwert mit Eins gleichgesetzt wurde. Die Wildtpwerte aus den Messreihen 2 und 3 wurden nicht mit übernommen. IDI+: Überexpressionspflanzen; RNAi: RNAi-Pflanzen; K1: pCAMBIA2301-Vektorkontrollen; K2: pCAM1305.2-Vektorkontrollen; die Standardfehler stammen vom qRT-Programm.

sodass sie wieder in derselben Größendimension sind wie der Wildtypwert aus ihrer Messreihe. Mit diesen so modifizierten Messreihen werden alle weiteren Betrachtungen angestellt.

Ergebnisse meiner Messreihe, im Weiteren bezeichnet als Messreihe 1:

In den Blättern der RNAi-Pflanze #5 ist die relative IDI-Expression 0,058. Die Vektorkontrollen mit pCAM1305.2 haben Expressionswerte von 0,6868, 1,7642, 0,7336 und 1,3476, wobei die Proben 1305.2-1-1 und 1305.2-1-2 von der selben Pflanze stammen. Dabei war erstere mit der relativen Expression von 0,68676 das kleinere und jüngere Blatt und letzteres mit dem Wert 1,7642 das Blatt, dass etwas älter war als alle

Anderen. Die relative IDI-Expression in dem Blatt der Überexpressionspflanze IDI+7 ist 1,5847, während die IDI-Expression in der entsprechenden Vektorkontrolle bei pCAMGW2³ 1,069 ist.

Der von dem qRT-Programm berechnete Standardfehler für die ursprünglichen Werte ist für IDI+7, IDI-5, pCAM1305.2-1-2, pCAM1305.2-2, pCAMGW2 und wt10 relativ niedrig mit Standardfehlern unterhalb oder knapp über von 0,02. Die Standardfehler von pCAM1305.2-6 und wt9 sind größer als 0,02, aber unterhalb von 0,024 dadurch sind sie in einem mittleren Bereich. pCAM1305.2-1-1 hat den höchsten Standardfehler mit 0,034.

Bei den Daten, die aus den 2 Messreihen der Arbeitsgruppe übernommen wurden, stammen die meisten Werte aus der am 26.9.2014 angesetzten qRT-PCR, im Weiteren als Messreihe 2 bezeichnet. Allein der Wert von der Überexpressionspflanze Nummer 6 stammt aus dem qRT-Ansatz, der am 17. 9. angesetzt wurde, im Weiteren bezeichnet als Messreihe 3. Die Blattproben von Messreihe 2 und 3 einige Wochen vor denjenigen von Messreihe 1 gepflückt und analysiert.

Auch bei den Messwerten der Messreihen 2 und 3 wurde zuerst den Wildtypwert gleich Eins gesetzt; beziehungsweise bei Messreihe 3 war die relative IDI-Expression des Wildtyps bereits Eins, das heißt, dass die Umstellung der Werte - also das Gleichsetzen des Wildtypwertes mit Eins und dem anschließenden Angleichen aller anderen Werte der Messreihe via Dreisatz - nur noch mit Messreihe 2. durchgeführt wurde. Die so erhaltenen Werte für die relative IDI-Expression sind für die Überexpressionspflanzen 2, 6 und 8 jeweils 1,7143, 3,0907 und 3,1527 und für die RNAi-Pflanzen Nummer 1, 7 und 8 je 0,1741, 0,1901 und 0,1378.

Die von dem qRT-Programm berechneten Standardfehler sind für die Werte von Messreihe 2 allesamt relativ klein, lediglich der Wert von IDI + 8 ist mit 0,05908 etwas höher. Anders ist es mit dem Wert von IDI+6 aus Messreihe 3: hier ist der Standardfehler mit 0,58708 relativ hoch.

³ Bei der Bezeichnung pCAMGW handelt es sich um eine Abkürzung für den Vektor pCAMBIA2301

Die in Tabelle 12 aufgeführten Mittelwerte sind, entstanden indem die Werte der Überexpressions- und RNAi-Pflanzen aus den Messreihen 2 und 3 in den Datenreihe aus Messreihe 1 aufgenommen wurden.

	Mittelwert	Standardabweichung
Wildtyp	1	0,176471454
Überexpressionspflanzen	2,385598768	0,852024558
RNAi-Pflanzen	0,140013343	0,058858257
Vektorkontrollen pCAM1305.2	1,133039927	0,517400174

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der IDI-Expression basierend auf den vereinigten Daten aller drei Messreihen; der Mittelwert der Wildtypwerte basiert auf den Werten der Pflanzen wt 9 und wt10 aus Messreihe 1.

Der Mittelwert der Wildtyppflanzen 9 und 10 ist wie zuvor definiert Eins, die Standardabweichung 0,17647. Die vereinigten IDI-Expressionswerte der Überexpressionspflanzen haben einen Mittelwert von 2,3856, mit einer Standardabweichung von 0,85203. Die IDI-Expressionen der RNAi-Pflanzen sind im Mittel 0,14001, wobei eine Standardabweichung von 0,05886 berechnet wurde. Der Mittelwert aus den Vektorkontrollen von pCAM1305.2 ist 1,1330 mit einer Standardabweichung von 0,5174.

Ergebnisse der Signifikanzprüfungen

Mit den Werten wurden auch hier ein Signifikanztest durchgeführt. Dies geschah sowohl mit den Daten, die vom qRT-Programm ausgegeben wurden, um zu testen, ob die Einzeldaten in die Auswertung übernommen werden sollen, als auch mit den vereinheitlichten Werten.

Zunächst die Werte die das qRT-Programm ergeben hat: Die Werte der ÜE-Pflanzen 2 und 8 aus Messreihe 2 unterscheiden sich nicht signifikant von dem Wildtypwert dieser Messreihe (P-Wert =0,296), wohingegen sich die Werte der drei RNAi-Pflanzen in dieser Messreihe signifikant von dem Wildtypwert unterscheiden.

Für den Expressionswert der Überexpressionspflanze Nummer 6 aus Messreihe ließ sich weder der einfache t-Test noch der unabhängige t-Test für zwei Stichproben durchführen, weil es sich um einen Einzelwert handelte. Für die Einzelwerte der Überexpressionspflanze 7 und der RNAi-Pflanze 5 Messreihe 1 ließen sich die beiden

t-Testvarianten ebenfalls nicht durchführen, um zu testen, ob sich die Werte signifikant von den Wildtypwerten unterscheiden.

Für die 4 Werte der Vektorkontrolle pCAM1305.2 gegen den Wildtypmittelwert beziehungsweise die Wildtypwerte meiner Messreihe wurde mit Hilfe des einfachen t-Tests (P-Wert=0,643) und des unabhängigen t-Tests für zwei Stichproben (P-Wert =0,753) jeweils eine nicht signifikante Abweichung ermittelt.

Die t-Tests deren Ergebnisse im Folgenden aufgeführt werden wurden - mit Ausnahme des Vergleiches der Vektorkontrolle pCAM1305.2 mit dem Wildtypen - auf der Basis der vereinheitlichten Werte durchgeführt, bei denen jeweils der Wildtypwert jeder Messreihe mit Eins gleichgesetzt wurde. Während die Signifikanztests ergeben haben, dass die Werte der Überexpressions-pflanzen sich signifikant vom Wildtypwert unterscheiden (P-Wert= 0,043 bzw. 0,047), ergab ein einfacher t-Test dass sie sich nicht signifikant von der Vektorkontrolle pCAMGW2 unterscheiden (P-Wert= 0,054). Die Werte der RNAi-Pflanzen unterscheiden sich laut einfachem t-Test signifikant vom Wildtypwert. Von den Werten der Vektorkontrolle pCAM1305.2 unterscheiden sich die Werte der RNAi-Pflanzen signifikant (P-Wert=0,03).

Diskussion

Verwundungsexperiment

Wie bereits in den Ergebnissen beschrieben, und wie man in Abbildung 5 sehen kann, ist bei den unverwundeten Pflanzen die IDI in den unteren Blättern im Mittel höher exprimiert als in den mittleren Blättern, in den Oberen ist sie wiederum im Mittel schwächer exprimiert als in den mittleren Blättern. Jedoch hat der t-Test für unabhängige Stichproben gezeigt, dass keiner der Unterschiede innerhalb dieser Wertegruppen signifikant ist. Die verwundeten Blätter haben von allen Probengruppen die niedrigste durchschnittliche IDI-Expression mit 0,766: sie haben im Durchschnitt sowohl eine geringere IDI Expression als die unteren, oberen und mittleren Blätter der unverwundeten Pflanzen, als auch eine geringere mittlere IDI Expression als die der oberen und unteren Blätter der verwundeten Pflanzen.

Die IDI Expressionen der verwundeten Blätter unterscheiden sich signifikant von denen der mittleren Blätter der unverwundeten Pflanzen. Die verwundeten Blätter unterscheiden sich auch signifikant von den Expressionswerten der oberen Blätter der verwundeten Pflanzen, welche den höchsten durchschnittlichen Mittelwert aller Blattgruppen der verwundeten Pflanzen haben. Der Mittelwert der unteren Blätter der verwundeten Pflanzen ist auch höher als der Mittelwert der Expression der verwundeten Blätter, aber laut t-Test unterscheidet er sich mit einem p-Wert von 0,061 sehr knapp nicht mehr signifikant von den verwundeten Blättern. Auch voneinander unterscheiden sich die unteren und oberen Blätter, also die nicht verwundeten Blätter der verwundeten Pflanzen nicht signifikant, hier ist der p-Wert mit 0,277 jedoch eindeutig.

Die oberen Blätter der verwundeten Pflanzen unterscheiden sich nicht signifikant von den oberen Blättern der nicht verwundeten Pflanzen, obwohl die Mittelwerte mit je 1,077 und 0,86 eine Verschiedenheit suggerieren. Ebenso unterscheiden sich die unteren Blätter der verwundeten Pflanzen von den unteren Blättern der nicht verwundeten Pflanzen nicht signifikant, mit 0,915 und 1,161 unterscheiden sich die jeweiligen Mittelwerte augenscheinlich. Die Signifikanztests haben ergeben, dass diese oben genannten Wertegruppen jeweils nicht voneinander unterscheidbar sind, wegen der zu hohen Varianzen der einzelnen Wertegruppen.

Man kann auch in die Mittelwerte der Gruppen, welche in Grafik 5 dargestellt sind, ein Muster hineininterpretieren: Bei den verwundeten Pflanzen exprimieren die oberen Blätter im Mittel mehr IDI als die unteren, und die mittleren exprimieren im Durchschnitt am wenigsten. Bei den nicht verwundeten Pflanzen sind, wie bereits zu Anfangs beschrieben die oberen Blätter diejenigen mit der niedrigsten mittleren IDI-Expression, etwas stärker ist die IDI im Durchschnitt in den mittleren Blättern exprimiert und am stärksten scheinbar in den oberen Blättern. Das spielt jedoch keine große Rolle, da die Unterschiede zwischen den Gruppen ohnehin nicht signifikant sind, außer die Unterschiede zwischen den tatsächlich verwundeten Blätter mit den oberen Blättern der verwundeten Pflanze beziehungsweise den mittleren Blättern der unverwundeten Pflanzen.

Dazu kommt noch, dass die Gruppe der unteren Blätter der nicht verwundeten Pflanzen problematisch ist, da sie nur aus zwei Proben besteht, von denen einer -16.4 -, für den das qRT-Programm einen relativ hohen Standardfehler berechnet hat, mit seinem relativ

hohen Einzelwert den Mittelwert dieser Gruppe erhöht. Bei dem Expressionswert des Blattes 16.4 handelt es sich mit 1,34 um einen Ausreißer, mit einem Blick auf alle Einzelwerte kann man sehen, dass dieser Wert deutlich über dem Durchschnitt der Blätter der unverwundeten Pflanzen liegt.

Die verwundeten Blätter der verwundeten Pflanzen haben den geringsten Standardabweichung. Dadurch dass sie verwundet wurden ist ihre IDI-Expression nach 3 Stunden deutlich verschieden von der IDI-Expression in allen anderen Proben drei Stunden nach der Verwundung. Dies untermauern auch die im Folgenden aufgeführten Signifikanztests:

Die verwundeten Blätter unterscheiden sich mit hoher Signifikanz von den zusammengefassten Blattgruppen der nicht verwundeten Blätter der verwundeten Pflanzen und der Blätter der nicht verwundeten Pflanzen. Alle Blätter der verwundeten Pflanzen zusammengefasst unterscheiden sich nicht nicht signifikant von den Blättern der nicht verwundeten Pflanzen, der p-Wert ist hier aber mit 0,166 weniger hoch als der p-Wert von 0,961, der aus der Signifikanzprüfung aus dem Vergleich der unverwundeten Blätter der verwundeten Pflanzen mit den Blättern der unverwundeten Pflanzen resultiert ist, die sich somit nicht signifikant unterscheiden. Alle unverwundeten Blätter unterscheiden sich also hinsichtlich der IDI-Expression drei Stunden nach der Verwundung noch weniger voneinander, als wenn die verwundeten Blätter bei diesem Test in die Gruppe der Blätter der Verwundeten Pflanzen einbezogen werden.

Die entsprechenden Mittelwerte der IDI-Expression der nicht verwundeten Blätter der verwundeten Pflanzen und der Blätter der nichtverwundeten Pflanzen liegen mit jeweils 0,9959 und 0,9628 nahe beieinander.

Auch bei *p. nigra* und *p. trichocarpa* ist die IDI in den verwundeten Blättern weniger stark exprimiert als in den Blättern der nicht verwundeten Pflanzen. Sowohl für *p. nigra* als auch für *p. trichocarpa* ist der Unterschied zwischen diesen beiden Blattgruppen signifikant.

Verglichen mit den mit Eins gleichgesetzten Blattprobengruppen von den unverwundeten Pflanzen der jeweiligen Spezies, ist die veränderte IDI-Expression in verwundeten Blätter der drei Pappelspezies drei Stunden nach der letzten Verwundung

so zusammenzufassen: Durch die Verwundung zeigt sich in den verwundeten Blättern bei *p. canescens* eine Verringerung der IDI-Expression um 23,4%, bei *p.nigra* um 41,27% und bei *p.trichocarpa* ist in den verwundeten Blättern im Durchschnitt 26,14% weniger IDI exprimiert worden als in den Blättern der nichtverwundeten Pflanzen.

Aus der Tatsache, dass bei *p. canescens* die nicht verwundeten Blätter der verwundeten Pflanzen im Mittel ca. die selben mRNA-Level der IDI wie die Blätter der nicht verwundeten Pflanzen aufweisen, kann man schließen, dass die nicht verwundeten Blätter der verwundeten Pflanzen durch die Verwundung ihrer Nachbarblätter bezüglich der IDI-Transkription im Durchschnitt genauso wenig beeinflusst werden könnten wie die Blätter der nicht verwundeten Pflanzen.

Also wurden keine Erhöhung der IDI-Expression in den nicht verwundeten Blättern auf der verwundeten Pflanze induziert. Es ist dennoch denkbar, dass ein anderer Abwehrmechanismus in den benachbarten Blättern der verwundeten Blätter induziert wurde.

Es ist bekannt, dass die Synthese von Terpene bei Verwundung induziert wird [6]

Die IDI nimmt als eines der frühesten Enzyme in der Terpenbiosynthese eine Schlüsselrolle ein, da sie eine Verbindung zwischen den Pools von IDP und DMADP herstellt [IDIcheckpBerthelot]. In Hinblick auf die Vielzahl von Terpenen, die eine Rolle in der Verteidigung von Pflanzen spielen [IDIcheckpBerthelot][Pbiochem Bowsher] [Thieme] wurde erwartet, dass die IDI in der Verteidigungsreaktion der Pappel involviert ist.

Wenn besonders viele Terpene im Rahmen einer Verwundungsantwort benötigt werden, wäre es nötig, wenn die IDI als Ventil zwischen dem IDP- und dem DMADP-Pool, vermehrt exprimiert wird.

Man würde deshalb eigentlich erwarten, dass bei einer Verwundung mehr IDI benötigt wird, und sie deshalb im Rahmen der Verteidigungsantwort verstärkt exprimiert wird, falls Terpene eine prominente Rolle bei der Verteidigung von Pappeln spielen. Deshalb wäre zu erwarten gewesen, dass nach einer Verwundung die IDI-Expression in den Zellen der Pappeln ansteigt und dass die m-RNA-Level bei den verwundeten Proben im Verhältnis zu den unverwundeten Pflanzen erhöht sind. Die Messwerte von *p.canescens*,

p. trichocarpa und p. nigra entsprechen diesbezüglich nicht unbedingt den Erwartungen.

Möglicherweise ist zu viel Zeit seit der zweiten Verwundung vergangen. Es ist denkbar, dass der relative IDI-mRNA-Level nach zweiten Verwundung erst angestiegen ist und dann wieder auf ein niedrigeres Level gesunken ist.

Andererseits: Was würde eine Verringerung der IDI-Expression als Reaktion auf eine Verwundung bedeuten?

Vielleicht spielen die Terpene in Pappel nur zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Verwundung oder überhaupt nur eine untergeordnete Rolle. Wie in der Einleitung dargelegt, gibt es mit den Phenolglycosiden [8] Inhaltsstoffe in Pappeln, die bei der Verteidigung vielleicht eine größere Rolle spielen als Terpene.

Es kann sein, dass die IDI-Expression nach einer Verwundung heruntergefahren wird, weil die Pappeln die Ressourcen benötigen, um andere Verteidigungsmechanismen in Gang zu bringen. Dies wird dadurch untermauert, dass Major und Constabel [6] vermuteten, dass Terpene nur indirekt einen Beitrag zur Verteidigung von Pappeln liefern.

Überexpressionsexperiment

Wenn man die Werte aus den vereinigten Datensätzen vergleicht, macht man folgende Beobachtungen: Die Vektorkontrollen von pCAM1305.2 unterscheiden sich nicht signifikant von den Wildtypen und ihr Mittelwert unterscheidet sich ebenfalls augenscheinlich nicht im großen Maße von den Wildtypen, jedoch haben die pCAM1305.2-Werte eine relativ hohe Standardabweichung. Von den IDI-Expressionen der RNAi-Pflanzen unterscheiden die Expressionen der pCAM1305.2-Vektorkontrollen sich signifikant. Die RNAi-Pflanzen haben mit 0,14 eine erwartungsgemäß niedrige mittlere IDI-Expression, die deutlich niedriger als bei den Vektorkontrollen und dem Wildtyp ist. Die Werte der RNAi-Pflanzen unterscheiden sich laut dem einfachen t-Test signifikant vom Wildtypmittelwert: Der P-Wert dieses Tests war unter dem Signifikanzniveau von 0,05.

Die IDI-Expressionswerte bei den Überexpressionspflanzen sind allesamt deutlich höher als die Wildtypwerte, von denen sie sich zudem signifikant unterscheiden. Allerdings haben die Werte der Überexpressionspflanzen, weil sie stark streuen, einen relativ hohen Standardfehler. Die IDI-Level der vier ÜE-Pflanzen sind also relativ unterschiedlich voneinander.

Die IDI-Expressionen der Überexpressionspflanzen aus den Messreihen 2 und 3 sind allesamt höher als die IDI-Expression der Überexpressionspflanze IDI+ 7 aus Messreihe 1. Die IDI-Expression der Pflanzen IDI+6 und IDI+8 sind sogar zweimal so groß wie die von IDI+7. Für IDI+2 ist die IDI-Expression mit 1,7143 jedoch noch in der Größenordnung von IDI+7, für die eine IDI-Expression von 1,5847 nachgewiesen wurde.

Die Werte der ÜE-Pflanzen und der Wert von pCAMGW2 unterscheiden sich mit einem p-Wert von 0,054 nicht signifikant voneinander, obwohl der Mittelwert der Überexpressionspflanzen mit 2,386 deutlich höher ist als der Wert von pCAMGW2 mit 1,069.

Problematisch könnte sein, dass die höheren Werte allesamt aus den Messreihen 2 und 3 stammen, also nicht aus der selben Messreihe wie die Vektorkontrolle. Es ist vor Allem mit einem gewissen Vorbehalt zu betrachten, da die Werte aus den Messreihen 2 und 3 es ja sind, die den Mittelwert der Überexpressionspflanzen so stark erhöhen.

Im Falle der Wildtypen und der pCAMGW-Vektorkontrollen wäre es von Vorteil, wenn man von mehr Proben die IDI-Expression ermittelt hätte, um vernünftige Signifikanzprüfungen machen zu können.

Dadurch, dass in allen Messreihen die Wildtypwerte mit Eins gleichgesetzt werden, werden die Werte der verschiedenen Messreihen miteinander erst vergleichbar. Die Werte der Wildtyppflanzen müssen als mögliche Ursache für die Unterschiede zwischen den Expressionswerten der Überexpressionspflanzen in Betracht gezogen werden. In Messreihe 1, wurden zwei Wildtypproben analysiert, die zwei voneinander verschiedene IDI-Expressionen hatten. Man kann allerdings nicht ausschließen, dass die IDI-Level in den Wildtypproben von Messreihe 2 und 3 natürlichen Schwankungen unterworfen sind, wie in dem Verwundungsexperiment zu beobachten ist. Es könnte daher problematisch sein, pro Messreihe nur einen Wildtypwert zur Vereinheitlichung der

Datensätze zu verwenden, denn wenn der Wildtypwert zu stark von der Norm abweicht, sind die Expressionswerte der transformierten Pflanzen nicht mehr repräsentativ.

Bei der Frage warum die IDI-Expression bei den verschiedenen Proben so stark schwankt, könnte auch eine Rolle spielen, dass die Proben der Messreihen 2 und 3 zu einem früheren Zeitpunkt geerntet wurden, zu dem die Pflanzen noch jünger waren. Bei den früher geernteten Proben hatten die Pflanzen in ihren Zellen möglicherweise zum Zeitpunkt der Ernte höhere IDI-Level. Mit der Zeit fluktuiert die IDI-Expression in den Geweben einer Pflanzen möglicherweise stark.

Auch die IDI-Expressionen der RNAi-Pflanzen, die in dieser Arbeit ausgewertet werden, stammen aus zwei Messreihen, deshalb sollten sie sich, wegen der zunehmenden Unterschiedlichkeit der absoluten Wildtypwerte aus den beiden Messreihen, auch voneinander unterscheiden. Da jedoch die IDI-Expressionen der RNAi-Pflanzen in allen Messreihen sehr niedrig sind kommt dies hier nicht zum tragen.

Bei Pflanze 1305.2-1 gab es kein Blatt was so groß war wie das der anderen. Deshalb wurde ein jüngerer und ein älterer genommen. Möglicherweise aufgrund des Alters schwankt der IDI-Gehalt sichtbar.

Im Falle der pCAM1305.2-Kontrollpflanzen wurde die leere RNAi-Kassette zusammen mit einer Antibiotikaresistenz an eine zufälligen Stelle des Pflanzengenoms inseriert. Und im Falle der Kontrollpflanzen für pCAMBIA2103 wurde ebenfalls der Bereich zwischen den Bordersequenzen, der auch Kanamycinresistenz trägt sowie die leere Gatewaysite, inseriert. Die Wildtyppflanzen unterscheiden sich von den Vektorkontrollen insofern, dass bei ihnen keine derartigen Konstrukte willkürlich ins Genom inseriert wurden. Man muss in diesem Zusammenhang in Erinnerung behalten, dass jede transformierte Pflanze auf ein Einzeltransformationsereignis zurückgeht.

Für die Überexpressionspflanzen und die RNAi Pflanzen gelten die selben Überlegungen mit dem Unterschied, dass hier bei den Gatewaysites das entsprechende DNA-Fragment, nämlich die RNAi-Kassette oder das IDI-Gen inseriert wurde

Im Falle der ÜE-Pflanzen: findet sich daran, dass das Fragment, das in das Pflanzengenom inseriert wird dort rein zufällig inseriert wird möglicherweise ein weiteren Ansatz um die unterschiedlich hohen IDI-Expressionen in den Überexpressionspflanzen zu erklären. Das Gen steht zwar hinter einem starken Promoter aber wie stark das die IDI exprimiert wird, hängt auch davon ab ob es:

1. an einer gut oder schlecht zugänglichen Stelle des Genoms inseriert wurde, und außerdem
2. ob das / die inserierten Gen/e irgendwelche Pappel Gene/ oder andere Bereiche des Genoms, die nicht direkt kodieren, aber dennoch das physiologisch normale , situationsabhängige exprimieren/supprimieren von Genen mit beeinflussen.

Andererseits wird von Gavin [17] wird nahegelegt, dass Pflanzen, bei denen t-DNA an unzugängliche Stelle inseriert wird, nicht die Antibiotikabehandlung überstehen und damit erst gar nicht oder mit geringerer Wahrscheinlich kultiviert werden.

Bei den pCAM1305.2-Vektorkontrollen ist die Streuung der Expressionswerte jedoch vermutlich hauptsächlich dem Umstand geschuldet, dass die beiden Werte von Pflanze 1 von verschiedenen alten Blättern stammen. Den Insertionsort dafür als Ursache in Erwägung zu ziehen scheint ungerechtfertigt.

Wie kann man wiederum bei den ÜE-Pflanzen ausschließen, dass die hohe IDI-Expression von der Spezifität der Insertionsorte und daraus denkbar resultierender Auswirkungen auf den Stoffwechsel herrührt?

Das wird hoffentlich dadurch eliminiert, dass solche Pflanzen im weiteren Wachstum Probleme bekommen und schlechter wachsen und eingehen oder andere Auffälligkeiten im Wachstum an den Tag legen.

Die Probe von pCAMGW2 ist so wie man es für eine Vektorprobe erwarten würde: sie unterscheidet sich nicht großartig vom Wildtyp und untermauert so die Wirkung von der Positivprobe.

pCAMGW2 reicht als Vektorkontrolle aus: es wurde bewiesen, dass eine Pflanze, die Teile des den leeren Vektors enthält eine relativ normale IDI-Expression an den Tag legt. Damit könnte bereits hinreichend bewiesen sein, dass der Reste des leeren Vektors,

wenn er an keiner ungünstigen Stelle inseriert wird, keine Auswirkung auf die IDI-Expression hat.

Fazit:

Auch allein reicht die Vektorkontrolle pcamgw 2 um zu beweisen, dass es auf den Inhalt der ÜE-Kassette ankommt.

Die IDI-Expression der RNAi-Pflanzen ist deutlich niedriger als in den Wildtypen.

Zudem unterscheiden sich die RNAi-Pflanzen Signifikant von ihnen. Die ÜE-Pflanzen haben eine deutlich höhere IDI-Expression als der Wildtyp, von dem sie sich auch signifikant unterscheiden. Dies entspricht den Erwartungen.

Einige IDI-Expressionen der ÜE-Pflanzen sind deutlich höher als die anderer ÜE-Pflanzen, aber das lässt sich letztendlich auf die Tatsache zurückführen, dass alle Transformationsereignisse individuell sind und dass die in dieser Arbeit verwendeten Werte aus verschiedenen Messreihen stammen.

Mithilfe in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse ließ sich feststellen, dass die Pflanzen, die mit dem von mir hergestellten Überexpressionsplasmid transformiert wurden, im Verhältnis zum Wildtyp mehr IDI exprimieren, sowie dass in den von der Arbeitsgruppe hergestellten knockdown-Linien erfolgreich die IDI reprimiert wurde.

Quellen:

- [1] **Die Kosmos Enzyklopädie der Bäume**, More, White, Franckh-Kosmos Verlag, 2005
- [2] **Deutschlands alte Bäume** Stefan Kühn, Bernd Ulrich, Uwe Kühn, BLV Verlagsgesellschaft München, 2002
- [3] **Taschenlehrbuch Biologie: Botanik**, Munk, Bilger, Dauborn, Dietz, Thieme, 2009
- [4] **Plant Biochemistry**, Bowsher, Steer, Tobin, Garland Science, 2008
- [5] **Pflanzenphysiologie**, Schopfer, Brennicke, Spektrum Akad. Verlag, 7. Auflage, 2010
- [6] **Molecular analysis of poplar defense against herbivory: comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression**, Major und Constabel, Blackwell Publishing Ltd. (2006)
- [7] **Molecular Physiology and Biotechnology of Flowering Plants**, A. Rashid, Alpha Science International Ltd, 2009
- [8] **Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses** Boeckler, Gershenzon, Unsicker, Phytochemistry, Elsevier (2011)
- [9] **Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defense of conifers against insects and pathogens**, Keeling, Bohlmann, New Phytologist (2006)
- [10] **Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis**, Berthelot, Estevez, Deffieux, Peruch, Biochimie, Elsevier (2012)
- [11] <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.1>
- [12] Script zur Vorlesung Naturstoffchemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Modulverantwortlicher: C. Hertweck
- [13] **Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of Populus trichocarpa**, Danner, Boeckler, Irmisch, Yuan, Chen, et. Al., Phytochemistry, Elsevier (2011)
- [14] <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.17.1.2>
- [15] **Isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate/isopentenyl diphosphate ratio measured with recombinant isopentenyl diphosphate isomerase and isoprene synthase**, Zhou, Wiberley-Bradford, Weise, Sharkey, Analytical Biochemistry, Elsevier (2013)
- [16] **A single Gene encodes Isopentenyl diphosphate isomerase isoforms targeted to plastids, mitochondria and peroxysomes in Catharanthus Roseus**, Guirimand, Guihur, Phillips, Oudin, et. Al., Plant Mol Bio (2012)
- [17] **Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool** Stanton B. Gelvin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders gilt dieser Dank Herrn Dr. Axel Schmidt, der meine Arbeit betreut hat. Und der mir einen wertvollen Einblick in das Fachgebiet ermöglicht hat. Vielen Dank für die Geduld und Mühen.

Ich möchte mich auch bei Marion Stäger bedanken, die mir bei den Unwegsamkeiten des Laboraltags mit Rat und Tat beiseite stand.

Daneben gilt mein Dank meinen Eltern, die mir immer beigestanden haben und Ricard Anufriev für seinen Glauben an mich.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift