

**Zum Antioxidativen Verteidigungssystem bei
*Mesembryanthemum crystallinum***

INAUGURALDISSERTATION

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg**

2002

**vorgelegt von
Diplom-Biologe Markus Kiefer**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Markus Kiefer
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Zum Antioxidativen Verteidigungssystem
bei *Mesembryanthemum crystallinum*

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Rausch
Prof. Dr. Michael Wink

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Oxidativer Stress	1
1.1.1. Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies	1
1.1.2. Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies	4
1.2. Das antioxidative Verteidigungssystem	7
1.2.1. Nicht enzymatisch vermittelte Verteidigungsmechanismen	7
1.2.2. Enzymvermittelte antioxidative Abwehrmechanismen	12
1.3. Kohlenstoffwechsel bei <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	21
1.3.1. Der C ₃ -Metabolismus	21
1.3.2. Der Crassulaceen-Säurestoffwechsel	23
1.4. Fragestellung	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Pflanzenanzucht	27
2.2. Bezugsquellen	27
2.3. Verwendete Lösungen und Medien	29
2.3.1. Antibiotika und sonstige Zusätze	35
2.4. Methoden im Umgang mit <i>Escherichia coli</i>	36
2.4.1. Verwendete Bakterienstämme	36
2.4.2. Verwendete DNA-Vektoren	36
2.4.3. Bakterienanzucht und Bestimmung der Zelldichte	36
2.4.4. Anlegen von Langzeitkulturen	37
2.4.5. Herstellung elektrokompetenter Bakterien	37
2.4.6. Transformation	37
2.4.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	38
2.5. DNA-Techniken	38
2.5.1. Konzentrationsbestimmung von DNA-haltigen Lösungen	38
2.5.2. Fällung und Umsalzen von DNA	38
2.5.3. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	39
2.5.4. Isolierung genomischer DNA aus <i>M. crystallinum</i>	39
2.5.5. Reinigung von DNA durch Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation	39
2.5.6. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
2.5.7. Ligation von DNA	40
2.5.8. DNA-Gelelektrophorese	41

2.5.9. Polymerasekettenreaktion	42
2.5.10. Southern Blot	43
2.5.11. DNA-Sequenzierung	44
2.5.12. Durchmustern einer cDNA-Bank	44
2.5.13. RACE-Technik	46
2.5.14. Verwendete Primer	47
2.6. RNA-Techniken	48
2.6.1. Isolierung von Gesamt-RNA	48
2.6.2. Fällung von RNA	49
2.6.3. Konzentrationsbestimmung von RNA-haltigen Lösungen	49
2.6.4. RNA-Gelelektrophorese	49
2.6.5. Northern Blot	49
2.6.6. cDNA-Synthese und RT-PCR	50
2.6.7. <i>In vitro</i> -Transkription	51
2.6.8. Real Time PCR	52
2.7. Protein-Techniken	52
2.7.1. Präparation löslicher Proteine aus <i>M.crystallinum</i>	52
2.7.2. Fällung von Proteinen	53
2.7.3. Konzentrationbestimmung proteinhaltiger Lösungen	54
2.7.4. Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen	54
2.7.5. Western Blot	54
2.7.6. Reinigung eines Antiserums	55
2.8. Bestimmung von Thiolen	56
2.8.1. Probenvorbereitung für HPLC	56
2.8.2. Auftrennung und Quantifizierung mittels HPLC	57
2.9. Ballistische Transformation	57
2.10. Computergestützte Analysen	59
3. Ergebnisse	60
3.1. Klonierung der am antioxidativen Verteidigungssystem beteiligten Enzyme	60
3.1.1. Klonierung einer Glutathion Peroxidase cDNA	60
3.1.2. Klonierung eines Glutathion Peroxidase Gens	63
3.1.3. Klonierung einer Monodehydroascorbat Reduktase cDNA	66
3.1.4. Klonierung einer Glutathion Reduktase cDNA	68
3.1.5. Klonierung einer γ -Glutamylcystein Synthetase cDNA	71
3.1.6. Klonierung einer Glutathion Synthetase cDNA	74
3.2. Expressionsanalysen zu den Enzymen des antioxidativen Verteidigungs-	
systems	78
3.2.1. Expression der Cu/Zn-Superoxid Dismutase	78
3.2.2. Expression der Ascorbat Peroxidase	79

3.2.3.	Expression der Katalase	82
3.2.4.	Expression der Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase	82
3.2.5.	Expression der Monodehydroascorbat Reduktase	85
3.2.6.	Expression der Glutathion Reduktase	86
3.2.7.	Expression der γ -EC Synthetase	86
3.3.	Subzelluläre Lokalisierung einiger am antioxidativen Verteidigungssystem beteiligten Enzyme	87
3.3.1.	Subzelluläre Lokalisierung der chloroplastidären APX-Isoformen	87
3.3.2.	Subzelluläre Lokalisierung der Monodehydroascorbat Reduktase	88
3.4.	Thiolgehalt	91
4.	Diskussion	92
4.1.	cDNA-Sequenzen und Sequenzanalyse	92
4.1.1.	Glutathion Peroxidase	92
4.1.2.	Ascorbat Peroxidase	94
4.1.3.	Monodehydroascorbat Reduktase	95
4.1.4.	Glutathion Reduktase	95
4.1.5.	Enzyme der Glutathion-Biosynthese	96
4.2.	Expressionsanalysen	97
4.2.1.	Die Expression der Cu/Zn-Superoxid Dismutase ist im CAM-Zustand erhöht.	98
4.2.2.	Die Transkriptmenge der APX1 nimmt im CAM-Zustand ab.	99
4.2.3.	Die Expression der Katalase in <i>M. crystallinum</i> reagiert schwach auf oxidativen Stress	100
4.2.4.	Die Expression der Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase wird durch oxidativen Stress induziert	101
4.2.5.	Die Expression der Monodehydroascorbat Reduktase in <i>M. crystallinum</i> ist nicht durch oxidativen Stress reguliert.	102
4.2.6.	Die Expression der Glutathion Reduktase wird durch oxidativen Stress induziert.	103
4.2.7.	Die Biosynthese von Glutathion ist bei Pflanzen im CAM-Zustand erhöht, ohne daß die Transkriptmenge ansteigt.	103
4.2.8.	Verschiedene Ascorbat Peroxidase Isoformen reagieren unterschiedlich auf oxidativen Stress	104
5.	Ausblick	107
A.	Zusammenfassung	108
B.	Abkürzungen	109

C. Danksagung	114
Literaturverzeichnis	115

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projekts, daß sich die Untersuchung der Vorgänge im oxidativen Stressabwehrsystem der fakultativen CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* beim Übergang von der C₃-Photosynthese zum Crassulaceen-Säurestoffwechsel zur Aufgabe gemacht hat. Im folgenden soll eine Zusammenfassung über die Entstehung und die Abwehr oxidativen Stresses gegeben werden, sowie auf die metabolischen Besonderheiten von *Mesembryanthemum crystallinum* und die daraus resultierenden Folgen für die antioxidativen Verteidigungsmechanismen eingegangen werden.

1.1. Oxidativer Stress

1.1.1. Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Sauerstoff in jeder Form ist eine ausgesprochen reaktive Substanz. Seine Anwesenheit in der Atmosphäre stellt einerseits die Grundlage für zahlreiche metabolische Prozesse dar, die eben diese Reaktivität nutzen. Andererseits ist er dadurch jedoch auch eine ständige Gefahrenquelle für zelluläre Strukturen und Prozesse. Da in Pflanzenzellen eine große Zahl von Elektronentransportvorgängen ablaufen ist es unvermeidlich, daß durch Reduktion von molekularem Sauerstoff hochreaktive, giftige Sauerstoffspezies ("Reactive Oxygen Species", ROS) gebildet werden. Genannt werden müssen in diesem Zusammenhang freie Radikale wie das Superoxid-Radikalanion ($O_2^{\bullet-}$) und das Hydroxyl- oder Alkoxyradikal ($\bullet OH$ bzw. $RO\bullet$) ebenso, wie auch erheblich weniger reaktive Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und organische Peroxide (ROOR) und Hydroperoxide (ROOH). Ebenfalls sehr reaktiv sind Derivate des molekularen Sauerstoffs, wie der intrazellulär gebildete Singulett-Sauerstoff (1O_2) und das von außen auf die Pflanze einwirkende Ozon (O_3). Eine Erhöhung der Konzentration dieser Substanzen über das normale, durch physiologische Prozesse erklärbare Niveau kann durch verschiedene biotische und abiotische Stressfaktoren ausgelöst oder gefördert werden [2, 4, 8], entweder durch deren verstärkte Bildung oder die Hemmung ihres Abbaus. Als die schädlichsten reaktiven Sauerstoffspezies werden das Hydroxylradikal und Sauerstoff im Singulettzustand genannt [50, 73]. Die meisten anderen ROS, insbesondere H_2O_2 und $O_2^{\bullet-}$ werden selbst unter für die Pflanze optimalen Bedingungen in großen Mengen synthetisiert. Sie übernehmen Aufgaben bei der Synthese von Zellbestandteilen (Lignifizierung [62]), dienen als Signalmoleküle oder zur Pathogenabwehr und haben verglichen mit den beiden erstgenannten eine relativ hohe Lebensdauer, so daß

sie in substantiellen Konzentrationen in der Zelle vorliegen können. Ihre Toxizität erklärt sich vorwiegend durch die Tatsache, daß sie in der Lage sind Reaktionskaskaden auszulösen, die erst zur Bildung der eigentlich toxischen Verbindungen wie HO^\bullet oder Lipid(hydro)peroxiden führen. Dies muß durch ein effizientes antioxidatives zelluläres Verteidigungssystem (AOS) vermieden werden.

1.1.1.1. Molekularer Sauerstoff

Molekularer Sauerstoff im Grundzustand (Triplett-Sauerstoff) besitzt zwei einfach besetzte π^* -Orbitale, ist also als Biradikal zu bezeichnen. Die ungepaarten Elektronen besitzen parallelen Spin, so daß nach der Wignerschen Spinauswahlregel Reaktionen mit den im Singulettzustand befindlichen organischen Molekülen der Zellbestandteile ohne weitere Aktivierung verboten sind. Diese kinetische Hemmung sorgt dafür, daß Sauerstoff im Grundzustand sich im Vergleich zu den sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) relativ wenig reaktionsfreudig verhält. Jede Änderung dieser Anordnung der äußeren Elektronen führt dagegen zu deutlich reaktiveren Substanzen [41]. Durch eine Energieübertragung ausgehend von lichtangeregten Molekülen, wie Chlorophyll im Triplett-Zustand ($^3\text{chl}^*$) am Photosystem II der Chloroplasten [97], läßt sich zum Beispiel der erste elektronisch angeregte Zustand des Sauerstoffs erreichen, dessen Anregungsenergie nur 94 kJ/mol beträgt. Man erhält Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), für den keine kinetische Hemmung mehr existiert, so daß Reaktionen mit organischen Molekülen leicht ablaufen können.

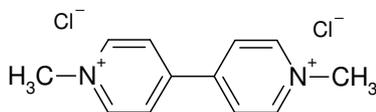


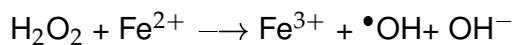
Abb. 1.1.: Strukturformel des radikalbildenden Herbizids Paraquat (Methylviologen)

Das selbe gilt für das Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), bei dem eines der beiden π^* -Orbitale mit einem weiteren Elektron besetzt ist. Es geht durch Reduktion aus dem Sauerstoff-Biradikal hervor ($\text{O}_2 + e^- \longrightarrow \text{O}_2^{\bullet-}$), ein Vorgang der auf der reduzierenden Seite des Photosystems I oder an den Elektronentransportketten der Mitochondrien stattfinden kann. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die sogenannte Mehler-Reaktion [103], die auch pseudo-zyklischer Elektronentransport genannt wird. Hier werden, vor allem dann, wenn die Verfügbarkeit von NADP wegen z.B. geringer interner CO_2 -Konzentration hinter geschlossenen Stomata und gleichzeitiger hoher Lichtintensität eingeschränkt ist, die Elektronen von reduziertem Ferredoxin (Fd_{red}) direkt auf Sauerstoff übertragen ($\text{O}_2 + \text{Fd}_{red} \longrightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + \text{Fd}_{ox}$). Die Wirkung des Herbizids Paraquat (Methylviologen, s. Abb. 1.1) beruht ebenfalls auf einer Vermittlung dieser Reduktion, da dieses sehr leicht durch die Enzymausstattung der Zelle (von den chloroplastidären Photosystemen und Cytochrom P450c Reduktasen bis zu Glutathionreduktasen) in ein Radikal überführt werden kann und die Radikalfunktion in der Folge z.B. an molekularen Sauerstoff weitergeben kann.

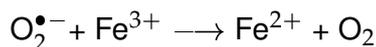
Ein weiteres Derivat des Sauerstoffs, das eine oxidative Schädigung der Pflanze verursachen kann, ist das Ozon (O_3), das von außen als Umweltgift auf die Pflanze einwirkt. Es kann oxidative Schäden durch Ozonolyse zelleigener Moleküle und die Bildung weiterer ROS hervorrufen.

1.1.1.2. Die Fenton-Reaktion

Die Fenton-Reaktion kann bei Anwesenheit von verfügbaren Eisen(II)-Ionen zu einer Quelle von Hydroxylradikalen werden. Bei einer Redox-Reaktion vom Fenton-Typ wird Wasserstoffperoxid nach folgender Reaktionsgleichung durch ein zweiwertiges Eisenion zu einem Hydroxylradikal und einem Hydroxylion umgesetzt.



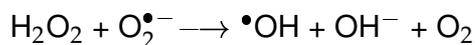
Eisen(II)-Ionen können durch vorgeschaltete Redoxprozesse wie den folgenden erst generiert bzw. regeneriert werden:



Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer superoxidassistierten Fenton-Reaktion [12]. Die Synthese von $O_2^{\bullet -}$ aus Triplett-Sauerstoff dient so indirekt als Triebkraft für die Entstehung von $\bullet OH$.

1.1.1.3. Die Haber-Weiss-Reaktion

In der metallionenkatalysierten Haber-Weiss-Reaktion wird Wasserstoffperoxid mit Superoxidradikalen zum Hydroxylradikal umgesetzt [12]. Häufig wird sie beispielsweise durch Eisenionen katalysiert. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab, wobei Fe^{3+} zuerst durch $O_2^{\bullet -}$ reduziert, danach durch H_2O_2 wieder oxidiert wird.



1.1.1.4. Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht vor allem durch Superoxid Dismutasen (SOD) enzymatisch katalysiert durch Disproportionierung zweier Superoxidradikalanionen (s. Abschn. 1.1.2.3). Dieser Vorgang kann auch spontan ablaufen, was jedoch im Vergleich zur durch die SOD-Reaktion synthetisierten Menge zu vernachlässigen ist. Unter physiologischen Bedingungen entsteht H_2O_2 aber auch als Nebenprodukt zahlreicher Oxidationsreaktionen vorrangig in den Peroxisomen [114].

1.1.2. Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Lage mit praktisch allen Zellbestandteilen chemische und physikochemische Reaktionen einzugehen. Je nach Bildungsort der ROS, Art des Reaktionspartners und Kapazität eventueller Reparaturmechanismen kann dies zu strukturellen und funktionellen Störungen der Zelle bis hin zum Zelltod führen. Die wichtigsten bei Oxidationsprozessen auftretenden Schäden sind:

1. DNA-Schäden durch Strangbrüche und Modifikation von Basen

Durch die Wirkung von ROS kann es nicht nur zum Bruch von DNA-Strängen kommen, sondern auch zur Modifikation der Basen selbst. Durch einen Angriff des Hydroxylradikals am Kohlenstoffatom 8 von Guanidin kommt es zum Beispiel zur Bildung von 8-oxo-Guanidin (s. Abb. 1.2), einem der häufigsten Oxidationsprodukte in geschädigter DNA, das die Transversion eines G/C- zu einem T/A-Basenpaar fördert [104]. Bei der Bewertung oxidativer DNA-Schäden spielt, wie bei allen mutagenen Prozessen nicht zuletzt auch eine maßgebliche Rolle, inwieweit die zelleigenen Schutz- und Reparaturmechanismen entstandene Schäden erkennen und beheben können.

2. Inaktivierung von Proteinen durch Modifikation von Aminosäuren

Insbesondere die Aminosäuren Cystein, Histidin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin sind aufgrund der Art ihrer funktionellen Gruppen besonders anfällig für oxidative Schädigung. Die Anfälligkeit eines Proteins für Inaktivierung unter Bedingungen des oxidativen Stresses hängt somit stark von seiner Aminosäurezusammensetzung und Struktur ab, da sie durch Vorhandensein und sterische Zugänglichkeit dieser Aminosäuren gefördert wird. Besonders gefährdet sind natürlich Proteine, deren Funktion oder Struktur von ihrem Redoxzustand (Cystein, Disulfidbrücken) abhängig sind und solche, die für Modifikation anfällige Aminosäuren im reaktiven Zentrum tragen.

3. Veränderung von Membraneigenschaften durch Lipidperoxidation und ihre Folge-reaktionen

Membranphospholipide sind durch das Vorhandensein mehrfach ungesättigter Fettsäurereste durch Oxidanzien angreifbar. Es kommt zur Lipidperoxidation, wobei über radikalische Zwischenstufen Lipidperoxide und -hydroperoxide gebildet werden. Insbesondere die bei der Peroxidation auftretende Verbrückung von Fettsäuren kann die Membraneigenschaften empfindlich stören. Weitere Produkte oxidativer Prozesse an Lipiden sind Aldehyde, deren chemische Eigenschaften weitere schädliche Reaktionen mit Proteinen DNA und RNA ermöglichen.

1.1.2.1. Sauerstoff im Singulettzustand

Singulett-Sauerstoff ist der niedrigste elektronische Anregungszustand des molekularen Sauerstoffs. Seine Anregungsenergie beträgt nur 0.98 eV, was jedoch als Aktivierungsenergie für zellschädigende Oxidationsprozesse ausreichend sein kann. In der Gasphase ist Singulett-Sauerstoff relativ stabil; hier beträgt die mittlere Lebensdauer eines angeregten O_2 -Moleküls ca. fünfundvierzig Minuten. In wässriger Lösung, wie zum Beispiel am hauptsächlichsten Entstehungsort des Singulett-Sauerstoffs in pflanzlichen Zellen, dem Chloroplasten, wird die Anregungsenergie mit sehr hoher Geschwindigkeit an Wasser abgegeben. Die Lebensdauer für den $^1\Sigma_g^+O_2$ -Zustand beträgt hier nur 10^{-11} Sekunden, was nahelegt, daß der $^1\Delta_g^+O_2$ -Zustand, dessen mittlere Lebensdauer immerhin 2×10^{-6} Sekunden beträgt für den schädlichen Einfluß angeregten Sauerstoffs auf biologisches Material verantwortlich ist [7]. Die Reaktionsrate des Singulett-Sauerstoffs mit Zellbestandteilen ist praktisch diffusionskontrolliert (ca. $10^8 M^{-1} s^{-1}$ [7]), was bedeutet, daß er direkt am Ort seiner Entstehung abreagiert, sei es durch Energieübertragung auf Wasser oder Interaktion mit Biomolekülen. Verteidigungsmechanismen können deshalb nicht gegen Singulett-Sauerstoff direkt wirksam sein, sondern nur verhindern, daß sich der durch diese ROS angerichtete Schaden fortpflanzt.

1.1.2.2. Das Hydroxylradikal

Das Hydroxylradikal ($\bullet OH$) ist ebenso wie 1O_2 (s. Abschn. 1.1.2.1) eine extrem reaktive Spezies, die ebenfalls mit nahezu diffusionskontrollierter Rate mit jeglicher Komponente der Pflanzenzelle zu reagieren in der Lage ist. Zwar läuft die spontane Radikalrekombination zu Wasserstoffperoxid nach der Gleichung $2\bullet OH \longrightarrow H_2O_2$ ebenfalls sehr schnell ab, da jedoch praktisch jeder Reaktionspartner in höherer Konzentration vorliegt als das Hydroxylradikal selbst, wird dessen Lebensdauer (ca. 10^{-7} Sekunden) vorwiegend durch seine Interaktion mit Zellbestandteilen bestimmt. Es richtet Schaden also sofort am Ort seiner Entstehung an. Dies macht es, zieht man außerdem in Betracht, daß es leicht durch Redoxkaskaden aus anderen ROS gebildet werden kann, zu einer außergewöhnlich cytotoxischen Substanz.

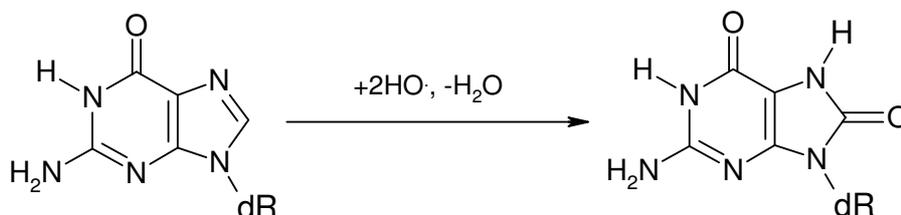


Abb. 1.2.: Oxidation von Guanin zu 8-oxoguanin durch $\bullet OH$

1.1.2.3. Das Superoxidradikalanion

Die Gefahr, die für die Pflanzenzelle vom Superoxidradikal ausgeht ist geringer einzu-
stufen als die, die von $^1\text{O}_2$ und $\bullet\text{OH}$ ausgeht. Eine direkte Reaktion mit Zellbestandteilen
ist zwar möglich, so wurde unter anderem gezeigt, daß $\text{O}_2^{\bullet-}$ in der Lage ist Ribonukleo-
tioxidoreduktasen zu inaktivieren [56], jedoch findet dies in der Regel nur langsam und
mit geringer Effizienz statt. Die mittlere Lebensdauer von $\text{O}_2^{\bullet-}$ ist mit $50 \mu\text{s}$ relativ lang
im Vergleich zu hochreaktiven Substanzen wie $\bullet\text{OH}$ (s. Abschn. 1.1.2.2) und $^1\text{O}_2$ (s. Ab-
schn. 1.1.2.1). Dies beruht zum einen auf der Tatsache, daß für den Hauptabbauweg des
Superoxids, die Disproportionierung nach der Gleichung $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
eine pH-Abhängigkeit besteht. Das pH-Optimum für die spontane Disproportionierungs-
reaktion des Superoxidradikals liegt bei pH 4,8, dem pK_s -Wert des Superoxids. Unter
diesen Bedingungen läuft der Superoxidabbau mit $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ab, während Abweichun-
gen zu höheren oder niedrigeren pH-Werten eine um ein bis zwei Größenordnungen
geringere Reaktionsrate zur Folge haben [7]. Zum anderen tritt die spontane Dispropor-
tionierung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ in ihrer Bedeutung zurück gegenüber der durch die Superoxid Dis-
mutase vermittelten katalytischen Disproportionierung, die die Konzentration an freien
Superoxidradikalen zum Beispiel im Chloroplasten auf unter 3 nM hält.

1.1.2.4. Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid stellt im Vergleich mit $\bullet\text{OH}$ und $^1\text{O}_2$ eine geringere Gefahr für die Zel-
le dar, obwohl für einige wenige Enzymklassen eine direkte Inaktivierung durch physio-
logische Konzentrationen von H_2O_2 nachgewiesen ist [22]. Weder Lipide noch DNA zei-
gen jedoch nach Inkubation mit H_2O_2 Oxidationsschäden [60]. Die Hauptgefahr, die von
erhöhten H_2O_2 -Konzentrationen ausgeht, ist die Oxidation von Thiolgruppen zu Disul-
fidbrücken, was sich auf die Funktion thiolregulierte Enzyme schädlich auswirken kann
[78]. Dieses Problem tritt vor allem in Chloroplasten auf, wo die Akkumulationsrate von
Wasserstoffperoxid, bedingt durch die Photoreduktion von molekularem Sauerstoff und
ihre Folgereaktionen bis zu $240 \mu\text{M s}^{-1}$ betragen kann. In diesem Fall inhibiert H_2O_2 die
Photosynthese und muß deshalb ebenso schnell entgiftet werden [6]. Es hat eine hohe
Halbwertszeit, die vorwiegend durch seinen enzymatischen Abbau durch Katalase und
Peroxidasen [112] bestimmt ist. Es ist sehr gut wasserlöslich und membranpermeabel.
Die Hauptgefahr, die von Wasserstoffperoxid ausgeht ist indirekter Natur, da H_2O_2 nach
der Fenton- (s. Abschn. 1.1.1.2) oder Haber-Weiss-Reaktion (s. Abschn. 1.1.1.3) zu stark
toxischen Hydroxylradikalen umgesetzt werden kann. Im Gegensatz zu den reaktiveren
Sauerstoffspezies wie $\bullet\text{OH}$ und $^1\text{O}_2$ erfüllt H_2O_2 jedoch auch physiologisch bedeutsame
Aufgaben. Zum einen in der hypersensitiven Reaktion während der pflanzlichen Patho-
genabwehr, wobei $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 durch sukzessive Einelektronenreduktion von mole-
kularem Sauerstoff, katalysiert durch NADPH Oxidase gebildet werden [41, 124, 131].
Zum anderen ist Wasserstoffperoxid an Signalmechanismen beteiligt, die zur Reaktion

auf Stressfaktoren unabdingbar sind [52]. Dies schließt den Signaltransduktionsweg, der zur Induktion von „pathogenrelated proteins“, der hypersensitiven Reaktion und dem programmierten Zelltod führt mit ein, bezieht sich aber darüberhinaus auch auf jede Form von abiotischem Stress, der sich auf die Redoxbalance der Zelle auswirkt.

1.2. Das antioxidative Verteidigungssystem

1.2.1. Nicht enzymatisch vermittelte Verteidigungsmechanismen

Die nicht enzymatisch vermittelten Verteidigungsmechanismen der Zelle gegen oxidative Schädigung beruhen auf der Reaktion von Antioxidantien mit reaktiven sauerstoffspezies. Als Antioxidans bezeichnet man jede Verbindung, die in der Lage ist eine chemische Reaktion mit ROS einzugehen, ohne dabei selbst in eine hochreaktive Verbindung überführt zu werden. Durch solche Reaktionen werden die Kaskaden von unkontrollierten Redoxprozessen die zu einem Anstieg der Konzentrationen an gefährlichen ROS führen abgebrochen. Aus Tab. 1.1 läßt sich ablesen, daß sowohl Monodehydroascorbat als auch GSH mit den gefährlichsten ROS, dem Hydroxylradikal, den Alkoxyradikalen und den Alkylperoxyradikalen Redoxreaktionen eingehen und somit als Antioxidantien wirken können.

Redoxpaar	$E^{0'}$ /mV
$\bullet\text{OH}, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$	+2310
$\text{RO}\bullet, \text{H}^+/\text{ROH}$	+1600
$\text{ROO}\bullet, \text{H}^+/\text{ROOH}$	+1000
$\text{GS}\bullet/\text{GS}^-$	+920
$\text{H}_2\text{O}_2, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}, \bullet\text{OH}$	+320
$\text{MDHA}\bullet^-, \text{H}^+/\text{AsA}^-$	+282
$\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$	-330

Tab. 1.1.: Redoxpotentiale einiger ROS und Antioxidantien nach [25]; hohe positive Redoxpotentiale können als Anhaltspunkt für die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Oxidationsreaktionen mit Zellkomponenten verwendet werden, aus der Reihenfolge der aufgeführten Redoxpaare läßt sich ersehen, welche Verbindung bezüglich welcher Antioxidanzwirkung ausüben kann.

1.2.1.1. Ascorbinsäure

Ascorbat kann in Pflanzen bis zu millimolaren Konzentrationen (0,6 mM in der Vakuole, 20-50 mM in Chloroplasten [49]) akkumulieren. Es kann bis zu 10% der löslichen Kohlenhydrate ausmachen und ist ein wichtiges primäres Antioxidanz, das in der Lage ist direkt mit Superoxid, Hydroxylradikalen, Singulett-Sauerstoff und Ozon zu reagieren

[117, 26]. So wurde gezeigt, daß niedrigere Ascorbatkonzentrationen zu erhöhter Schädigung durch Ozon im Zellwandbereich führen [108]. Außerdem fungiert Ascorbat als sekundäres Antioxidanz, da es oxidiertes α -Tocopherol zu regenerieren vermag und somit auch einen wichtigen Beitrag zur Abwehr von oxidativer Schädigung in nichtwässrigen Bereichen der Zelle leistet[119].

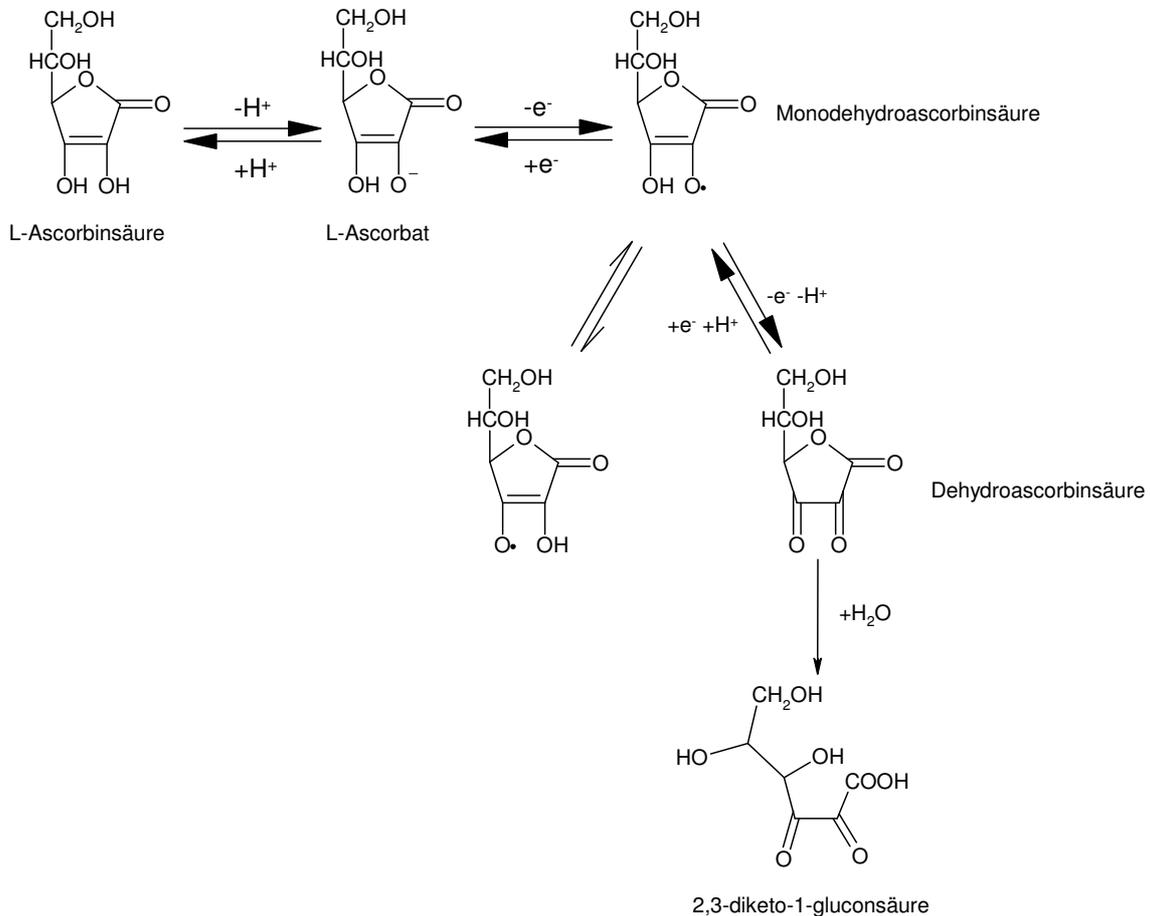


Abb. 1.3.: L-Ascorbat und seine Oxidationsprodukte nach [158]

Sekundär ist Ascorbat auch an der nicht-photochemischen Löschung überschüssiger Excitonenenergie im Chloroplasten beteiligt, da es als Reduktionsmittel im Zeaxanthin-Zyklus benötigt wird. Bei erhöhter Anregung des Photosystems I setzt die Deepoxidase Violaxanthin ascorbatabhängig zum Monoepoxid Antheraxanthin und weiter zu Zeaxanthin um. Dieses kann überschüssige Excitonenenergie als Wärme unschädlich machen und so den Photosyntheseapparat vor oxidativer Schädigung durch 1O_2 schützen. Jede der beiden Deepoxidierungsreaktionen verbraucht zwei Elektronen; für die Bildung eines Moleküls Zeaxanthin werden also zwei Moleküle Ascorbat zu Dehydroascorbat oxidiert. Bei geringer werdender Anregung des Photosystems I wird der Prozess unter NADPH-Verbrauch durch eine Expoxidase rückgängig gemacht. Die Regulation der beiden Enzyme erfolgt wahrscheinlich mittels des pH-Gradienten über der Thylakoidmem-

bran [36]. Weitere Aufgaben des Ascorbats sind die Regulation der Photosynthese [47] und des Zellzyklus [84] und seine Funktion als Reduktionsmittel bei der Extensinbiosynthese [93].

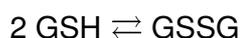
Die Ascorbat-Biosynthese wurde erst in jüngerer Zeit aufgeklärt [138, 137]. Der Syntheseweg verläuft ausgehend von L-Galactose über GDP-Mannose und GDP-L-Galactose. Möglicherweise existiert in Pflanzen jedoch mehr als ein Syntheseweg für diese Verbindung [30]. Jedenfalls wird Ascorbat sowohl in photosynthetisch aktivem als auch in inaktivem Gewebe gebildet.

Das Redoxsystem der Ascorbinsäure (s. Abb. 1.3) besteht aus Ascorbat selbst, dem radikalischen Monodehydroascorbat (MDHA) und dem noch weiter oxidierten Dehydroascorbat (DHA). Letzteres wird, wenn es nicht schnell wieder in Ascorbat rücküberführt wird, sei es enzymatisch durch die Dehydroascorbatreduktase (DHAR) oder chemisch durch Glutathion, dem Ascorbatvorrat der Zelle entzogen, indem es über 2,3-diketo-4-gluconsäure und α -ketoaldehyd zu C₂- und C₄-Körpern, wie Tartrat und Oxalat abgebaut wird.

Monodehydroascorbat ist, wie auch Dehydroascorbat, in wässriger Lösung instabil [118] und kommt aufgrund seines äußerst niedrigen pK_s-Werts von -0,45 bei physiologischen pH-Werten nur anionisch vor. Das Monodehydroascorbat-Radikal ist in der Lage spontan zu Ascorbat und Dehydroascorbat zu disproportionieren und seine mittlere Lebensdauer liegt in etwa im selben Bereich wie die von O₂^{•-}. Trotz seiner radikalischen Natur ist Monodehydroascorbat jedoch nicht reaktiv genug durch Reaktion mit Zellbestandteilen Schaden anzurichten, da die Radikalfunktion mesomer stabilisiert werden kann.

1.2.1.2. Glutathion

Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist neben Ascorbat das wichtigste Antioxidanz im Pflanzen und Tierreich. Es ist reversibel in seine oxidierte, dimere Form überführbar:



Der pK_s-Wert des reduzierten Glutathions liegt bei 9,2, so daß es in wässriger Lösung meist deprotoniert vorliegt. Außer der verbreitetsten Form, γ -Glu-Cys-Gly, kommen in einigen Pflanzenarten auch modifizierte Glutathione wie das Homoglutathion (γ -Glu-Cys- β -Ala) oder das Hydroxymethylglutathion (γ -Glu-Cys-Ser) vor [86, 87]. Die Aufgaben des Glutathions im pflanzlichen Metabolismus sind vielfältig und beschränken sich nicht auf die Rolle im Antioxidativen Verteidigungssystem:

- Speicherung reduzierten Schwefels: Glutathion kommt in relativ hohen Konzentrationen in Pflanzenzellen vor und der Großteil des in Pflanzen vorhandenen reduzierten Schwefels liegt in Form von GSH (und GSSG) vor. Außerdem stellt Glutathion die Haupttransportform des Schwefels in Pflanzen dar [123]. Dieser Schwefelvorrat kann durch Abbau von Glutathion bei Bedarf für Synthesaufgaben mobilisiert werden [141].

- Regulation der Schwefelaufnahme und Kontrolle der ATP-Sulfurylase-Aktivität in der Wurzel [66, 91]
- Xenobiotika-Detoxifikation: Durch Glutathion-S-Transferasen (GST) wird Glutathion auf zahlreiche, insbesondere elektrophile Xenobiotika-Klassen übertragen und dient der Detoxifikation bzw. Sequestration derselben [39]. Glutathion-S-Transferasen sind eine sehr vielfältige Gruppe von Enzymen, die aus mehreren Klassen besteht und ubiquitär bei allen aerob lebenden Organismen vorkommt. Ihnen kommt große Bedeutung im Zusammenhang mit Herbizidresistenzen bei Nutzpflanzen zu [148]. In den meisten Fällen katalysieren sie Substitutionsreaktionen vom S_N -Typ, nach dem Schema $R-X + GSH \longrightarrow H-X + GS-R$. GSTs zeigen jedoch eine große Zahl anderer Aktivitäten, darunter zum Beispiel auch Konjugationsreaktionen nach einem additiven Mechanismus und glutathionabhängige Peroxidaseaktivität [17].
- Kontrolle der Schwermetallhomöostase bzw. Schwermetallentgiftung: Durch Phytochelatin Synthase (PCS) werden mehrere Glutathioneinheiten verkettet um Phytochelatine zu bilden. Diese sind wirkungsvolle Chelatbildner und gehen Komplexe mit Schwermetallionen ein, die so dem pflanzlichen Metabolismus entzogen werden [59]. Dieser Mechanismus ist eine Besonderheit des Pflanzenreichs, da diese Funktion im Tierreich fast ausschließlich von den bei Pflanzen ebenfalls vorhandenen Metallothioneinen, cysteinreichen Genprodukten, übernommen wird.
- Detoxifikation von Formaldehyd: Formaldehyd tritt sowohl endogen als Stoffwechselprodukt, als auch als externe Schadsubstanz auf. Vermittelt durch Formaldehyddehydrogenasen (FDH) wird H_2CO in zwei Schritten zu Ameisensäure oxidiert. Der erste Schritt beinhaltet die spontane Bildung von S-hydroxymethylglutathion, das dann durch FDH zu S-formylglutathion umgesetzt wird. Im zweiten Schritt vollzieht sich vermittelt durch das Enzym Formylglutathionhydrolase die Rückgewinnung reduzierten Glutathions und die Freisetzung von $HCOOH$ [39, 45].
- Detoxifikation von Methylglyoxal: Methylglyoxal ist ein toxisches Nebenprodukt des Triosephosphatstoffwechsels, das auf einem ähnlichen Weg detoxifiziert wird wie Formaldehyd. Die Entgiftung vollzieht sich über ein ebenfalls spontan gebildetes Glutathion-Hemithioacetal, das danach unter Beteiligung der Enzyme Glyoxalase I und II unter Regeneration von GSH zu Milchsäure abgebaut wird [39].
- Antioxidanz und Redoxpuffer: Unter normalen Bedingungen liegt Glutathion zum überwiegenden Teil in der reduzierten Form vor [52], was maßgeblich dazu beiträgt ein reduzierendes Milieu im Zellinneren aufrecht zu erhalten. GSH kann mit den toxischeren ROS Redoxreaktionen eingehen [25] und wird dabei selbst zu einer für die Zelle ungefährlichen Verbindung umgesetzt. Redoxreaktionen mit GSH kön-

nen als Ein- oder Zweielektronenübertragungen stattfinden. Als Zwischenprodukte können entsprechend Glutathylradikale (GS^\bullet) oder Glutathionkationen (i.d.R. in der Form $\text{GSOH} + \text{H}^+$) auftreten, die sich in der Folge zum oxidierten Glutathiondimer GSSG stabilisieren.

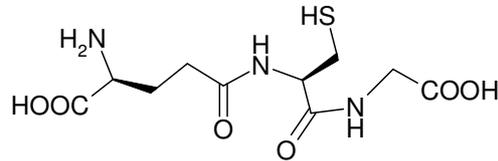


Abb. 1.4.: Glutathion, γ -Glu-Cys-Gly, reduzierte Form (GSH)

Die Biosynthese des Glutathions verläuft in zwei ATP-abhängigen Schritten, die durch die γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS) und die Glutathion-Synthetase (GS) katalysiert werden. Im ersten Schritt wird aus L-Glutamat und L-Cystein γ -Glutamylcystein (γ -EC) gebildet, im abschließenden Schritt wird die zweite Peptidbindung zum Glycin hergestellt (s. Abb. 1.5). Bei Spezies, die modifizierte Glutathionderivate enthalten spiegelt auch die enzymatische Ausstattung diese Besonderheit wieder, indem die GS z.B. durch Homoglutathionsynthetase ersetzt oder ergänzt ist. In den meisten Fällen nimmt die Glutathionkonzentration unter Stressbedingungen aller Art zu [98, 100, 133, 139], es gibt jedoch auch Berichte, daß das Gegenteil der Fall ist [53, 92]. Ein fundamentaler Regulationsmechanismus der GSH-Biosynthese scheint die Hemmung der γ -Glutamylcystein-synthetase durch reduziertes Glutathion zu sein [63]. Die erste Reaktion des Synthesewegs scheint auch der limitierende Schritt zu sein, während die Glutathionsynthetase keine Rolle bei der Regulation spielt [53, 144]. Ein weiterer für die Aufrechterhaltung der Glutathionbiosynthese wichtiger Faktor ist die Verfügbarkeit von Glycin und Serin, deren Synthese von der Photorespiration abhängig ist. Damit ist auch die Synthese des Glutathions letztlich lichtabhängig, was sich auch in höheren GSH-Konzentrationen im Licht niederschlägt [16, 118].

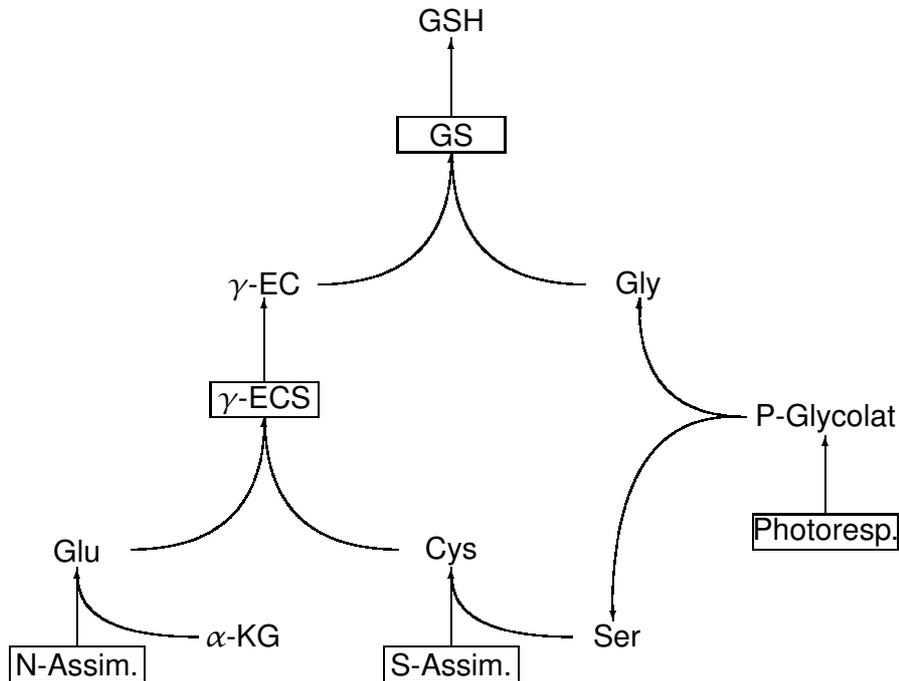


Abb. 1.5.: Schematische Darstellung der Glutathion-Biosynthese. (α -KG = α -Ketoglutarat, Cys = Cystein, γ -EC = γ -Glutamylcystein, Glu = Glutamat, Gly = Glycin, GSH = reduzierte Form des Glutathions, N-Assim. = Stickstoffassimilation, P-Glycolat = Phosphoglycolat, Photoresp. = Photorespiration, S-Assim. = Schwefelassimilation, Ser = Serin)

1.2.2. Enzymvermittelte antioxidative Abwehrmechanismen

Die antioxidative Stressabwehr erfordert das Zusammenspiel einer ganzen Reihe verschiedener Enzyme. Die Aufgaben, die jeweils von diesen wahrgenommen werden, kann man grob in zwei Bereiche aufteilen:

1. Abwehr
2. Regeneration

Unter den Bereich „Abwehr“ fällt die Katalyse all jener Reaktionen, die direkt die Umsetzung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies beinhalten, „Regeneration“ umfasst alle Reaktionen, die dazu dienen, verbrauchte Antioxidantien und Cosubstrate wieder in funktionsfähigen Zustand zu versetzen bzw. deren Abbau zu verhindern. Als dritter Bereich wäre schließlich noch „Reparatur“ anzuführen, um alle Enzymsysteme zusammenzufassen, die für Erkennung und Reparatur oxidativer Schäden zuständig sind, bzw. mit der Neusynthese geschädigter Verbindungen wie z.B. Phospholipiden. Enzyme, deren Aufgabe die Entgiftung von ROS ist sind Katalase, Peroxidasen und Superoxid Dismuta-

sen. Regenerative Enzyme sind Monodehydroascorbat- und Dehydroascorbatreduktase und Glutathionreduktase sowie die Enzyme der Biosynthesewege der Antioxidantien. Die Enzyme aus dem Bereich „Abwehr“ verwenden als Substrate nur diejenigen reaktiven Sauerstoffspezies, deren durchschnittliche Lebenszeit und Reaktivität die Teilnahme an einer enzymatischen Reaktion überhaupt möglich macht, nämlich Superoxid, Wasserstoffperoxid und die Alkoyl- und Alkylperoxy-Radikale. Es gibt keinen enzymatischen Mechanismus, der die direkte Abwehr von $^1\text{O}_2$, $\bullet\text{OH}$ oder O_3 ermöglicht. Eine Sonderstellung unter den AOS-Enzymen nimmt die Katalase ein, die auf Peroxisomen beschränkt ist und dort die Disproportionierung von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff nach der Gleichung $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ katalysiert [160]. Vorwiegend ist die Katalase zuständig für den Abbau des innerhalb der Peroxisomen bei der Oxidation von Glycolat zu Glyoxylat durch die Glycolatoxidase anfallenden Wasserstoffperoxids. Aufgrund der schnellen Diffusion und guten Membrangängigkeit von H_2O_2 werden jedoch auch große Mengen von Wasserstoffperoxid aus anderen Quellen durch Katalase umgesetzt [159]. In allen anderen Kompartimenten existiert das aus Superoxid Dismutase (SOD) und Ascorbat Peroxidase (APX) bestehende Entgiftungssystem, das sowohl Superoxidradikalanionen, als auch Wasserstoffperoxid detoxifiziert. $\text{O}_2^{\bullet-}$ wird dabei zuerst durch SOD zu H_2O_2 umgesetzt (s. Abschn. 1.1.2.3), das dann wiederum von APX unter Zuhilfenahme von Ascorbat als Elektronendonator zu Wasser reduziert wird. Das dabei anfallende Monodehydroascorbat disproportioniert nichtenzymatisch zu Dehydroascorbat und Ascorbat, bzw. wird durch die Monodehydroascorbat reductase NADPH-abhängig zu Ascorbat reduziert. Das aus der spontanen Disproportionierung des MDHA hervorgehende DHA wird durch die Dehydroascorbatreduktase ebenfalls zu Ascorbat reduziert. Hierbei wird Glutathion als Elektronenlieferant verwendet, das wiederum durch Glutathionreduktase NADPH-abhängig in die reduzierte Form rücküberführt wird (s. Abb. 1.6). Diese Abfolge von Reaktionen wird als Ascorbat-Glutathion- oder Halliwell-Asada-Zyklus bezeichnet.

Enzym	Abk.	EC-Nr.
Superoxid Dismutase	SOD	1.15.1.1
Ascorbat Peroxidase	APX	1.11.1.11
Monodehydroascorbat Reductase	MDHAR	1.6.5.4
Dehydroascorbat Reductase	DHAR	1.8.5.1
Glutathion Reductase	GR	1.6.4.2
Catalase	CAT	1.11.1.6
Glutathion Peroxidase(n)	GPX	1.11.1.9
Glutathion-S-Transferasen	GST	2.5.1.18

Tab. 1.2.: An der antioxidativen Abwehr beteiligte Enzyme

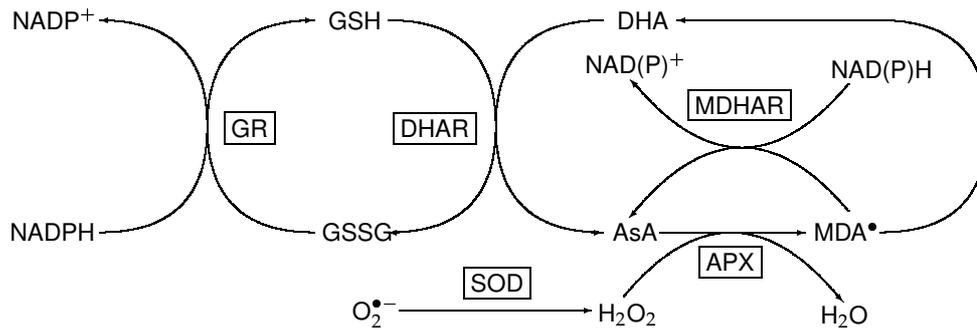


Abb. 1.6.: Der Ascorbat-Halliwell- oder Glutathion-Ascorbat-Zyklus. (Die Abkürzungen stehen für: GSH = reduziertes Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion, AsA = Ascorbat, APX = Ascorbat Peroxidase, SOD = Superoxid Dismutase, MDHAR = Monodehydroascorbat Reduktase, DHAR = Dehydroascorbatreduktase, DHA = Dehydroascorbat, MDA = Monodehydroascorbat-Radikal, GR = Glutathion Reduktase, NAD = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, NADP = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat)

1.2.2.1. Superoxid Dismutase und Ascorbat Peroxidase

Superoxid wird in allen Zellkompartimenten durch verschiedene Formen der Superoxid Dismutase in Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff überführt [54]. Es existieren drei Isoenzyme, die sich jeweils durch die Art des metallischen Cofaktors im aktiven Zentrum unterscheiden lassen: Kupfer/Zink-SOD, Mangan-SOD und Eisen-SOD. Kupfer/Zink-SODs wurden im Cytosol, in Chloroplasten und in Mitochondrien nachgewiesen. Sie unterscheiden sich strukturell von den beiden anderen Formen. Die Manganform findet man vorwiegend in der mitochondrialen Matrix, aber auch in Peroxisomen und Chloroplasten, während das Vorkommen der Eisen-Form offenbar auf die Chloroplasten beschränkt bleibt.

Isoform	Lokalisation	Cofaktoren	UE	Masse	H ₂ O ₂	CN ⁻
Cu/Zn	Cyt , Chl, Mit	1 Cu + 1 Zn pro UE	2	32 kDa	✓	✓
Mn	Mit , Chl, Per	1–4 Mn	2–4	40–90 kDa	×	×
Fe	Chl	1–2 Fe	2	40 kDa	✓	×

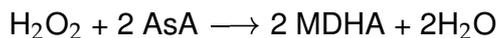
Tab. 1.3.: Eigenschaften der SOD-Isoformen, nach [21] (Cyt = Cytosol, Chl = Chloroplast, Mit = Mitochondrium, Per = Peroxisom, UE = Untereinheiten, ✓ = sensitiv, × = nicht sensitiv)

Es gibt in höheren Pflanzen mehr als ein für jede der SOD-Formen codierendes Gen, so wurden z.B. in Mais zehn Gene identifiziert, die für Superoxid Dismutasen codieren: vier cytosolische und eine chloroplastidäre Cu/Zn-SODs, sowie vier mitochondriale Mn-SODs und eine chloroplastidäre Fe-SOD [57, 154]. Die Unterschiede zwischen den Genprodukten der einzelnen Klassen sind zum Teil minimal, jedoch sind die Promotoren und

deren Regulation völlig verschieden. So reagiert beispielsweise die Expression zweier fast identischer Cu/Zn-SOD-Isoformen unterschiedlich auf osmotische Stressbehandlungen [57]. Außerdem ist das Expressionsmuster der Cu/Zn-SOD-Formen offenbar auch durch den Entwicklungszustand der Pflanze moduliert [81].

Die Induktion der SOD-Expression und -Aktivität durch oxidative und osmotische Stressbedingungen scheint ein allgemeines Prinzip bei höheren Pflanzen zu sein [9, 166, 29, 40, 105], dafür sprechen auch zahlreiche Ergebnisse, die eine mehr oder weniger ausgeprägte Schutzwirkung gegen oxidative Schädigung durch die Überexpression verschiedener SOD-Isoformen dokumentieren [154, 136, 51, 1]. Die Aktivitäten einiger anderer Enzyme des oxidativen Stress Abwehrsystems wurden durch Überexpression der SOD mitunter ebenfalls verstärkt, so diejenige der DHAR [5] und zahlreicher anderer Enzyme [136]. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß durch die SOD-Überexpression ein Anstieg der H_2O_2 -Konzentration auftritt, was wiederum als Signal für andere Teile des Stressabwehrsystems wirkt [121].

Der zweite Teil der Entgiftung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ erfolgt durch die Ascorbat Peroxidase, die die Reaktion



katalysiert. Sie gehört zu den Häm-Peroxidasen der Klasse I [77], deren Reaktionsmechanismus ihre Oxidation durch Wasserstoffperoxid beinhaltet, die in zwei Stufen durch ein elektronenlieferndes Substrat rückgängig gemacht wird, wobei während der letzten Teilreaktion ein zweites Molekül Wasser frei wird. Ein anderer Vertreter der Klasse I Häm-Peroxidasen ist die Cytochrom c Peroxidase, die eine hohe Homologie zur Ascorbat Peroxidase aufweist und im Mitochondrium auch ähnliche Aufgaben wahrnimmt [6]. Ascorbat Peroxidase ist in der Lage auch andere Substrate als Elektronenlieferanten anzunehmen, wie z.B. Guajacol und Pyrogallol, die klassischen Substrate der sogenannten Guajacol Peroxidasen, die u.a. bei der Lignin-Biosynthese beteiligt sind. Diese Substrate binden jedoch nicht wie Ascorbat an einem reaktiven Zentrum im Bereich der Aminosäure 32, einem Cystein, sondern an der δ -Kante der prosthetischen Häm-Gruppe [99]. In einem Medium, das keinen Elektronendonator enthält, wird APX sehr schnell inaktiviert, was sie von anderen Peroxidasen unterscheidet. Als Häm enthaltendes Enzym läßt sie sich außerdem durch Cyanid inaktivieren [107]. Das Molekulargewicht des Proteins liegt bei 34 kDa [6] und es wurden cytosolische, chloroplastidäre und in einem Fall auch eine glyoxisomengebundene Isoform beschrieben. Im Chloroplasten existieren sowohl thylakoidgebundene, als auch Stromaformen [107, 71]. Pflanzliche Ascorbat Peroxidasen lassen sich allgemein anhand Ihrer Aminosäuresequenzen in sieben Klassen einteilen [75]:

- 2 lösliche cytosolische Klassen
- 3 membrangebundene cytosolische Klassen (darunter die erwähnte glyoxisomale Form)
- 2 chloroplastidäre Klassen (Stroma- und Thylakoid-Form)

Die meisten cytosolischen Ascorbat Peroxidasen scheinen als Homodimere vorzuliegen, während die chloroplastidären Formen monomer sind. Die untersuchten cytosolischen Ascorbat Peroxidasen von *Mesembryanthemum crystallinum* stellen dahingehend eine Ausnahme dar, daß sie ebenfalls monomer vorliegen [75].

In *Arabidopsis thaliana* codiert eine kleine Multigenfamilie für die Ascorbat Peroxidase. Die codierenden Bereiche beider Gene scheinen eng verwandt zu sein, die unähnlichen Promotorbereiche weisen jedoch darauf hin, daß sie unterschiedlich reguliert werden. Tatsächlich wird eine der beiden Isoformen auch nur unter Stressbedingungen exprimiert [130]. Der Promotor des *apx1*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* enthält ein Hitzeschock-element, dessen Beteiligung an der Induktion des Gens durch oxidativen Stress gezeigt werden konnte [143].

Im Falle von *Spinacia oleracea* werden vier chloroplastidäre Isoenzyme durch alternatives Splicen aus einem gemeinsamen mRNA-Vorläufer generiert, für den das *apxII*-Gen codiert [72, 168].

Die Regulation der Ascorbat Peroxidase scheint recht komplex zu sein, da sowohl mehrere Isoformen abhängig von Entwicklungsstadium und Umweltbedingungen unterschiedlich exprimiert werden, als auch eine posttranscriptionelle Regulation der Aktivität vorzuliegen scheint [95, 106]. Die Aktivität der APX wird nicht in jedem Fall durch oxidative Stressbedingungen genauso stark induziert wie diejenige der SOD [58], so daß bei oxidativem Stress eine Erhöhung des intrazellulären H_2O_2 -Spiegels wahrscheinlich erscheint. In *Spinacia oleracea* zeigen sowohl Transkriptlevel als auch Aktivitäten der chloroplastidären Isoformen der APX gar keine Reaktion auf verschiedene Stressoren; nur die cytosolische Ascorbat Peroxidase wird bei Behandlung mit Paraquat oder hoher Lichtintensität, jedoch nicht bei Trockenheit oder Salzstress induziert [167].

1.2.2.2. Katalase

Katalase ist ein tetrameres Enzym, das als prosthetische Gruppe Häm enthält und H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert ($2 H_2O_2 \longrightarrow O_2 + H_2O$), ohne dazu Reduktionsäquivalente zu verbrauchen. Es weist eine außergewöhnlich hohe Reaktionsgeschwindigkeit auf, jedoch im Vergleich zu Peroxidasen nur eine geringe Affinität zu Wasserstoffperoxid. Weitere von der Katalase katalysierte Reaktionen sind die Oxidation von Methanol, Ethanol, Formaldehyd und Ameisensäure. Katalase ist praktisch ausschließlich in Peroxisomen lokalisiert, wurde jedoch in Mais auch in Mitochondrien nachgewiesen [120, 159]. In *Nicotiana plumbaginifolia* [162], *Zea mays* [55] und *Arabidopsis*

thaliana [101] existieren mindestens drei Gene (Cat1, Cat2, Cat3) für das Enzym, jedoch scheinen die Produkte von Cat1 (Klasse I, ca. 80% der Gesamtaktivität, in photosynthetisch aktivem Gewebe lokalisiert) und Cat2 (Klasse II, ca. 20% der Gesamtaktivität, im Leitgewebe lokalisiert) praktisch für die gesamte Katalase-Aktivität der ausgewachsenen Pflanze verantwortlich zu sein [161, 35]. Hierbei scheint die Hauptaufgabe der zweiten Klasse weniger die H₂O₂-Entgiftung zu sein, als vielmehr die Mitwirkung an der Lignifikation. Das Vorkommen der dritten Klasse von Katalasen ist beschränkt auf Samen und junge Pflanzen, wo sie für die Entgiftung großer Wasserstoffperoxidmengen sorgt, die in Glyoxisomen beim Abbau von Fettsäuren entstehen. In *Mesembryanthemum crystallinum* wurden bisher Transkripte zweier Isoformen sequenziert (Michalowski, C.B.; Quigley-Landreau, F.; Bohnert, H.J.; unveröffentlicht), die ca. 75% Identität aufweisen und in Wurzel bzw. Blatt exprimiert werden. Katalasedefiziente Tabak- und Roggenpflanzen zeigten unter erhöhten Lichtintensitäten Läsionen, während vergleichbare Maispflanzen nicht beeinträchtigt zu sein schienen [159, 83, 132]. Aus der Reaktion dieser transgenen Pflanzen auf Bedingungen, die oxidativen Stress hervorrufen, läßt sich schließen, daß Katalase in der Entgiftung des bei der Photorespiration anfallenden Wasserstoffperoxids nicht ihre einzige Funktion hat. Trotz ihrer vorwiegend mikrosomalen Lokalisation kann sie aufgrund der Diffusionseigenschaften von H₂O₂ offenbar eine wichtige Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress spielen [159]. Peroxidasen und Katalase arbeiten offenbar bei der H₂O₂-Detoxifikation zusammen, wobei den beiden Systemen unterschiedliche Aufgaben zukommen. Ein Vergleich der kinetischen Eigenschaften von Ascorbat Peroxidase und Katalase legt nahe, daß der Hauptteil des in der Zelle anfallenden Wasserstoffperoxids durch Katalase umgesetzt wird, während die Ascorbat Peroxidase durch ihre höhere Affinität besser für Restmengen geeignet ist. In Chloroplasten werden außerdem die Photosyntheseenzyme durch thylakoidgebundene Ascorbat Peroxidase geschützt, da hier ein Abwehrsystem, das sich nur auf die Diffusion des H₂O₂ zu den Peroxisomen verläßt nicht ausreichen würde [35]. Die Expression der Katalase ist durch oxidativen Stress induzierbar, ausgelöst z. B. durch Kälte [120] oder Ozonbehandlung [14].

1.2.2.3. Glutathionperoxidase

Die Glutathion Peroxidasen stellen im Tierreich neben der Katalase den Hauptentgiftungsmechanismus für Wasserstoffperoxid dar, nehmen dort also die Aufgabe der pflanzlichen Ascorbat Peroxidasen wahr [46]. Sie katalysieren, wie alle Peroxidasen die Umsetzung eines Peroxids zu Wasser unter Oxidation eines zweiten elektronenliefernden Substrats, in diesem Fall GSH ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \longrightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$). Als eines von wenigen Enzymen enthält Glutathion Peroxidase in seinem reaktiven Zentrum die seltene Aminosäure Selenocystein (Sec), codiert durch das Codon TGA, normalerweise ein Stopcodon [18]. Dies verbessert die Redoxeigenschaften des Selenoproteins deutlich. In Vertebraten wurden bisher vier Klassen von Glutathion Peroxidasen identifiziert [152]:

1. klassische, cytosolische Glutathion Peroxidase
2. extracelluläre, „plasmatische“ Glutathion Peroxidase
3. gastrointestinale cytosolische Glutathion Peroxidase
4. Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase (PHGPX)

Die Klassen 1 bis 3 liegen als Homotetramere vor, während die Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase in nativer Form monomer ist. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß während der Evolution der Glutathion Peroxidasen in der Sequenz der PHGPX offenbar Deletionen aufgetreten sind, die sowohl zum Verlust der Tetramerbildung geführt haben, als auch eine Verschiebung der Substratspezifität herbeigeführt haben: Die PHGPX weist eine höhere Aktivität gegenüber Phospholipidhydroperoxiden auf als gegenüber H_2O_2 . Die meisten Glutathion Peroxidasen aus Vertebraten und Invertebraten enthalten Selenocystein, jedoch wurden auch Enzyme dieser Klasse isoliert, die keine solche Ersetzung des Cysteins im reaktiven Zentrum aufwiesen [31].

In Pflanzen wurden nach verschiedenen Stressbehandlungen erhöhte Glutathion Peroxidase-ähnliche Aktivitäten nachgewiesen, z.B. in *Malus pumila*, *Hordeum vulgare* und dem Moos *Tortula ruralis* [89, 113, 37]. Es ist jedoch nicht klar, ob diese Aktivitäten wirklich auf Glutathion Peroxidasen zurückzuführen sind, oder auf Glutathion-S-Transferasen, die bekanntermaßen zum Teil ebenfalls Glutathion Peroxidase Aktivität aufweisen. Mittlerweile wurden auch mehrere pflanzliche Gene beschrieben, die Sequenzhomologie zu tierischen GPX-Genen aufweisen (*Arabidopsis thaliana*, Acc. No. X89866; *Avena fatua* [76]; *Citrus sinensis* [67]). Die höchste Homologie zeigen alle bisher isolierten pflanzlichen GPX-Gene zu tierischen PHGPX-Genen. Computeranalysen legen nahe, daß zumindest in *Arabidopsis thaliana* und *Brassica campestris* Isoformen der Glutathion Peroxidase in unterschiedlichen Organellen auftreten und die Proteine durch eine kleine Genfamilie kodiert werden [43]. Die resultierenden Genprodukte weisen berechnete Molekulargewichte zwischen sechzehn und achtundzwanzig kDa auf, das bisher am besten untersuchte Enzym (*Citrus sinensis* [67]) hat eine Masse von 22 kDa, einen pI von 6,1 und scheint im Cytosol lokalisiert zu sein. Es ist salzinduzierbar, jedoch nimmt seine Expression über mehrere Tage hinweg nur allmählich zu. Im reaktiven Zentrum trägt diese Glutathion Peroxidase ein Cystein, das nicht selenmodifiziert ist. Dies spiegelt sich in einer drastisch erniedrigten Aktivität (ca. 0,2%) im Vergleich zum Selen enthaltenden Enzym aus *Sus scrofa* wieder, das ansonsten eine sehr hohe Homologie zur Citrus-Glutathion Peroxidase aufweist. Ersetzt man in der Glutathion Peroxidase aus *Sus scrofa* durch eine Punktmutation Selenocystein durch unmodifiziertes Cystein, so wird deren Aktivität auf einen vergleichbaren Wert gesenkt [43]. Zieht man die langsame Induktion, die Substratspezifität gegenüber oxidativ geschädigten Membranbestandteilen und die niedrige Aktivität in Betracht, so kommt man zu dem Schluß, daß die pflanzliche PHGPX keine Alternative zur Ascorbat Peroxidase darstellt, sondern

eine Art zweite Verteidigungslinie unter Stressbedingungen aufbaut. Eine erhöhte ROS-Produktion bringt mit der Zeit auch eine Membranschädigung mit sich, da die Aktivitäten von Katalase und Ascorbat Peroxidase nicht mehr ausreichen um H_2O_2 schnell genug zu entgiften. Durch die Fenton-Reaktion und die nachfolgenden Redoxprozesse kann Phospholipidhydroperoxid entstehen, das dann wiederum durch die Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase entgiftet wird [43].

1.2.2.4. Regenerative Enzyme

Zu den Enzymen, die in der oxidativen Stressabwehr Regenerationsfunktionen wahrnehmen sind

1. die Monodehydroascorbat Reduktase
2. die Dehydroascorbat Reduktase
3. die Glutathion Reduktase

zu zählen (s. Abb. 1.6).

Monodehydroascorbat Reduktase Die Monodehydroascorbat Reduktase ist für den pflanzlichen Stoffwechsel eine Möglichkeit Ascorbat wiederzugewinnen, nachdem es durch spontane Reaktion mit einem Oxidationsmittel oder durch die Ascorbat Peroxidase zu Monodehydroascorbat umgesetzt worden ist ($2\text{MDHA} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2 \text{AsA} + \text{NAD}^+$). Andere mögliche Reaktionswege für Monodehydroascorbat sind die Disproportionierung zu Ascorbat und Dehydroascorbat und die Reduktion durch Ferredoxin am Photosystem I. Monodehydroascorbat Reduktase ist ein NAD(P)H-abhängiges Enzym, das weiterhin Bindungsstellen für FAD enthält [110]. Es kommt löslich im Cytosol und im Chloroplastenstroma vor. Drei weitere Isoformen wurden in *Spinacia oleracea*-Blättern als an die Plasmamembran gebundene, FAD enthaltende Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von 45 kDa identifiziert. Plasmamembrangebundene MDHAR ist möglicherweise beteiligt am Elektronentransport von cytosolischem Ascorbat zu apoplastischem Monodehydroascorbat über die Cytochrom b_{561} -Oxidoreduktase [15]. Eine Induktion der MDHAR-Expression wurde für zahlreiche Spezies unter unterschiedlichen Stressbedingungen nachgewiesen, darunter *Oryza sativa* [153] und *Zea mays* [85].

Dehydroascorbat Reduktase Die Dehydroascorbat Reduktase bildet ein zweites Regenerationssystem für Ascorbat in dem sie Dehydroascorbat, das aus der spontanen Disproportionierungsreaktion des Monodehydroascorbat stammt wieder zu Ascorbat reduziert und so den Verlust dieser Antioxidanz vermeidet. Durch Abbau zu 2,3-diketo-1-gluconsäure geht Dehydroascorbat ansonsten verloren (s. Abb. 1.3) und müßte durch Neusynthese von Ascorbat ersetzt werden. Das Enzym

nutzt als Reduktionsmittel Glutathion, das dabei in das oxidierte Dimer GSSG überführt wird, regeneriert also ein Antioxidanz auf Kosten eines zweiten. Die Dehydroascorbat Reduktase war lange Zeit nur in Form ihrer meßbaren Aktivität bekannt [68, 82], da ihre Reinigung und Charakterisierung sich aufgrund ihrer geringen Stabilität sehr schwierig gestaltet. Eine molekulargenetische Identifikation erfolgte erst in jüngster Zeit [151, 134]. In Blättern von *Spinacia oleracea* wurden mindestens zwei Isoformen der Dehydroascorbat Reduktase nachgewiesen, eine davon in Chloroplasten [134]. Es handelt sich um monomere Enzyme mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Es gibt auch andere Enzyme, wie Glutaredoxin, Proteindisulfid Isomerase, die reduzierte Form eines Kunitz Trypsin Inhibitors und bestimmte Glutathion-S-Transferasen, die eine Dehydroascorbat -reduzierende Aktivität aufweisen [150].

Glutathion Reduktase Die Glutathion Reduktase hält den Glutathionvorrat der Zelle unter Zuhilfenahme von NADPH als Reduktionsmittel in einem möglichst reduzierten Zustand. Sie katalysiert damit das letzte Glied in der Kette von Redoxreaktionen, die nötig ist um reaktive Sauerstoffspezies zu reduzieren und damit zu entgiften. NADPH wiederum wird von den Photosystemen I und II bereitgestellt, was die Entgiftung von ROS über den Halliwell-Asada-Zyklus zu einem lichtabhängigen Prozess macht. Das Molekulargewicht der Glutathion Reduktase liegt in einem Bereich um 55 kDa; die aus zahlreichen Spezies isolierten cDNA-Sequenzen weisen einen hohen Homologiegrad auf [70, 80]. In *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana* kodiert jeweils nur ein Gen für Glutathion Reduktase, dessen kodierende Sequenz bei Reis in sechzehn Exons aufgeteilt ist und dessen Expression durch Kälte, Trockenheit und Salzbehandlung induziert wird [80, 88]. Die Regulation erfolgt wahrscheinlich über abscisinsäurebindende Elemente im 5' flankierenden Bereich des Gens. Eine cytosolisch lokalisierte Glutathion Reduktase aus *Pisum sativum* zeigt ein ähnliches Verhalten [142]. Aus *Nicotiana tabacum* sind zwei für die GR kodierende Gene bekannt, aus denen mindestens vier Isoformen des Enzyms hervorgehen [32].

1.2.2.5. 2-Cys-Peroxyredoxin

Die in allen Organismen ubiquitär vorliegenden Enzyme der Klasse 2-Cys-Peroxyredoxin (2CP) stellen ein weiteres System dar, das in der Lage ist oxidativem Stress entgegenzuwirken. Sie katalysieren den Elektronentransfer von Sulfhydrylgruppen auf Peroxide. Als ein Vertreter dieser Proteingruppe in höheren Pflanzen wurde BAS1 charakterisiert [10]. Es handelt sich um ein kernkodiertes Protein, das in die Chloroplasten importiert wird und eine Schutzfunktion gegen Photoinhibition ausübt, wie durch Versuche mit 2CP-defizienten Mutanten von *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden konnte [11]. Die Expression von BAS1 ist durch den zellulären Redoxstatus reguliert, reduzierte Antioxidanzien

führen zu einer Herabregulation, während oxidativer Stress eine Induktion auslöst [10].

1.3. Kohlenstofferb bei *Mesembryanthemum crystallinum*

Mesembryanthemum crystallinum (gr.: Mesembria = Mittag, anthemon = Blume), die Mittagsblume oder englisch „common ice plant“, eine Bezeichnung, die auf die auffälligen glänzenden Papillen auf den Blattoberflächen zurückzuführen ist, gehört zu den Mittagsblumengewächsen oder Aizoaceen. Die Familie umfasst ca. 140 Gattungen und 2400 Arten, die vorwiegend im mediterranen Raum, im südlichen Afrika und der Westküste Nord- und Südamerikas beheimatet sind.

Ihre Mitglieder sind vielfach an extreme Trockenheit und teilweise auch an Salinität angepasste Blattsukkulente. Zusammen mit den Cactaceen und den Caryophyllaceen umfaßt die Familie Aizoaceae ca. zwei Drittel aller Arten der Ordnung Caryophyllales [65]. Die fleischigen Blätter von *Mesembryanthemum crystallinum* sind am Grund gegenständig



Abb. 1.7.: Blüte von *M. crystallinum*

und zeigen große morphologische Unterschiede zwischen primären und sekundären Blättern (s. Abb. 1.8). Die einzelstehenden, weiß bis leicht rosa gefärbten Blüten (s. Abb. 1.7) bilden ein doppeltes Perianth aus Sepalen und zahlreichen linearen Staminoidien. Das Androeceum wird von einer Vielzahl fertiler Stamina gebildet; das Gynoeceum besteht aus fünf verwachsenen Karpellen. Die Frucht besteht aus einer Samenkapsel mit zahlreichen sehr kleinen Samen.



(a) 4 Wochen



(b) 12 Wochen

Abb. 1.8.: 4 und 12 Wochen alte *M. crystallinum*-Pflanzen

1.3.1. Der C₃-Metabolismus

Der Großteil aller höheren Pflanzen betreibt Photosynthese nach dem C₃-Typ. Im Gegensatz zur Photosynthese nach dem CAM- und C₄-Typ, bei dem als erstes Carboxylierungsprodukt durch die Phosphoenolpyruvat Carboxylase der C₄-Körper Malat ge-

bildet wird, beginnt die CO_2 -Fixierung bei C_3 -Pflanzen direkt mit der Bildung von 3-phosphoglycerat aus Ribulose-1,5-bisphosphat durch RubisCO.

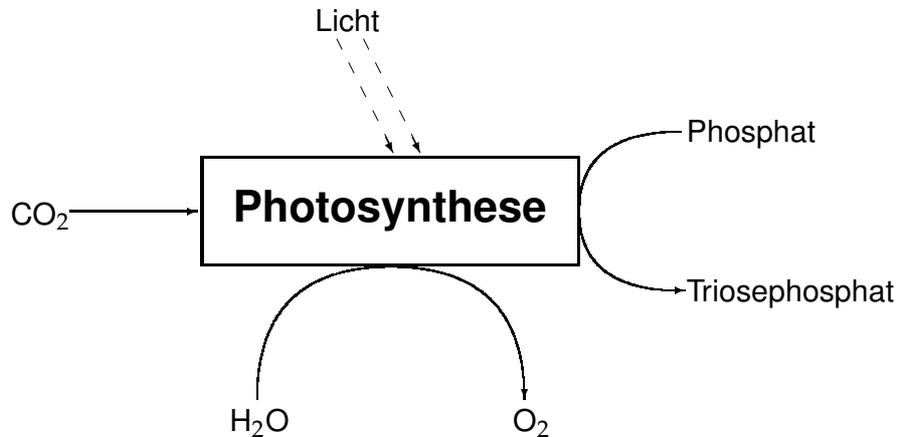


Abb. 1.9.: Allgemeine Übersicht über die Photosynthese: Bei der Lichtreaktion der Photosynthese werden unter O_2 -Entwicklung Reduktionsäquivalente zur Fixierung von CO_2 als Triosephosphat bereitgestellt.

Die RubisCO-Reaktion ist die einzige Reaktion, die in der Lage ist Biomasse durch Synthese von Kohlenstoffgerüsten aus Luft-Kohlendioxid aufzubauen. Sie verläuft über mehrere Teilreaktionen, bei denen zuerst Kohlendioxid mit dem durch Tautomerie gebildeten Endiol des Ribulose-1,5-bisphosphats kondensiert. Nach Wasseranlagerung an der Carbonylgruppe (C_3) des Zwischenprodukts zerfällt dessen hydratisierte Form zu zwei Molekülen 3-phosphoglycerat. Aufgrund des erheblich höheren Partialdrucks des Sauerstoffs in der Atmosphäre im Vergleich zu dem des Kohlendioxids kann stattdessen auch eine Oxygenierungsreaktion katalysiert werden, die als unerwünschtes Nebenprodukt das toxische 2-phosphoglycolat bildet. Dieses muß im Photorespirationsweg mit großem Aufwand entgiftet werden, wobei über Glycin und Serin letztlich wieder 3-phosphoglycerat regeneriert wird. Allerdings ist dieser Prozess andererseits u.a. auch für die Biosynthese der erwähnten Aminosäuren und ihrer Folgeprodukte wichtig, so ist z.B. die Bildung von Glutathion ohne das auf diesem Wege anfallende Glycin nicht möglich. Das bei der Carboxylierungsreaktion gebildete 3-phosphoglycerat wird zuerst durch das Enzym Phosphoglycerat Kinase unter ATP-Verbrauch zu dem gemischten Anhydrid 1,3-bisphosphoglycerat umgesetzt und danach durch Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase NADPH-abhängig zu Triosephosphat reduziert. Triosephosphat ist eine Mischung aus ca. 96% Dihydroxyacetonphosphat und 4% Glycerinaldehydphosphat. Die Isomerisierung wird durch Triosephosphat Isomerase katalysiert. Fünf Sechstel des so gebildeten Triosephosphats werden über den reduktiven Pentosephosphatweg wieder zu Ribulose-1,5-bisphosphat regeneriert. Das verbleibende Sechstel kann von der Zelle genutzt werden.

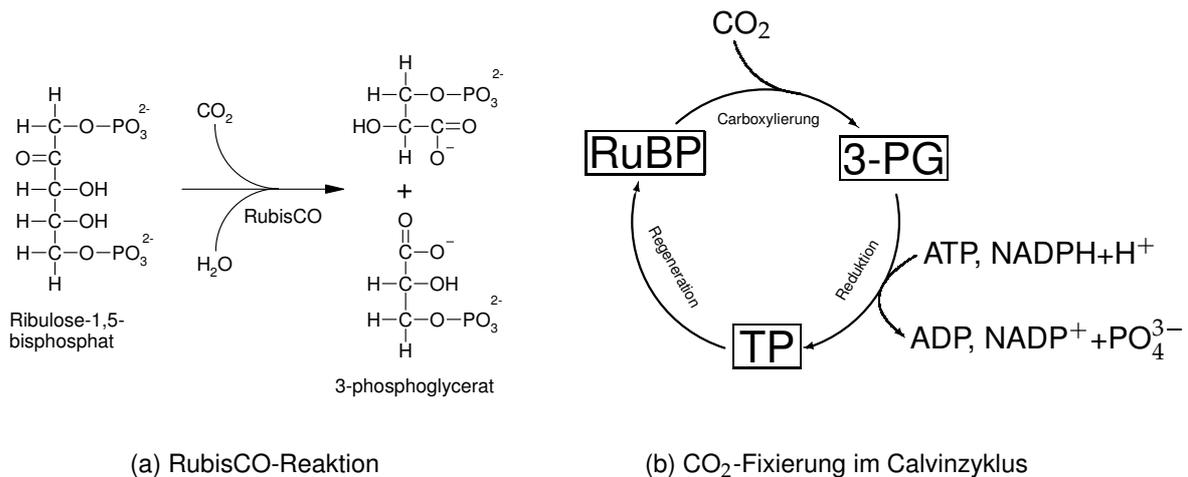


Abb. 1.10.: Vereinfachte Darstellung von RubisCO-Reaktion und Calvinzyklus
(RuBP=Ribulose-1,5-bisphosphat, 3-PG=3-Phosphoglycerat, TP=Triosephosphat)

1.3.2. Der Crassulaceen-Säurestoffwechsel

Die nächtliche Azidifizierung bestimmter sukkulenter Pflanzen, die mit dem Crassulaceen-Säure-Stoffwechsel (CAM) einhergeht, ist bereits seit über 150 Jahren bekannt und wurde unter anderem von de Saussure und Heyne Anfang des 19. Jahrhunderts erforscht. Die gesamte Reaktionsfolge des CAM-Zyklus wurde schließlich in der Mitte des 20. Jahrhunderts verstanden und beschrieben [19, 149, 146, 147]. Bei Pflanzen, die an ariden Standorten überleben müssen, beobachtet man oft die Nutzung des Crassulaceen-Säure-Stoffwechsels, da dieser ermöglicht, die CO₂-Assimilation auf wassersparendem Wege zu bewerkstelligen. Bei dieser Art des Kohlenstoffwechsels finden Photosynthese und CO₂-Assimilation zeitlich getrennt statt. Während der kühleren Nachtstunden wird Kohlendioxid bei geöffneten Stomata durch die Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC) [33] fixiert. Das dabei gebildete Oxalacetat wird zu Malat reduziert, in die Vakuole transportiert und dort gespeichert. Der Wasserverlust pro assimilierter CO₂-Menge bleibt dabei gering, da die Transpiration bei niedrigeren Temperaturen aufgrund der kleineren Dampfdruckdifferenz zwischen Pflanze und Umgebung ebenfalls niedrig bleibt. Am darauffolgenden Tag wird das Malat aus der Vakuole freigesetzt und zu Pyruvat decarboxyliert um während der Lichtphase mit dem freigesetzten Kohlendioxid Photosynthese nach dem C₃-Modus bei geschlossenen Stomata zu ermöglichen. Diese findet dabei weitgehend ohne Gasaustausch mit der Umwelt statt um den Wasserverlust gering zu halten. Die Decarboxylierung des Malats findet in zwei unterschiedlichen Pflanzengruppen auf verschiedenen Wegen statt. Entweder mittels des NADP- und NAD-abhängigen Malatenzyms (ME) oder der Malat Dehydrogenase (MDH) und Phosphoenolpyruvat carboxykinase (PEPCK) [38]. Diese Gruppen von Pflanzenspezies unterscheiden sich außerdem in der Art der bevorzugten Kohlenhydratspeicherform, da

die erste Gruppe (ME-Decarboxylierung) ausschließlich Stärke speichert, während die zweite Gruppe (PEP Carboxykinase-Decarboxylierung) einen Großteil der Kohlenhydrate in Form löslicher Zucker akkumuliert [164].

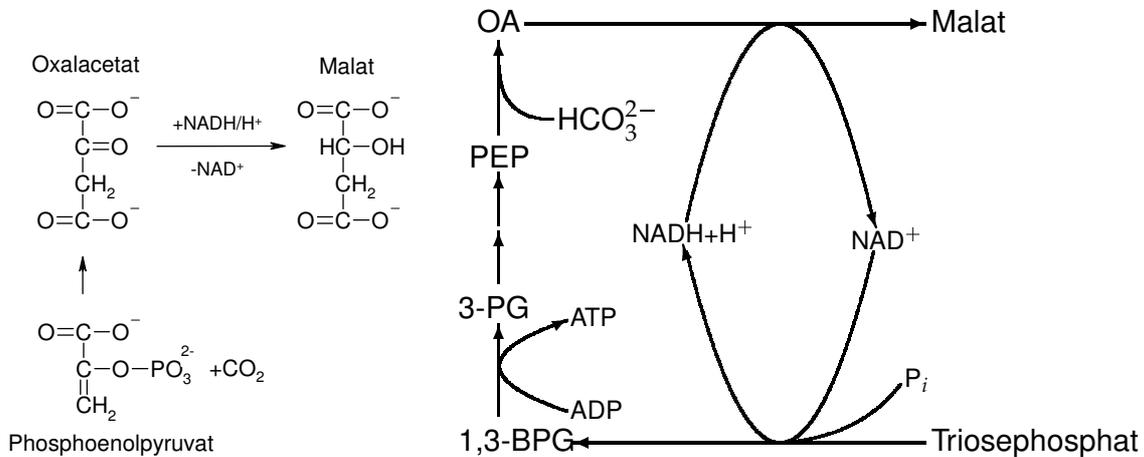


Abb. 1.11.: Nächtliche CO₂-Fixierung im CAM: Durch z.B. Stärkeabbau mobilisiertes Triosephosphat wird zur Synthese von Phosphoenolpyruvat verwendet. Dieses wird durch die PEP Carboxylase zu Oxalacetat umgesetzt. Oxalacetat wird zu Malat reduziert. (1,3-BPG=1,3-bisphosphoglycerat, 3-PG=3-Phosphoglycerat, OA=Oxalacetat, PEP= Phosphoenolpyruvat)

Das wichtigste Schlüsselenzym bei der Regulation des CAM-Zyklus ist die PEPC, die nachts durch Phosphorylierung in eine aktive Form überführt wird, die auch keinerlei Substratinhibition durch Malat unterliegt [163].

Man teilt das Gaswechselverhalten von CAM-Pflanzen in 4 distinkte Phasen ein (s. Abb.1.12):

- **Phase I:** Nacht, Stomata geöffnet, CO₂-Fixierung mittels PEPC in Form von Malat
- **Phase II:** morgendliche Übergangsphase, Stomata meist noch geöffnet, PEPC und RubisCO gleichermaßen aktiv
- **Phase III:** Tag, Stomata geschlossen, RUBISCO-Aktivität, Malatdecarboxylierung
- **Phase IV:** Abend, Stomata öffnen sich, CO₂-Fixierungsaktivität geht von RubisCO auf PEPC über

Viele Pflanzen sind in der Lage sowohl C₃-Photosynthese zu betreiben, als auch sich des CAM in unterschiedlicher Ausprägung zu bedienen. Während beispielsweise zahlreiche Kakteen ausschließlich und völlig unabhängig von den Umweltbedingungen auf die CO₂-Fixierung mittels CAM zurückgreifen, gibt es auch zahlreiche Spezies, die in der Hauptsache tagsüber atmosphärisches Kohlendioxid assimilieren und nachts nur

zusätzlich in geringem Maß auf die CO₂-Speicherung in Form von Malat zurückgreifen. Zwischen diesen Extremen ist — resultierend aus unterschiedlicher Akzentuierung der Längen der vier CAM-Phasen — praktisch jede Gewichtung der beiden Gaswechsellmodi zu finden. Meßbar ist das Verhältnis der Beiträge der beiden Kohlenstoffverwechsellmodi zur gesamten CO₂-Fixierung als massenspektrometrisch bestimmter $\delta^{13}\text{C}$ -Wert, einem Ausdruck für die relative Menge an ¹³C in der Biomasse der Pflanze, da sich RUBISCO und PEPC hinsichtlich ihres Diskriminationsverhaltens gegen ¹³CO₂ unterscheiden.

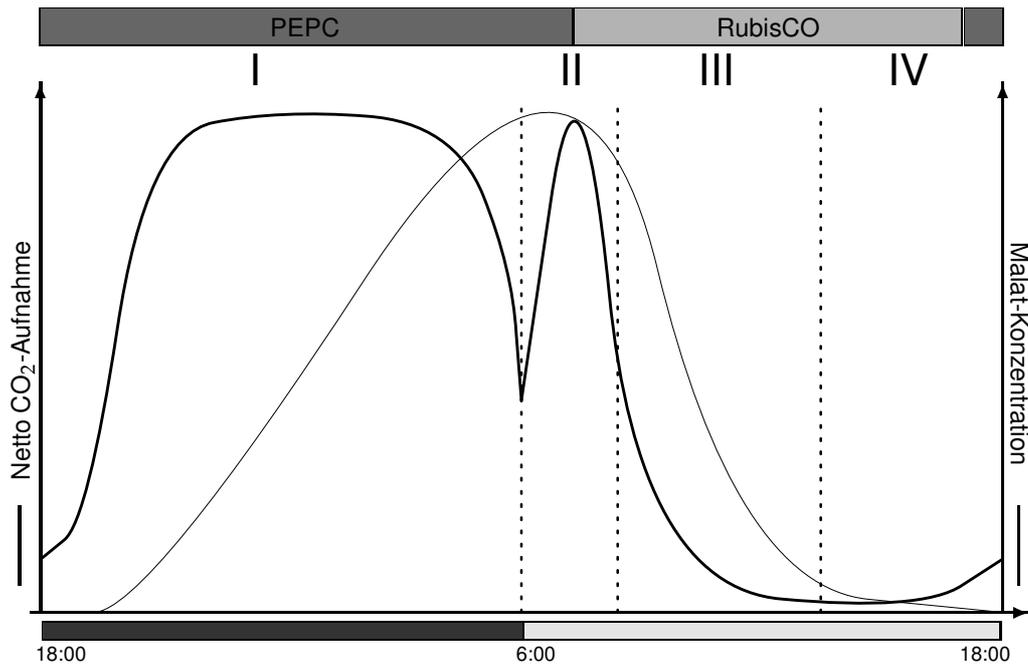


Abb. 1.12.: Schematische Darstellung der Gaswechsellphasen und zeitliche Verteilung der RubisCO- und PEPC-Aktivitäten während des Crassulaceen-Säure-Stoffwechsels für eine idealisierte CAM-Pflanze, die während der Phase IV kaum CO₂ aufnimmt (nach [164], verändert).

Zahlreiche Pflanzenspezies, darunter auch *Mesembryanthemum crystallinum* [165], stellen außerdem induzierbare oder fakultative CAM-Pflanzen dar, die als Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen zwischen den beiden Stoffwechsellmodi wechseln können. *Mesembryanthemum crystallinum* stellt seinen Stoffwechsel aufgrund von Trocken- oder Salzstress auf CAM-Photosynthese um, dies tritt jedoch mit zunehmendem Alter der Pflanze auch bei besten Umweltbedingungen langsam ein. Bei Verschwinden des jeweiligen Stressfaktors kann die Induktion des CAM bis auf die altersbedingte Ausprägung rückgängig gemacht werden [105]. Ein Charakteristikum dieses Kohlenstoffverwechsellmodus ist, wie bereits erwähnt die Tatsache, daß während der Phase III des CAM die Photosynthese hinter geschlossenen Stomata stattfindet. Daß der Gasaustausch mit der Umwelt in dieser Zeit unterbunden ist, hat außer der effektiven Wassereinsparung zweierlei zur Folge. Zum einen kommt es durch die Decarboxylierung

des gespeicherten Malats zu einem hohen CO_2 -Partialdruck im Inneren des Gewebes, was optimale Bedingungen für die Fixierung von Kohlenstoff durch die RubisCO schafft und so einen gewissen Schutz vor der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch die Mehler-Reaktion bieten sollte. Die photosynthetisch bedingte Freisetzung von Sauerstoff bei unterbundenem Gasaustausch sollte jedoch dazu führen, daß die Oxygenasereaktion der RubisCO mit zunehmender Dauer der Lichtphase an Bedeutung gewinnt. Die beiden Effekte sind offensichtlich gegenläufig. Je weiter der Malatabbau fortschreitet, desto höher wird auch der Sauerstoffpartialdruck und damit die Tendenz zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Letzteres ist vor allem auch deshalb hoch zu bewerten, weil CAM-Pflanzen meist an Standorte angepaßt sind, an denen auch mit einer hohen Licht-einstrahlung zu rechnen ist. Es steht deshalb zu vermuten, daß diese Pflanzen über besonders ausgeprägte Schutzmechanismen gegenüber oxidativer Schädigung verfügen.

1.4. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit soll durch die Schaffung experimenteller Grundlagen in Form von Informationen über die am antioxidativen Verteidigungssystem beteiligten Enzyme und der für sie kodierenden Gene einen Beitrag zur Aufklärung der während des Wechsels des Stoffwechselmodus von der C_3 -Photosynthese zum Crassulaceen-Säure-Metabolismus ablaufenden Vorgänge im antioxidativen Verteidigungssystem, sowie der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen leisten.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenanzucht

Mesembryanthemum crystallinum L. (Aizoaceae) Samen wurden auf Einheitserde (ED-73 DIN 11540-80T) ausgesät und unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Temperatur lag zwischen 20 und 27°C, bei 60 bis 80% relativer Luftfeuchte; die Lichtintensität auf Höhe der Anzuchten betrug 300-350 $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nach ca. zwei Wochen wurden die Pflanzen pikiert und in 9 cm durchmessende Töpfe überführt. Die Bewässerung erfolgte mit Leitungswasser. Experimente fanden jeweils mit sieben Wochen alten Pflanzen statt.

Zur Induktion des CAM-Zustandes wurden die Pflanzen täglich mit 400 mM NaCl gegossen, während Kontrollpflanzen weiterhin mit Leitungswasser bewässert wurden. Die Probennahme erfolgte 14 Tage nach Beginn der Salzbehandlung.

Um die Verfügbarkeit von Kohlendioxid zu verringern wurden Kontrollpflanzen im C₃-Zustand in Plexiglasgefäße eingeschlossen und CO₂-freier Luft ausgesetzt. Die Behandlung wurde jeweils zwei Stunden vor der ersten Probennahme begonnen.

2.2. Bezugsquellen

Sofern im Text nicht anders angegeben wurden durchweg mindestens analysenreine Chemikalien der Firmen Baker, Fluka, Merck, Roche, Roth, Sigma-Aldrich, sowie Schleicher und Schüll verwendet. Die Restriktionsenzyme stammten von den Firmen New England Biolabs und Stratagene (Heidelberg). Als DNA-Polymerasen für die PCR kamen „Platinum-Taq“ der Firma Gibco-BRL, „Goldstar-Taq“ der Firma Eurogentec (Brüssel) und „Taq-Plus Precision“ der Firma Stratagene zum Einsatz. Die verwendeten Reversen Transkriptasen waren „Superscript“ und „Thermoscript“ der Firma Gibco-BRL. Die verwendeten DNA-Längenstandards waren „Smart-Ladder“ der Firma Eurogentec, sowie „1kb-Ladder“ der Firma Gibco-BRL. Die DNA-Vektoren „pGEM T“, „pQE“, „pBlue-script II SK⁺“ und „pCR4TOPO“ wurden von den Firmen Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Stratagene (CA,USA) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Für DNA-Ligationen wurden Enzyme der Firmen Roche (Mannheim) und Promega benutzt. Die Chemolumineszenz-Reagenzien für die Southern-, Northern- und Western-Blot Analysen stammten von der Firma Pierce (Rockford, USA). Zur Chemolumineszenz-Detektion kamen ECL-Röntgenfilme der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig) zum Einsatz. Northern- und Southern-Blots wurden auf „Duralon“ Nylonmembranen der Firma Statagene, Western-

Blots auf „Immobilon-P“ PVDF-Membranen der Firma Millipore (Bedford, USA) durchgeführt. Als Protein-Molekulargewichtsstandard kam „Prestained Marker“ der Firma Gibco-BRL zum Einsatz. Plasmid-Präparationen wurden mit Kits der Firmen Qiagen und Machery-Nagel (Düren) durchgeführt. Für die RACE-Technik wurde das „Generacer“-System der Firma Invitrogen, für die in vitro Transkription das „Riboprobe“-System der Firma Promega verwendet. Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec, MWG (Ebersberg) und Interactiva (Ulm) synthetisiert. Alle Sequenzierungen wurden bei der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Alle Materialien für die ballistische Transformation wurden von der Firma Biorad (München) bezogen. Es wurden HPLC-Säulen der Firma Alltech (Unterhaching) und Rockland Technologies (Agilent Inc., Wilmington, USA) eingesetzt.

2.3. Verwendete Lösungen und Medien

APS-Gebrauchslsg.	10% Lagerung bei -20°C	Ammoniumperoxodisulfat in A.bidest
Assaypuffer	100 mM pH 10 1 mM	Diethanolamin mit HCl einstellen MgCl ₂
Blockpuffer	0,2% (w/v) 0,5% (w/v)	I-Block (Casein, Perkin-Elmer) in 1XPBS, auf 70°C erhitzt SDS
C/I	96% (v/v) 4% (v/v)	Chloroform Isoamylalkohol
Coomassie-Entfärbelsg.	45% (v/v) 10% (v/v)	Ethanol Essigsäure
Coomassie-Färbelsg.	45% (v/v) 10% (v/v) 0,1% (w/v)	Ethanol Essigsäure Coomassie Brilliant Blue G-250
CsCl-Lsg.	6,6 M	Cäsiumchlorid in TE
Denaturierungslsg.	0,5 M 1 M	NaOH NaCl
DEPC-Wasser	0,02%	Diethylpyrocarbonat in A.bidest über Nacht in offenem Gefäß gerührt
Depurinierungslsg.	0,25 M	HCl
5×DNA-Auftragspuffer	50% (v/v) 5× 0,5% (w/v)	Glycerol TAE-Puffer Orange G

5×DNA-Extraktionspuffer	1,75 M	Sorbitol
	0,5 M	Tris-Base
	0,125 M	Natrium-EDTA
	0,05% (v/v)	Triton X-100
	pH 8	
10×EP, nativ	30 mM	Tris-Base
	190 mM	Glycin
	pH 8,8	
EtBr-Vorratslsg.	10 mg/ml	Ethidiumbromid in Wasser
Extraktionspuffer für Chloroplastenpräparation	100 mM	HEPES
	330 mM	Sorbitol
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	KCl
	pH 8; sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	
	vor Gebrauch frisch hinzufügen:	
	1 mM	PMSF
2 mM	DTT	
Gellagerungslsg.	45% (v/v)	Methanol
	2,5% (v/v)	Glycerol
	52,5% (v/v)	A.bidest
HPLC-Laufmittel A	0,1%	Trifluoressigsäure (TFA)in A.bidest
HPLC-Laufmittel B	0,1%	Trifluoressigsäure (TFA)in Acetonitril
HPLC-Derivatisierungslsg.	0,75µM	DTNB
		K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
	pH 7,6	
HSW	0,2×	SSC
	0,1% (w/v)	SDS

(Prä-)Hybridisierungslösung	30% (v/v)	Formamid
	1% (w/v)	SDS
	1 M	NaCl
	6% (w/v)	Polyethylenglykol (PEG 6000)
	250 µg/µl	gescherte Lachssperma-DNA)

Die Hybridisierungslösung enthielt außerdem
0,1 nM biotinyliertes Oligonukleotid (Sonde).

LB-Medium	1%	Bacto Tryptone (Difco)
	0,5%	Bacto Yeast Extract (Difco)
	1%	NaCl
	pH 7; autoklavieren	

Für die Herstellung von Festmedien
wurden 2% Agar eingewogen.

LB⁺-Medium	1%	Bacto Tryptone (Difco)
	0,5%	Bacto Yeast Extract (Difco)
	1%	NaCl
	0,2%	Maltose
	10 mM	MgSO ₄

pH 7; autoklavieren

LSW	2X	SSC
	0,1% (w/v)	SDS

Lysispuffer	2 M	NaCl
	0,2 M	Tris-Base
	50 mM	EDTA
	2% (w/v)	CTAB
	pH 8,0	

20XMOPS	0,4 M	MOPS
	0,1 M	Natriumacetat
	20 mM	Natrium-EDTA
	pH 7	

Neutralisierungslsg.	0,5 M	Tris-Base
	1,5 M	NaCl
	pH 7,4	

NZY-Medium	1%	NZ Amine(Casein Hydrolysat)
	0,5%	Bacto Yeast Extract (Difco)
	0,5%	NaCl
	0,2%	MgSO ₄ × 7H ₂ O
	pH 7,5; autoklavieren	
Für die Herstellung von Festmedien wurden 2% Agar eingewogen.		
5×PBS	685 mM	NaCl
	13,5 mM	KCl
	40,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	957,5 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4	
P/C/I	50% (v/v)	mit TE-Puffer gesättigtes Phenol
	48% (v/v)	Chloroform
	2% (v/v)	Isoamylalkohol
Proteinextraktionspuffer	100 mM	HEPES
	250 mM	Sorbitol
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	KCl
	pH 7,5; sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	
	vor Gebrauch frisch hinzufügen:	
1 mM	PMSF	
2 mM	DTT	
Resuspensionspuffer für Chloroplastenpräparation	10 mM	KH ₂ PO ₄
	300 mM	Saccharose
	0,1% (w/v)	BSA
	sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	
5×RNA-Auftragspuffer	50% (v/v)	Glycerol
	5X	MOPS-Puffer
	0,5% (w/v)	Bromphenolblau
RNA-Extraktionspuffer	8 M	Guanidinium-Hydrochlorid
	20 mM	MES
	20 mM	Natrium-EDTA
	pH 7,2	

Sarkosyllsg.	5%(w/v)	N-Lauroylsarcosin in A.bidest
10×SDS-EP	200 mM 25 mM 1% (w/v)	Glycin Tris-Base SDS
4×SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4% (w/v) pH 6,8	Tris-Base SDS
4×SDS-Trenngelpuffer	1,5 M 0,4% (w/v) pH 8,8	Tris-Base SDS
SM-Phagenpuffer	100 mM 10 mM 50 mM 0,01% (w/v) pH 7,5	NaCl MgSO ₄ Tris-HCl Gelatine
SOC-Medium	2% 0,5% 0,05% 20 mM 2,5 mM 10 mM pH 7; autoklavieren	Bacto Tryptone (Difco) Bacto Yeast Extract (Difco) NaCl Glucose KCl MgCl ₂
20×SSC	3 M 0,3 M pH 7,0	NaCl Natriumcitrat
50×TAE	5 M 2,5 M 125 mM pH 7,2	Tris-Base Natriumacetat Natrium-EDTA

10×TBE	1 M 0,9 M 25 mM pH 8,4	Tris-Base Borsäure Natrium-EDTA
10×TBS	0,2 M 1,5 M pH 7,5	Tris-HCl NaCl
10×TBST	0,2 M 1,5 M 0,05% (w/v) pH 7,5	Tris-HCl NaCl Tween 20
TCAD	gesätt. Lsg. 4 mg/ml	Trichloressigsäure Desoxycholat
TE	100 mM 10 mM pH 8,5	Tris-Base Natrium-EDTA
low TE	5 mM 0,5 mM pH 8,5	Tris-Base Natrium-EDTA
4×Trenngelbuffer, nativ	1,5 M pH 8,8	Tris-Base
Waschpuffer	1× 0,5% (w/v)	PBS SDS
Waschpuffer für Chloroplastenpräparation	50 mM 330 mM 5 mM 5 mM pH 7,2; sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	HEPES Sorbitol MgCl ₂ KCl
Waschlösung (Screening)	2× 0,2 M pH 7,5	SSC Tris-Base

Western Blockpuffer	5% (w/v) 1X	Magermilchpulver TBS
----------------------------	----------------	-------------------------

Western Transferpuffer	20% (v/v) 48 mM 39 mM 0,0375% (v/v)	Methanol Glycin Tris-Base SDS
-------------------------------	--	--

2.3.1. Antibiotika und sonstige Zusätze

Folgende Konzentrationen an Antibiotika¹ wurden für Bakterienkulturen verwendet:

Ampicillin 100 mg/l
Kanamycin 50 mg/l
Tetracyclin 25 mg/l

Auf Indikatorplatten für die α -Komplementation ("Blau/Weiß-Screening") wurden je 50 μ l folgender Vorratslösungen aufgetragen:

X-Gal 25 mg/ml in Dimethylformamid
IPTG 23 mg/ml in A.bidest

¹Festmedien, die Ampicillin enthielten wurden maximal 2 Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

2.4. Methoden im Umgang mit *Escherichia coli*

2.4.1. Verwendete Bakterienstämme

DH5 α	F ⁻ <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1</i> (ϕ 80dlacZ Δ M15)
M15[pREP4] (Qiagen [169])	<i>nal^S str^S rif^S thi⁻ lac⁻ ara⁺ gal⁺ mtl⁻ f⁻ recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i>
SOLR (Stratagene [61])	E14 ⁻ (<i>mcrA⁻</i>) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>sbcC recB recJ uvrC</i> <i>umuC::Tn5 (Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ^R [F' proAB</i> <i>lac^qZΔM15]^c</i>
TOP10 (Invitrogen)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)(ϕ 80dlacZ Δ M15) Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1</i> <i>nupG</i>
XL1-Blue (Stratagene [27])	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)]</i>
XL1-Blue MRF' (Stratagene [74])	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)]</i>

2.4.2. Verwendete DNA-Vektoren

pBluescript II SK ⁺	(Stratagene)
pCR4TOPO	(Invitrogen)
pGEM-T	(Promega)
pGEM-T easy	(Promega)
pFF19G:: <i>GFP</i>	(siehe [157])
pFF19G:: <i>RFP</i>	(siehe [157])
pQE-30	(Qiagen)

2.4.3. Bakterienanzucht und Bestimmung der Zelldichte

Die Zellanzucht in Flüssigkultur erfolgte bei 37°C unter Schütteln (180-200 U/min); Anzuchten auf Agarplatten wurden bei 37°C i.d.R. über Nacht inkubiert und danach bei 4°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte photometrisch im Zweistrahlphotometer (Hitachi U-2000) gegen entsprechendes klares Medium bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm.

2.4.4. Anlegen von Langzeitkulturen

Zur Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerolkulturen angelegt. Hierzu wurden Aliquots von Übernachtflüssigkulturen zu einer Endkonzentration von 25%(v/v) mit sterilem Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.5. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Übernackultur angeimpft und bis zu einer OD von ca. 0,6 im Schüttelinkubator bei 37°C und 180 U/min inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 4000 Xgin einem auf 4°C vorgekühlten Rotor (Beckman JA-14) pelletiert. Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen eiskaltem, sterilem A. bidest aufgenommen, mit 0,5 l A. bidest gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal mit 250 ml A. bidest und einmal mit 25 ml 10% Glycerol wiederholt. Danach wurde das Pellet in 2 ml 10% Glycerol resuspendiert und die Suspension in Aliquots von je 50 µl aufgeteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.6. Transformation

2.4.6.1. Elektroporation

Für die Transformation elektrokompetenter *Escherichia coli* wurde das „Genepulser II“-System (Biorad) verwendet. Die Elektroporation fand in Küvetten mit einer Spaltbreite von 1 mm statt; die Geräteeinstellungen waren wie folgt:

- Widerstand: 200 Ω
- Kapazität: 25 µ
- Spannung: 1,8 kV

Zu 50 µl auf Eis aufgetauter Bakteriensuspension wurden 10-200 ng Plasmid-DNA pipettiert, der Ansatz nach 30 s in die gekühlte Küvette überführt und sofort elektroporiert. Im Durchschnitt wurden Zeitkonstanten von $\tau=4,5$ ms gemessen. Die Bakterien wurden sofort in 1 ml SOC-Medium suspendiert und 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Von dem Ansatz wurden danach 10-250 µl auf Selektivagar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Einige der erhaltenen Kolonien wurden danach auf eine frische Platte überimpft und Übernackulturen (je 5 ml) angezogen um die erhaltenen Plasmide zu überprüfen.

2.4.6.2. Hitzeschocktransformation

Zu 50 µl auf Eis aufgetauter Bakteriensuspension wurden 10-200 ng Plasmid-DNA pipettiert, gemischt und der Ansatz 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Suspension genau 30 s in einen Heizblock bei 42°C gestellt und sofort wieder auf Eis überführt. Es wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und eine Stunde bei 37°C und 200 U/min geschüttelt. Von dem Ansatz wurden danach 10-250 µl auf Selektivagar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Einige der erhaltenen Kolonien wurden danach auf eine frische Platte überimpft und Übernachtskulturen (je 5 ml) angezogen um die erhaltenen Plasmide zu überprüfen.

2.4.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und nachfolgender Reinigung der DNA über Glasfasersäulen durchgeführt. Es wurden Kits der Hersteller Machery-Nagel ("Nucleospin") und Qiagen ("Qiaprep") verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Für die Gewinnung von Plasmid-DNA im „Mini“-Maßstab (bis ca. 25 µg) wurden jeweils 4 ml Übernachtskultur eingesetzt, für Isolierungen im „Midi“-Maßstab (bis ca. 300 µg) 50 ml Übernachtskultur.

2.5. DNA-Techniken

2.5.1. Konzentrationsbestimmung von DNA-haltigen Lösungen

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Eine OD von 1 entspricht dabei einer Konzentration von ca. 50 µg für doppelsträngige DNA bzw. 33 µg für Oligonukleotide. Eingesetzt wurde jeweils ein Aliquot der DNA-Lösung in einer Verdünnung von 1:250 in TE-Puffer. Die Messung fand in einem Zweistrahlphotometer gegen TE-Puffer als Referenz statt. Die Reinheit bzgl. Proteinkontamination wurde durch eine zweite Messung bei $\lambda=280$ nm überprüft. Das Verhältnis zwischen OD_{260} und OD_{280} sollte bei pH 8 zwischen 1,8 und 2,0 betragen.

2.5.2. Fällung und Umsalzen von DNA

Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 7,2) versetzt um eine Salzkonzentration von ungefähr 300 mM einzustellen. Danach wurde das Doppelte des Ausgangsvolumens an kaltem, absolutem Ethanol zugegeben und 30 min bei -20°C gefällt. Bei größeren Volumina an DNA-haltiger Lösung wurde alternativ durch Zugabe von einem Anfangsvolumen 2-propanol zur salzhaltigen Lösung und zehninütiger Inkubation bei Raumtemperatur oder auf Eis gefällt. Die DNA wurde anschließend durch zwanzigminütige Zentrifugation bei mindestens 10000 Xg und 4°C pelletiert. Das

Pellet wurde durch ein- bis zweimaliges Waschen mit 70 %igem Ethanol entsalzt, einige Minuten luftgetrocknet und in einem kleinen Volumen geeigneten Puffers rückgelöst.

2.5.3. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Zur Entfernung von Proteinen aus einer Nukleinsäurelösung wurde diese mit TE-Puffer auf ein Volumen von 400 µl eingestellt und mit demselben Volumen P/C/I einige Sekunden intensiv ausgeschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch einminütiges Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge bei 14000 U/min beschleunigt. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und ein weiteres Mal mit P/C/I ausgeschüttelt. Zur Entfernung von Phenolresten wurde die DNA-haltige wässrige Phase danach zweimal mit C/I extrahiert und wie unter 2.5.2 (s.S. 38) beschrieben gefällt.

2.5.4. Isolierung genomischer DNA aus *M. crystallinum*

Das Pflanzenmaterial wurde mit 7,5 ml/g FG vorgekühltem, mit 40 mM NaHSO₃ und 500 mg/g FG PVPP versetztem 1XExtraktionspuffer in einem Laborhomogenisator gründlich homogenisiert. Danach wurde der Ansatz über ein Nylonnetz mit 80 µm Porengröße filtriert und 20 min bei 750 Xg und 4°C zentrifugiert (Rotor: Beckman JA-14). Das Sediment wird in 1XExtraktionspuffer ohne NaHSO₃ mit abgeschnittener Pipettenspitze vorsichtig resuspendiert (1 ml Extraktionspuffer/5 g FG) und das Volumen bestimmt. Zu der Suspension wird 1 Volumen auf 65°C erwärmter Lysispuffer und 0,5 Volumen Sarkosyl-Lösung zugegeben. Der Ansatz wird durch zehnmaliges Invertieren des Zentrifugenröhrchens vorsichtig gemischt und 20-30 min bei 65°C inkubiert. Nach der Beendigung der Inkubation wird der Ansatz auf Eis auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 1 Volumen C/I 1 min bei Raumtemperatur geschwenkt und anschließend zur Trennung der Phasen 5 min bei 5000 Xg zentrifugiert (Heraeus Megafuge, Swingoutrotor). Der Überstand wird in ein durchsichtiges Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei 5000 Xg zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wird zuerst mit 1 Volumen Isopropanol und $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 7,2) durch zehnmaliges Invertieren des Röhrchens vorsichtig gemischt, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zur Sedimentierung der DNA bei 6000 Xg 30 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge, Swingoutrotor). Das Sediment wird zuerst zweimal mit 5 ml 70% Ethanol dann einmal mit absolutem Ethanol gewaschen und anschließend einige Minuten luftgetrocknet. Die gewonnene DNA wird schließlich über Nacht bei 4°C in einem geeigneten Volumen TE-Puffer gelöst.

2.5.5. Reinigung von DNA durch Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation

320 µl DNA-haltige Lösung wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und mit 660 µl 6,6 M CsCl-Lösung und 10 µl Ethidiumbromid-Vorratslösung versetzt. Wenn nötig wurde vorsichtig gemischt. Die fertige Gradientenlösung sollte eine Dichte von 1,55 g/ml

haben. Die Zentrifugation der Ansätze erfolgte über Nacht während 6-16 Stunden bei 100.000-120.000Xg und 15°C in einer Beckman „Optima TLX“-Tisch-Ultrazentrifuge mit einem „TLA 120.2“-Festwinkelrotor. Die fokussierte, ethidiumbromidgefärbte DNA-Bande wurde vorsichtig abpipettiert, mit 2 Volumen TE-Puffer verdünnt und durch vier- bis sechsmaliges Ausschütteln mit TE-gesättigtem Butanol ethidiumbromidfrei gewaschen. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde wie unter 2.5.2 (s.S. 38) beschrieben einer Isopropanol-Fällung unterworfen.

2.5.6. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Es wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen Stratagene und New England Biolabs jeweils mit den mitgelieferten Reaktionspuffersystemen verwendet. Für einen analytischen Verdau wurden 300 ng bis 2 µg, für einen präparativen Verdau bis zu 20 µg DNA eingesetzt. Der Ansatz enthielt weiterhin eine entsprechende Menge des zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers (Endkonzentration nach Herstellerangabe), eine geringe Menge BSA, wenn laut Hersteller erforderlich und zwischen 2 und 20 Enzymeinheiten der Restriktionsendonukleasen pro µg DNA. Zum Endvolumen, das je nach Reaktionsbedingungen zwischen 10 und 250 µl betrug, wurde jeweils mit A.bidest aufgefüllt. Die DNA-Konzentration im Reaktionsansatz betrug zwischen 100 und 200 ng/µl. Insbesondere bei Ansätzen, die mehrere Restriktionsenzyme enthielten, wurde darauf geachtet, daß die Endkonzentration an durch die eingesetzten Enzymlösungen eingebrachtes Glycerol nicht über 5% lag, um eine Herabsetzung der Schnittstellenspezifität durch „Sternaktivität“ zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte je nach Reaktionsbedingungen 2-10 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Nach Beendigung der Reaktion wurden –wenn nötig– die Restriktionsenzyme durch Erhitzen auf 65°C oder wie in Abschn. 2.5.3 (s.S. 39) beschrieben durch Phenol-Chloroform-Extraktion inaktiviert. Die DNA wurde anschließend entweder sofort analysiert oder einer Fällung unterworfen (s. Abschn. 2.5.2).

2.5.7. Ligation von DNA

Allgemein wurden zur Ligation 100-300 ng Vektor-DNA eingesetzt. Bei Ligationen, bei denen DNA mit glatten Enden bzw. T/A-Überhängen ligiert werden sollte, wurde ein 3 bis 5-facher molarer Überschuß an Insert-DNA zugegeben. Bei „blunt-end“-Ligationen wurde die Effizienz, soweit aufgrund der Sequenz des Inserts die Möglichkeit bestand, durch Zugabe einiger Enzymeinheiten der Restriktionsendonuklease erhöht, mit der der Vektor geschnitten worden war. Für „sticky-end“-Ligationen wurden äquimolare Mengen an Vektor und Insert verwendet. Sowohl Ligase als auch Reaktionspuffer wurden von den Herstellern Roche oder Promega bezogen und nach deren Angaben angewendet. Ebenso wurde das „TOPO-TA-Cloning“-Kit der Firma Invitrogen gemäß Herstellerangaben eingesetzt.

2.5.8. DNA-Gelelektrophorese

2.5.8.1. Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente betrug die Agarosekonzentration („ultra-PURE“, Firma Gibco BRL) zwischen 0,7 und 1,4% (w/v). Nach Aufkochen der Agarose in einem geeigneten Volumen 1XTAE-Puffer ließ man auf ca. 50°C abkühlen und goß sie in ein vorbereitetes Gelbett (Agagel-System, Firma Biometra; „Owl“, Firma Peqlab). Nach Erstarren des Agarosegels fand die Gelelektrophorese in 1XTAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 65-85 V statt.

2.5.8.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden native Polyacrylamidgele mit Konzentrationen zwischen 7 und 14% verwendet. Es wurden jeweils $\frac{1}{4}$ Volumen 4XTrenngelpuffer und je nach angestrebter Konzentration entsprechende Volumina einer Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung (Rotiphorese, Firma Roth, 30%/0,8%) und A.bidest zusammengegeben. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 5 µl TEMED und 30 µl APS-Gebrauchslösung gestartet, gemischt und zügig in eine vorbereitete Apparatur gegossen. Der Gellauf fand in vertikalen Minigelapparaturen (Biometra) in nativem 1XElektrophoresepuffer bei einer konstanten Spannung von 200 V statt.

2.5.8.3. Ethidiumbromid-Färbung

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Agarose- oder Polyacrylamidgele in eine Schale mit Ethidiumbromid-Färbelösung (10 mg/l) überführt, einige Minuten geschwenkt und danach in Wasser entfärbt. Die Visualisierung der DNA-Banden fand in einem Gel-Dokumentationssystem der Firma Herolab auf einem UV-Durchlichttisch bei $\lambda=254$ nm statt.

2.5.8.4. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Gelen

Bei der Extraktion von DNA-Fragmenten aus Gelen wurde darauf geachtet, daß die Schädigung der DNA beim Ausschneiden aus dem Gel, das auf dem UV-Durchlichttisch erfolgte möglichst gering gehalten wurde. Für Agarosegele kam das Gelextraktionskit der Firma Qiagen zum Einsatz und wurde gemäß Herstellervorgaben angewendet. Für Fragmente aus Polyacrylamidgelen wurde eine Elektroelution durchgeführt. Hierfür wurde das ausgeschnittene Gelstück in einen in 0,1XTBE äquilibrierten Dialyseschlauch überführt, der luftblasenfrei mit 0,1XTBE gefüllt und an beiden Enden mit Klammern abgeschlossen wurde. Die Elution fand während einer Stunde bei konstant 30 V in einer mit 0,1XTBE gefüllten Elektrophoresekammer statt, wobei das Gelstück auf der Kathodenseite des Dialyseschlauchs angeordnet war. Nach Umpolen der Elektroden für 30

Sekunden bei 100 V wurde die Lösung aus dem Inneren des Dialyseschlauchs abpipetiert und die enthaltene DNA gefällt.

2.5.9. Polymerasekettenreaktion

Die Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes war wie folgt:

Komponente	Konzentration im Ansatz
Templat	4pg-5ng/ μ l
sense-Primer	1 μ M
α -sense-Primer	1 μ M
dNTP-Gemisch	0,2 mM (0,05 mM je dNTP)
Reaktionspuffer	1X
MgCl ₂	1,25-2,5 mM
Taq-Polymerase	1 u/50 μ l

Als PCR-Programm wurde typischerweise folgendes verwendet:

- | | | | | |
|---------------------|-------|---------|--------------|---------------|
| 1. Denaturierung | 5 min | 94°C | (Vorzyklus) | |
| 2. Denaturierung | 30 s | 94°C | | ←
34X
→ |
| 3. Primer-Annealing | 45 s | 45-65°C | | |
| 4. Elongation | 1 min | 72°C | | |
| 5. Elongation | 5 min | 72°C | (Nachzyklus) | |

Es kamen drei unterschiedliche Typen von Thermocyclern zum Einsatz: Biometra Personalcycluser, Eurogentec Thermojet und Stratagene Robocycler. Da das Eurogentec-Gerät nicht mit einem heizbaren Deckel versehen war, mußten die Proben hier vor dem Programmstart mit Mineralöl überschichtet werden. Wenn die PCR-Bedingungen optimiert werden mußten, weil Spezifität oder Ausbeute unter Standardbedingungen nicht ausreichend waren, wurde als Reaktionspuffer die im Optiprime-Kit (Stratagene) enthaltene Auswahl eingesetzt um die Parameter Manganesium- und Kaliumkonzentration sowie pH-Wert zu variieren. Weiterhin wurde dann mitunter je $\frac{1}{10}$ Volumen der Zusätze Dimethylsulfoxid, Formamid und Glycerol zugegeben. Die „Primerannealing“-Temperatur wurde jeweils so gewählt, daß sie 2-3°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide lag. Die Schmelztemperaturen wurden dabei für kurze Primer, die aus weniger als 23 Basen bestanden, nach der Formel $T_m = 4n_{G/C} + 2n_{A/T}$ berechnet. Für längere Primer ist die Formel $T_m = 22 + 1,46(2n_{G/C} + n_{A/T})$ genauer. Beim Entwurf der Primer wurde darauf geachtet, daß sie eine möglichst geringe Komplementarität zu sich selbst und innerhalb eines Paares aus „sense“- und „ α -sense“-Primer aufwiesen. Um spezifischere Produkte zu erhalten wurde bei einigen Gelegenheiten auf „Touchdown“-PCR-Programme zurückgegriffen, bei denen zuerst ausgehend von 72°C einige Zyklen mit sukzessive niedrigerer „Primerannealing“-Temperatur bis zum Erreichen der endgültigen

tigen Temperaturparameter durchlaufen wurden. Für Polymerasekettenreaktionen, deren Produkte zur Expression in einen entsprechenden Vektor kloniert werden sollten, wurden *Taq/Pfu*-Polymerasegemische verwendet, um eine höhere Replikationsgenauigkeit zu erreichen.

2.5.9.1. Herstellung von biotinmarkierten Sonden

Um DNA-Fragmente als Sonden in der nichtradioaktiven Detektion bei Northern- und Southern Blots sowie bei der Durchmusterung von cDNA-Banken einzusetzen, wurden diese mit Biotin-16-dUTP (Roche, Mannheim) markiert. Die Markierung erfolgte mittels einer Polymerasekettenreaktion nach Standardbedingungen, wobei abweichend für 50 µl PCR-Ansatz 10 µl eines Nukleotidgemisches folgender Zusammensetzung zum Einsatz kamen:

Nukleotid	Anteile	Endkonzentration
dATP	2	0,25 mM
dCTP	2	0,25 mM
dGTP	2	0,25 mM
dTTP	1	0,125 mM
bio-16-dUTP	1	0,125 mM
Die Konzentration der einzelnen Vorratslösungen war 1 mM.		

Parallel zu dieser Markierungsreaktion wurde jeweils eine PCR durchgeführt, die eine normale Nukleotidmischung ohne Biotin-16-dUTP enthielt um die erfolgreiche Markierung anhand der unterschiedlichen Laufstrecken im Polyacrylamidgel kontrollieren zu können.

2.5.10. Southern Blot

Nach der Gelelektrophorese von je 7,5-15 µg restriktionsverdauter genomischer DNA (s. Abschn. 2.5.6) in einem 0,7%-Agarosegel (s. Abschn. 2.5.8) wurde dieses 8 min depuriniert (0,25 M HCl) um den Transfer großer Fragmente zu erleichtern, kurz in Wasser gespült, 20 min in Denaturierungslösung geschwenkt, und 15 min neutralisiert (s. Abschn. 2.3). Direkt vor dem Transfer wurde das Gel 10 min in 10XSSC äquilibriert. Der Transfer auf Nylonmembran erfolgte nach dem üblichen Verfahren mittels Kapillarkraft in 10XSSC. Als erstes wurde ein Streifen befeuchtetes Whatmanpapier so über eine Glasplatte gelegt, daß die Enden in ein darunter befindliches Pufferreservoir mit 10XSSC reichten. Darauf wurden in folgender Reihenfolge luftblasenfrei übereinander geschichtet: 3 mit Transferpuffer befeuchtete Whatmanpapiere, das umgekehrt gelegte Gel, drei weitere befeuchtete Whatmanpapiere, drei trockene Whatmanpapiere und ein ca. 2 cm dicker Stapel saugfähigen Papiers. Der Blotaufbau wurde mit 3 g/cm² (Glasplatten) be-

schwert. Nach dem Transfer über Nacht wurde die DNA in einem UV-Crosslinker („Stratalinker“, Stratagene) auf der Membran fixiert. Nach fünfundvierzigminütiger Prähybridisierung fand die Hybridisierung mit einer biotinmarkierten DNA-Sonde über Nacht statt. Beide Inkubationen wurden bei 42°C durchgeführt. Die nichtradioaktive Detektion erfolgt nach [96] (modifiziert).

Zuerst wurde die Membran zweimal 15 min bei Raumtemperatur mit „Low Stringency Wash“ (LSW) gewaschen, dann einmal 45 min bei 50-60°C, je nach Spezifität der Sonde mit „High Stringency Wash“ (HSW). Die Temperatur dieses Waschschruttes wurde so gewählt, daß für die Bindung der Sonde an ein DNA-Fragment eine Homologie von mindestens 75% zwischen beiden vorliegen mußte. Es folgten zwei fünfminütige und eine halbstündige Inkubation mit Blockpuffer bei Raumtemperatur. Daran schloß sich eine Inkubation von 30 min Länge bei Raumtemperatur in Konjugatpuffer (Streptavidin-Konjugat mit alkalischer Phosphatase 1:6000 in Blockpuffer) und eine weitere fünfminütige Inkubation in Blockpuffer bei Raumtemperatur an. Nach drei Waschschrutten von je 5 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer und zwei fünfminütigen Äquibrierungsschrutten in Assaypuffer wurde die Membran gleichmäßig mit Substratpuffer (CDP-Star-Vorratslösung, 1:100 in Assaypuffer, Perkin-Elmer) besprüht und überschüssiger Substratpuffer kurz darauf durch auflegen auf ein mit Assaypuffer angefeuchtetes Whatmanpapier abgezogen. Auf die in durchsichtige Plastikfolie eingeschweißte Membran wurde darauf ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser nach Expositionszeiten zwischen 1 h und einem Tag entwickelt.

Die Sonde ließ sich durch dreißigminütige Inkubation in einer „Strip“-Lösung, bestehend aus 50% Formamid in 2XSSC bei 65°C und nachfolgendem fünfminütigem Schwenken in einer kochenden Lösung aus 0,1XSSC und 0,1% SDS entfernen, so daß die Membran ein- bis zweimal wiederverwendet werden konnte.

2.5.11. DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firma Seqlab (Göttingen) nach Sanger ([128], modifiziert) durchgeführt.

2.5.12. Durchmustern einer cDNA-Bank

Es stand eine cDNA-Bank aus Blattmaterial von *Mesembryanthemum crystallinum* zur Verfügung (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Cushman). Die Bank bestand aus λ -Phagen (Uni-ZAP XR-System, Stratagene).

2.5.12.1. Durchmustern einer cDNA-Bank mit DNA-Sonden

Infektion von Wirtszellen Es wurde eine XL1-Blue MRF'-Kultur in 50 ml LB⁺ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden pelletiert und in 10 mM MgSO₄ mit einer OD₆₀₀ von 0,5 resuspendiert. Aliquots von 600 μ l dieser Suspension

wurden sodann mit jeweils 50.000 pfu der cDNA-Bank versetzt und 15 min bei 37°C langsam geschüttelt.

Ausbringen auf NZY-Festmedium Die infizierte Bakteriensuspension wurde zu je 8 ml bei 40°C flüssiggehaltenem NZY-Topagar (0,7% Agar in NZY-Medium) pipettiert und sofort auf eine vorgewärmte NZY-Agarplatte (Ø 15 cm) gegossen. Nach Erstarren des Topagars wurden die Platten invertiert und bei 37°C einige Stunden stehen gelassen, bis sich ausreichend große, jedoch noch nicht konfluente Plaques gebildet hatten. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Platten auf 4°C überführt und bis direkt vor der Weiterverarbeitung gekühlt gelagert.

Transfer auf Nylonmembran Es wurden je zwei Nylonmembranen pro Platte angelegt, die erste Membran wurde 2 min auf die Topagarschicht aufgelegt, die zweite die doppelte Zeit. Dabei wurde durch Durchstechen der Membranen an drei Stellen sichergestellt, daß deren Orientierung nachvollziehbar blieb. Die von der Oberfläche vorsichtig abgezogenen Membranen wurden zuerst 2 min in Denaturierungslösung, dann 5 min in Neutralisierungslösung und zuletzt 30 s in Waschlösung geschwenkt. Anschließend wurden die Membranen auf Whatmanpapier getrocknet und die DNA im UV-Crosslinker fixiert.

Detektion und Vereinzeln Hybridisierung mit biotinylierten DNA-Sonden und Detektion wurde wie in Abschnitt 2.5.10 (s.S. 43) beschrieben durchgeführt. Die entwickelten Röntgenfilme wurden ausgeschnitten und die Abbilder jeweils beider Membranen einer Platte in der richtigen Orientierung zur Deckung gebracht. Signale in ausreichender Stärke, die auf beiden Filmen zu erkennen waren, wurden markiert und die entsprechende Stelle im Topagar der Platte wurde ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer mit 20 µl Chloroform extrahiert. Mit 10-20 µl der so erhaltenen angereicherten Phagensuspension wurden wiederum Wirtszellen infiziert und der ganze Vorgang so oft wiederholt, bis sich ein Einzelphage kontaminationsfrei isolieren ließ.

Anlegen eines „High Titer Stocks“ Mit 100 µl Eluat eines Einzelphagen wurden 200 µl Wirtszellen infiziert und in Topagar auf eine NZY-Platte (Ø 10 cm) ausgebracht. Nach ausreichender Plauebildung wurde die Platte mit 4 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4°C gelagert.

2.5.12.2. *In vivo* Exzision

Das Uni ZAP-System bietet den Vorteil, daß die klonierte cDNA sich direkt ohne weitere Subklonierung aus dem Phagen als pBluescript-Phagemide erhalten läßt. Hierbei wird die Biologie des Phagen M13 ausgenutzt. Die Exzision erfolgt durch Überinfektion

von Wirtszellen, die zuvor mit dem rekombinanten λ -Phagen infiziert wurden mit einem f1-Helferphagen [135]. 200 μ l XL1-Blue MRF'-Wirtszellen mit einer OD_{600} von 1 wurden mit dem halben Volumen „High Titer Stock“ (s. Abschn. 2.5.12.1) und 1 μ l „ExAssist“-Helferphagensuspension gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 5 ml NZY-Medium zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 37°C mit 150 U/min geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch eine Hitzebehandlung bei 70°C abgetötet und der Ansatz 15 min bei 100 Xg zentrifugiert um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand enthielt den ausgeschnittenen pBluescript-Phagemid-Vektor mit der gewünschten cDNA als Insert, verpackt in filamentöse Phagenpartikel. Diese wurden wiederum zur Infektion von 200 μ l SOLR-Zellsuspension eingesetzt ($OD_{600}=1$). Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C wurden 300 μ l NZY-Medium zugegeben, weitere 45 min auf 37°C gehalten und 200 μ l des Ansatzes auf Selektivagar ausplattiert.

2.5.13. RACE-Technik

Zur Vervollständigung partieller cDNA-Klone in 5'- und 3'-Richtung, die zum Beispiel durch RT-PCR mit Consensus-Primern erhalten wurden, wurde das „Generacer“-Kit der Firma Invitrogen eingesetzt. Es wurde von 5 μ g Gesamt-RNA ausgegangen, die mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) isoliert wurde. Um die Wahrscheinlichkeit unvollständige Produkte zu erhalten zu minimieren, wird bei diesem System zuerst alle mRNA dephosphoryliert, die nicht mehr über eine intakte CAP-Struktur verfügt, damit diese in der nachfolgenden Ligationsreaktion nicht mehr als Substrat dienen kann. Danach werden alle noch vorhandenen CAP-Strukturen mit einer saueren Phosphatase aus *N. tabacum* hydrolysiert, wobei ein Phosphatrest am 5'-Ende der mRNA verbleibt. Nun wird ein Oligo-Ribonukleotid an alle phosphorylierten mRNA-Moleküle ligiert, dessen Sequenz später als Bindestelle für PCR-Primer dienen kann. Für die folgende Reverse Transkription wird ein Oligo-dT-Primer eingesetzt, der in 5'-Richtung mit einem „Anker“-Oligonukleotid versehen ist, das nachfolgend ebenfalls als Bindestelle für PCR-Primer fungieren soll. Durch den Einsatz von Primerpaaren, die jeweils in den durch Oligo-Ribonukleotid bzw. Oligo-dT-Primer angefügten bekannten „Anker“-Sequenzen und dem bereits bekannten Sequenzbereich binden, können nun die unbekannt Sequenzbereiche in 5'- und 3'-Richtung amplifiziert werden. Um spezifischere Produkte zu erhalten wird hierfür eine „nested PCR“ eingesetzt, bei der aus einem primären Produktgemisch durch den Einsatz eines weiter „innen“ bindenden zweiten Primerpaars das gewünschte Produkt mit hoher Spezifität und Ausbeute reamplifiziert wird.

Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die jeweils aus den zweiten Polymerasekettenreaktionen erhaltenen Produkte wurden über Glasfasersäulen gereinigt, in den PCR4TOPO-Vektor ligiert und wie unter 2.4.6.2 (s.S. 38) beschrieben in eine Hitzeschocktransformation von *Escherichia coli* -Top10 eingesetzt.

2.5.14. Verwendete Primer

Folgende Oligonukleotide wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit als PCR-Primer verwendet. Sofern am 5'-Ende Modifikationen zur Einführung von Schnittstellen in die Amplifikate vorhanden waren, beziehen sich die angegebenen Längen und Schmelztemperaturen nur auf den bindungsrelevanten Teil des Primers.

Name	Sequenz	T_m	Länge
apxrfp2rv	5'-TATACTGCAGGCATTTCTGTGCTGAACCT-3'	54.0°C	18
asxchlfw	5'-ACTCCTCTGGCAAGAAAGAGC-3'	64.0°C	21
asxchlr	5'-ACTTTGATCTTGAAGCCGTAGC-3'	64.0°C	22
asxchlr2	5'-GTATCATAGCAAACATTCCTGTC-3'	68.7°C	23
asxcodsn	5'-AACCCCTCAAGTTTGATAATTCC-3'	68.7°C	23
asxcodas	5'-GTCTTAACAACAGTGACGAGCG-3'	66.0°C	22
cat1	5'-GTIAARTTYCAYTGGAAARCC-3'	51.0°C	20
cat2	5'-GGIAHSAIRTCYTCDDGGCC-3'	54.0°C	19
czsodfor	5'-TGTAACCTGGAAATGTCTCGGG-3'	62.0°C	21
czsodrev	5'-AGATCATCAGGATCAGCATGG-3'	62.0°C	21
czsqrtrv	5'-CAATACTCTTCTGCAAACATGG-3'	62.0°C	22
ecs5out	5'-GTACATGGGTACATCAAGAGCATAAT-3'	74.6°C	26
ecs5nest	5'-CAGACCAAATATGGCTTCTCATACT-3'	74.6°C	26
gpx1	5'-GTIYTBHTIATYGTIAAYGTNGC-3'	62.9°C	23
gpxrev	5'-CATAATTTTCAATAACCAACC-3'	54.0°C	21
gpxrv2	5'-GAAGTTGTTGGTGCATAACG-3'	58.0°C	20
gpxpqefw	5'-TCGATAGGTGGATCCATGGCTAGCCAGTCCACC-3'	58.0°C	18
gpxqrtrv	5'-TAGACAGGTCTGCAGGGTCTTCATGAGGTGCCG-3'	58.0°C	18
gpxqrtrfw	5'-AGCCCTTTGTCTCAGTTTCGC-3'	64.0°C	21
gpxqrtrv	5'-GAAAGCACAATGAACGAAATAGG-3'	68.7°C	23
gpxqrD2	5'-TAGTATGGCGCGCCATGGGATCAAATGGAACCTTCAC-3'	62.0°C	22
gr3	5'-GGITAYATYKIBTIGARTTYGC-3'	64.3°C	23
gr4	5'-SCYTCCATIARIGCVACDGG-3'	56.0°C	20
gshs1	5'-ACIAAGAARATYCAICARG-3'	46.0°C	19
gshs2	5'-TTIGGRAAIATYCTYTGC-3'	44.0°C	18
gs5out	5'-GGATGTATGCAGCAGCGTCTTCTT-3'	74.6°C	24
gs5nest	5'-CTCCACAGGCCAGCAAAGCATTTCC-3'	78.9°C	25
gs3out	5'-GCTGGCCTGTGGAGCTTAGATGAT-3'	76.0°C	24
gs3nest	5'-ACAGAAGAAGACGCTGCTGCATACA-3'	76.0°C	25
mdhar3	5'-CCIGARCCNTGGTGYATGCC-3'	61.0°C	20
mdhar4	5'-CCNACRTRRTCICCIKARAAYTGC-3'	68.7°C	24
mdho5	5'-AAGGTGGCTACATCACCAACAGCAT-3'	76.0°C	25

Name	Sequenz	T_m	Länge
mdhi5	5'-CACCAACGCCAACCACCACAATATCA-3'	78.9°C	26
mdhi3	5'-ATATGACTACCTACCATACTTCTATTCT-3'	90.6°C	28
mdho3	5'-ACCATGCCCGTAAATCTGCAGAACA-3'	77.5°C	25

R	[A, G]	Y	[C, T]	M	[A, C]
K	[G, T]	S	[C, G]	H	[A, T, C]
B	[G, T, C]	D	[G, A, T]	N	[A, T, G, C]
V	[A, G, C]	W	[A, T]	I	dInosin

Tab. 2.3.: IUB-Abkürzungen für Degenerationsstellen in Primern

2.6. RNA-Techniken

2.6.1. Isolierung von Gesamt-RNA

2.6.1.1. RNA-Isolierung nach Logemann

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Logemann et al [94]. Das Pflanzenmaterial wurde im Mörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen und in stickstoffgekühlte Eppendorfgefäße gegeben. Pro Gramm Frischgewicht wurden daraufhin 2 ml Extraktionspuffer mit 50 µl β-Mercaptoethanol/ml Puffer dazugegeben und bis zum Auftauen des Pulvers auf einem Vortexer intensiv durchmischt. Bei Raumtemperatur wurde dann ca. 1 Volumen Phenol (Aqua-Roti-Phenol, Roth) zugegeben und wiederum gut gemischt. Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 15.000 Xg in einer Tischzentrifuge wurde der wässrige Überstand mit ca. 1 Volumen P/C/I ausgeschüttelt, nochmals zentrifugiert und noch ein bis zweimal mit C/I ausgeschüttelt um Phenolreste zu entfernen. Der Überstand wurde mit $\frac{1}{5}$ Volumen 1 M Essigsäure und $\frac{3}{4}$ Volumen vorgekühltem absolutem Ethanol versetzt und die Nukleinsäuren eine Stunde bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch eine halbstündige Zentrifugation bei 4°C und 15.000 Xg pelletiert, zweimal mit vorgekühlter 3 M CH₃COONa-Lösung (pH 5,2) und danach zweimal mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Der Alkohol wurde möglichst vollständig abpipettiert und das verbliebene Pellet einige Minuten bei 37°C luftgetrocknet. Je nach geplanter Anwendung wurde die erhaltene RNA dann in Formamid oder DEPC-Wasser 20 min bei 65°C gelöst. Die zu erwartenden Ausbeuten lagen bei 50-150 µg/g FG.

2.6.1.2. RNA-Isolierung mit RNEasy-Kit

Für Anwendungen bei denen es auf hochreine RNA und weniger auf hohe Ausbeuten ankommt wurde das RNEasy-Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Jeweils ca. 250 µg im

Mörser unter Flüssigstickstoffkühlung pulverisiertes Pflanzenmaterial wurde strikt nach Herstellerprotokoll unter Verwendung des mitgelieferten Extraktionspuffers „RLT“ aufgearbeitet. Die erhaltene Gesamt-RNA war von sehr guter Qualität; die Ausbeuten lagen in der Regel bei 30-80 µg/g FG.

2.6.2. Fällung von RNA

Zu der RNA-haltigen Lösung wurde $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M CH₃COONa-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Volumen eiskalten absoluten Ethanols gegeben und die enthaltene RNA mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Alternativ wurde zu der salzhaltigen Lösung 1 Volumen 2-propanol gegeben und 15 min bei Raumtemperatur gefällt oder die salzfreie Lösung mit 12 M Lithiumchloridlösung auf 2-3 M LiCl eingestellt. Die Fällung erfolgt in letztem Fall eine Stunde auf Eis. Die Zentrifugation wurde jeweils in einer gekühlten Tischzentrifuge 30 min bei 15.000 Xg durchgeführt und das Pellet anschließend zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, von Ethanolresten befreit und in einem adäquaten Volumen DEPC-Wasser aufgenommen.

2.6.3. Konzentrationsbestimmung von RNA-haltigen Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von RNA-haltigen Lösungen wurde wie unter 2.5.1 (s.S. 38) für DNA beschrieben durchgeführt. Eine optische Dichte von 1 bei $\lambda=260$ nm entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml.

2.6.4. RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Gelelektrophorese fand in Agarosegelen wie unter 2.5.8 (s.S. 41) für DNA beschrieben statt, mit dem Unterschied, daß in diesem Fall TBE statt TAE als Elektrophoresepuffer eingesetzt wurde und auf RNase-Freiheit des verwendeten Gel-Kamms geachtet wurde.

2.6.5. Northern Blot

5-20 µg Gesamt-RNA, gelöst in 13,7 µl Formamid oder DEPC-Wasser wurden mit 6,3 µl eines Auftragspuffers, bestehend aus 3,3 µl Formaldehyd(37% in Wasser), 1 µl 20XMOPS, 0,1 µl Ethidiumbromidvorratslösung und 2 µl RNA-Auftragspuffer gemischt, 5 min bei 65°C erhitzt und bis zum Beladen des Gels auf Eis aufbewahrt. Das verwendete Gel war ein 1,4%iges denaturierendes Agarosegel, das 6% (v/v) 37%ige Formaldehyd-Lösung enthielt und mit 1XMOPS angesetzt war. Die Elektrophorese fand in 1XMOPS als Laufpuffer bei konstant 80 V Spannung statt. Der anschließende Transfer der aufgetrennten RNA auf Nylonmembran und die nichtradioaktive Detektion fand wie unter 2.5.10 (s.S. 43) beschrieben statt.

2.6.6. cDNA-Synthese und RT-PCR

2.6.6.1. cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden 5 µg Gesamt-RNA gelöst in 5 µl DEPC-Wasser eingesetzt. Sollte die cDNA zur Durchführung von Expressionsanalysen verwendet werden, wurden eventuelle DNA-Verunreinigungen der eingesetzten RNA vorher durch DNase abgebaut. Hierzu wurde pro µg Gesamt-RNA 1 U DNase I (Gibco BRL oder Promega) im entsprechenden, vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 25 mM NaEDTA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 5 mM gestoppt und die RNA nach Extraktion mit P/C/I ethanolisch gefällt und in einem adäquaten Volumen DEPC-Wasser aufgenommen. Diese Lösung wurde versetzt mit 100 pmol oligo-dT-Primer (18mer), 20 U RNase-Inhibitor („RNasOUT“, Gibco BRL) und auf ein Volumen von 12,5 µl mit A.bidest aufgefüllt. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurde der Ansatz danach 10 min auf 70°C erhitzt und auf Eis gestellt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden 10 nmol dNTP-Mischung (2,5 nmol je Nukleotid), 100 nmol Dithiothreitol und 2 µl 5XReaktionspuffer (Promega) zugegeben, auf 18,5 µl mit A.bidest aufgefüllt und nach zwei Minuten Inkubation bei 45°C 300 U MMLV-RT (Promega) hinzugefügt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 20 µl. Nach einer Stunde bei 45°C wurde die Reverse Transkriptase durch zehnmütiges Erhitzen auf 94°C inaktiviert, die restliche RNA durch Inkubation mit 500 ng RNaseA beseitigt und der Ansatz durch Fällung oder unter Verwendung eines PCR-Reinigungskits mit Glasfasersäulen (Qiagen) gereinigt.

2.6.6.2. RT-PCR

Für die Amplifikation unbekannter DNA-Fragmente aus cDNA wurden degenerierte Primer eingesetzt, deren Sequenz aus dem Alignment bekannter Proteinsequenzen anderer Spezies abgeleitet wurde. Als Templat wurden Verdünnungen (1:1000 bis 1:10) von cDNA-Präparationen verwendet, die wie unter 2.6.6.1 (s.S. 50) beschrieben hergestellt wurden. Die PCR wurde wie unter 2.5.9 (s.S. 42) beschrieben durchgeführt und die Bedingungen optimiert, bis ein hinreichend spezifisches Produkt erhalten wurde, das kloniert werden konnte.

Alternativ zur Durchführung der RT-PCR in zwei getrennten Reaktionsansätzen wurden mitunter beide Schritte nacheinander in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Hierzu wurde das „Thermoscript“- oder „Superscript RT-PCR One-Step“ Kit (Gibco BRL) verwendet. Die Reaktionen wurden in der Regel in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt; die Komponenten wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Komponente	Konzentration im Ansatz
Gesamt-RNA	2-30 ng/μl
sense-Primer	0,2-0,5 μM
α-sense-Primer	0,2-0,5 μM
Reaktionspuffer	1X
dNTP-Gemisch	0,2 mM (0,05 mM je dNTP) ^a
MgSO ₄	1,2-1,75 mM ^b
RNase-Inhibitor	1 u/μl
RT- <i>Taq</i> -Mischung	1 u/50 μl

^aim Reaktionspuffer enthalten

^b1,2 mM im Reaktionspuffer enthalten, evtl. durch Zugabe entsprechender Menge 50 mM MgSO₄-Lsg. erhöht.

Als PCR-Programm wurde für die „One-Step“-RT-PCR folgendes verwendet:

1. RT-Reaktion	30 min	45-65°C	
2. Denaturierung	5 min	94°C (Vorzyklus)	
3. Denaturierung	30 s	94°C	← 19-29X
4. Primer-Annealing	45 s	45-65°C	
5. Elongation	1 min	72°C	→
6. Elongation	5 min	72°C (Nachzyklus)	

2.6.7. *In vitro*-Transkription

Für die *In vitro*-Transkription wurde das „Riboprobe“-Kit der Firma Promega eingesetzt. Als Templat dienten Konstrukte auf Basis des pGEM-T-Vektors (Promega), der die viralen Promotoren T7 und SP6 auf den beiden Seiten der MCS enthält. Durch Sequenzierung wurde jeweils ermittelt in welcher Orientierung das Insert im Vektor vorlag, um die richtige Polymerase auswählen zu können. Um zu verhindern, daß die *in vitro*-Transkription über das Ende des Inserts hinaus stattfand, wurde das Plasmid direkt hinter diesem mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease geschnitten. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μl nach folgendem Schema durchgeführt:

Komponente	Konzentration
linearisiertes Templat	20 mM
Ribonukleotid-Mischung	0,5 mM jeweils
DTT	10 mM
„Transcription Optimized Buffer“	1X
RNaseIn Ribonukleaseinhibitor	1 u/μl
RNA-Polymerase	0,4 u/μl

Der Ansatz wurde 1½ Stunden bei 38°C inkubiert, danach wurde zur Entfernung der

Templat-DNA 1 u/μl RQ1-DNase hinzugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der Proteine wurde anschließend mit Phenol/CHCl₃ extrahiert und der Ansatz einer ethanolischen Fällung unterworfen (s. Abschn. 2.5.3 und 2.6.2 auf S. 39 und S. 49).

2.6.8. Real Time PCR

Real Time-PCR-Analysen wurden mit dem iCycler der Firma BioRad durchgeführt. Als Fluorophor kam SYBR-Green zum Einsatz, zur Kalibration der Optik enthielten außerdem alle Ansätze die gleiche Menge des Fluorophors FITC. Als Templat wurden gleiche Mengen (je 1 μl) 1:50 verdünnter cDNA-Lösungen eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden analog zu Abschnitt 2.5.9 angesetzt. Jedoch wurde um Komplexierungsverluste durch SYBR-Green zu kompensieren eine höhere Mg²⁺-Konzentration von 3 mM eingesetzt. Um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten wurden die gemeinsamen Komponenten so weit wie möglich in größeren Volumina vorpipettiert und die Einzelansätze aus diesem „Mastermix“ aliquotiert. Zum Mengenabgleich wurden jeweils parallel Reaktionen mit Primern gegen β-Actin durchgeführt. Die Spezifität der gebildeten Produkte wurde jeweils direkt im Anschluß an die PCR mittels Schmelzpunktanalyse überprüft.

2.7. Protein-Techniken

2.7.1. Präparation löslicher Proteine aus *M.crystallinum*

2.7.1.1. Gewinnung von Gesamtprotein

Das Pflanzenmaterial wurde unter Flüssigstickstoffkühlung zu einem feinen Pulver gemörsert. Jeweils 200 mg wurden mit 750 μl Proteinextraktionspuffer versetzt und bis zum Auftauen auf einem Vortexer intensiv durchmischt. Die Probe wurde danach erneut in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach dem Auftauen bei 4°C 20 min mit 15.000 Xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.1.2. Gewinnung cytosolischer Proteine

Frisches Pflanzengewebe wurde mit eiskaltem Extraktionspuffer im Mörser homogenisiert und anschließend durch eine Nylongaze mit 80 μm Porengröße filtriert. Das Filtrat wurde 15 min in einer gekühlten Zentrifuge bei 15.000 Xg zentrifugiert. Vom erhaltenen Überstand wurde ein Aliquot 30 min in einer Ultrazentrifuge (Optima, Beckman) bei 500.000 Xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.1.3. Gewinnung chloroplastidären Proteins

2,5 g Blattmaterial wurden mit 20 ml eiskühlem Extraktionspuffer für Chloroplastenpräparation gemörsert und das Homogenisat durch eine doppelte Lage Nylongaze mit einer Porengröße von 80 μm filtriert. Nach einer vierminütigen Zentrifugation bei 1.600 $\times\text{g}$ und 4°C in einem Beckman JS-13.1-Rotor wurde das Pellet mit einem Pinsel vorsichtig in je 2,5 ml Resuspensionspuffer resuspendiert. Auf vorbereitete Percoll-Dichtegradienten (1,5 ml 80% Percoll mit 8,5 ml 40% Percoll überschichtet, jeweils hergestellt aus Percollvorratslösung durch Verdünnen mit 2 \times Chloroplastenextraktionspuffer) wurden mit einer Pasteurpipette je 1,25 ml der Suspension aufgetragen. Die Gradienten wurden 10 min bei 2.500 $\times\text{g}$ und 4°C zentrifugiert (Rotor JS-13.1); der Rotor wurde danach langsam auslaufen gelassen. Die Interphase aus intakten Chloroplasten an der Grenze zur 80% Percollphase wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und dreimal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die Resuspension nach den einminütigen Zentrifugationsschritten fand hierbei wieder mit einem Pinsel statt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Pellets in je 1 ml Waschpuffer aufgenommen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Chloroplasten wurden daraufhin bei 2.500 $\times\text{g}$ pelletiert und die Überstände verworfen. Für die anschließende Western Blot-Analyse wurden die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in 85°C heißem 2 \times Rotiload-Auftragspuffer aufgenommen.

2.7.2. Fällung von Proteinen

2.7.2.1. Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Zu einer Proteinprobe wurde $\frac{1}{9}$ Volumen TCAD gegeben und gut gemischt. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wurde die Probe 30 min bei 4°C mit 15.000 $\times\text{g}$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 90% eiskaltem Aceton gewaschen und kurz luftgetrocknet um überschüssiges Aceton zu entfernen. Das Pellet wurde anschließend in einem geeigneten Puffer resuspendiert (z.B. Proteinauftragspuffer 2 \times Rotiload, Roth) 5 min auf 85°C denaturiert und bei -20°C gelagert.

2.7.2.2. Proteinfällung mit Aceton

Die Fällung mit Aceton ist gegenüber der TCAD-Fällung schonender, jedoch weniger selektiv. Bei Proben mit hohem Salzgehalt ist mit starken Verunreinigungen im Pellet zu rechnen. Zu einer Proteinprobe wurde $\frac{1}{4}$ Volumen eiskaltes Aceton gegeben, gemischt und eine Stunde bei -20°C gefällt. Nach einer halbstündigen Zentrifugation bei 15.000 $\times\text{g}$ und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 90% eiskaltem Aceton gewaschen. Nach Entfernen des überschüssigen Acetons wurde das Pellet in einem geeigneten Puffer aufgenommen.

2.7.3. Konzentrationbestimmung proteinhaltiger Lösungen

Die Proteinkonzentration einer wässrigen Lösung wurde mit Hilfe der „Protein-Assay-Lösung“ (Biorad) bestimmt. Hierbei handelt es sich um den Protein-Nachweis nach Bradford [20]. Die Analysen wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Zur 1:5 verdünnten Assay-Lösung wurden jeweils 5-50 μ l Proteinlösung gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei $\lambda=595$ nm in einem Zweistrahlphotometer gegen einen proteinfreien Blindwert gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand einer parallel dazu mit Rinderserumalbumin angesetzten Eichreihe ermittelt.

2.7.4. Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen

2.7.4.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese [90]. Es wurde ein Tris/Glycin-Puffersystem (10XSDS-EP), das für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 140 kDa geeignet ist verwendet. Alle Sammelgele wurden mit 4,5% Acrylamid gegossen, die Prozentigkeit der Trenngele lag zwischen 9 und 14%. Die Gele wurden mit SDS-Sammel- bzw. Trenngelpuffer wie unter 2.5.8.2 (s.S. 41) beschrieben hergestellt, wobei in diesem Fall zuerst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach dessen vollständiger Polymerisation wurde das Sammelgel gegossen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Rotiload-Auftragspuffer (Roth) versetzt und 5 min bei 90°C denaturiert. Nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile wurde das Gel beladen und eine Spannung von 100 V angelegt. Nachdem die Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf konstant 200 V erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel weiterverarbeitet.

2.7.4.2. Coomassie-Färbung

Die Färbung der Polyacrylamidgele fand mit Coomassie-Färbelösung für 30 min bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht bei langsamem Schwenken statt. Nach dem Färben wurde das Gel solange in Entfärbelösung inkubiert, bis ein ausreichender Kontrast erreicht wurde. Zur Aufbewahrung wurden die entfärbten Gele in Lagerungslösung überführt und nach frühestens 30 min Inkubation zwischen zwei Cellophanfolien in einen Trockenrahmen eingespannt. Die Trocknung fand einige Stunden bei 50°C in einem Trockenschrank statt.

2.7.5. Western Blot

“Semi-dry“ Transfer Für Westernblot Analysen wurden 10-15 μ g Protein je Spur geladen und in einem SDS-Polyacrylamidgel wie unter 2.7.4.1 (s.S. 54) beschrieben

elektrophoretisch getrennt. Das Trenngel wurde anschließend zweimal für 10 min in das Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurden sechs Whatman3MM-Filterpapiere auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und ebenfalls mit Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde auf die gleiche Größe zugeschnitten, kurz mit Methanol benetzt, mit A.bidest abgespült und bis zum Gebrauch in Transferpuffer aufbewahrt. Der Transfer erfolgte in einer Semi-dry Elektroblob-Apparatur (Transblot SD, Biorad), wobei Membran und Gel zwischen je drei Whatmanpapieren zu liegen kamen. Es wurde darauf geachtet, daß der Aufbau luftblasenfrei war. Die Membran befand sich dabei auf der Seite der Graphit-Anode, das Gel auf der Seite der Stahl-Kathode, so daß der Transfer der SDS-beladenen Proteine im elektrischen Feld von Kathode nach Anode erfolgen konnte. Es wurde ein konstanter Strom von von $3,5 \text{ mA/cm}^2$ eingestellt und die Spannung auf 15 V limitiert. Nach 35 min wurde der Transfer abgebrochen und die Membran weiterverarbeitet.

Detektion Nach dem Transfer wurde die Membran zuerst zweimal für 5 min in TBST gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation in Western Blockpuffer bei Raumtemperatur unter langsamem Schütteln. Die Blocklösung wurde abgegossen und die Membran über Nacht bei 4°C oder eine Stunde bei Raumtemperatur in Antikörperlösung (primärer Antikörper 1:5.000-1:20.000 in 5% BSA, 0,02% NaN_3) geschwenkt. Zum Einsatz kam hier ein gereinigtes (s. Abschn. 2.7.6) Antiserum gegen APX1. Danach wurde die Membran zweimal mit TBST gespült und dreimal je 5 min mit TBST gewaschen. Für die Detektion wurde eine 1:20.000-Verdünnung des sekundären Antikörpers in Western Blockpuffer verwendet. Der sekundäre Antikörper war gegen Kaninchen-IgG gerichtet und an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ("Goat anti-rabbit HRP", Pierce). Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte eine Stunde. Es folgten zwei Spülschritte mit TBST und drei fünfminütige Waschschrte mit TBS. Substrat- und Verstärkerlösung ("stable peroxide" und „enhancer“, „Supersignal Ultra“-Kit, Pierce) wurden 1:1 gemischt, die gewaschene Membran damit benetzt und naß in Plastikfolie eingeschweißt. Die Exposition erfolgte mit speziellem Röntgenfilm (Amersham), je nach Signalstärke 5 s bis 30 min.

2.7.6. Reinigung eines Antiserums

Ein Antiserum gegen APX1 [24] wurde von gegen bakterielle Proteine gerichteten Antikörpern, die durch Kreuzreaktion mit pflanzlichen Proteinen zahlreiche unspezifische Signale verursachten gereinigt, indem ein Überschuß an Antigen dazu verwendet wurde, deren Titer zu senken. Hierzu wurde eine 100 ml Übernachtskultur *Escherichia coli* M15[pREP4] angezogen und 10 min bei $2000\times g$ pelletiert. Das Pellet wurde in 20 ml deionisiertem Wasser gewaschen, wiederum pelletiert und in 5 ml Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend 10 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert und

darauf 5 min auf Eis abgekühlt. Zu diesem Bakterienlysat wurden 50 ml einer 1:1000 Verdünnung des APX1-Antiserums in 5% BSA in TBST, 0,02% NaN₃ gegeben und 4 h bei 4°C leicht geschüttelt. Abschließend wurde zweimal 20 min mit 6000Xg zentrifugiert und das Pellet jeweils verworfen. Die so erhaltene gereinigte Antiserenverdünnung wurde für den Einsatz in Western Blot Analysen weiter verdünnt.

2.8. Bestimmung von Thiolen

Zur Bestimmung von Glutathion kam eine HPLC-Anlage der Firma Biotec-Kontron zum Einsatz, bestehend aus

- HPLC Pumpsystem 322
- HPLC Pump 422
- HPLC Detector 335 (UV/Vis)
- Column Thermostat 482
- Column Thermostat Controller 402
- KromaSystem 2000 (Version 1.3) Auswerte- und Steuersoftware auf Basis von Microsoft Windows NT 3.51
- Zorbax SB-18 (C-18 reversed phase, Rockland Technologies) Säule, 25 cm Länge, 4,6 mm Durchmesser
- Rheodyne-Ventil mit 20 µl Probenschleife
- 300 µl Reaktionsschleife für Nachsäulenderivatisierung

2.8.1. Probenvorbereitung für HPLC

200 mg unter Flüssigstickstoffkühlung zu einem feinen Pulver gemörserteres Pflanzenmaterial wurde in ein Eppendorfgefäß eingewogen und mit 300 µl halbmolarer Salzsäure extrahiert. Nach Sedimentieren der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer gekühlten Tischzentrifuge (12000–13000Xg) wurde der Überstand vollständig abgenommen, das Volumen bestimmt und die Probe durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße gepresst um ein zu schnelles Verstopfen der HPLC-Vorsäule zu verhindern. Um Aufarbeitungsverluste abschätzen zu können wurden Wiederfindungsexperimente durch Zugabe verschiedener Mengen Cystein bzw. Glutathion zu einzelnen Proben während der Aufarbeitung durchgeführt. Die Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.8.2. Auftrennung und Quantifizierung mittels HPLC

Die Auftrennung erfolgte nach folgendem HPLC-Programm bei 1 ml/min Flußgeschwindigkeit:

- 11'40" konstant 100% A
- 01'20" Gradient auf 100% B
- 05'50" konstant 100% B
- 01'00" Gradient auf 100% A

Nach Durchlauf durch die Säule erfolgte die Derivatisierung durch Zufuhr des Derivatisierungsreagenz in eine Mischkammer mittels einer Kontron HPLC-Pumpe 422 bei 1 ml/min Flußgeschwindigkeit. Eine sechssekündige Reaktionszeit wurde durch das nachfolgende Durchlaufen einer Reaktionsstrecke mit einem Volumen von 300 µl sichergestellt. Danach erfolgte die photometrische Detektion bei $\lambda=412$ nm und Datenaufnahme über eine serielle RS232-Schnittstelle. Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software Kroma-System 2000 durchgeführt; die Integrale der durch die Retentionszeit zu den entsprechenden Thiolen zugeordneten Signale wurden mit jeweils aus 5 Messpunkten gebildeten Eichkurven in Beziehung gesetzt und auf nmol/g Frischgewicht zurückgerechnet.

2.9. Ballistische Transformation

Für transiente ballistische Transformationsexperimente wurde das Biolistic PDS-1000/He System der Firma Biorad verwendet. Die Partikelkanone enthält zwei durch eine Berstscheibe gasdicht von einander getrennte Behälter, zwischen denen eine Druckdifferenz aufgebaut wird, indem in den oberen Helium eingeleitet wird, während der andere evakuiert wird. Der Berstdruck ist durch die Dicke der Berstscheibe vorgegeben. Wenn dieser erreicht ist, reißt die Scheibe und durch die resultierende Druckwelle wird der darunter befindliche „Macrocarrier“, auf dessen Unterseite sich die mit DNA beladenen Wolframpartikel („Microcarrier“) befinden, in Richtung auf die im unteren, evakuierten Behälter aufgestellte Zellkulturplatte beschleunigt. Der Macrocarrier wird durch ein Stopppnetz gebremst und die mit den DNA-Konstrukten beladenen Partikel werden auf die Zellen geschleudert. Die Partikel durchdringen beim Auftreffen die Zellwände und transportieren so die DNA-Konstrukte ins Zellinnere. Die Unterdruckkammer wird vor jedem Schuß evakuiert, um den Luftwiderstand zu verringern und so möglichst eine Verminderung der Partikelgeschwindigkeit und ein Erhitzen der Partikel zu verhindern.

Zellkultur Es wurden *Beta vulgaris*-Zellsuspensionskulturen verwendet, die in regelmäßigen Abständen in frisches B5-Medium überführt wurden. Für die ballistische Transformation wurden die Zellen auf sterile Filterpapiere überführt, die auf B5-Agarplatten (\varnothing 53 mm) aufgelegt wurden.

Partikelpräparation Es wurden Wolframpartikel mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 1.318 μm ("M-20 Microcarriers", Biorad) verwendet. 30 mg Wolframpartikel wurden in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml 70% Ethanol für 20 s auf dem Vortexer geschüttelt. Nach zehnminütiger Inkubation wurden die Partikel 30 s bei 1.300 $\times\text{g}$ zentrifugiert. Die Zentrifugation fand bei 4°C statt und die Zentrifuge lief ungebremst aus. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel mit 500 μl sterilem A.bidest. gewaschen, indem sie 10 s auf dem Vortexer geschüttelt, anschließend 10 min absetzen gelassen und wie bereits beschrieben zentrifugiert wurden. Die sedimentierten Partikel werden mit 500 μl sterilem 50% (v/v) Glycerol versetzt und auf dem Vortexer gemischt. Zur Beladung wurde pro Beschuß eine Gesamtmenge von 1 μg Plasmid-DNA eingesetzt. Zum Einsatz kam jeweils eine Mischung äquimolarer Mengen des fraglichen GFP-Konstrukts (s. Abb. 3.27 und 3.29) mit einem chloroplastidären RFP-Kontrollkonstrukt 2.4.2 (s.S. 36). Die Partikel wurden gut resuspendiert, je 9 μl in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 μl der vorbereiteten DNA-Lösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA-Konzentration) unter Vortexen hinzugegeben. Die Suspension wurde für 15 min auf Eis gestellt und anschließend folgende Lösungen nacheinander unter langsamem Vortexen hinzupipettiert: 9 μl 2,5 M CaCl_2 (steril), 3,6 μl 1,2 mM Spermidin (steril filtriert) sowie 18,2 μl absolutes Ethanol. Die Partikel wurden nun 10 min in einem Eisbad inkubiert, anschließend für 5 s bei 180 $\times\text{g}$ sedimentiert und der Überstand verworfen. Zuletzt wurden die beladenen Partikel vorsichtig in 6,5 μl absolutem Ethanol resuspendiert und bis zum Beschuß auf Eis gelagert.

Beschuß Alle verwendeten Teile wurden unter der Sterilbank mit Ethanol sterilisiert und bereitgelegt. Die Partikelsuspension wurde mit sechs Impulsen bei maximaler Einstellung sonifiziert (Sonopuls HD 60, Bandelin) und 5 μl wurden sofort unter der Sterilbank auf vorbereitete Macrocarrier überführt. Für jeden Beschuß wurden Stopnetz, Berstscheibe und Macrocarrier in die entsprechenden Halter eingesetzt und in die Partikelkanone eingebaut. Der Petrischalenhalter, der die Agar-Platte mit den *B. vulgaris*-Zellen aufnimmt, wurde in die dritte Stellung von oben eingeschoben, was 9 cm Entfernung vom Macrocarrier entspricht. Nach Verschließen der Apparatur wurde der Raum unterhalb des Macrocarriers bis auf 25-Quecksilber Unterdruck (entspricht 167 mbar) evakuiert und anschließend in den Druckzylinder oberhalb der Berstscheibe bis zum Auslösen des Schusses Helium eingepreßt (ca. 1350 psi entsprechend 93 bar).

Auswertung Nach einer zweitägigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden Proben der beschossenen Zellen auf einem Objektträger in Glycerol resuspendiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz DMIL, Leica) nach Transformanten durchsucht. Folgende Filtersätze kamen zum Einsatz:

FITC Ex.:450-490 nm / Em.: 515 nm (Langpass) für GFP

XF 137-2 Ex.: 540±30 nm / Em.: 585 nm (Langpass) für RFP

Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer digitalen Kamera (ColorView 12, Olympus) und der AnalySIS Bildverarbeitungssoftware (Version x.y, Soft Imaging System GmbH).

2.10. Computergestützte Analysen

Sofern im Text nicht anders angegeben wurden alle Computeranalysen mit dem Wisconsin Package Version 10.2 der Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc. auf dem HUSAR 5.0-Server am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg durchgeführt.

3. Ergebnisse

Während der vorliegenden Arbeit wurden die wesentlichsten Enzyme des antioxidativen Verteidigungssystems von *Mesembryanthemum crystallinum* kloniert. Im Hinblick auf die Untersuchung der Regulation und des Zusammenspiels der einzelnen Bestandteile dieses gerade für eine Pflanze mit den metabolischen Besonderheiten von *Mesembryanthemum* besonders wichtigen Komplexes, sollten vor allem Grundlagen geschaffen werden um die zukünftige Richtung des Projektes „Regulation des antioxidativen Verteidigungssystems in *Mesembryanthemum crystallinum* während der C₃-CAM-Umstellung“ abstecken zu können. Hierfür war es zum einen nötig cDNA-Sequenzen der beteiligten Enzyme zu ermitteln, um Sonden für Northern Blot Analysen herstellen zu können, zum anderen sollten erste orientierende Expressionsanalysen durchgeführt werden. Im einzelnen wurden eine Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase (PHGPX), eine Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD), fünf Isoformen der Ascorbat Peroxidase (APX), eine Catalase (CAT), eine Glutathion Reduktase (GR), eine Monodehydroascorbat Reduktase (MDHAR), eine γ -Glutamylcystein Synthetase (γ -ECS, GSH I) sowie eine Glutathion Synthetase (GS, GSH II) untersucht. Neue Sequenzinformation konnte für die PHGPX, die GR, die MDHAR, die γ -ECS und die GS erhalten werden.

3.1. Klonierung der am antioxidativen Verteidigungssystem beteiligten Enzyme

3.1.1. Klonierung einer Glutathion Peroxidase cDNA

Aufgrund von Sequenzhomologien zu Glutathion Peroxidasen anderer Spezies wurde in den Sequenzdatenbanken ein partieller EST-Klon aus *Mesembryanthemum crystallinum* identifiziert (Acc.-No. AA825080). Mit Hilfe dieser Information wurden ein degenerierter (*gpx1*, sense) und zwei nicht degenerierte Primer (*gpxrev* und *gpxrv2*, antisense) erstellt. Diese erzeugten in der RT-PCR Amplifikate, die nach Klonierung und Sequenzierung über BLAST-Analysen als Fragmente einer Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase identifiziert werden konnten. Nach Biotinmarkierung wurde das kürzere der beiden Fragmente, hervorgegangen aus der Primerkombination *gpx1* und *gpxrv2*, eingesetzt um eine cDNA-Bank aus Blattmaterial zu durchmustern. Hierbei konnte nach Replattieren und Vereinzeln positiver Phagenplaques ein positiver Klon isoliert werden, der nach *in vivo*-Exzision und Sequenzierung des resultierenden Plasmids als Vollängen-cDNA bestätigt werden konnte (“GPX-A2#3“, Acc.No. AJ250951, s. Abb. 3.2). Die erhaltene Sequenz stellte sich jedoch als in 3'-Richtung um 59 bp kürzer heraus als die


```

1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  80
   GCACGAGTCTCTCCTCAGAACCCCTAACTGTTTCCTCTCCCTTGATTGGCTCAATTAAGCACTCATCCTCAATTCCAAGC

81  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  160
   AAACCCATTTGAGATCTTCCATCGAATTCGGTAATTTCTCTCTGGGTATTGAATCAAAGCCCTTTGTCTCAGTTTCGC

161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  240
   AGGTTCGAACACTCAATGGCTAGCCAGTCCACCGATCAGCCCAAATCCATCCACGACTTCATCGTCAAGGATGCTCGTGG
       M A S Q S T D Q P K S I H D F I V K D A R G
                                     gpv1 =>
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  320
   TAATGACGTGGATCTTAGCATCTACAAAGGAAGGTGCTGTGATTGTCATGTTGATCACAATGTGGTTTGACAAATT
   N D V D L S I Y K G K V L L I V N V A S Q C G L T N S

321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  400
   CAAACTACCCAGAATTGACCAAGTTGTATGAGCAATACAAGGACAAGGGTCTGGAGATATTGGCATTTCCTGCAACCAG
   N Y P E L T K L Y E Q Y K D K G L E I L A F P C N Q

401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  480
   TTCGGCAACCAGGAGCCTGGGGACAATGAACAGATCATGGAGTTCGCATGCACTCGCTTCAAAGCCGAGTTTCCCATATT
   F G N Q E P G D N E Q I M E F A C T R F K A E F P I F

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  560
   TGACAAGGTTGATGTGAATGGTAGTAATGCTGCCAGTCTACAAATATCTGAAATCAAGCAAAGCGGACTTTTCGGAG
   D K V D V N G S N A A P V Y K Y L K S S K G G L F G D
                                               =< gpv2
561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  640
   ATGGGATCAAATGGAAGTTCACAAAGTTCCCTGTTGACAGAGATGGAAAGGTTGTTGATCGTTATGCACCAACAATTCT
   G I K W N F T K F L V D R D G K V V D R Y A P T T S

641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  720
   CCCGCTAGCATCGAGAAGGACATTAAGAAACTGATCGGCACCTCATGAAGACCTGGATTTTGTACCAGCTACGTTAATAG
   P A S I E K D I K K L I G T S

721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  800
   CTGAGATATGATTCATACATATAAATAAGAGCATTTACAAACATCATCTCCCTATTTTCGTTTCATTGTGCTTTCTAGTTGC

801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  880
   GGGTTTTGTACGTATAAAAAGCTGTGTTTACTGAATATATTGCATATTATGCTTTGGGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

881 - 881
   A

```

Abb. 3.2.: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz einer Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase cDNA aus *M. crystallinum*

Programm, HUSAR-Paket; Gap-Alignment von genomischer und cDNA-Sequenz) ergab die in Abb. 3.4 und 3.5 dargestellte Verteilung.

```

1  ATGGCTAGCCAGTCCACCGATCAGCCCAAATCCATCCAGACTTCATCGT
   |||
176 ATGGCTAGCCAGTCCACCGATCAGCCCAAATCCATCCAGACTTCATCGT
   |||
51  CAAGGTTTGTAAAAATTCATAATCCCTGAAATGAATTCATTTCCG
   ||
226 CA.....
101 GTTAAAGGGTATTTGCGTGATTAATCCAGTTGTTGGTGATTTTC
228 .....
      [...]
851 TGATTCAAGAATTCGAGGTAATCAAATGTACTAGCAGAATTTGACAT
228 .....
901 TATTGGAACCTTATGCAGGATGCTCGTGGTAATGACGTGGATCTTAGCAT
   |||
228 .....AGGATGCTCGTGGTAATGACGTGGATCTTAGCAT
   |||
951 CTACAAAGGAAGGTGCTGTTGATTTGCAATGTTGCATCACAATGGTATG
   |||
262 CTACAAAGGAAGGTGCTGTTGATTTGCAATGTTGCATCACA.....
1001 ATTTGATTCAAATAATCATTTTCAGAACTTTAGTCCATATTTCTGCAATTT
305 .....
      [...]
1301 TGATGGTAATCACCATTGACGTTTGTGCTAAGAACCTTTTCTTCTTGG
305 .....
1351 GTGCTGTGGTTTGACAAATTCAAACTACCCAGAATTGACCAAGTTGTATG
   |||
305 ...TGTGGTTTGACAAATTCAAACTACCCAGAATTGACCAAGTTGTATG
   |||
1401 AGCAATACAAGGACAAGGTAAGTTTGTAGTACTTCATTTCTATTGGTTA
   |||
351 AGCAATACAAGGACAAG.....
1451 GTTCAGCTCCATGACTTCGGATCGCATGCTTAATTTTAGTATCGTAAAT
368 .....
1501 GCAGTCTGGAGATATTGGCATTTCCTGCAACCAGTTCGGCAACCAGGA
   |||
368 ...GGTCTGGAGATATTGGCATTTCCTGCAACCAGTTCGGCAACCAGGA
   |||
1551 GCCTGGGGACAATGAACAGATCATGGAGTTCGCATGCACCTCGTTCAAAG
   |||
415 GCCTGGGGACAATGAACAGATCATGGAGTTCGCATGCACCTCGTTCAAAG
   |||
1601 CCGAGTTTCCCATATTTGACAAGGTACTCTGTCTGAATTAGTAGGTTT
   |||
465 CCGAGTTTCCCATATTTGACA.....
1651 TCCTACTGGTGCATCAAAATGATTGCTCTTTTCTCTTTTCTTAGCTCT
486 .....
      [...]
1801 TAGGTCCATCTTTGGAGCTAAATGTTGTAACAGTAGTGACATCTTTCTCT
486 .....
1851 TAACATTTTGATTACAGTGTGATGTAATGGTAGTAATGCTGCCCCAGTC
   |||
486 .....AGGTTGATGTAATGGTAGTAATGCTGCCCCAGTC
   |||
1901 TACAAATATCTGAAATCAAGCAAAGGCGGACTTTTCGGAGATGGGATCAA
   |||
521 TACAAATATCTGAAATCAAGCAAAGGCGGACTTTTCGGAGATGGGATCAA
   |||
1951 ATGGAACCTTCACAAAGTTCCTTGTGACAGAGATGAAAGGTTGTTGATC
   |||
571 ATGGAACCTTCACAAAGTTCCTTGTGACAGAGATGAAAGGTTGTTGATC
   |||
2001 GTTATGCACCAACAACCTTCTCCCGCTAGCATCGAGGTAAGATATTAACA
   |||
621 GTTATGCACCAACAACCTTCTCCCGCTAGCATCG.....
2051 CAAAACAGCCCGTGTCGCCGTTTCAAGGATTGAATTTCTGATTGATTGA
654 .....
2101 AATAACTAAATATGTCTCCCTTTTTCGAGAAGGACATTAAGAAACTGA
   |||
654 .....AGAAGGACATTAAGAAACTGA
   |||
2151 TCGGCACCTCATGAAGACCCTGCAGACCTGTCTA 2184
   |||
675 TCGGCACCTCA..... 685

```

Abb. 3.4.: Sequenzalignment der genomischen (oben) und der cDNA-Sequenz (unten) der Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase aus *Mesembryanthemum crystallinum* (kodierende Bereiche)

Gen	cDNA	Protein	Länge (AS)	MW (kDa)	pI	Lok.	% hom.
At4g11600	AB001568	O48646	169	18,61	6,59	cyto	80
At2g31570	U94495 AY044330 AY058187	O04922	169	18,94	5,6	cyto	65
At2g25080	AY063024	O81717	236	26,02	9,42	chloro	64
At4g31870	—	Q9SZ54	230	25,43	9,55	chloro	61
At3g63080	—	Q9LYB4	173	19,33	9,28	ER	61
At2g43350	AY065372	O22850	206	23,26	9,24	mito	55
At1g63460	—	Q9SH32	167	19,07	5,11	cyto	53
At2g48150	—	Q9SL86	171	19,41	9,05	cyto	53

Tab. 3.1.: Zu GPX-A2#3 homologe Proteine in *Arabidopsis thaliana*; der Homologiegrad bezieht sich jeweils auf die reifen Polypeptide nach Abspaltung etwaiger Transitpeptide. Lokalisation: chloro=chloroplastidär, cyto=cytosolisch, mito=mitochondrial, ER=endoplasmatisches Reticulum

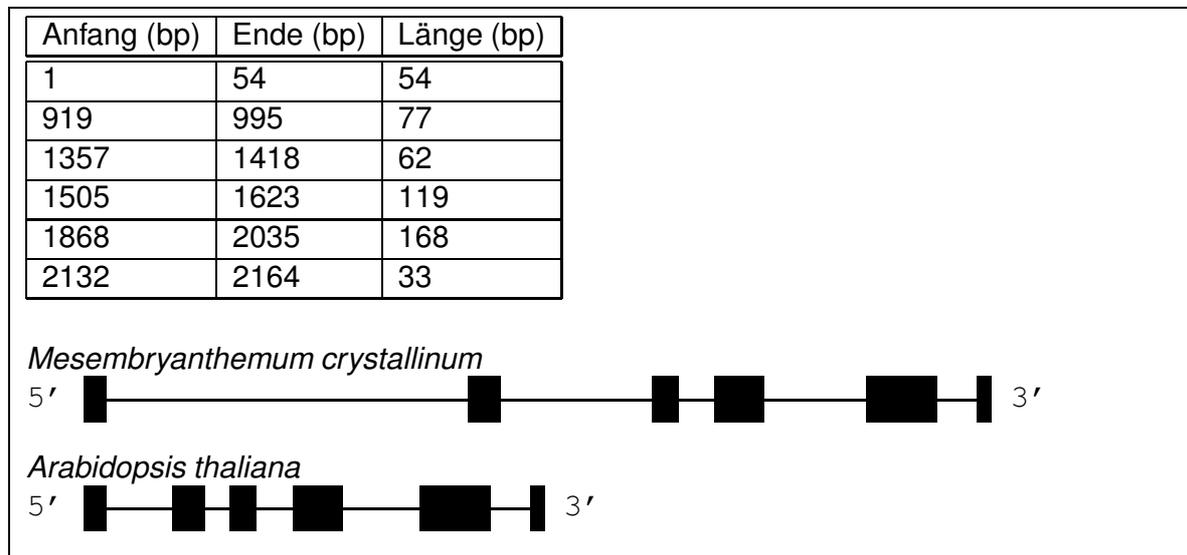


Abb. 3.5.: Exon/Intron-Verteilung innerhalb des kodierenden Bereichs des PHGPX-Gens aus *M. crystallinum*. Zum Vergleich ist der entsprechende Bereich des homologen At4g11600-Gens aus *Arabidopsis thaliana* dargestellt.

Eine Datenbanksuche (BLASTP) gegen die *Arabidopsis thaliana* Proteom-Datenbank (MATDB, Munich Information Center for Protein Sequences <http://mips.gsf.de>) ergibt acht signifikant ähnliche Einträge (s. Tab. 3.1). Die bei weitem höchste Homologie zum Translationsprodukt der aus *Mesembryanthemum crystallinum* isolierten cDNA weist das Gen At4g11600 aus *Arabidopsis thaliana* auf. Eine nähere Untersuchung der nicht prozessierten DNA-Sequenzen zeigt, daß die Gene beider Spezies aus sehr ähnlichen Exons aufgebaut sind, während sich die Introns in Sequenz und Länge stark unterscheiden.

3.1.3. Klonierung einer Monodehydroascorbat Reduktase cDNA

Zur Isolierung der Monodehydroascorbat Reduktase wurde von dem degenerierten Primerpaar mdhar3, sense und mdhar4, antisense, ausgegangen, mit dessen Hilfe in der RT-PCR ein Fragment amplifiziert wurde. Dieses konnte nach Klonierung und Sequenzierung bei einer BLASTN-Suche gegen das pflanzenspezifische Subset der EMBL-Datenbank anhand von Sequenzähnlichkeiten als Teil einer Monodehydroascorbat Reduktase identifiziert werden. Die so erhaltene Sequenzinformation wurde eingesetzt um die fehlenden Teile des Transkripts mit Hilfe von 5'- und 3'-RACE-Technik zu erhalten (verwendete Primer: mdho3, mdhi3, mdho5, mdhi5). Die resultierende Vollängensequenz ("MDHAR#9", Acc.-No. AJ301553, s. Abb. 3.6) codiert für ein Polyeptid von 477 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 51,75 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6,8. Wie das Alignment (s. Abb. 3.7) zeigt, weist das Produkt des identifizierten Transkripts aus *Mesembryanthemum crystallinum* große Homologie mit den Monodehydroascorbat Reduktasen anderer Pflanzenspezies auf (71% identischer Aminosäuren zu *P. sativum*, 75% zu *C. sativa*). Auffallend ist, daß der Anteil übereinstimmender Aminosäuren zur Sequenz einer chloroplastidären Monodehydroascorbat Reduktase aus *Arabidopsis thaliana* mit 39%, wobei 5'- und 3'-Ende der längeren *A. t.*-Sequenz nicht berücksichtigt sind, relativ niedrig ist.

```

1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 80
   ATTATTTATTATATAAAATGCGCCCAACAACCAATCCCAATATCGCAGCTCCTCCGATTTTCTCTCTCTCTCTCTGTC
           M R P T T N P N I A A P P I F S L F S L C L

81  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 160
   TCGCTCTCAGCTGCTCATTCTTTGCGCTTCGCTTCATCGATCGAAGGTCCACTAACTCCATTTCATGGCGGAAAAGCAC
   A L S C S F F A L R F I D R R S T N S I S M A E K H

161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
   TTTAAGTACATCGCTCTTGGTGGTGGCGTTTCCGGTGGATATGCCGCAAGAGAGTTGCTAAGCAGGGTGCCAACCAGG
   F K Y I A L G G G V S G G Y A A R E F A K Q G V Q P G

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 320
   CGAGTTAGCAATCATTCTAAAGAAGCGGTGGCCCTTATGAACGTCGGCACTTAGCAAGGCATACCTCTTCCAGAGG
   E L A I I S K E A V A P Y E R P A L S K A Y L F P E G

321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 400
   GTACTGCTAGACTTCTGGATTCCATGTTTGTGTAGGAAGCGGAGGGGAGAGACTTGTTCCTGACTGGTATAAGGAGAAA
   T A R L P G F H V C V G S G G E R L V P D W Y K E K

401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
   GGTATAGAGTTGATTCTGAGCACAGAAATAGTCAAAGCTGATCTTCTTCAAAGTCTCTCACAAGTCTAGTGGAGAAAT
   G I E L I L S T E I V K A D L S S K S L T S A S G E I

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 560
   ATTTAAATATGACAACTTGGTCATAGCAACTGGTTCACAGTCATAAAATTGTGATTTTGGTGTCCAAGGGGCTGATG
   F K Y D N L V I A T G S T V I K L S D F G V Q G A D A

561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 640
   CTA AAAACATCTTCTATCTTAGAGAAATTGATGATGCTGATAAGCTTGTGGAAGCAATCAAAACTAAGAAGAAATGAAAA
   K N I F Y L R E I D D A D K L V E A I K T K K N G K

641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
   GTTGTGTTGGTTGGTGGAGGTTACATTGGGCTTAGGCTTAGTGCAGCAATGAGAGTCAATGATTTGGATGTCACACTATGGT
   V V L V G G G Y I G L E L S A A M R V N D L D V T M V

```

```

mdhar3 =>
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 800
TTACCCAGAGCCCTGGTGCATGCCACGACTCTTCACTGCTGATATAGCAAAGTTCTATGAGGGTTACTACACTAACAAAGG
Y P E P W C M P R L F T A D I A K F Y E G Y Y T N K G

801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 880
GAGTCAAAATTATAAAAGGAACAGTAGCGGCTGGATTTCAGCTCCCATGATAATGGAGAGGTGAAAGAAGTGCAGCTAAAG
V K I I K G T V A A G F S S H D N G E V K E V Q L K

881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
GATGGTAGGTTCTGGCAGCTGATATTGTGGTGGTTGGCGTTGGTGAAGGCCTCTTACAGCTCTGTTCAAGGGTCAGGT
D G R V L A A D I V V V G V G G R P L T A L F K G Q V

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1040
TGCAGAGGAAAAGGAGGAATTAAGACTGATGGATTCTTTAAAACAAGCGTCCCAGATGTATATGTGTTGGTGTAGTAG
A E E K G G I K T D G F F K T S V P D V Y A V G D V A

1041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1120
CCACCTTTCCTACTGAAATTGTATGGTGAACAGAGAGTTGAACATGTCACCATGCCCGTAAATCTGCAGAACAGGCT
T F P L K L Y G E L R R V E H V D H A R K S A E Q A

1121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
GTGAAGGCTATCAAAGCTAGTGAGGAGGAAAAGCAGTTGAGGAATATGACTACCTACCATACTTCTATTCTCGTGCTTT
V K A I K A S E E G K A V E E Y D Y L P Y F Y S R A F

1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1280
CGATCTATCTTGGCAGTTTATGGGGATAATGTTGGAGATGCCGTTCTATTGGTGATAATGACCCTGCATCATCACCAC
D L S W Q F Y G D N V G D A V L F G D N D P A S S P H
<= mdhar4

1281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1360
ACAAGTTTGGTTCGTACTIONGATCAAAGATGGGAAGGTTGTAGGAGCATTCCCTAGAGAGCGGAACCCAGAGACAAG
K F G S Y W I K D G K V V G A F L E S G T P E E N K

1361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GCCATAGCAAAGGTTGCTCGAGTCCAGCCCCGGCTGACAGCTTGGAGCAGCTGTGAAAGAAGGACTCACCTTTGCCTC
A I A K V A R V Q P P A D S L E Q L S K E G L T F A S

1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1520
CAAGATCTGAACCTGATGATAATCTTTAGTGGTGTACAGTCTCCATTGCTGTAATTGTGCTCAATTTGTGTATTGAT
K I

1521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1588
TTAGGAATACCCTGCATAATAATTTCCGGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 3.6.: cDNA und abgeleitete Proteinsequenz der Monodehydroascorbat Reduktase aus *Mesembryanthemum crystallinum* ; die für die RT-PCR verwendeten Primer sind gekennzeichnet.

mustern einer cDNA-Bank eingesetzt. Hierbei konnte nach dreimaligem Replattieren und Vereinzeln positiver Phagenplaques ein cDNA-Klon von 1822 bp Länge isoliert werden. Nach *in vivo*-Exzision und Sequenzierung des resultierenden Plasmids ließ sich dieser als Vollängen-cDNA eines Glutathion Reduktase-Transkripts aus *Mesembryanthemum crystallinum* bestätigen ("GR5#3", Acc.No. AJ400816, s. Abb. 3.8). Die Sequenz besitzt ein offenes Leseraster, aus dem ein 461 Aminosäuren langes Polypeptid resultiert. Das berechnete Molekulargewicht für dieses Protein beträgt 50,06 kDa; der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei 6,13. Keines der verwendeten Vorhersageprogramme (TargetP, PSORT [115, 42, 111]) liefert einen Anhaltspunkt für das Vorhandensein eines Transitpeptids, das Enzym ist dementsprechend als cytosolisch lokalisiert zu betrachten. Ein Alignment der erhaltenen Aminosäuresequenz mit anderen pflanzlichen Glutathion Reduktasen (s. Abb. 3.9) läßt eine ausgesprochen hohe Homologie zwischen den verschiedenen Proteinen erkennen. Der Anteil identischer Aminosäuren liegt zwischen 72% (*Arabidopsis thaliana*) und 81% (*S. oleracea*). Die Sequenz aus *Mesembryanthemum crystallinum* weist die für diese Enzymklasse typische FAD-Bindestelle (ADP-Teil AS 17–47, Flavinteil AS 318–328) sowie das konservierte, cysteinreiche reaktive Zentrum (AS 60–70) auf.

```

1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 80
   GCACGAGGATTGATGGCGAAGCCGCGATGCAGAGCCAATCTAATGACGAAGACAACAACGCTCACTATGACTTCGACTTG
                                     M Q S Q S N D E D N N A H Y D F D L

81  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 160
   TTCGTCATAGGCGCGGAAGCGGGTGTTCGAGCTGCTCGATTCTCAGCCAAATTTGGTGCCAAGGTTGGTATATGCGA
   F V I G A G S G G V R A A R F S A K F G A K V G I C E

161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
   GCTCCCGTTTCATCCCATTAGTTCGGAAGTGATTGGAGGTGTTGGTGGAACATGTGTTATTCGTGGTTGTGCCAAAAA
   L P F H P I S S E V I G G V G G T C V I R G C V P K K

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 320
   AGATTTGGTCTACGGCGCATCTTTCAGTGGTGAACCTCAGGATGCACGGAACATGGATGGGAATTGAATGAAAATATT
   I L V Y G A S F S G E L Q D A R N Y G W E L N E N I

321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 400
   GATTTCAATTGAAAAAGCTTCTGCAGAAGAAGACAGACGAAATACTCAGACTTAATAATATTTACAAACGATTGTTGTC
   D F N W K K L L Q K K T D E I L R L N N I Y K R L L S

401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
   AAATGCTGGGGTCAAATTGTATGAAGGGGAGGGAAAGATAGTCAGTCCCAATGAAGTCCAAGTAACTCAGTTAGATGGCA
   N A G V K L Y E G E G K I V S P N E V Q V T Q L D G T

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 560
   CCAAATTGCTTATTTCAGCAAAGCACATATTGATTGCCACTGGTAGCCGAGCCCGCGTCTGACATCCGCGGGCAGGAG
   K L S Y S A K H I L I A T G S R A Q R P D I R G Q E

561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 640
   TTGGCAATAACTTCTGATGAGGCTTTGAGTTTAGAGGAACGCCGAAGCGTGCTGTGATACTTGGGGCGGGTACATTGC
   L A I T S D E A L S L E E L P K R A V I L G G G Y I A
                                     gr3 =>

641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
   TGTGAATTTGCTTCCATATGGCGTGGGATGGGTGCAACTGTAGATCTGTTCTTCAGAAGGGAGCTTCTTTAAGAGGCT
   V E F A S I W R G M G A T V D L F F R R E L P L R G F

721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 800
   TTGATGATGAAATGAGGGCTGTGGCTGCCAGAAATTTAGAAGGCAGGGGAGTTAATATGCATCCCAGGACTAATCTTACA
   D D E M R A V A A R N L E G R G V N M H P R T N L T

```

```

801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 880
GAGCTGGTGAAAACGATGGTGGTATTAAAGTTCGTACAGATCATGGTGAAGAATTGATGGCAGATGTTGTGCTCTTTGC
E L V K T D G G I K V R T D H G E E L M A D V V L F A

881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
GACTGGTCGTTCTCCAAACACGAAGAGGTTAAATCTGGATGCCGTTGGTGTCAACGTTGATAAAACAGGAGCTATTAAGG
T G R S P N T K R L N L D A V G V N V D K T G A I K V
                                         <= gr4

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1040
TTGATGACTATTCTCAGACCAGTGTACCGAGCATATGGGCTATTGGTGATGTTACAAACCGAATGAATCTCACTCCTGTT
D D Y S Q T S V P S I W A I G D V T N R M N L T P V

1041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1120
GCCTTGATGGAAGGAAGTGTGTTTGGCTAAATCACTATTTGGTGGCCAGCCAAACAAACCTGATTACAAAGATATACCTTG
A L M E G T C F A K S L F G G Q P T K P D Y K D I P C

1121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
TGCAGTGTTCAGCATAACCACCGCTTTCTGTGGTGGTCTTAGTGAAGAGCAAGCAATAGAGCAATCAAATGGAGACGTTT
A V F S I P P L S V V G L S E E Q A I E Q S N G D V L

1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1280
TGGTTTTACGTCATCATTCAATCCAATGAGGAATACTATCTCACAGCGGCAAGAAAAGTCTGTTATGAAGCTTGTGTGC
V F T S S F N P M R N T I S Q R Q E K S V M K L V V

1281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1360
GATGCTGAGACAGATAGAGTCTTGGAGCGTCCATGTGTGGCCAGATGCACCTGAAATTATGCAAGGAATGCTGTAGC
D A E T D R V L G A S M C G P D A P E I M Q G I A V A

1361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
TCTGAAATGTGGAGCAACAAAGGCACAGTTTGATAGCACGGTATCTCGATAATTCTCTTCTACCTCTGGCATAAATAGTT
L K C G A T K A Q F D S T V S R

1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1520
CTTGGCCTTCCCGTTCTCTTGTACTTCCCTCGATCTCCTGCTAATCCGTGATTATTTAAATATGATGTGAAGACATAGGA

1521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1600
GGTGGGAGTTAAGGGGGCAAAGGAGGCCTGATAGGTTCAACTTATGAGTGAGAGAGAAAACAAAGAGGATTGCAATGGCA

1601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
GTGCCTCACAGCATTAGTGGGCAGAGGAGGATATGGTGTGGTCCATGAGAATTGTTGTGTAGATGTTGGGAAAGGAGG

1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1760
AGTGAATGAGGATAGATAGGAGAAATTTAGTATAACTAAAATGGAAATTAAGAGTCAATTTCTATGAATGTCAACCCAAA

1761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1822
CAAGTTTATTGCAAGTATGAGTGGTTATGATATTGATAATGAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 3.8.: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz einer Glutathion Reduktase cDNA aus *Mesembryanthemum crystallinum* ; die für die RT-PCR verwendeten Primer sind eingezeichnet.

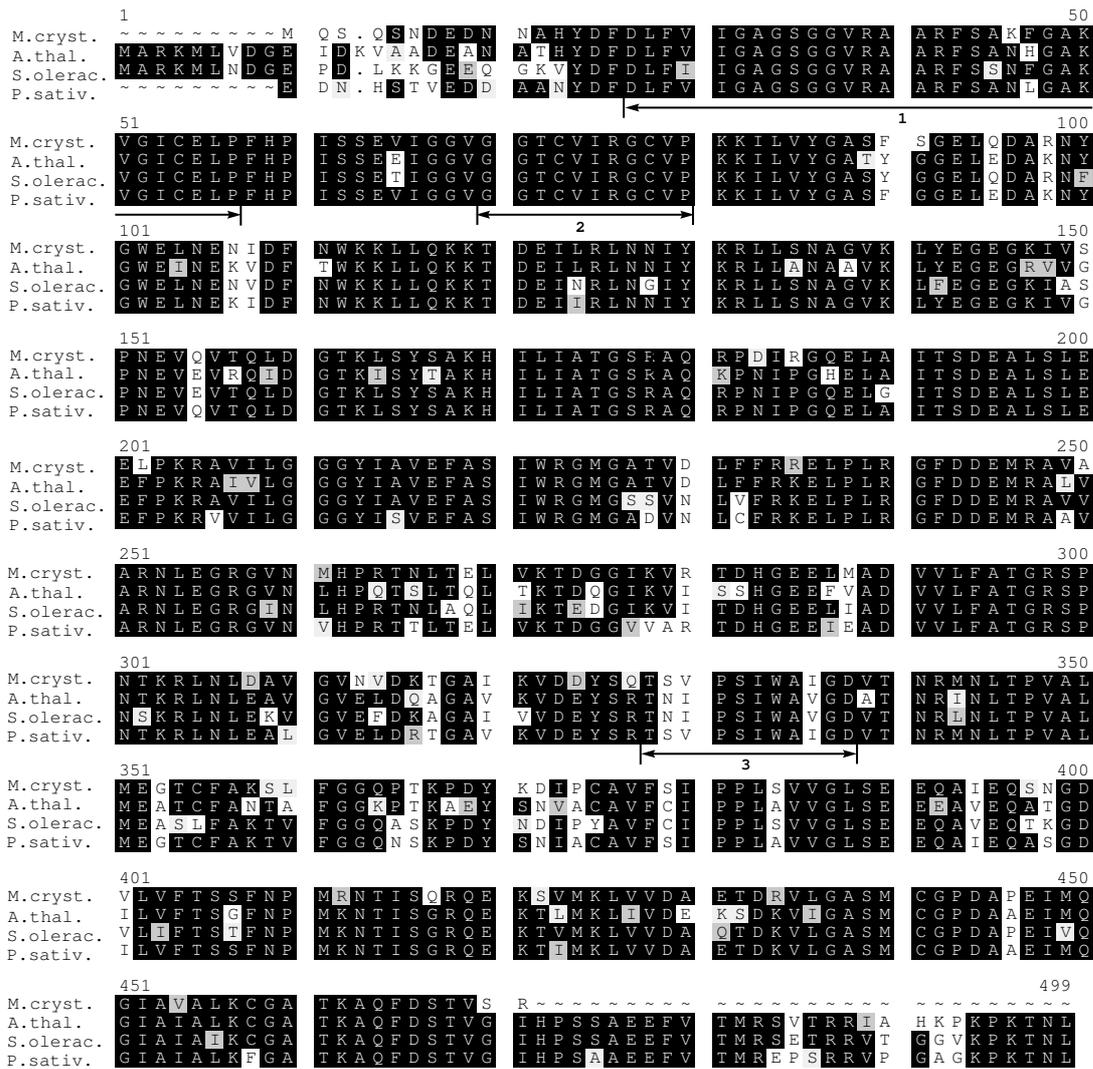


Abb. 3.9.: Alignment der Glutathion Reduktasen verschiedener Pflanzenspezies (*Mesembryanthemum crystallinum*, *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Spinacia oleracea*); die markierten Bereiche kennzeichnen für Glutathion Reduktasen typische Domänen, ADP- und Flavinteil der FAD-Bindestelle(1 und 3), sowie das redoxaktive Zentrum (2) mit zwei Cysteinen

3.1.5. Klonierung einer γ -Glutamylcystein Synthetase cDNA

Bei der Klonierung einer γ -ECS cDNA wurde von einem 408 bp langen Fragment ausgegangen (A. Haag-Kerwer, 1998), das von den degenerierten Primern *degecs-sense2* und *degecs-antis1* eingeschlossen wird. Nach Biotinylierung wurde dieses Fragment zur Durchmusterung einer blattspezifischen cDNA-Bank eingesetzt. Nach dreimaligem Replatieren und Vereinzeln positiver Phagenplaques konnte ein Klon isoliert werden, der nach *in vivo*-Exzision und Sequenzierung des resultierenden Plasmids als in 5'-Richtung unvollständige γ -Glutamylcystein Synthetase cDNA ("γECS-A2#7") von 1200 bp Länge identifiziert werden konnte. Die fehlende Sequenzinformation wurde unter Verwendung der Primer *ecs5out* und *ecs5nest* mittels 5'-RACE-Technik (Ge-


```

1041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1120
      GATAACAATCGTGCCGGGATGCTTCCTTTGTTTTGACGATTCTTTGGGTTTGAGCAATATGTGGATTATGCTCTTGA
      D N N R A G M L P F V F D D S F G F E Q Y V D Y A L D

1121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
      TGTACCCATGTA CTTGTTTATCGCCAGAAAAGATATGTTGATTGTGCTGGATTGCCTTTCGGGATTTTCATGGAAGGCA
      V P M Y F V Y R Q K R Y V D C A G L S F R D F M E G K
      ← degecs-antis1

1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1280
      AACTTCCCCTGCTTCTGCGGAGTTGCCAACGCTAAATGACTGGGAGAATCATCTGACAACCATATTCCTGAGGTTAGG
      L P V L P G E L P T L N D W E N H L T T I F P E V R

1281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1360
      TTGAAGAGTATTTGGAGATGAGAGGTGCTGATGGTGGACCGTGGAGGAGATTGTGCGCATTACCGGCATTCTGGGTTGG
      L K R Y L E M R G A D G G P W R R L C A L P A F W V G

1361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
      TTTGCTATATGATGAGGATTCTTTACAAAGTGTCTTGGACATGATAGCTGATTGGACCACGGAAGAAAGAGAAATGCTAA
      L L Y D E D S L Q S V L D M I A D W T T E E R E M L R

1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1520
      GAAATAAGGTACCAAAACTAGGTCTCAAAACTCCATTTTCGAGATGGATACTGCGACATGTTGCAGAGGATGTTCTAAAA
      N K V P K L G L K T P F R D G Y L R H V A E D V L K

1521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1600
      TTGTCAAAGGATGGCTTAGAAAAGAGGGGCTTCAAGGAGGTTGGATTTTTAAATGAAGTGCTGAAGTGGTCAGAACAGG
      L S K D G L E K R G F K E V G F L N E V A E V V R T G

1601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
      TGTAACCCAGCTGAGAGGCTTCTGGAGATGTATGAGGGGAAGTGGGGACAAAATGTGGATCCAGTGTGAGGAGTTGC
      V T P A E R L L E M Y E G K W G Q N V D P V F E E L L

1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1760
      TCTACTAGAACATTGGATTCTACCGGCAAACAGCACATAGTCAATAATGCTCTGTGCAGATTGAGAGGTTCTGGATATT
      Y

1761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1840
      TTATGGTAGAAAGAGACTTCGGAAAAGACAGAGACATATGTTCCAAATAATTGAATCGTCTAATTTCGTCTTCATCAAT

1841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
      GAGTTGCTGCTTACATGGACGTTGGTATAACTTGCTTTTTTTCTTTTTCTTTTCTCCTCATCTTAAAGCTGACACA

1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2000
      AGGGCGAAAATAGTGACATCTCATTGGATAGGTA CTTACTATGGATCAATTTCTCTGTCCCCCTAATTTGGGGTTGGCC

2001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2080
      AACACTCTTGATGCTGATCAACACTTCCTCACTTCTTGGTGCTCTAGTTGCTGAAATAATATGGCAAACAATTTTACTC

2081 -----+-----+----- 2099
      AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 3.10.: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz einer γ -Glutamylcystein Synthetase cDNA aus *Mesembryanthemum crystallinum*. Der übersetzte ORF beginnt mit dem ersten Methionin der Sequenz und endet mit dem Stopcodon „TAG“ an Basenpaar 1686. In der 5'-UTR befinden sich zwei Stopcodons vor dem Beginn des ORF.

(Generacer-Kit, Firma Invitrogen) ermittelt. Die für die RACE-PCR eingesetzten genspezifischen Primer bzw. nested Primer für 5'- und 3'- waren *gs5out* und *gs5nest* sowie *gs3out* und *gs3nest*. Die nach der nested PCR erhaltenen Amplifikate wurden in den Vektor pCR4TOPO kloniert, sequenziert und wiederum durch Datenbankanalyse sowie Alignment der überlappenden Bereiche mit dem bereits bekannten Fragment identifiziert. Aus dem offenen Leserahmen der Gesamtsequenz, der sich von Position 89 bis Position 1588 der cDNA-Sequenz erstreckt, läßt sich ein Polypeptid von 500 Aminosäuren Länge ableiten. Das berechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 55,65 kDa und der isoelektrische Punkt sollte bei 6,34 liegen. Das Alignment der abgeleiteten Proteinsequenz zeigt eine hohe Homologie mit den Sequenzen anderer pflanzlicher Glutathion Synthetasen, insbesondere im Bereich zweier hochkonservierter glycinreicher Domänen (s. Abb. 3.13). Der Anteil identischer Aminosäuren beträgt über 60%. Eine Analyse mit den Vorhersageprogrammen des „Center for Biological Sequence Analysis“, Lyngby (Dänemark), TargetP, ChloroP und SignalP [115, 42] sowie PSORT [111] ergibt, daß ein N-terminales Transitpeptid von 56 Aminosäuren Länge existiert. Diese Vorhersage gründet sich jedoch ausschließlich auf die Anwesenheit einer wahrscheinlichen Schnittstelle an der entsprechenden Position (hoher „C-Score“ von 0,839 bei SignalP), während die tatsächliche Anwesenheit eines Transitpeptids vor derselben nicht sicher vorhergesagt werden kann (niedriger durchschnittlicher „S-Score“ von 0,162). Eine genauere Aussage über die Kompartimentierung der Glutathion Synthetase läßt sich anhand dieser Analysen nicht treffen. Die höchsten Wahrscheinlichkeiten wurden von PSORT für eine vakuoläre oder cytosolische Lokalisierung des Enzyms berechnet.

```

1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  80
   ATCGATTAAACCCAACTCAAATTATTCCTTCATCAATCTCTCAACGTGTTCCATTACCCACATCTCCCAGGTTTCGCCA

81  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  160
   ACACAACCATGTCCTCACTTGTGCCATTGAATGCAGCAAAAGTCGATTCCATTGAAGCTCATCAAGAAATTTCAAAGAA
      M S S L V P L N A A K V D S I E A H Q E I S K E

161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  240
   CCCATCTTCGATCCTCATGGGGTGACCCTAATTGATTCAAAAAGTTGCTTATGATGCTTTAGTTTGGGTGTCTCTTCA
   P I F D P H G G D P N L I Q K V A Y D A L V W V S L H

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  320
   TGGGCTGGTGTGGGTGATCGAGCAAGTGCAGGGAGATCAGGGACAGTTCTGGAGTTGGGATGGTTCATGCCCCAGTTT
   G L V L G D R A S A G R S G T V P G V G M V H A P V S

321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  400
   CGCTGTTGCCCTGCGCCATTCTTGAAGTAACTTGAGACAAGCATGTGAATTAGCTCCTATTTTCAATGAAGTGTGAT
   L L P A P F L E S N L R Q A C E L A P I F N E L F D

401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  480
   CGTGTGAGCCTTGAATGCAAAGTTTTTTCAGGACTCACTGCAAGAAGCTAAGAAAGCTGATGAGTTCACCTCGAGATGTT
   R V S L E C K V F S G L T A R T K K A D E F T S R L L

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  560
   AGACATTCACTCAAAGATGATAGATATTAATAAAACAGAGGAAATTCGATTGGGTTTACACCGCTCAGATTACATGCTTG
   D I H S K M I D I N K T E E I R L G L H R S D Y M L D

561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  640
   ATGCACAAACCAAGTTGCTTCTCCAAATAGAGTTCAACACAACTCGTGTCTTTTCTGGGCTCACTTTCTCTTTGGTC
   A Q T K L L L Q I E F N T T S C S F P G L T F S L V

```

```

641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
AGTGAACCTCACAGGAGCTTGCTTAGTCACTATGGAAGCCAGCTTAAATTAGACTTTAAAAGAGTCCTGAAAACACAGC
S E L H R S L L S H Y G S Q L K L D F K R V P E N T A

721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 800
TATTCTAAAGTTTGCGAACCGGTTAGGTGAAGCTTGAGAGAGTACAATAATCCAAGGGCTGTAGTTCTGGTTGTTGTTTC
I L K F A N A L G E A W R E Y N N P R A V V L V V V Q

801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 880
AACCTGAGGAACGCAACATGTACGACCAGCATTGGCTTTCTGCTGTATTGAAGGAGAGACATGGTGTATATCTATCAGG
P E E R N M Y D Q H W L S A V L K E R H G V I S I R

881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
AAAACATTAGCTGAAATTGATGCAGAGGGAAGATACTGCCTGATGGGAGGACACTTGCTGTAAGTGGGGAAGAAGTTGC
K T L A E I D A E G K I L P D G R T L A V S G E E V A

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1040
AGTAGTGTATTTAGAGCTGGGTATGCACCTACTGATTATCCTTCTGAGTTGGAATGGAAGCAAGACTATTGATTGAGC
V V Y F R A G Y A P T D Y P S E L E W K A R L L I E Q

1041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1120
AGTCATCTGCTGTAAGTGTCCATCAATTGGATAACCATTAGCAGGTACCAAAAAGATTTCAGCAAGAGCTTGCAAAAACCG
S S A V K C P S I G Y H L A G T K K I Q Q E L A K P

1121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
AATGTAAGTGTGAGAGTTTCTGGATAACAAAGAAGACATTAGCAAGCTTCGAAATGCTTTGCTGGCTGTGGAGCTTAGA
N V L E R F L D N K E D I S K L R K C F A G L W S L D

1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1280
TGATTCTGAAGTTATTTAGATGCAATGGAAGACCTGAGCTGTATGTGATGAAACCACAAAGAGAAGCGGAGGAAACA
D S E V I S D A M E R P E L Y V M K P Q R E G G G N N

1281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1360
ACATTTACGGTAATGATGTGAGGGACACCCTGCAAAGAATACAGCAGGGAGGAACAGAAGAAGACGCTGCTGCATACATC
I Y G N D V R D T L Q R I Q Q G G T E E D A A A Y I

1361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
CTCATGCAAAGGATTTTCTACTGTTTTCCAGCACTTCTAATACGAGAAGGAAGGATCCACAAAGATCATGCTATATC
L M Q R I F P T V F P A L L I R E G R I H K D H A I S

1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1520
AGAGCTGGGATATATGGTGCTTATTTGAGAAACAAAGCCAAGATTATCTTAAATGAGGAATGTGGTTACTTGATCGGGA
E L G I Y G A Y L R N K A K I I L N E E C G Y L M R T

1521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1600
CAAAGTCGCTTCATCAAATGAAGTGGGGTTGCAGCTGGTTTTGCCGCTTGGACAGTTTATATTTGAGTTGATGCCTT
K V A S S N E G G V A A G F A V L D S L Y L

1601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
GAAGAAATAAGTTATGGCCGATAAAGGTTGACATAGACAGATGCATCAATAATGCATGGTTAACCTAGTTGAGCTTGGCT

1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1760
GCAGAACTGAACAGAGAAATAAGAACATGAAACTCAAGAGAGTGCCATCTCTTGCCAGCTGATGGGAAAGAGCAAACCTC

1761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1840
TGGAGGATATTTACTTTTTGTTTTTTTTGGTGCAAACCTCTGGAGGATAATTTGTATCAACATTATCATCATAAAAGAT

1841 -----+-----+-----+-----+-----+----- 1886
TGAAATGGACTGGTATTTGAGAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 3.12.: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz einer Glutathion Synthetase cDNA aus *Mesembryanthemum crystallinum*

3.2. Expressionsanalysen zu den Enzymen des antioxidativen Verteidigungssystems

3.2.1. Expression der Cu/Zn-Superoxid Dismutase

Beim Vergleich salzgestresster *M. crystallinum*-Pflanzen mit ungestressten Kontrollpflanzen im Northern Blot zeigt sich, daß die Transkriptmenge der Cu/Zn-Superoxid Dismutase zum einen bei den salzbehandelten Pflanzen am Vormittag und frühen Nachmittag höher ist, jedoch gegen Abend stärker abgenommen hat. Zum anderen unterliegt sie einem diurnalen Wechsel mit einem Maximum bei 14–16h (s. Abb. 3.15 und 3.14). Die verwendete Sonde wurde durch PCR aus einem Plasmid hergestellt, das die Cu/Zn-Superoxid Dismutase mit der Acc. No. AF034832 enthielt. Die hierfür eingesetzten Primer (*czsodfor*, sense und *czsodrev*, antisense) lieferten ein 288 bp langes Produkt, das nach Biotinmarkierung für die Detektion des Northern Blots eingesetzt wurde. Aus Abb. 3.14 geht außerdem hervor, daß sowohl Salzbehandlung, als auch Mangel an CO₂ zu einer Induktion der Cu/Zn-Superoxid Dismutase führen, wobei die Behandlung mit Natriumchlorid schneller zu einem Anstieg der Transkriptmenge führt als Kohlendioxidmangel.

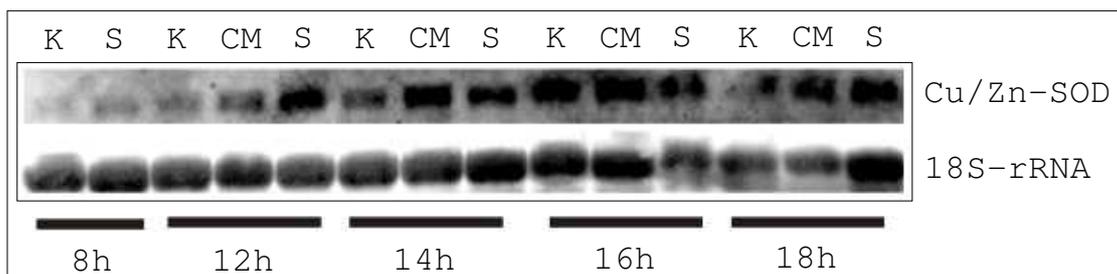


Abb. 3.14.: Northern Blot-Analyse der Expression von Cu/Zn-Superoxid Dismutase in *M. crystallinum*-Pflanzen die mit 400 mM NaCl (S) und Leitungswasser (K) gegossen wurden, bzw. CO₂-Mangel ausgesetzt waren (CM), im Tagesverlauf. Zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge wurden Vergleichshybridisierungen mit einer Sonde gegen 18S rRNA durchgeführt.

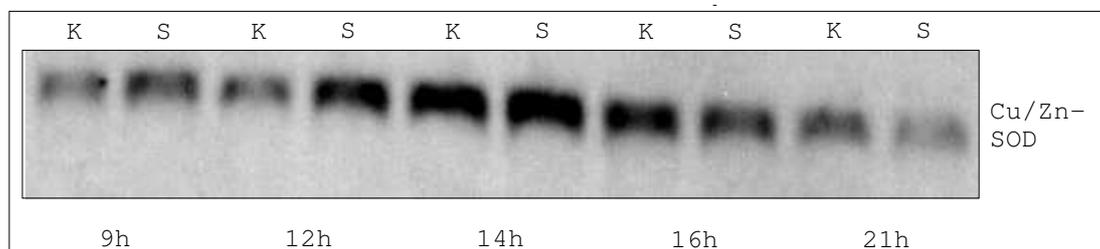


Abb. 3.15.: Northern Blot-Analyse der Expression von Cu/Zn-Superoxid Dismutase in *M. crystallinum*-Pflanzen die mit 400 mM NaCl (S) und Leitungswasser (K) gegossen wurden im Tagesverlauf. Zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge wurden Vergleichshybridisierungen mit einer Sonde gegen 18S rRNA durchgeführt (nicht gezeigt).

3.2.2. Expression der Ascorbat Peroxidase

3.2.2.1. Transkriptebene

M. crystallinum-Pflanzen im salzinduzierten CAM-Zustand wurden im Vergleich mit nicht gestressten Pflanzen im C₃-Zustand zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf ihren Gehalt an Ascorbat Peroxidase-Transkript hin untersucht. Die verwendete biotinmarkierte Sonde ging aus einer PCR mit den Primern *asxcodsn* und *asxcodas* und der cDNA des APX1-Transkripts als Templat hervor. Das 266 bp lange Produkt ist in der Lage mit allen bekannten Isoformen der Ascorbat Peroxidase zu hybridisieren, bei den gewählten Stringenzbedingungen (70% Homologie) wird jedoch, wie sich aus der Lage des erhaltenen Signals im Vergleich mit den Signalen isoformspezifischer Sonden[24] schließen läßt, nur die cytosolische Isoform 1 detektiert. Auch eine Überlagerung des Signals mit den Banden der ähnlich großen cytosolischen Isoformen 3 und 4 ist bei einer Homologie von 62% (APX3) bzw. 65% (APX4) im entsprechenden Bereich unwahrscheinlich.

Es zeigt sich, daß die Expression des APX1-Transkripts durchweg bei den Kontrollpflanzen deutlich höher ist, als bei den gestressten Pflanzen. Weiterhin ist sowohl bei Kontrolle als auch bei salzbehandelten Proben ein Anstieg der Transkriptmenge am Mittag und Nachmittag im Vergleich zu Vormittag und Abend zu verzeichnen. Das auffällig schwache Signal der 16h-Kontrollprobe ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Artefakt, das sich bei einer Wiederholung des Versuchs im fraglichen Zeitraum mit höherer zeitlicher Auflösung nicht reproduzieren ließ (nicht gezeigt).

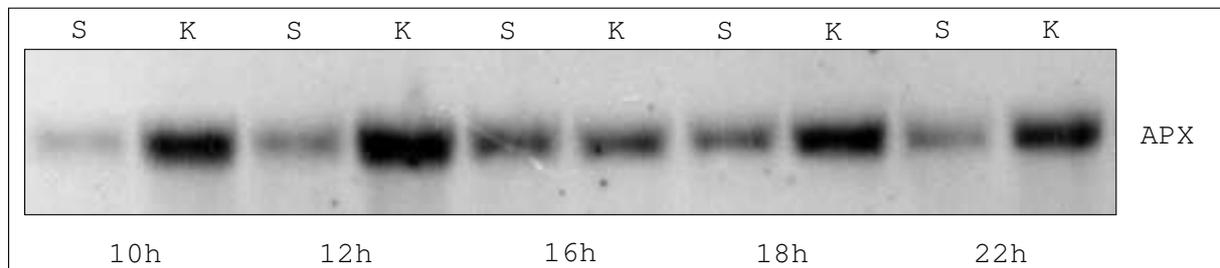


Abb. 3.16.: Northern Blot-Analyse der Expression von Ascorbat Peroxidase in *M. crystallinum*-Pflanzen im Tagesverlauf, die mit 400 mM NaCl (S) bzw. mit Leitungswasser (K) gegossen wurden. Zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge wurden Vergleichshybridisierungen mit einer Sonde gegen 18S rRNA durchgeführt (nicht gezeigt).

3.2.2.2. Proteinebene

Es wurde ein Antiserum gegen die bakteriell überexprimierte Ascorbat Peroxidase Isoform 1 aus *Mesembryanthemum crystallinum* [24] eingesetzt um Westernblot-Analysen an Proteinextrakten aus unterschiedlich behandeltem Blattmaterial durchzuführen. Das Antiserum sollte aufgrund der Homologie der verschiedenen Isoformen zueinander mit hoher Wahrscheinlichkeit mit allen Ascorbat Peroxidasen Kreuzreaktion zeigen. Wie in

Abb. 3.17 zu erkennen ist, detektiert das verwendete Antiserum mindestens vier unterschiedliche Proteine. Hier wurden Proteinproben von Pflanzen im salzinduzierten CAM-Zustand, sowie von Pflanzen, die CO₂-freier Luft ausgesetzt waren Proben von Kontrollpflanzen gegenübergestellt; die Probennahme erfolgte jeweils um 16h. Die einzelnen Spuren des Gels wurden mit jeweils gleichen Proteinmengen beladen. Es werden drei Signale im Bereich um die 30 kDa – vermutlich cytosolische Isoformen – und ein wahrscheinlich chloroplastidäres Signal bei ca. 40 kDa detektiert. Zu erkennen sind deutliche Unterschiede in der Gewichtung der verschiedenen Isoformen. Während die unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen vor allem die als Bande 2, sowie in geringerem Maß auch die als Bande 1 und 3 detektierten Isoformen exprimieren, verschiebt sich dieses Muster nach Wechsel zum CAM-Zustand dahingehend, daß nun Bande 2 deutlich schwächer ist als Bande 3, während Bande 1 praktisch nicht mehr zu erkennen ist. Außerdem kommt es bei Pflanzen im CAM-Zustand zu einer Induktion der chloroplastidären Isoform, die als Bande 4 detektiert wird. Dies tritt bei Pflanzen, die CO₂-Mangel ausgesetzt gewesen waren nicht auf, vielmehr kommt es hier zu einer Induktion aller auch bei Kontrollpflanzen exprimierten Isoformen (vor allem Bande 2, in geringerem Maß Bande 3), mit Ausnahme der chloroplastidären (Bande 4).

Die für den in Abb. 3.18 gezeigten Western Blot verwendeten Pflanzen wurden unter unterschiedlichen Lichtbedingungen angezogen. Als Kontrollpflanzen wurden Pflanzen bezeichnet, die unter den Standardbedingungen der Klimakammer mit 330 $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf Höhe der Pflanzfläche angezogen wurden, als „Hochlicht“-Pflanzen wurden Pflanzen bezeichnet, die davon abweichend 14 Tage mit 650 $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beleuchtet worden waren. „Dauerlicht“-Pflanzen wurden 7 Tage einer vierundzwanzigstündigen Dauerbeleuchtung mit 1200 $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgesetzt. Um chloroplastidäre Immunosignale identifizieren zu können wurden außerdem Chloroplastenisolationen aus Blättern von Kontrollpflanzen durchgeführt. Zur Westernblot-Analyse wurden jeweils gleiche Mengen der aus den unterschiedlichen Geweben erhaltenen Gesamtproteinlösungen nebeneinander aufgetragen. In allen Pflanzenproben treten Signale bei ca. 28-29 kDa (1 u. 2) auf. Bei den mit stärkerer Beleuchtung angezogenen Pflanzen kommt ein Signal bei ca. 30 kDa hinzu (3), das mit zunehmender Beleuchtungsstärke ausgeprägter wird. Weiterhin kommt im Vergleich zur Kontrolle bei den stärker beleuchteten Pflanzen („HL“) eine Bande bei ca. 40 kDa hinzu (4), die sich klar einem chloroplastidären Signal zuordnen läßt, jedoch bei den „Dauerlicht“-Proben nicht mehr nachweisbar ist. Zwei sehr schwache Banden bei den „HL“- und „DL“-Pflanzen zwischen 30 und 40 kDa (5 u. 6) deuten auf weitere mögliche schwach exprimierte Isoformen hin. Außer den genannten Signalen treten bei der Chloroplastenprobe zwei weitere unterhalb von 25 kDa auf, sowie ein weiteres oberhalb von 45 kDa (7) bei der Kontroll- und der HL-Probe. Das Auftreten von Bande 3 in der chloroplastidären Spur ist vermutlich auf eine Verunreinigung zurückzuführen. Eine Zuordnung der Banden zu den bekannten Ascorbat Peroxidase-Isoformen aus *M. crystallinum* wurde in Tabelle 3.2 unternommen.

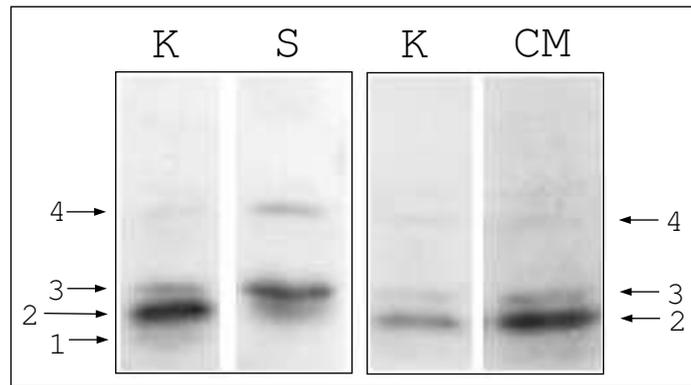


Abb. 3.17.: Westernblot-Analyse mehrerer Ascorbat Peroxidase-Isoformen. (K=Kontrolle, S=salzinduzierter CAM-Zustand, CM=CO₂-Mangel) Die Nummerierung der Banden entspricht Abb. 3.18.

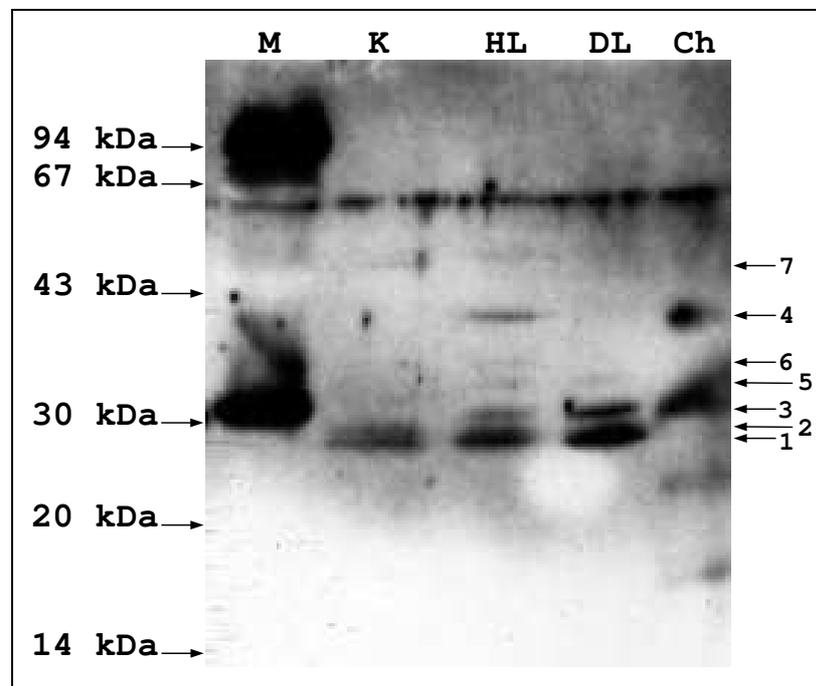


Abb. 3.18.: Westernblot-Analyse mehrerer Ascorbat Peroxidase-Isoformen. (M=Marker, K=Kontrolle, HL="Hochlicht"-Bedingungen, DL="Dauerlicht"-Bedingungen, Ch=chloroplastidäre Proteine)

Isoform	Acc.No.	Lokalisierung	Masse in kDa (Vorläufer)	Masse in kDa (reif)	Bande
APX1	U43561	Cytosol		28,3	2
APX2a	AF069316	Chloroplast	40,9	32,2	4/5
APX2b	AF069315	Chloroplast	46,5	37,9	7/4
APX3	AF079512	Cytosol		27,1	1
APX4	AF079513	Cytosol		28,4	2
APX5	AF139190	Cytosol		31,5	3

Tab. 3.2.: Übersicht über die berechneten Molekülmassen der bekannten Isoformen der Ascorbat Peroxidase aus *Mesembryanthemum crystallinum*, die Nummerierung der Banden bezieht sich auf Abb. 3.18

3.2.3. Expression der Katalase

Um Northern Blot Analysen der Katalase durchführen zu können wurde anhand einer der beiden für *Mesembryanthemum crystallinum* in der Datenbank publizierten Sequenzen (Acc.No. AF069319, blattspezifisch) eine 232 bp lange DNA-Sonde gegen Katalase kloniert. Hierzu wurde zuerst eine RT-PCR mit dem Primerpaar *cat1* und *cat2* durchgeführt. Das resultierende Produkt wurde in pBluescript II SK⁺ kloniert und durch Dideoxysequenzierung als Fragment der Katalase bestätigt. Nach Biotinylierung wurde es zur Hybridisierung im Northern Blot eingesetzt. Bei einer Northern Blot Analyse von Pflanzen, die zum einen mit 400 mM Natriumchlorid gegossen wurden, zum anderen kohlendioxidfreier Luft ausgesetzt waren, zeigte sich, daß CO₂-Mangel zu einer geringen Induktion der Katalaseexpression führt, während nach Salzbehandlung zu keiner Tageszeit ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ist.

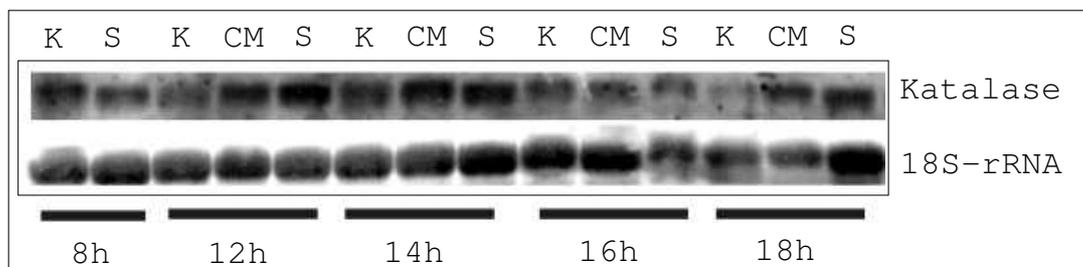


Abb. 3.19.: Northern Blot-Analyse der Expression von Katalase in *M. crystallinum*-Pflanzen die mit 400 mM NaCl (S) und Leitungswasser (K) gegossen wurden, bzw. CO₂-Mangel ausgesetzt waren (CM), im Tagesverlauf. Zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge wurden Vergleichshybridisierungen mit einer Sonde gegen 18S rRNA durchgeführt.

3.2.4. Expression der Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase

Um den Nachweis zu führen, daß die Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase in *Mesembryanthemum crystallinum* an der oxidativen Stressabwehr beteiligt ist, wurde bei 5 Wochen alten Pflanzen durch Besprühen der Blattoberflächen mit einer 50 µMLösung des Herbizids Methylviologen (s. Abschn. 1.1.1.1) oxidativer Stress induziert. Nach 48 h

wurde das Blattmaterial geerntet und Gesamt-RNA aus Mischproben von Blättern aller Entwicklungsstufen gewonnen. Die Analyse der Transkriptmenge erfolgte mittels Real Time-PCR, wobei die Primer „gpxqrtfw“ und „gpxqrtrv“ eingesetzt wurden, die ein Produkt von 600 bp Länge liefern. Für den Templatmengenabgleich wurden Primer gegen β -Actin aus *Brassica juncea* eingesetzt, mit denen sich auch aus *M. crystallinum*-cDNA spezifische Produkte synthetisieren lassen, da sie bis auf x und y ausgetauschte Basen homolog zur entsprechenden Sequenz aus *Mesembryanthemum crystallinum* sind. Die in Abb. 3.21 gezeigten Fluoreszenzkurven stellen Mittelwerte aus je drei Einzelreaktionen dar, wobei die Standardabweichungen der Meßwerte jeweils unter 2 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) lagen. Aus den Schmelzpunktanalysen der gebildeten Produkte der Einzelreaktionen ließ sich ersehen, daß jeweils nur ein Produkt spezifisch gebildet wurde. Das Primerannealing wurde für „gpxqrtfw“ und „gpxqrtrv“ bei 55°C, für „bjact1“ und „bjact2“ bei 60°C durchgeführt. Aus der Tatsache, daß der Fluoreszenzanstieg in den Reaktionen, für die als Templat cDNA aus gestressten Pflanzen eingesetzt wurde im Vergleich zur Kontrolle bereits drei Zyklen früher einsetzt, läßt sich schließen, daß die Paraquatbehandlung bereits nach 48 h zu einer Induktion der Glutathion Peroxidase-Expression geführt hat. Gestützt wird dieser Befund weiterhin durch Northern Blot Analysen (s. Abb. 3.20), die bei Pflanzen im salzinduzierten CAM-Zustand ebenfalls eine deutliche Induktion der Glutathion Peroxidase zeigen.

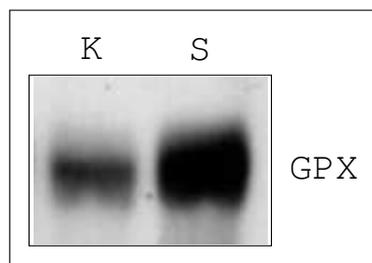


Abb. 3.20.: Northern Blot-Analyse der Expression von Glutathion Peroxidase in *M. crystallinum*-Pflanzen die mit 400 mM NaCl (S) und Leitungswasser (K) gegossen wurden. Zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge wurden Vergleichshybridisierungen mit einer Sonde gegen 18S rRNA durchgeführt (nicht gezeigt).

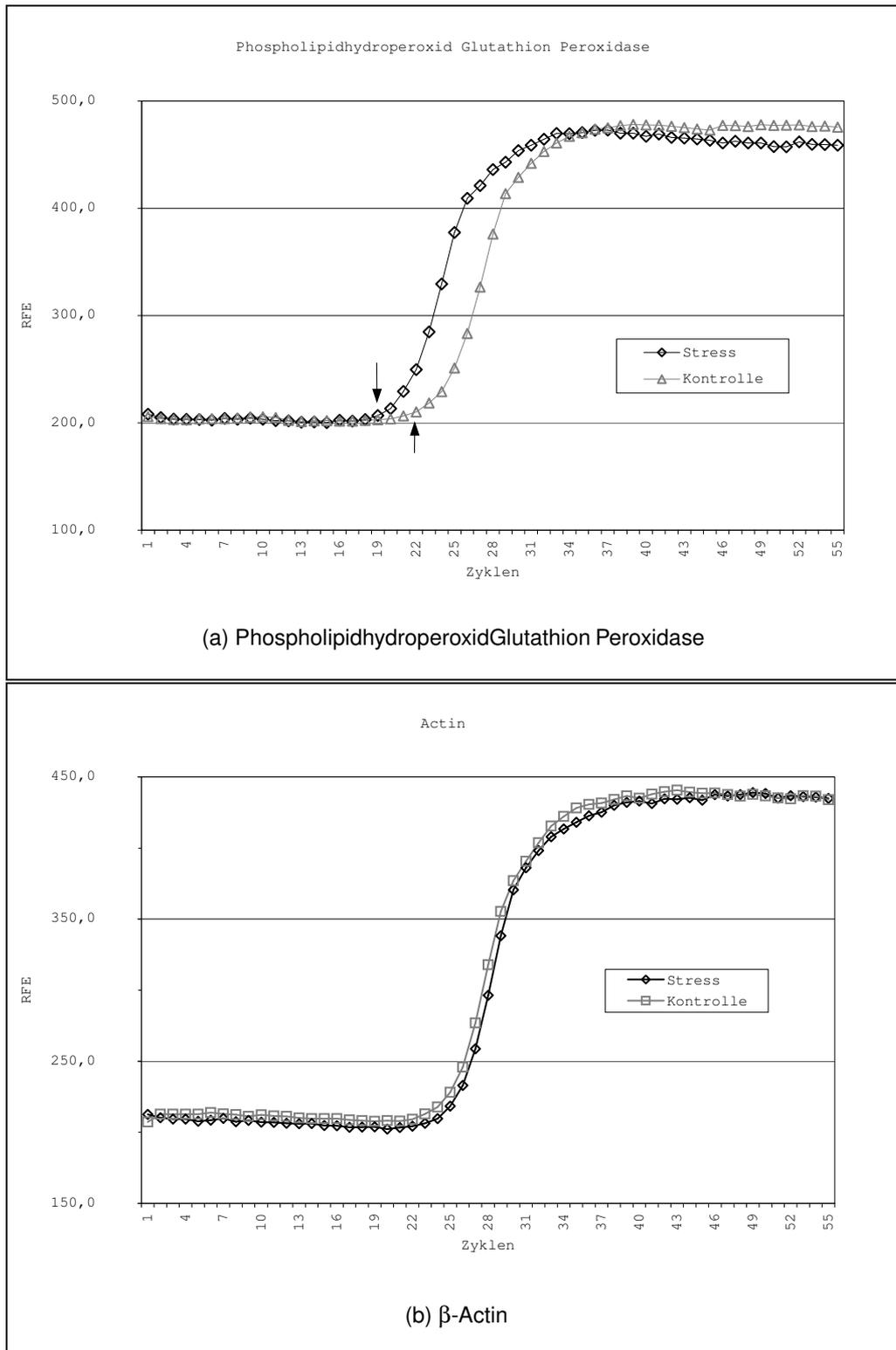


Abb. 3.21.: Real Time PCR-Analyse der Expression der Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase in *M. crystallinum*-Pflanzen die 50 μ M Paraquat ausgesetzt waren. Zum Abgleich der eingesetzten Templatmenge wurden Vergleichsreaktionen mit Primern gegen β -Actin durchgeföhrt. Die Pfeile im Bild links bezeichnen die Zyklen, bei denen zuerst ein signifikanter Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen ist.

3.2.5. Expression der Monodehydroascorbat Reduktase

Zum Vergleich der Transkriptmengen der isolierten Isoform der Monodehydroascorbat Reduktase unter normalen Bedingungen und solchen, die oxidativen Stress auslösen wurde eine Real Time-PCR-Analyse durchgeführt. Als Templat wurden gleiche Mengen 1:50 verdünnter cDNA-Lösungen eingesetzt, die aus der Gesamt-RNA von Blattmaterial 5 Wochen alter *M. crystallinum*-Pflanzen gewonnen wurde. Die mit „Stress“ bezeichneten Proben stammen hierbei von Pflanzen, die für 48 h dem Herbizid Methylviologen ausgesetzt gewesen waren. Die Applikation des Herbizids erfolgte durch Besprühen der Blätter mit einer 50 µM Lösung. Die für die PCR verwendeten Primer waren „mdhqr_tfw“ und „mdhqr_trv“, sie liefern ein Produkt von 600 bp Länge. Die Spezifität der Reaktion wurde mit einer an die PCR anschließenden Schmelzpunktanalyse verifiziert. Zum Abgleich der eingesetzten Templatmengen wurden parallel wiederum Reaktionen mit dem Primerpaar bjact1 und bjact2 durchgeführt, das ein Fragment des β-Actin-Transkripts von 500 bp amplifiziert. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte aus den gemessenen Fluoreszenzemissionen je dreier paralleler Ansätze dar, deren Standardabweichungen im relevanten Bereich der Reaktion unterhalb von 3,0 liegen. Wie aus Abb. 3.23 hervorgeht, ist kein Unterschied der MDHAR-Transkriptmenge zwischen gestressten und ungestressten Pflanzen festzustellen. Die Reaktion verläuft mit beiden eingesetzten Templaten praktisch gleich.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt auch der in Abb. 3.22 dargestellte Northern Blot. Auch zwischen Pflanzen im salzinduzierten CAM-Zustand und unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen läßt sich kein Unterschied in der Transkriptmenge der Monodehydroascorbat Reduktase feststellen.

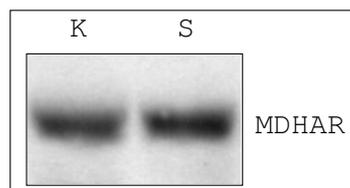


Abb. 3.22.: Northern Blot-Analyse der Expression von Monodehydroascorbat Reduktase in *M. crystallinum*-Pflanzen die mit 400 mM NaCl (S) und Leitungswasser (K) gegossen wurden. Zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge wurden Vergleichshybridisierungen mit einer Sonde gegen 18S rRNA durchgeführt (nicht gezeigt).

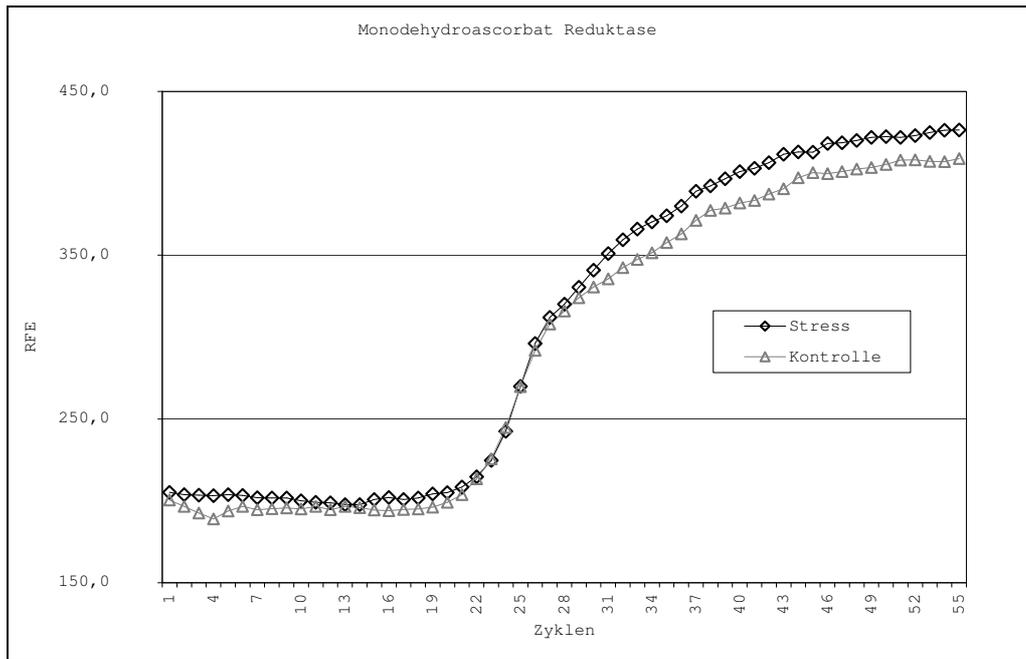


Abb. 3.23.: Real Time PCR-Analyse der Expression der Monodehydroascorbat Reduktase in *M. crystallinum*-Pflanzen die 50 μ M Paraquat ausgesetzt waren. Zum Abgleich der eingesetzten Templatmenge wurden Vergleichsreaktionen mit Primern gegen β -Actin durchgeführt (s. Abb. 3.21).

3.2.6. Expression der Glutathion Reduktase

Pflanzen im salzinduzierten CAM-Zustand wurden hinsichtlich der Expression der Glutathion Reduktase mit nicht salzbehandelten Pflanzen verglichen. Im Northern Blot zeigt sich ein deutlich stärkeres Signal bei den gestressten Pflanzen als bei den Kontrollen (s. Abb. 3.24).

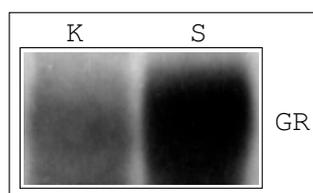


Abb. 3.24.: Northern Blot-Analyse der Expression von Glutathion Reduktase in *M. crystallinum*-Pflanzen die 12 Tage mit 400 mM NaCl (S) und Leitungswasser (K) gegossen wurden. Zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge wurden Vergleichshybridisierungen mit einer Sonde gegen 18S rRNA durchgeführt (nicht gezeigt).

3.2.7. Expression der γ -EC Synthetase

Bei einer Northern Blot Analyse von unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen, Pflanzen im salzinduzierten CAM-Zustand und solchen, die zweistündigem Kohlendioxidmangel ausgesetzt waren, zeigt sich, daß eine leichte Abhängigkeit der γ -ECS -

Transkriptkonzentration von der Tageszeit vorhanden ist. Eine schwache Induktion der γ -ECS bei den Proben von 14 und 16 h durch CO₂-Mangel, jedoch nicht durch Salz ist

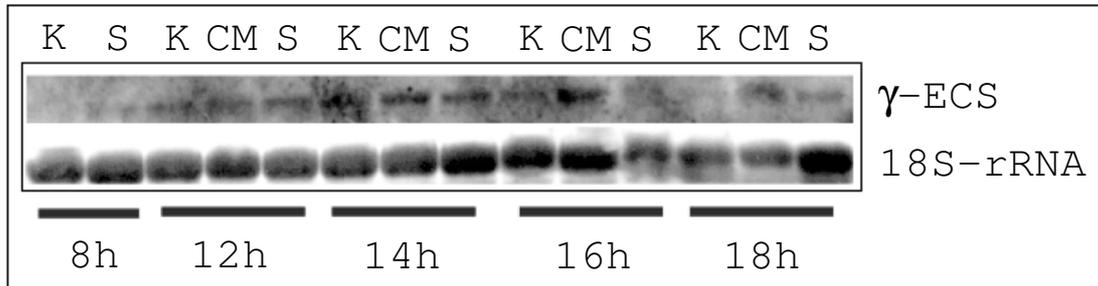


Abb. 3.25.: Northern Blot-Analyse der Expression von γ -EC Synthetase in *M. crystallinum*-Pflanzen die mit 400 mM NaCl (S) und Leitungswasser (K) gegossen wurden, bzw. CO₂-Mangel ausgesetzt waren (CM). Zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge wurden Vergleichshybridisierungen mit einer Sonde gegen 18S rRNA durchgeführt.

3.3. Subzelluläre Lokalisierung einiger am antioxidativen Verteidigungssystem beteiligten Enzyme

3.3.1. Subzelluläre Lokalisierung der chloroplastidären APX-Isoformen

Der ChloroP 1.1-Server [42] des „Center for Biological Sequence Analysis“, Lyngby (Dänemark) sagt nach Analyse der ersten zweihundert Aminosäuren der Isoformen 2a und 2b der Ascorbat Peroxidase aus *Mesembryanthemum crystallinum* ein chloroplastidäres Transitpeptid mit einer Länge von 85 Aminosäuren voraus („Score“ 0,587). Auch die Ergebnisse der Programme iPSORT [111] und TargetP legen nahe, daß die Isoformen APX2a und APX2b im Chloroplasten lokalisiert sind. Um dies experimentell zu überprüfen wurde ein DNA-Konstrukt hergestellt, das für ein GFP-Fusionsprotein mit den ersten 85 Aminosäuren der Isoform APX2a kodiert (s. Abb. 3.27). Mit diesem Konstrukt und einem nachgewiesenermaßen chloroplastidär lokalisierten Kontrollkonstrukt (Transitpeptid der γ -ECS aus *B. juncea*, dsRed-Konstrukt [157]) wurde eine transiente Kotransformation von *Beta vulgaris*-Zellen (Suspensionskultur) durchgeführt. Wie Abbildung 3.26 zeigt, sind beide Fusionsproteine in den selben Organellen lokalisiert.

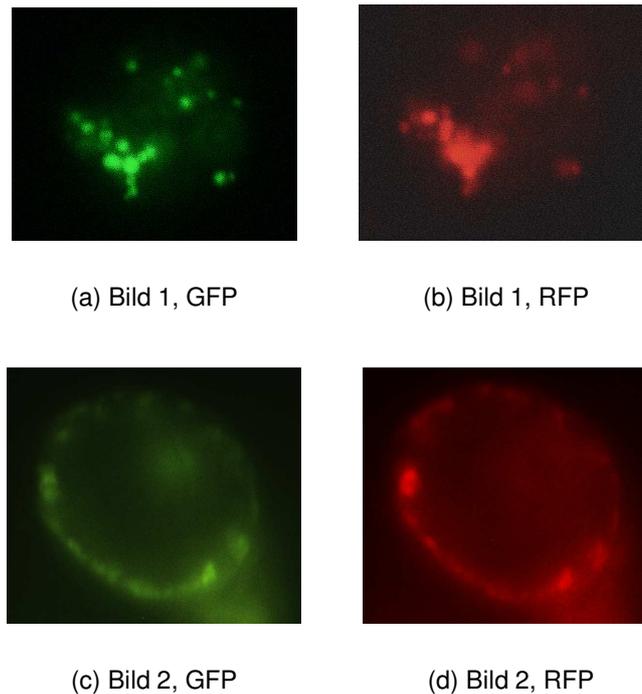


Abb. 3.26.: Subzelluläre Lokalisation der Ascorbat Peroxidase durch transiente Kotransformation von *Beta vulgaris*-Zellen mit GFP- und RFP-Fusionskonstrukten. Das GFP-Konstrukt enthält das Transitpeptid von APX2a; das RFP-Konstrukt enthält zur Kontrolle das Transitpeptid der chloroplastidären γ -ECS aus *Brassica juncea*.

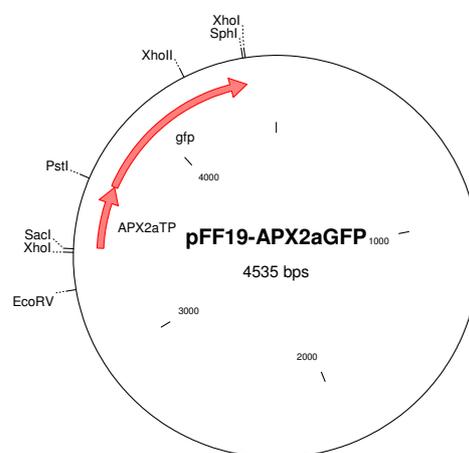


Abb. 3.27.: GFP-Konstrukt zur Lokalisierung der chloroplastidären Ascorbat Peroxidase Isoformen (APX-TP ist das verwendete, mögliche Transitpeptid der APX2a aus *M. crystallinum*.)

3.3.2. Subzelluläre Lokalisierung der Monodehydroascorbat Reduktase

Der SignalP-Server des „Center for Biological Sequence Analysis“, Lyngby (Dänemark) sagt ein N-terminales Transitpeptid von 32 Aminosäuren Länge voraus. Eine Analyse mit ChloroP 1.1 (s. Abschn. 3.3.1) deutet darauf hin, daß das gefundene Transkript für

ein chloroplastidär lokalisiertes Protein kodiert ("score" 0,521). Um dies zu verifizieren wurde ein DNA-Konstrukt hergestellt (s. Abb. 3.29), das für ein GFP-Fusionsprotein mit den ersten 33 Aminosäuren der isolierten Monodehydroascorbat Reduktase kodiert. Nach einer transienten, ballistischen Kotransformation von *Beta vulgaris*-Zellen aus Suspensionskultur mit diesem Konstrukt und einem chloroplastidären RFP-Kontrollkonstrukt (s. Abschn. 3.3.1) zeigte sich jedoch keine Anreicherung von GFP in Proplastiden, wie es für ein funktionsfähiges chloroplastidäres Transitpeptid zu erwarten gewesen wäre. Vielmehr lag GFP diffus über die gesamte Zelle verteilt vor, während RFP aus dem Kontrollkonstrukt die erwartete Lokalisierung zeigte (s. Abb. 3.28).

Einen weiteren Anhaltspunkt zur Lokalisierung des durch das gefundene Transkript kodierten Proteins lieferte eine phylogenetische Analyse. Es wurde überprüft, welcher Gruppe sich das *M. crystallinum*-Peptid in einem phylogenetischen Baum aus anderen pflanzlichen Isoformen des Enzyms mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation zuordnen läßt (s. Abb. 3.30). Diese Analyse ergab, daß das fragliche Polypeptid einen höheren Verwandtschaftsgrad zu cytosolischen Isoformen anderer Pflanzenspezies aufweist als zu chloroplastidär lokalisierten Formen. Zusammen mit dem durch die GFP-Transformation erhaltenen Ergebnis legt dies den Schluß nahe, daß es sich entgegen der Aussage der computergestützten Analysen um eine cytosolische Isoform handelt.

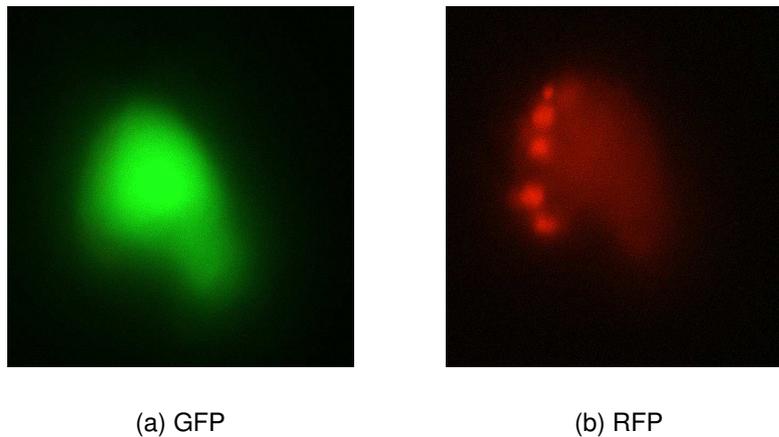


Abb. 3.28.: Subzelluläre Lokalisation der Monodehydroascorbat Reduktase durch transiente Kotransformation von *Beta vulgaris*-Zellen mit (a) GFP- und (b) RFP-Fusionskonstrukten. Das GFP-Konstrukt enthielt das putative Transitpeptid der gefundenen Monodehydroascorbat Reduktase aus *Mesembryanthemum crystallinum* ; das RFP-Konstrukt enthielt zur Kontrolle das Transitpeptid der chloroplastidären γ -ECS aus *Brassica juncea*.

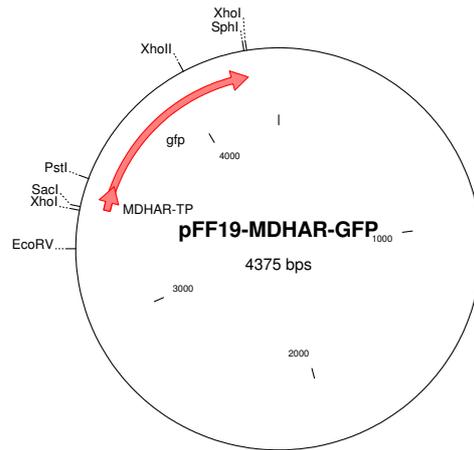


Abb. 3.29.: GFP-Konstrukt zur Lokalisierung der Monodehydroascorbat Reduktase (MDHAR-TP ist das verwendete, mögliche Transitpeptid der MDHAR#9 aus *Mesembryanthemum crystallinum* .)

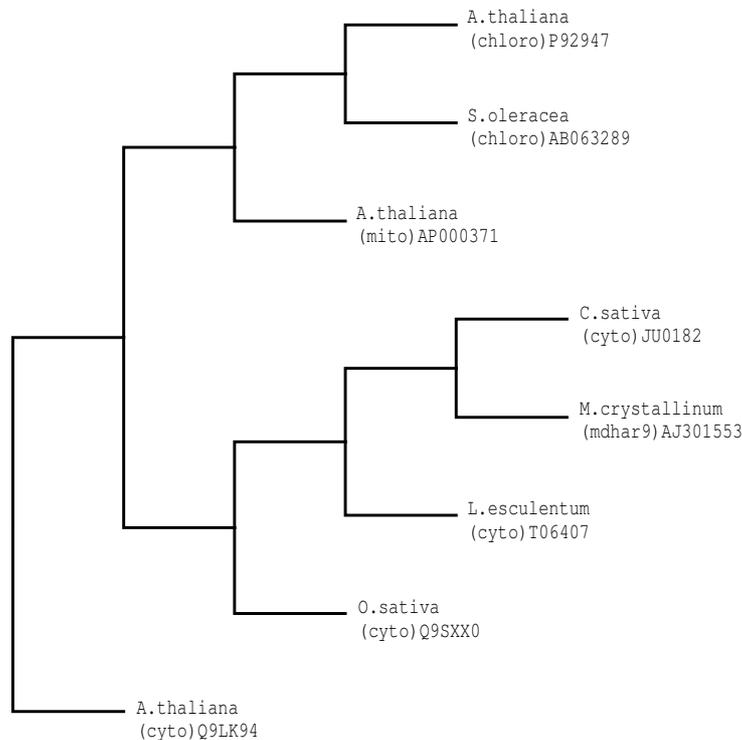


Abb. 3.30.: Phylogenetischer Baum unterschiedlich lokalisierter (chloroplastidär, mitochondrial und cytosolisch) Monodehydroascorbat Reduktasen verschiedener Pflanzenspezies (*Mesembryanthemum crystallinum* , *Arabidopsis thaliana* , *Cucumis sativa* , *Pisum sativum* , *Oryza sativa* , *Lycopersicon esculentum*). Die Analyse wurde mittels des „Path“-Pakets des WWW2HUSAR-Servers, ausgehend von einem Cluster-Alignment durchgeführt. Gezeigt ist der nach der „Distance“-Methode erstellte Baum, andere Methoden (Maximum Likelihood, Parsimony) liefern vergleichbare Ergebnisse.

3.4. Thiolgehalt

Blattproben von Kontrollpflanzen im C₃- und Pflanzen im CAM-Zustand nach zwölf-tägiger Salzbehandlung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 7 h morgens und 2 h nachts geerntet und der Gehalt an Cystein und Glutathion über HPLC bestimmt. Die gemessenen Cysteinwerte schwankten über den gesamten untersuchten Zeitraum um einen Mittelwert von 73,6 nmol/g FG ($\pm 15,1$ nmol/g FG) für gestresste und 60,6 nmol/g FG ($\pm 15,6$ nmol/g FG) für Kontrollpflanzen. Im Rahmen der Fehlergrenzen ließ sich weder eine diurnale Schwankung im Cysteingehalt feststellen, noch ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlich behandelten Proben. Der Glutathiongehalt (s. Abb. 3.31) dagegen zeigt ein Maximum am frühen Nachmittag (5–9 h laufender Zeit) und einen deutlichen Unterschied zwischen gestressten und ungestressten Pflanzen. Dieser Unterschied ist ebenfalls am frühen Nachmittag zwischen 12 h und 16 h (5–9 h laufender Zeit) mit über 30 nmol/g FG am ausgeprägtesten, während er später auf ca. 10 nmol/g FG abnimmt.

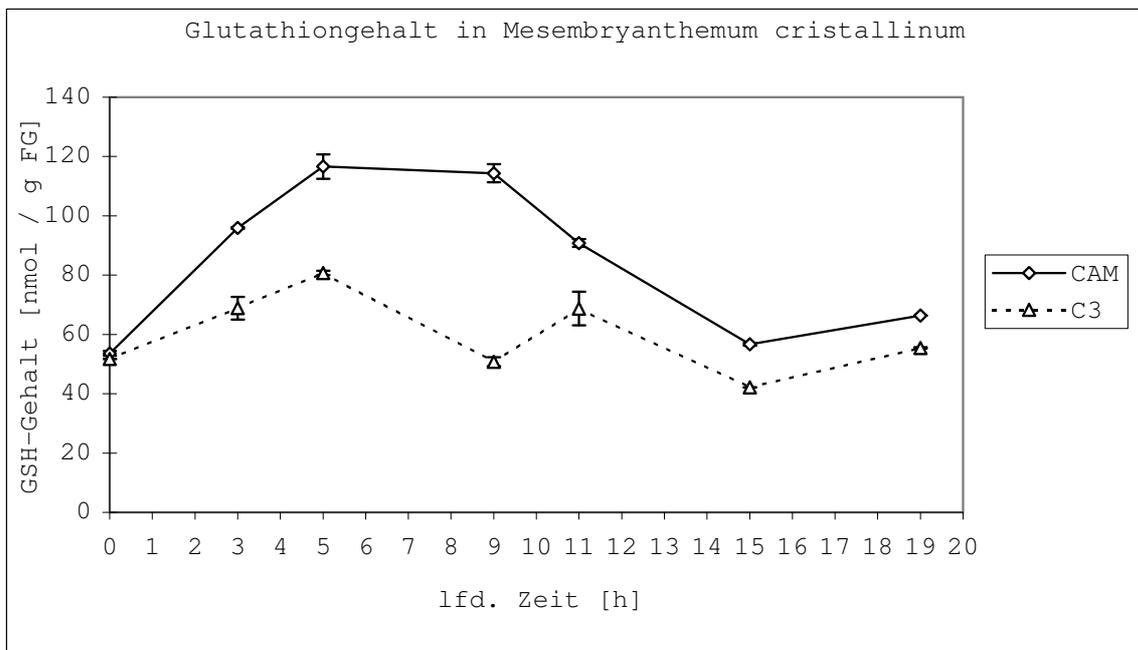


Abb. 3.31.: Vergleich der Glutathiongehalte von Kontrollpflanzen (C₃) und Pflanzen im salzinduzierten CAM-Zustand (CAM) über 19 h. Die Proben bei 15 h und 19 h wurden nach Ende der Lichtperiode genommen. Die Meßpunkte repräsentieren Mittelwerte von 2–4 Messungen.

4. Diskussion

Voraussetzung für die Untersuchung des antioxidativen Verteidigungssystems der fakultativen CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum*, wie sie im Rahmen des Projekts, dessen Teil die vorliegende Arbeit ist angestrebt wird, ist die Kenntnis der cDNA-Sequenzen der beteiligten Enzyme. Zu Beginn der Arbeit waren Datenbankeinträge für die Sequenzen der Superoxid Dismutase, der Katalase sowie mehrerer Isoformen der Ascorbat Peroxidase vorhanden. Vollängensequenzen für Transkripte einer Glutathion Peroxidase, einer Monodehydroascorbat Reduktase, einer Glutathion Reduktase, sowie der beiden am Biosyntheseweg des Glutathions beteiligten Synthetasen, der γ -EC Synthetase und der Glutathion Synthetase konnten im Verlauf der Arbeit gewonnen werden. Da computergestützte Sequenzanalysen Anhaltspunkte dafür boten, daß die Ascorbat Peroxidase Isoformen APX2a/2b sowie die erhaltene Monodehydroascorbat Reduktase ein chloroplastidäres Transitpeptid enthielten, wurden subzelluläre Lokalisierungsversuche mit GFP-Fusionsproteinen durchgeführt. Darüberhinaus wurden Transkriptmengenanalysen der Enzyme und Proteinmengenanalysen verschiedener Isoformen der Ascorbat Peroxidase nach unterschiedlichen Stressbehandlungen durchgeführt.

4.1. cDNA-Sequenzen und Sequenzanalyse

Enzym	Acc.No.	Methode	cDNA	Prot.
Glutathion Peroxidase	AJ315976	cDNA-Bank	881 bp	170 AS
Monodehydroascorbat Reduktase	AJ301553	RACE	1588 bp	477 AS
Glutathion Reduktase	AJ400816	cDNA-Bank	1822 bp	461 AS
γ -ECS	AJ011673	beides	2099 bp	510 AS
Glutathion Synthetase	AJ301552	RACE	1886 bp	500 AS

Tab. 4.1.: Im Verlauf der Arbeit generierte cDNA-Vollängensequenzen

4.1.1. Glutathion Peroxidase

4.1.1.1. Die isolierte Glutathion Peroxidase cDNA kodiert für eine Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase.

Durch RT-PCR mit degenerierten Primern konnte anhand unvollständiger in den EST-Datenbanken vorhandener Sequenzen ein Fragment einer pflanzlichen Glutathion Peroxidase erhalten werden, das anschließend erfolgreich als Sonde beim Durchmustern

einer cDNA-Bank eingesetzt wurde. Anhand von Sequenzalignments ließ sich die erhaltene Vollängensequenz (GPX-A2#3) in die Klasse der Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidasen (s. Abschn. 1.2.2.3) einordnen. Das aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Protein weist keinerlei Merkmale, die auf das Vorhandensein eines Transitpeptids oder einer Membranbindedomäne schließen lassen auf. Die Homologie zu anderen pflanzlichen Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidasen liegt bei 80%, zu tierischen Enzymen dieser Klasse ist sie etwas geringer, beispielsweise weist eine Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase aus *Bos taurus* ca. 50% Identität und über 60% Ähnlichkeit mit dem Enzym aus *Mesembryanthemum crystallinum* auf. Im Gegensatz zum Tierreich, wo Glutathion Peroxidasen die Hauptaktivität bei der Entgiftung von Wasserstoffperoxid zur Verfügung stellen und sich in mehrere Klassen einteilen lassen, von denen bei den Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidasen die wenigsten Vertreter bekannt sind, sind diese Enzyme offenbar die Hauptform der Glutathion Peroxidase in Pflanzen, wenn man Glutathion-S-Transferasen mit ähnlicher Aktivität außer Acht läßt. In *Arabidopsis thaliana* kodiert eine kleine Genfamilie für Glutathion Peroxidasen. Eine Suche in *Arabidopsis*-Genbanken ergab acht Proteine mit signifikanter Homologie zu dem aus *Mesembryanthemum crystallinum* isolierten Vertreter dieser Enzymklasse. Datenbankvergleiche ergaben, daß der höchste Homologiegrad zu At4g11600 vorliegt, einer Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase aus *Arabidopsis thaliana*. Ein Vergleich der beiden genomischen Sequenzen zeigt, daß sie aus sehr ähnlichen Exons aufgebaut sind, die jedoch von gänzlich unterschiedlichen Introns unterbrochen werden (s. Abb. 3.5).

4.1.1.2. Die isolierte Glutathion Peroxidase cDNA besitzt ein alternatives Polyadenylierungssignal.

Die Sequenz des isolierten cDNA-Klons (GPX-A2#3) ist um 59 bp kürzer als die eines ansonsten identischen jedoch 5' unvollständigen EST-Klons. Dies ist dadurch zu erklären, daß in der 3'-UTR des Gens offenbar zwei alternative Polyadenylierungssignale vorhanden sind, was für pflanzliche Gene nicht ungewöhnlich ist [69]. Bei dem erwähnten EST ist die Sequenz des vorderen Signals durch eine Mutation unbrauchbar geworden, so daß das zweite Signal verwendet wird, was in einer längeren 3'-UTR resultiert. Mittels RT-PCR lassen sich aus *Mesembryanthemum crystallinum* cDNA Fragmente beider Formen des Transkripts amplifizieren, sowohl mit längerer, als auch mit kürzerer 3'-UTR. Dies läßt den Schluß zu, daß beide Polyadenylierungssignale *in vivo* erkannt werden. Beide Signale haben die Sequenz TATAAA, was mit der für Säugetiere üblichen Konsensussequenz (T/A) (T/A) TAAA in Einklang steht [69].

4.1.2. Ascorbat Peroxidase

4.1.2.1. Die Isoformen 2a und 2b der Ascorbat Peroxidase sind chloroplastidär lokalisiert.

Die Ascorbat Peroxidase Isoformen 2a und 2b werden als chloroplastidäre Proteine beschrieben (Acc. No. AF069316 und AF069315), ein experimenteller Beweis stand jedoch bisher noch aus. Die Aussage gründete sich auf Computeranalysen, die mittels des Vorhersagealgorithmus des ChloroP-Softwarepakets [42] durchgeführt wurden (H.J. Bohner, pers. Kommunikation). Berechnet wurde ein 76 Aminosäuren langes Transitpeptid (s. Abb. 4.1) für die Isoform 2a, sowie eines von 74 bp für die Isoform 2b. Die beiden Isoformen unterscheiden sich in diesem Bereich nur um drei Aminosäuren, wobei vor dem Hintergrund, daß die beiden Isoformen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch alternatives Spleißen entstehen [72, 168, 24] die Annahme naheliegt, daß es sich bei diesen Unterschieden um Sequenzierungsartefakte handelt.

```

                *           20           *           40           *           60           *
ASX2a.pep : MSDCLSMASLTTTAAAAAAAATTSRLLPSSSLRSLSLSSSSSSFTSSSSSLKCLRSSPLVSHLFLRDLPRGSSA
ASX2b.pep : MSDCLSMASLTTTAAAAAAAATTSRLLPSSSLRSLSLSSSSSS--SSSSSSLKCLRSSPLVSHLFLRDLPRGSSA

```

Abb. 4.1.: Vergleich der Transitpeptide der Ascorbat Peroxidase Isoformen 2a und 2b, unterschiedliche Aminosäuren sind unterstrichen.

Für die Isoform 2b (Acc No. TREMBL:O81333), die als thylakoidgebunden beschrieben wird, sagt PSORT [111] aufgrund von Merkmalen im C-terminalen Sequenzbereich mit hoher Wahrscheinlichkeit (92%) eine Membranbindung voraus, jedoch ist keine klare Aussage über die tatsächliche Lokalisierung des reifen Polypeptids zu erhalten. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit werden endoplasmatisches Retikulum, Peroxysomen- oder Plasmamembran angegeben. In Anbetracht der hohen Wahrscheinlichkeit dagegen, mit der die auf chloroplastidäre Proteine spezialisierte Software ChloroP für die N-terminalen Sequenzen der Isoformen 2a und 2b jedoch ein chloroplastidäres Transitpeptid vorher sagt, erscheint hier die Thylakoidmembran tatsächlich als das wahrscheinlichste Ziel. Die mutmaßlichen Transitpeptide erfüllen die in der Literatur [75, 155] aufgestellten Kriterien für chloroplastidäres „Targeting“, wie hohe Anteile an Serin (33%) und Alanin (13%), sowie ein hoher Anteil basischer Aminosäuren am Ende des Transitpeptids; auch die Länge der Transitpeptide entspricht mit 76 bzw. 74 bp gut dem Durchschnitt bekannter Transitpeptide chloroplastidärer Ascorbat Peroxidasen [75]. Durch transiente Kotransformation einer *B. vulgaris*-Zellkultur mit einem DNA-Konstrukt, das für ein Fusionsprotein aus dem mutmaßlichen N-terminalen Transitpeptid der Ascorbat Peroxidase Isoform 2a vor GFP kodiert, sowie einem RFP-Kontrollkonstrukt, das das chloroplastidäre Transitpeptid der γ -ECS aus *B. juncea* [157] enthält, konnte experimentell bewiesen werden, daß die Ascorbat Peroxidasen 2a und 2b im Chloroplasten lokalisiert sind. Da die Isoformen 2a und 2b N-terminal wie bereits erwähnt im wesentlichen (97%) identisch sind

wurde auf eine eingehendere Untersuchung der Lokalisation der Isoform 2b verzichtet.

4.1.3. Monodehydroascorbat Reduktase

4.1.3.1. Der isolierte cDNA-Klon kodiert für eine cytosolische Monodehydroascorbat Reduktase.

Die Monodehydroascorbat Reduktase gehört zur regenerativen Enzymausstattung des antioxidativen Verteidigungssystems der Pflanze und ihre Aktivität beugt dem Verlust von Ascorbat durch Oxidation zu Monodehydroascorbat und Dehydroascorbat und nachfolgender Hydrolyse vor [2, 118, 129]. Eine Monodehydroascorbat Reduktase, deren vollständige cDNA-Sequenz durch RT-PCR mit degenerierten Primern und nachfolgende 5'- und 3'-RACE erhalten werden konnte (mdhar#9), zeigt auf Proteinebene hohe Homologie zu anderen bekannten pflanzlichen Monodehydroascorbat Reduktasen (um 70%). Die Vorhersageergebnisse der Softwarepakete SignalP [115] und ChloroP [42], die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit eine chloroplastidäre Lokalisation des im Verlauf der vorliegenden Arbeit isolierten Monodehydroascorbat Reduktase cDNA-Klons voraussagen, konnte durch transiente Kotransformation einer *B. vulgaris*-Zellkultur mit einem Konstrukt, das für ein GFP-Fusionsprotein mit dem vorhergesagten N-terminalen Transitpeptid kodiert sowie dem bereits in Abschn. 4.1.2.1 erwähnten chloroplastidären RFP-Kontrollkonstrukt nicht bestätigt werden. Auch durch Analyse der phylogenetischen Beziehungen des isolierten Transkripts mit den cDNA-Sequenzen unterschiedlich lokalisierter Monodehydroascorbat Reduktasen mehrerer anderer Pflanzenspezies konnte kein Anhaltspunkt für eine chloroplastidäre Lokalisation gefunden werden. Den höchsten Verwandtschaftsgrad zeigt die untersuchte Peptidsequenz vielmehr zu cytosolischen Isoformen, was auch mit der diffusen GFP-Fluoreszenz nach erfolgter transienter Transformation in Einklang steht. Auch für Transmembrandomänen ließ sich anhand der erhaltenen Sequenzinformation kein Anhaltspunkt feststellen, so daß davon auszugehen ist, daß es sich bei der untersuchten Form der Monodehydroascorbat Reduktase um ein lösliches cytosolisches Protein handelt.

4.1.4. Glutathion Reduktase

4.1.4.1. Klonierung einer cytosolischen Glutathion Reduktase cDNA.

Die Glutathion Reduktase gehört wie die Monodehydroascorbat Reduktase zur regenerativen Enzymausstattung des antioxidativen Verteidigungssystems. Sie sorgt für die Regeneration oxidierten Glutathions, das zum einen durch direkte, nicht enzymvermittelte Redoxvorgänge mit reaktiven Sauerstoffspezies, zum anderen durch die Aktivitäten der Dehydroascorbat Reduktase und der Glutathion Peroxidase entstehen kann, die reduziertes Glutathion als Elektronendonator verwenden. So ist dieses Enzym letztlich direkt oder indirekt für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für beide Klassen von

Peroxidaseaktivitäten der Pflanzenzelle essentiell [2, 118]. Ein cDNA-Klon, der aus einer *M. crystallinum*-cDNA-Bank durch Einsatz einer biotinylierten Sonde gewonnen wurde (gr3#4), konnte durch Datenbankvergleiche als Glutathion Reduktase identifiziert werden. Die eingesetzte Sonde wurde durch RT-PCR mit degenerierten Primern erhalten. Das aus der ermittelten Vollängensequenz abgeleitete Protein weist hohe Homologie zu anderen pflanzlichen Glutathion Reduktasen auf (70-80%). Dies ist in Anbetracht der Tatsache, daß pflanzliche Glutathion Reduktasen generell hohe Homologie untereinander zeigen und in den meisten Fällen nur ein einzelnes Gen für dieses Enzym kodiert [142], nicht verwunderlich. Es gibt keinerlei Anhaltspunkte für das Vorhandensein eines Transitpeptids oder einer Membranbindedomäne, so daß davon ausgegangen werden kann, daß das Protein im Cytosol lokalisiert ist.

4.1.5. Enzyme der Glutathion-Biosynthese

4.1.5.1. Es konnten vollständige cDNA-Sequenzen für γ -ECS und Glutathion Synthetase erhalten werden.

Die vollständige Sequenz einer γ -ECS aus *Mesembryanthemum crystallinum* konnte aus einer cDNA-Bank erhalten werden. Die hierfür eingesetzte biotinylierte Sonde wurde durch RT-PCR aus *M. crystallinum* Gesamt-RNA erhalten (A. Haag-Kerwer, unveröffentlicht). Das aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Protein wurde anhand seiner Homologie zu bekannten pflanzlichen γ -EC Synthetasen über BLASTN-Datenbanksuche und Proteinsequenzalignments identifiziert (70-80%). Das Protein ist mit hoher Wahrscheinlichkeit im Cytosol lokalisiert. Auch für eine Glutathion Synthetase konnte eine vollständige cDNA-Sequenz ermittelt werden. Ausgehend von einer wiederum durch RT-PCR mit degenerierten Primern amplifizierten Teilsequenz wurde in diesem Fall die RACE-Technik angewendet um die fehlende Sequenzinformation in 5'- und 3'-Richtung zu erhalten. Die Homologie zu bekannten Glutathion Synthetasen aus anderen Pflanzenspezies liegt durchschnittlich um 60% auf Proteinebene.

4.1.5.2. Beide Sequenzen kodieren wahrscheinlich für cytosolische Proteine.

Die ermittelte Sequenz einer γ -EC Synthetase-cDNA weist einen ORF, der für ein 510 Aminosäuren langes Protein kodiert auf. Laut Computeranalyse gibt es keine Anhaltspunkte, daß dieses Protein ein Transitpeptid enthält. Betrachtet man jedoch den 5' nicht translatierten Bereich (5'-UTR) der cDNA, so fällt auf, daß die Translation der mutmaßlichen 5'-UTR im Leseraster des ermittelten translatierten Bereichs — sieht man von zwei Stop-Codons ab — zu einem längeren Protein mit einem serinreichen Bereich am N-Terminus führen müßte (s. Abb. 4.2). Zwar ist es unwahrscheinlich, daß die verwendete RACE-Methode, die darauf beruht, daß der zur Einführung eines „5'-RNA-Ankers“ nötige Phosphatrest von der hydrolysierten CAP-Struktur stammt, ein unvollständiges Produkt

liefert, völlig auszuschließen ist es jedoch nicht. Wäre dies der Fall und geht man weiterhin davon aus, daß es sich bei den beiden Stop-Codons um Sequenzierungsartefakte handelt, so könnte der hohe Serinanteil auf ein chloroplastidäres Transitpeptid hindeuten. Dies wäre in Anbetracht der großen Anzahl publizierter chloroplastidär lokalisierter γ -EC Synthetasen nicht ungewöhnlich, da entsprechende Aktivität sowohl im Chloroplasten, als auch im Cytosol nachgewiesen ist [63], läßt sich beides nicht ausschließen.

```

1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  80
   CCAGCTCCTCTCTCTCTTTTCTCTCTCTTTTCTCTCTCGTTCTCACTCTCTACTTTTCTCTGTCACTTACAGACACTTAA
     S S S L S F S L S F S L V L T L Y F P L S L T D T *
                                           ORF =>
81  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  160
   AAGCAAAGAGGAAACGACGCCACAAACCTAGGCGTTCTTTCAATCGCCTAAACAAACCAAATCCAGGTATATCTATGGC
   K Q R G N D A T N L G V L S I A * T N Q I P G I S M A
161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  240
   ACTTATCTACAAGACAGGGGTTCCATTTACTGTTCACTCTGAGACAGTCCTATGTGAAGCAAATGCAAGGATATTTGTG
   L I Y K T G V P F T V H S E T V L C E A K C K D I C

```

Abb. 4.2.: 5' nicht translatierter Bereich der isolierten γ -ECS cDNA. Der Beginn des wahrscheinlichen translatierten Bereichs ist als ORF ("Open Reading Frame") gekennzeichnet.

Im Fall der Glutathion Synthetase besteht laut Computeranalyse eine geringe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines N-terminalen Transitpeptids von 43 Aminosäuren Länge, jedoch erscheinen die Vorhersageergebnisse zu vage um eine Zuordnung durchzuführen. Es wird kein Transitpeptid als solches erkannt, sondern nur eine mögliche Schnittstelle berechnet. Die höchste Wahrscheinlichkeit besteht für eine cytosolische Lokalisation dieser Glutathion Synthetase. Obwohl der 5'-Bereich auch dieser Sequenz mittels RACE erhalten wurde (s. Abb. 2.5.13) und sehr wahrscheinlich vollständig ist, existiert vor dem ersten ATG kein Stop-Codon, so daß sich nicht ausschließen läßt, daß die Sequenz in 5'-Richtung unvollständig ist. Deshalb läßt sich keine abschließende Aussage darüber treffen, ob ein Transitpeptid existiert oder nicht.

4.2. Expressionsanalysen

Beim Crassulaceen-Säure-Stoffwechsel [164] wird das in der Nacht durch die Aktivität der Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC) als Malat in der Vakuole gespeicherte CO_2 in der Lichtphase durch Decarboxylierung freigesetzt und der photosynthetischen Fixierung zugeführt (s. Abschn. 1.3.2). Dies führt einerseits dazu, daß die Ribulosebisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) aufgrund des resultierenden hohen Partialdrucks des Kohlendioxids mit hoher Effizienz arbeiten kann und nur geringe Photorespiration stattfindet. Andererseits wird durch die Wasserspaltung hinter geschlossenen Stomata während der Phase III des CAM eine hohe Sauerstoffkonzentration aufgebaut. Diese Konzentration kann mitunter mehr als 40% erreichen [140], so daß die

Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zunehmend begünstigt wird. Im Hinblick auf oxidativen Stress und dessen Bewältigung durch das antioxidative Verteidigungssystem ist der CAM-Zustand also von zwei entgegengesetzten Tendenzen geprägt.

Enzym	Salz	CO ₂	MV	Salz	CO ₂	HL
	Transkript			Protein		
Cu/Zn-Superoxid Dismutase	↗	↗	X	X	X	X
Ascorbat Peroxidase cyt. (APX1)	↘	X	X	↘	↗	↗
Ascorbat Peroxidase cyt. (APX3)	X	X	X	↘	–	–
Ascorbat Peroxidase cyt. (APX5)	X	X	X	→	↗	↗
Ascorbat Peroxidase chl. (APX2)	X	X	X	↗	→	↗
Katalase	→	→	X	X	X	X
Glutathion Peroxidase	↗	X	↗	X	X	X
Monodehydroascorbat Reduktase	→	X	→	X	X	X
Glutathion Reduktase	↗	X	X	X	X	X
γ-ECS	→	→	X	X	X	X

Tab. 4.2.: Übersicht über die durchgeführten Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene nach Salz-, CO₂-Mangel- (CO₂), Methylviologen- (MV) und Hochlichtbehandlung (HL) (X=nicht durchgeführt, ↗=erhöht, →=unverändert, ↘=erniedrigt, – =nicht meßbar)

4.2.1. Die Expression der Cu/Zn-Superoxid Dismutase ist im CAM-Zustand erhöht.

Die Superoxid Dismutase läßt sich in mehrere Klassen einteilen, die nach der Art des enthaltenen metallischen Kofaktors benannt sind (s. Abschn. 1.2.2.1). In Pflanzen kommen die verschiedenen Klassen der Superoxid Dismutase in unterschiedlichen Kompartimenten vor. Die Kupfer und Zink enthaltende Form (Cu/Zn-SOD) wurde in Chloroplasten, Mitochondrien und Cytosol gefunden [48, 125, 127], während die Mangan enthaltende Form (Mn-SOD) in Mitochondrien Peroxisomen und Cytosol vorkommt [2]. Die Eisen enthaltende Form (Fe-SOD) bleibt auf Chloroplasten beschränkt [126]. In *Mesembryanthemum crystallinum* scheinen sich die drei Klassen der Superoxid Dismutase jedoch strikter auf einzelne Kompartimente zu verteilen, so daß jeweils die Cu/Zn-SOD cytosolisch, die Fe-SOD chloroplastidär und die Mn-SOD mitochondrial lokalisiert ist [105]. Die Aufgabe dieser Enzyme besteht darin, in den jeweiligen Kompartimenten anfallende Superoxidradikale schnell in das weniger toxische Wasserstoffperoxid umzuwandeln. Ihnen kommt somit eine große Bedeutung bei der Vermeidung von oxidativen Schädigungen der Zelle zu. In der Literatur wird vielfach von einer Induktion der Transkription verschiedener für Formen der Superoxid Dismutase kodierender Gene als Reaktion auf oxidativen Stress in zahlreichen Pflanzenspezies berichtet [3, 23, 9, 166, 40, 29]. Bekanntermaßen nimmt die Aktivität der Cu/Zn-Superoxid Dismutase ebenso wie die der Fe-SOD bei *Mesembryanthemum crystallinum* beim Übergang vom C₃-Stoffwechsel zum CAM bzw. bei Salzbehandlung der Pflanzen zu [105, 23]. Es ist deshalb nicht überraschend,

daß die Expression der Cu/Zn-Superoxid Dismutase im Tagesverlauf bei CAM-Pflanzen schneller zunimmt als bei vergleichbaren Kontrollpflanzen (s. Abschn. 3.2.1). Da der vakuoläre Malatvorrat bereits am frühen Nachmittag erschöpft ist (A. Haag-Kerwer, unveröffentlichte Ergebnisse), die Stomata jedoch weiterhin geschlossen bleiben, sollte spätestens dann die Tendenz zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zunehmen. Im Gegensatz zu C₃-Pflanzen ist zu diesem Zeitpunkt bereits eine deutliche Zunahme an Cu/Zn-SOD Transkript zu erkennen (s. Abb. 3.15). Die verstärkte Expression eines solchen mit oxidativen Stressbedingungen assoziierten Enzyms bei Pflanzen im CAM-Zustand widerspricht der Hypothese, daß der Crassulaceen-Säure-Stoffwechsel an sich eine geringere Anfälligkeit gegen oxidativen Stress zur Folge hat. Vielmehr scheint mit zunehmender Dauer der Lichtphase in Chloroplasten und Cytosol ein verstärkter Bedarf nach ROS-Detoxifikation zu entstehen. Wie in Abb. 3.14 gezeigt, ist dies auch für *M. crystallinum*-Pflanzen der Fall, die CO₂-Mangel ausgesetzt sind. Aufgrund eines Elektronenakzeptormangels am Photosystem I werden unter diesen Bedingungen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet.

4.2.2. Die Transkriptmenge der APX1 nimmt im CAM-Zustand ab.

Bei *Mesembryanthemum crystallinum* Pflanzen im salzinduzierten CAM-Zustand ist die Transkriptmenge der Ascorbat Peroxidase Isoform 1 geringer als in vergleichbaren C₃-Pflanzen. Es ist davon auszugehen, daß die eingesetzte Sonde (s. Abschn. 3.2.2.1) unter den angewendeten Stringenzbedingungen (über 70% Homologie) spezifisch für die Isoform 1 ist, da die Transkriptgrößen aller anderen Isoformen deutlich unterschiedlich sind und als unterscheidbare Signale im Northern Blot detektierbar sein müßten. Auch der Homologiegrad im relevanten Sequenzabschnitt der unterschiedlichen Isoformen zueinander spricht gegen eine Hybridisierung der verwendeten Sonde mit anderen Isoformen [24]. Diese Abnahme der Transkriptkonzentration korreliert mit der im Western Blot erkennbaren Abnahme der Proteinmenge einer Ascorbat Peroxidase Isoform, deren Größe darauf hindeutet, daß es sich um APX1 handelt (s. Abschn. 4.2.8). Wenn man davon ausgeht, daß dadurch, daß bei Pflanzen in diesem Zustand die Superoxid Dismutase hochreguliert ist (s. Abschn. 4.2.1) in stärkerem Maß H₂O₂ anfällt, so ist unwahrscheinlich, daß ein geringerer Bedarf an Peroxidaseaktivität vorhanden sein sollte. Daraus ist zu schließen, daß die Aufgabe der APX1, die im C₃-Zustand die Hauptmenge der im Western Blot detektierbaren Ascorbat Peroxidase stellt, entweder von einer anderen Ascorbat Peroxidase Isoform, wie z.B. dem als Bande 3 detektierten Protein, oder einem völlig anderen Enzym übernommen wird. In *Raphanus sativus* ist nach Salzbehandlung keine Veränderung der Transkriptmenge cytosolischer Ascorbat Peroxidase zu erkennen, jedoch nimmt hier die lösliche APX-Aktivität zu [95]. In *Mesembryanthemum crystallinum* wird nach NaCl-Applikation ebenfalls eine Erhöhung der Aktivitäten zweier cytosolischer Isoformen, sowie ein Aktivitätsrückgang bei einer weiteren beschrieben [145, 102], so daß davon auszugehen ist, daß sich der Rückgang

an APX1-Transkriptmenge nicht auf die Gesamtaktivität auswirkt. Da die Abnahme der Transkriptmenge nach Salzapplikation bei Pflanzen im C₃-Zustand bereits deutlich vor dem Übergang zum CAM messbar ist [13] ist davon auszugehen, daß dieser Effekt nicht auf die Umstellung des Stoffwechselforms, sondern auf Salzstress zurückzuführen ist. Auch die Wirkung anderer Stressoren als Salz auf die Expression unterschiedlicher pflanzlicher APX-Isoformen ist sehr verschieden. In *Spinacia oleracea* nimmt die Transkriptmenge einer cytosolischen Isoform nach Behandlung mit Methylviologen oder unter Hochlichtbedingungen zu, während andere Stressoren keine Wirkung zeigen, chloroplastidäre und mikrosomale Isoformen dagegen reagieren unter keiner der untersuchten Bedingungen [167]. Bei *Pisum sativum* zeigt sich ebenfalls eine Erhöhung der Expression einer cytosolischen Isoform nach Trockenstress bzw. während der Erholungsphase nach Trockenstress [106]. Diese und ähnliche Befunde führten Alscher et al. [2] zu der Vermutung, daß eine Spezialisierung der Isoformen der Ascorbat Peroxidase im Hinblick auf unterschiedliche Formen oxidativen Stresses vorliegen könnte.

4.2.3. Die Expression der Katalase in *M. crystallinum* reagiert schwach auf oxidativen Stress

Eine Erhöhung der Transkriptmenge der Katalase ist bei *Mesembryanthemum crystallinum* nach salzinduzierter C₃-CAM-Umstellung sowie nach CO₂-Mangel nur in geringem Maße festzustellen. Insbesondere da bei weiteren Untersuchungen keine signifikante Induktion der Katalase bei der CAM-Ausprägung nachzuweisen war (E. Niewiadomska, M. Kiefer, A. Haag-Kerwer, in Vorbereitung) ist eine verstärkte Beteiligung dieses Enzyms an der Bewältigung von durch die Umstellung auf Crassulaceen-Säure-Stoffwechsel evtl. ausgelöstem oxidativen Stress als wenig wahrscheinlich zu betrachten. Natürlich ist die in der Literatur auch als „Radikalsenke“ bezeichnete Katalase nicht nur am Abbau von H₂O₂ im Peroxisom, sondern aufgrund der leichten Diffusion dieses Moleküls und der Tatsache, daß andere ROS in das stabilere H₂O₂ überführt werden, an der Detoxifikation vieler reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt, aber jedenfalls dürfte sie bei den hier untersuchten Bedingungen keine besonders hervorgehobene Rolle spielen. Diese Vermutung wird auch durch u.a. von Broetto et al. publizierte Ergebnisse bestätigt, aus denen hervorgeht, daß die Aktivität der Katalase in *M. crystallinum*-Pflanzen unter Salz- und Lichtstress und zu einem geringeren Maße auch beim Übergang zum CAM-Zustand verringert ist [34, 116, 23]. Dies geht zurück auf strukturelle Schädigung des Enzyms durch Einwirkung der jeweiligen Stressoren [79, 44], insbesondere NaCl. Um einen wesentlichen Beitrag zur Detoxifikation unter diesen Bedingungen zu leisten, müßte eine hohe *de novo* Syntheserate der Katalase aufrecht erhalten werden. Dies spiegelt sich nicht in einem entsprechend hohen Anstieg der Transkriptmenge wieder. Es steht deshalb zu vermuten, daß bei *Mesembryanthemum crystallinum* vor allem bei Salzstress die Detoxifikationsaufgaben der Katalase zu einem großen Teil auf andere Entgiftungssysteme, wie Ascorbat und Glutathion Peroxidasen übergehen. Die diurnale Schwankung

der Transkriptmenge steht im Einklang mit den publizierten Befunden, daß die Synthese der Katalase von einem circadianen Rhythmus abhängig ist [122, 116].

4.2.4. Die Expression der Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase wird durch oxidativen Stress induziert

Wie aus Abschnitt 3.2.4 hervorgeht, wurde durch Northern Blot- und Real Time-PCR-Analyse nachgewiesen, daß die Expression der isolierten Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase bei oxidativem Stress induziert wird. Nach Induktion des CAM-Zustandes durch Salzbehandlung kommt es, wie in dem Northern Blot in Abb. 3.20 gezeigt wird, zu einer deutlichen Induktion der Expression der Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte die in Abschn. 4.2.2 diskutierte Abnahme der Transkriptmenge der Ascorbat Peroxidase Isoform 1 und die gleichzeitige Induktion der Cu/Zn-Superoxid Dismutase (s. Abschn. 4.2.1) liefern. Die isolierte Form der Glutathion Peroxidase weist große Ähnlichkeit mit Enzymen auf, für die in anderen Pflanzenspezies eine Substratspezifität weniger für Wasserstoffperoxid, sondern vielmehr für organische Peroxide, wie peroxidierte Phospholipide nachgewiesen ist [67, 43]. Es handelt sich also nicht um ein Enzym, das direkt an der Beseitigung entstehender reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt ist, sondern vielmehr um ein Enzym, das der Beseitigung bereits aufgetretener Schäden dient. Nach Wechsel zum Crassulaceen-Säure-Stoffwechsel deutet seine Induktion wiederum darauf hin, daß die durch hohe interne Kohlendioxidpartialdrücke gebotene Schutzwirkung nicht ausreichend ist, um oxidative Schädigungen zu vermeiden. Möglicherweise kommt es aufgrund der in Abschn. 4.2.8 diskutierten Veränderungen im Verhältnis der Ascorbat Peroxidase Isoformen zueinander zu einem Defizit bei der Entgiftung des Wasserstoffperoxids, das durch den Anstieg der Superoxid Dismutase Aktivität in größerer Menge anfällt. Dies würde dann durch Zunahme der Aktivität eines in der Detoxifizierungskette weiter hinten gelegenen Enzyms kompensiert. Bei der hier untersuchten Glutathion Peroxidase handelt es sich außerdem, wie bei Pflanzen in der Regel der Fall, nicht um ein Selenoprotein, was in einer weit geringeren Aktivität im Vergleich zu den aus dem Tierreich bekannten Selenocystein tragenden Glutathion Peroxidasen resultiert [67]. Um eine adäquate Entgiftungsaktivität zu erreichen ist deshalb wahrscheinlich eine entsprechend größere Proteinmenge erforderlich. Dies könnte ebenfalls zur Erklärung der massiven Zunahme an Transkript beitragen, wie sie im Northern Blot auf S. 83 zu erkennen ist. Nach achtundvierzigstündiger Methylviologenbehandlung zeigt sich ebenfalls eine deutliche Zunahme der Transkriptmenge. Eine Zunahme des Schwellenwertes in der Real-Time PCR um 3,3 Zyklen entspricht bei nahezu 100% Reaktionseffizienz in etwa einem Unterschied in der Templatmenge um den Faktor 10. Da die gezeigte Analyse jedoch nicht durch eine Eichung untermauert wurde, ist das Ergebnis nicht quantitativ auswertbar. Es läßt sich jedoch zweifelsfrei sagen, daß eine deutliche Zunahme der Transkriptmenge zu verzeichnen ist. Da die Pflanzen nach dieser Zeit bereits begannen erkennbare

Schädigungen des Blattgewebes aufgrund der radikalbildenden Wirkung des Herbizids zu zeigen, ist die verstärkte Expression eines der Reparatur oxidativer Schädigungen dienenden Enzyms nicht verwunderlich.

4.2.5. Die Expression der Monodehydroascorbat Reduktase in *M. crystallinum* ist nicht durch oxidativen Stress reguliert.

Nach salzinduzierter Umstellung zum CAM-Zustand läßt sich bei *Mesembryanthemum crystallinum* für die Monodehydroascorbat Reduktase keine signifikante Veränderung der Transkriptmenge feststellen. Dies steht im Widerspruch zu für andere Pflanzenspezies veröffentlichten Ergebnissen [153, 85]. Diese Ergebnisse beziehen sich jedoch auf C₃- und C₄-Pflanzen, so daß sie auf eine fakultative CAM-Pflanze wie *Mesembryanthemum crystallinum* nicht ohne weiteres übertragbar sind. In Anbetracht der Tatsache, daß beim Übergang vom C₃-Stoffwechsel zum CAM-Zustand zwar drastische Veränderungen im Verhältnis der Proteinmengen der im Western Blot detektierbaren Ascorbat Peroxidase Isoformen stattfinden, daß jedoch nach der Stoffwechselumstellung in Summe nicht mehr, sondern eher etwas weniger Ascorbat Peroxidase Protein vorzuliegen scheint, liegt die Vermutung nahe, daß die Konzentration an Monodehydroascorbat nicht wesentlich verändert wird, so daß auch kein erhöhter Bedarf an Monodehydroascorbat Reduktase vorhanden zu sein scheint. Dies erklärt jedoch nicht, daß auch nach Methylviologenbehandlung, einem Stressor, der mit Sicherheit zu einem drastischen Anstieg der ROS-Konzentration und den damit verbundenen Auswirkungen auf den Redoxzustand des Ascorbatvorrats führt, keine Induktion der Monodehydroascorbat Reduktase stattfindet. Wenn der Ascorbatvorrat der Zelle stärker oxidiert wird, so ist die Aktivität der Monodehydroascorbat Reduktase das wichtigste Mittel um dem entgegenzuwirken. Sollte die Kapazität dieses Enzyms nicht ausreichen um den Ascorbatvorrat reduziert zu halten, so bleibt nur die Dehydroascorbat Reduktase um einen Verlust an Ascorbat durch Hydrolyse von Dehydroascorbat zu 2,3-diketo-1-gluconsäure zu vermeiden. Da unwahrscheinlich ist, daß nur dieser Weg der Regeneration von Ascorbat in *Mesembryanthemum crystallinum* bei oxidativem Stress beschritten werden sollte, ist davon auszugehen, daß die Kapazität der vorhandenen Monodehydroascorbat Reduktase Proteinmenge zusammen mit der Aktivität der Dehydroascorbat Reduktase ausreichend ist, um die anfallende Menge an Monodehydroascorbat zu bewältigen. Wäre dies nicht der Fall, hätte es zum einen den Effekt, daß nicht ausreichend Ascorbat für die Bindung an Ascorbat Peroxidase zur Verfügung stände, was eine verstärkte Inaktivierung dieses Enzyms zur Folge hätte (s. Abschn. 1.2.2.1), darüberhinaus stünde ein Verbraucher weniger für Reduktionsäquivalente in Form von NADPH zur Verfügung, was die Bildung von ROS über die Mehler-Reaktion begünstigen müßte. Wenn die Kompensation dieses Defizits über die Dehydroascorbat Reduktase, zu deren Analyse leider keine Werkzeuge zur Verfügung standen, oder Dehydroascorbat Reduktaseaktivität von Glutathion-S-Transferasen erfolgt, wäre weiterhin zu erwarten, daß sich dies auf den Redoxzustand des zellulären

Glutathionvorrats auswirkt.

4.2.6. Die Expression der Glutathion Reduktase wird durch oxidativen Stress induziert.

In *M. crystallinum*-Pflanzen, bei denen nach Natriumchloridbehandlung die Ausprägung des Crassulaceen-Säure-Stoffwechsels ausgelöst wurde, kommt es im Gegensatz zur Expression der Monodehydroascorbat Reduktase zu einer deutlich höheren Expression der Glutathion Reduktase als in vergleichbaren unbehandelten Pflanzen. Ein Ergebnis, das im Einklang mit der Literatur steht, da vielfach berichtet wird, daß die Glutathion Reduktase verschiedener Pflanzenspezies mit erhöhter Expression auf die verschiedensten oxidativen Stress auslösenden Einflüsse reagiert [80, 88, 142, 85]. Dies läßt darauf schließen, daß für die Pflanzen in diesem Stoffwechselzustand eine verstärkte Notwendigkeit besteht oxidiertes Glutathion zu reduzieren. Ein solcher, durch verstärkte Glutathion Reduktase Expression dokumentierter erhöhter Regenerationsbedarf für Glutathion deutet auf oxidativen Stress oder zumindest ein aktiviertes antioxidatives Verteidigungssystem hin. Die Tatsache, daß in hohem Maße die Glutathion Reduktase, nicht jedoch die Monodehydroascorbat Reduktase hochreguliert ist, könnte tatsächlich darauf hindeuten, daß ein Mangel an Aktivität der Monodehydroascorbat Reduktase zumindest zum Teil durch die Dehydroascorbat Reduktase kompensiert wird. Dies käme außer der Regeneration des reduzierten Ascorbatvorrats natürlich auch einer Verminderung des Elektronendrucks am Photosystem I zugute, da hierbei durch die Kopplung der Dehydroascorbat Reduktase mit der Glutathion Reduktase über das GSH/GSSG-Redoxsystem wiederum ein gewisser Verbrauch an Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH durch die Glutathion Reduktase gewährleistet bliebe. Ohne eine ausgiebige Analyse der entsprechenden Enzymaktivitäten, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätte, läßt sich dahingehend jedoch keine abschließende Aussage treffen. Aus dem Befund, daß der Anteil an oxidiertem Glutathion am gesamten Glutathionvorrat bei Pflanzen im salzinduzierten CAM-Zustand niedriger ist als bei C_3 -Pflanzen [13], läßt sich schließen, daß die durch erhöhte *de novo*-Synthese des Proteins gesteigerte Aktivität der Glutathion Reduktase in gestressten Pflanzen mehr als ausreichend ist, um den Redoxzustand des Glutathions aufrecht zu erhalten.

4.2.7. Die Biosynthese von Glutathion ist bei Pflanzen im CAM-Zustand erhöht, ohne daß die Transkriptmenge ansteigt.

Eine Analyse des Gehalts an Glutathion von Pflanzen im C_3 -, sowie im CAM-Zustand nach vierzehntägiger Salzbehandlung ergab, daß in CAM-Pflanzen, insbesondere während der Lichtphase eine deutlich höhere Glutathionkonzentration vorliegt. Der maximale Unterschied im Glutathiongehalt zwischen den unterschiedlich behandelten Pflanzenpopulationen wird am frühen Nachmittag erreicht, wenn die Decarboxylierung des Malat-

vorrats hinter geschlossenen Stomata abgeschlossen ist (A. Haag-Kerwer, in Vorbereitung). Das Schlüsselenzym der Biosynthese von Glutathion ist die γ -ECS [63, 53, 144], die außer von ATP abhängig ist von der Verfügbarkeit der Substrate Glutamat und Cystein, aus deren Biosyntheseweg sich die erhöhte Syntheserate während der Lichtphase erklärt. Die Glutathion Synthetase ist dagegen in der Regel konstitutiv mit ausreichender Aktivität vorhanden um alles synthetisierte γ -EC zu Glutathion umzusetzen, sofern eine ausreichende Versorgung mit Glycin sichergestellt ist. Hierfür ist es nötig, daß Photorespiration in ausreichendem Maße stattfindet. Ein Anstieg der Konzentration an Glutathion wird in vielen Fällen als ein Indiz für Stressbedingungen angesehen [98, 100, 133, 139], was wiederum auf nicht völlig ausreichende Schutzwirkung des Crassulaceen-Säurestoffwechsels gegen oxidativen Stress hindeutet; insbesondere, da die Akkumulation von Glutathion bereits früh in der Lichtphase, wenn der Partialdruck an CO_2 durch die Decarboxylierung von im Überschuß vorhandenem Malat noch sehr hoch ist beginnt. Eine signifikante Induktion der γ -ECS durch die Salzbehandlung läßt sich im Northern Blot nicht erkennen. Allerdings scheinen härtere Stressbedingungen, wie der CO_2 -Entzug durchaus eine entsprechende Wirkung zu zeigen. Eine Zunahme der Transkriptmenge der γ -ECS während der Tagesmitte bildet zwar den Tagesverlauf des Gehalts an Glutathion ab, jedoch läßt sich hieraus nicht der Unterschied zwischen C_3 - und CAM-Pflanzen erklären. Setzt man voraus, daß die Zunahme der Konzentration an GSH nicht durch eine Regulation der Glutathion Synthetase zustandekommt, was im Widerspruch zu allen veröffentlichten Ergebnissen bei anderen Pflanzenspezies stünde, so muß eine posttranskriptionale Regulation der γ -ECS unter diesen Bedingungen postuliert werden.

4.2.8. Verschiedene Ascorbat Peroxidase Isoformen reagieren unterschiedlich auf oxidativen Stress

Die verschiedenen Isoformen der Ascorbat Peroxidase in *Mesembryanthemum crystallinum* werden je nach physiologischem Zustand der Pflanze unterschiedlich exprimiert. In *Mesembryanthemum crystallinum* sind sechs Isoformen der Ascorbat Peroxidase bekannt, die sich in drei lösliche (APX1, 3 und 4) und eine membrangebundene cytosolische (APX5) Isoform, sowie zwei chloroplastidäre Isoformen gliedern, von denen wiederum eine im Stroma (APX2a) und eine thylakoidgebunden (APX2b) vorliegt. Die in Abschnitt 3.2.2.1 gezeigten Western Blot Analysen lassen mindestens vier Hauptbanden erkennen, die je nach der Behandlung, der die Pflanze unterworfen war in unterschiedlicher Stärke auftreten. Die apparenten Molekulargewichte der zu diesen Banden gehörenden Polypeptide liegen zum einen zwischen 27 und 32 kDa, zum anderen bei ca. 40 kDa. Anhand der berechneten Molekulargewichte der Isoformen (s. Tab. 3.2) läßt sich daraus schließen, daß es sich bei der Gruppe von Banden im Bereich um 30 kDa um cytosolische Ascorbat Peroxidasen handelt, während das Signal bei 40 kDa einer chloroplastidär lokalisierten Form zuzuordnen ist. Unter Kontrollbedingungen angezogene Pflanzen zeigen ein typisches Bandenmuster, in dem die Bande 2 (s. Abb. 3.17) am

stärksten ausgeprägt ist, die Banden 1 und 3 schwächer. Bande 4 ist in Kontrollproben am schwächsten ausgeprägt. Nach dem durch Salzbehandlung ausgelösten Übergang zum CAM-Zustand ändert sich dieses Bild dahingehend, daß das mutmaßlich chloroplastidäre Signal (Bande 4) deutlich an Stärke zunimmt, während im cytosolischen Triplet nun Bande 3 am stärksten erscheint, während Bande 2 an Stärke abnimmt und Bande 1 völlig verschwindet. Setzt man die Pflanzen CO_2 -freier Luft aus, so zeigt sich keine derartige Verschiebung der Signalstärken untereinander, vielmehr nehmen die Stärken aller Banden zu, ohne daß sich die Verhältnisse untereinander verändern. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei stärkerer Beleuchtung der Pflanzen ($650 \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bzw. $1200 \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Hier nehmen ebenfalls die auch unter Kontrollbedingungen stärksten Banden 2 und 3 an Stärke zu. Außerdem kommt es hier zu einer Induktion des als Bande 4 detektierten chloroplastidären Proteins. Bei massivem Lichtstress, wie ihn eine mehrtägige Dauerbeleuchtung unter Hochlichtbedingungen zur Folge hat, ist dieses Protein jedoch nicht mehr zu detektieren, während die Banden 2 und 3 weiter an Stärke zugenommen haben. Dies läßt sich vermutlich durch eine Schädigung der Chloroplasten aufgrund der extremen Beleuchtungsbedingungen erklären. Die Tatsache, daß offensichtlich oxidativen Stress auslösende Bedingungen wie starke Beleuchtung oder CO_2 -Mangel zu unterschiedlichen Veränderungen im Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen der Ascorbat Peroxidase führen wie Salzbehandlung legt nahe, daß hier unterschiedliche Mechanismen zum Tragen kommen. Da eine CAM-Induktion auch durch Hochlichtbedingungen erfolgen kann [23], ist es möglich, daß die Isoform, die als Bande 3 detektiert wird (vermutlich APX 5), sowie die chloroplastidäre Isoform (Bande 4) generell bei der Umstellung auf den Crassulaceen-Säure-Stoffwechsel verstärkt exprimiert wird, ohne daß dies tatsächlich eine direkte Reaktion auf oxidativen Stress ist. Dies wäre eine Erklärung für die Tatsache, daß nach acht Stunden CO_2 -Mangel keine erkennbare Veränderung in der Signalstärke dieses Proteins zu erkennen ist, obwohl diese Behandlung insbesondere im Chloroplasten oxidativen Stress auslösen sollte. Sowohl Dauerlicht, als auch CO_2 -Mangel, zwei Behandlungen, die die Pflanze mit Sicherheit einer erhöhten Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies aussetzen, führen zu einer Induktion der als Bande 2 und 3 detektierten cytosolischen Isoformen, während die auffällige Verschiebung der Signalintensität von Bande 2 zu Bande 3 nur bei Salzbehandlung auftritt. Die starke Abnahme der Proteinmenge von APX 1 (Bande 2) korreliert mit der Abnahme der Transkriptmenge der APX 1 (s. Abschn. 4.2.2) und ist als direkte Folge der Salzbehandlung, nicht der Umstellung zum CAM zu betrachten [13]. Offenbar löst dieser Mangel an APX1-Protein bei gleichzeitig erhöhter Aktivität der SOD einen Anstieg an der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies aus, meßbar als erhöhte Konzentration an H_2O_2 (A. Haag-Kerwer, nicht veröffentlichte Daten). Dieser Anstieg ist dagegen bei Pflanzen, die CO_2 -Mangel ausgesetzt waren, was keine Verringerung der APX1-Menge nach sich zieht, nicht nachweisbar. Dies spricht dafür, daß die Isoform 1 unter normalen Bedingungen einen maßgeblichen Anteil an der H_2O_2 -Detoxifizierung

leistet. Da beides, sowohl Salzstress, als auch der Übergang zum CAM die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ebenso wie Hochlichtbedingungen oder CO₂-Mangel begünstigen kann [64, 28, 105], muß die Salzbehandlung auf anderem Wege in die Regulation der APX1-Transkription eingreifen. Da nur diese eine Isoform hiervon betroffen ist, müssen sich deren Regulationsmechanismen deutlich von denen der anderen Isoformen unterscheiden. Betrachtet man die Aminosäuresequenz der Isoform APX1, so fällt im Vergleich mit den ansonsten sehr homologen anderen cytosolischen Formen eine C-terminale Verlängerung auf, die in der Literatur als Hinweis auf eine mögliche Membranbindung des Proteins gedeutet wird [75]. Dies hebt die Isoform 1 von den restlichen cytosolischen Isoformen ab und läßt eine unterschiedliche Regulation ebenfalls wahrscheinlicher erscheinen. Die Induktion der anderen Isoformen, deren Expression offenbar nicht durch NaCl-Einwirkung beeinträchtigt wird, könnte entweder aufgrund eines Anstiegs an ROS über einen noch zu klärenden Signaltransduktionsweg ausgelöst werden, oder ein generelles Merkmal der Umstellung zum CAM sein und damit nur sekundär eine Folge oxidativen Stresses.

5. Ausblick

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, die experimentellen Grundlagen für weitere molekulare Untersuchungen auf dem Gebiet der oxidativen Stressabwehr bei *Mesembryanthemum crystallinum* zu schaffen. Mit der Gewinnung von Sequenzinformation für die wichtigsten an dieser Aufgabe beteiligten Enzyme, steht nun das Handwerkszeug zur Verfügung, um die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen aufzuklären. Ausgehend von den Sequenzen der Transkripte wird es möglich sein genomische Sequenzinformation vor allem in 5'-Richtung zu erheben, um Promotoranalysen durchführen zu können. Durch Herstellung von Promotor/Reportergenkonstrukten und mit Hilfe der ballistischen Transformation von Zellkulturen besteht die Möglichkeit interessante Einblicke in die Regulation der für die oxidative Stressabwehr relevanten Gene zu erhalten. Insbesondere die offensichtlich recht komplexe Regulation der verschiedenen Isoformen der Ascorbat Peroxidase verdient weitere Aufmerksamkeit. Arbeiten in dieser Richtung wurden bereits begonnen. Eine genauere Zuordnung der bekannten Isoformen zu den in Western Blot Analysen immunodetektierten Signalen wird Gegenstand detaillierter zukünftiger Untersuchungen sein. Die Identifikation der korrespondierenden Polypeptide könnte durch den Einsatz der zweidimensionalen Gelelektrophorese in Kombination mit massenspektrometrischer Proteinanalytik erreicht werden. Eine genauere Analyse der Transkriptmengen der einzelnen Isoformen der Ascorbat Peroxidase wird durch Verwendung von isoformspezifischen Primern aus den nichttranslatierten Bereichen der Transkripte in der quantitativen RT-PCR möglich. Weiterhin von Interesse ist die Betrachtung der Vorgänge während der Umstellung des Stoffwechselmodus auch auf den Ebenen der Proteinmengen und Aktivitäten anderer an der oxidativen Stressabwehr beteiligter Enzyme. Zu diesem Zweck ist die Herstellung weiterer Antiseren für den Einsatz in der Western Blot Detektion nötig, sowie die Etablierung von Methoden zur Aktivitätsmessung der in Frage kommenden Enzyme in Zellextrakten. Mit Ausnahme der Glutathion Reduktase, für die in Pflanzen in der Regel nur ein Gen kodiert, ist außerdem zu erwarten, daß von den meisten der in Frage kommenden Enzymen weitere Isoformen existieren, die isoliert und in die Untersuchungen miteinbezogen werden müßten. Insbesondere von Monodehydroascorbat Reduktase und Glutathion Peroxidase sind aus anderen Pflanzenspezies chloroplastidäre Isoformen bekannt.

A. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Veränderungen im Antioxidativen Verteidigungssystem der fakultativen CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* zu untersuchen. Der Crassulaceen-Säure-Stoffwechsel (CAM) zeichnet sich dadurch aus, daß die Photosynthese teilweise hinter geschlossenen Stomata stattfindet, was zum einen ermöglicht, die Ribulosebisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) durch einen erhöhten CO₂-Partialdruck aufgrund der Decarboxylierung gespeicherten Malats mit hoher Effizienz zu betreiben, zum anderen führt es jedoch mit der Zeit zu einer Anreicherung des photosynthetisch gebildeten Sauerstoffs im Gewebe. Dieser Stoffwechselmodus stellt deshalb besondere Anforderungen an Regulation und Kapazität des antioxidativen Verteidigungssystems. Um Untersuchungen zur Expression der beteiligten Enzyme durchführen zu können mussten zuerst die entsprechenden cDNA-Sequenzen ermittelt werden. Aus den hierfür durchgeführten Arbeiten gingen Vollängensequenzen der Monodehydroascorbat Reduktase (MDHAR), Glutathion Reduktase (GR) und Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase (PHGPX) hervor, sowie der beiden an der Glutathion Biosynthese beteiligten Enzyme γ -Glutamylcystein Synthetase und Glutathion Synthetase (GSH I+II). Alle erhaltenen Sequenzen wiesen hohe Homologie zu entsprechenden in den Sequenzdatenbanken veröffentlichten Einträgen aus anderen Pflanzenspezies auf. Für die PHGPX konnte außerdem der kodierende Bereich der genomischen Sequenz ermittelt werden, deren Exon-/Intron-Struktur große Ähnlichkeit mit einem vergleichbaren Enzym aus *Arabidopsis thaliana* aufwies. Zusammen mit den bereits bekannten Sequenzen von fünf Isoformen der Ascorbat Peroxidase (APX), Katalase und Cu/Zn-Superoxid Dismutase (SOD) stand damit das Instrumentarium für Expressionsanalysen am überwiegenden Teil der beteiligten Enzyme zur Verfügung. Bei Pflanzen, die Salzstress ausgesetzt waren ergaben sich im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen drastische Zunahmen bei den Transkriptmengen der PHGPX, der GR und der Cu/Zn-SOD. Keine Veränderung war bei der Expression der MDHAR festzustellen. Ebenfalls keine signifikanten Veränderungen ließen Katalase und GSH I erkennen. Die Transkriptmenge der cytosolischen Isoform 1 der APX nahm ab, was sich auch in der Proteinmenge widerspiegelte. Die Proteinmengen anderer cytosolischer APX-Isoformen sowie einer chloroplastidären Isoform nahmen dagegen zu. Differentielle Reaktionen der Proteinmengen verschiedener APX-Isoformen auf unterschiedliche Stressbedingungen deuten auf komplexe Regulationsmechanismen hin. Darüberhinaus konnte die subzelluläre Lokalisation einer chloroplastidären APX-Isoform, sowie einer cytosolischen MDHAR durch den Einsatz von GFP-Fusionsproteinen aufgeklärt werden.

B. Abkürzungen

A.bidest	Bidestilliertes Wasser
Abk.	Abkürzung
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
APX	Ascorbatperoxidase
AS	Aminosäure(n)
Asa	Ascorbinsäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
2-CP	2-Cys-Peroxyredoxin
DHA	Dehydroascorbat
DHAR	Dehydroascorbat Reduktase
DNA	„Desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DTNB	Dithionitrobenzol, Ellmann's Reagenz
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	Elektrophoresepuffer
EST	„Expressed Sequence Tag“
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FG	Frischgewicht
g	Gramm
Xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
γ -EC	γ -Glutamylcystein
γ -ECS	γ -Glutamylcystein Synthetase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GR	Glutathion Reduktase
GS	Glutathion Synthetase
HEPES	2-(N-Hydroxyethylpiperazin)-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
Lsg.	Lösung

MCS	„multiple cloning site“
MDHA	Monodehydroascorbat
MDHAR	Monodehydroascorbat Reduktase
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar, Mikromol pro Liter
mM	Millimolar, Millimol pro Liter
mol	Mol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	optische Dichte
ORF	„Open Reading Frame“, Offenes Leseraster
P _i	Phosphat
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerasekettenreaktion
pfu	„plaque forming unit“, Titerangabe einer Phagensuspension
pg	Pikogramm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, Proteasehemmstoff
RFE	Relative Fluoreszenzeinheiten
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
UTR	„Untranslated Region“, nichttranslatierter Bereich
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

1.1. Strukturformel von Paraquat	2
1.2. Oxidation von Guanin zu 8-oxoguanin	5
1.3. Ascorbat und seine Oxidationsprodukte	8
1.4. Struktur von Glutathion	11
1.5. Schematische Darstellung der Glutathion-Biosynthese	12
1.6. Der Halliwell-Asada- oder Glutathion-Ascorbat-Zyklus	14
1.7. <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (Blüte)	21
1.8. <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> 4 und 12 Wochen alt	21
1.9. Allgemeine Übersicht über die Photosynthese	22
1.10.(a) RubisCO-Reaktion; (b) Calvinzyklus	23
1.11.CO ₂ -Fixierung im CAM	24
1.12.Gaswechselphasen während des CAM	25
3.1. Polyadenylierungssignale der Glutathion Peroxidase cDNA	61
3.2. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz einer Phospholipidhydroperoxid Glutathion Peroxidase cDNA aus <i>M. crystallinum</i>	62
3.3. Alignment der GPX-Proteine	63
3.4. PHGPX-Gen	64
3.5. PHGPX-Gen Exon/Intron-Verteilung	65
3.6. cDNA und abgeleitete Proteinsequenz der Monodehydroascorbat Reduktase aus <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ; die für die RT-PCR verwendeten Primer sind gekennzeichnet.	67
3.7. Alignment der MDHAR-Proteine	68
3.8. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz einer Glutathion Reduktase cDNA aus <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ; die für die RT-PCR verwendeten Primer sind eingezeichnet.	70
3.9. Alignment der GR-Proteine	71
3.10.Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz einer γ -Glutamylcystein Synthetase cDNA aus <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	73
3.11.Alignment der γ -ECS Proteine	74
3.12.Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz einer Glutathion Synthetase cDNA aus <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	76
3.13.Alignment der GSHS-Proteine	77
3.14.Northern Blot-Analyse der Expression von Cu/Zn-Superoxid Dismutase	78

3.15. Northern Blot-Analyse der Expression von Cu/Zn-Superoxid Dismutase im Tagesgang	78
3.16. Northern Blot-Analyse der Expression von Ascorbat Peroxidase	79
3.17. Expression verschiedener Ascorbat Peroxidase-Isoformen (2)	81
3.18. Expression verschiedener Ascorbat Peroxidase-Isoformen (1)	81
3.19. Northern Blot-Analyse der Expression von Superoxid Dismutase	82
3.20. Northern Blot-Analyse der Expression von Glutathion Peroxidase	83
3.21. Real Time PCR-Analyse der Expression von Glutathion Peroxidase	84
3.22. Northern Blot-Analyse der Expression von Monodehydroascorbat Reduktase	85
3.23. Real Time PCR-Analyse der Expression von Monodehydroascorbat Reduktase	86
3.24. Northern Blot-Analyse der Expression von Glutathion Reduktase	86
3.25. Northern Blot-Analyse der Expression von γ -ECS	87
3.26. Subzelluläre Lokalisation der Ascorbat Peroxidase	88
3.27. GFP-Konstrukt zur Lokalisierung der APX2a/b	88
3.28. Subzelluläre Lokalisation der Monodehydroascorbat Reduktase	89
3.29. GFP-Konstrukt zur Lokalisierung der MDHAR	90
3.30. Alignment der MDHAR-Proteine	90
3.31. Glutathiongehalt in <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	91
4.1. Transitpeptide von APX2a und 2b	94
4.2. 5'-UTR der isolierten γ -ECS cDNA	97

Tabellenverzeichnis

1.1. Redoxpotentiale einiger ROS und Antioxidantien	7
1.2. An der antioxidativen Abwehr beteiligte Enzyme	13
1.3. Eigenschaften der SOD-Isoformen	14
2.3. IUB-Abkürzungen für Degenerationsstellen in Primern	48
3.1. Zu GPX-A2#3 homologe Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
3.2. Molekülmassen der APX-Isoformen	82
4.1. Im Verlauf der Arbeit generierte cDNA-Vollängensequenzen	92
4.2. Übersicht über die Expressionsveränderungen	98

C. Danksagung

Ich bedanke mich vielmals bei Prof. Dr. Thomas Rausch, dafür daß er mir ermöglicht hat, diese Arbeit durchzuführen.

Prof. Dr. Michael Wink danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, für Ihre langjährige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Vielen Dank an Angela für das in mich gesetzte Vertrauen und die Überlassung des Themas.

Rafael, den ich nicht vergessen werde, schulde ich Dank für eine Menge Motivation und Hilfsbereitschaft.

Weiterhin danke ich herzlich allen Freunden und Kollegen, die mich während meiner Promotion begleitet, unterstützt und manchmal ertragen haben.

Andreas und Jochen für Schützenhilfe und leuchtende Konstrukte ☐ Annette für ein, zwei gute Feten und 3km abwärts ☐ Bob für's Reduzieren auf's Wesentliche ("Petrischal") ☐ Emilia für das Heben der Laborlaune ☐ Frank für's vom-Hals-halten der ständigen Pflasterei und Erkenntnisse über Tibet ☐ Heike für das Finden unerwarteter Phänomene und ehrliche Kommentare darüber ☐ Holger für das richtige Getränk zum Abschluß ☐ Ilka für das schadlose Überstehen meiner Betreuung und ein tolles Antiserum ☐ Klaus für's Gezocke ☐ der Firma Biotek-Kontron dafür, daß auch sie irgendwann das offensichtliche eingesehen hat ☐ Manfred für anspruchsvolle Problemstellungen im Netzwerk ☐ Markus für das Zusenden unzähliger Aufmunterungen und langjähriges Schreibtischsharing ☐ Michael Schilbach für das zuverlässige Anbauen meines Gestrüps ☐ Michael Melter für Rat und Tat beim Serverpöppeln und den einen oder anderen guten roten ☐ Michael Schröder für etliche Hektoliter Kaffee und das gemeinsame Überstehen von Netware 5 ☐ Rolf für Statler & Waldorf ☐ Ruth für's Fehlerjagen ☐ Sandra für Coolness auch beim hundertsten Northern ☐ Simone für das Abo, Bekochungen und EDV-Säuberungen ☐ Stefan für eine Menge Musik ☐ Steffen für die Molekularbiologie des Weglassens und zahllose Mittagessen über Mensaniveau

Literaturverzeichnis

- [1] R. Allen. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol*, 107:1049–1054, 1995.
- [2] R. G. Alscher, J. L. Donahue, und C. L. Cramer. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol Plant*, 100:224–233, 1997.
- [3] R. G. Alscher, N. Erturk, und L. S. Heath. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Ex Bot*, 53:1331–1341, 2002.
- [4] R. G. Alscher und J. L. Hess. *Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.
- [5] A. M. Arisi, G. Cornic, L. Jouanin, und C. H. Foyer. Overexpression of iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO₂ partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen. *Plant Physiol*, 117:565–574, 1998.
- [6] K. Asada. Ascorbate peroxidase — a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, 85:235–241, 1992.
- [7] K. Asada. Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In N. R. Baker und J. R. Bowyer, Hrsg., *Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field*, Kap. 7, S. 129–142. Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, 1994.
- [8] K. Asada. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In P. M. Mullineaux und C. H. Foyer, Hrsg., *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, S. 77–104. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.
- [9] R. A. Azevedo, R. M. Alas, R. J. Smith, und P. J. Lea. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant*, 104:280–292, 1998.
- [10] M. Baier und K. Dietz. The plant 2-cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: Its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant J*, 12:179–190, 1997.

- [11] M. Baier und K. Dietz. Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. evidence from transgenic *Arabidopsis*. *Plant Phys*, 119:1407–1414, 1999.
- [12] C. J. Baker und E. W. Orlandi. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol*, 33:299–321, 1995.
- [13] S. Bankowski. Oxidativer stress bei *Mesembryanthemum crystallinum*. Staatsexamensarbeit, Universität Heidelberg, 1999.
- [14] L. Baumbusch, M. Eiblmeier, J. Schnitzler, W. Heller, H. Sandermann, und A. Polle. Interactive effects of ozone and low UV-b radiation on antioxidants in spruce (*Picea abies*) and pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiol Plant*, 104:248–254, 1998.
- [15] A. Bérczi und I. M. Møller. Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles. *Plant Cell & Environment*, 23:1287–1302, 2000.
- [16] W. Bielawski und K. W. Joy. Reduced and oxidized glutathione and glutathione reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. *Planta*, 169:267–272, 1986.
- [17] P. G. Board, R. T. Baker, G. Chelvanayagam, und L. S. Jermiin. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J*, 328:929–935, 1997.
- [18] A. Böck, K. Forchhammer, J. Heider, und C. Baron. Selenoproteinsynthesis: An expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci*, 16:463–467, 1991.
- [19] W. Bonner und J. Bonner. The role of carbondioxide in acid formation by succulent plants. *Am J Bot*, 35:113–117, 1948.
- [20] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254, 1976.
- [21] S. M. Bridges und M. L. Salin. Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol*, 68:275–278, 1981.
- [22] A. E. Brodie und D. J. Reed. Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 148:120–125, 1987.
- [23] F. Broetto, U. Lüttge, und R. Ratajczak. Influence of light intensity and salt-treatment on mode of photosynthesis and enzymes of the antioxidative response system of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Funct. Plant Biol.*, 29:13–23, 2002.

- [24] I. Bruch. Die Isoformen der Ascorbat-peroxidase in *Mesembryanthemum crystallinum*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 2000.
- [25] G. R. Buettner. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*, 300:535–543, 1993.
- [26] G. R. Buettner und B. A. Jurkiewicz. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In E. Cadenas und L. Packer, Hrsg., *Handbook of Antioxidants*, S. 91–115. Dekker, New York, 1996.
- [27] W. O. Bullock, J. M. Fernandez, und J. M. Short. XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, 5:376, 1987.
- [28] F. Castillo. Antioxidative protection in the inducible CAM-plant *Sedum album* L. following the imposition of severe water stress and recovery. *Oecologia*, 107:469–477, 1996.
- [29] P. L. Conklin und R. L. Last. Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol*, 109:203–212, 1995.
- [30] P. L. Conklin, E. H. Williams, und R. L. Last. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:9970–9974, 1996.
- [31] E. Cookson, M. L. Baxter, und M. E. Selkirik. Identification of a major soluble cuticular glycoprotein of lymphatic filarial nematode parasites (gp29) as a secretory homolog of Glutathion Peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:5837–5841, 1992.
- [32] G. P. Creissen und P. M. Mullineaux. Cloning and characterisation of glutathione reductase cDNAs and identification of two genes encoding the tobacco enzyme. *Planta*, 197:422–425, 1995.
- [33] J. Cushman und H. J. Bohnert. Nucleotide sequence of the gene encoding a CAM specific isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Nucleic Acid Res*, 17:6745–6746, 1989.
- [34] J. Cushman und H. J. Bohnert. Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. *Plant Phys*, 113:667–676, 1997.
- [35] F. J. Dat, D. Inzé, und F. Van Breusegem. Catalase-deficient tobacco plants: Tools for in planta studies on the role of hydrogen peroxide. *Redox Report*, 6:37–42, 2001.

- [36] B. Demmig-Adams und W. W. Adams III. The role of the xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Sciences*, 1:21–26, 1996.
- [37] R. S. Dhindsa. Drought stress, enzymes of Glutathion metabolism oxidation injury and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol*, 95:648–651, 1991.
- [38] P. Dittlich. Enzymes of crassulaceen acid metabolism. In Photosynthesis II. Photosynthetic Carbon Metabolism and Related Processes. In M. Gibbs und E. Latzko, Hrsg., *Encyclopedia of Plant Physiology*, Bd. 6, S. 263–270. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979.
- [39] D. P. Dixon, I. Cummins, D. J. Cole, und R. Edwards. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Op Plant Biol*, 1:258–266, 1998.
- [40] A. G. Doulis, J. L. Donahue, und R. G. Alscher. Differential responses to paraquat-induced oxidative injury in a pea (*pisum sativum*) protoplast system. *Physiol Plant*, 102:461–471, 1998.
- [41] E. F. Elstner, W. Oßwald, und I. Schneider. *Phytopathologie — Allgemeine und Biochemische Grundlagen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1. Auflage, 1996.
- [42] O. Emanuelsson, H. Nielsen, und G. Von Heijne. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*, 8:978–984, 1999. (URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>).
- [43] Y. Eshdat, D. Holland, Z. Faltin, und G. Ben-Hayyim. Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant*, 100:234–240, 1997.
- [44] J. Feierabend und S. Engels. Photoinactivation of catalase *in vitro* and in leaves. *Archives Biochem Biophys*, 251:630–638, 1986.
- [45] J. Fliegmann und H. Sandermann. Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: A novel plant gene of detoxification. *Plant Mol Biol*, 34:843–854, 1997.
- [46] L. Flohé. Role of GSH peroxidase in lipid peroxide metabolism. In K. Yagi, Hrsg., *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*, S. 149–159. Academic Press, New York, 1982.
- [47] G. Forti und G. Elli. The function of ascorbic acid in photosynthetic phosphorylation. *Plant Physiol*, 109:1207–1211, 1995.
- [48] J. G. Foster und G. E. Edwards. Localization of superoxide dismutase in leaves of C₃ and C₄ plants. *Plant and Cell Phys*, 21:895–906, 1980.

- [49] C. Foyer und M. Lelandais. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasma membranes of pea leaf mesophyll cells. *J Plant Physiol*, 148:391–398, 1996.
- [50] C. H. Foyer und J. Harbinson. Oxygenmetabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In P. M. Mullineaux und C. H. Foyer, Hrsg., *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, S. 1–42. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.
- [51] C. H. Foyer, M. Lelandais, und K. J. Kunert. Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant*, 92:696–717, 1994.
- [52] C. H. Foyer, H. Lopez-Delgado, J. F. Dat, und I. M. Scott. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant*, 100:241–254, 1997.
- [53] C. H. Foyer, N. Souriau, S. Perret, M. Lelandais, K. J. Kunert, und Others. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol*, 109:1047–1057, 1995.
- [54] I. Fridovich. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201:875–880, 1978.
- [55] J. A. Frugoli, M. A. McPeck, T. L. Thomas, und C. R. McClung. Intron loss and gain during evolution of the catalase gene family in angiosperms. *Genetics*, 49:355–365, 1998.
- [56] P. Gaudu, V. Niviere, Y. Petillot, B. Kauppi, und M. Fontecave. The irreversible inactivation of RibonucleotideReductase from *Escherichia coli* by superoxide radicals. *FEBS Lett*, 387:137–140, 1996.
- [57] L. Guan und J. G. Scandalios. Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, Sod4 and Sod4A, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol*, 117:217–224, 1998.
- [58] Y. Gueta-Dahan, Z. Yaniv, B. A. Zilinskas, und G. Ben-Hayyim. Salt and oxidative stress: Similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta*, 203:460–469, 1997.
- [59] A. Haag-Kerwer, H. J. Schäfer, S. Heiss, C. Walter, und T. Rausch. Cadmium Exposure in *Brassica juncea* Causes a Decline in Transpiration Rate and Leaf Expansion Without Effect on Photosynthesis. *J Ex Bot*, 50:1–9, 1999.
- [60] B. Halliwell und J. M. C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, UK, 3. Auflage, 2000.

- [61] B. Hay und J. M. Short. -. *Strategies*, 5:16–18, 1992.
- [62] H. W. Heldt. *Pflanzenbiochemie*, Kap. 18.3, S. 426–429. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1 Auflage, 1996.
- [63] R. Hell und L. Bergmann. γ -glutamylcysteine synthetase in higher plants, catalytic properties and subcellular localization. *Planta*, 180:603–612, 1990.
- [64] J. A. Hernandez, E. Olmos, F. J. Corpas, F. Sevilla, und L. A. del Rio. Salt-induces oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Sci*, 105:151–167, 1995.
- [65] H. Herre. *The Genera of the Mesembryanthemaceae*. Nasionale Boekhandel, Ltd., London, 1971.
- [66] C. Herschbach und H. Rennenberg. Influence of glutathione on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *J Ex Bot*, 45:1069–1076, 1994.
- [67] D. Holland, G. Ben-Hayyim, Z. Faltin, L. Camoin, A. D. Strosberg, und Y. Eshdat. Molecular characterization of salt-stress associated protein in citrus: Protein and cDNA sequence homology to mammalian Glutathion Peroxidase . *Plant Mol Biol*, 21:923–927, 1993.
- [68] M. A. Hossain und K. Asada. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol*, 25:85–92, 1984.
- [69] A. G. Hunt. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45:47–60, 1994.
- [70] L. Hyoshin, J. Jinki, und S. Daeyoung. Molecular cloning and characterization of the gene encoding glutathione reductase in *Brassica campestris*. *Biochimica Biophysica Acta*, 1395:309–314, 1998.
- [71] T. Ishikawa, K. Yoshimura, K. Sakai, M. Tamoi, T. Takeda, und S. Shigeoka. Molecular characterization and physiological role of a glyoxisome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant Cell Physiol*, 39:23–34, 1998.
- [72] T. Ishikawa, K. Yoshimura, M. Tamoi, T. Takeda, und S. Shigeoka. Alternative mRNA Splicing of 3'-Terminal Exons Generates Ascorbate Peroxidase Isoenzymes in Spinach *Spinacia oleracea* Chloroplasts. *Biochem J.*, 328:795–800, 1997.
- [73] B. Jakob und U. Heber. Photoproduction and detoxification of hydroxyl radicals in chloroplasts and leaves in relation to photoinactivation of photosystems i and II. *Plant Cell Physiol*, 37:629–635, 1996.

- [74] B. Jerpseth, A. Greener, J. M. Short, J. Viola, und P. L. Kretz. XL1-blue MRF⁺ *E.coli* cells: *mcrA*⁻ *mcrCB*⁻ *mcrF*⁻ *mrr*⁻ *hsdR*⁻ derivative of XL1-blue cells. *Strategies*, 5:81–83, 1992.
- [75] H. M. Jespersen, I. V. H. Kjærsgård, L. Østergaard, und K. G. Welinder. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem J*, 326:305–310, 1997.
- [76] R. R. Johnson, H. J. Cranston, M. E. Chaverra, und W. E. Dyer. Characterization of cDNA clones for differentially expressed genes in embryos of dormant and nondormant *Avena fatua* L. caryopses. *Plant Mol Biol*, 28:113–122, 1995.
- [77] D. K. Jones, D. A. Dalton, F. I. Rosell, und E. L. Raven. Class I heme peroxidases: Characterization of soybean ascorbate peroxidase. *Arch Biochem Biophys*, 360:173–178, 1998.
- [78] W. M. Kaiser. Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta*, 145:377–382, 1979.
- [79] A. Kalir und A. Poljakoff-Mayber. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione portulacoides* (L.) Aellen exposed to high sodium chloride concentrations. *Annals of Botany*, 47:75–85, 1981.
- [80] H. Kaminaka, S. Morita, M. Nakajima, T. Masumura, und K. Tanaka. Gene cloning and expression of cytosolic glutathione reductase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol*, 39:1269–1280, 1998.
- [81] N. Kardish, N. Magal, D. Aviv, und E. Galun. The tomato gene for the chloroplastic Cu, Zn superoxide dismutase regulation of expression imposed in transgenic tobacco plants by a short promoter. *Plant Mol Biol*, 25:887–897, 1994.
- [82] Y. Kato, J. Urano, Y. Maki, und T. Ushimaru. Purification and characterization of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant Cell Physiol*, 38:173–178, 1997.
- [83] A. C. Kendall, A. J. Keys, J. C. Turner, P. J. Lea, und B. J. Mifflin. The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*hordeum vulgare*). *Planta*, 159:505–511, 1983.
- [84] N. M. Kerk und L. J. Feldman. A biochemical model for initiation and maintenance of the quiescent center: Implications for organisation of root meristems. *Plant Development*, 121:2825–2833, 1995.

- [85] A. H. Kingston-Smith und C. H. Foyer. Overexpression of mn-superoxide dismutase in maize leaves leads to increased Monodehydroascorbat Reduktase , Dehydroascorbat Reduktase , and Glutathion Reduktase activities. *J Ex Bot*, 51:1867–1877, 2000.
- [86] S. Klapheck. Homoglutathion, isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol Plant*, 74:727–732, 1988.
- [87] S. Klapheck, B. Chrost, J. Starke, und H. Zimmermann. γ -Glutamylcysteinylserin — a new homologue of glutathione in plants of the family *Poaceae*. *Botanica Acta*, 105:174–179, 1992.
- [88] A. Kubo, T. Sano, H. Saji, K. Tanaka, N. Kondo, und K. Tanaka. Primary structure and properties of glutathione reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 34:1259–1266, 1993.
- [89] H. Kuroda, S. Sagisaka, und K. Chiba. Collapse of peroxide-scavenging systems in apple flower-buds associated with freezing injury. *Plant Cell Physiol*, 33:743–750, 1992.
- [90] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [91] A. G. Lappartient und B. Touraine. Demand-driven control of root ATP-sulfurylase activity and sulphate uptake in intact canola. *Plant Physiol*, 111:147–157, 1996.
- [92] M. Y. Law, S. A. Charles, und B. Halliwell. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*spinacea oleracea*) chloroplasts. *Biochem J*, 210:899–903, 1983.
- [93] R. Liso, L. DeGara, F. Tommasi, und O. Arigoni. Ascorbic acid requirement for increased peroxidase activity during potato tuber slice aging. *FEBS Lett*, 187:141–145, 1985.
- [94] J. Logemann, J. Schell, und L. Willmitzer. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Ana Biochem*, 163:16–20, 1987.
- [95] F. Lopez, G. Vansuyt, F. Casse-Delbart, und P. Fourcroy. Ascorbate peroxidase activity, not the mRNA level, is enhanced in salt-stressed *Raphanus sativus* plants. *Physiol Plant*, 97:13–20, 1996.
- [96] R. Löw und T. Rausch. Nonradioactive detection of nucleic acids with biotinylated probes. In T. Meier und F. Fahrenholz, Hrsg., *A Laboratory Guide to Biotin-Labeling in Biomolecule Analysis, Biomethods Vol. 7*, S. 201–213. Birkhäuser Verlag, Basel, 1996.

- [97] A. N. Macpherson, A. Telfer, J. Barber, und T. G. Truscott. Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem II reaction centers. *Biochim Biophys Acta*, 1143:301–309, 1993.
- [98] N. R. Madamanchi, X. Yu, A. Doulis, R. G. Alscher, K. K. Hatzios, und C. L. Cramer. Acquired resistance to herbicides in pea cultivars through pretreatment with sulfur dioxide. *Pestic Biochem Physiol*, 48:31–40, 1994.
- [99] D. Mandelman, J. Jamal, und T. L. Poulos. Identification of two electron-transfer sites in ascorbate peroxidase using chemical modification, enzyme kinetics and cristallography. *Biochemistry*, 37:17610–17617, 1998.
- [100] M. J. May und C. J. Leaver. Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol*, 103:621–627, 1993.
- [101] C. R. McClung. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radic Biol Med*, 49:355–365, 1998.
- [102] T. Meckel. Etablierung einer methode zur *in vitro* quantifizierung der aktivität ascorbatspezifischer peroxidasen des C₃-CAM-intermediären halophyten *Mesembryanthemum crystallinum* L. Diplomarbeit, TU Darmstadt, 2000.
- [103] A. H. Mehler. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys*, 33:65–77, 1951.
- [104] M. L. Michaels und J. H. Miller. The GO-system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol*, 174:6321–6325, 1992.
- [105] Z. Miszalski, I. Slesak, E. Niewiadomska, R. Baczek-Kwinta, U. Lüttge, und R. Rajczak. Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C₃-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell & Environ*, 1998:169–179, 1998.
- [106] R. Mittler und A. Zilinskas. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J*, 5:397–405, 1994.
- [107] C. Miyake und K. Asada. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol*, 33:541–553, 1992.
- [108] H. Moldau, I. Bichele, und K. Hüve. Dark-induced ascorbate deficiency in leaf cell walls increases plasmalemma injury under ozone. *Planta*, 207:60–66, 1998.

- [109] M. Monroe. Hydrogen peroxide: Effects following application to extracellular biological material. *J Ex Cosm*, 234:2345–2356, 1952.
- [110] S. S. Murthy und B. A. Zilinskas. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding pea monodehydroascorbate reductase. *J Biol Chem*, 269:31129–31133, 1994.
- [111] K. Nakai und P. Horton. PSORT: A program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci*, 24(1):34–35, 1999.
- [112] Y. Nakano und K. Asada. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 34:867–880, 1981.
- [113] F. Navari-Izzo und R. Izzo. Induction of enzymes and antioxidant production in barley plants as a result of SO₂ fumigation. *Plant Sci*, 96:31–40, 1994.
- [114] E. H. Newcomb und H. Frederick. Distribution and structure of plant microbodies (peroxisomes). In M. D. Hatch, C. B. Osmond, und R. O. Slatyer, Hrsg., *Photosynthesis and Photorespiration*, S. 442–457. Wiley Interscience, New York, 1971.
- [115] H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, und G. von Heijne. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10:1–6, 1997. (URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).
- [116] E. Niewiadomska, Z. Miszalski, I. Slesak, und R. Ratajczak. Catalase activity during C₃-CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum* L. leaves. *Free Radical Research*, 31:251–256, 1999.
- [117] D. Nijs und P. M. Kelley. Vitamin c and e donate single hydrogen atoms *in vivo*. *FEBS Lett*, 284:147–151, 1991.
- [118] G. Noctor und C. H. Foyer. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49:249–279, 1998.
- [119] H. Padh. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol*, 68:1166–1173, 1990.
- [120] T. K. Prasad. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: Changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J*, 10:1017–1026, 1996.
- [121] T. K. Prasad, M. D. Anderson, B. A. Martin, und C. R. Stewart. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6:65–74, 1994.

- [122] M. G. Redinbaugh, M. Sabre, und J. G. Scandalios. Expression of the maize cat3 catalase gene is under the influence of a circadian rhythm. *Proc National Acad Sci USA*, 87:6853–6857, 1990.
- [123] H. Rennenberg, K. Schmitz, und L. Bergmann. Long-distance transport of sulfur in *nicotiana tabacum*. *Planta*, 147:57–62, 1979.
- [124] M. Sagi und R. Fluhr. Superoxide production by the gp1phox NADPH oxidase plant homologue: Modulation of activity by calcium and TMV. *Plant Physiol*, 126:1281–1290, 2001.
- [125] A. Sakamoto, T. Okumura, H. Kaminaka, K. Sumi, und K. Tanaka. Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase genes, SodCc1 and SodCc2, in rice protoplasts. *FEBS Lett*, 358:62–66, 1995.
- [126] M. L. Salin und S. Bridges. Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Arch Biochem Biophys*, 201:369–373, 1980.
- [127] M. L. Salin und S. M. Bridges. Localization of superoxide dismutase in chloroplasts from *Brassica campestris*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 99:37–45, 1981.
- [128] F. Sanger, S. Nicklen, und A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:5463–5467, 1977.
- [129] S. Sano, Y. Endo, T. Inaba, M. Hossain, C. Miyake, M. Matsuo, K. Asada, und K. Saito. Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach. *Plant & Cell Phys*, 42 (Supplement):180, 2001.
- [130] M. Santos, H. Gousseau, C. Lister, C. H. Foyer, G. Creissen, und P. Mullineaux. Cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* L. is encoded by a small multigene family. *Planta*, 198:64–69, 1996.
- [131] M. Sasabe, K. Takeuchi, S. Kamoun, Y. Ichinose, F. Govers, K. Toyoda, T. Shirais-hi, und T. Yamada. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst defense gene expression in response to elicitor in TobaccoCell suspension culture. *Eur J Biochem*, 267:5005–5013, 2000.
- [132] J. G. Scandalios. Regulation and properties of plant catalases. In C. H. Foyer und P. M. Mullineaux, Hrsg., *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants.*, S. 275–315. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.
- [133] A. Schmidt und K. J. Kunert. Lipid peroxidation in higher plants: The role of glutathione reductase. *Plant Physiol*, 82:700–702, 1986.

- [134] T. Shimaoka, A. Yokota, und C. Miyake. Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant Cell Physiol*, 41:1110–1118, 2000.
- [135] J. M. Short, J. A. Fernandez, J. M. and Sorge, und W. D. Huse. Lambda ZAP: A bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res*, 16:7583–7600, 1988.
- [136] L. Slooten, K. Capiou, W. Van Camp, M. Van Montagu, C. Sybesma, und D. Inzé. Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol*, 107:737–750, 1995.
- [137] N. Smirnoff. L-ascorbic acid biosynthesis. In T. Begley, Hrsg., *Vitamins and Hormones*, Bd. 61, S. 241–266. Academic Press, San Diego, CA, 2000.
- [138] N. Smirnoff, P. L. Conklin, und F. A. Loewus. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. *Annual Review of Plant Molecular Biology and Plant Physiology*, 52:437–467, 2001.
- [139] I. K. Smith. Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol*, 79:1044–1047, 1985.
- [140] M. Spalding, D. K. Stumpf, M. S. B. Ku, R. H. Burris, und G. E. Edwards. Crassulacean acid metabolism and diurnal variations of internal CO₂ and O₂ concentrations in *Sedum praealtum*. *Aus J Plant Phys*, 6:557–567, 1979.
- [141] R. Steinkamp, B. Schweihofen, und H. Rennenberg. γ -glutamylcyclotransferase in tobacco suspension cultures: Catalytic properties and subcellular localization. *Physiol Plant*, 69:499–503, 1987.
- [142] R. Stevens, G. P. Creissen, und P. M. Mullineaux. Cloning and characterisation of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Mol Biol*, 35:641–654, 1997.
- [143] S. Storozhenko, P. De Pauw, M. Van Montagu, D. Inzé, und S. Kushnir. The heat-shock element is a functional component of the Arabidopsis APX1 gene promoter. *Plant Physiol*, 118:1005–1014, 1998.
- [144] M. Strohm, L. Jouanin, K. J. Kunert, C. Pruvost, A. Pole, et al. Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. *Plant J*, 7:141–145, 1995.
- [145] T. Takeda und S. Shigeoka. Responses of antioxidant system to salt stress in *Meibryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology (Rockville)*, 3 Suppl.:121, 1997.

Poster/Abstract Nr. 547: PLANT BIOLOGY 97: Annual Meetings of the American Society of Plant Physiologists.

- [146] M. Thomas. Physiological studies on acid metabolism in green plants. I. CO₂ fixation and CO₂ liberation in crassulacean acid metabolism. *New Phytol*, 48:390–420, 1949.
- [147] M. Thomas und H. Beevers. Physiological studies on acid metabolism in green plants. II evidence of CO₂ fixation in *Bryophyllum* and the study of diurnal variation of acidity in this genus. *New Phytol*, 48:421–447, 1949.
- [148] P. A. Thompson, V. Roussel, und M. E. Knight. Over expression of the 27 KDa maize glutathione-S-transferase in transgenic tobacco confers herbicide resistance. *J Ex Bot*, 49 suppl.:25–26, 1998.
- [149] J. Thurlow und J. Bonner. Fixation of atmospheric CO₂ in the dark by leaves of *Bryophyllum*. *Arch Biochem*, 19:509–511, 1948.
- [150] S. Trümper, H. Follmann, und I. Häberlein. A novel dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts homologous to plant trypsin inhibitor. *FEBS Lett*, 352:159–162, 1994.
- [151] J. Urano, T. Nakagawa, Y. Maki, T. Masumura, K. Tanaka, N. Murata, und T. Ushimaru. Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Lett*, 466:107–111, 2000.
- [152] F. Ursini, M. Maiorino, R. Brigelius-Flohé, K. D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg, und L. Flohé. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 252:38–53, 1995.
- [153] T. Ushimaru, Y. Maki, S. Sano, K. Koshihara, K. Asada, und H. Tsuji. Induction of enzymes involved in the ascorbate-dependent antioxidative system, namely, ascorbate peroxidase, monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase, after exposure to air of rice (*Oryza sativa*) seedlings germinated under water. *Plant Cell Physiol*, 38:541–549, 1997.
- [154] F. Van Breusegem, L. Slooten, J. M. Stassart, J. Bottermann, T. Moens, M. Van Montague, und D. Inzé. Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. *J Ex Bot*, 50(330):71–78, 1999.
- [155] G. von Heijne, J. Steppuhn, und R. G. Herrmann. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem*, 180:535–545, 1989.

- [156] G. von Heijne. A Day in the Life of Dr K. or How I Learned to Stop Worrying and Love Lysozyme: a tragedy in six acts. *J Mol Biol*, 293:367–379, 1999.
- [157] A. Wachter. Subzelluläre lokalisierung der γ -ECS aus *Brassica juncea*. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, Fakultät für Biologie, 2000.
- [158] P. W. Washko, R. W. Welch, K. R. Dhariwal, Y. Wang, und M. Levine. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analysis in biological samples. *Anal Biochem*, 204:1–14, 1992.
- [159] H. Willekens, S. Chamnongpol, M. Davey, M. Schraudner, C. Langebartels, et al. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defense in C_3 plants. *EMBO J*, 14:4806–4816, 1997.
- [160] H. Willekens, D. Inzé, M. VanMontagu, und W. VanCamp. Catalase in plants. *Mol Breed*, 1:207–228, 1995.
- [161] H. Willekens, C. Langebartels, C. Tiré, M. Van Montagu, D. Inzé, und W. Van Camp. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:10450–10454, 1994.
- [162] H. Willekens, R. Villarroel, M. Van Montagu, D. Inzé, und W. Van Camp. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *FEBS Lett*, 352:79–83, 1994.
- [163] K. Winter. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in rapidly prepared desalted leaf extracts of the crassulaceen acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*, 154:298–308, 1982.
- [164] K. Winter und J. A. C. Smith, Hrsg. *Crassulacean Acid Metabolism, Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
- [165] K. Winter und D. J. Von Willert. NaCl-induzierter crassulaceensäurestoffwechsel bei *Mesembryanthemum crystallinum*. *Z Pflanzenphysiol*, 67:166–170, 1972.
- [166] G. Wu, R. W. Wilen, A. J. Robertson, und L. W. Gusta. Isolation chromosomal localization and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic Copper/Zink superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiol*, 120:513–520, 1999.
- [167] K. Yoshimura, Y. Yabuta, T. Ishikawa, und S. Shigeoka. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol*, 123:223–234, 2000.

- [168] K. Yoshimura, Y. Yabuta, M. Tamoi, T. Ishikawa, und S. Shigeoka. Alternatively spliced mRNA variants of chloroplast ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach leaves. *Biochem J*, 338:41–48, 1999.
- [169] P. Zamenhof und M. Villarejo. Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of beta-galactosidase fragments in vivo. *J Bacteriol*, 110:171–178, 1972.