

**DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION BEI
KÄLTEGEHÄRTETEN WINTERROGGENBLÄTTERN
(*SECALE CEREALE* L.)**

**DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN**

**VORGELEGT BEIM FACHBEREICH BIOLOGIE/INFORMATIK
DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT
IN FRANKFURT AM MAIN**

**VON
OLIVER IN
AUS PADERBORN**

**FRANKFURT AM MAIN
2003**

Vom Fachbereich Biologie/Informatik der
Johann Wolfgang Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. J. Feierabend und PD Dr. T. Berberich

Datum der Disputation: 25. Februar 2004

FÜR

YVONNE & FREDERICK & MONIKA

 INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS & MAßEINHEITEN

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL & METHODEN	14
2.1 VERSUCHSPFLANZEN UND ANZUCHTBEDINGUNGEN	14
2.1.1 Ernte des Pflanzenmaterials	15
2.2 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME UND DEREN ANUCHTBEDINGUNGEN	15
2.3 HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN FÜR DIE ELEKTROPORATION	16
2.3.1 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	17
2.4 HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN FÜR DIE HITZESCHOCKBEHANDLUNG	17
2.4.1 Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien durch Hitzeschockbehandlung	18
2.5 ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS BLATTGEWEBE	18
2.5.1 RNA-Isolierung mit saurem Phenol (AGPC-Methode)	19
2.5.2 Isolierung von Poly-A ⁺ -RNA aus Gesamt-RNA	21
2.6 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON RNA IN EINEM AGAROSEGEL	22
2.7 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON NUCLEINSÄUREN-KONZENTRATIONEN	23
2.7.1 Restriktion von Plasmid-DNA	23
2.7.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel	24
2.7.3 Elution von DNA aus Agarosegelen	24
2.8 DER SOUTHERN BLOT	25
2.9 DER NORTHERN BLOT	26
2.10 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT α - ³² P-dCTP	26
2.11 NORTHERN & SOUTHERN BLOT HYBRIDISIERUNGEN MIT RADIOAKTIVEN SONDEN	27
2.12 DIE SYNTHESE VON COPY DNA (cDNA)	29
2.13 DIE ERSTELLUNG EINER cDNA-BANK AUS KÄLTEGEHÄRTETEN WINTER-ROGGENBLÄTTERN	30
2.14 DETEKTION & ISOLIERUNG VON cDNA-KLONEN AUS EINER cDNA-BANK	31
2.14.1 Die <i>In-vivo</i> -Excision von cDNA-Plasmiden	32

2.15 ISOLIERUNG VON cDNA-FRAGMENTEN DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE MIT DER „SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDISATION (SSH)“-TECHNIK	33
2.16 ISOLIERUNG VON cDNA-FRAGMENTEN DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE MIT DER „DIFFERENTIAL DISPLAY PCR“ („DD-PCR“)-METHODE	37
2.17 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN IN DEN PGEM-TEASY VEKTOR	40
2.18 DIE PLASMIDISOLIERUNG	41
2.18.1 Fällung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung	42
2.19 ISOLIERUNG VON LÖSLICHEN PROTEINEN AUS BLATTGEWEBE	42
2.20 ISOLIERUNG VON CHLOROPLASTEN	42
2.21 DIE ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON PROTEINEN IN EINEM SDS-POLYACRYLAMID-GEL (SDS-PAGE)	43
2.22 DER WESTERN BLOT	45
2.22.1 Die Detektion von Western Blots mit Antikörpern	46
2.23 DIE INDUZIERTE PROTEINPRODUKTION IN DEN PQE EXPRESSIONSVEKTORSYSTEM	47
2.24 AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEN PROTEINEN MIT HILFE DES „BATCH-VERFAHRENS“ UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN	47
3. ERGEBNISSE	49
3.1 ISOLIERUNG VON DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENEN AUS WINTERROGGEN (<i>SECALE CEREALE</i> L.)	49
3.1.1 Etablierung einer „SSH“-cDNA-Bank aus Winterroggen (<i>S. cereale</i> L.)	49
3.1.2 Überprüfung der differentiellen Expression	53
3.1.3 Analyse von cDNA-Fragmenten aus der „SSH“-cDNA-Bank, deren differentielle Expression sich nach Northern Blot Analysen nicht bestätigten	57
3.1.4 Gene aus der „SSH“-cDNA-Bank, deren differentielle Genexpression noch nicht bestätigt werden konnte	58
3.2 ISOLIERUNG VON cDNA-FRAGMENTEN DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE NACH DER „DD-PCR“-METHODE	58
3.2.1 Überprüfung der differentiellen Expression	61
3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER EXPRESSION VON SCPMSR	65
3.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION DER PROTEINE DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE	70
3.4.1 Isolierung eines cDNA-Klons von ScPMSR	70

3.4.2 Klonierung des ScPMSR cDNA-Klons in den Expressionsvektor pQE32	71
3.5 PRODUKTION DES REKOMBINANTEN SCPMSR-PROTEINS ZUR HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN	73
3.5.1 Überprüfung der Induktion von ScPMSR	73
3.5.2 Ermittlung der optimalen Inkubationszeit zur Induktion von ScPMSR	75
3.5.3 Aufreinigung des rekombinanten Proteins von ScPMSR	77
3.5.4 Test des ScPMSR Antikörpers	79
3.6 WESTERN BLOT ANALYSEN	80
3.6.1 Western Blot Analysen zur Untersuchung der Expression von SSU und LSU	80
3.6.2 Western Blot Analysen zur Untersuchung der Expression von LHCI b	81
3.6.3 Western Blot Analysen zur Untersuchung der Expression von ScPMSR	82
3.7 STAMMBAUM VON SCPMSR	86
4. DISKUSSION	88
5. ZUSAMMENFASSUNG	116
6. LITERATURVERZEICHNIS	118
7. ANHANG	
8. DANKSAGUNG	
9. LEBENSLAUF	

Abkürzungsverzeichnis und Maßeinheiten

A	Adenin
ATP	Adenosin Triphosphat
Bromphenolblau	Tetrabromphenolsulfonphtalein
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CHL	<u>C</u> old- <u>h</u> ardened- <u>l</u> eaves
cDNA	Copy Desoxyribonucleinsäure
DHL	<u>D</u> e- <u>h</u> ardened- <u>l</u> eaves
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribosenucleosidtriphosphat N= A, C, G, T
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
HAc	Essigsäure
H ₂ O-Bidest	Zweifach, destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
NaAc	Natriumacetat
NADP	Nikotinadeninucleotidphosphat
NADPH	Reduziertes Nikotinadeninucleotidphosphat
NHL	<u>N</u> on- <u>h</u> ardened- <u>l</u> eaves
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	-log (H ₃ O ⁺)
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
rRNA	Ribosomale Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SSC	Standard-Salz-Citrat-Puffer
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units, Einheiten
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid

A	Ampere
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius [0°C = 273,15 K]
d	Tag
Da	Molekularmasse [1 Da = 1,66 x 10 ⁻²⁴ g]
G, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
h	Stunde
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
m	Meter
min	Minute
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
s	Sekunde
V	Volt

1. EINLEITUNG

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen Anpassungsmechanismen entwickelt, die ihnen eine sessile Lebensweise unter wechselnden Umweltbedingungen ermöglichen.

Eine Vielzahl biotischer und abiotischer Umweltfaktoren nehmen Einfluß auf die Wachstumsrate und Fitness von Pflanzen. Zu den biotischen Faktoren, die ein Pflanzenleben nachhaltig negativ beeinflussen können, zählen beispielsweise alle Formen von parasitierenden Pilzen, sowie pathogene Bakterien und Viren. Gegen erhöhte Salzkonzentrationen, zu hohe Lichtintensitäten, Trockenheit und extreme Temperaturen, die u.a. die Gruppe der abiotischen Faktoren repräsentieren, muß die Pflanze ebenfalls gewappnet sein.

Unter den abiotischen Umweltfaktoren, welche die Pflanzen stark beeinträchtigen können, spielt Kälte eine Hauptrolle. Mit der Zeit gelang es den Pflanzen trotzdem Anpassungsmechanismen zu entwickeln, die ihnen auch die Besiedelung von höheren Gebirgslagen und Bereichen der Subarktik, aber auch, wie in den gemäßigten Breiten, ein Überdauern des Winters, ermöglichten.

Auf dem Agrarsektor stellen Kälte und Frost, vom ökonomischen Standpunkt aus betrachtet, limitierende Faktoren bei der Ausdehnung der Anbauflächen für Getreide und andere Nutzpflanzen dar. Zusätzlich können durch ungünstige Witterungsverhältnisse Ernteeinbußen auftreten. So entstand beispielsweise allein durch eine Kältewelle in Italien im Winter 2001/2002 ein Ernteschaden in Milliardenhöhe.

Winterroggen (*Secale cereale*) kann sich durch langfristiges Wachsen bei niedriger Temperatur an Kälte und Frost anpassen. Diese Adaption können beispielsweise Tabak oder Mais, denen eine entsprechende genetische Disposition fehlt, nicht erzielen. Diese Anpassung wird als „Kältehärtung“ bezeichnet (Öquist & Huner 1991). Nach erfolgter Kältehärtung ist Winterroggen sogar in der Lage, längere Perioden von Temperaturen bis zu -30°C zu überdauern. Nicht akklimatisierter Roggen kann Temperaturen unter -5°C nicht überstehen (Thomashow 1999).

Als Kälte werden allgemein Temperaturen von 0°C - 4°C und als Frost solche unterhalb der 0°C -Grenze definiert. Aber schon Temperaturen von 10 - 15°C (= Kühle) können sich auf Pflanzen aus wärmeren Klimazonen schädlich auswirken. Weitere Faktoren, die im Zusammenhang mit Kälteschäden von Bedeutung sind, sind die Dauer der Kälteperiode und die Geschwindigkeit der Temperaturenniedrigung.

Im allgemeinen verlangsamt die Kälte Stoffwechselfvorgänge. Sinkt allerdings die Umgebungstemperatur weiter unter die 0°C-Grenze, birgt dies zusätzlich die Gefahr, daß die Pflanze dehydriert und es zu mechanischen Zellschäden durch Eiskristallbildung kommt (Pearce 1999).

Die Kältehärtung geht mit zahlreichen morphologischen, metabolischen und physiologischen Veränderungen der Pflanze einher. So wird die Wachstumsgeschwindigkeit der Pflanze deutlich gedrosselt. Die vollständige Entwicklung des Primärblattes dauert bei kältegehärteten Roggenpflanzen, die bei 4°C wuchsen, etwa fünfmal so lange, wie bei nicht-gehärteten Pflanzen, die bei 22°C angezogen wurden. Kältegehärtete Pflanzen akkumulieren lösliche Zucker in ihren Zellen (Hurry et al. 1995; Savitch et al. 2000 & 2002). Sasaki et al. (2001) konnten beispielsweise demonstrieren, daß Keimlinge von Kohlpflanzen, die ebenfalls kältehärtbar sind, während der Kältehärtung Saccharose, Glukose und Fructose in ihren Zellen anreichern. Gleichzeitig verdreifachte sich im Zeitraum der Kältehärtung die Enzymaktivität der Saccharosesynthase. Nach einer fünftägigen Enthärtung hatte sowohl die Aktivität der Saccharosesynthase als auch die Konzentration an Saccharose selbst ihren Ausgangswert von vor Beginn der Kältehärtung erreicht. Da bereits ein Zusammenhang zwischen Ansammlung von Zucker in den Pflanzenzellen und Frosttoleranz hergestellt werden konnte (Tognetti et al. 1990; Guy et al. 1992), legt dies die Vermutung nahe, daß der erhöhte Zuckergehalt kryoprotektive Eigenschaften besitzen muß. Dies deutet wiederum darauf hin, daß ein veränderter Zuckerstoffwechsel ein Baustein der Kältehärtung ist. Außerdem konnte ein deutlich erhöhter Gehalt an Malat in kältegehärteten Roggenblättern nachgewiesen werden (Crecelius et al. 2003). Los & Murata (1998) schreiben Fettsäuredesaturasen eine Schutzfunktion bei Kälte zu. Diese Enzyme sorgen für einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren in den Zellmembranen, was die Fluidität der Zellmembranen bei Kälte stabil hält. Allein die bisher aufgeführten Beispiele aus den unterschiedlichsten Stoffwechselbereichen der Pflanzen verdeutlichen, daß viele Einzelkomponenten bei der Kältehärtung von Bedeutung sind.

Kälte (RGT-Regel!) verringert u.a. die Aktivität von Photosyntheseenzymen oder von anderen Stoffwechsellenzymen. Die kältebedingte Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit von enzymatischen Reaktionen zieht ein Energieungleichgewicht im pflanzlichen Haushalt nach sich (Huner et al. 1998). Die Kälte beeinflußt die enzymatischen Reaktionen der Dunkelreaktion der Photosynthese nämlich im weitaus stärkeren Maße, als die Aufnahme von Lichtenergie und den Elektronenfluß (Lichtreaktion). Da die Enzymaktivitäten

kältebedingt gedrosselt sind können in der Dunkelreaktion die von der Lichtreaktion angelieferten Reduktionsäquivalente nicht in gleicher Weise wie unter günstigen Temperaturbedingungen verarbeitet werden. Dies führt dann letztendlich zu einem Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und der Verwertung der Energie. Aufgrund dieses Ungleichgewichts können bei den Pflanzen photooxidative Schäden auftreten (Huner et al. 1993; Wise 1995). Tritt das Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverwertung auf, so konnte festgestellt werden, daß der Reduktionszustand von Qa (stabiler erster Elektronenakzeptor des PS II) deutlich erhöht war, was die Photoinhibierung des Photosystems II bei Kälte förderte (Öquist et al. 1993; Melis 1999; Streb & Feierabend 1999).

Die Photosyntheserate besitzt bezüglich des Lichts einen Sättigungspunkt (Owens 1996). Folglich verursachen zu hohe Lichtintensitäten ein Übermaß an Anregungsenergie (Osmond 1994). Ist der Lichtsättigungspunkt überschritten, wird die Lichtenergie weiter ungebremst absorbiert. Im Zuge dessen werden weiterhin Reduktionsäquivalente bereitgestellt. Dies übersteigt schließlich die photosynthetische Leistungskapazität der Pflanze und mündet in der Photoinhibierung der Photosynthese. Die Überreduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette forciert u.a. die Bildung von ROS (reactive oxygen species), welche die Pflanzenzelle schädigen können (Krause 1988; Long 1994; Fryer et al. 1998). Bei freien Radikalen handelt es sich um Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen. Im pflanzlichen Organismus tauchen die in Stoffwechselprozessen entstehenden Sauerstoffradikale (beispielsweise Hydroxylradikale, Superoxidationradikale) oder das Wasserstoffperoxid, das kein Radikal ist, immer wieder auf. Diese reaktiven Sauerstoffformen erweisen sich deshalb als so gefährlich, weil das einzelne Elektron danach strebt, ein Elektronenpaar zu bilden und zu diesem Zweck einem anderen Molekül ein Elektron zu entreißen. Im einzelnen sind Pigmente, Zellmembranen und Proteine, sowie Nukleinsäuren von Schädigungen durch reaktive Sauerstoffformen bedroht. Bei der licht- und sauerstoffabhängigen Photooxidation werden zum Beispiel die Photosynthesepigmente geschädigt, was ein Ausbleichen des betroffenen Blattes nach sich zieht (Powles 1984). Lipidmembranen sind reich an ungesättigten Fettsäuren und stellen ebenfalls ein herausragendes Angriffsziel für reaktiven Sauerstoff dar. Dabei kommt es zur Entstehung von Peroxylradikalen, was zu umfangreichen Schädigungen wie dem Verlust der Ionenpermeabilität oder der Verringerung der Fluidität der Membran führt (Roubal & Tappel 1966; Asada 1996).

Pflanzen gelang es, um photooxidative Schäden zu vermeiden, eine Vielzahl von photo-
 protektiven Mechanismen hervorzubringen. Es gibt eine Reihe von anatomischen
 Anpassungen, die zu einer Verringerung der Lichtabsorbktion führen und damit einen
 Schutz vor Lichtschäden bewirken können. So können sich Pflanzen mit einer licht-
 reflektierenden Cuticula oder durch eine vertikale Blattstellung behelfen, um die Licht-
 absorbktion zu reduzieren (Öquist & Huner 1991). Die Lichtabsorbktion kann aber auch
 durch eine veränderte Stellung des Chloroplasten gesenkt werden (Park et al. 1996).

Niedrige Temperaturen in Kombination mit hohen Lichtintensitäten stellen für den pflanz-
 lichen Organismus, je nach Art und genetischer Disposition, ein besonders gravierendes
 Streßpotential dar. Deshalb muß die Pflanze auf physiologischer Ebene besonders der
 kälteinduzierten Photoinhibierung entgegenwirken. Das Photosystem II und das Enzym
 Katalase sind von der Photoinhibierung im besonderen Maße betroffen. Das D1 Protein,
 welches ein Teil des Reaktionszentrums des PSII bildet, und das Enzym Katalase, das bei
 der Entgiftung von H₂O₂ in der Zelle eine Rolle spielt, sind beide lichtempfindlich und
 unterliegen bei Licht einem hohen Turnover (Hertwig et al. 1992; Aro et al. 1993). Wird
 nun die Neusynthese des D1-Proteins erschwert, kann dies zur lichtabhängigen In-
 aktivierung des Elektronentransports führen. Das oxidativ modifizierte D1-Protein wird
 proteolytisch abgebaut und nachfolgend neu synthetisiert (Ohad et al. 1985; Andersson et
 al. 1996). In diesem Zusammenhang reguliert hauptsächlich die Abbaurrate des D1-Proteins
 die eigene Neusynthese (Kim et al. 1993; Anderson & Aro 1994; Vasiliokotis & Melis
 1995; Tyystjärvi et al. 1996). Allerdings konnte ebenso demonstriert werden, daß der
 Abbau des D1-Proteins weder licht- noch elektronentransportabhängig ist (Ohad et al.
 1985). Die Degradation wird viel mehr über eine reversible Phosphory-
 lierung/Dephosphorylierung des D1-Proteins gesteuert (Koivuniemi et al. 1995; Rintamäki
 et al. 1996; Ebbert & Godde 1996; Baena-Gonzales et al. 1999).

Bei niedrigen Temperaturen zeigen sich photooxidative Schäden bedingt durch ROS be-
 reits unter moderaten Lichtverhältnissen (Wise 1995).

Somersalo und Krause (1989, 1990) konnten erstmals zeigen, daß kälteakklimatisierte Spi-
 natblätter eine erhöhte Toleranz gegenüber kältebedingter Photoinhibierung besitzen.
 Krause et al. (1999) beobachteten eine Resistenz gegen Photoinhibierung bei bereits aus
 differenzierten Blättern, wenn die Anzuchttemperaturen für die Dauer von 17 Tagen auf 1-
 6°C gesenkt wurden. Im Gegensatz dazu ist bei Roggen eine Anzucht bei Kälte er-
 forderlich, damit eine Resistenz gegen Photoinhibierung erworben werden kann (Öquist &

Huner 1991). Die durch Kälteakklimatisierung erlangte Resistenz gegenüber Photoinhibition bei kältegehärteten Roggenblättern wird u. a. auf eine gesteigerte Kapazität der Photosynthese zurückgeführt (Huner 1984; Öquist & Huner 1993). Kältegehärteten Roggenblättern gelingt es, bei hohen Lichtintensitäten den primären Chinonelektronenakzeptor Q_A effektiver oxidiert zu halten. Verglichen mit nicht-gehärteten Roggenpflanzen ergibt sich für das Redoxverhältnis von Q_A ($Q_{\text{aox}}/Q_{\text{ared}}$) ein größerer Wert (Öquist et al. 1993, Öquist & Huner 1993). Sane et al. (2003) zeigten, daß es einen Zusammenhang zwischen Kälteakklimatisierung und einer verstärkten Dissipation von überschüssiger Lichtenergie innerhalb des Reaktionszentrums von PSII bei kältegehärteten *Arabidopsis thaliana* gibt. Über ein erhöhtes Redoxpotential zwischen $P680^+$ und Q_A^- und einem verringerten Redoxpotential zwischen Q_A und Q_B kann $S_2Q_A^-$ stabilisiert werden. Eine erhöhte Menge an Q_A^- führt zu einer erleichterten Rückreaktion zu $P680^+$, welche zu einer Dissipation der überschüssigen Lichtenergie innerhalb des Reaktionszentrums von PSII führt.

Die Schutzmechanismen, die die Resistenz gegenüber Photoinhibition erhöhen können, sind breit gefächert. Streb et al. (1999) konnten feststellen, daß das Photosystem II und die Katalase unter Kälteeinfluß bei nicht-gehärteten Roggenpflanzen (NHL = non-hardened leaves) weitaus stärker lichtinaktiviert werden, als dies bei kältegehärteten Roggenpflanzen (CHL = cold-hardened leaves) der Fall ist. Ein Aspekt der erhöhten Resistenz gegenüber kalteinduzierter Photoinhibition des Photosystems II wird deshalb von Shang et al. (2003) auf eine effizientere Neusynthese des D1 Proteins und der Katalase bei 4°C zurückgeführt. Ein weiterer Baustein der Resistenz gegenüber Photoinhibition ist beispielsweise ein vermehrtes Vorkommen von Carotinoiden bzw. von Xanthophyllpigmenten in kältegehärteten Pflanzen, verglichen mit nicht-gehärteten Pflanzen. Yamamoto et al. (1962) konnten zeigen, daß Streß ausgelöst durch Starklicht zur Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin in den Thylakoiden führt und brachten diesen Vorgang mit einer Anpassung an oxidativen Streß in Verbindung. Das Carotinoid Zeaxanthin ist in der Lage, direkt die Anregungsenergie von Chlorophyllen über transiente Ladungstrennung zu übernehmen (Owens 1994). Demming-Adams & Adams (1996) schreiben der Wärmedissipation überschüssiger Energie durch nichtphotochemisches Fluoreszenzquenching eine bedeutende Rolle bei der Abwehr kaltebedingter Lichtschäden zu. In vielen kälteakklimatisierten Pflanzen konnte parallel dazu ein erhöhtes Vorkommen von Pigmenten des Xanthophyllzyklus beobachtet werden (Krol & Huner 1985; Koroleva et al. 1994; Thiele et al.

1996). Allerdings muß deutlich unterschieden werden zwischen kurzzeitiger kältebedingter Photoinhibierung und längerfristiger Resistenz gegen Photoinhibierung. In der Frühphase auftretende kältebedingte Photoinhibierung ist auch ohne größere Reparaturleistungen reversibel (Hurry & Huner 1992; Leitsch et al. 1994). Die Bedeutung von Zeaxanthin und den Pigmenten des Xanthophyll-Zyklus scheint bei der Ausprägung längerfristiger Resistenz gegen kältebedingte Photoinhibierung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die erhöhten Zeaxanthinwerte in CHL korrelieren nämlich nicht mit einer längerfristigen Anpassung an kältebedingte Photoinhibierung (Hurry et al. 1992; Thiele et al. 1996; Haldimann 1997; Streb et al. 1999).

Dalton (1995) hat den Stand der Kenntnis über die nicht enzymatischen Radikalfänger bzw. Elektronensinks, α -Tocopherol, Ascorbat und Glutathion in einem Übersichtsartikel zusammengefaßt. Das Verschwinden dieser Radikalfänger ist ein erstes Symptom der auftretenden kältebedingten Photooxidation. So sinkt bei Paprika unter Kälteeinwirkung und Lichtstreß sofort der Ascorbat- und Glutathiongehalt (Wise & Naylor 1987). Desweiteren konnte bei kältegehärteten Pflanzen eine Zunahme an Superoxiddismutase und Komponenten des Ascorbat-Glutathion-Zyklus nachgewiesen werden. (Schöner & Krause 1990; Jahnke et al. 1991; Zhang et al. 1995; Leipner et al. 1997; Pinhero et al. 1997; Fryer et al. 1998, Streb et al. 1999).

Setzt man nun die kältegehärteten Roggenpflanzen nach vollständiger Entwicklung des Primärblattes zu einer Temperatur von 22°C um, geht die erworbene erhöhte Toleranz gegenüber kälteinduzierter Photoinhibierung innerhalb von drei Tagen wieder verloren (Streb et al. 1999). Interessanterweise geht der Verlust der erworbenen Resistenz gegenüber kälteinduzierter Photoinhibierung in den enthärteten Blättern (DHL = dehardened leaves) nicht, wie man es vermuten könnte, mit einem parallel starken Absinken der oben erwähnten Antioxidanzien oder antioxidativ wirkenden Enzyme einher. Allein die Aktivität der Glutathionreduktase ist bei DHL deutlich geringer als bei CHL und geht annähernd auf das Niveau von NHL zurück. Gleichzeitig ist aber der Gehalt an Glutathionreduktase bei CHL nicht in dem Maße erhöht, daß man die Schlußfolgerung ziehen könnte, daß dieses Enzym eine limitierende Funktion bei der Kältehärtung innehält. Die bisher untersuchten antioxidativ wirkenden Enzyme können also nicht als begrenzende Faktoren der Kältehärtung angesehen werden. Es muß also davon ausgegangen werden, daß es noch andere Komponenten gibt, die Einfluß auf die Kältehärtung nehmen.

Temperaturwechsel zum Beispiel nehmen direkten Einfluß auf thermodynamische Prozesse und beeinflussen somit letztendlich auch alle physiologischen und biochemischen Abläufe in der Pflanze. Um in angemessener Weise auf das Umweltsignal Kälte reagieren zu können, muß von der Pflanze die Kälte zunächst registriert und das Kältesignal innerhalb des pflanzlichen Organismus weitergeleitet werden. Es folgt die Expression oder die Repression derjenigen Gene, die an der Stressantwort beteiligt sind. Schließlich müssen die gebildeten Enzyme und Proteine so aufeinander abgestimmt werden, daß die Pflanze unter den veränderten Temperaturbedingungen weiter bestehen kann.

Wie genau die Pflanzen „Kälte“ wahrnehmen, konnte noch nicht bis ins Detail aufgeklärt werden: Nach Einwirken niedriger Temperaturen auf den pflanzlichen Organismus ist die erste meßbare Veränderung der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Cytosol (Knight et al. 1991). Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen wird mit einer veränderten Membranfluidität der Zelle in Zusammenhang gebracht (Ovar et al. 2000). Knight et al. (1996) konnten zeigen, daß die Erhöhung des Calciumspiegels Voraussetzung ist, um die Expression von bestimmten kälteinduzierten Genen bei *Arabidopsis thaliana* voranzutreiben.

Ein Modell, welches die Regulation der Expression von Genen erklärt, die an der Antwort auf Frost bei *Arabidopsis* beteiligt sind, wurde von Thomashow und Kim et al. (2001) vorgestellt. In den Promoter-Regionen bestimmter COR-Proteine (cold-regulated-proteins) bei *Arabidopsis* wurden cis-Elemente ausgemacht, die mit Kältehärtung in Zusammenhang gebracht wurden. Dabei handelt es sich um so genannte DRE-Elemente (dehydration responsive elements), um low temperature regulatory elements (LTRE) oder CRT (c-repeats) mit einer konservierten, zentralen Sequenz CCGAC. Nachfolgend konnten zahlreiche Transkriptionsaktivatoren, die an das CRT/DRE-Element binden können, detektiert werden (CBF 1, 2, 3 oder DREB 1 a- 1c; Thomashow 1998, Liu et al. 1998). Chinnusamy et al. (2003) konnten die Existenz eines stromaufwärts lokalisierten Transkriptionsfaktors ICE I (inducer of CBF expression I) nachweisen, der bei Kälte die Transkription der CBF-Gene reguliert. Schon Gilmour et al. (1998) hatten vermutet, daß es einen Transkriptionsfaktor ICE gibt, weil die CBF/DREB-Gene selbst kälteinduziert sind, und das dieser Transkriptionsfaktor an die CBF/DREB-Promotoren binden kann. Über eine Protein-Protein Wechselwirkung kann das Protein SCOF-1 (soybean cold-inducible Factor 1) die Transkription der COR-Gene ebenfalls positiv beeinflussen (Kim et al. 2001). Das SCOF 1 Protein bindet an einen G-Box-Binding-Factor, welcher wiederum als Transkriptionsfaktor an das ABA-Responsive Element (ABRE) „andockt“, der im Promoter-

Bereich der COR-Gene sitzt. Als negativer Regulator, der die Expression der COR-Gene unterdrücken kann, gilt das Protein HOS1 (high expression of osmotically responsive genes) (Ishitani et al. 1998; Lee et al. 1999).

Einige Beobachtungen deuten darauf hin, daß Pflanzen eher einen Temperaturwechsel, als absolute Temperaturen „erfühlen“ können (Minorsky 1989). Plieth et al. (1999) untersuchten den Zusammenhang zwischen kältebedingtem Einstrom von Calcium-Ionen ins Cytosol und der Geschwindigkeit der Temperaturabsenkung. Sie stellten fest, daß umso mehr Calcium nachfolgend ins Cytosol strömte, je schneller die Temperatur abgesenkt wurde. In einer Veröffentlichung von Ndong et al. (2001) wird die These aufgestellt, daß ein Anpassen der Photosynthese an niedrige Temperaturen viele Gemeinsamkeiten mit einer Adaption der Photosynthese an Starklicht aufweist. Sowohl niedrige Temperaturen, als auch Starklicht führen nämlich zu einem vergleichbaren Redoxstatus des PSII, sprich zu einem ähnlichen Excitonendruck. Es scheint also auch in diesem Falle so, daß die Pflanze nicht direkt auf absolute Temperaturen oder absolute Beleuchtungsstärke reagiert, sondern auf die Änderung des Excitonendrucks des PS II (= relativer Redoxstatus von QA, dem ersten stabilen Elektronenakzeptor von PS II). In der Arbeit von Ndong et al. (2001) wurden differentiell exprimierte Gene gesucht, die über niedrige Temperaturen, hohe Lichtintensitäten oder den Excitonendruck reguliert werden. Dazu wurden vergleichende mRNA-Expressionsanalysen von Winterroggen, der bei sehr hohem und sehr niedrigem Excitonendruck herangezogen worden war, durchgeführt. Ein vergleichbar hoher Excitonendruck ergab sich, wenn Pflanzen bei 5°C und einer Beleuchtung von $250\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ oder bei 20°C und $800\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ herangewachsen waren. Demgegenüber herrschte ein niedriger Excitonendruck bei Roggen vor, der bei 5°C und $50\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ bzw. 20°C und $250\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ heranwuchs. Es konnte gezeigt werden, daß strikt unterschieden werden kann zwischen Genen, die über einen hohen Excitonendruck (z. B. Gen *Wcs19* oder die O-Methyltransferase), über niedrige Wachstumstemperatur (z. B. die Transketolase) oder die Lichtintensität (z.B Gen *Li2a*) reguliert werden.

Kälte beeinflusst nicht nur die Expression in photosynthetisch aktiven Blättern, sondern auch im Wurzelgewebe. In Microarrayexpressions-Studien von Kreps et al. (2002) an *Arabidopsis* wurde der Einfluß von drei Stressoren (Kälte, Salz und Hyperosmose) auf die Transkription von schätzungsweise 8100 Genen untersucht. Zu vergleichenden Studien wurde sowohl Blatt- als auch Wurzelgewebe herangezogen. Die Forscher analysierten Gene, deren Transkriptmengen sich nach der Einwirkung des Stressors verdoppelt hatten.

Zum einen konnte festgestellt werden, daß Kälte etwa bei doppelt so vielen Genen eine Veränderung der Transkriptmenge bewirkt als Salzstreß oder osmotischer Streß. Zum anderen teilen Blatt und Wurzel Veränderungen der Transkriptmenge bei weniger als 14% der untersuchten Gene. Auf molekularer Ebene wird also ein Akklimatisieren an Kälte und Frost durch ein verändertes Expressionsprofil in allen Gewebeteilen sichtbar.

Das Studium der Wirkungsweise von Proteinen und Enzymen ist unerlässlich, um molekulare und biochemische Zusammenhänge in der Zelle charakterisieren und verstehen zu können. Ein erster Versuchsansatz, um diese Zusammenhänge näher bestimmen zu können, ist die Untersuchung der Genexpression. Die Information über Struktur und Funktion von Proteinen ist im Erbgut auf der DNA festgeschrieben. Die Genexpression führt zur Synthese eines funktionellen und aktiven Proteins. Unter dem Begriff Genexpression werden Transkription und Translation zusammengefaßt. Die gesamte Genexpression unterliegt zahlreichen Regulations- und Kontrollmechanismen, die beispielsweise über Transkriptionsfaktoren beeinflußt werden können.

Die Untersuchungen von mRNAs können dazu dienen, Informationen über das von einer mRNA abgeleitete Protein oder Enzym zu sammeln. Das Vorhandensein oder die Abwesenheit von mRNA in einer Zelle läßt in der Regel die Vermutung zu, daß das von dieser mRNA kodierte Protein in der Zelle ebenfalls vorliegt oder fehlt. Oftmals gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge einer mRNA und der später synthetisierten Proteinmenge für das diese mRNA kodiert. Das Untersuchungsprinzip beruht nun im allgemeinen darauf, die mRNA-Pools von Organismen zu analysieren und nach Transkripten zu suchen, die unter bestimmten Streßbedingungen vermehrt vorliegen. Nur einige Gene werden nämlich fortwährend in der Zelle exprimiert (so genannte „housekeeping genes“ oder „Haushaltsgene“), die meisten anderen Gene unterliegen einer differentiellen Regulation und werden nur dann angeschaltet, wenn der Organismus das entsprechende von dieser mRNA kodierte Protein benötigt, um auf ein äußeres oder inneres Signal reagieren zu können. Die Sammlung an verschiedenen Genen mit unterschiedlichem Expressionsniveau wird zu einem Expressionsprofil zusammengetragen. Die nachfolgende Analyse des Expressionsprofils kann es dann ermöglichen, Rückschlüsse zu ziehen, wie ein Organismus auf molekularer Ebene auf innere und äußere Signale reagiert. Unterschiedliche molekularbiologische Techniken erlauben es nun, gezielt nach differentiell exprimierten Genen zu suchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das unterschiedliche Expressionsmuster von Genen, die in kältegehärtetem und in enthärtetem Winterroggen exprimiert werden, miteinander verglichen. Kältegehärteter Winterroggen, abgekürzt CHL (= cold hardened leaves), wächst unter den in dieser Arbeit gewählten Anzuchtbedingungen bei 4°C und 96µE über einen Zeitraum von 30 Tagen heran. Nach 30 Tagen Wachstum bei 4°C haben die Primärblätter den gleichen Entwicklungsstand wie bei einer Anzucht von 6 Tagen bei 22°C erzielt. Die Primärblätter sind zu diesem Zeitpunkt maximal entwickelt. Durch Überführen der kältegehärteten Roggenpflanzen nach 30 Tagen zu einer Temperatur von 22°C für den Zeitraum von drei Tagen findet die Enthärtung statt. Nach der dreitägigen Enthärtung der Winterroggenpflanzen ist die durch Kältehärtung erworbene Resistenz gegenüber kälteinduzierter Photoinhibierung wieder verloren gegangen. Diese Roggenblätter werden dann als DHL (= dehardened leaves) bezeichnet (Streb et al. 1999).

Der Verlust der erworbenen Toleranz gegenüber kälteinduzierter Photoinhibierung bei enthärteten Blättern (DHL) geht nicht, wie man es zunächst vermuten könnte, mit einem gleichzeitigen starken Absinken von Antioxidanzien oder antioxidativ wirkender Enzyme einher (Streb et al. 1999). Dies wirft natürlich, wenn die bisher untersuchten Antioxidantien und antioxidativ wirkenden Enzyme nicht als die entscheidenden Faktoren der Kältehärtung in Betracht kommen, die Frage auf, welche zusätzlichen Faktoren dann für die Kältehärtung mitverantwortlich sind.

In der vorliegenden Dissertation wurde erstmals ein Versuchsansatz gewählt, der es ermöglicht, nach limitierenden Faktoren der Kältehärtung zu suchen. Kälteinduzierte Gene können bei einer vergleichenden Expressionsanalyse von Pflanzen, die kurzfristig Kältestreß ausgesetzt wurden, und solchen Pflanzen, die keinem Kältestreß ausgesetzt wurden, erkannt werden. Diese kälteinduzierten Gene müssen nun aber nicht zwingend als limitierende Faktoren an dem längerfristigen Prozeß der Kältehärtung beteiligt sein. Werden aber die mRNAs aus kältegehärteten Roggenblättern mit den mRNAs aus enthärteten Blättern verglichen, so können dann Gene gefunden werden, die in kältegehärteten Pflanzen stärker exprimiert werden. Diese differentiell exprimierten Gene können, da sie nach Enthärtung deutlich seltener exprimiert werden, eine limitierende Funktion bei der Kältehärtung einnehmen. Die nachfolgende Untersuchung dieser differentiell exprimierten Gene kann Hinweise liefern, inwieweit die physiologischen und biochemischen Eigenschaften dieser Gene Einfluß auf den Prozeß der Kältehärtung nehmen.

Die moderne Molekularbiologie bietet die unterschiedlichsten Techniken an, um differentiell exprimierte Gene isolieren zu können. Zu diesem Zweck kamen in dieser Arbeit die Methoden „Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)“ (Diatschenko et al. 1996) und die „Differential Display-PCR (DD-PCR)“ (Liang & Pardee 1992) zum Einsatz.

Bei der „Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)“ handelt es sich um eine Methode, die es gestattet, differentiell exprimierte Gene einer mRNA-Population anzureichern und diese zu isolieren. In dieser Promotion wurde nach Genen gesucht, die verstärkt in kältegehärteten Roggenblättern exprimiert werden und deren Transkriptmenge nach Enthärtung deutlich zurückgeht. Im Folgenden wird der Versuchsablauf kurz skizziert (siehe auch Graphik S. 13). Aus kältegehärteten und enthärteten Blättern wurde zunächst PolyA+RNA isoliert, in cDNA revers transkribiert und mit dem Restriktionsenzym *RsaI* geschnitten. Im Genom kodierte Gene sind von unterschiedlicher Größe. In PCR-Reaktionen werden aber kürzere Gensequenzen häufiger amplifiziert als längere Gensequenzen. Die Restriktion der cDNAs mit *RsaI* vor der PCR-Reaktion stellte sicher, daß die höhere Amplifikationsrate von kürzeren Genen das Mengenverhältnis der längeren und kürzeren Gene zueinander durch die PCR-Reaktion nicht verfälscht. Die cDNA aus gehärteten Blättern wurde im weiteren Versuchsverlauf als Tester-cDNA, diejenige aus enthärteten Blättern als Treiber-cDNA bezeichnet. Die Versuchsstrategie bestand zunächst darin cDNA-Fragmente, die in beiden Populationen auftreten, und solche, die nur in der Tester-cDNA vorhanden sind, durch Subtraktion zu eliminieren. Am Ende blieben dann nur die cDNA-Fragmente, die allein in den kältegehärteten Blättern (Tester-cDNA) vorkommen, übrig. Zu diesem Zweck wurde die Tester-cDNA-Population zweigeteilt und die cDNA-Fragmente der beiden Portionen wurden mit zwei verschiedenen Adaptoren ausgestattet. Die Treiber-cDNAs blieben ohne Adaptor, da deren Vervielfältigung in der späteren PCR-Reaktion natürlich nicht erwünscht war. Die Tester-cDNA mit dem Adaptor 1 und die Tester-cDNA mit dem Adaptor 2R wurden, um eine Anreicherung der einzig in der Tester-cDNA Population vorliegenden Fragmente zu erhalten, jeweils mit Treiber-cDNA im Überschuß hybridisiert. In einem nachfolgend durchgeführten zweiten Hybridisierungsansatz wurden die beiden Portionen der ersten Hybridisierung vereinigt und nochmals mit Treiber-cDNA im Überschuß inkubiert. Während der zweiten Hybridisierung konnten nun die verbliebenen einzelsträngigen Tester-cDNAs, die unterschiedliche Adaptoren trugen, miteinander hybridisieren. In einer nachfolgenden PCR-Reaktion, die mit dem PCR-Primer 1 durch-

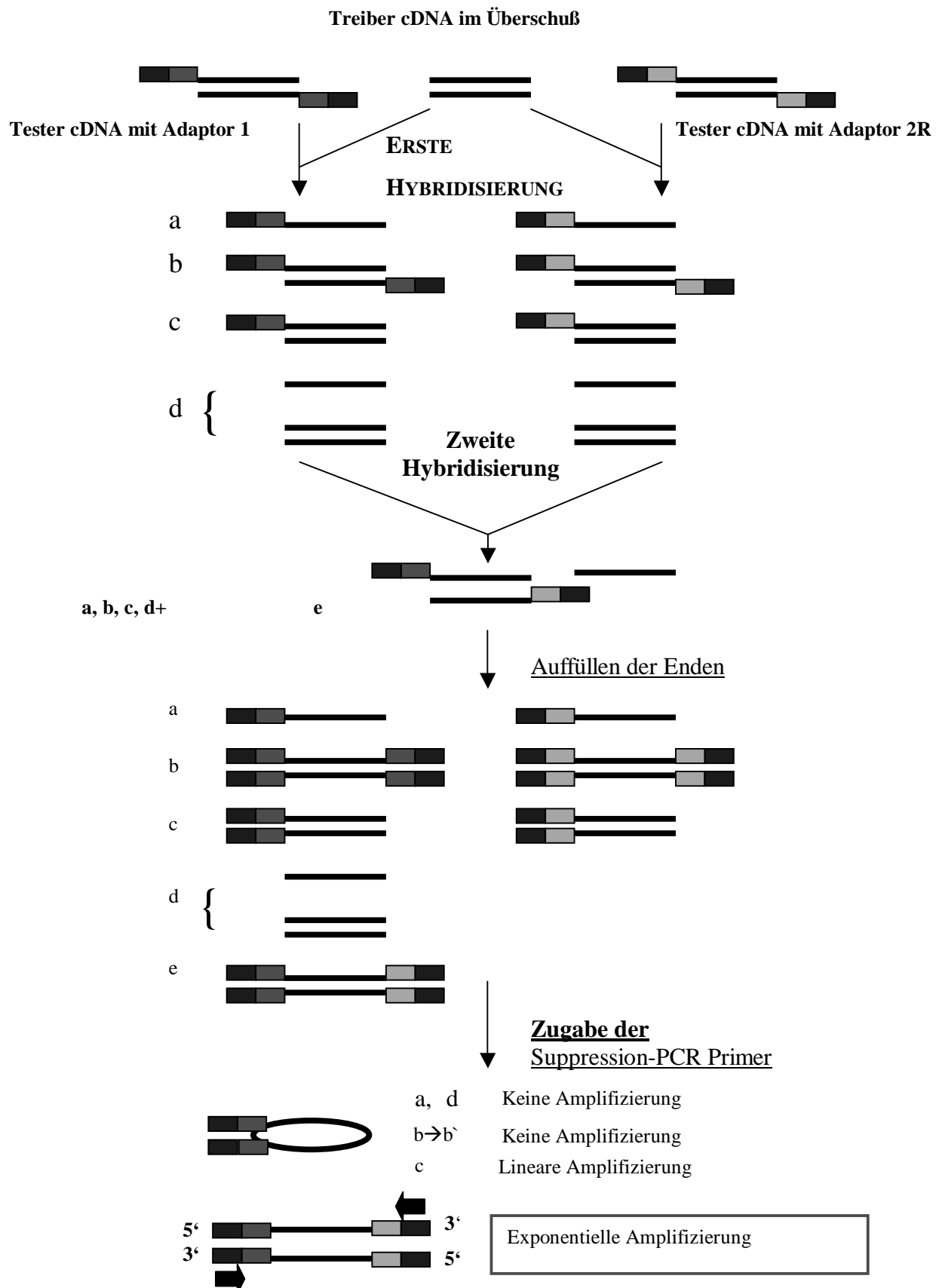
geführt wurde, dessen Sequenz identisch mit einem Abschnitt auf der Adaptorsequenz 1 und 2R war, wurden nur solche cDNA-Fragmente exponentiell amplifiziert, die beide Adaptoren trugen. Abschließend wurde abermals eine PCR-Reaktion, dieses Mal mit „nested Primern“ durchgeführt, die dazu diente, unspezifische Amplifikate zu reduzieren und die differentiell exprimierten Gene weiter anzureichern. Danach stand eine subtrahierte cDNA-Fragment-Bank mit Genen, die in kältegehärteten Roggenblättern verstärkt exprimiert werden, zur Verfügung.

Im Gegensatz dazu können mit der „DD-PCR“-Methode nicht nur Gene, die verstärkt in kältegehärteten Roggenblättern exprimiert werden, sondern auch solche Gene gewonnen werden, die nach Enthärtung durch vermehrte Transkriptmengen auffallen. Die „DD-PCR“-Methode wurde 1992 von Liang & Pardee vorgestellt. Es wurden 12 oligo-dT-Primer und 20 5'-Zufallsprimer so ausgewählt, daß jede Primerkombination etwa 50-100 verschiedene Amplifikate liefern sollte. Die Schwächen dieser Methode (beispielsweise gingen zu viele Amplifikate auf wenig informative Sequenzen des 3'-Endes zurück) wurden deshalb durch fortlaufende Neuerungen weiter reduziert, so daß heute nur noch jeweils ein einziger 10mer Primer in den PCR-Reaktionen eingesetzt werden muß. Die Primersequenzen wurden statistisch immer wieder mit bekannten Sequenzen von Genen abgeglichen, um die Möglichkeit zu erhalten, ein breites Spektrum an Genen amplifizieren zu können. Auch im Fall der vorliegenden Promotion wurde zunächst aus kältegehärteten und enthärteten Roggenblättern isolierte PolyA+RNA in cDNA revers transkribiert. In PCR-Reaktionen mit Zufallsprimern wurden die cDNAs amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden parallel auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, so daß differentiell exprimierte Gene durch einen unterschiedlichen Grad an Amplifikation (Intensitätsunterschiede der Ethidiumbromidfärbung der Fragmentbanden) hervorstachen. Diese Genbanden wurden aus dem Gel eluiert und kloniert.

Sowohl bei der „SSH“- als auch bei der „DD-PCR“-Methode können so genannte „Falschpositive“ auftreten. In Northern Blot Hybridisierungen mußte deshalb die differentielle Genexpression der Klone der „SSH“-cDNA-Bank und der „DD-PCR“ verifiziert werden.

Die Zielsetzung der Promotion war es, mit der „SSH“- und der „DD-PCR“-Methode nach differentiell exprimierten Genen bei kältegehärtetem Winterroggen (*S. cereale*) zu suchen. Befinden sich unter den isolierten Genen interessante Kandidaten die bei der Kältehärtung von Bedeutung sein könnten, so sollten diese weiterführenden Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene unterzogen werden.

Graphik : Subtraktive Hybridisierung



2. MATERIAL & METHODEN

2.1 VERSUCHSPFLANZEN UND ANZUCHTBEDINGUNGEN

Als Versuchspflanze dienten Keimlinge von Winterroggen (*Secale cereale* L. cv. Petkus „Halo“ Ernte 1998), die unter kontrollierten Bedingungen angezogen wurden.

Zur Oberflächensterilisation wurden Roggenkaryopsen in einer 3%igen (w/v) gefilterten Chlorkalk-Lösung 10 min lang vakuumfiltriert und für weitere 30 min in dieser Lösung bei Raumtemperatur belassen. Die Karyopsen wurden in entionisiertem Wasser für 1,5h unter mehrfachem Austausch des Wassers, vorgequollen. Anschließend wurden die gequollenen Karyopsen auf zwei Lagen Filterpapier (Machery & Nagel Mn 218), die zuvor mit Knop'scher Nährlösung angefeuchtet worden waren, in Plastikboxen ausgelegt und mit Glasplatten bedeckt.

In Anzuchtschränken wuchsen die Roggenpflanzen unter folgenden drei Bedingungen im Dauerlicht von Osram L/36N Natura und Phillips TL47W/47 Leuchtstoffröhren bei $96\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR heran:

- 5 Wochen bei einer Temperatur von 4°C (kältegehärteter Roggen = **CHL**, cold-hardened leaves)
- 5 Wochen bei einer Temperatur von 4°C und anschließend für 3 d bei 22°C (enthärteter Roggen = **DHL**, dehardened leaves)
- 6 d bei einer Temperatur von 22°C (nicht-gehärteter Roggen= **NHL**, non-hardened leaves)

Zu weiterführenden Experimenten wurden Roggenpflanzen wahlweise Lichtbedingungen von 20 bzw. $1000\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR ausgesetzt.

Die modifizierte Knop'sche Nährlösung (Feierabend & Schrader-Reichardt 1976) setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen, die in H₂O-Bidest gelöst wurden:

Knop'sche-Nährlösung

Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	2,4 mM	MnSO ₄ x H ₂ O	26,6 µM
KNO ₃	14,1 mM	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	5,2 µM
KH ₂ PO ₄	1,06 mM	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,16 µM
MgSO ₄	1,16 mM	H ₃ BO ₃	24,3 µM
KCl	0,95 mM	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	2,07 µM

Für den Fe-Komplex:

0,695g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ mit 0,93g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ in 80ml autoklaviertem H_2O lösen, kurz aufkochen und mit autoklaviertem H_2O auf 100ml auffüllen. Auf einen Liter Knop'sche Nährlösung kommen 1ml Fe-Komplex.

2.1.1 Ernte des Pflanzenmaterials

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden ausschließlich die Primärblätter der Roggenpflanzen verwendet.

Die Primärblätter wurden mit einer Pinzette aus den Koleoptilen gezogen, anschließend drei Zentimeter große Blattstücke aus der Blattmitte mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME UND DEREN ANZUCHTBEDINGUNGEN

Die verwendeten Bakterienstämme sind Abkömmlinge des Stammes *E.coli* K 12 und werden nach dem System von Demerec eingeteilt und benannt (Demerec et al. 1966).

DH 5 α ; F⁻, *endA1*, *hsdR17* (rk⁻,mk⁺), *supE44*, *thi-1*, *rec⁻*, *gyrA96*, *relA1*, O80*lacZ_M15* (Hanahan 1983)

XL-Blue; *endA1*, *hsdR17* (rk⁻,mk⁺), *supE44*, *thi-1*, lambda⁻, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, (*lac*-), [F['], *proAB*, *lacIZ_M15*, Tn10, (*tet^r*)]

(Bullock et al. 1987)

Anzucht der Bakterien

Die Bakterien wuchsen in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten. Zur Selektion von bestimmten Bakterien kam noch das Antibiotikum Ampicillin zum Einsatz.

LB-Flüssigmedium:

1%	Trypton (w/v)
0,5%	Hefeextrakt (w/v)
1%	NaCl (w/v)

Die abgewogenen Substanzen wurden in H₂O-Bidest gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt und abschließend wurde das LB-Medium durch Autoklavieren (20min; 120°C) sterilisiert (Sambrook et al. 1989).

Bei der Herstellung von LB-Agarplatten wurde das LB-Flüssigmedium vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Bactoagar versetzt. Das noch warme LB-Agarplatten-Medium wurde je nach Bedarf in runde Petrischalen (ca. 20ml pro Ø 90 mm-Platte) oder auf quadratische Plastischalen verteilt (ca. 450ml pro Platte 22,5 x 22,5 cm, 1,5% (w/v) Agar). Nach dem Erstarren des Agar wurden die Platten bei 4°C im Kühlraum gelagert.

Zur Herstellung der Ampicillin-Lösung wurde 40mg/ml Ampicillin-Na-Salz abgewogen, in H₂O-Bidest gelöst und sterilfiltriert (Schleicher & Schüll FP 027/3). Das nun gebrauchsfertige Antibiotikum wurde bei -20°C gelagert (Sambrook et al. 1989) und wurde in einer Konzentration von 40µg/ml als Selektionsmarker eingesetzt.

Die bei den Experimenten verwendeten Bakterien wuchsen in 3ml-Flüssigkultur bei 37°C über Nacht in 10ml-Reagenzgläsern in einem Schüttelinkubator bei 190 Upm heran.

2.3 HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN FÜR DIE ELEKTROPORATION

Mit einer Impföse wurde eine 3ml-Flüssigkultur mit einer Bakterienkolonie XL-1 Blue angeimpft. Die Bakterien vermehrten sich über Nacht bei 30°C im Schüttelinkubator (Fa. Braun Biotech Certomat H) bei 190 Upm. Am nächsten Morgen wurden 250ml LB-Flüssigmedium mit 1,5ml der 3ml-Übernachtskultur beimpft. Bei 37°C und 190 Upm wuchsen die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 heran. Die Kultur wurde in sterilisierte Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (20 min, bei 2°C, 4200 Upm/ Hermle ZK 401). Das Sediment wurde zweimal mit 200ml eiskaltem sterilem H₂O-Bidest resuspendiert und erneut, wie oben beschrieben, sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das mit 10ml eiskaltem, sterilem H₂O-Bidest resuspendierte Sediment wurde in vorgekühlte Falcon-Röhrchen (Fa. Roth) gegossen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4800 Upm, 2°C) wurde das Sediment in 10ml 10% Glycerinlösung aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Es wurde nochmals zentrifugiert (10 min, 4800 Upm, 2°C) und das Sediment in 2ml H₂O-Bidest und 2ml 10%iger Glycerinlösung aufgenommen. Jeweils 100µl der nun elektrokompenten Bakterienkultur wurden in Mikrozentrifugengefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.1 Transformation von *E.coli* durch Elektroporation

Zur Transformation wurde ein 100µl Aliquot an elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA (1µl bei der Verwendung des pGEM-Teasy Ligationskits, entspricht 1/10 des Ligationsansatzes) vorsichtig gemischt. Das Zell-DNA-Gemisch inkubierte weitere 5 min auf Eis und wurde dann luftblasenfrei in die vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Küvette wurde in den Küvettenhalter geklemmt und die Elektroporation erfolgte bei 1200V durch die Auslösung der Pulse-Taste (Fa. Eppendorf Elektroporator 2510). Nach erfolgter Elektroporation wurden 800µl SOC-Medium zu dem Transformationsansatz pipettiert und in ein Mikrozentrifugengefäß überführt. Das Ganze inkubierte 1h bei 37°C und 190Upm im Schüttelinkubator. Die transformierten Bakterien wurden abschließend auf mit Ampicillin versehenen LB-Platten ausplattiert. Die LB-Platten wurden bei 37°C über Nacht in den Brutschrank gestellt.

SOC-Medium:

1%	Trypton (w/v)
0,5%	Hefeextrakt (w/v)
1%	NaCl (w/v)
1M	KCl
0,1M	MgCl ₂
0,02M	Glucose (nach dem Autoklavieren hinzugefügt)

2.4. HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN FÜR DIE HITZESCHOCKBEHANDLUNG

Mit einer Impföse wurde eine Bakterienkolonie der Stammkultur von DH5α in eine 3ml-LB-Flüssigkultur überführt und wuchs bei 30°C im Schüttelinkubator über Nacht bei 190 Upm heran. Am nächsten Morgen wurden 250ml LB-Flüssigmedium in einem Erlenmeyer-Kolben mit 1ml der 3ml-Übernachtskultur angeimpft. Bei 37°C und 190 Upm wuchsen die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 heran. Die Kultur wurde in sterilisierte Zentrifugenbecher überführt und für 5 min bei 4000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 15ml kaltem TB-Medium resuspendiert und für 90 min auf Eis gestellt. Es wurde erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert und das Sediment in 2ml TB-Medium aufgenommen. Jeweils 100µl der kompetenten Bakterienkultur wurden in Mikrozentri-

fugengefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Nachfolgend ist das Rezept für das TB-Medium aufgeführt:

TB-Medium

10mM PIPES

15mM CaCl_2

250mM KCl

Mit KOH wurde ein pH-Wert von 6,7 eingestellt und anschließend noch MnCl_2 (55mM Endkonzentration hinzugefügt). Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.4.1 Transformation von *E.coli* Bakterien durch Hitzeschockbehandlung

Zur Transformation der Bakterien wurde ein $100\mu\text{l}$ Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zur transformierenden DNA vorsichtig gemischt. Das Ganze inkubierte für 30 min auf Eis, ehe das Zell-DNA-Gemisch (30s) bei 42°C einen Hitzeschock im Wasserbad erfuhr. Nach der Hitzeschockbehandlung erfolgte ein sofortiges Abkühlen der Proben für 2 min auf Eis. Die transformierten Bakterien wuchsen nach Zugabe von $800\mu\text{l}$ LB-Medium bei 37°C für 30 min heran. Am Ende wurden $50\mu\text{l}$ und $100\mu\text{l}$ des Transformationsansatzes auf mit Ampicillin versehenen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5 ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS BLATTGEWEBE

Um einem Abbau von RNA vorzubeugen, ist beim Isolieren und Experimentieren mit RNA grundsätzlich darauf zu achten, den Grad an Kontamination mit RNAsen so gering wie möglich zu halten. Dazu wurden alle benötigten Lösungen und Gefäße vorher autoklaviert oder mittels trockener Hitze von 130°C über Nacht sterilisiert. Die Behandlung der verwendeten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (1% Endkonzentration) trägt ebenso zur Erniedrigung der Aktivität von RNAsen bei.

Die Isolierung erfolgte mit Aurintricarboxylsäure nach der Vorschrift von Nagy et al. (1988).

Als erstes wurde das gefrorene Blattgewebe (1-2g) in einem gekühlten Mörser mit einem Pistill unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben. Dieses Pulver wurde, ohne daß es auftaute, in ein 50ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen überführt und mit dem

fünffachen Volumen an ATA-Extraktionspuffer versetzt. Durch kräftiges Schütteln und Inkubieren bei 50°C entsteht eine homogene Suspension. Diese Suspension wurde nach Zugabe einer 3 M KCl-Lösung (Endkonzentration 0,4M) 30 min auf Eis belassen. Dieser Schritt tauscht Na⁺-Ionen als Gegenion des SDS durch K⁺-Ionen aus und ermöglicht damit ein Ausfällen der denaturierten Proteine. Anschließend wurden die Zellreste und Proteine durch 20minütige Zentrifugation bei 10.000 x g (Hermle 401) und 4°C sedimentiert. Die im Überstand befindlichen Nukleinsäuren wurden unter Zugabe von 10 M LiCl (Endkonzentration 3 M) für eine Stunde auf Eis gefällt. Das durch anschließende Zentrifugation gebildete Sediment wurde in sterilem DEPC-H₂O resuspendiert und zweimal mit dem gleichen Volumen an TE-gesättigtem Phenol ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation (20°C, 10min, 14000 x g) kam es zur Phasentrennung. Die in der wässrigen Oberphase befindliche RNA wurde unter Zugabe von 1/10 Volumen 5 M NaCl und 2,5 Volumen eiskaltem 96%igen Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die gefällte RNA wurde erneut für 20 min bei 4°C und 14.000 x g sedimentiert und nach Waschen mit eiskaltem 70%igen Ethanol in 150µl DEPC-H₂O aufgenommen.

ATA-Extraktionspuffer: 50mM Tris-HCl (pH 8,0)
300mM NaCl
5mMEDTA
2% SDS (w/v)
1mM Aurintricarboxylsäure (ATA)

2.5.1 RNA-Isolierungsmethode mit saurem Phenol (AGPC-Methode)

Die so genannte AGPC-RNA-Isolierungsmethode wurde immer dann angewendet, wenn die isolierte RNA anschließend in cDNA revers transkribiert werden sollte. Die oben (2.5) beschriebene ATA-Methode eignet sich in diesem Falle nicht, da Spuren der Aurintricarboxylsäure in der RNA-Präparation die an der Erst- und Zweitstrangsynthese beteiligten Enzyme hemmen und es zu einer ineffizienten Umschreibung der RNA in cDNA kommen würde.

Das gefrorene Blattmaterial (0,5-1g) wurde in einem vorgekühlten Mörser mit einem Pistill unter Flüssigstickstoff aufgeschlossen, bis sich ein feines Pulver gebildet hat. Das Pulver wurde sofort, ohne daß das gemörserte Blattmaterial auftaute, in Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen überführt und mit 10ml Denaturierungspuffer und 70µl β-Mercaptoethanol

versetzt. Das Ganze wurde gut gemischt bis alle Klümpchen gelöst waren. Es wurde dann 1ml 2 M Na-Acetat pH 4,0 hinzupipettiert, gemischt, und 10ml saures Phenol (pH 4,5) hinzugefügt. Das Ganze wurde nach der Zugabe von 2ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) nochmals kräftig geschüttelt und anschließend für 15 min auf Eis gestellt. Nach der Zentrifugation (Fa. Hermle ZK 401) für 15 min bei 10.000 Upm und 4°C wurde der Überstand in einem neuen Zentrifugenröhrchen mit 10ml Isopropanol versetzt und 10 min bei RT die RNA gefällt. Es wurde wieder sedimentiert (10.000 Upm, 10 min, 4°C) und das Sediment mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen und, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Das Sediment wurde in 600µl DEPC-H₂O resuspendiert und in einem 1,5ml Mikro-zentrifugengefäß mit 300µl TE-gesättigtem Phenol und 300µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. In der Tischzentrifuge wurden die Phasen bei RT bei 14.000 Upm über 10 min getrennt. Die in der Oberphase (Volumen von ca. 800µl) befindliche RNA wurde in einem Mikro-zentrifugengefäß mit 200µl 10M LiCl-Lösung gemischt und 4h bei 4°C gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation (15 min, 14.000 Upm, 4°C) wurde das Sediment in 200µl DEPC-H₂O zurückgelöst und die RNA mit 20µl 3M Na-Acetat, pH 5,2 und 500µl 96%igem Ethanol eine Stunde bei -20°C gefällt. Die gefällte RNA wurde sedimentiert (15 min, 14.000 Upm, 4°C) und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die RNA trocknete an der Luft und wurde in 50µl DEPC-H₂O aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C eingefroren.

Für die AGPC-RNA-Extraktion wurden folgende Puffer benötigt:

- 1) 2M Na-Acetat (pH 4,0)**
- 2) 3M Na-Acetat (pH 5,2)**
- 3) 10M LiCl**
- 4) Denaturierungspuffer (4M Guanidinthiocyanat; 25mM Na-Citrat; 0,5% (w/v) N-lauroylsarcosin)**

2.5.2 Isolierung von Poly-A⁺-RNA aus Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Poly-A⁺-RNA aus Gesamt-RNA wurden, nachfolgend aufgeführte, verschieden konzentrierte Puffer und Oligo (dT) Cellulose verwendet.

- Hochsalzpuffer** **10mM Tris-HCl, (pH 7,5); 1mM EDTA; 0,5 M NaCl**
- 10x Probenpuffer** **10mM Tris-HCl, (pH 7,5); 1mM EDTA; 5 M NaCl**
- Niedrigsalzpuffer** **10mM Tris-HCl, (pH 7,5); 1mM EDTA; 0,1 M NaCl**
- Elutionspuffer/TE-Puffer** **10mM Tris-HCl, (pH 8,0); 10mM EDTA**

Dazu wurden 400mg Oligo (dT) Cellulose in 5ml Hochsalzpuffer in einem sterilen 30ml-Corex-Zentrifugengefäß bei Raumtemperatur für eine Stunde vorgequollen und anschließend abzentrifugiert (5 min, RT, 4.500 UPM). Der Überstand wurde verworfen und die gequollene Oligo (dT) Cellulose erneut in 2ml Hochsalzpuffer aufgenommen. Zur Isolierung der Poly-A⁺-RNA wurden pro Milligramm eingesetzter Gesamt-RNA 200µl dieser präparierten Suspension verwendet.

In einem Mikrozentrifugengefäß wurde 1mg Gesamt-RNA mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 1100µl gebracht, 10 min bei 65°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. In einem sterilisierten und silanisierten Corex-Gefäß wurden auf Eis 2500µl DEPC-H₂O und 400µl 10x Probenpuffer vorgelegt. Die denaturierte Gesamt-RNA wurde zu dem Ansatz pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch bei gelegentlichem Aufwirbeln der oligo (dT) Cellulose inkubiert. In dieser Zeit bindet die Poly-A⁺-RNA mit ihrem Poly-A-Schwanz an die Oligo (dT) Cellulose. Nach dieser Hybridisierung wurde die nun an die Oligo (dT) Cellulose gebundene Poly-A⁺RNA für 5 min bei 4500 x g sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 4ml Hochsalzpuffer resuspendiert und abermals sedimentiert. Das Waschen mit Niedrigsalzpuffer erfolgte auf die gleiche Weise, wie oben angeführt, bevor das Sediment erneut in 500µl Niedrigsalzpuffer aufgenommen und in Zentrifugationssäulchen (InVitrogen FastTrack) überführt wurde. In einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf 5402) wurde bei 4500 x g zentrifugiert und zweimal mit Niedrigsalzpuffer gewaschen und der jeweilige Durchlauf verworfen. Die Poly-A⁺-RNA wurde mit 300µl Elutions/TE-Puffer von der Säule gewaschen und mit 1/10 Volumen NaAc (3 M pH 5,0) und 2,5 Volumen Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Die gefällte Poly-A⁺-RNA wurde 60 min bei 14.000 x g bei 4°C sedimentiert und abschließend in 16µl Elutions/TE-Puffer aufgenommen.

Die isolierte Poly-A⁺-RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.6. ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON RNA IN EINEM AGAROSEGEL

Die Auftrennung von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem 1,2%igen Formaldehyd-Agarosegel.

Für 50ml Agarosegel wurden folgende Substanzen pipettiert und in der Mikrowelle geschmolzen:

- 600mg Agarose (Fa. Seakem)
- 35ml steriles H₂O-Bidest
- 5ml 10x MOPS-Puffer (0,2M MOPS; 0,05 M Na-Acetat; 0,5M EDTA pH 7,0)

Nach Abkühlen des Gemisches auf etwa 45°C wurde unter dem Abzug 10ml Formaldehyd hinzugefügt. Die noch flüssige Agarose-Lösung wurde in ein mit Klebeband (Fa. Beiersdorf) abgedichtetes und mit einem Probenkamm versehenes Gelbett gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Probenkamm herausgezogen und das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt. Als Laufpuffer diente eine 1x MOPS-Lösung. Das Gel wurde zunächst, ohne daß Proben aufgetragen wurden, für 10 min einer Stromstärke von 30mA ausgesetzt. Die RNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x MOPS-Puffer, 50% (v/v) Formamid und 15% (v/v) Formaldehyd gemischt.

Für einen Gesamtansatz von 15µl ergab sich folgendes Pipettierschema:

RNA (~ 2-4µg)	x µl
deionisiertes Formamid	7,5 µl
10 x MOPS-Puffer	1,5 µl
Formaldehyd	2,4 µl

Die Proben wurden bei 65°C für 5 min denaturiert. Nach sofortigem Abkühlen der RNA auf Eis wurden die abgekühlten Proben mit 1/10 Volumen RNA-Auftragspuffer versehen und konnten anschließend in die vorgeformten Geltaschen pipettiert werden. Die Elektrophorese erfolgte bei etwa 30mA, bis die Bromphenolblaufront das untere Drittel des Agarosegels erreicht hatte. Anschließend wurde das Agarosegel in einer Ethidiumbromidlösung (0,5µg Ethidiumbromid/ml H₂O-Bidest) unter leichtem Schütteln für 20 min gefärbt. In dieser Zeit konnte sich das Ethidiumbromid zwischen benachbarte Basenpaare schieben (interkalieren) bzw. bei der RNA anlagern, was ein späteres Sichtbarmachen der RNA bzw. DNA unter UV-Licht bei 302 nm ermöglichte. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde durch zehnminütiges Waschen des Gels in H₂O-Bidest entfernt.

Der **RNA-Auftragspuffer** setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen:

- 1mM EDTA, pH 8,0
- 50% (v/v) Glycerin
- 0,25% Xylencyanol
- 0,25% (w/v) Bromphenolblau

2.7 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER NUKLEINSÄUREN-KONZENTRATION

Die Konzentration von gelösten Nukleinsäuren kann über deren Extinktion im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260nm in einem Photometer bestimmt werden. Liegt bei einer Lösung einzelsträngiger Nukleinsäuren eine Extinktion von 1 vor, entspricht dies einer Konzentration von 40µg/ml, bei einer Lösung doppelsträngiger Nukleinsäuren ist eine Konzentration von 50µg/ml zu erwarten.

Folgende Formel dient der Berechnung der Konzentration:

$$C_{\text{RNA}} \text{ in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,04$$

$$C_{\text{dsDNA}} \text{ in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,05$$

2.7.1 Restriktion von Plasmid-DNA

Ein µg DNA wird mit einer Unit der gewünschten Restriktionsendonuclease in einem vom Hersteller angegebenen Restriktionspuffer für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Eine Unit ist die Menge eines Restriktionsenzym, die in einer Stunde bei 37°C ein µg DNA restringieren kann. Bei dem gleichzeitigen Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen („Doppelverdau“) ist in einer Tabelle des Herstellers nach einem Puffer zu suchen, der für beide Enzyme eine optimale Aktivität gewährleistet.

2.7.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel

Die Auftrennung der DNA erfolgte je nach erwarteter Länge der DNA-Fragmente in 0,7-1,2 % igen Agarosegelen.

Dazu wurde die abgewogene Agarose in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen und in ein mit Klebeband (Fa. Beiersdorf) abgedichtetes Gelbett, welches mit einem Probenkamm versehen wurde, gegossen. War das Gel erstarrt, konnten die Klebestreifen entfernt, der Probenkamm herausgezogen und das Gel in die mit 1x TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer gelegt werden. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versehen und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese fand bei einer konstanten Stromstärke von 40mA statt. Das Anfärben des Agarosegels und die Dokumentation wurden wie unter 2.6 beschrieben durchgeführt.

Der TAE-Puffer und der DNA-Auftragspuffer setzten sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

TAE-Puffer:

- 40mM Tris-HAc, pH 8,5
- 1mM EDTA, pH 8,0

DNA-Auftragspuffer:

- 0,25 % Bromphenolblau
- 0,25% Xylencyanol
- 30% Glycerol

2.7.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde der Qiaex II Gel Extraktion Kit der Firma Qiagen verwendet. Das Prinzip der Isolierung basierte auf den drei Reaktionsschritten: Auflösen der Agarose, Binden der DNA-Fragmente an Silicagel-Partikel und einem abschließenden Lösen der DNA von den Silicagel-Partikeln. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA wurde der Gelbereich, in dem sich die gewünschte DNA befindet, mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein Mikrozentrifugengefäß überführt. War das Gewicht des Gelstückes ermittelt, wurden pro 100mg Gel 300ml

des QX 1-Puffers und 10µl der QIAEX II Suspension, in der sich die Silicagel-Partikel befinden, bei 50°C unter gelegentlichem kräftigem Mischen für 10 min inkubiert. Danach wurde 30 sec bei maximaler Umdrehungszahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und das entstandene Sediment mit 500µl QX 1 Puffer gewaschen. Nach den Waschschritten mit zweimal je 500µl PE-Puffer ließ man das Sediment, bis es sich weiß abzeichnete, an der Luft trocknen. Um die DNA wieder von den Silicagel-Partikeln zu lösen, pipettiert man 20µl 10mM Tris-HCl, pH 8,5 zu dem Sediment. Das Ganze inkubierte 5 min bei 50°C im Heizblock. Durch Zentrifugation wurden die Silicagel-Partikel sedimentiert und die im Überstand befindliche DNA wurde in ein neues Mikrozentrifugengefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung können die DNA-Fragmente bei -20°C gelagert werden.

2.8 DER SOUTHERN BLOT

Die Technik des Kapillar-Transfers von Nucleinsäuren aus Agarosegelen auf Nitrocellulose-Membranen wurde von Southern 1975 entwickelt.

Die zu transferierende DNA wurde in einem Agarosegel in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Dokumentation der Auftrennung wurde nach dem Anfärben mit Ethidiumbromid-Lösung ein Polaroid-Photo angefertigt. Anschließend wurde die im Gel aufgetrennten Nucleinsäuren in einer Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5M NaCl) für 15 min bei RT auf den Schwenktisch denaturiert. In einer Edelstahlwanne wurde für den Transfer der Nucleinsäuren mit Hilfe von Glasplatten und Filterpapier eine Kapillarbrücke präpariert. Als Transferlösung diente 0,4 M NaOH. Es wurden, der Größe des Gels entsprechend, 4 Whatmannfilterpapiere (Fa. Whatmann 3 MM Filterpapiere), eine Nylonmembran (Porablot NY+, Fa. Macherey und Nagel) und eine vier cm starke Lage Saugpapier zurechtgeschnitten. Der Blotaufbau erfolgte, unter Vermeidung von Luftbläschen, wie nachfolgend beschrieben. Direkt auf die Kapillarbrücke wurden zwei Whatmannfilterpapiere gelegt, darauf wurde das Gel mit der Oberseite nach unten platziert. Auf das Gel wurde die Nylonmembran gelegt und den Abschluß bildeten zwei Whatmannfilterpapiere und der Stapel Saugpapier. Der Blotaufbau wurde mit einem Gewicht von 1 kg beschwert. Die Übertragung in alkalischer Transferlösung erfolgte bei RT für 16 bis 18 h. Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst in 2x SSC-Lösung neutralisiert, dann auf einem Whatmannfilterpapier für 30 min getrocknet und zur endgültigen

Fixierung der DNA mit UV-Licht für 40 sec mit 0,2 Joule bestrahlt. Die Membran konnte bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden.

2.9 DER NORTHERN BLOT

Die in einem Formaldehyd-Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde mit Kapillar-Blot-Technik auf eine Trägermembran übertragen. Die zu transferierende RNA wurde dazu, wie unter 2.6 beschrieben, präpariert und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit einer Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und unter UV-Licht photographiert. Es wurde, wie unter 2.8 „Der Southern Blot“ beschrieben, eine Transferwanne vorbereitet und die gleiche Anzahl an Whatmann Filterpapier, Nylonmembran und Saugtüchern zurechtgeschnitten. In diesem Fall war die verwendete Transferlösung allerdings 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat). Der Blotaufbau erfolgte wie unter 2.8 beschrieben. Die Übertragung mit 20x SSC-Transferlösung erfolgte bei RT für 16 bis 18 h. Nach dem Transfer wurde die Membran auf einem Whatmann Filterpapier für 30 min getrocknet und zur endgültigen Fixierung der RNA mit UV-Licht für 40 sec 0,2 Joule bestrahlt. Die Membran konnte bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden.

2.10. RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT α -³²P-DCTP

Zur Hybridisierung von Northern- und Southern Blots mit radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden die Fragmente durch „random priming“ (nach Feinberg & Vogelstein 1983) unter Einbau von α -³²P-dCTP radioaktiv markiert. Die 9mer Zufallsprimer banden je nach Sequenz an verschiedenen Stellen der zu markierenden einzelsträngigen DNA, welche als Matrize für die DNA-Polymerase diente. Durch die Verwendung von α -³²P-dCTP wurden so radioaktiv markierte Kopien des gewünschten DNA-Fragmentes synthetisiert.

In diesem Fall wurde der Ladderman Labeling Kit der Firma TaKaRa verwendet. Laut Anleitung wurden zunächst zwischen 10ng bis 25ng der zur markierenden DNA mit 2 μ l Zufallsprimern (9mer) versetzt mit H₂O-Bidest auf ein Volumen von 14 μ l gebracht. Die DNA-Probe wurde bei 95°C für 3 min denaturiert und anschließend sofort 5 min auf Eis

gestellt. Während dieser Zeit konnten die Zufallsprimer an die DNA binden. Als nächstes wurden 2,5µl 10x Puffer, 2,5µl dNTP Mix, 5µl radioaktiv markierte dCTP's (α -³²P-dCTP) und 1µl *Bca* DNA Polymerase zusammenpipettiert und für mindestens 10 min bei 50-55 °C im Heizblock inkubiert. Die Polymerase-Reaktion wurde durch die Zugabe von 1,5µl 0,5 M EDTA-Lösung (pH 7,5) abgestoppt. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden durch die Ausschlußchromatographie mit Hilfe von Biogel P 60 Partikeln von den markierten Fragmenten getrennt. 300µl der in TE-Puffer gequollenen Biogel P 60 Partikel wurden in ein 0,5µl Mikrozentrifugengefäß pipettiert. Der Boden des Mikrozentrifugengefäßes wurde zuvor mit einer Kanüle angestochen und in ein 1,5ml Mikrozentrifugengefäß gestellt. Durch eine einminütige Zentrifugation bei 1000 Upm wurden die Biogel P 60 Partikel sedimentiert und ein Teil des TE-Puffers sammelte sich im unteren Mikrozentrifugengefäß. Anschließend wurde der durchgelaufene TE-Puffer verworfen und die Markierungsreaktion auf die so präparierte Säule gegeben. Es wurde bei 2000 Upm für 2min zentrifugiert, wobei sich nun die markierte DNA im unteren Mikrozentrifugengefäß sammelte. Die markierte DNA konnte bis zur Anwendung im Hybridisierungsexperiment bei -20°C gelagert werden.

2.11 NORTHERN & SOUTHERN BLOT HYBRIDISIERUNGEN MIT RADIOAKTIVEN SONDEN

Die Northern Blots wurden in folgender Lösung in einer Hybridisierungsröhre bei 42°C hybridisiert. Es wurden 125µl Prähybridisierungslösung pro cm² Membranfläche eingesetzt.

Northern Blot Prähybridisierungslösung:

- 50 % Formamid (v/v)
- 3x SSC
- 50 mM Tris HCl, pH 7,5
- 1mM EDTA, pH 7,5
- 0,5% SDS
- 1x Denhardt's Lösung (Denhardt 1966)

Die Southern Blots wurden in folgender Lösung in einer Hybridisierungsröhre bei 65°C hybridisiert. Es wurden 125µl Prähybridisierungslösung pro cm² Membranfläche eingesetzt.

Southern Blot Prähybridisierungslösung:

- 5x SSC
- 1x Denhardt´s Lösung
- 0,1% SDS
- 40mM EDTA pH 7,5

Pro ml Sondenlösung wurden 100µg denaturierte Heringsspermien-DNA, die vorher 10 min bei 95°C denaturiert und für 5 min auf Eis abgekühlt worden war, eingesetzt.

Zur Prähybridisierung wurde die Membran mindestens drei Stunden in Prähybridisierungslösung in Hybridisierungsglasröhren bei 42°C bzw. 65°C im Hybridisierungsofen unter ständigem automatischem Drehen vorhybridisiert. Durch die Vorhybridisierung wurde die Membran unspezifisch abgedeckt. Die radioaktiv markierte DNA wurde ebenfalls für 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zur Prähybridisierungslösung pipettiert. Durch die Zugabe der radioaktiv markierten DNA wurde die Prähybridisierungslösung zur Hybridisierungslösung. Anschließend wurde über Nacht bei 42°C bzw. 65°C hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zunächst 20 min in Waschpuffer 1 (0,1% SDS; 2x SSC) auf dem Wipptisch unter leichtem Wippen bei Raumtemperatur und anschließend für 10 min in Waschpuffer 2 (0,1% SDS; 1x SSC) bei 42°C bzw. bei 60-65°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Röntgenfilmkassette mit einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) belegt. Nach der Exposition, die zeitlich stark variieren kann, wurde der Röntgenfilm entwickelt. Zur Entwicklung wurden die Filme für 4 min im Röntgenfilmentwickler (Fa. Adefo, 4-fach verdünntes Konzentrat) entwickelt. Der Entwicklungsvorgang wurde durch ein Stoppbad mit 2% Essigsäure beendet. Anschließend wurde der Röntgenfilm für 4 min in ein Fixiererbad (Fa. Adefo) gelegt und gut gewässert.

Sowohl Northern – als auch Southern Blots können mehrfach mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten hybridisiert werden. Dazu wurde die Membran zunächst „gestript“ (0,5%ige SDS-Lösung aufkochen und die Membran auf dem Schwenktisch so lange waschen, bis die Lösung Zimmertemperatur erreicht hat), d.h. von dieser wurden die radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten der vorher verwendeten Sonde abgewaschen.

2.12 DIE SYNTHESE VON COPY DNA (CDNA)

Die Synthese von copy DNA erfolgte unter Verwendung des Promega cDNA-Synthese-Kits.

Es wurden jeweils 2µg Poly-A⁺-RNA revers in cDNA transkribiert.

2µg Poly-A⁺-RNA wurden mit oligo dT Primern (0,5µg Primer/µg Poly-A⁺-RNA) versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 15µl gebracht. Das Primer-Poly-A⁺-RNA-Gemisch wurde für 10 min auf 70°C erhitzt und danach für 5 min auf Eis abgekühlt, so daß die Primer an die RNA binden konnten.

Für die Erststrangsynthese wurden folgende Komponenten der Reihe nach zu 25µl Reaktionsansatz pipettiert:

- 15 µl Primer-Poly-A⁺-RNA-Gemisch
- 5 µl Erststrangpuffer
- 1 µl RNAsin Ribonuclease Inhibitor (40U)
- 2,5 µl Natriumphosphat
- 1,5 µl AMV Reverse Transkriptase (30U)

Die Erststrangsynthese erfolgte für eine Stunde bei 42°C im Heizblock und wurde anschließend auf Eis gestellt.

Für die Zweitstrangsynthese wurden auf Eis zu den 25µl Reaktionsansatz der Erststrangsynthese folgende Substanzen zu einem Gesamtvolumen von 100µl pipettiert:

- 50 Zweitstrangsynthese-Puffer
- 3 µl DNA-Polymerase
- 0,5 µl RNase H
- 21,5 µl Nucleasefreies H₂O

Die Zweitstrangsynthese wurde über den Zeitraum von vier Stunden bei 14°C im Wasserbad durchgeführt. Zur Hitzeinaktivierung der Enzyme wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf 70°C erhitzt.

Es wurde 2µl T4 DNA Polymerase zu dem Ansatz pipettiert und bei 37°C für 10 min inkubiert. Die Polymerasereaktion wurde für 5 min auf Eis gestellt und durch die Zugabe von 10µl 0,2 M EDTA (pH 7,5) abgestoppt. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Volumen Phenol-Chloroform-IAA ausgeschüttelt und zur Phasentrennung für 5 min bei RT und 14.000 Upm zentrifugiert. Die cDNA wurde mit 0,1 Volumen 2,5 M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (96%) bei -20°C über Nacht gefällt. Die DNA wurde für 10 min bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert und das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA trocknete an der Luft und wurde in 20µl H₂O-Bidest aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.13 DIE ERSTELLUNG EINER cDNA-BANK AUS KÄLTEGEHÄRTETEN WINTERROGGENBLÄTTERN

Zur Errichtung einer cDNA-Bank aus kältegeharteten Winterroggen wurde das Reaktionskit „ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit“ der Firma Stratagene verwendet.

Als erstes wurde mit der AGPC-RNA-Isolierungsmethode (siehe 2.5.1) Gesamt-RNA aus den Blattmittelstücken der Primärblätter (ca. 2g eingesetzt) von kältegehartetem Winterroggen gewonnen. Danach wurde aus der Gesamt-RNA die Poly-A+-RNA (siehe 2.5.2) isoliert. Für die Synthese der doppelsträngigen cDNA wurden, wie in dem Reaktionskit von Stratagene vorgesehen, 5µg Poly-A+-RNA eingesetzt. Nach der cDNA-Synthese wurden an die Enden der cDNAs *EcoRI* Adaptoren ligiert und diese Enden phosphoryliert. Für die gerichtete Klonierung wurde die mit Adaptoren versehene cDNA mit dem Enzym *XhoI* restringiert. Die Größenfraktionierung der cDNA wurde mit einer Sepharose-Säule durchgeführt. Etwa 100ng cDNA wurden anschließend in den Uni-ZAP XR Vektor kloniert und nach dem Verpackungsprotokoll in Phagenköpfe verpackt. Bevor die cDNA-Bank auf quadratische LB-Platten ausgebracht wurde, mußte zunächst der Phagentiter ermittelt werden.

Dazu wurden XL 1 Blue Bakterienwirtszellen über Nacht in LB-Flüssigmedium bei 37°C angezogen. 1µl der Phagenbank wurde mit 99µl SM-Puffer verdünnt und anschließend wurde diese Verdünnung mit 100µl Wirtszellen vermischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Phagen/Wirtszellen-Suspension mit 3ml geschmolzener und auf 48°C abgekühlter Topagarose gemischt und sofort auf vorgewärmten (37°C) LB-Platten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die entstandenen Phagenplaques

gezählt und daraus die Phagendichte in pfu/ml nach der Formel Anzahl der Plaques x Verdünnungsfaktor x 10 errechnet.

Nach der Bestimmung der Phagendichte wurde die cDNA-Bank auf quadratischen LB-Platten (22,5 x 22,5 cm) ausplattiert. Dazu wurde die cDNA-Bank so ausplattiert, daß ein geschlossener Plaquerasen entstand, der die größtmögliche Anzahl an cDNA-Klonen pro Fläche sicherstellt. Die Wirtszellen wurden mit der errechneten Phagenkonzentration (etwa 300.000pfu/ LB-Platte einer Größe von 22,5 x 22,5 cm) infiziert, mit Topagarose auf quadratische LB-Platten ausplattiert. Die LB-Platte inkubierte über Nacht bei 37°C mit der Oberseite nach unten. Am nächsten Tag wurde die LB-Platte für 2 h bei 4°C belassen. Eine Nylonmembran (Porablot NY amp., Fa. Macherey und Nagel) wurde auf die Größe der Platte zurechtgeschnitten und 10 min bei 110°C autoklaviert. Die Membran wurde für 3 min luftblasenfrei auf den Phagenrasen gelegt. Zur späteren Orientierung wurden Membran und Platte mit einer Kanüle in asymmetrischen Mustern gekennzeichnet. Die Membran wurde vorsichtig abgezogen und 2 min in Denaturierungslösung (0,5M NaOH; 1,5M NaCl) gelegt. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Inkubation in Neutralisierungslösung (1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl, pH 8,0) und ein kurzes Spülen mit 0,2M Tris-HCl, pH 7,5/ 2x SSC. Nach dem Trocknen der Membran auf Whatmann-Filterpapier wurde die DNA mit UV-Licht fixiert.

2.14 DETEKTION & ISOLIERUNG VON CDNA-KLONEN AUS EINER CDNA-BANK

Die an die Nylonmembran gebundene Bakteriophagen-DNA wurde durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde nach den gesuchten Vollängklonen abgesehen. Die Bereiche, die nach dem Belegen der hybridisierten Membran auf dem Röntgenfilm geschwärzt waren, wurden, nach der zuvor vorgenommenen Orientierung, einem Ausschnitt auf der LB-Platte auf der cDNA-Bibliothek zugeordnet. Dieser Ausschnitt wurde mit einer sterilen Pasteurpipette großzügig aus dem LB-Agar herausgestochen und in ein Mikrozentrifugengefäß überführt. Es wurden 200µl SM-Puffer und 5µl Chloroform hinzugefügt, damit die im Agar enthaltenen Phagenpartikel während einer zweistündigen Inkubation bei RT in den SM-Puffer diffundieren konnten. Durch Zentrifugation für 5 min bei 10.000 Upm wurden Agar und Bakterienreste sedimentiert und das Chloroform und der SM-Puffer voneinander getrennt. Der Überstand mit den Phagen wurde in ein frisches Mikrozentrifugengefäß pipettiert. Es wurde eine 10⁻⁶ Verdünnung dieses Phagenstocks in

SM-Puffer angelegt. Mit diesen verdünnten Phagen wurden erneut die Wirtsbakterien infiziert und mit Top-Agarose auf LB-Platten (\varnothing 90 mm) ausplattiert. Die neuerlichen Filterabdrucke wurden wieder mit radioaktiv markierter DNA-Sonde detektiert. Diese Phagenvereinzelung wurde so lange durchgeführt, bis einem Plaque genau ein Signal auf einem Röntgenfilm zugeordnet werden konnte. Es schloss sich dann die *In-vivo*-Excision an.

2.14.1 Die *In-vivo*-Excision von cDNA-Plasmiden

In einem Mikrozentrifugengefäß wurden 200 μ l SM-Puffer und 5 μ l Chloroform vorgelegt. Der zuvor vereinzelte Plaque wurde mit einer sterilen Pasteurpipette aus der LB-Platte der cDNA-Bank ausgestanzt und in das vorbereitete Mikrozentrifugengefäß überführt. Das Agarose-SM-Puffer-Gemisch wurde für zwei Stunden bei RT inkubiert und abzentrifugiert (5 min, 10.000 Upm). In einem sterilen Falcon-Gefäß wurden 200 μ l XL 1-Blue Zellen, 100 μ l des Phagenstocks und 1 μ l Ex Assist Helfer-Phage pipettiert und bei 37°C für 15 min stengelassen. Dieses Zell-Phagen-Gemisch wurde mit 3ml LB-Flüssigmedium versetzt und im Inkubator bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde das Gemisch für 20 min bei 68°C in ein Wasserbad gestellt und anschließend für 15 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun Phagen, die das pBlueskript Phagemid in sich tragen. Mit 10 μ l dieser Phagen-Lösung wurden 200 μ l SOLR-Zellen bei 37°C über einen Zeitraum von 15 min infiziert. Auf LB-Platten, die mit dem Antibiotikum Ampicillin versehen worden waren, wurden 50 μ l dieses obigen Ansatzes ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Bakterien-Kolonien wurden in jeweils 3ml LB-Flüssigkulturen angezogen. Aus der Bakterienkultur wurden Plasmide isoliert und diese anschließend sequenziert.

2.15 ISOLIERUNG VON cDNA-FRAGMENTEN DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE MIT DER „SUPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDISATION (SSH)“ TECHNIK

Die Methode der „Supression Subtractive Hybridisation“ ermöglicht den Vergleich zweier mRNA-Pools zur Detektion differentiell exprimierter Gene. Das Prinzip beruht darauf, daß zunächst die beiden zu untersuchenden mRNA-Pools in cDNA (copy DNA) umgeschrieben werden und diese durch den Vorgang der Hybridisierung von DNA voneinander subtrahiert werden können. Diejenige Population, bei welcher nach differentiell exprimierten Genen gefahndet werden soll, wird generell als Tester-cDNA bezeichnet. Der Subtraktionspartner ist die Treiber-cDNA. In der vorliegenden Arbeit wird nach Genen gesucht, die in kältegehartetem Winterroggen ein erhöhtes Expressionsniveau, verglichen mit enthärteten Winterroggen, aufweisen. Folglich ist in diesem Fall die cDNA, die auf den kältegeharteten Winterroggen zurückgeht, die Tester-cDNA und diejenige, die sich auf den kältegeharteten Winterroggen bezieht, die Treiber-cDNA.

Zur Erstellung der subtrahierten cDNA-Bank wurde das Reaktionsset „Clontech-PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit“ der Firma Clontech verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden 2µg Poly-A⁺-RNA aus Primärblattmittelstücken von kältegeharteten und enthärteten Winterroggen, eingesetzt.

Nachdem die mRNA aus dem kältegeharteten und dem enthärteten Winterroggen in cDNA revers transkribiert wurde, wurden diese cDNAs mit dem Restriktionsenzym *RsaI* geschnitten. Das Restriktionsenzym *RsaI* liefert, statistisch ermittelt, DNA-Fragmente einer Größe um 400-700 Basenpaaren. Diese Prozedur ist erforderlich, um, während der späteren PCR-Reaktion, eine bevorzugte Amplifikation von kürzeren cDNA-Fragmenten im Vergleich zu den längeren cDNA's zu verhindern. Die Tester-Population wurde anschließend zweigeteilt und es wurden jeweils unterschiedliche Adaptoren (1 und 2R) an die cDNA ligiert. Die Treiber-cDNA blieb ohne Adaptoren, da ein späteres Amplifizieren in der PCR-Reaktion dieser cDNA nicht gewünscht war. Während der ersten Hybridisierung wurde im Überschuss Treiber-cDNA zu den beiden Tester-cDNA-Fractionen pipettiert. Es entstanden folgende Hybride:

- a) Tester-cDNA mit Tester-cDNA
- b) Tester-cDNA mit Treiber-cDNA
- c) Treiber-cDNA mit Treiber-cDNA

Nach der ersten Hybridisierungsrunde blieben in den zweigeteilten Ansätzen sowohl solche aus der Treiber-cDNA, als auch aus der Tester-cDNA-Fraktion als Einzelstrang-cDNA zurück. In der zweiten Hybridisierungsphase wurden die beiden Ansätze vereinigt und nochmals mit Treiber-cDNA versetzt. Nun können die verbliebenen Einzelstränge aus der Tester-Fraktion, die an ihren Enden entweder den Adaptor 1 oder den Adaptor 2R tragen miteinander hybridisieren. Außerdem konnte die nach der ersten Hybridisierungsrunde verbliebene Anzahl der einzelsträngigen Treiber-cDNA und Tester-cDNA durch die nochmalige Zugabe von Treiber-cDNA weiter verringert werden. Alle Gene die keinen Hybridisierungspartner gefunden haben, lassen sich folglich auf die Tester-cDNA zurückführen. Ein weiterer Schritt ist das Auffüllen des fehlenden Stranges der jeweiligen Adaptorsequenzen 1 und 2R, wobei eine Bindungsstelle für einen 2. Primer in der anschließenden PCR-Reaktion kreiert wurde.

In der ersten PCR-Reaktion wurden nur solche cDNAs, die an den jeweiligen Enden unterschiedliche Adaptorsequenzen tragen exponentiell exprimiert. Während der zweiten PCR-Reaktion, die mit so genannten „nested-Primern“ durchgeführt wurde, werden die differentiell exprimierten cDNA-Fragmente noch einmal verstärkt exprimiert und angereichert, um ein optimales Subtraktionsergebnis zu erzielen.

Der experimentelle Verlauf ist nachfolgend dargestellt.

Als erstes wurden jeweils 2µg Poly-A⁺-RNA aus kältegehärteten und enthärteten Primärblattmittelstücken revers transkribiert.

Die Poly A⁺-RNA (2µg in 4µl DEPC-Bidest) wurde mit 1µl cDNA Synthese Primern (10mM) versetzt und für 2min auf 70°C erhitzt und anschließend für 2min auf Eis abgekühlt.

Für die Erststrangsynthese wurden zu dem Poly-A⁺-RNA/Primer-Gemisch folgende Komponenten auf Eis hinzupipetiert:

- | | |
|---|------|
| - 5 x Erststrangpuffer | 2 µl |
| - dNTPs (10mM) | 1 µl |
| - H ₂ O | 1 µl |
| - AMV Reverse Transkriptase (20 Units/µl) | 1 µl |

Dieser Ansatz inkubierte für 1,5 h bei 42°C. Danach wurden die nachfolgend erwähnten Komponenten der Zweitstrangsynthese pipetiert und der Ansatz für 2h bei 16°C gehalten:

Erststrangansatz	10 μ l
- H ₂ O	48,4 μ l
- 5 x Zweitstrangpuffer	16 μ l
- dNTPs (10mM)	1,6 μ l
- 20 x Zweitstrangenzymcocktail	4 μ l

Nach der Zugabe von 2 μ l T4 DNA Polymerase (6 Units) wurde der Ansatz für weitere 30 min bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20x EDTA/Glycogen abgestoppt. Die cDNA wurde mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol ausgeschüttelt und mit 40 μ l 4 M NH₄-Acetat und 300 μ l 96% Ethanol gefällt. Nachdem die cDNA sedimentiert (14.000U_{pm}, 20 min, 20°C) und mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen wurde, wurde das Sediment in 50 μ l H₂O rückgelöst. Danach wurden 43,5 μ l dieser in Wasser gelösten cDNA mit 1,5 μ l (10 Units/ μ l) Enzym *RsaI* in 5 μ l 10 x *RsaI* –Puffer für 1,5 h re-stringiert. Die Reaktion wurde wiederum mit 20 x EDTA/Glycogen abgestoppt und dann die cDNA erneut mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol ausgeschüttelt, sowie mit 4 M NH₄-Acetat und 96% Ethanol gefällt. Die cDNA wurde in 5,5 μ l H₂O aufgenommen.

Die Adaptoren 1 und 2R wurden in zwei Ligationsreaktionen nur an die Tester-cDNA, wie folgt, ligiert.

Ein μ l geschnittener Tester cDNA wurde mit 5 μ l H₂O verdünnt und in folgender Ligationsreaktion eingesetzt:

- verdünnte Tester cDNA	2 μ l
- Adaptor 1 bzw. 2R (10 μ M)	2 μ l
- 5 x Ligationspuffer	2 μ l
- T4 DNA Ligase (400 Units/ μ l)	1 μ l
- H ₂ O	3 μ l

Die Ligation wurde über Nacht bei 16°C durchgeführt und anschließend mit 1 μ l 20x EDTA/Glycogen-Mix abgestoppt. Zur Hitzeinaktivierung der Ligase wurden die Proben für 5 min auf 72°C erwärmt.

Es schloß sich folgende erste Hybridisierungsreaktion 1 und 2R an:

- Treiber cDNA (<i>RsaI</i> -geschnitten)	1,5 μ l
- Adaptor 1 Tester cDNA bzw. Adaptor 2R cDNA	1,5 μ l
- 4 x Hybridisierungspuffer	1,0 μ l

Die Proben wurden in einem Thermocycler (Fa. Techne Progene 2D) mit beheizbarem Deckel für 90sec auf 98°C erhitzt und danach für 8h bei 68°C belassen. In einer zweiten

Hybridisierungsreaktion wurden 1µl Treiber cDNA mit 2µl H₂O und 1µl 4 x Hybridisierungspuffer versetzt und bei 98°C für 90sec denaturiert. Als nächstes wurde eine Pipette auf 15µl eingestellt und mit dieser die erste Hybridisierungsreaktion 1 aufgenommen, ein Luftpolster in der Pipettenspitze gebildet und 1µl der frisch denaturierten Treiber cDNA aufgenommen. Das Ganze wurde in das Tube mit der Hybridisierungsreaktion 2R pipettiert und vorsichtig gemischt. Die zweite Hybridisierungsreaktion bei 68°C dauerte über Nacht an. Im Anschluß daran wurden zu dem Reaktionsansatz 200µl Verdünnungspuffer pipettiert und das Ganze für 7 min auf 68°C erhitzt.

Die PCR-Amplifikationsreaktion Nr. 1 setzte sich wie folgt zusammen:

- Subtrahierte cDNA 1 µl
- 10 x PCR Reaktionspuffer 2,5 µl
- H₂O 19,5 µl
- dNTPs (10mM) 0,5 µl
- PCR Primer 1 1 µl
- 50 x Advantage cDNA Polymerase Mix 0,5 µl

Zunächst wurde die Probe für 5 min in einem Thermocycler (Fa. Techne, Progene 2D) auf 75°C erhitzt und nachfolgendem Temperaturzyklus, der 30 x durchlaufen wurde, unterworfen.

Sequenz des PCR Primers 1:

PCR-Primer 1 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

1. 94°C 30sec
2. 66°C 40sec
3. 72°C 90sec

Drei µl der PCR-Reaktion Nr.1 wurden mit 27µl H₂O verdünnt und 1µl dieser Verdünnung als Matrize in einer abschließenden PCR-Reaktion („nested“ Primer 1 und 2R) eingesetzt.

- verdünnte PCR-Reaktion Nr. 1 1 µl
- H₂O 18,5 µl
- 10 x PCR Reaktionspuffer 2,5 µl
- „nested“ PCR-Primer 1 (10µM) 1,0 µl
- „nested“ PCR-Primer 2R (10µM) 1,0 µl
- dNTPs (10mM) 0,5 µl
- 50 x Advantage cDNA Polymerase Mix 0,5 µl

Die PCR-Reaktion lief nach folgendem Temperaturzyklus 12x ab.

Sequenz der "nested" PCR Primer 1 und PCR Primer 2R

Nested PCR Primer 1 : 5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'

Nested PCR Primer 2R 5'-AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'

1. 94°C 30sec

2. 68°C 40sec

3. 72°C 90sec

Die PCR-Proben wurden mit dem Qiaex II Gel Extraktion Kit der Firma Qiagen aufgereinigt und die amplifizierte cDNA-Fragmente wurden anschließend in Vektoren (z.B. Bluescript-Vektoren oder pGEM-Teasy) kloniert und danach in Bakterien transformiert.

2.16 ISOLIERUNG VON cDNA-FRAGMENTEN DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE MIT DER „DIFFERENTIAL DISPLAY PCR“ („DD-PCR“)-METHODE

Die Methode des „Differential Display PCR“ ist eine weitere Möglichkeit, differentiell exprimierte Gene aufzuspüren. Diese Methode wurde 1992 von Liang & Pardee vorgestellt und bis heute immer wieder weiterentwickelt. Die Methode basiert auf einer Amplifikation mit Zufallsprimern von cDNA aus verschiedenen mRNA-Populationen. Nach einer anschließenden elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate in einem Agarosegel, können die differentiell exprimierten Gene durch einen Vergleich der Stärke der jeweiligen Fragmentbanden erkannt werden. Zeichnet sich bei dem Vergleich von Bandenpaaren eine Bande durch ein stärkeres Auftreten aus oder fehlt in einer Spur völlig, so deutet dies auf ein unterschiedlich häufiges Vorkommen dieser cDNA in einer der beiden untersuchten cDNA-Populationen hin.

Als erstes wurde dazu die mRNA aus kältegehärtetem und enthärtetem Winterroggen isoliert (wie unter 2.5.1 beschrieben) und in cDNA revers transkribiert (wie unter 2.12 beschrieben). In einer nachfolgenden PCR-Reaktion wurden diese cDNAs mit Zufallsprimern (eine Liste dieser Primer ist am Ende von 2.16 aufgeführt) amplifiziert.

Pro PCR-Reaktion wurden jeweils 12,5ng cDNA aus kältegehärteten und enthärteten Winterroggen in einem 200µl-PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt und folgender PCR-Ansatz pipettiert.

PCR-Ansatz für die ddPCR-Reaktion

1,0 μ l cDNA (= 12,5ng) aus CHL bzw. DHL
2,5 μ l 10x PCR Puffer (Fa. Takara)
2,0 μ l dNTPs (je 2,5 mM; Fa. Takara)
0,5 μ l rTaq 1U/ μ l(Fa. Takara)
5,0 μ l Primer (10 μ M; Fa. Operon-Technologies)
14,0 μ l H₂O

25 μ l

Für den Perkin-Elmer Thermocycler (Typ 9700) wurde folgender Programm-Zyklus festgelegt:

1. 92°C 5 min
2. 92°C 1 min
3. 35°C 1 min
4. 72°C 2 min

Schritte 2.-4. wurden vierzigmal wiederholt

5. 72°C 5 min
6. 25°C ∞ min

Die PCR-Produkte wurden dann mit 2,5 μ l 10 x Ladepuffer versehen und in einem 1,5%igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach dem Anfärben des Gels mit einer Ethidiumbromid-Lösung wurden unter dem UV-Schirm die als differentiell erkannten Banden aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Mikrozentrifugengefäß gebracht.

Die DNA-Fragmente wurden, wie unter 2.7.3 beschrieben, aus dem Agarosegel eluiert und anschließend zur weiteren Analyse in einen pGEM-Teasy Vektor (Fa. Promega) ligiert.

Nach der Ligation der PCR-Produkte in pGEM-Teasy Vektoren wurden kompetente DH5 α Zellen mit der Hitzeschockmethode mit diesen Vektoren transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Durch eine so genannte Kolonie-PCR wurde überprüft, ob das Fragment, welches in den pGEM-Teasy Vektor eingebaut worden war, die gleiche Größe aufweist, wie die aus dem Agarosegel eluierte differentiell erkannte Bande. Dazu wurde eine Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und diese Kolonie gleichzeitig auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen. Als Primer

dienten M13 Forward und T7 Reverse, die auf dem Vektor nach und vor der multiplen Klonierungsstelle binden und somit eine Amplifikation gewährleisten können.

Für die Kolonie-PCR-Reaktion wurde folgender PCR-Ansatz pipettiert:

7,15µl H₂O-Bidest + gepickte Kolonie
0,5 µl Primer M13 Forward (1µM)
0,5 µl Primer T7 Reverse (1µM)
1,0 µl 10x PCR-Reaktionspuffer (Fa. TaKaRa)
0,8 µl dNTP's (2,5mM)
0,05µl rTaq (Fa. TaKaRa)

10 µl

Der Thermocycler (Fa. Perkin-Elmer Typ 9700) wurde wie folgt programmiert:

1. 94°C 5min
2. 94°C 30sec
3. 55°C 30sec
4. 72°C 30-60sec (wahlweise, abhängig von der Größe des Inserts)

Schritte 2. –4. wurden 25 Mal wiederholt

5. 72°C 5min
6. 25°C ∞

Die PCR-Produkte wurden mit 1µl DNA-Ladepuffer versehen und in einem 1%igen Agarosegel in 1x TAE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit einer Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Stimmt die Größe der Amplifikate mit der Größe der als differentiell erkannten PCR-Fragmente überein, konnte eine 3ml-LB-Flüssigkultur der entsprechenden Kolonie angeimpft werden.

Nach der anschließenden Isolierung der Plasmid-DNA (unter 2.18 beschrieben) wurde die optische Dichte der Plasmid-DNA ermittelt und 1µg der DNA für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

Die experimentell ermittelte Basenreihenfolge wurde in einer Gendatenbank mit bereits bekannten DNA-Sequenzen verglichen.

Auch die „DD-PCR-Methode“ ist erfahrungsgemäß nicht frei von so genannten „Falschpositiven“. Eine abschließende Northern Blot Hybridisierung der PCR-Produkte lieferte endgültige Gewissheit, ob diese Fragmente tatsächlich differentiell exprimiert sind.

Auflistung der in der DD-PCR verwendeten Primer:

NAME DES PRIMERS	PRIMERSEQUENZ	NAME DES PRIMERS	PRIMERSEQUENZ
B.01	5'-GTTTCGCTCC-3'	C.01	5'-TTCGAGCCAG-3'
B.02	5'-TGATCCCTGG-3'	C.02	5'-GTGAGGCGTC-3'
B.03	5'-CATCCCCCTG-3'	C.03	5'-GGGGGTCTTT-3'
B.04	5'-GGACTGGAGT-3'	C.04	5'-CCGCATCTAC-3'
B.05	5'-TGCGCCCTTC-3'	C.05	5'-GATGACCGCC-3'
B.06	5'-TGCTCTGCCC-3'	C.06	5'-GAACGGACTC-3'
B.07	5'-GGTGACGCAG-3'	C.07	5'-GTCCCGACGA-3'
B.08	5'-GTCCACACGG-3'	C.08	5'-TGGACCGGTG-3'
B.09	5'-TGGGGGACTC-3'	C.09	5'-CTCACCGTCC-3'
B.10	5'-CTGCTGGGAC-3'	C.10	5'-TGTCTGGGTG-3'
B.11	5'-GTAGACCCGT-3'	C.11	5'-AAAGCTGCGG-3'
B.12	5'-CCTTGACGCA-3'	C.12	5'-TGTCATCCCC-3'
B.13	5'-TTCCCCCGCT-3'	C.13	5'-AAGCCTCGTC-3'
B.14	5'-TCCGCTCTGG-3'	C.14	5'-TGCCTGCTTG-3'
B.15	5'-GGAGGGTGTT-3'	C.15	5'-GACGGATCAG-3'
B.16	5'-TTTGCCCGGA-3'	C.16	5'-CACACTCCAG-3'
B.17	5'-AGGGAACGAG-3'	C.17	5'-TTCCCCCAG-3'
B.18	5'-CCACAGCAGT-3'	C.18	5'-TGAGTGGGTG-3'
B.19	5'-ACCCCCGAAG-3'	C.19	5'-GTTGCCAGCC-3'
B.20	5'-GGACCCTTAC-3'	C.20	5'-ACTTCGCCAC-3'

2.17 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN IN DEN pGEM-TEASY VEKTOR

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in den pGEM-TEasy Vektor wurde das Reaktionskit der Firma Promega verwendet.

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden A-Enden und den überhängenden T-Enden des pGEM-TEasy-Vektors wurde von der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Die Konzentration der zu ligierenden Fragmente wurde so gewählt, daß das molare Verhältnis von Insert zu Vektor mindestens 3:1 betrug.

Um die eluierten DNA-Fragmente in den pGEM-TEasy Vektor zu ligieren, wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

PCR-Produkt (> 150ng DNA) 3 µl

pGEM-T Easy Vektor (50ng) 1 µl

2x Rapid Ligation Puffer 5 µl

T4 DNA Ligase (3U/ µl) 1 µl

Die Ligierungsreaktion wurde für 1 h bei RT durchgeführt.

2.18 DIE PLASMIDISOLIERUNG

Bei der Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde die von Birnboim & Doly (1979) entwickelte und von Ish-Horowicz & Burke (1981) modifizierte Methode, die auf einer alkalischen und enzymatischen Lyse der Plasmid-DNA tragenden Bakterien beruht, angewendet.

Folgende Lösungen wurden für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet:

Lösung 1 : 10mM EDTA; 50mM Glucose; 50mM Tris-HCl (pH 8,0);
Lysozym (5mg/ml)

Lösung 2 : 0,2 N NaOH; 1% SDS (w/v)

Lösung 3 : 3 M K-Acetat, pH 4,8 mit Eisessig eingestellt

PEG-Lösung : 20% PEG 6000; 2,5M NaCl

Die Bakterien einer 3ml Übernachtskultur wurden in einer Eppendorfszentrifuge durch zweimaliges Zentrifugieren (8500 UPM, 3 min bei RT) in einem 1,5ml Mikrozentrifugengefäß sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit der Pipette in 100µl Lösung 1 resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Lösung 2 hinzugefügt, gemischt und das Ganze weitere 2 min stehen gelassen. Durch die Zugabe von 150µl Lösung 3 und einer anschließenden fünfminütigen Inkubation wurde die chromosomale Bakterien-DNA, sowie die Proteine gefällt. Durch Zentrifugation (14000 UPM, 10 min bei RT) wurde die chromosomale Bakterien-DNA, die Proteine und die Bakterienzellenreste sedimentiert. Der Überstand (ca. 400µl) wurde in ein neues Mikrozentrifugengefäß überführt und mit 200µl TE-gesättigtem Phenol und 200µl Chloroform-IAA (24:1) ausgeschüttelt. Das Gemisch inkubierte für 5 min auf einem Schwenktisch bei 60Upm. Nach der erneuten Zentrifugation (14000 UPM, 10 min bei RT) wurde die nach der Phasentrennung entstandene wässrige Oberphase in ein frisches Mikrozentrifugengefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte für mindestens 1 Stunde durch Zugabe von 1 Volumen Ethanol bei -20°C . Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (14000 Upm, 10 min, 4°C) sedimentiert und mit 200µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die Nukleinsäuren trockneten bei RT und wurden anschließend in 45µl TE-Puffer rückgelöst. Durch Zugabe von 5µl RNase-Lösung (100µg/ml) wurde die bakterielle RNA in 30 min bei 37°C abgebaut. Nun wurde nach Zugabe von 30µl PEG-Lösung die Plasmid-DNA 1 h auf Eis gefällt. Nach einer weiteren

Zentrifugation (14000 Upm, 20 min bei RT) wurde das Sediment abschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 50µl TE-Puffer zurückgelöst.

2.18.1 Fällung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte durch den Sequenzierservice der Firma MWG Biotech. 2µg Plasmid-DNA wurden mit 2,5 Volumen Ethanol (96%) und 0,1 Volumen 2,5 M NaAc (pH 5,2) versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 14.000rpm für 20 min bei 4°C wurde das Sediment mit 500µl Ethanol (70%) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde an der Luft getrocknet und konnte anschließend an den Sequenzierservice geschickt werden.

2.19 ISOLIERUNG VON LÖSLICHEN PROTEINEN AUS BLATTGEWEBE

Das Blattgewebe wurde auf Eis in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff unter zur Hilfenahme eines Pistills aufgeschlossen. Das pulverisierte Blattmaterial wurde in ein Mikrozentrifugengefäß überführt und mit 1,5 Vol (w/v) Na-Phosphat-Puffer 20mM (pH 7,4) versetzt und gevortext. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14.000 Upm wurde der Überstand in ein neues Mikrozentrifugengefäß pipettiert und konnte bei -20°C gelagert werden.

2.20 ISOLIERUNG VON CHLOROPLASTEN

Die Isolierung von Chloroplasten aus nicht-gehärteten Roggenpflanzen wurde nach einer Methode von Hönighaus & Feierabend (1983) durchgeführt. Das Blattmaterial (etwa 20g) wurde geerntet, mit entionisiertem Wasser gewaschen und getrocknet. Auf Eis wurde das Blattmaterial in einer Plastikschiene mit einem Rasierklingenhacker unter Zugabe des Grinding Mediums (50ml) zu einem feinen Brei homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Verbandmull und einer Lage Miracloth (Fa. Calbiochem) gepreßt und bei 3000g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Sowohl der Überstand als auch das Sediment (rückgelöst in 6ml Grinding Medium) wurden mit SDS-Ladepuffer versehen und bei 95°C

für 10min denaturiert. Die Proteinextrakte wurden in einem 12,5%igen SDS-PAGE-GEL elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

Grinding-Medium:

- 350 mM Saccharose
- 150 mM Tricin-KOH (pH 7,5)
- 2 mM Na₂-EDTA
- 10 mM KCl
- 1 mM MgCl₂
- 1 mM MnCl₂
- 4 mM DTT
- 0,01% Rinderserumalbumin

2.21 DIE ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON PROTEINEN IN EINEM SDS-POLYACRYLAMIND-GEL (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit 12,5%igen SDS-Polyacrylamind-Gelen im Puffersystem von Laemmli (1970).

Es wurden zur Herstellung eines Polyacrylamidgels zwei Glasplatten der Größe 10 x 8 x 0,1 cm verwendet, die zum Gießen des Gels mit einem Gummistreifen abgedichtet worden waren. Folgende Substanzen wurden zur Herstellung des Gels pipettiert:

Für das Trenngel:

- 2,5 ml Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
- 1,5 ml 1,5M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS
- 2,0 ml H₂O-Bidest
- 3,3 µl TEMED
- 60 µl Ammoniumpersulfat (10%)

Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und polymerisierte in ca. 25 min aus.

War das Trenngel polymersiert, wurden die Komponenten für das Sammelgel pipettiert und direkt über das Trenngel gegossen. Zur Formung der Probenaschen diente ein Probenkamm.

Für das Sammelgel:

- 0,45 ml Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
- 1,5 ml 1,5M Tris-HCl, (pH 6,8); 0,4% (w/v) SDS
- 1,8 ml H₂O-Bidest
- 3,0 µl TEMED
- 36 µl Ammoniumpersulfat (10%)

Für ein Liter 1x SDS-Laufpuffer wurden folgende Reagenzien benötigt:

- 3,0 g Tris-Base
- 14,0 g Glycin
- 1,0 g SDS

Für 100ml 2x SDS-Probenpuffer wurden folgende Substanzen pipettiert:

- 25 ml 4x Tris-HCl pH 6,8
- 20 ml Glycerin
- 4,0 gr SDS
- β-Mercaptoethanol
- 0,001 gr Bromphenolblau

Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und das Gel wurde mit Klammern an der Apparatur fixiert. Die aufzutragenden Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nachdem die Proben für 5 min bei 13.000rpm zentrifugiert worden waren, konnten diese auf das Gel aufgetragen werden. Bei einer Spannung von 100V wurden die Proteine so lange elektrophoretisch aufgetrennt, bis das Bromphenolblau aus den Proben gerade aus dem Gel herausgelaufen war. Anschließend konnten im Gel die aufgetrennten Proteine entweder mit Commassie-Blaufärbelösung gefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western Blot Technik übertragen werden.

Anfärbung mit Commassie-Blau

Färbelösung : 0,035% Serva Blue G250 und R250 (w/v)
 50 % Methanol (v/v)
 9 % Eisessig (v/v)

Entfärbelösung: 50 % Methanol (v/v) / 9 % Eisessig (v/v)

Das Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese für 2h auf dem Schwenktisch in Färbelösung angefärbt. Durch ein nachträgliches Inkubieren in Entfärbelösung über Nacht wurden die Proteinbanden sichtbar.

Das gefärbte Gel konnte zu Dokumentationszwecken zwischen zwei Cellophanfolien (Fa. Roth) getrocknet werden.

2.22 DER WESTERN BLOT

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, bedient man sich der Technik des Elektrotransfers mit der Fast Blot Apparatur (Fa. BioRad Trans Blot SD). Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst wie unter 2.20 beschrieben. Für den anschließenden Elektrotransfer wurden folgende Lösungen benötigt:

Kathodenpuffer:	0,025 M	Tris-HCl (pH 9.4)
	0,04 M	Glycin
	10%	Methanol
Anodenpuffer 1:	0,3 M	Tris-HCl (pH 10,4)
	10%	Methanol
Anodenpuffer 2:	0,025 M	Tris-HCl pH 10,4
	10%	Methanol

Es wurden sechs Whatmann Filterpapiere, der Gelgröße entsprechend, zurechtgeschnitten. Als erstes wurde ein in Anodenpuffer 1 getränktes Filterpapier auf die Anodenplatte des Blotapparates gelegt, anschließend folgten zwei in Anodenpuffer 2 angefeuchtete Filterpapiere, gefolgt von der Nitrocellulosemembran und dem SDS-Gel in seitenrichtiger Orientierung. Den Abschluß bildeten drei in Kathodenpuffer getauchte Filterpapiere. Das Schichten der Lagen sollte ohne den Einschluß von Luftblasen von statten gehen. Die Blotapparatur (Fa. BioRad Trans Blot SD) wurde verschlossen und die Proteine wurden 1,5 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von $1,5 \text{ mA/cm}^2$ auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wurde nach dem Transfer auf Filterpapier getrocknet und konnte bis zur anschließenden Detektion mit einem Antikörper bei 4°C gelagert werden.

2.22.1 Die Detektion von Western Blots mit Antikörpern

Nachfolgende Lösungen wurden für die Detektion der Western Blots benötigt:

TBST-Puffer: 10mM Tris-HCl, pH 8; 150mM NaCl; 0,05% Tween

Blockierlösung: 5% fettarmes Milchpulver in TBST-Puffer

Wasserstoffperoxid-Lösung: 30% (v/v) H₂O₂

Dianisidin in Methanol: 1% (w/v) ortho-Dianisidin in Methanol

War der Western Blot nach dem Elektrotransfer getrocknet, inkubierte dieser zunächst für 2 x 10min bei Raumtemperatur in jeweils 20ml TBST-Lösung auf dem Rundschüttler bei 80Upm. Anschließend wurde der Blot 1 h in 20ml Blockierlösung blockiert. Zur Reaktion mit dem Antikörper wurden 10ml TBST-Puffer mit einer entsprechenden Verdünnung des Antikörpers (z.B. 1:10000 bei Verwendung des His-Tag-Antikörpers) versehen und der Blot 1 h auf dem Schwenktisch belassen. Danach wurde abermals der Blot 3x für 10min in jeweils 30ml TBST-Puffer gewaschen. Die Membran wurde dann für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (Goat-Anti-Rabbit IgG-peroxidase-conjugated, Fa. Paesel & Lorei), der in einer Verdünnung von 1:10.000 in Westernblockierlösung eingesetzt wurde, behandelt. Vor der Färbereaktion wurde der Blot 3 x für 10min in jeweils 30ml TBST-Puffer gewaschen. Die Färbung erfolgte indem 25ml TBST-Puffer mit 7,5µl H₂O₂-Lösung und 500µl Methanol, in welchem zuvor 0,005g ortho-Dianisidin gelöst worden war, versetzt. Die Reaktion erfolgte unter Lichtausschluß so lange, bis die Signale als bräunliche Banden auf der Nitrocellulosemembran sichtbar wurden. Ein Abstoppen der Reaktion wurde durch Waschen des Blotes mit H₂O-Bidest erzielt. Die Membran wurde auf Filterpapier getrocknet und im Dunkeln bei RT gelagert.

2.23 DIE INDUZIERTER PROTEINPRODUKTION IN DEM PQE EXPRESSIONS-VEKTORSYSTEM

Zur Expression eines rekombinanten Proteins in *E.coli* wurde das Expressionssystem „The QIAexpressionist“ der Firma Qiagen verwendet.

Der Versuchablauf gliederte sich in die Abschnitte Klonierung der gewünschten cDNA in den Expressionsvektor pQE 30, 31 oder 32, die Expression des rekombinanten Proteins in *E.coli* und der anschließenden Isolierung und Aufreinigung des rekombinanten Proteins.

Der Klonierungsvektor ist so konzipiert, daß vor der multiplen Klonierungsstelle eine Gensequenz liegt, die für sechs His-Aminosäuren kodiert und nach der multiplen Klonierungsstelle Stopcodons geschaltet sind.

2.24 AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEN PROTEINEN MIT HILFE DES „BATCH-VERFAHRENS“ UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN

Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins ScPMSR erfolgte nach dem Handbuch „The QIAexpressionist“ der Firma Qiagen.

Eine 10ml LB-Kultur mit Ampicillin wurde mit dem Klon Sc PMSR pQE 32 C angeimpft und wuchs im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht heran. Mit jeweils 5ml dieser Kultur wurde eine mit Ampicillin versehene 50ml LB-Kultur beimpft und inkubierte bei 37°C im Schüttelinkubator bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Induktion unter Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM) für 6 h bei 37°C im Schüttelinkubator. Die Bakterien wurden danach bei 4000 x g zentrifugiert und das Sediment bei -20°C über Nacht eingefroren. Das Sediment wurde auf Eis aufgetaut und in 10ml Lysis-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden durch mehrfaches Scheren mit einer Kanüle mechanisch aufgeschlossen und dann bei 10000 x g und 4°C für 25 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 3ml Ni-NTA (Fa. Qiagen) pipettiert und eine Stunde bei RT bei 200 Upm im Schüttelinkubator belassen. Die Suspension wurde auf die Säulenapparatur gegossen. Nachdem sich das Säulenmaterial abgesetzt hatte, konnte mit der Aufreinigung begonnen werden. Dazu wurde als erstes der Durchlauf in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Als nächstes wurde 2 x mit je 5ml Wasch-Puffer gewaschen und der Durchlauf, wie oben beschrieben, in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Im letzten Schritt wur-

den die Proteine nacheinander mit je 4ml Elutionspuffer D (pH 5,9) und Elutionspuffer E (pH 4,5) von dem Säulenmaterial losgelöst. Die einzelnen Fraktionen wurden zu je 1ml Volumen in Mikrozentrifugengefäßen gesammelt.

Ob die Aufreinigung erfolgreich war, wurde mit Hilfe eines SDS-PAGE-Gels überprüft. Dazu wurden je 15µl der gewonnenen acht Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärben des SDS-Gels mit Commassie konnte erkannt werden, in welcher Fraktion sich das gewünschte Protein befindet und folglich mit welchem der beiden Elutionspuffer D oder E sich das Protein vom Säulenmaterial hat lösen lassen. Nachdem diese Frage geklärt worden war, konnte mit der Aufreinigung im großen Maßstab zur Gewinnung des ScPMSR Proteins für die Synthese eines Antikörpers begonnen werden. Die nachfolgenden Lösungen wurden bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins verwendet.

Lysis Puffer (pH 8,0)

100mM NaH₂PO₄
10mM Tris-HCl
8 M Harnstoff

Waschpuffer (pH 6,3)

100mM NaH₂PO₄
10mM Tris-HCl
8 M Harnstoff

Elutionspuffer D & E (pH 5,9 bzw. pH 4,5)

100mM NaH₂PO₄
10mM Tris-HCl
8M Harnstoff

Nach der induzierten Proteinproduktion von ScPMSR wurde das Protein mit Hilfe von Nanosept Mikrokonzentratoren (Fa. Pall Filtron) nach Versuchsvorschrift konzentriert. Die Nanosept Microconcentratoren funktionieren wie ein Sieb mit definierter Porenweite. Nach Zentrifugation bleibt im „Sieb“ das gewünschte Protein zurück und kann in ein neues Mikrozentrifugengefäß pipettiert werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 ISOLIERUNG VON DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENEN AUS WINTERROGGEN (*SECALE CEREALE* L.)

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zwei Methoden angewandt, um nach differentiell exprimierten Genen bei kältegehärtetem Winterroggen (*S. cereale*) zu suchen. Die Methode „Suppression Subtractive Hybridisation“ ermöglicht es, Gene aufzuspüren, die bei einem Vergleich zweier mRNA-Populationen in einem der beiden mRNA-Pools verstärkt exprimiert werden. Demgegenüber gestattet es die „DD-PCR-Methode“, sowohl hochregulierte als auch reprimierte Gene in beiden Populationen parallel zu detektieren. Bei der „SSH“-Methode wurden Gene gefunden, die in kältegehärteten Roggenblättern stärker exprimiert werden und deren Expressionsniveau nach Enthärtung dieser Pflanzen sinkt. Die „DD-PCR-Methode“ förderte Genfragmente zu Tage, die im Vergleich der untersuchten mRNA-Pools von kältegehärteten und enthärteten Roggenblättern in einem der beiden mRNA-Pools stärker exprimiert worden waren.

3.1.1 Etablierung einer „SSH“-cDNA-Bank aus Winterroggen (*S. cereale* L.)

Zur Herstellung einer „SSH“-cDNA-Bank wurde Gesamt-RNA aus den Blattmittelstücken von gehärtetem und enthärtetem Winterroggen isoliert. Mit Hilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Gesamt-RNA in einem Agarosegel wurde die Qualität der isolierten Gesamt-RNA überprüft.

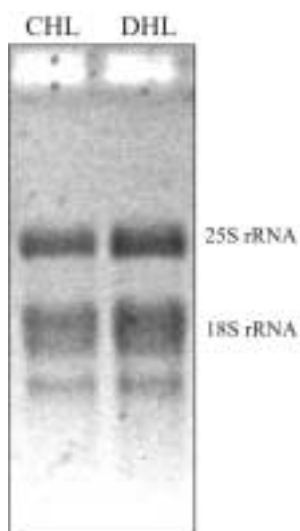


Abb.: 1

Photographie eines Ethidiumbromid-gefärbten 1,2%igen Agarosegels nach der Gelelektrophorese von 2µg Gesamt-RNA aus Blattmittelstücken von Winterroggen.

Bahn 1 : Gesamt-RNA aus CHL

Bahn 2 : Gesamt-RNA aus DHL

Die Abbildung 1 dokumentiert die erfolgreich verlaufene Gesamt-RNA-Isolierung. Es konnte keine Verunreinigung mit DNA festgestellt und keine Degradierung der 25S bzw. 18S rRNA nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt wurde aus Gesamt-RNA PolyA+RNA isoliert. Die ribosomale RNA (rRNA) besitzt einen Anteil von über 90% an der Gesamt-RNA. Für die Isolierung von 2µg PolyA+RNA wurden deshalb 500µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Beschaffenheit der PolyA+RNA wurde mit einem Northern Blot überprüft. Dazu wurde die PolyA+RNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Eine Anreicherung von mRNA wurde überprüft, indem Gesamt-RNA als Vergleichsmaßstab mit geblottet wurde. Diese Membran wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Dafür wurde das von PD Dr. T. Berberich zur Verfügung gestellte cDNA-Fragment eines Elongationsfaktors als Matrize bei der radioaktiven Markierung eingesetzt.



Abb.: 2

Autoradiogramm einer Northern Blot Hybridisierung nach Agarosegel-Elektrophorese von PolyA+RNA und Gesamt-RNA-Populationen mit einem radioaktiv markierten cDNA-Fragment eines Elongationsfaktors EF1 alpha.

Bahn 1 : PolyA+RNA (0,25µg) isoliert aus CHL

Bahn 2 : Gesamt-RNA (2µg) isoliert aus CHL

Bahn 3 : PolyA+RNA (0,25µg) isoliert aus DHL

Bahn 4 : Gesamt-RNA (2µg) isoliert aus DHL

Die Abbildung 2 zeigte in allen vier Spuren distinkte Banden und keine Abbauerscheinungen, was somit die gute Qualität der PolyA+RNA und der Gesamt-RNA bestätigen konnte. Die detektierte mRNA hatte eine Größe von etwa 1,2 Kb, was der mRNA-Größe des Elongationsfaktors entsprach. Bei einem Vergleich der Signalstärken von Gesamt-RNA und PolyA+RNA aus CHL und DHL konnte, obwohl im Vergleich zur PolyA+RNA-Menge achtmal so viel Gesamt-RNA-Menge geblottet wurde, ein deutlich stärkeres Signal in den Bahnen (1 & 3) der PolyA+RNA erkannt werden. Dies bedeutet, daß in den Proben eine Anreicherung (etwa Faktor 500) der PolyA+RNA gelungen ist.

Anschließend wurde die PolyA+RNA aus CHL und DHL in copy DNA revers transkribiert. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 2µg PolyA+RNA eingesetzt. Die Qualität der synthetisierten cDNA konnte abermals unter Durchführung einer Gelelektrophorese überprüft werden.

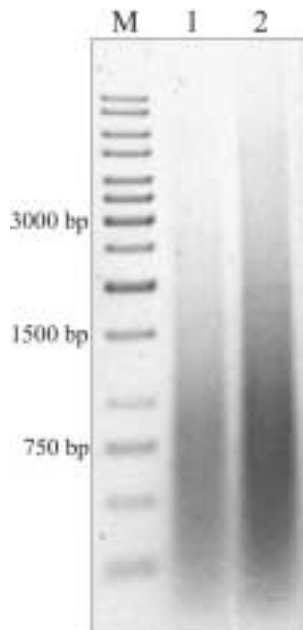


Abb. 3

Photographie eines Ethidiumbromid-gefärbten 1,2%igen Agarsegels nach einer Gelelektrophorese von etwa 1µg cDNA die aus PolyA+RNA von CHL und DHL synthetisiert wurde.

Bahn 1: cDNA aus CHL

Bahn 2: cDNA aus DHL

Die gleichmäßige Verteilung der unterschiedlichen cDNAs von 250 bis über 2000bp Länge belegt die erfolgreich verlaufene cDNA-Synthese.

Die aus der Poly-A+RNA von CHL und DHL synthetisierte cDNA wurde mit dem Restriktionsenzym *RsaI* restringiert. Im Anschluß daran wurde nur die CHL-cDNA in zwei Portionen aufgeteilt. An die cDNAs des einen halbierten Ansatzes wurde der Adaptor 1 und an die cDNAs des anderen Ansatzes der Adaptor 2R ligiert. In einer ersten Reaktion hybridisierte cDNA aus DHL im Überschuß mit cDNAs aus CHL die mit dem Adaptor 1 versehen worden waren. In einer zweiten Reaktion hybridisierte cDNA aus DHL im Überschuß mit cDNAs aus CHL die mit dem Adaptor 2R versehen worden waren. An diese erste Hybridisierung schloß sich eine weitere Hybridisierungsreaktion an. Dazu wurden die beiden obigen Reaktionsansätze vereint und erneut mit cDNA aus DHL im Überschuß hybridisiert. In nachfolgenden „SSH“-PCR-Reaktionen wurden die nun subtrahierten cDNA-Fragmente, die vermehrt in den CHL auftreten, amplifiziert. Dazu wurden die cDNA-Fragmente erst mit den PCR-Primern 1 und 2R, danach mit den "nested" Primern 1 und 2R vervielfältigt.

Diese cDNA-Fragmente der nun etablierten „SSH“-cDNA-Bank wurden anschließend in pGEM-Teasy Vektoren ligiert und in Bakterien des Stammes DH5 α kloniert. Aus den Bakterienkulturen von ausgewählten Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert. Die Plasmid-DNA (2 μ g) wurde zur Sequenzierung an die Firma MWG Biotech geschickt. Bei ersten Sequenzvergleichen der übermittelten Basensequenzen mit EST-Sequenzen aus Datenbanken konnte festgestellt werden, daß der deutlich überwiegende Teil der analysierten Klone starke Homologien zu Sequenzen aufwies, die für ribosomale RNA (rRNA) kodieren. Dieser Umstand massenhaft auftretender Klone, die Homologie zur Sequenz von rRNA zeigen, konnte bereits in einer früheren Arbeit von PD Dr. Thomas Berberich, der ebenfalls die Methode der „SSH“ angewandt hatte, festgestellt werden (pers. Mitteilung). Diejenigen Klone, die cDNA-Fragmente aufwies, welche homolog zur Sequenz von rRNA waren, spielten bei der Thematik der vorliegenden Arbeit keine Rolle. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurden deshalb alle isolierten Plasmide nun vor der Sequenzierung auf ihre Homologie zu ribosomaler RNA hin untersucht. Dazu wurden die Plasmide zunächst mit Restriktionsenzymen restringiert, die das zu überprüfende cDNA-Fragment aus dem Plasmid schneiden. In einem Agarosegel wurden die restringierten Plasmide elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran gebロットet. Diese Membran wurde anschließend mit radioaktiv markierter cDNA (von PD Dr. Thomas Berberich zur Verfügung gestellt), die auf eine 18S rRNA-Sequenz zurückgeht, detektiert. Dieses rDNA-Fragment (cDNA-Fragment aus der Prä-rRNA) war auch in der Lage, die Sequenz von 25s rRNA zu detektieren. Ein Autoradiogramm lieferte nachfolgend Rückschlüsse, welche Plasmide ein Fragment repräsentieren, deren Sequenz Homologie zu einer der beiden rRNAs aufzeigten. Diese Klone konnten dann von einer weiterführenden, zeitaufwendigen Analyse ausgeschlossen werden. Abbildung 4 zeigt beispielhaft ein solches Autoradiogramm der Hybridisierung eines Southern Blots mit einer radioaktiv markierten rDNA-Sonde.

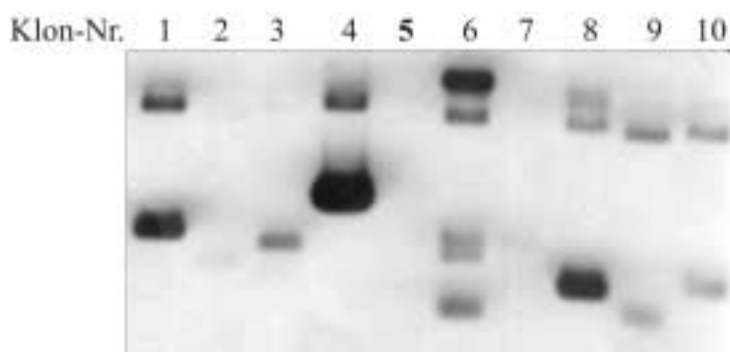


Abb.: 4 Autoradiogramm der Hybridisierung einer Membran eines Southern Blots mit einer radioaktiv markierten rDNA-Sonde, auf die mit *EcoRI/BamHI* restringierte Plasmid-DNA von zehn verschiedenen cDNA Klonen übertragen wurde.

Das Autoradiogramm (siehe Abbildung 4) dokumentiert, daß nur das cDNA-Fragment des Klons Nr. 5 keine Hybridisierung mit der verwendeten rDNA-Sonde eingeht. Die Klone in den Bahnen 2, 3, 7, 9 & 10 ergeben schwache Signale, die sich möglicherweise auf unspezifische Hybridisierungen zurückführen lassen. Die Klone Nr. 1, 4, 6 & 8 zeigen eine starke Reaktion mit der rDNA-Sonde und konnten folglich von weiterführenden Analysen ausgeschlossen und verworfen werden. Diejenigen Plasmide, die eindeutig keine Reaktion zeigten, wurden sequenziert.

Die nach der Sequenzierung durchgeführten Homologiestudien zeigten, daß die cDNA-Sequenzen Ähnlichkeiten mit Genen aus den verschiedenen pflanzlichen Stoffwechselprozessen besitzen. Die einzelnen DNA-Sequenzdaten sind im Anhang aufgeführt.

Die isolierten cDNA-Fragmente ließen sich in folgende funktionelle Teilbereiche des pflanzlichen Stoffwechsels einreihen:

a) Photosynthesestoffwechsel:

SSU („small subunit“, kleine Untereinheit der RubisCO, 0,8Kb) **rbcS**

LHC („Light-harvesting komplex“, Lichtsammelkomplex, 1,1Kb) **lhcb II**

Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (0,9Kb)

NAD-Malat Dehydrogenase (1,2Kb)

b) Antioxidativer Schutz:

Peptid-Methionin-Sulfoxid-Reduktase (PMSR, 1,0Kb)

c) Genexpression:

RNA Bindendes Protein (1,3Kb)

3.1.2 Überprüfung der differentiellen Expression

Bei der Anwendung der Methode der „Suppression Subtractive Hybridisation PCR“ ist man nicht vor dem Auftreten so genannter „Falschpositiver“ gefeit. Um den Nachweis zu führen, daß die cDNA-Fragmente aus der „SSH“-cDNA-Bank tatsächlich jeweils einen unterschiedlichen Grad an Expression in den CHL und DHL aufweisen, wurde eine Northern Blot Analyse sämtlicher isolierter cDNA-Fragmente durchgeführt. Mit Hilfe des

Northern Blot Analyseverfahrens ist es möglich, quantitative Aussagen über die relativen Transkriptmengen in den untersuchten Geweben zu fällen.

Dazu wurde Gesamt-RNA aus kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Winterroggenblättern isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Das cDNA-Fragment, welches aus der „SSH“-cDNA-Bank als differentiell exprimiert hervorgegangen war und überprüft werden sollte, wurde jeweils radioaktiv markiert. Mit diesem radioaktiv markierten cDNA-Fragment wurde eine Northern Blot Hybridisierung durchgeführt. Nach Entwickeln des Autoradiogramms konnte durch einen Vergleich der Signalstärken ersehen werden, ob das untersuchte Gen, in den unter unterschiedlichen Bedingungen herangewachsenen Pflanzen, tatsächlich differentiell exprimiert wurde.

Folgende Autoradiogramm-Serie zeigt die als differentiell exprimiert erkannten Gene, die sich nach der „Suppression Subtractive Hybridisation“ ergeben hatten. Zusätzlich wurde noch die differentielle Expression von LSU überprüft und dieses Autoradiogramm ist hier zusätzlich eingefügt.

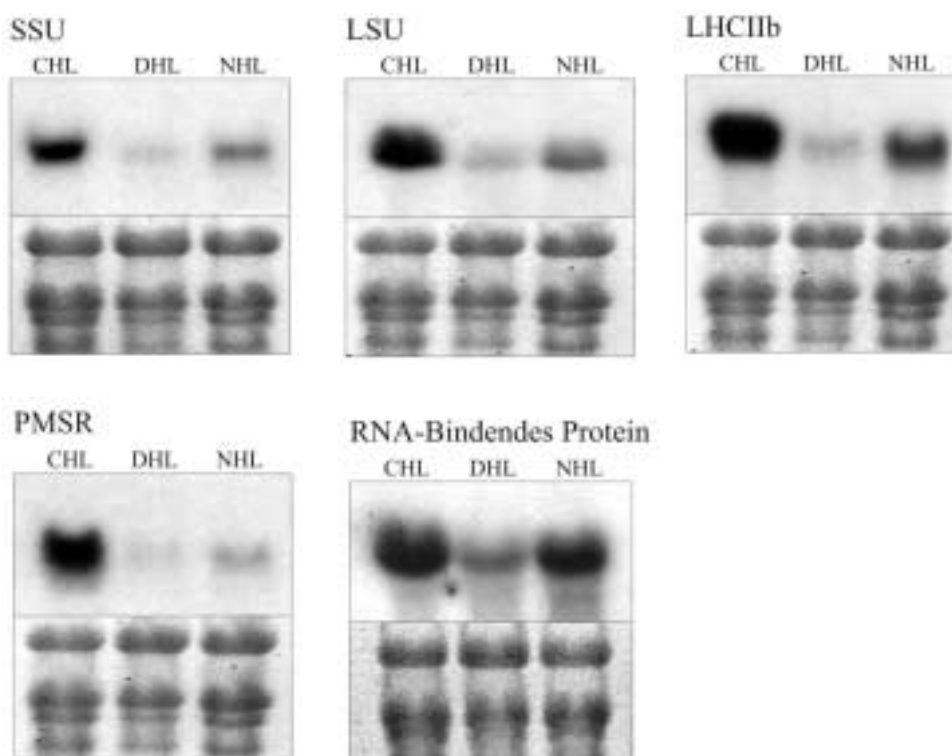


ABB.: 5

Autoradiogramme von Northern Blot Hybridisierungen. Es wurden jeweils 10µg Gesamt-RNA aus kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Winterroggenblättern auf eine Membran übertragen. Die Membranen wurden jeweils mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten (Sc rbcS, Sc rbcL, Sc lhciI, Sc PMSR, Sc RNA-Bindendes Protein) hybridisiert. Zur Kontrolle der Beladung wurde das Agarosegel mit der aufgetrennten RNA nach der Elektrophorese zunächst angefärbt und fotografiert.

Generell wird aus den Autoradiogrammen (siehe Abbildung 5) ersichtlich, daß bei kältegehärteten Roggenpflanzen die für drei Tagen bei 22°C enthärtet wurden, eine starke Abnahme des jeweiligen Transkripts bei allen hier aufgeführten Kandidaten zu verzeichnen war. Im Folgenden wird auf das Expressionsniveau der einzelnen Kandidaten detaillierter eingegangen.

a) Photosynthese-Stoffwechsel

- **rbcS/rbcL**
- **lhc b II**

Die Transkriptmenge der kleinen Untereinheit der RubisCO (SSU) rbcS fiel nach drei Tagen Enthärtung stark ab (siehe Abbildung 5). Bei den kältegehärteten Roggenpflanzen war auch deutlich mehr Transkript vorhanden, als bei nicht-gehärteten Roggenpflanzen. Das Expressionsniveau von rbcS bei nicht-gehärteten Roggenpflanzen lag höher als bei den enthärteten Pflanzen.

Nach diesem Resultat bestand nun Interesse zu erfahren, ob auch die Transkriptmenge der großen Untereinheit der RubisCO (LSU, rbcL) nach Enthärtung zurückgeht. Aus der Abbildung 5 wird ersichtlich, daß das gleiche Expressionsverhalten wie bei rbcS vorliegt: starker Rückgang des Transkripts nach Enthärtung und eine erhöhte Transkriptmenge bei nicht-gehärteten, verglichen mit enthärteten Blättern. Zur radioaktiven Markierung wurde ein EcoRI-Fragment (von P. Winter zur Verfügung gestellt) aus der ptDNA von Spinat, das für rbcL kodiert, eingesetzt.

Für das Gen lhc bII, welches für das Protein des Lichtsammelkomplexes Typ IIb kodiert und ebenfalls dem Photosyntheseapparat zugeordnet wird, konnte das gleiche Expressionsmuster wie für rbcS und rbcL nachgewiesen werden. Augenscheinlich ist wiederum der starke Rückgang des Transkripts von lhcII nach Enthärtung und ein erhöhter Gehalt dieses Transkripts bei nicht-gehärteten, verglichen mit enthärteten Blättern. Gehärtete Roggenblättern besaßen mehr Transkript als nicht-gehärtete Winterroggenblätter.

b) Antioxidativer Schutz

-ScPMSR

Die Abbildung 5 dokumentiert, daß die Transkriptmenge des Enzyms ScPMSR während der Enthärtung innerhalb von drei Tagen deutlich zurückging. Bei den enthärteten Roggen-

pflanzen lag die vorliegende Transkriptmenge an ScPMSR auch unter der Menge, die sich bei nicht-gehärteten Pflanzen nachweisen ließ. Das Expressionsniveau von ScPMSR der kältegehärteten Roggenpflanzen lag, verglichen mit dem der nicht-gehärteten Pflanzen, deutlich höher.

c) Genexpression

-RNA Bindendes Protein

Aus der Abbildung 5 kann ersehen werden, daß nach Enthärtung die Menge an Transkript des Gens, welches für das RNA-Bindungsprotein kodiert, deutlich verringert ist. Bei einem Vergleich der Transkriptmengen dieses Proteins konnte zwischen gehärteten und nicht-gehärteten Blättern kein großer Unterschied ausgemacht werden.

Nach weiteren Sequenzierungen zeigte sich, daß nicht nur viele Klone auftauchen, deren cDNA-Fragmente homolog zur Basensequenz von ribosomalen RNAs sind, sondern auch solche, deren cDNA-Fragmente Homologie zu rbcS („small subunit“, kleine Untereinheit der RubisCO) besitzen. Es ist hinlänglich bekannt, daß nach Enthärtung bei vielen an der Photosynthese beteiligten Enzymen deutlich weniger Transkript nachweisbar ist, als bei gehärteten Pflanzen (Rorat et al. 1997). Dieser Umstand konnte auch in der vorliegenden Arbeit für das cDNA-Fragment rbcS aus der „SSH“-cDNA-Bank bestätigt werden.

Das Absinken der Transkriptmenge von rbcS nach Enthärtung konnte als ein Indikator dafür gewertet werden, daß die „SSH-Methode“, d.h. die Subtraktion der cDNA-Fragmente aus kältegehärteten und enthärteten Roggenblättern, tatsächlich erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Wegen des gehäufteten Auftretens von Klonen, deren cDNA-Fragment Homologie zu dem Gen rbcS aufzeigten, wurden alle zur Sequenzierung anstehenden Klone der „SSH“-cDNA-Bank vorher auf ihre Homologie zu rbcS hin überprüft und gegebenenfalls aussortiert. Dazu wurden, wie schon für das Aussortieren der rRNA-Klone beschrieben, die restringierten Plasmide aus der „SSH“-cDNA-Bank auf Membranen geblottet und diese mit einer radioaktiv markierten cDNA von rbcS detektiert. In der Praxis konnte ein Southern Blot zunächst mit dem radioaktiv markierten rRNA cDNA-Fragment detektiert werden. Nach der Auswertung wurde die radioaktiv markierte rRNA-Sonde vom Blot gewaschen und anschließend konnte die Membran mit der radioaktiv markierten cDNA von rbcS abgesucht werden.

3.1.3 Analyse von cDNA-Fragmenten aus der „SSH“-cDNA-Bank, deren differentielle Expression sich nach Northern Blot Analysen nicht bestätigten

Neben den differentiell exprimierten Fragmenten aus der „SSH“-cDNA-Bank, bei welchen die differentielle Genexpression in Northern Blot Analysen bestätigt werden konnte, traten zwei cDNA-Fragmente aus der „SSH“-cDNA-Bank auf, die nicht auf differentielle Genexpression in kältegehärteten Winterroggenblättern zurückgehen. Zusätzlich wurde die Expression des NADP-abhängigen Malat Enzyms überprüft, und der resultierende Northern Blot ist hier mit aufgelistet. Das entsprechende cDNA-Fragment des NADP-abhängigen Malat Enzyms wurde von PD Dr. Thomas Berberich für die Northern Blot Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

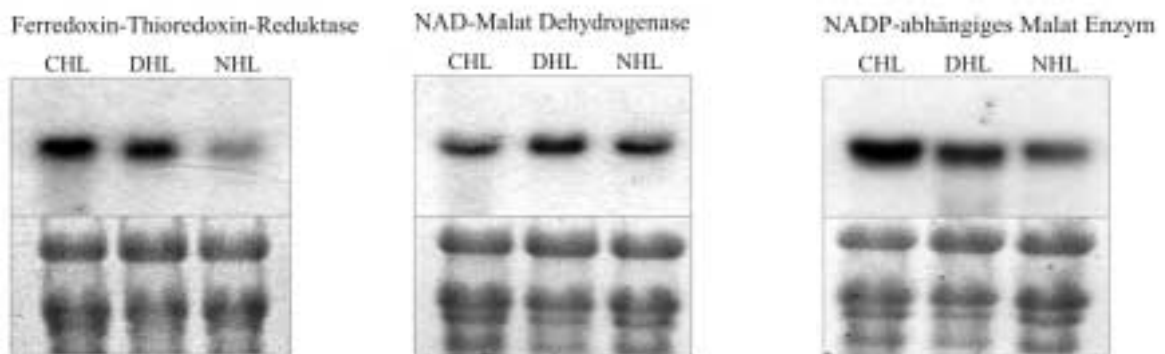


ABB.: 6

Autoradiogramme von Northern Blot Hybridisierungen. Es wurden jeweils 10µg Gesamt-RNA aus kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Winterroggenpflanzen auf eine Membran übertragen. Die Membranen wurden jeweils mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten (Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase, NAD-Malat Dehydrogenase, NADP-abhängiges Malat Enzym) hybridisiert. Zur Kontrolle der Beladung wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese der RNA zunächst angefärbt und photographiert.

a) Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase

Bei der Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase konnten keine Unterschiede der Transkriptmengen zwischen gehärteten und enthärteten Roggenblättern festgestellt werden. Allerdings liegt die Transkriptmenge dieses Enzyms bei nicht-gehärteten Blättern deutlich unter der Menge, die bei gehärteten und enthärteten Roggenblättern nachgewiesen werden konnte.

b) NAD-Malat Dehydrogenase

Die NAD-Malat Dehydrogenase muß wohl als ein echt „falschpositiver Klon“ bezeichnet werden. Hier konnten nach der Northern Blot Hybridisierung keinerlei Schwankungen der Transkriptmenge dieses Enzyms bei CHL, DHL und NHL erkannt werden.

c) NADP-abhängiges Malat Enzym

Auch das NADP-abhängige Malat Enzym trat nicht durch eine auffällige differentielle Expression hervor. Die Transkriptmenge für das NADP-abhängige Malat Enzym geht nach Enthärtung nur marginal zurück und auch der Unterschied zu den nicht-gehärteten Roggenpflanzen ist äußerst gering.

Diese drei Enzyme stehen also in keinem näheren Zusammenhang mit Kältehärtung bei Winterroggen und wurden von weiterführenden Untersuchungen ausgeschlossen.

3.1.4 Gene aus der „SSH“-cDNA-Bank, deren differentielle Genexpression noch nicht bestätigt werden konnte

Für zwei cDNA-Fragmente aus der „SSH“-cDNA-Bank konnte bisher noch keine erfolgreiche Northern Blot Analyse durchgeführt werden. Es handelt sich dabei um die Gene:

- **3-alpha-L-Fucosyltransferase**
- **unbekannte Gensequenz aus *O. sativa***

3.2 ISOLIERUNG VON cDNA-FRAGMENTEN DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE NACH DER „DD-PCR“ METHODE

Die Experimente zur Isolierung von differentieLL exprimierten cDNA-Fragmenten nach der „DD-PCR“-Methode wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthalts im Labor von Prof. Kusano an der Tohoku-Universität in Sendai/Japan durchgeführt.

Die „DD-PCR-Methode“ erlaubte es, parallel die unterschiedliche Expression von Genen unter variierenden Anzuchtbedingungen zu untersuchen. In diesem Fall konnten bei kältegehärteten Winterroggenblättern also sowohl hochregulierte und reprimierte Gene ermittelt werden.

Bei der „DD-PCR-Methode“ wurden jeweils gleiche Mengen an zuvor synthetisierter cDNA aus kältegehärteten und enthärteten Roggenblättern mit definierten Primern (Primersequenz siehe Methodenteil) in einer PCR-Reaktion vermehrt und nachfolgend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Diejenigen Fragmente, die nach Anfärben mit Ethidiumbromid durch einen unterschiedlich starken Grad an Amplifikation hervortraten, wurden aus dem Agarosegel eluiert und nachfolgend kloniert.

Zur Synthese von cDNA aus gehärteten und enthärteten Roggenblättern wurde zunächst, wie bei der Etablierung der „SSH“-cDNA-Bank bereits praktiziert, Gesamt-RNA isoliert. Aus dieser Gesamt-RNA wurde nachfolgend PolyA+RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden pro „DD-PCR“-Reaktion 12,5ng der synthetisierten cDNA eingesetzt. Die cDNA aus CHL und DHL wurden in zwei getrennten PCR-Reaktionen mit jeweils den gleichen PCR-Primern amplifiziert. Nach der PCR-Reaktion wurde der komplette PCR-Ansatz in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Anfärben mit Ethidiumbromid photographiert.

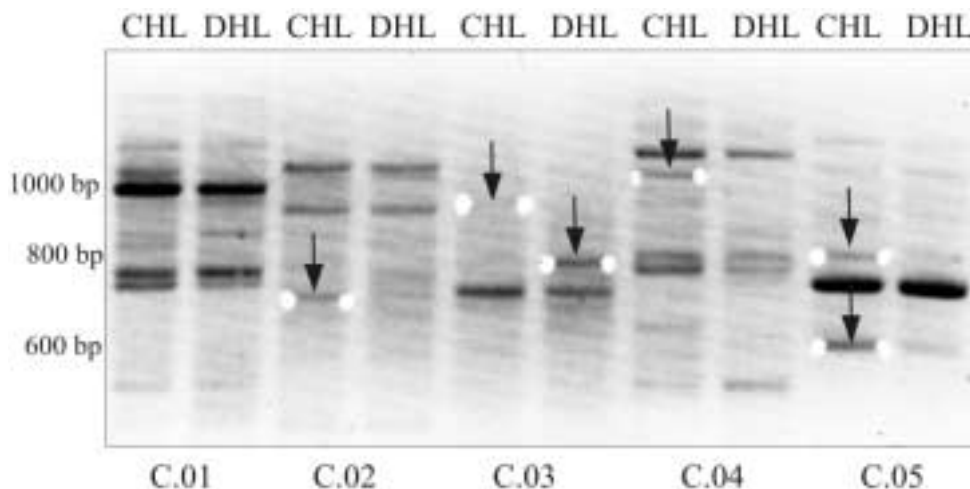


Abb.: 7

Elektrophoretische Auftrennung von fünf "DD-PCR"-Reaktionen in einem 1,5%igen Agarosegel. Eine "DD-PCR"-Reaktion setzt sich zusammen aus cDNA-Fragmenten aus CHL und DHL, die als Matrize dienen und immer jeweils einem Primer (z. B. C.01-C.05) der zur Amplifikation der cDNA-Fragmente eingesetzt wird. Um die resultierenden Amplifikate miteinander vergleichen zu können, wurden die "DD-PCR"-Reaktionen immer paarweise aufgetragen.

Die obige Abbildung 7 zeigt exemplarisch ein Agarosegel nach der Elektrophorese von fünf verschiedenen "DD-PCR"-Reaktionen. Es können bei einem Vergleich der paarweise aufgetragenen "DD-PCR"-Reaktionen, in denen jeweils cDNA aus CHL und DHL als Matrize und ein Primer C.01-C.05 eingesetzt wurden, unterschiedlich stark amplifizierte

cDNA-Fragmente erkannt werden. Diese unterschiedlich häufig amplifizierte cDNA-Fragmente aus CHL und DHL wurden auf dem gefärbten Agarosegel kenntlich durch eine unterschiedliche Intensität der Ethidiumbromidfärbung. Diese Fragmente sind durch Pfeile in der Abbildung 7 hervorgehoben. Daneben treten gleichhäufig amplifizierte cDNA-Fragmente, die keinen Unterschied in der Ethidiumbromidfärbung erkennen lassen, auf. Diejenigen Fragmente, die durch ein verstärktes Auftreten in einer der beiden "DD-PCR"-Ansätze auffallen, wurden aus dem Gel eluiert und nachfolgend kloniert. Von diesen Fragmenten wurde angenommen, daß der unterschiedliche Grad an Amplifikation in einer PCR-Reaktion ursächlich auf differentielle Genexpression in der Pflanze zurückgeführt werden kann. Das Auftreten von cDNA-Fragmenten, die in beiden PCR-Ansätzen gleich häufig amplifiziert wurden, bedeutet folglich, daß es sich dabei möglicherweise um so genannte „housekeeping genes“ (Haushaltsgene) oder um Gene, die in ihrer Expression unter Kältehärtung nicht beeinflußt wurden, handelt. Das Auftreten von gleichhäufig amplifizierten cDNA-Fragmenten kann somit als eine erste Erfolgskontrolle der „DD-PCR“ angesehen werden, da nicht anzunehmen ist, daß ein veränderter Umweltfaktor bei allen Winterroggenen zu einer differentiellen Genexpression führt.

Die aus dem Agarosegel eluierten cDNA-Fragmente wurden in pGEM-Teasy Vektoren ligiert und in Bakterien des Stammes DH5 α transformiert. Aus den Bakterienkulturen dieser Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert. Diese Plasmid-DNA wurde sequenziert, um festzustellen, welche DNA-Sequenz sich hinter dem isolierten und klonierten cDNA-Fragment verbirgt.

Nachfolgende Homologiestudien der sequenzierten Plasmide lieferten Daten über die Ähnlichkeit der klonierten cDNA-Fragmente mit Genen aus den verschiedenen Teilbereichen des pflanzlichen Stoffwechsels. Die Gene sind nach ihrem verstärkten Vorkommen in gehärteten oder in enthärteten Roggenblättern sortiert. Die einzelnen DNA-Sequenzdaten sind im Anhang aufgeführt.

I) Differentiell exprimierte Gene, die verstärkt in gehärteten Roggenblättern auftreten:

a) Genexpression :

- **putativer Transkriptionselongationsfaktor (0,8Kb)**

b) Nucleotidstoffwechsel :

- **UMP1 Synthase (1,4Kb)**

c.) Zuckerstoffwechsel :

- **Transketolase** (2,3Kb)
- **Fructose-1,6-bisphosphatase** (1,5Kb)

II) Differentiell exprimierte Gene, die verstärkt in enthärteten Roggenblättern vorkommen und deren Expression in kältegehärteten Roggenblättern reprimiert ist:

a) Energiestoffwechsel :

- **Protonen ATPase** (Ha1 Gen, 3,4Kb)

b) Pathogenabwehr/ programmierter Zelltod :

- **Lethal leaf spot Gen** (Lls1 Gen, 1,6Kb)

c) Proteinstoffwechsel :

- **Disulfid Isomerase** (1,0Kb)

d) Unbekannte Gensequenz aus *O. sativa* :

- **Klon Nr. 5C**

Die einzelnen Sequenzdaten sind im Anhang aufgeführt.

3.2.1 Überprüfung der differentiellen Expression

Auch in diesem Fall mußte, wie bei der „SSH“-Methode, die differentielle Genexpression der einzelnen Kandidaten bestätigt werden, um „Falschpositive“ auszuschließen. Um den Nachweis zu führen, daß die cDNA-Fragmente nach der „DD-PCR“ tatsächlich jeweils einen unterschiedlichen Grad an Expression in den CHL und DHL aufweisen, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt.

Folgende Autoradiogramm-Serie zeigt die als differentiell exprimiert erkannten cDNA-Fragmente, die sich nach Durchführung der „DD-PCR“ ergeben hatten. Die differentiell exprimierten Gene wurden nach ihrem verstärkten Auftreten in gehärteten oder in enthärteten Roggenblättern und nach ihrer Funktion im pflanzlichen Stoffwechsel sortiert.

Differentiell exprimierte Gene, deren Expression in gehärteten Roggenblättern hochreguliert ist:

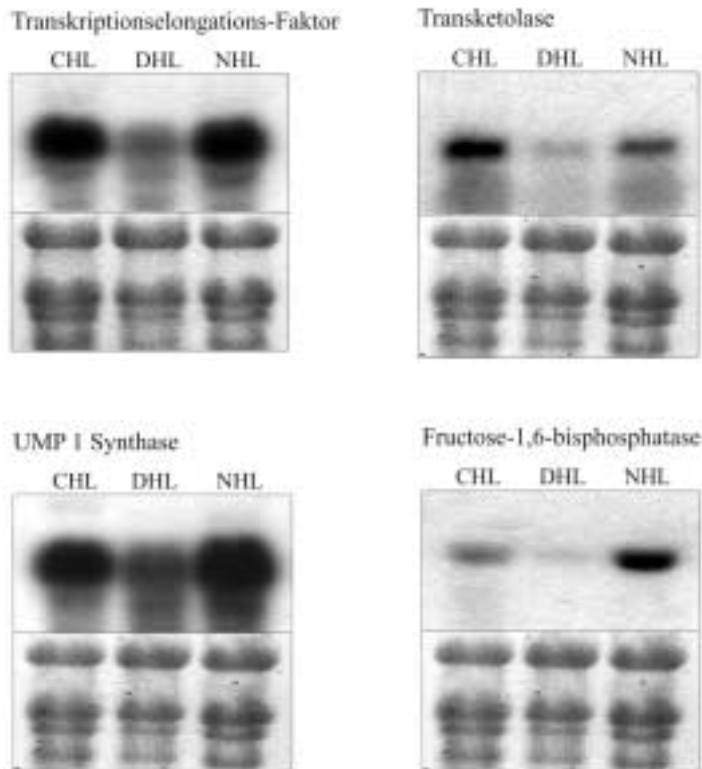


Abb.: 8

Autoradiogramme von Northern Blot Hybridisierungen. Es wurden jeweils 10µg Gesamt-RNA aus kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Winterroggenpflanzen auf eine Membran übertragen. Die Membranen wurden jeweils mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten (Transkriptionselongationsfaktor, UMP1 Synthase, Transketolase, Fructose-1,6-bisphosphatase) hybridisiert. Zur Kontrolle der Beladung wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese zunächst angefärbt und fotografiert.

a) Genexpression :

- putativer Transkriptionselongationsfaktor

Die Transkriptmenge in Roggenblättern eines Transkriptionselongationsfaktors ging nach der Enthärtungsphase deutlich zurück. Ähnlich wie bei der unten aufgeführten UMP1 Synthase waren keine großen Unterschiede in der Transkriptmenge bei kältegehärteten und nicht-gehärteten Roggenblättern feststellbar.

b) Nucleotidstoffwechsel :

- UMP1 Synthase

Die erhöhte Transkriptmenge des Enzyms UMP1 Synthase in kältegehärteten Roggenblättern erreichte nach der Enthärtung in enthärteten Roggenblättern nicht mehr das zuvor ermittelte Niveau. Bei den kältegehärteten Roggenblättern war verglichen mit nicht-gehärteten Roggenblättern allerdings gleich viel Transkript auf dem Northern Blot nachweisbar.

c) Zuckerstoffwechsel :

- **Transketolase**

Das Autoradiogramm (Abbildung 8) dokumentiert die Abnahme der Transkriptmenge des Enzyms Transketolase (plastidäre Form) nach Enthärtung der Roggenpflanzen innerhalb von drei Tagen. Bei den enthärteten Roggenblättern lag die Transkriptmenge an Transketolase auch unter der Menge, die sich bei nicht-gehärteten Blättern nachweisen ließ. Das Expressionsniveau an Transketolase der kältegehärteten Roggenpflanzen war, verglichen mit dem der nicht-gehärteten Pflanzen, erhöht.

- **Fructose-1,6-bisphosphatase**

Das Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase (cytosolische Form) war in kältegehärteten Roggenblättern ebenfalls differentiell exprimiert, da nach drei Tagen Enthärtung eine deutliche Verringerung der Transkriptmenge festzustellen war. Die höchste Transkriptmenge konnte allerdings bei den nicht-gehärteten Roggenpflanzen ermittelt werden.

II) Differentiell exprimierte Gene, die verstärkt in enthärteten Roggenblättern vorkommen und deren Expression in kältegehärteten Roggenblättern reprimiert ist:

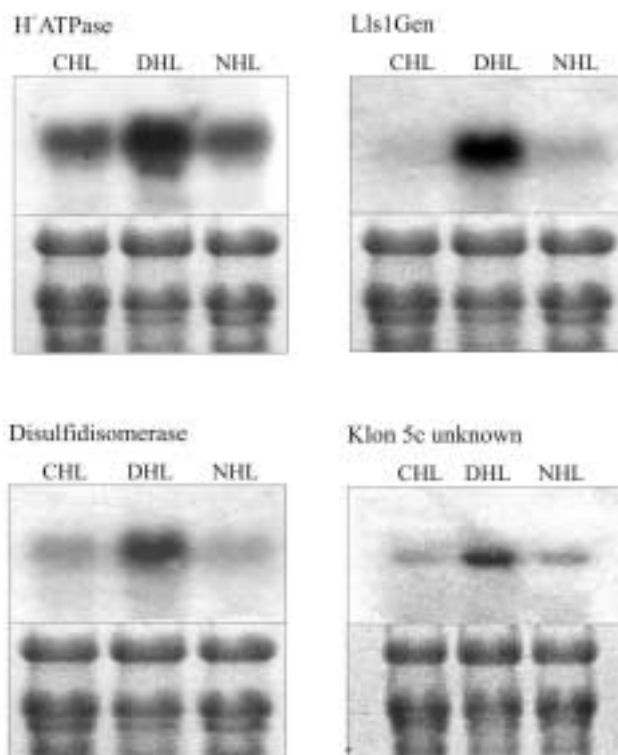


Abb.: 9

Autoradiogramme von Northern Blot Hybridisierungen. Es wurden jeweils 10µg Gesamt-RNA aus kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Winterroggenpflanzen auf eine Membran übertragen. Die Membranen wurden jeweils mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten (H+ATPase, Lls1 Gen, Disulfidisomerase, 5C unknown) hybridisiert. Zur Kontrolle der Beladung wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese zunächst angefärbt und photographiert.

a) Energiestoffwechsel :

- **Protonen ATPase (ha1 Gen)**

Das Autoradiogramm (Abbildung 9) zeigt, daß die mRNA-Menge der H⁺-ATPase (ha 1 Gen) nach der Enthärtung von Winterroggen in den Blättern innerhalb von drei Tagen hochreguliert wurde. Bei kältegehärteten und nicht-gehärteten Roggenpflanzen konnten jeweils identische Mengen an Transkript in den Blättern festgestellt werden.

b) Pathogenabwehr/ programmierter Zelltod :

- **Lethal leaf spot Gen (Lls1 Gen)**

Bei enthärteten Roggenpflanzen konnte eine erhöhte Transkriptmenge des Lls 1 Gens in Blättern, verglichen mit gehärteten und nicht-gehärteten Roggenpflanzen nachgewiesen werden. Der Vergleich der Transkriptmengen von kältegehärteten und nicht-gehärteten Roggenblättern förderte keinerlei nennenswerte Unterschiede zwischen den beiden Anzuchtbedingungen zu Tage.

c) Proteinstoffwechsel :

- **Disulfid Isomerase**

Von dem Enzym Disulfid Isomerase konnte eine erhöhte Transkriptmenge bei enthärteten, verglichen mit kältegehärteten und nicht-gehärteten Pflanzen, nachgewiesen werden. Die nicht-gehärteten und die kältegehärteten Roggenpflanzen wiesen vergleichbare Mengen an Disulfid Isomerase Transkript in ihren Blättern auf.

d) Unbekannte Gensequenz aus *O. sativa* :

- **Klon Nr. 5C**

Bei dem unbekanntem Gen Nr. 5C aus *Oryza sativa* wurde ebenfalls eine erhöhte Transkriptmenge dieses Gens bei enthärteten Blättern festgestellt. Wiederum lagen in den Blättern kältegehärteter und nicht-gehärteter Pflanzen vergleichbare Transkriptmengen vor. Die nachfolgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über das Expressionsmuster aller in dieser Promotionsarbeit untersuchten Gene.

ISOLIERTES GEN	CHL	DHL	NHL
PMSR	++++	+	++
SSU	++++	+	++
LSU	++++	+	++
LHC II b	++++	+	++
RNA-bindendes Protein	+++	++	+++
Transketolase	+++	+	++
Transkriptions Elongationsfaktor	+++	+	+++
UMP 1 Synthase	+++	++	+++
Fructose-1,6-bisphosphatase	++	+	+++
Lls1 Gen	+	++++	+
Disulfid Isomerase	+	+++	+
Klon 5c	+	+++	+
H ⁺ -ATPase	++	+++	++
NADP-abhängiges Malat Enzym	++	+	+
Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase	++	++	+
NAD-Malat Dehydrogenase	+	+	+

Tabelle 1 :

Tabellarische Zusammenstellung der Auswertung der Northern Blot Analysen aller untersuchten Gene. Die Anzahl der +-Zeichen geben dabei die relativen mRNA-Mengen in den miteinander verglichenen Proben aus CHL, DHL und NHL an.

3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER EXPRESSION VON ScPMSR

Nach der Durchführung der „SSH-PCR“-Methode konnte aus kältegehärteten Roggenblättern ein cDNA-Fragment eines differentiell exprimierten Gens isoliert werden. Dieses Gen kodiert für das Enzym PMSR, die so genannte Peptid-Methionin-Sulfoxid-Reduktase. Das antioxidativ wirkende Enzym PMSR wird zum Minigenet, über welchen jeder Organismus verfügt, gezählt (Mushegian et al. 1996).

Als erstes wurde die Verteilung des ScPMSR-Transkriptes innerhalb des Primärblattes untersucht.

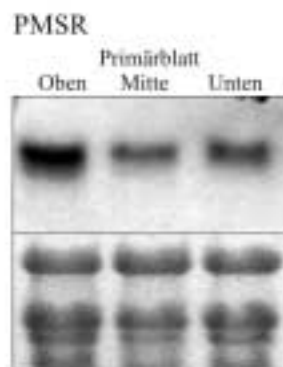


Abb.: 10

Autoradiogramm einer Northern Blot Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA von ScPMSR. Es wurden jeweils 10µg Gesamt-RNA, isoliert aus der Blattspitze(O) der Blattmitte (M) und der Blattbasis (U) von NHL elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen.

Das Autoradiogramm (Abbildung 10) zeigt ein verstärktes Auftreten des PMSR-Transkriptes im oberen Drittel des Primärblattes. In der Blattmitte und in der Blattbasis ist eine ähnliche Verteilung des PMSR-Transkriptes zu verzeichnen.

Wie in der Einleitung näher erläutert, begünstigen niedrige Temperaturen in Kombination mit hohen Lichtintensitäten im pflanzlichen Organismus das Auftreten von Sauerstoffradikalen. Es bestand nun Interesse zu erfahren, ob PMSR bei der Abwehr von ROS während der Kältehärtung eine entscheidende Rolle zugeordnet werden kann. Deswegen wurde als nächstes untersucht, ob die Transkriptmenge von ScPMSR bei Kälte, ähnlich wie bei Kälte-transkriptionsfaktoren sehr kurzfristig nach oben reguliert wird oder ob die Transkriptmenge über einen längeren Zeitraum hin zunimmt. Zu diesem Zweck wurden Transkriptmengen von ScPMSR bei Winterroggen bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen auf einem Northern Blot miteinander verglichen. Dazu wurde kältegehärteter, enthärteter und nicht-gehärteter Winterroggen unter den beschriebenen Bedingungen angezogen und im Anschluß für unterschiedliche Zeitintervalle bei verschiedenen Temperaturen weiter inkubiert.

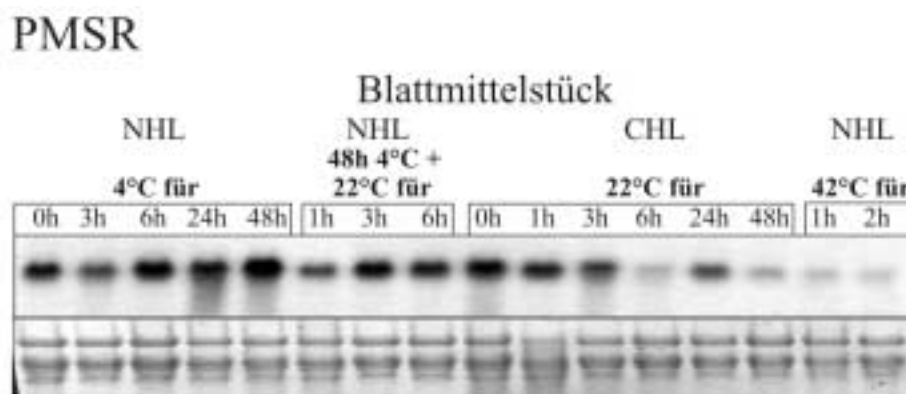


Abb.: 11

Autoradiogramm einer Northern Blot Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA von ScPMSR. Es wurden jeweils 10µg Gesamt-RNA, isoliert aus den Blattmittelstücken von Winterroggen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen.

- Bahn 1 NHL
- Bahn 2-5 NHL + 4°C für 3h, 6h, 24h, 48h
- Bahn 6-8 NHL + 4°C für 48h + 22°C für 1h, 3h, 6h
- Bahn 9 CHL
- Bahn 10-14 CHL + 22°C für 1h, 3h, 6h, 24h, 48h
- Bahn 15 & 16 NHL + 42°C für 1h, 2h

Die Abbildung 11 zeigt, daß bei nicht gehärteten Roggenblättern die zu 4°C transferiert wurden, die Transkriptmenge nach 3h zunächst deutlich rückläufig war. Danach stieg die

Transkriptmenge wieder an und erreicht bereits nach 6h wieder den Ausgangswert von NHL. Nach 24h Inkubation bei 4°C konnte wieder etwas weniger Transkript, als nach 6h, detektiert und nach 48 h Inkubation die höchste Menge an Transkript nachgewiesen werden.

Bei nicht-gehärteten Pflanzen, die nun für 48h in 4°C gekühlte Klimaschränke umgesetzt und anschließend wieder zurück in 22°C warme Klimaschränke gestellt wurden, sank die Transkriptmenge innerhalb einer Stunde rapide ab, um nach 3 und 6h Inkuabtion anzusteigen, allerdings wurde der Ausgangswert (NHL + 48h 4°C) nicht mehr erzielt.

Wurde kältegehärteter Roggen zu 22°C transferiert konnte ein kontinuierlicher Rückgang über 1h, 3h, 6h der Transkriptmenge von ScPMSR verfolgt werden. Nach 24h erhöhte sich die Transkriptmenge noch einmal, um nach 48h dann erneut stark zurückzugehen.

Bei nicht-gehärteten Winterroggenblättern, die bei 42°C hitzestress wurden, war die Transkriptmenge schon nach 1h deutlich zurückgegangen und dieser Trend zeigte sich auch noch nach 2h.

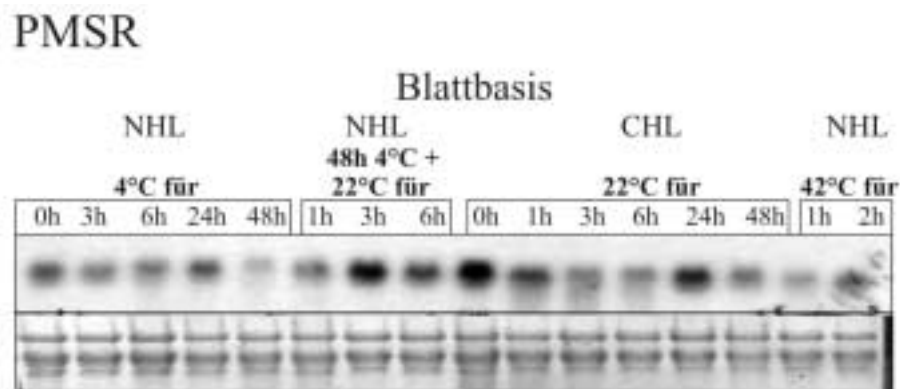


Abb.: 12

Autoradiogramm einer Northern Blot Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA von ScPMSR. Es wurden jeweils 10µg Gesamt-RNA, isoliert aus der Roggenblattbasis, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen.

- Bahn 1 NHL
- Bahn 2-5 NHL + 4°C für 3h, 6h, 24h, 48h
- Bahn 6-8 NHL + 4°C für 48h + 22°C für 1h, 3h, 6h
- Bahn 9 CHL
- Bahn 10-14 CHL + 22°C für 1h, 3h, 6h, 24h, 48h
- Bahn 15 & 16 NHL + 42°C für 1h, 2h

Die Abbildung 12 belegt, daß nachdem NHL in 4°C gestellt wurden in der Blattbasis keinerlei gravierende Veränderung der Transkriptmengen innerhalb des Beobachtungszeitraums von 48h festgestellt werden konnten. Wurden die für 48h bei 4°C inkubierten NHL zurück in 22°C gestellt, stieg die Transkriptmenge nach 3h kurzzeitig an und ging

nach 6h wieder zurück. Die Transkriptmenge von CHL, die in 22°C warme Klimaschränke umgesetzt wurden, war innerhalb der ersten Stunden stark rückläufig und steigerte sich nach 24h wieder, um nach 48h wieder abzufallen. Nach einem Umsetzen von NHL für 1h und 2 h in 42°C nahm die Transkriptmenge ebenfalls ab.

Die Resultate zeigten insgesamt, daß die Transkriptmenge von PMSR bei nicht gehärteten Roggenblattmittelstücken, die in 4°C kalte Klimaschränke umgesetzt werden, sich nicht kurzfristig innerhalb von drei Stunden erhöht, sondern daß die Zunahme der Transkriptmenge über einen längeren Zeitraum (bis zu 48h) erfolgt. Dies läßt vermuten, daß das Enzym PMSR bei der schnellen Reaktion auf Kältestreß eine untergeordnete Rolle spielt und eher bei der langfristigen Adaptation an Kälte von Bedeutung ist. Aufgrund dieser Vermutung bestand nun Interesse zu erfahren, ob die erhöhte Transkriptmenge bei kältegehärteten Roggenblättern auch mit einer gesteigerten Proteinmenge von ScPMSR in kältegehärteten Roggenblättern korreliert.

Im Weiteren wurden deshalb Versuche zur Untersuchung der Expression von ScPMSR auf Proteinebene durchgeführt.

Wie in der Einleitung näher erläutert stellt die Kombination aus tiefen Temperaturen und hohen Lichtintensitäten für viele Pflanzen eine besondere Streßsituation dar. Es war deshalb interessant zu erfahren, ob sich verschiedene Lichtstärken bei unterschiedlichen Temperaturen auf den PMSR mRNA Gehalt auswirken. Dazu wurden nicht-gehärtete Roggenblätter, die in 4°C kalte Klimaschränke umgesetzt worden waren, unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt. Gleichzeitig wurden kältegehärtete Roggenblätter, die anschließend bei einer höheren Temperatur von 22°C weiter inkubiert worden waren, ebenfalls zwei verschiedenen Lichtstärken (96 bzw. 1000µE) ausgesetzt.

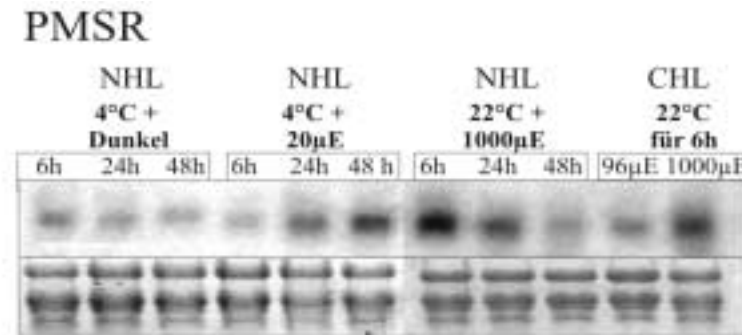


Abb.: 13

Autoradiogramm einer Northern Blot Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA von ScPMSR. Es wurden 10µg Gesamt-RNA, isoliert aus den Blattmittelstücken von nicht-gehärteten und gehärteten Winterroggen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen.

Bahn 1-3 NHL, die in 4°C kalte Klimaschränke umgestellt wurden und für 6h, 24h, 48h bei Dunkelheit inkubierten.

Bahn 4-6 NHL, die in 4°C kalte Klimaschränke umgestellt wurden und für 6h, 24h, 48h bei einer Lichtintensität von 20µE inkubierten.

Bahn 7-9 NHL, die bei 96µE gewachsen waren und nachfolgend für 6h, 24h, 48h einer Lichtstärke von 1000µE ausgesetzt wurden.

Bahn 10 & 11 CHL, die in 22°C warme Klimaschränke umgesetzt worden waren und dort für jeweils 6h bei 96 bzw. 1000µE inkubiert wurden.

Aus dem Autoradiogramm der Abbildung 13 wird ersichtlich, daß bei nicht-gehärteten Winterroggenpflanzen, die zu einer Temperatur von 4°C gestellt und für den Zeitraum von 6 bis 48h in Dunkelheit inkubiert wurden, der Gehalt an PMSR mRNA in dieser Zeit nahezu unverändert blieb. Wurden die nicht-gehärteten Winterroggenpflanzen unter den gleichen Temperaturbedingungen bei 20µE inkubiert, kam es zu einer merklichen Erhöhung der PMSR-Transkriptmenge innerhalb eines Zeitraumes von 6 bis 48h. Vergleicht man die Signalstärken von NHL, die für 48h in 4°C kalte Klimaschränke umgestellt und bei 20µE inkubiert worden waren mit NHL die in Abwesenheit von Licht inkubiert worden waren, so zeigt sich, daß deutlich mehr PMSR-Transkript in den Proben mit Lichtgabe vorliegt. In diesem Fall genügt bereits eine geringe Lichtmenge von 20µE, um Unterschiede in der Transkriptmenge von ScPMSR beobachten zu können

Wurden die nicht-gehärteten Winterroggenpflanzen weiterhin bei 22°C inkubiert und die Lichteinstrahlung auf 1000µE erhöht, ging die PMSR Transkriptmenge innerhalb des beobachteten Zeitraumes von 6-48h kontinuierlich zurück. In diesen Roggenblättern wirkt sich die hohe Lichtintensität in den untersuchten Zeitraum negativ auf die ScPMSR Transkriptmenge aus. Zwischen CHL die in 22°C umgestellt wurden und NHL die bei

22°C weiterwachsen wurden, konnten jeweils unter einer Lichtstärke von 1000 μ E nach 6h keine Unterschiede in der mRNA-Menge von ScPMSR festgestellt werden.

Kältegehärtete Winterroggenpflanzen, die anschließend bei einer höheren Temperatur von 22°C inkubiert und für 6h einer Lichteinstrahlung von 96 bzw. 1000 μ E ausgesetzt wurden, zeigten, daß die Transkriptmenge in den Blättern der Pflanzen, die bei 1000 μ E inkubiert wurden, deutlich höher lag, als bei den Blättern, die nur einer Lichtintensität von 96 μ E ausgesetzt worden waren.

3.4 UNTERSUCHUNG ZUR EXPRESSION DER PROTEINE DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE

Für die Untersuchungen zur Expression von ScLHC II b, ScSSU & ScLSU konnte auf bereits zur Verfügung stehende Antikörper zurückgegriffen werden. Ein Antikörper gegen ScPMSR lag nicht vor und mußte deshalb erst hergestellt werden.

3.4.1 Isolierung eines cDNA-Klons von ScPMSR

Das aus der "SSH"-Bank isolierte cDNA-Fragment von ScPMSR umfaßte nicht den vollständig kodierenden Bereich des Enzyms. Daher war es zunächst erforderlich, um weitere Untersuchungen vornehmen zu können (u.a. Herstellung eines ScPMSR Antikörpers), einen cDNA-Klon von ScPMSR mit dem vollständig kodierenden Bereich aus einer cDNA-Bank zu isolieren.

Zur Isolierung eines cDNA-Klons von ScPMSR wurde mit dem ursprünglichen cDNA-Fragment von ScPMSR aus der "SSH"-Bank eine cDNA-Bank aus kältegehärteten Blattmittelstücken von Winterroggen abgesucht. Die cDNA-Bank wurde mit dem Reaktionskit „ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit“ der Firma Stratagene hergestellt. Die Phagenbank besaß eine Konzentration von $1,9 \times 10^9$ pfu/ml. Auf einer quadratischen LB-Platte (22,5 x 22,5 cm) wurden etwa 300.000 pfu ausplattiert und an eine Nylonmembran gebunden. Diese Membran wurde mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment aus der "SSH"-Bank von ScPMSR hybridisiert. Auf dem Röntgenfilm erscheinende Signale wurden einem Plaqueareal auf der LB-Platte zugeordnet und dieses großflächig ausgeschnitten. Diese Phagen wurden soweit verdünnt und mit Wirtszellen ausplattiert, bis

schließlich ein Phagenplaque exakt einem Signal auf dem Röntgenfilm zugeordnet werden konnte.

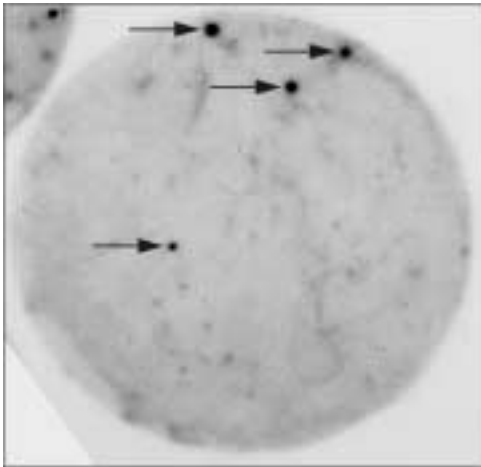


Abb.: 14
Röntgenfilm eines Rundfilterphagenabdrucks nach dem zweiten Screening der cDNA-Phagenbank detektiert mit einem radioaktiv markierten cDNA-Fragment von ScPMSR.

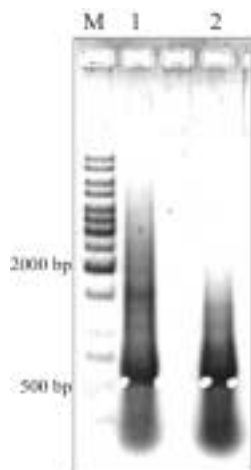
Der Röntgenfilm der Abbildung 14 dokumentiert exemplarisch eine erfolgreich verlaufene Phagenvereinzelung. Es schloß sich die In-vivo-excison und die Gewinnung von Plasmid-DNA an. Nach Sequenzierung des Plasmids zeigte sich, daß der isolierte Phage Träger des gesuchten cDNA-Klons von ScPMSR war. Die ScPMSR-Sequenz befindet sich im Anhang. Im nächsten Schritt wurde die Sequenz dieses cDNA-Klons in einen Expressionsvektor zur Produktion des rekombinanten ScPMSR-Proteins kloniert.

3.4.2 Klonierung des ScPMSR cDNA-Klons in den Expressionsvektor pQE32

Für die Produktion des rekombinanten Proteins von ScPMSR wurde das Expressionssystem „The Qiaexpressionist“ der Firma Qiagen verwendet. Die Expressionsvektoren sind so konzipiert, daß durch eine (pQE32), zwei (pQE31) oder keine (pQE30) zusätzliche Base vor der Klonierungsstelle jedweder cDNA-Klon im Leserahmen kloniert werden kann.

Zur gerichteten Klonierung des cDNA-Klons von ScPMSR in einen Expressionsvektor wurde zunächst der cDNA-Klon in einer PCR-Reaktion mit Primern, die bestimmte Restriktionsstellen tragen, amplifiziert. Bei den verwendeten Primern handelte es sich um Primer (5') „PMSR_BamHI“ mit einer Restriktionsstelle für das Enzym *Bam*HI und Primer (3') „PMSR_SalI“ mit einer Restriktionsstelle für das Enzym *Sal*I. Als Matrize diente in dieser PCR-Reaktion der aus der cDNA-Bank isolierte cDNA-Klon von PMSR. Die PCR-Reaktion erfolgte über 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 60°C unter Verwendung der beiden folgenden Primer:

Vorwärts PMSR30_bam 5'-CGGGATCCCCATGTCCAGCACCGGCGCGGC-3'
Rückwärts PMSR30_sal 5'-GCGTCGACTCACCCGTAGCAAGGGGAGGGG-3'

**Abb.: 15**

Photographie eines Ethidiumbromid-gefärbten 1%igen Agarosegels nach erfolgreicher Gelelektrophorese der PCR-Reaktion mit den Primern 5'-PMSR_BamHI und 3'-PMSR_SalI

Bahn 1 + 2: elektrophoretisch aufgetrennte PCR-Reaktion.

Die Photographie zeigte ein PCR-Fragment (in der Abbildung 15 markiert durch einen Pfeil) im Bereich von etwa 520 Basenpaaren. Dieses Fragment wurde aus dem Gel eluiert, in den Vektor pGEM-Teasy ligiert und in Bakterien des Stammes DH5 α kloniert. Anschließend wurde aus der Bakterienkultur Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, daß es sich bei dem PCR-Fragment um den gewünschten cDNA-Klon von ScPMSR, nun flankiert von Restriktionsstellen für *Bam*HI und *Sal*I, handelte. Im Anschluß wurde das klonierte PCR-Fragment und der Expressionsvektor pQE32 für die gerichtete Klonierung jeweils mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I restringiert. Die Wahl des Expressionsvektors pQE32 stellte sicher, daß der cDNA-Klon von ScPMSR im Leserahmen kloniert werden konnte. Der cDNA-Klon wurde nun gerichtet in den Expressionsvektor pQE32 ligiert und danach wurden Bakterien des Stammes DH5 α mit diesem Vektor transformiert. Aus den entstandenen Bakterienkolonien wurde Plasmid-DNA gewonnen. Eine Sequenzierung lieferte den Beleg dafür, daß der cDNA-Klon im Leserahmen und ohne Lesefehler in den Expressionsvektor kloniert worden ist. Die Sequenzdaten befinden sich im Anhang.

Zur späteren Kontrolle, ob tatsächlich eine Induktion von ScPMSR erzielt werden konnte, wurde der cDNA-Klon von ScPMSR parallel noch zusätzlich in den Expressionsvektor pQE30 ligiert und in den Bakterienstamm DH5 α transformiert. Bei der Wahl des Expressionsvektors pQE30 befindet sich die Sequenz des cDNA-Klons von ScPMSR nicht im Leserahmen und folglich konnte von den Bakterien trotz Induktion kein rekombinantes Protein gebildet werden.

3.5. PRODUKTION DES REKOMBINANTEN SCPMSR-PROTEINS ZUR HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN

3.5.1 Überprüfung der Induktion von ScPMSR

Nachdem der cDNA-Klon von ScPMSR erfolgreich in den Expressionsvektor pQE32 kloniert und in Bakterien transformiert werden konnte, wurden die transformierten Bakterien durch Zugabe von IPTG zur Produktion von ScPMSR angeregt. Zur Überprüfung, ob die transformierten Bakterien tatsächlich nach Induktion mit IPTG zur Produktion von ScPMSR veranlaßt werden konnten, wurden zwei Strategien verfolgt. In einem ersten Versuch wurden Gesamtproteinextrakte von transformierten Bakterien nach Induktion mit IPTG und ohne Induktion auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. In einem zweiten Versuch zur Bestätigung der Induktion von ScPMSR wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Der Expressionsvektor pQE der Firma Qiagen ist so konzipiert, daß sich vor der multiplen Klonierungsstelle eine Gensequenz befindet, die für sechs Histidine kodiert. Dieser Histidin-Abschnitt des Proteins diente später dazu, das mit dem His-Tag ausgestattete ScPMSR Protein von den anderen Proteinen mittels Säulenaffinitätschromatographie zu trennen. Gegen diese sechs Histidine liegt ein Anti-His-Tag-Antikörper vor, mit welchem der Histidin-Abschnitt in dem rekombinanten Protein nachgewiesen werden konnte.

Zur Verifizierung der Induktion von ScPMSR wuchsen die transformierten Bakterien mit dem cDNA-Klon in Abwesenheit des Induktors bis zu einer OD_{600nm} 0,6 heran. Die Kultur wurde geteilt und die eine Hälfte durch die Zugabe von IPTG (1mM Endkonzentration) induziert, die andere Hälfte wurde nicht induziert. Das gleiche Verfahren wurde auch mit der Kontrolle, also dem cDNA-Klon der sich im Expressionsvektor nicht im Leserahmen befindet, durchgeführt. Nach Ablauf von 1h, 2h, 3h und 4h Induktionszeit wurden Proteinproben aus den Kulturen entnommen. Die bakteriellen Gesamtproteinextrakte wurden denaturiert und in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, sowie durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Abbildung 16 dokumentiert die Induktion von ScPMSR und zeigt den zeitlichen Verlauf der Expression von ScPMSR.

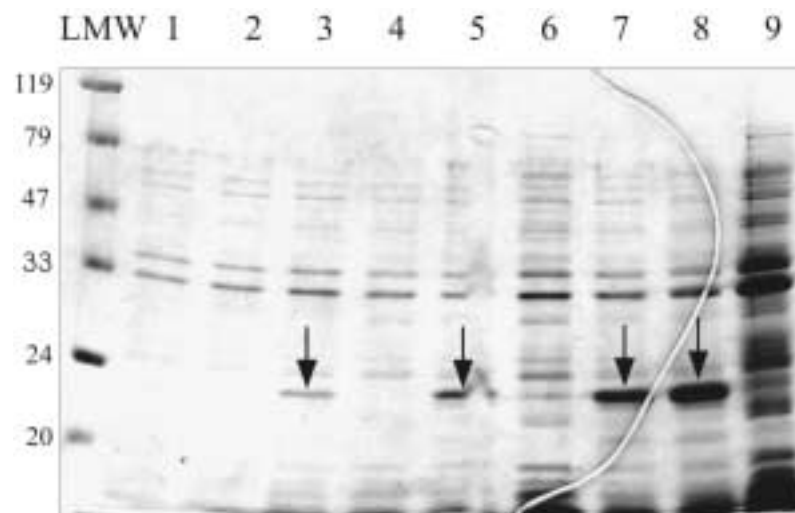


Abb.: 16

Coomassie-gefärbtes 12,5%iges SDS-PAGE-Gel von Gesamtextraktproteinen aus *E.coli* Kulturen nach unterschiedlichen Anzuchtbedingungen zur Überprüfung der Expression von ScPMSR.

LMW : Proteinlängenstandard in kDa

BAHN	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IPTG	-	-	+	+	+	+	+	+	+
h	0	0	1	1	2	2	3	4	4
pQE	30	32	32	30	32	30	32	32	30

pQE32 + = cDNA-Klon von ScPMSR im Expressionsvektor pQE32 im Leserahmen

pQE30 - = cDNA-Klon von ScPMSR im Expressionsvektor pQE30 nicht im Leserahmen befindlich

IPTG + = induziert mit IPTG

IPTG - = nicht induziert mit IPTG

h = Wachstumszeit nach IPTG-Induktion in Stunden/ Zeitpunkt der Probenentnahme

Abbildung 16 zeigte in sämtlichen Proben Proteinbandenmuster von charakteristischen *E.coli* Proteinen. Auffällig war jeweils nach Induktion eine zusätzliche dominante Proteinbande in Höhe von etwa 23kDa in den Bahnen 3, 5, 7 und 8. In diesen Bahnen befand sich der Gesamtproteinextrakt von induzierten, transformierten Bakterien des cDNA-Klons von ScPMSR, der in den Expressionsvektor pQE32 im Leserahmen ligiert wurde. Diese distinkte Bande fehlt in den Bahnen 1, 4, 6 und 9. In diesen Bahnen wurden Gesamt-extrakte von transformierten und induzierten Bakterien des cDNA-Klons von ScPMSR, der in den Expressionsvektor pQE30 nicht im Leserahmen kloniert wurde, elektrophoretisch aufgetrennt. Eine zusätzliche Proteinbande fehlte auch in der nicht-induzierten Probe von pQE32+ in Bahn 2. Die zusätzliche Proteinbande sollte daher dem induzierten ScPMSR Protein entsprechen. Diese Proteinbande intensivierte sich mit zunehmender Induktionsdauer (siehe dazu Bahn 3, 5, 7 & 8).

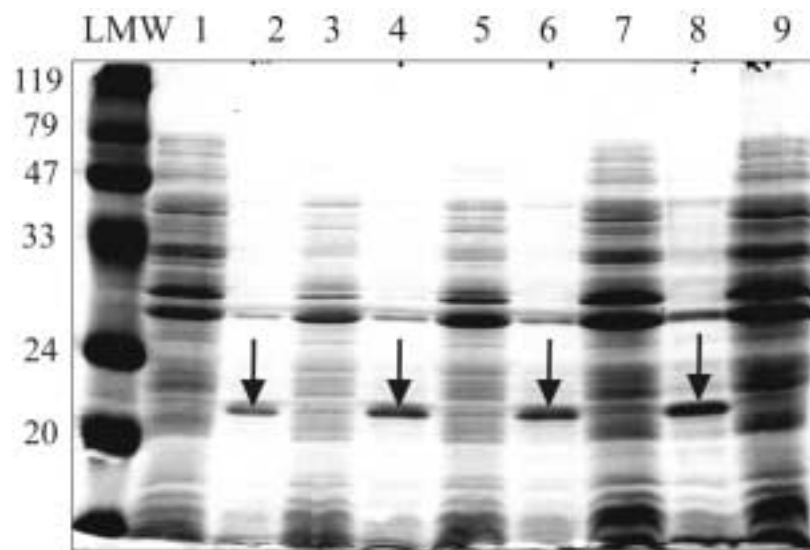


Abb.: 18

Coomassie-gefärbtes 12,5% SDS-PAGE-Gel nach der Elektrophorese. In einem 12,5%igen SDS-Gel wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt aus *E.coli* aus einer induzierten und nicht induzierten Kultur transformierter Bakterien elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel dokumentiert die Induktion von ScPMSR und gleichzeitig dessen zeitlichen Verlauf.

LMW : Proteinlängenstandard in kDa

BAHN	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IPTG	+	+	+	+	+	+	+	+	+
h	0	4	4	5	5	6	6	7	7
pQE	30	32	30	32	30	32	30	32	30

pQE32 + = cDNA-Klon von ScPMSR im Expressionsvektor pQE32 im Leserahmen

pQE30 - = cDNA-Klon von ScPMSR im Expressionsvektor pQE30 nicht im Leserahmen befindlich

IPTG + = induziert mit IPTG

h = Wachstumszeit nach IPTG-Induktion in Stunden/ Zeitpunkt der Probenentnahme

Die Abbildung 18 verdeutlicht erneut das Auftreten der Proteinbande von ScPMSR in den Bahnen 2, 4, 6 & 8 und ein Fehlen dieser Bande in den Kontrollproben (Bahn 1, 3, 5, 7 & 9). Aus dem Coomassie-Gel konnte ebenfalls nach einem Vergleich der Intensitäten der Proteinbande von ScPMSR ersehen werden, daß es nach einer Induktion über den Zeitraum von 6h nicht mehr zu einer nennenswerten Steigerung der induzierten Proteinproduktion an PMSR gekommen ist. Damit lag die optimale Induktionszeit bei einer Inkubationsdauer von 6h (Bahn 6).

Zur Gewinnung eines Antiserums gegen ScPMSR mußte als nächstes eine ausreichende Menge an ScPMSR-Protein durch die *E. coli* Bakterien hergestellt werden. Im Anschluß mußte dieses rekombinante Protein aus den Bakterien isoliert und über eine Ni-NTA-Säule von den anderen Proteinen getrennt werden.

3.5.3 Aufreinigung des rekombinanten Proteins von ScPMSR

Das zu reinigende rekombinante ScPMSR Protein besitzt am N-Terminus sechs Histidine, die sehr spezifisch an eine Ni-NTA-Säule binden können. Durch die Bindung des rekombinanten ScPMSR Proteins an die Säule konnte das rekombinante Protein von den übrigen *E. coli* Proteinen getrennt werden. Nach der Reinigung wurde das rekombinante Protein mit einem Puffer von der Säule gewaschen und aufgefangen (siehe Material & Methoden).

Zunächst wurden 100ml LB-Medium mit den transformierten Bakterien pQE32+ angeimpft und 6h mit IPTG (1mM Endkonzentration) induziert. Die Bakterien wurden, wie im Methodenteil beschrieben, aufgeschlossen und der Proteinextrakt auf die Ni-NTA-Säule aufgetragen. Nach einigen Waschschritten wurde das rekombinante Protein mit Harnstoffpuffern (pH 5,9 & pH 4,5) von der Säule eluiert. Dazu wurden jeweils 4 Fraktionen (je 1000 μ l) pro pH-Stufe gesammelt. Im nächsten Schritt galt es nun herauszufinden, in welchen Fraktionen sich das rekombinante Protein befindet. Zu diesem Zweck wurden Proben dieser Fraktionen (jeweils 15 μ l) in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

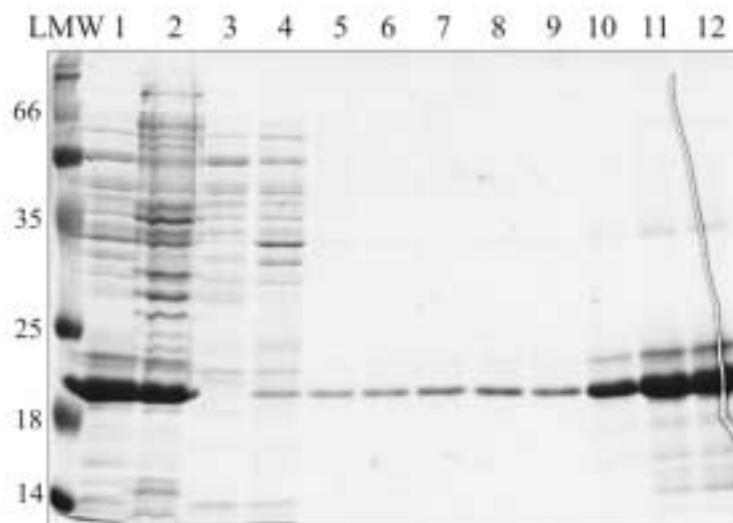


Abb.: 19

Coomassie-gefärbtes 12,5% SDS-PAGE-Gel nach der Elektrophorese von 15 μ l Gesamtproteinextrakten aus *E. coli* und rekombinanter ScPMSR Proteine nach verschiedenen Aufreinigungsschritten mit einer Ni-NTA-Säule.

LMW : Proteinlängenstandard in kDa

Bahn 1: Überstand nach dem Aufschluß der Bakterien

Bahn 2: Proteine des Sediments nach Extraktion der löslichen Proteine

Bahn 3: Durchlauf der löslichen Proteine des Extrakts

Bahn 4: Durchlauf der löslichen Proteine nach dem ersten Waschschriff

Bahn 5-8: gesammelte Fraktionen 1-4 unter Verwendung des Harnstoffpuffers mit dem pH-Wert 5,9;

Bahn 9-12: gesammelte Fraktionen 5-9 unter Verwendung des Harnstoffpuffers mit dem pH-Wert 4,5.

Die Abbildung 19 verdeutlicht, daß ein Teil des rekombinanten ScPMSR-Proteins im Sediment der Membranfraktionen verbleibt (Bahn 2). Aber es bleibt in etwa die gleiche Menge an gelösten ScPMSR-Proteinen im Überstand (Bahn 1) zurück. Diese Menge an gelöstem ScPMSR-Protein im Überstand reicht für die nachfolgenden Versuchsschritte aus. Da keine Proteinbande des rekombinanten Proteins in Bahn 3 auftaucht, belegte dies, daß das gesamte Protein an das Säulenmaterial gebunden hatte. Es ergab sich ein kleiner Verlust an Protein nach der Verwendung des Waschpuffers (Bahn 4). Das Proteinbandenmuster der gesammelten Fraktionen 1-8 (Bahn 5-12) wurde deutlich von der Proteinbande des rekombinanten Proteins geprägt. Das ScPMSR Protein sammelte sich hauptsächlich in den Fraktionen 6 bis 8 (Bahn 10-12).

Die nach der Aufreinigung des Proteins über eine Ni-NTA-Säule aufgefangenen Fraktionen 6 bis 8 wurden mit Hilfe von Nanosept Mikrokonzentratoren in einem Zentrifugationsschritt konzentriert (siehe Mat & Met). Die Mikrokonzentratoren fungieren dabei als ein Sieb mit definierter Porenweite.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Einengung des Proteins ScPMSR erfolgreich verlaufen war und inwieweit sich noch andere Proteine in der Lösung befanden. Dazu wurden 15µl des Durchlaufs, in welchem sich nach dem Größenausschlußverfahren kein ScPMSR-Protein mehr befinden sollte und 1,5µl des Überstandes in welchem das ScPMSR nun in höher konzentrierter Form vorliegen sollte, in einem SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

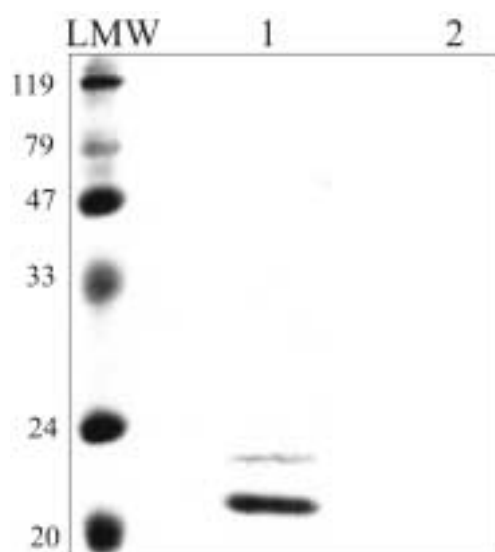


Abb.: 20

Coomassie-gefärbtes 12,5% SDS-PAGE-Gel nach der Elektrophorese von 15µl Proteinextrakt der sich nach der Zentrifugation als "Durchlauf" im Mikroreaktionsgefäß ansammelt und von 1,5µl Proteinextrakt der nach der Zentrifugation im Sieb zurückbleibt (hier als "Überstand" bezeichnet).

LMW : Proteinlängenstandard in kDa

Bahn 1: Proteinextrakt aus dem "Überstand"

Bahn 2: Proteinextrakt nach dem "Durchlauf"

Die Abbildung 20 zeigt die dominante Proteinbande von ScPMSR in Höhe von 23kDa in Bahn 1 und eine schwache Proteinbande in Höhe von etwa 24 kDa. Im Durchlauf (Bahn 2) konnte keine Proteinbande erkannt werden. Das zweite Protein, welches neben dem ScPMSR auftauchte, mußte aus der ursprünglichen Probe entfernt werden, damit sich bei der Antiserumproduktion nicht unspezifisch ein Antikörper gegen dieses nicht erwünschte Protein bildet. Um die beiden Proteine voneinander zu trennen, wurde das Proteingemisch in einem SDS-Gel erneut elektrophoretisch aufgetrennt. Zuvor wurde die Konzentration des ScPMSR Proteins nach Bradford ermittelt. Nach der Elektrophorese von 2,3 mg des Proteingemisches wurde das SDS-Gel mit Coomassie angefärbt und die ScPMSR Proteinbande aus dem Gel direkt herausgeschnitten und somit von dem nicht gewünschten Protein getrennt. Dieses SDS-Gelstück mit dem ScPMSR-Protein wurde zur Produktion des Antikörpers an die Firma BIOTREND Chemikalien GmbH geschickt.

3.5.4 Test des ScPMSR Antikörpers

Zunächst mußte getestet werden, ob der Antikörper das rekombinante ScPMSR Protein, gegen welches dieser Antikörper erzeugt wurde, detektieren kann. Dazu wurden etwa 50ng rekombinantes ScPMSR Protein nach Auftrennung in SDS-PAA-Gel auf eine Membran gebロットet und mit dem Antikörper PMSR detektiert.

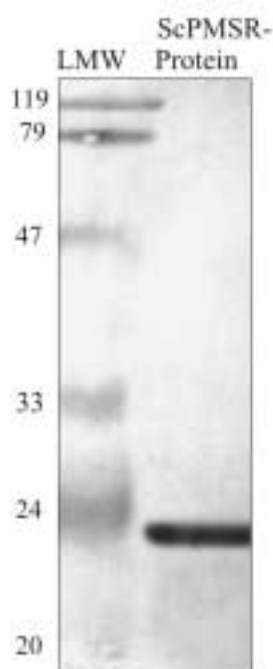


Abb.: 21
 Immunoblotanalyse eines Western Blots von rekombinantem ScPMSR Protein mit dem PMSR-Antikörper.
 LMW : Proteinlängenstandard in kDa

Das auf der Membran der Abbildung 21 sichtbare Signal zeigt die Reaktion des Antikörpers mit dem rekombinanten Protein und bestätigt damit die erfolgreich verlaufene Antikörper-Herstellung. Im nächsten Schritt wurde über eine Verdünnungsreihe des Antikörpers ermittelt bei welcher Verdünnung des Antikörpers dieser das rekombinante Protein auf einem Western Blot gerade noch detektieren kann. Es zeigt sich, daß eine Verdünnung des Antikörpers von 1:1000 ausreicht, um das rekombinante ScPMSR Protein nachweisen zu können. Der Antikörper wurde in dieser Verdünnung nachfolgend bei allen weiteren Immunoblotanalysen eingesetzt.

3.6 WESTERN BLOT ANALYSEN

Ein erhöhter mRNA-Gehalt ist nicht automatisch auch mit einem gesteigerten Vorkommen des Proteins, für das die mRNA kodiert, korreliert. Bei Schwankungen der Transkriptmenge spielt beispielsweise auch die Stabilität der mRNA oder Faktoren die die Translation beeinflussen, eine Rolle. Um zu überprüfen, ob die erhöhte Transkriptmenge der Enzyme ScPMSR, SSU, LSU und LHC Iib in kältegehärteten Roggen auch mit einer erhöhten Proteinmenge in Zusammenhang gebracht werden kann, wurde eine Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen unterschiedlichen Proteine durchgeführt.

3.6.1 Western Blot Analysen zur Untersuchung der Expression von SSU und LSU

Die Northern Blot Analysen zur Untersuchung der differentiellen Genexpression von *rbcS* und *rbcL* hatten gezeigt, daß nach Enthärtung die Transkriptmengen der beiden Gene deutlich zurückgegangen waren. Um überprüfen zu können, ob sich nun auch die Proteinmengen von ScSSU und ScLSU nach Enthärtung reduziert, wurden aus kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Roggenprimärblättern Gesamt-Proteine isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Untereinheiten der RubisCO wurden immunologisch mit den Antikörpern gegen ScSSU und ScLSU detektiert.

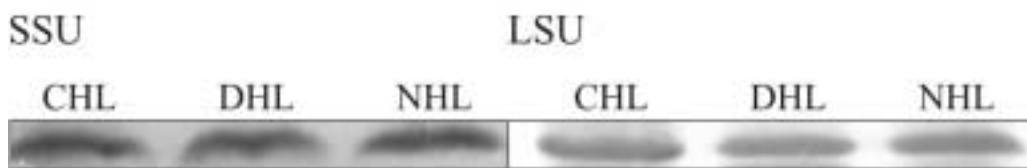


Abb.: 22 + 23

Immunoblotanalyse von Proteingestamtexttrakten aus kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Winterroggenpflanzen mit einem Antiserum gegen ScSSU bzw. ScLSU.

CHL : Gesamtproteinextrakt aus kältegehärteten Roggenblättern

DHL : Gesamtproteinextrakt aus enthärteten Roggenblättern

NHL: Gesamtproteinextrakt aus nicht-gehärteten Roggenblättern

Die Immunoblotanalyse (siehe Abbildungen 22 und 23) zeigte, daß sowohl bei kältegehärteten, enthärteten und auch bei nicht-gehärteten Roggenblätter mit dem Antiserum (135-2-IV Anti-RubisCO) von ScSSU und ScLSU vergleichbare Mengen an SSU und LSU Protein detektiert und somit keine gravierenden Unterschiede der Proteinmengen nachgewiesen werden konnten. Die Schwankungen der Transkriptmengen von *rbcS* und *rbcL* bei CHL, DHL und NHL korrelieren also nicht mit variierenden Proteinmengen von SSU und LSU.

3.6.2 Western Blot Analyse zur Untersuchung der Expression von LHCIib

Das Gen *LhcII b* konnte ebenfalls bei kältegehärteten Roggenblättern auf Transkriptebene als differentiell exprimiert erkannt werden. Wie schon für die Proteine SSU und LSU beschrieben, wurden Gesamt-Proteinen auf eine Membran geblottet. Diese Proteine wurden mit einem Antiserum (13-1-IV) gegen ScLHCIib detektiert.



Abb.: 24

Immunoblotanalyse von Proteingestamtexttrakten aus kältegehärteten, enthärteten und nichtgehärteten Roggenpflanzen mit einem Antiserum (13-1-IV) gegen LHCIib.

CHL : Gesamtproteinextrakt aus kältegehärteten Roggenblättern

DHL : Gesamtproteinextrakt aus enthärteten Roggenblättern

NHL: Gesamtproteinextrakt aus nicht-gehärteten Roggenblättern

Aus dem Western Blot konnte ersehen werden, daß das LHCIIB-Protein verstärkt in den kältegehärteten Roggenblättern auftritt und es zu einem Rückgang der Proteinmenge in den enthärteten Roggenblättern kommt. Im Gegensatz zu SSU und LSU besteht bei LHCIIB also ein Zusammenhang zwischen Abnahme der Transkriptmenge von *lhciIb* nach Enthärtung und zurückgehender Proteinmenge an LHCIIB bei enthärteten Pflanzen.

3.6.3 Western Blot Analysen zur Untersuchung der Expression von ScPMSR

Das antioxidativ wirkende Enzym ScPMSR weist in kältegehärteten, im Vergleich zu enthärteten und nicht-gehärteten Roggenblättern, die höchste Transkriptmenge auf. Zur Untersuchung der Proteinmengen von ScPMSR in kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Roggenblättern wurde aus den entsprechend herangezogenen Pflanzen Gesamtprotein aus 0,2g Blattmaterial gewonnen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die Membran wurde anschließend mit dem Antikörper gegen ScPMSR inkubiert.

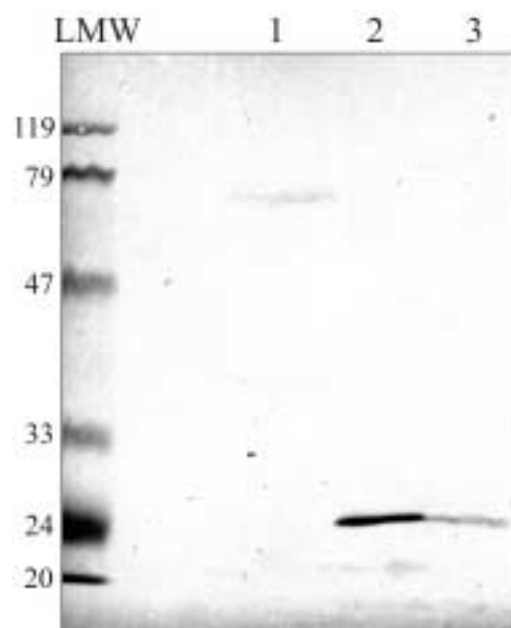


Abb.: 25

Immunoblotanalyse von 80µl Proteingesamtextrakten aus kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Roggenpflanzen mit einem Antikörper gegen ScPMSR.

LMW: Proteinlängenstandard in kDa

Bahn 1 : Gesamtproteinextrakt aus kältegehärteten Roggenblättern

Bahn 2 : Gesamtproteinextrakt aus enthärteten Roggenblättern

Bahn 3 : Gesamtproteinextrakt aus nicht-gehärteten Roggenblättern

In den Bahnen 3 und 4 der Abbildung 25 konnten Signale, welche der errechneten Größe des ScPMSR-Proteins entsprechen, detektiert werden. Dies verdeutlicht, daß der gegen ScPMSR gerichtete Antikörper in den pflanzlichen Gesamtproteinextrakten aus Winterroggenblättern, das Protein ScPMSR detektieren konnte. Hier zeigte es sich, daß das Protein ScPMSR in den enthärteten Roggenblättern im Vergleich zu den nicht-gehärteten Blättern, vermehrt vorliegt. Eine Bande vergleichbarer Größe konnte in den Gesamtproteinextrakten der kältegehärteten Blätter zunächst (siehe nachfolgender Western Blot) nicht ermittelt werden. Stattdessen konnte eine distinkte Proteinbande in Höhe von etwa 68kDa, die in etwa die Intensität der Proteinbande in den nicht-gehärteten Blättern zeigte, nachgewiesen werden. Die Größe dieser 68kDa Protein-Bande entspricht ca. der dreifachen Größe eines ScPMSR-Proteins. Es stellte sich nun die Frage, ob es in den kältegehärteten Winterroggenblättern tatsächlich keine 23kDa große ScPMSP-Proteinbande gibt oder ob sich diese Proteinbande detektieren läßt, wenn mehr Gesamtproteinextrakt eingesetzt wird. Gleichzeitig bestand Interesse zu erfahren, ob sich die 68kDa Proteinbande noch nachweisen läßt, wenn die kältegehärteten Pflanzen in die Wärme gestellt werden und umgekehrt, ob die 68kDa-Proteinbande detektiert werden kann, wenn nicht-gehärtete Pflanzen zu 4°C gestellt werden.

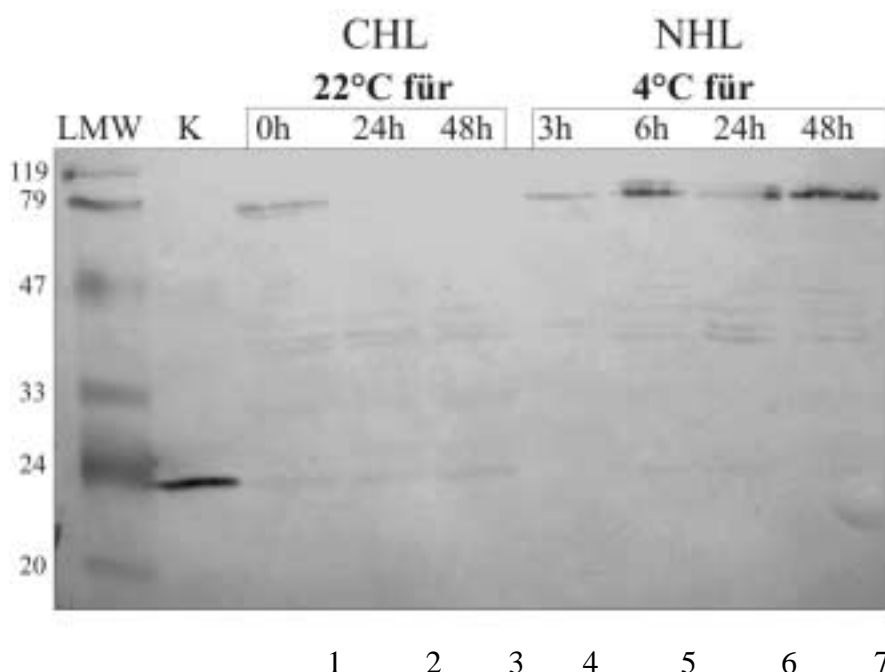


Abb.: 26

Immunoblotanalyse von 120µl Proteingestamtexttrakten aus kältegehärteten (die zu einer Temperatur von 22°C gestellt wurden) und nicht-gehärteten (die zu einer Temperatur von 4°C gestellt wurden) Winterroggenpflanzen mit einem Antikörper gegen ScPMSR..

LMW: Proteinlängenstandard in kDa

K: Rekombinantes ScPMSR-Protein

Bahn 1: Gesamtproteinextrakt aus kältegehärteten Roggenblättern

Bahn 2 + 3 : Gesamtproteinextrakt aus kältegehärteten Roggenblättern die für 24h bzw. 48h zu einer Temperatur von 22°C gestellt wurden.

Bahn 4, 5, 6 & 7 : Gesamtproteinextrakt aus nicht-gehärteten Roggenblättern die für 3h, 6h, 24h & 48h zu einer Temperatur von 4°C gestellt wurden.

Das auf der Membran (Abbildung 26) in der Kontrollspur (K) sichtbare Signal in Höhe von 23kDa bestätigt die Reaktion des Antikörpers mit dem rekombinanten Protein. Bahn 1 zeigt zum einen ein Signal in Höhe von 68kDa und die errechnete ScPMSR-Bande der Größe von 23kDa. In Bahn 2 & 3 lassen sich diese beiden Proteinbanden ebenso nachweisen, allerdings sind diese Signale schwächer als in den Gesamtproteinextrakten aus kältegehärteten Winterroggenblättern. In den Bahnen 4-7 kann nun auch in allen Gesamtproteinextrakten eine 68kDa Proteinbande detektiert werden. Die Intensität dieser 68kDa Proteinbande ist in der Bahn 7 am stärksten. Zusätzlich treten nun in allen untersuchten Gesamtproteinextrakten sehr schwache Banden der Größen 45kDa und 54kDa auf.

Es bestand nun Interesse zu erfahren, ob es sich bei der Proteinbande in Höhe von 68kDa um ein Proteinaggregat von drei ScPMSR-Proteinen handelt und ob sich dieses Aggregat mit anderen denaturierenden Reagenzien wie Guanidiniumhydrochlorid (6M), DTT oder Harnstoff (8M) auflösen läßt. Können nach der Auflösung des Aggregats Proteinbanden einer Größe von 23 kDa (entspricht der Größe eines PMSR-Proteins) und von 46kDa (entspricht etwa der Größe von zwei PMSR-Proteinen) auf einem Western Blot nachgewiesen werden, so könnten dies Hinweise sein, daß es sich bei dem 68kDa große Proteinkomplex tatsächlich um drei aggregierte PMSR-Proteine handelt.

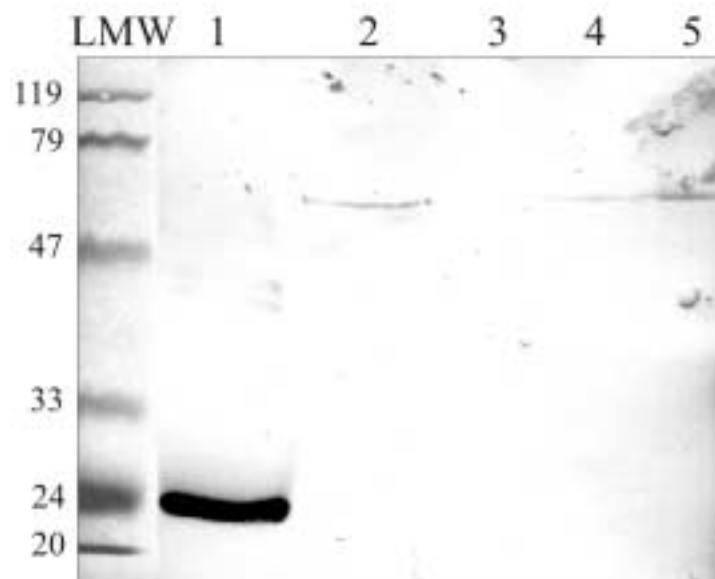


Abb.: 27

Immunoblotanalyse von 80µl Proteingesamtexttrakten aus kältegehärteten Roggenpflanzen mit einem Antikörper gegen ScPMSR.

Bahn 1 : rekombinantes ScPMSR-Protein als Positivkontrolle

Bahn 2: Gesamtproteinextrakt aus kältegehärteten Roggenblättern (mit DTT)

Bahn 3 : Gesamtproteinextrakt aus kältegehärteten Roggenblättern (mit Harnstoff)

Bahn 4: Gesamtproteinextrakt aus kältegehärteten Roggenblättern (mit Guanidinhydrochlorid)

Bahn 5: Gesamtproteinextrakt aus kältegehärteten Roggenblättern (mit Beta-Mercaptoethanol)

Es zeigte sich nach der Immunoblotanalyse (Abbildung 27), daß das Aggregat in den Gesamtproteinextrakten von kältegehärtetem Roggen auch durch die Substanzen Guanidinhydrochlorid und DTT nicht aufzulösen war. Harnstoff konnte das Aggregat wohl zerlegen, allerdings ließ sich anschließend hier immunologisch keine Bande mehr detektieren.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob es sich bei dem in dieser Arbeit charakterisierten ScPMSR Protein um eine plastidäre oder cytoplasmatische Isoform von PMSR handelt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Proteinextrakte von Chloroplasten isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Diese Membran wurde danach immunologisch mit dem ScPMSR Antikörper untersucht. Es konnte auf dem Western Blot keine Reaktion des ScPMSR Antikörpers mit den Proteinextrakten von Chloroplasten nachgewiesen werden (dieser Western Blot ohne Signal ist hier natürlich nicht aufgeführt). Um abzusichern, daß tatsächlich Chloroplasten isoliert und

auf eine Membran transferiert worden waren, wurde die Membran anschließend mit einem Antikörper gegen LSU behandelt

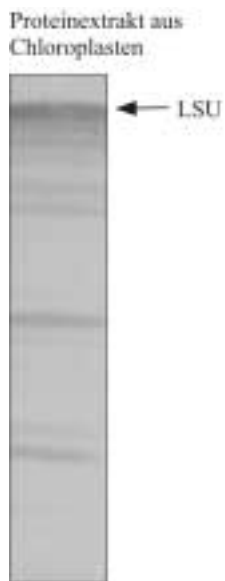


Abb.: 28
Immunoblotanalyse von chloroplastidären Proteinextrakten mit einem Antikörper gegen LSU.

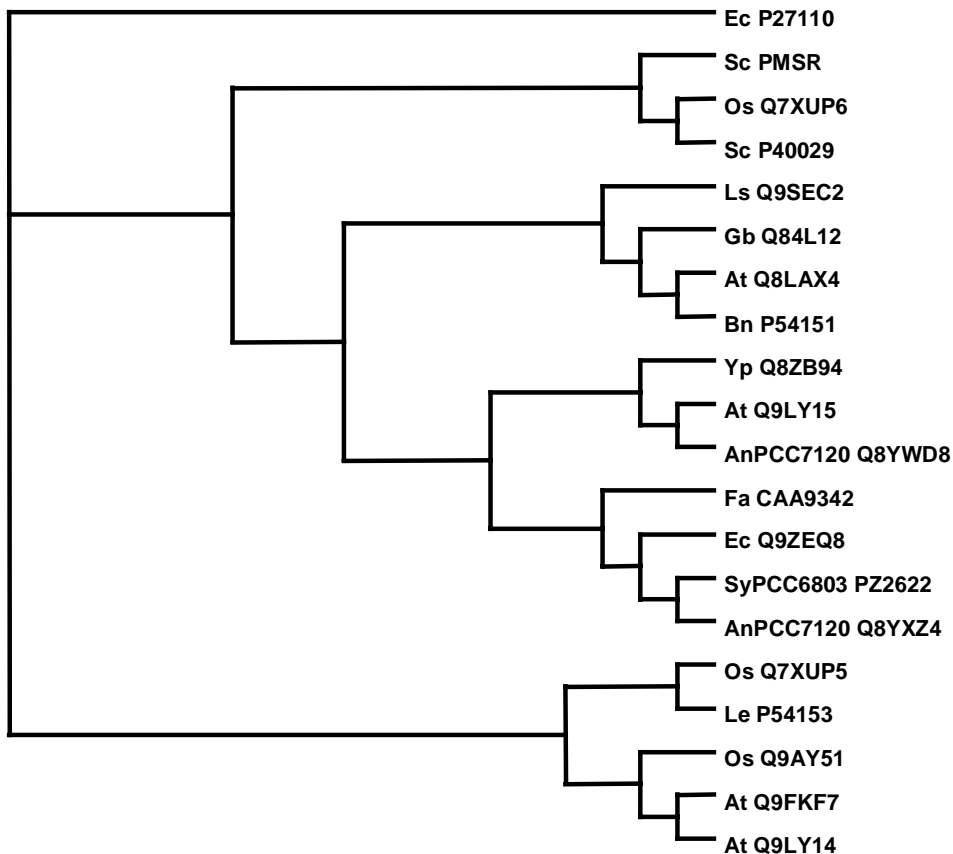
Der Western Blot (Abbildung 28) zeigt ein Signal, daß der LSU-Proteinbande entspricht, so daß davon ausgegangen werden kann, daß Chloroplasten isoliert wurden. Daher muß, nach dem Ausschlußverfahren davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem ScPMSR Protein um eine cytoplasmatische Isoform handelt.

3.7 STAMMBAUM VON ScPMSR

Zur Einordnung der verwandtschaftlichen Stellung von ScPMSR zu PMSR-Enzymen aus anderen Organismen wurde mit ClustalW (EMBL-Service) ein PMSR-Stammbaum (siehe S. 87) erstellt.

Der Stammbaum zeigt die nahe Verwandtschaft von ScPMSR zu der ebenfalls monokotyledonen Pflanze *Oryza sativa* (Os Q7XUP6). In der nächsten Verwandtschaftslineie zu ScPMSR stehen dann die dikotyledonen Pflanzen *Lactuca sativa* (Ls Q9SEC2), *Brassica napus* (Bn P54151), *Arabidopsis thaliana* (At Q8LAX4). Einen weiteren Ast bilden *Yersinia pestis* (Yp Q8ZB94), *Arabidopsis thaliana* (At Q9LY15) und *Nostoc sp.* (An Q8YWD8). *Fragaria anserina* (Fa CAA9342), *Erwinia chrysantemi* (Ec Q9ZEQ8), *Synechocystis* (Sy PZ2622) und *Nostoc sp.* (An Q8YXZ4) formieren sich zu einem anderen Ast.

In weiterer verwandtschaftlicher Entfernung bildet sich nochmals eine pflanzliche Gruppe, in der sowohl monokotyledone *O. sativa*, (Os Q7XUp5 und Os Q9AY51), als auch dikotyledone Pflanzen, *Lycopersicon esculentum* (Le P54153) und *Arabidopsis thaliana* (At Q9FKF7, At Q9LY14) zu finden sind.



Stammbaum PMSR

4. DISKUSSION

Die Fähigkeit zur differentiellen Genexpression ist eine grundlegende Voraussetzung für das Leben sämtlicher Organismen. Für die Entwicklung und die Anpassung eines Lebewesens an veränderte Umweltbedingungen ist die zeitliche, räumliche und mengen-mäßig unterschiedliche Aktivität von Genen unverzichtbar.

Faktoren, die in Pflanzen während Differenzierungsprozessen und als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen eine differentielle Genexpression erforderlich machen, können abiotischer und biotischer Natur sein. Pflanzen haben, bedingt durch ihre sessile Lebensweise, eine Vielzahl von Anpassungen auf metabolischer Ebene wie auch auf veränderter Genexpressionsebene entwickeln müssen, um an ihrem Standort überleben zu können. Auf etwa 2/3 der weltweiten Landfläche können zeitweise Temperaturen von 0°C und darunter herrschen (Öquist & Martin 1986). Diese Tatsache verdeutlicht, daß Anpassungen an Kälte und Frost für die meisten Pflanzen von höchster Dringlichkeit sind. In dieser Promotionsarbeit wurde nach Genen gesucht, die bei kältegehärtetem Winterroggen differentiell exprimiert sind. Um solche Gene isolieren zu können, wurden zwei molekularbiologische Techniken „Supression Subtractive Hybridisation“ (Diatschenko et al. 1996) und „Differential Display PCR“ (Liang & Pardee 1992) herangezogen.

Im folgenden Abschnitt sollen die einzelnen Stärken und Schwächen der beiden Methoden, die sich in diesem Versuchsansatz herauskristallisiert haben, miteinander verglichen werden.

Die „DD-PCR“-Methode bietet im Vergleich zur „SSH“-Methode zwei Vorteile: Zum einen können zeitgleich hoch- und herunterregulierte Gene isoliert werden, zum anderen können parallel mehr als zwei verschiedene mRNA-Profile miteinander verglichen werden.

Aufgrund des Subtraktionsvorgangs können mit der „SSH“-Methode hingegen nur zwei verschiedene mRNA-Profile nach differentiell exprimierten Genen gescreent werden. Bei der „SSH“-Methode kann in einem Versuchsansatz nur nach hochregulierten Genen in einer der beiden Population gesucht werden. Bei beiden Analyseverfahren stand die Isolierung von mRNA aus den jeweils zu untersuchenden Pflanzen und die Umschreibung in cDNA am Beginn des Versuchsschemas (in beiden Fällen mit ein und der selben Methode). Die „SSH“-Methode beansprucht nach der Umschreibung der mRNA in cDNA eine wesentlich längere und anspruchsvollere Bearbeitung (Restriktion, mehrere Hybridisierungsschritte und zwei PCR-Reaktionen) als die „DD-PCR“-Methode (keine Restrik-

tion, keine Hybridisierung, zunächst nur eine PCR-Reaktion), bis mit dem Klonieren der vermeintlich differentiellen DNA-Fragmente begonnen werden kann. Diese längere und aufwendigere experimentelle Phase bei der „SSH“-Methode zieht auch eine vergleichsweise komplexere Fehlerquellenanalyse nach sich. Bestimmte Versuchsschritte, wie zum Beispiel die Ligation der Adaptoren 1 und 2R an die cDNA-Fragmente, können bei der „SSH“-Methode kaum auf ihre Effizienz hin überprüft werden.

Eine erfolgreich durchgeführte „DD-PCR“ setzt voraus, daß pro PCR-Reaktion exakt die gleichen Mengen an cDNA eingesetzt werden und daß die einzelnen PCR-Reaktionen gleichmäßig verlaufen. Bei der „DD-PCR“ stellt in diesem Zusammenhang schon die Gelelektrophorese der PCR-Produkte eine erste Erfolgskontrolle dar. Treten bei den parallel in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkten neben unterschiedlich starken Banden (die als differentiell exprimiert erkannt, eluiert und kloniert werden) noch gleich starke Banden (in diesen Fällen handelt es sich dann um Gene, deren Transkriptmenge von den veränderten Bedingungen nicht beeinflusst wird) in beiden Proben auf, kann davon ausgegangen werden, daß in der PCR-Reaktion zu Beginn gleiche Mengen an cDNA eingesetzt wurden und daß die einzelnen PCR-Reaktionen einen gleichmäßigen Verlauf genommen haben. Die Elektrophorese kann also schon als erste Erfolgskontrolle gewertet werden.

Die Suche bei der „DD-PCR“-Methode nach derjenigen Bakterienkolonie, die nach der Klonierung der differentiell exprimierten Fragmente das PCR-Fragment mit der ausgewählten Größe trägt, ist eine besondere Hürde. Auch bei einem noch so sorgfältigen Ausschneiden der als differentiell exprimiert erkannten Bande aus dem Agarosegel, kann nämlich kaum vermieden werden, daß zusätzlich zu der ausgewählten eine weitere Bande, die mit dem bloßen Auge nicht auszumachen ist, mit herausgeschnitten, eluiert und kloniert wird. In diesem Fall wird mit der so genannten Kolonie-PCR versucht, das Plasmid mit der ausgewählten Fragmentgröße zu finden. Im Gegensatz dazu gehen bei der „SSH“-Methode alle klonierten Fragmente auf die subtrahierte „SSH“-cDNA-Bank zurück, womit sich eine Kolonie-PCR erübrigt.

In dieser Promotionsarbeit erwies sich bei der Durchführung der „SSH“-Methode das so gehäufte Auftreten von cDNA-Fragmenten die Homologien zu rRNA (über 90%) oder zu SSU (8%) zeigten, als ausgesprochen hinderlich. Dieses Problem konnte aber über ein Ausschlußverfahren durch Southern Blot Analysen behoben werden.

Die „DD-PCR“ steht und fällt mit der Verwendung ausgewählter Primer. Die Entwicklung der Primer der „DD-PCR“ fußte anfangs auf der Annahme, daß höhere Organismen ca. 100.000 Gene besitzen und nur etwa 15% davon in individuellen Zellen exprimiert werden (Liang & Pardee 1992). Jede Primerpaarkombination sollte etwa 50-100 mRNAs amplifizieren können. Wird die mRNA in cDNA revers transkribiert, so können durch die Verwendung unterschiedlicher Startprimer (z.B. Oligo-dT PolyTTTGC, PolyTTTTCG, PolyTTTGA oder PolyTTTGT) die cDNAs in unterschiedliche Klassen von Erststrang-cDNA eingruppiert werden. Als die „DD-PCR“-Methode erstmals vorgestellt wurde, wurden in den PCR-Reaktionen noch 12 oligo-dT-Primer und 20 5'-Zufallsprimer eingesetzt, woraus 240 verschiedene Primer-Kombinationsmöglichkeiten resultieren. Liefert jede Primerkombination tatsächlich 50-100 Amplifikate, könnten theoretisch bei der Verwendung aller Primerkombinationen etwa 12.000-24.000 unterschiedliche Gene erfaßt werden. Es konnte allerdings festgestellt werden, daß die einzelnen oligo-dT-Primer nicht die gleiche Anzahl an differentiellen Banden hervorbringen. So konnten Liskens et al. (1995) in ihrem Ansatz zeigen, daß oligo-dT-Primer, die die Basen A und nur T als Anker besitzen, keine differentiellen Banden hervorbringen. Dagegen förderten die oligo-dT-Primer mit den Basen C und G die meisten unterschiedlichen PCR-Fragmente zu Tage. Der Einsatz der oligo-dT-Primer hatte oftmals zur Folge, daß sie Primer Amplifikate lieferten, die homolog waren zu nicht-kodierenden und damit informationsarmen Abschnitten des 3'-Endes einer mRNA. Nachfolgend erforderte dies die Isolierung der kompletten cDNA, um an Informationen über das vom PCR-Fragment kodierte Gen zu gelangen.

In der überarbeiteten Methode (Fa. Operon Technologies) werden jetzt optimierte 10mer Zufallsprimer in den PCR-Reaktionen eingesetzt, die an verschiedenen Stellen mit der cDNA hybridisieren können. Es wird jeweils nur noch ein Primer in der PCR-Reaktion eingesetzt und die Verwendung von oligo-dT-Primern entfällt damit heute vollständig.

Die „SSH“-Methode ist seit 1996 eine der populären Methoden, differentiell exprimierte Gene zu isolieren, allerdings wurden erst 2002 durch Wan Ji et al. die Effizienz und die möglichen Grenzen dieser Methode näher untersucht. Wan Ji et al. (2002) testeten in ihrem Versuchsansatz erstmals die Effizienz der „SSH“-Methode, differentiell exprimierte Gene isolieren zu können. Sie kamen zu dem Schluß, daß die Effizienz der Isolierung differentieller Gene bei der „SSH“-Methode stark mit dem Konzentrationsverhältnis R von Tester cDNA zu Treiber cDNA korreliert. Je größer der Wert R ist, umso leichter kann ein differentiell exprimiertes Gen gefunden werden. In letzter Konsequenz bedeutet dies, daß

bevorzugt „alles oder nichts“-Gene detektiert werden können, d.h. nur diejenigen, die tatsächlich allein in einer der beiden Populationen vertreten sind. Ist das Konzentrationsverhältnis für ein Gen in zwei Populationen $R < 5$ so ist es nahezu unmöglich, dieses Gen als differentiell exprimiert erkennen zu können. Die Methode kann beispielsweise gute Dienste leisten, wenn man mRNA-Profile vergleicht, die sich vor und nach einer viralen Infektion ergeben oder bei einem Vergleich zweier verschiedener Gewebetypen. Die Effizienz der Methode ist unzureichend, wenn schon ein kleiner Unterschied in den verglichenen mRNA-Profilen ausreicht, um physiologische Anpassungen des Organismus an geänderte Umweltbedingungen zu gewährleisten. In dieser Arbeit kann das Erscheinen der „falschpositiven“ cDNA-Fragmente der Enzyme NAD-Malat Dehydrogenase und Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase wohl nicht auf eine fehlerhafte Versuchsdurchführung zurückgeführt werden, sondern auf zu geringe Unterschiede im Verhältnis der Treiber- und Tester cDNA für diese Gene. Als Beleg für die erfolgreiche Anwendung der „SSH“-Methode kann das Auftauchen der cDNA für die kleine Untereinheit der RubisCO (*rbcS*) in der „SSH“-Bank gewertet werden. Dieses Gen hat großen Anteil am pflanzlichen Transkriptom, und es ist bereits bei *Solanum soganandinum* nachgewiesen worden, daß nach Enthärtung die Transkriptmenge von *rbcS* zurückgeht (Rorat et al. 1997). In diesem Fall liegt das Verhältnis R von Tester-*rbcS* cDNA zu Treiber-*rbcS* cDNA wohl deutlich über 5. Um mit Hilfe der „SSH“-Methode ein differentiell exprimiertes Gen finden zu können, muß dessen Anteil an der gesamten mRNA mindestens 0,01% betragen. So können beispielsweise Transkriptionsfaktoren, die im Vergleich zu anderen Genen nur einen kleinen Teil der gesamten mRNA-Menge ausmachen, kaum detektiert werden (Wan Ji et al. 2002). Die Effizienz der Amplifikation von cDNA-Fragmenten in PCR-Reaktionen ist sequenzabhängig, d.h. je nach Sequenz gelingt es, in der PCR-Reaktion leichter oder schwerer ein Amplifikat zu synthetisieren. Es könnte also der Fall eintreten, daß ein differentiell exprimiertes Gen sequenzbedingt durch eine geringe Menge an Amplifikat unterrepräsentiert ist und folglich nicht detektiert werden kann. Oder im umgekehrten Fall ein nicht differentiell exprimiertes Gen sequenzbedingt überrepräsentiert ist und am Ende als „falschpositiver“ Klon erscheint (Wan Ji et al. 2002).

Um belegen zu können, daß die isolierten Gene in der Pflanze tatsächlich differentiell exprimiert worden sind, mußte deshalb abschließend bei beiden Versuchsstrategien eine Northern Blot Analyse durchgeführt werden. Der Northern Blot gibt letztendlich über die in der Pflanze vorliegende relative Menge an RNA des untersuchten Gens Aufschluß.

Insgesamt wurden mit der „DD-PCR“-Methode 37 Klone isoliert, wovon 21 Sequenzen keine Ähnlichkeit zu bekannten Genen aufwiesen. 16 der Gene zeigten Ähnlichkeit zu EST-Sequenzen (9) oder zu unbekanntem Genen auf dem Reisgenom (7 Sequenzen). Von 9 Sequenzen, die auf bekannte EST's zurückgingen, waren 7 differentiell exprimiert und bei zwei Genen (Hexokinase + Chlorophyll 2 b Synthase) konnte keine differentielle Expression bestätigt werden. Eine der unbekanntem Sequenzen aus dem Reisgenom war im Winterroggen ebenfalls differentiell exprimiert und für die übrigen sechs unbekanntem Gensequenzen aus *O. sativa* konnte keine differentielle Expression nachgewiesen werden.

Mit der „SSH“-Methode wurden etwa 600 Klone isoliert und analysiert. Dabei zeigte sich, daß über 90% der Gene Ähnlichkeit zu rRNA-Sequenzen und 8% zur kleinen Untereinheit der RubisCO besaßen. Insgesamt konnten acht Klone bekannten EST-Sequenzen zugeordnet werden, davon waren vier (PMSR, LHCIIB, SSU, RNA-Bindendes Protein) differentiell exprimiert, bei zwei Genen (NAD-Malat Dehydrogenase & Ferredoxin-Thio-redoxin-Reduktase) konnte die differentielle Genexpression nicht bestätigt werden und bei den letzten zwei Genen (unbekannte Gensequenz aus *Oryza sativa* & Fucosyltransferase) konnte die Expression noch nicht abschließend überprüft werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die „DD-PCR“-Methode vom allgemeinen „Versuchshandling“ etwas einfacher zu bewältigen ist und im Zweifelsfall leichter auf mögliche Fehlerquellen hin überprüft werden kann als die „SSH“-Methode. Vergleicht man außerdem die Anzahl an differentiell exprimierten Genen, die die „DD-PCR“ und die „SSH“ hervorgebracht haben, so muß man zu dem Schluß kommen, daß die „DD-PCR“ für den Vergleich der Genexpression von kältegehärteten mit enthärteten Winterroggen die effektivere Methode darstellt.

In nachfolgender Tabelle 2 werden die Vorzüge und Nachteile der beiden durchgeführten Methoden noch einmal gegenübergestellt.

Tabelle 2: Tabellarische Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der „SSH“ und der „DD-PCR“ Methode.

	„SSH“-METHODE	„DD-PCR“-METHODE
Analysemöglichkeiten	Vergleich zweier mRNA-Profile möglich; allerdings nur hochregulierte Gene faßbar	Vergleich von mehr als zwei mRNA-Profilen gleichzeitig möglich; hochregulierte und reprimierte Gene faßbar
Versuchsdurchführung	anspruchsvollere Versuchsdurchführung	einfachere Versuchsdurchführung
auftretende Schwierigkeiten	hohe Anzahl an rRNA und rbcS Klonen; wenn $R < 5$ und Anteil des Gens an der Gesamt-RNA weniger als 0,01% kann ein differentiell exprimiertes Gen nicht detektiert werden; Ausschlußverfahren von „Falschpositiven“	Ausschlußverfahren von „Falschpositiven“
Fehlerquellenanalyse	schwieriger, da einzelne Reaktionsschritte schwer überprüfbar (z.B. Adaptorligation)	leichter, Versuchsablauf an sich gewährleistet schon eine gestaffelte Erfolgskontrolle

Die beiden Methoden, deren Vor- und Nachteile eingehend erläutert wurden, förderten differentiell exprimierte Gene bei kältegehärtetem und enthärtetem Winterroggen zu Tage. Die isolierten Gene lassen sich in die unterschiedlichsten Bereiche des pflanzlichen Stoffwechsels eingruppiert. Diese Tatsache belegt erneut, daß die Anpassung an Kälte bei Winterroggen die Mobilisierung sämtlicher Teilbereiche des pflanzlichen Stoffwechsels erforderlich macht.

Die Liste an Publikationen, die sich mit kurzzeitigem Kältestreß befassen, ist lang (zuletzt u.a. Fowler et al. 2002). Bislang wurde allerdings noch nicht der Ansatz verfolgt, das Expressionsspektrum (Transkriptom) von Genen aus kältegehärtetem Roggen mit dem von Genen aus enthärtetem Roggen zu vergleichen. Hier könnten Hinweise eingehen, wie die Pflanze mit längerfristig einwirkender Kälte zurechtkommt und somit eine Anpassung an Kälte, Frost und kälteinduzierte Lichtschäden bewerkstelligt. Mit der hier angewandten

Versuchsstrategie war es also möglich, gezielt differentiell exprimierte Gene zu isolieren, die bei der Kältehärtung eine Rolle spielen können und deren Bedeutung folglich nach Enthärtung wieder schwindet. Welche Funktion die Gene, die in der vorliegenden Arbeit isoliert wurden, im einzelnen bei der Kältehärtung spielen können, gilt es nachfolgend näher zu diskutieren.

Bislang werden u.a. eine erhöhte Photosyntheseleistung (Huner 1984; Öquist & Huner 1993), eine Akkumulation von Zuckern in der Pflanzenzelle (Hurry et al. 1995; Savitch et al. 2000 & 2002), die erhöhte Aktivität von diversen Enzymen des Calvin-Zyklus und an der Saccharosesynthese beteiligter Enzyme des Cytosols (Strand et al. 1999) als einige Faktoren betrachtet, die eine Kältehärtung ermöglichen. Die Gefahr kälteinduzierter Photoinaktivierung wird durch eine verbesserte Reparaturleistung von PSII und Katalase bei niedrigen Temperaturen reduziert (Streb et al. 1999). Die Bedeutung der Antioxidanz-Systeme bei der Kältehärtung kann je nach Pflanzenart eine unterschiedliche Ausprägung besitzen. Die hochalpine Pflanze *Ranunculus glacialis* weist nur geringe Mengen an nicht-enzymatischen Antioxidanzmitteln und an Enzymen des Superoxiddismutase-Ascorbat-Glutathion-Zyklus auf (Foyer 1997) und belegt damit, daß ein hochreguliertes Antioxidanz-System alleine nicht für eine erfolgreiche Kältehärtung verantwortlich sein kann. Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei Winterroggen beobachtet werden (Streb & Feierabend 1999).

Ndong et al. (2001) führten an, daß die Anpassung an niedrige Temperaturen und die Anpassung der Photosynthese an Starklicht Parallelen aufweisen, da beide Bedingungen sich durch einen ähnlich erhöhten Excitonendruck auszeichnen. Ndong et al. (2001) untersuchten an Hand von Northern Blot Analysen inwieweit die einzelnen Faktoren niedrige Temperatur, Beleuchtungsstärke und Excitonendruck Einfluß auf das Expressionsmuster bei Winterroggen nehmen. Es zeigte sich, daß die beiden Gene *rbcS* (RubisCO, kleine Untereinheit der RubisCO) und die Transketolase, die beide auch in der hier vorliegenden Dissertation bei kältegehartetem Roggen als differentiell exprimiert erkannt wurden, ebenfalls in den Analysen von Ndong et al. auftraten. Diese wiesen nach, daß die Expression von Transketolase von niedrigen Temperaturen beeinflusst wird. Die Expression der kleinen Untereinheit von RubisCO wird hingegen erhöht, wenn ein bestimmter Schwellenwert des Excitonendrucks erreicht wird. Die vorliegende Arbeit zeigte, daß im Vergleich mit enthärteten Blättern in kältegeharteten Winterroggenblättern die Transkriptmengen für **rbcS** und **rbcL** deutlich erhöht waren. Schon Rorat et al. (1997) konnten bei

Kältebehandlung in *S. sogarandinum* eine deutlich erhöhte Transkriptmenge für *rbcS* nachweisen. Rorat et al. demonstrierten, daß es bei Kälte zu einer sukzessiven Zunahme der *rbcS*-Transkriptmengen bei *S. sogarandinum* kommt, die nach achttägiger Kältebehandlung ihr Maximum erreicht. Diese Zunahme an Transkriptmenge konnte nicht mit einer höheren Stabilität des *rbcS*-Transkripts bei niedrigen Temperaturen in Verbindung gebracht werden. Rorat et al. gehen deshalb davon aus, daß die erhöhte *rbcS*-Transkriptmenge durch eine höhere Expressionsrate bei Kälte bedingt wird.

In Western Blot Analysen bei *S. cereale* konnte nachgewiesen werden, daß die rückläufige Transkriptmenge von *rbcS* und *rbcL* nach Enthärtung aber nicht von einem parallelen Rückgang der Proteinmengen von SSU und LSU begleitet wird. Es zeigte sich, daß die Proteinmengen von SSU und LSU bei kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Winterroggenblättern nahezu unverändert bleiben. Dies wirft die Frage auf, warum es zu so deutlichen Unterschieden der Transkriptmengen von *rbcS* und *rbcL* bei kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Winterroggenblättern kommt. Es ist bekannt, daß kältegehärtete Roggenpflanzen eine hohe photosynthetische Leistungsfähigkeit besitzen (Huner 1984; Öquist & Huner 1993). So ist beispielsweise die Aktivität des Enzyms RubisCO bei kältegehärteten Roggenpflanzen erhöht (Hurry et al. 1994). Eine Erhöhung der Transkriptmenge von *rbcS* ist abhängig vom Überschreiten eines Excitonendruck-Schwellenwertes (Ndong et al. 2001). Nach Enthärtung ist die Pflanze einem niedrigeren Excitonendruck als bei 4°C ausgesetzt, da die Lichtverhältnisse nicht verändert wurden. Deshalb wird wohl die Expression von SSU nach Enthärtung gedrosselt. Da es sich bei RubisCO aber um ein Protein mit einem sehr niedrigen Turnover handelt (Berry et al. 1986; Ferreira & Davies 1987; Peterson et al. 1973), ist ein Rückgang an RubisCO-Protein nach drei Tagen Enthärtung noch nicht erkennbar und erklärt damit die Diskrepanz zwischen rückläufiger Transkriptmenge und gleich bleibender Proteinmenge von SSU.

Bei **LHCI**b** ergibt sich ein etwas anderer Zusammenhang. Die Experimente zeigten, daß die Transkriptmenge von *lhcII* nach drei Tagen Enthärtung ebenfalls dramatisch rückläufig war. Allerdings konnte nachgewiesen werden, daß sich auch die Proteinmengen von LHCI**b** nach Enthärtung, im Gegensatz zu SSU und LSU, mit zurückgehender LHCI**b**-Transkriptmenge parallel verringern.**

Über variable LHCI**b**-Proteinmengen kann die Pflanze die Aufnahme von Licht durch das PSII steuern und mit erhöhter proteolytischer Aktivität die Anpassung an erhöhte Lichtintensitäten gewährleisten. Diese Anpassung des Photosyntheseapparates an veränderte

Lichtverhältnisse wird daher als ein Mechanismus betrachtet, der eine optimale Photosynthese sicherstellen und gleichzeitig die Risiken von Lichtstreß und Photoinhibition des PSII drosseln kann (Yang et al. 1998). Lindahl et al. (1995) konnten bei der Adaption an Starklicht eine regulatorische Proteolyseaktivität bei Spinat nachweisen. Die für die Proteolyse des LHCIIB-Proteins zuständige Protease konnte bislang nicht identifiziert werden. Es konnte jedoch belegt werden, daß die Proteolyseaktivität 48-72h nach der Umsetzung der Pflanzen von Schwachlicht zu Starklicht erfolgte. In dieser Zeitspanne wird vermutlich die Protease exprimiert und aktiviert. Da nach der dreitägigen Enthärtung weniger LHCIIB-Protein vorliegt, kann dies bedeuten, daß während der Enthärtung der Proteinabbau von LHCIIB vorangetrieben wurde. Neben dem Proteinabbau ist wohl auch, da nach Enthärtung weniger LHCIIB-Transkript nachgewiesen werden konnte, eine verringerte Neusynthese von LHCIIB für die geringere LHCIIB-Proteinmenge in enthärteten Winterroggenblättern verantwortlich. Zusätzlich zu Starklicht scheint also auch die Enthärtung regulatorischen Einfluß auf die LHCIIB-Proteinmenge zu nehmen. Dies läßt den Schluß zu, daß die Pflanze nach Enthärtung nicht mehr auf die hohen LHCIIB-Kapazitäten, die bei gehärteten Roggenpflanzen zur optimalen Nutzung der Photosynthese bei Kälte anscheinend nötig waren, angewiesen ist. Dieser Zusammenhang ist recht verblüffend, da bei tiefen Temperaturen schon ein vergleichsweise hoher Excitonendruck vorherrscht und es unlogisch erscheint, daß eine Pflanze noch mehr Lichtsammelkomplexe errichtet, um noch mehr Lichtquanten einzufangen. La Rocca et al. (2001) untersuchten den Einfluß von Amitrol (Photosyntheseherbizid; Inhibitor der Carotinoidbiosynthese) auf die Transkription von LHCIIB und SSU. Es zeigte sich, daß ein Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Mg-Protoporphyrin und der Transkriptmenge von LHCIIB und SSU besteht. Je mehr Mg-Protoporphyrin in der Zelle akkumuliert wird, desto weniger LHCIIB und SSU Transkript kann nachgewiesen werden. Deshalb wird vermutet, daß eine Chlorophyll-Vorstufe als ein plastidäres Signal zur Regulation der LHCIIB und SSU-Synthese fungiert. Dieses plastidäre Signal löst wohl eine Signalkaskade aus, die schließlich zum Zellkern führt und dort über DNA-Bindeproteine die Transkription von LHCIIB und SSU reguliert (Kropat et al. 2000). *In vitro* Translationsexperimente könnten Hinweise dafür liefern, ob sich die Translationsraten von LHCIIB in kältegehärteten und enthärteten Winterroggenblättern voneinander unterscheiden. Dabei werden die bei der *in vitro* Translation von der mRNA aus CHL und der mRNA aus DHL gebildeten Mengen an LHCIIB-

Protein miteinander verglichen. Dieser Vergleich der gebildeten Proteinmengen läßt Rückschlüsse über die Translationseffizienz zu.

Zwei weitere an der Photosynthese beteiligte Enzyme sind in kältegehärteten Winterroggenblättern ebenfalls differentiell exprimiert. Bei diesen beiden Enzymen handelt es sich um **Transketolase** (plastidäre Form) und **Fructose-1,6-bisphosphatase** (cytosolische Form). In beiden Fällen geht die Transkriptmenge für diese Enzyme nach Enthärtung zurück.

Das Enzym Transketolase ist an der Regenerationsreaktion des primären CO₂-Akzeptors Ribulose-1,5-bisphosphat beteiligt. Es spaltet von Fructose-6-phosphat die C-Atome 1 und 2 als C2-Fragment ab, die dann auf Glycerinaldehyd-3-phosphat übertragen werden. Es entstehen Erythrose-4-phosphat und Xylose-5-phosphat, die in nachfolgenden Reaktionen für die Regeneration des primären CO₂-Akzeptors Ribulose-1,5-bisphosphat sorgen.

Das Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase katalysiert die hydrolytische Spaltung des an der C1-Position befindlichen Phosphats von Fructose-1,6-bisphosphat. Es bleiben Fructose-6-phosphat und Phosphor zurück. Fructose-1,6-bisphosphatase katalysiert sowohl Reaktionen im Cytosol als auch im Chloroplasten. Die cytosolische Form ist als wichtiges Enzym an der Regulation der Saccharosesynthese beteiligt. Beide Enzyme sind also bei der Photosynthese im Zuckerstoffwechsel involviert.

Kältehärtung führt bei vielen Pflanzen oftmals zur Akkumulation von löslichen Zuckern und Fructanen in den Zellen. Nach der Enthärtung sinkt der Gehalt an löslichen Zuckern wieder auf das Niveau von nicht-gehärteten Pflanzen ab. Zusätzlich kann die Aktivität von bestimmten Enzymen erhöht sein, wie bei *Brassica oleracea*, die eine erhöhte Saccharosesynthaseaktivität in kältegehärteten Keimlingen aufweisen. Nach Enthärtung zeigt sich wieder die gleiche Aktivität, wie bei den nicht-gehärteten Pflanzen (Hurry et al. 1995; Savitch et al. 2000 & 2002; Sasaki et al. 2001). Der akkumulierte Zucker führt in den Pflanzenzellen zum einen zu einer Erhöhung der Frosttoleranz (Tognetti et al. 1990; Guy et al. 1992) zum anderen wird der Zucker auch für das Wachstum der Pflanzen benötigt. Winterroggen stellt, im Gegensatz zu viele anderen Pflanzen, während des Winters sein Wachstum nicht dauerhaft ein. Daher benötigen diese Pflanzen auch einen gewissen Vorrat an Zucker, um ihren Stoffwechsel aufrecht halten zu können (Hurry et al. 1994). Strand et al. (2003) konnten zeigen, daß es bei Fructose-1,6-bisphosphatase Antisense-Transformatanten von *Arabidopsis* einen Zusammenhang zwischen der Zuckerkonzentration und dem Grad der erworbenen Frosttoleranz nach Kältehärtung gibt. So gesehen passen die

erhöhten Transkriptmengen für die Transketolase und Fructose-1,6-bisphosphatase in das sich abzeichnende Gesamtbild des erhöhten Zuckerstoffwechsels bei Kälte. Strand et al. (1999) konnten zeigen, daß sich in *Arabidopsis thaliana* bei Kälte, verglichen mit Kontrollpflanzen, die bei 23°C gewachsen waren, die Enzymaktivität von Transketolase und Fructose-1,6-bisphosphatase erhöht.

Grundsätzlich könnte durch eine Temperaturänderung das Verhältnis zweier miteinander verbundener Reaktionsabläufe in ein Ungleichgewicht geraten. Werden kältetolerante und kälteempfindliche Pflanzen, die bei Temperaturen über 20°C angezogen wurden, kältegestreßt (5-10°C), so hat dies weitreichende Folgen für die Pflanzen. Es kann beispielsweise zur Inhibierung der Kohlenstoffixierung, zur Inaktivierung und zum Verlust von RubisCO (Brüggemann et al. 1992 & 1994) führen. Die Transkription vieler kernkodierter, circadian gesteuerter Photosyntheseenzyme ist selbst bei einer kältetoleranten Pflanze wie *Arabidopsis thaliana* gestört, wenn sie nicht zuvor kältegehärtet wurde (Kreps & Simon 1997). Sowie die Enthärtung, als auch die Kältehärtung, erfordert natürlich eine Veränderung des Stoffwechsels. Hier gilt es dann, den Photosyntheseapparat an eine 18°C höhere Temperatur anzupassen. Nach der RGT-Regel bedeutet dies, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeit von enzymatischen Reaktionen bei diesem Temperatursprung nahezu verdoppeln kann. Ein Gen, das bei dem Prozeß der Enthärtung eine Rolle spielen könnte, ist die membranständige H⁺-ATPase (P3-Typ), die möglicherweise eine Schlüssel-funktion bei der Anpassung an die erhöhte Umgebungstemperatur besitzt. In dieser Promotionsarbeit konnte nämlich gezeigt werden, daß in enthärteten Winterroggenblättern die Transkriptmenge der **H⁺-ATPase (P3-Typ)** gesteigert wird. Die in der Plasmamembran lokalisierte H⁺-ATPase fungiert als eine Pumpe oder auch als ein primärer Transporter, der Protonen aus der Zelle pumpt und mit diesem Vorgang einen pH-Gradienten und ein elektrisches Potential über die Plasmamembran erzeugt. Dieser pH-Gradient und das elektrische Potentialgefälle stellen die Energie für die sekundären Transporter (Kanäle & Carrier) bereit. Die sekundären Transporter stellen schließlich den Stofftransport von beispielsweise Nitrat, Phosphat, Zuckern und Aminosäuren sicher. Aus diesem Grund sind besonders die Phloemelemente und die Wurzellhaarepidermiszellen reich an H⁺-ATPasen, da dort ein reger Stofftransport oder die Stoffaufnahme aus dem Boden stattfindet (DeWitt et al. 1991; Michelet et al. 1994; Parets-Soler et al. 1990). Die in dieser Arbeit isolierte cDNA kodiert für ein Gen, das zur isoformenreichen P3 Unterfamilie der H⁺-ATPasen gehört. In *Arabidopsis thaliana* konnten bislang 11 Isoformen isoliert werden (Axelsen &

Palmgren 2001). Diese Vielzahl von Isoformen sollen dem Bedarf an H⁺ATPasen sicherstellen, die unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen während verschiedener Entwicklungsstadien gerecht werden müssen (Outfattole et al. 2000).

Nach der RGT-Regel laufen während des Enthärtungsprozesses viele enzymatische Reaktionen bei 22°C schneller ab als zuvor bei 4°C. Es kommt zu einer Steigerung von Stoffwechselprozessen und im Zuge derer sich Stoffwechselprodukte ansammeln können. Durch eine erhöhte Tätigkeit der H⁺ATPasen als primärer Transporter können diese Stoffwechselprodukte über sekundäre Transporter an den Verbrauchsort transportiert werden. Denkbar wäre auch, daß dieser Anpassungsprozeß an die höhere Temperatur es erforderlich macht, daß bestimmte Metabolite (Aminosäuren, Hexosen, Saccharose) innerhalb der Pflanze umverteilt werden müssen. Auch bei dieser Umverteilung von Stoffen kann ein erhöhtes Auftreten von H⁺ATPasen zwingend sein und somit die erhöhte Transkriptmenge an H⁺ATPase bei enthärteten Winterroggenblättern erklären.

Ein weiteres Enzym, das in den Roggenblättern nach der Enthärtung hochreguliert wird, ist die **Protein Disulfid-Isomerase (Pdi-Gen)**. Die Protein Disulfid-Isomerase katalysiert die Bildung und Reduktion von Disulfidbrücken von neu synthetisierten Proteinen und ist auf der Lumenseite des ER lokalisiert. Daneben besitzt die Protein Disulfid-Isomerase Chaperonfunktion und verhindert das Aggregieren von ungefalteten Proteinen (Puig et al. 1994; Freedman et al. 1994; Cai et al. 1994; Kersteen & Raines 2003).

Durch die Ausbildung von Disulfidbrücken kann es zur Aktivierung von Enzymen kommen. Es konnte beispielsweise demonstriert werden, daß die beiden bakteriellen Proteine OxyR, ein Transkriptionsfaktor, und Hsp33, ein Hitzeschockprotein, durch die Oxidation der Cysteinseitenketten und der damit verbundenen Ausbildung einer Disulfidbrücke, aktiviert werden (Zheng et al. 1998; Jakob et al. 1999). Der Transkriptionsfaktor OxyR forciert die Expression der Antioxidanz-Enzyme Peroxidase und Superoxiddismutase und sorgt dafür, daß das Bakterium mit Hilfe dieser Antioxidanz-Enzyme die Anzahl von ROS verringern kann. Die Expression des Proteins Hsp33 wird sowohl unter Hitze- als auch unter oxidativem Streß induziert und kann in seiner Funktion als Chaperon die gefährdeten Proteine vor Degradierung schützen. Unter nicht-gestreßten Bedingungen sind die Cysteinseitenketten des Hsp33 mit einem Zinkatom ligiert. Werden die Cysteinseitenketten oxidativem Streß ausgesetzt, werden diese zu Disulfidbrücken umgewandelt und das Protein gewinnt seine Chaperonfunktion.

Kommt es in der Zelle durch oxidativen Streß zu veränderten Redoxbedingungen, können Cysteinseitenketten von Proteinen unter Entstehung von Disulfidbrücken oxidiert werden. Dadurch kann sich die Zahl der unerwünschten Disulfidbrücken bei Proteinen, die nicht auf die Ausbildung einer Disulfidbrücke zur Aktivierung ihrer Enzymtätigkeit angewiesen sind, erhöhen. Man spricht in diesem Fall von „Disulfid-Streß“. Aslund et al. (1999) vermuten, daß die Ausbildung von Disulfidbrücken auch bei Eukaryonten ein Schlüssel-signal zur Wahrnehmung von oxidativem Streß ist. Ob in den enthärteten Blättern die nachgewiesene erhöhte Transkriptmenge und die möglicherweise damit verbundene Steigerung der Proteinmenge und Enzymaktivität von Disulfidisomerase dafür sorgt, daß der Pflanze im Zuge dessen über die Bildung von Disulfidbrücken eine „Streß-Situation“ übermittelt werden soll, läßt sich noch nicht entgültig abschätzen.

Die Synthese von mRNA ist ein komplexer biochemischer Prozeß der u.a. von Transkriptionsfaktoren und Transkriptionselongationsfaktoren beeinflusst wird.

Bei Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Proteine, die die Transkription von Genen regulieren können. Zu den bekanntesten Vertretern der Transkriptionsfaktoren gehören der so genannte „Zinkfinger“, der „Leucin-Zipper“ und die bZIP-Proteine, mit einer basischen DNA-Bindungsdomäne und eine Leucin-Zipper-Dimerisierungsdomäne. Ein Transkriptionsfaktor kann aus drei bis neun einzelnen „Zinkfingern“ bestehen. Jeder dieser „Finger“ kann an eine Sequenz von drei Basen auf der DNA binden und damit die Transkription beeinflussen. Der „Leucin-Zipper“ bildet ein weiteres häufiges Strukturelement der Transkriptionsfaktoren. In diesem Fall besteht der Faktor aus zwei Peptidketten mit jeweils einer α -Helix, deren jeweils siebte Position einen Leucinrest enthält. Die beiden α -Helices werden durch hydrophobe Wechselwirkungen der Leucinreste wie ein Reißverschluß zusammengehalten. Die beiden DNA-Bindungsdomänen sind durch basische Aminosäuren gekennzeichnet, die über eine Bindung an die DNA die Transkription beeinflussen können (Landschulz et al. 1988; Takasuji 1998).

Bei kältegehärtetem Roggen konnte ein differentiell exprimiertes Gen isoliert werden, das Homologie zu einem putativen **Transkriptionselongationsfaktor** aus *Arabidopsis thaliana* aufzeigt. In enthärteten Winterroggenblättern ist die Transkriptmenge des Transkriptionselongationsfaktors deutlich reduziert. Transkriptionselongationsfaktoren sind maßgeblich an der Durchführung einer effizienten Transkription der DNA beteiligt. Sie sorgen entweder dafür, daß die RNA Polymerase II nicht vor dem Transkriptende stoppt, oder verringern die Häufigkeit und die Länge von Transkriptionspausen (Yamazaki et al. 2002).

Bislang konnte gezeigt werden, daß die Transkriptmengen für häufig in kältegehärtetem Winterroggen vorkommende Proteine, wie SSU, LSU oder auch LHCIIB, bei Winterroggen nach Enthärtung deutlich zurückgehen. Dies legt die Vermutung nahe, daß, da nach Enthärtung weniger Transkript der oben erwähnten Gene vorliegt, auch gleichzeitig der Bedarf an Transkriptionselongationsfaktoren, die möglicherweise an der Transkription dieser Gene beteiligt sind, rückläufig ist. Dieser Rückgang zeigt sich dann in der reduzierten Transkriptmenge des Transkriptionselongationsfaktors.

Neben Transkriptionselongationsfaktoren bilden die **RNA-bindenden Proteine** eine weitere klassische Gruppe an Proteinen, die an der Expression von Genen beteiligt sind. Die bekanntesten pflanzlichen Vertreter RNA-bindender Proteine sind die Glycin-reichen RNA-bindenden Proteine GRPs (glycine-rich RNA-binding proteins, GRPs) und die im Chloroplasten lokalisierten RNA-bindenden Proteine. Beide Typen besitzen ein oder mehrere RNA-Erkennungsmotive, kurz RRM (RNA-recognition motif, RRM). Die Glycin-reichen RNA-bindenden Proteine weisen am C-Terminus eine namens gebende glycinreiche Domäne auf. Die Funktion dieser glycinreichen Domäne am C-Terminus ist noch nicht geklärt worden. Da diese Domäne hochkonserviert ist, gehen Maruyama et al. (1999) davon aus, daß diese glycinreiche Domäne auch eine funktionelle Bedeutung hat. Horvath & Olson (1998) suchten nach kälteregulierten Genen bei *Euphorbia esula* und konnten ein Glycin-reiches RNA-bindendes Protein, *cor20*, bei Kälte als differentiell exprimiert erkennen. Die mRNA des *cor20* Gens zeichnet sich während der Kälteperiode (bis zu 30 Tage bei 5°C) durch eine gleichbleibend hohe Transkriptmenge aus. Wird die Pflanze bei 28°C deakklimatisiert, ist schon nach einem Tag die Transkriptmenge des *cor20* Gens deutlich zurückgegangen. Die RNA-bindenden Proteine sind in der Regulation der Prozessierung und der Translation von RNA involviert und nehmen somit Einfluß auf die Expression von Genen. RNA-bindende Proteine sind beispielsweise an der Kontrolle der mRNA Translation im Cytoplasma oder am Spleißen der prä-mRNA beteiligt (Birney et al. 1993; Alba et al. 1998). Dieses Glycin-reiche RNA-bindende Protein geht eine Bindung mit kälteinduzierten RNAs ein und kann somit Einfluß auf die Expression von kälteinduzierten Genen nehmen. So bindet *cor20* an die RNA eines noch nicht näher charakterisierten kälteinduzierten Gens aus der Wurzel von *Euphorbia esula* (Horvath & Olson 1998). Für die Expression des RNA-bindenden Proteins aus den kältegehärteten Blättern von *Secale cereale* konnte ein ähnliches Expressionsmuster, wie dies bei *Euphorbia esula* vorlag, bestimmt werden. In kältegehärteten Roggenblättern ist deutlich

mehr Transkript als bei enthärteten Blättern nachzuweisen. Es spricht vieles dafür, daß während der Kälteperiode die RNA-bindenden Proteine aus kältegehärteten Roggenblättern an der Regulation des Spleißens von Prä-mRNA und der Translation von kälteinduzierten Genen beteiligt sind. Die RNA-bindenden Proteine können also einen Beitrag zur Kältehärtung leisten, indem diese für eine effiziente Translation von kälteinduzierten Genen sorgen. Nach der Enthärtung geht der Bedarf an diesen RNA-bindenden Proteinen, da die kälteinduzierten Gene nicht mehr im gleichen Maße exprimiert werden wie zuvor, wieder zurück. Dieser Rückgang spiegelt sich in der deutlich geringeren Transkriptmenge für das RNA-bindende Protein wider. Shang et al. (2003) untersuchten welchen Einfluß tiefe Temperaturen auf die Effizienz der Synthese des D1 Proteins und der Katalase in Winterroggen nehmen. Es zeigte sich, daß CHL im Vergleich zu NHL, sowohl für das D1 Protein als auch für die Katalase eine höhere Syntheseleistung besitzen. Da die mRNA-Mengen für das D1 Protein und die Katalase in CHL und NHL keine großen Unterschiede zeigten, schloß man daraus, daß die erhöhte Synthesleistung bei Kälte posttranskriptionelle Ursachen hat.

Das Enzym **UMP1 Synthase** wird in kältegehärteten Roggenblättern differentiell exprimiert. Nach dem Prozeß der Enthärtung kann in den Roggenblättern weniger UMP1 Synthase Transkript nachgewiesen werden. Das bifunktionelle Enzym UMP1 Synthase katalysiert die letzten zwei Reaktionsschritte der Biosynthese von Pyrimidin. Es setzt Orotat zu Ortidin5-monophosphat und dieses weiter zu Uridin5-monophosphat um (Walther et al. 1984; Santoso & Thornburg 2000). Dabei kam es im Laufe der Evolution zur Fusion der beiden ursprünglichen Enzyme Orotatphosphoribosyltransferase und Ortidindecaboxylase zu einem bifunktionellen Enzym, der UMP-Synthase (Jones 1980). Pyrimidine spielen, da diese als Bausteine an der Synthese von DNA und RNA, als Co-Faktoren bei der Biosynthese von Zuckern, Polysacchariden, sowie Phospholipiden beteiligt sind, eine wichtige Rolle im pflanzlichen Stoffwechsel (Neuhard & Nygaard 1987). Bislang liegen über die regulatorischen Prozesse, die die Neusynthese von Pyrimidin steuern, noch nicht allzu viele Informationen vor (Boldt & Zrenner 2003). Santoso & Thornburg (1998) konnten zeigen, daß es einen direkten Zusammenhang zwischen der in der Zelle vorliegenden Nucleotidmenge und der mRNA Menge an UMP-Synthase und der Proteinmenge von UMP-Synthase gibt. In diesem Fall führte ein Thymin-Mangel in der Zelle zu einer gesteigerten Expression von UMP-Synthase. Es wurde deshalb postuliert, daß in der Zelle ein Protein vorliegt, welches den Thymin-Gehalt misst und diese Information an die

Promotor-Region der UMP-Synthase weiterleiten kann. Über diesen Vorgang könnte die Expression der UMP-Synthase gesteuert werden. Welche Bedeutung eine erhöhte Transkriptmenge von UMP-Synthase bei kältegehärtetem Roggen besitzt, konnte in dieser vorliegenden Promotion nicht detaillierter geklärt werden. Pyrimidine sind nicht nur Bausteine des DNA und RNA-Stoffwechsel, sondern in Form von UTP und UDP-Zucker als Vorstufen am Zuckerstoffwechsel beteiligt. Unter Umständen gibt es deshalb einen engeren Zusammenhang zwischen der bei kältegehärteten Roggenpflanzen festgestellten Akkumulation von Zuckern (Hurry et al. 1995; Savitch et al. 2000 & 2002) und einer hier nachgewiesenen erhöhten Transkriptmenge von UMP-Synthase.

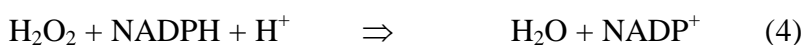
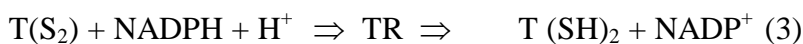
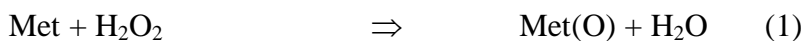
Am Ende der Diskussion stehen nun noch zwei Gene, *Lls1* und *PMSR*, denen eine Schutz- und Abwehrfunktion von ROS zugeordnet wird.

In dieser Arbeit angefertigte Northern Blot Analysen zeigten eine erhöhte Transkriptmenge des ***Lls1*-Gen (*lethal leaf spot-1*)** in Winterroggenblättern nach Enthärtung. Da das Transkript nur in photosynthetisch-aktiven Teilen der Pflanze nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß das *Lls1* Protein in den Chloroplasten lokalisiert ist. Gray et al. (2002) nehmen an, daß das *Lls1* Gen-Produkt den Chloroplasten unter biotischen oder abiotischen Streßbedingungen vor Zerstörung schützen kann. Fällt diese Schutzfunktion weg, kann Lichtenergie direkt oder indirekt die Entstehung von ROS oder phototoxische Chlorophyllabbauprodukte fördern, die dann den Chloroplasten schädigen. In diesem Zusammenhang wird dem *Lls1* eine zentrale Rolle bei der Eindämmung des programmierten Zelltods zugeordnet. Welche Funktion das *Lls1* Gen bei enthärteten Winterroggenblättern innehat, bleibt zunächst ungeklärt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß ***PMSR* (Peptidmethioninsulfoxidreduktase)** in kältegehärteten Winterroggenblättern differentiell exprimiert wird. *PMSR* ist ein ubiquitär verbreitetes Enzym, das zu dem so genannten „Minigenet“, mit welchem jeder Organismus ausgestattet ist, gehört (Mushegian et al. 1996). Der Begriff „Minigenet“ charakterisiert die minimale Grundausstattung an Genen, die jeder Organismus zum Überleben benötigt. Brot et al. (1981) untersuchten erstmals die Aktivität von *PMSR* in *E. coli*. Nachfolgend wurde *PMSR* auch bei Hefen und dem Menschen, sowie in den Blättern von Erbsen entdeckt (Brot & Weissbach 1982; Sanchez et al. 1983).

Freies Methionin oder in Proteinseitenketten lokalisiertes Methionin (Met) kann von reaktiven Sauerstoffformen (ROS) oder H_2O_2 , zu Methioninsulfoxid (Met(O)) oxidiert werden (1). Das Enzym *PMSR* katalysiert in Verbindung mit dem Enzym Thioredoxinreduktase

(TR) die Rückreaktion (Reduktion) von Methioninsulfoxid zu Methionin (2+3). Reduziertes Thioredoxin ($T(SH)_2$) liefert die Elektronen für die Entgiftung von H_2O_2 und erhält die Elektronen von $NADPH + H^+$ zurück. Alles in allem werden in diesem enzymatischen Reaktionsverlauf also Elektronen von $NADPH + H^+$ auf H_2O_2 übertragen (4).



Das Enzym besitzt ein breites Substratspektrum und kann sowohl Tetramethylsulfoxid als auch Dimethylsulfoxid umsetzen (Moskovitz et al. 1996). *In vivo* sind oxidierte Methioninseitenketten und freies Methioninsulfoxid das Substrat für PMSR. Wird Methionin zu Methioninsulfoxid oxidiert, kommt es am Schwefelatom zu einer Asymmetrie. Folglich können zwei Enantiomere Met-R(O) und Met-S(O) entstehen. Es konnte von Grimaud et al. 2001 an Hefen gezeigt werden, daß MsrA die S-Form und MsrB die R-Form von Methioninsulfoxid zu Methionin rückreduzieren kann.

Das Enzym PMSR ist unabhängig von Co-Faktoren und von proteingebundenem Metall. Drei Cysteinseitenketten befinden sich in der Nähe des aktiven Zentrums und der katalytische Prozeß scheint über eine Reihe von Thiol-Disulfid-Wechselschritten abzulaufen. In 19 von 20 untersuchten PMSR-Sequenzen verschiedenster Organismen sind diese Cysteinseitenketten hochkonserviert und veranschaulichen damit die Bedeutung der Cysteinseitenketten für den enzymatischen Reaktionsverlauf (Lowther 2000).

Eine wichtige Funktion, die das Enzym PMSR ausübt, ist die Reparatur von oxidativ geschädigten Proteinen. Diese Reparaturleistung kann dem Organismus die Proteolyse und anschließende kostspielige Neusynthese des geschädigten Proteins ersparen. Der erste Nachweis der Reparatur von oxidierten Proteinen *in vivo* durch PMSR gelang Moskovitz et al. (1995). Eine *E.coli* msrA(-) Mutante war gegenüber oxidativem Streß, ausgelöst durch die Zugabe von H_2O_2 ins Nährmedium, wesentlich sensitiver als der Wildtyp. Moskovitz et al. 1998 konnten darlegen, daß ein PMSR überexprimierender Hefestamm wiederum wesentlich unempfindlicher gegenüber oxidativem Streß als der Wildtyp ist. Patienten, die unter der Alzheimer Krankheit leiden, besitzen oxidativ geschädigte Hirnareale, die dann

zu den bekannten Ausfallserscheinungen des Gedächtnisses führen. Alzheimer Patienten weisen einen niedrigeren PMSR-Spiegel und eine verringerte PMSR-Aktivität auf als die nicht unter dieser Krankheit leidende Kontrollgruppe. Daraus wurde gefolgert, daß die Methioninsulfoxidreduktase einen Beitrag zur Reparatur oxidativ geschädigter Proteine im Gehirn leistet und bei Alzheimer Patienten diese oxidativen Schäden durch den zu niedrigen PMSR-Spiegel und die geringere Enzymaktivität nicht mehr behoben werden können (Gabbita et al. 1999). Eine weitere Untersuchung an dem Pflanzenpathogen *Erwinia chrysanthemi* konnte belegen, daß das Virus sein Überleben in der Pflanze, die zur Virusabwehr mit der Freisetzung von ROS reagiert, u.a. durch den Einsatz des Enzyms Methioninsulfoxidreduktase bewerkstelligt (El Hassouni et al. 1999). Besonders eindrucksvolle Studien, die die Bedeutung von PMSR hervorheben, wurden von Moskovitz et al. (2001) und Ruan et al. (2002) vorgelegt. Moskovitz et al. untersuchten PMSR Knockout-Mäuse und konnten zeigen, daß der Verlust des PMSR-Gens den oxidativen Streß in den untersuchten Zellen erhöht und sich im Zuge dessen die Lebenserwartung dieser Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe um 40% verkürzt. Ruan et al. (2002) gelang es, in Fruchtfliegen das Gen PMSR zu überexprimieren und damit die Lebenserwartung dieser Tiere um 70% zu erhöhen. Bei der Überexpression eines anderen antioxidativ wirkenden Enzyms, der Superoxiddismutase, durch Parkes et al. (1998) konnte die Lebenserwartung von Fruchtfliegen nur um 40% gesteigert werden.

Levine et al. (1996) stellten die These auf, daß die Protein-Methioninseitenketten allgemein Proteine vor reaktiven Sauerstoffformen schützen kann, in dem diese Methioninseitenketten als Beseitigungsort („sink“) für eben diese reaktiven Sauerstoffformen dienen können. Reaktive Sauerstoffformen oxidieren eine Methioninseitenkette eines Proteins, woraufhin das Enzym PMSR die Oxidation der Methioninseitenkette unter $\text{NADPH} + \text{H}^+$ Verbrauch rückgängig macht. Unter dem Strich gelingt es unter $\text{NADPH} + \text{H}^+$ Verbrauch in einer zyklischen Abfolge von nicht-oxidierten und oxidierten Methioninen, die Zahl der ROS in der Zelle zu senken und damit insgesamt die Gefahr der Oxidation von Proteinen zu verringern. Durch die „Antioxidanz“-Funktion von Methionin kann verhindert werden, daß andere Aminosäuren in Proteinen von ROS oxidiert werden können, was möglicherweise in einer Abnahme von Enzymaktivität münden oder eine irreparable Zerstörung eines Proteins nach sich ziehen könnte. Die Aminosäure Methionin kann, wenn diese im Zusammenhang mit dem Reparaturenzym PMSR gesehen wird, als ein Antioxidanzmittel betrachtet werden, daß das Protein selbst beherbergt. In einem *in vitro* Modell wurde der

Einfluß von H₂O₂ auf die Glutamin Synthase aus *E. coli* untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß, selbst wenn die Hälfte der 16 Methioninseitenketten der Glutamin Synthase oxidiert vorlagen, keine Verringerung der Enzymaktivität verzeichnet werden konnte. Im Zuge dessen wird Methionin oftmals als eine Aminosäure mit „suizidalen Tendenzen“ oder auch als „letzte Verteidigungslinie“ bei der Abwehr von ROS bezeichnet (Levine et al. 1996).

Neben der Reparatur von oxidativen Schäden und als wichtiger Bestandteil der Beseitigung von ROS, konnte dem Enzym PMSR vereinzelt auch eine regulatorische Rolle zugeschrieben werden. Ciorba et al. (1997) konnten an einem spannungsabhängigen K⁺-Kanal bei *Drosophila* zeigen, daß oxidiertes Methionin oder nichtoxidiertes Methionin bei diesem Kanalprotein als eine Art Aus/Ein-Schalter fungiert, der für das Schließen und Öffnen des Kanals verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, daß in kältegehärteten Roggenblättern die Transkriptmenge an PMSR, verglichen mit enthärteten und nicht-gehärteten Blättern, deutlich erhöht ist. Da dem Enzym PMSR, wie oben näher erläutert, in allen bisher untersuchten Organismen eine wichtige Funktion als antioxidativ wirkendes Enzym zugeschrieben wird, stellt sich die Frage, inwieweit PMSR in einen näheren Zusammenhang mit Kältehärtung bei Winterroggen und der damit verbundenen Gefahr auftretender ROS gebracht werden kann.

Die Bedeutung von PMSR bei der Abwehr von ROS und der Reparatur von ROS-geschädigten Proteinen ist unstrittig, allerdings scheint es innerhalb der verschiedenen Pflanzengruppen eine unterschiedlich starke Gewichtung der PMSR-Leistung zu geben. Ferguson et al. (1994) untersuchten, ob es unter dem Einfluß von Trockenstreß einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von PMSR und der Anzahl von oxidierten Protein-Methioninseitenketten gibt. Diese Untersuchungen wurden an Baumwolle (*Gossypium hirsutum*), Erbsen (*Pisum sativum*), Weizen (*Triticum aestivum*) und Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) durchgeführt. Die Veränderungen der Enzymaktivitäten von PMSR nach Trockenstreß ergaben bei den untersuchten Pflanzen kein einheitliches Bild. Unter Trockenstreß nahm die Enzymaktivität von PMSR bei Baumwolle und Erbsen deutlich ab, wohingegen bei der Kartoffel keine größeren Abweichungen festgestellt werden konnten. Einzig der Weizen zeigte nach Streßbehandlung eine deutlich erhöhte Aktivität des Enzyms PMSR. In allen untersuchten Pflanzen kam es nach Trockenstreß-Behandlung überraschenderweise zu keiner bemerkenswerten Erhöhung der Anzahl von oxidierten Methio-

ninseitenketten. Die Ergebnisse verdeutlichen, daß Pflanzen unterschiedliche Strategien verfolgen, oxidativem Streß zu begegnen und hierbei das Enzym PMSR von unterschiedlicher Bedeutung ist. Weizen gelingt es mit einer gesteigerten PMSR-Aktivität, die Anzahl der oxidierten Methioninseitenketten gering zu halten und somit möglicherweise oxidativen Streß abzuwehren. Auf der anderen Seite kommt es bei Baumwolle und Erbsen, trotz geringerer Aktivität von PMSR, nicht zu einer vermehrten Anzahl von oxidierten Methioninseitenketten. Baumwolle und Erbsen verfolgen anscheinend eine andere Strategie, die nicht so stark mit einer erhöhten Aktivität von PMSR gekoppelt ist, um oxidativem Streß zu begegnen. Möglicherweise gelingt es Baumwolle und Erbse, schon die Oxidation von Methioninseitenketten zu verhindern, d.h. ROS vorher abzufangen, so daß keinerlei erhöhte Enzymaktivität von PMSR bei diesen Pflanzen zwingend ist.

Es konnte bislang festgestellt werden, daß im Genom von *Arabidopsis thaliana* insgesamt fünf Isoformen, drei cytoplasmatische (cPMSR) und zwei plastidäre (pPMSR) Formen des Enzyms PMSR vorliegen. Die beiden pPMSRs sind nur im photosynthetisch aktiven Gewebe anzutreffen und werden in intakte Chloroplasten importiert. Während der Belichtung von etiolierten Keimlingen wird pPMSR besonders stark exprimiert. Im Gegensatz dazu tritt cPMSR in allen Gewebetypen, allerdings vermehrt in Blättern und Wurzeln, auf. Eine erhöhte Expression von cPMSR wird beispielsweise bei der Infektion mit dem Cauliflower-Mosaikvirus beobachtet. Nach einer Infektion reagiert die Pflanze mit der Freisetzung von ROS, um das Virus zu eliminieren. Bei der Freisetzung der ROS werden aber auch die eigenen pflanzlichen Proteine geschädigt. Eine erhöhte Expressionsrate von cPMSR kann die im Zuge der Pathogenabwehr geschädigten eigenen Proteine wieder reparieren (Sadanandom et al. 2000).

Die Wiederherstellung der Enzymaktivität durch PMSR nach Oxidation eines Enzyms konnte bislang für den α -1-Proteinase-Inhibitor (Abrams et al. 1981) Calmodulin (Sun et al. 1999) und die HIV-2 Proteinase (Davis et al. 2000) belegt werden. Die drei aufgelisteten Beispiele stammen alle aus dem tierischen oder humanen System. In pflanzlichen Systemen sind solche Erkenntnisse über spezifische Reparaturleistungen von PMSR noch nicht allzu zahlreich. Sadanandom et al. (2000) konnten zwar zeigen, daß die plastidäre Form von PMSR in photosynthetisch aktivem Gewebe differentiell exprimiert ist, allerdings konnte in den Chloroplasten selbst bislang noch kein spezielles Enzym, das von pPMSR repariert werden kann, gefunden werden. Schon 1983 konnte von Sanchez et al. eine erhöhte Aktivität von PMSR im Stroma der Chloroplasten detektiert werden und es

wurde daraus geschlossen, daß das „Zielsubstrat“ für PMSR im Chloroplasten lokalisiert sein muß. Gustavsson et al. (2002) vermuteten, daß das kleine Hitzeschockprotein Hsp21, welches viele hochkonservierte Methioninseitenketten besitzt, möglicherweise ein solches „Zielsubstrat“ für pPMSR darstellen könnte. Die kleinen Hitzeschockproteine besitzen die Funktion eines Chaperons und gewährleisten eine korrekte Faltung von Proteinen (Ehrnsperger et al. 1997; Horwitz 1992; Jakob et al. 1993). Kommt es zur Oxidation von Methionin (im Experiment hier mit 5mM H₂O₂ ausgelöst) tritt eine Konformationsänderung beim Hsp21 auf und das Protein verliert seine Chaperonfunktion (Härndahl et al. 2001). Diese oxidierten Hsp21 wurden pPMSR als Substrat angeboten und es zeigte sich, daß pPMSR die Oxidation von Methionin im Hsp21 beheben kann und als Resultat die Chaperonfunktion von Hsp21 wiederherstellen kann. Die Reduktion von Methioninsulfoxid zu Methionin durch pPMSR war DTT-abhängig. Diese Daten deuten darauf hin, daß das Hsp21, welches selber eine wichtige Schutzfunktion für Proteine besitzt, von pPMSR vor oxidativer Inaktivierung bewahrt wird. In weiteren Versuchen von Härndahl et al. 2001 wurde RubisCO als mögliches „Substrat“ von pPMSR untersucht. Es konnte allerdings erst nach Behandlung mit 20mM H₂O₂ eine Oxidation einer Methioninseitenkette festgestellt werden. RubisCO scheint also, im Vergleich zu Hsp21, weniger empfänglich für die Oxidation von Methionin. Die Oxidation einer Methioninseitenkette in RubisCO konnte ebenfalls durch pPMSR rückgängig gemacht werden.

Streb et al. (1999) stellten fest, daß CHL, verglichen mit NHL, 21% mehr lösliche Proteine pro Gramm Frischgewicht aufweisen. Die erhöhte Proteinmenge in CHL verlangt, um die korrekte Faltung der Proteine sicher zu stellen, vermutlich gleichsam eine erhöhte Expression vieler Chaperonproteine zur Bewerkstelligung dieser Aufgabe. Neben dem Chloroplasten-lokalisierten Hsp21 liegt im Cytosol das Hsp90, das ebenfalls Chaperonfunktion besitzt, in hohen Konzentrationen vor und gilt als das häufigste Protein im Cytosol überhaupt (Jakob et al. 1994). Möglicherweise kann das Enzym PMSR, da es sich durch eine geringe Substratspezifität auszeichnet, auch oxidierte Methioninseitenketten von Hsp90 reparieren und somit die Chaperonfunktion des Hsp90 im Cytosol bei Kälte erhalten. Durch die Erhaltung der Chaperonfunktion könnte die korrekte Faltung der Proteine bei Kälte sichergestellt werden.

Es ist zu vermuten, daß auch weitere Chloroplasten-Proteine gefunden werden, bei welchen ein direkter Zusammenhang zwischen Reparatur des oxidierten Enzyms und der Wiederherstellung der Enzymaktivität durch PMSR hergestellt werden kann.

Bislang gibt es noch keine Erkenntnisse darüber, wie die Expression von PMSR gesteuert und von welchen weiteren Faktoren sie beeinflusst wird. Bei Pflanzen gibt es bisher noch keine Hinweise auf Transkriptionsfaktoren, die die Expression von PMSR regulieren. Allerdings konnten Hanbauer et al. (2003) bei *Saccharomyces cerevisiae* nachweisen, daß ein DNA-Bindungsprotein die Expression von PMSR steuert. Das CPBP (calcium phospholipid-binding protein) wird kodiert von dem TEF3 Gen, welches eine Homologie von 64% mit dem TEF4 Gen aufweist, das wiederum für den Elongationsfaktor 1 γ kodiert (Kinzy et al. 1994). Hanbauer et al. (2003) konnten zeigen, daß die Behandlung von *Saccharomyces cerevisiae* mit H₂O₂ zu erhöhten Transkriptmengen von TEF3 und PMSR führt und daß bei einem Unterbinden der Expression des DNA-Bindungsproteins CPBP die Menge an PMSR mRNA und die Menge an PMSR Protein verringert wird. Wurde allerdings die Expression des Elongationsfaktors 1 γ gestört, konnte kein paralleler Rückgang der Expression von PMSR bemerkt werden. Bei *Saccharomyces cerevisiae* besitzt der Elongationsfaktor 1 γ also keinen Einfluß auf die Expression von PMSR. Es scheint so, daß das DNA-Bindungsprotein CPBP die Expression von PMSR steuert und damit den Bedarf an diesem Reparaturenzym bei oxidativem Streß reguliert. Inwieweit die in dieser Arbeit als differentiell exprimiert charakterisierten Gene eines Transkriptionselongationsfaktors und eines RNA-bindenden Proteins Einfluß auf die Expression von ScPMSR nehmen können, ist nicht geklärt. Moskovitz et al. (1997) haben bei Hefe „stromaufwärts“ vom Transkriptionsstart des Gens PMSR drei Sequenzabschnitte mit TATA-Box-Motif (einmal TATA und zweimal CATATATA-Sequenz) ausmachen können. Inwieweit an diesen Sequenzabschnitten RNA-Polymerasen und mögliche Transkriptionsfaktoren die Expression von PMSR beeinflussen können, ist bislang noch nicht untersucht.

Die Northern Blot Analysen von Winterroggen belegen, daß bei Kälte PMSR nicht kurzfristig, wie einige kälte-induzierte Transkriptionsfaktoren (z.B. *mlip15* aus Mais, Kusano et al. 1995), sondern nur nach längerfristiger Kältebehandlung hochreguliert wird.

Die Enzyme PMSR von Hefe (Moskovitz et al. 1998), Mensch (Kuschel et al. 1999), *Arabidopsis thaliana* (Sadanandom et al. 2000) und *Ochrobactrum anthropi* (Tamburro et al. 2001) konnten bisher in *E.coli* exprimiert und die Expression von PMSR analysiert werden. Bei Winterroggen lagen bisher keine Kenntnisse zur Expression von ScPMSR auf Proteinebene vor, da kein spezifisches Antiserum gegen ScPMSR hergestellt worden war. Um diese Untersuchungen erstmals durchführen zu können, wurde in dieser Promotion die Expression des rekombinanten Proteins von ScPMSR in *E. coli* mit einem Expressions-

system angestrebt. Nach der Klonierung und Transformation eines pQE32-ScPMSR Expressionskonstrukts konnte die Überexpression von ScPMSR in *E. coli* erfolgreich durchgeführt werden. Das rekombinante Protein wurde später als Antigen bei der Herstellung des Antikörpers eingesetzt. Mit dem Antikörper gegen ScPMSR gelang es, das Enzym PMSR in Winterroggenblättern immunologisch nachzuweisen.

In dieser Promotion konnte die Frage geklärt werden, ob das isolierte PMSR-Gen für eine plastidäre oder eine cytoplasmatische Isoform kodiert. Die Immunoblot Analysen zeigten, daß das isolierte PMSR-Gen nicht für eine plastidäre, sondern für eine cytoplasmatische PMSR-Isoform kodiert. Damit bleibt die Frage offen, ob *S. cereale*, ähnlich wie *A. thaliana*, ebenso verschiedene Isoformen von PMSR besitzt.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Frage nachgegangen, ob bei CHL die erhöhte PMSR-Transkriptmenge auch mit einer erhöhten Menge an PMSR-Protein korreliert und welchen Einfluß die Enthärtung auf die Expression von PMSR nimmt.

Die durchgeführten Immunoblot Analysen von ScPMSR zeigten, daß in allen drei untersuchten pflanzlichen Gesamtproteinextrakten von kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Roggenblättern eine Proteinbande in Höhe von etwa 23kDa nachgewiesen werden kann. Diese Proteinbande entspricht der errechneten Größe des PMSR-Proteins. In den kältegehärteten Winterroggenblättern konnte noch eine zusätzliche Proteinbande in Höhe von etwa 68kDa ermittelt werden. Die Größe dieser Bande entspricht in etwa der dreifachen Größe von ScPMSR (23kDa). In den enthärteten und nicht gehärteten Roggenblättern fehlt diese Proteinbande in Höhe von 68kDa. Weitere Immunoblot Analysen zeigten, daß bei kältegehärteten Blättern, die zu einer Temperatur von 22°C für 24 bzw. 48h gestellt wurden, ein leichter Rückgang der Proteinbande in Höhe von 68kDa zu verzeichnen war. Wurden hingegen nicht-gehärtete Pflanzen bis zu 48h bei einer Temperatur von 4°C inkubiert, so konnte nun ebenfalls eine Proteinbande in einer Höhe von 68kDa detektiert werden. Zusätzlich traten auch schwache Proteinbanden in Höhe von 45 und 54kDa auf.

Bislang gibt es in der Literatur noch keine Hinweise darauf, ob PMSR-Proteine bei Kälte aggregieren und ob sich dieses Aggregat in einer Proteinbande der Größe von etwa 68kDa manifestiert. Die weitere Versuchsstrategie dieser Arbeit verfolgte das Ziel, das vermeintliche Aggregat in den Gesamtproteinextrakten aus kältegehärteten Roggenblättern mit denaturierenden oder reduzierenden Reagenzien aufzulösen und gegebenenfalls in seine Untereinheiten zu zerlegen. Zu diesem Zweck wurden Harnstoff, Guanidin-

hydrochlorid und DTT eingesetzt. Es zeigte sich, daß sich das Aggregat von Guanidinhydrochlorid und DTT *in vitro* nicht auflösen ließ. Harnstoff konnte das Aggregat wohl auflösen, aber es konnten danach keinerlei distinkte Proteinbanden mehr detektiert werden. Es bleibt jetzt die Frage bestehen, warum ScPMSR in Winterroggenblättern bei Kälte zur Aggregatbildung neigt und dieses nicht durch SDS aufzulösen ist. Das nachgewiesene Aggregat entspricht in etwa der dreifachen Größe eines PMSR-Proteins. Unter Umständen könnten also drei PMSR-Proteine bei Kälte einen Proteinkomplex bilden.

Ein Aminosäuresequenzvergleich mit Hilfe des „Network Protein Sequence Analysis“-Programmes ergab, daß ScPMSR eine cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase Phosphorylierungsstelle, eine Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle sowie eine Caseinkinase II Phosphorylierungsstelle besitzt. Inwieweit eine oder mehrere Proteinphosphorylierungen die Laufeigenschaften von PMSR in einem SDS-Gel verändern und damit das Auftreten von zusätzlichen Proteinbanden auf Western Blots erklären könnten, bleibt zu klären. Eine weitere Möglichkeit für das Auftreten von großen Proteinbanden könnte sich aus einer Bindung von PMSR mit anderen Proteinen ergeben, um diese bei Kälte vor ROS zu schützen. Ob allerdings diese Proteinbindungen unter dem Einsatz stark denaturierender Reagenzien wie SDS, Guanidinhydrochlorid oder DTT bestehen bleiben können, ist fraglich.

Die Enzyme 2-Cystein Peroxiredoxin (2-CP) sowie PMSR weisen einige bedeutsame Parallelen auf. 2-CP dient ebenfalls der Beseitigung von Zellgiften, in diesem Fall von Peroxiden, und besitzt auch konservierte, an der katalytischen Reaktion mitwirkende, Cysteinseitenketten (Baier & Dietz 1996). 2-Cystein Peroxiredoxin liegt in der aktiven Form als Dimer vor, welches durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke entsteht. Je nach Redoxstatus können sich diese Dimere weiter zu Oligomeren und schließlich zu Dekameren umlagern. Die oxidierten Cysteinseitenketten können durch den Elektronendonator Thioredoxin wieder reduziert werden, womit der katalytische Kreis geschlossen wird. König et al. (2002) konnten feststellen, daß sich unter hohen Phosphatkonzentrationen zehn 2-CPs zu einem Aggregat formieren. Durch die Aggregatbildung wird die Regenerierung des 2-CP durch Thioredoxin negativ beeinflusst. Kommt es in der Zelle zur vermehrten Entstehung von ROS so wird 2-CP durchoxidiert und die 2-CP Oligomere lagern sich als Dekamere an die Thylakoidmembran an. Es wird nun spekuliert, daß der Pflanzenzelle photooxidativer Streß durch die Anlagerung von Dekameren an die Thylakoidmembran vermittelt wird (König et al. 2003). Es stellt sich jetzt die Frage, ob bei

dem Enzym PMSR ein ähnlicher Sachverhalt vorliegt. Ist in diesem Fall die 68kDa große Proteinbande mit der aktiven Form eines PMSR-Trimers gleichzusetzen oder handelt es sich um das Aggregat eines PMSR-Oligomers, welches dann die durchoxidierte, inaktive Form von PMSR repräsentiert? Kann sich das Aggregat ebenfalls an pflanzliche Zellstrukturen anlagern, um dadurch der Pflanzenzelle als Signal für das Vorhandensein von oxidativem Streß zu dienen?

Werden die Gesamtmengen (68kDa + 23kDa) von gebildetem ScPMSR-Protein in kältegehärteten, enthärteten und nicht-gehärteten Winterroggenblättern miteinander verglichen, so zeigt sich, daß die Unterschiede in den Proteinmengen nicht allzu groß sind. Bei kältegehärteten und bei nicht-gehärteten Winterroggenblättern, die für 48h in tiefe Temperaturen umgestellt werden, liegt der hauptsächliche Anteil der Proteinmenge bei dem 68kDa Protein und der Anteil des 23kDa Proteins ist geringer. Werden kältegehärtete Winterroggenblätter für 24h und 48h in 22°C warme Anzuchtschränke umgesetzt, so wird zwar die Menge des 68kDa Proteins geringer, aber die Menge des 23kDa Proteins nimmt nicht im gleichen Maße zu.

Das Enzym PMSR spielt bei kältegehärteten Roggenpflanzen eine Rolle bei der Abwehr von ROS. Die Expression von PMSR wird bei Kältestreß nicht kurzfristig hochreguliert, sondern wird nur längerfristig erhöht. Der zyklische Oxidations- und Reduktionsprozeß von Methionin und Methioninseitenketten wird als eine Art „sink“ für ROS angesehen. PMSR besitzt in diesem Zyklus die Aufgabe, die Oxidation von Methionin und Methioninseitenketten rückgängig zu machen. Aufgrund seiner geringen Substratspezifität könnte PMSR bei Kälte durch ROS geschädigte Proteine reparieren und damit als breit gefächertes Reparaturenzym fungieren.

Die weiteren Versuchsstrategien sollten sich zum einen mit der Fragestellung auseinandersetzen, ob es bei *S. cereale* neben der cytosolischen auch plastidäre Isoformen von PMSR gibt und zum anderen, ob im Genom, wie bei *Arabidopsis thaliana*, mehrere Isoformen kodiert sind. Diese Untersuchung könnte mit Southern Blot Analysen von genomischer DNA aus *S. cereale* durchgeführt werden. Zusätzlich können genomische DNA-Banken nach weiteren Isoformen gescreent werden.

Ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Forschung an ScPMSR könnte darauf liegen, eine PMSR Knock-out Mutante einer kältehärtbaren Pflanze (z.B. *Arabidopsis thaliana*) zu erzeugen oder durch die RNAi-Technik über ein Einschleusen von dsRNA eine Inhibierung der Genfunktion von ScPMSR zu bewirken. Somit könnte die Bedeutung des

Einflusses von PMSR bei der Kältehärtung möglicherweise noch eingehender charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang könnte auch die Suche nach transkriptionsregulatorischen Elementen, welche die Expression von PMSR bei Pflanzen steuern, von Bedeutung sein. Dazu muß das ScPMSR-Gen aus einer genomischen DNA-Bank isoliert und kloniert werden. Die DNA-Sequenz wird dann stromaufwärts nach Proteinbindungsstellen für mögliche Transkriptionsfaktoren abgesucht.

Im Zuge der Expressionsanalysen könnten mit dem nun vorhandenen Antikörper gegen ScPMSR erstmals Analysen zur *in vitro* Translation durchgeführt werden. In diesem Fall kann die PMSR-mRNA aus kältegehärtetem und aus enthärtetem Winterroggen *in vitro* translatiert werden. Bei einem Vergleich der beiden gebildeten Proteinmengen können Rückschlüsse über eine mögliche Translationskontrolle von ScPMSR gezogen werden. Zusätzlich stehen noch Versuche an, um den noch nicht näher definierten Ursprung der Aggregatbildung bei kältegehärteten Pflanzen zu erhellen. Eine weitere interessante Versuchstrategie könnte darauf abzielen, nach Zielsubstraten für ScPMSR zu suchen. Für die Suche nach Interaktionspartnern eignet sich generell das Hefe-Zwei-Hybrid-System. In diesem Fall könnte sich die praktische Durchführung allerdings als schwierig erweisen, da ScPMSR oxidierte Methioninseitenketten von Proteinen als Substrat benötigt. Es ist schwierig für alle möglichen PMSR-Interaktionspartner solche oxidierenden Bedingungen zu schaffen, daß spezifische Aussagen über eine Interaktion getroffen werden können. In diesem Fall ist es besser, wie bei Gustavsson et al. (2002), zunächst mögliche Interaktionspartner auf das Vorhandensein von hochkonservierten Methioninseitenketten durch Sequenzvergleiche hin zu untersuchen und dann speziell bei diesen Proteinen mit hochkonservierten Methioninseitenketten eine Interaktion zu überprüfen.

Es ist zu vermuten, daß in näherer Zukunft weitere Gene entdeckt werden, die mit dem Streßfaktor Kälte und der Kältehärtung in Zusammenhang stehen. Um weitere Gene, die mit Kältehärtung in Verbindung gebracht werden können, isolieren zu können, wird ein großes Augenmerk auf eine wiederholte Verbesserung der Isolierungsmethoden gelegt werden müssen. Hier gilt es beispielsweise zu bedenken, daß häufig exprimierte Gene natürlich schneller isoliert werden können als selten exprimierte Gene.

Die Entwicklung von neuen Methoden zur Isolierung differentiell exprimierter Gene hat die so genannte Microarray-Technik hervorgebracht. Die Technik fußt auf der Hybridisierung von komplementären Nucleinsäure-Einzelsträngen und bedient sich der Ent-

wicklungsfortschritte auf den Feldern der Mikroelektronik und Mikrotechnik. Auf geeigneten Trägeroberflächen, z.B. Glas, können auf kleinster Fläche eine Vielzahl von DNA oder RNA-Fragmenten sowie Proteine appliziert und immobilisiert werden. Anschließend können die komplementären und mit einem Farbstoff versehenen Molekülpärchen, die sich in der zu untersuchenden Probe befinden, von diesen Biochips „gefischt“ werden. Kommt es zur Hybridisierung, wird von einem Fluoreszenzfarbstoff ein Lichtsignal ausgelöst, das von geeigneten Sensoren registriert und von Datenanalyse-Programmen ausgewertet wird. Die Microarray-Technik kann zur Analyse von mRNA-Expressionsprofilen herangezogen werden, um verschiedene Expressionsmuster zu untersuchen. Der Vorteil dieser neuen Verfahrenstechnik ist, daß binnen kurzer Zeit eine große Anzahl von Genen, die sich durch ein unterschiedliches Expressionsverhalten hervorheben, gescreent werden können. Ein Nachteil der Microarray-Technik ist der sehr hohe Kostenaufwand, die eine Etablierung der Microarray-Technik in einem Labor mit sich bringt.

Ob ein differentiell exprimiertes Gen tatsächlich auch mit einer erhöhten Proteinnmenge korreliert, kann letztendlich erst über Immunoblot Analyse herausgefunden werden. Dieser Umstand wird von Kritikern (z. B. Gygi et al. 1999) oftmals bemängelt und halten deshalb die vergleichende Analyse von Transkriptomen zur Isolierung von differentiell exprimierten Genen für nicht sehr aussagekräftig. Von einem anderen Blickwinkel aus betrachtet, erweisen sich die am Anfang stehenden vergleichenden Untersuchungen von Transkriptomen zur Isolierung von differentiell exprimierten Genen dennoch als sinnvoll. Mit dieser Vorgehensweise erhält man zunächst ein Spektrum an differentiell exprimierten Genfragmenten und grenzt somit das Feld der Kandidaten ein. In einem nächsten Schritt können dann möglicherweise interessante Kandidaten auch auf variierende Proteinnmengen hin untersucht werden.

Die Proteom-Analyse („Proteomics“) rückt im Zusammenhang mit der Untersuchung differentieller Genexpression in den letzten Jahren, immer mehr ins Blickfeld und wird zukünftig noch an Bedeutung gewinnen können.

Am Ende stellt sich die Frage, ob kältetolerante Pflanzen bestimmte „Kältegene“ in ihrem Genom verankert haben, die kältesensitiven Pflanzen fehlen. Erstaunlicherweise wurden bislang auf diesem Feld wenige Southern Blot Analysen durchgeführt, die diesen Zusammenhang hätten erhellen könnten. Danyluk et al. (1994) konnten in Southern Blot Analysen zeigen, daß das *Wcor410* Gen, welches bei Kälte exprimiert wird, in den

Genomen der kältetoleranten Pflanzen Weizen, Roggen und Gerste, aber auch in den kälte-sensitiven Pflanzen Reis und Mais, kodiert ist. Allerdings wurde das Gen bei Kälte nur in Weizen, Roggen und Gerste exprimiert. So gesehen scheint der Besitz eines vermeintlichen „Kältegens“ allein nicht vor Kälte zu schützen; es Bedarf auch bestimmter weiterer Faktoren, die eine Expression eines „Kältegens“ ermöglichen. Vielleicht gibt es also gar keine bzw. nur sehr wenige einzigartige, nur in kältetoleranten Pflanzen vorkommenden Kältegene, sondern die Unterschiede in der Kontrolle der Expression von Genen, die bei der Anpassung an Kälte hilfreich sind, ermöglichen ein Überdauern von Kälte und Frost.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Winterroggen (*Secale cereale* L.) erwirbt durch längerfristiges Wachsen bei tiefen Temperaturen eine Anpassung an Kälte und Frost und entwickelt eine erhöhte Toleranz gegenüber kälte-induzierter Photoinhibierung. Diese Anpassung wird als Kältehärtung bezeichnet. Die erworbene Toleranz gegenüber kälteinduzierter Photoinhibierung geht nach drei Tagen Enthärtung bei einer Temperatur von 22°C wieder verloren. Die Zielsetzung der Promotion war es, nach differentiell exprimierten Genen zu suchen, die nicht als Antwort auf kurzzeitigen Kältestreß hochreguliert werden, sondern Gene zu isolieren die im Zuge länger einwirkender Kälte in Winterroggenblättern verstärkt exprimiert werden. Werden die mRNAs aus kältegehärteten (CHL) mit den mRNAs aus enthärteten Roggenblättern (DHL) verglichen, so können Gene isoliert werden, die in CHL stärker exprimiert werden. Diese differentiell exprimierten Gene können, da sie nach Enthärtung deutlich seltener exprimiert werden, eine limitierende Funktion bei Kältehärtung einnehmen. Um diese Gene isolieren zu können wurden zwei molekularbiologische Methoden, „Suppression Subtractive Hybridisation“-PCR und „Differential Display“-PCR angewendet. Mit diesen Methoden konnten insgesamt zwölf verschiedene cDNA-Fragmente differentiell exprimierter Gene isoliert werden. Im Vergleich mit DHL sind in CHL die Transkriptmengen für neun cDNA-Fragmente isolierter Gene erhöht. Auch die Transkriptmenge des Chloroplasten-kodierte Gens für LSU ist in CHL bei einem Vergleich mit DHL gesteigert. Die isolierten cDNA-Fragmente von differentiell exprimierten Genen kodieren für Proteine aus den verschiedensten Teilbereichen des pflanzlichen Stoffwechsels und sind nachfolgend aufgelistet.

Photosynthesestoffwechsel	SSU und LSU (kleine und große Untereinheit von RubisCO), LHCIIB (Lichtsammelkomplex IIB), Fructose-1,6-bisphosphatase, Transketolase
<u>Genexpression</u>	RNA-bindendes Protein, Transkriptionselongationsfaktor

Nucleotidstoffwechsel	UMP Synthase
Antioxidativ wirkendes Enzym	PMSR (Peptid-Methioninsulfoxidreduktase)

Es konnten cDNA-Fragmente dreier bekannter Gene und eines unbekanntes Gens (Klon 5C, zeigte Homologie zu einer Sequenz aus *Oryza sativa*) isoliert werden, deren Expression in DHL spezifisch erhöht ist.

Energiestoffwechsel	H ⁺ ATPase
Pathogenabwehr/ programmierter Zelltod	Lls1 Gen (lethal leaf spot Gen 1)
Proteinstoffwechsel	Disulfidisomerase

Neben der Analyse der Expression auf RNA-Ebene wurden Untersuchungen zur Expression auf Proteinebene vorgenommen. Western Blot Analysen zeigten, daß die geringeren Transkriptmengen

von rbcS und rbcL in DHL und NHL nicht mit einem parallelen Rückgang der Proteinmengen von SSU und LSU korrelieren. Die Proteinmengen an SSU und LSU in CHL, DHL und NHL weisen keine allzu großen Unterschiede auf.

Sowohl die Transkriptmenge des Gens *Lhcb* als auch die Menge des LHCIIB-Proteins war in enthärteten Winterroggenblättern in Vergleich zu gehärteten Winterroggenblättern vermindert.

Auch für das antioxidativ wirkende Enzym PMSR (Peptid-Methionin-Sulfoxid-Reduktase) konnten in CHL höhere Transkriptmengen als in DHL und in NHL nachgewiesen werden. PMSR ist ein ubiquitär verbreitetes Enzym, das eine nachgewiesene wichtige Funktion bei der Abwehr von reaktiven Sauerstoffformen (ROS) ausübt. Den bislang untersuchten antioxidativen Schutzsystemen konnte bei der Kältehärtung keine begrenzende Funktion zugeschrieben werden. Ein Schwerpunkt der Promotion lag deshalb auf der Untersuchung vom ScPMSR als antioxidativ wirkendes Enzym im Zusammenhang mit Kältehärtung. Die Transkriptmenge an ScPMSR erhöht sich nach dem längerfristigen Einwirken von Kälte. Zur Durchführung von Immunoblot Analysen mußte zunächst ein Antikörper gegen ScPMSR hergestellt werden. Mittels eines aus einer cDNA-Bank isolierten cDNA-Klons von ScPMSR wurde rekombinantes ScPMSR-Protein in *E.coli* Zellen produziert und nach der Reinigung zur Herstellung spezifischer Antiseren eingesetzt. Bei dem in dieser Arbeit isolierten ScPMSR handelt es sich um ein cytoplasmatisches Isoenzym.

In Western Blot Analysen mit dem ScPMSR-Antikörper konnte in Gesamtproteinextrakten aus CHL, DHL und NHL die ScPMSR-Proteinbande (23kDa) nachgewiesen werden. In CHL und in NHL die in niedrige Temperaturen umgesetzt wurden liegt noch eine zusätzliche Proteinbande einer Größe von 68kDa vor. Werden CHL in 22°C umgesetzt wird diese Bande innerhalb von 48h deutlich schwächer. Im Gegensatz dazu verstärkt sich die 68kDa-Proteinbande kontinuierlich, wenn NHL bis zu 48h in tiefe Temperaturen gestellt werden. Die Gesamtmengen an PMSR-Protein (23kDa + 68kDa) zeigen nicht allzu große Unterschiede bei CHL, DHL und NHL und korrelieren damit nicht mit der geringeren Transkriptmenge an PMSR in DHL und NHL. Rechnerisch könnte es sich bei dem bei Kälte gebildeten 68kDa großen Proteinaggregat um ein PMSR-Trimer handeln. Dieses Aggregat konnte allerdings *in vitro* durch die stark denaturierend wirkenden Stoffe Guanidiniumhydrochlorid und SDS nicht in nachweisbare Untereinheiten aufgelöst werden. Bei dem bei Kälte gebildeten Proteinaggregat könnte es sich um die enzymatisch aktive Form eines PMSR-Trimers handeln, das bei Kälte der Abwehr von ROS dient. Insgesamt deuten die Resultate darauf hin, daß ScPMSR bei der Kältehärtung von *S. cereale* von Bedeutung ist. Aufgrund der geringer Substratspezifität kann PMSR bei Kälte als weitgefächertes Reparaturenzym fungieren. Nicht zuletzt wird der zyklische Oxidations- und Reduktionsprozeß von Methionin und Methioninseitenketten auch als „sink“ für ROS angesehen. Es bedarf jedoch zusätzlicher Untersuchungen, um die Rolle von ScPMSR bei Kältehärtung von *Secale cereale* als antioxidativ wirkendes Enzym weiter definieren zu können.

6. Literaturverzeichnis

- Abrams W.R., Weinbaum G., Weissbach L., Weissbach H. & Brot N. (1981)** : Enzymatic reduction of oxidized alpha 1 proteinase inhibitor restores biological activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78** : 7483-7486
- Albá M.M. & Pagés M. (1998)** : Plant proteins containing the RNA-recognition motif. Trends Plant Sci., **3** : 15-21
- Anderson J.M. & Aro E.-M. (1994)** : Grana stacking and protection of photosystem II thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: a hypothesis. Photosynth. Res., **41** : 315-326
- Andersson B., Adamska I., Kloppstech K., Lindahl M. & Ohad I. (1996)** : Proteolytic activities associated with the photosynthetic membrane. In : Plant membrane biology, (eds.: Moller J.M. & Brodelins P.), Oxford Press, Oxford, pp. 3-14
- Aro J.M., Virgin I., Andersson B. (1993)** : Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochim Biophys Acta, **1143**: 113-134
- Asada K. (1996)** : Radical production and scavenging in the chloroplasts. In : Photosynthesis and the environment, (eds. Baker N.R.), Kluwer Academic Publishers, pp. 123-150
- Aslund F. & Beckwith J. (1999)** : Bridge over troubled waters : sensing stress by disulfide bond formation. Cell, **96** : 751-753
- Axelsen K. & Palmgren M. (2001)** : Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. Plant Phys., **126** : 696-706
- Baena-González E., Barbato R. & Aro E.-M. (1999)** : Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. Planta, **208** : 196-204
- Baier M. & Dietz K.-J. (1996)** : The two-Cys peroxiredoxin Bas1 : insight in a new family of plant peroxidases. In : Obinger C., Burner U., Ebermann R., Penel C., Greppin H. eds. Plant peroxidases biochemistry and physiology. Wien : University of Agriculture, 204-209
- Berry J.O., Nikolau B.J., Carr J.P. & Klessig D.F. (1986)** : Translational regulation of light-induced ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in amaranth. Mol.Cel. Biol., **6** : 2347-2353
- Birnboim H. & Doly J. (1979)** : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid Res., **7** : 1513-1522

- Birney E., Kumar S. & Krainer A.R. (1993)** : Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains : conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Research*, 21 : 5803-5816
- Boldt R. & Zrenner R. (2003)** : Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Physiologica Plantarum*, 117 : 297-304
- Brot N., Weissbach L., Werth J. & Weissbach H. (1981)** : Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 2155-2158
- Brot N. & Weissbach H. (1982)** : The biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 7 : 137-139
- Brüggemann W. (1992)** : Low temperature limitations of photosynthesis in three tropical *Vigna* species : A chlorophyll fluorescence study. *Photosynth. Res.*, 34 : 309-310
- Brüggemann W., Klauke S. & Maas-Kantel K. (1994)** : Long-term chilling of young tomato plants under low light. V. Kinetic and molecular properties of two key enzymes of the calvin-cycle in *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* Mill. *Planta* 194 : 160-168
- Bullock W.O., Fernandez J.M. & Short J.M. (1987)** : XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques*, 5 : 376
- Cai H., Wang C.C. & Tsou C.L. (1994)** : Chaperone-like activity of PDI in the folding of a protein with no disulfide bonds. *J. Biol. Chem.*, 269 : 24550-24552
- Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X., Agarwal M. & Zhu J.K. (2003)** : ICE I : a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 17 : 1043-1054
- Ciorba M., Heinemann S., Weissbach H., Brot N. & Hoshi T. (1997)** : Regulation of voltage-dependent K⁺ channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 : 9932-9937
- Combet C., Blanchet C., Geourjon C. & Deléage G. (2000)** : Network Protein Sequence Analysis. *TIBS*, 25 : 147-150
- Crecelius F., Streb P. & Feierabend J. (2003)** : Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *J. of Experimental Botany*, Vol. 54 Nr. 384: 1075-1083
- Dalton D.A. (1995)** : Antioxidant defenses of plants and fungi. In : *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*, (eds.: Ahmad S.), Chapman & Hall, pp. 298-355

- Danyluk J., Houde M., Rassart E. & Sarhan F. (1994)** : Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS Lett.* 344 : 20-24
- Davis D.A., Newcomb F.M., Moskovitz J. Wingfield P.T. Stahl S.J. Kaufman J. Fales H.M. Levine R.L. & Yarchoan R. (2000)** : HIV 2 protease is inactivated after oxidation at the dimer interface and activity can be partly restored with methionine sulfoxide reductase. *Biochem Journal*, 346 : 305-311
- Demming-Adams B. & Adams W.W. (1996)** : The role of the xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1 : 21-26
- Denhardt D.T. (1966)** : A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23 : 641-646
- DeWitt N.D., Harper J.F. & Sussman M.R. (1991)** : Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *Plant J.*, 1 : 121-128
- Dietz K.-J., Horling F., König J. & Baier M. (2002)** : The function of the chloroplast 2-cystein peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J. Experimental Botany*, 53 : 1321-1329
- Diatchenko L., Lau Y.C., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D. & Siebert P.D. (1996)** : Suppression subtractive hybridisation: a method for generating differentially regulated or tissue-specific probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 6025-6030
- Ebbert V. & Godde D. (1996)** : Phosphorylation of PSII polypeptides inhibits D1 protein-degradation and PSII stability. *Photosynth. Res.*, 50 : 257-269
- Ehrnsperger M., Graeber S., Gaestel M. & Buchner J. (1997)** : Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.*, 16 : 221-229
- El Hassouni M., Chambost J.P., Expert D., Van Gijsegem F., Barras F. (1999)** : The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *PNAS*, 96: 887-892
- Feierabend J. & Schrader-Reichhardt U. (1976)** : Biochemical differentiation of plastids and other organells in rye leaves with a high-temperature-induced deficiency of plastid ribosomes. *Planta*, 129 : 133-145
- Feinberg A.P. & Vogelstein B. (1983)** : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132 : 6-13

- Ferguson D. & Burke J.J. (1994)** : Methionyl sulfoxide content and protein-methionine-S-oxide reductase activity in response to water deficits or high temperature. *Physiol Plant*, 90 : 253-258.
- Ferreira R.B. & Davies D.D. (1987)** : Protein degradation in *Lemna* with particular reference to ribulose biphosphate carboxylase. The effect of light and dark. *Plant Physiol.*, 83 : 869-877
- Fowler S. & Thomashow M.F. (2002)** : Arabidopsis transkriptom profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell*, 14 : 1675-1690
- Foyer C.H. (1997)** : Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, (eds.: Scandalios J.G.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.587-621
- Freedmann R.B., Hirst T.R. & Tuite M.F. (1994)** : Protein disulfide isomerase : building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.*, 19 : 331-336
- Fryer M.J., Andrews J.R., Oxborough K., Blowers D.A. & Baker N.R. (1998)** : Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol.*, 116 : 571-580
- Gabbita S.P., Aksenov M.Y., Lovell M.A., Markesbery W.R. (1999)** : Decrease in Peptide Methionine Sulfoxide Reductase in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neurochemistry*, 73: 1660-1666
- Gilmour S., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M., Thomashow M.F. (1998)** : Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transkriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J*, 16 : 433-434
- Gray J., Janick-Buckner D., Buckner B., Close P.S. & Johal G.S. (2002)** : Light-dependent death of Maize *lls1* cells is mediated by mature chloroplasts. *Plant Physiol.*, 130 : 1894-1907
- Grimaud R., Ezraty B., Mitchell J.K., Lafitte D., Briand C., Derrick P. & Barass F. (2001)** : Repair of oxidized proteins, Identification of an new methionine sulfoxide reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 : 48915- 48920
- Gustavsson N., Kokke B.P.A., Härndahl U., Silow M., Bechthold U., Poghosyan Z., Murphy D., Boelens W.C. & Sundby C. (2002)** : A peptide methionine sulfoxide

reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. *The Plant Journal*, 29 : 545-553

Guy C.L., Huber J.L.A., Huber S.C. (1992) : Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology*, 100: 502-503

Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R. & Aebersold R. (1999) : Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 19 : 1720-1730

Härndahl U., Kokke B.P., Gustavsson N., Linse S., Berggren K., Tjerneld F., Boelens W.C. & Sunby C. (2001) : The chaperone-like activity of a small heat shock protein is lost after sulfoxidation of conserved methionines in a surface-exposed amphiphatic alpha-helix. *Biochim. Biophys. Acta*, 1545 : 227-237

Haldimann P. (1997) : Chilling-induced changes on carotenoid composition, photosynthesis and the maximum quantum yield of photosystem II photochemistry in two maize genotypes differing in tolerance to low temperature. *J. Plant Physiol.*, 151 : 610-619

Hanah D. (1983) : Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol. Bio.*, 166 : 557-580

Hanbauer I., Boja E.S. & Moskovitz J. (2003) : A homologue of elongation factor 1 γ regulates methionine sulfoxide reductase A gene expression in *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 8199-8204

Hertwig B., Streb P., Feierabend J. (1992) : Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol*, 100: 1547-1553

Hönighaus R. & Feierabend J. (1983) : Rapid purification of intact chloroplasts and heat-bleached ribosome-deficient plastids from rye leaves on discontinuous percoll gradients. *Protoplasma*, 118 : 114-120

Horvath D.P. & Olson P.A. (1998) : Cloning and characterization of cold-regulated glycine-rich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones. *Plant Mol Biol*, 38 : 531-538

Horwitz J. (1992) : Alpha crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 10449-10453

Huner N.P.A. (1984) : Acclimation of winter rye to cold-hardening temperatures results in an increased capacity for photosynthetic electron transport. *Can. J. Bot.*, 63 : 506-511

- Huner N.P.A., Öquist G., Hurry V.M., Krol M., Falk S., Griffith M. (1993)** : Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynth Res*, 37: 19-39
- Huner N.P.A., Öquist G., Sarhan F. (1998)** : Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci*, 3 : 224-230
- Hurry V.M. & Huner N.P.A. (1992)** : Effect of cold hardening on sensitivity of winter and spring wheat leaves to short-term photoinhibition and recovery of photosynthesis. *Plant Physiol*, 100: 1283-1290
- Hurry V.M., Krol M., Öquist G. & Huner N.P.A. (1992)** : Effect of long-term photoinhibition on growth and photosynthesis of cold-hardening spring and winter wheat. *Planta*, 188 : 369-375
- Hurry V.M., Malmberg G., Gardeström P. & Öquist G. (1994)** : Effects of a short-term shift to low temperature and of long-term cold-hardening on photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and sucrose phosphate synthase activity in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.). *Plant Physiol*, 106 : 983-990
- Hurry V., Strand A., Tobiaeson M., Gardeström P. & Öquist G. (1995)** : Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in different effects on growth, carbon metabolism and carbohydrate content. *Plant Physiol*, 109 : 697-706
- Ish-Horowicz, D. & Burke, J. F. (1981)**. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9, 2989-2998
- Ishitani M., Xiong L., Lee H., Zhu J.K. (1998)** : HOS 1, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10 : 1151-1161
- Jahnke L.S., Hull M.R. & Long S.P. (1991)** : Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Environ.*, 14 : 97-104
- Jakob U., Gaestel M., Engel K. & Buchner J. (1993)** : Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.*, 268 : 1517-1520
- Jakob U., Lilie H., Meyer J. & Buchner J. (1994)** : Transient interaktion of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase – implication for heat shock in vivo. *J. Biol. Chem.*, 270 : 7288-7294
- Jakob U., Muse W., Eser M. & Bardwell J.C.A. (1999)** : Chaperone activity with a redox switch. *Cell*, 96 : 341-352
- Jones M.E. (1980)** : Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals : genes, enzymes and regulation of UMP biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 49 : 253-279

- Kersteen E.A. & Raines R.T. (2003)** : Catalysis of disulfide bond formation by protein disulfide isomerase and small-molecule mimics. *Antioxidants & Redox Signaling*, 5 : 414-424
- Kim J.C., Lee S.H., Choeng Y.H., Yoo C-M., Lee S.I., Chun H.J., Yun D-Y., Hong J.C., Lee S.Y., Lim C.O., Cho M.J. (2001)** : A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J*, 25: 247-259
- Kim J.H., Nemson J.A. & Melis A. (1993)** : Photosystem II reaction centre damage and repair in *Dunaliella salina* (green alga). *Plant Physiol.*, 103 : 181-189
- Kinzy T.G., Ripmaster T.L. & Woolford J.L. Jr. (1994)** : Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 gamma in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 22 : 2703-2707
- Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M. & Trewavas A.J. (1991)** : Transgenic plant aequorin reports the effect of touch, cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352 : 524-526
- Knight H., Trewavas A.J. & Knight M.R. (1996)** : Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 8 : 489-503
- König J., Baier M., Horling F., Kahmann U., Harris G., Schürmann P. & Dietz K.-J. (2002)** : The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Plant Physiol.*, 124 : 823-832
- König J., Lotte K., Plessow R., Brockhinke A., Baier M. & Dietz K.-J. (2003)** : Reaction Mechanism of Plant 2-Cys Peroxiredoxin – Role of the C terminus and the quaternary structure. *J. Biological Chemistry*, 278 : 24409-24420
- Koivuniemi A., Aro E.-M. & Andersson B. (1995)** : Degradation of the D1 and D2 proteins of photosystem II in higher plants is regulated by reversible phosphorylation. *Biochemistry*, 34 : 16022-16029
- Koroleva O., Brüggemann W., & Krause G.H. (1994)** : Photoinhibition, xanthophyll-cycle and in vivo fluorescence quenching of chilling-tolerant *Oxyria digyna* and chilling-sensitive *Zea mays*. *Physiol Plant*, 92: 577-584
- Krause G.H. (1988)** : Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.*, 74 : 566-574

- Krause G.H., Carouge N. & Garden H. (1999)** : Long-term effects of temperature shifts on xanthophyll cycle and photoinhibition in spinach (*Spinacia oleracea*). Aust. J. Plant Physiol., 26 : 89-98
- Kreps J.A. & Simon A.E. (1997)** : Environmental and genetic effects on circadian clock-regulated gene expression in Arabidopsis. Plant Cell, : 297-304
- Kreps J.A., Wu J., Chang H.-S., Zhu T., Wang X. & Harper J.F. (2002)** : Transkriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic and cold stress. Plant Physiol., 130 : 2129-2141
- Krol M. & Huner N.P.A. (1985)** : Growth and development at cold-hardening temperatures. Pigment and benzoquinone accumulation in winter rye. Can J Bot, 63: 716-721
- Kropat J., Oster U., Rüdiger W. & Beck C.F. (2000)** : Chloroplast signaling in the light induction of nuclear HSP 70 genes requires the accumulation of chlorophyll precursors and their accessibility to cytoplasm/ nucleus. Plant J., 24 : 523-531
- Kusano T., Berberich T., Harada M., Suzuki N. & Sugawara K. (1995)** : A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. Mol Gen Genet, 248 : 507-517
- Kuschel L., Hansel A., Schönherr R., Weissbach H., Brot N., Hoshi T. & Heinemann S.H. (1999)** : Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). Federation of European Biochemical societies, 456 : 17-21
- Laemmli U.K. (1970)** : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685
- Landschulz W.H., Johnson P.F. & McKnight S.L. (1988)** : The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science, 240 : 1759-1763
- La Rocca N., Rascio N., Oster U. & Rüdiger W. (2001)** : Amitrole treatment of etiolated barley seedlings leads to deregulation of tetrapyrrole synthesis and to reduced expression of *Lhc* and *RbcS* genes. Planta, 213 : 101-108
- Lee H., Xiong L., Ishitani M., Stevenson B., Zhu J.K. (1999)** : Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in an *Arabidopsis thaliana* mutant. Plant J, 17 : 301-308
- Leipner J., Fracheboud Y. & Stamp P. (1997)** : Acclimation by suboptimal growth temperature diminishes photooxidative damage in maize leaves. Plant, Cell & Environment, 20: 366-372

- Leitsch J., Schnettger B., Critchley C. & Krause G.H. (1994)** : Two mechanisms of recovery from photoinhibition *in vivo* : reactivation of photosystem II related and unrelated to D1-protein turnover. *Planta*, 194 : 15-21
- Levine R.L., Mosoni L., Berlett B.S. & Stadtman E.R. (1996)** : Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *PNAS*, 93 : 15036-15040
- LIANG P. & PARDEE A.B. (1992)** : DIFFERENTIAL DISPLAY OF EUKARYOTIC MESSENGER RNA BY MEANS OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION. *SCIENCE*, 257 : 967-971
- Lindahl M., Yang D.H. & Andersson B. (1995)** : Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of PSII by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur J. Biochem*, 231 : 503-509
- Liskens M.H.K., Feng J., Andrews W.H., Enlow B.E., Saati S.M., Tonkin L.A., Funk W.D. & Villeponteau B. (1995)** : Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucl. Acids Res.* 23 : 3244- 3251
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (1998)** : Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10 : 1391-1406
- Long S.P., Humphries S. & Falkowski P.G. (1994)** : Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45 : 633-662
- Los D.A. & Murata N. (1998)** : Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1394 : 3-15
- Lowther W.T., Brot N., Weissbach H., Matthews B. (2000)** : Structure and mechanism of Peptide Methionine Sulfoxide Reductase, an „Anti-Oxidation“ enzyme. *Biochemistry*, 39 : 13307-13312
- Maruyama K., Sato N. & Ohta N. (1999)** : Conservation of structure and cold-regulation of RNA-binding proteins in cyanobacteria: probable convergent evolution with eukaryotic glycine-rich RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, 27 : 2029-2036
- Melis A. (1999)** : Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends Plant Sci*, 4 : 130-135
- Michelet B., Lukaszewicz M., Dupriez V. & Boutry M. (1994)** : A plant plasma membrane proton-ATPase gene is regulated by development and environment and shows signs of a translational regulation. *Plant Cell*, 6: 1375-1389

- Minorsky P.V. (1989)** : Temperature sensing in plants: a review and a hypothesis. *Plant Cell Environ.*, 12 : 119-135
- Moskovitz J., Rahman M.A., Strassman J., Yancey S.O., Kushner S.R., Brot N. & Weissbach H. (1995)** : *E.coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protection against oxidative damage. *J. Bacteriol.*, 177 : 502-507
- Moskovitz J., Weissbach H. & Stadtman E.R (1996)** : Cloning the expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins. *PNAS*, 93 : 2095-2099
- Moskovitz J., Berlett B.S., Poston J.M. & Stadtman E.R. (1997)** : The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*. *PNAS*, 94 : 9585-9589
- Moskovitz J., Berlett B.S., Poston J.M. & Stadtman E.R. (1998)** : Methionine sulfoxide reductase in antioxidant defense. *Methodes in Enzymology*, 300 : 239-245
- Moskovitz J., Shoshana B., Wesley M.W., Requena J., Berlett B.S., Stadtman E.R. (2001)** : Methionine sulfoxide reductase (Msr A) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 12920-12925
- Mushegian A.R. & Konin E.V. (1996)** : A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93 : 10268-10273
- Nagy F., Kay S.A. & Chua N.H. (1998)** : Analysis of gene expression in transgenic plants. In : *Plant molecular biology manual*, (eds.: Gelivin R.A. & Schilperoort R.A.), Kluwer Academic Publishers, pp. 1-29
- Ndong C., Danyluk J., Huner N.P.A., & Sarhan F. (2001)** : Survey of gene expression in winter rye during changes in growth temperature, irradiance or excitation pressure. *Plant Molecular Biology*, 45 : 691-703
- Neuhard J. & Nygaard P. (1987)** : Purines and Pyrimidines. In Neidhardt F.C., Ingram J.L., Low B.K., Magasanik B., Schaechter M., Umberger H.E., eds, *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium* : Cellular and Molecular Biology. American society for Microbiology, Washington, DC, pp 445-473
- Ohad I., Kyle D.J. & Hirschberg J. (1985)** : Light-dependent degradation of the Q_B-protein in isolated pea thylakoids. *EMBO J.* 4 (7) : 1655-1659
- Öquist G. & Martin B. (1986)** : Cold climates. In : *Photosynthesis in contrasting environments*, (eds.: Baker N.R. & Long S.P., Elsevier, pp.237-293

- Öquist G. & Huner N.P.A. (1991)** : Effects of cold acclimation on the susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in scots pine and winter and spring cereals: a fluorescence analysis. *Funct Ecol.*, 5: 91-100
- Öquist G. & Huner N.P.A. (1993)** : Cold-hardening-induced resistance to photoinhibition of photosynthesis in winter rye is dependent upon an increased capacity for photosynthesis. *Planta*, 189 : 150-156
- Öquist G., Hurry V.M., Huner N.P.A. (1993)** : The temperature dependence of the redox state of Q_A and susceptibility of photosynthesis to photoinhibition. *Plant Physiol Biochem*, 31: 683-691
- Orvar B.L., Sangwan V., Omann F. & Dhindsa R.S. (2000)** : Early steps in cold sensing by plant cells : the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.*, 23 : 785-794
- Osmond C.B. (1994)** : What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In : *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to field*, (eds.: Baker N.R. & Bowyer J.R.), BIOS, Oxford pp.1-24
- Outfattole M., Arango M. & Bountry M. (2000)** : Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of a plasma membrane H^+ -ATPase and one of which is induced by mechanical stress. *Planta*, 10 : 715-722
- Owens T.G. (1996)** : Processing of excitation energy by antenna pigments. In : *Photosynthesis and the environment*, (eds.: Baker N.R.) Kluwer Academic publishers, pp. 1-23
- Parets-Soler A., Pardo J.M. & Serrano R. (1990)** : Immunocytolocalization of plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Physiol*, 93 : 1654-1658
- Park Y.-I., Chow W.S. & Anderson J.M. (1996)** : Chloroplast movement in the shade plant *Tradescantia albiflora* helps protect photosystem II against light stress. *Plant Physiol.*, 111 : 867-875
- Parkes T., Elia A.J., Dickinson D., Hilliker A., Phillips J.P. & Boulianne G.L. (1998)** : Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons *Nat.Genet.*, 19 : 171-174
- Pearce R.S. (1999)** : Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation*, 29 : 47-76
- Peterson L.W., Kleinkopf G.E. & Huffacker R.C. (1973)** : Evidence for lack turnover of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in barley leaves. *Plant Physiol.*, 51 : 1042-1045

- Pinhero R.G., Rao M.V., Paliyath G., Murr D.P. & Fletcher R.A. (1997)** : Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol.*, 114 : 695-704
- Plieth C. (1999)** : Temperature sensing by plants: calcium-permeable channels as primary sensors- a model. *J. Membr. Biol.*, 172 : 121-127
- Powles S.B. (1984)** : Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35 : 15-44
- Puig A. & Gilbert H.F. (1994)** : Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 269 : 7764-7771
- Rintamäki E., Salo R., Koivuniemi A. & Aro E.-M. (1995)** : Protein phosphorylation and magnesium status regulate the degradation of the D1 reaction centre protein of photosystem II. *Plant Sci.*, 115 : 175-182
- Rorat T., Irzykowski W. & Grygorowicz W.J. (1997)** : Identification and expression of novel cold induced genes in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Science*, 124 : 69-78
- Roubal W.T. & Tappel A.L. (1966)** : Damage to proteins, enzymes and amino acids by peroxidizing lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 113 : 5-8
- Ruan H. Xiang D.T., Mai-Lei A.J., Guangrong S., Brot N., Weissbach H., Heinemann S., Iverson L., Chun-Fang W. & Toshinori H. (2002)** : High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 : 2748-2753
- Sadanandom A., Poghosyan Z., Fairbairn D.J. & Murphy D.J. (2000)** : Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in *Arabidopsis*. *Plant Phys*, 123 : 255-263
- Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. (1989)** : Molecular cloning, a laboratorial manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanchez J., Nikolau B. & Stumpf P.K. (1983)** : Reduction of N-acetyl methionine sulfoxide in plants. *Plant Physiol.*, 73 : 619-623
- Sane P.V., Ivanov A.G., Hurry V., Huner N.P.A. & Öquist G. (2003)** : Changes in the redox potential of primary and secondary electron-accepting quinones in PSII confer increased resistance to photoinhibition in low-temperature-acclimated *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 132 : 2144-2151

- Santoso D. & Thornburg R. (1998)** : Uridine 5'-monophosphate synthase is transcriptionally regulated by pyrimidine levels in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol*, 116 : 815-821
- Santoso D. & Thornburg R. (2000)** : Fluoroorotic acid-selected *Nicotiana plumbaginifolia* cell lines with a stable thymine starvation phenotype have lost the thymine-regulated transcriptional program. *Plant Phys*, 123 : 1517-1524
- Sasaki H., Ichimura K., Imada S. & Yamaki S. (2001)** : Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings. *J. Plant Physiol.*, 158 : 847-852
- Savitch L.V., Harney T. & Huner N.P.A. (2000)** : Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 108 : 270-278
- Savitch L.V., Leonardos E.D., Krol M., Jansson S., Grodzinski B., Huner N.P.A. Öquist G. (2002)** : Two different strategies for light utilization in photosynthesis in relation to growth and cold acclimation. *Plant, Cell and Environment*, 25 : 761-771
- Schöner S. & Krause G.H. (1990)** : Protective systems against active oxygen species in spinach : response to cold acclimation in excess light. *Planta*, 180 : 383-389
- Shang W., Schmidt M. & Feierabend J.B. (2003)** : Increased capacity for synthesis of the D1 protein and of catalase at low temperature in leaves of cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.). *Planta*, 216 : 865-873
- Smallwood M. & Bowles D.J. (2002)** : Plants in a cold climate. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 357 : 831-847
- Somersalo S. & Krause G.H. (1989)** : Photoinhibition at chilling temperatures. *Planta*, 177: 409-416
- Somersalo S. & Krause G.H. (1990)** : Reversible photoinhibition of unhardened and cold acclimated spinach leaves at chilling temperatures. *Planta*, 180: 181-187
- Southern E.M. (1975)** : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98 : 503-517
- Strand A., Hurry V., Henkes S., Huner N., Gustafsson P., Gardeström P. & Stitt M. (1999)** : Acclimation of Arabidopsis leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 119 : 1387-1397

- Strand A., Foyer C.H., Gustafsson P., Gardeström P. & Hurry V. (2003)** : Altering flux through sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 26 : 523-535
- Streb P. & Feierabend J. (1999)** : Significance of antioxidants and electron sinks for the cold-hardening-induced resistance of winter rye leaves to photo-oxidative stress. *Plant, Cell and Environment*, 22 : 1225-1237
- Streb P., Shang W. & Feierabend J. (1999)** : Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress. *Plant, Cell and Environment*, 22 : 1211-1223
- Sun H., Gao J., Ferrington D.A., Biesiada H., Williams T.D. & Squier T.C. (1999)** : Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry*, 38 : 105-112
- Takatsuji H. (1998)** : Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell Mol Life Sci.*, 54 : 582-596
- Tamburro A., Allocati N., Massuli M., Rotilio D., Di Ilio C. & Favaloro B. (2001)** : Bacterial peptide methionine sulfoxide reductase co-induction with glutathione S-transferase during chemical stress conditions. *Biochem. J.*, 360 : 675-681
- Thiele A., Schirwitz K., Winter K. & Krause G.H. (1996)** : Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Sci*, 115: 237-250
- Thomashow M.F (1998)** : Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.*, 118 : 1-7
- Thomashow M.F (1999)** : Plant cold acclimation, freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mo. Biol.*, 50 : 571-599
- Tognetti J.A., Salerno G.L., Crespi M.D. & Pontis H.G. (1990)** : Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiologica Plantarum*, 78 : 554-559
- Tyystjärvi E., Mulo P., Mäenpää P. & Aro E.-M. (1996)** : D1 polypeptide degradation may regulate psbA gene expression at transcriptional and translational levels in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.*, 47 : 111-120
- Vasilikiotis C. & Melis A. (1995)** : The role of chloroplast-encoded protein biosynthesis on the rate of D1 protein degradation in *Dunaliella salina*. *Photosynth. Res.*, 45 : 147-155

- Walther R., Wald K., Glund K. & Tewes A. (1984)** : Evidence that a single polypeptide catalyses the two steps conversion of orotate to UMP in cells from tomato suspension culture. *J Plant Physiol*, 116 : 301-311
- Wan J., Wright M.B., Cai L., Flament A. & Lindpaintner K. (2002)** : Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics*, 3 : 1-7
- Weissbach H., Etienne F., Hoshi T., Heinemann S.H., Lowther W.T., Matthews B., St. John G., Nathan C. & Brot N. (2002)** : Peptide Methionine Sulfoxide Reductase: Structure, Mechanism of Action, and Biological Function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397 : 172-178
- Wise R.R. & Naylor A.W. (1987)** : Chilling-enhanced photooxidation. *Plant Physiol.*, 83 : 278-282
- Wise R.R. (1995)** : Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth Res*, 45: 79-97
- Yang D.H., Webster J., Adam Z., Lindahl M. & Andersson B. (1998)** : Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of PSII in response to elevated light intensities. *Plant Physiol.* 118 : 827-834
- Yamamoto H.Y., Nakayama T.O.M. & Chichester C.O. (1962)** : Studies on the light and dark interconversion of leaf xanthopylls. *Arch. Biochem. Biophys.*, 97 : 168-173
- Zhang J., Cui S., Li J., Wei J. & Kirkham M.B. (1995)** : Protoplasmic factors, antioxidant responses, and chilling resistance in maize. *Planta* 33 : 567-575
- Zheng M., Aslund F. & Storz G. (1999)** : Activation of the OxyR transkription factor by reversible disulfide bound formation. *Science*, 279 : 1718-1721

7. ANHANG

I.) Sequenzanalysen der isolierten cDNA-Fragmente

- a) SSU (kleine Untereinheit der RubisCO)
- b) LHCIIB („Light-Harvesting-Komplex“)
 - c) RNA-bindendes Protein
- d) PMSR (Peptid-Methionin-Sulfoxid-Reduktase)
- e) Transketolase (plastidäre Form)
- f) Fructose-1,6-bisphosphatase (cytoplasmatische Form)
- g) UMP Synthase
- h) Transkriptionselongationsfaktor
- i) H⁺-ATPase
- j) Lls1 Gen („lethal leaf spot“ Gen)
- k) Disulfidisomerase
- l) unbekannte cDNA-Sequenz (Klon 5c) aus *O.sativa*
- m) Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase
- n) unbekannte cDNA-Sequenz aus *O.sativa*
- o) NAD-Malat Dehydrogenase
- p) Fucosyltransferase

II.) SEQUENZANALYSE KLONIERUNG SCPMSR IN PQE32

III.) SEQUENZ ALIGMENT FÜR DEN STAMMBAUM VON PMSR

I.) Sequenzanalyse der isolierten cDNA-Fragmente

a) Sequenzanalyse SSU

ACATGAACATGGACATACACATATTCTTAGGAACAAATAAGAAAGATAAAATGGACAAGGAAAACCCAAAGCAA
 TGTCAGAGTTGACAAAACCTGCAATGGCACTTTATATGCGGCCCGTGGTGAGTGAGCTTGTATTATGCTTGCCGG
 ACTCCTCGCAGCCCCGTTGGCTTGAAGGCGATGAAGCTGACGCACTGCACCTGGCGCATGTTGTGCAATCCGGA
 TGATGCGGACGTACCT

K02324.1 Wheat (*T. aestivum*) chloroplast ribulosebisphosp... 315 2e-83
 U43493.1 Hordeum vulgare ribulose-1,5-bisphosphate carbox... 165 4e-38

K02324.1 Wheat (*T. aestivum*) chloroplast
 ribulosebisphosphate carboxylase small subunit mRNA,
 clone pTS406, 3' end.
 Length = 317

Score = 315 bits (159), Expect = 2e-83
 Identities = 191/199 (95%), Gaps = 2/199 (1%)
 Strand = Plus / Minus

Query:1 acatgaacatggacatacacatattcttaggaacaaataagaaagataaatggacaagga60
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct:199 acatgaacatggacatacacatattcttaggaacaaataagaaagataaatggagaagga140

Query:61 aaacccaaagcaatgtcagagttgacaaaactgcaatggcactttatatgcgcccggtgg120
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct:139 aaacccaaagcaatgtcagagttgacaaaactgcaatggcactttatatatggcctgtcg 80

Query:121 tgagtgagcttggttatg-cttgccggactcctcgcagcccgggtggcttgaaggcgatga179
 ||||||||| ||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 79 tgagtgagc-tggttaggccttgccggactcctcgcagcccgggtggcttgaaggcgatga 21

Query: 180 agctgacgcaactgcacctg 198
 |||||||||||||||||||||
 Sbjct: 20 agctgacgcaactgcacctg 2

b) Sequenzanalyse LHCIIB

TCCGTTGCTGTGCGGGTGGTGCTCATGGGCTTCATCGAGGGCTACCGGTTGGTGGCGGCC
 CCCTCGGCGAGGGCCTCGACATCATCTACCCGGGCGGCGCCTTCGACCCGCTTGGCCTCG
 CCGACACCCCGACACCCGCGGAGCTCAAGGTCAAGGAGCTCAAGAACGGCCGCTCG
 CCATGTTCTCCATGTTTCGGCTTCTTCGTGACGACGATCGTACCCGGGAAGGGCCAGTTG
 AGAACCTCTTCGACCACGTCGCGGACCCAGTCAACAACAACGCTGGGCTTCGCCACCA
 ACTTCGCCCCCGGAAGCTAAATGTGTTTAGCCATCGGACGAGATATGCATGTGTACTTGT
 ACGTCGTGGATCAACGTGTAGCTGCACGTAATTTGTGTGTTTATTTGTACCATGATCGAG
 CGAGCGAGAGGTCTCTCGCTGGCTGTGCGCAATGTAATTAATTAAGCACGAGGTGCAC
 GAGCAAATGGATGGAAGAATCGTGTGTCATTTAGTAC

D00642.1 *Oryza sativa* (*japonica* cultivar-group) mRNA for ... 357 1e-95
 X68682.1 *Z.mays* mRNA for type II light-harvesting chlorop... 341 8e-91

D00642.1 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) mRNA for
 type II light-harvesting chlorophyll a/b binding protein
 of photosystem II (LHCPII), complete cds.
 Length = 989

Score = 357 bits (180), Expect = 1e-95
 Identities = 270/300 (90%)
 Strand = Plus / Plus

```

Query:14  ggtggtgctcatgggcttcacgcgagggtaccgcggttggtggcgccccctcggcgaggg 73
          |||
Sbjct:518 ggtggtgctcatgggattcgtcgagggtaccgcggtcggcgggcgccccgctcggcgaggg577

Query:74  cctcgacatcatctaccggggcgcccttcgacccgcttgccctcgccgacgacccccga133
          |||
Sbjct:578 cctcgacaaggtgtaccaggggcgcccttcgacccgctcggcctcgccgacgacccctga637

Query:134 caccgcccggagctcaagggtcaaggagctcaagaacggccgctcgccatgttctccat193
          |||
Sbjct:638 caccttcgcccggagctcaagggtgaaggagctcaagaacggccgctcgccatgttctccat697

Query:194 gttcggcttcttcgctgcaggccatcgtcaccgggaaggggcccagttgagaacctcttcga253
          |||
Sbjct:698 gttcggattcttcgctccaggccatcgtcaccgggaagggccccatcgagaacctcttcga757

Query:254 ccacgtcgccgacccagtcacaacaacgcctgggccttcgccaccaacttcgcccccg313
          |||
Sbjct:758 ccacgtcaccgacccccgctcgccaacaacgcctggtcatacgccaccaacttcgcccccg817
  
```

c) Sequenzanalyse RNA-Bindendes Protein

```

GAACCGAAATAAACCAAATGCCACGAGGAGGGAATTAGGTGTCAGCAGTACATTTTCATCGGATGAGTGAACCT
CAACCTATATCCCAAACTGAGATCATCTTCCCTGTGATACATATGCACCCGCACACCAACAGTTGCCACGCG
CTTTGCGCTGCCATGAGCCATGCTTCCATcTATGCACGCCGAGATCGACTCagACGCTCACGAGCTTCTTGC
CGAGGATCATGTCTCGTCCGTGGTGAAGTCAGCCTCCTTCTGAAGGTCCCGCGCCGAAGTCGAGGTTGTACGA
GTCCGTCAAGCCATCGAGGAGGTCGTACTCCGGCGTAACCCCAAGGTCCTTGCTGGCTTCTCCACCGACGCG
AAGAAATGCTGGTCTCTGAAGGGGAAGGCCTTCTTCTTGCCGAAATCGAAGTCCTTGGGGTTGTAGTGGATGA
TCTCCGGCTCAGGGAACCTCCAagCCTTTGCGCATGCCCGTGCTAGCCCGTC
  
```

Y15382.1 *Arabidopsis thaliana* mRNA for putative RNA bind... 68 2e-08

Y15382.1 *Arabidopsis thaliana* mRNA for putative RNA binding
 protein.
 Length = 1291

Score = 67.9 bits (34), Expect = 2e-08
 Identities = 100/122 (81%)
 Strand = Plus / Minus

```

Query:351 ttctccaccgacgcgaagaaatgctggtctctgaaggggaaggccttcttcttgccgaaa410
          |||
Sbjct:999 ttctccaccgatgcaaagaaatgctgatcacggaaagggaaatgccttcttctcccaaag940

Query:411 tcgaagtccttgggggttgtagtggatgatctccggctcagggaaacctccagcctttgcg470
          |||
Sbjct:939 tcgaactcttctgggggttgtaatgaacaatctctggctccggaaacccaccggcctttgcg880
  
```



```

                280      290      300      310      320      330
Sequen  CCACCACGCTCAACAAGCAGGGCAACGACGTCGGGACGCAGTACCGGTCGGGCATCTACT
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL:  CGACCACGTTGAATCGCCAGGGGAATGATGTGGGGACGAGGTACAGATCGGGCATATACT
                510      520      530      540      550      560

                340      350      360      370      380      390
Sequen  ACTACACGGCGGAGCAGGAGCGGCAGGCTAGGGAGTTCGCTGGCGGAGAAGCAGCAAGAAT
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL:  TCTACACAGACGAGCAAGAGAAGTTAGCTCGTGAAGCAATGGAGAAAACAGCAGAAGATCT
                570      580      590      600      610      620

                400      410      420      430      440      450
Sequen  GGAAGGAGAAGATCGTGACGGAGGTCTCCCGGCGAGGAAAGTTCTACCCAGCCGAGGACT
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL:  TGAACAGGAAGATTGTGACTGAGATACTTCCCGCCACTAAATTCTACAGAGCAGAAAACT
                630      640      650      660      670      680

                460      470      480      490      500      510
Sequen  ACCACCAGCAGTACCTCGAGAAGGGCGGCCAGCCCCGCAAGAAGCGCTGCTCCGACCCCA
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_PL:  ACCACCAGCAGTACCTGGCAAAAGGTGGTTCGCATGGGTCTCAGTCAATCTGCTGAGAAAAG
                690      700      710      720      730      740

```

e) Sequenzanalyse Transketolase

```

                                Vektorsequenz GAAT TCGATTTGAT
CCCTGGGGTG  TGCAGCGCAA  TGCCGTTGCA  AATGGCGCCC  ATTCCGTGCT  CCCTAACTCC
AAAGCGGACA  TTGCGCTCCT  CAGGGGTATC  CTTCTGGAAG  TCGCCAAACA  TCTTGAGCAA
TGTCATGTTG  GAGGACGCAA  GATCAGCACT  GCCTCCAATA  AGGCCAGGCA  CAACTTTAGC
AAGTGCATTC  AAGCATTGCT  GGGAGAGATT  CCTGGTGGCA  TCTGCTGGGC  TCTCTGTAGT
GTATTGAGGA  AGAGCATCGG  CCCAGCCAGC  GGGCAACTCT  CCTGTGATAA  TACTTTTCAA
GGTGGCGGCA  TCTTCTGGGT  ACTTCTGCTC  AACTGTGCA  AACTTAGCAT  CCCATTGAGC
TTCAAGCTCG  GCACCTTGGG  GAATATGGCG  GCTCCAGTGG  CTCTTGACAT  CCTCAGGCAC
AAAGAATGGC  TCATATGGCC  ATCCGAGGTT  TGCCCTGGTC  GCTTCGACC  TCGCTGGTGC
CCAATGCAGC  TCCGTGCACA  GCGTATGAGT  TGGGCCTTGT  TTGGGAGAGT  CMAAAACCGA
TTGKTGGTGG  TCACCYTGAT  CATTGTTGGG  GSTTGTCAAG  TAAACTGAWT  TTGGCTYCCN
YGAATGGCCT  TACCGGATTT  YATCGTAACC  AATCGTTGCC  ACTTCTTATC  TCCACGAGTG
GGGTGCACCC  CACAGAGVCS  TCMAAAACGG  GCACCSTMCC  AATCCTCTGY  TAAAAGAWAT
TTTCTYGTGT  STCCATCCAC  TCGCAGRATG  TKGGTGGTTK  TYGTTTGAAA  GAAAATAATW
TTTTGTCAA A

```

AK067452.1 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) cDNA... 504 e-139
 AP002542.2 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) geno... 320 2e-84

AK067452.1 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) cDNA
 clone:J013107D17, full insert sequence.
 Length = 2280

Score = 504 bits (252), Expect = e-139
 Identities = 493/568 (86%), Gaps = 5/568 (0%)
 Strand = Plus / Minus

Query:7 cctgggggtgtgcagcgcgaatgccggttgcaaatggcgcccattccgtgctccctaactcca 66
 ||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |||||
 Sbjc:1326cctggggtgtgcagagcaatgccggttgcaaatggcgcccattccatgctccctgactcca1267

AK059092.1 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) cDNA... 593 e-166
 AK059092.1 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) cDNA
 clone:001-022-C01, full insert sequence.
 Length = 1051

Score = 593 bits (297), Expect = e-166
 Identities = 485/547 (88%), Gaps = 3/547 (0%)
 Strand = Plus / Minus

Query: 1 ctggagtcatcggttgaccaccgggtgtaccaggaaggtacgcggcagaatttggtgtca 60
 |||
 Sbjct:587ctggagtcatcggttgaccaccaggtgtaccaggaaggtacgaggcagaattcgggtgtca 528

Query:61 ttggctgaccaacaggtgtagaaggcacatatgggcttggagcatttgcatagttgctct 120
 |||
 Sbjct:527ttggttgacctacaggagtggaaggcacatatgggcttggagcatttccgtagttgctct 468

Query:121ctctaggagttggaacatcattataactaactcctggagtatttaccaccctaatccag 180
 |||
 Sbjct:467ccctgggagttggagcgtcattatagctaactcctggcgtatttgcccaccctgatccag 408

Query:181gtggtggggcttcatatggccgagctgggtggtgctcctggctggtaagctggactgcttc 240
 |||
 Sbjct:407gtgtgggtgcttcatatggccgagctgggtggagttcctggctggtaagctggactgcttc 348

Query:241cccaagtatcaggatttccatcttcccaattatctcttggaggactcataggagcccagg 300
 |||
 Sbjct:347cccaagtagcaggatttcttcttcccagttatccctcggaggactcataggagcccag- 289

Query:301ccctactacgcatcgggggttcgcattccatcatgtatcgggtgttggctccaggatcccgca 360
 |||
 Sbjct:288--ccacgacgcataggagtccgcatgccatcgtgtattgggggttggctccagggtcccgca 231

Query:361ttggagctctgaaatggatgaagtggtggttctggacgggtgcatcgggtgtttcactacca 420
 |||
 Sbjct:230ttgggtgtctggtgaaggatgaagcgggtggtcagagatgggtgcatcgggtgtttcaccacca 171

Query:421acgaaaatcgggggttcacggaatggtggtgcaacagtaggcgtgtcggaatatcatctc 480
 |||
 Sbjct:170acggataacgaggttcacggaatggtggtgcaacagtaggtgtatcagcaatatcatctc 111

Query:481 tcttaactgtgacaatcttcattaatggatcaagctcaacacgcacaagcaccctcagtc 540
 |||
 Sbjct:110 ttttaactgtcacaatcttcattaacgaatcaagctccacacgcacaagcagccagtc 51

Query: 541 cctcttt 547
 |||
 Sbjct: 50 cctcttt 44

AAC27397.1| 990|*Arabidopsis thaliana* putative t... 182 1e-44
 AAC27397.1| 990|*Arabidopsis thaliana* putative
 transcription elongation factor protein.
 Length = 990

Score = 182 bits (458), Expect = 1e-44
 Identities = 116/197 (58%), Positives = 130/197 (65%), Gaps = 19/197
 (9%)
 Frame = -3

Query:592KINLVLNKGYPWPALKEVTGVLVVRVELDPLMKIVTVK----RDDIADTP--TVATPFREP 431
 KI L KGY L EV LVRVEL+ KIVT K R I+D VATP
 Sbjc:691 KIRLGPFKGYSG-RLVEVKDKLVRVELEA--KIVTGKLFERKAISDMTNDNVVATP----- 743

Query:430RFSLSGSETPMHPSRTPLHPFQTPMRDPGATPIHDGMRTPMRSRAW---APMSPPRDNWED 260
 ++++GS+TPMHPSRTPLHP TPMR GATPIHDGMRTPMR RAW PMSPPRDNWED
 Sbjc:744QYNMGSQTPMHPSRTPLHPCMTPMRHSGATPIHDGMRTPMRGRAYNPYMPMSPPRDNWED 803

Query:259GNPDTWGSSPAYQPGTTPPARPYEAPTPLGLW-VNTPG-VSYNDVPTPRESNY----- 110
 GNP +WG+SP YEA TPG W +TPG SY D TP + +
 Sbjc:804 GNPGSWGTSP-----YEAATPGSDWGSSTPGRSSYRDAGTPIINNGFVYYLLCLN 852

Query:109 ANAPSPYVPSTPVGQPMTPNSAAYLPGTGGQPMTP 2
 ANAPSP MTP+S +YLP TPGGQ MTP
 Sbjt: 853 ANAPSP-----MTPSSTSYLPTTPGGQAMTP 878

i) Sequenzanalyse der H⁺-ATPase (P-Typ)

	<u>Vektorsequenz</u>	<u>GAATTC</u>
CGAGCCAGGT CTTAGTGTCA TTATCAGTGC TGTGCTGACC AGCAGGTGCA TTTTCCAGGG		
GATGAAGAAC TACACGATCT ATGCAGTTTC CATCACCATC CGTATAGTGC TTGGCTTTAT		
GCTTATTGCC TTGATCTGGA AATTTGATTT CGCCCCCTTC ATGGTCCCTTA TCATCGCCAT		
TCTCAATGAT GGTACTATCA TGACAATCTC TAAGGACAGA GTTAAGCCAT CTCCCTTACC		
CGACAGCTGG AAGCTCAATG AAATCTTTGC CACTGGTGTT GTGCTTGGAA CCTACCTTGC		
TCTGATGACT GTTGTGTTCT TCTGGGCCAT GCACAAGACA GATTTCTTCA CTAACAAATT		
TGGCGTTAGG TCAATCAGGG ACAGTGAATT TGAGATGATG TCTGCACTGT ACCTCCAAGT		
CAGTATTGTA AGCCAGGCTC TTATCTTCGT GACTCGTTCC CGTAGCTGGT CCTTTGTTGA		
GCGCCCTGGT TTCCTCTTGG TCACCGCCTT CTTCTTGGC CAATTGGTTG CAACACTCAT		
CGCTGTCTAC GCCAACTGGG ACTTTGCAAG GATCAAGGGA ATCGGGTGGG GCTGGGCTGG		
TGT		

AY136627.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare plasma membr... 807 0.0
 AJ344078.1 Hordeum vulgare partial mRNA for plasma mem... 807 0.0

AY136627.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare plasma membrane
 P-type proton pump ATPase (Hal) mRNA, complete cds.
 Length = 3446
 Score = 807 bits (407), Expect = 0.0
 Identities = 554/603 (91%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 7 cgagccaggtcttagtgatcattatcagtgctgtgctgaccagcaggtgcattttccaggg 66
 |||
 Sbjc:2059cgagccaggtcttagtgatcattatcagtgctgtcctgaccagcagatgcattttccagag2118

Query:67 gatgaagaactacacgatctatgcagtttccatcaccatccgtatagtgcttggctttat 126
 |||
 Sbjc:2119gatgaagaactacacaatctacgcagtttccatcaccatccgtattgtgcttggcttttt2178

Query:127gcttattgccttgatctggaatgtgatttcgcccccttcatggctccttatcatcgccat 186
 |||
 Sbjc:2179gcttattgccttgatctggaatgtgatttcgctcccttcatggctccttatcattgccat2238

Query:187tctcaatgatggactatcatgacaatctctaaggacagagttaagccatctcccttacc 246
 |||
 Sbjc:2239tctcaatgatggcactatcatgacaatccaaggacagagttaagccatctcccttacc2298

Query:247cgacagctggaagctcaatgaaatctttgccactggtggttgcttggaaacctaccttgc 306
 |||
 Sbjc:2299cgacagctggaagctcaatgaaatcttcgccactggtggttgctcggaaacctaccttgc2358

Query:307tctgatgactggttggttcttctgggcatgcacaagacagatttcttactaacaatt 366
 |||
 Sbjc:2359tctgatgacagtggttcttctggatcatccacaggaccgacttcttcacaaacaaatt2418

Query:367tggcggttaggtcaatcagggacagtgaatttgagatgatgtctgactgtacctccaagt 426
 |||
 Sbjc:2419cgggtgacaggtcaatcagggaaaatgaaactgagaagatgtctgactgtacctccaagt2478

Query:427cagtattgtaagccaggctcttatcttcgctgactcgttcccgtagctggtcctttgttga 486
 |||
 Sbjc:2479cagtattgtgagccaggctcttatctttgtgactcgttctcgcagctggtcctttgttga2538

Query:487gcgccctgggttcttcttgggtcaccgccttcttcttgcgcaattggttgcaactcat 546
 |||
 Sbjc:2539gcgccctgggttcttcttgggtatcgccttcttctcgcgcaattggttgcgactcat2598

Query:547cgctgtctacgccaactgggactttgcaaggatcaagggaaatcgggtggggctgggctgg 606
 |||
 Sbjc:2599tgcgtgtgatgccaactggggatttgcaaggatcagtggaatcgggtggggctgggctgg2658

Query:607 tgt 609
 |||
 Sbjc:2659 tgt 2661

j)Sequenzanalyse Lls1 Gen

VektorsequenzGAATTCGAT

TCTGCTGGGACAAGGCCAAGGCTACCAAGCCTCCAATGTTGCCGAAAAGAGTTTCGATGA
 CCCGGCTTTCTCAACCGTGACGATCCAGAGGGACCTGTTCTATGGATATGACACGTTGAT
 GGAGAACGTCTCTGATCCCTCGCATATAGAATTTGCTCACCACAAGGTCCTGGGCGAAG
 AGATAGAGCCAAGCCTTTACCTTTCAAATGGAATCAAGTGGCGCTTGGGGATATTCAGG
 GGCAAATGCCGGTAATCCTCGCATCACTGCAACTTTGAGGCCCTTGCTATGCATTGAA
 CAAAATAGAGATTGACACAAAATTACCGATTGTGGGAGATCAGAAATGGGTGATATGGAT
 TTGCTCCTTCAACATCCCAATGGCCCCAGGGAAAACCTCGTTCTATTGTCTGCAGCGCTCG
 CAACTTTTTCCAGTTTACAATGCCAGGAAAGGCATGGTGGCAGTTTGTCCCTCGGTGGTA
 TGAACATTGGACCTCAAATTTGGTCTACGACGGTGATATGATTGTGCTTCAGGCCAAGAG
 AAGGTTTTCTGTCTGCATCCAAGGAGTCGTCTGCAGATGTTAATCAGCAGTACACGAAG
 CTCACTTTTACGCCCCACACAAGCCGACCGATTGTCTTGGCTTTCCGGGCATGGCTAAG
 GAATTTGGCAATAGCCAGCCTGACTGGTACGGAAGCCCTAGCCAAGATGCATTACCTTCT
 ACGGTCCCTTTCAAAGCGAGAGATGCTAGACAGATACGAGCAGCCACGCTGAAATGC

U77345. 1 Zea mays lethal leaf-spot 1 (lls1) mRNA, partia... 728 0.0
 AY093092.1 Arabidopsis thaliana lethal leaf-spot 1 hom... 70 7e-09

U77345.1 Zea mays lethal leaf-spot 1 (lls1) mRNA, partial cds.
 Length = 1683
 Score = 728 bits (367), Expect = 0.0
 Identities = 663/755 (87%), Gaps = 5/755 (0%)
 Strand = Plus / Plus

Query:24 accaagcctccaatggttgccgaaagagttcgatgacccggctttctcaaccgtgacgatc 83
 |||
 Sbjc:434 accaagcctccaatggttgccgaaagaatgtgaggacccggccttctccacgggtgacaatc 493

Query: 382ctgcagcctttattttctaactgtggtgcacgaaactttcgtttgcaagcccttgagatgc441
|||||
Sbjct: 663ctgcagcctttattttccaactgcggtgcacgcaactttcgtttgcaagcccttgagatgc722

Query: 442ttgaaaacttgatgtcaaatagattcatatggtagttgtcatcgtaaccgtgacggca501
|||||
Sbjct: 723ttgaaagcttagatgtaaaaattgattcttatggtagctgtcatcgtaacgtgatggca782

Query: 502 aagtggacaaagtgga 517
|||||
Sbjct: 783 aagtggacaaagtgga 798

II.) Sequenzanalyse Klonierung ScPMSR in pQE32 Vektor

Primer Fwd: PMSR30_bam 5'-CGGGATCCCC**ATG**TCCAGCACCGGCGCGGC-3'
 Primer Rev: PMSR30_sal 5'-GCGT**CGACTC**ACCCGTCAGCAAGGGGAGGGG-3'

>PMSR-QE32-pQEfor 18..901 of trace file

EcoRI *BamHI*
AGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACT**ATG**AGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCCC**ATG**TCC
 M R G S H H H H H H G I P M S
TCCAGCACCGGCGCGGGCGGGCCCGGACGCCGACGCGCCGGCCGGCGAGGGCTGGAGCTGGCCCAGTTCGGGG
 S S T G A A G P D A D A P A G E G L E L A Q F G
 CGGGCTGCTTCTGGAGCGTGGAGCTGGCGTACCAGCGGCTCCCCGGCGTGGCGCGCTCGGAGGTGGGCTACTC
 A G C F W S V E L A Y Q R L P G V A R S E V G Y S
 GCAGGGGCACCTCGACGGGCCGACCTACCGCGACGTCTGCGGGCGGGCCACCGGCCACCGGAGGTGGTGC GC
 Q G H L D G P T Y R D V C G G G T G H A E V V R
 GTGCACTACGACCCCAAGGAGTGCTCCTACGCCGTCCTCCTCGACGTCTTCTGGGCCAAGCACACCCACCA
 V H Y D P K E C S Y A V L L D V F W A K H N P T
 CGCTCAACAAGCAGGGCAACGACGTCGGGACGCAGTACCGGTTCGGGCATCTACTACTACACGG
 CGGAGCAGGA
 T L N K Q G N D V G T Q Y R S G I Y Y Y T A E Q E
 GCGGCAGGCTAGGGAGTCGCTGGCGGAGAAGCAGCAAGAATGGAAGGAGAAGATCGTGACGGAGGTCTCCCC
 R Q A R E S L A E K Q Q E W K E K I V T E V L P
 GCGAGGAAGTTCTACCCAGCCGAGGACTACCACCAGCAGTACCTCGAGAAGGGCGGCCAGCCC
 GCCAAGAAGC
 A R K F Y P A E D Y H Q Q Y L E K G G Q P A K K
 GCTGCTCCGACCCCATCCGCTGCTACGGT**TGA**AGCCACTGCCCCCCCTCCCTTGCTACGGGTGAGTCGACCTG
 R C S D P I R C Y G * *SalI*
 CAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTT

Q8LAX4	Q8LAX4	Protein-methionine-S-oxide reductase.	653	7.1e-63	1
Q9AY51	Q9AY51	Putative peptide methionine sulfoxide...	653	7.1e-63	1
MSRA_ARATH	P54150	Peptide methionine sulfoxide redu...	650	1.5e-62	1

>SWALL:Q8LAX4 Q8LAX4 Protein-methionine-S-oxide reductase.
 Length = 258 Score = 653 (234.9 bits), Identities = 123/185 (66%)

Qu: 4 SSTGAAGPDADAPAGEGLELAQFGAGCFWSVELAYQRLPGVARSEVGYSSQGHLDGPTYRD 183
 S+ A GPD D P+ G + AQFGAGCFW VELAYQR+PGV ++EVGYS G + P+Y D
 Sb:75 SAAIAQGPDDDPSS-GQQFAQFGAGCFWVELAYQRVPGVTKTEVGYSHGIVHNPSYED 133

Qu:184 VCGGGTGHAEVVRVHYDPKECSYAVLLDVFWAKHNPTTLNKQGNDVGTQYRSGIYYYYTAE 363
 VC G TGH EVVRV YDPKECS+ LLDVFW +H+PTTLN+QG DVGTQYRSGIYYYYT E
 Sb:134 VCTGTTGHNEVVRVQYDPKECSFESLLDVFWRHDPPTTLNRQGGDVGTQYRSGIYYYYTDE 193

Qu:364 QERQARESLAEKQQEWEKIVTEVLPARKFYPAEDYHQQYLEKGG-----QPAKKRCS DP 528
 QER ARE++ ++Q+ +KIVTE+LPA KFY AE+YHQQYL KGG Q A+K C DP
 Sb:194 QERIAAREVEKQQKILNKIVTEILPATKFYRAENYHQQYLAKGGRMGLRQSAEKGCKDP 253

Qu:529 IRCYG 543
 IRCYG
 Sb:254 IRCYG 258

III.) Sequenz Alignment für den Stammbaum von PMSR

```

Os_Q7XUP6 -----
Os_Q7XUP5 -----
Sc_PMSR -----
Os_Q9AY51 -----MS-WL 4
Ls_Q9SEC2 MFLLRRTTTATTTTPASLPLPLLSISSHLSLSKPSFPVSTKPLFTRLRHSSTPKIMS-WL59
At_Q9FKF7 -----MN-IL 4
At_Q9LY14 -----MN-IL 4
Gb_Q84L12 MLRSLALTTSSSSSLVAKPFFSFS-QASLTLS--APISLPPFPQTRR-SISLHTRPMN-IL55
At_Q8LAX4 MQVLVVSPPLIAAASLSKPLNSLS-KAALSFS-RAKPICFPFPQTSRRPISVYKSPMNNLF58
Bn_P54151 MLSIVASPPVISAVSLSKPLQSLA-KAALSLSKRAKPTSPFPKTAR-SISVYKSPMNNLF58
At_Q9LY15 -----MDSLKTQEPQVVETSP17
Le_P54153 -----
SyPCC6803_PZ2622 -----MGFFDLFGKKTAM13
AnPCC7120_Q8YWD8 -----MALFG-FGKKLAL12
Ec_P27110 -----SLFD----KKHL 8
Ec_Q9ZEQ8 -----MIANFD----KTQP10
Yp_Q8ZB94 -----MQNVD----NTAV 9
AnPCC7120_Q8YXZ4 -----MELK 4
Sc_P40029 -----MSSL 4
Fa_CAA9342 -----

Os_Q7XUP6 -----MS-DS--NPGAANPALGPDADAAAGEGLELAQFAAGCFWSVELTYQRLP--GV48
Os_Q7XUP5 -----MSNDTGADGGAANPDGPDADAAAGEGLELAQFAAGCFWSVELTYQRLP--GV51
Sc_PMSR -----MS-----STGAA----GPDADAPAGEGLELAQFGAGCFWSVELAYQRLP--GV42
Os_Q9AY51 GKLGLGGLGGSPRASAASAALAQQPDEDRPA-AGNEFAQFGAGCFWGVELAFQVRP--GV61
Ls_Q9SEC2 GRLGX-GTRTPADASMDQSSIAQGPDDDDIPA-PGQQFAQFGAGCFWGVELAFQVRP--GV 115
At_Q9FKF7 NKLGI-GSSRQ--TNMDPSPIAQVIDDEAPA-PGNQFTQFGAGCFWSVELAYQVRP--GV58
At_Q9LY14 NRLGL-GSSGQ--TNMDPSPIAQGNDDDDTPA-PGNQFAQFGAGCFWGVELAFQVRP--GV58
Gb_Q84L12 KSLGF-GANNKPTASMDNCAIAQGPEDDVPP-PGQQFAQFGAGCFWGVELAFQVRV--GI 111
At_Q8LAX4 NRLGF-GSRPQAQADPSSAAIAQGPDDDDVPS-SGQQFAQFGAGCFWGVELAYQVRP--GV 114
Bn_P54151 TRLGF-GSRPQDPD-AASSAIAQGPDDDDVPS-PGQQFAQFGAGCFWGAELAYQVRP--GV 113
At_Q9LY15 SPVAQEPQVADKPAIVPSPIAQEPDNDVPA-PGNEFAEFAAGCFWGVELAFQVRIP--GV74
Le_P54153 -----MEGNSSSKSTTNPALDPDLSDPQGLEFAQFAAGCFWGVELAFQVRG--GV51
SyPCC6803_PZ2622 VAPNEALPGRSATMPVPDKHFVNGNPLKAPFPQGMETALFGLGCFWGAERKFWQIP--GV71
AnPCC7120_Q8YWD8 TPTEKALPGRAQIMPVPANHYVNKNPLKPPFPDGFEEKALFGLGCFWGAERKFWQQQ--GV70
Ec_P27110 VSPADALPGRNTPMPVATLHAVNGHSMTN-VPDGMEIAIFAMGCFWVERLFWQLP--GV65
Ec_Q9ZEQ8 IGQSDALPGRRTTPMPVARLHVNVQHSMTN-VPDHMEVAIFAMGCFWVERLFWQQP--GV67
Yp_Q8ZB94 IDAANALPGRLTSSIPVSPPLHAVHGHSMTY-IPEGMDLAFFAMGCFWGAERLFWQQP--GV66
AnPCC7120_Q8YXZ4 IGSTEAP-----MEKATFGAGCFWGEAAFRKVK--GV35
Sc_P40029 ISKTIKYD-----PAKDKLITLACGCFWGTEHMYRKYLNDR141
Fa_CAA9342 -----MASSTNPSSGPRFRHSGKPGSPVCSIRGGLLLGSRAQVSASR--RR45
: * : . .

Os_Q7XUP6 ARTEVGYSQG-----HRHEPTYRDVCGGGTGHAEVVRVHYDPKACPYEVLDDVFWAKHN 102
Os_Q7XUP5 ARTEVGFSQG-----HHHEPTYDDVCGGQTGHAEVVRVHYDPKACPYGVLDDVFWAKHR 105
Sc_PMSR ARTEVGYSQG-----HLDGPTYRDVCGGGTGHAEVVRVHYDPKACPYAVLDDVFWAKHN96
Os_Q9AY51 TRTEVGYSQG-----NLHDPTYEDVCTGATYHNEVVRVHYDVSACKFDDLLDVFWARHD 115
Ls_Q9SEC2 SKTEVGYTQG-----FLHNPTYNDICSGTTNHSEVVRVQYDPKACSFDSLLDCFWERHD 169
At_Q9FKF7 TQTEVGYSQG-----ITHDPSYKDVCSGTTNHAIEIVRVQYDPKECSYQSLDLDFWSKHD 112
At_Q9LY14 TQTEAGYTQG-----TVDNPSYGDVCSGTTGHSEVVRVQYDLNDCITYESLDDLFWSRHD 112
Gb_Q84L12 TKTEVGYSQG-----FMHNPSYEDVCSGTTNHSEVVRVQYDPNECSYDTHLVFWARHD 165
At_Q8LAX4 TKTEVGYSHG-----IVHNPSYEDVCTGTTGHNEVVRVQYDPKECSFESLDDVFWNRHD 168
Bn_P54151 TKTEVGYSHG-----FVDNPTYEDVCSETTGHNEIVRVQYDPKEVSFESLDDVFWKRHD 167
At_Q9LY15 TVTEVGYTHG-----ISHNPSYEDVCTNNTNHAIEVVRVQYDPKECTYETLLDLFWSRHN 128
Le_P54153 VKTEVGYSQG-----NVHDPNYKLICSGTTEHAEAIRIQFDPNVCPYSNLLSLFWSRHD 105
SyPCC6803_PZ2622 YSTAVGYAAG-----YTPNPTYQEVCTGMTGHNEVVLVAFDPQVSYDQLLKVFWESHN 125
AnPCC7120_Q8YWD8 YSTAVGYAAG-----FTPNPTYDEVCTGLTGHNEVVLVVFDPKVISYQQLLKVFWESHN 124
Ec_P27110 YSTAAGYTGG-----YTPNPTYREVCSGDTGHAEAIVRYDPSVISYEQQLQVFWENHD 119
Ec_Q9ZEQ8 YSTASGYCGG-----YTPNPTYREVCTGKTGHAEAVRVVFDPAVVSYPQLLQVFWENHN 121
Yp_Q8ZB94 YSTAAGYSYG-----HTPNPTYHEVCSGRTGHAEVVRVVFDPAVISYQQLLQIFWENHD 120
AnPCC7120_Q8YXZ4 VSTSVGYMGG-----HFPNPCYLDVLSRTGHAEVVQIEYDPLVSYEDLLAVFWDIHD 89
Sc_P40029 VDCKVGYANGEESKKDSSVSYKRVCGGDTDAEVLQVSYNPKVITLRELTDFFFRIHD 101
Fa_CAA9342 DQDRGSLLP-----QRPRPELRASLRNHQPLRGGSSAPLRPASLLILRPTSRISWRHD 99
: : *

```


Os_Q7XUP6 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYYYYTAEQEKAARDSLAEKQK-----EWKERIVTEILPATRF 157
 Os_Q7XUP5 PTTLIRQGDVGTQYRSGIYYYYTAEQERVARESLAEKQE-----EWKEKIVTEILPARRF 160
 Sc_PMSR PTTLNKQGNVDVGTQYRAGIYYYYTAEQERQARESLEAKQQ-----EWKEKIVTEVLPKQV 151
 Os_Q9AY51 PTPPNRQGNVDVGTQYRSGIYYYYTPEQEKAARESLEKQK-----LLNRTIVTEILPAKRF 170
 Ls_Q9SEC2 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYFYNDPEQEKAARESLERHQQ-----KLNRVTVTEILPAKRF 224
 At_Q9FKF7 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYFYNDPEQEKAARESLERHQQ-----QVDRKVVTEILPAKRF 167
 At_Q9LY14 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYFYNDPEQEKAARESLERHQQ-----QMERKIMTEILPAKRF 167
 Gb_Q84L12 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYFYNDPEQEKAARESMKQK-----LLNRKIVTEILPARKF 220
 At_Q8LAX4 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYFYNDPEQEKAARESLERHQQ-----ILNKKIVTEILPATKF 223
 Bn_P54151 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYFYNDPEQEKAAREAMEKQK-----ILNRKIVTEILPATKF 222
 At_Q9LY15 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYFYNDPEQEKAARESLERHQQ-----KLEDKIVTEILPAKRF 183
 Le_P54153 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYFYNDPEQEKAARESLERHQQ-----FMDKKIVTEILPAKRF 161
 SyPCC6803_PZ2622 PTQGMRQGNVDVGTQYRSGIYTYSEAQQQAALASKQAYQQALQQAG-YGEITTEILPAPDF 184
 AnPCC7120_Q8YWD8 PTQGMRQGNVDVGTQYRSGIYVYSEAQKQLAEASRDAYQQALSSAG-YEKITTEILDAPEF 183
 Ec_P27110 PAQGMRQGNVDVGTQYRSGIYVYSEAQKQLAEASRDAYQQALSSAG-YEKITTEILDAPEF 179
 Ec_Q9ZEQ8 PAQGMRQGNVDVGTQYRSGIYVYSEAQKQLAEASRDAYQQALSSAG-YEKITTEILDAPEF 181
 Yp_Q8ZB94 PAQGMRQGNVDVGTQYRSGIYVYSEAQKQLAEASRDAYQQALSSAG-YEKITTEILDAPEF 180
 AnPCC7120_Q8YXZ4 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYVYSEAQKQLAEASRDAYQQALSSAG-YEKITTEILDAPEF 146
 Sc_P40029 PTTNSQGNVDVGTQYRSGIYVYSEAQKQLAEASRDAYQQALSSAG-YEKITTEILDAPEF 156
 Fa_CAA9342 PTTLNRQGNVDVGTQYRSGIYVYSEAQKQLAEASRDAYQQALSSAG-YEKITTEILDAPEF 154
 *: ** * . : . . : : :

Os_Q7XUP6 YPAE-EYHQRYLEKGG-----QSACKS-CNDPIRCYG--- 187
 Os_Q7XUP5 YPAE-EYHQRYLEKGG-----QSAQKG-CTDPIRRYG--- 190
 Sc_PMSR LPTRGTTTSKYLREGR-----PIRPRDPFSNPSPCYG--- 183
 Os_Q9AY51 YRAE-EYHQYLLAKGGRFGFRQSAEKG-CNDPIRCYG--- 205
 Ls_Q9SEC2 YRAE-EYHQYLLAKGGRFGFRQSTTEKG-CNDPIRCYG--- 259
 At_Q9FKF7 YRAE-EHHQYLLSKGGRFGFRQSTTEKG-CNDPIRCYG--- 202
 At_Q9LY14 YRAE-EHHQYLLSKGGRFGFRQSTTEKG-CNDPIRCYG--- 202
 Gb_Q84L12 YRAE-EYHQYLLAKGGRFGFRQSAEKG-CNDPIRCYG--- 255
 At_Q8LAX4 YRAE-NYHQYLLAKGGRMGLRQSAEKG-CKDPIRCYG--- 258
 Bn_P54151 YRAE-NYHQYLLAKGGRMGLRQSAEKG-CNDPIRCYG--- 257
 At_Q9LY15 YKAE-EYHQYLLVKGGMHGNAQSPAKS-CKDPIRCYG--- 218
 Le_P54153 YRAE-EYHQYLLAKGGRGCKQSAAKG-CNDPIRCYG--- 196
 SyPCC6803_PZ2622 YYAE-DYHQYLLAKNPNNGYCGLGGTNVACPIGTEVSLGA- 222
 AnPCC7120_Q8YWD8 YYAE-AYHQYLLAKNPNNGYCGLGGTNVACPIGTEVSLGA- 222
 Ec_P27110 YYAE-DDHQYLLHKNPNYGYCGIGGIGVCLPPEA----- 211
 Ec_Q9ZEQ8 YYAE-DEHQYLLHKNPNYGYCGIGGIGVCLPPEA----- 213
 Yp_Q8ZB94 YYAE-DDHQYLLHKNPNYGYCGIGGIGVCLPPEA----- 212
 AnPCC7120_Q8YXZ4 YLAT-EEHQYFQAKR----- 163
 Sc_P40029 YDAE-EYHQYLLDKNPQGYACPTHYLRM----- 184
 Fa_CAA9342 YRSE-EYHQYLLAKGGRGCKQSAEKG-CTDPIRCYG--- 188
 : . * : :

8. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. J. Feierabend für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung eines interessanten Themas und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

PD Dr. Thomas Berberich danke ich für die hervorragende Betreuung meiner Promotion und für seine Fähigkeit einen auch in frustrierenden Phasen wieder motivieren zu können. Ich freue mich nach wie vor darüber, daß mich seine Begeisterung für das Forschen und Leben in Japan angesteckt hat und er mich dabei unterstützt hat, daß ich zu einem zweimonatigen Forschungsaufenthalt nach Japan aufbrechen konnte.

Prof. Dr. Kusano und den Mitgliedern seines Arbeitskreises danke ich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die Unterstützung im Laboralltag während meines Aufenthalts in Japan im Sommer 2002. Dem Japanischen Bildungsministerium Mombukagakusho danke ich in diesem Zusammenhang für das mir zugeteilte Stipendium.

Ich danke den Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Feierabend, Dr. Matthias Schmidt, Stefan Schubert, Nicole Engel, Frank Badenhop, Loeki Hägar-Hogerland, Christel van Ojien und Regina Ennemann für die mir entgegengebrachte Hilfe. Ein besonderer Dank gilt Kerstin Pieper die mich nach meiner Diplomarbeit nun auch bei meiner Promotion begleitet und immer unterstützt hat. Connie Anken („Frau Lehrerin“) danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

In meinem privaten Umfeld möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Freunden Michaela Klinghammer (danke für die Lösung meiner Computerprobleme) und Bernd Seidendorf, sowie Christine & Frank Heeren mit Wanja dafür bedanken, daß sie mir das entgegenbringen was wirklich zählt.

Meiner „Badminton-Truppe“ (Frank Heeren, Christian Wiblishauser und Stefan Zech) danke ich für den regelmäßigen sportliche Ausgleich.

Ferner gilt mein aufrichtiger Dank Dr. Jäger und Dr. Legrum.

Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

9. Tabellarischer Lebenslauf

Name	Oliver In
Geburtsdatum	30. Dezember 1971
Geburtsort	Paderborn
Eltern	Peter und Gabriele In (geb. Kiersch)
Schulische Laufbahn	
1978-1980	Grundschule München
1980-1982	Grundschule Friedberg/Bayern
1982-1991	Rudolf-Diesel-Gymnasium Augsburg Abschluß: Abitur (LK Englisch & Erdkunde/Geschichte)
Wehrdienst	
Okt. 1991- Okt.1992	Santitätsakademie in München
Studium	
Okt. 1992- März 1998	Studium der Biologie an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main Diplomarbeit bei PD Dr. Ludwig-Müller Thema : Differentielle Genexpression während der Infektion von Chinakohl mit <i>Plasmodiophora brassicae</i> . Abschluß: Diplom-Biologe (Hauptfach : Botanik; Nebenfächer : Zoologie, Staats- und Umweltrecht
Juni 1997- März 1998	
Okt. 1998 - Jan. 2001	Wissenschaftliche Hilfskraft
ab Feb. 1999	Promotion im Ak Prof. Dr. Feierabend Thema: Differentielle Genexpression bei kältegehärteten Winterroggenblättern (<i>Secale cereale</i> L.)
Feb. 2001 - Juli 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Juni/August 2002	Forschungsaufenthalt an der Tohoku-Universität in Sendai/Japan