

**Isolierung und Charakterisierung von
Genkopien der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2
aus *Brassica napus* L.
sowie Entwicklung transgener Rapspflanzen
mit erhöhtem Ölsäuregehalt im Samen**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Patricia Spiekermann
Hamburg**

Hamburg, 2005

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACP	Acyl-Carrier-Protein
Amp	Ampicillin
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CDP	Cytidindiphosphat
CoA	Coenzym A
DAG	Diacylglycerin
DGD	Digalaktosyldiacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	<i>fatty acid desaturase</i> (Fettsäure-Desaturase)
G	Guanin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
Gent	Gentamycin
G3P	Glycerin-3-phosphat
HK	Halbkorn
HO	<i>high oleic</i> (Hoch-Ölsäure)
HP	Hairpin
iHP	Hairpin mit Intron
IR	Inverted-Repeat
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LeB4	Legumin 4 der Klasse B aus <i>Vicia faba</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
MES	2-N-morpholinoethansulfonsäure
MGD	Monogalaktosyldiacylglycerin
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Murashige und Skoog
MUFA	<i>monounsaturated fatty acid</i> (einfach ungesättigte Fettsäure)
NAA	Naphthyllessigsäure
NPTII	Neomycin-Phosphotransferase
OD	optische Dichte
ODP	<i>oleic acid desaturation proportion</i> (Ölsäure-Desaturierungsrate)
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phosphatidylethanolamin, Petrolether
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
PTGS	<i>posttranscriptional gene silencing</i>

PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i> (mehrfach ungesättigte Fettsäure)
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
SFA	<i>saturated fatty acid</i> (gesättigte Fettsäure)
sHP	Haipin mit Spacer
Sm	Streptomycin
<i>sn</i>	stereospezifische Numerierung
Sp	Spectinomycin
SQD	Sulfochinovosyldiacylglycerin
T	Thymin
TAG	Triacylglycerin
U	<i>unit</i> (Einheit für Enzymaktivität)
USP	<i>unknown seed protein</i> aus <i>Vicia faba</i>
UTR	<i>untranslated region</i> (untranslatierter Bereich)
v/v	Volumen per Volumen
VLCFA	<i>very-long-chain fatty acid</i> (sehr langkettige Fettsäure)
w/v	Gewicht per Volumen
WT	Wildtyp

Aminosäuren:

A	Alanin	L	Leucin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	M	Methionin
D	Asparaginsäure	F	Phenylalanin
C	Cystein	P	Prolin
Q	Glutamin	S	Serin
E	Glutaminsäure	T	Threonin
G	Glycin	W	Tryptophan
H	Histidin	Y	Tyrosin
I	Isoleucin	V	Valin

Fettsäuren werden im Text auch in Zahlenform abgekürzt. Dabei wird die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Fettsäure durch die Zahl vor dem Doppelpunkt und die Anzahl der Doppelbindungen durch die Zahl nach dem Doppelpunkt angegeben. So steht z.B. 18:1^{Δ9} für Ölsäure. Die Position der Doppelbindungen wird durch die hochgestellten Zahlen wiedergegeben. Erfolgt die Bestimmung der Lage vom Carboxylende aus, so steht ein Δ vor den Zahlen. Bei der Bestimmung vom Methylende aus wird dies durch ein ω gekennzeichnet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Anwendungsbereiche für HO-Pflanzenöle und Bedeutung von Raps als Ölsaart	1
1.2 Speicherlipid- und Membranlipid-Biosynthese in höheren Pflanzen	5
1.3 Struktur, Funktion und Gene der Oleatdesaturasen FAD2 und FAD6	10
1.4 Ansätze zur Entwicklung von HO-Formen traditioneller Ölsaaten	14
1.5 PTGS in Pflanzen	18
1.6 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Verbrauchsmaterial	25
2.2 Biologisches Material	26
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	26
2.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme	26
2.2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stamm	26
2.2.4 Pflanzenmaterial	26
2.3 Vektoren	27
2.4 Kultivierung von Bakterien und Hefen	27
2.4.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	27
2.4.2 Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i>	28
2.4.3 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	29
2.5 Transformation von Bakterien und Hefen	30
2.5.1 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock	30
2.5.2 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	31
2.5.3 Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	31
2.5.4 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mittels Elektroporation	32
2.6 Isolierung von Plasmid-DNA	32
2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	32
2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i>	34
2.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	35
2.7 Molekularbiologische Standardmethoden	35
2.7.1 Enzymatische Modifizierung von DNA	35
2.7.2 Klonierung von PCR-Fragmenten	36
2.7.3 Reinigung und Fällung von DNA	36
2.7.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.7.5 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese	37
2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
2.9 DNA-Sequenzierung	39
2.10 Computer-gestützte Sequenzauswertung	40

2.11 Herstellung von rekombinanten Plasmiden.....	40
2.11.1 Klonierung von <i>FAD2</i> -Genkopien aus <i>B. napus</i> var. Ascari, Drakkar, Wotan.....	40
2.11.2 Konstrukte zur heterologen Expression von <i>FAD2</i> -Genkopien in <i>S. cerevisiae</i>	41
2.11.3 Konstrukte zur Transformation von <i>B. napus</i>	42
2.11.3.1 Klonierung von Sequenzen der Zielgene.....	42
2.11.3.2 Herstellung von Promotor/Terminator-Kassetten.....	43
2.11.3.3 Herstellung von Promotor/Hairpin/Terminator-Kassetten	44
2.11.3.4 Herstellung von Hairpin-Konstrukten	47
2.12 Transformation von <i>B. napus</i>	48
2.13 Isolierung von Nukleinsäuren aus <i>B. napus</i>	50
2.13.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>B. napus</i>	50
2.13.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe.....	51
2.14 PCR-Analyse von transformierten Pflanzen	51
2.15 RT-PCR.....	52
2.16 Markierung von DNA mit DIG-dUTP	52
2.17 Southern-Blot-Analysen.....	53
2.18 Screening einer cDNA-Bank.....	56
2.18.1 Präparation von Wirtszellen und Plattieren der cDNA-Bank.....	56
2.18.2 Plaque-Transfer auf Nylonmembranen, Plaque-Hybridisierung und Detektion	57
2.18.3 <i>in vivo</i> -Excision	59
2.19 Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	60
2.20 GLC-Analyse von Fettsäuremethylestern (FAMES).....	61
3. Ergebnisse und Diskussion	62
3.1 Isolierung von Genkopien der mikrosomalen Oleatdesaturase <i>FAD2</i> aus <i>B. napus</i>	62
3.2 Charakterisierung von Genkopien der mikrosomalen Oleatdesaturase <i>FAD2</i>	67
3.2.1 Funktionale Expression von <i>FAD2</i> -Genkopien in <i>S. cerevisiae</i>	67
3.2.2 Expression der <i>FAD2</i> -Genkopien in vegetativem Gewebe	69
3.2.3 Charakterisierung einer HO-Mutante von <i>B. napus</i> var. Wotan.....	70
3.3 Entwicklung transgener Hoch-Ölsäure-Rapspflanzen.....	77
3.3.1 Hemmung der mikrosomalen Oleatdesaturase <i>FAD2</i> in reifenden Rapssamen.....	78
3.3.1.1 Effizienz der Silencing-Konstrukte	80
3.3.1.2 Ausprägung des HO-Phänotyps.....	85
3.3.1.3 Stabilität des HO-Phänotyps.....	90
3.3.1.4 Gewebespezifität der <i>FAD2</i> -Hemmung	93
3.3.1.5 Korrelation von ODP-Verteilung und Transgen-Kopienzahl.....	95
3.3.2 Versuche zur simultanen Hemmung der Oleatdesaturasen <i>FAD2</i> und <i>FAD6</i> in reifenden Rapssamen.....	101
4. Zusammenfassung	104
5. Literatur	106
6. Anhang.....	118

1. Einleitung

Rapsöl mit hohem Ölsäuregehalt ist sowohl für den Nahrungsmittelbereich als auch für verschiedene chemisch-technische Anwendungen von großem Interesse. Aufgrund des hohen Anteils an einfach-ungesättigten Fettsäuren (MUFAs, *monounsaturated fatty acids*) und reduzierten Gehalten an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs, *polyunsaturated fatty acids*) zeigt Hoch-Ölsäure(HO)-Rapsöl eine verbesserte Stabilität gegenüber oxidativen Veränderungen und weist vorteilhafte nutritive Eigenschaften auf. In dieser Arbeit sollte HO-Raps mittels gentechnischer Methoden entwickelt werden, wobei die Strategie darin bestand, die Desaturierung der Ölsäure im Samen durch gezielte Hemmung der beteiligten Desaturasen zu unterbinden. Bei diesem Ansatz waren die enge Koordination von Membranlipid- und Speicherlipid-Biosynthese, mögliche Desaturierungs-Alternativen und Kompensations-Mechanismen zu berücksichtigen. In den folgenden Abschnitten werden zunächst in einer allgemeinen Einführung die Vorzüge von HO-Pflanzenölen und deren Anwendungsbereiche vorgestellt, desweiteren wird die Eignung von Raps für die gentechnologische Verbesserung von Ölqualitäten erläutert. Anschließend erfolgt eine Darstellung der Glycerolipid-Biosynthese in höheren Pflanzen mit besonderem Augenmerk auf die für die Oleatdesaturierung relevanten Stoffwechselwege und Enzyme. Anhand der Erläuterungen zu den Desaturierungs-Kompartimenten soll deutlich werden, welche Faktoren den Desaturierungsgrad der C18-Fettsäuren in den Speicherlipiden beeinflussen. Die Funktionsweise der wichtigsten Ziel-Enzyme – der Oleat-desaturasen FAD2 und FAD6 – wird beschrieben und auf deren Bedeutung für Wachstum und Entwicklung der Pflanzen hingewiesen. Weiterhin werden verschiedene Ansätze aus Selektions-züchtung und Gentechnologie vorgestellt, mit denen bereits HO-Formen verschiedener Ölsaaten entwickelt werden konnten. Da in dieser Arbeit für die sequenzspezifische Hemmung von Enzymen die Antisense-Hairpin-Technik gewählt wurde, wird der zugrunde liegende Mechanismus PTGS (*posttranscriptional gene silencing*) abschließend näher erläutert.

1.1 Anwendungsbereiche für HO-Pflanzenöle und Bedeutung von Raps als Ölsaat

Pflanzenöle mit hohem Ölsäuregehalt eignen sich als Rohstoffe für verschiedenste Anwendungen. Sie werden von der Lebensmittelindustrie ebenso geschätzt wie von Schmierstoff-Herstellern, Kunststoff-Produzenten und der Kosmetikindustrie. Derzeit werden weltweit jährlich ca. 300.000 t HO-Pflanzenöle erzeugt, in Europa 75.000 t und in Deutschland zuletzt 6.000 t (1999). Die Vermarktung erfolgt gegenwärtig vorwiegend im Food-Sektor (mind. 80 %), der industrielle Non-Food-Sektor trägt etwa zu 10-20 % zum Verbrauch bei (Narocon, 2001).

Für eine Verwendung im Nahrungsmittelbereich bieten HO-Pflanzenöle vorteilhafte nutritive Eigenschaften. Bei der Pathogenese und dem Verlauf ernährungsbedingter Krankheiten wie z.B. der Arteriosklerose ist nicht nur die Höhe des Fettkonsums, sondern auch die Fettsäurezusammensetzung der Nahrung von Bedeutung. So können die verschiedenen Fettsäuren u.a. gegensätzliche Effekte auf die Konzentration von LDL- und HDL-Cholesterin im Plasma haben. Die gesättigten Fettsäuren (SFAs) 12:0, 14:0 und 16:0 besitzen die unerwünschte Eigenschaft, LDL-Cholesterin zu steigern, wodurch sich das Risiko für arteriosklerotische Gefäßerkrankungen erhöht. 18:0 zeigt diesen Effekt nicht und gilt als neutral in Bezug auf das Arteriosklerose-Risiko. Im Vergleich dazu wirken MUFAs und PUFAs LDL-senkend (Kris-Etherton und Yu, 1997).

Der Gehalt an LDL-Cholesterin wird in erster Linie durch die Syntheserate und die Rezeptor-abhängige Aufnahme in die Leber bestimmt. Die in der Leber akkumulierenden verschiedenen Fettsäuren aus der Nahrung greifen in Rückkopplungs-Mechanismen der Cholesterinbiosynthese ein und steigern oder supprimieren die Rezeptor-Aktivität in den Leberzellen. Bestimmt wird die Auswirkung jeder Fettsäure dabei durch die Fähigkeit, als effektives Substrat für die Bildung von Cholesterinestern zu dienen, die im Gegensatz zum Cholesterin nicht regulatorisch wirken. Ölsäure ist das bevorzugte Substrat für die ACAT (Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase) und bewirkt bei Anreicherung in den Leberzellen eine Verkleinerung des zellulären Cholesterin-Pools, was zu einer erhöhten hepatischen LDL-Rezeptor-Aktivität und damit zur Senkung des LDL-Cholesterins im Blut führt (Renaud und Lanzmann-Petithomy, 2001). Bei Anreicherung von 16:0 vergrößert sich dagegen der Cholesterin-Pool, der dann eine Hemmung der LDL-Rezeptoren und damit einen erhöhten LDL-Plasmaspiegel auslöst.

Zusätzlich zum LDL-senkenden Effekt zeigt Ölsäure, wenn sie in den LDL-Partikeln angereichert ist, bei oxidativem Stress im Vergleich zur Linolsäure einen negativen Einfluss auf Chemotaxis und Adhaesion von Monozyten und bewirkt so eine verzögerte Entstehung von Arteriosklerose (Tsimikas *et al.*, 1999). Außerdem scheint Ölsäure einen günstigen Effekt auf die Pathogenese von Thrombosen zu haben. So wurde eine verringerte Aktivität des Gerinnungsfaktors VII beobachtet, der mit der Sterblichkeit an koronaren Herzerkrankungen assoziiert wird (Roche *et al.*, 1998).

Bei der Herstellung von Margarinen, Frittierölen, Brat- und Backfetten werden aus lebensmitteltechnologischer Sicht besondere Anforderungen an die Fettsäure-Zusammensetzung eines Pflanzenöls gestellt, wobei Eigenschaften wie Haltbarkeit, thermische Stabilität und Oxidationsanfälligkeit im Vordergrund stehen. Ein aus ernährungsphysiologischer Sicht günstiger hoher Anteil an PUFAs stellt aufgrund der hohen Oxidationsanfälligkeit einen beträchtlichen Nachteil für die Verwendbarkeit als Frittier- oder Bratfett dar. Um sowohl die Oxidationsstabilität als auch die Haltbarkeit von Pflanzenöl-enthaltenden Lebensmitteln zu erhöhen, werden die Öle partiell hydriert, woraus sich allerdings Nachteile durch Bildung von unerwünschten *trans*-Fettsäuren wie z.B. Elaidinsäure (*trans*-18:1) ergeben können. Im Humanversuch stellten Mensink und Katan (1990) fest, dass *trans*-Fettsäuren eine Erhöhung der Serum-Triglyceride, des Gesamt-Cholesterins und des LDL-

Cholesterins bewirken, das HDL-Cholesterin erniedrigen und generell ähnliche Auswirkungen auf die Serumlipide haben wie gesättigte Fettsäuren. Weitere Befunde zeigten, dass *trans*-Fettsäuren nachteiligen Einfluss auf die Entwicklung des menschlichen Fötus haben können. Ein hoher Gehalt an *trans*-Fettsäuren korreliert mit einem geringen Geburtsgewicht und erniedrigten Gehalten an C20- und C22-PUFAs, die auf eine Beeinträchtigung der Desaturierung und/oder Kettenverlängerung der essentiellen Fettsäuren zurückgeführt wurden (Koletzko, 1992). Aufgrund der gesundheitlichen Risiken ist es deshalb wünschenswert, den Gehalt an *trans*-Fettsäuren in Lebensmitteln zu reduzieren. HO-Pflanzenöle bieten die Möglichkeit, auf Hydrierung zu verzichten, da sie eine geringe Oxidationsanfälligkeit und gutes Hochtemperaturverhalten aufweisen. Da die relativen Oxidationsraten von Linol- bzw. Linolensäure 10- bzw. 20-mal höher sind als die von Ölsäure, ist die oxidative Stabilität eines Öls umso größer, je geringer der Anteil an PUFAs ist. Die verbesserte Funktionalität wurde für eine Reihe von HO-Ölen in Tests zur oxidativen Stabilität und zum Temperaturverhalten nachgewiesen, z.T. waren die Eigenschaften mit denen hydrierter Produkte vergleichbar (Hazebroek, 2000).

HO-Pflanzenöle stellen ideale Rohstoffe für die Oleochemie dar, da sie aufgrund der von Ölsäure dominierten Fettsäurezusammensetzung eine Reinheit aufweisen, die im Bereich natürlicher Rohstoffe nur selten zu finden ist. Technische Ölsäure („Olein“) wird heute vorwiegend aus Rindertalg gewonnen, der von Natur aus ca. 40 % Ölsäure enthält. Entscheidend für die technische Ölsäure sind niedrige Gehalte an gesättigten Fettsäuren, die in einem niedrigen Stockpunkt resultieren. Die gesättigten Fettsäuren werden durch Hochdruckhydrolyse und anschließende Umnetzung oder Kristallisation abgetrennt, wodurch Öle mit 70-75 % Ölsäure erhalten werden. Allerdings steigen bei den verwendeten Reinigungsverfahren im Talg-Olein die Anteile der für das Oxidationsverhalten nachteiligen mehrfach ungesättigten C18-Fettsäuren, deren Abtrennung einen erheblichen Aufwand bedeutet. Im Gegensatz dazu führt die Spaltung von HO-Pflanzenölen direkt zu einem Produkt von hoher Reinheit.

Zusätzlich zur hohen oxidativen Stabilität und gutem Hoch- und Tieftemperaturverhalten bieten HO-Öle mit der Δ^9 -Doppelbindung in der Alkylkette ein eindeutiges und reaktives Zentrum für chemische Synthesen. Ausgehend von Ölsäure oder Ölsäuremethylestern können eine Reihe von gezielten Reaktionen mit breitem Anwendungspotential durchgeführt werden: z.B. 1) Ozonolyse oder Übergangsmetall-katalysierte direkte oxidative Spaltung der Doppelbindung zur Gewinnung von Pelargonsäure und Azelainsäure, 2) Epoxidierung und anschließende Hydrolyse zu Polyolkomponenten, 3) Dimerisierung zur Herstellung von Dimerfettsäuren, 4) Metathese zur Gewinnung mittelkettiger und ω -ungesättigter Fettsäureester (Biermann *et al.*, 2000; Narocon, 2001).

Aufgrund der biologischen Abbaubarkeit werden Pflanzenöle als sog. Verlustschmierstoffe wie z.B. Sägekettenöle oder Weichenschmierstoffe eingesetzt. HO-Öle können dort eingesetzt werden, wo herkömmliche Rapsöle aufgrund ihres Gehalts an PUFAs zu Verharzung oder oxidativen

Unbeständigkeit führen. Eine weitere Verbesserung der oxidativen Stabilität der Schmierstoffe ohne Verlust der biologischen Abbaubarkeit ist durch katalytische Addition von organischen Säuren an die Doppelbindung möglich (Keller *et al.*, 2001).

Ölsäurederivate eignen sich in der Fettchemie für verschiedenste Anwendungsbereiche und finden gegenwärtig vor allem Einsatz als Schmierstoffe, Emulgatoren, kosmetische Komponenten oder Polymer-Additive. Derzeit werden in Europa jährlich etwa 15.000-20.000 t HO-Öle in der oleochemischen Industrie eingesetzt. Das Potential wird allerdings um den Faktor 5 höher eingeschätzt (Narocon, 2001). Besonders in der Kunststoff-Industrie, in der fettchemische Derivate bislang nur im Bereich der Additive eine Rolle spielen, besteht ein enormes Nutzungspotential. Da für Polymerisationsreaktionen die Reinheit der Edukte zur Steuerung des Prozesses von großer Bedeutung ist, da sonst Kettenabbruchsreaktionen drohen, ist dieser Anwendungsbereich geradezu prädestiniert für definierte Rohstoffe wie HO-Öle.

Von den HO-Ölsaaten wird gegenwärtig nur HO-Sonnenblumenöl in nennenswertem Umfang produziert und vermarktet. In den USA liegt mit 100.000 ha die größte Anbaufläche, in Frankreich werden 30.000-50.000 ha angebaut (Narocon, 2001). Die Erträge je Hektar liegen allerdings unter dem Niveau der konventionellen Sorten, außerdem ist der Anbau aufgrund der generellen Kälteempfindlichkeit der Sonnenblume regional begrenzt.

Als natürliche Ölsäure-Quelle ist prinzipiell *Euphorbia lathyris* (Kreuzblättrige Wolfsmilch) sehr interessant. Der Ölsäuregehalt der Samen beträgt ca. 85 %, der Ölgehalt ca. 50 % und der Ertrag kann 30 dt/ha erreichen. Allerdings weist die Pflanze einige Nachteile auf, wie z.B. toxische Inhaltsstoffe und typische Charakteristika von Wildpflanzen, die eine Kultivierung und Produktion in größerem Umfang erschweren (Lühs und Friedt, 1994b).

Raps ist aus verschiedenen Gründen für eine gezielte Veränderung der Ölqualität geeignet. Die *Brassica*-Ölsaaten gehören zu den wichtigsten Quellen für Pflanzenöle, weltweit stehen sie an dritter Stelle hinter Soja und der Ölpalme. Sie weisen eine Anpassungsfähigkeit auf, die ein Wachstum sowohl in subtropischen als auch in kühlen gemäßigten Regionen erlaubt, außerdem sind sowohl Sommer- als auch Winterformen vorhanden. In Nord- und Mitteleuropa ist Raps die am besten adaptierte Ölpflanze. Die Produktionsfläche von Raps und Rübsen betrug 2001 in Deutschland nach BMVEL-Angaben 1,14 Mill. ha mit einem durchschnittlichen Ertrag von 35,2 dt, wobei auf ca. 93 % der Ölsaatenfläche Winterraps angebaut wurde. Zusätzlich zu den agronomischen Vorteilen bietet der Raps eine besondere Eignung für biotechnologische Methoden durch relativ einfache Transformier- und Regenerierbarkeit in *in vitro*-Zell- und Gewebekulturen. Neben der Entwicklung von transgenen Rapspflanzen mit Protein-Modifikationen oder mit Pathogen- oder Insekten-Toleranz ist die Veränderung des Fettsäure-Musters im Samenöl ein wichtiger Schwerpunkt. Einen Erfolg in dieser Hinsicht erzielten Voelker *et al.* (1996), die durch Expression einer für Lauroyl-ACP spezifischen Acyl-ACP-Thioesterase aus *Umbellularia californica* Hoch-Laurinsäure-Raps entwickelten. Andere

Modifikationen zielten z.B. auf Erhöhung des Gehalts an Stearinsäure (Knutzon *et al.*, 1992; Hawkins und Kridl, 1998), Erucasäure (Zou *et al.*, 1997; Münster *et al.*, 1998) oder Palmitinsäure (Jones *et al.*, 1995), Produktion von Caprylsäure (8:0) und Caprinsäure (10:0) (Dehesh *et al.*, 1996) oder γ -Linolensäure (18:3^{A6,9,12}) (Ursin *et al.*, 2000).

Bei einer Suppression endogener Gene mittels gentechnischer Methoden ist die Polyploidie von *B. napus* zu berücksichtigen. Der allotetraploide Raps (Genom AACC, n = 19) ist durch spontane Bastardierung von Rübsen (*B. rapa*, AA, n = 10) und Kohl (*B. oleracea*, CC, n = 9) entstanden und weist in seinem Genom größere dublizierte Bereiche auf. So werden, anders als in *Arabidopsis*, die Desaturasen und andere Enzyme des Lipidmetabolismus durch Multigen-Familien repräsentiert (Scheffler *et al.*, 1997). Folglich sind für eine erfolgreiche Suppression endogener Gene neben Kenntnissen über Biosynthese-Wege und Regulationsmechanismen Informationen über Kopienzahl, Funktionalität und Expression der Zielgene von Bedeutung.

1.2 Speicherlipid- und Membranlipid-Biosynthese in höheren Pflanzen

Die Lipide der Pflanzenzellen bilden eine strukturell heterogene Gruppe von hydrophoben Verbindungen mit vielfältigen Funktionen. In erster Linie wirken die Lipide als Membrankomponenten oder Speicherverbindungen, sie dienen dem Oberflächenschutz oder sind an Elektronentransport-, Signalübertragungs- und Proteinmodifizierungs-Prozessen beteiligt. Zellen aus Blattgewebe enthalten bezogen auf ihr Trockengewicht ca. 5-10 % an Lipiden (Ohlrogge und Browse, 1995). Diese sind hauptsächlich in den Membranen lokalisiert und bestehen zum größten Teil aus Galakto- und Phospholipiden. In Samen dagegen kann der Lipidgehalt durch Akkumulation von Speicherlipiden bis 80 % des Trockengewichts erreichen (Voelker und Kinney, 2001). Die Speicherlipide haben vor allem die Funktion eines Kohlenstoffspeichers und bestehen zumeist aus Triacylglycerinen (TAGs), die während der Samenreifung in Zellen des Embryos und/oder Endosperms gebildet und in Ölkörpern abgelagert werden.

Zusammen mit den Phospho- und Galaktolipiden der Membranen gehören die TAGs zu den strukturell auf Glycerin basierenden Glycerolipiden, die die größte Gruppe pflanzlicher Lipide bilden. Bei den Membranlipiden ist das Glycerinmolekül mit einer polaren Kopfgruppe und zwei Fettsäuren verestert, wobei es sich in erster Linie um C16- und C18-Fettsäuren mit ein bis drei Doppelbindungen handelt. In die TAGs, die drei veresterte Fettsäuren besitzen, können zusätzlich „ungewöhnliche“ Acylketten eingeschleust werden, die sich in ihrer Länge oder durch funktionale Gruppen wie z.B. Hydroxylgruppen unterscheiden. So sind in Samenölen mehr als 300 verschiedene Fettsäuren nachgewiesen worden (van de Loo *et al.*, 1993).

Bei Pflanzen sind an der Glycerolipidbiosynthese die Kompartimente Plastid, Cytosol und Endoplasmatisches Retikulum (ER) beteiligt (Abb. 1.1). Die *de novo*-Biosynthese der Fettsäuren erfolgt im Stroma der Plastiden ausgehend von Acetyl-CoA durch zyklische Verlängerung von Acyl-Carrier-Protein(ACP)-gebundenen Acylgruppen um C₂-Einheiten (Ohlrogge und Browse, 1995), katalysiert durch den Multienzymkomplex Fettsäure-Synthase (FAS). Als wichtigste Primärprodukte resultieren Palmitoyl-ACP (16:0-ACP) und Stearoyl-ACP (18:0-ACP). Die erste Doppelbindung in 18:0-ACP wird von der löslichen Stearoyl-ACP-Desaturase an der Δ^9 -Position eingeführt, wodurch Oleoyl-ACP (18:1-ACP) entsteht (Shanklin und Somerville, 1991). Im folgenden werden die Acylreste der Acyl-ACPs zur Glycerolipidbiosynthese genutzt, und zwar entweder innerhalb der Plastiden über den prokaryoten Weg oder am ER über den eukaryoten Weg.

Der prokaryote Weg der Glycerolipidbiosynthese, dessen Enzyme in der Hüllmembran der Plastiden lokalisiert sind, dient in erster Linie der Synthese von plastidären Membranlipiden. Durch eine schrittweise Acylierung von Glycerin-3-phosphat (G3P) entsteht zunächst Phosphatidsäure (PA). Aufgrund der Substratspezifitäten der beteiligten Acyltransferasen (Frentzen, 1993) besitzt PA an der *sn*-1-Position vorwiegend 18:1, an der *sn*-2-Position stets 16:0. Da dieses für die Plastiden typische Fettsäuremuster, das in den gebildeten Membranlipiden erhalten bleibt, auch bei Cyanobakterien beobachtet wird, bezeichnet man die Glycerolipidsynthese in den Plastiden als prokaryoten Weg. PA wird für die Synthese von Phosphatidylglycerin (PG) genutzt oder zu Diacylglycerin (DAG) dephosphoryliert, welches dann als Vorstufe für die anderen wichtigen Membranlipide Monogalaktosyldiacylglycerin (MGD), Digalaktosyldiacylglycerin (DGD) und Sulfochinovosyldiacylglycerin (SQD) dient.

Die Desaturierung der lipidgekoppelten C₁₆- und C₁₈-Acylreste in den Plastiden erfolgt durch membrangebundene Acyl-Lipid-Desaturasen, die vorwiegend an der Envelopemembran lokalisiert sind. Eine Δ^3 -*trans*-Doppelbindung wird von der Desaturase FAD4 selektiv in PG an der *sn*-2-Position in 16:0 eingeführt (Browse *et al.*, 1985). Das Enzym FAD5 inseriert dagegen ausschließlich an der *sn*-2-Position von 16:0 in MGD eine Δ^7 -*cis*-Doppelbindung (Kunst *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu FAD4 und FAD5 sind die anderen plastidären Desaturasen relativ unspezifisch bezüglich der Kettenlänge (C₁₆ oder C₁₈), der Position des Acylrests (*sn*-1 oder *sn*-2) und der Kopfgruppe am Glyceringerüst. Die Acylreste 16:1 ^{Δ^7} bzw. 18:1 ^{Δ^9} werden durch die Desaturase FAD6 an der ω^6 -Position zu 16:2 ^{$\Delta^{7,10}$} bzw. 18:2 ^{$\Delta^{9,12}$} desaturiert (Browse *et al.*, 1989). Anschließend erfolgt eine ω^3 -Desaturierung zu 16:3 ^{$\Delta^{7,10,13}$} bzw. 18:3 ^{$\Delta^{9,12,15}$} durch die Desaturase FAD7 (Browse *et al.*, 1986) oder das bei niedrigen Temperaturen exprimierte Isoenzym FAD8 (Gibson *et al.*, 1994; McConn *et al.*, 1994). Etwa 70 % der Acylreste plastidärer Membranlipide sind dreifach-ungesättigt (Somerville und Browse, 1991).

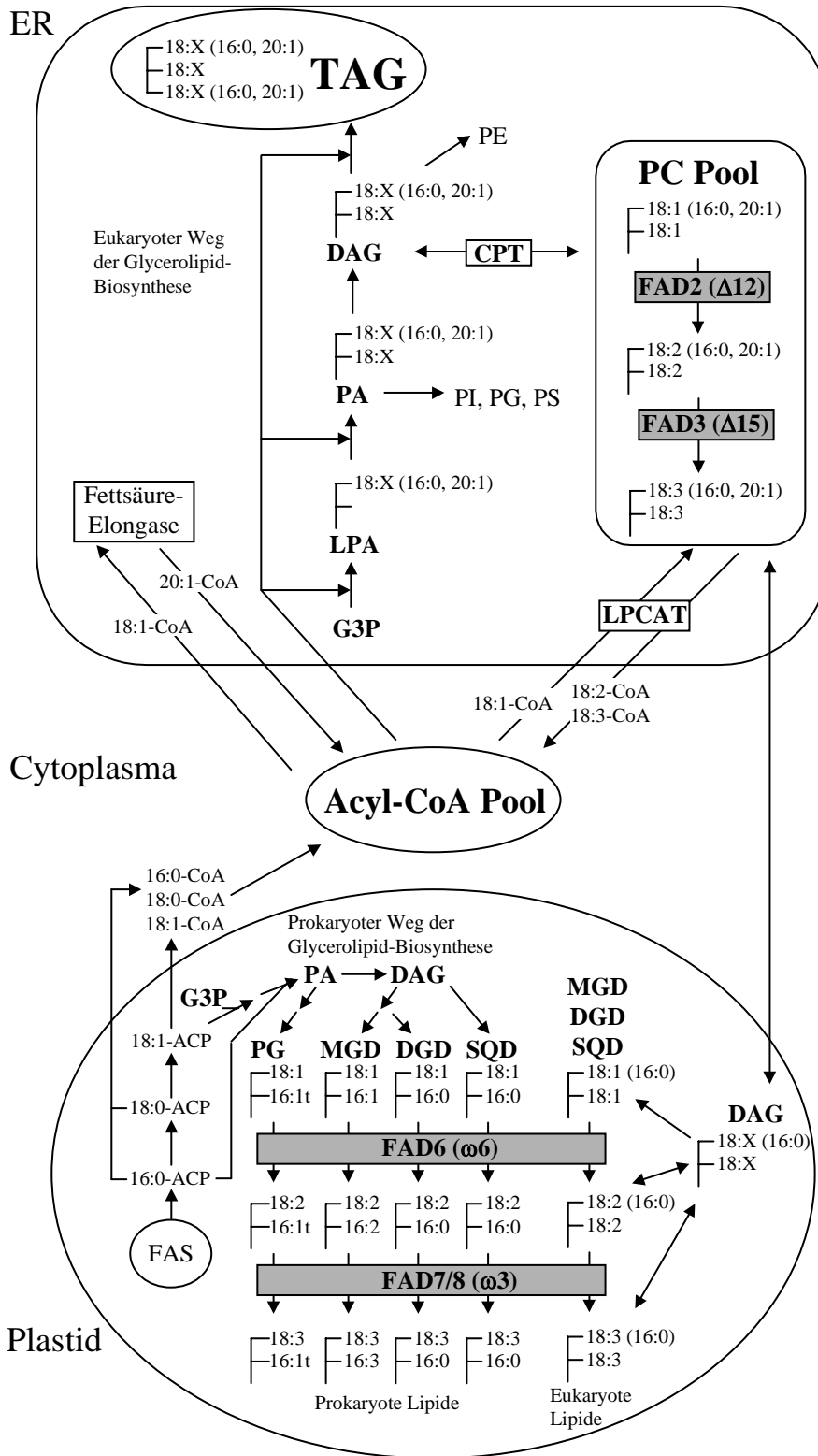


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Desaturierungs-Kompartimente bei der Glycerolipid-Biosynthese in Brassicaceae: Vernetzung von Stoffwechselwegen der Membran- und Speicherlipid-Biosynthese, Funktion der mikrosomalen und plastidären Desaturasen und C18-Austausch zwischen ER, Cytosol und Plastid. Erläuterungen und Erklärung der Abkürzungen s. Text (verändert nach: Frentzen, 1993; Ohlrogge und Browse, 1995).

Der Anteil an Lipiden, die über den prokaryoten Weg synthetisiert werden, variiert in Angiospermen zwischen 5 und 40 % in Abhängigkeit von der Pflanzen- und Gewebeart (Ohlrogge und Browse, 1995). Dieser Stoffwechselweg ist in Samen von TAG-speichernden Ölsaaten von geringerer Bedeutung, dort dominiert der eukaryote Weg der Glycerolipidbiosynthese.

Da die eukaryote Glycerolipidbiosynthese am ER erfolgt, müssen die in den Plastiden synthetisierten Fettsäuren exportiert werden. Um freie Fettsäuren zu erhalten, können die Acyl-ACPs durch zwei verschiedene Acyl-ACP-Thioesterasen hydrolysiert werden. Das Enzym FATA hydrolysiert überwiegend 18:1-ACP und mit geringerer Aktivität 16:0-ACP und 18:0-ACP. Die Thioesterase FATB dagegen besitzt eine höhere Selektivität für 16:0-ACP, hydrolysiert aber auch 18:1-ACP (Voelker und Kinney, 2001). Das Verhältnis der plastidär gebildeten Fettsäuren wird somit beeinflusst durch die relativen Aktivitäten der Δ^9 -Stearoyl-ACP-Desaturase und der Thioesterasen. Die freien Fettsäuren gelangen wahrscheinlich durch Diffusion ins Cytoplasma und werden an der äußeren Envelopemembran der Plastiden von Acyl-CoA-Synthetasen mit Coenzym A (CoA) verestert und stehen so für die eukaryote Glycerolipidbiosynthese am ER zur Verfügung (Schnurr *et al.*, 2002).

G3P wird an der *sn*-1-Position zu Lysophosphatidsäure (LPA) acyliert, anschließend verestert die *sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase (LPAAT) des ER die *sn*-2-Position mit ungesättigten C18-Fettsäuren (Frentzen, 1993). Durch die abweichende Acylierung der *sn*-2-Position im Vergleich zu den plastidären Lipiden entsteht das typisch eukaryote Fettsäuremuster der am ER synthetisierten Glycerolipide. Ausgehend von PA werden die verschiedenen Phospholipide des ER gebildet, wobei PA zunächst in DAG oder CDP-DAG überführt wird. Aus DAG entsteht Phosphatidylcholin (PC) bzw. Phosphatidylethanolamin (PE), aus CDP-DAG Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylglycerol (PG) (Ohlrogge und Browse, 1995). In vielen Pflanzen kommt es über bisher unbekannte Mechanismen zum Reimport des DAG-Restes aus PC oder von Lyso-PC in die Plastiden (Ohlrogge und Browse, 1995; Mongrand *et al.*, 2000). Dadurch können MGD, DGD und SQD mit einem eukaryoten Fettsäuremuster gebildet werden. Am 16:3/18:3-Verhältnis in der *sn*-2-Position des MGD kann der Umfang des Reimports bestimmt werden, entsprechend werden 16:3- und 18:3-Pflanzen unterschieden.

Die TAG-Synthese erfolgt aus eukaryotem DAG durch die *sn*-3-Diacylglycerin-Acyltransferase (DAGAT), die die *sn*-3-Position mit einer Fettsäure aus dem cytosolischen Acyl-CoA-Pool verestert. Dieser Schritt ist spezifisch für die TAG-Synthese. Als Acyl-CoA-unabhängiger Weg wird der direkte Transfer von Fettsäuren von PC auf DAG durch eine Phospholipid:DAG-Acyltransferase (PDAT) diskutiert. Diese Alternative wurde für hydroxylierte Fettsäuren bei *Ricinus communis* gezeigt (Dahlquist *et al.*, 2000). Die synthetisierten TAGs lagern sich in der ER-Membran ab und werden als Ölkörper mit einer umgebenden Monolayer-Membran abgeschnürt.

Die TAGs enthalten in den meisten Samen in erster Linie die Acylgruppen Palmitat (16:0), Stearat (18:0), Oleat (18:1), Linoleat (18:2) und Linolenat (18:3), wobei die jeweiligen Anteile artspezifisch

variieren. An der Bereitstellung von Fettsäuren für die TAGs sind der Acyl-CoA-Pool im Cytosol und der PC-Pool im ER beteiligt. Über den Acyl-CoA-Pool können Ölsaaten wie *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* sehr langkettige Fettsäuren (VLCFAs) wie 20:1^{Δ11} und 22:1^{Δ13}, die durch Elongation von 18:1^{Δ9}-CoA am ER entstanden sind, in die TAGs einlagern. Die VLCFAs befinden sich dann, wie die gesättigten Fettsäuren, in der *sn*-1 oder *sn*-3-Position des Glyceringerüsts, während die *sn*-2-Position ausschließlich mit ungesättigten C18-Fettsäuren acyliert ist (Frentzen, 1993). Mindestens zwei Faktoren scheinen für die Anteile der verschiedenen ungesättigten C18-Acylreste in den TAGs verantwortlich zu sein (Somerville und Browse, 1991): (1) DAG kann durch die CDP-Cholin:DAG-Phosphocholyltransferase (CPT) in PC überführt werden, welches das wichtigste Substrat für die mikrosomalen Desaturasen ist. Mit PC veresterte 18:1^{Δ9}-Acylketten werden durch die Δ12-Desaturase FAD2 zu 18:2^{Δ9,12} und weiter durch die Δ15-Desaturase FAD3 zu 18:3^{Δ9,12,15} desaturiert. Durch die reversible Reaktion der CPT gelangen die mehrfach ungesättigten Acylreste in DAG und anschließend in die Speicherlipide. (2) Der PC-Pool steht über die *sn*-2-Lyso-Phosphatidylcholin-Acyltransferase (LPCAT) in Verbindung mit dem Acyl-CoA-Pool im Cytosol. Die LPCAT ist selektiv für ungesättigte C18-CoA-Thioester und katalysiert den Austausch von Fettsäuren an der *sn*-2-Position von PC. Als Folge wird der Acyl-CoA-Pool mit 18:2-CoA und 18:3-CoA angereichert, wodurch mehrfach ungesättigte Acylreste für die Acylierung von LPA und DAG zur Verfügung stehen. Einen weiteren Einfluss auf den Anteil an ungesättigten Fettsäuren in den TAGs könnte der reversible Austausch von Lipiden zwischen ER und Plastiden haben, der bei verschiedenen *Arabidopsis*-Mutanten mit defekter ER-Desaturierung beobachtet wurde. Aus Mesophyllzellen wurde PC, das zu 40 % in der äußeren Envelopemembran der Chloroplasten lokalisiert ist, in chloroplastidären bzw. extrachloroplastidären Fraktionen aus dem Wildtyp, *fad2*- und *fad6*-Mutanten von *Arabidopsis* isoliert und bezüglich der Fettsäure-Zusammensetzung analysiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die FAD2 zwar den größten Anteil an der PUFA-Synthese in PC hat, dass aber auch die FAD6 die PC-Fettsäurezusammensetzung sowohl im Chloroplasten-Envelope als auch in den anderen Membranen beeinflusst und folglich eine alternative Route für die 18:1-Desaturierung in *fad2*-Mutanten bietet (Miquel und Browse, 1992). Ebenso wird für *fad3*-Mutanten von *Arabidopsis* vermutet, dass ein Defekt in der mikrosomalen Desaturierung von 18:2 durch die entsprechenden plastidären Enzyme gemildert wird (Browse *et al.*, 1993). Desweiteren wurden die Restgehalte von 18:2 und 18:3 in Samen von *fad2*-Mutanten auf die Aktivität der FAD6 zurückgeführt. Auch nach Transformation der Mutanten mit einem hocheffizienten Hairpin-Konstrukt zur Hemmung der FAD2 konnten die PUFA-Gehalte nicht weiter reduziert werden (Stoutjesdijk *et al.*, 2002).

Innerhalb des komplexen Systems, das die Fettsäure-Zusammensetzung von Speicherlipiden bestimmt, verfügen die Pflanzen also über Kompensationsmechanismen, die eventuelle Defizite z.B. in der Desaturierung ausgleichen können.

1.3 Struktur, Funktion und Gene der Oleatdesaturasen FAD2 und FAD6

Die Desaturasen der Pflanzen unterteilt man aufgrund ihrer Substratspezifität in Acyl-ACP- und Acyl-Lipid-Desaturasen. Acyl-ACP-Desaturasen sind als lösliche Enzyme im Plastiden-Stroma lokalisiert und führen ausschließlich in gesättigte, mit ACP veresterte Fettsäuren die erste Doppelbindung ein. Acyl-Lipid-Desaturasen dagegen sind membrangebundene Enzyme, die mit dem ER oder Plastidenmembranen assoziiert sind und mit Glycerolipiden veresterte Fettsäuren als Substrate nutzen. Zu dieser Gruppe gehören die Oleatdesaturasen FAD2 und FAD6, die maßgeblich an der Synthese von mehrfach ungesättigten C18-Acylresten beteiligt sind. In zwei Kompartimenten, in den Plastiden bzw. am ER, erfolgt die Desaturierung von Ölsäure. Die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2 führt eine Doppelbindung an der $\Delta 12$ -Position von Oleoylresten $18:1^{\Delta 9}$ ein, die mit PC verestert sind. Obwohl als PC-Desaturase beschrieben, kann die FAD2 wahrscheinlich auch andere Phospholipide als Substrate verwenden (Ohlrogge und Browse, 1995). Das plastidäre Enzym FAD6 desaturiert an MGD, DGD, SQD oder PG gebundenen $18:1^{\Delta 9}$ - und $16:1^{\Delta 7}$ -Acylresten die $\omega 6$ -Position. Meist werden die pflanzlichen FAD2- bzw. FAD6-Desaturasen als $\Delta 12$ - bzw. $\omega 6$ -Desaturasen bezeichnet, sie nutzen aber nicht das Carboxyl- bzw. Methylende als Referenzpunkt, sondern „zählen“ vielmehr drei Kohlenstoffatome von existierenden Doppelbindungen in Richtung Methylende. So zeigt die FAD6 aus *B. napus* bei Expression in *Synechococcus* eine $\omega 4$ -Desaturierung von $16:1^{\Delta 9}$ zu $16:2^{\Delta 9,12}$ (Hitz *et al.*, 1994), das Enzym FAD2 aus *B. napus* desaturiert bei Expression in *S. cerevisiae* die $\Delta 14$ -Position von $20:1^{\Delta 11}$, woraus $20:2^{\Delta 11,14}$ resultiert (Domergue *et al.*, 2003). Aus diesem Grund sind die Enzyme FAD2 und FAD6 besser als $\nu+3$ -Methyl-End-Desaturasen beschrieben, wobei ν die Position der bereits existierenden Doppelbindung bezeichnet (Meesapyodsuk *et al.*, 2000) (Abb. 1.2). Nur bei den in Pflanzen vorkommenden Substraten $18:1^{\Delta 9}$ und $16:1^{\Delta 7}$ wirken FAD2 bzw. FAD6 als $\Delta 12$ - bzw. $\omega 6$ -Desaturasen.

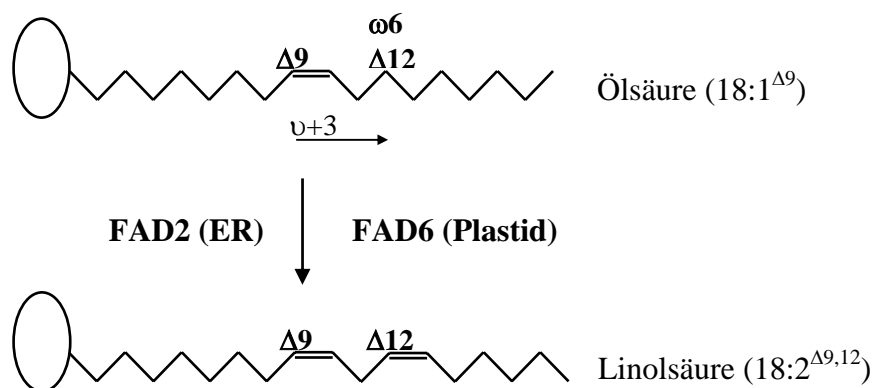


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Desaturierung lipidgebundener Ölsäure durch die Methyl-End-Desaturasen FAD2 und FAD6.

Bei der Desaturierung von Fettsäuren wird durch *cis*-Eliminierung benachbarter *D-erythro*-Wasserstoffatome eine Doppelbindung in eine Acylkette eingeführt und molekularer Sauerstoff zu zwei Molekülen H₂O reduziert. Für jede Doppelbindung sind zwei Elektronen erforderlich, für deren Bereitstellung zwei verschiedene Elektronen-Transportsysteme existieren, eines für die löslichen und membrangebundenen Desaturasen der Plastiden und ein weiteres für die Desaturasen des ER. So nutzen die plastidären Desaturasen wie FAD6 Elektronen, die im Licht über Photosystem I und im Dunkeln von NADPH über die lösliche NADPH:Ferredoxin-Oxidoreduktase (FNR) auf Ferredoxin übertragen werden (Schmidt und Heinz, 1990). Am ER wirkt Cytochrom-b₅ für die FAD2 als Elektronendonator und wird durch die membrangebundene NADH:Cytochrom-b₅-Oxidoreduktase unter Einsatz von NADH reduziert (Smith *et al.*, 1990).

Die Aminosäuresequenz der pflanzlichen membrangebundenen Desaturasen besitzen drei Histidinreiche Regionen – sog. His-Boxen – mit der Konsensussequenz HX₍₃₋₄₎H-HX₍₂₋₃₎HH-(H/Q)X₍₂₋₃₎HH. Dieses Motiv wird auch in CoA-Desaturasen der Pilze und Tiere und verschiedenen Hydroxylasen und Epoxidasen gefunden und weist auf eine evolutionäre Verwandtschaft dieser Gruppe funktional diverser Enzyme hin (Shanklin und Cahoon, 1998). Innerhalb dieser Gruppe kann ein Austausch weniger Aminosäuren z.B. eine Oleatdesaturase in eine Hydroxylase umwandeln (Broun *et al.*, 1998). Durch Mutagenese-Experimente wurde gezeigt, dass alle acht konservierten Histidin-Reste essentiell für die katalytische Aktivität sind (Shanklin *et al.*, 1994). Spektroskopische und kristallographische Untersuchungen der löslichen Δ^9 -Acyl-ACP-Desaturase und verwandter bakterieller Monoxygenasen lassen vermuten, dass auch in den membrangebundenen Desaturasen die konservierten Histidin-Reste als Eisen-Liganden wirken und an der Bildung eines Zwei-Eisen-Zentrums beteiligt sind.

Für die lösliche Δ^9 -Acyl-ACP-Desaturase, die zu einer Gruppe von Zwei-Eisen-Proteinen mit der Konsensussequenz EXXH-EXXH für die His-Boxen gehört, wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, bei dem die Eisenionen zwischen Fe^{II} (ferro), Fe^{III} (ferri) und Fe^{IV} (ferryl) wechseln (Broadwater *et al.*, 1998). Den katalytisch aktiven Zustand stellt der Bis- μ -oxo-ferryl-Komplex dar, bei dem zwischen den Eisenatomen zwei Sauerstoffbrücken vorhanden sind. Er katalysiert den schrittweisen Abzug von zwei Substrat-Wasserstoffatomen, die mit einem Brücken-Sauerstoff zu H₂O umgesetzt werden. Der verbleibende Brücken-Sauerstoff wird reduktiv unter Bildung eines zweiten H₂O-Moleküls entfernt, wodurch das Eisenzentrum in den Diferro-Zustand übergeht. Die Reaktivierung des Komplexes erfolgt nach Beladung mit molekularem Sauerstoff unter Ausbildung einer intermediären Peroxobrücke. Obwohl die lösliche Δ^9 -Acyl-ACP-Desaturase und die membrangebundenen Acyl-Lipid-Desaturasen bezüglich ihrer Aminosäure-Sequenz keine Verwandtschaft zeigen, ist aufgrund der Ähnlichkeit der His-Boxen und der Eisenabhängigkeit ein ähnlicher Reaktionsmechanismus wahrscheinlich (Shanklin und Cahoon, 1998).

Ein Modell zur Topologie der membrangebundenen Desaturasen wurde basierend auf Hydrophathie-Analyse der Desaturasen und dem Strukturmodell für die Alkan-Hydroxylase aus *Pseudomonas*

oleovorans vorgeschlagen (Shanklin *et al.*, 1994). Danach sind zwei längere hydrophobe Domänen vorhanden, die die Membran jeweils zweimal durchspannen, wobei die His-Boxen, die in den hydrophilen Bereichen liegen, zur cytosolischen Membranseite ausgerichtet sind. Die erste experimentelle Bestimmung der Topologie einer Acyl-Lipid-Desaturase wurde für die $\Delta 12$ -Desaturase aus *Bacillus subtilis* durchgeführt (Diaz *et al.*, 2002). Nach diesem Modell besitzt das Membranprotein sechs Transmembranhelices und eine Membran-assoziierte Domäne, die vermutlich ein Substrat-bindendes Motiv darstellt.

Aufgrund methodischer Schwierigkeiten, Membranproteine zu reinigen, war die Klonierung von Genen membrangebundener Desaturasen zunächst problematisch. Umfassende Arbeiten an *Arabidopsis thaliana*, insbesondere die Untersuchung von Mutanten und Kartierungs-Analysen, ermöglichten die Identifizierung und Isolierung der ersten cDNAs von Desaturasegenen. Als erste cDNA einer pflanzlichen Oleatdesaturase wurde das Gen der FAD2 aus *Arabidopsis* durch T-DNA-Insertionsmutagenese isoliert (Okuley *et al.*, 1994). Ausgehend von diesen Sequenzinformationen konnten anschließend weitere cDNAs von FAD2-Genen aus einer Reihe von verschiedenen Kulturarten durch PCR- oder Hybridisierungs-Methoden isoliert werden (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Isolierte cDNA-Klone von Genen der pflanzlichen Oleatdesaturasen FAD2 und FAD6.

Desaturase	Gen	Art	Kopien	Referenz
Mikrosomale Oleatdesaturase	FAD2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	Okuley <i>et al.</i> , 1994
		<i>Arachis hypogaea</i>	2	Jung <i>et al.</i> , 2000a
		<i>Borago officinalis</i>	1	Sayanova <i>et al.</i> , 1999
		<i>Brassica carinata</i>	1	Marillia und Taylor, 1999
		<i>Brassica juncea</i>	1	Singh <i>et al.</i> , 1995
		<i>Brassica napus</i>	1	Katavic und Taylor, 2000 ^b
			2	Kodali <i>et al.</i> , 2002
		<i>Brassica oleracea</i> ^a	1	Fourmann <i>et al.</i> , 1999 ^b
		<i>Brassica rapa</i>	1	Sivaraman, 2003 ^b
		<i>Corylus avellana</i>	1	Dani und Catello, 1997
		<i>Crepis palaestina</i>	1	Lee <i>et al.</i> , 1998
		<i>Glycine max</i>	2	Heppard <i>et al.</i> , 1996
		<i>Gossypium hirsutum</i>	2	Liu <i>et al.</i> , 1999a,b
		<i>Helianthus annuus</i>	3	Martínez-Rivas <i>et al.</i> , 2001
		<i>Petroselinum crispum</i>	1	Kirsch <i>et al.</i> , 1997
		<i>Sesamum indicum</i>	1	Jin <i>et al.</i> , 2001
<i>Solanum commersonii</i>	1	Consiglio <i>et al.</i> , 1995 ^b		
<i>Vernonia galamensis</i>	2	Hage <i>et al.</i> , 2000		
Plastidäre Oleatdesaturase	FAD6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	Falcone <i>et al.</i> , 1994
		<i>Brassica napus</i>	1	Hitz <i>et al.</i> , 1994
		<i>Glycine max</i>	1	Hitz <i>et al.</i> , 1994
		<i>Spinacia oleracea</i>	1	Schmidt <i>et al.</i> , 1994

^a partielle Sequenz

^b GenBank (NCBI)

Die Klonierung von Genen der plastidären Oleatdesaturase FAD6 (Tab. 1.1) erfolgte vorwiegend über Methoden, die Sequenzinformationen von verwandten Vertretern nutzten. Die einzige cDNA, die über Reinigung des Enzyms isoliert werden konnte, ist die cDNA der FAD6 aus *Spinacia oleracea* (Schmidt *et al.*, 1994).

Aus einigen Pflanzenarten wurden für die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2 mehrere cDNAs isoliert, die in unterschiedlicher Weise an der Synthese von Membran- bzw. Speicherlipiden beteiligt sind (Tab. 1.2). Durch Screening von cDNA-Banken aus Soja (*Glycine max*) mit der FAD2-cDNA-Sonde aus *A. thaliana* wurden zwei verschiedene Gene isoliert, die für mikrosomale Oleatdesaturasen kodieren. Die Charakterisierung dieser Gene mit Hilfe von RNA-Isolierung und Northern-Blot-Analysen ergab, dass *FAD2-1* ausschließlich in reifenden Samen exprimiert wird und somit eine entscheidende Rolle für die 18:1-Desaturierung in Speicherlipiden spielt. *FAD2-2* dagegen wird konstitutiv in vegetativem und Speicher-Gewebe exprimiert und ist folglich in erster Linie an der PUFA-Synthese der Membranlipide beteiligt (Heppard *et al.*, 1996). Auch aus der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) und der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) wurden cDNAs für FAD2 isoliert, die sich in ihren Expressionsmustern unterscheiden (Martínez-Rivas *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1999). Interessanterweise zeigen die samenspezifisch exprimierten FAD2-Gene aus verschiedenen Pflanzen untereinander eine höhere Sequenzhomologie als zu den jeweiligen konstitutiv exprimierten Genen aus der gleichen Art, aufgrund dessen eine unabhängige evolutionäre Entwicklung vermutet wird (Martínez-Rivas *et al.*, 2001).

Tab. 1.2: Genkopien der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2 mit analysiertem Expressionsmuster.

Art	Gen	Expression	Referenz
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>ahFAD2A</i> <i>ahFAD2B</i>	konstitutiv konstitutiv	Jung <i>et al.</i> , 2000a
<i>Glycine max</i>	<i>FAD2-1</i> <i>FAD2-2</i>	samenspezifisch konstitutiv	Heppard <i>et al.</i> , 1996
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>ghFAD2-1</i> <i>ghFAD2-2</i>	samenspezifisch konstitutiv	Liu <i>et al.</i> , 1999a Liu <i>et al.</i> , 1999b
<i>Helianthus annuus</i>	<i>Ha89FAD2-1</i> <i>Ha89FAD2-2</i> <i>Ha89FAD2-3</i>	samenspezifisch konstitutiv konstitutiv	Martínez-Rivas <i>et al.</i> , 2001
<i>Sesamum indicum</i>	<i>SeFAD2</i>	samenspezifisch	Jin <i>et al.</i> , 2001

Die Analysen von *Arabidopsis*-Mutanten mit defekten Oleatdesaturasen liefern Informationen darüber, wie die Lipid-Zusammensetzung Wachstum und Entwicklung der Pflanzen beeinflusst. *Fad2*-Mutanten von *Arabidopsis* besitzen keine Aktivität der mikrosomalen Oleatdesaturase, die für die Produktion von PUFAs über den eukaryoten Weg der Glycerolipidsynthese verantwortlich ist (Miquel

und Browse, 1992). Während die Pflanzen bei 22 °C in Wachstum und Erscheinung dem Wildtyp ähneln, zeigen sie bei 6 °C einen dramatischen Niedrig-Temperatur-Phänotyp, der zum Absterben der Blätter und evtl. der ganzen Pflanze führen kann (Miquel *et al.*, 1993). Bei niedrigen Temperaturen sind demnach Membranen mit PUFAs notwendig für die Überlebensfähigkeit der Pflanzen. In der *fad6*-Mutante von *Arabidopsis* liegt ein Defekt der plastidären Oleatdesaturase vor, der reduzierte Gehalte an 16:3 und 18:3 in den Lipiden des Blattgewebes verursacht (Browse *et al.*, 1989). Daraus resultiert für die Mutanten eine Beeinträchtigung der Photosynthese (Hugly *et al.*, 1989) sowie eine veränderte Temperatur-Toleranz (Hugly und Somerville, 1992). Keine PUFAs sind in den Membranlipiden von *fad2fad6*-Doppelmutanten nachweisbar, da Monoen-Fettsäuren weder im Chloroplasten noch am ER desaturiert werden können (McConn und Browse, 1998). Diese Pflanzen sind nicht zu autotrophem Wachstum fähig und können nur auf Sucrose-Medium kultiviert werden.

1.4 Ansätze zur Entwicklung von HO-Formen traditioneller Ölsaaten

Die Variation der Zusammensetzung von Samenölen erfolgt traditionell durch Selektionszüchtung. So konnten erfolgreich HO-Sorten verschiedener Kulturarten entwickelt werden (Tab. 1.3), deren Charakterisierung bezüglich der molekularen Grundlagen des HO-Merkmals auf die Beteiligung der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2 hinwies. Als Ursachen für reduzierte Enzymaktivität wurden unzureichende Proteinfaltung bedingt durch Austausch von Aminosäuren oder Defekte auf Transkriptionsebene festgestellt.

Von *Arachis hypogaea* (Erdnuss) wurde ausgehend von der natürlichen Mutante F435 mit erhöhtem Ölsäuregehalt (Norden *et al.*, 1987) die Sorte SunOleic 95R entwickelt (Gorbert und Knauff, 1997). Diese enthält in ihrem Öl ca. 80 % Ölsäure und weniger als 3 % Linolsäure und zeigt damit einen stark reduzierten PUFA-Gehalt im Vergleich zu konventionellen Sorten mit ca. 50 % Ölsäure und ca. 30 % Linolsäure (Abb. 1.3). Zur Ermittlung der molekularen Grundlagen des Merkmals Hoch-Ölsäure wurden Gene für die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2 isoliert und bezüglich ihrer Struktur und Expression charakterisiert. Zwei cDNAs *ahFAD2A* und *ahFAD2B* konnten identifiziert werden, die sich in der allotetraploiden Erdnuss als homöologe Gene jeweils einem diploiden Vorfahren zuordnen lassen. Im Wildtyp erfolgt die Expression beider Gene in verschiedenen Geweben, am stärksten aber während der Samenreifung. Die Ausprägung des HO-Phänotyps wurde zurückgeführt auf gleichzeitiges Auftreten einer Reduktion der Transkriptmenge von *ahFAD2B* und einer Mutation in *ahFAD2A*. Die Mutation verursacht einen Aminosäure-Austausch D150N und eine reduzierte Enzymaktivität (Jung *et al.*, 2000a,b; Bruner *et al.*, 2001). In anderem HO-Material von *A. hypogaea* wurde in *FAD2*-Genen eine durch eine „A“-Insertion verursachte Leserasterverschiebung mit vorzeitigen Stop-Codons ermittelt (López *et al.*, 2002).

Durch ein Züchtungsprogramm wurde HO-Material von *Brassica rapa* ssp. *oleifera* (Sommerrübsen) mit 85-90 % Ölsäure entwickelt (Vilkki, 1995), konventionelle Sorten enthalten im Vergleich dazu ca. 60 % 18:1. Der Vergleich von *FAD2*-Allelen ergab eine für den HO-Phänotyp spezifische Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch und wahrscheinlich zu unzureichender Proteinfaltung führt (Tanhuanpää *et al.*, 1998).

Tab. 1.3: Natürliche Hoch-Ölsäure-Quellen und HO-Formen traditioneller Ölsaaten.

Art	Methode	Max. C18:1 (%)	Referenz
Natürliche Ölsäure-Quellen			
<i>Euphorbia lathyris</i>		85	Ucciani, 1995
<i>Garcinia multiflora</i>		88	Ucciani, 1995
<i>Olea europaea</i>		82	Ucciani, 1995
Selektions-/Mutationszüchtung			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	T-DNA-Insertionsmutagenese	54	Okuley <i>et al.</i> , 1994
<i>Arachis hypogaea</i>	natürliche Mutation	81	Gorbert und Knauff, 1997
<i>Brassica napus</i>	EMS-Mutagenese	89	Auld <i>et al.</i> , 1992
<i>Brassica rapa</i>	natürliche Mutation	90	Vilkki, 1995
<i>Helianthus annuus</i>	Dimethylsulfat-Mutagenese	92	Cole <i>et al.</i> , 1998
<i>Zea mays</i>	EMS-Mutagenese	52	Wright, 1995
Gentechnologie			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FAD2 Suppression (Hairpin-RNA)	57	Stoutjesdijk <i>et al.</i> , 2002
<i>Brassica juncea</i>	FAD2 Cosuppression	73	Stoutjesdijk <i>et al.</i> , 2000
<i>Brassica napus</i>	FAD2 Cosuppression	89	Stoutjesdijk <i>et al.</i> , 2000
<i>Glycine max</i>	FAD2-1 Cosuppression	85	Kinney, 1996
<i>Glycine max</i>	FAD2-1 und FATB Suppression (Ribozym-Termination)	91	Buhr <i>et al.</i> , 2002
<i>Gossypium hirsutum</i>	FAD2-1 Suppression (Hairpin-RNA)	78	Liu <i>et al.</i> , 2002a

Induzierte Mutagenese wurde eingesetzt, um den Ölsäuregehalt im Samenöl von *Brassica napus* (Auld *et al.*, 1992; Rucker und Röbbelen, 1995) und *Helianthus annuus* (Soldatov, 1976) zu erhöhen. Von *B. napus* (Raps) konnten durch Mutationszüchtung Linien mit 85 % Ölsäure erhalten werden, deren agronomische Eigenschaften sich allerdings als nicht akzeptabel erwiesen (Downey und Taylor, 1996). Von *H. annuus* (Sonnenblume) dagegen, deren Öl normalerweise nur ca. 20 % 18:1 enthält, gelang die Entwicklung von HO-Varietäten mit mehr als 90% Ölsäure für die kommerzielle Produktion (Cole *et al.*, 1998) (Abb. 1.3). Drei verschiedene cDNAs für die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2 wurden isoliert, von denen nur Ha89FAD2-1 ausschließlich in reifenden Samen exprimiert wird. In HO-Sonnenblumenvarietäten liegt die Mutation dieser samenspezifischen

Genkopie wahrscheinlich auf Transkriptionsebene, da die Expression trotz Funktionsfähigkeit des Enzyms drastisch reduziert ist (Martínez-Rivas *et al.*, 2001).

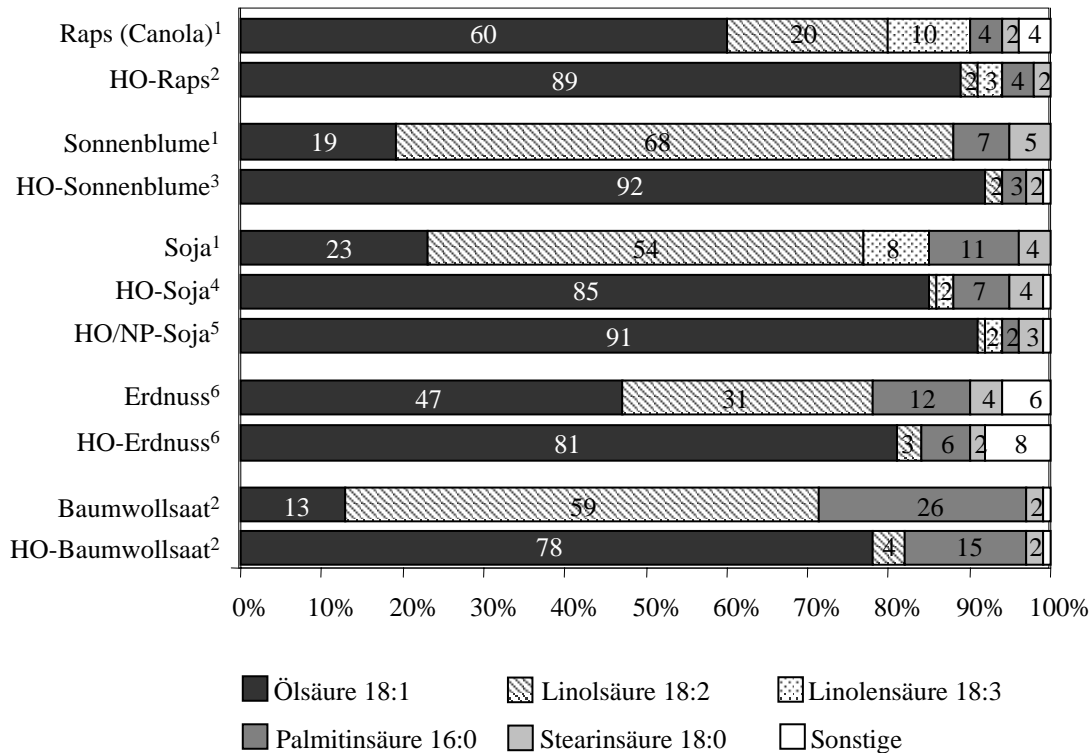


Abb. 1.3: Fettsäure-Profile von konventionellen Ölsaaten und HO-Formen. HO: Hoch-Ölsäure; NP: Niedrig-Palmitin. (Referenzen: ¹Lühs und Friedt, 1994a; ²Liu *et al.*, 2002b; ³Cole *et al.*, 1998; ⁴Kinney, 1996; ⁵Buhr *et al.*, 2002; ⁶Mugendi *et al.*, 1998)

Die Isolierung von cDNAs, die für die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2 kodieren, ermöglichte die sequenzspezifische Hemmung des Enzyms mit Hilfe von gentechnischen Methoden (Tab. 1.3). Vorwiegend wurden Cosuppressions-, Antisense- und Hairpin-Techniken eingesetzt, die auf PTGS (*posttranscriptional gene silencing*; s. Kap. 1.5) beruhen.

Eine klonierte cDNA für die FAD2 aus *B. napus* bewirkte nach Transformation mit Hilfe von *A. tumefaciens* unterschiedliche Veränderungen des Fettsäuremusters in Rapsamen (Hitz *et al.*, 1995). Das FAD2-Gen unter Kontrolle des samenspezifischen Napin-Promotors wurde in einigen transgenen Rapspflanzen überexprimiert, in anderen Pflanzen lag eine Cosuppression der FAD2 in den Samen vor. Dies führte zur Erniedrigung bzw. Erhöhung des Ölsäuregehalts im Vergleich zu 67 % in untransformierten Linien. Aus Transformanten, in denen die FAD2 durch Cosuppression gehemmt war, konnten erfolgreich HO-Rapslinien mit einem stabilen Phänotyp von 84 % Ölsäure im Samenöl entwickelt werden. In einem ähnlichen Ansatz wurden HO-Varianten von *B. napus* und *B. juncea* durch Cosuppression der jeweiligen endogenen FAD2 produziert (Stoutjesdijk *et al.*, 2000). Die

Analyse von Samen der Primärtransformanten ergab maximale Ölsäurewerte von 89 % für *B. napus* (Kontrollen: 60-65 %) und 73 % für *B. juncea* (Kontrollen: 40-45 %).

Bei der Entwicklung transgener HO-Varitäten von *G. max* (Soja) mittels Cosuppression der FAD2 konnte die Verfügbarkeit verschiedener Genkopien mit unterschiedlichem Expressionsmuster genutzt werden (Kinney, 1996). Als Zielgen wurde das samenspezifisch exprimierte Gen der FAD2-1 gewählt, die die Oleatdesaturierung in den Speicherlipiden kontrolliert. Mit diesem Ansatz sollte die konstitutiv exprimierte Genkopie der FAD2-2, die für die PUFA-Synthese in den Membranlipiden verantwortlich ist, nicht beeinträchtigt werden. Zur Ermittlung eines geeigneten Promotors und der optimalen Konstrukt-Variante wurden als Modellsystem somatische Sojabohnenembryonen in Suspensionskultur eingesetzt. Durch samenspezifische Suppression des *FAD2-1*-Gens wurden transgene HO-Sojalinien mit einem Ölsäuregehalt von 85 % und weniger als 5 % PUFAs produziert (Abb. 1.3), die einen über Generationen stabilen Phänotyp und einen mit den kommerziellen Linien vergleichbaren Ertrag zeigten. Das Öl wies eine um 10mal verbesserte oxidative Stabilität im Vergleich zu konventionellem Öl auf, welches zu mehr als 50 % aus Linolsäure besteht.

Eine Variante der Antisense-Technik stellt der Einsatz von Hairpin-Konstrukten dar, bei denen die Transkription von Inverted-Repeat-Sequenzen zur Ausbildung von Doppelstrang-RNA (dsRNA) führt. Nachdem Waterhouse *et al.* (1998) gezeigt hatten, dass duplex-bildende RNAs effektiver in der Auslösung von Virus-Resistenz und GUS-Silencing in Pflanzen sind als Sense- oder Antisense-RNAs allein, untersuchten Smith *et al.* (2000) die Effizienz verschiedener Hairpin-Konstrukte bezüglich der Suppression des *FAD2*-Gens in *Arabidopsis*. Eine Konstrukt-Variante enthielt Teilsequenzen des Zielgens als Inverted-Repeat mit einem nicht-komplementären Spacer-Bereich. Daraus resultiert nach Transkription eine Hairpin-RNA (hpRNA) mit Schleife. 69 % der transgenen Pflanzen mit dem Spacer-Konstrukt zeigten Silencing des Desaturasegens, d.h. in diesen Pflanzen war die Enzymaktivität um mehr als 20% reduziert. Die zweite Konstrukt-Variante beinhaltete ein Intron anstatt des Spacers und führte in fast allen transformierten Pflanzen zur Suppression des Zielgens. Die bessere Effizienz des Konstrukts mit Intron wurde auf unterstützende Wirkung des Spleißosoms bei der Hybridisierung der RNA-Arme zurückgeführt. Nähere Untersuchungen zum Grad der FAD2-Hemmung und der phänotypischen Stabilität bei hpRNA-Silencing in *Arabidopsis* wurden von Stoutjesdijk *et al.* (2002) durchgeführt. In den Samen der Primärtransformanten stellten sie eine breite Varianz in der Ausprägung des Phänotyps fest, bei der besten Linie war die Reduktion in der Desaturierung vergleichbar mit der in der *fad2*-Mutante. Desweiteren wurde gezeigt, dass der Phänotyp über mehrere Generationen stabil vererbt werden kann: eine HO-Linie mit Hairpin-Konstrukt wurde über fünf Generationen vermehrt und zeigte keine Reversion oder Verminderung im Grad des Silencings.

Von *Gossypium hirsutum* (Baumwollsaat), deren Öl aufgrund des hohen PUFA-Gehalts von mehr als 50 % zu oxidativer Instabilität neigt, konnten durch Silencing mittels hpRNA erfolgreich HO-Formen entwickelt werden (Liu *et al.*, 2002a). Die Hairpin-Konstrukte enthielten Sequenzen des samenspezifisch exprimierten Gens *ghFAD2-1* unter Kontrolle des samenspezifischen Lectin-

Promotors aus *G. max*. Zum Vergleich wurden Transformationen mit herkömmlichen Antisense-Konstrukten vorgenommen, die eine niedrigere Effizienz, aber ähnliche Phänotypen zeigten. Bei der besten Transformante konnte der Ölsäuregehalt von 13 % auf 78 % gesteigert werden, während der Linolsäuregehalt von 59 % auf 4 % reduziert war (Abb. 1.3).

Eine modifizierte Silencing-Methode wurde von Buhr *et al.* (2002) vorgestellt, die untersuchten, ob die Termination von Transkripten mit selbst-schneidenden Ribozymen die Retention im Nukleus fördert und als Mittel zur spezifischen Hemmung endogener Genexpression genutzt werden kann. Northern-Blot-Analysen von Total- und Kern-RNA und *in situ*-Hybridisierungen zeigten, dass Ribozym-terminierte Transkripte vorwiegend im Nukleus lokalisiert sind. Zur simultanen Suppression der Embryo-spezifischen Gene der Palmitoyl-Thioesterase FATB und der Oleatdesaturase FAD2-1 in *G. max* wurden Ribozym-Terminationskassetten für Sense-Transkripte unter Kontrolle eines einzigen Promotors hergestellt. Mehrere transgene Soja-Linien zeigten Ölsäure-Gehalte über 85 % und SFA-Gehalte unter 6 %, wobei die beste Transformante 91 % Ölsäure und 2 % Palmitinsäure aufwies (Abb. 1.3).

Im Unterschied zur traditionellen Mutationszüchtung erlauben die gentechnischen Methoden eine gerichtete, sequenzspezifische Hemmung und durch Wahl geeigneter Promotoren eine samenspezifische Suppression von Genkopien ohne Beeinträchtigung der Genexpression in anderen Geweben. Vergleichende Untersuchungen zu Cosuppressions-, Antisense- und Hairpin-Konstrukten zeigen, dass letztere mit höherer Effizienz Silencing in transgenen Pflanzen auslösen können, wobei die Variabilität in der Ausprägung der Phänotypen bei allen Methoden ähnlich zu sein scheint. Der zugrunde liegende Mechanismus PTGS wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.5 PTGS in Pflanzen

Bei den ersten Versuchen, Fremdgene in transgenen Pflanzen zu exprimieren, wurde das Phänomen des Gene-Silencings als unvorhersehbarer und unerwünschter Nebeneffekt betrachtet. Inzwischen ist bekannt, dass es sich um die Folge der zufällig ausgelösten Mechanismen handelt, die die Pflanzen zur Abwehr von Viren und zur Kontrolle von transponierbaren Elementen entwickelt haben. Diese Prozesse gehören zu einer Gruppe von Silencing-Systemen, die sequenzspezifisch durch RNA ausgelöst werden. RNA-Silencing wurde für verschiedene Organismen beschrieben: *posttranscriptional gene silencing* (PTGS) in Pflanzen, *quelling* in Pilzen und *RNA interference* (RNAi) in Tieren. Obwohl diese Prozesse mechanistisch verwandt sind, zeigt jedes System Besonderheiten und Variationen. Inzwischen werden RNAi/PTGS zur gezielten Hemmung von Genexpression genutzt. Da hierbei nicht immer eine vollständige Suppression erfolgt, spricht man im Unterschied zum „Knock-out“ eher von einem „Knock-down“.

Die gezielte Hemmung der Aktivität von Enzymen in Pflanzen erfolgte traditionell durch die Transformation mit Antisense-Konstrukten. Dabei wurde zuerst vermutet, dass die Antisense-RNA mit der Ziel-mRNA hybridisiert und deren Translation unterbindet. Zunächst unerklärlich war deswegen die Beobachtung, dass eine Sense-mRNA, die homolog zu einem endogenen Gen ist, dessen Aktivität hemmen konnte. Beschrieben wurde dieses gelegentlich auftretende Phänomen der Cosuppression für transgene Petunien, in denen das eingeführte Gen der Chalkon-Synthase, die für die Biosynthese von Anthocyanen erforderlich ist, eine variiere oder fehlende Pigmentierung auslöste (Napoli *et al.*, 1990). Überraschend war außerdem, dass Pflanzen, die mit einem Virus-Transgen zur Übertragung eines Protein-vermittelten Schutzmechanismus transformiert wurden, eine Virus-Resistenz entwickelten, obwohl das Protein nicht synthetisiert wurde (Lindbo *et al.*, 1992). Die nähere Analyse der cosupprimierten bzw. Virus-resistenten Pflanzen ergab, dass die Transgen-DNA in hohem Maße transkribiert wurde, während die Gehalte der mRNAs im Cytoplasma sehr niedrig waren. Daraus wurde geschlossen, dass die transgene mRNA als fremd erkannt wird und sowohl den eigenen Abbau als auch den von komplementärer endogener mRNA induziert. Aberrante RNA-Moleküle, die z.B. durch Änderung der Chromatin-Struktur und/oder Methylierung des Transgens entstehen, scheinen eine auslösende Funktion zu haben. Als letztendlich entscheidendes Molekül für die Induktion des Mechanismus wird aber Doppelstrang-RNA (dsRNA) angesehen, die normalerweise in einer Pflanzenzelle nicht vorkommt. Die zentrale Rolle von Duplex-bildender RNA wurde durch Transgene mit Inverted-Repeat(IR)-Sequenzen demonstriert. Die gebildeten selbst-komplementären dsRNAs, auch als Hairpin-RNAs (hpRNAs) bezeichnet, erwiesen sich als hocheffizient in der Auslösung von Gene-Silencing und Virus-Resistenz (Waterhouse *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000).

Von entscheidender Bedeutung war die Entdeckung von zur Ziel-mRNA homologen 21-25 nt RNAs in Pflanzen, die Cosuppression, Antisense-Suppression, VIGS (*virus-induced gene-silencing*) oder Virus-Resistenz zeigen (Hamilton und Baulcombe, 1999). Damit wurde bestätigt, dass die verschiedenen Formen von Silencing auf posttranskriptioneller Ebene wirken und somit dem PTGS (*post-transcriptional gene silencing*) zuzuordnen sind.

Durch Screening von *Arabidopsis*-Mutanten, die eine Beeinträchtigung in PTGS zeigen, konnten einige Gene isoliert werden, die PTGS in Pflanzen kontrollieren. Sie codieren für eine putative RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) SDE1/SGS2 (Mourrain *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2000), das *coiled-coil*-Protein SGS3 mit unbekannter Funktion (Mourrain *et al.*, 2000), das PAZ- und Piwi-Domänen-enhaltende Protein AGO1 (Fagard *et al.*, 2000; Cerutti *et al.*, 2000) bzw. die RNA-Helikase SDE3 (Dalmay *et al.*, 2001). In *C. elegans*, *Neurospora* und *Chlamydomonas* sind jeweils verwandte Proteine an RNAi beteiligt. Die einzige Ausnahme bildet SGS3, dessen Funktion wahrscheinlich Pflanzen-spezifisch ist.

Auch Änderungen auf DNA-Ebene sind an PTGS beteiligt. So zeigen die *Arabidopsis*-Mutanten *ddm1* und *met1* eine Beeinträchtigung in der Auslösung bzw. der Erhaltung der Suppression eines exogenen 35S-GUS-Transgens (Morel *et al.*, 2000). Die entsprechenden Gene kodieren für den Chromatin-

Umordnungs-Faktor DDM1 (Jeddeloh *et al.*, 1999) bzw. die DNA-Methyltransferase MET1 (Finnegan *et al.*, 1996).

Die Proteine SDE1/SGS2, SGS3, SDE3 und AGO1 sind nach Analysen der *Arabidopsis*-Mutanten nicht für IR- und Virus-induziertes RNA-Silencing erforderlich (Vance und Vaucheret, 2001). Ausgehend von diesen und anderen Untersuchungen und in Anlehnung an Erkenntnisse aus genetischen und biochemischen Untersuchungen zu RNAi in *C. elegans* und *Drosophila* und *quelling* in *Neurospora* wird derzeit ein verzweigtes Modell für PTGS in Pflanzen vorgeschlagen (Abb. 1.4). Es beschreibt die Prozesse der Abwehr gegen Viren, Sense- und Antisense-Transgene in getrennten Seitenwegen mit einem gemeinsamen, durch dsRNA ausgelösten zentralen Mechanismus.

Beim Phänomen der Cosuppression in transgenen Pflanzen wird vermutlich ausgehend von Sense-DNA zunächst aberrante RNA (abRNA) synthetisiert, wahrscheinlich aufgrund von Änderung der Chromatin-Struktur vermittelt durch DDM1. Diese aberranten Transkripte können als Substrate für die putative RdRP SDE1/SGS2 dienen, die in Kombination mit den Proteinen SGS3, SDE3 und AGO1 längere dsRNA-Moleküle synthetisiert. Ob auch Antisense-RNA von diesen Enzymen als aberrant erkannt wird oder direkt mit der Ziel-mRNA dsRNA bildet, ist noch ungeklärt. Direkten Zugang zum zentralen Silencing-Mechanismus erhalten dagegen zum einen virale dsRNAs, die durch eine virale RdRP synthetisiert wurden, und zum anderen IR-Transgene und transponierbare Elemente, deren komplementäre RNA-Bereiche je nach Struktur Hairpin-RNAs mit oder ohne Schleife bilden.

Die Modellvorstellung zum zentralen Mechanismus des RNA-Silencings entstand nach der Entdeckung der Proteine Dicer (Bernstein *et al.*, 2001) und RISC (*RNA induced silencing complex*) (Hammond *et al.*, 2000) in *Drosophila*. Obwohl in Pflanzen bislang weder Dicer- noch RISC-Proteine identifiziert sind, wird auch hier aufgrund der nachgewiesenen 21-25 nt RNAs (Hamilton und Baulcombe, 1999) dieser Mechanismus vermutet. Dicer gehört zu einer Klasse von RNaseIII-Enzymen mit zwei katalytischen Domänen und zusätzlichen Helikase- und PAZ-Motiven. Es arbeitet als Dimer und schneidet dsRNA endolytisch in Intervallen von ca. 22 Nukleotiden, wodurch die sog. siRNAs (*small interfering RNAs*) entstehen. Die siRNAs sind Doppelstrang-Komplexe mit 3'-Überhängen von 2 Nukleotiden und 5'-Phosphatgruppen. Diese Konfiguration ist funktional erforderlich für die anschließende Inkorporation in den Multikomponenten-Komplex RISC, der ssRNase-Aktivität besitzt (Elbashir *et al.*, 2001; Nykanen *et al.*, 2001). RISC muss von der latenten Form durch ATP zur aktiven Form aktiviert werden, in der die siRNAs entwunden sind (Nykanen *et al.*, 2001). Durch den Antisense-Strang der siRNA erhält der Komplex seine Spezifität und findet seine Ziel-mRNA, die schließlich abgebaut wird (Hammond *et al.*, 2000). Für RISC wird außerdem bei der Amplifikation des Silencing-Signals eine vermittelnde Funktion angenommen, indem siRNAs einer RdRP als Primer zur Synthese von dsRNA bereitgestellt werden (Hannon, 2002). Als weitere Funktionen von RISC werden Beteiligung an Translations-Inhibierung und auch Chromatin-Umordnungen diskutiert (Hannon, 2002).

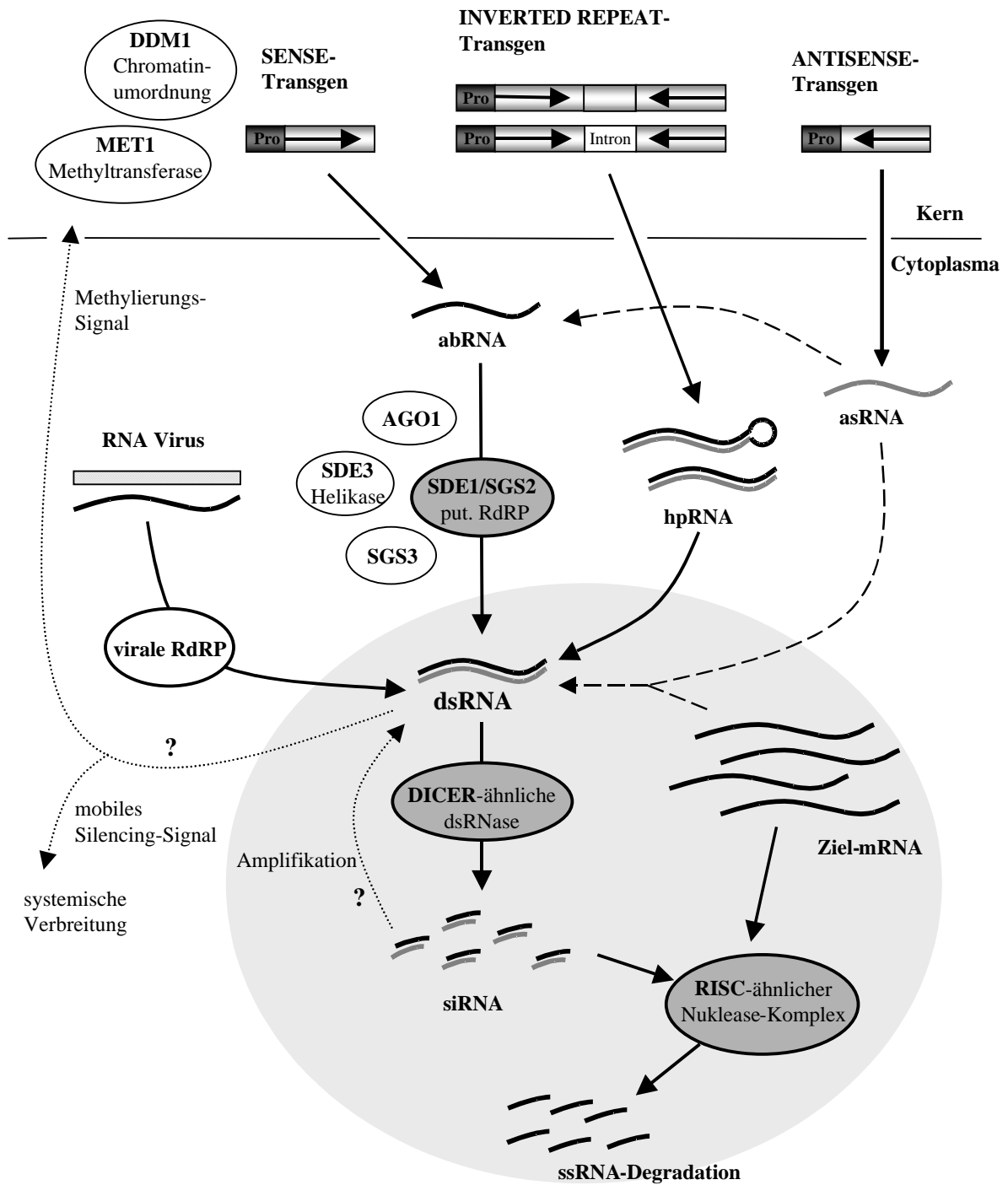


Abb. 1.3: Modell für PTGS in Pflanzen als Antwort auf Virus-Infektion oder Transgen-DNA. Erläuterungen und Erklärung der Abkürzungen s. Text. (verändert nach: Vance und Vaucheret, 2001; Voynet, 2001; Béclin *et al.*, 2002)

In Pflanzen wird PTGS lokal ausgelöst, kann dann aber systemisch verbreitet und stabilisiert werden. Die Existenz eines mobilen, sequenzspezifischen Signals wurde durch Pfropfungs-Experimente bestätigt, bei denen Silencing mit 100 % Effizienz übertragen wurde (Palauqui *et al.*, 1997). Die Verbreitung erfolgt zum einen von Zelle zu Zelle durch Plasmodesmata, zum anderen über längere Distanzen durch das Gefäßsystem. Neben den Signalen zur systemischen Verbreitung existieren Signale, die als Auslöser von Transgen-Methylierung für die Erhaltung von PTGS sorgen. Die Identität der Signale – bei denen es sich um das gleiche Molekül handeln könnte – ist derzeit noch nicht geklärt, allerdings wird davon ausgegangen, dass es sich um RNA handelt. Gegen eine Beteiligung der siRNAs sprechen Untersuchungen mit dem viralen Suppressor HC-Pro, der in Pflanzen mit GUS-Silencing die Akkumulation von siRNAs verhindert, nicht aber Transgen-Methylierung oder systemische Verbreitung (Mallory *et al.*, 2001). Vielmehr kommt dsRNA als Signalmolekül in Betracht, zumal gezeigt werden konnte, dass dsRNA zur Auslösung von *de novo*-Methylierung genomischer DNA befähigt ist (Wassenegger *et al.*, 1994). Als weitere Kandidaten für das mobile Signal werden aberrante RNAs oder auch “getaggte” RNAs in Form von mobilen mRNA/Protein-Komplexen diskutiert (Mlotshwa *et al.*, 2002).

1.6 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Ein wichtiges Ziel unter den Bestrebungen, die Qualität von Rapsölen durch Veränderung des Fettsäuremusters zu verbessern, ist die Entwicklung von Raps-Linien mit hohem Ölsäuregehalt im Samen. Sowohl im Nahrungsmittelbereich als auch in der technischen Verarbeitung besteht ein Bedarf für HO-Rapsöl, das aufgrund der niedrigen SFA- und PUFA-Gehalte eine verbesserte Haltbarkeit und vorteilhafte nutritive Eigenschaften bietet.

Zur Akkumulation von Ölsäure in den TAGs der Samen kommt es, wenn die Desaturierung der 18:1-Reste zu 18:2 und 18:3 durch Defekte der beteiligten Desaturasen verhindert wird. Dies kann durch Mutagenese oder gentechnologische Eingriffe induziert werden. Während die durch Mutations-Züchtung selektierten HO-Formen von Raps zumeist agronomische Nachteile aufweisen, die auf Beeinträchtigung der Membranlipid-Biosynthese in vegetativem Gewebe zurückgeführt werden, ermöglichen gentechnologische Methoden bei Kenntnis der molekularen Grundlagen gezieltere Eingriffe. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Mutations-Züchtung ist die Möglichkeit zur Optimierung des Ölsäuregehalts, z.B. durch simultane Hemmung mehrerer Enzyme.

Für eine Erhöhung des Ölsäuregehalts in den TAGs durch einen gentechnischen Ansatz kommt in erster Linie die Hemmung der Enzyme in Betracht, die direkt oder indirekt die Desaturierung von 18:1 bewirken und dadurch im Samenöl die MUFA-Anteile erniedrigen und die PUFA-Anteile erhöhen. Die im ER lokalisierte Oleatdesaturase FAD2 ist verantwortlich für mehr als 90 % der PUFA-Synthese in reifenden Samen von Ölpflanzen wie Raps, Soja oder Sonnenblume (Okuley *et al.*, 1994). Sie ist somit das wichtigste Zielenzym. Durch Hemmung der FAD2 mittels Mutation, Cosuppression

oder Antisense-Technik konnten bereits HO-Formen von Raps und anderen Ölsaaten entwickelt werden, deren Samen allerdings Restgehalte an PUFAs enthalten. Nach Untersuchung von HO-Formen von *Arabidopsis*, die durch Mutation bzw. Antisense hergestellt wurden, wurde vermutet, dass die Aktivität der plastidären Oleatdesaturase FAD6 in Zusammenhang mit einem Lipidaustausch zwischen Plastid und ER für die PUFA-Restgehalte verantwortlich ist (Stoutjesdijk *et al.*, 2002). Aus diesem Grund scheint eine Hemmung der FAD6 geeignet für eine weitere Optimierung des Ölsäuregehalts. Zwei weitere Enzyme, deren Hemmung eine Erhöhung des Ölsäuregehalts bewirken könnten, sind die CPT und die LPCAT. Durch eine geringere Aktivität der CPT, die DAG in PC überführt, würden die Oleoylreste der Desaturierung entzogen werden, da PC das wichtigste Substrat der FAD2 darstellt. Eine Hemmung der LPCAT, die 18:2 und 18:3 in PC gegen 18:1 austauscht, könnte eine Anreicherung des Acyl-CoA-Pools mit PUFAs verhindern.

Bei einer Hemmung der genannten Enzyme durch gentechnische Methoden ist zu berücksichtigen, dass sie nicht nur in der TAG-Synthese, sondern auch in der Synthese von Membranlipiden involviert sind. An *fad2*- und *fad6*-Mutanten von *Arabidopsis* wird deutlich, welche Auswirkungen der komplette Verlust der Enzymaktivität auf Wachstum und Entwicklung der Pflanzen haben kann. Zur Vermeidung von agronomischen Nachteilen sollte eine Hemmung der Enzyme demnach nur gewebespezifisch in reifenden Samen erfolgen. Zum einen wird daher die Wahl geeigneter Promotoren für die Konstrukt-Herstellung erforderlich. Zum anderen wäre zu prüfen, ob von dem zu hemmenden Enzym Isoformen existieren, die ausschließlich in den Samen aktiv sind. In diesem Fall könnte durch sequenzspezifische Suppression einzelner Genkopien eine Beeinträchtigung des vegetativen Gewebes vermieden werden. Eine Untersuchung zur Zahl an funktionalen Kopien und deren Expressionsmuster sollte in dieser Arbeit für die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2 vorgenommen werden, da dieses Enzym den größten Anteil an der Oleatdesaturierung hat. Durch RFLP-Kartierung wurde ermittelt, dass im Rapsgenom vier Genkopien der FAD2 existieren, je zwei auf dem A- bzw. C-Genom (Scheffler *et al.*, 1997). Bislang ist nicht bekannt, welche der Kopien funktional sind und ob sie gewebespezifisch exprimiert werden.

Die Entwicklung transgener HO-Rapspflanzen erfolgte in dieser Arbeit zunächst durch gezielte Hemmung von funktionalen Genkopien der FAD2, in einem weiteren Ansatz sollte zur Optimierung des Ölsäuregehalts zusätzlich die plastidäre Oleatdesaturase FAD6 inhibiert werden. Unerwünschte Nebeneffekte bei der Steigerung der Ölsäuregehalte sollten durch Einsatz samenspezifischer Promotoren vermieden werden. Da im Vorfeld nicht eingeschätzt werden konnte, welcher Promotor im Wirt Raps PTGS auslösen kann und zusätzlich in seinem Aktivitäts-Zeitraum optimal zur Expression der Zielenzyme passt, wurden zur Konstrukt-Herstellung vier verschiedene Promotoren eingesetzt. Zur Verfügung standen der Promotor des Samenspeicherproteins Napin aus *B. napus* (Kridl *et al.*, 1991), der Promotor eines Samenspeicherproteins aus *Vicia faba* (LeB4; Bäumlein *et al.*, 1991), der Promotor eines bisher unbekanntes Samenspeicherproteins ebenfalls aus *Vicia faba* (USP; Fiedler *et al.*, 1993) sowie der Promotor eines *lea*-Gens aus *Daucus carota* (Dc3; Seffens *et al.*, 1990).

Für die züchterische Bearbeitung von transgenen Raps-Pflanzen werden generell Linien gewünscht, die nur eine Kopie des Transgens tragen. Da keine geeignete Methode für gesicherte Einzelkopie-Insertionen existiert, ist die Produktion einer größeren Anzahl an Primärtransformanten erforderlich. Dies ist außerdem notwendig, da unter den Primärtransformanten im allgemeinen eine breite Variabilität in der Ausprägung des Phänotyps besteht und es zudem in den nächsten Generationen zu Verlusten durch Transgeninaktivierung kommen kann. Hairpin-Konstrukte mit Intron können in mehr als 90 % der Transformanten gezielt eine phänotypische Veränderung hervorrufen (Wesely *et al.*, 2001) und sind damit weitaus effizienter als herkömmliche Antisense- oder Cosuppressions-Konstrukte. Bei Verwendung von Hairpin-Konstrukten wird somit die Selektion von gewünschten Transformanten und damit die Entwicklung von Linien mit einem stabilen Phänotyp erleichtert. Daher wurde auch in dieser Arbeit die Hairpin-Technik zur Entwicklung von transgenen HO-Rapspflanzen eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders vermerkt, stammen alle Chemikalien in Analyse-Qualität von den Firmen Biomol (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme sowie DNA-Längenstandards und Nukleotide wurden von den Firmen Life Technologies (Karlsruhe), Invitrogen (Groningen), MBI Fermentas (Vilnius), New England Biolabs (Schwalbach), Roche (Mannheim), Sigma-ARK (Darmstadt) und Stratagene (Heidelberg) bezogen.

In der folgenden Liste sind bei dieser Arbeit verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Elektrophoresekammer Horizon 11.14	Gibco BRL
Elektroporator 2510	Eppendorf
Gaschromatograph H6850 Series	Hewlett Packard
Auto-Injektor 7683 Series	Hewlett Packard
Kapillarsäule ZB-Wax 52 (30 m x 320 µm x 0,5 µm)	Phenomenex
Heizplatte/Magnetrührer Ikamag [®] RCT	IKA
Hybridisierungssofen OV2	Biometra
Membranen Hybond N+, N	Amersham
Netzgerät PS304	Life Technologies
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Photometer 20 Genesis [™]	Spectronic
Röntgenfilm Hyperfilm [™] -MP, 18 x 24 cm	Amersham
Rotoren:	
A6.9, A8.24, SW60, AS4.13	Kontron
A-6-24	Eppendorf
Sterilbank DLF/BSS4	Woerdau
Thermo-Cycler Primus	MWG Biotech
UV-Crosslinker Hoefer [®] UVC 500	Hoefer Pharmacia Biotech Inc.
UV-Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech
UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab
Video-Printer 429 K	Herolab
Vortex-Schüttler Reax 2000	Heidolph
Wasserheizbäder Thermomix [®] MM	B.Braun
Zentrifugen:	
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Centrikon 324	Kontron
Zentrifuge Mikro 22	Hettich
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich

2.2 Biologisches Material

2.2.1 *Escherichia coli*-Stämme

XL1-Blue MRF⁺ Kan (Stratagene, Heidelberg)

$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*[F'*proAB*, *lacI^qZ* Δ M15, Tn5 (*kan^r*)]

SOLRTM (Hay und Short, 1992)

e14⁺(mcrA), $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171, *sbcC*, *recB*, *recJ*, *umuC::Tn5(kan^r)*, *uvrC*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*, λ^R , [F'*proAB*, *lacI^qZ* Δ M15] Su⁻ (nonsuppressing)

2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme

C58C1 ATHV Rif

C58C1 ATHV Rif leitet sich ab von dem Stamm EHA 101 (Hood *et al.*, 1986). Er trägt das Ti-Helferplasmid pEHA101 ohne Kanamycin-Resistenz und besitzt eine chromosomale Rifampicin-Resistenz.

GV3101:: pMP90RK

Der Stamm GV3101::pMP90RK besitzt eine chromosomale Rifampicin-Resistenz und eine vom Ti-Helferplasmid pMP90RK kodierte Gentamycin-Resistenz (Koncz und Schell, 1986).

2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm

INVSc1 (Invitrogen)

Mat α , *his3- Δ 1*, *leu2*, *trp1-289*, *ura3-52*

2.2.4 Pflanzenmaterial

Saatgut von *Brassica napus* wurde freundlicherweise von der Norddeutschen Pflanzenzucht in Hohenlieth bereitgestellt. In dieser Arbeit wurde Pflanzenmaterial der Sommerrapssorte Drakkar, der Winterrapssorten Ascari und Wotan und der Hochölsäure-Mutante 19661 verwendet. Die Mutante stammt aus einem EMS-Mutagenese-Programm der Sorte Wotan (Rücker und Röbbelen, 1995).

2.3 Vektoren

Vektor	Selektionsmarker	Referenz
pUC18	amp ^R	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
pBluescript II SK-	amp ^R	Stratagene
pBluescript II KS-	amp ^R	Stratagene
pRE1	sm ^R , sp ^R /kan ^R	Weier <i>et al.</i> , 1997
pYES2	amp ^R /URA3	Invitrogen

Der binäre Vektor pRE1 (s. Anhang), ein Derivat des Vektors pgscl706a von de Block mit einem chimären Neomycin-Phosphotransferase-Gen als Selektionsmarker, wurde von Prof. Dr. R. Töpfer, Institut für Rebenzüchtung, BAZ Siebeldingen, bereitgestellt.

2.4 Kultivierung von Bakterien und Hefen

2.4.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* wurde nach Standardtechniken von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Luria-Bertani (LB)-Medium

1 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

pH 7,5

für LB-Festmedium Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar

Für eine Selektion wurden den Medien nach dem Autoklavieren die benötigten Antibiotika zugesetzt. Die Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei –20 °C gelagert.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in Aqua dest.	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml in Aqua dest.	25 µg/ml
Streptomycin (Sm)	200 mg/ml in Aqua dest.	20 µg/ml
Spectinomycin (Sp)	100 mg/ml in Aqua dest	50 µg/ml

Die Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. Dabei wurde bei einer OD₆₀₀ von 1,0 ein Wert von 1-2 x 10⁹ Zellen zugrunde gelegt.

Für Dauerkulturen wurde eine exponentiell gewachsene Bakterienkultur mit sterilem Glycerin (Endkonzentration 20 %, v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert.

2.4.2 Kultivierung von *A. tumefaciens*

Die in dieser Arbeit verwendeten *A. tumefaciens*-Stämme wurden nach der Methode von Walkerpeach und Velten (1994) bei 28 °C kultiviert.

YEP-Medium

1 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt

1 % (w/v) Bacto-Pepton

0,5 % (w/v) NaCl

pH 7,2

für YEP-Festmedium Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar

Zur Selektion wurden folgende Antibiotika zugegeben:

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration für	
		C58C1 ATHV	GV3101::pMP90RK
Rifampicin (Rif)	20 mg/ml in DMSO	80 µg/ml	80 µg/ml
Gentamycin (Gent)	40 mg/ml in Aqua dest.	–	40 µg/ml
Streptomycin (Sm)	200 mg/ml in Aqua dest.	200 µg/ml	200 µg/ml
Spectinomycin (Sp)	100 mg/ml in Aqua dest	100 µg/ml	100 µg/ml

Für Dauerkulturen wurden exponentiell gewachsene Bakterienkulturen mit sterilem Glycerin in einer Endkonzentration von 50 % (v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert.

2.4.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte entweder in dem Vollmedium YPD oder in dem Minimalmedium CMdum mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (Ausubel *et al.*, 1995). Letzteres enthielt für normales Wachstum auf Fest- oder in Flüssigmedien 2 % (w/v) Glucose, in Expressionsversuchen mit dem Vektor pYES2 dagegen wurde 2 % (w/v) Raffinose eingesetzt, da Glucose den Promotor reprimiert.

YPD-Medium

1 % (w/v) Hefeextrakt

2 % (w/v) Bacto Pepton

Nach dem Autoklavieren wurde zugegeben:

2 % (w/v) Glucose

CMdum

1,155 g/l DP (s. unten)

Nach dem Autoklavieren wurden zugegeben:

0,67 % (w/v) YNB-AA (*yeast nitrogen base without amino acid*)

20 mg/l Histidin

60 mg/l Leucin

40 mg/l Tryptophan

1 % (w/v) Tergitol NP-40

2 % (w/v) Glucose oder Raffinose

Für Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Bacto-Agar und ein NaOH-Plätzchen zugegeben.

DP („dropout Powder“)

Adenin (Hemisulfat)	2,5 g
L-Arginin (HCl)	1,2 g
L-Aspartat	6,0 g
L-Glutamat (Na-Salz)	6,0 g
L-Lysin (HCl)	1,8 g
L-Methionin	1,2 g
L-Phenylalanin	3,0 g
L-Serin	22,5 g
L-Threonin	12,0 g
L-Tyrosin	1,8 g
L-Valin	9,0 g

2.5 Transformation von Bakterien und Hefen

2.5.1 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Zu transformierende *E. coli*-Stämme wurden in 50 ml LB-Medium unter Antibiotikumselektion bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 10-15 min auf Eis gekühlt, durch Zentrifugation bei 3.000 x g (15 min, 4 °C) sedimentiert und in 18 ml RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation der Zellen unter den gleichen Bedingungen und die Aufnahme des Sediments in 4 ml RF2-Lösung. Die Zellsuspension wurde in 200 µl Aliquots auf sterile Eppendorfreaktionsgefäße verteilt, direkt zur Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Pro Transformationsansatz wurden 0,2 ml einer Suspension kompetenter Zellen mit 50-250 ng zu transformierender DNA gut durchmischt und für 30 min auf Eis gestellt. Zur Aufnahme der DNA wurden die Zellen für 45 sec auf 42 °C erwärmt, anschließend auf Eis für 1-2 min abgekühlt. Nach Zugabe von 0,8 ml LB-Medium erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 60-90 min zur Ausprägung der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz. Daraufhin wurden die Transformanten auf Selektivmedien ausplattiert und zur Isolierung rekombinanter Klone über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA-Zugabe mitgeführt.

RF1-Lösung

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
30 mM Kaliumacetat
10 mM CaCl₂ x 6 H₂O

Die Einstellung des pH-Wertes auf 5,8 erfolgte mit konz. Essigsäure.

RF2-Lösung

10 mM RbCl
10 mM MOPS
75 mM CaCl₂ x 6 H₂O
15 % (v/v) Glycerin

Die Einstellung des pH-Wertes auf 5,8 erfolgte mit NaOH.

2.5.2 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Eine 50 ml LB-Kultur mit geeignetem Antibiotikum wurde mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* beimpft und bei 37 °C inkubiert. Die Zellernte erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zentrifugation (10 min, 3.000 x g) bei 4 °C. Die Zellen wurden in eiskalter 10 % (v/v) Glycerollösung gewaschen und nach erneuter Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen in 250 ml eiskalter 10 % (v/v) Glycerollösung resuspendiert.

50 µl der kompetenten Zellen wurden mit 10 pg-25 ng DNA gemischt und in eine vorgekühlte 2 mm-Elektroporationsküvette (Equibio) pipettiert. Die Elektroporation (Electroporator 2510, Eppendorf) erfolgte bei 2,5 kV (Kapazität 25 µF, 200 Ω), danach wurden sofort 800 µl SOC Medium zugegeben. Die Zellen wurden zur Regeneration für 45 min bei 37 °C inkubiert, anschließend auf Selektivmedien ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium

2 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
0,05 % (w/v)	NaCl
2,5 mM	KCl

Nach dem Autoklavieren wurden zugesetzt:

10 mM MgCl ₂
10 mM MgSO ₄
20 mM Glucose

2.5.3 Transformation von *A. tumefaciens*

(An *et al.*, 1988)

Zur Herstellung kompetenter Agrobakterium-Zellen wurden 2 ml YEP-Flüssigmedium (s. 2.4.2) mit geeigneten Antibiotika (80 µg/ml Rifampicin für den Stamm C58C1 ATHV, zusätzlich 40 µg/ml für den Stamm GV3101::pMP90RK) mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 28 °C über Nacht im Rollinkubator kultiviert. Anschließend wurde die Vorkultur in 40 ml YEP-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika überführt und dieses bei 28 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4 °C (10 min, 3.000 x g) sedimentiert, in 1 ml eiskaltem 20 mM CaCl₂ resuspendiert und in 100 µl-Portionen auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt.

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen mit 10 µl Plasmid-Präparation (1 µg DNA) versetzt, für 15 sec in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei 37 °C (5 min) wieder aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml YEP-Flüssigmedium ohne Antibiotika wurde der Ansatz über Nacht

bei 28 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Ausplattierung von 20 µl bzw. 50 µl auf YEP-Selektionsplatten mit anschließender Inkubation bei 28 °C 24-48 h im Dunkeln.

2.5.4 Transformation von *S. cerevisiae* mittels Elektroporation

(pers. Mit. Dr. Robert Sclafani, Universität Colorado)

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen von *S. cerevisiae* wurde eine 500 ml YPD-Flüssigkultur (mit 10 % Glycerol) mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3-1,5 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4.000 x g) bei 4 °C geerntet, in 1 Volumen (500 ml) eiskaltem sterilen Aqua dest. gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend folgten weitere Waschschrte mit 0,5 Volumen (250 ml) eiskaltem sterilem Aqua dest. und 0,04 Volumen (20 ml) eiskalter 1 M Sorbitol/10% Glycerol-Lösung. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 0,5-1,0 ml 1 M Sorbitol/10% Glycerol-Lösung aufgenommen, in 65 µl-Portionen auf Reaktionsgefäße verteilt, direkt zur Elektroporation eingesetzt oder nach langsamem Einfrieren bei -70°C gelagert.

Pro Ansatz wurde 0,5-3 µg salzfreie DNA in einem maximalen Gesamtvolumen von 5 µl mit den elektrokompetenten Zellen vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde dann in einer eiskalten 2 mm-Elektroporationsküvette bei 1500 V durchgeführt. Die Zellen wurden sofort mit 1 ml eiskalter 1 M Sorbitol/10% Glycerol Lösung versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend konnten sie direkt durch Zentrifugation für 1 min bei 1.000 x g sedimentiert, in 100 µl eiskalter 1 M Sorbitol/10% Glycerol-Lösung resuspendiert und auf Selektivmedien ausplattiert werden.

2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

(nach Birnboim und Doly, 1979)

Plasmid-tragende *E. coli*-Stämme wurden in 5 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C kultiviert. Jeweils 1,5 ml der Übernachtskultur wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen 2 min bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge Micro20, Hettich) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 200 µl einer frisch angesetzten NaOH/SDS-Lösung. Das Aufklaren der Lösung nach 5 min Inkubation auf Eis zeigte die vollständige Lyse der Zellen an. Nach Zugabe von 150 µl Kaliumacetat-Lösung, Mischen mittels Whirlmix und 5 min Inkubation auf Eis wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm Proteine sowie Zell-

trümmer der chromosomalen DNA sedimentiert. Der Überstand mit der renaturierten Plasmid-DNA wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und einer Ethanol-Präzipitation (s. 2.7.3) unterzogen. Anschließend wurde das getrocknete DNA-Pellet in 30-50 µl RNase-haltigem TE-Puffer (0,01 % RNase) gelöst. Die Lagerung der präparierten DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

GTE-Lösung

25 mM Tris/HCl, pH 8,0

10 mM EDTA

50 mM Glucose

NaOH/SDS-Lösung

200 mM NaOH

1 % (w/v) SDS

5 M Kaliumacetat-Lösung

29,5 ml Eisessig

ad 100 ml Aqua dest.

Mit KOH wurde der pH-Wert auf 4,8 eingestellt.

RNase-Lösung

150 mM NaCl, pH 5,0

1 % (w/v) RNase A

(durch 15 min Inkubation bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ DNase frei)

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens*

(An *et al.*, 1988)

2 ml YEP-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit einer Agrobakterium-Einzelkolonie beimpft und als Vorkultur bei 28 °C für 7 h im Roller inkubiert. Nach Überführung in 10 ml YEP-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika wurde die Hauptkultur über Nacht bei 28 °C kultiviert. Die gesamten 10 ml wurden 10 min bei 3.000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend sorgfältig entfernt. Das Sediment wurde in 1,5 ml TE+Sarcosyl-Puffer aufgenommen, 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert, das Pellet in 100 µl einer Lysozym/GTE-Lösung (5 mg/ml) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl Lösung II wurden hinzugefügt, dann erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Nach Zugabe von 150 µl einer eiskalten Kaliumacetatlösung und einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde für 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde für 10 min einer Behandlung mit RNase unterzogen, die anschließend mit Hilfe einer zweimaligen Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1) bzw. Chloroform inaktiviert und entfernt wurde. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte mit 1 ml Ethanol für 30 min bei -20 °C und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 x g (4 °C). Nach Waschen mit 180 µl Ethanol und Trocknen wurde das Pellet in 30-50 µl Aqua dest. aufgenommen. Für Restriktionsanalysen wurden 8 µl der DNA eingesetzt.

TE+Sarcosyl-Puffer

50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
20 mM	EDTA, pH 8,0
0,05 %	N-Laurylsarcosinnatriumsalz

GTE-Lösung

50 mM	Glucose
50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
10 mM	EDTA, pH 8,0

Lösung II (NaOH/SDS in GTE)

200 mM	NaOH
1 % (w/v)	SDS

Kaliumacetat-Lösung

3,5 M	Kaliumacetat
11,5 % (v/v)	Eisessig
pH 4,8	

2.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

(nach Ausubel *et al.*, 1995)

Zur Plasmid-Isolierung aus Hefezellen wurden zunächst 2 ml YPG-Flüssigmedium (s. 2.4.3) mit einer Einzelkolonie angeimpft und bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in einem Reaktionsgefäß durch Zentrifugation bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge Micro20, Hettich) für 1 min sedimentiert, in 200 µl TENS-Puffer resuspendiert, mit 0,3 g Glasperlen (Ø 0,45 mm) versetzt und 1 min kräftig geschüttelt (Vortex-Schüttler). Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform wurde erneut für 1 min geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000 rpm, 2 min). Die Oberphase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und weiteren Extraktionsschritten mit Phenol/Chloroform bzw. Chloroform unterzogen. Die Plasmid-DNA wurde gefällt (s. 2.7.3), in 20 µl Aqua dest. gelöst und 2 µl für die Retransformation von *E. coli* eingesetzt. Nach der Isolierung aus *E. coli*-Zellen konnten die Plasmide durch Restriktions- und Sequenz-Analyse überprüft werden.

TENS-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA, pH 8,0
100 mM	NaCl
1 % (v/v)	SDS
2 % (v/v)	Triton X-100

2.7 Molekularbiologische Standardmethoden

2.7.1 Enzymatische Modifizierung von DNA

Zur Herstellung von rekombinanten Plasmiden wurden die Nucleinsäuren durch enzymatische Reaktionen modifiziert. Restriktionsendonukleolytische Spaltungen von DNA erfolgten mit Restriktionsendonukleasen des Typs II (New England Biolabs). Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) durchgeführt, wobei Vektorenden zur Vermeidung von Selbstligation mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (New England Biolabs) dephosphoryliert wurden. Die enzymatischen Reaktionen wurden, soweit im Text nicht anders vermerkt, nach den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

2.7.2 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurden diese zunächst gereinigt, und zwar entweder direkt nach der PCR mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder aus dem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Die gereinigten PCR-Produkte wurden anschließend *sticky end* oder *blunt end* in geeignete Vektoren kloniert. Für eine *sticky end*-Klonierung wurden die gereinigten PCR-Fragmente mit Restriktionsenzymen geschnitten, deren Schnittstellen zusammen mit weiteren Nukleotiden zuvor über die Primer-Sequenz angefügt worden waren. Die Fragmente konnten dann in einen mit den gleichen Enzymen restringierten Vektor kloniert werden. *Blunt end*-Klonierungen in *SmaI*-restringierten pUC18 wurden mit dem „SureClone™ Ligation Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die klonierten PCR-Produkte wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

2.7.3 Reinigung und Fällung von DNA

Die Reinigung einer DNA-Lösung von Proteinen erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung zweimal mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gemischt und 10 min bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge Micro20, Hettich) zur Phasentrennung zentrifugiert. Um Phenolreste aus der Oberphase zu entfernen, folgte anschließend eine Extraktion mit 1 Volumen Chloroform.

Zur Fällung von DNA-Lösungen wurde eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 96 %igem Ethanol für 30 min bei -20 °C gefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm wurde die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Aqua dest. aufgenommen.

Als Alternative zur Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurden DNA-Lösungen nach enzymatischen Reaktionen mit Hilfe spezieller Säulen laut Herstellerangaben (z.B. QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) gereinigt.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.7.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Für Nukleinsäure-Konzentrationen bestehen folgende Zusammenhänge (Sambrook *et al.*, 1989):

DNA: $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$

RNA: $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Verunreinigungen der Nukleinsäurelösungen mit Proteinen wurden aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{280 \text{ nm}}$ abgeschätzt. Dieser Quotient sollte bei DNA zwischen 1,8-1,9 und bei RNA zwischen 1,9-2,1 liegen.

2.7.5 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). Die Konzentration der Gele richtete sich nach der Größe der erwarteten DNA-Moleküle, in der Regel wurden 0,7-1,6 %ige (w/v) Agarosegele in TBE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel (3 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) bei 5-10 V/cm getrennt.

10 x TBE-Puffer

890 mM	Tris
890 mM	Borsäure
20 mM	EDTA, pH 8,3

DNA-Probenpuffer

250 mM	EDTA, pH 8,0
10 % (w/v)	Ficoll
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylolcyanol

Die Bestimmung der DNA-Fragmentlängen erfolgte über einen Vergleich mit verschiedenen DNA-Längenstandards, z.B. GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Lambda DNA/*Bst*EII Marker oder GeneRuler™ 1kp DNA Ladder (MBI Fermentas).

2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. In dieser Arbeit wurde die Vent_R[®]DNA-Polymerase (New England Biolabs) oder die *Taq* DNA-Polymerase (Gibco BRL) verwendet.

Die Vent_R[®]DNA-Polymerase besitzt eine Korrekturlesefunktion aufgrund ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Sie wurde deshalb für PCR-Anwendungen eingesetzt, bei denen eine fehlerfreie DNA-Sequenz der PCR-Produkte von Bedeutung war, wie die Isolierung von Genkopien und die Herstellung von Konstrukten für die Transformation von Raps (s. 2.11.3). Die *Taq* DNA-Polymerase fand aufgrund ihrer hohen Prozessivität Anwendung bei der Überprüfung selektierter transformierter Pflanzen (s. 2.14) durch PCR.

Die Sequenzen der Primer (Life Technologies) sind im Anhang aufgeführt. Die Schmelztemperatur T_m (°C) der Oligonukleotide wurde nach Suggs *et al.* (1981) berechnet: T_m (°C) = 4 (G+C) + 2 (A+T), wobei im Falle von Primern mit angefügten Restriktionsschnittstellen nur der zur DNA-Template komplementäre Bereich berücksichtigt wurde.

Eine Standard-PCR mit der Vent_R[®]DNA-Polymerase bzw. der *Taq* DNA-Polymerase wurde im entsprechenden Puffer (ThermoPol Puffer bzw. PCR-Puffer, dieser mit Zusatz von 2,5 mM MgCl₂) wie folgt angesetzt:

PCR-Ansatz

10-100 ng	Template-DNA
1x	Puffer
0,2 mM	dNTPs
0,5 μM	Primer 1
0,5 μM	Primer 2
10 %	Glycerin
1 U	DNA-Polymerase
ad 50 μl	Aqua dest.

PCR-Temperaturprofil

1. Denaturierung: 5 min 94 °C
2. Denaturierung: 30 sec 94 °C
3. Annealing: 30 sec Schmelztemperatur $T_m - 5$ °C
4. Polymerisation: 60 sec/1000 bp 72 °C
5. Polymerisation: 10 min 72 °C
6. Termination: 4 °C

Die Schritte 2-4 wurden 30mal wiederholt.

Nach Beendigung des Amplifikationsvorgangs wurden die PCR-Produkte in einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

2.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977) in einer automatisierten Abwandlung, bei der die Didesoxynukleotide mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Sequenzreaktionen wurden mit dem „Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (PE Applied Biosystems) durchgeführt.

PCR-Ansatz

0,5-1 µg	Template-DNA
3 µl	BDT <i>Ready Reaction Mix</i>
7 µl	<i>half term</i> Puffer
15 pmol	Sequenzier-Primer
ad 20 µl	H ₂ O

PCR -Temperaturprofil

1. Denaturierung: 4 min 96 °C
2. Denaturierung: 30 sec 96 °C
3. Annealing: 15 sec 47-60 °C
4. Polymerisation: 4 min 60 °C
5. Termination: 4 °C

Die Schritte 2-4 wurden 25mal wiederholt.

Nach Fällung und Trocknung der Ansätze wurden anschließend die Sequenzanalysen unter Verwendung des „ABI Prism 377 DNA Sequencer“ (PE Applied Biosystems) vorgenommen.

2.10 Computer-gestützte Sequenzauswertung

Die Sequenzdaten wurden am PC mit Hilfe folgender Programme ausgewertet:

Chromas 1.43 (<http://trishul.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>)

ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997)

GeneDoc (Nicholas und Nicholas, 1997)

Clone Manager 4.1 (Scientific & Educational Software)

Sequenzvergleiche im Internet erfolgten in der „GenBank“ des NCBI (National Center of Biotechnology Information) über das Programm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.*, 1990).

Zur Analyse von Proteinen wurden folgende Programme genutzt:

TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)

TMPRED (http://www.isrec.isb-sib.ch/cgi-bin/TMPRED_form_parser)

2.11 Herstellung von rekombinanten Plasmiden

Die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungstechniken erfolgten nach den Standardmethoden aus Sambrook *et al.* (1989).

2.11.1 Klonierung von *FAD2*-Genkopien aus *B. napus* var. *Ascari*, *Drakkar*, *Wotan*

Zur Isolierung von Genkopien der mikrosomalen Oleatdesaturase *FAD2* aus *B. napus* wurde zunächst eine Lambda-cDNA-Bank aus *B. napus* var. *Ascari* (reifende Schoten, 20 daf) mit einer homologen Sonde abgesucht (s. 2.18). Nach der *in vivo*-Excision konnten Plasmide isoliert werden, die ca. 1,5 kb große cDNA-Fragmente mit dem offenem Leserahmen von ca. 1,2 kb enthielten. Zwei Genkopien *FAD2*-I und *FAD2*-II wurden identifiziert (s. 3.1), von denen Genkopie-spezifische Primer abgeleitet werden konnten. Der Primer PA16 bindet am 5'-kodierenden Bereich in sense-Orientierung, während die Primer PA45 bzw. PA30 im 3'-untranslatierten Bereich von Genkopie I bzw. II in antisense-Orientierung binden. Mit Hilfe dieser Primer konnten durch PCR (s. 2.8) aus genomischer DNA jeweils aus *B. napus* var. *Drakkar*, *Wotan* sowie aus der Hoch-Ölsäure-Mutante *Wotan* 19661 beide Genkopien der *FAD2* amplifiziert werden. Die ca. 1,2 kb großen PCR-Produkte wurden *blunt end* in den Vektor pUC18 kloniert und durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung (s. 2.9) überprüft. Die entstandenen rekombinanten Plasmide sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.2: Rekombinante Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit zur Klonierung von *FAD2*-Genkopien aus *B. napus* hergestellt wurden.

Plasmid	Vektoranteil	relevantes DNA-Fragment
pPA1	pBluescript II SK ⁻	<i>FAD2</i> - I (cDNA) aus <i>B. napus</i> var. Ascari
pPA2	pBluescript II SK ⁻	<i>FAD2</i> -II (cDNA) aus <i>B. napus</i> var. Ascari
pPA3	pUC18	<i>FAD2</i> - I aus <i>B. napus</i> var. Drakkar
pPA4	pUC18	<i>FAD2</i> -II aus <i>B. napus</i> var. Drakkar
pPA5	pUC18	<i>FAD2</i> - I aus <i>B. napus</i> var. Wotan
pPA6	pUC18	<i>FAD2</i> -II aus <i>B. napus</i> var. Wotan
pPA20	pUC18	<i>FAD2</i> - I aus <i>B. napus</i> Wotan 19661
pPA21	pUC18	<i>FAD2</i> -II aus <i>B. napus</i> Wotan 19661

2.11.2 Konstrukte zur heterologen Expression von *FAD2*-Genkopien in *S. cerevisiae*

Die heterologe Expression von *FAD2*-Genkopien aus *B. napus* in *S. cerevisiae* erfolgte mit Hilfe des Expressionsvektors pYES2. Die offenen Leserahmen wurden durch PCR (s. 2.8) amplifiziert, wobei jeweils durch die Primer am 5'-Ende eine *KpnI*-Schnittstelle angefügt wurde, während das 3'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle erhielt. Für die Genkopien I bzw. II wurden die Primerpaare PA55/PA56 bzw. PA55/PA57 eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden nach Reinigung (s. 2.7.2) mit den Enzymen *KpnI* und *XbaI* restringiert und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pYES2 ligiert. Nach Transformation von *E. coli* (s. 2.5.1) wurden positive Klone identifiziert und die rekombinanten Plasmide (Tab. 2.3) durch Elektroporation in *S. cerevisiae* INVSc1 (s. 2.5.4) transferiert. Plasmidtragende Hefe-Klone wurden nach Überprüfung für Expressions-Experimente eingesetzt (s. 2.19).

Tab. 2.3: Rekombinante Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit zur heterologen Expression von *FAD2*-Genkopien aus *B. napus* hergestellt wurden. Als Ausgangsvektor diente pYES2.

Plasmid	relevantes DNA-Fragment
pYES2- <i>FAD2</i> -I	<i>FAD2</i> -I aus <i>B. napus</i> var. Drakkar
pYES2- <i>FAD2</i> -II	<i>FAD2</i> -II aus <i>B. napus</i> var. Drakkar
pYES2-19661 <i>FAD2</i> -I	<i>FAD2</i> -I aus <i>B. napus</i> var. Wotan 19661
pYES2-19661 <i>FAD2</i> -II	<i>FAD2</i> -II aus <i>B. napus</i> var. Wotan 19661

2.11.3 Konstrukte zur Transformation von *B. napus*

Zur Entwicklung transgener Rapspflanzen mit erhöhtem Ölsäuregehalt im Samen wurden Konstrukte hergestellt, die samenspezifisch die Desaturierung der Ölsäure unterbinden sollten. Die Hemmung der Oleatdesaturasen und ancillärer Enzyme sollte durch PTGS (*posttranscriptional gene silencing*) ausgehend von Doppelstrang-RNAs erfolgen. Hierzu wurden Teilsequenzen der Zielgene als Inverted-Repeats (IRs) zu Hairpin(HP)-Kassetten kloniert, die in der Pflanze nach Transkription unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors zur Ausbildung von Hairpin-RNAs führen sollten.

Zunächst wurden rekombinante Plasmide hergestellt, die eine Promotor-Terminator-Kassette enthalten, in die dann die IRs der Zielgene kloniert werden konnten. Anschließend wurde jeweils die gesamte Kassette herausgeschnitten und in den binären Vektor pRE1 ligiert.

Die Sequenzen der zur Konstruktherstellung verwendeten PCR-Primer sind im Anhang angegeben.

2.11.3.1 Klonierung von Sequenzen der Zielgene

Um Hairpin-Kassetten herstellen zu können, wurden zunächst die Sequenzen der in Frage kommenden Zielgene kloniert. Sie dienten im folgenden als Templates zur Amplifikation von Teilfragmenten.

Das Enzym mit dem größten Anteil an der Ölsäuredesaturierung ist die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2, für die zwei in Schoten exprimierte Genkopien *FAD2-I* und *FAD2-II* isoliert werden konnten (s. 3.1). Aus verschiedenen Raps-Varietäten wurden beide *FAD2*-Sequenzen kloniert, die entsprechenden rekombinanten Plasmide sind in Tab. 2.2 zusammengefasst.

Ein weiteres Zielgen ist *FAD6*, das für die plastidäre Oleatdesaturase FAD6 kodiert. Ausgehend von der veröffentlichten Sequenz Ac. Nr. L29214 wurden die für den offenen Leserahmen spezifischen Primer PA23 und PA24 abgeleitet. In einer PCR mit genomischer DNA von *B. napus* var. Drakkar als Template wurden 2,1 kb-Fragmente amplifiziert, die *blunt end* in den Vektor pBluescript II KS⁻ kloniert und anschließend durch Sequenzierung als *FAD6*-Sequenzen mit 9 Introns identifiziert wurden (pPA9, Tab. 2.4). In einer weiteren PCR diente als Template eine in Plasmidform überführte Lambda-cDNA-Bank von *B. napus* var. Ascari (reifende Schoten, 20 daf), die freundlicherweise von Dr. M. Fulda zur Verfügung gestellt wurde (Fulda *et al.*, 1997). Hier konnten ca. 1,3 kb große *FAD6*-cDNA-Fragmente amplifiziert werden, die ebenfalls *blunt end* in den Vektor pBluescript II KS⁻ kloniert und anschließend durch Sequenzierung überprüft wurden (pPA7; Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Rekombinante Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit zur Klonierung von *FAD6*-Sequenzen aus *B. napus* hergestellt wurden. Als Ausgangsvektor wurde pBluescript II KS⁻ eingesetzt.

Plasmid	relevantes DNA-Fragment
pPA7	<i>FAD6</i> (cDNA; 1,3 kb) aus <i>B. napus</i> var. Ascari
pPA9	<i>FAD6</i> (genomisch; 2,1 kb) aus <i>B. napus</i> var. Drakkar

2.11.3.2 Herstellung von Promotor/Terminator-Kassetten

Bei der Herstellung von Konstrukten für die Raps-Transformation fanden verschiedene putativ samenspezifische Promotoren Anwendung: der Dc3-, Napin-, USP- bzw. LeB4-Promotor. Diese wurden zunächst zur Erstellung von Promotor/Terminator-Kassetten jeweils zusammen mit dem Nos-Terminator in einen Vektor kloniert. Dabei wurden die Promotor-Fragmente über PCR-Primer mit Restriktionsschnittstellen versehen, die die Klonierung sowie ein Herausschneiden der gesamten Kassette ermöglichten, außerdem entstand eine *multiple cloning site* zwischen Promotor und Terminator. Die als Templates eingesetzten Plasmide und die verwendeten Primer sind in Tab. 2.5 aufgeführt.

Tab. 2.5: Verwendete rekombinante Plasmide zur Herstellung von Promotor-Terminator-Kassetten.

Plasmid	Referenz	verwendetes Fragment	Primerpaar für PCR, angefügte Restr.-Schnittstellen
DC3ΩGUSOCS	Jorasch, pers. Mitteilung	Dc3-Promotor	PA49 (<i>NotI</i> , <i>SalI</i>) PA4 (<i>XmaI</i> , <i>XhoI</i> , <i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>)
pUCNap1	Jorasch, pers. Mitteilung	Napin-Promotor	PA31(<i>NotI</i> , <i>SalI</i>) PA32 (<i>XmaI</i> , <i>NcoI</i> , <i>BamHI</i>)
USP	Drexler, pers. Mitteilung	USP-Promotor	PA37 (<i>NotI</i> , <i>SalI</i>) PA33 (<i>XmaI</i> , <i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>)
pRT103-42-14	Fiedler, 1996	LeB4-Promotor	PA43 (<i>NotI</i> , <i>SalI</i>) PA44 (<i>XmaI</i> , <i>NcoI</i> , <i>BamHI</i>)
SLJ4K1	Jones <i>et al.</i> , 1992	Nos-Terminator	

Die gereinigten PCR-Produkte der Promotoren wurden entweder direkt oder nach Klonierung in einen Vektor mit den Enzymen *NotI* und *BamHI* restringiert und jeweils gleichzeitig mit dem 275 bp-*BamHI/PstI*-Fragment des Nos-Terminators aus dem Plasmid SLJ4K1 in den *NotI/PstI*-geschnittenen Vektor pBluescript II KS' ligiert. Die entstandenen rekombinanten Plasmide pBDN, pBNN, pBUN und pBLN sind in Tab. 2.6 aufgeführt.

Tab. 2.6: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte rekombinante Plasmide mit Promotor/Terminator-Kassetten (Vektoranteil pBluescript II KS'). Die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang abgebildet.

Plasmid	relevantes DNA-Fragment
pBDN	Dc3-Promotor (222 bp) + MCS + Nos-Terminator (275 bp)
pBNN	Napin-Promotor (590 bp) + MCS + Nos-Terminator (275bp)
pBUN	USP-Promotor (688 bp) + MCS + Nos-Terminator (275 bp)
pBLN	LeB4-Promotor (1235 bp) + MCS + Nos-Terminator (275 bp)

2.11.3.3 Herstellung von Promotor/Hairpin/Terminator-Kassetten

Die *multiple cloning site* der Plasmide pBDN, pBNN, pBUN und pBLN diente als Insertionsort für Hairpin-Kassetten. Insgesamt wurden 12 Promotor/Hairpin/Terminator-Kassetten im pBluescript II KS⁻ erstellt: drei verschiedene HP-Kassetten unter Kontrolle der vier unterschiedlichen Promotoren.

Zwei HP-Kassetten richten sich gegen die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2. Die erste besteht aus einem ca. 500 bp-Fragment des *FAD2*-Gens in sense-Orientierung und einem ca. 300 bp-Fragment in antisense-Orientierung, wobei letzteres zum 5'-Bereich der 500 bp-Sequenz komplementär ist. Diese HP-Kassette mit einem Spacer (sHP) von ca. 200 bp führt nach der Transkription zu einer Hairpin-RNA (hpRNA) mit einer Schleife. Die zweite HP-Kassette setzt sich im Unterschied zur ersten aus zwei ca. 300 bp-Fragmenten des *FAD2*-Gens in sense- bzw. antisense-Orientierung zusammen, die durch ein 100 bp großes Intron aus der genomischen Sequenz von *FAD6* getrennt sind. Aus dieser Kassette (iHP) resultiert nach Transkription und Spleißen eine hpRNA mit sehr kurzer Schleife. Die Herstellung der beiden HP-Kassetten und Klonierung hinter die vier verschiedenen Promotoren erfolgte jeweils durch PCR-Amplifikation unter Anfügung geeigneter Restriktionsschnittstellen und anschließender Ligation mit drei bzw. vier Komponenten. Die einzelnen Schritte mit Angabe der verwendeten Primer sind in Abb. 2.1 schematisch dargestellt.

Für Doppelkonstrukte zur gleichzeitigen Hemmung der mikrosomalen und der plastidären Oleatdesaturase wurde eine dritte HP-Kassette erstellt, die Fragmente des *FAD2*- und des *FAD6*-Gens enthält. Die Fragmente bilden jeweils eine HP-Sequenz mit Intron und sind durch eine ca. 280 bp große, nicht-komplementäre Sequenz aus *FAD6* getrennt. Durch Transkription entsteht so eine hpRNA, die an beiden Enden einen Doppelstrang ausbildet. Die Konstruktion dieses dritten Kassetten-Typs erfolgte wie in Abb. 2.2 angegeben durch Herstellung einer *fad6*-iHP-Sequenz und Klonierung vor den Nos-Terminator einer Promotor/*fad2*-iHP/Terminator-Kassette.

Die 12 Promotor/Hairpin/Terminator-Kassetten im pBluescript II KS⁻ wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Da die IRs nur suboptimale Sequenzierungsergebnisse lieferten, wurde die Plasmid-DNA mit dem Enzym *SpeI* restringiert, so dass die aus dem Agarosegel gereinigten Fragmente getrennt sequenziert werden konnten.

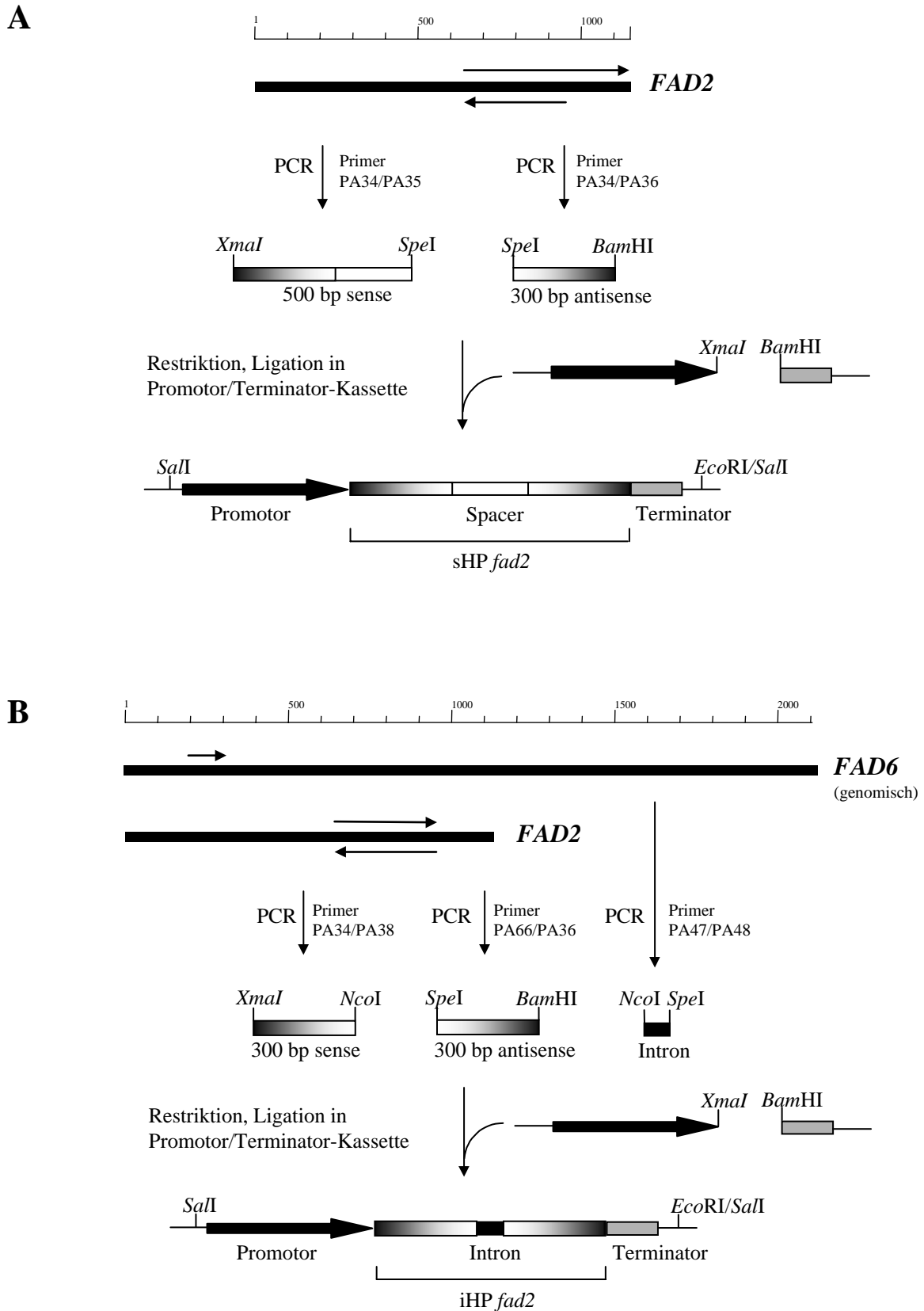


Abb. 2.1: Herstellung von Promotor/Hairpin/Terminator-Kassetten für Konstrukte zur Hemmung der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2. Die Hairpin-Sequenzen enthalten Fragmente aus *FAD2* als Inverted-Repeats: **A** Hairpin mit Spacer (sHP), **B** Hairpin mit Intron (iHP). Als Templates dienen die Plasmide pPA9 (*FAD6*, genomischer Klon) und pPA2 (*FAD2*).

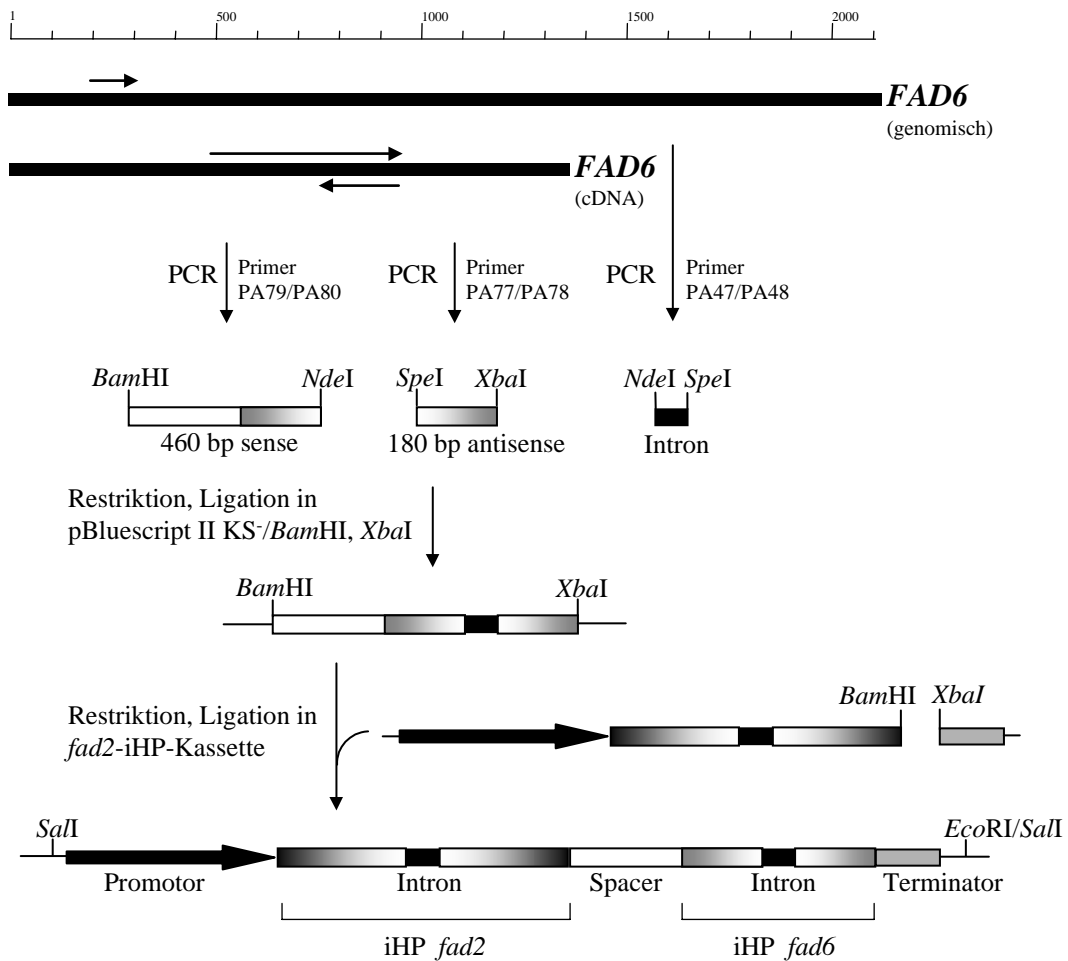


Abb. 2.2: Herstellung von Promotor/Hairpin/Terminator-Kassetten für Doppel-Konstrukte zur simultanen Hemmung der Oleatdesaturasen FAD2 und FAD6. Fragmente aus *FAD6* wurden als iHP kloniert und in *fad2*-iHP-Kassetten (s. Abb. 2.1) inseriert. Als Templates dienen die Plasmide pPA9 (*FAD6*, genomischer Klon) und pPA7 (*FAD6*, cDNA).

2.11.3.4 Herstellung von Hairpin-Konstrukten

Nach Fertigstellung und Sequenzierung der zwölf verschiedenen Promotor/HP/Terminator-Kassetten wurden sie durch Restriktion mit *SalI* oder *SalI/EcoRI* aus den Plasmiden herausgeschnitten und jeweils in die entsprechenden Schnittstellen des binären Vektors pRE1 ligiert. Die entstandenen Konstrukte wurden durch Elektroporation in *E. coli* (s. 2.5.2) transferiert. Anschließend wurden positive Klone (Tab. 2.7) mit geeigneten Primern sequenziert und in *A. tumefaciens* (s. 2.5.3) transferiert.

Tab. 2.7: Konstrukte mit Vektoranteil pRE1, die im Rahmen dieser Arbeit zur Transformation von Raps hergestellt wurden. Die Vektorkarte des pRE1 ist im Anhang abgebildet.

Plasmid	Größe (kb)	Klonierungsstelle	relevantes DNA-Fragment		
			Promotor/Terminator	Fragmente/Inverted-Repeat	Orientierung
pRD <i>fad2irA</i>	11,74	<i>SalI</i>	Dc3/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Spacer	Pro-RB
pRN <i>fad2irA</i>	12,10	<i>SalI</i>	Napin/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Spacer	Pro-RB
pRU <i>fad2irA</i>	12,19	<i>SalI</i>	USP/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Spacer	Ter-RB
pRL <i>fad2irA</i>	12,74	<i>SalI</i>	LeB4/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Spacer	Ter-RB
pRD <i>fad2irB</i>	11,65	<i>SalI</i>	Dc3/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Intron	Ter-RB
pRN <i>fad2irB</i>	12,01	<i>SalI</i>	Napin/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Intron	Ter-RB
pRU <i>fad2irB</i>	12,10	<i>SalI</i>	USP/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Intron	Ter-RB
pRL <i>fad2irB</i>	12,65	<i>SalI, EcoRI</i>	LeB4/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Intron	Pro-RB
pRD <i>fad2fad6irB</i>	12,28	<i>SalI, EcoRI</i>	Dc3/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Intron <i>FAD6</i> /Hairpin mit Intron	Pro-RB
pRN <i>fad2fad6irB</i>	12,77	<i>SalI</i>	Napin/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Intron <i>FAD6</i> /Hairpin mit Intron	Pro-RB
pRU <i>fad2fad6irB</i>	12,84	<i>SalI, EcoRI</i>	USP/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Intron <i>FAD6</i> /Hairpin mit Intron	Pro-RB
pRL <i>fad2fad6irB</i>	13,39	<i>SalI, EcoRI</i>	LeB4/Nos	<i>FAD2</i> /Hairpin mit Intron <i>FAD6</i> /Hairpin mit Intron	Pro-RB

2.12 Transformation von *B. napus*

Die Transformation von *B. napus* wurde nach einem modifizierten Protokoll von de Block *et al.* (1989) durch Kokultivierung von Hypokotylsegmenten mit *A. tumefaciens* durchgeführt. Die *in vitro*-Kultivierung der Segmente, Sprosse und Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer bei 24 °C (Weiss Technik, Typ TKR+12) und einem Licht/Dunkelwechsel von 15/9 Stunden.

Zur Gewinnung steriler Rapshypokotyle wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert, indem sie 5 min in 70 %igem Ethanol und 30 min in 0,8 %iger Natriumhypochlorit-Lösung (mit 0,1 % (v/v) Tween 20) unter Schütteln inkubiert wurden. Anschließend wurden die Samen dreimal mit sterilem Aqua dest. gespült und zweimal 15 min mit sterilem Aqua dest. gewaschen, um die Hypochloritlösung vollständig zu entfernen. Dann wurden je 50 Samen in 0,5 l-Weckgläser mit MS-Medium ausgelegt, die nur von oben belichtet werden konnten. Zur Keimung wurden die Samen für 24 h bei 24 °C im Dunkeln und anschließend 5 bis 6 Tage in einer Klimakammer kultiviert, bis die Hypokotyle eine Größe von ca. 8-10 cm erreicht hatten.

Für die Transformation wurden die Agrobakterien über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 1-1,2 angezogen, anschließend bei 3000 x g sedimentiert, in MS-Medium resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,4 bis 0,6 verdünnt. Die Rapshypokotyle wurden in 0,5-0,7 cm große Segmente geschnitten, wobei die basalen 1-2 cm verworfen wurden, und jeweils ca. 100 Segmente wurden für mindestens 30 min in 20 ml Agrobaktériensuspension inkubiert. In Kontrollansätzen wurden Segmente mit MS-Medium ohne Agrobakterien behandelt und im weiteren Verlauf auf Medien mit bzw. ohne Selektionsdruck (Kanamycin für pRE1-Derivate) kultiviert. Je 30 Hypokotylexplantate wurden auf Kokultivierungsplatten (Ø 9 cm) überführt und 2 bis 3 Tage bei geringer Beleuchtung inkubiert. Zur Selektion bei gleichzeitiger Abtötung der Agrobakterien wurden die Segmente dreimal für 15 min in Waschlösung gewaschen und mit einer Dichte von 15 Segmenten pro Platte (Ø 9 cm) auf Selektionsmedium I ausgelegt. Alle 3 Wochen wurden die Explantate auf dem gleichen Medium subkultiviert, bis sich nach ca. 3 bis 6 Wochen Kalli und kleine Sprossen an den Enden der Explantate bildeten. Die Sprosse wurden unter Entfernung eines Großteils oder des gesamten Kallusgewebes in 0,5 l-Weckgläser auf Selektionsmedium II umgesetzt. Nach dieser ersten Selektionsphase mit 25 mg/l Kanamycin folgte die weitere Kultivierung der Sprosse auf Selektionsmedium II mit erhöhter Kanamycin-Konzentration (50 mg/l). Die überlebenden Sprosse wurden nach Erreichen einer Größe von 3-5 cm auf Wurzelinduktionsmedium überführt. Eine erste Überprüfung der bewurzelten Pflänzchen auf Transgenität erfolgte durch Isolierung genomischer DNA aus Blattproben und anschließender PCR mit genspezifischen Primern (s. 2.14). Putativ transgene Pflanzen wurden auf sterile Erde in 0,75 l-Weckgläser umgesetzt und 2 Wochen in der Klimakammer (Weiss Technik, Typ LKK+2, 20 °C, 70-80 % Luftfeuchtigkeit, Tag/Nachtrhythmus 16/8 h, ca. 45-75 µE) kultiviert, wobei die Deckel der Weckgläser während der zweiten Woche langsam zurückgeschoben wurden. Nach der Überführung in Töpfe konnten die Pflanzen im Gewächshaus weiter kultiviert werden.

Murashige & Skoog (MS)-Medium

4,4 g/l MS-Medium „including modified vitamins“ (M 0245, Duchefa)

10 g/l Sucrose

pH 5,8 (NaOH)

Für Festmedien wurde 7,5 g/l Plantagar (Duchefa) zugesetzt.

Kokultivationsmedium

4,4 g/l MS-Medium „including modified vitamins“ (M 0245, Duchefa)

0,4 g/l *myo*-Inositol

15 g/l Sucrose

0,5 g/l MES

pH 5,8; 7,5 g/l Plantagar (Duchefa)

Waschlösung

4,4 g/l MS-Medium „including modified vitamins“ (M 0245, Duchefa)

pH 5,7

Nach den Autoklavieren wurden 500 mg/l Carbenicillin und 50 mg/l Cefotaxime zugeben.

Selektionsmedium I

4,4 g/l MS-Medium „including Gamborg B5 vitamins“ (M 0231, Duchefa)

0,4 g/l *myo*-Inositol

0,5 g/l MES

20 g/l Sucrose

100 µl/l Glycin (20 mg/ml)

pH 5,8; 7,5 g/l Plantagar (Duchefa)

Nach den Autoklavieren wurden 0,5 mg/l BAP, 0,01 mg/l GA3, 400 mg/l Carbenicillin, 50 mg/l Cefotaxim, 20 mg/l Kanamycin und 5 mg/l AgNO₃ zugeben.

Selektionsmedium II

Zusammensetzung wie Selektionsmedium I, nach den Autoklavieren wurden zusätzlich 500 ng/l NAA zugeben.

Für die erste Selektion wurde 25 mg/l Kanamycin eingesetzt, für die zweite Selektion 50 mg/l.

Wurzelinduktionsmedium

4,4 g/l MS-Medium „including Gamborg B5 vitamins“ (M 0231, Duchefa)

0,4 g/l *myo*-Inositol

0,5 g/l MES

15 g/l Sucrose

pH 6,0; 7,5 g/l Plantagar (Duchefa)

Nach den Autoklavieren wurden 400 mg/l Carbenicillin und 50 mg/l Kanamycin zugeben.

BAP (6-Benzylaminopurin) 2 mg/ml (Sigma)

100 mg in 1 ml 1M NaOH lösen, mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen, sterilfiltrieren

GA3 (Gibberellinsäure) 0,1 mg/ml (Sigma)

5 mg in 1 ml 50% Ethanol lösen, mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen, sterilfiltrieren

NAA (1-Naphthyllessigsäure) 1 µg/ml (Duchefa)

10 mg in 1 ml 1M NaOH lösen, mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen, 1: 200 verdünnen, sterilfiltrieren

AgNO₃ 5 mg/ml (Sigma) in Aqua dest., sterilfiltriert

Carbenicillin 250 mg/ml (Duchefa) in Aqua dest., sterilfiltriert

Cefotaxime 250 mg/ml (Duchefa) in Aqua dest., sterilfiltriert

Kanamycin 50 mg/ml (Sigma) in Aqua dest., sterilfiltriert

Antibiotika wurden bei -20 °C gelagert, Stammlösungen bei 4 °C.

2.13 Isolierung von Nukleinsäuren aus *B. napus*

2.13.1 Isolierung von genomischer DNA aus *B. napus*

(modifiziert nach Chen und Dellaporta, 1994)

200-500 mg Blattmaterial von jungen Blättern wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 2 ml Extraktionspuffer aufgenommen und gründlich gemischt (Vortex). Die Proben wurden dann mit 2 ml Phenol/Chloroform versetzt, wiederum gut gemischt und für 10 min geschüttelt. Nach Zentrifugation (15-20 min, 4 °C, 4.000 x g) wurde die Oberphase auf zwei 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt, zur DNA-

Fällung mit jeweils 1 ml Isopropanol versetzt und 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 15 min bei $14.000 \times g$ ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in $250\text{ }\mu\text{l}$ TE-Puffer unter kontinuierlichem Schütteln bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ wieder gelöst. Danach wurden die Proben wieder vereinigt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei $13.000 \times g$ für 10 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die DNA mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 Volumen Isopropanol erneut gefällt. Der anschließenden Zentrifugation folgte zweimaliges Waschen mit 80 % Ethanol, Trocknen des Pellets und Rücklösen in $50\text{-}150\text{ }\mu\text{l}$ Aqua dest. bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Konzentration wurde photometrisch oder über die Signalintensität der DNA-Bande im Agarosegel im Vergleich zu definierten Plasmid-DNA-Mengen abgeschätzt (s. 2.7.4, 2.7.5).

Harnstoffextraktionspuffer

7 M	Harnstoff
300 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
20 mM	EDTA
1 %	N-Laurylsarcosinnatriumsalz

2.13.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe

Für alle Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Lösungen und Geräte verwendet. Wasser und wässrige Lösungen wurden, soweit zulässig, mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht gerührt und dann zweimal 20 min autoklaviert. Glaswaren wurden 6 h bei $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebacken, Kunststoffgegenstände 1 h in 3% H_2O_2 und anschließend mit DEPC-Wasser gespült.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe erfolgte aus in flüssigem Stickstoff schockgefrorenem Material mit dem „RNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde zur Entfernung von DNA eine DNase-Behandlung mit dem „RNase-Free DNase Set“ (Qiagen) durchgeführt.

2.14 PCR-Analyse von transformierten Pflanzen

Zur ersten Überprüfung putativ transgener Pflanzen wurde eine PCR (s. 2.8) mit konstrukt-spezifischen Primern durchgeführt. Als Polymerase wurde die *Taq* DNA-Polymerase eingesetzt. Als Template diente genomische DNA, die aus Raps-Blattmaterial mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) isoliert wurde. DNA aus untransformiertem Raps wurde für die Negativ-Kontrolle

verwendet, eine Plasmidpräparation des Konstrukts für die Positiv-Kontrolle. Die Überprüfung jeder Probe erfolgte mit zwei verschiedenen Primerpaaren: eins zum Nachweis des Selektionsmarkergens NPTII (PA90/PA91) und eins zum Nachweis des Nos-Terminators (PA92/PA87) im eigentlichen Transgen. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.15 RT-PCR

Die RT-PCR diente dem spezifischen Nachweis von Transkripten in Gesamt-RNA aus Blattgewebe von *B. napus*. Zunächst wurde durch die Reverse Transkriptase (StrataScript™ RT, Stratagene) mit Hilfe eines Oligod(T)-Primers die gesamte mRNA-Population in cDNA umgeschrieben. In der anschließenden PCR (s. 2.8) konnten mit spezifischen Primern die gewünschten cDNA-Fragmente amplifiziert werden. Zum Nachweis von Transkripten der Genkopien *FAD2-I* bzw. *FAD2-II* wurden die Primerpaare PA16/PA45 bzw. PA16/PA30 eingesetzt.

Durch einen Kontroll-Ansatz ohne Reverse Transkriptase wurde überprüft, ob in der RNA Verunreinigungen mit genomischer DNA enthalten waren.

Ansatz für RT-Reaktion

5-10 µg RNA

3 µl Oligo d(T)-Primer (100 ng/µl)

ad 42 µl DEPC-H₂O

Inkubation für 5 min bei 65 °C, dann Lagerung für 10 min bei Raumtemperatur

5 µl 10x Puffer

2 µl dNTPs (25 mM)

1 µl StrataScript™ RT (50 U/µl)

Inkubation für 1 h bei 42 °C, dann für 5 min bei 90 °C

2.16 Markierung von DNA mit DIG-dUTP

Die nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche). Sie beruht auf dem Einbau von Digoxigenin-11-UTP während einer PCR.

Zur Vermeidung von Hintergrundsignalen, die auf Vektorsequenzen zurückzuführen sind, wurde die gewünschte DNA zunächst in einer ersten PCR (s. 2.8) mit unmarkierten dNTPs amplifiziert. Das aus einem Agarosegel gereinigte Produkt diente dann als Template für die DIG-Markierung.

PCR-Ansatz

5 µl	10 x PCR-Puffer mit MgCl ₂
2,5 µl	10 x PCR DIG Probe Synthesis Mix
2,5 µl	10 x dNTPs
50 pmol	Primer I
50 pmol	Primer II
50 ng	Template DNA
0,75 µl	Enzym-Mix
ad 50 µl	Aqua dest.

Die PCR erfolgte nach dem Standard-Temperaturprofil (s. 2.8). Die gewählten Primerkombinationen, Templates und Sondenlängen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang aufgeführt.

Tab. 2.1: Digoxigenin-markierte Sonden für Southern-Blot-Analyse bzw. Screening der cDNA-Bank.

DNA-Sonde	Sondenlänge (bp)	Primerpaar	Template	Referenz
nos	275	PA92/PA87	SLJ4K1	Jones <i>et al.</i> , 1992
fad2	888	MR1/MR2	Fad2-1	Scheffler, pers. Mitteilung

2.17 Southern-Blot-Analysen

5-10 µg genomische DNA von *B. napus* wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen für 3-4 h in einem Volumen von 25 µl restringiert, mit Blaumarker versetzt und in einem 0,75 %igen Agarosegel (11 x 14 cm) in TAE für 8 h bei 40 V oder über Nacht bei 20 V getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Überprüfung der Restriktion unter UV-Licht fotografiert.

Anschließend erfolgte die Depurinierung, Denaturierung und Neutralisierung der DNA durch Behandlung des Gels mit 250 mM HCl (8 min), Denaturierungslösung (2 x 15 min) und Neutralisierungslösung (2 x 15 min), wobei das Gel in den Lösungen geschüttelt und zwischen den einzelnen Schritten mit Aqua dest. gespült wurde. Die DNA wurde dann mittels Kapillar-Blot nach Sambrook *et al.* (1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) transferiert, wobei 20 x SSC als Transferpuffer diente. Nach 16-18 h wurde die Blotapparatur abgebaut und die DNA durch UV-Behandlung mit 0,12 Joule/cm² auf der Membran fixiert.

Für die anschließende Vorhybridisierung, Hybridisierung und Detektion der DNA wurde das „DIG System für die Filter Hybridisierung“ (Boehringer Mannheim) eingesetzt. Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte mit 25 ml DIG Easy Hyb bei 42 °C für mindestens 2 h im Hybridisierungssofen. Die

Hybridisierung wurde dann in 5 ml DIG Easy Hyb mit ca. 25 ng/ml der Digoxigenin-markierten Sonde (PCR s. 2.16) über Nacht bei 42 °C durchgeführt. Am nächsten Tag folgten zur Entfernung nicht-hybridisierter Sonde mehrere Waschschrte, und zwar in 2 x Waschlösung (2 x 5 min) bei RT und in 0,5 x Waschlösung (2 x 15 min) bei 68 °C.

Die Detektion erfolgte mittels eines Anti-Digoxigenin-Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, welche das Chemolumineszenz-Substrat CSPD[®] dephosphoryliert und somit Chemolumineszenz auslöst. Die Membranen wurden zunächst 1 min in Waschpuffer äquilibriert, dann wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit 200 ml 2 % Blockinglösung für 60 min bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran für 30 min in 200 ml Antikörperlösung bei RT inkubiert. Dem schlossen sich zwei 15minütige Waschschrte in Waschpuffer bei RT an, bevor die Membranen zur Vorbereitung der Lumineszenz-Reaktion in Detektionslösung äquilibriert wurden. Für diese wurden die Membranen mit 2 ml CSPD[®]-Lösung versetzt und unter Ausschluss von Luftblasen in Kunststoffolie eingeschweißt. Durch Inkubation der Membran für 5 min bei RT im Dunkeln und anschließend für 15 min bei 37 °C wurde die Reaktion ausgelöst, und durch Auflegen eines Röntgenfilms (HyperfilmTM-MP, 18 x 24 cm, Amersham) konnten die Signale sichtbar gemacht werden.

Um die Filter ein zweites Mal hybridisieren zu können, wurde die gebundene Sonde mit 0,2 M NaOH/0,1 % SDS von der Membran entfernt. Nach Äquilibrierung der Filter in 2 x SSC wurden diese bei 4 °C gelagert oder sofort rehybridisiert.

TAE-Puffer

40 mM	Tris-Acetat, pH 7,5
20 mM	Natriumacetat
1 mM	EDTA

Denaturierungs-Lösung

0,5 M	NaOH
1,5 M	NaCl

Neutralisierungs-Lösung

0,5 M	Tris/HCl, pH 7,5
3 M	NaCl

20 x SSC

3 M	NaCl
0,3 M	Na-Citrat
pH 7,0	

2 x Waschlösung

2 x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS

0,5 x Waschlösung

0,5 x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS

Maleinsäurepuffer

0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 (mit NaOH-Plätzchen)

0,15 M NaCl

Waschpuffer

Maleinsäurepuffer mit 0,3 % (v/v) Tween[®]20

2 % Blocking-Lösung:

2 % (w/v) Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer

Antikörper-Lösung

20 µl Anti-Digoxigenin-AP (Fab-Fragmente mit alkalischer Phosphatase konjugiert; 750 U/ml) in

200 ml 2 % (w/v) Blockinglösung

Detektionslösung

0,1 M Tris/HCl, pH 9,5

0,1 M NaCl

CSPD[®]-Lösung

2 µl 25 mM Dinatrium-3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat in 2 ml Detektionslösung

2.18 Screening einer cDNA-Bank

Zur Isolierung von Genkopien der mikrosomalen Oleatdesaturase *FAD2* aus *B. napus* wurde eine cDNA-Bank aus reifenden Schoten (20 daf) von *B. napus* var. Ascari mit einer DIG-markierten, homologen Sonde (s. 2.16) abgesucht. Die cDNA-Bank (Fulda *et al.*, 1997) wurde freundlicherweise von Dr. M. Fulda, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg, zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung war das „ZAP-cDNA®Gigapack®II Gold Cloning Kit“ (Stratagene) verwendet worden. Bei diesem System wird die cDNA gerichtet in einen Lambda-Vektor kloniert und kann später durch eine *in vivo*- Excision einfach in Plasmidform überführt werden.

Das Screening der cDNA-Bank erfolgte durch Plaque-Hybridisierung auf Nylon-Membranen mit DIG-markierten DNA-Sonden und anschließender colorimetrischer Detektion mit NBT/BCIP nach dem „DIG System für Filter Hybridisierung“ (Boehringer Mannheim).

2.18.1 Präparation von Wirtszellen und Plattieren der cDNA-Bank

Zur Vorbereitung von *E. coli*-Zellen für die Infektion wurden zunächst XL1-Blue MRF⁻-Zellen in 50 ml LB-Flüssigmedium (angereichert mit 10 mM MgSO₄ und 0,2 % (w/v) Maltose) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 1.500 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert, das Pellet wurde in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und die Zellsuspension auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Die Zellen waren nun bereit zur Infektion, konnten aber auch bis zu 48 h bei 4 °C gelagert werden.

Für die Infektion wurden je 600 µl der Zellsuspension mit 10 µl Phagenlysate versetzt und 15 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, um den Phagen Gelegenheit zu geben, an den Zellen zu binden. Anschließend wurde der Ansatz in 6,5 ml auf 48 °C warmen Top-Agar gegeben, kurz geschwenkt und dann sofort auf ebenfalls vorgewärmte NZY-Platten (Ø 140 mm) verteilt. Nach Erstarren des Top-Agars wurden die Platten mit der Unterseite nach oben bei 37 °C für 8-12 h bebrütet, bis auf der Platte Plaques von 1-2 mm Durchmesser im Bakterienrasen zu sehen waren.

Da für das erste Absuchen der cDNA-Bank pro Platte 50.000 Plaques ausplattiert werden sollten, wurde zunächst der Titer (in *plaque-forming units* pfu/µl) bestimmt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA-Bank (bis 1:10⁸) in SM-Puffer hergestellt und jeweils 10 µl für die Infektion eingesetzt. Nach Auszählen der Plaques konnte der Titer der Phagen berechnet werden.

NZY-Medium

5 g/l NaCl
2 g/l MgSO₄ x 7 H₂O
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NZ-Amin (Caseinhydrolysat)
pH 7,5 mit NaOH

Für NZY-Festmedien wurde 15 g/l Difco Microagar zugegeben.

Top Agar

0,7 % (w/v) Agarose in NZY-Medium

SM-Puffer

5,8 g/l NaCl
2 g/l MgSO₄ x 7 H₂O
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
0,01 % (w/v) Gelatine

2.18.2 Plaque-Transfer auf Nylonmembranen, Plaque-Hybridisierung und Detektion

Für das erste Screening der cDNA-Bank wurden insgesamt 500.000 Plaques auf 10 große NZY-Platten ausplattiert. Der Plaque-Transfer auf Nylon-Membranen (Hybond N, Amersham) erfolgte durch luftblasenfreies Auflegen einer Membran auf die Top Agar-Oberfläche der NZY-Platten für 1 min, wobei Membran und Platte durch Einstiche einer Kanüle so markiert wurden, dass positive Signale später den entsprechenden Plaques auf den Platten zugeordnet werden konnten. Anschließend wurden die Filter mit der Abdruckseite nach oben zunächst 5 min mit Denaturierungslösung, dann 5 min mit Neutralisierungslösung und schließlich 15 min mit 2 x SSC behandelt, indem sie auf Whatman 3M-Papier gelegt wurden, das mit den entsprechenden Lösungen getränkt war. Nachdem die Membranen getrocknet waren, wurde die DNA durch UV-Behandlung mit 0,12 J/cm² fixiert.

Die Vorhybridisierung erfolgte in DIG Easy Hyb (10 ml/großer Filter) im Wasserbad bei 42 °C für 2 h. Für die Hybridisierung wurde DIG Easy Hyb mit der denaturierten, DIG-markierten Sonde versetzt (25 ng/ml) und zu den Filtern gegeben (5 ml /großer Filter). Die Membran wurden dann über Nacht erneut bei 42 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgten mehrere Waschschrte (20 ml/Membran), zunächst für 5 min in 2 x Waschlösung (2 x SSC mit 0,1 % SDS) bei RT, dann zweimal für 15 min in 0,1 x Waschlösung (0,1 x SSC mit 0,1 % SDS) bei 69 °C. Die Filter wurden anschließend in 1 x Maleinsäurepuffer äquilibriert, danach zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 2 % Blockinglösung überführt (30 ml/großem Filter) und 1 h bei RT inkubiert. Zur Herstellung der

Antikörperlösung wurde das Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat 1:5000 in 1 % Blockinglösung verdünnt (für 10 große Membranen: 36 µl Antikörper in 180 ml Blockinglösung). In dieser Lösung wurden die Filter 30 min bei RT inkubiert, anschließend zweimal für 15 min mit 1 x Maleinsäurepuffer gewaschen. Die Filter wurden dann nach Äquilibration in Detektionspuffer einzeln mit je 10 ml Detektionslösung in Plastikfolie eingeschweisst und im Dunkeln bei RT inkubiert.

Die Detektionslösung enthält BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat) als Substrat für die alkalische Phosphatase des Anti-Digoxigenin-AP-Konjugats, sowie NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) als Elektronenakzeptor für das Dephosphorylierungsprodukt von BCIP. In Verbindung mit gebundener DIG-markierter Sonde entsteht so in einer Farbreaktion ein blauer Niederschlag auf der Membran. Nach Entwicklung der Signale wurden die Filter in Aqua dest. gewaschen, um die Farbreaktion zu unterbrechen.

Die Signale auf den Membranen konnten dann anhand der Markierungen bestimmten Bereichen auf der NZY-Platte zugeordnet werden. Die Plaques wurden mit einem Korkbohrer ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer über Nacht bei 4 °C eluiert. Das gewonnene Eluat wurde in SM-Puffer im Verhältnis 1:10³ und 1:10⁴ verdünnt und davon jeweils 10 µl für ein zweites Screening zur erneuten Infektion der vorbereiteten *E. coli*-Zellen eingesetzt. Jetzt wurden 250 µl Zellen und kleine NZY-Platten (Ø 82 mm) eingesetzt und die Volumina der Lösungen entsprechend angepasst. Gegebenenfalls wurde ein drittes Screening durchgeführt, bis definitiv ein einzelner, positiver Plaque sauber ausgestochen werden konnte. Ein solcher Plaque wurde in 500 µl SM-Puffer eluiert und das Eluat in der *in vivo*-Excision eingesetzt.

Denaturierungs-Lösung

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

Neutralisierungs-Lösung

1 M Tris/HCl, pH 7,5

1,5 M NaCl

2 x SSC

0,3 M NaCl

30 mM Natriumcitrat

pH 7,0

Maleinsäurepuffer

0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 (mit NaOH-Plätzchen)

0,15 M NaCl

2 % Blocking-Lösung:

2 % (w/v) Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer

Detektionspuffer

100 mM Tris/HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

Detektionslösung

100 ml Detektionspuffer

450 µl NBT-Lösung (75 mg/ml 70 % Dimethylformamid)

350 µl BCIP-Lösung (50 mg/ml 100 % Dimethylformamid)

2.15.3 *in vivo*-Excision

Bei der *in vivo*-Excision wird aus dem Lambda-ZAP® II-Vektor mit Hilfe des Helferphagen ExAssist™ ein Plasmid mit der inserierten cDNA (Vektoranteil pBluescript II SK⁻) herausgeschnitten und zirkularisiert, wodurch die gewünschte DNA in leicht handhabbarer Form zur Verfügung steht.

Entscheidend für dieses System ist der Bereich, der die herauszuschneidende DNA flankiert; hier handelt es sich um Sequenzen des Replikationsursprungs des Bakteriophagen f1, die für die Initiation bzw. die Termination der Positiv-Strang-Synthese erforderlich sind. „Helfer“-Proteine erkennen den f1-Initiationsstart, schneiden einen DNA-Strang und synthetisieren den komplementären Strang bis zur Terminationssequenz. Auf diese Weise entsteht eine Einzelstrangkopie des pBluescript mitsamt cDNA-Insert, die von weiteren Proteinen zirkularisiert, mit Proteinen verpackt und als fertiges Phagemid aus der *E. coli*-Zelle sekretiert wird. Die Synthese des zweiten Strangs erfolgt im *E. coli*-Stamm SOLR. Dieser ist resistent gegen eine Infektion durch den Lambda-Phagen und verhindert als Nicht-Suppressor-Stamm die Replikation des Helferphagen, dessen Genom eine amber-Mutation trägt.

Für die *in vivo*-Excision wurden zunächst Übernachtskulturen der *Escherichia coli*-Stämme SOLR und XL1 Blue MFR['] bei 30 °C in LB-Medium angezogen. Diese Kulturen wurden am nächsten Tag 1/100 verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,5 angezogen. Die SOLR-Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt und bei RT bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 weiter wachsen gelassen. Die XL1 Blue MFR[']-Zellen wurden bei 1500 x g sedimentiert, in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. In einem 15 ml Falcon-Röhrchen wurde mit diesen Zellen folgende Coinfektion angesetzt:

200 µl XL1 Blue MRF['] Zellen (OD_{600nm} = 1,0)

250 µl Phageneluat (1:50 in SM-Puffer verdünnt)

1 µl ExAssist™ Helferphage

Dieser Ansatz wurde 15 min bei 37 °C inkubiert, dann 3 ml LB-Medium hinzugegeben und 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei 2000 x g abzentrifugiert, und der die Phagemide enthaltende Überstand wurde für 15 min auf 70 °C erhitzt. Der Ansatz wurde dann mit 4.000 x g zentrifugiert und der Überstand mit den Phagemiden in ein neues Gefäß überführt. So präparierte Phagemide sind bei 4 °C für 1-2 Monate haltbar.

Zur Gewinnung der Plasmide wurden anschließend 200 µl der vorbereiteten SOLR-Zellen mit 10 µl der Phagemide infiziert, 15 min bei 37 °C inkubiert und dann 1 bzw. 10 µl auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten aus Einzelkolonien die Plasmide isoliert und diese durch Restriktion und Sequenzierung analysiert werden.

2.19 Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Die Überprüfung der Funktionalität von Enzymen erfolgte durch Expression der heterologen Gene im eukaryotischen System der Hefe. Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsexperimente wurden in dem *S. cerevisiae*-Stamm INVSc1 durchgeführt, dessen Uracil-Auxotrophie für die Selektion transgener Zellen genutzt wurde.

Die Anzucht der transgenen Hefen, die den Vektor pYES2 bzw. verschiedene Expressionskonstrukte (s. 2.11.2) enthalten, erfolgte in Minimalmedium CMdum mit 2 % Raffinose als Kohlenstoffquelle. Als Vorkultur wurden jeweils 2 ml Minimalmedium mit einer Einzelkolonie der transgenen Hefeklonen angeimpft und über Nacht bei 30 °C kultiviert. Für die Expressionskulturen wurden 10 ml Minimalmedium mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm solange kultiviert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Induktion des GAL1-Promotors durch Zugabe von 1 ml 20 % (w/v) Galaktose. Nach ca. 24 h Inkubation bei 30 °C und 180 rpm wurden die Kulturen bei einer OD₆₀₀ von 3,0-6,0 in ein Pyrex-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (1.000 x g, 5 min, 4 °C) geerntet. Nach Dekantierung des Mediums wurde das Zellsediment zur Entfernung nicht inkorporierter Fettsäuren in 2 ml 100 mM NaHCO₃ resuspendiert und erneut mit den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die so erhaltenen, gereinigten Zellsedimente wurden anschließend direkt zur Derivatisierung der Fettsäuren für die gaschromatographische Analyse eingesetzt (s. 2.20).

2.20 GLC-Analyse von Fettsäuremethylestern (FAMES)

Zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung in Rapssamen oder Hefezellen wurden durch saure Methanolyse Fettsäuremethylester hergestellt und einer GLC-Analyse unterzogen. Dazu wurden entweder intakte Rapssamen (2 x 10 für Ramschanalysen), die äußeren Kotyledonenhälften von gekeimten Rapssamen (für Halbkornanalysen), 50 mg Blattmaterial oder gereinigte Hefe-Zell-sedimente in einem Pyrex-Gläschen mit 2-5 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2 % (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80 °C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte nach Abkühlung der Ansätze durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Die oberen PE-Phasen wurden in einem Spitzröhrchen vereinigt und zur Entfernung nichtderivatisierter freier Fettsäuren je 1 x mit 2 ml 100 mM NaHCO₃ und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, unter Argon eingedampft und in 50-100 µl PE aufgenommen. Zur GLC-Analyse wurden 1-5 µl in den Gaschromatographen injiziert. Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma).

GC-Bedingungen:

Gaschromatograph:	Hewlett-Packard 6850
Säule:	ZB-Wax, 30 m, 0.32 mm, 0.25 µm film (Phenomenex, Torrance, CA)
Detektor:	Flammenionisationsdetektor
Trägergas:	Stickstoff 5.0
Software:	HP ChemStation Rev. A 06.03.

3. Ergebnisse und Diskussion

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Erhöhung des Ölsäuregehalts in Rapsamen mittels gentechnischer Methoden. Die Desaturierung der Ölsäure sollte während der TAG-Biosynthese durch sequenzspezifische Suppression beteiligter Oleatdesaturase-Gene, ausgelöst durch PTGS (*posttranscriptional gene silencing*), unterbunden werden. Da das wichtigste Ziel-Enzym – die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2 – durch eine Multigen-Familie repräsentiert wird, wurden zunächst funktionale Genkopien isoliert und charakterisiert. Desweiteren erfolgte u. a. die Klonierung von DNA-Sequenzen der plastidären Oleatdesaturase FAD6, der eine mögliche kompensatorische Funktion zugesprochen wird. Zur sequenzspezifischen Suppression wurden Hairpin-Konstrukte hergestellt, die durch Einsatz putativ samenspezifischer Promotoren ausschließlich während der Samenreife aktiv sein sollten. Nach *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation von Raps konnte durch Analysen der Samen die Funktionalität verschiedener Konstrukt-Varianten in Bezug auf Steigerung des Ölsäure-Gehalts ermittelt werden.

3.1 Isolierung von Genkopien der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2 aus *B. napus*

Die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2 hat den größten Anteil an der Produktion von C18-PUFAs bei der Synthese von Speicherlipiden. Aus Southern Blot-Analysen von 16 Raps-Varietäten und 3 Resyntheselinien wurde abgeschätzt, dass im haploiden Genom 4-6 Genkopien des *FAD2*-Gens vorliegen (Scheffler *et al.*, 1997). Durch RFLP-Mapping konnten für *FAD2* vier Loci ermittelt und vier verschiedenen Kopplungsgruppen zugeordnet werden, von denen zwei dem A-Genom (*B. rapa*) und zwei dem C-Genom (*B. oleracea*) angehören. Anscheinend liegen die Desaturase-Gene in *B. napus* dupliziert vor, es ist allerdings nicht bekannt, welche der Kopien funktional sind und ob sie samenspezifisch oder konstitutiv exprimiert werden. Da diese Informationen für ein effektives *FAD2*-Silencing von Bedeutung sind, wurden funktionale, an der Speicherlipid-Biosynthese beteiligte *FAD2*-Genkopien aus *B. napus* isoliert und charakterisiert.

Eine cDNA-Bank aus reifenden Schoten (Fulda *et al.*, 1997) von *B. napus* var. Ascari wurde mit einem *FAD2*-Fragment aus *B. napus* als DIG-markierte homologe Sonde abgesucht (s. 2.18). Die Hybridisierung von 5×10^5 Plaques ergab ca. 150 positive Klone, von denen 20 nach *in vivo*-Excision sequenziert wurden. Zwei verschiedene Genkopien, die in etwa gleichen Anteilen vorlagen, konnten identifiziert werden. Sequenzvergleiche der offenen Leserahmen mit bekannten *FAD2*-Sequenzen aus der Datenbank wiesen eine 99 bzw. 96 %ige Identität zu einem *FAD2*-Gen aus *B. napus* (Ac. Nr. AF243045) auf. Abb. 3.1 zeigt zwei cDNA-Klone als Vertreter der Genkopien, die mit *FAD2*-I und *FAD2*-II bezeichnet werden. Während die beiden Kopien im 1155 bp großen offenen

Leserahmen zu 97 % identisch sind, bestehen in den untranslatierten Bereichen – insbesondere im 3'-UTR – deutliche Abweichungen in der DNA-Sequenz. Diese wurden genutzt, um Genkopie-spezifische PCR-Primer abzuleiten. Mit einem 5'-Primer, der am 5'-ORF bindet (PA 16), und jeweils einem im 3'-UTR bindenden Primer (PA45, PA30) können so durch PCR beide *FAD2*-Genkopien getrennt amplifiziert werden.

```

GGCACGAGAGATAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGGAGACAGAGAGAGAGTTTGGAGGAGGACTTCTTCGTAGGGTTCATCGTTATTAACGTT
-----GGCACGAGG.....T.....
AAATCTTCATCCCCCTACGTCAGCCAGCTCAAGAAACATGGGTGCAGGTGGAAGAATGCAAGTGTCTCCTCCCTCCAAAAAGTCTGAA
.....G.....
ACCGACAACATCAAGCGCGTACCCTGCGAGACACCGCCCTTCACTGTCTGGAGAACTCAAGAAAGCAATCCACCGCACTGTTTCAAACGC
.....C.....
TCGATCCCTCGCTCTTCTCCTACCTCATCTGGGACATCATCATAGCCTCCTGCTTCTACTACGTGCGCCACCACTTACTTCCCTCTCCTC
.....
CCTCACCTCTCTCTACTTCGCCTGGCCTCTCTACTGGGCTGCCAGGGCTGCGTCTAACCGGCGTCTGGGTCATAGCCCACGAGTGC
.....A..G.....
GGCCACCACGCTTTCAGGACTACCAGTGGCTGGACGACACCGTCGCCTCATCTTCCACTCCTTCTCCTCGTCCCTTACTTCTCCTGG
.....T.....T.....
AAGTACAGTCATCGACGCCACCATTCCAACACTGGCTCCCTCGAGAGAGACGAAGTGTGTTGCCCCAAGAAGAAGTCAGACATCAAGTGG
.....
TACGGCAAGTACCTCAACAACCTTTGGGACGCACCGTGATGTTAACGGTTCAGTTCACTCTCGGCTGGCCTTGTACTTAGCCTTCAAC
.....G.....
GTCTCGGGGAGACCTTACGACGGCGGCTTCGCTTGCCATTTCCACCCCAACGCTCCCATCTACAACGACCGTGAGCGTCTCCAGATATAC
.....A.....C.....
ATCTCCGACGCTGGCATCCTCGCGTCTGCTACGGTCTCTACCGCTACGCTGTGTTCAAGGAGTTGCCTCGATGGTCTGCTTCTACGGA
.....T..T..C..C..G..G.....G.....
GTTCTCTTCTGATTGTCAACGGGTTCTTAGTTTTGATCACTTACTTGCAGCACACGCATCCTTCCCTGCCTCACTATGACTCGTCTGAG
..C..G.....T..T..C..C..G.....C..T..C..
TGGGATTGGTTGAGGGGAGCTTTGGCCACCGTTGACAGAGACTACGGAATCTTGAACAAGGTCTTCCACAATATCACGGACACGCACGTG
.....T.....T..C.....
GCGCATCACCTGTTCTCGACCATGCCGATTATCATGCGATGGAAGCTACGAAGGCGATAAAGCCGATACTGGGAGAGTATTATCAGTTC
.....T.....C..G.....C.....C.....
GATGGGACCCCGTGGTTAAGCGCATGTGGAGGGAGGCGAAGGAGTGATCTATGTGGAACCGGACAGGCAAGGTGAGAAGAAAGGTGTG
.....
TTCTGGTACAACAATAAGTTATGAAG-----CAAAGAAGAAACTG-----AACCTTCTCTT-----CTATGATT
.....G..ATATGATGATGGTGAAAGAA.....T..T..TCACG.....GCTGT..C..G..C
.....
GTCTTTGTTT-AAGAAGCTATGTTTCTGTTTCAATAATCTTAATTATCCATTTTGTGTGTTTCTGACATTTGGCTAAAATTATGTGA
.....T.....TC.....C.....G-.....
TGTTGGAAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
...G...CACGTTAGTGTCTAAAATGTCTCTGTGTCTGTATTGTTCTCTCATCTGTGACTTTCGGACAACATAACTTGTCTCGAAC
-----
TACCTCAATGTGGCATTAAATGAAAGTGTATTGTTGATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 3.1: Vergleich von cDNA-Sequenzen der Genkopien *FAD2*-I und *FAD2*-II aus *B. napus* var. Ascari. Start- und Stop-Codon des ORF sind grau unterlegt. Mit *FAD2*-I identische Nukleotide sind als Punkte dargestellt. Die Pfeile markieren die Bindungsstellen der Primer PA16, PA45 und PA30, die eine Genkopie-spezifische Amplifikation ermöglichen.

Mit Hilfe der Genkopie-spezifischen Primer-Paare PA16/PA45 und PA16/PA30 wurden im folgenden die genomischen *FAD2*-I- und *FAD2*-II-Sequenzen aus *B. napus* var. Drakkar isoliert und kloniert. Die Sequenz-Vergleiche mit den cDNA-Klonen zeigten, dass im offenen Leserahmen keine Introns vorliegen. Die genomische Sequenz der Kopie *FAD2*-II aus Drakkar ist zu 100 % identisch mit der cDNA *FAD2*-II aus Ascari, während die Sequenz der Genkopie I aus Drakkar eine einzige Nukleotid-Abweichung in der Sequenz im Vergleich zur entsprechenden Kopie aus Ascari aufweist. Dieser Unterschied (C statt T an Position 987 des ORF) wirkt sich auf Proteinebene nicht aus.

Um zu überprüfen, ob die isolierten Genkopien dem *B. rapa*(A)- oder dem *B. oleracea*(C)-Genom zuzuordnen sind, wurden die DNA-Sequenzen mit den entsprechenden *FAD2*-Sequenzen aus der Datenbank verglichen (Tab. 3.1). Die Kopie *FAD2*-I zeigt 99 % Identität zu einer *FAD2*-Sequenz aus *B. rapa*, aber nur 95 % zu einer partiellen *FAD2*-Sequenz aus *B. oleracea*. Für die Kopie *FAD2*-II dagegen wird die höchste Identität zur *FAD2*-Sequenz aus *B. oleracea* festgestellt. Nach diesen Hinweisen kann vermutet werden, dass die isolierten Genkopien *FAD2*-I und *FAD2*-II homöologe Gene darstellen, die von den Vorfahren *B. rapa* bzw. *B. oleracea* abstammen.

Tab. 3.1: Übereinstimmung der DNA-Sequenz von aus *B. napus* var. Drakkar isolierten *FAD2*-Genkopien zu veröffentlichten *FAD2*-Sequenzen aus *B. rapa*, *B. oleracea* und *B. napus*. Der Sequenzvergleich wurde mit dem BLAST-Programm durchgeführt.

<i>FAD2</i> -Genkopie	Identität (%)		
	AJ459107 (<i>B. rapa</i>)	AF181726 (<i>B. oleracea</i>) ^a	AF243045 (<i>B. napus</i>)
<i>FAD2</i> -I	99	95	96
<i>FAD2</i> -II	97	99	99

^a partielle Sequenz 619 bp

Die aus den *FAD2*-Genkopien abgeleiteten Aminosäuresequenzen weisen eine Länge von 384 Aminosäuren auf und unterscheiden sich nur an drei Positionen (Abb. 3.2), sie zeigen somit eine Identität von 99 %. Bei Vergleichen mit *FAD2*-Sequenzen aus *B. napus* var. Westar (Kodali *et al.*, 2002) kann *FAD2*-I dem „Wildtyp-D“ und *FAD2*-II dem „Wildtyp-F“ mit jeweils 100 %iger Übereinstimmung zugeordnet werden.

BnFAD2-I	MGAGGRMQVSPPSKKSETDNIKRVPCE	TPPFTV	GELKKAIPPHCFKRSIPRSFSYLIW	DI	60
BnFAD2-II	MGAGGRMQVSPPSKKSETDTIKRVPCET	TPPFTV	GELKKAIPPHCFKRSIPRSFSYLIW	DI	
BnFAD2-I	IIASCFYYVATTYFPLLPHPLSYFAWPLYWACQGC	VL	TGVVIAHECGHHAFSDYQWLDD	120	
BnFAD2-II	IIASCFYYVATTYFPLLPHPLSYFAWPLYWACQGC	VL	TGVVIAHECGHHAFSDYQWLDD		
BnFAD2-I	TVGLIFHSFLLVPYFYSWKYSFIRRHHSNTG	S	LERDEVFVPPKKKSDIKWYGKYLNNPLGRTV	180	
BnFAD2-II	TVGLIFHSFLLVPYFYSWKYSFIRRHHSNTG	S	LERDEVFVPPKKKSDIKWYGKYLNNPLGRTV		
BnFAD2-I	MLTVQFTLWPLYLAFNVSGRPYDGGFACHFHPNAPIY	ND	RERLQIYISDAGILAVCYGL	240	
BnFAD2-II	MLTVQFTLWPLYLAFNVSGRPYDGGFACHFHPNAPIY	ND	RERLQIYISDAGILAVCYGL		
BnFAD2-I	YRYAAVQGVASMVCFYGVPLLI	VNGFLVLITYLQHTHPSLPHYDSSEWDWLRGALATVDR	300		
BnFAD2-II	FRYAAAQGVASMVCFYGVPLLI	VNGFLVLITYLQHTHPSLPHYDSSEWDWLRGALATVDR			
BnFAD2-I	DYGILNKVFHNITDTFVAHHLLFSTMPHYHAMEATKA	IKPILGEYYQFDGTPVVKAMWREA	360		
BnFAD2-II	DYGILNKVFHNITDTFVAHHLLFSTMPHYHAMEATKA	IKPILGEYYQFDGTPVVKAMWREA			
BnFAD2-I	KECIYVEPDRQGEKKGVF	WYNNKL	384		
BnFAD2-II	KECIYVEPDRQGEKKGVF	WYNNKL			

Abb. 3.2: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von FAD2-I und FAD2-II aus *B. napus*. Unterschiede in der Sequenz sind grau unterlegt, die Rahmen markieren die drei Histidin-Boxen.

Aus *H. annuus*, *G. max* und *G. hirsutum* wurden jeweils mehrere cDNAs isoliert, die für mikrosomale Oleatdesaturasen codieren (Martínez-Rivas *et al.*, 2001; Heppard *et al.*, 1996; Liu *et al.* 1999a,b). Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster kann in jedem der Organismen zwischen konstitutiv und samenspezifisch exprimierten *FAD2*-Genen unterschieden werden, wobei deutliche Abweichungen in den Sequenzen bestehen. So weisen die Enzyme FAD2-1 und FAD2-2 aus *G. max* eine Sequenz-Identität von 73 % auf, FAD2-1 aus *H. annuus* ist nur zu 67 bzw. 66 % identisch mit FAD2-2 bzw. FAD2-3. Im Phylogramm mit allen bekannten Oleatdesaturasen treten die samenspezifischen Enzyme von *H. annuus*, *G. max* und *G. hirsutum* interessanterweise in einem getrennten Ast abseits der konstitutiven Enzyme auf (Abb. 3.3), was eine unabhängige Entwicklung in der Evolution vermuten lässt (Martínez-Rivas *et al.*, 2001). Die Proteine FAD2-I und FAD2-II der isolierten Genkopien aus *B. napus* werden innerhalb des Phylogramms in die Gruppe eingeordnet, in der die konstitutiven Oleatdesaturasen vertreten sind.

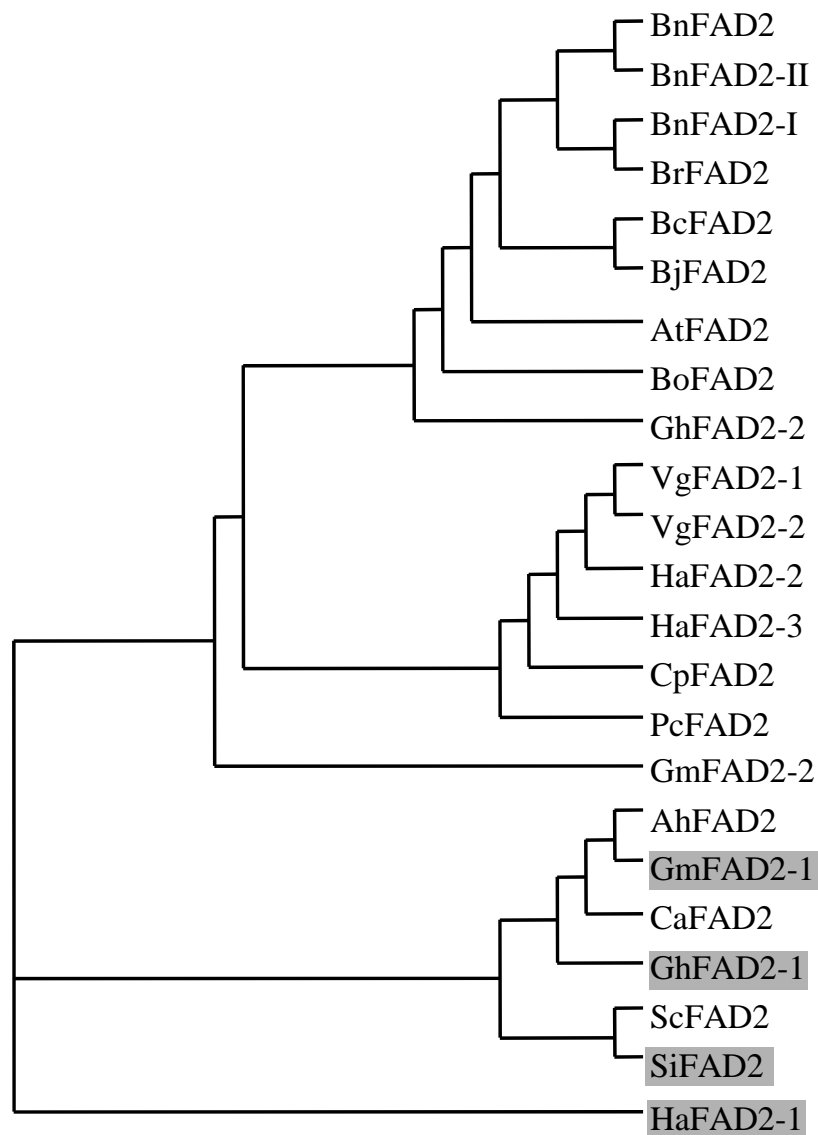


Abb. 3.3: Phylogramm, das aus einem Aminosäure-Sequenzvergleich von FAD2-Sequenzen berechnet wurde. Samenspezifische Enzyme sind grau unterlegt. Accession-Nummern der Sequenzen: *Arabidopsis thaliana* AtFAD2, AAA32782; *Arachis hypogaea* AhFAD2, AAB84262; *Borago officinalis* BoFAD2, AAC31698; *Brassica carinata* BcFAD2, AAD19742; *Brassica juncea* BjFAD2, CAA62578; *Brassica napus* BnFAD2, AAF78778; BnFAD2-I, diese Arbeit; BnFAD2-II, diese Arbeit; *Brassica rapa* BrFAD2, CAD30827; *Corylus avellana* CaFAD2, CAA03835; *Crepis palaestina* CpFAD2, CAA761157; *Glycine max* GmFAD2-1, AAB00859; GmFAD2-2, AAB00860; *Gossypium hirsutum* GhFAD2-1, CAA65744; GhFAD2-2, CAA71199; *Helianthus annuus* HaFAD2-1, AAL68981; HaFAD2-2, AAL68982; HaFAD2-3, AAL68983; *Petroselinum crispum* PcFAD2-1, AAB80696; *Sesamum indicum* SiFAD2, AAF80560; *Solanum commersonii* ScFAD2, CAA63432; *Vernonia galamensis* VgFAD2-1, AAF04093; VgFAD2-2, AAF04094.

3.2 Charakterisierung von Genkopien der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2

3.2.1 Funktionale Expression von FAD2-Genkopien in *S. cerevisiae*

Zur Ermittlung der Funktionalität der aus *B. napus* isolierten Genkopien *FAD2-I* und *FAD2-II* erfolgte eine heterologe Expression in *S. cerevisiae*. Die kodierenden Bereiche wurden in den Hefe-Expressions-Vektor pYES2 stromabwärts des Galaktose-induzierbaren GAL1-Promotors inseriert (s. 2.11.2). Nach Transformation des Stammes INVSc1 (s. 2.5.4) mit den rekombinanten Plasmiden bzw. dem Ausgangs-Vektor wurden die transgenen Zellen für Expressionsversuche kultiviert, wobei die Induktion des Promotors in der frühen logarithmischen Phase erfolgte (s. 2.19). Aus den geernteten Zellen erfolgte die Analyse der Fettsäure-Zusammensetzung durch Herstellung von FAMES mit anschließender GLC-Analyse (s. 2.20). Das Fettsäure-Profil der Zellen mit dem Ausgangs-Vektor pYES2 (Abb. 3.4 A) zeigt das typische Wildtyp-Muster mit gesättigten und einfach ungesättigten C16- und C18-Fettsäuren (Kajiwara *et al.*, 1996). Dagegen kommt es bei transgenen Zellen mit den Genkopien *FAD2-I* bzw. *FAD2-II* zu einer Akkumulation von 16:2^{Δ9,12} und 18:2^{Δ9,12} (Abb. 3.4 B, C). Die beiden Fettsäure-Profile weisen eine ähnliche Zusammensetzung mit 16:2^{Δ9,12}-Gehalten von ca. 13-14 % und 18:2^{Δ9,12}-Gehalten von ca. 23-24 % auf (Tab. 3.2). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Genkopien *FAD2-I* und *FAD2-II* in *S. cerevisiae* funktional exprimiert werden und die endogenen MUFA-Substrate 18:1^{Δ9} und auch 16:1^{Δ9} für eine Δ12-Desaturierung nutzen können. Die FAD2-Proteine werden anscheinend korrekt in die ER-Membran inkorporiert und können mit dem Hefe-eigenen Cytochrom-b₅ interagieren. Im heterologen Wirt *S. cerevisiae* beträgt der Substrat-Umsatz für 18:1 ca. 70 %. Im reifenden Rapssamen dagegen desaturiert die FAD2 unter Einfluss der Regulationsmechanismen des natürlichen Wirts-Hintergrunds mit ca. 30 % weitaus weniger 18:1-Substrat.

Tab. 3.2: Fettsäure-Zusammensetzung transgener *S. cerevisiae* INVSc1-Zellen, die den Vektor pYES2 oder die Expressionskonstrukte pYES2-*FAD2-I* bzw. pYES2-*FAD2-II* tragen. Die FAMES der Gesamtlipide wurden über GLC analysiert.

Konstrukt	Fettsäure-Zusammensetzung (%)					
	16:0	16:1 ^{Δ9}	16:2 ^{Δ9,12}	18:0	18:1 ^{Δ9}	18:2 ^{Δ9,12}
pYES2	22,4	36,9	-	9,1	31,6	-
pYES2- <i>FAD2-I</i>	20,7	19,9	14,3	11,4	9,2	24,4
pYES2- <i>FAD2-II</i>	21,1	21,5	13,2	10,6	10,5	23,1

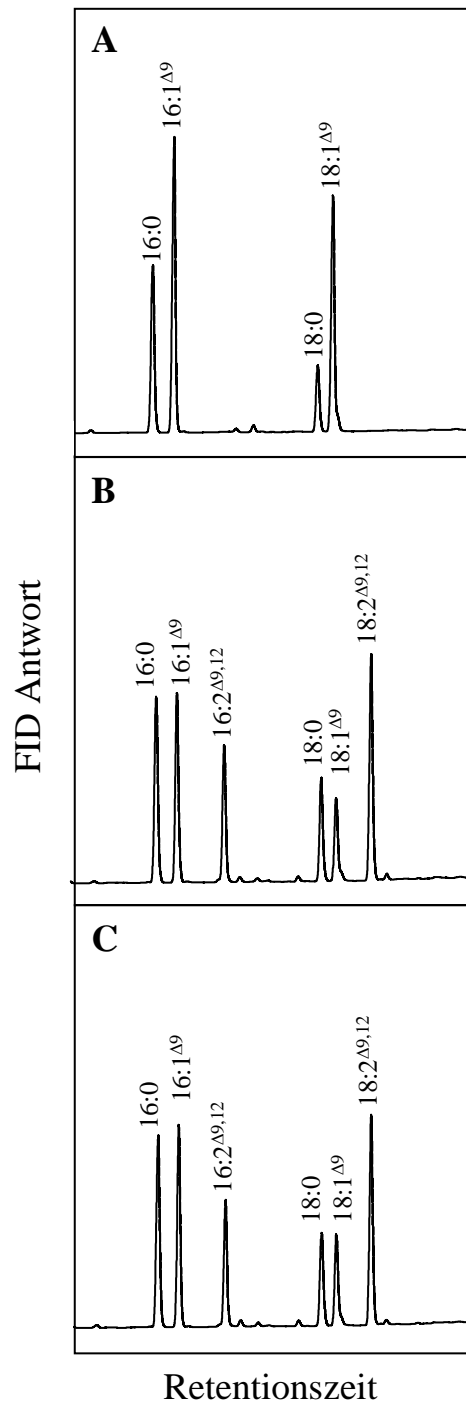


Abb. 3.4: Fettsäure-Profile von transgenen *S. cerevisiae*-Zellen mit heterologer Expression von *FAD2*-Genkopien aus *B. napus*. Die FAMES der Gesamtlipide wurden über GLC analysiert. In Tab. 3.2 sind die entsprechenden Flächenprozentage angegeben.
A Vektor-Kontrolle pYES2, **B** pYES2-*FAD2*-I, **C** pYES2-*FAD2*-II.

3.2.2 Expression der *FAD2*-Genkopien in vegetativem Gewebe

Für eine gentechnologische Hemmung der mikrosomalen Oleatdesaturasen zur Steigerung des Ölsäuregehalts in Samen sind Kenntnisse über die Expressionsmuster der zu supprimierenden Gene von Bedeutung, da aus der Hemmung eines konstitutiv exprimierten Gens empfindliche agronomische Nachteile resultieren könnten. Die *FAD2*-Gene der Pflanzen *H. annuus*, *G. max* und *G. hirsutum* lassen sich jeweils aufgrund ihrer Expressionsmuster in samenspezifisch und konstitutiv exprimierte Genkopien unterteilen. Durch gezielte Hemmung von ausschließlich im Samen exprimierten Genkopien konnten erfolgreich HO-Formen von *G. max* (Kinney, 1996) und *G. hirsutum* (Liu *et al.*, 2002a) entwickelt werden, die keine Beeinträchtigung des vegetativen Wachstums zeigen.

Um zu überprüfen, ob die aus einer cDNA-Bank aus reifenden Rapsschoten isolierten Genkopien *FAD2*-I und *FAD2*-II auch in vegetativem Gewebe exprimiert werden, wurde Blattgewebe mittels RT-PCR auf Anwesenheit der mRNAs untersucht. Aus Blattmaterial von *B. napus* wurde RNA isoliert (s. 2.13.2) und mit Hilfe der Reversen Transkriptase cDNA synthetisiert (s. 2.15). Zur Vermeidung von Kontaminationen mit genomischer DNA wurde während der RNA-Isolierung eine DNase-Restriktion durchgeführt, außerdem erfolgte zur Kontrolle eine RT-PCR ohne Reverse Transkriptase. In der anschließenden PCR mit *FAD2*-I- und *FAD2*-II-spezifischen Primern konnten cDNAs beider Genkopien amplifiziert werden (Abb. 3.5, Spuren 1 und 4), ihre Identität wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Nach diesen Ergebnissen kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich bei den aus *B. napus* isolierten Genkopien *FAD2*-I und *FAD2*-II um ausschließlich während der Samenreifung exprimierte Gene handelt. Folglich fällt bei der gentechnologischen Suppression der Genkopien den Eigenschaften der verwendeten Promotoren eine besondere Bedeutung zu, damit eine ausschließlich samenspezifische Hemmung gewährleistet ist und agronomische Nachteile vermieden werden.

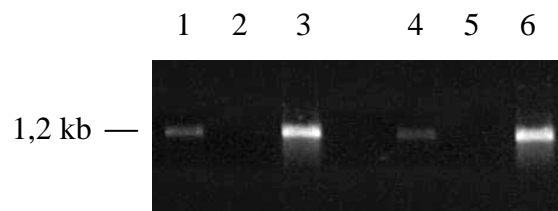


Abb. 3.5: Amplifizierte Fragmente der Genkopien *FAD2*-I- und *FAD2*-II durch RT-PCR. Die RNA wurde aus Blattmaterial von *B. napus* isoliert. Spur 1: RT-PCR *FAD2*-I; Spur 2: Negativ-Kontrolle ohne Reverse Transkriptase; Spur 3: Plasmid-Kontrolle *FAD2*-I; Spur 4: RT-PCR *FAD2*-II; Spur 5: Negativ-Kontrolle ohne Reverse Transkriptase; Spur 6: Plasmid-Kontrolle *FAD2*-II.

3.2.3 Charakterisierung einer HO-Mutante von *B. napus* var. Wotan

Die Sequenz-Informationen der beiden isolierten funktionalen *FAD2*-Genkopien aus *B. napus* wurden genutzt, um eine HO-Mutante der Winterraps-Sorte Wotan zu charakterisieren. Die Mutante 19661 aus einem EMS-Mutagenese-Programm (Rücker und Röbbelen, 1995, 1997) wurde von A. Schierholt (2000a) genetisch und molekular charakterisiert, indem u.a. die Genetik des HO-Merkmals untersucht und molekulare Marker für die Lokalisierung auf der Karte des Rapsgenoms entwickelt wurden. Das Fettsäure-Profil der Mutanten-Linie zeigte im Vergleich zur Ausgangsform Wotan im Samen eine signifikante Erhöhung des Ölsäuregehalts von ca. 60 auf 77 % bei Reduzierung des Linolsäuregehalts von ca. 19 auf 8 % und des Linolensäuregehalts von ca. 10 auf 7 %. In Blättern und Wurzeln lagen im Vergleich zu Wotan leicht erhöhte Ölsäuregehalte vor. Durch Spaltungsanalysen wurde für die Mutante 19661 das Muster einer monogenen Vererbung ermittelt, der verantwortliche Locus erhielt die Bezeichnung HO1 (Schierholt *et al.*, 2001). Nach Entwicklung von gekoppelten AFLP-Markern konnte der HO1-Locus durch Kartierung in der Nähe einer Kopie des *FAD2*-Gens im Rapsgenom lokalisiert werden (Schierholt *et al.*, 2000b)

Aus genomischer DNA (s. 2.13.1) der Wotan-Mutante 19661 und des Wildtyps konnten mit Hilfe der für die Genkopien *FAD2*-I und *FAD2*-II spezifischen Primer die offenen Leserahmen amplifiziert und kloniert werden. (s. 2.11.1). Die *FAD2*-I- und *FAD2*-II-Sequenzen des Wotan Wildtyps stimmen zu 100 % überein mit den entsprechenden Genkopien aus *B. napus* var. Ascari; im Vergleich zu *B. napus* var. Drakkar besteht für die Kopie I – wie schon für Ascari festgestellt – eine Abweichung in der Nukleotid-Sequenz (s. 3.1). Auf Protein-Ebene sind *FAD2*-I bzw. *FAD2*-II bei den drei Varietäten Wotan, Drakkar und Ascari absolut identisch. Die Sequenzvergleiche zwischen Wotan-Wildtyp der Mutante 19661 zeigten, dass die *FAD2*-II-Sequenzen übereinstimmen, während in *FAD2*-I der Mutante eine Punktmutation identifiziert wurde (Abb. 3.6). An Position 598 liegt anstatt eines Guanins ein Adenin vor, wodurch der Aminosäure-Austausch des Glycins an Position 200 gegen ein Arginin resultiert. Desweiteren entsteht durch die Punktmutation eine zusätzliche *Xho*I-Restriktionsschnittstelle.

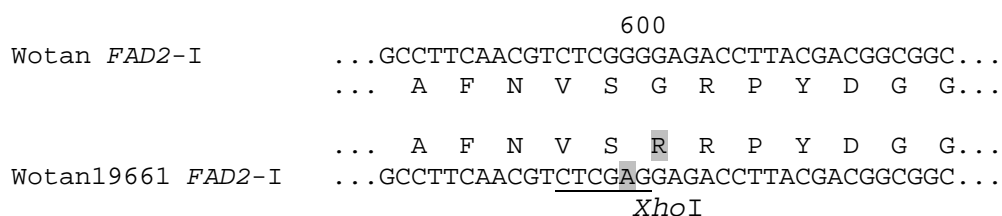


Abb. 3.6: Ausschnitte aus den Nukleotid-Sequenzen der Genkopie *FAD2*-I aus *B. napus* var. Wotan und der HO-Mutante 19661 mit den abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen. Die durch Sequenzvergleich identifizierte Punktmutation und der resultierende Aminosäure-Austausch sind grau unterlegt, die entstandene *Xho*I-Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen.

Um den Grad der Konservierung des ausgetauschten Glycin-Rests einschätzen zu können, wurde ein Aminosäure-Sequenzvergleich von 23 FAD2-Proteinen und FAD2-I der HO-Mutante mit dem Programm ClustalX erstellt. Der in Abb. 3.7 dargestellte Ausschnitt zeigt, dass der betroffene Glycin-Rest an Position 200 der FAD2-Sequenzen aus *B. napus* in allen bekannten FAD2-Proteinen hochkonserviert ist.

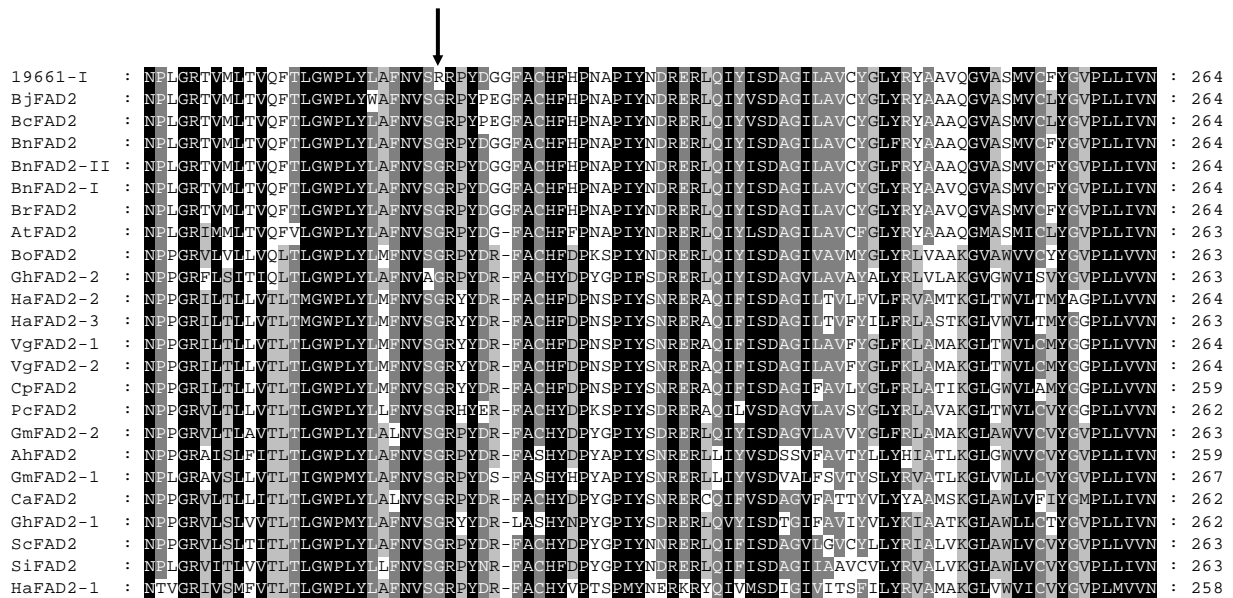


Abb. 3.7: Ausschnitt eines Aminosäure-Sequenzvergleichs von FAD2-Proteinen. Der Pfeil markiert den Austausch G200R in FAD2-I der HO-Mutante 19661. (Accession-Nummern s. Abb. 3.3)

Aufgrund des hohen Konservierungsgrads des Glycin200-Rests wäre es vorstellbar, dass der Austausch gegen das positiv geladene und größere Arginin Auswirkungen auf die Faltung und/oder Funktion des Proteins FAD2-I in der Mutante hat. Um die Funktionalität des Enzyms zu überprüfen, wurde eine heterologe Expression der *FAD2*-Genkopien in *S. cerevisiae* durchgeführt. Da die *FAD2*-Sequenzen aus *B. napus* in der Hefe effektiv exprimiert werden (s. 3.2.1), ist dies eine geeignete Methode für Struktur-Funktions-Analysen bei mutierten *FAD2*-Genen und deren Genprodukten. Die offenen Leserahmen der Genkopien *FAD2*-I bzw. *FAD2*-II aus der Mutante 19661 wurden in den Vektor pYES2 inseriert, anschließend erfolgte die Transformation des Stamms INVSc1 mit den Expressionskonstrukten bzw. dem Vektor. Die Expression wurde wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt und die FAMES über GLC analysiert.

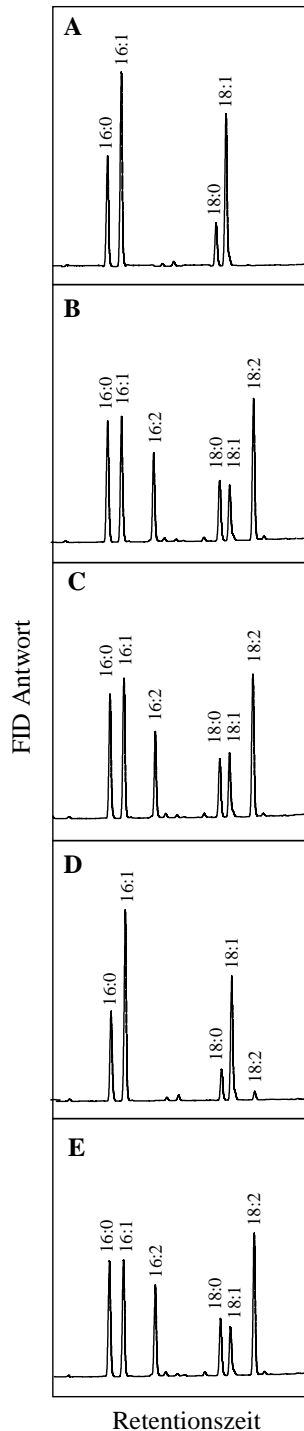


Abb. 3.8: Fettsäure-Profile von transgenen *S. cerevisiae*-Zellen mit exprimierten Wildtyp- und Mutanten-Genkopien von *FAD2* aus *B. napus*. Die FAMES der Gesamtlipide wurden über GLC analysiert. In Tab. 3.3 sind die entsprechenden Flächenprozentage angegeben.

A Vektor-Kontrolle pYES2, **B** pYES2-*FAD2*-I, **C** pYES2-*FAD2*-II, **D** pYES2-19661*FAD2*-I, **E** pYES2-19661*FAD2*-II.

Das Fettsäure-Profil der transgenen Hefen mit Kontroll-Vektor (Abb. 3.8 A) zeigt keine Akkumulation von 16:2 und 18:2. Die *FAD2*-I und *FAD2*-II-Sequenzen des Wildtyps und die nicht-mutierte Genkopie *FAD2*-II der Mutante 19661 werden funktional exprimiert, so dass 16:2- bzw. 18:2-Gehalte von ca. 13-15 % bzw. ca. 23-25 % resultieren (Abb. 3.8 B, C, E; Tab. 3.8). In den Hefezellen mit der mutierten Genkopie *FAD2*-I wird kein 16:2 und lediglich 1,8 % 18:2 akkumuliert (Abb. 3.8 D). Der 18:1-Substrat-Umsatz beträgt somit nur ca. 6 % im Vergleich zu ca. 70 % bei funktionalen *FAD2*-Kopien. Diese Ergebnisse zeigen, dass der mutationsbedingte Aminosäure-Austausch G200R in der Genkopie *FAD2*-I der Mutante 19661 bei heterologer Expression zu einem dramatischen Aktivitätsverlust des Enzyms *FAD2*-I führt, wobei die Restaktivität unter 10 % im Vergleich zum unveränderten Enzym liegt. Bei der Mutation scheint es sich somit um den HO1-Locus zu handeln, der für den HO-Phänotyp der Wotan-Mutante 19661 verantwortlich ist, wenngleich zusätzliche Mutationen im Promotorbereich nicht ausgeschlossen werden können.

Tab. 3.3: Fettsäure-Zusammensetzung transgener *S. cerevisiae* INVSc1-Zellen, die den Vektor pYES2 oder die Expressionskonstrukte pYES2-*FAD2*-I, pYES2-*FAD2*-II, pYES2-19661*FAD2*-I bzw. pYES2-19661*FAD2*-II tragen. Die FAMES der Gesamtlipide wurden über GLC analysiert.

Konstrukt	Fettsäure-Zusammensetzung (%)					
	16:0	16:1 ^{Δ9}	16:2 ^{Δ9,12}	18:0	18:1 ^{Δ9}	18:2 ^{Δ9,12}
pYES2	22,4	37,3	-	8,9	31,3	-
pYES2- <i>FAD2</i> -I	20,6	21,0	14,1	10,7	9,5	24,1
pYES2- <i>FAD2</i> -II	20,5	22,4	13,0	9,9	10,7	23,5
pYES2-19661 <i>FAD2</i> -I	20,3	41,2	-	7,3	29,3	1,8
pYES2-19661 <i>FAD2</i> -II	20,6	20,0	15,2	10,3	8,9	24,9

Um Hinweise zu erhalten, auf welche Weise der Austausch G200R den Aktivitätsverlust der Desaturase *FAD2*-I verursachen könnte, sollte die Position des konservierten Glycin-Rests innerhalb des Membranproteins bestimmt werden. Von der Aminosäure-Sequenz wurden nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982) ein Hydrophathie-Plot abgeleitet und zusätzlich mit dem Programm TMHMM mögliche transmembrane Helices berechnet (Abb. 3.9). Im Hydrophathie-Plot zeigen sich zwei längere hydrophobe Bereiche von je ca. 45-50 Aminosäuren sowie – dazwischenliegend – zwei kürzere hydrophobe Regionen, während N- und C-Terminus im hydrophilen Bereich lokalisiert sind. Modellvorstellungen zur Topologie der membrangebundenen Desaturasen gehen davon aus, dass die für den katalytischen Mechanismus essentiellen drei Histidin-Boxen zusammen mit dem N- und C-Terminus des Proteins zur cytoplasmatischen Seite der ER-Membran lokalisiert sind. Das Programm TMHMM berechnet für die *FAD2*-I vier transmembrane Helices, deren Orientierung eine Ausrichtung der Histidin-Boxen zur cytoplasmatischen Seite erlauben. Das entsprechende Proteinmodell ist in Abb. 3.10 A schematisch dargestellt. Nach dieser Darstellung würde sich der konservierte Glycin-Rest stromabwärts der dritten Transmembranhelix auf der luminalen Seite der ER-Membran befinden. Der durch die Mutation eingefügte Arginin-Rest wäre in diesem Fall vermutlich für eine Beeinflussung der Faltung und/oder der Insertion des Proteins verantwortlich.

Für die Position G200R gibt es allerdings eine zweite Möglichkeit, da die Bewertung der dritten transmembranen Region durch das Programm TMHMM nicht den vorgeschlagenen Modellen entspricht. Das Hydrophathie-Profil ähnelt dem für das *FAD2*-Protein aus *Arabidopsis* (Okuley *et al.*, 1994). Auch hier liegen zwei lange Bereiche (> 45 Aminosäuren) hydrophober Reste zusammen mit zwei kürzeren hydrophoben Sequenzen im mittleren Bereich des Proteins vor. Shanklin *et al.* (1994) schlugen ein Modell vor, in dem die langen hydrophoben Sequenzen jeweils zwei membrandurchspannende helikale Segmente bilden. Durch die zusätzlichen hydrophoben Bereiche im

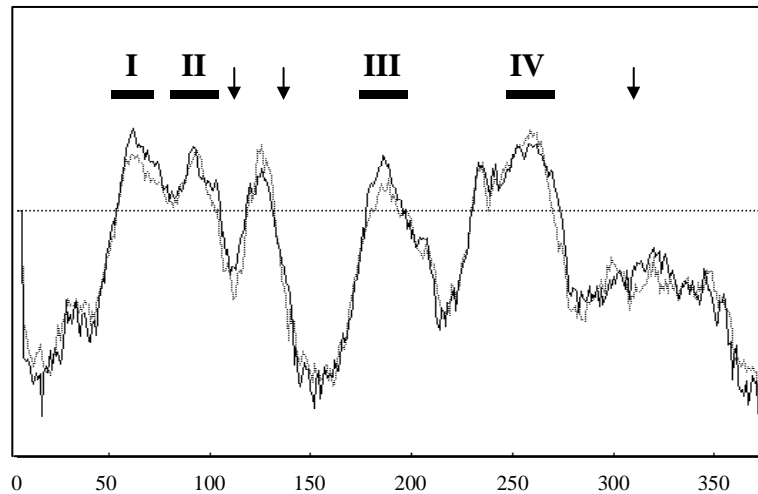


Abb. 3.9: Hydropathie-Profil der FAD2 aus *B. napus* nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982). Die römischen Zahlen kennzeichnen Bereiche, die mit dem Programm TMHMM als transmembrane Helices identifiziert wurden. Die Lage der Histidin-Boxen ist durch Pfeile markiert.

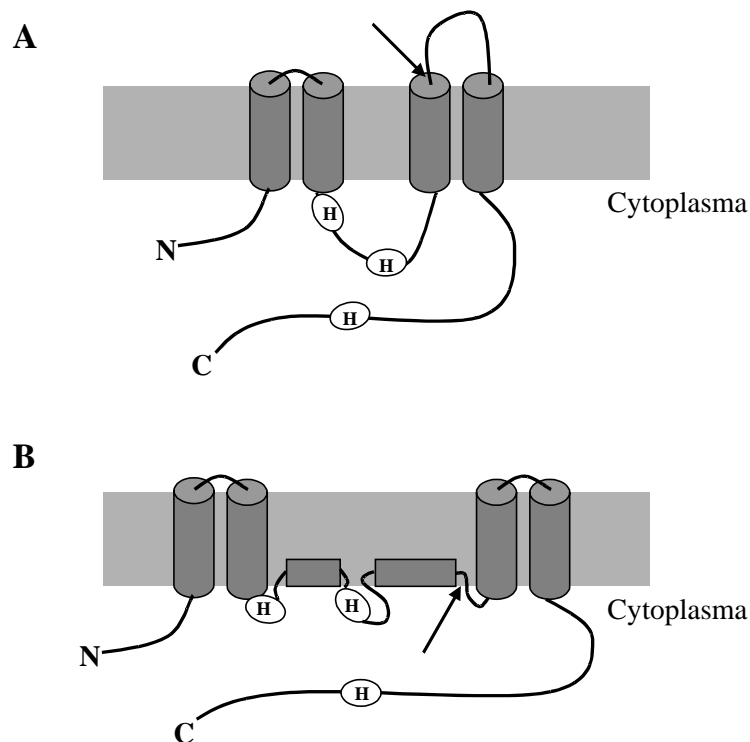


Abb. 3.10: Alternative Modelle zur Topologie der FAD2 aus *B. napus*. Der Pfeile markieren jeweils die mögliche Lokalisierung des konservierten Glycin-Rests an Position 200, der in der HO-Mutante 19661 gegen ein Arginin ausgetauscht ist. H: Histidin-Box. **A** Modell nach Berechnung der Transmembran-Helices mit dem Programm TMHMM, **B** Modell nach Okuley *et al.* (1994), Los und Murata (1998).

Hydrophathie-Profil der FAD2 und anderer membrangebundener Desaturasen liegen sechs potentielle Transmembran-Regionen vor. Die Akzeptanz aller membrandurchspannenden Helices würde es allerdings nicht erlauben, dass alle konservierten Histidin-Reste auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert sind. Daher wurde vorgeschlagen, dass die zusätzlichen hydrophoben Regionen Kandidaten für nicht-durchspannende Segmente darstellen und in anderen Aspekten der Struktur-Determination oder Interaktion mit den Substrat-Membranlipiden involviert sind (Okuley *et al.*, 1994). Ausgehend von dieser Modellvorstellung wäre es möglich, dass der vierte hydrophobe Bereich der FAD2 aus *B. napus* nicht – wie mit dem Programm TMHMM berechnet – eine Transmembran-Helix darstellt, sondern ein im cytoplasmatischen Leaflet lokalisiertes Segment. Für die Position des Aminosäure-Austauschs G200R würde dies eine Lokalisierung auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran bedeuten, wo eine Beteiligung an der Stabilisierung und/oder Funktionsweise des katalytischen Zentrums nicht ausgeschlossen wäre (Abb. 3.10 B). Somit bestehen zwei alternative Möglichkeiten für die Positionierung des konservierten Glycinrests. Nach den Sequenz-Analysen befindet er sich vermutlich außerhalb der Transmembran-Helices in einer hydrophilen Schleife, deren Ausrichtung allerdings unklar bleibt. Eine Verifizierung der vorgeschlagen Modelle zur Membranprotein-Topologie der FAD2 könnte durch Markierungsexperimente z.B. durch Insertion von Glycosylierungsstellen, Antikörper-Epitopen oder Proteolysestellen erfolgen sowie alternativ durch Fusionen mit Reporter-Molekülen.

Durch heterologe Expression der mutierten Genkopie *FAD2-I* aus Wotan 19661 wurde gezeigt, dass das Genprodukt eine stark verringerte Aktivität aufweist. Mit der Punktmutation ist anscheinend der Locus identifiziert, der für den HO-Phänotyp der Mutante verantwortlich gemacht wird (Schierholt *et al.*, 2000b). Diese Lokalisierung erlaubt die Entwicklung eines vollständig gekoppelten PCR-Markers, der eine Verfolgung der Mutation in Selektionsprogrammen erlaubt. Der Vorteil gegenüber der phänotypischen Selektion liegt in der Stabilität des Markers, da keine Beeinflussung durch Umwelteffekte auftritt. Da in diesem Fall durch die Punktmutation zufällig eine weitere *XhoI*-Restriktionsschnittstelle entstanden ist, eröffnet sich zusätzlich eine einfache Möglichkeit zur Identifizierung der Mutation. Aus Amplifikation der mutierten Genkopie mit den spezifischen Primern und anschließender Restriktion der PCR-Produkte resultieren statt eines 720 bp-Fragments bei Wildtyp-Genkopien Fragmente der Größe 580 bp und 140 bp.

Scheffler *et al.* (1997) kartierten das Desaturasegen *FAD2* aus *B. napus* in der genetischen Karte von Parkin *et al.* (1995). Von den vier im Genom des allotetraploiden *B. napus* lokalisierten Kopien befanden sich jeweils zwei auf Kopplungsgruppen, die von *B. rapa* (A-Genom) bzw. von *B. oleracea* (C-Genom) stammen. Eine der Genkopien wurde am Ende der von *B. rapa* stammenden Kopplungsgruppe N5 positioniert. Sie wird als funktionale *FAD2*-Kopie angesehen, da Schierholt *et al.* (2000b) in dieser Region einen mit dem HO1-Locus gekoppelten AFLP-Marker lokalisierten. Die Sequenzanalysen der vermutlich zum HO1-Locus analogen Genkopie *FAD2-I* hatten eine höhere

Homologie zu *FAD2*-Sequenzen aus *B. rapa* gezeigt als zu denen aus *B. oleracea* (s. 3.1) und sprechen so ebenfalls für eine Zuordnung des HO1-Locus zum *B. rapa*-Genom.

In den Samen der Mutante 19661 ist mit einem Ölsäuregehalt von 77 % noch nicht der maximal erreichbare Wert erreicht, der im Feldanbau bei etwa 87 % liegt (DeBonte und Hitz, 2000). Demnach wäre die Existenz einer weiteren funktionalen – evtl. durch die Genkopie *FAD2-II* kodierten – Desaturase vorstellbar, wenngleich alle von Schierholt *et al.* (2001) untersuchten Mutanten eine Mutation in dem gleichen HO1-Locus aufwiesen. Dieses könnte nach Ansicht der Autoren allerdings durch die Existenz von „hot spots“ zu erklären sein, die mutationsanfällige Regionen darstellen. Analysen anderer HO-Mutanten von *B. napus* weisen darauf hin, dass die volle Kapazität von zwei *FAD2*-Genen zur Produktion von Wildtyp-PUFA-Gehalten im Samenöl erforderlich ist (Kodali *et al.*, 2002), während die Kapazität einer einzelnen Genkopie dagegen anscheinend zur Gewährleistung der Desaturierung in vegetativem Gewebe ausreicht. Es wird angenommen, dass maximale Ölsäuregehalte im Samenöl nur durch eine samenspezifische Suppression beider Gene erreicht werden können (Kinney *et al.*, 2002). Durch traditionelle oder Mutations-Züchtung können vergleichbare 18:1-Gehalte nicht ohne agronomische Beeinträchtigungen erreicht werden. So zeigen Mutanten, bei denen beide *FAD2*-Gene defekt sind, im Vergleich zum Wildtyp einen 10mal höheren 18:1-Gehalt in Wurzelgewebe und ein schwaches Wachstum (Kodali *et al.*, 2002).

3.3 Entwicklung transgener Hoch-Ölsäure-Rapspflanzen

Hoch-Ölsäure(HO)-Rapsöl ist sowohl für den Nahrungsmittel- als auch für den Non-Food-Bereich von Interesse. Durch Mutagenese gelang es bereits, den Ölsäuregehalt in Rapssamen zu erhöhen (Auld *et al.*, 1992), die Entwicklung kommerzieller Sorten scheiterte allerdings an unzureichenden agronomischen Eigenschaften. Diese liegen begründet in ungerichteten, multiplen Mutationen und in der Beeinträchtigung der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2 im Hinblick auf ihre Beteiligung an der Membranlipid-Biosynthese. So wurden in HO-Canola-Linien in PC und DGD aus Blattgewebe signifikant höhere 18:1-Gehalte ermittelt (Hazebroek, 2000). Zur Minimierung von nachteiligen Effekten auf agronomische Charakteristika von Rapspflanzen ist für eine Hemmung von Oleatdesaturasen der gentechnische Ansatz mit Verwendung von samenspezifischen Promotoren von Vorteil. Mittels Cosuppression konnten HO-Formen von Raps entwickelt werden (DeBonte und Hitz, 2000; Stoutjesdijk *et al.*, 2000), deren Samen Ölsäuregehalte von bis zu 89 % aufwiesen. Bezüglich der Restgehalte an 18:2 und 18:3 wird vermutet, dass die plastidären Desaturasen – in Verbindung mit einem Lipid-Austausch zwischen den Kompartimenten – kompensatorisch wirken können. Aus diesem Grund ist eine simultane samenspezifische Hemmung beider Oleatdesaturasen, FAD2 und FAD6, ein sinnvoller Ansatz zur Optimierung des Ölsäuregehalts in Rapssamen. In der vorliegenden Arbeit wurde zur sequenzspezifischen Hemmung der Oleatdesaturasen die Hairpin-Technik gewählt, die ebenso wie die Antisense- und Cosuppressions-Methodik durch Auslösung von PTGS wirkt. Der Vorteil des RNA-Silencings durch Verwendung von Hairpin-Konstrukten liegt im Vergleich zu herkömmlichen Antisense-Techniken in einer weitaus besseren Effizienz bezüglich des Anteils an transgenen Pflanzen mit gewünschtem Phänotyp (Smith *et al.*, 2000).

Um Hairpin-Konstrukte zur sequenzspezifischen Hemmung herstellen zu können, mussten zunächst die in Frage kommenden Zielgene aus *B. napus* kloniert werden (s. 2.11.1; 2.11.3). Die funktionalen Genkopien *FAD2-I* und *FAD2-II* der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2 wurden durch Screening einer cDNA-Bank aus reifenden Schoten identifiziert (s. 3.1). Da sie zu 97 % identisch sind, konnten durch Auswahl von Fragmenten mit identischer Nukleotidsequenz Hairpin-Konstrukte hergestellt werden, die gleichzeitig beide Gene erfassen. DNA-Sequenzen der plastidären Oleatdesaturase FAD6 wurden mit Hilfe von spezifischen Primern über PCR aus der o.g. cDNA-Bank isoliert. Außerdem konnte durch PCR eine genomische *FAD6*-Sequenz aus *B. napus* amplifiziert werden. Diese weist im Vergleich zur cDNA neun Introns auf, von denen das zweite zur Herstellung der Intron-haltigen Hairpin-Kassetten eingesetzt wurde.

Zur Steigerung des Ölsäuregehalts in Rapssamen wurden insgesamt zwölf Konstrukte für die Transformation von Raps hergestellt (Klonierungsschritte s. 2.11.3; schematische Darstellung der Charakteristika s. Abb. 3.11). Für Hairpin-Kassetten wurden Fragmente der Zielgene als Inverted-Repeats kloniert, die entweder einen Spacer oder ein Intron enthalten. Durch Transkription der

Variante mit Spacer (sHP) entsteht nach Zusammenlagerung der komplementären Bereiche eine Hairpin-RNA (hpRNA) mit einer Schleife. Aus Inverted-Repeats mit Intron (iHP) dagegen resultiert nach Spleißen eine hpRNA mit einer sehr kurzen Schleife, die durch nicht-komplementäre Sequenzen von – für die Klonierung angefügten - Restriktionsschnittstellen entsteht. Aus 300 bp-Fragmenten der *FAD2* wurden eine sHP- und eine iHP-Kassette erstellt, die jeweils stromabwärts von vier verschiedenen, samenspezifischen Promotoren (Napin, USP, LeB4 und Dc3) kloniert wurden. Durch Insertion in den binären Vektor pRE1 entstanden so acht Konstrukte zur Hemmung der mikrosomalen Oleatdesaturase *FAD2* (Abb. 3.11 A, B). Zur simultanen Hemmung der mikrosomalen und der plastidären Oleatdesaturase wurden vier Doppelkonstrukte hergestellt: sie enthalten zwei durch einen Spacer verbundene iHP-Kassetten aus *FAD2*- bzw. *FAD6*-Fragmenten, die hinter einen gemeinsamen Promotor kloniert wurden (Abb. 3.11 C). Als hpRNA resultieren daraus zwei RNA-Duplices, die durch ssRNA verbunden sind.

Die hergestellten Konstrukte und der Ausgangsvektor wurden in *A. tumefaciens*-Stämme transferiert, die dann für die Transformation von Raps zur Verfügung standen.

3.3.1 Hemmung der mikrosomalen Oleatdesaturase *FAD2* in reifenden Rapssamen

Im Rahmen des Verbundprojekts „Entwicklung und anwendungstechnische Evaluierung neuartiger Rapsöle“ erfolgte ausgehend von acht Konstrukt-Varianten zur Hemmung der mikrosomalen Oleatdesaturase *FAD2* (Abb. 3.11 A, B) die Herstellung und Analyse transgener Rapspflanzen. Vier Konstrukte (pRD*fad2*irA, pRN*fad2*irA, pRU*fad2*irA, pRL*fad2*irA) enthalten jeweils eine sHP-Kassette in Kombination mit dem Dc3-, Napin-, USP- bzw. LeB4-Promotor. Die anderen vier Konstrukte (pRD*fad2*irB, pRN*fad2*irB, pRU*fad2*irB, pRL*fad2*irB) besitzen mit einer iHP-Kassette die alternative Hairpin-Variante mit Intron. Die Transformation von Raps wurde freundlicherweise von Frau Dr. K. Sonntag, BAZ Groß Lüsewitz, nach einem modifizierten Protokoll von DeBlock *et al.* (1989) durchgeführt, transgene T1-Pflanzen wurden der Norddeutschen Pflanzenzucht (NPZ), Hohenlieth, zur Aufzucht übergeben. Die GLC-Analysen von Ramschproben der T2-Samen erfolgten am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität Gießen, und wurden von Herrn K. Zarhloul durchgeführt. Von Samen ausgewählter Primärtransformanten, die einen HO-Phänotyp von > 80 % Ölsäure zeigten, wurden bei der NPZ GLC-Halbkornanalysen erstellt. Anschließend erfolgte die Selektion von T2-Pflanzen mit einem Ölsäure-Gehalt von > 84 % sowie deren weitere Kultivierung. Die Lipidanalysen der transgenen Rapspflanzen, die im Rahmen des Verbundprojekts hergestellt worden waren, sind in den Kapiteln 3.3.1.1 bis 3.3.1.4 dargestellt. Für zusätzliche Analysen wurde eine Transformation von Raps mit den Konstrukten pRN*fad2*irB bzw. pRU*fad2*irB durchgeführt (Kap. 3.3.1.5).

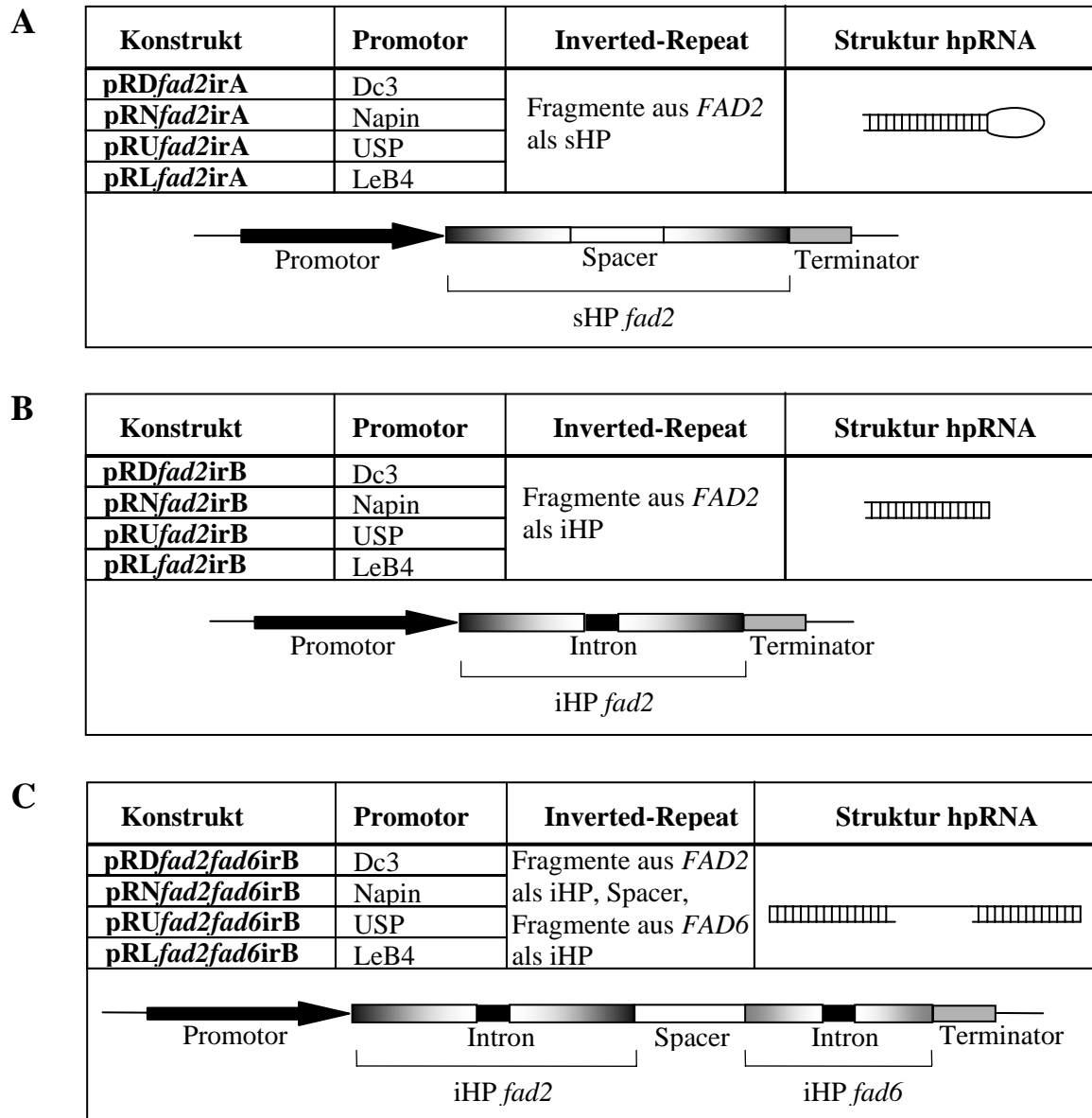


Abb. 3.11: Schematische Darstellung von Silencing-Konstrukten zur Erhöhung des Ölsäuregehalts in Rapssamen. Als Vektoranteil wurde für alle aufgeführten Konstrukte der binäre Vektor pRE1 verwendet (s. Anhang). **A, B** Konstrukte zur Hemmung der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2, **C** Doppelkonstrukte zur simultanen Hemmung der mikrosomalen und der plastidären Oleatdesaturasen FAD2 und FAD6.

3.3.1.1 Effizienz der Silencing-Konstrukte

Aus den Transformationen von *B. napus* var. Drakkar mit acht verschiedenen Konstrukten zur Hemmung der FAD2 sind insgesamt 246 Primärtransformanten hervorgegangen. Die T1-Pflanzen wurden geselbstet und deren T2-Samen zunächst in Ramschanalysen (2 x 10 Samen) auf ihre Fettsäure-Zusammensetzung hin untersucht. Für 191 Primärtransformanten liegen Ergebnisse vor. Die für Samen von Pflanzen mit gleichem Konstrukt ermittelten durchschnittlichen Ölsäuregehalte und deren Variationsbreite sind in Tab. 3.4 als Übersicht zusammengefasst. Als Vergleich dienten Samen von Wildtyp-Pflanzen, die unter ähnlichen Gewächshaus-Bedingungen kultiviert worden waren, und Samen von wenigen nicht-transformierten, regenerierten Wildtyp-Pflanzen (Regenerate). Die Analysen der Wildtyp-Samen zeigen eine Schwankungsbreite des Ölsäuregehalts von ca. 62-77 % bei einem durchschnittlichen Gehalt von etwa 71 %. Für Pflanzen mit sHP-Konstrukten wurden z.T. erhöhte durchschnittliche Ölsäuregehalte bis ca. 75 % und maximale Werte von ca. 82 % ermittelt. Deutlich erhöhte Mittelwerte bis ca. 80 % und Maximalwerte bis ca. 85 % weisen die Pflanzen mit iHP-Konstrukten auf. Die Daten zeigen, dass mit Ausnahme von pDfad2irA alle Konstrukte eine Steigerung des Ölsäuregehalts durch Hemmung der FAD2 induzieren können.

Tab. 3.4: Variationsbreite der Ölsäuregehalte und ODP-Werte in Samen (Ramschanalyse) von *B. napus* var. Drakkar (Wildtyp bzw. nicht-transformierte, regenerierte Pflanzen) und unabhängigen Primärtransformanten mit Konstrukten zur Hemmung der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2. ODP (*oleic acid desaturation proportion*): (% 18:2 + % 18:3)/(% 18:1 + % 18:2 + % 18:3).

Konstrukt	Hairpin/ Promotor	Anzahl T1-Pfl.	C18:1 (%)			ODP		
			Min	MW	Max	Min	MW	Max
Wildtyp		26	61,6	70,5	76,8	0,15	0,22	0,32
Regenerate		8	66,1	71,7	76,7	0,16	0,21	0,27
pRNfad2irA	sHP/Napin	25	65,1	75,4	82,4	0,07	0,17	0,29
pRUfad2irA	sHP/USP	26	64,9	71,2	80,0	0,12	0,22	0,29
pRLfad2irA	sHP/LeB4	28	65,0	73,2	80,9	0,10	0,19	0,29
pRDFad2irA	sHP/Dc3	27	58,1	71,7	76,4	0,16	0,21	0,35
pRNfad2irB	iHP/Napin	10	68,8	77,8	84,6	0,07	0,14	0,24
pRUfad2irB	iHP/USP	49	69,2	77,0	85,3	0,06	0,15	0,24
pRLfad2irB	iHP/LeB4	26	68,7	79,7	85,3	0,07	0,12	0,24

Eine geeignete Methode zur Bewertung der FAD2-Aktivität und Abschätzung des Silencing-Effekts bietet die Berechnung des ODP-Werts (*oleic acid desaturation proportion*), der das Verhältnis der 18:1-Desaturierungsprodukte zum Gehalt an verfügbarem 18:1-Substrat darstellt ($\% 18:2 + \% 18:3$) / ($\% 18:1 + \% 18:2 + \% 18:3$). Dieser Parameter ist somit ein Maß für die Restgehalte an 18:2 und 18:3. Die Wildtyp-Samen haben einen ODP-Wert von ca. 0,22, d.h. 22 % der produzierten Ölsäure wird desaturiert zu 18:2 und 18:3. Im Vergleich dazu weisen minimale ODP-Werte von 0,06 bei einigen Primärtransformanten auf eine deutliche Reduktion der Oleatdesaturierung hin (Tab. 3.4).

Der Ölsäure- bzw. ODP-Mittelwert aus Ramschanalysen von T1-Pflanzen eines Konstrukts ist abhängig vom Anteil an transgenen Pflanzen mit HO-Phänotyp und damit von der Konstrukt-Effizienz. Diese wird u.a. bestimmt durch Art der verwendeten Hairpin-Variante. So weisen die Samen von Pflanzen mit iHP-Konstrukten niedrigere ODP-Mittelwerte auf als die mit den entsprechenden sHP-Konstrukten, z.B. zeigen die ODP-Werte der Napin-Konstrukte von 0,14 für iHP bzw. 0,17 für sHP eine deutlich bessere Effizienz für die Hairpin-Variante mit Intron. Zur Veranschaulichung dieses Effekts wurde für jedes Konstrukt eine Häufigkeitsverteilung der ODP-Werte von Ramschanalysen der T1-Pflanzen erstellt (Abb. 3.12). Die als Vergleichs-Pflanzen analysierten Drakkar-Wildtypen und Regenerate (Abb. 3.12 A) weisen mit ODP-Werten von 0,15-0,32 eine breite natürliche Variabilität auf. Für das sHP-Konstrukt mit Napin-Promotor wurden ODP-Werte zwischen 0,07 und 0,29 ermittelt, die entsprechende iHP-Variante weist mit einem Bereich von 0,07-0,24 geringere Anteile an Wildtyp-Phänotypen auf (Abb. 3.12 B). Die Konstrukte mit USP- und LeB4-Promotor zeigen ODP-Verteilungen von ca. 0,10-0,29 für die sHPs und etwa 0,06-0,24 für die iHPs (Abb. 3.12 C, D). Insgesamt ist bei diesen Häufigkeitsverteilungen der ODP-Werte die Tendenz erkennbar, dass die jeweiligen sHP-Varianten der Konstrukte mit Napin-, USP- und LeB4-Promotor hohe Anteile an Wildtyp-Phänotypen aufweisen, während bei den entsprechenden iHP-Varianten eine deutliche Verschiebung zugunsten der Anteile an HO-Phänotypen sichtbar wird.

Das Konstrukt pRD*fad2**irA* (mit sHP und Dc3-Promotor) scheint nach diesen Daten keinen Einfluss auf die FAD2-Aktivität zu haben (Abb. 3.12 E). Obgleich Versuche mit transienter GUS-Expression in Raps-Embryonen darauf hinweisen, dass der Dc3-Promotor ein für Raps geeigneter samenspezifischer Promotor ist (Voss, 2000), wäre es denkbar, dass seine Stärke nicht zur Induktion von PTGS ausreicht. Eine Beurteilung ist allerdings erst nach Vorlage der Daten für das entsprechende effizientere Konstrukt mit iHP möglich.

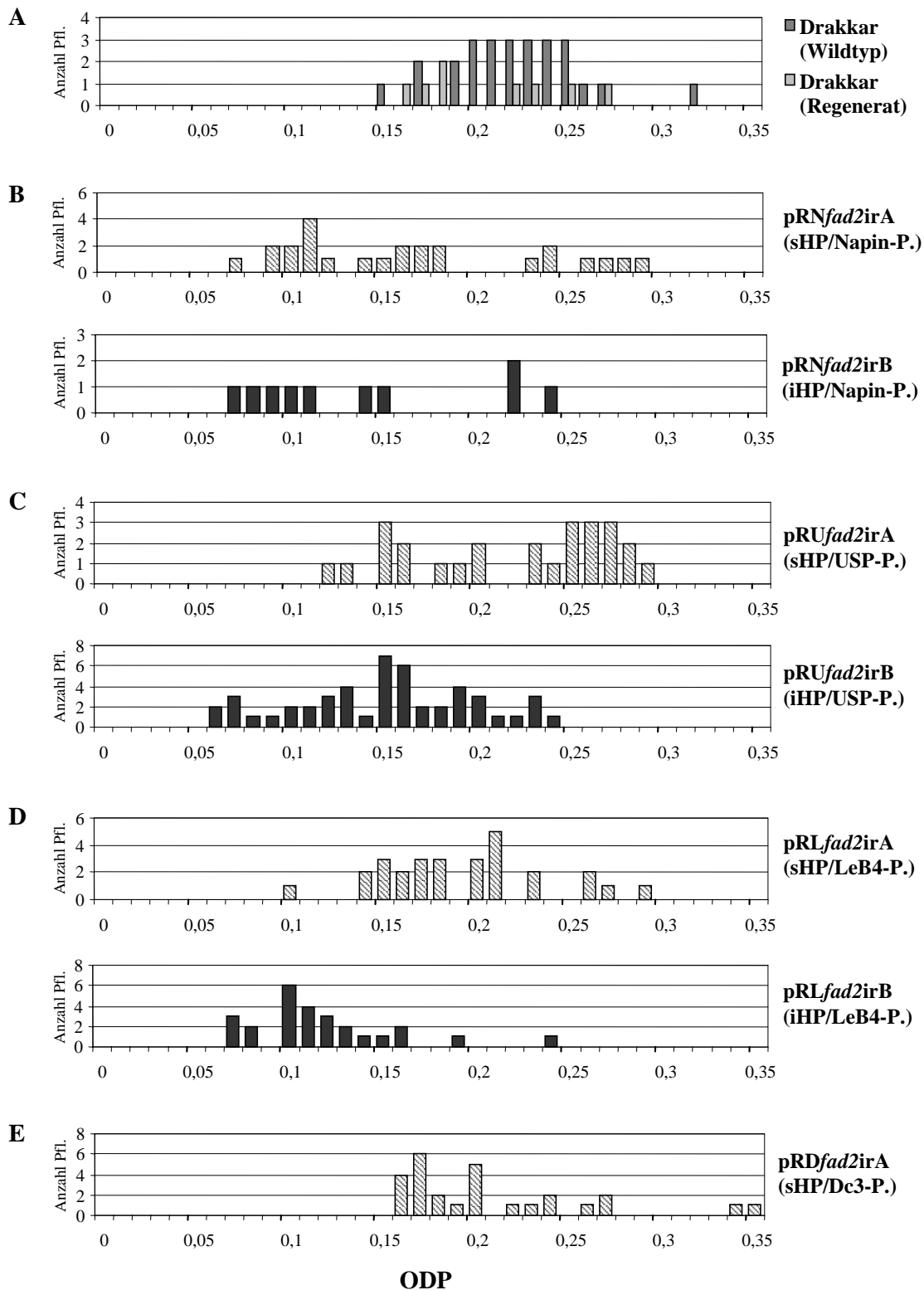


Abb. 3.12: Häufigkeitsverteilung (Anzahl an Pflanzen) der ODP-Werte in Samen (Ramschanalyse) von *B. napus* var. Drakkar Wildtyp bzw. nicht-transformierten, regenerierten Pflanzen (A) und unabhängigen Primärtransformanten mit Konstrukten zur Hemmung der FAD2 (B-E). Die Konstrukte enthalten IR-Sequenzen aus *FAD2* als Hairpin mit Spacer (▨ sHP) oder mit Intron (■ iHP) unter Kontrolle des Napin- (B), USP- (C), LeB4- (D) oder Dc3-Promotors (E).

Eine genaue Unterteilung der transgenen Pflanzen in HO- und Wildtyp-Formen kann anhand dieser zusammenfassenden Darstellung nicht vorgenommen werden, da die Einflüsse der Kultivierungsbedingungen hier keinen Niederschlag finden. Insbesondere die Temperatur-Bedingungen während der Samenreife stellen einen wichtigen Faktor für die Beeinflussung der 18:1-Desaturierung dar, da niedrige Temperaturen eine Erhöhung des Desaturierungsgrades im Rapssamen bewirken (Diepenbrock, 1984; Pleines und Friedt, 1989). Um dennoch Aussagen zur Effizienz der Konstrukte machen zu können, wurden differenziert für jede Anzuchtserie unter Berücksichtigung der jeweiligen Kontroll-Pflanzen die HO-Phänotypen bestimmt und die Anteile für die verschiedenen Konstrukte ermittelt (Tab. 3.5). Die höchste Effizienz zeigen mit 70 bzw. 77 % die iHP-Konstrukte mit Napin- bzw. LeB4-Promotor. Erwartungsgemäß weniger HO-Phänotypen produzieren die entsprechenden sHP-Varianten mit 56 bzw. 39 %. Eine insgesamt schlechtere Effizienz weisen die beiden USP-Konstrukte mit 23 % für sHP und 53% für iHP auf.

Tab. 3.5: Effizienz von Hairpin-Konstrukten bezüglich der Anteile an transgenen Pflanzen mit HO-Phänotyp.

Konstrukt	Hairpin/Promotor	T1-Pflanzen	HO-Phänotypen	Effizienz (%)
pRN <i>fad2irA</i>	sHP/Napin	25	14	56
pRU <i>fad2irA</i>	sHP/USP	26	6	23
pRL <i>fad2irA</i>	sHP/LeB4	28	11	39
pRD <i>fad2irA</i>	sHP/Dc3	27	0	0
pRN <i>fad2irB</i>	iHP/Napin	10	7	70
pRU <i>fad2irB</i>	iHP/USP	49	26	53
pRL <i>fad2irB</i>	iHP/LeB4	26	20	77

Wesley *et al.* (2001) stellten eine Zusammenfassung von Untersuchungen zur Effizienz von iHP-, sHP-, Sense- und Antisense-Konstrukten vor, die an einer Reihe von Gen/Wirt-Kombinationen durchgeführt wurden: z.B. Hemmung von $\Delta 9$ und $\Delta 12$ -Desaturasen in *Arabidopsis* und/oder *G. hirsutum*, einem GUS-Gen in Tabak oder der Chalkonsynthese in *Arabidopsis*. Dabei wurde Silencing als eine um wenigstens 20 % reduzierte Genaktivität definiert. Während konventionelle Cosuppressions- und Antisense-Konstrukte nur eine Effizienz von 0-30 % (durchschnittlich 13 bzw. 12 %) zeigten, lösten sHP-Konstrukte in 48-69 % (durchschnittlich 58 %) der Pflanzen den Silencing-Phänotyp aus. Am effizientesten aber waren die iHP-Konstrukte, die 66-100 % (durchschnittlich 90 %) unabhängige Transformanten produzierten. Die in dieser Arbeit eingesetzten Napin- und LeB4-Konstrukte zum Silencing der FAD2 weisen somit vergleichbare Effizienzen auf, während die Konstrukte mit USP-Promotor eine weniger optimale Effizienz zeigen.

Der signifikant höhere Anteil an Transformanten mit Silencing durch iHP im Vergleich zu sHP kann dadurch erklärt werden, dass die iHP-Konstrukte höhere Gehalte an dsRNA produzieren, welche dann wiederum effizienter PTGS in Pflanzen induzieren (Waterhouse *et al.*, 2001). Bei Insertion in schwach transkribierten Regionen wären so iHPs im Unterschied zu sHPs in der Lage, Silencing zu aktivieren. Eine Reihe von Attributen könnte die iHP-Konstrukte befähigen, mehr dsRNAs zu produzieren: 1) iHPs besitzen nur eine kurze Schleife, die für den Angriff von Nukleasen weniger anfällig ist; 2) bei iHPs werden die komplementären Arme durch das Spleißosom zusammengelagert, bei sHPs erfolgt eine weniger effiziente zufällige Hybridisierung; 3) die bloße Anwesenheit des Introns könnte erhöhte und stabilisiertere Transkript-Gehalte bewirken (Callis *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1990). Momentan wird die dritte Erklärung bevorzugt, da Wesley *et al.* (2001) Hinweise liefern, die gegen die beiden ersten Aussagen sprechen. Sie testeten ein Konstrukt, das sowohl einen Spacer als auch ein Intron enthält und somit eine hpRNA mit Schleife produziert, wobei der Spacer die Hybridisierung durch das Spleißosom behindern sollte. Da dieses Konstrukt aber mit 89 % eine ähnliche Effizienz zeigte wie iHPs, wurde gefolgert, dass weder die Stabilität durch die kurze Schleife noch die unterstützende Funktion des Spleißosoms für die höhere Effizienz der iHPs verantwortlich sind.

Zwischen den verschiedenen Anzuchtserien der transgenen HO-Pflanzen war eine Variabilität in der Oleatdesaturierung zu beobachten, die vermutlich auf Umwelteinflüsse zurückzuführen ist. Unter den Umweltfaktoren, die den Lipid-Metabolismus in Pflanzen beeinflussen (Harwood, 1998), spielt die Temperatur eine besondere Rolle für die Desaturierung. Generell korrelieren niedrige Temperaturen während des Wachstums mit einem erhöhten Desaturierungsgrad in Membranlipiden, wodurch vermutlich die Erhaltung der Membran-Fluidität gewährleistet werden soll. Desweiteren beeinflusst die Wachstums-Temperatur die relativen 18:1- und 18:2-Gehalte in Speicherlipiden. Die Regulierung der Oleatdesaturierung in reifenden Achänen durch Temperatur und Sauerstoff wurde für *H. annuus* näher untersucht (García-Díaz *et al.*, 2002). Anscheinend unterliegt sowohl die Menge an verfügbarem Oleat als auch die Aktivität der Desaturase FAD2 einer Temperatur-Abhängigkeit. Die Enzymaktivität scheint außerdem durch die Verfügbarkeit von Sauerstoff reguliert zu werden. Eine Limitierung des Sauerstoffs entsteht dabei vermutlich durch begrenzte Aufnahme sowie Konkurrenz von Desaturierung und Atmung, wobei diese Faktoren wiederum durch die Temperatur beeinflusst werden. Ob die Schwankungen der Oleatdesaturierung in den Samen der transgenen Rapspflanzen tatsächlich auf die Wachstums-Temperatur zurückzuführen sind, ist in dieser Arbeit nicht näher untersucht worden und kann demnach nur vermutet werden.

3.3.1.2 Ausprägung des HO-Phänotyps

Die Ramschanalyse der T2-Samen einer Primärtransformante liefert lediglich einen Durchschnittswert für die Population der spaltenden Genotypen, bei denen sowohl unterschiedliche Ausprägungen des HO-Phänotyps als auch Wildtyp-Formen auftreten. Zur Beurteilung des Aufspaltungsmusters erfolgten Halbkornanalysen von jeweils 20 T2-Samen ausgesuchter, geselbsteter T1-Pflanzen.

Unter den 191 durch Ramschanalyse untersuchten T1-Primärtransformanten wurden 40 Pflanzen ermittelt, deren Samen einen Ölsäuregehalt von mindestens 80 % aufwiesen. Von 21 dieser Pflanzen liegen die Ergebnisse der Halbkornanalysen vor. Die Häufigkeitsverteilungen der ODP-Werte von Samen zeigen für die einzelnen T1-Pflanzen verschiedene Muster, von denen typische Beispiele in Abb. 3.13 dargestellt sind. Die ODP-Verteilung von Wildtyp-Samen (Abb. 3.13 A) weist einen Bereich von 0,16-0,27 auf, der einer Zuordnung von Wildtyp-Phänotypen unter den Samen der transgenen Pflanzen dienen soll. Im Vergleich dazu zeigen die Aufspaltungsmuster von Samen der T1-Pflanzen 2110.24a und 2111.179a (Abb. 3.13 B, C) z.T. sehr niedrige ODP-Werte (0,05-0,07) und damit einen hohen Silencing-Grad in den Samen mit HO-Phänotyp. Das Auftreten der niedrigen ODP-Werte in 12 bzw. 20 von 20 untersuchten Halbkörnern lässt eine dominante Vererbung des Merkmals vermuten. Die Anteile an HO- und Wildtyp-Phänotypen der T1-Pflanzen 2110.24a (Abb. 3.13 B) deuten ein 3:1-Verhältnis an, welches für eine Ein-Locus-Vererbung spricht. Die fehlenden Wildtyp-Phänotypen bei der T1-Pflanze 2111.179a (Abb. 3.13 C) lassen dagegen das Vorhandensein von mehreren unabhängigen Kopien des Transgens vermuten, wobei die Anzahl von 20 untersuchten Halbkörnern anscheinend zu gering war, um die Null-Genotypen zu entdecken. Beispiele für eine breitere Variabilität im Silencing-Grad liefern die Aufspaltungsmuster der T1-Pflanzen 2112.521a und 2112.181a (Abb. 3.13 D, E), deren ODP-Verteilungen von 0,05-0,15 bzw. 0,05-0,22 auch gemäßigte Silencing-Effekte zeigen. Diese gestreuten ODP-Werte könnten durch ineffiziente oder variable Transkription des Transgens begründet sein. Die ODP-Verteilung der T1-Pflanze 2113.192b (Abb. 3.13 F) weist wie die T1-Pflanze 2110.24a (Abb. 3.13 B) ein angedeutetes 3:1-Verhältnis auf, allerdings liegt der beste ODP-Wert nur bei 0,08 statt bei 0,05, und die Wildtyp-Phänotypen weisen ebenfalls höhere ODP-Werte auf. Eine derartige Verschiebung in Richtung höherer ODP-Werte könnte durch Umwelt-Einflüsse wie z.B. der Temperatur während der Samenreifung bedingt sein.

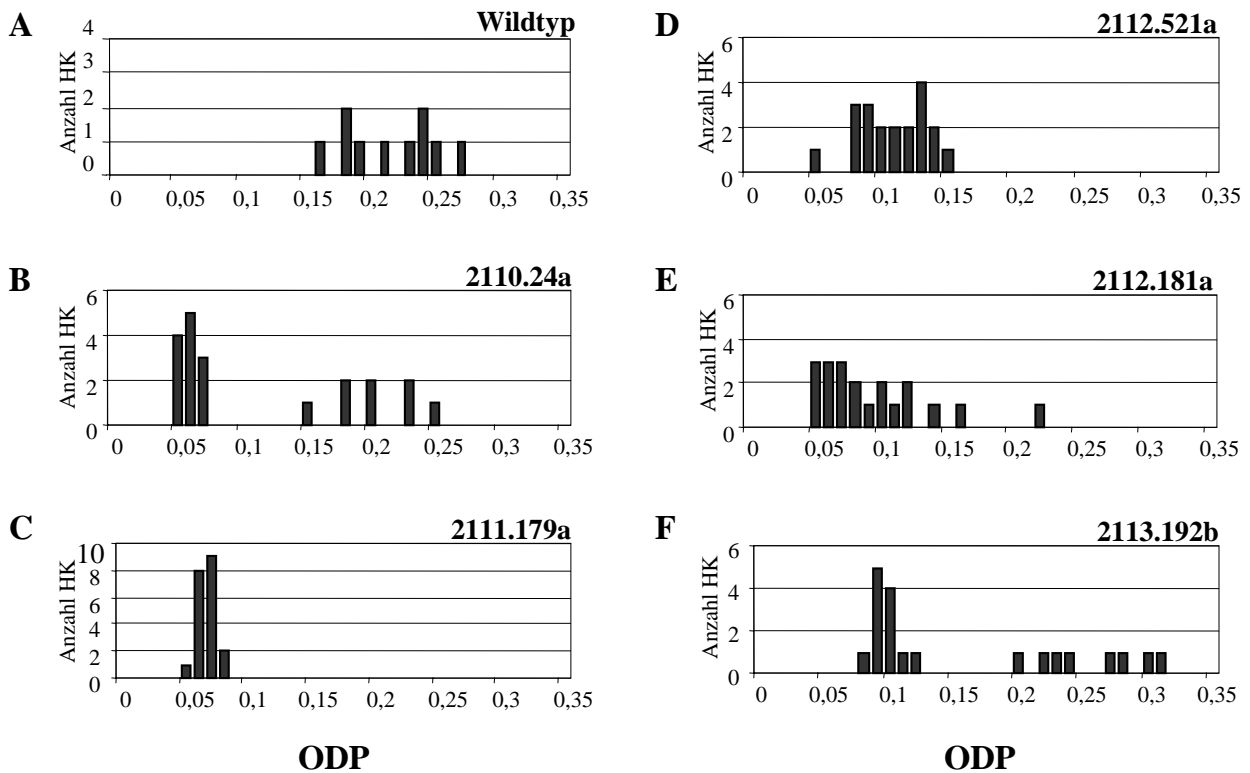


Abb. 3.13: Ausprägung des HO-Phänotyps in Primärtransformanten mit FAD2-Silencing. Dargestellt sind Häufigkeitsverteilungen (Anzahl Halbkörner) der ODP-Werte in Samen (Halbkornanalyse) von *B. napus* var. Drakkar Wildtyp (A) und T2-Samen von unabhängigen Primärtransformanten mit den Konstrukten pRN*fad2*irB (iHP/Napin-Promotor) (B, C) bzw. pRU*fad2*irB (iHP/USP-Promotor) (D-F).

Liu *et al.* (2002) fanden ähnliche Segregations-Muster in T2-Samen transgener HO-Formen von *G. hirsutum*, die Hairpin-Konstrukte gegen das samenspezifisch exprimierte Gen *ghFAD2-1* tragen. Da in den meisten der untersuchten Pflanzen ein hoher Grad an FAD2-Silencing mit einer 3:1-Aufspaltung vorlag, wurde angenommen, dass FAD2-1-Silencing in *G. hirsutum* als dominantes Merkmal vererbt wird. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass eine Kopie des Transgens für eine maximale Hemmung der FAD2 ausreicht. Andere Verhältnisse für FAD2-Silencing wurden in *Arabidopsis* ermittelt. Dort traten 1:2:1-Aufspaltungsmuster auf, bei denen Hemizygoten nicht den hohen Silencing-Grad von Homozygoten erreichten (Stoutjesdijk *et al.*, 2002).

Generell können moderate Silencing-Grade durch Positionseffekte wie z.B. Insertion in schwach transkribierte Regionen entstehen. Interessanterweise treten aber die in Abb. 3.13 gezeigten Typen von Segregations-Mustern in unterschiedlichen Anteilen bei den Pflanzen mit verschiedenen Konstrukten auf. Die Muster in Abb. 3.13 B und C scheinen typisch für Konstrukte mit dem Napin-Promotor, während Aufspaltungsmuster mit etwas breiterer Streuung (Abb. 3.13 D, E) tendentiell häufiger bei Konstrukten mit dem USP-Promotor zu finden sind. Zur Verdeutlichung wurden aus Halbkornanalysen

von mehreren T1-Pflanzen mit den Konstrukten pRN*fad2irB* bzw. pRU*fad2irB* ODP-Häufigkeitsverteilungen erstellt (Abb. 3.14), als Berechnungsgrundlage dienen die ODP-Werte von 100 bzw. 160 Samen, die aus 5 bzw. 8 Primärtransformanten hervorgegangen waren. In den Samen, in denen FAD2-Silencing durch den Napin-Promotor kontrolliert wird, besteht eine eindeutige Tendenz zu maximalem Silencing-Grad, der sich in minimalen ODP-Werten von 0,05-0,07 ausdrückt (Abb. 3.14 B). Dagegen weisen Samen mit USP-Konstrukt eine Variabilität in der Ausprägung des Phänotyps auf, bei der neben ODP-Minimalwerten von 0,05-0,07 relativ hohe Anteile von moderaten ODP-Werten bis 0,14 auftreten. Dieser Unterschied zu Konstrukten mit Napin-Promotor könnte andeuten, dass der USP-Promotor im Timing oder Grad der Transgen-Transkription nicht optimal zum Expressionsmuster des Zielenzyms FAD2 passt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gezeigten Unterschiede der Promotoren im FAD2-Silencing aufgrund der relativ kleinen Anzahl an untersuchten T1-Pflanzen durch andere Einflüsse wie z.B. Kopienzahl oder Positionseffekte bedingt sind.

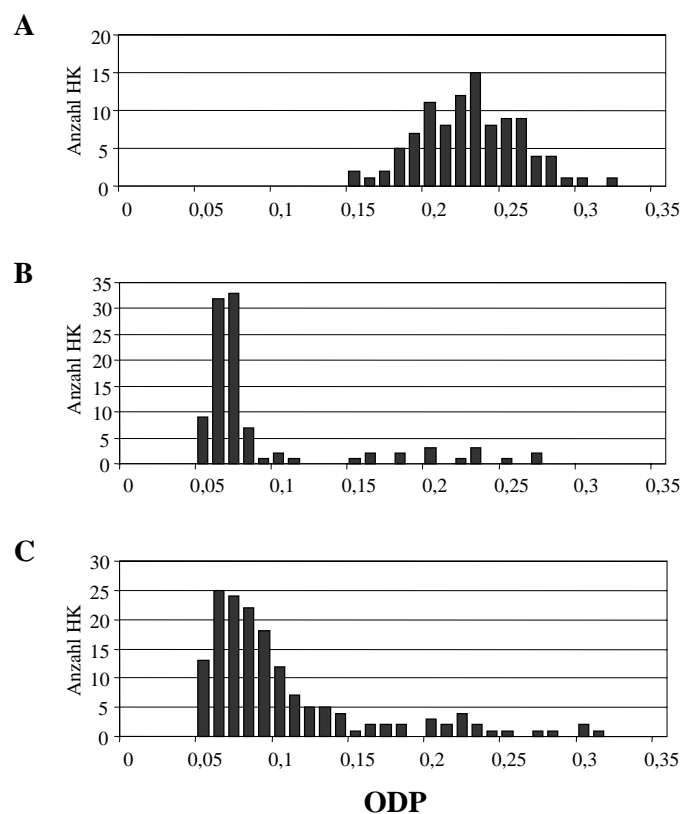


Abb. 3.14: Ausprägung des HO-Phänotyps in Primärtransformanten mit FAD2-Silencing unter Kontrolle des Napin- bzw. USP-Promotors. Dargestellt sind Häufigkeitsverteilungen (Anzahl Halbkörner) der ODP-Werte für Samen (Halbkornanalyse) von 10 Wildtyp-Pflanzen *B. napus* var. Drakkar (A) und T2-Samen von 5 T1-Pflanzen mit dem Konstrukt pRN*fad2irB* (iHP/Napin-P.) (B) bzw. 8 T1-Pflanzen mit dem Konstrukt pRU*fad2irB* (iHP/USP-P.) (C).

Bezeichnungen der WT- und T1-Pflanzen: **A** 2199.159K-168K; **B** 2110.4c, 2110.24a, 2111.70b, 2111.179a, 2111.188c; **C** 2112.60a, 2112.67b, 2112.77a, 2112.181a, 2112.120a, 2112.521a, 2113.192b, 2113.317a.

Von den für das FAD2-Silencing eingesetzten Konstrukt-Varianten sind diejenigen mit dem Napin-, USP- und LeB4-Promotor – mit sHP oder iHP – in der Lage, die Oleatdesaturierung deutlich zu reduzieren. Wenngleich bezüglich der Effizienz und der Phänotyp-Ausprägung Unterschiede zwischen den Konstrukten bestehen, so scheinen doch alle zu maximalem Silencing befähigt zu sein. Die Fettsäure-Analysedaten der besten Samen (Halbkornanalyse) aus jeder Konstrukt-Serie sind in Tab. 3.6 zusammengefasst, wobei aufgrund der unterschiedlichen Umweltbedingungen bei den Anzuchtserien die jeweiligen Kontrollen mit aufgeführt sind. Während die Kontrollwerte zwischen 62,6 und 71,4 % schwanken, liegen die maximalen Ölsäuregehalte zwischen 85,6 und 88,9 %. Dementsprechend weisen ODP-Werte von 0,05-0,08 im Vergleich zu 0,21-0,32 auf eine deutliche Reduzierung des Desaturierungsgrads hin. Die Linolsäuregehalte wurden von ca. 13-19 % auf ca. 2 % reduziert, die Linolensäuregehalte von 7-11 % auf ca. 3-5 %. Insgesamt konnte so durch Silencing beider *FAD2*-Genkopien der Ölsäuregehalt in einzelnen Samen auf bis zu 89 % gesteigert werden. Dieser Wert entspricht den von Stoutjesdijk *et al.* (2000) ermittelten Ergebnissen für HO-Rapspflanzen, die mittels Cosuppression entwickelt wurden.

Tab. 3.6: Fettsäure-Zusammensetzung und ODP-Werte der T2-Samen mit den höchsten Ölsäuregehalten (Halbkornanalyse) aus verschiedenen Konstruktserien. Zum Vergleich wurden Mittelwerte aus Halbkornanalysen der Kontroll-Pflanzen (*B. napus* Wildtyp und Regenerate) berechnet. Die Zahl in der Klammer gibt die Anzahl der verfügbaren Kontroll-Pflanzen für die jeweilige Anzuchtserie an.

Konstrukt	Fettsäure-Zusammensetzung (%)								ODP
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	
Wildtyp (2)	3,4	1,3	62,6	18,5	11,4	0,6	1,3	0,5	0,32
pRN <i>fad2</i> irA sHP/Napin	2,9	1,5	87,1	1,8	3,9	0,5	1,4	0,3	0,06
pRU <i>fad2</i> irA sHP/USP	2,7	1,1	85,6	2,3	5,4	0,5	1,5	0,5	0,08
Wildtyp (8)	3,2	1,5	68,2	13,7	9,7	0,5	1,0	0,1	0,25
Regenerat (2)	3,2	1,3	66,1	15,6	10,2	0,5	1,2	0,1	0,28
pRL <i>fad2</i> irA sHP/LeB4	2,3	1,3	86,1	2,5	4,1	0,6	1,6	0,5	0,07
Wildtyp (10)	3,3	1,6	69,8	13,0	7,4	0,4	1,0	0,1	0,23
Regenerat (3)	3,3	1,4	71,4	12,7	6,5	0,5	1,3	0,2	0,21
pRN <i>fad2</i> irB iHP/Napin	2,6	1,8	88,3	1,8	2,9	0,6	1,0	0,3	0,05
pRU <i>fad2</i> irB iHP/USP	2,1	1,3	88,9	1,8	3,1	0,6	1,2	0,4	0,05

Durch Hemmung der FAD2 konnten jedoch die Gehalte an 18:1-Desaturierungsprodukten nicht vollständig eliminiert werden. Desweiteren ist auffällig, dass 18:3 nicht in dem gleichen Maße reduziert wird wie 18:2. Diese Beobachtungen korrelieren mit Ergebnissen aus Experimenten mit *fad2*-Mutanten und FAD2-Silencing in *Arabidopsis* (Stoutjesdijk *et al.*, 2002). Die EMS-Mutante produziert normale RNA-Gehalte, besitzt aber geringe FAD2-Aktivität, da aus der Translation ein defektes Protein resultiert (Miquel und Browse, 1994). Dennoch produzieren die Samen signifikante Gehalte an 18:2 und 18:3 (8 %), die auch durch Transformation der *fad2*-Mutante mit sHP- und iHP-Silencing-Konstrukten zur Hemmung der FAD2 nicht weiter reduziert werden konnten. So bewirkte selbst die Entfernung der FAD2-mRNA keine weitere Reduktion der 18:2- und 18:3-Gehalte. Vermutlich ist die Restaktivität an $\Delta 12$ -Desaturierung durch andere Gene bedingt, die nicht durch das Silencing-Konstrukt erfasst werden. In Frage kommt hier die plastidär lokalisierte FAD6, deren Gen in *Arabidopsis* lediglich 41 % Identität zur FAD2 aufweist und somit dem FAD2-Silencing entgeht. Untersuchungen an *fad2*- und *fad6*-Mutanten haben gezeigt, dass ein flexibles Zusammenspiel zwischen prokaryotem und eukaryotem Weg durch einen reversiblen Austausch von Fettsäuren zwischen plastidären und endoplasmatischen Membranen besteht (Miquel und Browse, 1992; Browse *et al.*, 1993). Jeder Weg kann teilweise Mutationen im anderen Weg kompensieren, um adäquate Gehalte an C18:PUFAs zu gewährleisten. So können plastidär synthetisierte C18:PUFAs entweder im Plastiden lokalisiert bleiben oder exportiert und anschließend in ER-Lipide und TAGs inkorporiert werden.

Das FAD2-Silencing zielte auf Veränderung der Anteile an C18-Fettsäuren in Form von Reduzierung der Desaturierungsprodukte "downstream" der FAD2 bei gleichzeitiger Akkumulation des Substrats 18:1. Dennoch ist bei den Samen mit HO-Phänotyp auch eine leichte Erniedrigung der Palmitinsäurewerte von 3,3 % auf 2,1-2,9 % erkennbar. Dieser pleiotrope Effekt wurde schon bei *fad2*-Mutanten von *Arabidopsis* beobachtet, in deren PC aus Blatt- und Wurzelgewebe eine 40-60 %ige Reduktion des 16:0-Gehalts auftrat (Miquel und Browse, 1992). Desweiteren dokumentieren eine Reihe von Autoren diese negative Korrelation zwischen 16:0 und 18:1 in Samen von HO-Formen für z.B. *Arabidopsis* (Okuley *et al.*, 1994; Stoutjesdijk *et al.*, 2002), *H. annuus* (Cole *et al.*, 1998), *G. max* (Kinney, 1996) und *G. hirsutum* (Liu *et al.*, 2002). Die geringere Inkorporations-Rate von 16:0 könnte damit erklärt werden, dass erhöhte Gehalte an Oleoyl-CoA im Acyl-CoA-Pool des Cytoplasmas die relative Selektivität der Acyl-Transferasen beeinflussen (Liu *et al.*, 2002). Während die mikrosomale GPAT normalerweise bevorzugt Palmitinsäurereste gegenüber ungesättigten und gesättigten C18-Fettsäureresten nutzt (Frentzen, 1993), könnte durch hohe 18:1-Gehalte eine Konkurrenzsituation entstehen. Eine andere Erklärung liefern Möllers und Schierholt (2002), die auf die negative Korrelation von Palmitat und Ölgehalt in HO-Winterraps und HO-Formen anderer Ölsaaten hinweisen. Der in HO-Linien festgestellte erhöhte Ölgehalt könnte eine gesteigerte Aktivität der KASII erfordern, die im Plastiden die Verlängerung von 16:0-ACP zu 18:0-ACP katalysiert. Der

dadurch entstehende erhöhte Substrat-Flux würde den 16:0-ACP-Pool und damit die Freisetzung und den Export von 16:0 reduzieren.

3.3.1.3 Stabilität des HO-Phänotyps

Ein kritischer Punkt bei der Entwicklung transgener Pflanzen ist die stabile Erhaltung des Phänotyps über mehrere Generationen. Zur Untersuchung der Stabilität des FAD2-Silencing-Merkmals erfolgte zunächst eine Selektion und Kultivierung der T2-Samen, die nach der Halbkornanalyse einen Ölsäuregehalt von mindestens 84 % aufgewiesen hatten. Die T3-Samen der geselbsteten Pflanzen wurden Ramschanalysen unterzogen und ihre Fettsäure-Zusammensetzungen ermittelt. In Abb. 3.15 sind für eine Wildtyp-Pflanze und fünf HO-Primärtransformanten die ODP-Werte der T2-Samen aus Ramsch- und Halbkornanalyse sowie die T3-Ramschanalyse der weitergeführten Pflanzen dargestellt. Die Halbkornanalysen der Wildtyp-Samen (Abb. 3.15 A) zeigen ODP-Werte zwischen 0,22 und 0,36, die Samen der nächsten Generation weisen mit ODP-Werten von 0,15-0,21 einen erniedrigten Desaturierungsgrad auf. Die entsprechenden Ölsäuregehalte lagen bei ca. 72-77 % im Vergleich zu 60-72 % in der Generation davor. Diese Schwankungen sind ein deutliches Beispiel für die Umwelt-Variabilität der Oleatdesaturierung. Unter Berücksichtigung dieses Effekts soll anhand der ODP-Werte der transgenen HO-Pflanzen abgeschätzt werden, ob eine stabile Vererbung des Merkmals vorliegt. Die analysierten T3-Nachkommen der Primärtransformanten 2102.179b, 2101.33a und 2101.186a (Abb. 3.15 D, E, F) zeigen Ramsch-Werte unter 0,1 ODP, die mit denen der jeweiligen Ausgangs-Primärtransformante vergleichbar sind. Hier konnte anscheinend der Silencing-Phänotyp stabil auf die nächste Generation vererbt werden. Während das ODP-Verteilungsmuster von T2-Samen der Primärtransformante 2102.179b eine Ein-Locus-Vererbung vermuten lässt, ist bei den Pflanzen 2101.33a und 2101.186a aufgrund der fehlenden Wildtyp-Phänotypen eine Insertion von mehreren Kopien des Transgens anzunehmen. Nach Ermittlung der Kopienzahl könnte abgeschätzt werden, ob eine stabile Vererbung des HO-Phänotyps unabhängig von der Kopienzahl erfolgt. Ein Beispiel für Verlust des Silencing-Merkmals sind die T3-Nachkommen der T1-Pflanze 2103.47a (Abb. 3.15 B), die mit ODP-Werten von 0,15-0,17 den Wildtyp-Phänotyp zeigen. Eine generelle Instabilität weisen Nachkommen der T1-Pflanze 2101.63a auf, von denen einige den HO-Phänotyp erhalten und andere einen verschlechterten Silencing-Grad aufweisen (Abb. 3.15 C). Die den Daten in Abb. 3.15 entsprechenden absoluten Ölsäuregehalte der Ramschanalysen von T2 und der ausgewählten T3-Samen sind in Tab. 3.7 vergleichend dargestellt. Hier ist wiederum mit Hinblick auf die Kontrollwerte anzumerken, dass scheinbar gesteigerte Ölsäuregehalte in den Samen der T3-Generation vermutlich auf Umwelteinflüsse zurückzuführen sind.

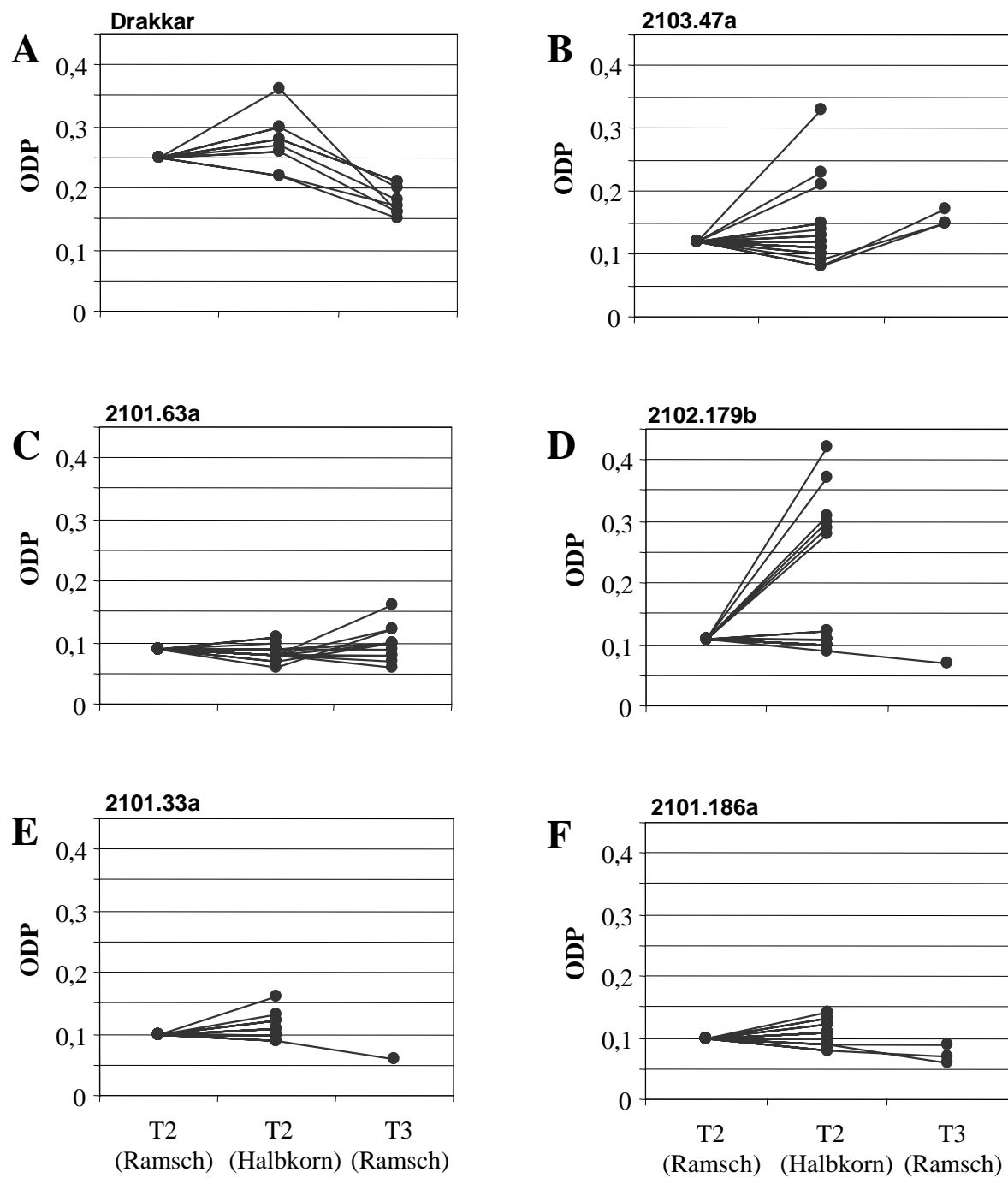


Abb. 3.15: Stabilität des HO-Phänotyps bei FAD2-Silencing. Dargestellt sind ODP-Werte der T2-Samen (Ramschanalyse) von Primärtransformanten, der T2-Halbkornanalysen und der T3-Ramschanalysen weitergeführter T2-Pflanzen (**B** pRU*fad2*irB: iHP/USP-Promotor; **C-F** pRN*fad2*irB: iHP/Napin-Promotor) im Vergleich zu ODP-Werten der Nachkommen einer Wildtyp-Pflanze (**A**).

Tab. 3.7: Ölsäure-Gehalte (% der Gesamt-Fettsäuren) in T2- und T3-Samen (Ramschanalyse) von HO-Primärtransformanten und in Wildtyp-Samen. Die Anzahl der weitergeführten T2-Pflanzen und damit die Anzahl der durchgeführten T3-Ramschanalysen ist durch n angegeben.

T1-Pflanze	Konstrukt	T2-Samen	T3-Samen C18:1 (%)			n
		C18:1 (%)	Min	MW	Max	
Drakkar 11		68,9	71,9	74,8	77,1	8
2101.33a	pRN <i>fad2irB</i> (iHP/Napin)	81,0	-	85,3	-	1
2101.63a	pRN <i>fad2irB</i> (iHP/Napin)	82,2	77,3	82,4	85,7	12
2101.186a	pRN <i>fad2irB</i> (iHP/Napin)	81,7	82,5	84,6	86,0	3
2102.179b	pRN <i>fad2irB</i> (iHP/Napin)	81,0	-	85,6	-	1
2103.47a	pRU <i>fad2irB</i> (iHP/USP)	80,0	75,8	77,1	77,9	3

Wildtyp-Phänotypen mit einem Ölsäuregehalt von 72-77 % treten – analog zu Abb. 3.15 – in allen Nachkommen der T1-Pflanze 2103.47a und einigen der T1-Pflanze 2101.63a auf. Für den hier vorliegenden Verlust des HO-Phänotyps könnte das bei der Entwicklung transgener Pflanzen häufig auftretende Phänomen der Transgeninaktivierung verantwortlich sein, das durch Positionseffekte oder HDGS (*homology-dependent gene silencing*) entsteht. Eingeführte Transgene inserieren an zufälligen Positionen des Pflanzengenoms und scheinen wie andere „Fremd“-DNA von den Pflanzen erkannt zu werden (Meyer und Heidmann, 1994). Diese Erkennung kann auf Zerstörung der normalen Chromatin-Struktur oder auf von der umgebenden DNA abweichenden Sequenz-Charakteristika basieren. Die Insertion von fremder DNA in ein Isochor – Bereiche mit definierten GC-Gehalt (Salinas *et al.*, 1988) – könnte diese Region zur Methylierung und Inaktivierung markieren (Finnegan und McElroy, 1994). Von besonderer Bedeutung ist der Methylierungs-Status der Integrationsstelle. Hypermethylierung von Transgenen kann durch den Einfluss von Integrations-Regionen entstehen (Meyer, 1998), indem das Methylierungsmuster auf die transgene DNA übertragen wird. Ein weiterer möglicher Auslöser für Verlust des HO-Phänotyps liegt in der Transformations-Methode begründet. Lange wurde angenommen, dass bei *Agrobacterium*-vermittelten Transformationen nur die T-DNA und keine externe Vektor-DNA in die Pflanze transferiert wird. Detaillierte molekulare Charakterisierung der DNA-Insertionen in transgenen Pflanzen haben allerdings gezeigt, dass auch Vektor-Sequenzen mit hohen Frequenzen in das pflanzliche Genom integriert werden (Matzke und Matzke, 1998). Die prokaryoten Sequenzen tragen zur Transgeninaktivierung bei, da sie als Fremd-DNA erkannt werden (Yoder *et al.*, 1997), vermutlich aufgrund des aberranten GC-Gehalts, der Inkompatibilität mit eukaryoten Proteinen und der Anwesenheit von repetitiven Sequenzen wie z.B. bakteriellen Replikations-Ursprüngen. Ob Vektor-DNA für die Transgeninaktivierung der HO-Pflanzen verantwortlich ist, könnte nur durch molekulare Analyse der Transgen-Umgebung ermittelt werden. Eine weitere Ursache für den Verlust des HO-Phänotyps wäre das Vorhandensein von vielen

Transgen-Kopien. Diese begünstigen das Auftreten von HDGS, das z.B. auf transkriptioneller Ebene mit meiotisch vererbaren epigenetischen Modifikationen wie Promotor-Methylierung assoziiert ist (Fagard und Vaucheret, 2000). Southern-Blot-Analysen der transgenen HO-Pflanzen könnten Aufschluss darüber geben, ob eine Korrelation von Kopienzahl und Transgeninaktivierung besteht. Wenngleich bei zwei der fünf untersuchten HO-Pflanzen anscheinend Transgeninaktivierung oder Instabilität vorliegt, konnte für drei Primärtransformanten demonstriert werden, dass das Merkmal FAD2-Silencing stabil auf die nächste Generation vererbt wird. Stoutjesdijk *et al.* (2002) zeigten für *Arabidopsis*-Genotypen, die eine Einzel-Insertion eines iHP-Transgens zur Hemmung der FAD2 besaßen, die Erhaltung des hohen Silencing-Grads über fünf Generationen.

3.3.1.4 Gewebespezifität der FAD2-Hemmung

Wie die Samenanalysen der transgenen Rapspflanzen zeigten, eigneten sich zur FAD2-Suppression Konstrukte mit dem Promotor des Napin-Gens aus *B. napus*, des Legumin-Gens aus *Vicia faba* und dem Promotor des Gens eines bisher unbekanntes Samen-Speicherproteins (USP) ebenfalls aus *Vicia faba*. Die Expression von Samen-Speicherproteinen erfolgt normalerweise zeitlich und örtlich streng reguliert unter Beteiligung von interagierenden DNA-Sequenzmotiven und assoziierten *trans*-Faktoren. Bei Verwendung der 5'-flankierenden Bereiche für Expressionen in heterologen Wirten ist von Bedeutung, ob die eingesetzten Fragmente die essentiellen Informationen für eine korrekte Regulation der zeitlichen und gewebespezifischen Aktivität besitzen und ob diese vom Wirt erkannt werden. Eine Hemmung der FAD2 in vegetativem Gewebe könnte aufgrund von Beeinträchtigungen der Membranlipid-Synthese nachteilige agronomische Eigenschaften für die Rapspflanzen bedeuten. Zur Überprüfung auf potentielle unerwünschte Promotoraktivität erfolgte eine Untersuchung von Blattmaterial transgener HO-Pflanzen auf Abweichungen in der Fettsäure-Zusammensetzung. Ausgewählt wurden jeweils 3-5 T2-Pflanzen mit den Konstrukten pRN*fad2irA*, pRL*fad2irA*, pRN*fad2irB* bzw. pRU*fad2irB*, die den Napin-, LeB4- oder USP-Promotor in Kombination mit einer sHP- oder iHP-Kassette enthalten. Aus den Blattlipiden wurden durch saure Methanolyse FAMES hergestellt und diese dann gaschromatographisch getrennt (s. 2.20). Die ermittelte Fettsäure-Zusammensetzung ist in Tab. 3.8 angegeben und in Abb. 3.16 graphisch dargestellt. Eine Hemmung der FAD2 während der vegetativen Phase würde in den Blattlipiden zu einer deutlichen Steigerung des 18:1-Gehalts bei gleichzeitiger Reduzierung der 18:2- und 18:3-Gehalte führen. Bei *fad2*-Mutanten von *Arabidopsis* ist der 18:1-Anteil in den Blattlipiden gegenüber dem Wildtyp um etwa das 5fache erhöht (Miquel und Browse, 1992). Im Blattmaterial der untersuchten transgenen HO-Pflanzen liegen die 18:1-Gehalte zwischen 2,6 und 3,4 % gegenüber 1,9 % beim Wildtyp. Die 18:3-Gehalte sind mit 42,5-45,3 % im Vergleich zum Wildtyp (47,8 %) leicht erniedrigt. Bei diesen leichten Abweichungen

kann davon ausgegangen werden, dass keine Hemmung der FAD2 vorliegt und somit keine dramatischen Beeinträchtigungen der Pflanzen-Entwicklung zu befürchten sind.

Tab. 3.8: Fettsäure-Zusammensetzung der Lipide in Blattmaterial transgener HO-Rapspflanzen mit verschiedenen Silencing-Konstrukten. Die FAMES wurden über GLC analysiert. Angegeben sind Mittelwerte aus Analysen von jeweils 3-5 T2-Pflanzen.

Konstrukt	Fettsäure-Zusammensetzung (%)					
	16:0	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3
Wildtyp	17,3	10,6	1,8	1,9	13,0	47,8
pRN <i>fad2</i> irA sHP/Napin	16,5	11,4	1,7	3,0	14,5	42,7
pRL <i>fad2</i> irA sHP/LeB4	16,3	12,1	1,2	3,4	13,9	42,5
pRN <i>fad2</i> irB iHP/Napin	15,8	13,0	1,2	2,6	12,6	44,5
pRU <i>fad2</i> irB iHP/USP	16,0	11,9	1,4	2,8	12,9	45,3

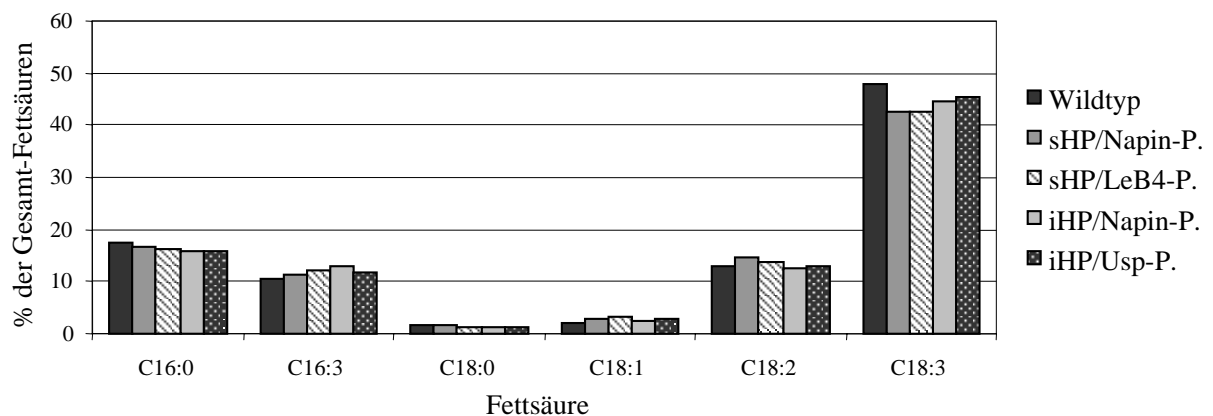


Abb. 3.16: Fettsäureprofile der Lipide in Blattmaterial transgener HO-Rapspflanzen mit verschiedenen Silencing-Konstrukten. Die FAMES wurden über GLC analysiert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus den Analysen von jeweils 3-5 T2-Pflanzen.

An *Arabidopsis*-Mutanten mit reduzierter oder ausgeschalteter FAD2-Aktivität wird deutlich, welche Auswirkungen die veränderte Fettsäurezusammensetzung von Membranlipiden in vegetativem Gewebe haben kann. Bei 22 °C entwickeln sich *fad2*-Mutanten von *A. thaliana* wie der Wildtyp. Bei 6 °C dagegen zeigen die Mutanten eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber Kälte: die Blätter werden nekrotisch, akkumulieren Anthocyane und sterben schließlich ab (Miquel *et al.*, 1993). Für ein Wachstum bei niedrigen Temperaturen ist demnach die mikrosomale 18:1-Desaturierung essentiell

zum Überleben. Die Veränderungen durch den Mangel an PUFAs in den Lipiden in den bei 6 °C kultivierten *fad2*-Mutanten beeinträchtigt die Vitalität der Zellen allerdings erst nach einigen Tagen (Miquel *et al.*, 1993). Diese allmähliche Entwicklung der Symptome bei 6 °C spricht dafür, dass der erniedrigte Desaturierungsgrad der Membranlipide zunächst nur begrenzt die Zellfunktionen schädigt (Wallis und Browse, 2002). Eine mögliche Erklärung wäre der Zusammenhang von *fad2*-Mutation und Beeinträchtigung von mitochondrialen Funktionen (Caiveau *et al.*, 2001). Das veränderte Fettsäure-Profil in mitochondrialen Membranen von *fad2*-Mutanten zeigte, dass die Mitochondrien kein autonomes Desaturase-System neben denen in endoplasmatischen und plastidären Membranen besitzen. Als weitere Konsequenz der Mutation wurde eine erniedrigte Protein-Dichte im Bilayer festgestellt. Diese und/oder die veränderte Fettsäure-Zusammensetzung in den mitochondrialen Membranen wurden für verschiedene funktionale oder dynamische Modifikationen verantwortlich gemacht, wie z.B. erhöhte Lateral-Diffusion der Lipide, erniedrigte Protonen-Permeabilität der Membranen oder gesteigerte Microviskosität.

3.3.1.5 Korrelation von ODP-Verteilung und Transgen-Kopienzahl

Für ergänzende Analysen zu den in Kap. 3.3.1.1-3.3.1.4 dargestellten Ergebnissen wurden transgene Rapspflanzen mit den Konstrukten pRN*fad2*irB und pRU*fad2*irB zur Hemmung der mikrosomalen Oleatdesaturase FAD2 hergestellt. Die Transformation wurde wie unter 2.12 beschrieben durch Kokultivierung von Agrobakterien mit Hypokotylexplantaten durchgeführt, die anschließende Selektion erfolgte aufgrund der T-DNA-vermittelten Kanamycin-Resistenz. Für Vektor-Kontrollen wurden parallel Hypokotylsegmente mit dem Ausgangsvektor pRE1 transformiert. Außerdem erfolgte die Regeneration von Rapspflanzen ohne Agrobakteriuminfektion und ohne Selektionsdruck aus Explantaten, sowie die Anzucht von Wildtyp-Pflanzen.

Bewurzelte, putativ-transgene Pflanzen wurden mittels PCR auf Vorhandensein der T-DNA überprüft (s. 2.14). Als Template diente genomische DNA, die aus Blattmaterial isoliert wurde. Die PCR wurde mit zwei verschiedenen Primerpaaren zur Amplifikation der NPTII-Kassette bzw. des Nos-Terminators durchgeführt. In allen *in vitro* selektierten Pflanzen mit Silencing-Konstrukten konnten sowohl das Resistenz-Gen als auch der Terminator des Transgens nachgewiesen werden, für Pflanzen mit dem Ausgangsvektor pRE1 war erwartungsgemäß nur der PCR-Nachweis der NPTII-Kassette positiv.

Ausgehend von jeweils 525 Hypokotyl-Explantaten für die Transformation mit den Konstrukten pRN*fad2*irB bzw. pRU*fad2*irB konnten 12 bzw. 20 transgene Rapspflanzen selektiert werden. 10 Kontrollpflanzen mit dem Vektor pRE1 resultierten aus 210 Explantaten, außerdem wurden 5 nicht-transformierte Wildtyp-Pflanzen regeneriert. Die Transformationsraten von 2,3-4,8 % (Tab. 3.9) sind vergleichbar mit denen anderer in der Literatur beschriebener Rapstransformationen

(Han, 1999). Sowohl die transgenen als auch die Kontroll-Pflanzen wurden in Erde überführt, im Gewächshaus kultiviert und geselbstet. Nach massivem Schädlingsbefall konnten allerdings insgesamt nur 13 Pflanzen beerntet werden: 4 mit dem Vektor pRE1, 5 mit dem Konstrukt pRN*fad2irB* und 4 mit pRU*fad2irB*.

Tab. 3.9: Transformationsraten (TF) von *B. napus* var. Drakkar mit verschiedenen Konstrukten.

Konstrukt	HP/ Promotor	Anzahl Explantate	Sprosse 1. Selektion		Sprosse 2. Selektion		Transgene Pflanzen	
			Anzahl	TF	Anzahl	TF	Anzahl	TF
pRE1		210	70	33,3 %	18	8,6 %	10	4,8 %
pRN <i>fad2irB</i>	iHP/Napin	525	212	40,4 %	21	4,0 %	12	2,3 %
pRU <i>fad2irB</i>	iHP/USP	525	321	61,0 %	36	6,9 %	20	3,8 %

Von den Samen der Primärtransformanten wurde zunächst in Ramschanalysen (je 2 x 10 Samen) gaschromatographisch (s. 2.20) die Fettsäure-Zusammensetzung ermittelt. Ursprünglich war vorgesehen, mit den Vektor-Kontrollen, den nicht-transformierten Regeneraten und ausgesäten Wildtypen drei unterschiedliche Kontroll-Typen zu analysieren. Dieser Ansatz sollte dazu dienen, Einflüsse des Regenerationsprozesses und/oder der eingeführten T-DNA auf die Fettsäure-Zusammensetzung abzuschätzen. Aufgrund der geringen Anzahl an überlebenden Pflanzen konnten diese vergleichenden Analysen nicht durchgeführt werden. Dennoch standen mit den Samen von 4 Vektor-Kontroll-Pflanzen geeignete Kontrollen zur Bewertung der transgenen Pflanzen bezüglich des Silencing-Effekts zur Verfügung. In der Ramschanalyse zeigten die Kontroll-Samen einen mittleren Ölsäuregehalt von ca. 70 % und einen ODP-Wert von 0,25 (Tab. 3.10). Von den fünf transgenen Pflanzen mit dem Konstrukt pRN*fad2irB* – iHP mit Napin-Promotor – wiesen drei einen deutlich gesteigerten Ölsäuregehalt bis maximal 85 % auf, der ODP-Wert war dementsprechend auf bis zu 0,07 reduziert. Zwei der vier Primärtransformanten mit dem Konstrukt pRU*fad2irB* – iHP mit USP-Promotor – zeigten einen deutlichen HO-Phänotyp mit ca. 83 % Ölsäure und erniedrigtem Desaturierungsgrad bis auf 0,09. Insgesamt zeigen so die Silencing-Konstrukte mit Intron-Hairpin wie bereits dargestellt (s. Kap. 3.3.1.1) eine hohe Effizienz in der Produktion von HO-Phänotypen.

Tab.3.10: Ölsäuregehalte und ODP-Werte der Samen (Ramschanalyse) von Primärtransformanten mit Ausgangsvektor bzw. Konstrukten zur Hemmung der FAD2.

Konstrukt	T1-Pflanze	C18:1 (%)	ODP	MW C18:1 (%)	MW ODP	Anteil HO-Phänotypen
pRE1	101	72,2	0,21	69,3	0,25	0
	105	60,9	0,33			
	107	69,9	0,24			
	109	74,1	0,20			
pRN <i>fad2irB</i>	201	82,1	0,11	79,5	0,14	4/5
	202	69,7	0,25			
	203	75,7	0,18			
	204	85,3	0,07			
	205	84,5	0,09			
pRU <i>fad2irB</i>	301	83,4	0,09	78,6	0,15	3/4
	310	82,6	0,11			
	311	75,0	0,18			
	312	73,2	0,21			

Von den Samen der T1-Pflanzen 201, 204 und 205 wurden im folgenden Halbkornanalysen durchgeführt, indem ausgehend von den Kotyledonen FAMES hergestellt und diese gaschromatographisch getrennt wurden (s. 2.20). In den Samen mit HO-Phänotyp waren die Ölsäuregehalte auf 82-89 % erhöht im Vergleich zu 57-73 % in den Kontroll-Samen. Die Fettsäure-Zusammensetzungen des Samens mit dem höchsten Ölsäuregehalt und eines Kontroll-Samens sind in Tab. 3.11 aufgeführt und in Abb. 3.17 als Chromatogramme dargestellt. Analog zu den Halbkornanalysen, die im Rahmen des Verbundprojekts ermittelt wurden (s. 3.3.1.2), liegt eine Erhöhung des 18:1-Gehalts auf Kosten eines stark reduzierten 18:2- sowie mäßig reduzierten 18:3-Gehalts vor. Desweiteren korreliert der hohe Ölsäuregehalt mit erniedrigtem Gehalt an gesättigten Fettsäuren.

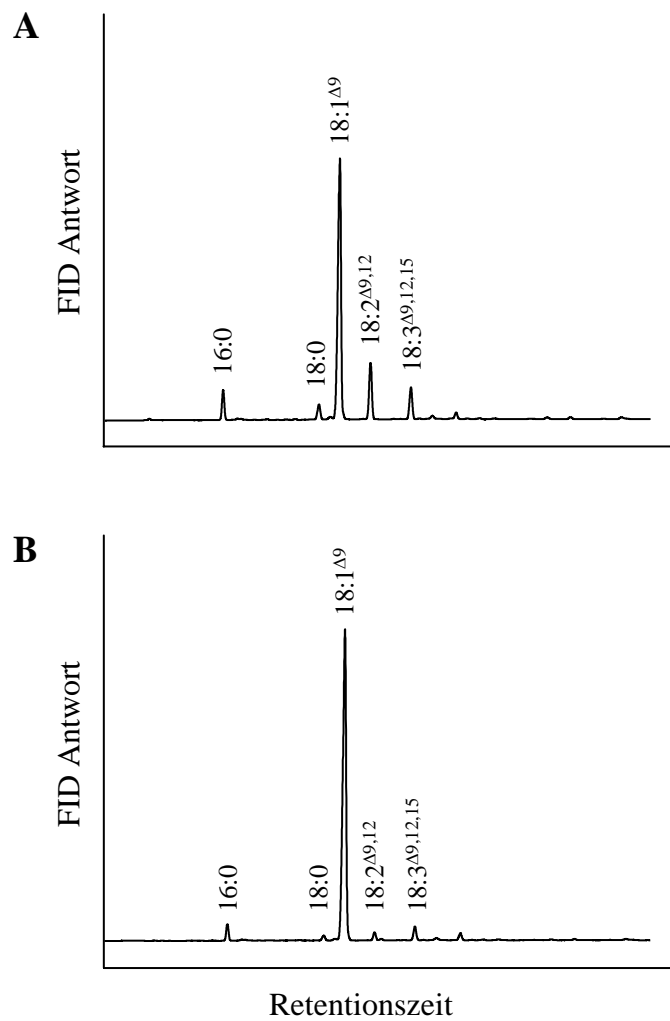


Abb. 3.17: Erhöhung des Ölsäuregehalts in Rapssamen durch FAD2-Silencing. Die FAMES der Halbkornanalysen wurden über GLC analysiert. In Tab. 3.11 sind die entsprechenden Flächenprozentage angegeben. **A** T2-Samen 101.4 (Vektor-Kontrolle); **B** T2-Samen 205.5 (pRN*fad2irB*).

Tab. 3.11: Fettsäure-Profil und ODP-Wert des T2-Samens (Halbkornanalyse) mit dem höchsten Ölsäuregehalt durch FAD2-Silencing im Vergleich zu einer Vektor-Kontrolle.

Konstrukt	T2-HK	Fettsäure-Zusammensetzung (%)					ODP
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	
pRE1	101.4	5,5	3,4	69,2	12,3	7,5	0,22
pRN <i>fad2irB</i>	205.5	3,2	1,2	88,6	1,7	3,0	0,05

Die Halbkornanalysen der T2-Samen dienen desweiteren zur Abschätzung der Aufspaltungsmuster. Die Häufigkeitsverteilungen der ODP-Werte (Abb. 3.18) zeigen eine eindeutige Tendenz zu niedrigen Desaturierungsgraden von 0,04-0,07. Wildtyp-Phänotypen lagen nur bei Samen der Pflanze 201 (Abb. 3.18 B) vor, während diese Phänotypen bei den anderen beiden Pflanzen nicht auftraten. Die Muster entsprechen den in Kap. 3.3.1.2 für transgene Rapspflanzen mit dem gleichen Konstrukt pRN*fad2irB* gezeigten ODP-Verteilungen (s. Abb. 3.13). Die dort geäußerte Vermutung, dass fehlende Wildtyp-Phänotypen mit dem Vorhandensein von mehreren Transgen-Kopien korrelieren, soll hier näher untersucht werden. So wurde für die T1-Pflanzen 201, 204 und 205 durch Southern-Blot-Analysen ermittelt, wieviele Kopien des Transgens vorliegen.

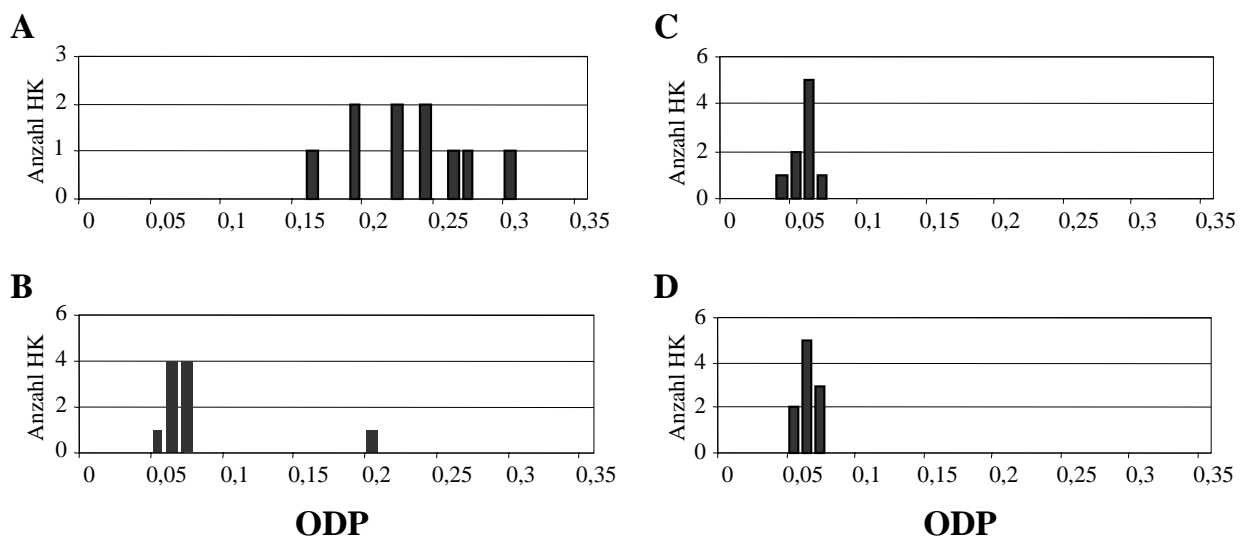


Abb. 3.18: Häufigkeitsverteilung (Anzahl Halbkörner) der ODP-Werte in T2-Samen von *B. napus* var. Drakkar mit dem Vektor pRE1 (A 101) bzw. dem Konstrukt pRN*fad2irB* (B 201; C 204; D 205).

Für die Southern-Blot-Analysen wurde aus Blattmaterial der transgenen Pflanzen 201, 204 und 205, sowie der Vektor-Kontrolle 101 und einer regenerierten Wildtyp-Pflanze genomische DNA isoliert. Die Restriktion erfolgte mit dem Enzym *Bgl*II, das einmal innerhalb der T-DNA, aber außerhalb des Transgens und der Resistenzkassette schneidet. Nach der Position der Restriktionsschnittstelle werden bei Hybridisierung mit der eingesetzten Sonde – ein DIG-markiertes DNA-Fragment des Nos-Terminators – ab einer Fragmentgröße von ca. 3,6 kb vollständige Integrationen des Transgens erwartet. Desweiteren sprechen Signale bei ca. 4,2 kb für Tandem-Integrationen. Die Hybridisierungssignale der DNA aus den transgenen HO-Pflanzen 201, 204 und 205 zeigen ein komplexes Bandenmuster (Abb. 3.19, Spuren 1-3), wobei die starken Signale für Mehrfach-Integrationen des Transgens sprechen, in der Probe 205 (Spur 3) liegen anscheinend Tandem-Integrationen vor. Bei den Kontrollen – der Vektor-Kontrolle und des Regenerats (Spuren 4 und 5) – treten wie erwartet keine

Signale auf. Insgesamt liegen in der T1-Pflanze 201 mindestens drei Kopien des Transgens vor, in den Pflanzen 204 und 205 sind es mindestens neun bzw. zehn Kopien. Bei Vorliegen dieser Anzahl an Transgen-Kopien einer T1-Pflanze wird die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Wildtyp-Phänotypen – auch bei Kopplung einzelner Loci – in der spaltenden Generation sehr gering. Die ermittelte hohe Kopienzahl in den drei untersuchten HO-Pflanzen könnte somit der Grund für die T2-Aufspaltungsmuster sein, in denen die HO-Phänotypen dominieren.

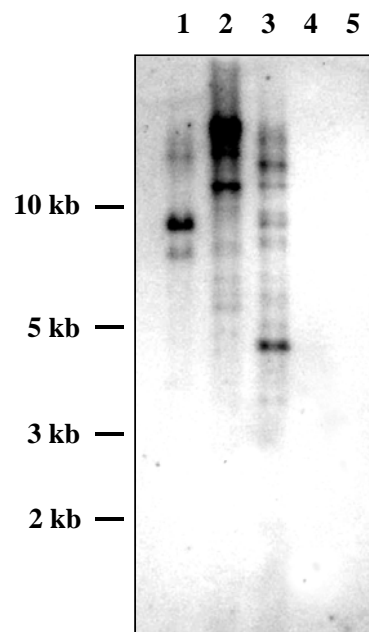


Abb. 3.19.: Southern-Blot-Analyse der mit *Bg*III restringierten genomischen DNA aus transgenen HO-Rapspflanzen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten Nos-Terminator-Sonde. Spur 1-3: T1-Pflanzen 201, 204 und 205, transformiert mit dem Konstrukt pRN*fad2irB*; Spur 4: T1-Pflanze 101, transformiert mit dem Vektor pRE1; Spur 5: nicht-transformierte, regenerierte Wildtyp Pflanze.

Generell begünstigt die Anwesenheit von vielen Transgen-Kopien Homologie-abhängiges Silencing, d.h. es besteht eine höhere Gefahr der Transgeninaktivierung (Fagard und Vaucheret, 2000). Desweiteren erschwert eine hohe Kopienzahl – insbesondere bei Vorliegen von Dosis-Effekten – die weitere züchterische Bearbeitung einer Primärtransformante, da Genotypen mit unterschiedlicher Kopienzahl weder phänotypisch noch auf molekularer Ebene leicht zu unterscheiden sind. Bei der routinemäßig durchgeführten phänotypischen Selektion mittels Halbkornanalyse kann das Fettsäureprofil durch Umwelteffekte (Harwood, 1998), cytoplasmatische (Diepenbrock und Wilson, 1987) oder maternale Effekte (Pleines und Friedt, 1989) so verändert sein, dass der Phänotyp nicht mehr dem Genotyp entspricht. Analysen mit Hilfe von Southern-Blot oder Markern dagegen sind sehr

aufwendig. So sind aus züchterischer Sicht Primärtransformanten wünschenswert, in denen – bei voller Ausprägung des transgenen Merkmals – nur eine einzige Kopie des Transgens vorliegt. Ein Beispiel unter den Bemühungen, Methoden zur Gewährleistung von *single copy*-Integrationen zu entwickeln, ist die Nutzung sequenz-spezifischer Rekombination zur Auflösung von komplexen Loci (Srivastava *et al.*, 1999). In den Konstrukten sind die Transgene von Rekombinationsstellen in umgekehrter Orientierung flankiert, die unabhängig von der Zahl an integrierten Kopien und deren Orientierung eine Umwandlung in *single copy*-Transgene bewirken.

3.3.2 Versuche zur simultanen Hemmung der Oleatdesaturasen FAD2 und FAD6 in reifenden Rapssamen

Wie die Ergebnisse zum FAD2-Silencing in reifenden Rapssamen zeigen, konnte der Ölsäuregehalt auf maximal 89 % gesteigert werden. Die niedrigste Desaturierungsrate lag bei 0,05 ODP, d.h. 5 % des verfügbaren 18:1-Substrats wird trotz Suppression beider *FAD2*-Genkopien zu 18:2 und 18:3 desaturiert. Diese Werte sind vergleichbar mit den Fettsäure-Profilen in Samen von HO-Raps, der mittels Cosuppression der *FAD2* hergestellt wurde (Stoutjesdik *et al.*, 2000). Zur weiteren Reduktion der Desaturierungsprodukte sollte simultan zur *FAD2* die im Plastiden lokalisierte Oleatdesaturase *FAD6* gehemmt werden, um so mögliche Kompensationswege abzuschneiden.

Die vier Doppel-Konstrukte (pRD*fad2fad6irB*, pRN*fad2fad6irB*, pRU*fad2fad6irB*, pRL*fad2fad6irB*; s. Abb. 3.11) enthalten Teilsequenzen aus *FAD2* und *FAD6* als iHP unter Kontrolle des Dc3-, Napin-, USP- bzw. LeB4-Promotors. Im Unterschied zu den Einfach-Konstrukten wird hpRNA synthetisiert, die zwei Duplices bilden kann. Mit diesen Konstrukten zur simultanten Hemmung der mikrosomalen und der plastidären Oleatdesaturase wurden im Rahmen des Verbundprojekts „Entwicklung und anwendungstechnische Evaluierung neuartiger Rapsöle“ wie unter 3.3.1 beschrieben ca. 140 transgene Pflanzen hergestellt und kultiviert. Die für 37 T1-Pflanzen mit dem Konstrukt pRN*fad2fad6irB* (mit Napin-Promotor) vorliegenden Ramschanalysen der T2-Samen sind in Tab. 3.12 zusammenfassend dargestellt. Im Vergleich zu den Kontroll-Samen ist der mittlere Ölsäuregehalt von 73 % auf 78 % erhöht, der Maximalwert der Ramschanalysen liegt bei 84 %. Dementsprechend konnten die Desaturierungsraten auf bis zu 0,07 ODP reduziert werden. Diese Werte sind vergleichbar mit den Ergebnissen, die für das Einzel-Konstrukt ohne *FAD6*-Sequenzen (pRN*fad2irB*) ermittelt wurden (s. Kap. 3.3.1.1, Tab. 3.4). Northern-Blot-Analysen könnten klären, ob tatsächlich nur die mRNA der *FAD2* abgebaut wurde.

Tab. 3.12: Variationsbreite der Ölsäuregehalte und ODP-Werte in Samen (Ramschanalyse) von *B. napus* var. Drakkar (nicht-transformierte, regenerierte Pflanzen) und unabhängigen Primärtransformanten mit dem Konstrukt pRN*fad2fad6irB* zur Hemmung der Oleatdesaturasen FAD2 und FAD6.

Konstrukt	Hairpin/ Promotor	Anzahl T1-Pfl.	C18:1 (%)			ODP		
			Min	MW	Max	Min	MW	Max
Regenerate		4	70,9	73,4	76,3	0,14	0,18	0,22
pRN <i>fad2fad6irB</i>	iHP/Napin	37	68,0	78,1	84,2	0,07	0,13	0,25

Dennoch konnte gezeigt werden, dass das Doppel-Hairpin-Konstrukt, welches die Bildung einer Hybrid-RNA mit zwei Duplices bewirkt, PTGS auslösen kann. Die in Abb. 3.20 dargestellte Häufigkeitsverteilung der ODP-Werte zeigt für die T1-Pflanzen eine eindeutige Tendenz zu niedrigen ODP-Werten und einen hohen Anteil HO-Phänotypen. Letzterer liegt bei etwa 62 %, die Effizienz des Konstrukts und ist damit etwas niedriger als die des entsprechenden Einzel-Konstrukts mit 70 % (s. Tab. 3.5).

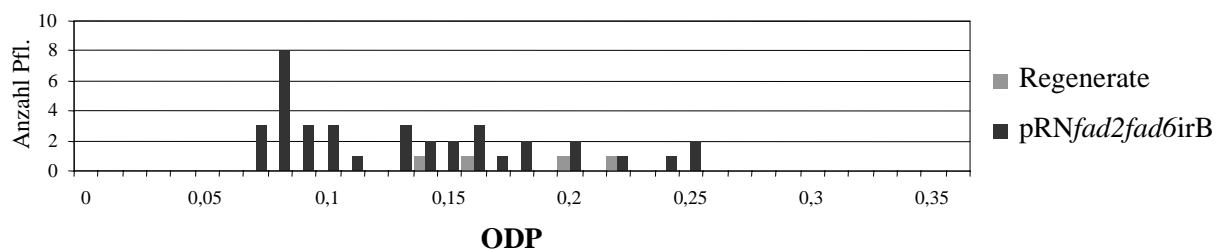


Abb. 3.20: Häufigkeitsverteilung (Anzahl an Pflanzen) der ODP-Werte in Samen (Ramschanalyse) von *B. napus* var. Drakkar (Regenerate) und unabhängigen Primärtransformanten mit dem Konstrukt pRN*fad2fad6irB*.

Wenngleich mit dem Konstrukt pRN*fad2fad6irB* erfolgreich HO-Phänotypen produziert werden konnten, deuten die bis jetzt vorliegenden Ergebnisse der Ramschanalysen nicht auf eine weitere Erniedrigung des Desaturierungsgrads im Vergleich zum FAD2-Silencing hin. Für eine sichere Interpretation liegen derzeit keine ausreichenden Daten vor. Halbkornanalysen werden zeigen, ob in einzelnen Samen eine Optimierung des Ölsäuregehalts vorliegt. Desweiteren werden die Analysen zu den weiteren Konstrukten Aufschluss darüber geben, ob die alternativen Promotoren in der Lage sind, eine optimale Hemmung beider Ziel-Enzyme zu induzieren.

Falls eine simultane Hemmung beider Oleatdesaturasen erfolgreich sein sollte, ist für die plastidäre Oleatdesaturase FAD6 ebenso wie für FAD2 die Beteiligung an der Membranlipid-Biosynthese zu berücksichtigen. Analysen von *fad6*- und *fad2fad6*-Mutanten von *Arabidopsis* geben Aufschluss über mögliche Beeinträchtigungen von Wachstum und Entwicklung der Pflanzen.

Das Blattgewebe der *fad6*-Mutante von *Arabidopsis* enthält reduzierte Gehalte an 16:3 und 18:3 und erhöhte Gehalte der Vorstufen 16:1 und 18:1 (Browse *et al.*, 1989). Der erniedrigte Desaturierungsgrad wird begleitet von einer reduzierten Synthese von plastidären Membranen und leicht reduzierter Photosynthese, wenn die Pflanzen bei 22 °C kultiviert werden (Hugly *et al.*, 1989). Insgesamt zeigen die *fad6*-Mutanten eine verschobene Temperatur-Toleranz. Einerseits besteht für die Thylakoidmembranen eine erhöhte Stabilität gegenüber thermischer Disruption, andererseits korreliert die Mutation mit einer erhöhten Sensitivität bei niedrigen Temperaturen. *Fad6*-mutanten werden bei 6 °C chlorotisch und zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine 20-30 %ige Reduktion in der Wachstumsrate (Hugly und Somerville, 1992). Strukturanalysen der Chloroplasten von Pflanzen, die bei niedriger Temperatur kultiviert wurden, wiesen eine reduzierte Menge an Thylakoiden und simultan erniedrigte Chlorophyll-, Lipid- und Protein-Gehalte auf. In *fad6*-Mutanten beeinträchtigt die veränderte Fettsäure-Zusammensetzung somit die Entwicklung der Chloroplasten bei niedriger Wachstums-Temperatur.

Während *fad2*- bzw. *fad6*-Mutanten in den Blättern 63 % (Miquel und Browse, 1992) bzw. 52 % (Browse *et al.*, 1989) PUFAs im Vergleich zu 77 % im Wildtyp aufweisen, sind in Blättern der *fad2fad6*-Doppelmutante keine der normalerweise synthetisierten PUFAs detektierbar. Die Mutanten können nicht auf Erde wachsen, sondern lediglich auf Sucrose-Medium. Die Pflanzen besitzen also nicht die Erfordernisse für ein autotrophes Wachstum, sind aber zum vegetativen Wachstum bei geeigneter C-Quelle befähigt. Allerdings kommt es nicht zur Blütenbildung, da die für die reproduktive Entwicklung in *Arabidopsis* essentielle Fettsäure 18:3 als Vorstufe für Jasmonsäure fehlt (McConn und Browse, 1996). Die Photosynthese scheint der Prozess zu sein, der primär angegriffen wird. Bei einem normalen Gehalt an Thylakoidmembranen in den Chloroplasten beträgt der Chlorophyll-Gehalt in den Blättern der *fad2fad6*-Mutanten nur 11 % des Wildtyps, dadurch ist die Anzahl an photosynthetisch wirksamen Komplexen stark reduziert. Messungen zur Effizienz lassen außerdem eine erniedrigte Kapazität der CO₂-Fixierung vermuten.

Insbesondere die Analysen der Doppel-Mutanten zeigen, welche dramatischen Auswirkungen aus einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität von Oleat-Desaturasen für die zellulären Funktionen in vegetativem Gewebe und damit die Lebensfähigkeit der Pflanzen resultieren. Zukünftige Analysen werden zeigen, ob eine gezielte Hemmung der Desaturasen FAD2 und FAD6 ohne Beeinträchtigung der Entwicklung möglich ist.

4. Zusammenfassung

Rapsöl mit hohen MUFA(*monounsaturated fatty acid*)- und geringen PUFA(*polyunsaturated fatty acid*)-Anteilen wäre ein wertvolles Produkt für die Nahrungsmittel-Industrie und die Oleochemie. In der vorliegenden Arbeit sollte mittels gentechnischer Methoden der Ölsäuregehalt in reifenden Rapsamen erhöht und gleichzeitig der Gehalt an mehrfach-ungesättigten C18-Fettsäuren erniedrigt werden. Für die Hemmung der beteiligten Desaturasen wurde die Hairpin-Technik eingesetzt, die auf PTGS (*posttranscriptional gene silencing*) beruht. Bei diesem Ansatz musste berücksichtigt werden, dass die Oleatdesaturasen sowohl in der Speicherlipid- als auch in der Membranlipid-Biosynthese involviert sind. Daher war die Gewährleistung einer ausschließlich samenspezifischen Hemmung der Enzyme erforderlich.

Das wichtigste Ziel-Enzym für eine Steigerung des Ölsäuregehalts ist die mikrosomale Oleatdesaturase FAD2, die den größten Anteil an 18:1-Substraten während der Samenreifung desaturiert. Für dieses Enzym liegen im Genom des allotetraploiden *B. napus* vier Genkopien vor, von denen nicht bekannt war, welche funktional sind und wann und in welchem Gewebe sie exprimiert werden. So wurden in dieser Arbeit zunächst funktionale FAD2-Kopien isoliert und charakterisiert. Dabei wurde überprüft, ob es sich um samenspezifisch exprimierte Kopien handelt, da das Vorhandensein einer solchen Kopie eine Suppression ohne agronomische Nachteile erlauben könnte. Aus einer cDNA-Bank aus reifenden Schoten von *B. napus* var. *Ascari* konnten zwei Genkopien FAD2-I und FAD2-II isoliert werden. Sie sind zu 97 % identisch und lassen sich durch Sequenzvergleiche dem A-Genom bzw. dem C-Genom zuordnen, sie stammen somit offenbar von den Vorfahren *B. rapa* bzw. *B. oleracea* ab. Durch heterologe Expression der Genkopien in *S. cerevisiae* wurde die Fähigkeit der entsprechenden Desaturasen zur $\Delta 12$ -Desaturierung nachgewiesen. RT-PCR-Analysen von RNA aus Blattgewebe zeigten, dass die Genkopien auch in vegetativem Gewebe exprimiert werden. In *B. napus* liegen also nicht unterschiedliche samenspezifische bzw. konstitutiv exprimierte FAD2-Gene vor, wie es für *G. max*, *H. annuus* und *G. hirsutum* gezeigt wurde. Für die gentechnologische Suppression bedeutet dies, dass durch Einsatz geeigneter Promotoren eine samenspezifische Hemmung erreicht werden muss.

Mit Hilfe der Sequenzinformationen zu den Genkopien wurde eine klassisch erzeugte Hoch-Ölsäure(HO)-Mutante aus *B. napus* var. *Wotan* charakterisiert, um weitere Informationen zu den molekularen Grundlagen des HO-Phänotyps zu erhalten. In der Genkopie FAD2-I konnte eine Punktmutation identifiziert werden, die zu einem Aminosäure-Austausch eines konservierten Glycin-Rests gegen ein Arginin führt. Bei heterologer Expression der mutierten Genkopie in *S. cerevisiae* zeigte die Desaturase einen um mehr als 90 % reduzierten Substratumsatz im Vergleich zum unveränderten Protein FAD2-I. Die Punktmutation kann somit dem Locus zugeordnet werden, der den HO-Phänotyp der Mutante verursacht. Dabei bestätigen Sequenzvergleiche der mutierten Genkopie Kartierungsanalysen, die den HO-Locus dem A(*B. rapa*)-Genom zuordnen. Die Fettsäure-Daten der

HO-Mutante sprechen für die Existenz eines weiteren funktionalen *FAD2*-Gens, bei dem es sich vermutlich um *FAD2-II* handelt. Mutationen in beiden *FAD2*-Genen würden allerdings beträchtliche agronomische Nachteile bedeuten. Eine Hemmung beider *FAD2*-Proteine ohne Beeinträchtigung der Pflanzenentwicklung kann somit nur mit gentechnologischen Methoden unter Einsatz geeigneter Promotoren erreicht werden.

Zur Steigerung des Ölsäuregehalts in reifenden Rapssamen wurden Hairpin-Konstrukte mit Fragmenten der *FAD2*-Genkopien hergestellt und durch *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation in Raps transferiert. Von den eingesetzten, verschiedenen samenspezifischen Promotoren erwiesen sich der Napin-, USP- und LeB4-Promotor als geeignet, *FAD2*-Silencing in Rapssamen auszulösen. Konstrukte mit dem Dc3-Promotor bewirkten dagegen keine Erhöhung des Ölsäuregehalts. Die Hairpin-Variante mit einem Intron produzierte mehr HO-Phänotypen als Hairpin-Kassetten mit einem Spacer. In der Ausprägung des HO-Phänotyps zeigten Konstrukte mit dem Napin-Promotor höhere Anteile von Phänotypen mit maximalem Silencing-Grad als Konstrukte mit dem USP-Promotor. Für die verschiedenen Konstrukt-Varianten wurden demnach zwar Unterschiede bezüglich der Effizienz und der Ausprägung des HO-Phänotyps festgestellt, dennoch erzielten sie ähnliche Höchstwerte für den Ölsäuregehalt. Dieser konnte durch Hemmung der *FAD2* in Einzelsamen von ca. 70 % auf bis zu 89 % gesteigert werden. Jedoch wurde die Oleatdesaturierung nicht vollständig unterbunden, da die 18:2- und 18:3-Gehalte in der Summe nicht unter 5 % gesenkt werden konnten. Diese Restgehalte werden der Aktivität der plastidären Oleatdesaturase *FAD6* sowie einem Lipid-Austausch zwischen den Kompartimenten Plastid, Cytosol und ER zugeschrieben. Daher sollte der Ölsäuregehalt in einem zweiten Ansatz durch simultane Hemmung der mikrosomalen und der plastidären Oleatdesaturasen (*FAD2* und *FAD6*) optimiert werden. Hierzu wurden Doppel-Konstrukte mit Hairpin-Kassetten und den o.g. Promotoren hergestellt. Die Ergebnisse der bisher analysierten transgenen Pflanzen sprechen nicht für eine weitere Erniedrigung des Desaturierungsgrads. Eine sichere Beurteilung kann allerdings erst nach Vorlage der noch ausstehenden Daten erfolgen.

Durch samenspezifische Suppression von zwei Genkopien der mikrosomalen Oleatdesaturase *FAD2* mit Hilfe von Hairpin-Konstrukten konnten somit erfolgreich transgene Rapspflanzen mit HO-Phänotyp hergestellt werden. Die angewendete Hairpin-Technik erwies sich als geeignete Methode zur effizienten Produktion von Primärtransformanten mit dem gewünschten Phänotyp. Eine Beeinträchtigung der Membranlipid-Biosynthese im vegetativen Gewebe wurde nicht festgestellt. Desweiteren konnte das HO-Merkmal stabil auf die nächste Generation vererbt werden.

5. Literatur

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

An, G., Ebert, P.R., Mitra, A., Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In: Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A., Verma, D. P. S. (Eds). *Plant Molecular Biology Manual A3*, pp. 1-19, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Auld, D., Heikkinen, M.K., Erickson, D.A., Sernyk, L., Romero, E. (1992) Rapeseed mutants with reduced levels of polyunsaturated fatty acids and increased levels of oleic acid. *Crop Sci.* **32**: 657-662.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M., Varki, A. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.

Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Bassuner, R., Van Montagu, M., Inze, D., Wobus, U. (1991) A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Mol. Gen. Genet.* **225**: 459-467.

Beclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P., Vaucheret, H. (2002) A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr. Biol.* **12**: 684-688.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.

Biermann, U., Friedt, W., Lang, S., Lühs, W., Machmüller, G., Metzger, J.O., Rüscher, M., Schäfer, H.J., Schneider, M. (2000) Neue Synthesen mit Ölen und Fetten als nachwachsende Rohstoffe für die chemische Industrie. *Angew. Chemie* **112**: 2293-2310.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Broadwater, J.A., Haas, J.A., Fox, B.G. (1998) The fundamental, versatile role of diiron enzymes in lipid metabolism. *Fett/Lipid* **100**: 103-113.

Broun, P., Shanklin, J., Whittle, E., Somerville, C. (1998) Catalytic plasticity of fatty acid modification enzymes underlying chemical diversity of plant lipids. *Science* **282**: 1315-1317.

Broun, P., Gettner, S., Somerville, C. (1999) Genetic engineering of plant lipids. *Annu. Rev. Nutr.* **19**: 197-216.

Browse, J., McCourt, P., Somerville, C.R. (1985) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplast-specific lipid. *Science* **227**: 763-765.

Browse, J., McCourt, P., Somerville, C.R. (1986) A mutant of *Arabidopsis* deficient in C18:3 and C16:3 leaf lipids. *Plant Physiol.* **81**: 859-864.

Browse, J., Kunst, L., Anderson, S., Hugly, S., Somerville, C.R. (1989) A mutant of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16:1/18:1 desaturase. *Plant Physiol.* **90**: 522-529.

Browse, J., McConn, M., James, D., Miquel, M. (1993) *Arabidopsis* mutants deficient in the synthesis of α -linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase. *J. Biol. Chem.* **268**: 16345-16351.

- Bruner, A.C., Jung, S., Abbott, A.G., Powell, G.C. (2001)** The naturally occurring high oleate oil character in some peanut varieties results from reduced oleoyl-PC desaturase activity from mutation of aspartate 150 to asparagine. *Crop Sci.* **41**: 522-526.
- Buhr, T., Sato, S., Ebrahim, F., Xing, A., Zhou, Y., Mathiesen, M., Schweiger, B., Kinney, A., Staswick, P. (2002)** Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. *Plant J.* **30**: 155-163.
- Caiveau, O., Fortune, D., Cantrel, C., Zachowski, A., Moreau, F. (2001)** Consequences of $\omega 6$ -oleate desaturase deficiency on lipid dynamics and functional properties of mitochondrial membranes of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**: 5788-5794.
- Callis, J., Fromm, M., Walbot, V. (1987)** Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* **1**: 1183-1200.
- Cerutti, L., Mian, N., Bateman, A. (2000)** Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 481-482.
- Chen, J., Dellaporta, S. (1994)** Urea-based plant DNA miniprep. In: Freeling M., Walbot V. (Eds). *The Maize Handbook*, pp. 526-527, Springer Verlag, New York.
- Cole, G., Coughlan, S., Frey, N., Hazebroek, J., Jennings, C. (1998)** New sunflower and soybean cultivars for novel vegetable oil types. *Fett/Lipid* **100**: 177-181.
- Dahlqvist, A., Ståhl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., Stymne, S. (2000)** Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme catalyses the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6487-6492.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D.C. (2000)** An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543-553.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H., Baulcombe, D.C. (2001)** SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **20**: 2069-2078.
- Dani, M., Catello, S. (1997)** Isolation and sequencing of the hazel FAd2-N gene. Patent: EP 0794250-A 1.
- De Block, M., De Brouwer, D., Tenning, P. (1989)** Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol.* **91**: 694-701.
- DeBonte, L.R., Hitz, W.D. (2000)** Canola oil having increased oleic acid and decreased linoleic acid content. US Patent 6063947.
- Dehesh, K., Jones, A., Knutzon, D.S., Voelker, T.A. (1996)** Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of *Ch FatB2*, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana*. *Plant J.* **9**: 167-172.
- Diaz, A.R., Mansilla, M.C., Vila, A.J., de Mendoza, D. (2002)** Membrane topology of the acyl-lipid desaturase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **277**: 48099-48106.
- Diepenbrock, W. (1984)** Einfluss der Temperatur auf die Fettsäurezusammensetzung von Triglyceriden und Galaktolipiden aus Rapssamen (*Brassica napus* L.). *Z. Acker- und Pflanzenbau* **153**: 208-215.

- Diepenbrock, W., Wilson, R.F. (1987)** Genetic regulation of linolenic acid concentration in rapeseed. *Crop Sci.* **27**: 75-77.
- Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P.A., Boland, W., Zähringer, U., Heinz, E. (2003)** New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal $\Delta 12$ -fatty acid desaturases. *Plant Physiol.* (im Druck).
- Downey, R.K., Taylor, D.C. (1996)** Diversification of canola/rapeseed fatty acid supply for the year 2000. *Oléagineux Corps Gras Lipides* **3**: 9-13.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001)** Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**: 6877-6888.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C., Vaucheret, H. (2000)** AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 11650-11654.
- Fagard, M., Vaucheret, H. (2000)** (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 167-194.
- Falcone, D.L., Gibson, S., Lemieux, B., Somerville, C. (1994)** Identification of a gene that complements an *Arabidopsis* mutant deficient in chloroplast $\omega 6$ -desaturase activity. *Plant Physiol.* **106**: 1453-1459.
- Fiedler, U., Filistein, R., Wobus, U., Bäumlein, H. (1993)** A complex ensemble of *cis*-regulatory elements controls the expression of a *Vicia faba* non-storage seed protein gene. *Plant Mol. Biol.* **22**: 669-679.
- Fiedler, U. (1996)** Hochexpression rekombinanter Antikörperfragmente in transgenen Pflanzen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Finnegan, J., McElroy, D. (1994)** Transgene inactivation: plants fight back! *Bio/technology* **12**: 883-888.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1996)** Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8449-8454.
- Fourmann, M., Froger, N., Brunel, D. (1999)** Amplified consensus gene markers : Tools designing for a genetic map of *Arabidopsis*-known-function genes in *Brassica*. NCBI GenBank.
- Frentzen, M. (1993)** Acyltransferases and triacylglycerols. In: *Lipid Metabolism in Plants*. T.S. Moore, Jr., ed., pp. 195-231, CRC Press.
- Fulda, M., Heinz, E., Wolter, F.P. (1997)** *Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. *Plant Mol Biol.* **33**: 911-922.
- García-Díaz, M.T., Martínez-Rivas, J.M., Mancha, M. (2002)** Temperature and oxygen regulation of oleate desaturation in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiol. Plant.* **114**: 13-20.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K., Somerville, C. (1994)** Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast $\omega 3$ desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **106**: 1615-1621.
- Gorbert, D.W., Knauff, D.A. (1997)** Registration of SunOleic 95R. *Crop Sci.* **37**: 1392.

- Hage, T.G., Seither, C., Hildebrand, D. (2000)** Isolation of two cDNAs from *Vernonia galamensis* (Cass.) Less. encoding a microsomal oleate desaturase (FAD2) (accession nos. AF188263 and AF188264) and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae* (PGR 00-035). *Plant Physiol.* **122**: 1457.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C. (1999)** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. (2000)** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.
- Han, J. (1999)** β -Ketoacyl-CoA-Synthase Genes from *Brassica napus* L.: Functional characterization and promotor analysis. Dissertation, Universität Hamburg.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hannon, G.J. (2002)** RNA interference. *Nature* **418**: 244-251.
- Harwood, J.L. (1998)** Environmental effects on plant lipid biochemistry. In: *Plant Lipid Biosynthesis*; Harwood, J.L. (ed.), pp. 305-347, Cambridge University Press.
- Hawkins, D.J., Kridl, J.C. (1998)** Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola. *Plant J.* **13**: 743-752.
- Hay, B., Short, J.M. (1992)** ExAssist™ helper phage and SOLR™ cells for lambda ZAP ®II excision. *Strategies* **5**: 16-18.
- Hazebroek, J.P. (2000)** Analysis of genetically modified oils. *Prog. Lipid Res.* **39**: 477-506.
- Heppard, E.P., Kinney, A.J., Stecca, K.L., Miao, G.H. (1996)** Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiol.* **110**: 311-319.
- Hitz, W.D., Carlson, T.J., Booth, J.R. Jr., Kinney, A.J., Stecca, K.L., Yadav, N.S. (1994)** Cloning of a higher-plant plastid ω -6 fatty acid desaturase cDNA and its expression in a cyanobacterium. *Plant Physiol.* **105**: 635-641.
- Hitz, W.D., Mauvis, L.F., Ripp, K.G., Reiter, R.J., DeBonte, L., Chen, Z. (1995)** The use of cloned rapeseed genes for the cytoplasmatic fatty acid desaturases and the plastid acyl-ACP-thioesterases to alter relative levels of polyunsaturated and saturated fatty acids in rapeseed oil. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, H. Ling. Ltd., Dorset Press, Dorchester, Vol.2: pp. 470-472.
- Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T., Chilton, M.D. (1986)** The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* **168**: 1291-1301.
- Hugly, S., Kunst, L., Browse, J., Somerville, C. (1989)** Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of *Arabidopsis* deficient in lipid desaturation. *Plant Physiol.* **90**: 1134-1142.
- Hugly, S., Somerville, C. (1992)** A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiol.* **92**: 197-202.

- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L., Richards, E.J. (1999)** Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. Genet.* **22**: 94-97.
- Jin, U.H., Lee, J.W., Chung, Y.S., Lee, J.H., Yi, Y.B., Kim, Y.K., Hyung, N.I., Pyee, J.H., Chung, C.H. (2001)** Characterization and temporal expression of a ω -6 fatty acid desaturase cDNA from sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. *Plant Sci.* **161**: 935-941.
- Jones, J.D., Shlumukov, L., Carland, F., English, J., Scofield, S.R., Bishop, G.J., Harrison, K. (1992)** Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transgenic Res.* **1**: 285-297.
- Jones, A., Davies, H.M., Voelker, T.A. (1995)** Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. *Plant Cell* **7**: 359-371.
- Jung, S., Swift, D., Sengoku, E., Patel, M., Teule, F., Powell, G., Moore, K., Abbott, A. (2000a)** The high oleate trait in the cultivated peanut [*Arachis hypogaea* L.]. I. Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 796-805.
- Jung, S., Powell, G., Moore, K., Abbott, A. (2000b)** The high oleate trait in the cultivated peanut [*Arachis hypogaea* L.]. II. Molecular basis and genetics of the trait. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 806-811.
- Kajiwara, S., Shirai, A., Fujii, T., Toguri, T., Nakamura, K., Ohtaguchi, K. (1996)** Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of ethanol tolerance and the *FAD2* gene from *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4309-4313.
- Katavic, V., Taylor, D.C. (2000)** Isolation and characterization of full-length cDNA clone encoding a *Brassica napus* endoplasmic reticulum-bound Δ 12 oleate desaturase (FAD2). NCBI GenBank.
- Keller, U., Hölderich, W.F., Schmidt, M., Murrenhoff, H. (2001)** New environmentally friendly lubricants by chemical modification of oleochemicals. *Agro-Food-Industry Hi-Tech July/August*: 17-21.
- Kinney, A.J. (1996)** Development of genetically engineered soybean oils for food applications. *J. Food Lipids* **3**: 273-292.
- Kinney, A.J. (1998)** Plants as industrial chemical factories – new oils from genetically engineered soybeans. *Fett/Lipid* **100**: 173-176.
- Kinney, A.J., Cahoon, E.B., Hitz, W.D. (2002)** Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 1099-1103.
- Kirsch, C., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1997)** Rapid and transient induction of a parsley microsomal Δ 12 fatty acid desaturase mRNA by fungal elicitor. *Plant Physiol.* **115**: 283-289.
- Knutzon, D.S., Thompson, G.A., Radke, S.E., Johnson, W.B., Knauf, V.C., Kridl, J.C. (1992)** Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 2624-2628.
- Kodali, D.R., Fan, Z., DeBonte, L.R. (2002)** Plants, seeds and oils having an elevated total monounsaturated fatty acid content. US Patent 6.414.223.
- Koletzko, B. (1992)** Trans fatty acids may impair biosynthesis of long-chain polyunsaturates and growth in man. *Acta Paediatr.* **81**: 302-306.

- Koncz, C., Schell, J. (1986)** The promotor of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 383-396.
- Kridl, J.C., McCarter, D.W., Rose, R.E., Scherer, D.E., Knutzon, D.S., Radke, S.E., Knauf, V.C. (1991)** Isolation and characterization of an expressed napin gene from *Brassica rapa*. *Seed Sci. Res.* **1**: 209-219.
- Kris-Etherton, P.M., Yu, S. (1997)** Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **65** (5 Suppl): 1628S-1644S.
- Kunst, L., Browse, J., Somerville, C. (1989)** A mutant of *Arabidopsis* deficient in desaturation of palmitic acid in leaf lipids. *Plant Physiol.* **90**: 943-947.
- Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982)** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Lee, M., Lenman, M., Banas, A., Bafor, M., Singh, S., Schweizer, M., Nilsson, R., Liljenberg, C., Dahlqvist, A., Gummesson, P., Sjoedahl, S., Green, A., Stymne, S. (1998)** Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation. *Science* **280**: 915-918.
- Lindbo, J.A., Dougherty, W.G. (1992)** Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**: 725-733.
- Liu, Q., Singh, S.P., Brubaker, C.L. Sharp, P.J., Green, A., Marshall, D.R. (1999a)** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a microsomal ω -6 fatty acid desaturase from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Aust. J. Plant Physiol.* **26**:101-106.
- Liu, Q., Singh, S.P., Green, A., Brubaker, C.L. (1999b)** Cloning and sequence analysis of a novel member (Accession No.Y10112) of the microsomal ω -6 fatty acid desaturase family from cotton (PGR 99-063). *Plant Physiol.* **120**: 340.
- Liu, Q., Singh, S., Green, A. (2000)** Genetic modification of cotton seed oil using inverted-repeat gene-silencing techniques. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 927-929.
- Liu, Q., Singh, S.P., Green, A.G. (2002a)** High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiol.* **129**: 1732-1743.
- Liu, Q., Singh, S., Green, A. (2002b)** High-Oleic and High-Stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *J. Am. Col. Nutr.* **21**: 205S-211S.
- López, Y., Nadaf, N.L., Smith, O.D., Simpson, C.E., Fritz, A.K. (2002)** Expressed variants of Δ^{12} -fatty acid desaturase for the high oleate trait in spanish market type peanut lines. *Mol. Breeding* **9**: 183-190.
- Los, D.A., Murata, N. (1998)** Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**: 3-15.
- Lühs, W., Friedt, W. (1994a)** The major oil crops. In: *Designer Oil Crops*. Ed. D.J. Murphy, pp. 5-71, VCH, Weinheim.
- Lühs, W., Friedt, W. (1994b)** Non-Food uses of vegetable oils and fatty acids. In: *Designer Oil Crops*. Ed. D.J. Murphy, pp. 73-130, VCH, Weinheim.

- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., Vance, V.B. (2001)** HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* **13**: 571-583.
- Marillia, E.F., Taylor, D. (1999)** Cloning and nucleotide sequencing of a cDNA encoding a *Brassica carinata* FAD2 (PGR 99-068). *Plant Physiol.* **120**: 339.
- Martínez-Rivas, J.M., Sperling, P., Lühs, W., Heinz, E. (2001)** Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Mol. Breeding* **8**: 159-168.
- Matzke, A.J., Matzke, M.A. (1998)** Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 142-148.
- McConn, M., Hugly, S., Somerville, C., Browse, J. (1994)** A mutation at the *fad8* locus of *Arabidopsis* identifies a second chloroplast ω 3 desaturase. *Plant Physiol.* **106**: 1609-1614.
- McConn, M., Browse, J. (1996)** The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* **8**: 403-416.
- McConn, M., Browse, J. (1998)** Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* **15**: 521-530.
- Meesapyodsuk, D., Reed, D.W., Savile, C.K., Buist, P.H., Schäfer, U.A., Ambrose, S.J., Covello, P.S. (2000)** Substrate specificity, regioselectivity and cryptoregiochemistry of plant and animal ω 3 fatty acid desaturases. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 632-635.
- Mensink, R.P., Katan, M.B. (1990)** Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *New Engl. J. Med.* **323**: 439-445.
- Meyer, P., Heidmann, I. (1994)** Epigenetic variants of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 390-399.
- Meyer, P. (1998)** Stabilities and instabilities in transgene expression. In: K. Lindsey (Ed.) *Transgenic Plant Research*, pp. 263-275, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Millar, A.A., Smith, M.A., Kunst, L. (2000)** All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. *Trends Plant Sci.* **5**: 95-101.
- Miquel, M., Browse, J. (1992)** *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J. Biol. Chem.* **267**: 1502-1509.
- Miquel, M., James, D. Jr, Dooner, H., Browse, J. (1993)** *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6208-6212.
- Miquel, M.F., Browse, J.A. (1994)** High-oleate oilseeds fail to develop at low temperature. *Plant Physiol.* **106**: 421-427.
- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M.F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S.W., Pruss, G., Vance, V.B. (2002)** RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* **14** Suppl: S289-301.
- Möllers, C., Schierholt, A. (2002)** Genetic variation of palmitate and oil content in a winter oilseed rape doubled haploid population segregating for oleate content. *Crop Sci.* **42**: 379-384.

- Mongrand, S., Cassagne, C., Bessoule, J.J. (2000)** Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. *Plant Physiol.* **122**: 845-852.
- Morel, J.B., Mourrain, P., Beclin, C., Vaucheret, H. (2000)** DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **10**: 1591-1594.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A., Vaucheret, H. (2000)** *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**: 533-542.
- Münster A.G., Lühs, W., Borchardt, D.S., Wolter, F.P., Frentzen, M. (1998)** Experiments to optimize the channeling of erucic acid into the *sn*-2 position of transgenic rapeseed oil. In: J. Sanchez, E. Cerda-Olmeda, E. Martinez-Force (Eds.). *Advances in Plant Lipid Research*, Universidad de Sevilla: pp. 671-674.
- Mugendi, J.B., Sims, C.A., Gorbet, D.W., O'Keefe, S.F. (1998)** Flavor stability of high-oleic peanuts stored at low humidity. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**: 21-25.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990)** Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **7**: 599-609:
- Narocon Innovationsberatung Dr. H. Käb (2001)** Marktanalyse: Industrielle Einsatzmöglichkeiten von High Oleic Pflanzenölen. Hrsg. FNR. Gülzower Fachgespräche: Band 19.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr. (1997)** GeneDoc: a tool for editing annotation multiple sequence alignments. Distributed by the author, www.cris/~ketchup/genedoc.shtml.
- Norden, A.J., Gorbet, D.W., Knauft, D.A., Young, C.T. (1987)** Variability in oil quality among peanut genotypes in the Florida breeding program. *Peanut Sci.* **14**: 7-11.
- Nykanen, A., Haley, B., Zamore, P.D. (2001)** ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**: 309-321.
- Ohlrogge, J.B. (1994)** Design of New Plant Products: Engineering of Fatty Acid Metabolism. *Plant Physiol.* **104**: 821-826.
- Ohlrogge, J., Browse, J. (1995)** Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957-970.
- Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., Lark, E., Browse, J. (1994)** *Arabidopsis* *FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* **6**: 147-158.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., Vaucheret, H. (1997)** Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* **16**: 4738-4745.
- Parkin, I.A.P., Sharpe, A.J., Keith, D.J., Lydiate, D.J. (1995)** Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome* **38**: 1122-1131.
- Pleines, S., Friedt, W. (1989)** Genetic control of linolenic acid concentration in seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genetics* **78**: 793-797.
- Renaud, S., Lanzmann-Petithory, D. (2001)** Coronary heart disease: dietary links and pathogenesis. *Public Health Nutr.* **4**: 459-474.

- Roche, H., Zampelas, A., Knapper, J.M.E. (1998)** Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**: 552-560.
- Routaboul, J.M., Fischer, S.F., Browse, J. (2000)** Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiol.* **124**: 1697-1705.
- Rücker, B., Röbbelen, G. (1995)** Development of high oleic rapeseed. In: Proc. 9th Intern. Rapeseed Congress, Cambridge, UK: pp. 389:391.
- Rücker, B., Röbbelen, G. (1997)** Mutants of *Brassica napus* with altered seed lipid fatty acid composition. Proc. 12th International Symposium on Plant Lipids, July 8-12 1996, Toronto, Canada. In: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids. Kluwer Academic Publishers: pp. 316-318.
- Salinas, J., Matassi, G., Montero, L.M., Bernardi, G. (1988)** Compositional compartmentalization and compositional patterns in the nuclear genomes of plants. *Nucleic Acids Res.* **16**: 4269-4285.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sayanova, O., Shewry, P.R., Napier, J.A. (1999)** Characterization and expression of a fatty acid desaturase from *Borago officinalis*. *J. Exp. Bot.* **50**: 411-412.
- Scheffler, J.A., Sharpe, A.G., H., Sperling, P., Parkin, I.A.P., Lühs, W., Lydiate, D.J., Heinz, E. (1997)** Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 583-591.
- Schierholt (2000a)** Hoher Ölsäuregehalt im Samenöl: genetische Charakterisierung von Mutanten im Winterraps (*Brassica napus* L.). Dissertation, Universität Göttingen.
- Schierholt, A., Becker, H.C., Ecker, W. (2000b)** Mapping a high oleic acid mutation in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **101**: 897-901.
- Schierholt, A., Rücker, B., Becker, H.C. (2001)** Inheritance of high oleic acid mutations in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Crop Sci.* **41**: 1444-1449.
- Schmidt, H., Heinz, E. (1990)** Involvement of ferredoxin in desaturation of lipid-bound oleate in chloroplasts. *Plant Physiol.* **94**: 214-220.
- Schmidt, H., Dresselhaus, T., Buck, F., Heinz, E. (1994)** Purification and PCR-based cDNA cloning of a plastidial n-6 desaturase. *Plant Mol. Biol.* **26**: 631-642.
- Schnurr, J.A., Shockey, J.M., de Boer, G.J., Browse, J.A. (2002)** Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129**: 1700-1709.
- Seffens, W.S., Almoguera, C., Wilde, H.D., Vonder Haar, R.A., Thomas, T.L. (1990)** Molecular analysis of a phylogenetically conserved carrot gene: developmental and environmental regulation. *Dev Genet.* **11**: 65-76.
- Shanklin, J., Whittle, E., Fox, B.G. (1994)** Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* **33**: 12787-12794.

- Shanklin, J., Cahoon E.B. (1998)** Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 611-641.
- Singh, S., van der Heide, T., McKinney, S., Green, A. (1995)** Nucleotide sequence of a cDNA (Accession No. X91139) from *Brassica juncea* encoding a microsomal ω -6-desaturase (PGR 95-107). *Plant Physiol.* **109**: 1498.
- Smith, M.A., Cross, A.R., Jones, O.T., Griffiths, W.T., Stymne, S., Stobart, K. (1990)** Electron-transport components of the 1-acyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine Δ 12-desaturase (delta 12-desaturase) in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons. *Biochem. J.* **272**: 23-29.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., Waterhouse, P.M. (2000)** Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**: 319-320.
- Solvatov, K.J.(1976)** Chemical mutagenesis in sunflower breeding. Proc. VIIth Int. Sunflower Conf.: pp. 352-357.
- Somerville, C., Browse, J. (1991)** Plant lipids: metabolism, mutants and membranes. *Science* **252**: 80-87.
- Srivastava, V., Anderson, O.D., Ow, D.W. (1999)** Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 11117-11121.
- Stoutjesdijk, P.A., Hurlestone, C., Singh, S.P., Green, A.G. (2000)** High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous Δ 12-desaturases. *Biochem. Soc.Trans.* **28**: 938-940.
- Stoutjesdijk, P.A., Singh, S.P., Liu, Q., Hurlestone, C.J., Waterhouse, P.A., Green, A.G. (2002)** hpRNA-mediated targeting of the Arabidopsis *FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol.* **129**: 1723-1731.
- Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K., Wallace, R.B. (1981)** Use of synthetic oligodesoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences. In: D. D. Brown, C. F. Fox, eds., *Developmental Biology Using Purified Genes*, pp. 683-693, Academic Press.
- Tanaka, A., Mita, S., Ohta, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K., Nakamura, K. (1990)** Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6767-6770.
- Tanhuanpää, P., Vilkki, J., Vihinen, M. (1998)** Mapping and cloning of *Fad2* gene to develop allele-specific PCR for oleic acid in spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*). *Mol. Breeding* **4**: 543-550.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997)** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- Tocher, D.R., Leaver, M.J., Hodgson, P.A. (1998)** Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog. Lipid Res.* **37**: 73-117.
- Tsimikas, S., Philis-Tsimikas, A., Alexopoulos, S., Sigari, F., Lee, C., Reaven, P.D. (1999)** LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an Oleate-supplement diet induces less monocyte chemotaxis and adhaesion when exposed to oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **87**: 403-406.

- Ucciani, E. (1995)** Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales-Composition en Acides Gras. Lavoisier, Paris.
- Ursin, V., Knutzon, D., Radke, S., Thornton, J., Knauf, V. (2000)** Production of beneficial dietary ω -3 and ω -6 fatty acids in transgenic canola. In: Abstracts of the 14th International Symposium on Plant Lipids: 13.
- Vance, V., Vaucheret, H. (2001)** RNA silencing in plants - defense and counterdefense. *Science* **292**: 2277-2280.
- Van de Loo, F.J., Fox, B.G., Somerville, C. (1993)** Unusual fatty acids. In: Lipid Metabolism in Plants. T.S. Moore, Jr., ed., CRC Press: 91-126.
- Vilkki, J.P. (1995)** Breeding of high oleic acid spring turnip rape in Finland. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, H. Ling. Ltd., Dorset Press, Dorchester, Vol.2: pp. 386-388.
- Voelker, T.A., Hayes, T.R., Cranmer, A.M., Turner, J.C., Davies, H.M. (1996)** Genetic engineering of a quantitative trait: metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of laurate in rapeseed. *Plant J.* **9**: 229-241.
- Voelker, T., Kinney, A.J. (2001)** Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 335-361.
- Voinnet, O. (2001)** RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**: 449-459.
- Voss, H. (2000)** Versuche zur gentechnologischen Modifikation von Triacylglycerolen durch Expression heterologer Lipoxygenasen in transgenem Lein. Dissertation, Universität Hamburg.
- Yanisch-Perron, C., Vierra, J., Messing, J. (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-109.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H. (1997)** Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13**: 335-340.
- Walkerpeach, C.R., Velten, J. (1994)** *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. *Plant Mol. Biol. Manual* **B1**: 1-19.
- Wallis, J.G., Browse, J. (2002)** Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Prog. Lipid Res.* **41**: 254-278.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., Sanger, H.L. (1994)** RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell.* **76**: 567-576.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., Wang, M.B. (1998)** Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 13959-13964.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T. (2001)** Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**: 834-842.
- Weier, D., Hanke, C., Eichelkamp, A., Lühs, W., Dettendorfer, J., Schaffert, E., Möllers, C., Friedt, W., Wolter, F.P., Frentzen, M. (1997)** Trierucoyl biosynthesis in transgenic plants of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Fett/Lipid* **99**: 160-165.

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**: 581-590.

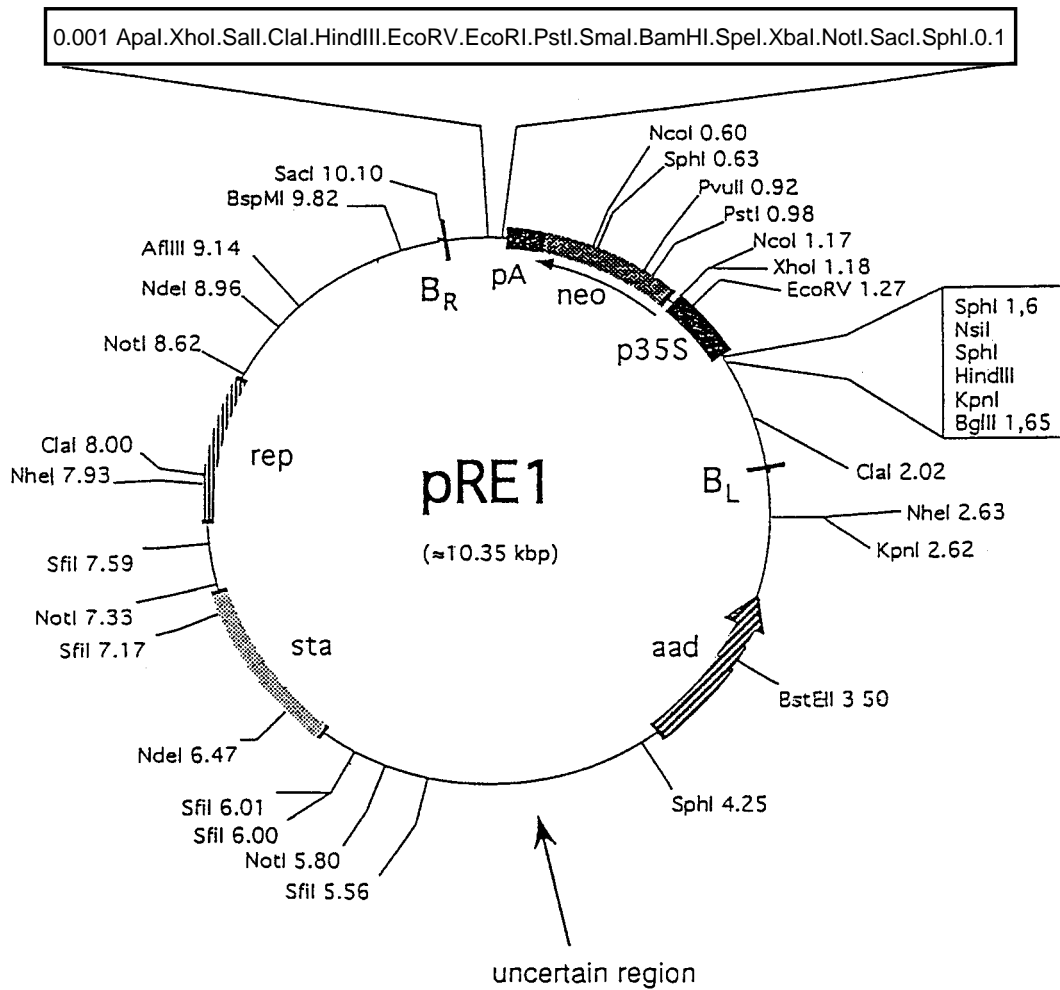
Wright, A. (1995) A gene conditioning high oleic maize oil, *OLC1*. *Maydica* **40**: 85-88.

Zou, J., Katavic, V., Giblin, E.M., Barton, D.L., MacKenzie, S.L., Keller, W.A., Hu, X., Taylor, D.C. (1997) Modification of seed oil content and acyl composition in the Brassicaceae by expression of a yeast *sn-2* acyltransferase gene. *Plant Cell* **9**: 909-923.

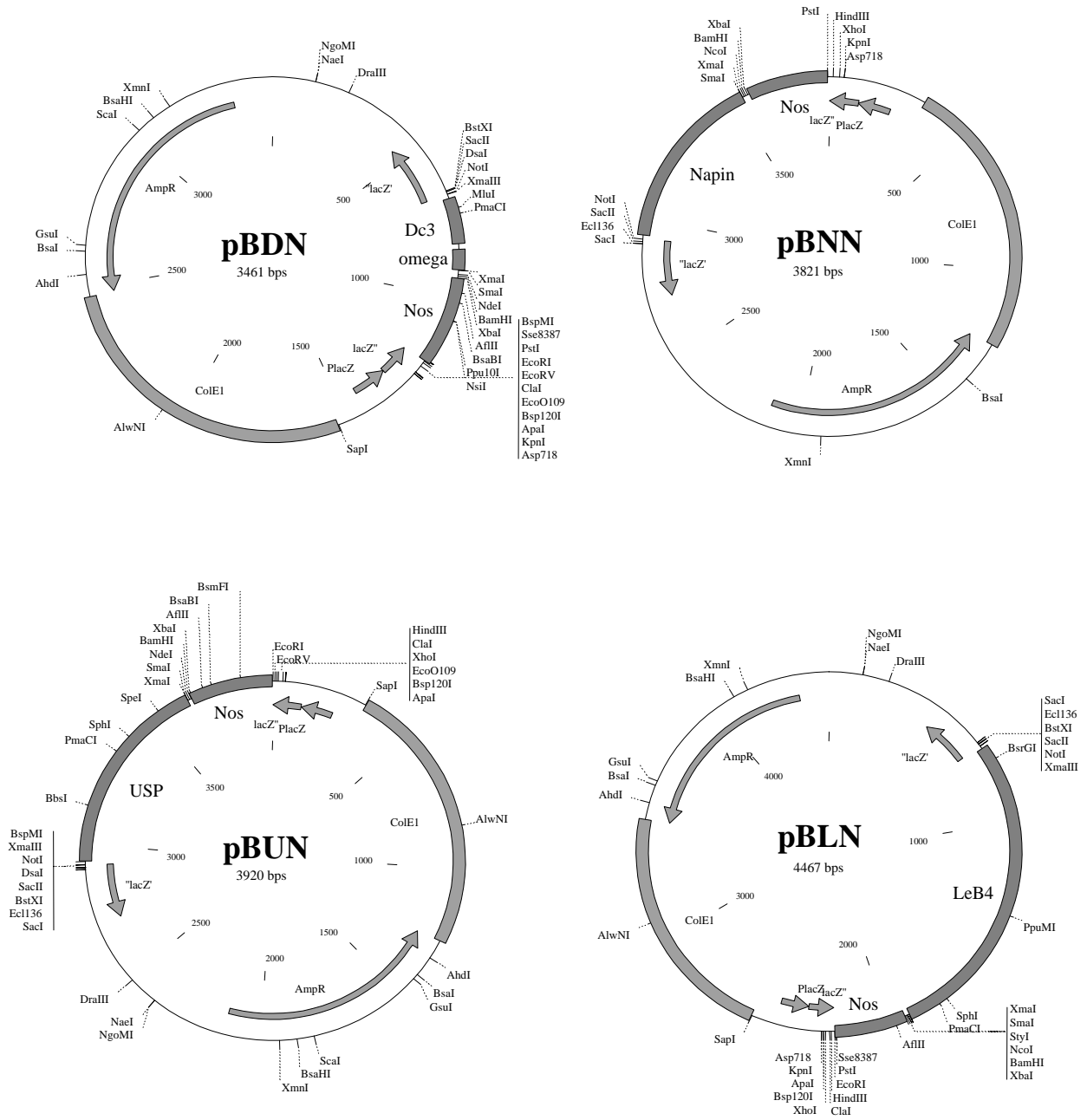
6. Anhang

Anhang 1: Vektorkarte pRE1

(hergestellt von Elke Filsak und Reinhard Töpfer, 1992, unveröffentlicht)



Anhang 2: Plasmidkarten der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Plasmide mit Promotor/Terminator-Kassetten



Anhang 3: Primer-Sequenzen

Die Orientierung (bezogen auf die Template) ist durch Pfeile angegeben. Start- und Stopcodon sind fettgedruckt, angefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und bezeichnet. Die Schmelztemperatur bezieht sich auf die zur Template komplementären Bereiche.

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m (°C)	Template/ Herkunft
PA16 (→)	ATGGGTGCAGGTGGAAGAATG	64	<i>BnFAD2</i>
PA45 (←)	CAGTTTCTTCTTTGCTT CATAAC	62	<i>BnFAD2-I</i>
PA30 (←)	TTCTTTCACCATCATATCC	60	<i>BnFAD2-II</i>
PA55 (→)	CGGGGTACCACATA ATGGGTGCAGGTGGAAGAATG	64	<i>BnFAD2</i>
	<i>KpnI</i>		
PA56 (←)	GCTCTAGACAGTTTCTTCTTTGCTT CATAAC	62	<i>BnFAD2-I</i>
	<i>XbaI</i>		
PA57 (←)	GCTCTAGATTCTTTCACCATCATATCC	60	<i>BnFAD2-II</i>
	<i>XbaI</i>		
PA23 (→)	ATGGCGTCAAGAATTGCTGATTC	66	<i>BnFAD6</i>
PA24 (←)	TCAGGCTGCGTAGTCAGGC	62	<i>BnFAD6</i>
PA49 (→)	ATAAGAATGCGGCCGCGTCGACCCCGAGCTAACCAC	46	Dc3- Promotor
	<i>NotI</i> <i>SalI</i>		
PA4 (←)	GGATCCCATATGCTCGAGCCCGGGTAATTGTAAATGTAATTG	42	Dc3- Promotor
	<i>BamHI</i> <i>NdeI</i> <i>XhoI</i> <i>XmaI/SmaI</i>		
PA31 (→)	GCGGCCGCGTCGACTAGTAGAAAGATTTGAGAGC	54	Napin- Promotor
	<i>NotI</i> <i>SalI</i>		
PA32 (←)	GGATCCCATGGCCCGGGTTTGTGTATGTTTGTAGTG	52	Napin- Promotor
	<i>BamHI</i> <i>NcoI</i> <i>XmaI/SmaI</i>		
PA37 (→)	ATAAGAATGCGGCCGCGTCGACCTGCAGCAAATTTACACATTG	58	USP- Promotor
	<i>NotI</i> <i>SalI</i>		
PA33 (←)	CGCGGATCCCATATGCCCGGGTTTGACTGGCTATGAAGAAAT	56	USP- Promotor
	<i>BamHI</i> <i>NdeI</i> <i>XmaI/SmaI</i>		
PA43 (→)	ATAAGAATGCGGCCGCGTCGACCGATTCAATTATTGAGAAAAAG	60	LeB4- Promotor
	<i>NotI</i> <i>SalI</i>		
PA44 (←)	CGCGGATCCCATGGCCCGGGTGTGACTGTGATAGTAAACAAC	60	LeB4- Promotor
	<i>BamHI</i> <i>NcoI</i> <i>XmaI/SmaI</i>		
PA34 (→)	CGCGGATCCCCCGGGCTCCCATCTACAACGACCG	64	<i>BnFAD2</i>
	<i>BamHI</i> <i>XmaI/SmaI</i>		
PA35 (←)	GGACTAGTTCATAACTTATTGTTGTACCAGAAC	66	<i>BnFAD2</i>
	<i>SpeI</i>		
PA36 (←)	GGACTAGTTGATGCGCCACGTGCGTGTC	66	<i>BnFAD2</i>
	<i>SpeI</i>		
PA38 (←)	GGAATTCATATGCCATGGTGATGCGCCACGTGCGTGTC	66	<i>BnFAD2</i>
	<i>NdeI</i> <i>NcoI</i>		
PA66 (→)	CGCGGATCCGCTCCCATCTACAACGACCG	64	<i>BnFAD2</i>
	<i>BamHI</i>		
PA47 (→)	CATGCCATGGCATATGGTACTCCTCAAAAAACCCATC	62	<i>BnFAD6</i> 2.Intron
	<i>NcoI</i> <i>NdeI</i>		
PA48 (←)	GGACTAGTCTGATAGAACGGTTCATAAC	60	<i>BnFAD6</i> 2.Intron
	<i>SpeI</i>		

PA79 (→)	CGGGATCCAGATCTTTACAGGGTCTTTGTGATAGGC <i>Bam</i> HI <i>Bgl</i> III	68	<i>BnFAD6</i>
PA80 (←)	GGAATTCATATGCCAAAAGTGATAGCCCAACCATG <i>Nde</i> I	68	<i>BnFAD6</i>
PA77 (→)	GCTCTAGAGGTGAACTGGCACTTCAACCTG <i>Xba</i> I	68	<i>BnFAD6</i>
PA78 (←)	GGACTAGTCCAAAAGTGATAGCCCAACCATG <i>Spe</i> I	68	<i>BnFAD6</i>
PA92 (→)	GTCAAGCAGATCGTTCAAAC	58	Nos-Terminator
PA87 (←)	GGGGTACCGTTCGACAAGCTTCTCGAGGTTCGATCTAGTAACATAGATG <i>Kpn</i> I <i>Sal</i> I <i>Hind</i> III <i>Xho</i> I	58	Nos-Terminator
MR1 (→)	AAGAARGCGATHCCGCCGCAITG	66	<i>FAD2</i>
MR2 (←)	YTCCATGGCRTKKTARTG	58	<i>FAD2</i>
PA90 (→)	GGAGAGGCTATTCGGCTATGAC	64	NPTII
PA91 (←)	CGAATCGGGAGCGGCGATAC	66	NPTII

Anhang 4: Nukleotid-Sequenzen isolierter *FAD6*-Klone aus *B. napus* mit abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen

FAD6 (genomischer Klon, 2101 bp) aus *B. napus* var. Drakkar in pPA9

Markierte Bereiche kennzeichnen Introns.

ATGGCGTCAAGAATTGCTGATTCTCTCTTCGCCTTCACGGTAAAAAAAAAAGTCTTCACCTTTACATTCTTCTCT
M A S R I A D S L F A F T

ATTGCCCATCACTACTAGTTGAGTTTCCCATCATCAATTTTGTTCCTTTGCTCATTTGGATTCTCAGGGCCACAA
G P Q

CAATGTCTTCTAGGGCTCCTAAGCTTGCTTCTGCTCGTCTTTCTCCTGGTACTCCTCAAAAAAACCCATCTTTT
Q C L P R A P K L A S A R L S P

TGTTCTGCAAGTGCAAAGTTGTTGTCTTTCTTATATGAATGCAGATGGCTGATGTTAGTGAACCGTTCTATCAGG
G

TGTGTATGCTGTGAGACCAATTGATCTTCTGTTAAAAGGAACCAGAAGAACATTCTTGTTCCTGCAAAGAAAAG
V Y A V R P I D L L L K G T R R T F L V P A K K R

GATTGGATGTATAAAAGCTGTCTTTGTCCCTGTGCGACCACCATCAGCTGATAATGCAGAAGACAGGGAACAGCT
I G C I K A V F V P V A P P S A D N A E D R E Q L

AGCAGAAAGCTATGGATTCAAACAAATTGGACAAGATCTTCTGATAACGTCACCTTGAAAGATATCATGGATAC
A E S Y G F K Q I G Q D L P D N V T L K D I M D T

CCTTCCCAAAGAGGTTATACAGCTTTTTCAATAAGCGTTGTGTGTGATTGATACTGAACTTCTTCTTGTCTTCA
L P K E

GGTGTGTTGAGATTGATGATGTGAAAGCATGGAAGTCTGTGTTGATATCTGTGACTTCCTATGCTTTGGGGCTCTT
V F E I D D V K A W K S V L I S V T S Y A L G L F

CATGATTGCGAAAGCTCCGTGGTATCTGCTTCCCTTGGCTTGGGCATGGACAGGAACTGCAGTTACAGGGGTAAG
M I A K A P W Y L L P L A W A W T G T A V T G

CCTCTCATCATCCACTGTCTCTTCTCTATGTGTCCTTGTACTTTACTCTTGTCTAAGTGCATTGTTTCTTTCTT

CTAGTTCTTTGTGATAGGTCATGATTGTGCTCATAAATCATTTTTCAAAGAACAAATTGGTTGAAGACATTGTGGG
F F V I G H D C A H K S F S K N K L V E D I V G

TACTCTAGCCTTCTACCTCTTGTGTACCCTTATGAGCCATGGCGGTTTAAGCACGACCGTCACCACGCCAAAAAC
T L A F L P L V Y P Y E P W R F K H D R H H A K T

CAACATGTAACTCTTACTTACTTAACTTAGACCCTTAAAGGTATTCACTATAGGATAAGTGATGACTTTGTTTCT
N M

CTATAGGTTAGTTCATGACACAGCTTGGCAACCAGTTCCTCCAGAGGAGTTTGATTTCGTCACCTGTTCTGCGAAA
L V H D T A W Q P V P P E E F D S S P V L R K

GGCGATTATTTTTGGATATGGCCCTATTAGGCCTTGGTTGTCCATAGCTCACTGGTATGTATATAAAGATTCACT
A I I F G Y G P I R P W L S I A H W

TTTACTCTTTACACAGTGATCAATTCTTCTTTTCTCTGTATACCTTTTTTACTTAAACGATTGTAATTGTTCTAACA

GGGTGAACTGGCACTTCAACCTGAGAAAGTTTCAGACCAAGTGAAGTGAATAGGGTGAAGATAAGTCTGGCTTGTG
V N W H F N L R K F R P S E V N R V K I S L A C

TTTTCGCCTTTCATGGCCGTTGGTTGGCCGCTGATCATATACAAAGTTGGTGTATTGGGATGGGTAAAGTCTGGT
V F A F M A V G W P L I I Y K V G V L G W V K F W

TGATGCCATGGTTGGGCTATCACTTTTGGGTAATGCTTCTCTCTTTTCGTTTGATAGAGCATCAGAAGCCACAA
L M P W L G Y H F W

TGGTTACACACTTATTGTTTATTCTATAGATGAGTACGTTTACAATGGTTTCATCATACGGCTCCACACATTCCTT
M S T F T M V H H T A P H I P

TCAAGCCTGCTGATGAGTGGAAACGCAGCTCAGGCCAGCTCAACGGAAGTTCATTGTGATTACCCTAGTTGGT
F K P A D E W N A A Q A Q L N G T V H C D Y P S W

AGTGCATCTCCACCTGCTAAGTTGGTGAAGTTAGTATTCTCTAAGTTTGGAGATTTCTTGTTTGACTTTCATATG

AATGTTTTGTGACAGGATTGAGATTCTCTGCCATGATATCAACGTACACATCCCGCATCACATAAGCCCAAGGAT
I E I L C H D I N V H I P H H I S P R I

ACCGAGCTACAATCTCCGTGCGGCTCATCAGTCTATAACAAGAGAACTGGGGAAAGGTAACAGCCACTTCTTATC
P S Y N L R A A H Q S I Q E N W G K

ACATAAAGCTTTGTGAATTTATATTTCACTGACAGAAGATTTGAGGTTTCTTTTGTGATGCAGTATACAAACTTGGC
Y T N L A

TACGTGGAATTGGCGGTTGATGAAGACGATAATGACTGTGTGCCATGTCTATGACAAAAGAGGAGAACTACATTCC
T W N W R L M K T I M T V C H V Y D K E E N Y I P

TTTTGATAGGTTAGCCCCTGAAGAATCGCAACCAATAACATTCCTCAAGAAAGCAATGCCTGACTACGCAGCCTG
F D R L A P E E S Q P I T F L K K A M P D Y A A *

A

FAD6 (cDNA, 1341 bp) aus *B. napus* var. *Ascari* in pPA7

ATGGCGTCAAGAATTGCTGATTCTCTATTTCGCCTTCACGGGCCCCACAACAATGTCTCCCCAGGGCTCCTCAAGTT
M A S R I A D S L F A F T G P Q Q C L P R A P Q V
GCTCATGCTCGTCTTTCTCCAGGTGTGTATGCTGTGAGACCTATTGATCTTCTATTAAAGGGAAAAGACGCATAGA
A H A R L S P G V Y A V R P I D L L L K G K T H R
AGGAGAACGTTTCTTGGTTTCTGCAAAGAAAAGGGTTGGATCTATAAAAAGCCGTGGCTGTTCCAGCCGCACCGCCT
R R T F L V S A K K R V G S I K A V A V P A A P P
TCAGCTGACAGTGCAGAAGAGAGGGAGCAGTTAGCAGAAAAGCTATGGGTTCGAACAAAATTGGACAAGATCTTCCCT
S A D S A E E R E Q L A E S Y G F E Q I G Q D L P
GATAATGTCACTTTAAAGATATCATGGACACACTCCCCAAAGAGGTGTTTGAGATTGATGATGTGAAAGCTTGG
D N V T L K D I M D T L P K E V F E I D D V K A W
AAGTCTGTGTTGGTATCTGTGACTTGCTACGCTTTGGGGCTCTTCATGATTTCCAAAGCGCCATGGTATCTGCTT
K S V L V S V T C Y A L G L F M I S K A P W Y L L
CCGTTGGCTTGGGCTTGGACAGGAACTGCAGTTACAGGGTTCTTTGTGATAGGCCATGATTGTGCTCATAAATCA
P L A W A W T G T A V T G F F V I G H D C A H K S
TTTTCAAAGAACAAATTGGTAGAAGACATTGTGGTACTCTAGCCTTCCCTACCTCTTGTATACCCCTATGAGCCA
F S K N K L V E D I V G T L A F L P L V Y P Y E P
TGGAGGTTTAAGCATGACCGTCATCACGCCAAAACCAACATGTTAGTTCATGATACAGCTTGGCAACCAGTTCCA
W R F K H D R H H A K T N M L V H D T A W Q P V P
CCAGAGGAGTTTGATTTCATCTCCGGTTCTGCGAAAAGCAATCATTCTTGGATATGGTCCAATCCGGCCTTGGCTG
P E E F D S S P V L R K A I I L G Y G P I R P W L
TCCATAGCTCACTGGGTGAACTGGCACTTCAATCTGAGAAAAGTTCAGACCAAGCGAAGTGAATAGGGTGAAGATA
S I A H W V N W H F N L R K F R P S E V N R V K I
AGCTTGGCTTGTGTTTTTCGCCTTCATGGCCGTTGGGTGGCCACTGATCATATACAAAGTTGGCATATTGGGATGG
S L A C V F A F M A V G W P L I I Y K V G I L G W
GTGAAGTTCTGGTTGATGCCATGGTTGGGCTATCACTTTTGGATGAGCACGTTTACGATGGTTCATCATAACAGCT
V K F W L M P W L G Y H F W M S T F T M V H H T A
CCACACATCCCTTTCAAGCCTGCGGATGAGTGGAACGCGGCTCAGGCACAGCTTAACGGAAGTTCATTGTGAT
P H I P F K P A D E W N A A Q A Q L N G T V H C D
TATCCTAGTTGGATTGAGATTCTCTGCCATGATATCAACGTACACATCCCACATCACATTAGCCCAAGGATACCA
Y P S W I E I L C H D I N V H I P H H I S P R I P
AGCTACAACCTCCGTGCGGCTCATGAGTCTATTCAAGAGAACTGGGGAAAAGTATACAAACCTTGGCTACTTGGAAC
S Y N L R A A H E S I Q E N W G K Y T N L A T W N
TGGCGCTTGATGAAGACAATAATGCTGTGTGCCATGTCTATAACAAAGAGGAGAACTACATTCCCTTTTGACCGAT
W R L M K T I M T V C H V Y N K E E N Y I P F D R
TAGCCCCAGAGGAGTCGCAACCAATAACATTCCCTCAAGAAAGCAATGCCTGACTACGCAGCCTGA
L A P E E S Q P I T F L K K A M P D Y A A *

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 1999 bis März 2003 in der physiologischen Abteilung des Instituts für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten der Universität Hamburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Heinz erstellt.

Herrn Prof. Dr. E. Heinz danke ich für die interessante Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung und seine Diskussionsbereitschaft.

Bei Frau Prof. Dr. M. Frentzen bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. K. Sonntag, BAZ Groß Lüsewitz, danke ich für die Raps-Transformationen im Rahmen des Verbundprojekts „Neuartige Öle“. Für die Lipid-Analytik der Ramschproben bedanke ich mich bei Herrn K. Zarhloul, Universität Gießen. Desweiteren danke ich den Mitarbeitern der Norddeutschen Pflanzenzucht, insbesondere Frau A. Zurborg, für die Bearbeitung der Pflanzen und die Halbkornanalysen.

Wiebke Hellmeyer danke ich für die Unterstützung bei den Lipidanalysen.

Ganz besonders danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen für die angenehme Laboratmosphäre und die zahlreichen anregenden Diskussionen sowie für ihre Hilfsbereitschaft und persönliche Unterstützung. Besonders erwähnen möchte ich Dr. Hjördis Drexler, Dr. Martina Leipelt, Astrid Meyer und Dr. Thorsten Zank. Bei Dr. Amine Abbadi und Dr. Jelena Kirsch bedanke ich mich für die Durchsicht des Manuskripts zu dieser Arbeit und die Unterstützung in der Endphase des Schreibens.