

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilian-Universität München**

**Expressionsprofile von ABC-Transportern in *Arabidopsis thaliana*:
Reaktionen auf Xenobiotika im Kontext
mit anderen Genfamilien der Entgiftung**

Sabine Glombitza

aus

Frankfurt am Main

2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von PD Dr. Anton R. Schäffner betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 05.02.02

(Sabine Glombitza)

Dissertation eingereicht am: 05.02.02

1. Gutachter: PD Dr. Anton R. Schäffner
2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Cramer

Mündliche Prüfung: 15.03.02

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 METABOLISMUS VON XENOBIOTIKA IN PFLANZEN	1
1.2 ABC-TRANSPORTER	2
1.3 DNA-ARRAYS.....	6
1.4 AUSWAHL DER XENOBIOTIKA	8
1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	10
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 GERÄTE.....	11
2.2 CHEMIKALIEN UND ENZYME	11
2.2.1 Chemikalien.....	11
2.2.2 Radiochemikalien	12
2.2.3 Molekularbiologische „Kit“-Systeme.....	13
2.2.4 Enzyme.....	13
2.3 MATERIALIEN.....	13
2.4 SOFTWARE UND INTERNETSEITEN	14
2.4.1 Verwendete Software	14
2.4.2 Internetseiten	14
2.5 VERWENDETE ORGANISMEN	14
2.5.1 Bakterien.....	14
2.5.2 Pflanzen.....	14
2.6 BAKTERIENVEKTOREN	15
2.7 GÄNGIGE LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN	15
2.8 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	17
2.8.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	17
2.9 PFLANZENANZUCHT	18
2.10 METHODEN ZUR NUKLEINSÄURECHEMIE	18
2.10.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	18
2.10.2 Reinigung von PCR-Produkten.....	19
2.10.3 Restriktionsverdau	19
2.10.4 Ligation.....	19
2.10.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	19
2.10.6 Polymerasekettenreaktion.....	21
2.10.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
2.10.8 Sequenzierungen.....	22
2.10.9 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzengewebe	22
2.10.10 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe.....	23
2.10.11 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA.....	24
2.10.12 Fällung von DNA oder RNA	24
2.11 MACROARRAY-ANALYSE.....	24
2.11.1 Pflanzenmaterial für die organspezifische Expressionsanalyse	25

2.11.2	<i>Pflanzenbehandlung mit Herbiziden bzw. Safenern</i>	25
2.11.3	<i>Herstellung der spezifischen Sonden</i>	26
2.11.4	<i>Herstellung der Macroarray-Filter</i>	28
2.11.5	<i>Referenzhybridisierung</i>	29
2.11.6	<i>Komplexe Hybridisierung der Macroarray-Filter</i>	30
2.11.7	<i>Auswertung der radioaktiven Signale</i>	32
2.12	QUANTITATIVE POLYMERASEKETTENREAKTION	33
2.12.1	<i>Reverse Transkription</i>	33
2.12.2	<i>Amplifizierung der revers transkribierten DNA mittels Polymerase-kettenreaktion</i>	34
2.13	INDIREKTER IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON ABC-TRANSPORTPROTEINEN	35
2.13.1	<i>Präparation einer mikrosomalen Fraktion</i>	35
2.13.2	<i>Denaturierung der Proteine</i>	36
2.13.3	<i>Proteinbestimmungen</i>	37
2.13.4	<i>Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel</i>	38
2.13.5	<i>Herstellung der Antigene</i>	39
2.13.6	<i>Klonierung des Antigens in den Expressionsvektor pMAL-pΔH</i>	40
2.13.7	<i>Western-Blot</i>	41
2.13.8	<i>Antikörperbehandlung von Western-Blots</i>	42
2.13.9	<i>Solubilisierungen von Membranproteinen</i>	43
2.14	METHODEN ZUR ISOLIERUNG VON INSERTIONSMUTANTEN	45
2.14.1	<i>Bestätigung der Insertionen</i>	45
2.14.2	<i>Orientierung des Transposons</i>	46
2.14.3	<i>Lokalisierung der Insertion</i>	46
2.14.4	<i>Kreuzungen von Pflanzen</i>	47
2.14.5	<i>Bestimmung der Anzahl von Insertionen</i>	47
3	ERGEBNISSE	50
3.1	DER DETOX-ARRAY	50
3.1.1	<i>Auswahl und Spezifität der Sondenbereiche für die ABC-Transporter</i>	51
3.1.2	<i>Herstellung der genspezifischen Sonden</i>	56
3.1.3	<i>Normalisierungsstrategie der erhobenen Daten</i>	59
3.1.4	<i>Sensitivität des Detox-Arrays</i>	62
3.2	ORGANSPEZIFISCHE EXPRESSION DER ABC-TRANSPORTER	63
3.3	INDUKTIONEN NACH XENOBIOTIKA-BEHANDLUNG	66
3.3.1	<i>Behandlung der Pflanzen</i>	67
3.3.2	<i>Induktionen auf Transkriptebene</i>	69
3.3.3	<i>Hauptkomponentenanalyse der Herbizidversuche</i>	75
3.3.4	<i>Induktionen auf Proteinebene</i>	76
3.4	ISOLIERUNG EINER INSERTIONSMUTANTE	81
3.4.1	<i>Identifizierung von Insertionslinien am MPI für Züchtungsforschung</i>	81
3.4.2	<i>Bestätigung der Insertionen</i>	82
3.4.3	<i>Rückkreuzungen</i>	84
3.4.4	<i>Nachweis der En-Elemente</i>	84
3.4.5	<i>Fazit</i>	85
4	DISKUSSION	86
4.1	SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT DES DETOX-ARRAYS	86
4.2	ORGANSPEZIFISCHE EXPRESSION DER ABC-TRANSPORTER	88
4.3	REAKTIONEN DER ABC-TRANSPORTER AUF XENOBIOTIKA	90
4.4	DIE TRANSKRIPTIONSPROFILE	91
4.5	KLASSIFIZIERUNG DER AUSWIRKUNGEN	94
4.6	AUSBlick	98

5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	LITERATUR.....	102
7	ANHANG.....	109
7.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR KREUZHYBRIDISIERUNG DER GENSPEZIFISCHEN SONDEN	109
7.1.1	<i>ABC-Transporter</i>	<i>109</i>
7.1.2	<i>Cytochrom P450.....</i>	<i>114</i>
7.1.3	<i>Glutathion-S-Transferasen und Glutathion-abhängige Enzyme</i>	<i>118</i>
7.1.4	<i>UDP-Glycosyltransferasen.....</i>	<i>122</i>
7.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR KREUZHYBRIDISIERUNG DER CDNA-KLONE	127
7.3	OLIGONUKLEOTIDE.....	128
7.3.1	<i>Quantitative RT-PCR.....</i>	<i>128</i>
7.3.2	<i>Herstellung der Antigene.....</i>	<i>128</i>
7.3.3	<i>Isolierung der Insertionsmutanten.....</i>	<i>129</i>
7.3.4	<i>Vektorspezifische Oligonukleotide.....</i>	<i>129</i>
7.4	ORGANSPEZIFISCHE EXPRESSION DER ABC-TRANSPORTER	130
	DANKSAGUNG	131
	LEBENS LAUF	133
	<i>Schulbildung</i>	<i>133</i>
	<i>Ausbildung und Berufstätigkeit:</i>	<i>133</i>
	<i>Studium und Berufstätigkeit:.....</i>	<i>133</i>
	<i>Promotion:.....</i>	<i>133</i>
	<i>Praktika:</i>	<i>133</i>

Abkürzungsverzeichnis:

μCi	Mikro-Curie
ABC-Transporter	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette Transporter
AOH	ABC1 homologs; Subfamilie der ABC-Transporter
BAC	bacterial artificial chromosome
BEN24	Benoxacor, 24h
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BXN	Bromoxynil, 24h
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan-sulfonat
d	Tage
DNA	Internationale Bezeichnung für Desoxyribonukleinsäure
ETH	Ethylen
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
h	Stunden
HR	Hypersensitive Reaktion (<i>hypersensitive reaction</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
MDR	multidrug resistance proteins; Subfamilie der ABC-Transporter
MeJA	Methyljasmonat
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
MIPS	Munich information center for protein sequences, GSF
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MRP	multidrug resistance-associated proteins; Subfamilie der ABC-Transporter
OD	optische Dichte
PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDR	pleiotropic drug resistance proteins; Subfamilie der ABC-Transporter
PGP	P-glycoprotein; Subfamilie der ABC-Transporter (=MDR)
PR24	Primisulfuron, 24h
PS36	Primisulfuron, 36h
PS-AVIR	Pseudomonas, avirulent
PS-VIR	Pseudomonas, virulent
RNA	Internationale Bezeichnung für Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
SA	Salicylsäure
SAR	Systemisch erworbene Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAP	transporter associated with antigen processing; Subfamilie der ABC-Transporter
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Upm	Umdrehung pro Minute
UTR	<u>un</u> translated <u>re</u> gion; untranslatierter Bereich der mRNA
UV-HIGH	UV-B mit hoher PAR
UV-LOW	UV-B mit niedriger PAR
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WBC	white-brown complex homologs; Subfamilie der ABC-Transporter

1 Einleitung

1.1 Metabolismus von Xenobiotika in Pflanzen

Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung einer großen Diversität an Substanzen ausgesetzt, die entweder anthropogenen Ursprungs sind oder von anderen Organismen der pflanzlichen Lebensgemeinschaft (Biozönose) ausgeschieden werden (Xenobiotika). Dabei können die Substanzen anthropogenen Ursprungs danach unterschieden werden, ob sie zu einem bestimmten Zweck in die Umwelt gebracht wurden, wie z.B. Pestizide, oder ob sie aufgrund von unbeabsichtigten Emissionen in die Umwelt gelangt sind (Berndt, 1996). Pflanzen haben die Fähigkeit diese zum Teil toxischen Substanzen zu metabolisieren und dabei zu detoxifizieren. Der Metabolismus von Xenobiotika wird in drei Phasen eingeteilt (Abbildung 1.1) (Coleman *et al.*, 1997; Kreuz & Martinoia, 1998; Sandermann, 1994). Während die Substanzen in der ersten Phase durch Reduktion, Oxidation, Hydrolyse oder Einführung einer reaktiven Gruppe, z.B. durch Cytochrom P450-Monooxygenasen, auf die zweite Phase vorbereitet werden, findet die eigentliche Detoxifizierung meist in der zweiten Phase statt. Die Metabolite werden deaktiviert, indem sie mit endogenen hydrophilen Molekülen konjugiert werden, wie z.B. Glucose, Malonat oder Glutathion. Beteiligte Enzyme an diesen Prozessen sind unter anderem die Malonyl-Transferasen, UDP-Glycosyltransferasen und Glutathion-S-Transferasen. Während im Tier die entstandenen Konjugate über die Niere ausgeschieden werden können, findet bei Pflanzen in der dritten Phase eine Kompartimentierung statt. Die dritte Phase beinhaltet die Kompartimentierung der Metabolite entweder in die Vakuole oder aber in den apoplastischen Raum. Ob es sich dabei um einen direkten Transport aus dem Cytoplasma über die Plasmamembran hinweg handelt oder aber in jedem Fall der Umweg über weitere Prozessierungen in der Vakuole geht, ist noch nicht geklärt (Coleman *et al.*, 1997; Sandermann, 1992). Grundsätzlich denkbar ist auch, dass die Metabolite oder Metabolitenkonjugate über den Vesikeltransport in den Apoplasten gelangen. In jedem Fall ist aber der Transport durch Membranen notwendig.

Mitglieder der Genfamilien, die mit der Detoxifizierung in Zusammenhang gebracht werden, sind an endogenen Prozessen des Sekundärmetabolismus der Pflanzen beteiligt. So katalysieren Cytochrom P450 Monooxygenasen eine Vielzahl von biochemischen Reaktionen wie zum Beispiel im Metabolismus von Pflanzenhormonen, wie Jasmonsäure, Gibberelline und Brassinosteroide und in der Biosynthese von Pflanzenprodukten wie Phenylpropanoiden, Alkaloiden, Terpenoiden, Lipiden, Lignin, cyanogenen Glycosiden und Glucosinolaten (Xu *et al.*, 2001). Über die endogene Funktion von Glutathion-S-Transferasen (GST) ist weit weniger bekannt. Dennoch wurde diskutiert, dass der Transport von Anthocyanen in die Vakuole nur als Konjugat mit Glutathion stattfinden kann (Alfenito *et al.*, 1998; Marrs *et al.*, 1995), obwohl spätere Studien den Prozess mit Flavonoidkonjugaten in Zusammenhang brachten. (Mueller *et al.*, 2000). Allerdings wurde das Phytoalexin Medicarpin als Glutathion-Konjugat in die Vakuole transportiert (Li *et al.*, 1997a). Vermutlich sind GSTs an weit mehr Prozessen der Biosynthese und des Transports von sekundären Metaboliten beteiligt als es bisher angenommen wurde (Wagner *et al.*, 2001). Der Transfer von UDP-Glucose auf andere Verbindungen durch UDP-Glycosyltransferasen kann zur Aktivierung oder Inaktivierung dieser Substanzen führen. Durch den Transfer der Glucose an eine Carboxylgruppe entstehen Glucoseester, die biosynthetische Intermediate für weitere Reaktionen mit Aglykonen

darstellen. Der Glucosetransfer an eine Hydroxygruppe, z.B. an Pflanzenhormone, können diese inaktivieren und stellen möglicherweise die Transportform dar (Jackson *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001).

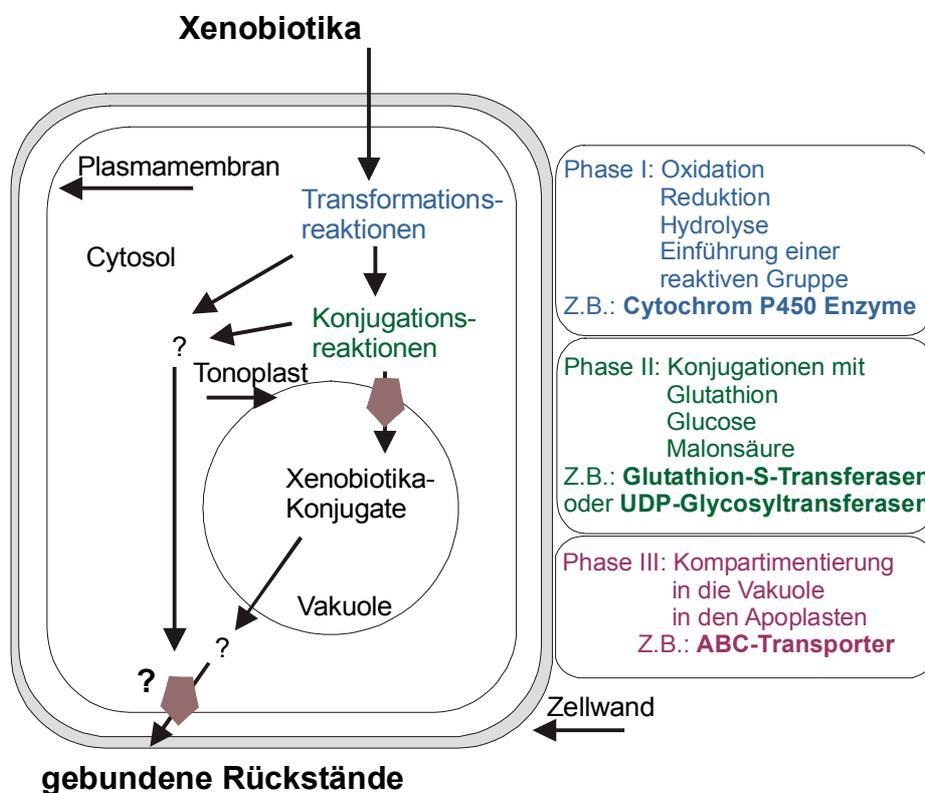


Abb. 1.1: Xenobiotika-Metabolismus in Pflanzen. (Nähere Erläuterungen siehe Text).

Unabhängig davon, ob es sich um Metabolite von Detoxifizierungsreaktionen handelt oder um endogene Konjugate, die entweder in Kompartimenten der Zelle gelagert werden oder innerhalb der Pflanze transportiert werden müssen, sind Transporter notwendig, die die Vielzahl an strukturell unterschiedlichen Substanzen über die Membranen befördern. Da aus anderen Organismen wie Mensch, Tier, Hefe und Bakterien bereits bekannt ist, dass Mitglieder der großen Genfamilie der ABC-Transporter (ATP-binding-cassette transporters) in der Lage sind eine Vielzahl an fremden und strukturell sehr verschiedenen Substanzen zu transportieren (Higgins, 1992), ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Superfamilie auch in der Pflanze diese Aufgabe übernimmt.

1.2 ABC-Transporter

ABC-Proteine repräsentieren eine der größten Proteinfamilien. In allen bisher untersuchten Organismen, von Mikroorganismen bis zu Säugetieren, wurden diese Proteine bereits identifiziert (Higgins, 1992). Charakteristisch für diese Proteinfamilie sind die Domänen, die

zusätzlich zu je einem Walker A und B Motiv das konservierte ABC-Motiv enthalten. ABC-Proteine enthalten entweder eine oder zwei dieser ATP-bindenden Domänen. Der größte Teil dieser Proteine enthält zusätzlich ein oder zwei weitere Domänen, die aus 6-11 transmembranen α -Helices bestehen (transmembrane Domänen). Diese ABC-Transporter nutzen die aus der Hydrolyse des gebundenen ATPs gewonnene Energie, um eine Vielzahl an verschiedenen Molekülen, von anorganischen Ionen über Zucker bis hin zu großen Polypeptiden, über die Zellmembranen zu transportieren. Während bei Prokaryonten auch ein Import von Substanzen statt findet, scheint es sich bei Eukaryonten ausschließlich um einen Export zu handeln. Dabei sind die nukleotidbindenden Domänen im Cytoplasma lokalisiert und exportieren die Substanzen aus der Zelle oder in andere Kompartimente der Zelle (z.B. Endoplasmatisches Retikulum). Dabei ist der genaue Mechanismus wie die Energiegewinnung aus der ATP-Hydrolyse mit der Konformationsänderung, die für die Substrattranslokation notwendig ist, verbunden wird, bisher nicht bekannt (Higgins & Linton, 2001).

Anhand der Genstruktur und der Sequenzhomologien werden die ABC-Proteine in Subfamilien unterteilt. Im menschlichen Organismus sind bisher 48 Gene bekannt, die in sieben Subfamilien klassifiziert werden (Dean *et al.*, 2001). In den komplett sequenzierten Organismen Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und *Escherichia coli* gibt es 29 bzw. 79 offene Leserahmen für diese Genfamilie (Decottignies & Goffeau, 1997; Linton & Higgins, 1998). In Hefe erfolgte die Einteilung in sechs „Cluster“ und zehn „Subcluster“, in *E. coli* in zehn Subfamilien.

In der vollständig sequenzierten Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gibt es 129 offene Leserahmen für ABC-Proteine, die in 12 Subfamilien unterteilt werden. Davon kodieren 26 für sogenannte „lösliche ABC-Proteine“, die keine transmembranen Domänen besitzen. Die anderen 103 Gene teilen sich auf in 52 Vollängentransporter, die je zwei ATP-bindende (ABC) und zwei transmembrane Domänen (TM) besitzen, und 51 halbe Transporter, bestehend aus je einer dieser Domänen (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Alle ABC-Transporter aus *Arabidopsis thaliana* sind in Abbildung 1.2 in einem phylogenetischen Stammbaum dargestellt.

Die Vollängen ABC-Transporter in *Arabidopsis thaliana* unterteilen sich in die vier Subfamilien MDR (*multidrug resistance proteins*), MRP (*multidrug resistance-associated proteins*), PDR (*pleiotropic drug resistance*) und AOH (*ABC1 homolog*). Die halben ABC-Transporter bestehen ebenfalls aus vier Subfamilien. Dazu gehören die WBC (*white-brown complex homologs*), ATH (*ABC2 homolog*), ATM (*ABC transporter of the mitochondria*) und die TAP (*transporter associated with antigen processing*). Die Subfamilie PMP (*peroxisomal membrane protein*) besteht aus zwei Mitgliedern, je einem Vollängen und einem halben ABC-Transporter.

Die aus menschlichen Tumorzellen isolierten MDR-Proteine (auch als P-Glycoproteine bezeichnet), bei denen die ABC-Domäne (ABC) jeweils einer transmembranen Domäne (TM) folgt und sich somit die Reihenfolge TM-ABC-TM-ABC ergibt (Tusnady *et al.*, 1997), sind in der Lage Chemotherapeutika aus den Zellen zu exportieren. Da sich die Medikamente nicht mehr anreichern können, bildet sich dadurch in diesen Zelllinien eine Resistenz gegenüber jenen Substanzen aus (Higgins, 1993). Auch aus *Arabidopsis thaliana* wurde bereits ein P-Glycoprotein (*AtMDR1*) isoliert (Dudler & Hertig, 1992). Dieser Transporter wurde in der Plasmamembran lokalisiert und eine Beteiligung bei der lichtabhängigen Entwicklung des Hypokotyls nachgewiesen (Sidler *et al.*, 1998). Auch in Gerste (*Hordeum vulgare*) und

Kartoffel (*Solanum tuberosum esculentum*) wurden bereits ABC-Transporter dieser Subfamilie kloniert, deren Funktion aber bisher noch nicht geklärt ist (Davies *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996).

Die Subklasse der MRP-Proteine (*multidrug resistance-associated proteins*) ist dafür bekannt, dass sie ebenfalls in Tumorzellen eine Medikamentenresistenz verursacht und wird häufig im Zusammenhang mit dem Transport von Glutathion-Konjugaten diskutiert (Cole *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1994; Tommasini *et al.*, 1996). Die MRP-Proteine gleichen zwar in der Reihenfolge der Domänen den MDR-Proteinen, doch sie besitzen zusätzlich am N-terminalen Ende eine große hydrophobe, sehr wahrscheinlich membrangebundene Domäne bestehend aus 4-6 transmembranen Segmenten (TM₀) (Tusnady *et al.*, 1997). Auch in *Arabidopsis thaliana* konnte der Transport von Glutathion-Konjugaten für die vier ABC-Transporter dieser Subfamilie (AtMRP1, AtMRP2, AtMRP3 und AtMRP5) gezeigt werden (Gaedeke *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1997; Tommasini *et al.*, 1998). Die Lokalisation von AtMRP2 in der Tonoplastenmembran (Liu *et al.*, 2001) lässt vermuten, dass die in heterolog exprimierten Systemen gezeigten Transportvorgänge *in vivo* von diesem Transporter in die Vakuole stattfinden.

Eine weitere Subklasse umfasst die PDR-Proteine (pleiotropic drug resistance). Im Vergleich zu den beiden vorherigen Subklassen ist bei dieser Subfamilie die Reihenfolge der Domänen vertauscht. Die erste Domäne ist eine ABC-Domäne gefolgt von einer transmembranen Domäne, wodurch sich die Abfolge ABC-TM-ABC-TM ergibt (Balzi & Goffeau, 1994; Smart & Flemings, 1996). Der aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) isolierte ABC-Transporter PDR5 wird unter Stressbedingungen, wie Hitzeschock oder Anwesenheit von Xenobiotika, induziert und verleiht Resistenz zum Beispiel gegenüber Cycloheximid (Balzi & Goffeau, 1994). Davon ausgehend wird postuliert, dass dieser Transporter eine Rolle bei der Entgiftung zytotoxischer Verbindungen oder der Metabolite spielt, die während des Wachstums und insbesondere unter umweltbedingten Stressbedingungen akkumulieren. In der aquatischen Pflanze *Spirodela polyrrhiza* konnte ein Homolog des PDR5-Proteins kloniert werden (*TUR2*) (Smart & Flemings, 1996). Behandlung der Pflanzen mit Abscisinsäure führte zu einer Akkumulation der *TUR2*-mRNA, ebenso führten Salz- und Kältestress zu einer Induktion. Somit könnten diese Proteine bei dem Transport der unter Stressbedingungen entstehenden Metabolite involviert sein (Smart & Flemings, 1996). In *Nicotiana plumbaginifolia* wurde erst kürzlich ein ABC-Transporter dieser Subfamilie identifiziert. Vermutlich ist dieser Transporter NpABC1 in der Sekretion von sekundären Metaboliten involviert, die in der Pflanzenabwehr eine Rolle spielen (Jasinski *et al.*, 2001). In *Arabidopsis thaliana* sind bisher keine homologen Sequenzen experimentell untersucht worden. Obwohl diese Subfamilie sowohl in *Arabidopsis thaliana* als auch in Hefe vertreten ist, ist bisher kein homologes Gen im menschlichen Genom identifiziert worden.

Von der vierten Subfamilie der Volllängen ABC-Transporter AOH (*ABC1 homolog*), die in *Arabidopsis thaliana* auf Genomebene identifiziert wurden, gibt es nur einen einzigen offenen Leserahmen. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist 1816 Aminosäuren lang, und damit der größte ABC-Transporter, der durch ein einziges Gen kodiert ist, und der einzige Volllängen ABC-Transporter, zu dem es keine Homologen in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) gibt (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Der aus dem menschlichen Organismus bekannte homologe ABC1-Transporter ist vermutlich in den Lipidstoffwechsel involviert (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). In Proteinen der AOH-Subklasse folgt die ABC-Domäne der TM-Domäne, wie auch bei den Proteinen der MDR und MRP-Subklassen. Jedoch gibt es

in der zentralen Region eine zusätzliche hydrophobe Domäne, die möglicherweise regulatorische Aufgaben übernimmt (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

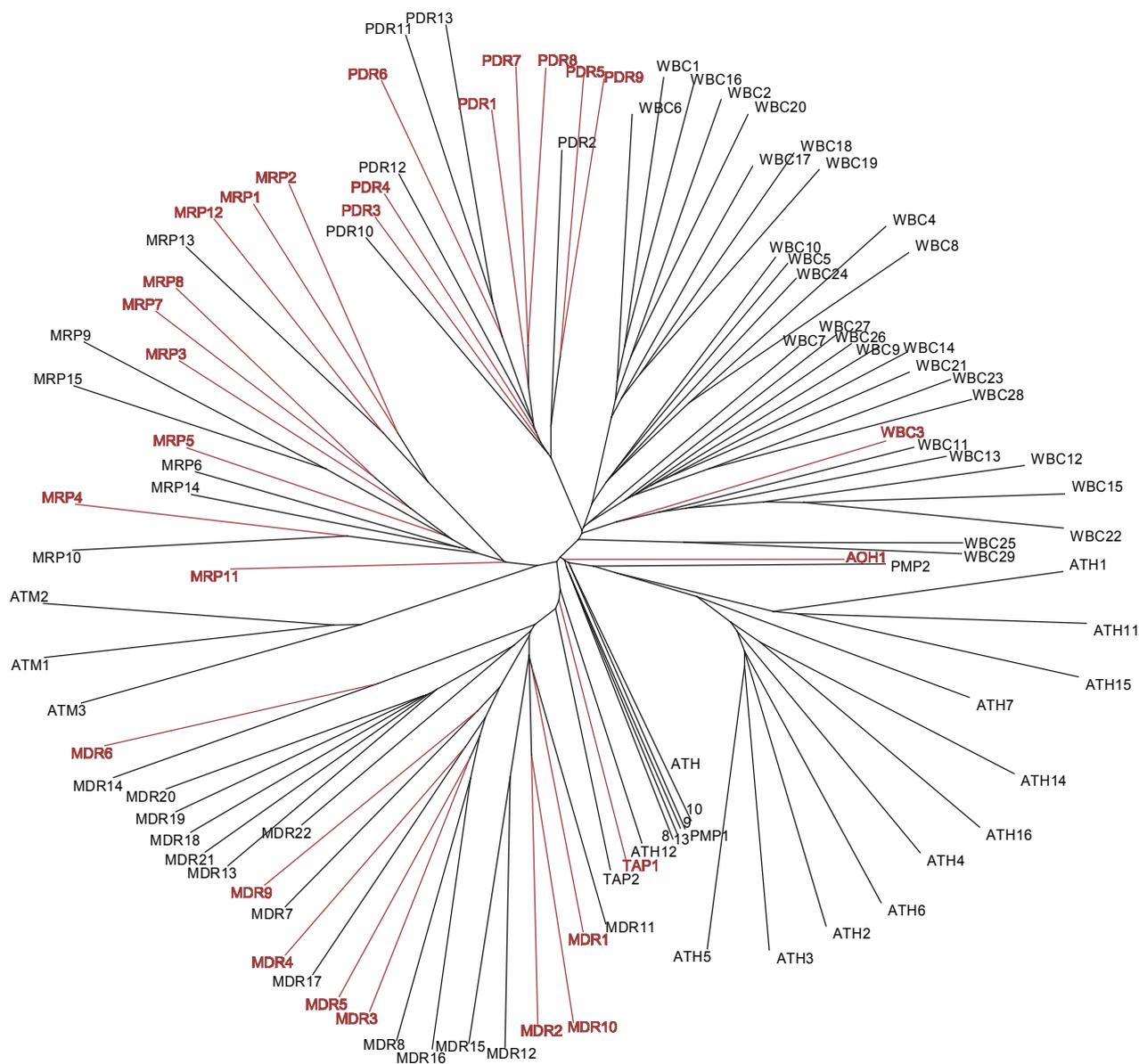


Abb. 1.2: Phylogenetischer Stammbaum aller ABC-Transportproteine (angelehnt an Sanchez-Fernandez (2001)). Nähere Erläuterungen zu den Subfamilien und Erklärungen der Abkürzungen siehe Text. Rot markiert sind die Gene, die mit genspezifischen Sonden auf dem DNA-Array untersucht wurden.

Kein Mitglied der vier Subfamilien, die zu den halben ABC-Transportern gehören, ist bisher in Pflanzen näher charakterisiert. Zwei Gene aus zwei dieser Subfamilien wurden in die Untersuchungen mit eingeschlossen, deswegen werden diese beiden Subfamilien im Folgenden kurz vorgestellt.

In der WBC-Subfamilie (*white-brown complex homologs*) folgt die TM-Domäne der ABC-Domäne. Die Prototypen sind die *White*, *Brown* und *Scarlet* Proteine aus *Drosophila melanogaster*. Diese Proteine müssen zunächst dimerisieren bevor die Pigmentvorstufen, die für die Augenfarbe verantwortlich sind, transportiert werden können (Dreesen *et al.*, 1988). In *Arabidopsis thaliana* gibt es 29 Gene, die für Proteine dieser Subfamilie kodieren und ist damit die Subfamilie mit den meisten Mitgliedern (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Die andere Subfamilie bilden die TAPs (*transporter associated with antigen processing*), deren Domänenorganisation entgegengesetzt zu der der WBC-Subfamilie ist. Die im Säugetier vorkommenden TAP1-TAP2-Peptidtransporter sind in dem Prozess der Antigenpräsentation an Zelloberflächen involviert. Dieser heterodimere Proteinkomplex ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und spielt bei der Immunantwort eine wichtige Rolle. Von Proteasomen degradierte Proteine werden von diesem Proteinkomplex aus dem Cytosol in das ER transportiert. Die Peptide werden im ER an MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I Moleküle gebunden und von dort in Golgivesikeln an die Oberfläche transportiert (Abele & Tampe, 1999). In *Arabidopsis thaliana* gibt es zwei Leserahmen, die für diese Subklasse kodieren (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

In Pflanzen wurde bisher nicht *in vivo* gezeigt, dass ABC-Transporter an der Kompartimentierung von Xenobiotika-Konjugaten beteiligt sind. Die bisherigen Arbeiten zu ABC-Transportern in *Arabidopsis thaliana* zeigen jedoch, dass diese Proteine heterolog exprimiert in Hefe Glutathion-Konjugate oder Chlorophyll-Katabolite in die Vakuole transportieren können (Gaedeke *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1997; Tommasini *et al.*, 1998). Der Transport von Glutathion-Konjugaten und Chlorophyll-Kataboliten in isolierte Vakuolen von Gerste, Roggen, Roter Bete, Mungbohne, Mais und *Arabidopsis thaliana* ist strikt ATP-abhängig. Die Aufnahme der untersuchten Substanzen konnte zwar durch Vanadat (bildet intermediäres Produkt mit ATP) gehemmt werden, aber nicht durch Bafilomycin, das die vakuoläre H⁺-ATPase spezifisch hemmt. Außerdem konnten die Transportvorgänge durch ATP stimuliert werden, während das nicht hydrolysierbare Analogon 5'-Adenylyl β,γ -imidodiphosphat den ATP-abhängigen Transport der Glutathion-Konjugate hemmte. Durch GTP und UTP konnte der Transport stimuliert werden, während ADP und Pyrophosphat keinen Einfluss auf die Transportvorgänge hatten. Gramacidin und Ammoniumchlorid beeinflussten den Transport nicht, obwohl sie den pH-Gradienten entkoppeln. Diese Studien zeigten, dass die Transportvorgänge ATP-abhängig, aber unabhängig vom pH-Gradienten sind (Blake-Kalff & Coleman, 1996; Gaillard *et al.*, 1994; Hinder *et al.*, 1996; Hörtensteiner *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997a; Li *et al.*, 1995a; Li *et al.*, 1995b; Martinoia *et al.*, 1993; Tommasini *et al.*, 1993). Auch an isolierten Protoplasten der Ackerbohne (*Vicia faba* L.) wurde bereits die Aufnahme von reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) mit den gleichen Eigenschaften gezeigt (Jamai *et al.*, 1996). Über die Mechanismen der Sekretion von Xenobiotika-Metaboliten in den Apoplasten ist bisher nichts bekannt.

1.3 DNA-Arrays

Um eine Vielzahl an Genen auf Transkriptebene parallel betrachten zu können und einen Einblick in die Komplexität der regulatorischen Netzwerke in Organismen zu bekommen

wurde in den letzten Jahren die Technik der DNA-Arrays entwickelt. In einem der ersten Ansätze wurden 45 *Arabidopsis thaliana* Gene in unterschiedlichen Organen betrachtet (Schena *et al.*, 1995). Sowohl die Komplexität der betrachteten Gene als auch die Technologie selber hat sich mittlerweile in viele Richtungen entwickelt.

Das Prinzip des DNA-Arrays ist unabhängig von der angewendeten Technik für alle gleich. Auf einer festen Matrix (z.B. Glas oder Nylonmembran) werden zunächst die Sonden fixiert. Diese bestehen entweder aus cDNA-Klonen oder aus ausgewählten Teilbereichen der genomischen Sequenz. Die Sonden werden mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und mit einer Vorrichtung auf die feste Matrix aufgebracht. Dabei ist die Position jedes einzelnen PCR-Produkt auf der Matrix festgelegt. Die Vorrichtungen können Stempel mit einem Durchmesser von 400 oder 700µm sein, mit denen 15 bzw. 60nl der PCR-Produktlösung übertragen werden. Sollen mehrere Matrices parallel hergestellt werden, müssen die Stempel immer erneut in die Ausgangsplatte getaucht werden, bevor die neue Matrix mit dem PCR-Produkt versehen werden kann. Bei gespaltenen Nadeln oder Nadeln mit einem kleinen Flüssigkeitsreservoir wird genügend Flüssigkeit aufgenommen, um viele Membranen oder Glaträger parallel herstellen zu können. Außerdem können auch mit einer Piezo-Elektronik definierte Mengen aufgetragen werden. Die Matrices mit den fixierten PCR-Produkten werden anschließend mit einer komplexen und markierten Sonde hybridisiert. Die komplexe Sonde ist in cDNA umgeschriebene *messenger*RNA, die während der reversen Transkription markiert wurde. Die Markierung kann entweder radioaktiv oder über Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen. Während bei der radioaktiven Markierung die Kontroll- und Behandlungs-RNA auf zwei verschiedenen Membranen hybridisiert werden muss, können bei der Fluoreszenz-Markierung für die zwei verschiedenen RNAs zwei verschiedene Fluoreszenzen eingebaut werden, die dann gleichzeitig auf einem Glaträger hybridisiert werden und nur mit zwei verschiedenen Wellenlängen eingelesen werden müssen (Baldwin *et al.*, 1999; Granjeaud *et al.*, 1999; Lemieux *et al.*, 1999). Die Entscheidung welche Technik verwendet wird, hängt von der bereits vorhandenen Ausstattung ab, von der angestrebten Spezifität und Sensitivität, sowie von dem Umfang der untersuchten Gene. Auch die Menge an vorhandenem Material, aus dem RNA isoliert werden kann, kann entscheidend für die angewendete Technik sein. Allen Techniken gemeinsam ist, dass die Intensität der Markierung an der Stelle der bekannten Gensonden in Relation zu der Häufigkeit des korrespondierenden Transkripts steht.

Eine davon abweichende Technik bei der Herstellung der Matrix wird von der Firma Affymetrix vertrieben. Dabei werden modifizierte Nukleotide mit einer Schutzgruppe, die durch Licht in der Synthesereaktion aktiviert werden kann, auf die Matrix gebracht. Mit bestimmten Schablonen wird bestimmt an welchen Sonden die Schutzgruppen aktiviert werden, um dann in der nächsten Runde der Oligonukleotidsynthese zu bestimmen, an welche Sonde das nächste Nukleotid angehängt werden soll. Bei einem Oligonukleotid mit 25bp, müssen diese Vorgänge also ca. 100x wiederholt werden, um alle vier Nukleotide jeweils an die richtige Stelle zu synthetisieren (Lemieux *et al.*, 1999; Lockhart *et al.*, 1996). Das Prinzip der Hybridisierung weicht jedoch nicht von den oben dargestellten Techniken ab.

Auch an *Arabidopsis thaliana* wurden bereits einige DNA-Array gestützte Untersuchungen durchgeführt und zeigen das Potential dieser Methode auf. So wurde z.B. die organspezifische Expression von 1400 cDNA-Klonen in Wurzel, Blatt und zwei Stadien der Blütenentwicklung untersucht (Ruan *et al.*, 1998). Der Vergleich der Expressionsprofile zwischen Blatt und Wurzel zeigte, dass insgesamt ca. 1/3 der untersuchten Gene unterschiedlich exprimiert sind.

Von den 490 differenziert exprimierten Genen wurden 433 in der Wurzel exprimiert. In einer weiteren Untersuchung wurden 1300 Vollängen cDNA-Klone unter verschiedenen Bedingungen wie Trocken- und Kältestress, sowie in verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert. In diesem Ansatz konnten 44 Trockenstressgene identifiziert werden, von denen 30 bisher nicht in diesem Zusammenhang bekannt waren. Auch durch den Kälteschock konnten 19 cDNA-Klone isoliert werden, von denen 10 bisher nicht als Kälteschock induzierbar bekannt waren. In einem Vergleich zwischen dem Wildtyp und einer transgenen Linie, die den Transkriptionsfaktor DREB1A (Dehydration-responsive element) überexprimierte, konnten 12 Gene identifiziert werden, die von diesem Transkriptionsfaktor reguliert werden. Sechs Gene davon waren vorher unbekannt (Seki *et al.*, 2001). Um Gene zu identifizieren, die in einem circadianen Rhythmus exprimiert werden, wurde ein Microarray mit über 11.000 cDNA-Klonen eingesetzt, der vermutlich 7.800 verschiedene Gene repräsentiert. Die Expression von 2% der untersuchten Gene unterlagen einem circadianen Rhythmus (Schaffer *et al.*, 2001). Die Auswirkungen von Eisenmangel auf den primären Stoffwechsel wurde ebenfalls mit einem cDNA-Microarray untersucht. Dieser Array enthielt ca. 6.000 verschiedene Sequenzen. Aufgrund der Untersuchungen wurde vermutet, dass es durch den Eisenmangel zu einem erhöhten Energieverbrauch in der Wurzel kommt, der durch Kohlenstoffimport aus anderen Organen und anaerobe Respiration kompensiert wird (Thimm *et al.*, 2001).

Diese Beispiele zeigen, welches Potenzial in dieser sich fortschreitend entwickelnden Technologie steckt und welche Variabilität der Einsatzmöglichkeiten diese Technik bietet. In Organismen wie Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Reis (*Oryza sativa*) ist man inzwischen dazu übergegangen spezifischere Sonden einzusetzen (Hauser *et al.*, 1998; Yazaki *et al.*, 2000), die nur den 3'-untranslatierten Bereich (UTR) und einen kleinen Anteil der kodierenden Sequenz der Gene enthalten. Basis für die Herstellung der Sonden ist entweder die genomische Sequenz (Hefe) oder sequenzierte cDNA-Klone (Reis).

1.4 Auswahl der Xenobiotika

Für die Aufnahme von Expressionsprofilen sollten Substanzen ausgewählt werden, die bereits im Zusammenhang mit ABC-Transportern untersucht wurden oder für deren Metabolismus ein Transport über Membranen gefordert werden muss.

Das Herbizid **Primisulfuron** (Abbildung 1.3) wurde bereits im Zusammenhang mit ABC-Transportern untersucht. Nach Inkubation von *Arabidopsis thaliana* in sterilen Schwimmkulturen mit Primisulfuron konnte für *AtMRP3* eine starke Induktion nachgewiesen werden (Tommasini *et al.*, 1997). Primisulfuron gehört zur Klasse der Sulfonylharnstoffe, (Katagi & Mikami, 2000). Der primäre Angriffspunkt dieser Substanzklasse ist die Inhibierung der Acetolactatsynthase, wodurch die Synthese der verzweigten Aminosäuren inhibiert wird. Sekundäre Effekte sind der Stillstand der DNA-Synthese, der Zellteilung und des Pflanzenwachstums (Katagi & Mikami, 2000). Der Metabolismus dieser Substanz ist teilweise aus anderen Pflanzen bekannt. In *Zea mays* wird Primisulfuron zunächst am Phenyl- oder am Pyrimidinring durch mikrosomale Cytochrom P450 Monooxygenasen hydroxyliert und es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Hydroxyphenyl-primisulfuron mit einer partiell aufgereinigten Glycosyltransferase und UDP-Glucose in 5'-Position glucosyliert wird (Kreuz & Martinoia, 1998). Dieses Glucosekonjugat von Hydroxy-Primisulfuron wurde in

Transportstudien an isolierten Vakuolen der Gerste eingesetzt. Das Hydroxyprimisulfuron-glucosid wurde mit den Charakteristika eines ABC-Transporters in die Vakuole transportiert (Gaillard *et al.*, 1994). Der dafür verantwortliche Transporter ist aber vermutlich kein Glutathionkonjugat-Transporter, da das endogene Substrat Esculin nur die Aufnahme des Glucose-Konjugats inhibierte, nicht aber die Aufnahme des Metolachlor-Glutathionkonjugats (Kreuz & Martinoia, 1998).

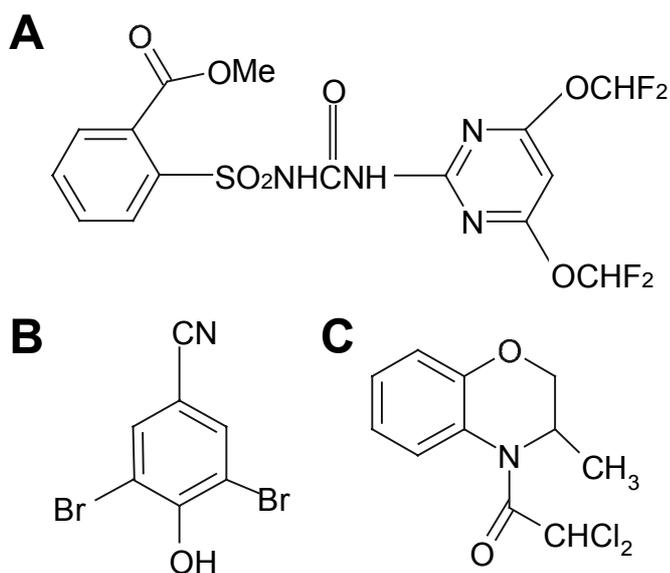


Abb. 1.3: Chemische Strukturen der verwendeten Xenobiotika. Primisulfuron (A), Bromoxynil (B) und Benoxacor (C).

Werden Pflanzen in sterilen Kulturen angezogen und mit radioaktiv markiertem **Bromoxynil** (Abbildung 1.3) inkubiert, so wird ein großer Anteil der Radioaktivität sowohl gebunden an die Proteinfraction gefunden, als auch gebunden an die nicht-extrahierbaren Lignin-Rückstände der Zellwand (Wunderwald, persönliche Mitteilung). Dies stellt einen Hinweis dafür da, dass es in *Arabidopsis thaliana* einen natürlichen Metabolismus von Bromoxynil und einen Transportmechanismus der Metabolite in den Apoplasten gibt. Bromoxynil (Abbildung 1.3) aus der Stoffklasse der Hydroxybenzoxynitrile gehört zu den Herbiziden, die eine Hemmwirkung auf den Elektronentransport im Photosystem II ausüben. Dabei kommt es zu einer Unterbrechung des Elektronentransports durch die irreversible Bindung des Herbizids an die Q_B-Bindestelle des D1-Proteins. Ein weiterer Effekt dieser Herbizide ist, dass das normalerweise sehr häufig ausgetauschte D1-Protein („*rapidly turning over protein*“) durch

die Bindung des Herbizids nicht mehr aus der Membran entfernt werden kann (Hock *et al.*, 1995; Smeda & Vaughn, 1997).

Benoxacor (Abbildung 1.3) ist ein in Maiskulturen in Kombination mit Metolachlor eingesetzter Safener. Es hat sich herausgestellt, dass Benoxacor gerade im Bereich des besonders herbizidempfindlichen Apikalmeristems den Herbizidabbau drastisch beschleunigt (Ebert & Kreuz, 1991). An Zellkulturen der dikotylen Sojabohne (*Glycine max*) konnte durch die Zugabe von Benoxacor die Aktivität der 2,4,5-Trichlorphenol-Glucosyltransferase (2,4,5 TCO-O-GT) induziert werden (Messner *et al.*, 1996). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Safener auch in dikotylen Pflanzen Gene des Sekundärmetabolismus induziert.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Hauptziel dieser Arbeit war es, auf Basis der gesamten genomischen Information, Grundlagen über die Detoxifizierung von Xenobiotika im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* zu erarbeiten. Anhand eines „*functional genomics*“ Ansatzes sollten die Reaktionen von ABC-Transportern im Kontext mit anderen Genfamilien, die ebenfalls eine Rolle bei der Detoxifizierung von Xenobiotika spielen (Cytochrom P450 Monooxygenasen, UDP-Glycosyltransferasen und die Glutathion-S-Transferasen), auf exogene Chemikalien untersucht werden.

Die zunächst zentrale Aufgabe war die Voraussetzung für die parallele Transkriptmessung der z.T. hoch homologen Mitglieder der ausgewählten Genfamilien zu schaffen. In Zusammenarbeit mit anderen Projekten sollte auch der Einfluss weiterer biotischer und abiotischer Umweltfaktoren auf die Transkripte der ausgewählten Genfamilien zueinander in Bezug gesetzt werden.

Zudem sollten weiterführende Ansätze zur funktionellen Charakterisierung, wie Detektion der ABC-Transporter auf Proteinebene und Identifizierung von „*knock-out*“ Mutanten, initiiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Neben den gängigen Laborgeräten wurden verwendet:

Ausschwingzentrifuge Hettich	Hettich, Tuttlingen
BioRad Gel Doc 2000	BioRad Lab GmbH, München
Miniprotean II cell	BioRad Lab GmbH, München
Drehofen zur radioaktiven Hybridisierung	Bachofer GmbH, Reutlingen
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
FLA-3000	FUJI Photo Film Co., LTD, Japan
Heizblock	Bachofer GmbH, Reutlingen
Hettich Tischzentrifuge EBA12	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge RC58 Plus	Sorvall (Kendro), Stuttgart
Microgrid II	BioRobotics, UK
Mikrotiterplattenzentrifuge 4K15C	Sigma GmbH, Osterode
MultiCycler PTC 200	Watertown, MA, USA
Sigma 2 K15 Laborzentrifuge	Sigma GmbH, Osterode
Spektrophotometer DU® 640	Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim
Tragbarer Kontaminationsmonitor LB1210B	Berthold, Bad Wildbad
Ultrazentrifuge Optima LE-70	Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim
Univapo 100H	Uniequip, Martinsried
UV Stratalinker®	Stratagene, La Jolla, USA

2.2 Chemikalien und Enzyme

2.2.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%)	Roth, Karlsruhe
Agarose SEA KEM® LE	FMC Biochemicals, Maine, USA
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP)	Boehringer, Mannheim
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)	Boehringer, Mannheim
Benoxacor	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
BHT: 2,2-Di-tert-butyl-4-Methylphenol	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Bradford-Lösung	BioRad,
Bromoxynil-octanoate	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
CHAPS	USB, Cleveland, Ohio, USA
Coomassie G250	Merck KgaA, Darmstadt
Diethylpolycarbonat (DEPC)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Dimethylformamid	Merck KgaA, Darmstadt

Dithiothriitol (DTT)	Invitrogen, Lifetechnologies, Groningen, NL
Deoxycholat	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Ethidiumbromid	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Ethylacetat	Merck KgaA, Darmstadt
Ficoll, Type 400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Folin-Reagenz	Merck KgaA, Darmstadt
Glutathion, reduziert	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
HEPES	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Hexadecyltrimethylammoniumbromide (CTAB)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
IPTG	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Milchpulver	Glücksklee (Nestlé), Frankfurt/M.
MOPS	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Nitroblau-Tetrazolium (NBT)	Boehringer, Mannheim
Nonidet-P40	Boehringer, Mannheim
n-Octylglucosid	USB, Cleveland, Ohio, USA
Nukleotide (dATP,dTTP,dCTP,dGTP)	MBI Fermentas
Oligo-dT	Invitrogen, Lifetechnologies, Groningen, NL
pAW109 RNA	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Polyvinylpyrrolidon (PVP-360; MW 360.000)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Polyvinylpyrrolidon K 30	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Ponceau S	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Primisulfuron	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Polyvinylpyrrolidon	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Rinderserumalbumin,BSA (Fraction V)	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Rubidiumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Salmon sperm DNA	Boehringer, Mannheim
Silwet L-77	Lehle Seeds, USA
Spermidine	SERVA, Heidelberg
Sulfosalicylsäure	Merck KgaA, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck KgaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethyl	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Triton X-100	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Tween 20	SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim
Xylencyanol, Indikator	Merck KgaA, Darmstadt

Alle nicht im Detail aufgeführten Chemikalien und Antibiotika wurden *p. A.* bzw. in der höchsten erhältlichen Reinheit verwendet.

2.2.2 Radiochemikalien

γ -[³³ P]-ATP, Redivue	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
α -[³³ P]-dATP, Redivue	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.2.3 Molekularbiologische „Kit“Systeme

DecaLabel™ DNA Labelling Kit	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
PGEM®-T Easy Vector System	Promega GmbH, Mannheim
QIAquick Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

2.2.4 Enzyme

Lysozym (10U/μl)	Merck KgaA, Darmstadt
Rnase-Inhibitor Rnasin (35-50U/μl)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Superscript II (200U/μl)	Invitrogen, Life Technologies
T4 Polynucleotide Kinase (10U/μl)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	Qbiogene, Heidelberg

Alle Enzyme zur Modifikation von Nucleinsäuren wurden gemeinsam mit den zugehörigen Puffern bezogen.

2.3 Materialien

Centricon YM-10	Millipore, Eschborn
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond-N+ (15mmx73mm)(Nylonmembran)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybridisierungsröhrchen (50mmx150mm)	ThermoHybaid, Heidelberg
Imaging Plate BAS-IP 2340	FUJI Photo Film Co., LTD, Japan
MicroSpin Columns (G-25)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
MicroSpin Columns (S-400)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mira cloth-Filter	Calbiochem, LaJolla, USA
MultiScreen PCR®	Millipore, Eschborn
Nitrocellulosemembran (BSA 85)	Schleicher&Schuell, Dassel
Nunclon™ OmniTray	Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden
MicroWell™ Platten (Polystyrol)	Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden
PCR-Reaktionsgefäße (8er-stripes, 96-well)	Biozym, Hess. Oldendorf
Whatman Papier	Schleicher&Schuell, Dassel

2.4 Software und Internetseiten

2.4.1 Verwendete Software

Außer den üblichen Software-Programmen wurden folgende spezielle Anwendungsprogramme verwendet:

Vector-NTI Suite 6.0, Informax
ArrayVision, Interfocus, England
MultiAnalyst, BioRad
EndNote 4, ISI Research Soft

2.4.2 Internetseiten

Die Sequenzsuchen und –analysen wurden an Datenbanken durchgeführt, die über das Internet zugänglich sind:

The TIGR Arabidopsis thaliana Database: <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>

MIPS Arabidopsis Thaliana DataBase: <http://mips.gsf.de/proj/thal/>

Arabidopsis Information Resource (TAIR) Database: <http://www.arabidopsis.org/home.html>

National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.5 Verwendete Organismen

2.5.1 Bakterien

Escherichia coli Stamm MC 1061 (Mass. General Hospital, Boston, USA)

Escherichia coli Stamm DH5 α (Mass. General Hospital, Boston, USA)

Escherichia coli Stamm BL21 (Stratagene, Stratagene, La Jolla, USA)

2.5.2 Pflanzen

Arabidopsis thaliana Columbia R (eigene Inzuchtlinie, basierend auf Columbia-Stamm von G. Redei, Columbia, Missouri, USA)

Insertionslinien für Gen At2g47000 (*AtMDR4*):

7AAB1111(1); 5AEB92(2); 5ABA22(3)

Insertionslinien für Gen At2g26910 (*AtPDR4*):

7AT117(4); 7AS5(5); 7AQ106(6); 4ACA107(7); 4ACA108(8)

2.6 Bakterienvektoren

Plasmid	Selektionsmarker	Herkunft
pGEX-2T	Ampicillin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pMAL-pΔH	Ampicillin	New England Biolabs GmbH; Frankfurt; verändert von A. Schäffner und H. Siebert
pGEM-T Easy	Ampicillin	Promega GmbH, Mannheim
pBluescript	Ampicillin	Stratagene, LaJolla, USA
pUX12	(für DNA-Größenstandard mit <i>MspI</i> restriktionsverdaut)	pUC12 verändert von J. Sheen, Mass. General Hospital, Boston, USA

Die in den PCR-Reaktionen eingesetzten vektorspezifischen Oligonukleotide sind im Anhang (7.3.4) aufgeführt.

2.7 Gängige Lösungen, Puffer und Medien

Coomassie-Färbelösung	0,05% Coomassie G250 5 Volumenanteil Methanol 1 Volumenanteil Eisessig 5 Volumenanteile bidest. Wasser
100x Denhardt-Lösung	2%(w/v) Ficoll (Type 400, Pharmacia) 2%(w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP-360, Sigma) 2%(w/v) BSA (Fraktion V, Sigma) autoklaviert und steril filtriert
DNA-Auftragspuffer	50% Glycerin 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol, Indikator
Entfärbelösung	1 Volumenanteil Eisessig 1 Volumenanteil Methanol 8 Volumennateile bidest. Wasser
Fixierlösung	25 Volumenanteile Isopropanol 65 Volumenanteile bidest. Wasser 10 Volumenanteile Eisessig
Heringssperma-DNA	10mg/ml autoklaviert
0,1M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,8	90,8ml 1M K ₂ HPO ₄ 9,2ml 1M KH ₂ PO ₄ ad 1l bidest. Wasser

5xLaemmli-Puffer	10% (v/v) SDS 30% Glycerin 100mM Tris-HCl pH 6,8 0,25%Bromphenolblau (je nach Anwendung)
1xLaufpuffer	1xTris-/Glycin-Puffer 0,1% SDS
LB-Medium	2,5% (w/v) Miller's Luria Broth Base (Sigma) 60µl 5M NaOH/100ml Medium
LB-Platten	1,25% (w/v) Bacto Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) 2,5% (w/v) Miller's Luria Broth Base (Sigma) 60µl 5M NaOH/100ml Medium
1% LPA (Lineares Polyacrylamid)	20% (w/v) Acrylamid pH 7,5 3mM Natriumacetat 0,4 mM EDTA 2% (v/v) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 2% (v/v) TEMED 1:20 Verdünnung nach 30minütiger Polymerisierung
10xPonceau S-Lösung	2g Ponceau S 30g Trichloressigsäure 30g Sulfosalicylsäure ad 100ml bidest. Wasser
Prähybridisierungslösung	5xSSC 5xDenhardt 0,5% SDS 100µg/ml Heringssperma-DNA
RB-Medium	1% (w/v) Tryptone (Difco Laboratories, Detroit, USA) 0,5% (w/v) Yeast Extract (Difco Laboratories, Detroit, USA) 0,5% (w/v) NaCl 2ml 1N NaOH/l Medium
4xSammelpuffer	0,4% (v/v) SDS 0,5M Tris-HCl pH 6,8
20xSSC	3M NaCl 0,3M Na ₃ citrat x 2H ₂ O pH 7,0
STE-Puffer	25mM Tris-HCl pH 8,0 150mM NaCl 1mM EDTA
1xTAE	40mM Tris-acetate 1mM EDTA
10xTBS	10mM Tris-HCl pH 7,5 150mM NaCl
1xTBST	1xTBS 0,05% (v/v) Tween 20
1xTE	10mM Tris-HCl pH 8,0 1mM EDTA
4xTrennpuffer	0,4% SDS 1,5M Tris-HCl pH 8,8

10xTris-/Glycin-Puffer	30g Tris 144g Glycin ad 1l bidest. Wasser
------------------------	---

Lösungen für spezielle Anwendungen sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt. Alle hier nicht im Detail aufgeführten Puffer und Lösungen sind Standard-Lösungen (Sambrook *et al.*, 1989) (Ausubel *et al.*, 1995).

2.8 Mikrobiologische Methoden

2.8.1 Transformation von *Escherichia coli*

2.8.1.1 Herstellung RbCl-kompetenter Zellen

250ml RB-Medium mit 20mM MgSO₄ wurden mit 1ml einer Vorkultur von *E. coli* (wahlweise Stamm MC1061 oder DH5 α) angeimpft und mit 200 bis 250Upm bei 37°C im Inkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 geschüttelt. Der Kulturansatz wurde für 5min bei 5000Upm und 4°C in der Beckman-Zentrifuge, Rotor GSA, sedimentiert. Das Medium wurde dekantiert und das Bakterien-Sediment in 100ml eiskaltem Puffer TFB I vorsichtig resuspendiert.

TFB I-Puffer:

30mM KOAc
100mM RbCl
10mM CaCl₂ x 2 H₂O
50mM MnCl₂ x 2 H₂O
15% (v/v) Glycerin
pH 5,8 wurde mit Essigsäure eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

Nach einer 5-minütigen Ruhephase auf Eis wurde erneut wie oben zentrifugiert und anschließend das Sediment in 10ml eisgekühltem Puffer TFB II aufgelöst.

TFB II-Puffer:

10mM MOPS, Natrium-Salz
75mM CaCl₂ x 2 H₂O
10mM RbCl
15% (v/v) Glycerin
pH 6,5 wurde mit KOH eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

An eine weitere Inkubation für 45 bis 60min auf Eis schloß sich die Aufteilung des Ansatzes in Portionen von 100 μ l pro Eppendorf-Reaktionsgefäß (vorgekühlt) an. Die kompetenten Zellen wurden augenblicklich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.8.1.2 Transformation von RbCl-kompetenten Zellen

Die kompetenten, bei -70°C gelagerten Zellen wurden für ca. 10min auf Eis aufgetaut und nach vorsichtigem Untermischen der Plasmid-DNA für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem

Hitzeschock für 2min bei 37°C im Wasserbad wurde der Transformationsansatz erneut einige Minuten auf Eis gestellt. Um den Bakterien die Möglichkeit der Erholung zu geben, wurden die Ansätze auf 1ml mit LB-Medium aufgefüllt und im Anschluß für 50 bis 60min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die Bakterien wurden schonend bei 4600xg und RT in der Hettich-Tischzentrifuge sedimentiert und das Medium bis auf etwa 100µl abgenommen. Hierin wurden die Bakterien resuspendiert und das gesamte Volumen auf die jeweiligen selektiven Agarplatten ausgestrichen. Während der Erholungsphase waren die Zellen in der Lage, die auf den Plasmiden kodierten Antibiotikaresistenz vermittelnden Proteine zu exprimieren, so dass sie nun während der Inkubation bei 37°C auf den antibiotikahaltigen Agarplatten wachsen konnten.

2.8.1.3 Test der kompetenten Zellen

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden je 140µl der RbCl-kompetenten Zellen mit 0,1, 1, 10 oder 100pg/5µl mit pBluescript-Vektor transformiert. Nach der Inkubation auf antibiotikahaltigen Agarplatten über Nacht bei 37°C wurden die Zellen der unterschiedlichen Verdünnungen ausgezählt. Die Zellen wurden verwendet, wenn die Effizienz größer als $3 \cdot 5 \times 10^6$ Zellen/µg Vektor war.

2.9 Pflanzenanzucht

Die Aussaat aller Pflanzensamen erfolgte auf tonhaltiger Anzuchterde (Floraton1, Floragard®) (Floraton:Grobsand (Kiesgrube Moosach) wurde 4:1 gemischt und gesiebt (1cm²)), die in Töpfe oder Schalen mit Löchern an der Unterseite gefüllt wurde. Die mit Erde gefüllten Behältnisse wurden in große mit Wasser gefüllte Schalen gestellt, so dass sich die Erde von unten mit Wasser vollsaugen konnte. Das nicht aufgesogene Wasser wurde wieder entfernt und die Samen gleichmäßig oder vereinzelt darauf verteilt und mit einer Sprühflasche nochmals von oben angefeuchtet. Zur Stratifizierung der Samen wurde eine Klarsichtfolie über die Schalen oder Töpfe gezogen und so für ca. 48h bei 4°C stehen gelassen. Auch nachdem die Töpfe in den Anzuchtraum umgestellt wurden, blieb die Klarsichtfolie bis zur Keimung der Pflanzen auf den Töpfen. Die Pflanzen wuchsen dann unter ausreichender Wässerung bei einem 16h Lichttag mit ca. 200µE, 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% bis zum gewünschten Alter heran.

2.10 Methoden zur Nukleinsäurechemie

2.10.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *QIAprep Miniprep* Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Der Bakterienaufschluss erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Durch Bindung der dabei freigesetzten Plasmid-DNA an das Säulenmaterial wird eine Abtrennung der rekombinanten Plasmide von der chromosomalen Bakterien-DNA erreicht. Die Präparation erfolgte nach den Herstellerangaben.

Das aufzuarbeitende Bakteriensediment wurde hergestellt, indem 5ml LB-Medium mit dem Antibiotikum versetzt (Ampicillin 100µg/ml) wurde und mit einer einzelnen, rekombinanten Bakterienkolonie beimpft wurde. Die Kultur wurde über Nacht bei 200Upm und 37°C inkubiert. Für eine Glycerin-Stammkultur wurden 400µl der trüben Kultur abgenommen und mit 200µl 80% Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren. 2x2ml der Kultur wurden in dem selben Gefäß bei 14.000Upm (Hettich Tischzentrifuge) für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet weiter aufgearbeitet. Um die DNA zu eluieren, wurde die Säule mit 50µl des im Kit enthaltenen EB-Puffers versetzt und 60sec zentrifugiert. Die DNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.10.11).

2.10.2 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten wurde mit Hilfe des „*QIAquick PCR purification Kits*“ der Firma Qiagen durchgeführt. Die Reinigung der DNA erfolgt dabei durch die Bindung an das Säulenmaterial in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und einem pH-Wert <7,5, während die Kontaminationen die Säule passieren. Die Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte, die mit 50µl EB-Puffer eluiert wurden, erfolgte gelelektrophoretisch durch Vergleich mit einem Marker (siehe 2.10.5).

2.10.3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsansatz wurde so eingestellt, dass das Volumen der eingesetzten Enzymlösung 1/10 des Gesamtansatzes nicht überschreitet, um eine Inhibition durch das im Lagerpuffer der Enzyme befindliche Glycerin zu vermeiden. Pro 1µg zu spaltender DNA wurden 3 bis 5U Enzym eingesetzt und die Reaktion in dem spezifischen Reaktionspuffer bei der optimalen Reaktionstemperatur für das Enzym durchgeführt. Als Reaktionszeit wurden für die hier verwendeten Enzyme eine bis wenige Stunden (Plasmide), bis über Nacht (genomische DNA) für die Spaltung zugelassen.

2.10.4 Ligation

Bei einer Standard- Ligation wurde ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:15 eingesetzt. Die in 10µl Gesamtvolumen über Nacht bei RT durchgeführte Ligation enthielt außer den beiden DNA-Fragmenten :

- 1µl 100mM DTT
- 1µl Ligase Puffer (MBI)
- 0,1µl T4-Ligase 5U (MBI).

2.10.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die größenabhängige Separation von Makromolekülen durch Gelelektrophorese basiert auf dem elektrokinetischen Phänomen, dass ein geladener Partikel durch elektrostatische Kräfte in Bewegung gesetzt wird. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente

umgekehrt proportional dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Zusätzlich hängt das Wanderungsverhalten von der Dichte der Gelmatrix ab, weswegen die Agarosekonzentration (SEA KEM® LE Agarose, FMC Biochemicals, Maine, USA) an die Fragmentgröße des aufzutrennenden DNA-Fragmentes angepasst wurde und zwischen 1% und 2% (w/v) variierte. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Zum Erstarren wurde die Agaroselösung bei einer ungefähren Temperatur von 60°C in einen mit Kämmen versehenen Gelträger gegossen. Die Proben wurden jeweils mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1xTAE-Puffer, der mit dem fluoreszierenden polycyclischen Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) versetzt wurde. Dieser Farbstoff interkaliert zwischen den gestapelten Basenpaaren der Nukleinsäuren, daher können die Banden im Agarosegel durch Anregung mit UV-Licht (320nm) sichtbar gemacht werden. Zur Größenbestimmung der DNA-Banden wurde als Referenz ein DNA-Größenstandard mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Feldstärke von 5-10V/cm.

Als DNA-Größenstandards dienten:

Lambda-DNA/Eco91I(BstEII)		pUX12/MspI	
Basenpaare (bp)	ng/5µl	Basenpaare (bp)	ng/5µl
14152		501/489	188,6
8465	85	404	77
7242	72	328	62,5
6369	64	242	46,1
5678	57	190	36,2
4822	48	147	28
4324	43	110	21
3675	37	87	16,6
2323	23	67	12,8
1929	19	34	6,5
1371	14	26	5
1264	13		
702	7		
200	2		

Um die aufgetragene DNA-Menge abschätzen zu können, wurden jeweils 5µl des Größenstandards aufgetragen.

2.10.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) dient generell der selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz. Das Verfahren beruht auf der Fähigkeit bestimmter hitzestabiler DNA-Polymerasen *in vitro*, in mehreren aufeinander folgenden Zyklen von Denaturierung der DNA zum Einzelstrang, Hybridisierung strangspezifischer Oligonukleotide und deren Verlängerung, neue zur DNA-Matrize komplementäre DNA-Stränge zu synthetisieren (Mullis *et al.*, 1986). Die geeigneten DNA-Polymerasen benötigen für die DNA-Synthese jeweils spezifische Oligonukleotide (Primer), die sich antiparallel an den Randbereich der zu amplifizierenden Sequenzen durch komplementäre Basenpaarung anlagern können (Annealing). Von dort startet die Verlängerung der Oligonukleotide (Extension) die den DNA-Einzelstrang zum Doppelstrang auffüllt. Nach der Denaturierung des synthetisierten Doppelstranges wird durch Absenken der Temperatur eine erneute spezifische Hybridisierung der Primer ermöglicht. In den folgenden Zyklen (Annealing, Extension und Denaturierung) dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge und ihre komplementären Sequenzen als Matrizen für die weitere DNA-Synthese. Voraussetzung für eine erfolgreiche DNA-Amplifikation ist ein Primer-Paar, das sich antiparallel an Sinn- und Gegensinnstrang anlagern kann, da die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerasen stets nur von 5'- in 3'-Richtung katalysiert wird.

Mittels PCR wurden während dieser Dissertation gewünschte Gensequenzen aus genomischer DNA oder Plasmid-DNA amplifiziert, durch PCR-Mutagenese Mutationen in Gensequenzen inseriert und mittels semi-quantitativer RT-PCR Expressionsanalysen ausgewählter Gene durchgeführt.

Oligonukleotidsequenzen wurden mit den Computerprogrammen „Hyper-PCR“ von B. Osborn (Albany, CA, USA) und „osp“ von Hillier und Green (1991) bzw. mit dem DNA-Verarbeitungsprogramm „Vector NTI“ ermittelt. Die Programme erlaubten die exakte Berechnung der für jede PCR-Reaktion optimalen Anlagerungstemperatur. Die DNA-Synthese erfolgte standardmäßig bei 72°C, die Denaturierungen wurden durchgängig bei 94°C durchgeführt.

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte in der GSF an dem Institut für BIO-DV oder bei der Firma MWG. Alle Sequenzen der in den PCR-Reaktionen eingesetzten Oligonukleotide sind im Anhang (7.3) und in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Ein 20µl Standard-PCR-Ansatz enthielt stets 0,15µl *Taq*-DNA-Polymerase (5U/µl; Appligene), 2µl des 10x *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer, 0,2µl 20mM dNTP (Endkonzentration 200µM) und jeweils 1µl des forward bzw. reverse Primers mit einer Ausgangskonzentration von 10µM. Von der DNA-Matrize in geeigneter Konzentration wurde 1µl eingesetzt. Die Differenz zum gewünschten Endvolumen wurde mit sterilem bidest. Wasser ausgeglichen. Bei einer Bakterienkolonie-PCR wurde als Template von einer einzelnen Kolonie Material mittels Impföse in den PCR-Ansatz übertragen und der Reaktionsansatz auf ein Endvolumen von 19µl aufgefüllt. Die Verdunstung der Flüssigkeit wurde durch die stets auf 95°C eingestellte Deckelheizung des PCR-Gerätes (Multicycler PTC 200) verhindert. Bei Ansätzen für die semi-quantitative PCR (siehe 2.12) wurde die Verdunstung von Flüssigkeit durch Überschichten mit 25µl Paraffinöl (Pristan, Sigma) verhindert.

2.10.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus 1% Agarosegelen, die zum Sequenzieren verschickt wurden (siehe 2.10.8), erfolgte unter Anwendung des „*Qiaquick Gel-Extraction Kit*“. Dabei wurde strikt an die Vorschrift des Herstellers gehalten, die dem beigegeführten Handbuch entnommen werden kann. Eluiert wurde stets mit 50µl EB-Puffer.

2.10.8 Sequenzierungen

Alle erforderlichen Sequenzierungen wurden von den Firmen TopLab oder MediGenomix, beide Martinsried, durchgeführt.

2.10.9 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzengewebe

2.10.9.1 DNA-Minipräparation

Die DNA-Minipräparation wurde eingesetzt, um transgene Pflanzen hinsichtlich ihrer Insertion mittels PCR zu überprüfen (siehe 2.14). Sie stellt eine schnelle und einfache Präparation der DNA da, die in hohem Durchsatz durchgeführt werden kann.

Von den zu untersuchenden Pflanzen wurde jeweils ein Blatt abgeschnitten und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zur Aufarbeitung wurde das Pflanzenmaterial mit einer zugeschmolzenen Pipettenspitze zerkleinert und anschließend mit 200µl CTAB-Puffer vermischt, der zuvor mit 2% 2-Mercaptoethanol versetzt und auf 65°C erwärmt worden war.

2xCTAB-Puffer:

100mM Tris pH 8
2% CTAB
1,4M NaCl
1% PVP 40
20mM EDTA

Die Präparationen wurden zwischen 5min und 1h bei 65°C inkubiert. Eine Abtrennung der hydrophoben Substanzen erfolgte über eine Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (Mischungsverhältnis 24:1). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1µl 0,5% LPA und 2,5 Volumen Ethanol (100%) 20min bei -20°C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 15min bei 15.000Upm in einer Hettich Tischzentrifuge wurde die sedimentierte DNA einmal mit 75% Ethanol gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 50µl $\frac{1}{4}$ TE-Puffer aufgenommen, mit 20µg/ml RNase 30min bei 37°C inkubiert und schließlich bei -20°C aufbewahrt.

2.10.9.2 Isolierung genomischer DNA

Im Gegensatz zur DNA-Minipräparation ermöglicht diese Art der Isolierung eine effektivere Abtrennung von Polysacchariden und phenolischen Verbindungen, die bei einem anschließenden Restriktionsverdau den vollständigen Abbau verhindern können.

Für eine DNA-Extraktion wurde jeweils 1g in flüssigem Stickstoff gemörserteres Pflanzenmaterial eingesetzt und mit 5ml 2xCTAB-Puffer (siehe 2.10.9.1), der ebenfalls direkt vor Gebrauch mit 2% 2-Mercaptoethanol versetzt worden war, für 20min bei 74°C inkubiert. Es folgten 2 Extraktionen mit einem Chloroform-Isoamylalkoholgemisch (Verhältnis 24:1) und eine Fällung des zweiten wässrigen Überstands für 30min bei RT mit 1 Volumenanteil Isopropanol. Die in der Hettich Tischzentrifuge sedimentierte DNA wurde getrocknet und in $\frac{1}{4}$ TE-Puffer mit 1M NaCl und 20 μ g/ μ l RNase A bei 37°C inkubiert, bis sich die DNA vollständig gelöst hat.

Als weitere Aufreinigung der DNA erfolgte eine *Qiagen Plasmid MiniKit* Aufarbeitung. Dazu wurde die gelöste DNA mit 425 μ l bidest. Wasser und 825 μ l QBT-Puffer gemischt. Die in dem Kit-System enthaltenen tip20-Säulchen wurden mit 1ml QBT-Puffer äquilibriert und anschließend die verdünnte DNA-Lösung über das Säulchen gegeben. Mit 3x1ml QC wurde die an das Säulenmaterial gebundene DNA gewaschen und mit 1x1ml QBT-Puffer (50°C) eluiert. Das Eluat wurde nochmals mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt, die DNA mit 75% Ethanol gewaschen und schließlich in 20 μ l EB-Puffer aufgenommen.

Für eine Qualitätskontrolle wurden 2 μ l der genomischen DNA auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und photometrisch vermessen (siehe 2.10.11).

2.10.10 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe

Die verwendete Methode Gesamt-RNA aus dem Pflanzenmaterial wurde zu isolieren erwies sich als besonders effektiv, um die für Folgereaktionen störenden Polysaccharide und phenolischen Verbindungen zu entfernen (Chang *et al.*, 1993). Das geerntete und in 0,5g Portionen bei -70°C eingefrorene Pflanzenmaterial wurde im Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerrieben. Der RNA-Extraktionspuffer wurde zuvor auf 65°C erwärmt.

RNA-Extraktionspuffer:

- 2% Polyvinylpyrrolidone (K30)
- 100mM Tris-HCl pH 8,0
- 25mM EDTA
- 2M NaCl
- 0,5g Spermidin

Diese Lösung wurde autoklaviert und aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch wurden 2% 2-Mercaptoethanol zugegeben. 2,5ml dieses Puffers wurden zu 0,5g gemörserterem Pflanzenmaterial gegeben, kräftig gemischt und ca. 5-10min bei 65°C inkubiert. Es folgten zwei Extraktionen mit je einem Volumen eines Chloroform-Isoamylalkoholgemisches mit einem Mischungsverhältnis von 24:1. Zu dem Überstand wurden $\frac{1}{4}$ Volumen 10M Lithiumchlorid-Lösung gegeben und die RNA über Nacht bei 4°C gefällt. Das Pellet wurde in 500 μ l SSTE-Puffer (1M NaCl, 0,5% SDS, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0) gelöst und eine dritte Chloroform-Isoamylalkoholextraktion durchgeführt. Zu dem Überstand wurden 2 Volumenanteile absoluten Ethanol zugegeben und die RNA erneut 20min bei -70°C präzipitiert. Die RNA wurde anschließend in der Tischzentrifuge sedimentiert, mit 75% Ethanol gewaschen, dann getrocknet und schließlich in 50 μ l DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Qualität und Konzentration wurden wie unter 2.10.11 beschrieben bestimmt.

2.10.11 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration und Reinheit von DNA oder RNA wurde nach der Isolierung photometrisch bestimmt und zur Abschätzung der Qualität in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Bestimmung der Absorption im Spektralphotometer erfolgte gewöhnlich in einer 1:200 Verdünnung zwischen 220 und 360nm. Die Absorptionswerte für 230, 260 und 280nm wurden verwendet, um durch Berechnung der Quotienten zusätzlich die Reinheit abzuschätzen. Während bei 230nm phenolische Verunreinigungen, Salze und Kohlenhydrate absorbieren, erfolgt bei ca. 280nm eine Absorption der Proteine. Aus den jeweiligen Quotienten lassen sich Aussagen zur Reinheit der Nukleinsäuren treffen (Ausubel *et al.* 1995).

Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand des Absorptionswertes bei 260nm auf der Grundlage, dass die OD_{260} 1 beträgt, wenn RNA in einer Konzentration von 40µg/ml und DNA in einer Konzentration von 50µg/ml vorliegt.

2.10.12 Fällung von DNA oder RNA

Um für anschließende Reaktionen eine ausreichende Ausgangskonzentration von RNA oder DNA zu erhalten, wurden die Nukleinsäuren falls notwendig gefällt. Dazu wurde die entsprechende Menge der Nukleinsäurelösung mit bidest. Wasser auf 100µl aufgefüllt und mit 10µl 3M Natriumacetat pH 5,2 (steril filtriert) die für die Fällung nötige Salzkonzentration eingestellt. Mit einem 2,5-fachen Volumen an Ethanol (100%) wurden die Nukleinsäuren 20min bei -70°C gefällt. Nach einer 15minütigen Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Die gefällten Nukleinsäuren wurden unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in einem entsprechenden Volumen bidest. Wasser oder EB-Puffer aufgenommen. Die RNA wurde stets in DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

2.11 Macroarray-Analyse

Die Macroarray-Analyse, die eine reverse Northern-Analyse darstellt, ermöglicht die parallele Analyse zahlreicher Gene auf Transkriptionsebene in einem einzigen Versuch. Die eingesetzten genspezifischen Sonden wurden mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und auf Membranen fixiert. Durch die Hybridisierung mit einer komplexen Sonde, die mittels reverser Transkription von mRNA aus bestimmtem Pflanzenmaterial bei der Umschreibung in cDNA radioaktiv markiert wurde, und der anschließenden Messung der radioaktiven Signale nach der Hybridisierung, können Aussagen über die relativen Transkriptaktivitäten der ausgewählten Gene gemacht werden.

2.11.1 Pflanzenmaterial für die organspezifische Expressionsanalyse

Pflanzenmaterial, das für die organspezifische Expressionsanalyse wurde hydroponisch angezogen (Gibeaut *et al.*, 1997). Verändert wurde nur, dass die 15l Behälter zusätzlich 0,5g/l MES enthielten und der pH-Wert mit Phosphorsäure auf 5,4 gesenkt wurde. Die Anzucht erfolgte wie unter den in Abschnitt 2.9 beschriebenen Bedingungen.

Blatt- und Wurzelmaterial wurde nach 3 Wochen geerntet, Blütenstände und Stängel nach 5 Wochen und die Schoten nach 6 Wochen.

Die Anzucht, die Aufarbeitung des Materials und die Hybridisierungen wurden von Matthias Affenzeller durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie unter 2.11.7 beschrieben.

2.11.2 Pflanzenbehandlung mit Herbiziden bzw. Safenern

Arabidopsis thaliana wurde mit drei verschiedenen Xenobiotika behandelt. Dabei handelte es sich um die zwei Herbizide Primisulfuron und Bromoxynil, sowie um die Substanz Benoxacor, die in monokotylen Pflanzen als Safener wirkt.

Von den Xenobiotika wurden zunächst Stammlösungen angesetzt, die bei 4°C aufbewahrt werden konnten. Von Primisulfuron wurde eine 100mM Lösung in Aceton angesetzt, von Bromoxynil eine 400mM Lösung in Acetonitril und von Benoxacor wurde eine 1M Stammlösung ebenfalls in Acetonitril hergestellt. Alle drei Stammlösungen wurden am Tag der Pflanzenbehandlung 1:1000 in 0,05%(w/v) Silwet-Lösung verdünnt, wobei während der Zugabe der Stammlösung die Behandlung mit einem Ultraschallstab eine möglichst große Feinverteilung in dem Detergenz ermöglichte. Als Kontrolllösungen dienten jeweils die Verdünnungen der Lösemittel in 0,05%(w/v) Silwet-Lösung.

Die zu behandelnden Pflanzen wurden in Ecktöpfen mit einer Aussaatfläche von 5x5cm² angezogen und nach der Keimung auf ca. 10 Pflanzen reduziert, die möglichst gleichmäßig über die Fläche verteilt waren. Die Behandlung der Pflanzen erfolgte am 21. Tag nach der Aussaat, also zum Zeitpunkt der abgeschlossenen Blattexpansion und vor der Sprossentwicklung. Eine möglichst große Feinverteilung der Lösung auf den Blättern wurde dadurch erzielt, dass 4ml der Lösungen mit einer gasgetriebenen Sprühhvorrichtung über die Töpfe verteilt wurde. Die Wanne, in der die Pflanzen behandelt wurde, hatte eine Fläche von 2500cm², so dass die applizierten Mengen für Primisulfuron 0,75mg/m², für Bromoxynil 1,9mg/m² und für Benoxacor 4,2mg/m² betragen. Die Behandlung mit den Kontroll- und Xenobiotika-Lösungen erfolgte jeweils zwei Stunden nachdem das Licht in dem Pflanzenanzuchtsraum anging. Nach der Behandlung wurden die Töpfe wieder in den Pflanzenanzuchtsraum zurückgestellt.

Bei Primisulfuron erfolgte die Ernte der Blätter, sowohl von den Kontrollen als auch von den behandelten Pflanzen nach 24h und nach 36h (je 2x 0,5g). Die mit Bromoxynil und Benoxacor behandelten Pflanzen wurden lediglich nach 24h geerntet. Alle Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, allerdings konnte von den Primisulfuron-behandelten Pflanzen nach 36h nur 2x geerntet werden. Das Blattmaterial wurde bis zur RNA-Isolierung (siehe 2.10.10) bzw. bis zur Präparation von mikrosomaler Fraktion (siehe 2.13.1) bei -70°C aufbewahrt.

Um die Entwicklung der sichtbaren Schäden zu kontrollieren, die sich erst nach dem Erntezeitpunkt einstellten, wurden jeweils 2-3 Töpfe je Behandlung nicht geerntet und weiter im Anzuchtraum stehen gelassen. Das geerntete Blattmaterial von den mit Primisulfuron und Bromoxynil behandelten Pflanzen wurde nur dann verwendet, wenn die Ausbildung der sichtbaren Schäden auch eindeutig war. Bei Benoxacor kam es zu keiner Schadentwicklung, daher wurde hier in jedem Fall das Blattmaterial verwendet.

2.11.3 Herstellung der spezifischen Sonden

2.11.3.1 Subklonierung der spezifischen Sonden

Die zu untersuchenden Gene wurden mittels Datenbankrecherche (TAIR oder MIPS) ausgewählt und die genomischen Sequenzen der 3'-untranslatierten Bereiche in einer Länge zwischen 170 und 400bp so ausgewählt, dass bei einem Datenbankenvergleich dieser Sequenz möglichst keine weiteren Sequenzen gefunden wurden, die mehr als 70% Identität über einen Bereich von 70bp aufwiesen. Dies konnte für die meisten der ausgewählten Gene gewährleistet werden. Gene, für die dieses Kriterium nicht zutraf werden im Ergebnisteil gesondert markiert (Anhang 7.1). Die ausgewählten Bereiche wurden mittels PCR amplifiziert. Die Länge der PCR-Produkte wurde anhand eines Aliquots im Agarosegel kontrolliert und der verbleibende PCR-Ansatz mit dem „Qiagen PCR purification Kit“ (siehe 2.10.2) aufgereinigt. Die Subklonierung des DNA-Fragmentes erfolgte mit dem Ligationskit „pGEM® -T EASY“ von Promega. Der in dem Kit enthaltene Vektor enthält an beiden 3'-Enden einen Thymidin-Überhang, der eine Religation des Vektors verhindert und eine Anlagerung des Adenosin-Überhangs, der von den thermostabilen Polymerasen stets an die 3'-Enden der PCR-Fragmente angehängt wird, ermöglicht. Diese Überhänge sichern eine effiziente Ligation. Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Transformation wurden die Klone auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen, die vorher mit jeweils 20µl X-GAL (50mg/ml) und 100µl IPTG (100mM) vorbehandelt wurden und so eine Blau-Weiß-Selektion möglich war. Nach der Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurden die weißen Klone in einer PCR überprüft (2.10.6). Von den positiven Klonen wurde eine Glycerin-Stammkultur angelegt, indem 400µl der parallel angezogenen Bakterienkultur in LB-Medium mit Ampicillin mit 200µl 80% Glycerin vermischt wurden und bei -70°C gelagert wurden.

2.11.3.2 Erste Runde PCR

Von den Glycerin-Stammkulturen wurde die erste PCR-Runde im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Dazu wurde ein ausreichend großer Ansatz an PCR-Mastermixes hergestellt.

Der PCR-Mastermix bestand aus:

- 220µl 10x Enzym-Puffer (Appligene)
- 22µl dNTPs (je 20mM)
- 5,5µl M13(22)-f (200µM)
- 5,5µl M13(25)-r (200µM)
- 11µl Taq-Polymerase (5U/µl, Appligene)
- 1936µl bidest. Wasser

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 20µl des Mixes verteilt und mit einer Impfspitze die Klone aus den Glycerin-Stammkulturen übertragen. Anschließend wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

95°C	5min 30sek	
95°C	1min	}
55°C	45sek	
72°C	2min	}
72°C	7min	

Zum Überprüfen der PCR-Produkte wurden jeweils 5µl des Reaktionsansatzes auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Die restlichen 15µl wurden 1:10 verdünnt und 5µl dieser Verdünnung in die zweite Runde PCR eingesetzt.

2.11.3.3 Zweite Runde PCR

Die zweite Runde PCR wurde mit Oligonukleotiden durchgeführt, die im Bereich der Vektorsequenz in Richtung der einklonierten spezifischen Sonde eingerückt waren (nested PCR). Auch diese PCR wurde im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Der PCR-Mix setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 1ml 10xTaq-Puffer(Hybaid oder Appligene)
- 100µl dNTPs (je 20mM)
- 25µl T7 (200µM)
- 25µl Sp6 (200µM)
- 500µl Taq-Polymerase (5U/µl, Appligene)
- 7850µl bidest Wasser

Von den 1:10 verdünnten PCR-Produkten aus der ersten Runde wurden 5µl vorgelegt und mit 95µl des Mixes auf 100µl aufgefüllt. Anschließend wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

95°C	5min 30sek	
95°C	1min	}
50°C	45sek	
72°C	2min 30sek	}
72°C	7min	

Die zweite Runde wurde im doppelten Ansatz durchgeführt, so dass insgesamt pro Probe 200µl PCR-Produkt zur Verfügung stand.

2.11.3.4 Reinigung und Konzentration der PCR-Produkte

Um eine möglichst hohe Dichte an spezifischen Sonden auf der Membran zu erreichen, wurden die PCR-Produkte auf ein geringeres Volumen eingeengt. Da die Qualität der ausgewerteten Signale stark von der Reinigungsmethode und von dem verwendeten Taq-Polymerase-Puffer abhängig war, wurden mehrere Methoden für die Konzentrierung der Proben und ihrer Aufreinigung getestet.

Eine Methode war, die PCR-Produkte entweder unter Vakuum oder unter der Sterilbank zu trocknen und in 60µl bidest. Wasser aufzunehmen. Als zweites wurden die PCR-Produkte mit dem „*Qiaquick PCR Purification Kit*“ aufgereinigt und mit 60µl EB-Puffer von den Säulen eluiert. Für die dritte und vierte Testmethode wurden die PCR-Produkte über eine Multiscreen PCR[®]-Platte (Millipore) gereinigt und dabei aufkonzentriert. Dazu wurde die gesamte Lösung in die Vertiefungen der Platte pipettiert und mit einer Vakuumvorrichtung die Flüssigkeit mit Salzen abgesaugt. Die auf der Membran verbliebene DNA wurde entweder mit 60µl Array-Link-Puffer von GeneScan (Freiburg) oder mit 60µl bidest. Wasser resuspendiert. In allen Fällen wurden die Lösungen in MicroWell[™]Platten (NUNC) überführt und 5µl auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Die restlichen 55µl wurden bis zur Herstellung der Macroarray-Filter bei -20°C aufbewahrt.

Als Standardmethode wurde die 2. Runde der PCR mit Hybaid-Puffer durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte über die Multiscreen PCR[®]-Platte (Millipore), wobei die Resuspendierung mit bidest. Wasser erfolgte (3.1.2.2).

2.11.4 Herstellung der Macroarray-Filter

2.11.4.1 Übertragung der PCR-Produkte

Die Übertragung der PCR-Produkte aus den MicroWell[™]Platten auf die Membranen erfolgte mit dem MicroGrid II (BioRobotics), der mit einem 96er Stempel versehen wurde, dessen Nadeln einen Durchmesser von 400µm aufwiesen. So konnten bei jedem Transfer ca. 15nl DNA-Lösung auf die trockenen Membranen übertragen werden. Die Membranen wurden mit doppelseitigem Klebeband in Nunclon[™]Omnitrays fixiert, damit die Membranen möglichst eben in dem Plastikträger lagen. Je Membran wurden vier Platten mit je 96 verschiedenen PCR-Produkten übertragen, wobei jedes PCR-Produkt an zwei verschiedenen Stellen je zehnmal auf den selben Punkt transferiert wurde. Dadurch ergab sich zum einen ein 12x8-Muster, entsprechend der Mikrotiterplatte aus der die PCR-Produkte stammten (Level 1) und zum anderen ein 3x3-Muster (Level 2), indem die PCR-Produkte derselben Position aus den vier Platten je zweimal aufgetragen wurden und in der Mitte eine freie Stelle blieb, die jeweils für das entsprechende Quadrat zur Verrechnung des lokalen Hintergrunds verwendet wurde.

Nach der Übertragung der PCR-Produkte wurde die DNA mit UV-Licht auf der Membran fixiert (Automatisches Programm im UV-Stratalinker[®], Stratagene).

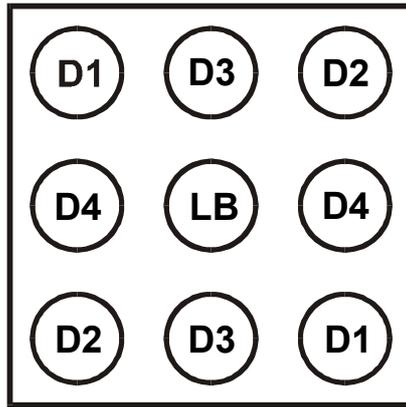


Abbildung 2.1: Level 2 (Subgrid) des Auftragungsmusters der PCR-Produkte auf die Membranen. D1-D4 entsprechen den Bezeichnungen der Mikrotiterplatten, aus denen die PCR-Produkte auf die Membranen übertragen wurden. Die mittlere Position dient zur Verrechnung des jeweiligen lokalen Hintergrunds (LB: local background).

2.11.4.2 Denaturierung der DNA

Die doppelsträngigen membranfixierten PCR-Produkte wurden mittels Natriumhydroxid denaturiert. Dazu wurden drei Whatman-Filter mit je einer Lösung getränkt:

- 1.Lösung: 1,5M NaCl
0,5M NaOH
- 2.Lösung: 1,5M NaCl
0,5M Tris pH 7,5
- 3.Lösung: 2xSSC

Die Membranen wurden nacheinander auf den drei Whatman-Filtern für 5min inkubiert und anschließend nochmals in 2xSSC bis zur Neutralisation gewaschen.

2.11.4.3 Entfernen nicht fixierter PCR-Produkte

Da nach der ersten Behandlung der Membranen der Verlust an aufgebrachtten PCR-Produkten signifikant groß ist (Hauser *et al.*, 1998), wurden diese vor der ersten Hybridisierung entfernt. Die Membranen wurden vor der Referenzhybridisierung 2x30min in 0,4M NaOH bei RT inkubiert und anschließend in 2xSSC bis zur Neutralisation gewaschen. Anschließend wurden die Membranen entweder direkt in die Referenzhybridisierung eingesetzt oder getrocknet und bei RT gelagert.

2.11.5 Referenzhybridisierung

Zur Qualitätskontrolle und für die Quantifizierung der fixierten DNA auf den einzelnen Punkten wurden die Filter zunächst mit einem radioaktiv markierten Referenz-Oligonukleotid hybridisiert.

Die Prähybridisierung von 4 Filtern erfolgte in einem Volumen von 20ml Prähybridisierungslösung für ca. 2-4h, wobei die Schale in einem Wasserbad bei 38°C bewegt wurde. Die radioaktive Markierung des Oligonukleotids T7, dessen Sequenz in allen auf die Membran aufgetragenen PCR-Produkten enthalten ist, erfolgte durch die T4-Polynukleotid-Kinase, die das mit ³³P markierte γ -Phosphat des Adenosintriphosphats in einem Gesamtvolumen von 25 μ l an das 5'-Ende des Oligonukleotids einbaute:

5 μ l T7-Oligonukleotid (10 μ M)
2,5 μ l 10xPolynukleotid-Kinase Puffer A
4 μ l γ -[³³P]-ATP
2 μ l Polynukleotid-Kinase (10U/ μ l)
11,5 μ l ddH₂O

Diese Lösung wurde 30min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Wasser auf 50 μ l aufgefüllt. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden mit MicroSpin Columns (G-25) von Pharmacia nach den Angaben des Herstellers abgetrennt. Von dem Zentrifugat wurde 1 μ l im Szintillationszähler gemessen. Dabei ergab sich nach erfolgreicher Markierung eine Gesamtaktivität des Zentrifugats von 10-15 Mio cpm. Das restliche Zentrifugat wurde zu den 40ml Prähybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid erfolgte ca. 20h über Nacht bei 38°C.

Anschließend wurden die Filter wie folgt gewaschen:

- a) 1x kurz in 2xSSC/0,1%SDS bei RT
- b) 1x 20min in 2xSSC/0,1%SDS bei RT
- c) 1x kurz in 0,2xSSC/0,1%SDS bei RT
- d) 1x 20min in 0,2xSSC/0,1%SDS bei RT
- e) 1x 20min in 0,2xSSC/0,1%SDS bei 38°C

Die Filter wurden anschließend in Folie eingeschweißt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen zwischen Filter und Folie zurückblieben, da dies zu unscharfen Signalen bei der späteren Auswertung führte. Außerdem durften die Membranen dabei nicht trocken werden, da dies ein späteres Entfernen der Oligonukleotide verhinderte. Die eingeschweißten Filter wurden für ca. 15-20h über Nacht auf den Imaging Platten (Fuji) exponiert und am folgenden Tag die gespeicherten Signale auf den Platten mit dem FLA-3000 (Fuji) eingelesen.

Die weitere Auswertung erfolgte wie unter 2.11.7 beschrieben. Um die radioaktiv markierten Oligonukleotide von der Membran zu entfernen wurden diese 2x30min in 0,4M NaOH bei RT bewegt und anschließend mit 2xSSC neutral gewaschen. Um sicher zu stellen, dass die radioaktive Markierung vollständig entfernt wurde, wurden die Membranen erneut in Folie eingeschweißt, über Nacht auf Image-Platten exponiert und die Signale am folgenden Tag gemessen. Die Membranen wurden nur dann für die komplexe Hybridisierung eingesetzt, wenn die Signale nicht mehr detektierbar waren. Diese wurden dann entweder direkt in die komplexe Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet und bei RT aufbewahrt.

2.11.6 Komplexe Hybridisierung der Macroarray-Filter

Für die komplexe Hybridisierung wird die in der Gesamt-RNA enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben, wobei während des Umschreibens radioaktiv markierte Adenosintriphosphate (α -[³³P]-dATP) eingebaut werden. Die so markierte cDNA wird in der Hybridisierung

eingesetzt. Je mehr Vertreter der einzelnen cDNA-Spezies in der cDNA-Mischung enthalten sind, desto stärker wird das detektierbare radioaktive Signal.

Vor der Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA wurden die Filter erneut prähybridisiert. Die Filter wurden einzeln in Hybridisierungsröhrchen gelegt und mit 3ml Prähybridisierungslösung 2 – 4h bei 65°C im Drehofen inkubiert.

Von der aus dem Pflanzenmaterial isolierten Gesamt-RNA (siehe 2.10.10) wurden 30µg in die Reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt. Damit das Volumen von 10µl nicht überschritten wurde, wurde die RNA vor der Reaktion unter Vakuum getrocknet und in 10,5µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde direkt vor der Reaktion 0,5µl der RNA-Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen. Zum Teil wurden die Reaktionen mit unterschiedlichen Volumina synthetischer RNA (pAW 109, Applied Biosystems) versetzt. Da diese Lösung Tris, EDTA und NaCl enthält, wurden diese RNA-Gemische nach Zugabe von Natriumacetat mit Ethanol gefällt (siehe 2.10.12), in 10,5µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und ein 0,5µl Aliquot zur Qualitätskontrolle in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die restliche RNA-Lösung (10µl) wurde zusammen mit 0,5µg oligo dT (Invitrogen) für 10min bei 70°C inkubiert und anschließend 2-3min auf Eis gekühlt. Die nun an die mRNA gebundenen Oligonukleotide wurden in der anschließenden Reaktion in 5'-Richtung verlängert und die radioaktiv markierten Adenosinriphosphate eingebaut. Folgende Lösungen wurden zu der bisherigen Lösung gegeben:

- 1µl 7,5mM dNTP (ohne ATP)
- 6µl 5xfirst strand buffer (Invitrogen)
- 3µl 0,1M DTT (Invitrogen)
- 1µl RNase-Inhibitor RNasin (MBI Fermentas)
- 1µl 32µM dATP
- 7µl α -[³³P]-dATP (=70µCi)
- 1,5µl Superscript II (200U/µl, Invitrogen)

Diese Lösung wurde 2h bei 42°C inkubiert. Um das Hybrid aus RNA und DNA zu trennen, wurde die Lösung alkalisiert. Dazu wurden:

- 1µl 1%SDS
- 1µl 0,5M EDTA pH 8,0
- 3µl 3M NaOH

zugegeben und zunächst 30min bei 65°C inkubiert und dann 15min bei RT stehen gelassen. Eine anschließende Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von:

- 10µl 1M Tris pH 8,0
- 3µl 2M HCl.

Anschließend wurde die Lösung auf 100µl mit bidest. Wasser aufgefüllt und die nicht eingebauten Nukleotide mit MicroSpin Columns (S-400, Pharmacia) abgetrennt. Von dem Zentrifugat wurde 1µl abgenommen und im Szintillationszähler gemessen. Bei erfolgreichem Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide erhielt man eine Gesamtaktivität von 40-60 Mio cpm. Das restliche Zentrifugat wurde zum Denaturieren der Sekundärstrukturen für 2min auf 100°C erhitzt und anschließend im Eis möglichst schnell gekühlt. Die nun radioaktiv markierte cDNA wurde zu den Filtern in die Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C ca. 20h über Nacht im Drehofen.

Anschließend wurden die Filter wie folgt gewaschen:

- a) 1x kurz in 2xSSC/0,1%SDS bei RT
- b) 1x 20min in 2xSSC/0,1%SDS bei RT
- c) 1x kurz in 0,2xSSC/0,1%SDS bei RT
- d) 1x 20min in 0,2xSSC/0,1%SDS bei RT
- e) 1x 20min in 0,2xSSC/0,1%SDS bei 65°C

Die Filter wurden anschließend, genauso wie nach der Referenzhybridisierung in Folie eingeschweißt und für ca. 15-20h über Nacht auf den Imaging Platten (Fuji) exponiert. Am folgenden Tag wurden die gespeicherten Signale auf den Platten mit dem Scanner (FLA-3000, Fuji) eingelesen. Da sich die komplexen Sonden nicht mehr von den Filtern entfernen ließen wurden diese anschließend entsorgt.

Die weitere Auswertung erfolgte wie unter 2.11.7 beschrieben.

2.11.7 Auswertung der radioaktiven Signale

Die Quantifizierung der radioaktiven Signale erfolgte mit dem von der Firma Interfocus erworbenen Programm ArrayVision. Die bei einer Auflösung von 25µm eingelesenen Daten (FLA-3000, FUJI), konnten mit diesem Programm geöffnet und die Intensitäten der einzelnen Punkte vermessen werden.

Die Zuordnung der Signale zu den spezifischen Sonden und andere Verrechnungen erfolgten mit der Datenbank „Harpuspex“, die am MPI für Pflanzenphysiologie, Golm entwickelt wurde. Die Daten der Referenz- und der komplexen Hybridisierungen wurden über das „Internet“ in die Datenbank geladen.

Dort erfolgten folgende Schritte:

- a) Die doppelt aufgetragenen PCR-Produkte wurden zu dem entsprechenden Klonnenamen sortiert. Dazu wurde vorher bereits eine Liste mit den Namen und den Plattenpositionen in die Datenbank geladen.
- b) Die Werte für die Hintergrundposition wurden von den direkt umliegenden Werten subtrahiert. Waren die verbliebenen Werte kleiner als der Hintergrundwert wurden diese gekennzeichnet und aus der weiteren Auswertung entfernt. Beim verbliebenen Wert wurde nochmals kontrolliert, ob der Betrag größer ist als der Hintergrundwert. War dieses nicht der Fall, wurde der Wert mit einem Minuszeichen versehen, um dies kenntlich zu machen. Zuverlässige Werte waren nur solche, deren absoluter Wert zweimal größer war als der Hintergrundwert.
- c) Im Anschluss erfolgte eine interne Normalisierung, indem von allen verbliebenen Werten der Mittelwert gebildet und jeder einzelne Wert dadurch dividiert wurde. Das Ziel war, unterschiedlich effiziente Markierungsreaktionen und Unterschiede in der eingesetzten RNA-Menge abzugleichen.
- d) Nachdem diese Prozesse sowohl für die Referenzhybridisierung und die komplexe Hybridisierung durchgeführt wurde, erfolgte die volle Normalisierung, wobei die Werte der komplexen Hybridisierung durch die der Referenzhybridisierung dividiert wurden. Dadurch wurden Unterschiede in den aufgetragenen DNA-Mengen der spezifischen Sonden ausgeglichen.

Dateien, die nach der Verrechnung in der Haruspex-Datenbank geöffnet wurden, enthielten in der letzten Spalte die Werte der Genaktivitäten. Sollten Induktionen berechnet werden, mussten die Genaktivitäten der Behandlungen durch die der Kontrollen dividiert werden.

Mit einem in Excel hergestellten Formelblatt, konnte dieser Vorgang weitgehend automatisiert werden. Bevor man die Spalten der Genaktivitäten in dieses Formelblatt kopiert, wurden die in der Haruspex-Datenbank mit einem Minuszeichen gekennzeichneten Werte durch die für den jeweiligen Filter geringste gemessene Genaktivität ersetzt. Anschließend erfolgte die Berechnung der Induktionen der einzelnen Experimente, sowie die Ermittlung der Mittelwerte mit den Standardabweichungen einmal als absoluter Wert und einmal zur Basis 2 logarithmiert. Zusätzlich erhielt man Angaben darüber, ob die Werte nur aus einer Bestimmung stammten und ob die Werte aus zuvor ersetzten Genaktivitäten berechnet wurden und somit artifizielle, aber an die Wahrheit angenäherte Werte ergaben. Schließlich wurden markierte Werte oder Werte mit großen Standardabweichungen nochmals auf die Reproduzierbarkeit hin überprüft und im Zweifelsfall die Werte aus der Auswertung entfernt.

2.12 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Zielsetzung dieser aus Reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion kombinierten Methode (RT-PCR) ist es, über das Umschreiben von mRNA in cDNA und deren anschließende Vervielfachung Rückschlüsse auf die eingesetzte Menge an mRNA ziehen zu können. Durch das Mitführen eines internen mRNA-Standards sowohl bei der Reversen Transkription als auch der entsprechenden, daraus resultierenden cDNA bei der nachfolgenden PCR, läßt sich der Gehalt spezifischer mRNA in der Probe quantitativ ermitteln. Dieser für die Reaktion interne mRNA-Standard ist nicht pflanzlichen Ursprungs und stellt daher für die Pflanze einen externen Standard dar. Konkret sollten mit dieser Methode die in der Macroarray-Analyse erzielten Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden.

2.12.1 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird eine einzelsträngige RNA als Matrize verwendet und von ihr eine einzelsträngige DNA-Kopie (cDNA) hergestellt. Die katalysierenden Enzyme, auch als Reverse Transkriptasen oder RNA-abhängige DNA-Polymerasen bezeichnet, benötigen neben allen vier Desoxyribonukleosid-Triphosphaten und Mg- oder Mn-Ionen noch zusätzlich ein Oligonukleotid, an dem die Synthese beginnen kann. Unter natürlichen Bedingungen wird dieses Startmolekül durch eine tRNA gebildet. Im *in vitro*-Versuch bindet hingegen ein Oligonukleotid, einzig bestehend aus dTTP (Oligo(dT)), an das polyadenylierte Ende des mRNA-Einzelstranges. Dadurch wird ausgeschlossen, dass andere RNA-Sorten ebenfalls an der Reaktion teilnehmen und revers transkribiert werden.

Die Reverse Transkription (Wang *et al.*, 1989) fand in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l statt und wurde je nach Anzahl der nachzuweisenden Gene auch mehrfach angesetzt:

x μ l DEPC-behandeltes bidest. Wasser
4 μ l 5xErststrang-Synthese Puffer (Invitrogen)
1 μ l dNTPs (je 20mM)
0,5 μ l RNase Inhibitor (30-40U/ μ l; MBI Fermentas)
2 μ l 0,1M DTT (Invitrogen)
3,4 μ l oligo dT (0,05 μ g/ μ l, Invitrogen)
1 μ l pAW109 (1x10⁶ Kopien/ μ l; Applied Biosystems)
y μ l Gesamt-RNA (1 μ g).

Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurde 1 μ l Superscript II, 1:3 in 1xErststrang-Synthese-Puffer verdünnt (67U), dazugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte im MultiCycler PTC 200 bei folgenden Temperaturen:

42°C 30min
50°C 40min
95°C 5min
mit anschließender Kühlung auf 4°C.

2.12.2 Amplifizierung der revers transkribierten DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Aus der durch Pflanzenzellaufschluss gewonnenen Gesamt-RNA, wurde in der reversen Transkriptionsreaktion aufgrund der Oligonukleotidwahl lediglich selektiv der mRNA-Anteil revers transkribiert. Aus dem dabei entstandenen Kontingent an cDNAs wurden nachfolgend gezielt einige cDNAs und der interne, ebenfalls in cDNA umgeschriebene Standard mittels PCR amplifiziert. In jedem PCR-Ansatz waren deshalb sowohl genspezifische als auch standardspezifische (DM151 und DM152) Oligonukleotide enthalten. Um Verunreinigungen an genomischer DNA in der cDNA erkennen zu können, wurden die genspezifischen Oligonukleotide so gewählt, dass bei Amplifizierung von genomischer DNA ein Intron mit in dem PCR-Produkt enthalten war. So konnten die PCR-Produkte der cDNAs von denen der genomischen DNA anhand der Größe unterschieden werden. In jedem RT-PCR-Ansatz diente eine Probe mit genomischer DNA als Reinheits- und Positivkontrolle.

Ein einfacher RT-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

9,5 μ l bidest. Wasser
2 μ l 10xTaq-Polymerase-Puffer (Appligene)
0,2 μ l dNTPs (je 20mM)
je 1 μ l DM151 und DM152 (je 10 μ M)
je 1 μ l genspezifischer Primer (je 10 μ M)
0,3 μ l Taq-Polymerase (Appligene)
4 μ l cDNA oder genomische DNA

Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde so gewählt, dass sämtliche cDNAs mit dem gleichen PCR-Programm amplifiziert werden konnten:

94°C	2min		
94°C	30sek	}	
55°C	30sek	}	32x
72°C	1min	}	
72°C	5min	}	

Da sich die Reaktion der exponentiellen Vervielfachung gerade noch im linearen Bereich befinden sollte, wurden in Vorstudien die geeigneten Zyklen-Zahlen der Reaktionen empirisch ermittelt. Verdunstung des PCR-Mixes wurde vermieden, indem jeder Ansatz mit 25µl Pristaneöl überschichtet wurde und die Reaktion ohne Deckelheizung durchgeführt wurde.

Der PCR-Ansatz wurde möglichst vollständig auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen, die Banden mit Hilfe des MultiAnalyst-Programms (BIO-RAD) quantifiziert und der Quotient aus genspezifischem und standardspezifischem PCR-Produkt ermittelt.

2.13 Indirekter Immunologischer Nachweis von ABC-Transportproteinen

Der Nachweis von ABC-Transportproteinen sollte nicht nur auf Transkriptebene, sondern auch auf Proteinebene stattfinden. Dazu wurden weitgehend spezifische Bereiche der Gensequenzen ausgewählt und an ein Glutathion-S-Transferasegen ligiert. Das exprimierte Fusionsprotein wurde zur Immunisierung von Hühnern als Antigen eingesetzt. Zunächst wurde untersucht, ob die gewonnenen polyklonalen Antikörper den Teil des Antigens wieder erkennen, der gegen den ABC-Transporter gerichtet sein sollte. Anhand von mikrosomalen Fraktionen aus dem mit Xenobiotika behandeltem Blattmaterial wurde untersucht, ob sich Induktionen oder Repressionen auf Proteinebene nachweisen lassen.

2.13.1 Präparation einer mikrosomalen Fraktion

Unter Mikrosomen versteht man die bei Zellaufschluss sich aus dem endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran bildenden artifiziellen Vesikel. Sie können durch differentielle Zentrifugation leicht isoliert werden. In der Regel entstehen bei der Präparation stets in etwa zur Hälfte Vesikel mit gleicher Konstitution wie in der intakten Zelle („*right site out*“-Vesikel) und umgestülpte Vesikel („*inside out*“-Vesikel). Mikrosomale Fraktionen (Larsson *et al.*, 1987) wurden aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* (Col-R), sowie aus herbizidbehandeltem Pflanzenmaterial (2.11.2) gewonnen.

Von den auf Erde angezogenen Pflanzen wurden die Blätter abgeschnitten und in 5g bzw. 0,5g Portionen bei -70°C aufbewahrt. Der für die folgende Homogenisierung eingesetzte Puffer wurde vor jeder Präparation frisch angesetzt.

Homogenisierungspuffer:

- 50mM Hepes-KOH, pH 7,5
- 5mM EDTA
- 1mM PMSF
- 0,1mg/ml BHT
- 2mM DTT
- 0,1% PVPP
- 0,5M Sucrose

Homogenisierungspuffer, Mörser und Zentrifugationsröhrchen wurden auf 4°C gekühlt und 0,5g Pflanzenmaterial in 10ml Homogenisierungspuffer zerrieben. Das homogenisierte Material wurde über 2 Lagen Miracloth-Filter direkt in die Zentrifugationsröhrchen filtriert und anschließend 10min bei 4°C und 8000g zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Lage Miracloth-Filter direkt in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und 40min bei 4°C und 80.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Mikrosomen mit 100 μl Resuspendierungspuffer überschichtet, 30min auf Eis inkubiert und anschließend resuspendiert.

Resuspendierungspuffer:

- 0,33M Sucrose
- 5mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,8
- 4mM KCl
- 2mM DTT

Mit weiteren 150 μl des Resuspendierungspuffers wurde die mikrosomale Fraktion in einen Homogenisator mit Teflon-Pistill überführt und durch 20maliges Auf- und Abbewegen größere Mikrosomen nochmals zerteilt. Die Lösung wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Homogenisator mit 50 μl Resuspendierungspuffer nachgespült, so dass das Endvolumen ungefähr 300 μl betrug. Die gesamte Präparation wurde bei -70°C tiefgefroren aufbewahrt.

Für die Präparation von 5g Pflanzenmaterial wurden jeweils die 10-fachen Mengen der Lösungen eingesetzt.

2.13.2 Denaturierung der Proteine

Bevor eine Proteinbestimmung nach Esen (Esen, 1978) oder eine Auftrennung in einem Polyacrylamid-SDS-Gel durchgeführt werden kann, müssen die Proben zunächst denaturiert werden. Handelte es sich um lösliche Proteine wurden diese mit 5xLaemmli-Puffer (frisch mit 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol versetzt) gemischt, so dass dieser dabei auf ein fünftel seiner Ausgangskonzentration verdünnt wurde. Die Proben wurden 5min bei 95°C denaturiert. Mikrosomale Fraktionen wurden zusätzlich mit DTT und SDS versetzt, so dass die Endkonzentrationen 4% SDS und 0,1M DTT betragen. Wurde die Proteinbestimmung anschließend mit dem Esen-Test durchgeführt, durfte der 5xLaemmli-Puffer kein

Bromphenolblau enthalten, da die Färbung bei der Konzentrationsbestimmung stört. Diese Proben wurden 20min bei 56°C denaturiert.

2.13.3 Proteinbestimmungen

2.13.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde für nicht denaturierte Proben durchgeführt. Für die Erstellung einer Eichreihe wurden 0, 2,5, 5, 10, 20 und 40µg einer BSA - Stammlösung eingesetzt. Ebenso wurden von den zu bestimmenden Proben jeweils 10, 20 und 40µl in der Küvette mit bidest. Wasser auf 800µl aufgefüllt. Dazu wurden jeweils 200µl unverdünnte Bradfordlösung zugegeben und die Lösungen kräftig vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 15min wurden die Proben bei 595nm vermessen.

2.13.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Alternativ zu der Methode nach Bradford wurde die Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt (Lowry *et al.*, 1951). Die BSA-Eichreihe umfasste 0, 2, 10, 15 und 20µg, von den zu bestimmenden Proteinproben wurde je eine 1:15, 1:30 und 1:60 Verdünnung in einem Gesamtvolumen von 600µl eingesetzt. Die Proteine wurden während einer 15-minütigen Inkubation bei RT in einer 1%igen Natrium-Desoxycholat Lösung gefällt, die anschließend mit 200µl Trichloressigsäure (24%w/w) versetzt wurde. Nach einer Zentrifugation von 5min in der Tischzentrifuge wurden die Überstände abgegossen und das sedimentierte Protein in 450µl der Reagenzienmischung resuspendiert:

- 28 Teile 0,8M NaOH
- 18 Teile Lowry-Reagenz A, bestehend aus:
 - 0,2g Na-tartrat
 - 10g Na₂CO₃
 - 55ml 1M NaOH
 - ad 100ml mit bidest. Wasser
- 2 Teile Lowry-Reagenz B, bestehend aus:
 - 2,82g Kalium-Natrium-Tartrat
 - 1g CuSO₄x5H₂O
 - 90ml bidest. Wasser
 - 10ml 1M NaOH

Durch Zugabe von 300µl einer 1:3 Verdünnung des Folin-Reagenzes wurde das Protein angefärbt. Die Inkubation erfolgte 45min bei RT im Dunkeln, an die sich die Extinktionsmessung im Photometer bei 750nm anschloss.

2.13.3.3 Proteinbestimmung nach Esen

Für einen semiquantitativen Vergleich der Proteine aus mikrosomalen Membranfraktionen wurde eine Proteinbestimmung nach Esen (Esen, 1978) durchgeführt.

Von den denaturierten Proben (BSA-Proteine und Proteine mikrosomaler Fraktionen) wurde je ein Aliquot von 10µl auf ein 2x1cm großes Rechteck eines Whatman-Filterpapiers aufgetragen und getrocknet. Das Whatman-Filterpapier wurde anschließend 5min in

Fixierlösung und 15min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Um überschüssige, nicht an das Protein gebundene Coomassie-Lösung zu entfernen, wurde das Filterpapier in bidest. Wasser gewaschen, 2x in jeweils frischem bidest. Wasser aufgekocht und anschließend nochmals bei RT gewaschen. Getrocknet wurde das Filterpapier bei 56°C im Inkubationsschrank. Die 1x2cm großen Flächen wurden ausgeschnitten und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 1,5ml 0,5% SDS-Lösung 1h bei 56°C geschüttelt. Die entsprechend der Proteinmenge auf dem Filter gefärbte Lösung wurde bei 578nm vermessen.

2.13.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel

Durch Anlagerung von SDS an die Aminosäurekette von Proteinen wird diesen eine negative Nettoladung verliehen, die ungefähr proportional zu deren Masse ist. Diese, als SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) bezeichnete Methode erlaubt die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen im wesentlichen gemäß ihrer Größe (Laemmli, 1970).

Die 7% oder 12% Trenngel und das 3% Sammelgel für die SDS-PAGE setzten sich wie in dem folgenden Schema angegeben zusammen:

	Trenngel (7%)	Trenngel (12%)	Sammelgel (3%)
H ₂ O	7,5ml	4,8ml	3,25ml
4xTrenngelpuffer	3,75ml	3,75ml	
4xSammelgelpuffer			1,25ml
Acrylamid/ Bisacrylamid	3,5ml	5,4ml	0,5ml
Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	45µl	45µl	20µl
TEMED	7µl	7µl	4µl

Für die Gelelektrophorese der 1,5mm dicken Minigele, für die diese Angaben ausgerichtet sind, wurde das Miniprotean II-System von Biorad benutzt.

Das Sammelgel wurde bis ca. 15mm unterhalb des Randes der kleinen Glasplatte gegossen und zur Bildung einer glatten Oberfläche ca. 500µl Tris-gesättigtem Butanol überschichtet, das außerdem durch Sauerstoffausschluß eine vollständige Polymerisation des Gels ermöglichte. Das Butanol wurde nach erfolgter Polymerisation mit einem Papiertuch abgesaugt, mit Wasser nachgespült, der Freiraum mit Sammelgel aufgefüllt und der Kamm zwischen die Platten gesteckt. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurden die Glasplatten in die Puffertankvorrichtung eingebaut, der Laufpuffer für die SDS-Gelelektrophorese eingefüllt und die denaturierten Proben in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde der „Prestained, Broad Range“ von BIO-RAD verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel für 1h bei 80V und 1,5-2h bei 100V.

2.13.5 Herstellung der Antigene

Zur Erkennung von ABC-Transportproteinen und einem aus dem Tonoplast stammenden Aquaporin als Marker, wurden Antikörperseren hergestellt. Geeignete Bereiche dieser Proteine wurden in einem Expressionssystem an eine Glutathion-S-Transferase fusioniert und so zur Immunisierung als Antigen Hühnern bzw. Kaninchen verabreicht.

Die in Frage kommenden Sequenzen wurden in dem in der GSF zugänglichen Programm GCG hinsichtlich ihrer Hydrophobizität (Kyte & Doolittle, 1982) untersucht und der Antigen-Index (Jameson & Wolf, 1988) bestimmt. Es wurden Bereiche ausgewählt, deren Hydrophobizität deutlich >0 und dessen Antigen-Index möglichst nahe bei 1,7 lag. Nach einer TAIR-Datenbanksuche, die einem Aufschluss über die Spezifität des ausgewählten Bereichs geben sollte, wurde von dem ausgewählten Proteinabschnitt die dazu gehörige Nukleinsäuresequenz mittels PCR amplifiziert. Als Template wurde genomische DNA oder, bei Intron überspannenden Sequenzen, aus Blättern oder Blüten revers transkribierte cDNA eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide enthielten eingebaute Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Eco*RI. Da bei dem Restriktionsverdau lediglich wenige Basen an den Enden des DNA-Fragmentes entfernt wurden, konnten diese mit dem „*QIAquick PCR purification Kit*“ von Qiagen entfernt werden. Bei der sich anschließenden Ligation wurde ein Verhältnis von Vektor (pGEX-2T, Pharmacia) zu Insert von 1:15 eingesetzt. Die in 10 μ l Gesamtvolumen über Nacht bei RT durchgeführte Ligation enthielt außer den beiden DNA-Fragmenten :

1 μ l 100mM DTT
1 μ l Ligase Puffer (MBI)
0,1 μ l T4-Ligase 5U (MBI).

Nach der Ligation war das einklonierte Fragment im Leserahmen an das 3'-Ende des Glutathion-S-Transferasegens fusioniert. Der vorgeschaltete Promotor des lac-Gens ermöglichte die Expression des Fusionsproteins durch spätere Zugabe von IPTG.

Der Ligationsansatz wurde transformiert (siehe 2.8.1.2) und mit den Einzelkolonien auf den ampicillinhaltigen LB-Platten sowohl 4ml LB-Medium (Vorkultur) als auch ein PCR-Mix (siehe 2.10.6) angeimpft. Dabei enthielt der PCR-Mix die vektorspezifischen Oligonukleotide Gex-f und Gex-r (siehe Anhang 7.3.4). Die Anlagerungstemperatur der durchgeführten PCR-Reaktion lag bei 52°C. Positive Klone wurden ausgewählt und von den bereits angeimpften Vorkulturen 20ml Übernachtskulturen angesetzt. Diese wurden am nächsten Tag 1:25 in LB-Medium verdünnt und weiter bei 37°C und 200Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 inkubiert. Von der 500ml-Kultur wurden 3-5ml abgenommen und die restliche Kultur mit IPTG (Endkonzentration 100 μ M) induziert. Nach weiteren 3h Inkubation wurden ebenfalls 3ml abgenommen, die restliche Kultur im GS3-Rotor 10min bei 7.000Upm zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien mindestens 30min bei -70°C eingefroren. Die von den nicht-induzierten und induzierten Kulturen abgenommenen Proben wurden sedimentiert und für das SDS-Gel in Laemmli-Puffer denaturiert.

Die Lyse der Bakterien erfolgte in 14ml STE-Puffer, der mit 100 μ g/ml Lysozym und 500 μ M PMSF (in DMSO gelöst) versetzt war. Die Bakterien wurden in dieser Lösung resuspendiert und anschließend in ein 50ml Röhrchen überführt und 15min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von Aprotinin (Endkonzentration: 2 μ g/ml) und Sarcosyl (1,5%) wurde die Bakteriensuspension etwa 1min mit dem Ultraschallstab lysiert und anschließend die Lösung

für 5min bei 8000Upm zentrifugiert. Alle groben Bestandteile, wie z.B. die Bakterienzellwände, wurden in der anschließenden Zentrifugation sedimentiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde die Lösung mit 2% Triton X-100 vermischt und ein Aliquot von 100µl für das spätere SDS-Gel entnommen. Die Glutathion Sepharose 4B (Pharmacia), an die das Fusionsprotein über die Glutathion-S-Transferase binden konnte, wurde nach den Angaben des Herstellers vorbereitet (abweichend vom Protokoll wurde STE-Puffer verwendet) und der Überstand dazu gegeben. Die Anbindung des Fusionsproteins erfolgte über Nacht bei 4°C, wobei die Probe über Kopf gedreht wurde.

Die Sepharose wurde 2min bei 500xg sedimentiert und anschließend 4x mit 25ml STE-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte 5x mit je 1ml mit einer Lösung, die reduziertes Glutathion enthielt:

50mM Tris pH 8,0
10mM Glutathion, reduziert

Während der Aufreinigung wurden von dem Durchfluss, von dem ersten Waschschrift und von den 5 Elutionen je 100µl abgenommen, mit 5xLaemmli-Puffer versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Zusammen mit den denaturierten Bakterienkulturproben wurden diese in einem 12% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Banden anschließend mit Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. In den Elutionen sollte nur noch eine Bande sichtbar sein und der Größe des Fusionsproteins entsprechen. Von den Elutionen wurde die Proteinkonzentration bestimmt und auf eine Konzentration von 1mg/ml in Centricon YM-10 aufkonzentriert. Die Immunisierung der Hühner wurden von Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers (Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung; LMU München) durchgeführt.

Das Sepharose-Säulenmaterial wurde nach Angaben des Herstellers wieder regeneriert und aufbewahrt.

2.13.6 Klonierung des Antigens in den Expressionsvektor pMAL-pΔH

Um zu zeigen, dass die gewonnenen Antikörperseren außer dem GST-Protein auch den für die ABC-Transportproteine spezifischen Anteil erkennen, wurden die Fragmente in den Expressionsvektor pMAL-pΔH kloniert. Dieser Vektor enthielt in der „*multi-cloning-site*“ an Stelle der *Hind*III Schnittstelle ein Stop-Codon. Dies führte zu einer Expression eines Fusionsproteins aus maltosebindendem Protein (MBP) und dem Fragment des ABC-Transportproteins. Die eigentliche Expression des lacZα-Gens wurde durch die eingeführte Mutation unterdrückt.

Für die Klonierung wurden die genomischen Bereiche mittels PCR amplifiziert. Die in der PCR eingesetzten Mutagenese-Primer enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Pst*I. Das amplifizierte Fragment wurde nach einem entsprechenden Restriktionsverdau und anschließender Aufreinigung über das „*QIAquick PCR purification Kit*“ in die Ligation eingesetzt.

Die Transformation und Selektion der positiven Klone erfolgte wie unter 2.13.5 beschrieben. Die PCR der Einzelkolonien enthielt die vektorspezifischen Primer mbp-f und mbp-r. Von

den positiven Klonen wurden die Vorkulturen genutzt, um Plasmide mit dem „*QIAprep Miniprep Kit*“ zu isolieren.

Nach einer erneuten Transformation wurden Kulturen angezogen, die durch Induktion mit IPTG das entsprechende Fusionsprotein exprimierten. 3ml Vorkultur wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und nach entsprechender Inkubation eine 25ml Übernachtskultur angesetzt. 1ml dieser Übernachtskultur wurde 1:30 verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,9 bei 37°C und 200Upm inkubiert. Vor der Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 100 μ M) wurde 1ml für die nicht-induzierte Kontrolle abgenommen. Nach einer 3-stündigen Inkubation wurde ein weiterer Aliquot von 1ml dem induzierten Medium entnommen. Die Bakterien wurden sedimentiert und in Laemmli-Puffer für 5min bei 95°C denaturiert und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

2.13.7 Western-Blot

Bei der hier angewandten Technik handelt es sich um eine Methode elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter zu übertragen. Dabei wird eine Kopie des Gels produziert, indem die Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und darauf immobilisiert werden. Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine, die entweder aus dem Bakterienlysat stammten oder ein aufgereinigtes lösliches Protein darstellten, wurden stets im sog. „semi-dry“-Verfahren (gemäß Protokoll der Fa. Millipore GmbH, Eschborn) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell) übertragen. Anschließend wurde das Gel in Transferpuffer äquilibriert und auf eine in der gleichen Größe zugeschnittenen und in bidest. Wasser und Transferpuffer äquilibrierten Nitrocellulose-Membran aufgelegt.

Transferpuffer:

- 48mM Tris
- 39mM Glycin
- 0,037% SDS
- 20% Methanol

Beides zusammen wurde zwischen je drei auf die gleiche Größe zugeschnittenen Whatman-Filter gelegt, die ebenfalls mit Transferpuffer getränkt wurden und zwischen die Elektroden der Blot-Apparatur gelegt. Dabei wurde die Membran auf die Kathodenseite gelegt, da die durch das SDS denaturierten und negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur positiv geladenen Elektrode wandern.

Nach dem Zusammenbau der Apparatur wurde 1h eine Stromstärke von 2,5mA/cm² Membranfläche angelegt.

Bei der Auftrennung von mikrosomalen Membranproteinen wurden u.a. Proteine von >120kDa auf die Membran transferiert. Zu diesem Zweck wurde das sog. „Tankblot“-Verfahren eingesetzt. Die NC-Membran wurde zunächst in bidest. Wasser und anschließend in 1xTris-/Glycin-Puffer inkubiert. Der Zusammenbau der Apparatur erfolgte in 4°C kaltem 1xTris-/Glycin-Puffer. Das vorab in 1xTris-/Glycin-Puffer äquilibrierte Gel wurde luftblasenfrei direkt auf die Membran aufgelegt und zwischen zwei Whatman-Filtern und den

zu der Apparatur zugehörigen Schaumstoff-Platten zu einem „Sandwich“ zusammengebaut. Der Proteintransfer erfolgte bei 14V und 4°C über Nacht.

Nach dem Proteintransfer wurde das Gel zur Kontrolle der Effizienz des Transfers mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Die Färbung der Membran mit 1xPonceau S-Lösung (Inkubationszeit 5min) fixierte die Proteine zusätzlich. Überschüssige Färbelösung wurde mit bidest. Wasser entfernt und der Proteintransfer kontrolliert.

Vor der sich anschließenden Antikörperbehandlung wurden die Membranen ca. 1h bei RT in 5% Milchpulverlösung (in TBST) blockiert und mit TBST gewaschen.

2.13.8 Antikörperbehandlung von Western-Blots

Da Proteine nach dem Transfer unter geeigneten Bedingungen ihre Immunreaktivität nicht verlieren, können sie mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Bei der indirekten Nachweismethode wird ein bereits an Proteinen auf dem Gel gebundener, spezifischer Antikörper (primärer Antikörper) durch einen mit einem Enzym gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden sekundäre Antikörper verwendet, die je nach Ursprung des primären Antikörpers gegen Huhn oder Kaninchen gerichtet und stets mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt waren (Promega). Das verwendete Substrat BCIP (5-Brom-4-chlor-3-Indolylphosphat) ergibt nach hydrolytischer Spaltung durch das Enzym einen tiefblau gefärbten, unlöslichen, leicht erkennbaren Indigo-Niederschlag. Die Zugabe von NBT (Nitroblau-Tetrazolium) verstärkt die Blaufärbung, da bei der Umsetzung Protonen entstehen, die das NBT zum purpurfarbenen Diformazin reduzieren. Der primäre Antikörper wurde stets 1:300 in TBST verdünnt eingesetzt. Die an die Membran fixierten Proteine wurden für 1h bei RT mit dem ersten Antikörper inkubiert und anschließend die Membranen 3x10min in TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte ebenfalls für 1h bei RT in einer 1:6000 Verdünnung in TBST-Lösung. Die Membranen wurden 2x mit TBST und 2x mit TBS-Lösung gewaschen und anschließend kurz auf Whatman-Filter getrocknet. Da die Alkalische Phosphatase optimal bei pH 9,5 arbeitet, wurden die Membranen vor der eigentlichen Färbereaktion 5min in folgendem Puffer äquilibriert:

0,1M Tris pH 9,5

0,1M NaCl

5mM MgCl₂

Für die eigentliche Färbereaktion wurden zu 20ml des alkalischen Puffers 33µl BCIP (50mg/ml in DMF) und 50µl NBT (75mg/ml in DMF) gegeben. Nach 5-20min zeigte sich die deutliche Färbung der Niederschlagsreaktion, die in bidest. Wasser gestoppt wurde.

2.13.9 Solubilisierungen von Membranproteinen

Die Vollängen-ABC-Transportproteine sind Membranproteine, deren Molekulargewicht über 120kDa liegt. Die Bedingungen unter denen eine vollständige Entfernung der Membranlipide von den Proteinen möglich ist, hängen entscheidend von den physikochemischen Eigenschaften des jeweiligen Proteins ab. Für die gleichmäßige Einwanderung der Proteine in das Polyacrylamidgel ist die vollständige Solubilisierung ein entscheidender Faktor. Daher wurden neben einer Ethanol/Aceton-Fällung Detergenzien mit unterschiedlichen Eigenschaften zur Solubilisierung eingesetzt.

2.13.9.1 Ethanol/Aceton-Fällung

Vor der eigentlichen Fällung, wurden 500µg der mikrosomalen Fraktion von Blättern lyophilisiert (Liu *et al.*, 2001; Parry *et al.*, 1989). Zunächst wurden die Proben für 2h bei –70°C eingefroren und anschließend über Nacht unter Vakuum im Lyophilisator getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 500µl bidest. Wasser aufgenommen. 25ml einer Ethanol/Aceton-Mischung (1:1), die bereits mindestens 1h bei –20°C vorgekühlt war, wurden in einem SS34-Zentrifugenbecher vorgelegt. Nach Zugabe der mikrosomalen Fraktion und kräftigem Schütteln wurden die Proteine innerhalb von 5-7h bei –20°C gefällt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt im SS34-Rotor bei 14.000Upm und 4°C für 10min. Das Zentrifugat wurde bei 37°C getrocknet und in 500µl 1xLaemmli-Puffer mit 4% SDS und 0,1M DTT resuspendiert, so dass eine Proteinendkonzentration von 1µg/µl erreicht wurde. Die Proben wurden 20min bei 56°C inkubiert und schließlich bei –20°C aufbewahrt.

2.13.9.2 Solubilisierung mit Nonidet-P40

Von der mikrosomalen Fraktion wurden 500µg in der Ultrazentrifuge sedimentiert (1h, 122.000xg, 4°C) und in 210µl vorgekühltem (4°C) Solubilisierungspuffer mit Nonidet-P40 resuspendiert (Rehm, 1995).

Solubilisierungspuffer mit Nonidet-P40:

- 20mM Tris-HCl pH 6,0
- 20% Glycerin
- 0,25M NaCl
- 1mM EDTA
- 1mM DTT
- 10µM PMSF
- 2% Nonidet-P40

Die sedimentierte mikrosomale Fraktion wurde mit einem Plastikstab aufgewirbelt und anschließend 1h auf Eis bewegt. Nicht solubilierte Proteine wurden im folgenden Zentrifugationsschritt (s.o.) sedimentiert. Der Überstand (ca. 210µl) wurde mit 140µl 5xLaemmli-Puffer versetzt, so dass dieser eine 1x Endkonzentration mit 4% SDS und 0,1M DTT hatte (Endkonzentration der Proteine ca. 1,4µg/µl). Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei 56°C und eine Aufbewahrung bei –20°C.

2.13.9.3 Solubilisierung mit Triton X-100

Die Solubilisierung mit dem ebenfalls nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 erfolgte wie unter 2.13.9.2 beschrieben.

Solubilisierungspuffer mit Triton X-100:

- 20mM Tris-HCl pH 6,0
- 20% Glycerin
- 0,25M NaCl
- 1mM EDTA
- 1mM DTT
- 10 μ M PMSF
- 3% Triton X-100

2.13.9.4 Solubilisierung mit N-Octylglucosid

Die Solubilisierung mit dem ebenfalls nicht-ionischen Detergenz N-Octylglucosid (Jasinski *et al.*, 2001) erfolgte wie unter 2.13.9.2 beschrieben.

Solubilisierungspuffer mit n-Octylglucosid:

- 80mM Tris-HCl pH 6,8
- 20% Glycerin
- 0,25M NaCl
- 1mM EDTA
- 1mM DTT
- 1mM PMSF
- 2 μ g/ml Aprotinin
- 2% n-Octylglucosid

2.13.9.5 Solubilisierung mit Deoxycholat

Die Solubilisierung mit dem ionischen Detergenz Deoxycholat erfolgte wie unter 2.13.9.2 beschrieben.

Solubilisierungspuffer mit Deoxycholat:

- 20mM Tris-HCl pH 8,0
- 20% Glycerin
- 0,25M NaCl
- 1mM EDTA
- 1mM DTT
- 10 μ M PMSF
- 2% Deoxycholat

2.13.9.6 Solubilisierung mit CHAPS

Die Solubilisierung mit dem zwitterionischen Detergenz CHAPS erfolgte wie unter 2.13.9.2 beschrieben.

Solubilisierungspuffer mit CHAPS:

20mM Tris-HCl pH 6,0
20% Glycerin
0,25M NaCl
1mM EDTA
1mM DTT
1mM PMSF
1% CHAPS

2.14 Methoden zur Isolierung von Insertionsmutanten

Anhand eines Ansatzes, der der reversen Genetik zuzuordnen ist, wurden an dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln im Rahmen des ZIGIA- (ehemals AMAZE-) Projektes Pflanzenlinien gesucht, die eine Transposon-Insertion entweder in dem ABC-Transporter AtPDR4 oder AtMDR haben. Da bei einer Insertion des Transposons entweder im 5'-Bereich des Gens oder im Promotor mit einem Ausfall der Genaktivität zu rechnen ist („*knock-out*“-Mutanten), oder zumindest von einer starken Beeinträchtigung der Funktion ausgegangen werden kann, können bei Beobachtung eines Phänotyps Rückschlüsse auf die Funktion des Gens gemacht werden.

In einer systematischen Analyse der zu dem Zeitpunkt vorhandenen ca. 6.000 Insertionslinien, konnten am MPI für beide Gene mehrere mögliche Kandidatenpflanzen identifiziert werden. Anhand von PCR-Produkten konnte die genaue Insertionsstelle und die Orientierung der Insertion bestimmt werden. Um einen möglicherweise vorhandenen Phänotyp auf die Insertion des gewünschten Gens zurück führen zu können, wurde die Anzahl der Insertionen bestimmt und Rückkreuzungen durchgeführt.

2.14.1 Bestätigung der Insertionen

Die Bestätigung einer Transposon-Insertion in den gewünschten Genen erfolgte durch Polymerasekettenreaktion. Die einem Insertionsmutagenese Screening unterzogenen Pflanzen wurden wie unter 2.9 beschrieben angezogen. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte wie unter 2.10.9.1 aufgeführt.

Die Polymerasekettenreaktion zur Bestätigung der Insertion in der Einzellinie, erfolgte stets mit dem genomischen Oligonukleotid, das bereits bei der Isolierung am MPI in Köln ein positives Ergebnis ergab und beiden Oligonukleotiden, die jeweils an das Ende des Transposons hybridisieren (7.3.2).

1,5µl CTAB-Lösung
1µl En205 oder En26 (10µM)
1µl En8130 oder En8202 (10µM)
1µl 4411bw1 oder 5168bw1 (10µM)
0,2µl Taq-Polymerase (5U/µl ;Appligene)
2µl 10x Enzym-Puffer (Appligene)
0,15µl dNTPs (je 20mM)
13,15µl bidest. Wasser

Die Reaktion wurde unter den folgenden Temperaturbedingungen durchgeführt:

84°C	2min		
94°C	40sek	}	
65°C	1min	}	40x
72°C	2min	}	
72°C	5min	}	

Zur Kontrolle wurden von den 25µl PCR-Ansätzen stets 15µl nach Zugabe von 5µl Auftragspuffer auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen.

In Fällen wo keine Banden der PCR-Produkte im Agarosegel detektierbar waren, wurde 1,5µl des PCR-Ansatzes als Template in einer „*semi-nested*“ mit einem eingerückten Primer oder in einer „*nested*“ PCR, mit beiden Primern eingerückt, eingesetzt.

2.14.2 Orientierung des Transposons

Anhand der positiven Linien wurde anschließend die Orientierung des Transposons untersucht, indem die transposonspezifischen Oligonukleotide in zwei getrennten Reaktionen eingesetzt wurden. In dem Fall wurde die PCR wie oben angegeben angesetzt, aber einer der *En*-Oligonukleotide durch bidest. Wasser ersetzt.

2.14.3 Lokalisierung der Insertion

Die exakte Stelle der Insertion des Transposons wurde untersucht, indem eine PCR mit je einem transposon- und einem genspezifischen Oligonukleotid angesetzt wurde. Der unter 2.14.1 angegebene Ansatz wurde verdreifacht und die PCR-Produkte nach Auftrennung in einem Agarosegel anschließend mit dem „*Qiagen Gel-Extraction-Kit*“ aufgereinigt. Nach der anschließenden Quantifizierung im 1,5% Agarosegel wurde das PCR-Produkt zum Sequenzieren verschickt (siehe 2.10.8).

2.14.4 Kreuzungen von Pflanzen

Pflanzenlinien, in denen die *En*-Insertion bestätigt worden war, enthielten außer der Insertion in dem gewünschten Gen zusätzlich 5-20 Insertionen. Diese wurden durch Rückkreuzungen in den Wildtyp entfernt. Dazu wurden von den parallel angezogenen Wildtyp-Pflanzen die Kelch-, Blüten- und Staubblätter entfernt. Zu diesem Zeitpunkt sollten die Staubblätter die Pollen noch nicht frei gegeben haben, um eine Selbstbefruchtung auszuschließen. Von der ausgewählten Insertionslinie wurden Blüten abgeschnitten, deren Staubblätter voll ausgereift waren und der Pollen bereits frei lag. Dieser Pollen wurde auf die Griffel der Wildtyp-Pflanzen gebracht. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen wurden am nächsten Tag erneut Pollen von der Insertionslinie auf den gleichen Griffel aufgebracht. Die daraus entstandenen Samen wurden erneut ausgesät und die Insertion in dem gewünschten Gen erneut bestätigt.

2.14.5 Bestimmung der Anzahl von Insertionen

Von der Anzahl der in dem Genom enthaltenen Transposons ist es abhängig, wie häufig Rückkreuzungen in den Wildtyp notwendig sind, bis nur noch die eine Insertion in dem ausgewählten Gen zurückbleibt. Mit einer an das Transposon hybridisierenden radioaktiv markierten Sonde, konnten mit Hilfe des Southern-Blots die Anzahl der Insertionen bestimmt werden.

2.14.5.1 Vorbereitung der genomischen DNA

Von den Insertionslinien wurden je 1g Pflanzenmaterial geerntet und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.10.9.2 beschrieben. Nach der Qualitätskontrolle sowohl im Gel als auch photometrisch (siehe 2.10.11) wurden 2µg der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind*III (30U) über Nacht bei 37°C in 300µl Gesamtvolumen verdaut. Nach einem Fällungsschritt (siehe 2.10.12) wurde die DNA in 10µl bidest. Wasser aufgenommen.

2.14.5.2 Southern-Blot

Beim Southern-Blot (Southern, 1975) werden DNA-Fragmente nach einem Verdau mit Restriktionsenzymen durch eine Agarose-Gelelektrophorese gemäß ihrer Fragmentgröße aufgetrennt, denaturiert und auf eine Nylonmembran transferiert.

Die restriktionsverdaute genomische DNA wurde mit 5µl Auftragspuffer versetzt (Gesamtvolumen 15µl) und auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen und über Nacht bei 20V im elektrischen Feld aufgetrennt.

Das Agarosegel wurde zur Vorbehandlung mit bidest. Wasser gewaschen, 30min in 0,25M HCl depurinert, ein zweites Mal mit bidest. Wasser gewaschen und die DNA 20min in 0,4M NaOH denaturiert. Der DNA-Transfer aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels Saugverfahren über Nacht bei RT in 0,4M NaOH. Die Membran wurde anschließend in 2xSSC bis zur Neutralisation gewaschen und getrocknet.

Nach Fixierung der einzelsträngigen Ziel-DNA auf der Membran im UV Stratalinker® konnte die gesuchte DNA-Sequenz durch Hybridisierung mit einer markierten einzelsträngigen DNA-Sonde identifiziert werden.

2.14.5.3 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Das subklonierte *En*-Element (Vektor: pACYC177) wurde vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung zur Verfügung gestellt. In einem Standard PCR-Ansatz (siehe 2.10.6) mit den *En*-Oligonukleotiden En1 und En603 (Sequenz siehe Anhang 7.3.2) und dem Plasmid als DNA-Matrize (50ng) konnte ein 5'-Fragment des Transposons amplifiziert werden.

95°C	5min		
95°C	30sek	}	
60°C	30sek	}	40x
72°C	60sek	}	
72°C	7min		

Das PCR-Produkt wurde mit dem „Qiagen Gel-Extraction-Kit“ aufgereinigt und die Reinheit und Konzentration gelelektrophoretisch bestimmt (2.10.11).

Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem „DecaLabel™ DNA Labelling Kit“. Die Methode basiert auf der Anlagerung von zufälligen 10mer Oligonukleotiden an das einzelsträngige PCR-Produkt und der Polymerisierung des komplementären Stranges, beginnend an den Oligonukleotiden in 3'-Richtung. Das katalysierende Enzym, das große Fragment der DNA-Polymerase (auch als Klenow-Fragment bezeichnet), dessen Exonuklease-Aktivität eliminiert ist, baut dabei radioaktiv markierte Nukleotide ein.

In einem Volumen von 6,2µl wurden ca. 100ng des PCR-Produktes und 4µl des 5xEnzympuffers 10min bei 100°C denaturiert. Die schnelle Abkühlung in Eiswasser verhinderte eine erneute Hybridisierung der komplementären DNA-Stränge. Eine 10-minütige Inkubation bei 37°C erfolgte nach Zugabe von:

- 1,2µl Mix A (Bestandteil des Kits)
- 6µl α-[³³P]-dATP, Redivue (Amersham)
- 0,4µl Klenow-Fragment (Bestandteil des Kits).

Nach der Zugabe von 1,6µl dNTPs (Bestandteil des Kits) und einer weiteren 5-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 4µl 0,05M EDTA-Lösung gestoppt. Das Volumen wurde auf 200µl mit bidest. Wasser aufgefüllt und 2µl im Szintillationszähler gemessen. Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wurden über zwei MicroSpin Columns (S-400; Amersham) abgetrennt (nach Angaben des Herstellers), die Zentrifugate vereinigt und davon nochmals 2µl im Szintillationszähler gemessen. Waren mehr als 10% der radioaktiv markierten Nukleotide eingebaut, so wurde die Sonde in der folgenden Hybridisierung eingesetzt.

2.14.5.4 Hybridisierung des Southern-Blots

Die Nitrocellulosemembran, die die fixierte Ziel-DNA trägt, wurde mit 6ml Prähybridisierungslösung ca. 2-4h bei 65°C im Drehofen vorbehandelt, bevor die gesamte markierte Sonde zugegeben und bei der gleichen Temperatur über Nacht hybridisiert wurde.

Anschließend wurden die Filter wie folgt gewaschen:

- a) 1x kurz in 2xSSC/0,1%SDS bei RT
- b) 1x 20min in 2xSSC/0,1%SDS bei RT
- c) 1x kurz in 0,2xSSC/0,1%SDS bei RT
- d) 1x 20min in 0,2xSSC/0,1%SDS bei RT
- e) 1x 20min in 0,2xSSC/0,1%SDS bei 65°C

Die Filter wurden anschließend, genauso wie nach der Referenzhybridisierung in Folie eingeschweißt und für ca. 15-20h über Nacht auf den Imaging Platten (Fuji) exponiert. Am folgenden Tag wurden die gespeicherten Signale auf den Platten mit dem FLA-3000 (Fuji) eingelesen.

3 Ergebnisse

Von großem Interesse ist die Frage, wie Pflanzen auf die Einwirkung von Xenobiotika reagieren und wie die Metabolisierung und Entgiftung, sehr wahrscheinlich auch in Form einer Kompartimentierung in die Vakuole oder in den Apoplasten, stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand von drei Xenobiotika dieser Frage nachgegangen werden. Ausgewählt wurden dazu zwei Herbizide, Primisulfuron und Bromoxynil, die sich hinsichtlich ihres Wirkortes unterscheiden. Während Primisulfuron die Acetolactatsynthese hemmt und damit die Synthese der verzweigten Aminosäuren verhindert, unterbricht Bromoxynil die Elektronentransportkette am Photosystem II. Das dritte Xenobiotikum ist der aus der Behandlung von Nutzpflanzen bekannte Safener Benoxacor. Die Wirkung dieser Substanz auf *Arabidopsis thaliana* ist gänzlich unbekannt, jedoch wurde vermutet, dass einige Gene aus dem Sekundärmetabolismus induziert werden (Messner *et al.*, 1996).

Da an der Kompartimentierung der Xenobiotikametabolite vermutlich ABC-Transporter beteiligt sind, lag der Schwerpunkt auf dieser Genfamilie. Die Metabolite der Xenobiotika entstehen durch das Zusammenwirken von Enzymen des Sekundärmetabolismus (Sandermann, 1992; Sandermann, 1994), die nur in den wenigsten Fällen auch auf Genebene identifiziert sind. Um die ABC-Transporter im Kontext mit anderen Genen des Sekundärmetabolismus untersuchen zu können, wurden die Genfamilien der Cytochrom P450 Monooxygenasen, der Glutathionabhängigen Enzyme und der UDP-Glycosyltransferasen mit in die Untersuchungen eingeschlossen. Durch die Etablierung des Detox-Arrays konnten deren Expressionsprofile gemeinsam nach Behandlung mit den oben genannten Xenobiotika untersucht werden. Gemeinsamkeiten und Unterschiede sollten herausgearbeitet werden und Kandidatengene der Detoxifizierung identifiziert werden. Die Funktion könnte dann in weitergehenden Studien näher untersucht werden.

Zur weiteren Charakterisierung der ABC-Transporter sollte auch die Induktion auf Proteinebene untersucht werden. Dafür wurden zwei Antikörper entwickelt, die die Subfamilien MDR („*multidrug-resistant proteins*“) und PDR („*pleiotropic drug resistant proteins*“) erkannten. Desweiteren sollten „*knock-out*“-Linien isoliert werden, deren Transposoninsertion innerhalb des Genbereichs von ABC-Transportern lag.

3.1 Der Detox-Array

Der Detox-Array ist durch die funktionsbezogene Auswahl von vier Genfamilien des Sekundärmetabolismus gekennzeichnet. Um zuverlässig die Expression der einzelnen Mitglieder bestimmen zu können, wurden genspezifische Sonden entwickelt. Desweiteren sollte eine Basis geschaffen werden, von der aus im Hochdurchsatzverfahren die Herstellung der Sonden möglichst einfach, zuverlässig und in gleichbleibender Ausbeute und Qualität möglich ist. Mittels einer angewendeten Normalisierungsstrategie konnten unterschiedlich übertragene DNA-Mengen auf die Membranen ausgeglichen werden. Zudem sollte überprüft werden, mit welcher Sensitivität die Detektion im Vergleich zu anderen Array-Methoden erfolgt.

3.1.1 Auswahl und Spezifität der Sondenbereiche für die ABC-Transporter

Da die Homologien zwischen den ABC-Transportern zum Teil sehr hoch sind, wurde alternativ zu der bereits etablierten Strategie cDNA-Klone als Sonden auf dem Filter zu fixieren (Schena *et al.*, 1995), der 3'-untranslatierte Bereich (untranslated region: UTR) als Sonde eingesetzt. Aufgrund des verminderten Selektionsdrucks in diesem Bereich gibt es auch unter nahe verwandten Mitgliedern in den meisten Fällen deutliche Sequenzunterschiede. Diese Strategie sollte gewährleisten, dass die Expression jedes einzelnen Mitglieds untersucht wird.

3.1.1.1 Auswahl der Sondenbereiche

Anhand eines Datenbankvergleichs wurde die Spezifität der Sonde mit der des korrespondierenden cDNA-Klons des Gens *AtMDR4* verglichen. Dabei unterschied sich die Anzahl der homologen Sequenzen erheblich (Abbildung 3.1). Geht man davon aus, dass im Experiment bei einer Homologie von mehr als 70% über mindestens 70bp eine Kreuzhybridisierung stattfinden kann, so findet man für den cDNA-Klon 178K23 (650bp) des Gens *AtMDR4* sechs weitere Kandidaten, mit denen eine Kreuzhybridisierung potentiell möglich ist. Als Basis für diese Suche wurde von MIPS eine Datenbank erzeugt, die nur aus den kodierenden Bereichen, ohne die Introns, aller annotierten Gene besteht. Im Gegensatz dazu findet man für die 177bp lange Sequenz aus dem 3'-UTR desselben Gens keine weiteren möglichen Kreuzhybridisierungen (Abbildung 3.1).

Um zu zeigen, dass auch im Experiment die genspezifischen Sonden den cDNA-Klonen im Bezug auf die Spezifität überlegen sind, wurden beide Ansätze miteinander verglichen. Als unabhängige Methode wurde die RT-PCR gewählt, da sie eine spezifische und auch sensitive Methode darstellt und zudem unabhängig von Hybridisierungsbedingungen ist (2.12). Zusätzlich zu dem bereits in Abbildung 3.1 gezeigten Gen *AtMDR4* wurde noch *AtPDR8* ausgewählt. Die Sonde zu diesem Gen ist ebenso absolut spezifisch. Der zugehörige cDNA-Klon 43A12 hat zwei theoretische Kreuzhybridisierungen (Anhang 7.2).

Vergleicht man die absoluten Werte der Genaktivitäten zwischen der spezifischen Sonde und dem cDNA-Klon, so fällt auf, dass die Genaktivität des cDNA-Klons für *AtMDR4* in der Wurzel das 20-fache der spezifischen Sonde beträgt (Abbildung 3.2A und B). Die Genaktivität des cDNA-Klons zu *AtPDR8* ist um den Faktor zwei erhöht (Abbildung 3.2 C und D). Die Gründe für die erhöhte gemessene Genaktivität der cDNA-Klone können zum einen veränderte Hybridisierungsbedingungen, abhängig von der Länge und somit der Schmelztemperaturen zwischen dem fixierten PCR-Produkts und der cDNA-Sonde sein, zum anderen zeigt sich jedoch auch eine Abhängigkeit von der Anzahl der potentiellen Kreuzhybridisierungen. In der RT-PCR wurden für das Gen *AtMDR4* die Oligonukleotide QPCR-ABC-K-f und QPCR-ABC-K-r eingesetzt und für das Gen *AtPDR8* QPCR-ABC-R-f und QPCR-ABC-R-r (Sequenzen siehe Anhang 7.3.1). Die mit dieser Methode bestimmten Werte, die relativ zur detektierten Transkriptmenge des Gens in den unterschiedlichen Organen sind, wurden in Abbildung 3.2 jeweils an die Genaktivität der Wurzel angepasst. Dabei zeigte sich, dass die relativen Expressionshöhen der RT-PCR den Genaktivitäten der spezifischen Sonden entsprechen und die der cDNA-Klone davon sehr stark abweichen. Dies zeigt, dass die Sonden ebenso spezifisch sind wie eine RT-PCR und besser geeignet sind als cDNA-Klone.

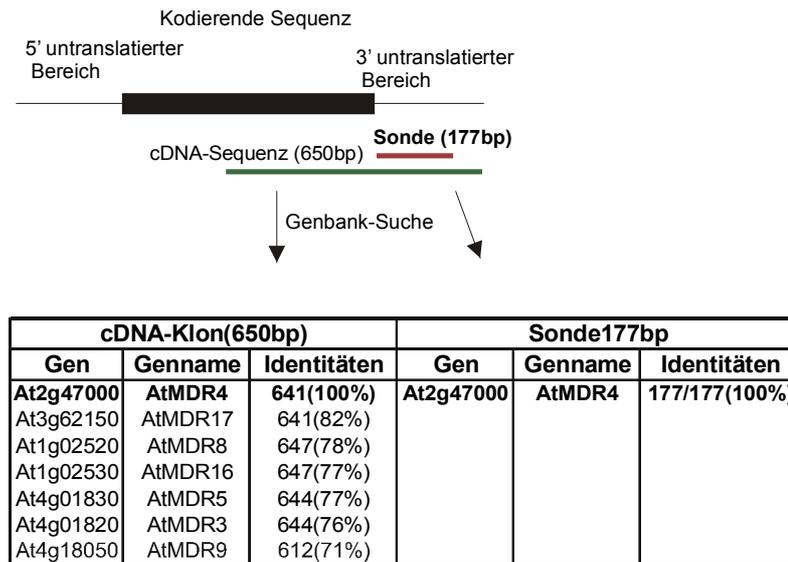


Abb. 3.1: Vergleich einer Genbanksuche zwischen einem cDNA-Klon für *AtMDR4* (178K23) und einer spezifischen Sonde für dasselbe Gen (At2g47000). Grundlage der Datenbank waren die annotierten kodierenden Bereiche ohne Introns (FASTA, MIPS). Schwarz: kodierende Sequenz des gesamten Gens; grün: Sequenzbereich des gesamten cDNA-Klons.

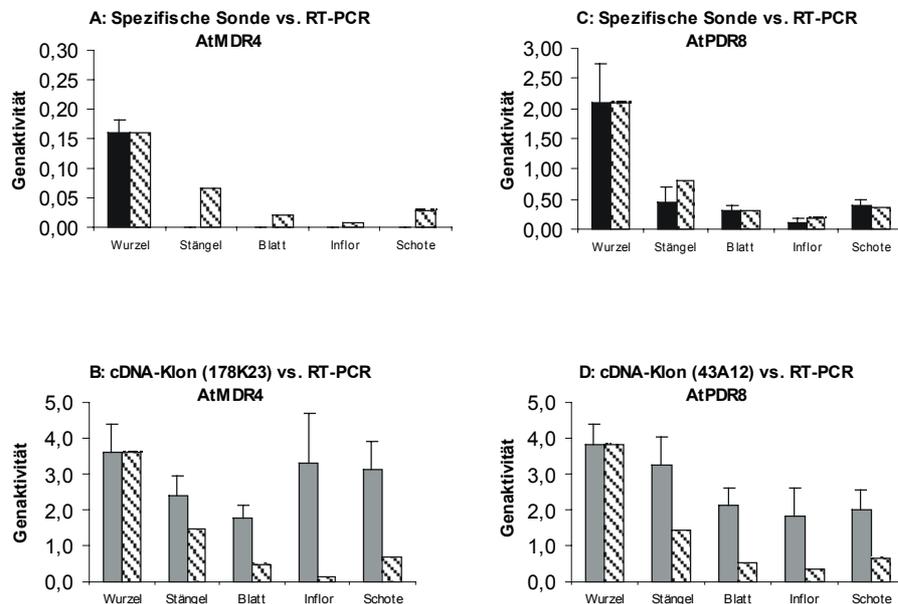


Abb. 3.2: Vergleich der Genaktivitäten von spezifischer Sonde, cDNA-Klon und quantitativer RT-PCR. Der Vergleich wurde für die beiden Gene *AtMDR4* (A, B) und *AtPDR8* (C, D) durchgeführt. Die Genaktivitäten der spezifischen Sonden (A, C; schwarz) und der cDNA-Klone (B (178K23), D (43A12); grau) wurden jeweils mit den relativen Expressionshöhen der quantitativen RT-PCR verglichen (jeweils an die Genaktivität der Wurzel angepasst; diagonal gestreift). Infloreszenz = Blütenstand.

Deswegen wurden alle Sonden zu den ABC-Transporten nach dieser Strategie hergestellt. Alle Sonden stammen aus dem Bereich des letzten Exons und des 3' UTR, die in Datenbankvergleichen daraufhin untersucht wurden, dass keine bzw. möglichst wenige weitere Sequenzen mit hoher Homologie vorhanden sind. Die Oligonukleotide (Tabelle 3.1) wurden ausgewählt und mittels PCR, in der genomische DNA als Matrize eingesetzt wurde, die genspezifischen Bereiche mit einer Länge zwischen 148bp und 480bp amplifiziert (Tabelle 3.2).

Tab. 3.1: Ausgewählte Oligonukleotide zur Amplifizierung der genspezifischen Bereiche. Angegeben sind die Gennamen nach Sánchez-Fernández *et al.* (2001), die Bezeichnungen der Oligonukleotide (abgeleitet von den BAC-Nummern oder von vorläufigen Bezeichnungen) und die Sequenzen.

	Forward-Primer Bezeichnung	Sequenz	Reverse-Primer Bezeichnung	Sequenz
AtMDR1	rtppg1-f	atgcttagtactactactttgg	rtppg1-r	atcaaatctgaaacgtagtcc
AtMDR2	rt227-f	aacaacctaaattaagtactatac	rt227-r	aaattgggtgaaaatacatagc
AtMDR3	rt7138a-f	tagttgacaaacaattgtttcc	rt7138an-r	ttaaattcgggagaaacgac
AtMDR4	rt4411-f	ttgatcttaattatcttttgcc	rt4411-r	ttggatattctgtttgaaacac
AtMDR5	rt7138b-f	taattgacgcaaacattattg	rt7138b-r	tcgtgatgccaccattattc
AtMDR6	rt4218b-f	atcaactgatctaaaagagattgg	rt4218b-r	ttgcttacagaaactaacctggg
AtMDR9	rtal123-f	taattgaattctttgggttgc	rtal123o-r	tcttgttcataattgtgatcc
AtMDR10	ABC_AC009398_f	ctcagatatgataagtgaatacaaa	ABC_AC009398_r	aatcgttactttttccctc
AtMRP1	rtmrp1-f	tgtaaacgatgaaaggcttactactaa	rtmrp1-r	aactctcttttccaaaagaagc
AtMRP2	rtmrp2-f	tgtagataagttcatgttaaactagg	rtmrp2-r	aagtaattctctacttatcacg
AtMRP3	rtu92-f	gtttcgattgaagcaagactc	rtu92-r	aagctataaactaagaacaaaagc
AtMRP4	rt2584-f	aatatgaatctttacgccg	rt2584-r	ttgttgaagtagtgagcg
AtMRP5	rt2411-f	ctggaatccctgaattatgatcc	rt2411-r	tgttcgacagaagagattaaacc
AtMRP7	rtap375c-f	ttgcctgtcgtgtttgttcag	rtap375c-r	aaaagagttcctcgtgaagtcc
AtMRP8	rtap375b-f	aagaagctgataaatcaaatgatcc	rtap375b-r	taagtctatcacgatattggagcc
AtMRP11	rt6225n-f	aacttttcaagctttgtca gacg	rt6225n-r	tctcagttcctaatcaccatcg
AtMRP12	ABC_AC009917_f3	agagggaatggaatgagtcaag	ABC_AC009917_r	ttgaaacaatcaatatattgtagc
AtPDR1	rtpdr2-f	ccaacaacgatagggtgtagtgg	rtpdr2n-r	ctccccacaatctattgtgtg
AtPDR3	rt4680-f	gaagataaaaaagtcctgtggg	rt4680-r	ctataaaaccctaattagagc
AtPDR4	rtpdr1-f	ccagagaagatgatggattgattac	rtpdr1-r	cacaacacaagcttttattgatccc
AtPDR5	rt5896-f	tcaaaaacgatg atcaatcaaa ttc	rt5896-r	gcaaaggttactcaattctc
AtPDR6	rt6919-f	ccaagaaggtgaagaaaac	rt6919-r	gcataatacaagatgaataagg
AtPDR7	rt7591-f	tagataaccactatacactctg	rt7591o-r	ttcttctgttttgattgc
AtPDR8	rt7258n-f	aactccagaccag ataaaacc	rt7258p-r	aaatggactttgagggattgtgg
AtPDR9	ABC_AL132966a_f	gattctgaaagactattttgga	ABC_AL132966a_r	cccattttcttgattgaagg
AtAOH1	ABC_AC002339_f	attctatggcaggaatcgg	ABC_AC002339_r	gcattctctatttgaattag
AtTAP1	rt10796-f	acgatgccgtcttatgattgatcc	rt10796-r	aacaggaaatatagaaacggcagg
AtWBC3	rt5851-f	tagaaaattgggtagataaacacc	rt5851-r	attcatacaatcaaatcatacacg

3.1.1.2 Spezifität der ABC-Transportersonden

Nach Abschluss des Sequenzierungsprojektes von *Arabidopsis thaliana* wurde die Spezifität nochmals überprüft, um auszuschließen, dass neue annotierte Sequenzen dem Kriterium der Kreuzhybridisierung entsprechen könnten. Diese Untersuchung wurde von MIPS automatisiert und dort durchgeführt.

Die Datenbankvergleiche wurden mit Hilfe des FASTA-Algorithmus gegen die kodierenden Sequenzen durchgeführt. Besonders markiert werden sollten die Sequenzen, die eine Homologie über 70% und über 70bp hatten. Da die kodierenden Sequenzen zusätzlich am 5'- und am 3'-Ende 500bp der genomischen Sequenz beinhalteten, kam es bei dem automatisierten Datenbankvergleich zu Angaben von Kreuzhybridisierungen, die aber bei näherer Betrachtung der Abstände der Gene sehr unwahrscheinlich sind. Dazu wurden, wenn möglich, mit Hilfe angegebener cDNA-Klone das Transkriptende des benachbarten Gens bestimmt und der Abstand zur Sonde genau determiniert. Ebenso wurden angegebene Kreuzhybridisierungen mit anderen Genen daraufhin untersucht, inwieweit der Transkriptbereich des angegebenen Gens tatsächlich betroffen war. Zum anderen wurde der Datenbankvergleich gegen die genomischen Sequenzen durchgeführt, um auszuschließen, dass noch nicht annotierte Bereiche oder fehlerhafte Annotierungen dazu führen, dass potentielle Kreuzhybridisierungen übersehen werden. Durch die anschließende Überprüfung der FASTA-Ergebnisse konnten einige der angegebenen Kreuzhybridisierungen ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst und detailliert im Anhang dargestellt (Anhang 7.1.1).

Nach Überprüfung der FASTA-Ergebnisse, gibt es für vier Gene potentielle Kreuzhybridisierungen, die zwischen 70% über 179bp und 79% über 79bp liegen. Dies betrifft die Gene *AtMDR10*, *AtMRP12*, *AtPDR9* und *AtPDR6* (Tabelle 3.2 und Anhang 7.1.1). Die Homologien bestehen jeweils zu anderen ABC-Transportern. Im Experiment konnte die Kreuzhybridisierung für *AtMDR10* ausgeschlossen werden. Die bestehende Homologie von 73% über 235bp zu *AtMDR2* führte nicht zu einem gleichen Expressionsmuster. Während *AtMDR2*, dessen Sonde spezifisch ist, sowohl in Blüten als auch in Schoten detektiert wurde, konnte für *AtMDR10* die Expression nur in der Schote nachgewiesen werden (Abbildung 3.8).

Eine fünfte Sonde, zugehörig zu *AtMDR9*, weist laut der FASTA-Analyse eine Kreuzhybridisierung mit einem benachbarten Gen auf. Die beiden offenen Leserahmen haben einen Abstand von 253bp. Der cDNA-Klon des benachbarten Gens (*At4g18060*) und die Sonde für *AtMDR9* überlappen mit 39bp zu 100%. Da der Bereich sehr kurz ist, sollte bei stringenten Hybridisierungsbedingungen keine Kreuzhybridisierung auftreten.

Alle anderen 23 Sonden wiesen keine weiteren Homologien über 70% und 70bp auf.

Tab. 3.2: Untersuchte ABC-Transporter auf dem Detox-Array. Angegeben sind die Gennamen nach Sánchez-Fernández *et al.* (2001); die Kurzbezeichnungen (Bez.); der offizielle MIPS-Code; die ursprünglichen BAC-Namen angelehnt an MIPS (M) mit der Ausnahme von zwei Genen, die nach Angaben von NCBI benannt wurden; die BAC Accession-Nummer und die Sondenlänge. Zusätzlich wurden die potentiellen Kreuzhybridisierungen mit Genen der eigenen Genfamilie (EGF) und mit Genen anderer Genfamilien (FGF) zusammengefasst.

Gennamen	Bez.	MIPS-Code	BAC-Name (M)	BAC-Acc.	Sondenlänge	x mit EGF	x mit FGF
AtMDR1	ABC-H	At2g36910	T1J8.9	AC006922	174	-	-
AtMDR2	ABC-J	At4g25960	F20B18.70	AL049483	197	-	-
AtMDR3	ABC-G	At4g01820	T7B11.8	AC007138	181	-	-
AtMDR4	ABC-K	At2g47000	F14M4.17	AC004411	177	-	-
AtMDR5	ABC-I	At4g01830	T7B11.9	AC007138	168	-	-
AtMDR6	ABC-L	At2g39480	F12L6.14	AC004218	198	-	-
AtMDR9	ABC-T	At4g18050	F15J5.20	AL110123	169	-	x
AtMDR10	ABC-AB	At1g10680	F20B24.12	AC009398	345	x	-
AtMRP1	ABC-N	At1g30400	T4K22.12	AC025295	148	-	-
AtMRP2	ABC-M	At2g34660	T29F13.13	AC003096	166	-	-
AtMRP3	ABC-P	At3g13080	MJG9.2	AP000375	165	-	-
AtMRP4	ABC-Q	At2g47800	F17A22.19	AC005309	177	-	-
AtMRP5	ABC-O	At1g04120	F20D22.11	AC002411	212	-	-
AtMRP7	ABC-W	At3g13100	MJG19.5(NCBI)	AP000375	201	-	-
AtMRP8	ABC-V	At3g13090	MJG19.4(NCBI)	AP000375	301	-	-
AtMRP11	ABC-U	At2g07680	T5E7.1	AC006225	230	-	-
AtMRP12	ABC-AD	At1g30420	F26G16.1	AC009917	248	x	-
AtPDR1	ABC-A	At3g16340	T02o04.17	AC001645	154	-	-
AtPDR3	ABC-E	At2g29940	F23F1.14	AC004680	170	-	-
AtPDR4	ABC-B	At2g26910	F12C20.5	AC005168	176	-	-
AtPDR5	ABC-D	At2g37280	F3G5.7	AC005896	189	-	-
AtPDR6	ABC-F	At2g36380	F1o11.1	AC006919	184	x	-
AtPDR7	ABC-S	At1g15210	F9L1.15	AC007591	175	-	-
AtPDR8	ABC-R	At1g59870	F23H11.19	AC007258	239	-	-
AtPDR9	ABC-AE	At3g53480	F4P12.180	AL132966	480	x	-
AtAOH1	ABC-Z	At2g41700	T11A7.20	AC002339	344	-	-
AtTAP1	ABC-X	At1g70610	F5A18.21	AC010796	199	-	-
AtWBC3	ABC-Y	At2g28070	F24D13.14	AC005851	209	-	-

3.1.1.3 Genfamilien des Detox-Arrays

Die auf dem Detox-Array vertretenen Genfamilien sind vermutlich an der Detoxifizierung von Xenobiotika beteiligt. Die Sonden für die drei anderen Genfamilien wurden von Kooperationspartnern nach den gleichen Kriterien hergestellt wie die Sonden der ABC-Transporter.

Die Genfamilie der Cytochrom P450 Monooxygenasen ist mit einer Auswahl von 65 genspezifischen Sonden vertreten, die von Danièle Werck-Reichhart aus Strasbourg kloniert wurden. Felix Mauch aus Fribourg stellte 62 genspezifische Sonden zur Verfügung, die die Genfamilien der Glutathion-abhängigen Enzyme komplett abdecken. Auch die Genfamilie der UDP-Glycosyltransferasen ist nahezu vollständig mit 115 genspezifischen Sonden auf dem

Array vertreten. Diese Sonden wurden von Sigrun Wegener und Oliver Thulke (GSF, München) hergestellt. Die FASTA-Analysen zur Überprüfung der Spezifität dieser Sonden ist hier nur für diejenigen durchgeführt worden, die nach Xenobiotika-Behandlung deutliche Verschiebungen der Transkriptmenge anzeigten. Eine Zusammenfassung ist der Tabelle 3.4 zu entnehmen und eine detaillierte Darstellung dem Anhang (7.1.2-7.1.4).

Somit bestand der Detox-Array zum Zeitpunkt der in dieser Arbeit dargestellten Versuche aus 270 genspezifische Sonden, die eine Untersuchung des Expressionsprofils dieser vier potentiell am Detoxifizierungsmechanismus beteiligten Genfamilien ermöglichen.

Von Enrico Martinoia aus Neuchâtel wurden 2 cDNA-Klone zur Verfügung gestellt, die in Einzelfällen zu Vergleichszwecken herangezogen wurden.

3.1.2 Herstellung der genspezifischen Sonden

Bei der Herstellung der Sonden sollte zum einen ein Verfahren entwickelt werden, mit dem die Sonden in einem Hochdurchsatzverfahren hergestellt werden können. Dabei sollte die Herstellung möglichst effizient durchführbar und die Ausbeute der PCR sollte möglichst konstant sein. Die Übertragung der PCR-Produkte auf die Membran und deren Hybridisierung sollte Signale ergeben, deren Qualität eine zuverlässige Auswertung ermöglichte.

3.1.2.1 Herstellung im Hochdurchsatzverfahren und Qualitätskontrolle

In Abbildung 3.3 ist die Herstellung der Sonden, die letztendlich auf die Membranen übertragen wurden, schematisch dargestellt. Die genspezifischen PCR-Produkte wurden in den pGEM-T Easy Vektor (Promega) kloniert. Dadurch konnte die Amplifizierung aller Sonden mit nur einem Oligonukleotidpaar (M13(22)-f und M13(25)-r) in einer einzigen PCR-Reaktion („Erste Runde“) durchgeführt werden. Nach der Kontrolle in einem Agarosegel und einer Verdünnung wurden diese PCR-Produkte wiederum als Matrize verwendet. Die Oligonukleotide T7 und Sp6 wurden in der „zweiten Runde“ verwendet (2.11.3) (alle Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang unter 7.3.5 aufgeführt). Diese Oligonukleotide sind ebenfalls vektorspezifisch, aber in Richtung des inklonierten Fragments eingerückt („*nested*“ PCR). Die so amplifizierten genspezifischen Sonden, wurden konzentriert und gereinigt und nochmals auf einem Agarosegel überprüft (Abbildung 3.2).

Dieses Verfahren hatte mehrere Vorteile:

- 1.) Durch die Verdünnung der PCR-Produkte aus der „ersten Runde“ konnte diese mehrfach in der „zweiten Runde“ eingesetzt werden.
- 2.) Die Amplifizierung aller Sonden erfolgte in beiden Runden jeweils mit nur einem Oligonukleotidpaar in einer gemeinsamen PCR-Reaktion.
- 3.) Die Ausbeute der PCR-Produkte wurde dadurch erhöht und war gleichmäßiger als nach der „ersten Runde“ PCR.
- 4.) Eine Kontamination benachbarter Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden so weitgehend vermieden.
- 5.) Alle PCR-Produkte enthalten eine gemeinsame Sequenz, die eine Hybridisierung mit einem Oligonukleotid ermöglicht, um die Qualität und Quantität der PCR-Produkte auf der Membran zu überprüfen.

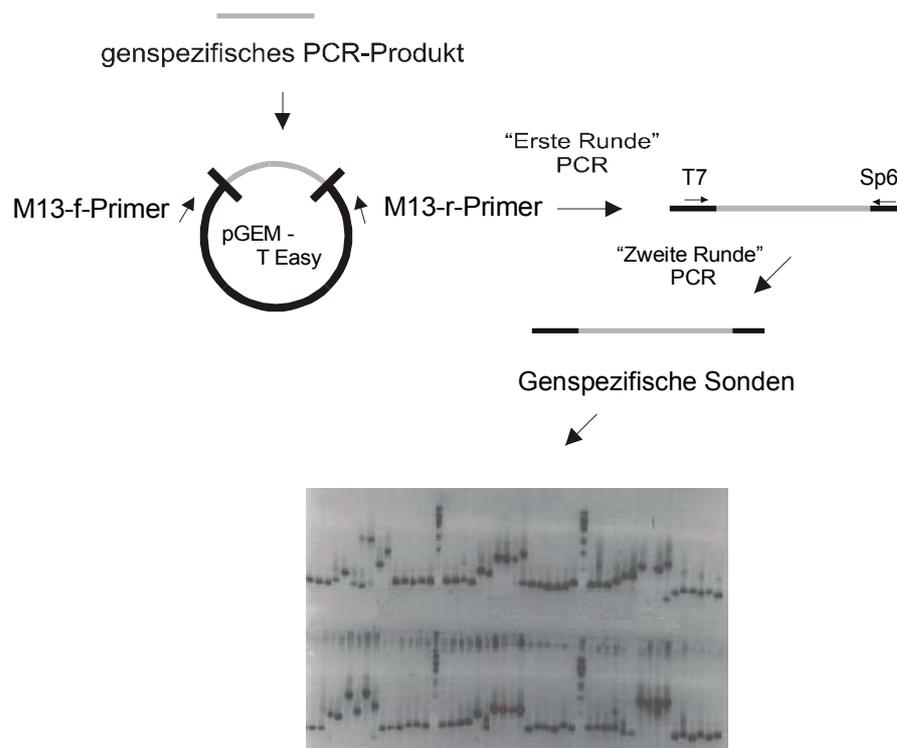


Abb. 3.3: Prinzip der Herstellung genspezifischer Sonden. Nach der Subklonierung des genspezifischen PCR-Produkts, fanden zwei Runden PCR statt, die eine gleichmäßig hohe Ausbeute an PCR-Produkten ermöglichte. Diese sind im unteren Teil der Abbildung, exemplarisch für eine Mikrotiterplatte nach der „zweiten Runde“ PCR gezeigt (invertierte Darstellung der Ethidiumbromid-Fluoreszenz).

3.1.2.2 Qualitätsvergleich der PCR-Produkte

Um eine gleichbleibende Qualität der auszuwertenden Signale zu gewährleisten, wurde der Einfluss des PCR-Reaktionspuffers und der Reinigungsmethode der Sonden untersucht. Neben dem Taq-Polymerase-Puffer von Appligene (A) wurde auch der Puffer von Hybaid (H) getestet. Der Unterschied der Puffer bestand im Wesentlichen in der Konzentration der Detergenzien. Während der Appligene-Puffer 0,1% Triton X-100 enthält, beträgt die Konzentration für Tween 20 in dem Hybaid-Puffer nur 0,01%. Jedes der drei PCR-Produkte wurde je viermal mit einem der beiden 10x Reaktionspuffer hergestellt und diese dann mit vier verschiedenen Methoden gereinigt und konzentriert (siehe 2.11.3.4 und Abbildung 3.4).

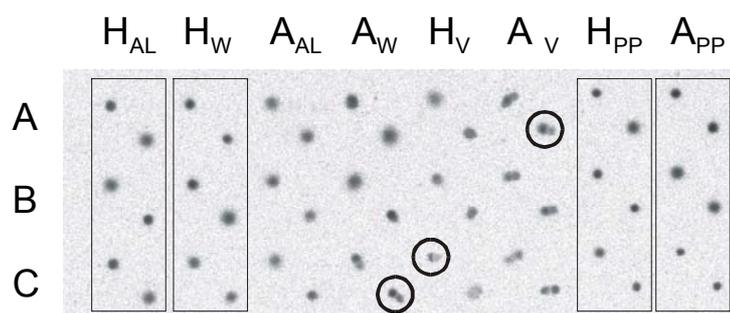


Abb. 3.4: Qualitätsvergleich der PCR-Produkte drei verschiedener genspezifischer Sonden (A, B und C, je doppelt aufgetragen). Nach Amplifizierung in Appligene-Puffer (A) und in Hybaid-Puffer (H) und nach Konzentration mit vier verschiedenen Methoden: 1. Filtration über MultiScreen PCR[®]-Platten (Millipore) und Resuspension in Array-Link-Puffer (GeneScan) (AL). 2. Filtration über MultiScreen PCR[®]-Platten (Millipore) und Resuspension in bidest. Wasser (W). 3. Eintrocknung unter Vakuum und Aufnahme in bidest. Wasser (V). 4. Reinigung über „*QIAquick PCR Purification Kit*“ und Aufnahme in EB-Puffer (PP) (2.11.3.4). PCR-Produkte wurden auf Membran übertragen und mit radioaktiv markiertem T7-Oligonukleotid hybridisiert. Eingezeichnet sind Beispiele von PCR-Produkten mit schlechter Qualität.

Es zeigte sich, dass die Qualität der Signale sehr stark von dem Detergenziengehalt des PCR-Reaktionspuffers abhing. So sind bei den PCR-Produkten, die mit Appligene-Puffer hergestellt und entweder über die MultiScreen PCR[®]-Platte (Millipore) filtriert und mit bidest. Wasser resuspendiert oder unter Vakuum getrocknet und in bidest. Wasser gelöst wurden, entweder verlaufene oder doppelte Signalpunkte zu erkennen. Solche Signale zeigten sich auch in schwächerer Form bei den in Appligene-Puffer hergestellten PCR-Produkten, die nach der Filtration in der MultiScreen PCR[®]-Platte (Millipore) in Array-Link-Puffer (GeneScan) aufgenommen wurden oder bei den PCR-Produkten, deren Reaktion in Hybaid-Puffer stattfand und lediglich nach Trocknung in geringerem Volumen bidest. Wasser aufgenommen wurden. Deutliche Qualitätssteigerung der Signale sind bei den PCR-Produkten zu erkennen, die unabhängig vom verwendeten Puffer mit dem „*QIAquick PCR purification Kit*“ gereinigt wurden. Hierbei kommt es durch die spezifische Bindung der DNA an die Silica-Matrix auch zu einer Abtrennung der Detergenzien. Gleiche Qualität der Signale sind bei der Verwendung von Hybaid-Puffer und der Filtration über die MultiScreen PCR[®]-Platte (Millipore) zu erkennen, jedoch unabhängig davon, ob in Wasser oder in Array-Link-Puffer resuspendiert wurde.

Obwohl die Signale nach der Aufreinigung mit dem „*QIAquick PCR purification Kit*“ unabhängig vom verwendeten Puffer sehr gut waren, wurde sich für das weitere Vorgehen gegen dieses Verfahren entschieden, da es sehr zeit- und kostenaufwendig ist, die PCR-Produkte im 96er Mikrotiterplattenformat mittels dieser Methode zu reinigen und zu konzentrieren. Es wurde sich grundsätzlich gegen die Verwendung des Appligene-Puffers entschieden und nur noch der Taq-Polymerase-Puffer von Hybaid verwendet. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte über die MultiScreen PCR[®]-Platten (Millipore) und aus denen sie dann mit bidest. Wasser resuspendiert wurden.

3.1.3 Normalisierungsstrategie der erhobenen Daten

Ein grundsätzliches Problem der Arrays ist, dass die übertragenen DNA-Mengen des gleichen PCR-Produkts zwischen den Membranen variiert. Da die Signalintensitäten zum einen von der übertragenen DNA-Menge abhängen [Kloska, not published #557] und zum anderen die Signale mindestens zweier verschiedener Membranen miteinander verglichen werden, stellte dies ein Problem dar. Am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie (Golm) wurde für diesen Zweck die „Haruspex“-Datenbank entwickelt. Um Verrechnungen über die Datenbank laufen lassen zu können, müssen zunächst die Daten einer Referenzhybridisierung mit dem Oligonukleotid T7 aufgenommen werden. Nach Entfernen der Oligonukleotide wird auf der gleichen Membran die komplexe Hybridisierung durchgeführt (Abbildung 3.5). Die Daten beider Hybridisierungen werden in der Datenbank miteinander verrechnet („volle Normalisierung“). Werden diese Ergebnisse von zwei zu vergleichenden Behandlungen miteinander verrechnet, so haben die Unterschiede der aufgetragenen DNA-Mengen keinen maßgeblichen Einfluss auf das Ergebnis (2.11.5-2.11.7).

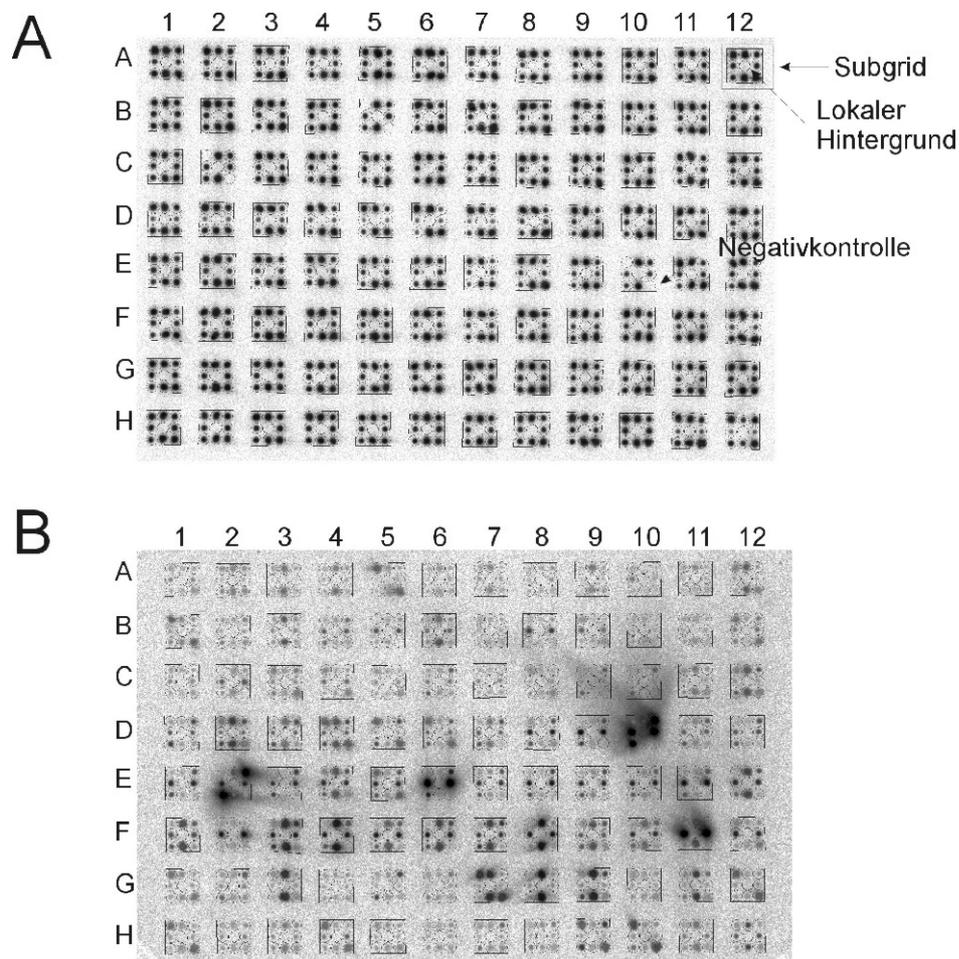


Abb. 3.5: Filter mit aufgetragenen PCR-Produkten nach Durchführung der Hybridisierungen. A: Referenzhybridisierung mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid (2.11.5); B: Komplexe Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA aus Blattmaterial. (2.11.6). Positionen A-H und 1-12 entsprechen den Positionen der Mikrotiterplatte, aus denen die PCR-Produkte stammen. In dem „Subgrid“ sind jeweils die PCR-Produkte aus 4 Mikrotiterplatten je zweimal aufgetragen. Die mittlere Position jedes „Subgrids“ bleibt ohne PCR-Produkt und dient zur Verrechnung des Lokalen Hintergrunds.

Um die Reproduzierbarkeit der Hybridisierungen und den Einfluss der Normalisierungsstrategie über die „Haruspex“-Datenbank zu untersuchen, wurden die Signalintensitäten von zwei Filtern miteinander verglichen, mit denen zunächst eine Referenzhybridisierung und anschließend eine komplexe Hybridisierung von zwei unabhängigen Blatternten durchgeführt wurde. Für die Darstellungen in Abbildung 3.6 wurden 125 Gene ausgewählt, deren Signalintensität in allen Fällen deutlich über dem lokalen Hintergrund lagen.

Gegeneinander aufgetragen in Abbildung 3.6 sind jeweils die Genaktivitäten der 125 ausgewählten Gene aus zwei verglichenen Datensätzen. Angegeben wird jeweils die Gleichung der Regressionsgeraden und das Bestimmtheitsmaß (R^2). Ist die Steigung der Regressionsgeraden gleich „eins“, so sind die gemessenen Genaktivitäten beider Datensätze gleich. Abweichungen entstehen zum Beispiel durch unterschiedliche Effizienz der radioaktiven Markierungen. Das Bestimmtheitsmaß ist ein Maß für die Streuung zweier Datensätze von der Regressionsgeraden. Ist das Bestimmtheitsmaß gleich „eins“, so liegen die verglichenen Genaktivitäten derselben Signalpunkte von zwei verschiedenen Datensätzen alle auf der Regressionsgeraden. Abweichungen sind in diesem Fall ein Zeichen für unterschiedlich aufgetragene DNA-Mengen.

In den Diagrammen A und E der Abbildung 3.6 wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der doppelt aufgetragenen PCR-Produkte auf demselben Filter miteinander verglichen. Da sämtliche versuchsabhängigen Parameter für die benachbarten Punkte konstant sind, sind die Abweichungen des Bestimmtheitsmaßes von dem Wert Eins nur auf die Fluktuation der Auftragsvolumina der PCR-Produkte auf die Membran zurückzuführen. Obwohl die Übertragung derselben PCR-Produkte auf die benachbarten Positionen mit derselben Nadel des 96er Stempels erfolgt (2.11.4.1), beträgt das Bestimmtheitsmaß für die beiden Referenzhybridisierungen nur 0,9 und für die komplexen Hybridisierungen 0,92. Die Steigung der Trendlinie, ein Maß für die Korrelation der Genaktivitäten beider Datensätze, ist erwartungsgemäß nahezu gleich eins.

Betrachtet man jeweils nur einen Punkt der doppelt aufgetragenen PCR-Produkte, aber auf zwei unterschiedlichen Filtern (Diagramme B und F, Abbildung 3.6), so ergeben sich Abweichungen für die Steigung der Trendlinie, da die Gesamtintensitäten der beiden Hybridisierungen voneinander abweichen. Das Bestimmtheitsmaß der komplexen Hybridisierung vermindert sich auf 0,84. Zusätzlich zu der Varianz der aufgetragenen PCR-Produktmenge, addiert sich hier der Effekt der Effizienz der radioaktiven Markierung der cDNA.

Das Bestimmtheitsmaß wird durch den doppelten Auftrag der PCR-Produkte auf einen Filter und der Berechnung der Mittelwerte verbessert (Diagramme C und G). Da diese Maßnahme jedoch keinen Einfluss auf die radioaktive Gesamtaktivität der einzelnen Hybridisierungen hat, bleibt die Steigung der Trendlinie ähnlich wie in den Diagrammen B und F.

Die interne Normalisierung, die in der Datenbank „Haruspex“ automatisch erfolgt (2.11.7), beinhaltet die Verrechnung des lokalen Hintergrundwertes, sowie die Division jedes einzelnen Punktes durch den Mittelwert der Signalintensität aller Punkte. Außerdem wird der Mittelwert der doppelt aufgetragenen PCR-Produkte gebildet (Diagramme D und H). Da durch diese Verrechnung Unterschiede in der Gesamtaktivität berücksichtigt werden, nähert sich die Steigung der Trendlinie wieder dem Wert Eins.

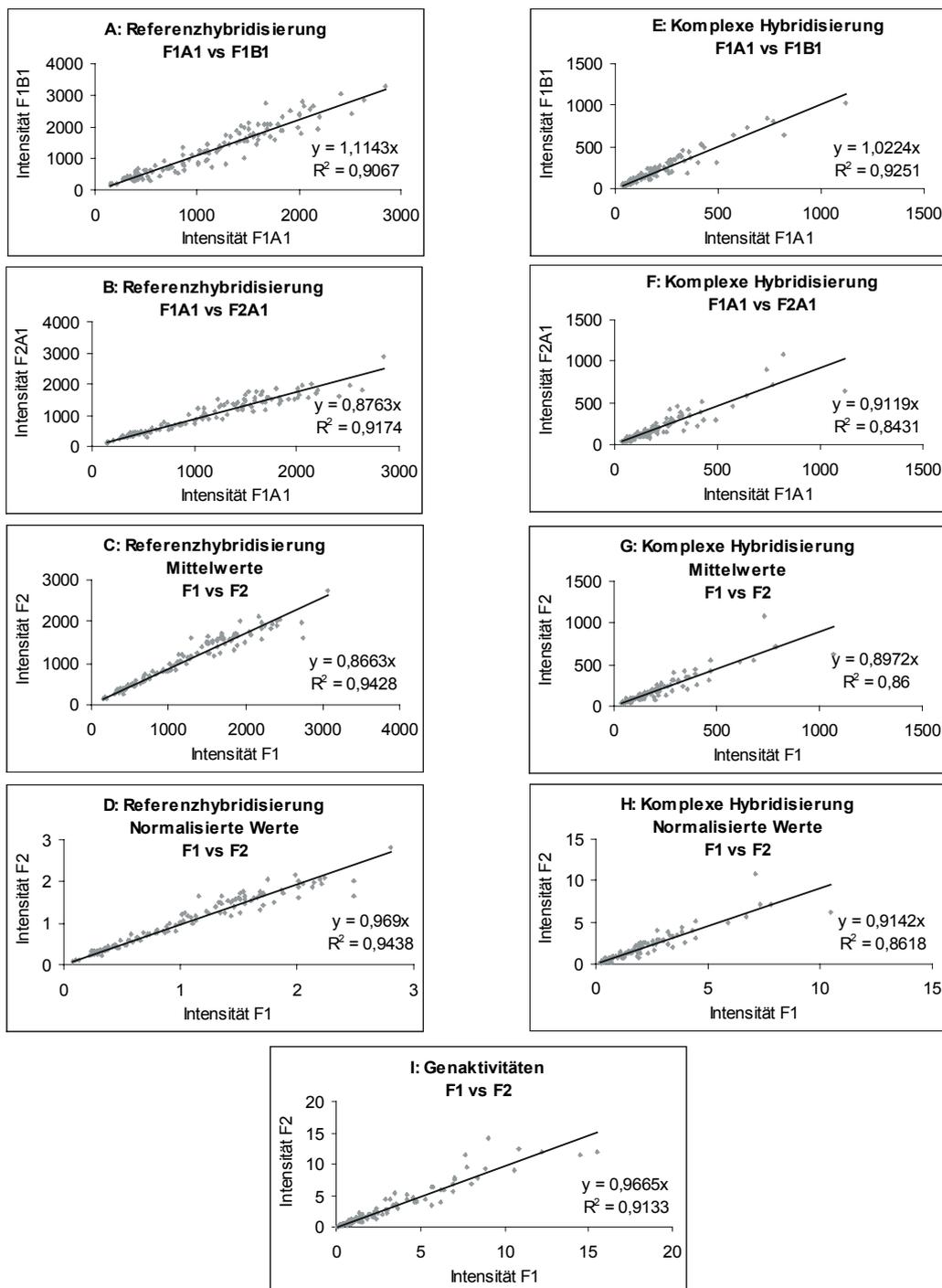


Abb. 3.6: Reproduzierbarkeit und Einfluss der Normalisierungsstrategie. Vergleich zweier Hybridisierungen anhand einer Auswahl von 125 Genen (A-D: Referenzhybridisierung; E-H: Komplexe Hybridisierung). Vergleich der Intensitäten der doppelt aufgetragenen PCR-Produkte auf einem Filter (A;E), Intensitäten je einer Position im Vergleich von zwei Filtern (B,F), berechnete Mittelwerte der doppelt aufgetragenen PCR-Produkte auf zwei Filtern (C;G), Vergleich der intern normalisierten Werte (D;H), vollständig normalisierte Werte von zwei Filtern (I). F1: Filter1; F2: Filter2; A1 und B1: jeweilige Positionen der doppelt aufgetragenen PCR-Produkte; R^2 : Bestimmtheitsmaß.

Dem Phänomen, dass die Signalintensität von der Menge der aufgetragenen PCR-Produkte abhängig ist (Diagramme A und E), kann durch die vollständige Normalisierung Rechnung getragen werden (2.11.7). In diesem Schritt erfolgt die Division der intern normalisierten Werte der komplexen Hybridisierung durch die der Referenzhybridisierung. Unterschiede in den aufgetragenen DNA-Mengen werden dadurch verrechnet. Dies zeigt sich deutlich in Diagramm I der Abbildung 3.6, in der die Genaktivitäten der beiden Filter miteinander verglichen werden. Die Steigung der Trendlinie nähert sich dem Wert Eins und auch das Bestimmtheitsmaß steigt von 0,86 (Diagramm H) auf 0,91.

Die genauere Betrachtung zweier komplexer Hybridisierungen macht deutlich, dass die doppelte Auftragung der PCR-Produkte auf eine Membran und der Bezug auf eine Referenzhybridisierung erheblich zur Reproduzierbarkeit der Versuche beiträgt. Da hier nur die Summe für 125 Gene betrachtet wurde, kann dies im Einzelfall, in dem die aufgetragene DNA-Menge tatsächlich hohen Schwankungen unterlag, eine noch höhere Bedeutung haben. Daher wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche mittels dieser Normalisierungsstrategie ausgewertet. Zusätzlich wurden alle Experimente in drei unabhängigen Versuchsansätzen wiederholt.

3.1.4 Sensitivität des Detox-Arrays

Die Qualität eines DNA-Arrays ist neben der Spezifität (siehe 3.1.1.2) auch von der Sensitivität des Systems abhängig. Um diese messen zu können, wurden zusätzlich zu den spezifischen Gensonden auch Sonden hergestellt, die die Transkripte einer synthetischen RNA detektieren können. Zu der von Applied Biosystems vertriebenen synthetischen RNA *pAW109* wurden drei Sonden hergestellt, die 100, 200 und 300bp lang waren. Diese ausgewählten Längen decken im Wesentlichen den Bereich ab, der auch für die genomischen Sonden verwendet wurde. Diese Sonden wurden ebenfalls in den Vektor pGEM T-Easy kloniert und zusammen mit den genomischen Sonden amplifiziert und auf die Nylonmembranen übertragen.

Um unter realen Testbedingungen zu arbeiten wurden unterschiedliche Mengen an *pAW109*-RNA zur pflanzlichen RNA zugegeben (2.11.6). Dieser Versuch wurde von Matthias Affenzeller in unserem Labor durchgeführt. Die Auswahl der zugegebenen Mengen erfolgte aufgrund folgender Überlegungen:

Geht man davon aus, dass 2% der Gesamt-RNA messenger-RNA ist, so ist in 30µg Gesamt-RNA 600ng mRNA enthalten. Sind von den 25.000 Genen in *Arabidopsis thaliana* ca. 1/3 der Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiv, so gibt es ca. 10.000 unterschiedliche Transkriptspezies in der mRNA. Bei einer durchschnittlichen Transkriptlänge von 1200b enthalten die 600ng mRNA ca. 1×10^{12} Transkripte. Somit ergeben sich pro durchschnittlich transkribiertem Gen ca. 1×10^7 Transkripte. Um die Nachweisgrenze zu untersuchen, wurden von der synthetischen RNA zu drei verschiedenen RNA-Präparationen 20×10^6 , 50×10^6 und 100×10^6 Transkripte zugegeben. Nach Auswertung der komplexen Hybridisierung ergab sich für die Genaktivitäten der drei verschiedenen Transkriptmengen und der drei verschiedenen Längen der Sonden das in Abbildung 3.7 gezeigte Bild.

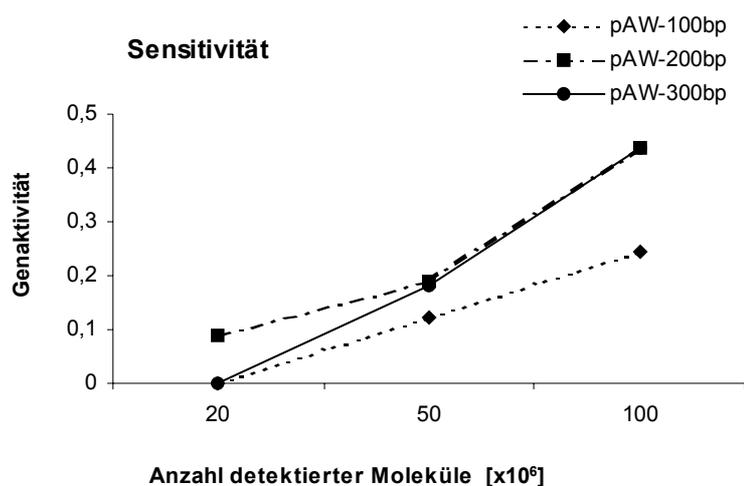


Abb. 3.7: Abhängigkeit der Signalstärke von Transkriptmenge und Sondenlänge. 20×10^6 , 50×10^6 und 100×10^6 Kopien der synthetischen RNA *pAW109* (Applied Biosystems) wurden zu $30 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA zugegeben und die Genaktivitäten der drei 100, 200 und 300bp langen Sonden ermittelt (2.11.6) (Durchführung des Versuchs: Matthias Affenzeller).

Unabhängig von der Länge der Sonde, konnten 50×10^6 Kopien der synthetischen RNA nachgewiesen werden, während der Nachweis von 20×10^6 Kopien nicht reproduzierbar war. Der Nachweis von 50×10^6 Kopien der synthetischen RNA erfolgte nach Zugabe zu 1×10^{12} Transkripten mRNA, so dass die Detektionsgrenze bei $1/20.000$ liegt. Eine Abhängigkeit der Signalstärke von der Sondenlänge, zeigte sich nur zwischen 100bp und 200bp. Durch die Verlängerung der Sonde um weitere 100bp konnte keine Verstärkung des Signals mehr beobachtet werden.

3.2 Organspezifische Expression der ABC-Transporter

Von den 28 ABC-Transportern, die auf dem Detox-Array vertreten sind, wurde zunächst die organspezifische Expression untersucht. Die Kenntnis der organspezifischen Expression jedes einzelnen ABC-Transporters stellt eine wichtige Basis für alle sich anschließenden Funktionsuntersuchungen dar. Um einen möglichst guten Überblick zu bekommen, wurde die Expression der 28 ABC-Transporter in den fünf Organen Blatt, Blütenstände, Wurzel, Schote und Stängel untersucht. Das dafür verwendete Pflanzenmaterial stammte aus hydroponischen Kulturen (2.11.1). Die Blätter und Wurzeln wurden nach 21 Tagen geerntet. Blütenstände und Stängel nach 5 Wochen und Schoten nach 6 Wochen. Die Durchführung dieses Versuchs erfolgte zusammen mit Matthias Affenzeller.

Von den 28 untersuchten ABC-Transportern, konnten 27 auf Transkriptebene in mindestens einem der untersuchten Organe nachgewiesen werden, sechs davon in allen fünf Organen. Auffällig ist, dass 25 in der Wurzel nachgewiesen werden konnten, während im Gegensatz dazu nur sieben im Blatt detektiert wurden. Die anderen drei Organe sind mit 11 Nachweisen

im Stängel, 13 in der Blüte und 14 in der Schote mittelmäßig häufig vertreten. Möglicherweise spielt hier eine Rolle, dass in der Wurzel die Gene mit sehr hohen Transkriptmengen wie Ribulosebisphosphat-Carboxylase und Gene des Lichtsammelkomplexes nicht vorhanden sind. Aufgrund der verminderten Konkurrenz können andere Transkripte in der Wurzel leichter nachgewiesen werden. Dieser Punkt liefert aber nicht nur in diesen Experimenten ein möglicherweise verzerrtes Bild der organspezifischen Expression, sondern ebenso in konventionellen Methoden wie Northern-Blot und RT-PCR.

Neun Mitglieder der **Subfamilie MRP** waren in dieser Untersuchung eingeschlossen, die alle in mindestens einem der Organe nachgewiesen werden konnten. Die höchste Expression wurde für *AtMRP12* in der Wurzel detektiert, die dort ca. 10 mal höher war als in den anderen Organen und als die durchschnittlich detektierte Transkripthöhe der anderen MRP-Mitglieder. Für diese Sonde gibt es allerdings eine potentielle Kreuzhybridisierung mit *AtMRP13*, die mit 88% über 197bp auch relativ hoch ist (Tabelle 3.1; Anhang 7.1). Ungefähr fünfmal höher war die Expression von *AtMRP5* in der Schote im Vergleich zu der ansonsten in dieser Subfamilie im Durchschnitt detektierten Genaktivität (Abbildung 3.8A).

Während alle untersuchten Mitglieder dieser Subfamilie in der Wurzel detektiert werden konnten, konnte die Expression im Blatt nur für *AtMRP12* gezeigt werden.

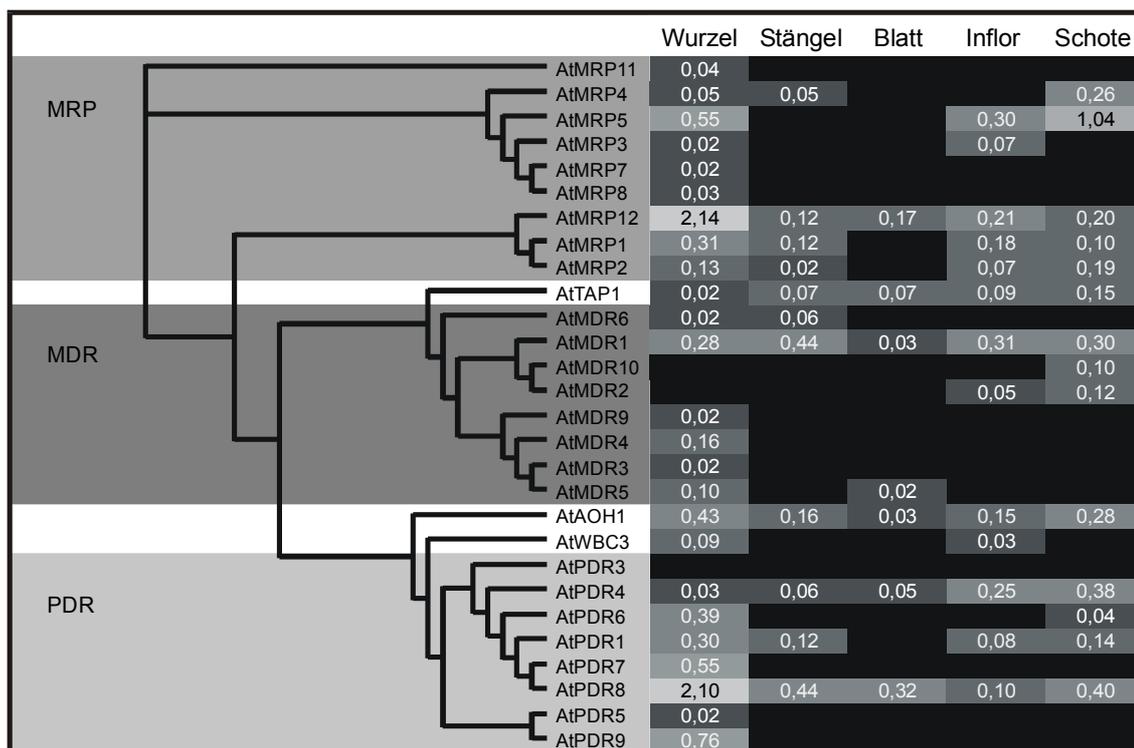


Abb. 3.8: Organspezifische Expression und phylogenetischer Stammbaum der 28 untersuchten ABC-Transporter. Die Zahlen geben einen relativen Wert zur Expressionshöhe an (Genaktivität; Berechnung siehe 2.11.7). Je heller die Grauschattierung mit denen die Zahlen unterlegt sind, desto höher die Expression. Schwarz: keine Expression nachgewiesen. Die drei Subfamilien, von denen mehr als ein Mitglied untersucht wurde, sind extra gekennzeichnet (MRP: *multidrug resistance associated protein*; MDR: *multidrug resistance protein*; PDR: *pleiotropic drug resistance*). Die Standardabweichungen sind der Abbildung 7.1 im Anhang zu entnehmen.

Von den untersuchten 9 Mitgliedern dieser Subfamilie wurden bereits 5 (*AtMRP1-5*) experimentell in Northern-Experimenten oder mit Hilfe von Reporter-Gen-Konstrukten nachgewiesen (Gaedeke *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1997; Sanchez-Fernandez, 1998; Tommasini *et al.*, 1998; Tommasini *et al.*, 1997).

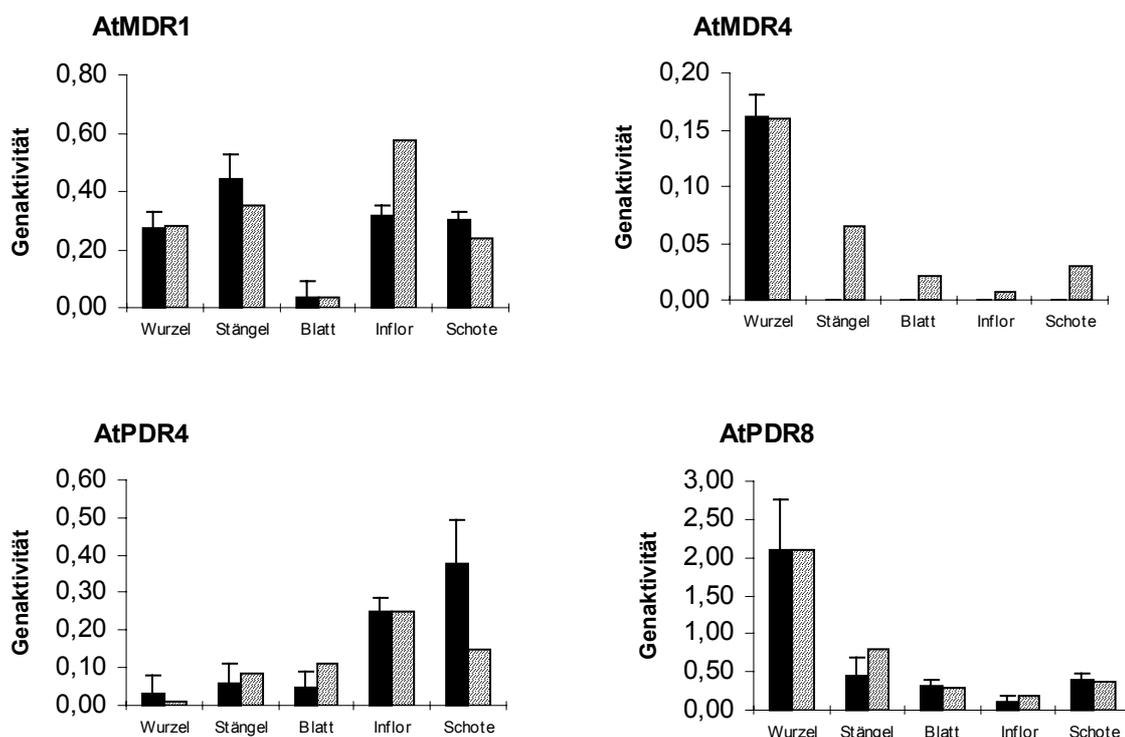


Abb. 3.9: Bestätigung ausgewählter Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR. Die relativen Werte der quantitativen RT-PCR (diagonal gestreift) wurden zur besseren Vergleichbarkeit an die Genaktivitäten (schwarz) der Wurzel angepasst. Genaktivitäten geben Werte relativ zur Expressionshöhe an (Berechnung siehe 2.11.7).

Alle acht untersuchten Mitglieder der **Subfamilie MDR** sind in mindestens einem der fünf Organe exprimiert. *AtMDR1*, dessen Expression bereits zuvor in Reporter-Gen-Konstrukten gezeigt wurde (Sidler *et al.*, 1998), konnte als einziger in allen fünf Organen nachgewiesen werden, wobei die schwächste Expression im Blatt und die höchste im Stängel zu finden war. Allerdings sind die Expressionsunterschiede in Wurzel, Stängel, Blüte und Schote nur minimal. In einer semi-quantitativen RT-PCR konnten die relativen Transkripthöhen in den Organen im Wesentlichen reproduziert werden. Auch hier zeigte sich die niedrigste Expression im Blatt und eine deutlich höhere Expression in den anderen vier Organen. Allerdings konnte die höchste Expression im Stängel hier nicht bestätigt werden (Abbildung 3.9). Neben *AtMDR1* konnte nur für *AtMDR5* die Expression im Blatt gezeigt werden. Auch hier zeigte die RT-PCR, dass zumindest *AtMDR4* ebenso im Blatt transkribiert wird. Dieses Gen ist jedoch eindeutig am höchsten in der Wurzel exprimiert (Abbildung 3.2, 3.8 und 3.9).

Die nahe verwandten Gene *AtMDR2* und *AtMDR10* konnten nur in den Reproduktionsorganen nachgewiesen werden.

Von den sieben untersuchten Vertretern der **Subfamilie der PDR**, konnte nur *AtPDR3* in keinem der untersuchten Organe nachgewiesen werden. Die sechs anderen sind in der Wurzel transkribiert, wobei *AtPDR8*, *AtPDR7* und *AtPDR9* relativ hoch in der Wurzel exprimiert sind. *AtPDR4* und *AtPDR8* konnten in allen Organen nachgewiesen werden, wobei *AtPDR4* die höchste Expression in der Schote zeigte. Auch für diese beiden Gene konnten die relativen Transkripthöhen im Wesentlichen in einer semi-quantitativen RT-PCR reproduziert werden (Abbildungen 3.9 und 3.2). Lediglich die hohe Expression von *AtPDR4* in der Schote konnte mit der unabhängigen Methode nicht bestätigt werden. *AtPDR1* wurde, außer im Blatt, in allen vier anderen Organen eindeutig transkribiert.

Die jeweils einer Subfamilie zugehörigen Gene, *AtTAP1*, *AtWBC3* und *AtAOH1*, wurden durchgehend in der Wurzel und in der Blüte exprimiert. *AtTAP1* und *AtAOH1* wurden zusätzlich auch in allen drei anderen Organen nachgewiesen.

Expressionsmuster, die sich mit der Zugehörigkeit zu Subfamilien korrelieren lassen, ließen sich nicht finden. Aber es gibt einige Beispiele von je zwei nahe verwandten Genen, deren Expression in den Organen gleich ist. *AtMDR2* und *AtMDR10* sind beide nur in den Reproduktionsorganen detektiert worden. Kein anderes von den 28 Genen wurde ausschließlich in Blütenständen und Schoten nachgewiesen. *AtMRP1* und *AtMRP2* wurden in allen Organen außer den Blättern nachgewiesen. Auch dieses Expressionsmuster ergab sich nur für diese beiden Gene. *AtMRP7* und *AtMRP8* und *AtPDR5* und *AtPDR9* konnten jeweils nur in den Wurzeln nachgewiesen werden, das trifft allerdings auch auf noch andere untersuchte ABC-Transporter zu. Allerdings können sich Expressionsmuster auch für nahe verwandte Gene sehr wohl unterscheiden. *AtPDR7* und *AtPDR8* sind am gleichen Ast des Stammbaums angeordnet, trotzdem differiert hier das Expressionsmuster. Während *AtPDR7* nur in der Wurzel nachzuweisen war, konnte *AtPDR8* in allen Organen detektiert werden, wobei die Expression in der Wurzel am höchsten war.

ABC-Transporter wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals in einer derart umfassenden systematischen Art untersucht. Mit Hilfe der verwendeten genspezifischen Sonden konnten 27 Mitglieder der Superfamilie aus sechs Subfamilien auf Transkriptebene nachgewiesen werden. Die Expression von 21 ABC-Transportern wurden erstmals in einem derartig umfassenden Organ-Expressionsprofil gezeigt.

3.3 Induktionen nach Xenobiotika-Behandlung

Um die Reaktion der Pflanze auf die Einwirkung von für die Pflanzen fremden Substanzen (Xenobiotika) zu untersuchen, wurden drei Substanzen ausgewählt, die sich sowohl in ihrer Struktur, als auch in ihrer Wirkung auf die Pflanze unterscheiden. Dazu wurden zwei Herbizide (Primisulfuron und Bromoxynil) und ein aus monokotylen Nutzpflanzen bekannter „Safener“ (Benoxacor) ausgewählt. Die Auswirkungen dieser Substanzen sollten sowohl auf Transkriptebene als auch auf Proteinebene untersucht werden.

3.3.1 Behandlung der Pflanzen

Für die ausgewählten Xenobiotika Primisulfuron, Bromoxynil und Benoxacor mussten zunächst die zu applizierenden Mengen an *Arabidopsis thaliana* ausgetestet werden. Die eingesetzten Applikationsmengen sollten sublethal sein, aber dennoch, wenn möglich, zu einem späteren Zeitpunkt Pflanzenschäden verursachen. Der Zeitpunkt der Materialernte wurde nach den Vorversuchen so gewählt, dass bis zur Ernte keine sichtbaren Schäden auftraten (2.11.2).

Primisulfuron inhibiert die pflanzenspezifische Acetolactat-Synthase und verhindert dadurch die Synthese der verzweigten Aminosäuren. Eine Folge dessen ist die Beeinflussung des Wurzel- und Sproßwachstums. Bereits nach 1-2 Tagen ist die Schädigung an Wachstumsstillstand, Absterben der terminalen Vegetationskegel, Anthocyanfärbung und Nekrosen sichtbar (Hock *et al.*, 1995). Bei einer feldüblichen Applikation werden 10-40g/ha ausgebracht (Hock *et al.*, 1995), das entspricht im Labormaßstab in etwa 1-4mg/m². In Vorversuchen konnte beobachtet werden, dass das Wachstum bei einer Applikation von 750µg/m² nach 2-3 Tagen gegenüber der Kontrolle eindeutig beeinträchtigt ist (siehe Abbildung 3.10; 2.11.2).

Das Herbizid Bromoxynil gehört zu der Klasse der Photosynthese-Inhibitoren. Dabei konkurriert es mit dem Plastochinon Q_B um die Bindungsstelle am D1-Protein, verhindert dadurch den Elektronentransport und damit die Bildung von NADPH-Äquivalenten, sowie die Photophosphorylierung. Durch die Behinderung des Elektronentransports werden die Elektronen zunächst auf Chlorophyll und dann auf Sauerstoff übertragen und es entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Zusätzlich wird der Austausch des D1-Proteins („*rapidly turning over D1 protein*“) durch die Bindung des Herbizids gehemmt, was den natürlichen Reparaturmechanismus dieses Proteins unterbindet (Smeda & Vaughn, 1997). Die feldübliche Applikation liegt bei 400-600g/ha (Hock *et al.*, 1995), das entspricht ca. 40-60mg/m². Die in den eigenen Versuchen applizierte Menge von 1,9mg/m² (2.11.2) führte zu einer unterschwelligeren Photosynthesehemmung, was nach ca. 2-3 Tagen zu den dafür typischen Symptomen wie hellgrünen und weißen Chlorosen (Hock *et al.*, 1995) an den Blättern der behandelten Pflanzen führte (siehe Abbildung 3.10).

Von Benoxacor, ein in Mais-Kulturen angewendeter Safener, ist bekannt, dass durch die Behandlung Cytochrom P450 Monooxygenasen und Glutathion-S-Transferasen induziert werden und dadurch die Metabolisierung von Herbiziden beschleunigt wird. Auf dikotyle Pflanzen hat diese Substanz keine Safener-Wirkung. Dennoch konnte interessanterweise in Soja- und Fichtenzellkulturen durch Zugabe von Benoxacor die Aktivität der 2,4,5-Trichlorphenol-Glucosyltransferase induziert werden (Messner *et al.*, 1996). Die feldübliche Applikationsmenge liegt bei 67g/ha (Hock *et al.*, 1995), dies entspricht im Labormaßstab 6,7mg/m². Die auf die Pflanzen verteilte Menge entsprach 4,2mg/m² und verursachte, wie erwartet, keine sichtbaren Schäden.

In Tabelle 3.3 sind die in einer Sprühapplikation aufgetragenen Mengen, zusammen mit den Konzentrationen des Lösemittels und des Detergenzes dargestellt.

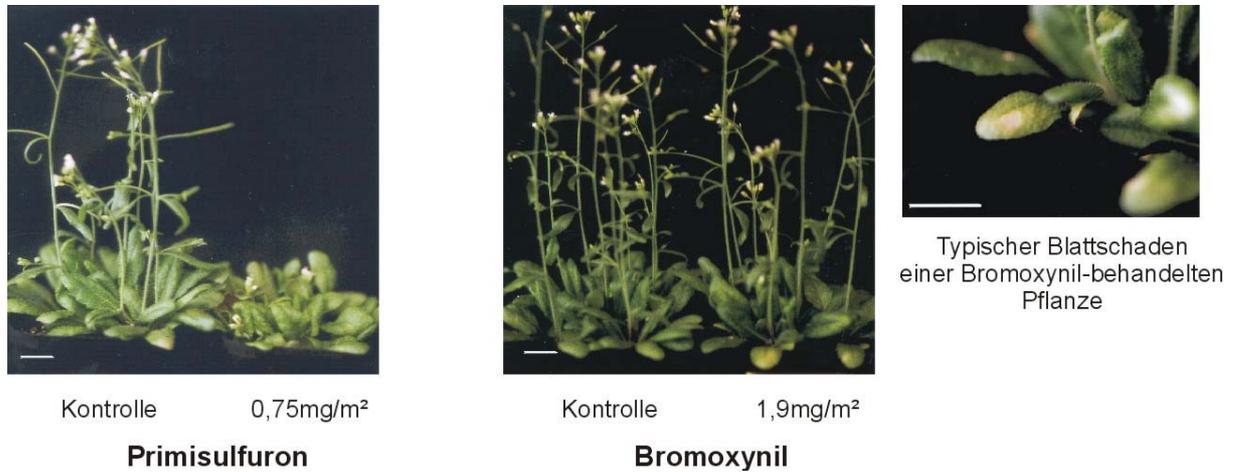


Abb. 3.10: Behandlung der Pflanzen mit den Herbiziden Primisulfuron und Bromoxynil. Gezeigt sind die sichtbaren Schäden 3 Tage nach Behandlung mit den angegebenen sublethalen Applikationsmengen (Weißer Balken = 1cm).

Tab. 3.3: Versuchsbedingungen und Zusammenfassung der applizierten Xenobiotika-Mengen. Die Sprühapplikation der Pflanzen mit den Xenobiotika erfolgte 21d nach Aussaat mit 4ml der angegebenen Lösungen in einer 2500cm² großen Wanne. Pflanzenmaterial wurde nach den angegebenen Zeiten geerntet (2.11.2).

	Herbizide				Safener	
	Primisulfuron		Bromoxynil		Benoxacor	
	Kontr.	Beh.	Kontr.	Beh.	Kontr.	Beh.
Pflanzen / Topf [Anzahl]	10	10	10	10	10	10
Applikation - Versuch [mg/m ²]	#	0,75	#	1,9	#	4,2
Lösemittel [%]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Lösemittel	Aceton		Acetonitril		Acetonitril	
Silwet L-77 [%]	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Inkubationszeit [h]	24+36	24+36	24	24	24	24

Die Ernte des Pflanzenmaterials erfolgte für alle Behandlungen in jeweils drei unabhängigen Versuchen nach 24 Stunden, zusätzlich wurde in zwei voneinander unabhängigen Behandlungen mit Primisulfuron nach 36h Pflanzenmaterial geerntet.

3.3.2 Induktionen auf Transkriptionsebene

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war, die Auswirkungen der Xenobiotika-Behandlungen auf die Pflanzen zu untersuchen. Durch den Einsatz des Detox-Arrays konnten die Expressionsprofile der vier ausgewählten Genfamilien Cytochrom P450 Monooxygenasen, UDP-Glycosyltransferasen, Glutathionabhängige Enzyme und der ABC-Transporter untersucht werden. Unter den auf die Behandlungen reagierenden Genen könnten sich auch solche befinden, die an der Detoxifizierung dieser Substanzen beteiligt sind. Eine Reaktion von ABC-Transportergenen könnte demnach auf die Beteiligung bei der Kompartimentierung der Xenobiotikametabolite hinweisen.

Von den 270 Genen, die mittels spezifischer Sonden in diese Untersuchungen eingeschlossen waren, zeigten insgesamt 59 Gene eine Reaktion in Form von deutlicher Induktion (mindestens 2-fach induziert) oder Repression (mindestens um die Hälfte reduziert). Davon reagierten 53 auf die Behandlung mit Primisulfuron und 7 Gene wurden in ihrem Transkriptionsverhalten durch die Behandlung mit Bromoxynil verändert (Tabelle 3.4). Für kein Gen konnte eine Veränderung der Transkription nach der Behandlung mit Benoxacor nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass Benoxacor keine Auswirkung auf die dikotyle Pflanze *Arabidopsis thaliana* hat. Aber es ist auch nicht auszuschließen, dass die an monokotyle Pflanzen angelehnte Applikationsmenge für die dikotyle Modellpflanze zu niedrig war, um Änderungen des Transkriptionsprofils detektieren zu können. Die veränderten Gene nach Primisulfuron- und Bromoxynilbehandlung stammten aus allen vier Genfamilien. Die beiden Behandlungen mit den sich in ihrer Struktur und in ihrem Angriffspunkt unterscheidenden Herbizide induzierten jeweils spezifische Gengruppen. Nur das Glutathion-S-Transferase Gen *AtGSTU20* zeigte 36h nach Behandlung mit Primisulfuron und nach Behandlung mit Bromoxynil eine deutliche Repression (Abbildungen 3.12 und 3.14).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Behandlungen beschrieben. Dabei wurde bei der Behandlung mit Primisulfuron unterschieden, ob die Induktionen oder Repressionen nur nach 24h (Abbildung 3.11) oder nur nach 36h (Abbildung 3.12) zu detektieren waren, oder ob diese Veränderungen zu beiden Zeitpunkten bestanden (Abbildung 3.13). Die Veränderungen durch die Behandlung der Pflanzen mit Bromoxynil sind der Abbildung 3.14 zu entnehmen. Die veränderten Gene sind zugehörig zu ihren jeweiligen Genfamilien in separaten Diagrammen dargestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Von den 53 Genen, die sich nach **Primisulfuronbehandlung** in ihrem Transkriptionsniveau verändert hatten, waren 35 Gene nur nach 24h verändert, sechs ausschließlich nach 36h und 12 Gene blieben zu beiden Zeitpunkten induziert bzw. reprimiert.

Von den 65 untersuchten Cytochrom P450 Monooxygenasen konnte für acht Gene ausschließlich **24h nach Behandlung mit Primisulfuron** (Abbildung 3.11A) eine Induktion nachgewiesen werden. Da diese Induktion nach 36h nicht mehr bestand, handelt es sich hier also um eine transient erhöhte Expression der Gene. Die induzierte *CYP76C2* wurde bereits in anderen Untersuchungen mit Zelltod und Seneszenz assoziiert und gezeigt, dass die Induktion bereits vor der Entwicklung der hypersensitiven Reaktion (HR), die sich in Pflanzen nach Pathogenbefall entwickelt, erfolgte (Glazebrook, 2001; Godiard *et al.*, 1998). Eine ebenfalls transiente Induktion konnte für 7 der 115 untersuchten UDP-Glycosyltransferasen festgestellt werden (Abbildung 3.11B). Auch zu diesen Genen ist die Funktion weitestgehend unbekannt. Lediglich für *UGT74F1* wurde gezeigt, dass das heterolog exprimierte Enzym Salicylsäure

glucosyliert (Lim *et al.*, 2001a). Drei Mitglieder, *UGT84A2*, *UGT89C1* und *UGT89B1*, waren zu diesem Zeitpunkt reprimiert. Von den 12 induzierten Glutathion-abhängigen Enzymen wurde bisher nur *AtGSTF2* näher charakterisiert (Abbildung 3.11C). Dieses Enzym mit nachgewiesener Glutathion-S-Transferaseaktivität gegenüber CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) und BITC (Benzylisothiocyanat) ist sowohl durch Herbizide (Metolachlor und 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure) als auch durch Signalmoleküle (Ethylen und Salicylsäure) induzierbar (Wagner *et al.*, 2001; Zajc *et al.*, 1999; Zhou & Goldsbrough, 1993). Vier der 28 ABC-Transporter zeigten 24h nach Behandlung eine deutliche Induktion (Abbildung 3.11D). Die vier Vollängen-Transporter *AtAOH1*, *AtMRP4*, *AtMRP3* und *AtPDR8* gehören zu drei unterschiedlichen Subfamilien. Die Induktionen für *AtPDR8* und *AtAOH1* konnten anhand einer semi-quantitativen RT-PCR bestätigt werden (siehe Tabelle 3.6). Während *AtAOH1* und *AtPDR8* zum ersten Mal in Untersuchungen eingeschlossen wurden, wurden die anderen beiden ABC-Transporter bereits in ersten Untersuchungen charakterisiert. So zeigte sich *AtMRP4* durch Menoadion, Benoxacor, Primisulfuron und IRL1803 induzierbar (Sanchez-Fernandez, 1998; Tommasini *et al.*, 1997). *AtMRP5* wird im Zusammenhang mit Auxin-Transport oder Ionenaufnahme bzw. Ionenkanalregulation diskutiert (Gaedeke *et al.*, 2001).

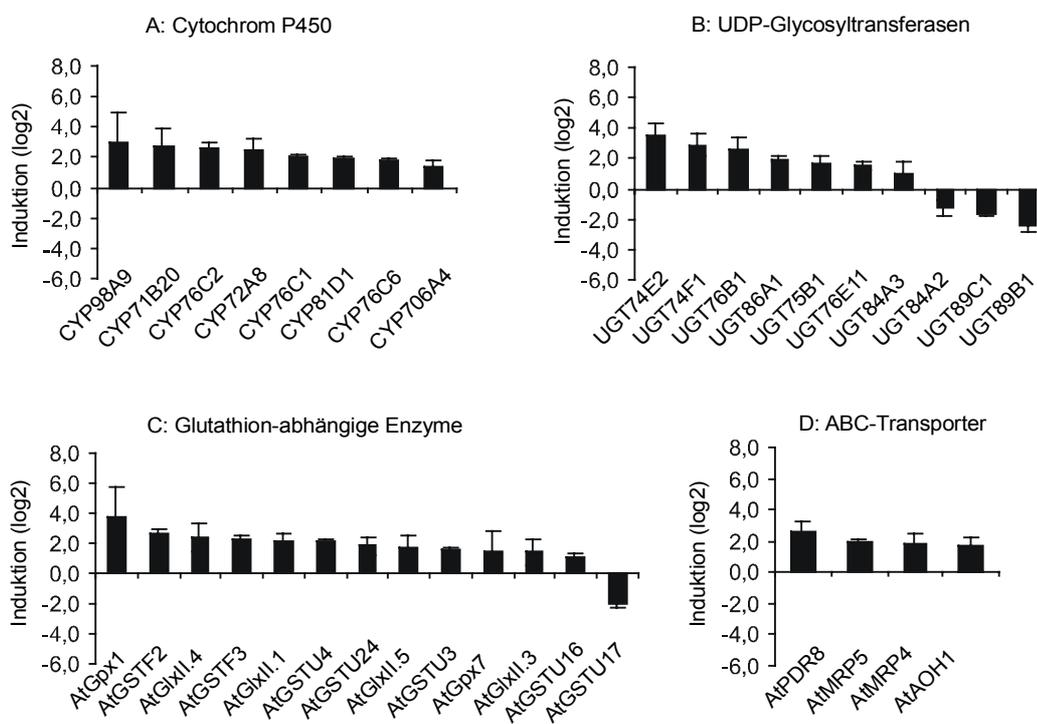


Abb. 3.11: Induktionen bzw. Repressionen von Genen 24h nach Behandlung mit Primisulfuron. Cytochrom P450 Monooxygenasen (Diagramm A), UDP-Glycosyltransferasen (Diagramm B), Glutathion-abhängige Enzyme (Diagramm C) und ABC-Transporter (Diagramm D). Die Veränderungen des Transkriptionsniveaus sind logarithmisch zur Basis 2 dargestellt.

Keiner der untersuchten ABC-Transporter zeigte eine Induktion oder Repression ausschließlich **36h nach Behandlung mit Primisulfuron**. Nur *CYP79B2* und *AtGSTU12* wurden induziert. Für *CYP79B2* wurde bereits gezeigt, dass dieses Gen Wund- und

Pathogeninduzierbar ist. Es katalysiert die Umwandlung von Tryptophan zu Indol-3-acetaldoxim, welches ein Intermediat in der Biosynthese von Indolelessigsäure oder Indolglucosinolaten darstellt (Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2000). Die anderen vier Gene, *CYP706A6*, *UGT79B2*, *UGT85A1* und *AtGSTU20*, wurden reprimiert.

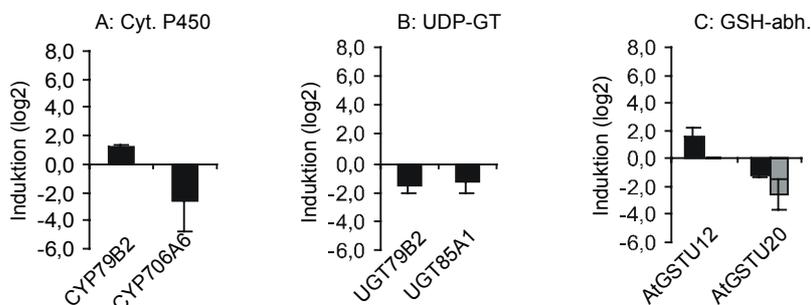


Abb. 3.12: Induktionen bzw. Repressionen von Genen 36h nach Behandlung mit Primisulfuron. Cytochrom P450 Monooxygenasen (Cyt P450; Diagramm A), UDP-Glycosyltransferasen (UDP-GT; Diagramm B) und Glutathion-abhängige Enzyme (GSH-abh.; Diagramm C). Grauer Balken: Repression durch Bromoxynilbehandlung. Die Veränderungen des Transkriptionsniveaus sind logarithmisch zur Basis 2 dargestellt.

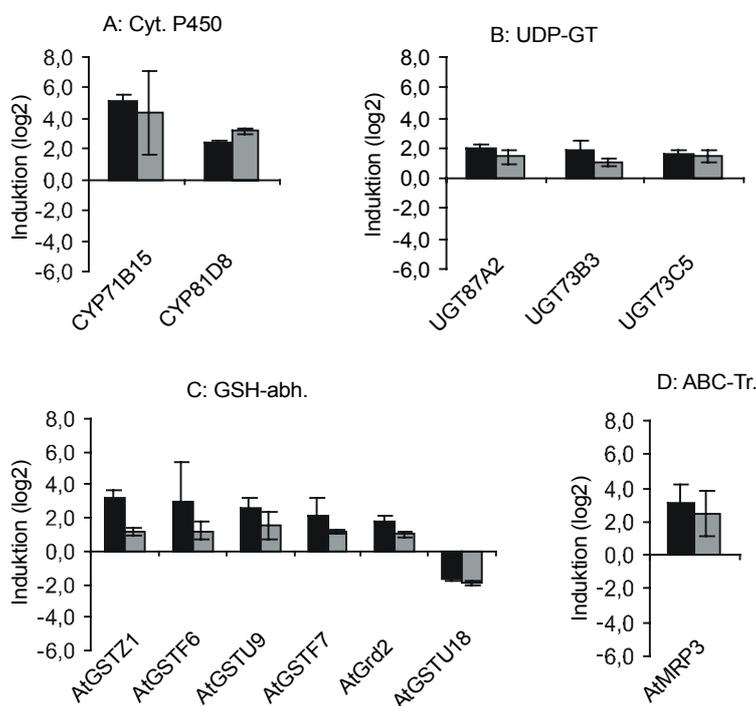


Abb. 3.13: Induktionen bzw. Repressionen von Genen 24h und 36h nach Behandlung mit Primisulfuron. Cytochrom P450 Monooxygenasen (Cyt. P450; Diagramm A), UDP-Glycosyltransferasen (UDP-GT; Diagramm B), Glutathion-abhängige Enzyme (GS-abh.; Diagramm C) und ABC-Transporter (ABC-Tr.; Diagramm D). Induktion nach 24h: schwarze Balken; Induktion nach 36h: graue Balken. Die Veränderungen des Transkriptionsniveaus sind logarithmisch zur Basis 2 dargestellt.

Eine über einen längeren Zeitraum veränderte Transkription konnte für 12 der 270 untersuchten Gene nachgewiesen werden (Abbildung 3.13). Sowohl nach **24h als auch 36h nach der Behandlung mit Primisulfuron** zeigten zwei der Cytochrom P450 Monooxygenasen eine Induktion. Während die Funktion von *CYP81D8* bisher nicht bekannt ist, ist *CYP71B15* auch als *PAD3* bekannt und ist sehr wahrscheinlich in der Biosynthese des Phytoalexins Camalexin involviert (Zhou *et al.*, 1999). Drei UDP-Glycosyltransferasen zeigten ebenfalls zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine Induktion (Abbildung 3.13B). Für die heterolog exprimierte *UGT73B3* wurde bereits gezeigt, dass die Glucosylierung von Zimtsäuren und Benzoesäuren zwar erfolgt, jedoch mit sehr geringer Aktivität. Für zwei der fünf induzierten Glutathion-abhängigen Enzyme (*AtGSTF6* und *AtGSTZ1*) wurde bereits gezeigt, dass sie durch Methyljasmonat und 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure induzierbar sind. *AtGSTF6* ist zusätzlich durch Metolachlor, Ethylen, Wasserstoffperoxid und Salicylsäure induzierbar, während *AtGSTZ1* durch Metolachlor reprimiert wird (Wagner *et al.*, 2001). Zudem konnte für *AtGSTZ1* gezeigt werden, dass dieses Enzym die notwendige Isomerisierung von Maleylaceton zu Fumarylaceton während des Tyrosinabbaus glutathionabhängig katalysieren kann (Dixon *et al.*, 2000). Der ABC-Transporter *AtMRP3*, für den bereits zuvor gezeigt wurde, dass dieser durch eine Behandlung mit Primisulfuron induzierbar war (Tommasini *et al.*, 1997), zeigte ebenfalls zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine deutliche Induktion (Abbildung 3.13D). In einer semi-quantitativen RT-PCR konnten die Induktionen zu beiden Zeitpunkten bestätigt werden (siehe Tabelle 3.6).

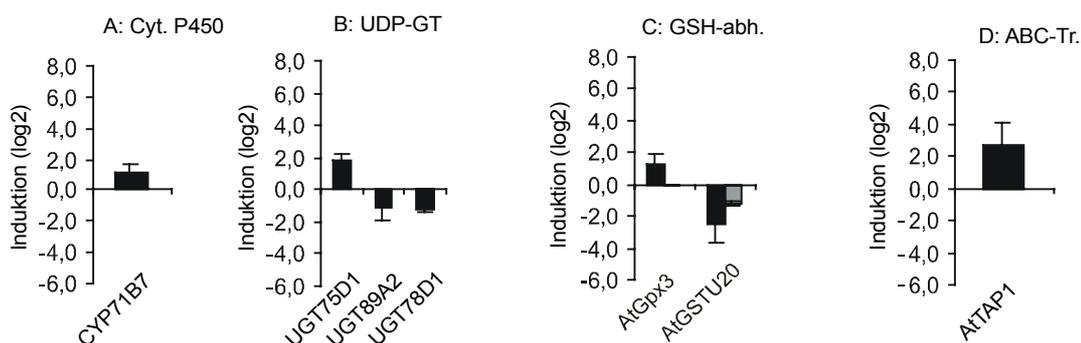


Abb. 3.14: Induktionen bzw. Repressionen von Genen, 24h nach der Behandlung mit Bromoxynil. Cytochrom P450 Monooxygenasen (Cyt P450; Diagramm A), UDP-Glycosyltransferasen (UDP-GT; Diagramm B), Glutathion-abhängige Enzyme (GSH-abh.; Diagramm C) und ABC-Transporter (ABC-Tr.; Diagramm D). Grauer Balken: Repression 36h nach Primisulfuronbehandlung Die Veränderungen des Transkriptionsniveaus sind logarithmisch zur Basis 2 dargestellt.

Die **Behandlung mit Bromoxynil** führte bei 7 Genen zu einem veränderten Transkriptionsniveau (Abbildung 3.14). Aus der Genfamilie der Cytochrom P450-Gene konnte nur für *CYP71B7* eine Induktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.14A). Für dieses Gen wird allerdings angenommen, dass es eine Rolle in dem Terpenoidstoffwechsel spielt, da es das Modellsubstrat 7-Ethoxycumarin in Gegenwart von Cuminhydroperoxid deethyliert (Maughan *et al.*, 1997). Von den 115 UDP-Glycosyltransferasen zeigte nur *UGT75D1* eine deutliche Induktion (Abbildung 3.14B). Wird dieses Gen heterolog exprimiert, so ist es in der Lage ein erstes Hydrolyseprodukt von Bromoxynil, die 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzoesäure zu glucosylieren (Messner, pers. Mitteilung). Zwei weitere Gene *UGT89A2* und *UGT78D1*

wurden reprimiert. Eine Glutathionperoxidase wurde induziert und die bereits vorher erwähnte *AtGSTU20* zeigte eine deutliche Repression. Ein ABC-Transporter aus der aus zwei Mitgliedern bestehenden TAP-Subfamilie zeigte nach dieser Behandlung eine ca. 8-fache Induktion.

Tab. 3.4: Zusammenfassung der Graphiken 3.11-3.14. Zusätzlich angegeben sind bekannte Reaktionen bzw. Funktionen aus der Literatur. Angegeben sind außerdem die Ergebnisse der FASTA-Analyse in der *Arabidopsis thaliana* Datenbank MIPS. Unterschieden wurde, ob Kreuzhybridisierungen mit Genen der eigenen Genfamilie bestanden (x mit EGF) oder zu fremden Genfamilien (x mit FGF). Die Anzahl der Kreuze spiegelt die Anzahl der potentiellen Kreuzhybridisierungen wider (genauere Angaben siehe 3.1.1.3 und Anhang 7.1.2). PS 24h: 24h nach Primisulfuronbehandlung geerntet; PS 36h: 36h nach Primisulfuronbehandlung geerntet; BXN: Bromoxynil; Induziert: ↑; Reprimiert: ↓. CYT P450: Cytochrom P450 Monooxygenasen; DCA: Dichloranilin, 2,4D: 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure; Sán-Fern: Sánchez-Fernández; HR: hypersensitive Reaktion.

CYT P450	PS 24h	PS 36h	BXN	Funktion	Zitat	x mit EGF	x mit FGF
CYP706A4	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
CYP706A6	-	↓	-	unbekannt	-	x	-
CYP71B15	↑	↑	-	Camalexin-Biosynthese	Zhou (1999)	xx	xx
CYP71B20	↑	-	-	unbekannt	-	xxxxxx	-
CYP71B7	-	-	↑	Terpenoidstoffwechsel (Deethyliert Modellsubstrat 7-Ethoxycumarin in Gegenwart von Cuminhydroperoxid)	Maughan (1997)	-	x
CYP72A8	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
CYP76C1	↑	-	-	unbekannt	-	x	-
CYP76C2	↑	-	-	assoziiert mit Zelltod und Seneszenz, induziert durch nekrotisierende Schwermetalle und Bleinitrat, Induktion erfolgt vor Entwicklung von HR	Godiard (1998)	xx	-
CYP76C6	↑	-	-	unbekannt	-	xxxx	-
CYP79B2	-	↑	-	Abbau von Tryptophan, wund- und pathogeninduzierbar	Hull (2000) Mikkelsen (2000)	-	-
CYP81D1	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
CYP81D8	↑	↑	-	unbekannt	-	-	-
CYP98A9	↑	-	-	unbekannt	-	x	xx
UDP-Glycosyltransferasen							
UGT73B3	↑	↑	-	glucosyliert Zimtsäuren und Benzoesäuren mit geringer Aktivität	Lim (2001a/b)	x	xx
UGT73C5	↑	↑	-	unbekannt	-	xxxx	-
UGT74E2	↑	-	-	unbekannt	-	xx	xx
UGT74F1	↑	-	-	glucosyliert Salicylsäure	Lim (2001a)	-	-
UGT75B1	↑	-	-	glucosyliert Zimtsäuren, Indolessigsäure, Salicylsäure, 3,4-Dihydroxy und 4-Hydroxybenzoesäure mit geringer Aktivität; Involviert in Kallozesynthese	Jackson (2001) Lim (2001a/b) Hong (2001)	-	-
UGT75D1	-	-	↑	glucosyliert 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzoesäure und TCP	Messner (pers. Mitteilung)	-	x
UGT76B1	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
UGT76E11	↑	-	-	unbekannt	-	x	-
UGT78D1	-	-	↓	unbekannt	-	-	-
UGT79B2	-	↓	-	unbekannt	-	xxx	x
UGT84A2	↓	-	-	glucosyliert Sinapinsäure, (Esterbildung)	Lim (2001b)	-	-
UGT84A3	↑	-	-	glucosyliert Sinapinsäure, Zimtsäure, Ferulasäure und p-Cumarsäure (Esterbildung)	Lim (2001b)	-	-

Tabelle 3.4: Fortsetzung

UGT85A1	-	↓	-	unbekannt	-	-	-
UGT86A1	↑	-	-	unbekannt	-	-	x
UGT87A2	↑	↑	-	unbekannt	-	x	-
UGT89A2	-	-	↓	glucosyliert 3,4-Dihydroxybenzoesäure in Position 3	Lim (2001a)	x	x
UGT89B1	↓	-	-	glucosyliert 3,4-Dihydroxy- und 4-Hydroxybenzoesäure	Lim (2001a)	-	-
UGT89C1	↓	-	-	unbekannt	-	-	-
Glutathion-abhängige Enzyme							
AtGlxII.1	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
AtGlxII.3	↑	-	-	unbekannt	-	x	-
AtGlxII.4	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
AtGlxII.5	↑	-	-	unbekannt	-	x	x
AtGpx1	↑	-	-	unbekannt	-	-	x
AtGpx3	-	-	↑	unbekannt	-	-	-
AtGpx7	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
AtGrd2	↑	↑	-	unbekannt	-	-	-
AtGSTF2	↑	-	-	ethyleninduzierbar, interagiert m. FOE5043 (Oxyacetamid), induzierbar d. Metolachlor, 2,4D, Ethylen und Salicylsäure; pathogeninduzierbar; Glutathion-S-Transferaseaktivität gegenüber CDNB und BITC	Zhou (1993) Zajc (1999) Wagner (subm.)	xx	x
AtGSTF3	↑	-	-	unbekannt	-	xxx	x
AtGSTF6	↑	↑	-	induzierbar d. Metolachlor, 2,4D, Methyljasmonat, Ethylen, Wasserstoffperoxid und Salicylsäure; pathogeninduzierbar	Wagner (subm.)	x	-
AtGSTF7	↑	↑	-	unbekannt	-	xx	-
AtGSTU12	-	↑	-	unbekannt	-	-	-
AtGSTU16	↑	-	-	unbekannt	-	x	-
AtGSTU17	↓	-	-	unbekannt	-	-	-
AtGSTU18	↓	↓	-	unbekannt	-	-	x
AtGSTU20	-	↓	↓	unbekannt	-	-	-
AtGSTU24	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
AtGSTU3	↑	-	-	unbekannt	-	x	-
AtGSTU4	↑	-	-	unbekannt	-	x	-
AtGSTU9	↑	↑	-	unbekannt	-	-	-
AtGSTZ1	↑	↑	-	Abbau von Tyrosin; Isomerisierung; Dehalogenierung von DCA; induzierbar d. Methyljasmonat und 2,4D; reprimiert durch Metolachlor; pathogeninduzierbar	Dixon (2000) Wagner (subm.)	x	-
ABC-Transporter							
AtA OH1	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
AtMRP3	↑	↑	-	induzierbar d. Aminotriazol, Benoxacor, Oxabetrinil, Primisulfuron, IRL 1803. Transport von DNB-GS und Bn-NCC1	Sán-Fern. (1998) Tommasini (1997/1998)	-	-
AtMRP4	↑	-	-	induzierbar durch Menoadion, Benoxacor, Primisulfuron, IRL 1803	Sán-Fern. (1998) Tommasini (1997)	-	-
AtMRP5	↑	-	-	Auxin-Konjugat-Transporter, Ionenaufnahme oder Ionenkanalregulator	Gaedeke (2001)	-	-
AtPDR8	↑	-	-	unbekannt	-	-	-
AtTAP1	-	-	↑	unbekannt	-	-	-

Tab. 3.5: Unabhängige Quantifizierung der Induktionen von ABC-Transportern in einer quantitativen RT-PCR. Angegeben ist die mittels Detox-Array gemessene Induktion mit Standardabweichung (SD) im Vergleich zu der mittels RT-PCR nachgewiesenen Induktion.

Genname	Behandlung	Detox-Array		RT-PCR
		Induktion (x-fach)	SD	Induktion (x-fach)
AtPDR8	Primisulfuron, 24h	6,35	+/-2,46	3,3
AtAOH1	Primisulfuron, 24h	3,37	+/-1,32	4
AtMRP3	Primisulfuron, 24h	10,2	+/-8,43	3,7
AtMRP3	Primisulfuron, 36h	6,97	+/-5,69	2,8

3.3.3 Hauptkomponentenanalyse der Herbizidversuche

In einer Hauptkomponentenanalyse wurden die erstellten Transkriptionsprofile hinsichtlich der Unterschiede und Gemeinsamkeiten eingehender untersucht (Alter *et al.*, 2000; Holter *et al.*, 2000). Durchgeführt wurde diese Analyse in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Gerhard Welzl am Institut für Biomathematik und Biostatistik (GSF).

Zusätzlich zu den Behandlungen mit Primisulfuron (24h und 36h) und Bromoxynil wurden die Daten einer Prosulfuronbehandlung mit eingeschlossen. Diese Versuche erfolgten nach demselben Protokoll wie die anderen Herbizidbehandlungen (2.11.2). Die Prosulfuronbehandlung und die komplexen Hybridisierungen wurden von Lucien Bovet in Neuchâtel (Schweiz) mit Hilfe des Detox-Arrays durchgeführt. Prosulfuron ist wie Primisulfuron ein Sulfonylharnstoff, der die Acetolactatsynthase hemmt.

Es wurden nur die Gene mit in die Hauptkomponentenanalyse mit eingeschlossen, die in mindestens einem der vier Versuche detektiert wurden, unabhängig davon, ob diese Gene induziert, reprimiert oder konstant geblieben sind. Wurden Gene in den verbleibenden Versuchen nicht detektiert, oder musste der Wert aufgrund eines experimentellen Artefakts entfernt werden, so wurde dafür der Wert „1“ eingesetzt. Da in diese Analyse alle Werte eingehen, unabhängig davon, ob es sich um eine mehr als zweifache Induktion oder Repression handelte, wurden 178 Gene verrechnet. Dies sind mehr als in den graphischen Darstellungen unter 3.3.2, da hier nur die Werte der Gene betrachtet wurden, die eine mehr als 2-fache Induktion oder Repression zeigten.

Das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse zeigt Abbildung 3.15. Zur besseren Übersicht wurden 25 Gene ausgewählt, die mit dem Gennamen dargestellt wurden, alle anderen werden durch ein Kreuz symbolisiert. Die Pfeile zeigen die Richtungen der vier Variablen (Behandlungen) an, wobei die Darstellung so gewählt ist, dass in der zweidimensionalen Projektion, die Korrelationen am besten dargestellt sind.

Die mit Namen angezeigten Gene sind auch schon in den Abbildungen 3.11-3.14 zu sehen. Diese Gene sind maßgeblich an der Komponentenbildung beteiligt. Gene, die entlang der Pfeile eingezeichnet sind, wurden durch die entsprechende Behandlung induziert. Gene, die auf der rückwärtigen Seite des Schnittpunktes der Pfeile liegen wurden reprimiert. Da die Reaktionen auf die Behandlungen hier miteinander verrechnet wurden und einige Gene auf mehrere Behandlungen reagierten (z.B.: *AtGSTU20*), sind diese nicht genau einem Pfeil zugeordnet.

Die Abbildung zeigt die deutliche und auch erwartete Korrelation der beiden Primisulfuronbehandlungen. Die Prosulfuronkomponente weicht leicht davon ab, dennoch ist die Korrelation mit Primisulfuron deutlich zu erkennen. Das weist darauf hin, dass einige Gene in den Behandlungen der Sulfonylharnstoffe unterschiedlich reagierten, aber die Reaktion im Wesentlichen die gleiche ist. Dass Bromoxynil als Elektronentransporthemmer eine andere Reaktion auslöste ist daran zu erkennen, dass die Komponente BXN24 deutlich in eine andere Richtung weist.

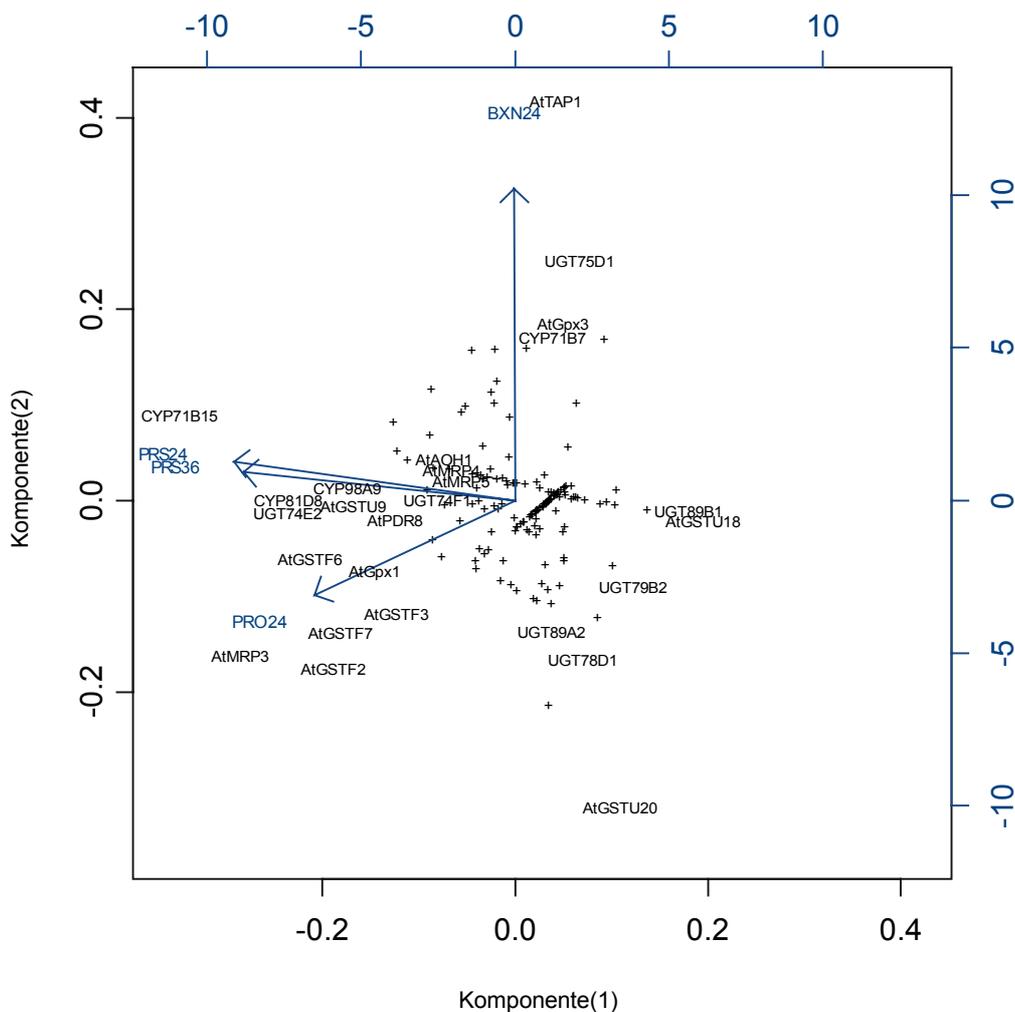


Abb. 3.15: Hauptkomponentenanalyse von vier Herbizidbehandlungen. Primisulfuron 24h (PRS24) und 36h (PRS36), Prosulfuron 24h (PRO24) und Bromoxynil 24h (BXN24). Genname oder Kreuz repräsentieren jeweils ein Gen. Die Hauptkomponentenanalyse wurde in Zusammenarbeit mit G. Welzl, IBB (GSF) durchgeführt.

3.3.4 Induktionen auf Proteinebene

Das Induktionsverhalten der ABC-Transporter sollte auch auf Proteinebene untersucht werden. Da der Fokus dieser Arbeit auf den Vollängen-Transportern lag und über die Subfamilien PDR und MDR (bzw. PGP) bisher nur sehr wenig bekannt ist, wurden zwei Antikörper so hergestellt, dass die jeweiligen Subfamilien detektiert werden konnten. Hier

wurde auf die Spezifität, wie sie im Detox-Array von besonderer Bedeutung war, verzichtet, um eine größere Sicherheit zu haben diese Gene auf Proteinebene zu detektieren. Es musste mit besonderen Schwierigkeiten gerechnet werden: 1. Die Expressionshöhe einzelner Mitglieder konnte sehr niedrig sein. 2. Zum Zeitpunkt der Antikörperentwicklung war die organspezifische Expression noch unbekannt. 3. Es war mit methodischen Schwierigkeiten zu rechnen, da die vollständige Solubilisierung der ca. 150kDa Membranproteine ein entscheidender Faktor für das gleichmäßige Einwandern in das Polyacrylamidgel ist. Die Solubilisierung hängt jedoch von den physikochemischen Eigenschaften des jeweiligen Proteins ab.

3.3.4.1 Antigenherstellung

Da die nukleotidbindenden Domänen in den einzelnen Subfamilien hohe Homologien aufweisen, wurden diese Bereiche heterolog exprimiert und diese Antigene zur Antikörperherstellung eingesetzt. Diese Aminosäuresequenzen wurden in einer BLAST-Suche überprüft, ob möglichst viele der Mitglieder der entsprechenden Subfamilie hohe Homologien aufwiesen und ausgeschlossen werden konnte, dass Mitglieder anderer Subfamilien erkannt werden.

Für die Subfamilie der PDR wurde die Sequenz von *AtPDR4* (At2g26910) als Basis verwendet. Die nukleotidbindenden Domänen (NBD) erstrecken sich von Aminosäure 161 bis 384 und 856 bis 1046. Verwendet man diese Bereiche für eine BLAST-Suche so findet man für die erste NBD 5 Sequenzen und für die zweite NBD 9 Sequenzen mit über 80%iger Homologie zu Sequenzen der gleichen Genfamilie. Deswegen wurde der Bereich der zweiten NBD zur Antigenherstellung ausgewählt (Abbildung 3.15).

In der Subfamilie der MDR diente die Sequenz von *AtMDR1* (*AtPGPI*, At2g36910) als Basis. In diesem Gen erstrecken sich die nukleotidbindenden Domänen von 396 bis 580 und von 856 bis 1046. Auch hier wurden die NBD in einer BLAST-Suche miteinander verglichen. Die erste NBD hat zu 19 weiteren Sequenzen eine Homologie zwischen 80 und 90%, die zweite hingegen nur zu 2 Sequenzen zwischen 70 und 80%. Da hier die erste nukleotidbindende Domäne die deutlich höheren Homologien aufwies wurde diese zur Antigenherstellung ausgewählt (Abbildung 3.15).

Die Antigene wurden als GST- (Glutathion-S-Transferase-) Fusionsproteine exprimiert und zur Immunisierung von Hühnern eingesetzt. Um zu zeigen, dass die Antiseren das Antigen erkennen, wurden die Bereiche der nukleotidbindenden Domänen auch als Fusionsprotein mit MBP (maltosebindendes Protein) heterolog exprimiert. Nach Induktion einer Bakterienkultur wurden die Lysate in einem Western-Blot eingesetzt (Abbildung 3.17; 2.13.5-2.13.8). Beide Seren erkannten die jeweiligen Fusionsproteine (ohne Abbildung).

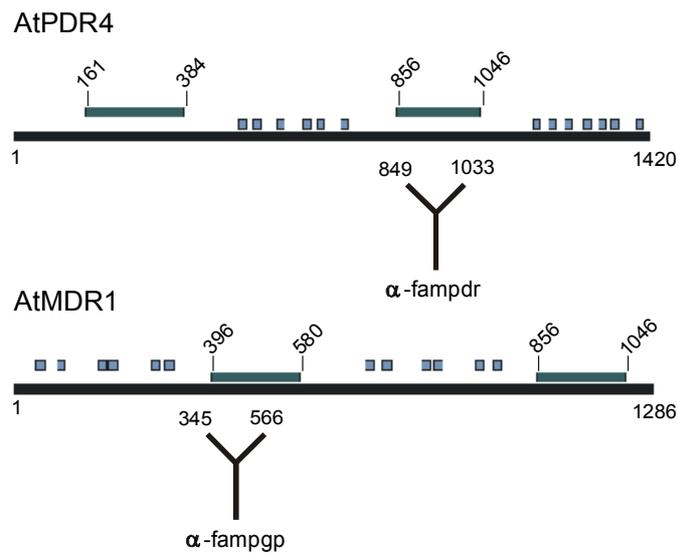


Abb. 3.16: Membrantopologien von *AtPDR4* und *AtMDR1* (*AtPGPI*) (verändert nach MIPS). Dargestellt sind jeweils die ATP-bindenden Domänen (grün) mit Angaben der Aminosäurebereiche und die potentiellen transmembranen Helixdomänen (blau). Die Aminosäurebereiche der Antigene wurden jeweils unterhalb der Gesamtsequenz angegeben.

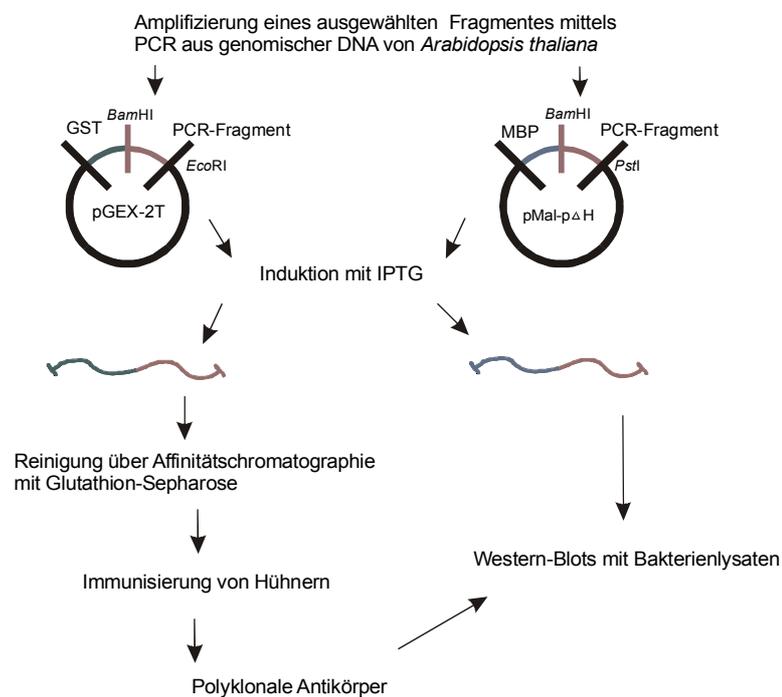


Abb. 3.17: Prinzip der Antigenherstellung und Prinzip des Funktionsnachweises der Antigenerkennung. Der Bereich des ausgewählten Fragments wurde einmal als GST- (Glutathion-S-Transferase) und einmal als MBP- (Maltosebindendes Protein) Fusionsprotein exprimiert (blau: heterologer Anteil des Gens bzw. Proteins, der aus dem Expressionsvektor stammt; rot: Anteil des ausgewählten Gens bzw. Proteins). Das GST-Fusionsprotein wurde zur Immunisierung verwendet, das MBP-Fusionsprotein diente als Nachweis der Antigenerkennung.

3.3.4.2 Nachweis der Induktion auf Proteinebene

Für die gleichmäßige Einwanderung der Proteine in das Polyacrylamidgel ist die Solubilisierung ein entscheidender Faktor. Die Bedingungen unter denen eine vollständige Entfernung der Membranlipide von den Proteinen möglich ist, hängen jedoch entscheidend von den weitgehend unbekanntem physikochemischen Eigenschaften des jeweiligen Proteins ab (Rehm, 1995). Es wurden einige Detergenzien ausgewählt und mikrosomale Fraktionen von Blättern mit unterschiedlichen Verfahren und Detergenzien solubilisiert (2.13.9) und in Western-Blots mit den beiden Antikörperseren behandelt. Dabei wurde zunächst darauf geachtet, dass sich Banden zeigten, die in entsprechender Größe zu detektieren waren. Die erwartete Größe für die PDR-Subfamilie liegt in etwa im Bereich zwischen 160 und 165kDa, für die MDR-Subfamilie zwischen 130 und 155kDa. Allerdings geht man davon aus, dass Membranproteine in einer SDS-Gelelektrophorese eine erhöhte Mobilität aufweisen und deswegen die sichtbaren Bandengrößen meist kleiner als die theoretischen Angaben sind (Ausubel *et al.*, 1995).

Der Antikörper gegen die MDR-Subfamilie (α -fampgp) zeigte im Gegensatz zum Prä-Immunserum keine zusätzliche Bande. Ein Grund dafür könnte sein, dass entweder diese Subfamilie nicht oder nur sehr niedrig im Blatt exprimiert wird, wie es auch die organspezifischen Expressionsuntersuchungen auf Transkriptebe-
ne andeuten. Da die Expression einiger Mitglieder in der Wurzel höher ist, sollte der Antikörper zur Untersuchung von mikrosomalen Fraktionen der Wurzel eingesetzt werden. Ein zweiter Grund könnte sein, dass die heterogene Größe der Mitglieder (130-155kDa) nicht zu einer Verstärkung des Signals führt.

Der Antikörper gegen die PDR-Subfamilie (α -fampdr) hingegen detektierte in der Solubilisierung mit erhöhter SDS-Konzentration eindeutig eine 150kDa große Bande (Abbildung 3.18). Zusätzlich konnte eine 75kDa-Bande detektiert werden. Diese ist möglicherweise auf die Detektion der WBC-Subfamilie zurückzuführen. Diese Subfamilie hat in diesem Bereich eine Homologie von ca. 60% zu der PDR-Subfamilie und besteht aus „halben“ ABC-Transportern.

Auf Transkriptebe-
ne konnte bereits gezeigt werden, dass der aus der Subfamilie der PDR stammende ABC-Transporter *AtPDR8* 24h nach Primisulfuronbehandlung induziert war. Die Frage war nun, ob die Induktion dieses Transporters bzw. dieser Subfamilie auch auf Proteinebene nachzuweisen ist. Von dem aus der Xenobiotikabehandlung stammenden Blattmaterial wurden mikrosomale Fraktionen gewonnen. Um sicher zu stellen, dass in allen Spuren die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, wurde die Proteinbestimmung nach Esen durchgeführt, da so die Konzentration in den bereits denaturierten und solubilisierten Proben unmittelbar vor der SDS-Gelelektrophorese bestimmt wird (Esen, 1978) (2.13.3.3).

Es wurden je 10 μ g Protein der acht verschiedenen mikrosomalen Fraktionen in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit α -fampdr Antikörperserum behandelt. Die 75kDa zeigte eine gleichbleibende Intensität und konnte deswegen als interne Kontrolle genutzt werden, um zu zeigen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

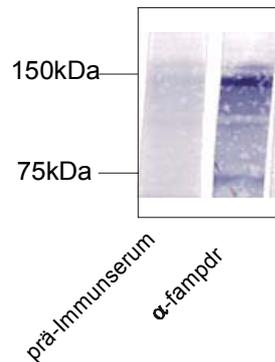


Abb. 3.18: Detektion der PDR-Transporter auf Proteinebene. Mikrosomale Fraktion von Blättern (21d) wurde mit erhöhter SDS-Konzentration solubilisiert und ca. 35µg Protein/Spur aufgetragen. Nach dem Western-Blot wurde mit prä-Immuns serum und mit dem Antikörperserum α -fampdr behandelt. Links angegeben ist der Größenstandard des Proteinmarkers.

In allen 8 Spuren konnte eine 150kDa Bande detektiert werden (Abbildung 3.19). Eine deutliche Induktion zeigte sich nach Primisulfuronbehandlung nach 24h und eine etwas schwächere auch nach 36h. Dies ist im Einklang mit der auf Transkriptebene detektierten Induktion von *AtPDR8*. Die auch nach 36h detektierte Induktion auf Proteinebene ist entweder auf die verzögerte Expression der Proteine zurückzuführen oder aber auf ein Mitglied dieser Subfamilie, das nicht auf Transkriptebene untersucht wurde. Letzteres ist möglicherweise auch der Grund für die Detektion einer deutlichen Induktion auf Proteinebene nach Benoxacor-Behandlung, die aber auf Transkriptebene nicht gezeigt werden konnte. Die Bromoxynilbehandlung führte zu keiner eindeutigen Reaktion auf Proteinebene. Da auch auf Transkriptebene kein Mitglied dieser Subfamilie durch Bromoxynil induziert wurde, stehen diese beiden Ergebnisse im Einklang miteinander.

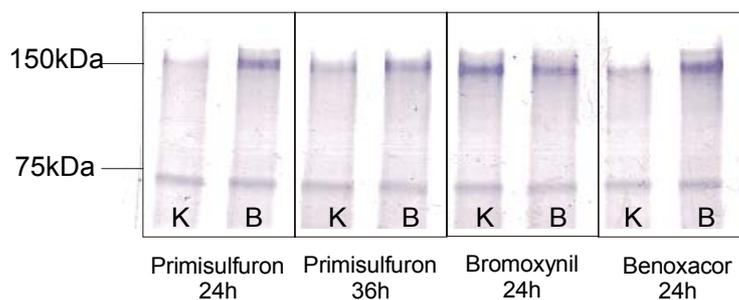


Abb. 3.19: Induktionen der PDR-Transporter auf Proteinebene. 10µg Protein/Spur von mikrosomalen Fraktionen aus Blättern der vier Behandlungen (je Kontrolle (K) und Behandlung (B)) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, im Western-Blot auf eine Membran übertragen und mit dem Antikörperserum α -fampdr behandelt. Links angegeben ist der Größenstandard des Proteinmarkers.

3.4 Isolierung einer Insertionsmutante

Transgene Pflanzen, die in einem ausgewählten Gen so verändert sind, dass die Funktion entweder beeinträchtigt oder vollständig ausgeschaltet ist („*knock-out*“), können einen wichtigen Beitrag zur Funktionsaufklärung leisten. Zwei ABC-Transportergene wurden ausgewählt, um in einer Sammlung von Insertionsmutanten gezielt nach diesen „*knock-out*“-Linien zu suchen. Ist eine Linie mit einer einzigen Insertion in dem gewählten Gen gefunden, kann neben einer phänotypischen Charakterisierung auch den Fragen nachgegangen werden, ob sich die organspezifische Expression anderer, naher verwandter ABC-Transporter im Vergleich zum Wildtyp verändert und ob und wie sich die Expressionsprofile nach Xenobiotikabehandlung verändern.

3.4.1 Identifizierung von Insertionslinien am MPI für Züchtungsforschung

Um nach Insertionsmutanten zu suchen, bot sich das ZIGIA-Projekt an. Ziel des ZIGIA-Projektes am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln ist es, eine Sammlung an Mutanten zu etablieren, in denen alle 25.500 Gene von *Arabidopsis thaliana* betroffen sind, um so eine Basis für eine umfassende Genfunktionsstudie zu schaffen. Die Population umfasst derzeit 11.000 Linien, die durchschnittlich 8-16 *En*-Insertionen tragen (Wisman *et al.*, 1998). Zum Zeitpunkt der Suche nach ABC-Transportermutanten, umfasste die Sammlung lediglich 3.000 Linien mit ca. 15.000 Insertionen (Winkler *et al.*, 1998). Um möglichst effizient einzelne Insertionslinien zu identifizieren, sind die Pflanzen in einem dreidimensionalen System organisiert und die DNA der Pflanzen wird so gepoolt, dass nach der Durchführung von zwei PCR-Ansätzen auf eine Einzelpflanze rückgeschlossen werden kann. Werden in dem zweiten PCR-Ansatz positive Signale erhalten, so kann die Einzelpflanze, mit der gesuchten Insertion, identifiziert werden (Winkler *et al.*, 1998).

Am MPI für Züchtungsforschung wurden zu den beiden Genen *AtMDR4* und *AtPDR4* Oligonukleotide für das PCR-Screening hergestellt. Diese wurden so in den Genbereich gelegt, dass es je ein Primerpaar im vorderen und hinteren Genbereich gab, die theoretisch die Amplifizierung dieser Bereiche ermöglichten (*AtMDR4*: 4411fw1, 4411bw1, 4411fw2, 4411bw2 und *AtPDR4*: 5168fw1, 5168bw1, 5168fw2, 5168bw2; Sequenzen sind im Anhang 7.3.4 aufgeführt). Jeder der genomischen Oligonukleotide wurde in den PCR-Ansätzen mit zwei Oligonukleotiden kombiniert, die jeweils am Ende des Transposons binden konnten. Dies ermöglichte die Amplifizierung eines chimären PCR-Produktes, das also Teile des *En*-Elementes und des gewünschten Gens enthielt, unabhängig von der Orientierung des inserierten *En*-Elementes.

Am MPI für Züchtungsforschung konnten für das Gen *AtMDR4* drei und für *AtPDR4* zwei Insertionslinien identifiziert werden. Die für *AtPDR4* die Signale nicht ganz eindeutig waren, mussten die zwei Linien noch aus fünf Linien herausgefunden werden (Tabelle 3.6).

Tab. 3.6: Isolierte Pflanzenlinien am MPI für Züchtungsforschung, die Transposoninsertionen in den Genen *AtMDR4* und *AtPDR4* tragen. Angegeben ist, ob die Insertion eindeutig der Pflanzenlinie zugeordnet werden konnte (ja) oder nicht (?). Unter den fünf Linien für *AtPDR4* sind aber zwei Linien, die die Insertion tragen. Zusätzlich sind die Oligonukleotidkombinationen angegeben (Sequenzen siehe 7.3.4), mit denen die Insertionen detektiert wurden. In den weiteren Untersuchungen wurde eine eigene Bezeichnung (Eigene Bez.) eingeführt.

Genname	Insertion	Pflanzen-Nr.	Eigene Bez.	Oligo- Kombination
AtMDR4	ja	7AAB1111	1	4411bw1/En26+8202
AtMDR4	ja	5AEB92	2	4411bw1/En26+8202
AtMDR4	ja	5ABA22	3	4411bw1/En26+8202
AtPDR4	?	7AT117	4	5168bw1/En26+8202
AtPDR4	?	7AS5	5	5168bw1/En26+8202
AtPDR4	?	7AQ106	6	5168bw1/En26+8202
AtPDR4	?	4ACA107	7	5168bw1/En26+8202
AtPDR4	?	4ACA108	8	5168bw1/En26+8202

3.4.2 Bestätigung der Insertionen

Aus den 8 Kandidaten wurden nun die Linien isoliert, in denen sich die Insertion bestätigen ließ. Gleichzeitig konnte dabei die Orientierung des *En*-Elementes festgestellt werden, indem jeweils nur ein Oligonukleotid passend zum *En*-Element in der PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Außerdem sollte die genaue Insertionsstelle determiniert werden, da dies Aufschluss über die zu erwartende Auswirkung der Insertion geben kann. So kann die Insertion im Promotorbereich entweder zu einem „*knock-out*“ führen, oder aber auch nur zu einem veränderten Transkriptionsmuster. Insertionen im vorderen Bereich führen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu einem Funktionsverlust dieses Gens, weiter am Ende vielleicht nur zu einer Funktionsbeeinträchtigung.

In je 30 Nachkommen einer Kandidatenlinie wurde mit den in Tabelle 3.6 angegebenen Oligonukleotidkombinationen nach transposontragenden Nachkommen gesucht (2.14.1). In Linie 2 konnte die Insertion in Gen *AtMDR4* bestätigt werden. Durch die Kombination eines genomischen mit je einem *En*-Oligonukleotid wurde die Orientierung des Transposons in zwei Nachkommen bestimmt. Um die genaue Insertionsstelle bestimmen zu können, wurde mit der positiv getesteten Kombination das PCR-Produkt angereichert und sequenziert. Beide Sequenzen waren identisch und enthielten sowohl Teile des *En*-Elementes als auch des gesuchten Gens (Abbildung 3.20). Das Transposon ist an Position 1135 inseriert und befindet sich somit im 5. Exon des Gens *AtMDR4*. Die Insertion in einem Exon führt mit sehr großer Wahrscheinlichkeit zu einem „*knock-out*“ dieses Gens. Sollte trotzdem eine Transkription und Translation des ersten Teilstücks erfolgen, so wird dieses Protein nicht funktionsfähig sein, da diese Insertion im Bereich der ersten nukleotidbindenden Domäne liegt (Abbildung 3.16).

AtMDR4 (Linie 2):

```

1   AAACCCACAC TCTTAAATTA AAAGCGTCGG TTTCATCGGG ACCCCGACAC TCTTAAATTA
61  AGAGTGTCGG TGCAGCAAAA CCCACACTTT TACTTCCATT AAGAGTGTCG GCCCCGACAC
121 TCTTAAATTA ACTGACACTC CTTTGACGTT TTCTTGTAGT GGATAAGCAA TTACAATAAA
181 CATCTGTGCA CTGCTTATAA AGCAGGAGTC ATTGAAGGTG GTTCAACTGG ATTGGGTCTT
241 GGAACGCTCT TTCTTGTAGT CTTTGTAGC TACGCTTAG CAGTATGGTA TGGAGGAAAG
301 TTGATATTGG ATAAAGGCTA CACAGGAGGA CAAGTCTCA ATATCATCAT CGCTGTTTTA
361 ACTGGATCCA TGTAAGTACC TTTCATTAGC AATACCTCTT TGGTTCATTA ACTTCCCTGC
421 AAATAATTT GAGATATCTT TTTGTTCCCTT CCTTAGGTCG TTAGGTCAA CATCGCCTTG
481 CTTAAGCGCA TTTGCAGCTG GACAAGCCGC GGCTTACAAG ATGTTTGAGA CAATTGAGAG
541 AAGACCTAAC ATAGATTCTT ATAGTACAAA TGGTAAAGTT TTGGATGACA TTAAGGGAGA
601 T

```

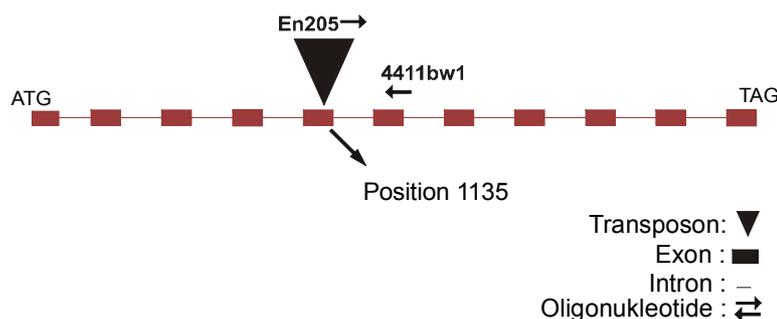


Abb. 3.20 : Insertionsstelle des *En*-Elementes in Gen *AtMDR4*. Im oberen Teil ist die Teilsequenz des PCR-Produktes gezeigt (schwarz: Sequenz des *En*-Elementes; rot: Sequenz von *AtMDR4*). Im unteren Teil ist die Insertionsstelle im Bezug auf das gesamte Gen gezeigt.

Auch für die Nachkommen der Linie 8 (*AtPDR4*) konnte die Insertion bestätigt werden. Der positive Nachweis konnte bei dieser Linie nur dann erfolgen, wenn von dem PCR-Ansatz eine weitere Reaktion angesetzt wurde und mit einem eingerückten genomischen Primer (5168nbw1) eine „semi-nested“ PCR durchgeführt wurde. Das PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden En205 und dem etwas eingerückten genomischen 5168nbw1 hergestellt wurde, wurde aufgereinigt und sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit der Sequenz des Gens verglichen und war identisch. Die Insertion befindet sich demnach im Bereich des 21. Exons von insgesamt 24. Allerdings überspannte die erhaltene Sequenz entweder nicht den Übergang zum *En*-Element (Sequenzierung mit 5168nbw1) oder die Sequenzierung brach frühzeitig ab (Sequenzierung mit En 205). Da in diesem Bereich in der PDR-Subfamilie die transmembranen Domänen liegen, die vermutlich die Substratspezifität determinieren (Higgins, 1995), könnte es durch diese Insertion, vorausgesetzt die Transkription und die Translation sind nicht von vorne herein schon unterbunden, zu einem Verlust der Substraterkennung oder zu einer Veränderung der Substratspezifität kommen.

Für die anderen 6 Linien konnte die Insertion des Transposons in dem gewünschten Gen nicht bestätigt werden.

3.4.3 Rückkreuzungen

Nachdem die Insertionen der *En*-Elemente in den ausgewählten Genen bestätigt werden konnte, sollten nun die in den Linien 2 und 8 zusätzlich im Genom verteilten Transposons durch Rückkreuzungen entfernt werden. Pflanzen, in denen die Insertion durch PCR bestätigt werden konnte, wurden in Wildtyp-Pflanzen (Col-R) des auch im ZIGIA-Projekts verwendeten Ökotyps rückgekreuzt (2.14.4). Die aus den Kreuzungen stammenden Samen wurden ausgesät und von den Pflanzen erneut die Insertion mittels PCR bestätigt.

Beide Linien wurden so zweimal in den Wildtyp gekreuzt. Für Linie 2 waren in jedem Fall die Insertionen bestätigt worden, für Linie 8 konnte nur nach der ersten Rückkreuzung die Insertion bestätigt werden.

3.4.4 Nachweis der *En*-Elemente

Um nach wenigen Rückkreuzungen einen Einblick zu erhalten, wieviele weitere Insertionen in dem Genom enthalten sind, wurde eine Southern-Analyse für Linie 2 und Linie 8 durchgeführt.

Die genomische DNA (2.10.8.2) der Ausgangslinien, der Pflanzen nach der 2. Rückkreuzung und des Wildtyps Col-R wurde mit *Hind*III restriktionsverdaut und einer Southern-Analyse (2.14.5) unterzogen. Die *En*-Sonde, mit der hybridisiert wurde, stammte aus dem 5'-Bereich des Transposons (Abbildung 3.21).

Die erwarteten Bandengrößen betragen für Linie 2 2.238bp und für Linie 8, da hier nicht die genaue Insertionsstelle bestimmt werden konnte, ca. 2500bp. Die Wildtyp-DNA zeigte wie erwartet keine Bande. Das Ausgangsmaterial für Linie 2 enthielt acht Insertionen. Nach zwei Rückkreuzungen waren noch sieben Insertionen vorhanden, davon sind noch vier an derselben Stelle, wie im Ausgangsmaterial. An drei Stellen erscheinen neue Banden, die möglicherweise auf einen unvollständigen Restriktionsverdau zurückzuführen sind. Da das *En*-Transposon aber weiterhin aktiv bleibt, ist alternativ nicht auszuschließen, dass dies eine Folge von neuen Insertionen des Transposons ist. Die Insertion in dem Gen *AtMDR4* ist auch nach 2 Rückkreuzungen noch bei 2,3 kb nachzuweisen. Die Southern-Analyse für Linie 8 bestätigte das negative PCR-Ergebnis nach der zweiten Rückkreuzung, denn die Bande bei 2,5kb, die im Ausgangsmaterial noch zu detektieren war, konnte nach zwei Rückkreuzungen nicht mehr detektiert werden (ohne Abbildung).

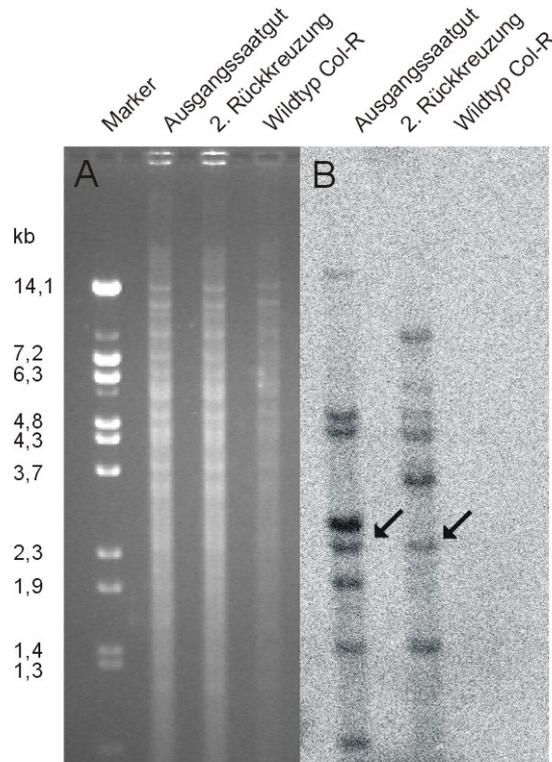


Abb. 3.21: Southern-Analyse der Insertionslinie 2 für das Gen *AtMDR4*. A: Restriktionsverdaute genomische DNA der Ausgangsline, der gleichen Linie nach der 2. Rückkreuzung und des Wildtyps nach Auftrennung in einem Agarosegel (Ethidiumbromidfluoreszenz), links angegeben sind die Bandengrößen des Markers in kb. B: Southern-Blot (2.14.5.2) nach der Hybridisierung mit einer Sonde für das *En*-Element, mit Pfeilen markiert sind die Insertionen im Gen *AtMDR4*.

3.4.5 Fazit

Für die endgültige Vereinzelung der gewünschten Insertion müssten für Linie 2 noch mindestens 5-6 Rückkreuzungen vorgenommen werden. Linie 8 sollte nach der ersten Rückkreuzung erneut ausgesät werden, um dort die Insertion noch einmal zu bestätigen und müsste dann noch mindestens 5-6 mal in den Wildtyp rückgekreuzt werden. Da der Umfang dieser noch notwendigen Arbeiten den zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit überstieg, wurden die Arbeiten an dieser Stelle von mir eingestellt.

4 Diskussion

Pflanzen haben ein universelles Detoxifizierungssystem, mit dem sie eine große Anzahl an natürlichen und synthetischen Chemikalien metabolisieren können. Ein wichtiger Mechanismus dabei ist die Konjugation der Substanzen mit hydrophilen Konjugaten wie Glutathion oder Glucose. Diese Konjugate können anschließend in einem ATP-abhängigen Mechanismus aus dem Cytosol in die Vakuole oder in den Apoplasten kompartimentiert werden. Diese Detoxifizierungsreaktionen haben viel Ähnlichkeiten mit den Reaktionen des sekundären Metabolismus. Transportvorgänge von Glutathion-Konjugaten in die Vakuole zeigten mechanistische Ähnlichkeiten mit ABC-Transportern, die aus medikamententoleranten menschlichen Tumorzellen bekannt sind. Da es bisher zu ABC-Transportern in *Arabidopsis thaliana* nur wenige experimentelle Daten gibt, lag der Fokus der hier vorliegenden Arbeit auf dieser Genfamilie.

Für wichtige Genfamilien, die an der Detoxifizierung beteiligt sind, Cytochrom P450 Monooxygenasen, UDP-Glycosyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen und ABC-Transporter wurde ein funktionsbezogener DNA-Macroarray („Detox-Array“) etabliert. Aufgrund des mittlerweile abgeschlossenen Sequenzierungsprojektes der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* war es möglich, genspezifische Sonden zur Erstellung von Expressionsprofilen herzustellen. Die hohe Spezifität dieser Sonden ermöglichte auch hoch homologe Mitglieder dieser Genfamilien differenziert zu betrachten und Kreuzhybridisierungen weitestgehend auszuschließen.

Der Detox-Array wurde eingesetzt, um die organspezifische Expression der ABC-Transporter zu untersuchen. Damit wurde eine wichtige Basis für weitere Arbeiten hergestellt.

Außerdem wurden nach Behandlung mit zwei Herbiziden, Primisulfuron und Bromoxynil, die sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrem Wirkort unterscheiden und dem in Nutzpflanzenkulturen eingesetzten Safener Benoxacor Expressionsprofile der ausgewählten Genfamilien erstellt. Die komplexen Reaktionsmuster stellen eine Basis für die Identifizierung einzelner responsiver, und damit möglicherweise an der Detoxifizierung beteiligter Gene dar. Im Vergleich mit weiteren von Kooperationspartnern durchgeführten Versuchen wurden die Expressionsprofile anhand einer Hauptkomponentenanalyse zueinander in Bezug gestellt.

4.1 Spezifität und Sensitivität des Detox-Arrays

Die meisten bisher bestehenden DNA-Arraysysteme nutzten cDNAs mit einer Länge zwischen 500bp und 1,5kb als Sonden (Ruan *et al.*, 1998; Schena *et al.*, 1995), und nur wenige nutzten den Bereich der 3'-untranslatierten Bereiche der cDNA zur Synthese von genspezifischen Sonden mit einer Länge zwischen 100bp und 500bp (Hauser *et al.*, 1998; Yazaki *et al.*, 2000). Für cDNA Arrays können öffentlich zugängliche cDNA-Bibliotheken genutzt werden (<http://arabidopsis.org/abrc/>) oder eigene cDNA-Banken eingesetzt werden, auch ohne dass die Sequenzen der einzelnen Klone bekannt sind. Dies ermöglicht die

Entdeckung neuer und bisher nicht charakterisierter Gene, insbesondere in nicht sequenzierten Organismen. Komplette cDNA-Klone beinhalten einen hohen Anteil kodierender Sequenz. Weil auf kodierende Bereiche ein starker Selektionsdruck wirkt, der darauf abzielt die funktionellen Domänen eines Proteins zu konservieren, bringt dieses System entscheidende Nachteile mit sich. Genfamilien, deren Mitglieder zum Teil hohe Homologien aufweisen, können aufgrund von Kreuzhybridisierungen nicht differenziert betrachtet werden. Wie in Abbildung 3.1 anhand einer Datenbankanalyse und in Abbildung 3.2 anhand eines methodischen Vergleichs gezeigt werden konnte, ist es mit spezifischen Sonden, im Gegensatz zu cDNA-Klonen möglich, die relativen Expressionsniveaus einzelner Gene, wie sie anhand der spezifischen Methode der RT-PCR detektiert wurden, in gleichen Verhältnissen nachzuweisen. Da mit dem hier etablierten Detox-Array ausgewählte Genfamilien untersucht werden sollten, war die hohe Spezifität der Gensonden eine der wichtigsten Voraussetzungen.

Zur Untersuchung der Spezifität wurde eine Homologiegrenze von 70% innerhalb eines Sequenzbereichs von 70bp festgelegt. Untersuchungen zur Kreuzhybridisierung anhand von cDNAs zeigten, dass unterhalb einer Sequenzhomologie von 70% nahezu keine Kreuzhybridisierung mehr nachzuweisen ist (Xu *et al.*, 2001). Experimentelle Daten zeigten, dass sich auch bei höheren Homologien Kreuzhybridisierungen ausschließen lassen. Expressionsmuster von Genen, deren Sonden höhere Homologien als 70% aufwiesen, konnten im Experiment voneinander unterschieden werden. So war zum Beispiel die für das *AtMDR10* Gen eingesetzte Sonde über einen Bereich von 235bp zu 73% dem *AtMDR2* Gen homolog, währenddessen sich die Sonde für *AtMDR2* als genspezifisch erwies. Im Falle einer Kreuzhybridisierung müßten sich die organspezifischen Expressionsmuster beider Sonden gleichen. Beide Gene konnten zwar in der Schote nachgewiesen werden, aber nur *AtMDR2* wurde auch in den Blütenständen detektiert. Die unterschiedlichen Expressionsmuster beider Gene schließt eine tatsächliche Kreuzhybridisierung im Experiment für diesen Fall aus (Abbildung 3.8). Um aber eine größtmögliche Sicherheit zu haben, dass es sich tatsächlich um spezifische Sonden handelt, ist diese Grenze dennoch sinnvoll und sollte zukünftig für die Neusynthese von Sonden, wenn möglich, eingehalten werden.

Die Genaktivitäten der spezifischen Sonde und des cDNA-Klons für *AtPDR8* (43A12) unterschieden sich in der Wurzel um den Faktor 2 (Abbildung 3.2). Dies warf die Fragen auf, ob der Unterschied mit dem Verlust an Sensitivität der spezifischen Sonden zu erklären ist, ob die Länge der Sonden einen Einfluss auf die Signalintensität hat oder ob Kreuzhybridisierungen im Experiment zur Verstärkung der Signalintensität geführt haben.

Die Untersuchungen zur Sensitivität mittels Zugabe synthetischer RNA (*pAW109*) zeigte, dass die minimale Anzahl an zu detektierenden Molekülen bei 50×10^6 lag (Abbildung 3.7). Dies entspricht bei einer Zugabe zu $30 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA, und der Annahme, dass 2% davon mRNA ist, einem Detektionslimit von 1/20.000 (3.1.4). Die Bestimmung der Sensitivität in einem vergleichbaren DNA-Array (Bernard *et al.*, 1996), in dem cDNAs als fixierte Sonden eingesetzt wurden, ergab ebenfalls ein Detektionslimit von 1/20.000. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Erhöhung der Spezifität der fixierten Sonden nicht zu einem Verlust der Sensitivität geführt hat.

Vermutlich hat die Länge der Sonden nur einen geringen Einfluss auf die Signalintensität. Zum einen zeigten die 200bp und 300bp langen Sonden für die synthetische RNA (*pAW 109*, Applied Biosystems) oberhalb des Detektionslimits von 50×10^6 Kopien keinen Unterschied in der Signalintensität (Abbildung 3.7). Zum anderen wurde die Signalintensität von dem 1kb

langen cDNA-Klon 43A12 mit zwei weiteren verglichen, die ebenfalls zu *AtPDR8* gehören und 800bp (49G12) und 1,5kb (184B22) lang sind. Auch hier zeigten sich nur geringe Unterschiede in der Signalintensität, die aber nicht direkt mit der Länge der Klone in Relation zu setzen waren (ohne Abbildung). Um den Einfluss der Länge ausschließen zu können, müssten längere Sonden passend zur synthetischen RNA auf den Detox-Array integriert werden und die Signalintensitäten untersucht werden.

Die genspezifische Sonde für *AtPDR8* wies im Gegensatz zu den cDNA-Klonen keine weiteren Kreuzhybridisierungen in dem Datenbankvergleich auf. Die drei cDNA-Klone hatten jeweils Homologien zu zwei weiteren Genen, die über einen längeren Bereich als 70bp höher als 70% war (Anhang 7.2). Vermutlich liegt hier der Grund für die unterschiedlichen Signalintensitäten zwischen genspezifischer Sonde und cDNA-Klon.

4.2 Organspezifische Expression der ABC-Transporter

Als Basis für alle weiteren Arbeiten diente die Untersuchung der organspezifischen Expression der ABC-Transporter (3.2) in Wurzel, Blatt, Stängel, Blütenständen und Schoten. Die Auswahl der zu untersuchenden ABC-Transporter fand bis Ende August 2000 statt. Der Fokus lag auf den Volllängentransportern, für die 26 genspezifische Sonden hergestellt wurden. Zwei weitere Gene, die zu den halben Transportern gehören, wurden zusätzlich in die Untersuchungen mit einbezogen. Seit Beendigung des Sequenzierungsprojektes im Dezember 2000 gibt es den Annotierungen zufolge, 52 Volllängentransporter und 103 ABC-Transporter insgesamt (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

Die **Subfamilie der MRP** (multidrug-resistance-associated proteins) wurde anhand von neun Mitgliedern untersucht. In Northern-Experimenten und in Reportergenkonstrukten wurden bereits die Expressionen von fünf MRPs untersucht (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

Die in dem Detox-Array detektierten Expressionen von *AtMRP5* in Wurzeln, Blütenständen und Schoten entsprechen im Wesentlichen den Expressionsmustern der Reportergenkonstrukte, die hohe Expressionen in Wurzeln, Blüten und Schoten zeigten (Gaedeke *et al.*, 2001). Zusätzlich zeigten die histochemischen Lokalisierungsexperimente transkriptionelle Aktivität in Schließzellen und in den Leitgeweben niederer und höherer Ordnung des Blattes. Für die Detektion solcher auf wenige Zellen begrenzten Transkripte sind Reportergenkonstrukte besonders gut geeignet. Da für die Erstellung eines Expressionsprofils jedoch das ganze Blatt geerntet wird, das die große Menge an Mesophyllzellen einschließt, werden einzelne, auf wenige Zellen begrenzte Transkripte verdünnt und können somit unterhalb der Sensitivitätsgrenze der Arraymethode sein.

In Northern-Analysen, in denen Sonden passend zum 3'-untranslatierten Ende der Gene *AtMRP1* und *AtMRP2* zur Hybridisierung eingesetzt wurden, wurde für *AtMRP1* im Vergleich mit *AtMRP2* eine höhere Expression in Wurzeln, Stängeln und Blüten gezeigt (Lu *et al.*, 1998). Die Array-Experimente bestätigten diese Ergebnisse, mit der Ausnahme, dass die Expression im Blatt für beide Gene nicht detektiert werden konnte. In Schoten, die im Northern-Experiment nicht untersucht wurden, war die Expression für *AtMRP2* höher als für *AtMRP1*. Außerdem war die Expression in der Wurzel für beide Gene in Relation zu den anderen Organen höher als es im Northern-Experiment gezeigt wurde. Die bestehenden

Unterschiede in der organspezifischen Expression sind vermutlich auf methodische Unterschiede zurückzuführen. Das für die Arrays verwendete Pflanzenmaterial wurde hydroponisch angezogen und außerdem nach drei und nicht nach fünf Wochen wie bei Lu *et al.* (1998) geerntet.

Frühere Untersuchungen des organspezifischen Expressionsmusters des Gens *AtMRP3*, die mittels Dot-Blot-Northern und einem cDNA-Klon von *AtMRP3* als Sonde durchgeführt worden sind, zeigten eine ubiquitäre und gleich starke Expression in allen untersuchten Organen (Keimling, Spross, Wurzel, Stängel) (Tommasini *et al.*, 1998). Dieses im Gegensatz zu den Array-Ergebnissen wenig differenzierte Bild ist womöglich auf Kreuzhybridisierungen des eingesetzten cDNA-Klons als Sonde zurückzuführen.

Mit dem Detox-Array konnte für *AtMRP4* eine relativ starke Expression in Schoten und eine schwächere, aber detektierbare Expression in Wurzeln und Stängeln nachgewiesen werden. In der Literatur wird die Expression dieses Gens im Vergleich zu *AtMRP3* als niedriger eingestuft (Tommasini *et al.*, 1997). Da dort für beide Gene jedoch ein cDNA-Klon als Sonde eingesetzt wurde und die Expression in ganzen Pflanzen in einem Dot-Blot-Northern untersucht wurde, sind die Ergebnisse nicht vergleichbar.

In der **Subfamilie der MDRs** (*multidrug resistant proteins*) konnten Transkripte aller acht untersuchten Mitglieder in mindestens einem der untersuchten Organe detektiert werden. *AtMDR1*-Transkripte konnten sogar in allen fünf untersuchten Organen nachgewiesen werden. *AtMDR1* wurde verstärkt in Blütenständen und Stängeln und vermindert in Blättern exprimiert. *AtMDR1* (*AtPGP1*) war der erste ABC-Transporter, der in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen und inzwischen näher charakterisiert wurde (Dudler & Hertig, 1992; Sidler *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass dieses Gen in dem Transport von Signalmolekülen involviert ist, die direkt oder indirekt die Länge des Hypokotyls regulieren. Mittels Reporterengenkonstrukten wurden Wurzel- und Sproßscheidung als exprimierende Organe nachgewiesen. Außerdem zeigten sich Expressionen des Gens an den Ansatzstellen der Blätter (Nodien), an der Basis der Stammblätter, am proximalen Teil der Mittelrippe und in den meristematischen Regionen der sekundären Blütenstände und in den Blütenböden (Sidler *et al.*, 1998). Das Expressionsmuster von *AtMDR1* deckt sich mit den detektierten Expressionen mittels DNA-Array. Insbesondere die Beobachtung, dass die GUS-Färbung nur in jungen Blättern sichtbar war, aber nicht mehr in adulten, deckt sich mit der niedrigen Genaktivität in den Blättern. Außerdem konnten die relativen Expressionshöhen in den Organen mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 3.9).

Die hohe Expression von *AtMDR4* in der Wurzel (Genaktivität 0,15), die in dieser Subfamilie nur von *AtMDR1* noch übertroffen wurde (Genaktivität 0,3), konnte ebenfalls mittels RT-PCR bestätigt werden, wobei allerdings die sensitivere Methode eine schwache Expression in den anderen vier Organen andeutet (Abbildung 3.9). Die schon in 4.1 diskutierte Expression der beiden nahe verwandten Gene *AtMDR2* und *AtMDR10* weist auf eine Spezialisierung in den Reproduktionsorganen hin, da nur diese beiden Gene ausschließlich in diesen Organen nachgewiesen werden konnten.

Die **Subfamilie der PDR** (*pleiotropic drug resistant proteins*) war zum ersten Mal Bestandteil systematischer Expressionsanalysen. Zwei Gene (*AtPDR1* und *AtPDR8*) wurden in allen fünf Organen nachgewiesen, wobei die höchste Expression für *AtPDR8* in der Wurzel

gezeigt wurde. Auch hier konnten die relativen Expressionshöhen in den Organen mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 3.9).

In einem genomweiten Ansatz von *Arabidopsis thaliana* werden die Transkripte als cDNA-Klone aus unterschiedlichen Organen und Entwicklungsstadien isoliert und die Genzugehörigkeit durch Sequenzierung eines Teilstücks festgestellt („*expressed sequenced tags*“, EST). Diese Informationen sind über öffentliche Datenbanken wie TIGR und MIPS erhältlich und geben Hinweise darauf, in welchen Organen die Gene häufig oder weniger häufig exprimiert sind. Vergleicht man diese Daten jedoch mit den mittels Detox-Array erstellten Expressionsprofilen, so zeigen sich doch einige Unterschiede. Für *AtPDR5* existiert in der TIGR-Datenbank kein cDNA-Klon (Stand vom 07.12.01), obwohl die Expression in der Wurzel nachgewiesen werden konnte. Für *AtAOH1* enthält die TIGR-Datenbank nur einen aus keimenden Samen stammenden cDNA-Klon (Stand vom 07.12.01), jedoch konnten mittels Detox-Array *AtAOH1*-Transkripte in allen Organen der Pflanze nachgewiesen werden. Die mittels Detox-Array erstellten Expressionsprofile zeigen zum einen, dass die in den Datenbanken annotierten Gene zum großen Teil exprimiert werden, auch wenn keine oder nur aus anderen Organen stammende ESTs in der TIGR-Datenbank vorhanden sind. Zum anderen zeigten die erhobenen Expressionsdaten Übereinstimmung mit der Literatur, insbesondere dann, wenn auch dort für Northern-Analysen Sonden aus dem 3'-UTR eingesetzt wurden oder Reportergenkonstrukte zum Vergleich zur Verfügung standen.

Die umfassende Untersuchung zeigte ein Bild eines differenzierten Expressionsprofils der ABC-Transporter in *Arabidopsis thaliana*. Zusammen mit der großen Anzahl von 103 annotierten ABC-Transportern ist diese Genfamilie, auch wenn ein redundanter Anteil von Genen nicht auszuschließen ist, vermutlich in vielen verschiedenen Prozessen der Pflanze beteiligt. Zur Zeit ist die Beteiligung von ABC-Transportern an endogenen Kompartimentierungsprozessen noch reine Spekulation. An folgenden notwendigen Transportprozessen, ist jedoch eine Beteiligung der ABC-Transporter nicht auszuschließen: 1.) Da es kein Exkretionssystem wie in tierischen Organismen gibt, ist die Exkretion auf zellulärer Ebene von besonderer Bedeutung. 2.) Die vielen verschiedenen sekundäre Metabolite, von denen bis heute 50.000 verschiedene in Pflanzen identifiziert wurden (Martinoia *et al.*, 2000), wären für die synthetisierenden Zellen zum Teil toxisch, wenn sie nicht in andere Zellkompartimente transportiert werden würden. 3.) Auch die chemische Komplexität der direkten Umgebung, insbesondere in der Rhizosphäre, erfordert einen Schutzmechanismus gegen die zum Teil toxischen Substanzen (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

4.3 Reaktionen der ABC-Transporter auf Xenobiotika

Spätestens seit Beendigung des Sequenzierungsprojektes von *Arabidopsis thaliana* ist klar (AGI, 2000), dass die potentiell am Xenobiotikametabolismus beteiligten Genfamilien mit einer großen Anzahl an Isoenzymen in der Pflanze vorhanden sind. Mit dem in dieser Arbeit gewählten Ansatz, möglichst alle Vertreter anhand genspezifischer Sonden auf Transkriptebene zu untersuchen, sollte es möglich sein, die Anzahl der möglichen Genkandidaten einzuschränken, um auf dieser Basis die weiterführenden

Funktionsuntersuchungen durchführen zu können. Da die Reaktionen der ABC-Transporter im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse waren, werden diese zunächst separat diskutiert.

Nach der Sprühapplikation mit sublethalen Konzentrationen des Herbizids Primisulfuron, das durch die Hemmung der Acetolactatsynthase die Bildung von verzweigten Aminosäuren verhindert, zeigten fünf ABC-Transporter nach 24h eine deutliche Induktion (Abbildung 3.11 und 3.13). Die Reaktionen von *AtMRP3* und *AtMRP4* bestätigen die bereits in der Arbeit von Tommasini *et al.* (1997) anhand von sterilen Schwimmkulturen gezeigten Induktionen dieser beiden Gene. *AtMRP4* zeigte in der Arbeit von Tommasini *et al.* (1997) eine ca. 2-4fache Induktion, die auch nach der Sprühapplikation des Herbizids gefunden wurde. Die von Tommasini *et al.* (1997) gezeigte 40-fache Induktion von *AtMRP3* konnte in dieser Größenordnung nicht bestätigt werden, allerdings ist die im Array gezeigte ca. 8-fache Induktion von *AtMRP3* eine der stärksten gemessenen Reaktionen (Abbildung 3.13). Die Beobachtungen von Tommasini *et al.* (1997), dass die Induktion von *AtMRP3* in einer Zeitreihe konstant bleibt, währenddessen sich die Induktion von *AtMRP4* mit der Zeit verringert, und die Beobachtung, dass *AtMRP1* nicht durch Primisulfuron induzierbar ist, decken sich mit den Ergebnissen des Sprühversuchs.

Außer den bereits erwähnten ABC-Transportern aus der Subklasse der MRP konnte die Induktion eines weiteren Mitglieds dieser Subklasse nachgewiesen werden. *AtMRP5* zeigte nach 24h eine ca. 4-fache Induktion, die nach 36h nicht mehr nachzuweisen war. Ebenso verhielt sich der einzige ABC-Transporter aus der Subklasse der AOH. Mit einer ca. 6-fachen Induktion zeigte der ABC-Transporter *AtPDR8* eine der stärksten Induktionen, die ebenfalls nur transient nach 24h auftrat. Nach der Sprühapplikation sublethaler Mengen von Bromoxynil wurde ein weiterer bisher nicht untersuchter ABC-Transporter induziert. Der aus der TAP-Subfamilie stammende *AtTAPI* wurde durch diese Behandlung ca. 6-fach induziert (Abbildung 3.14) (siehe 4.5).

Mit einem gegen die PDR-Subfamilie gerichteten Antikörper wurde die Induktion auf Proteinebene gezeigt (Abbildung 3.19). Nach Behandlung mit Primisulfuron war die Induktion sowohl nach 24h als auch nach 36h sichtbar. Da die Induktion von *AtPDR8* auf Transkriptebene nur nach 24h nachweisbar war, ist die nach 36h auf Proteinebene detektierte Induktion entweder auf eine verzögerte Expression des Proteins zurückzuführen oder ein weiteres Mitglied dieser Subfamilie, das nicht in den Untersuchungen enthalten war, wurde induziert. Die sichtbare Induktion der PDR-Subfamilie auf Proteinebene nach Benoxacor-Behandlung ist vermutlich auf einen nicht in den Untersuchungen auf Transkriptebene einbezogenen Vertreter zurückzuführen. Untersuchungen in dieser Richtung auf Proteinebene gibt es bisher nur für einen Vertreter der MRP-Subfamilie (Theodoulou *et al.*, 1998). Dabei wurde Weizen mit dem Safener Cloquintocet-mexyl in Kombination mit dem Xenobiotikum Phenobarbital behandelt und die Induktion an isolierten Tonoplastenvesikeln gezeigt.

4.4 Die Transkriptionsprofile

Unter Einsatz des Detox-Arrays war es möglich die Auswirkungen verschiedener Xenobiotika auf 270 Gene des sekundären Metabolismus zu untersuchen. Anhand der in Abbildung 3.15 gezeigten Hauptkomponentenanalyse wurde bereits deutlich, dass die strukturell verwandten

Sulfonylharnstoffe Primi- und Prosulfuron eine ähnliche Reaktion auslösten. Diese Reaktion war grundverschieden von dem Expressionsprofil nach Behandlung mit Bromoxynil.

Da der Detox-Array bereits zur Evaluierung anderer Behandlungen von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt wurde, konnten alle Transkriptionsprofile gemeinsam in einer Hauptkomponentenanalyse untersucht werden (Abbildung 4.1). Dazu gehören die institutsintern durchgeführten Lichtstressversuche von Michael Götz, in denen die Auswirkungen erhöhter UV-B Strahlung auf *Arabidopsis thaliana* einmal in Kombination mit hoher und einmal mit niedriger photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) untersucht wurden. Pierre-Henri Dubuis aus der Arbeitsgruppe von Felix Mauch (Fribourg, Schweiz) führte Versuche mit einem virulenten und einem avirulenten Stamm von *Pseudomonas* durch und behandelte außerdem *Arabidopsis thaliana* mit den Signalmolekülen Salicylsäure, Methyljasmonat und Ethylen.

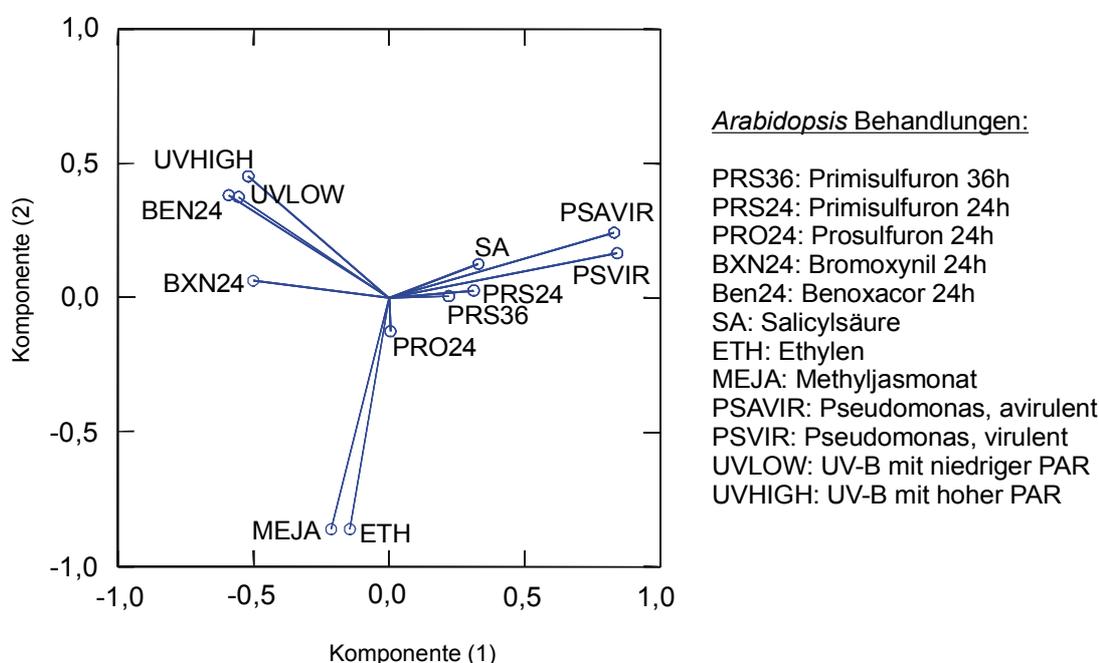


Abb. 4.1: Hauptkomponentenanalyse aller bisher mit dem Detox-Array durchgeführten Versuche. Durchführung der Hauptkomponentenanalyse in Zusammenarbeit mit G. Welzl, IBB (GSF).

Die Unterschiede in den Expressionsprofilen aller untersuchten Gene aufgrund der Herbizidbehandlungen wird im Vergleich mit den zusätzlich durchgeführten Versuchen noch einmal verdeutlicht. Das Expressionsprofil nach Bromoxynilbehandlung grenzt sich deutlich von dem Profil nach Primisulfuronbehandlung ab. Aufgrund der Projektion in die Ebene scheint Prosulfuron nicht die Komponente von Primisulfuron zu teilen. Dass es aber deutliche Übereinstimmungen in den Expressionsprofilen gibt, sieht man deutlich in Abbildung 3.15.

Aufgrund des gleichen Wirkorts und der strukturellen Ähnlichkeit entspricht das auch den Erwartungen.

Die in Abbildung 4.1 gezeigte Hauptkomponentenanalyse zeigt im groben eine Dreiteilung der Reaktionen.

- 1.) Die Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit Methyljasmonat und Ethylen führte, wie in der Hauptkomponentenanalyse zu sehen, zu ähnlichen Expressionsprofilen. Methyljasmonat und Ethylen stellen in dem Signaltransduktionsweg der induzierten systemischen Resistenz Signalmoleküle dar (Glazebrook, 2001), die durch die Kolonisierung der Wurzeln von bestimmten Bakterien der Rhizosphäre ausgelöst wird.
- 2.) In der zweiten Gruppe befinden sich die Behandlungen mit Salicylsäure, mit dem Pathogen *Pseudomonas* und die Primisulfuronbehandlung. Pflanzen haben spezifische Resistenzgene, mit denen sie Pathogene erkennen, die entsprechende Avirulenzgene tragen. Der Kontakt eines solchen Pathogens mit der Pflanze löst eine Pflanzenabwehr aus, die normalerweise den programmierten Zelltod von den Pflanzenzellen nach sich zieht, die in direktem Kontakt mit dem Pathogen stehen. Dieses Phänomen wird hypersensitive Reaktion (HR) genannt und löst ihrerseits eine systemische Resistenz aus, die als systemisch erworbene Resistenz (SAR) bezeichnet wird. Die SAR beinhaltet die Akkumulation des Signalmoleküls Salicylsäure in der gesamten Pflanze (Glazebrook, 2001). Anhand der Hauptkomponentenanalyse ist erkennbar, dass die Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit dem Pathogen *Pseudomonas* und mit Salicylsäure zu ähnlichen Expressionsprofilen geführt hat. Jedoch ist es wichtig an dieser Stelle zu beachten, dass die Grundlage für diese Analyse nur Gene sind, die aus dem Sekundärmetabolismus stammen und Gene, die bekannt dafür sind, dass sie eine Rolle in den Signaltransduktionswegen spielen, nicht auf dem Array vorhanden waren. Völlig neu ist die Beobachtung, dass die Behandlung mit den Sulfonylharnstoffen eine ähnliche Antwort wie Salicylsäure oder einem entsprechenden Pathogen hervorruft.
- 3.) In der dritten Gruppe der Hauptkomponentenanalyse befinden sich die beiden UV-B-Behandlungen und die beiden Xenobiotikabehandlungen mit Bromoxynil und Benoxacor. Insgesamt werden bei diesen Behandlungen nur wenige Gene in ihrem Transkriptniveau verändert. Dennoch könnte man die Ähnlichkeit der Expressionsprofile nach UV-B- und Bromoxynilbehandlung damit erklären, dass in beiden Fällen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst wird.

Pflanzenabwehr gegen Pathogenbefall beinhaltet die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies im Apoplasten. Dieser sogenannte „oxidative burst“ wird sowohl von bestimmten Pathogenen wie zum Beispiel *Pseudomonas* ausgelöst, als auch von dem als Elicitor verwendeten Ozon (Sandermann *et al.*, 1998). Sowohl Pathogen als auch Ozon führen zur Induktion von PR-Proteinen („pathogen-related proteins“) und zur Anreicherung von Salicylsäure (Sandermann *et al.*, 1998). Sauerstoffradikale im Apoplasten führen also zunächst zu einer HR und später zu einer SAR. Solche Sauerstoffradikale, die während Lichtstress oder nach Bromoxynilbehandlung gebildet werden, entstehen im Chloroplasten und führen vermutlich zu einer anderen Form der Antwort, wie die Hauptkomponentenanalyse andeutet (Abbildung 4.1). Anscheinend ist die Pflanze in der Lage Sauerstoffradikale im Apoplasten von denen im Chloroplasten zu unterscheiden.

4.5 Klassifizierung der Auswirkungen

Die dargestellten Auswirkungen der Herbizidbehandlungen in den Hauptkomponentenanalysen (Abbildungen 3.15 und 4.1) und die in Abschnitt 3.3 und Tabelle 3.4 dargestellten Ergebnissen führen zur Ableitung von drei Theorien:

- 1.) Die Applikation eines Herbizids und dessen Penetration in die Zelle induziert die Transkription von Genen, die an der Metabolisierung und damit der Detoxifizierung beteiligt sein können.
- 2.) Die Induktion von Genen, deren Funktion bereits charakterisiert wurde, führt zu der Annahme, dass die Xenobiotika bisher unbekannte Auswirkungen haben.
- 3.) Die Transkriptionsprofile deuten darauf hin, dass es Ähnlichkeiten zwischen einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR) und der Behandlung mit Primisulfuron gibt.

Diese drei Theorien sollen nun im Einzelnen anhand der Reaktionen auf Genebene diskutiert werden.

1.) Metabolisierung der Herbizide

Als erstes wird der Frage nachgegangen, ob sich anhand der Gene, denen man eine Funktion zuweisen kann, Hinweise für eine Beteiligung an der Metabolisierung der Xenobiotika finden.

Die Mehrheit der induzierten Gene ist bisher nicht funktionell charakterisiert und der Metabolismus von **Primisulfuron** in *Arabidopsis thaliana* wurde bisher nicht untersucht. Auch nach diesen Untersuchungen bleibt es spekulativ, welche Gene für eine Metabolisierung verantwortlich sein könnten. Voraussetzung für die Interpretation der Ergebnisse in diesem Sinn ist die Annahme, dass Primisulfuron die Gene induziert, die für die eigene Metabolisierung notwendig sind.

Unter den induzierten Cytochrom P450 Monooxygenasen könnte sich eine befinden, die in der Lage ist Primisulfuron am Phenyl- oder am Pyrimidinring zu hydroxylieren. Eine solche Reaktion ist bereits für mikrosomale Cytochrom P450 Monooxygenasen aus *Zea mays* bekannt und ist die Voraussetzung für die Glucosylierung an 5'-Position, die bereits *in vitro* mit einer partiell aufgereinigten Glycosyltransferase und UDP-Glucose gezeigt wurde (Kreuz & Martinoia, 1998). Von allen induzierten Genen nach Primisulfuronbehandlung, die bereits funktionell charakterisiert wurden, könnte eine UDP-Glycosyltransferase an der Glucosylierung des Primisulfurons an 5'-Position verantwortlich sein. Die durch die Primisulfuronbehandlung induzierte UGT73B3 zeigte Glucosylierungsaktivität in 4'- und 5'-Position gegenüber 2,4- und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Lim *et al.*, 2001a). Diese Struktur ist ähnlich wie die des Phenylringes von Primisulfuron, daher ist eine Glucosylierung von diesem Enzym in 5'-Position denkbar. Aber auch unter den induzierten und bisher nicht charakterisierten Genen könnte sich ein Kandidat für diese Reaktion befinden. Für Hydroxyprimisulfuron-Glucosid, das bei der Glucosylierung in 5'-Position entsteht, konnte bereits ein Transport in isolierte Pflanzenvakuolen nachgewiesen werden. Dabei konnte die Aufnahme durch Zugabe von Mg-ATP stimuliert und durch Vanadat gehemmt werden, wie dies auch typisch für ABC-Transporter vermittelte Transportvorgänge ist (Gaillard *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1996).

Da die Aufnahme von Hydroxyprimisulfuron-Glucosid durch das endogene Glucosid Esculin gehemmt wird, nicht aber die Aufnahme des Metolachlor-Glutathions, wurde vermutet, dass zwei unterschiedliche Systeme für den Transport von Glutathion- und Glucose-Konjugaten verantwortlich sind (Gaillard *et al.*, 1994). In weiteren Studien wurde bereits gezeigt, dass die heterolog exprimierte ABC-Transporter aus der Subfamilie MRP *AtMRP1-3* und *AtMRP5* in der Lage sind unterschiedliche Glutathion-Konjugate zu transportieren (Gaedeke *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1997; Tommasini *et al.*, 1998). Der Transport von Glucose-Konjugaten ohne Glutathion von heterolog exprimierte ABC-Transportern wurde bisher nicht gezeigt. Neben den drei ABC-Transportern der MRP-Subfamilie wurden auch noch zwei ABC-Transporter aus zwei weiteren Subfamilien induziert (*AtAOH1* und *AtPDR8*). Der anschließende Transport des möglicherweise entstehenden Glucose-Konjugats, wie in anderen Pflanzen gezeigt, in die Vakuole (Gaillard *et al.*, 1994), könnte von einem der induzierten ABC-Transporter übernommen werden.

Jedoch können erst heterologe Expressionen aller Kandidatengene und die Isolierung der Metabolite aus *Arabidopsis thaliana* Aufschluss darüber geben, inwieweit die induzierten Gene mit dem Metabolismus von Primisulfuron tatsächlich im Zusammenhang stehen.

Auch der Metabolismus von **Bromoxynil** ist bisher in *Arabidopsis thaliana* nicht näher untersucht worden. Es existieren aber eingehende Untersuchungen der Metabolite von Bromoxynil in *Hordeum vulgare* und *Stellaria media* (Schaller *et al.*, 1992). Außer dem Befund, dass durch Hydrolyse der Nitrilgruppe die Carbonsäure von Bromoxynil (3,5-Dibromo-4-hydroxybenzoesäure) entsteht, werden eine Vielzahl unterschiedlicher Glucoside generiert, die noch mehrfach konjugiert werden.

Für die nach Bromoxynilbehandlung induzierte *UGT75D1* konnte bereits gezeigt werden, dass mit UDP-Glucose und der 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzoesäure eine Umsetzung stattfindet (Messner, persönliche Mitteilung). Da *UGT75D1* im Stammbaum in unmittelbarer Nachbarschaft zu den esterbildenden UGTs *UGT75B1* und *UGT75B2* liegt (Lim *et al.*, 2001a; Lim *et al.*, 2001b), scheint eine Esterbildung bei der Umsetzung möglich. Die nachgewiesenen nicht-extrahierbaren Rückstände in der Ligninfraktion von *Arabidopsis thaliana* fordern einen Transport der Metaboliten über die Plasmamembran (Wunderwald, persönliche Mitteilung). Homologe zu dem induzierten ABC-Transporter der Subfamilie der TAP („*transporter associated with antigen processing*“) sind aus dem menschlichen Organismus bekannt und charakterisiert (Williams *et al.*, 1996). Lokalisiert in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums werden Peptidfragmente, die im Cytosol von Proteasomen degradiert wurden, in das ER transportiert und in Verbindung mit MHC Klasse I Molekülen in Vesikeln an die Plasmamembran transportiert und die Antigene an der Oberfläche präsentiert. Desweiteren wurde gezeigt, dass die stets heterodimere bildenden TAP-Transporter in transfizierten Tumorzelllinien Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Mitoxantrone verleiht. Es wurde spekuliert, dass die hydrophobe Substanz anstatt der Peptide von dem TAP-Komplex in das ER transportiert und via Golgivesikel aus der Zelle hinaus geschleust wird (Lage *et al.*, 2001). Denkbar, wenn auch sehr spekulativ, ist nun, dass auch die Bromoxynilkonjugate ebenso über diesen Weg in den Apoplasten transportiert werden.

2.) Unbekannte Auswirkungen der Herbizide

Andere Enzymaktivitäten von induzierten Genen legen die Vermutung nahe, dass eine Behandlung mit Herbiziden weitreichendere Auswirkungen hat, als die Hemmung des bekannten Wirkortes und die Metabolisierung der Substanz.

So werden zum Beispiel nach Behandlung mit **Primisulfuron** zwei Gene induziert, die vermutlich am Abbau von aromatischen Aminosäuren involviert sind. Die Cytochrom P450 Monoxygenase CYP79B2 katalysiert die Umwandlung von Tryptophan zu Indol-3-acetaldoxim, welches ein Intermediat bei der Umwandlung von Indolglucosinolaten zu Indolessigsäure darstellt (Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2000). Die Glutathion-S-Transferase AtGSTZ1 konvertiert glutathionabhängig Maleylaceton zu Fumarylaceton, ein Reaktionsschritt, der beim Abbau von Tyrosin zu Acetoacetat und Fumarat vorkommt (Dixon *et al.*, 2000). Durch die Hemmung der Acetolactatsynthase wird das bestehende Gleichgewicht zwischen aromatischen und verzweigten Aminosäuren gestört. Bei der Neusynthese von Proteinen ist dies aber wichtig, um einen geregelten Einbau zu gewährleisten. Das Gleichgewicht könnte nun durch den Abbau der aromatischen Aminosäuren wieder hergestellt werden. Denkbar ist auch, dass Primisulfuron einen zweiten, bisher unbekanntem Wirkort hat.

Nach der Behandlung mit **Bromoxynil** wurde *CYP71B7* induziert. Diese Cytochrom P450 Monoxygenase ist in der Lage das Modellsubstrat 7-Ethoxycumarin in Gegenwart von Cuminhydroperoxid zu deethylieren (Maughan *et al.*, 1997), und wird deswegen im Zusammenhang mit dem Terpenoidstoffwechsel diskutiert. Da die genaue Funktion dieses Enzyms nicht bekannt ist und Terpene sowohl Funktionen im primären als auch im sekundären Stoffwechsel haben, bleibt der Zusammenhang ungeklärt.

3.) Vergleich der Transkriptionsprofile

Die in der Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 4.1) aufgedeckten Ähnlichkeiten der Expressionsprofile auf die Behandlungen mit Salicylsäure, *Pseudomonas* und Primisulfuron warfen die Frage auf, ob anhand charakterisierter Gene, die nach Primisulfuronbehandlung induziert waren, auch solche befinden, die mit der Pflanzenabwehr in Form einer systemisch erworbenen Resistenz in bereits in Zusammenhang gebracht wurden.

Unter den nach **Primisulfuronbehandlung** induzierten und bereits charakterisierten Genen, befinden sich zwei Cytochrom P450 Monoxygenasen und eine UDP-Glycosyltransferase. Die nur transient nach 24h induzierte *CYP76C2* (Abbildung 3.11A) wurde bereits mit Zelltod und Seneszenz assoziiert und die Induktion erfolgte stets vor der Entwicklung der hypersensitiven Reaktion (Godiard *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde auch *CYP71B15* (Abbildung 3.13A) induziert, eine Cytochrom P450 Monoxygenase, die auch als *PAD3* in der Literatur beschrieben wird (Zhou *et al.*, 1999). Die *phytoalexin deficient3 (pad3)* Mutation verursacht einen Defekt in der Produktion von Camalexin. Camalexin ist ein in *Arabidopsis thaliana* bekanntes Phytoalexin, das als Pflanzenabwehrstoff nach Infektion mit *Pseudomonas* gebildet wird. Zhou *et al.* (1999) zeigen, dass die Cytochrom P450 Monoxygenase *PAD3* sehr wahrscheinlich in der Biosynthese von Calamexin involviert ist. Auch die induzierte *UGT74F1* kann mit Reaktionen der Pflanzenabwehr in Zusammenhang gebracht werden. Als heterolog exprimiertes Protein bildet die UDP-Glycosyltransferase den Glucoseester sowohl

von Salicylsäure, als auch von Benzoesäure (Lim *et al.*, 2001a). Salicylsäureester wurde neben dem Glucosid der Salicylsäure während der systemisch erworbenen Resistenz als Metabolit identifiziert (Lee & Raskin, 1999).

Die Ähnlichkeit der Expressionsprofile nach Salicylsäure-, *Pseudomonas*- und Primisulfuronbehandlung und einzelne induzierte Gene nach Primisulfuronbehandlung, die bereits zuvor mit der Pflanzenabwehr in Zusammenhang gebracht wurden, legen die Vermutung nahe, dass Primisulfuron eine Elicitor-ähnliche Wirkung auf *Arabidopsis thaliana* hat.

Welche Aufgabe den ABC-Transportern in einem der drei Reaktionsmöglichkeiten zukommt, muss in eingehenden Funktionsuntersuchungen geklärt werden.

Alle untersuchten Mitglieder der MDR-Subfamilie konnten in mindestens einem der untersuchten Organe detektiert werden. Somit kommt dieser Subfamilie sehr wahrscheinlich eine bedeutende physiologische Rolle zu, wie sie bereits für *AtMDR1* gezeigt werden konnte (Sidler *et al.*, 1998). Es wurde für kein Mitglied dieser Subfamilie eine Veränderung der Transkriptmenge nach Xenobiotikabehandlung nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu stehen die veränderten Expressionsstärken bei gleich drei Mitgliedern der Subfamilie der MRP nach Primisulfuronbehandlung. Ein weiterer MRP-Transporter (*AtMRP10*) wurde ausschließlich nach Prosulfuronbehandlung induziert. Da auch diese Subfamilie in allen Organen detektiert werden konnte, scheint zusätzlich zur natürlichen Funktion in ungestressten Situationen noch eine Funktion der Stressabwehr hinzuzukommen, wie sie nach Pathogenbefall mit *Pseudomonas* und scheinbar auch nach Primisulfuronbehandlung zu beobachten ist.

AtPDR8 ist der einzige Vertreter der PDR-Subfamilie der nach Primisulfuronbehandlung induziert wurde. Dies impliziert die Frage, ob *AtPDR8* einen Metaboliten des Sulfonylharnstoffs zu transportieren vermag. Andererseits könnte im Verlauf der Abwehrreaktionen ein erhöhter Transport von Sekundärmetaboliten oder Signalmolekülen nötig sein. Für einen homologen ABC-Transporter in *Nicotiana plumbaginifolia* (NpABC1) konnte gezeigt werden, dass dieser vermutlich an der Sekretion von Sekundärmetaboliten im Rahmen der Pflanzenabwehr beteiligt ist (Jasinski *et al.*, 2001). Da *AtPDR8* auch nach Infektion mit *Pseudomonas* induziert wurde (Pierre-Henri Dubuis, persönliche Mitteilung), ist eine ähnliche Aufgabe auch für *AtPDR8* denkbar.

4.6 Ausblick

Die hohe Anzahl an ABC-Transportern, die durch den Abschluss des Sequenzierungsprojekts von *Arabidopsis thaliana* im Dezember 2000 (AGI, 2000) aufgedeckt wurde, legt eine wichtige Rolle im Sekundärmetabolismus nahe (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Durch die Etablierung des Detox-Arrays konnten für 28 Vertreter die organspezifischen Expressionsmuster als grundlegende Arbeit aufgenommen werden. In gegenwärtigen Arbeiten werden die noch fehlenden Vertreter dieser Superfamilie in dem Detox-Array integriert. Andere Genfamilien, die an den komplexen Vorgängen der Metabolisierung von Xenobiotika beteiligt sein könnten, sollten ebenfalls in den Detox-Array integriert werden (z.B. Peroxidasen).

Mit einem ausgeweiteten Detox-Array könnten weitere Versuche durchgeführt werden. Die genauere Untersuchung der Kinetiken nach Primisulfuron- und Bromoxynilbehandlung könnten einen genaueren Einblick in die zeitlichen Verschiebungen der Genaktivitäten geben.

Wichtig wäre es, ein besseres Verständnis über die Auswirkungen der Xenobiotika auf Pflanzen zu bekommen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führen strukturell ähnliche Herbizide mit gleichem Wirkort auch zu ähnlichen Expressionsprofilen. Die Applikation von Herbiziden, die zwar den gleichen Wirkort haben, sich aber in der Struktur unterscheiden, müssten eine Gruppe von gleichen Genen induzieren, die alleine auf die Wirkung des Herbizids zurückzuführen sind. Im Vergleich zu den verwendeten Sulfonylharnstoffen bieten sich die Imidazolinone an, da sie sich strukturell unterscheiden, aber ebenfalls die Acetolactatsynthase hemmen. Der entgegengesetzte Fall würde eintreten, wenn man die Expressionsprofile von resistenten Mutanten untersucht. In diesem Fall würde die Hemmung der Acetolactatsynthase ausbleiben und die Veränderungen des Transkriptoms wären hauptsächlich auf die Metabolisierung zurückzuführen.

Wie die übergreifende Betrachtung mittels Hauptkomponentenanalyse gezeigt hat, können durch Vergleiche mit weiteren biotischen und abiotischen Stressfaktoren Hinweise auf die Auswirkungen der Xenobiotikabehandlungen erhalten werden. In gegenwärtigen Arbeiten werden weitere UV-B-Behandlungen und Trocken- und Salzstressversuche durchgeführt. Auch Versuche mit dem als Elicitor verwendeten Ozon können in diese Analysen mit einbezogen werden.

Um genaueren Einblick in die molekularen Ursachen für Koregulationen von Genen zu bekommen, können Gene mit gleichen Reaktionsmustern im Promotorbereich auf gleiche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren untersucht werden. So werden gegenwärtig erste Analysen an einer Gruppe von Genen, die transient 24h nach Behandlung mit Primisulfuron induziert waren, durchgeführt.

Eingehendere Charakterisierungen der ABC-Transporter sind notwendig, um mehr über ihre Funktion zu erfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits Insertionsmutanten isoliert, die im Hinblick auf ein verändertes organspezifisches Transkriptionsprofil und Metabolitenspektrum im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden können. Auch die Veränderungen des Expressionsprofils nach Xenobiotikabehandlung können weiteren Aufschluss über die Funktion geben.

Mittels heterologer Expression von besonders interessanten ABC-Transportern in geeignete Hefemutanten, könnten anhand von Transportstudien die transportierten Metabolite identifiziert werden.

Mittels Reportergenkonstrukten und spezifischen Antikörpern kann die gewebe-, und zellspezifische Expression, sowie die subzelluläre Lokalisation aufgeklärt werden, woraus sich wiederum Hinweise auf die Funktion ableiten lassen.

5 Zusammenfassung

Die Superfamilie der ABC-Proteine ist eine der größten bisher bekannten Proteinfamilien. Ihre Mitglieder enthalten ein oder zwei nukleotidbindende Domänen mit je einem Walker A- und B-Motiv, sowie das charakteristische ABC-Motiv. Ein Großteil darunter sind Membranproteine, die zusätzlich ein oder zwei Transmembrandomänen besitzen. Diese ABC-Transporter sind vor allem in Mensch und Hefe charakterisiert, wo sie in zahlreichen Transportprozessen über die Membranen involviert sind. Über die Funktion der ABC-Transporter in pflanzlichen Organismen ist wenig bekannt, jedoch gibt es Hinweise dass diese Proteinfamilie in Pflanzen auch an der Kompartimentierung von Fremdstoffmetaboliten beteiligt ist. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden 103 ABC-Transportergene annotiert, die sich in 9 Subfamilien aufteilen. Experimentell nachgewiesen wurden bisher lediglich 6 Mitglieder aus 2 Subfamilien. In dieser Arbeit wurden 28 ABC-Transporter aus 6 Subfamilien, davon 4 bisher nicht untersuchte, hinsichtlich organspezifischer Expression und Induktionsverhalten nach Herbizid- bzw. Safenerbehandlung untersucht.

Dazu wurde ein DNA-Array ("Detox-Array") mit genspezifischen Sonden zur parallelen Transkriptanalyse etabliert. Zusätzlich wurden in Zusammenarbeit mit anderen Projekten weitere Genfamilien mit einbezogen, die potenziell an der Detoxifizierung von Xenobiotika beteiligt sind (Cytochrom P450 Monooxygenasen, Glutathion-S-Transferasen und UDP-Glycosyltransferasen), um Koregulationen einzelner Mitglieder der unterschiedlichen Genfamilien untersuchen zu können. Um die Unterscheidung auch hoch homologer Mitglieder dieser Familien zu ermöglichen, wurden Sonden aus dem 3'-untranslatierten Bereich dieser Gene entwickelt und auf ihre Eignung zur Transkriptmessung untersucht.

Die Expressionsanalyse der ABC-Transporter in Wurzeln, Stängeln, Blättern, Blütenständen und Schoten zeigte neben den sechs bereits bekannten ABC-Transportern Transkripte von 21 weiteren Vertretern. Die meisten waren in der Wurzel (26 von 28) nachzuweisen, die wenigsten (7 von 28) im Blatt. Am höchsten exprimiert waren *AtMRP12* und *AtPDR8* in der Wurzel und *AtMRP5* in der Schote.

Die Induktion der ABC-Transporter durch Xenobiotika wurde an Pflanzen 24h oder 36h nach Behandlung mit unterschiedlichen Chemikalien (Primisulfuron, Bromoxynil, Benoxacor) in sublethalen Dosen untersucht. Für die beiden Herbizide typische Schäden konnten erst 3 Tage nach der Behandlung beobachtet werden. Neben der in der Literatur beschriebenen Primisulfuron-Induktion von *AtMRP3* (Tommasini *et al.*, 1997) waren *AtPDR8*, *AtMRP5*, *AtMRP4* und *AtAOH1* transient nach 24h induziert. Mit einem Antiserum, das gegen die Subfamilie der PDR-Transporter erzeugt worden war, konnte deren Induktion durch Primisulfuron und Benoxacor auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Eine spezifische 6-fache Induktion nach Bromoxynil-Behandlung zeigte der ABC-Transporter *AtTAP1*. Die sechs genannten ABC-Transporter stellen somit Kandidaten dar, die an der Kompartimentierung von Metaboliten beteiligt sein können. Dabei kann es sich entweder um Primisulfuron- bzw. Bromoxynilmetabolite oder durch die Behandlung mit den Xenobiotika entstandene endogene Metabolite handeln.

Eine Hauptkomponentenanalyse der Expressionsprofile zeigte, dass auf der Basis der auf dem Detox-Array vertretenen, aus dem Entgiftungs- und Sekundärmetabolismus ausgewählten Genfamilien eine eindeutige Unterscheidung der Antwort auf die verschiedenen Herbizide abgeleitet werden kann. Weitere Daten aus Kollaborationen mit anderen Projekten wurden in einer zweiten Hauptkomponentenanalyse mit einbezogen und zeigen, dass die Unterschiede vor allem auf die sekundären Auswirkungen der Herbizide zurückzuführen sind. Die dabei gefundene Koregulation der Primisulfuron-Behandlung mit der Reaktion auf das Signalmolekül Salicylsäure und ein bakterielles Pathogen ließ weiter schließen, dass Primisulfuron einen Elicitor-ähnlichen Effekt auf die Pflanze hat.

Zur weiterführenden Funktionsanalyse von ABC-Transportern wurden parallel zu diesen Arbeiten *knock-out* Mutanten gesucht. In einer Kollektion des MPI für Züchtungsforschung in Köln konnten zwei Mutanten identifiziert werden, die jeweils ein *En*-Transposon innerhalb der offenen Leserahmen von *AtPDR4* bzw. *AtMDR4* besitzen.

6 Literatur

- Abele, R. & Tampe, R.** (1999) Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* **1461**, 405-419.
- Aarbidopsis Genome Initiative.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Alfenito, M.R.; Souer, E.; Goodman, C.D.; Buell, R.; Mol, J.; Koes, R. & Walbot, V.** (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent Glutathione S-Transferases. *Plant Cell* **10**, 1135-1149.
- Alter, O.; Brown, P.O. & Botstein, D.** (2000) Singular value decomposition for genome-wide expression data processing and modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10101-6.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidmann, J.G.; Smith, J.A. & Struhl, K.** (1995). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley Sons, New York.
- Baldwin, D.; Crane, V. & Rice, D.** (1999) A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 96-103.
- Balzi, E. & Goffeau, A.** (1994) Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1187**, 152-162.
- Bernard, K.; Auphan, N.; Granjeaud, S.; Victorero, G.; Schmitt-Verhulst, A.M.; Jordan, B.R. & Nguyen, C.** (1996) Multiplex messenger assay: simultaneous, quantitative measurement of expression of many genes in the context of T cell activation. *Nucleic Acids Res* **24**, 1435-42.
- Berndt, J.** (1996). Umweltbiochemie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Blake-Kalff, M.M.A. & Coleman, J.O.D.** (1996) Detoxification of xenobiotics by plant cells: Characterisation of vacuolar amphiphilic organic anion transporters. *Planta* **200**, 426-431.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Chang, S.; Puryear, J. & Cairney, J.** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from Pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113-116.
- Cole, S.P.C.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J.H.; Mackie, J.E.; Grant, C.E.; Almquist, K.C.; Stewart, A.J.; Kurz, E.U.; Duncan, A.M.V. & Deeley, R.G.** (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-1654.
- Coleman, J.O.D.; Blake-Kalff, M.M.A. & Davies, T.G.E.** (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in plant science* **2**, 144-151.
- Davies, T.G.E.; Theodoulou, F.L.; Hallahan, D.L. & Forde, B.G.** (1997) Cloning and characterization of a novel P-glycoprotein homologue from barley. *Gene* **199**, 195-202.
- Dean, M.; Rzhetsky, A. & Allikmets, R.** (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**, 1156-66.

- Decottignies, A. & Goffeau, A.** (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* **15**, 137-45.
- Dixon, D.P.; Cole, D.J. & Edwards, R.** (2000) Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. *Arch Biochem Biophys* **384**, 407-12.
- Dreesen, T.D.; Johnson, D.H. & Henikoff, S.** (1988) The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and to components of active transport complexes. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5206-5215.
- Dudler, R. & Hertig, C.** (1992) Structure of an *mdr*-like gene from *Arabidopsis thaliana*: Evolutionary implications. *J. Biol. Chem.* **267**, 5882-5888.
- Ebert, E. & Kreuz, K.** (1991) Die Selektivität von Herbiziden - das Prinzip der Safener. *Biologie in unserer Zeit* **21**, 299-306.
- Esen, A.** (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein. *Anal Biochem* **89**, 264-73.
- Gaedeke, N.; Klein, M.; Kolukisaoglu, U.; Forestier, C.; Muller, A.; Ansoerge, M.; Becker, D.; Mamnun, Y.; Kuchler, K.; Schulz, B.; Mueller-Roeber, B. & Martinoia, E.** (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *Embo J* **20**, 1875-87.
- Gaillard, C.; Dufaud, A.; Tommasini, R.; Kreuz, K.; Amrhein, N. & Martinoia, E.** (1994) A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Letters* **352**, 219-221.
- Gibeaut, D.M.; Hulett, J.; Cramer, G.R. & Seemann, J.R.** (1997) Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol* **115**, 317-9.
- Glazebrook, J.** (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*--2001 status. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 301-8.
- Godiard, L.; Sauviac, L.; Dalbin, N.; Liaubet, L.; Callard, D.; Czernic, P. & Marco, Y.** (1998) CYP76C2, an *Arabidopsis thaliana* cytochrome P450 gene expressed during hypersensitive and developmental cell death. *FEBS Lett* **438**, 245-9.
- Granjeaud, S.; Bertucci, F. & Jordan, B.R.** (1999) Expression profiling: DNA arrays in many guises. *Bioessays* **21**, 781-790.
- Hauser, N.C.; Vingron, M.; Scheideler, M.; Krems, B.; Hellmuth, K.; Entian, K.-D. & Hoheisel, J.D.** (1998) Transcriptional Profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1209-1221.
- Higgins, C.F.** (1992) ABC-Transporter: From microorganism to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113.
- Higgins, C.F.** (1993) The multidrug resistance P-glycoprotein. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **5**, 684-687.
- Higgins, C.F.** (1995) The ABC of Channel Regulation. *Cell*, 693-696.
- Higgins, C.F. & Linton, K.J.** (2001) STRUCTURAL BIOLOGY: The xyz of ABC Transporters. *Science* **293**, 1782-4.
- Hinder, B.; Schellenberg, M.; Rodon, S.; Ginsburg, S.; Vogt, E.; Martinoia, E.; Matile, P. & Hörtensteiner, S.** (1996) How plants dispose of chlorophyll catabolites. Directly energized uptake of tetrapyrrolic breakdown products into isolated vacuoles. *J. Biol. Chem.* **271**, 27233-27236.
- Hock, B.; Fedtke, C. & Schmidt, R.R.** (1995). Herbizide: Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

- Holter, N.S.; Mitra, M.; Maritan, A.; Cieplak, M.; Banavar, J.R. & Fedoroff, N.V. (2000) Fundamental patterns underlying gene expression profiles: simplicity from complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8409-14.
- Hörtensteiner, S.; Vogt, E.; Hagenbuch, B.; Meier, P.J.; Amrhein, N. & Martinoia, E. (1993) Direct energization of bile acid transport into plant vacuoles. *J. Biol. Chem.* **268**, 18446-18449.
- Hull, A.K.; Vij, R. & Celenza, J.L. (2000) *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan- dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2379-84.
- Jackson, R.G.; Lim, E.K.; Li, Y.; Kowalczyk, M.; Sandberg, G.; Hoggett, J.; Ashford, D.A. & Bowles, D.J. (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem* **276**, 4350-6.
- Jamai, A.; Tommasini, R.; Martinoia, E. & Delrot, S. (1996) Characterization of Glutathione uptake in Broad Bean leaf protoplasts. *Plant Physiol.* **111**, 1145-1152.
- Jameson, B.A. & Wolf, H. (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* **4**, 181-186.
- Jasinski, M.; Stukkens, Y.; Degand, H.; Purnelle, B.; Marchand-Brynaert, J. & Boutry, M. (2001) A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* **13**, 1095-107.
- Katagi, T. & Mikami, N. (2000). Primary Metabolism of Agrochemicals in Plants. In *Metabolism of Agrochemicals in Plants. Agrochemicals and Plant Protection* (ed. T. R. Roberts), pp. 43-106. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Klein, M.; Martinoia, E.; Hoffmann-Thoma, G. & Weissenböck, G. (2000) A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant J.* **21**, 289-304.
- Klein, M.; Martinoia, E. & Weissenböck, G. (1998) Directly energized uptake of beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) in plant vacuoles is strongly stimulated by glutathione conjugates. *J Biol Chem* **273**, 262-70.
- Klein, M.; Weissenböck, G.; Dufaud, A.; Gaillard, C.; Kreuz, K. & Martinoia, E. (1996) Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside. *J. Biol. Chem.* **271**, 29666-29671.
- Kreuz, K. & Martinoia, E. (1998). Herbicide metabolism in plants: Integrated pathways of detoxification. In *The Food-Environment. The proceedings of the 9th International congress on Pesticide Chemistry*, pp. 279-287. The Royal Society of Chemistry, London.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lage, H.; Perlitz, C.; Abele, R.; Tampe, R.; Dietel, M.; Schadendorf, D. & Sinha, P. (2001) Enhanced expression of human ABC-transporter TAP is associated with cellular resistance to mitoxantrone. *FEBS Lett* **503**, 179-84.
- Larsson, C.; Widell, S. & Kjellbom, P. (1987) Preparation of high purity plasma membranes. *Methods in Enzymology* **148**, 558-568.

- Lee, H.I. & Raskin, I. (1999) Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP- glucose: Salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J Biol Chem* **274**, 36637-42.
- Lemieux, B.; Aharon, M. & Schena, M. (1999) Overview of DNA chip technology. *Mol Breeding* **4**, 277-289.
- Li, Y.; Baldauf, S.; Lim, E.K. & Bowles, D.J. (2001) Phylogenetic analysis of the UDP-Glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 4338-43.
- Li, Z.-S.; Alfenito, M.R.; Rea, P.A.; Walbot, V. & Dixon, R.A. (1997a) Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry* **45**, 689-693.
- Li, Z.-S.; Rea, P.A. & Zhen, R.-G. (1995a) Magnesium adenosine 5'-triphosphate-energized transport of glutathione S-conjugates by plant vacuolar membrane vesicles. *Plant Physiol.* **107**, 1257-1268.
- Li, Z.-S.; Rea, P.A. & Zhen, R.-G. (1995b) 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene-elicited increase in vacuolar glutathione S-conjugate transport activity. *Plant Physiol.* **109**, 177-202.
- Lim, E.K.; Doucet, C.J.; Li, Y.; Elias, L.; Worrall, D.; Spencer, S.P.; Ross, J. & Bowles, D.J. (2001a) The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases towards salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid and other benzoates. *J Biol Chem* **18**, 18.
- Lim, E.K.; Li, Y.; Parr, A.; Jackson, R.; Ashford, D.A. & Bowles, D.J. (2001b) Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **276**, 4344-9.
- Linton, K.J. & Higgins, C.F. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **28**, 5-13.
- Liu, G.; Sanchez-Fernandez, R.; Li, Z.S. & Rea, P.A. (2001) Enhanced multispecificity of *Arabidopsis* vacuolar MRP-type ABC transporter, AtMRP2. *J Biol Chem* **276**, 8648-8656.
- Lockhart, D.J.; Dong, H.; Byrne, M.C.; Follettie, M.T.; Gallo, M.V.; Chee, M.S.; Mittmann, M.; Wang, C.; Kobayashi, M.; Horton, H. & Brown, E.L. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **14**, 1675-80.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lu, Y.-P.; Li, Z.-S.; Drozdowicz, Y.M.; Hörtensteiner, S.; Martinoia, E. & Rea, P.A. (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugate and chlorophyll catabolites: Functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* **10**, 267-282.
- Lu, Y.-P.; Li, Z.-S. & Rea, P.A. (1997) AtMRP1 of *Arabidopsis thaliana* encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8243-8248.
- Marrs, K.A.; Alfenito, M.R.; Lloyd, A.M. & Walbot, V. (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375**, 397-400.
- Martinoia, E.; Grill, E.; Tommasini, R.; Kreuz, K. & Amrhein, N. (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364**, 247-249.
- Martinoia, E.; Klein, M.; Geisler, M.; Sanchez-Fernandez, R. & Rea, P.A. (2000). Vacuolar transport of secondary metabolites and xenobiotics. In *Vacuolar Compartments*, vol. **5**. *Annual Plant Reviews* (ed. D. G. Robinson and J. C. Rogers), pp. 221-253. Sheffield Academic Press.
- Maughan, J.A.; Nugent, J.H. & Hallahan, D.L. (1997) Expression of CYP71B7, a cytochrome P450 expressed sequence tag from *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* **341**, 104-11.

- Messner, B.; Schröder, P. & Sandermann, H., Jr. (1996) Cell suspension cultures of Spruce and Soybean: Induction of Trichlorophenol-Glucosyltransferase activity by herbicide safeners and fungal elicitors. *Plant Physiol. Biochem.*, 288.
- Mikkelsen, M.D.; Hansen, C.H.; Wittstock, U. & Halkier, B.A. (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem* **275**, 33712-7.
- Mueller, L.A.; Goodman, C.D.; Silady, R.A. & Walbot, V. (2000) AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol* **123**, 1561-70.
- Muller, M.; Meijer, C.; Zaman, G.J.R.; Borst, P.; Scheper, R.J.; Mulder, N.H.; de Vries, E.G.E. & Jansen, P.L.M. (1994) Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 13033-13037.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263-73.
- Parry, R.V.; Turner, J.C. & Rea, P.A. (1989) High purity preparations of higher plant vacuolar H⁺-ATPase reveal additional subunits. Revised subunit composition. *J Biol Chem* **264**, 20025-32.
- Rehm, H. (1995). Der Experimentator: Proteinbiochemie. Gustav Fischer Verlag.
- Ruan, Y.; Gilmore, J. & Conner, T. (1998) Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant J.* **15**, 821-833.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Fernandez, R. (1998) Cloning and expression of *AtMRP4*, a novel MRP-like gene from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 655-662.
- Sanchez-Fernandez, R.; Davies, T.G.; Coleman, J.O. & Rea, P.A. (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC Protein Superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**, 30231-44.
- Sandermann, H., Jr. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* **17**, 82-84.
- Sandermann, H., Jr. (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* **4**, 225-241.
- Sandermann, H., Jr.; Ernst, D.; Heller, W. & Langebartels, C. (1998) Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in plant science* **3**, 47-50.
- Schaffer, R.; Landgraf, J.; Accerbi, M.; Simon, V.V.; Larson, M. & Wisman, E. (2001) Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 113-123.
- Schaller, B.; Schneider, B. & Schütte, H.R. (1992) Metabolism of the herbicide bromoxynil in *Hordeum vulgare* and *Stellaria media*. *Z.Naturforsch.* **47c**, 126-131.
- Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R.W. & Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- Seki, M.; Narusaka, M.; Abe, H.; Kasuga, M.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Carninci, P.; Hayashizaki, Y. & Shinozaki, K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA Microarray. *Plant Cell* **13**, 61-72.

- Sidler, M.; Hassa, P.; Hasan, S.; Ringli, C. & Dudler, R.** (1998) Involvement of an ABC-Transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light. *Plant Cell* **10**, 1623-1636.
- Smart, C.C. & Flemings, A.J.** (1996) Hormonal and environmental regulation of a plant PDR5-like ABC-Transporter. *J. Biol. Chem.* **271**, 19351-19357.
- Smeda, R.J. & Vaughn, K.C.** (1997). Mechanisms of resistance to herbicides. In *Chemistry of Plant Protection* (ed. V. Sjut). Springer-Verlag, Berlin.
- Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
- Theodoulou, F.L.; Clark, I.M.; Pellet, K.E. & Hallahan, D.L.** (1998). A herbicide safener-induced MRP homologue from wheat. *11th International Workshop on Plant Membrane Biology*. Cambridge, UK.
- Thimm, O.; Essigmann, B.; Kloska, S.; Altmann, T. & Buckhout, T.J.** (2001) Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol* **127**, 1030-43.
- Tommasini, R.; Evers, R.; Vogt, E.; Mornet, C.; Zaman, G.H.; Schinkel, A.H.; Borst, P. & Martinoia, E.** (1996) The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6743-6748.
- Tommasini, R.; Martinoia, E.; Grill, E.; Dietz, K.-J. & Amrhein, N.** (1993) Transport of oxidized glutathione into barley vacuoles: Evidence for the involvement of the glutathione-S-conjugate ATPase. *Z.Naturforsch.* **48c**, 867-871.
- Tommasini, R.; Vogt, E.; Fromentau, M.; Hörtensteiner, S.; Philippe, M.; Amrhein, N. & Martinoia, E.** (1998) An ABC-Transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* **13**, 773-780.
- Tommasini, R.; Vogt, E.; Schmid, J.; Fromentau, M.; Amrhein, N. & Martinoia, E.** (1997) Differential expression of genes coding for ABC transporters after treatment of *Arabidopsis thaliana* with xenobiotics. *FEBS Letters* **411**, 206-210.
- Tusnady, G.E.; Bakos, E.; Varadi, A. & Sarkadi, B.** (1997) Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Letters* **402**, 1-3.
- Wagner, U.; Edwards, R.; Dixon, D.P. & Mauch, F.** (2001) Probing the diversity of the *Arabidopsis* Glutathione S-Transferase gene family. *submitted*.
- Wang, A.M.; Doyle, M.V. & Mark, D.F.** (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9717-21.
- Wang, W.; Takezawa, D. & Pooviah, B.W.** (1996) A potato cDNA encodes a homologue of mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Plant Mol. Biol.* **31**, 683-687.
- Williams, D.B.; Vsilakos, A. & Suh, W.** (1996) Peptide presentation by MHC class I molecules. *Trends Cell Biol.* **6**, 267-273.
- Winkler, R.G.; Frank, M.R.; Galbraith, D.W.; Feyereisen, R. & Feldmann, K.A.** (1998) Systematic reverse genetics of Transfer-DNA-Tagged lines of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**, 743-750.
- Wisman, E.; Hartmann, U.; Sagasser, M.; Baumann, E.; Palme, K.; Hahlbrock, K.; Siedler, H. & Weisshaar, B.** (1998) Knock-out mutants from *En-1* mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12432-12437.

- Xu, W.; Bak, S.; Decker, A.; Paquette, S.M.; Feyereisen, R. & Galbraith, D.W.** (2001) Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **272**, 61-74.
- Yazaki, J.; Kishimoto, N.; Nakamura, K.; Fujii, F.; Shimbo, K.; Otsuka, Y.; Wu, J.; Yamamoto, K.; Sakata, K.; Sasaki, T. & Kikuchi, S.** (2000) Embarking on rice functional genomics via cDNA microarray: use of 3' UTR probes for specific gene expression analysis. *DNA Res* **7**, 367-70.
- Zajc, A.; Neufeind, T.; Prade, L.; Reinemer, P.; Huber, R. & Bieseler, B.** (1999) Herbicide detoxification by glutathione S-transferases as implicated from x-ray structures. *Pestic. Sci.* **55**, 248+.
- Zhou, J. & Goldsbrough, P.B.** (1993) An *Arabidopsis* gene with homology to Glutathione S-Transferases is regulated by ethylene. *Plant Mol Biol* **22**, 517-23.
- Zhou, N.; Tootle, T.L. & Glazebrook, J.** (1999) *Arabidopsis PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* **11**, 2419-28.

7 Anhang

7.1 Untersuchungen zur Kreuzhybridisierung der genspezifischen Sonden

7.1.1 ABC-Transporter

AtAOH1 ABC_Z (344 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t11a7	100	344	0	.t11a7	100	344	0	At2g41700
t32g6	73	83	0.15	.t32g6	73	83	0.071	At2g41690
f23a5	64	136	0.72	.f23a5	64	136	0.69	At1g80830
mud21	58	248	1.1	.f23a5	64	136	1.2	At1g80820
f25p17	55	260	1.4	.wt_d_35	61	133	1.5	At4g24390
.f27f5	60	125	1.8	At1g45000
.mx_c_24	58	193	1.8	At3g43220

t11a7 und t32g6 sind überlappende BACs. Der Abstand zwischen At2g41700(C) und At2g41690(W) beträgt 663nt.

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMDR1 ABC_H (174 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
tlj8	100	174	6.5e-25	.tlj8	100	174	3.3e-24	At2g36910
f28i8	65	117	0.6

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMDR2 ABC_J (197 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
en_d_24	100	197	7.9e-23	.en_d_24	100	197	2.9e-25	At4g25960
sa_d_27	100	197	1.7e-22	.f20b24	68	106	1.2	At1g10680
t26j14	60	185	0.77	.f20b24	68	106	1.3	At1g10670
mbb18	61	176	0.9	.sa_d_28	62	160	1.7	At4g12770
t2j15	63	155	1.1
f14d7	63	149	1.3

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMDR3 ABC_G (181 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t7b11	100	181	2.4e-26	.t7b11	100	181	3.1e-28	At4g01820
wu_e_95	62	160	0.33	.wu_e_95	62	160	0.3	At5g28190
ch_e_32	62	160	0.58
t12p18	65	125	1.9
mfb13	60	161	1.9

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMDR4 ABC_K (177 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f14m4	100	177	1e-20	.f14m4	100	177	1.5e-22	At2g47000
mx_c_24	67	123	1.3	.mx_c_24	67	123	1.5	At3g43270
myf5	65	120	1.8

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMDR5 ABC_I (168 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t7b11	100	168	2.9e-32	t7b11	100	168	2.3e-34	At4g01830
tn_e_22	59	142	0.14	t7b11	100	168	2.3e-34	At4g01820
chloroplast	75	62	0.45	.chloro	75	62	0.5	psaA

Abstand zwischen At4g01830(C) und At4g01820 (C) beträgt 354nt. Abstand zwischen Sonde und At4g01820 beträgt 193nt.

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMDR6 ABC_L (198 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f1216	100	198	0	f1216	100	198	0	At2g39480
pl_d_21	66	69	1	f1216	100	89	6.2e-19	At2g39470
.gl_d_21	66	77	0.85	At4g34310
.gf_c_22	68	63	1.8	At3g54340

Abstand zwischen At2g39480 (C) und At2g39470 (W) beträgt 596nt. Abstand zwischen Sonde und At2g39470 beträgt 412nt.

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMDR9 ABC_T (169 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
my_d_34	100	169	2.8e-27	my_d_34	100	169	2.2e-28	At4g18050
f25p12	59	169	0.025	my_d_34	100	169	3.4e-28	At4g18060
t8123	59	169	0.039	.wt_d_24	61	171	0.23	At4g25040
f4h5	68	85	0.67	.f4h5	68	85	0.75	At1g06690
f4h6	65	123	1.5	.f4h5	68	85	0.83	At1g06700
pl_d_25	60	112	1.7	.f23h14	63	126	1.5	At2g01300
t26j12	61	122	1.9

At4g18050(W) und At4g18060(C) haben einen Abstand von 253nt. Sonde und EST (AV521384) des Gens At4g18060 überlappen um 39bp.

AtMDR10 ABC_AB (345 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f20b24	100	345	0	f20b24	100	341	0	At1g10670
en_d_24	73	235	1.3e-11	f20b24	100	345	0	At1g10680
sa_d_27	73	235	3e-11	.en_d_24	73	235	2.4e-11	At4g25960
t8d8	61	176	0.22

Abstand zwischen At1g10670(W) und At1g10680(C) beträgt 372nt. Abstand zwischen sonde ABC-AB und At1g10670 beträgt 163nt. Kreuzhybridisierung über kurzen Bereich möglich. Außerdem Kreuzhybridisierung mit At4g25960 (AtMDR2).

AtMDR17 ABC_AF (417 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
rr_c_28	100	417	0	rr_c_28	100	417	0	At3g62140
f14m4	73	185	2.8e-10	rr_c_28	100	417	0	At3g62150
t7b11	75	160	3.4e-09	f14m4	73	185	3e-11	At2g47000
t14p4	61	310	1.3e-07	t7b11	75	160	4.7e-10	At4g01820
my_d_34	69	146	1.6e-05	t14p4	61	310	1.7e-08	At1g02520
f9c16	55	236	0.59	t7b11	70	174	4.4e-08	At4g01830
t4d8	57	240	0.96	t14p4	69	164	1.3e-07	At1g02540
f28g4	58	248	1	t14p4	69	164	1.9e-07	At1g02530
t1f15	56	309	1.2	.my_d_34	69	146	8.5e-06	At4g18050
t2g17	64	135	1.2	.my_d_34	68	122	0.0019	At4g18060
f12b7	56	309	1.3	.f28d6	58	245	0.26	At4g07440
.t6a23	59	206	0.7	At2g38510
.myh9	57	251	0.77	At5g09940

→ Aus Auswertung entfernt, da Sonde die benachbarten Gene nicht unterscheidet! Zusätzlich Kreuzhybridisierungen mit AtMDR4 und AtMDR3.

AtMRP1 ABC_N (148 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t4k22	100	148	9e-33	t4k22	100	148	2.9e-32	At1g30400
rr_c_23	71	60	0.61

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMRP2 ABC_M (166 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t29f13	100	166	3.3e-25	t29f13	100	166	3.9e-28	At2g34670
t8f5	64	115	0.24	t29f13	100	166	2.3e-27	At2g34660
f6d8	61	124	1.1	t8f5	64	115	0.19	At1g65430
f7f23	66	100	1.9	f6d8	61	124	1.3	At1g52710

Abstand zwischen At2g34660(W) und At2g34670(C) (hypothetisches protein ohne EST) beträgt 354nt. Abstand zwischen Sonde und At2g34670 beträgt 191nt.

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMRP3 ABC_P (165 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
mjg19	99	165	1.3e-30	mjg19	99	165	1.5e-30	At3g13080
mnb8	69	69	1.4	f2h15	62	132	0.34	At1g17780
myf5	63	128	1.5
f7e22	59	166	1.7
f15d2	61	159	1.8

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMRP4 ABC_Q (177 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f17a22	100	177	3.9e-28	f17a22	100	177	1.1e-32	At2g47800
.	.	.	.	f5o8	62	130	0.82	At1g23570
.	.	.	.	f20c19	61	158	1.3	At3g26350

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMRP5 ABC_O (212 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f20d22	100	212	0	f20d22	100	212	0	At1g04120
.	.	.	.	f8n16	70	78	1.5	At2g28810

Kreuzhybridisierung mit At2g28810 trifft ca. 330bp hinter dem Stop-Kodon des betreffenden Gens.

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMRP7 ABC_W (201 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
mjg19	100	201	1.8e-33	mjg19	100	201	1.1e-33	At3g13100
f11p17	67	132	0.19	t26c19	63	126	1	At2g22310
f9k20	60	160	1.1	f9k20	60	160	1.6	At1g78810
t5i8	67	91	1.4

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMRP8 ABC_V (301 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
mjg19	100	276	0	mjg19	100	276	0	At3g13090
ph_c_22	57	235	1.2	t1o3	59	196	0.92	At2g04520
msd24	63	126	1.2	pl_d_21	61	209	1.2	At4g20850
.	.	.	.	bt_d_20	60	154	1.5	At4g31250

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMRP11 ABC_U (230 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t5e7	100	230	0	t5e7	100	230	0	At2g07680
t12j2	100	119	5.3e-18	f13p17	62	111	1.8	At2g34230
mpo12	59	171	0.54
f5i14	58	190	1.3
by_c_20	61	121	1.3
f13p17	62	111	1.6
mpn9	66	93	2

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtMRP12 ABC_AC (366 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f26g16	100	366	0	t4k22	100	366	0	At1g30420
t4k22	100	366	0	t4k22	88	197	6.2e-32	At1g30410
t29f13	64	129	0.001	t29f13	64	129	0.0017	At2g34660
t18a10	65	88	1.3	t4k22	68	86	0.069	At1g30400
ph_c_21	80	41	1.5	t7d17	68	99	0.88	At2g40760
mra19	66	96	1.6

Kreuzhybridisierung mit At1g30410 (Hypothetisches Protein mit ABC-Transporter Familiensignatur).

→ Nicht in Auswertung enthalten, da ABC-AD zu gleichem Gen gehört.

AtMRP12 ABC_AD (248 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f26g16	100	248	0	t4k22	100	248	0	At1g30420
t4k22	100	248	0	t4k22	79	79	2.4e-05	At1g30410
t18a10	65	88	1.3	t7d17	68	99	0.6	At2g40760
ph_c_21	80	41	1.5	bl_d_20	59	149	1.8	At4g27240
mra19	66	96	1.7

Kreuzhybridisierung mit At1g30410 (Hypothetisches Protein mit ABC-Transporter Familiensignatur).

AtPDR1 ABC_A (154 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
mya6	100	154	1.1e-26	mya6	100	154	1.9e-27	At3g16340
f14m4	64	128	0.81	f4h6	63	107	1	At4g04580
.	.	.	.	f14m4	64	128	1.4	At2g46890

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtPDR3 ABC_E (170 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f23f1	100	170	3.2e-27	f23f1	100	170	9.4e-28	At2g29940
f11c10	62	163	0.073	f11c10	62	163	0.16	At2g46400
wu_e_26	60	145	0.27	f23f1	76	77	0.18	At2g29960
t17a2	67	94	0.74	wu_e_26	60	145	0.59	At5g28700
.	.	.	.	f27g20	64	105	0.9	At1g32300

Abstand zwischen kreuzhybridisierender Sonde und At2g29960 beträgt 324nt.

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtPDR4 ABC_B (176 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences			
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value
f12c20	100	176	3.7e-34	f12c20	100	176	0

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtPDR5 ABC_D (189 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences			
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value
f3g5	100	189	9.2e-29	f3g5	100	189	8.4e-32
wr_d_20	62	145	0.83	wr_d_20	62	145	0.58
.	.	.	.	t24m8	61	192	0.84

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtPDR6 ABC_F (184 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences			
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value
f1o11	100	184	2.3e-19	f1o11	100	184	1.9e-23
f1o19	70	179	0.00031	t4o24	70	179	2.4e-05
t4o24	70	179	0.00044	mgd8	62	163	0.51
mt024	65	144	0.93
mgd8	62	163	1.2

Kreuzhybridisierung mit At1g66950 (putative ABC-Transporter)

AtPDR7 ABC_S (175 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences			
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value
f911	100	175	6e-21	f911	100	175	6.5e-22
t916	68	94	1.7	f911	100	134	2.5e-15

Zwischen At1g15210(C) und At1g15200(C) befindet sich eine repetitive Sequenz.

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtPDR8 ABC_R (239 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences			
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value
f23h11	100	239	7.6e-32	f23h11	100	239	3.6e-33
t31j18	65	170	0.052	f16f17	63	136	1.5
f19c17	68	100	1.3

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtPDR9 ABC_AE (480 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences			
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value
gf_c_20	100	480	0	gf_c_20	100	480	0
f3g5	70	185	5.1e-06	f3g5	70	185	2.2e-07
fca_all	64	234	4.8e-05	f6a14	75	128	1.6e-05
t26c19	68	176	0.00015	fca_all	72	123	0.00047
f6n18	75	127	0.00018	sr_d_22	60	181	0.35
f6a14	75	128	0.00023	f23h11	61	133	0.75
gl_d_20	74	126	0.00048	mvil1	64	142	0.81
ve_c_25	62	173	0.043	mra19	59	236	1.1
mza15	67	121	0.093	mxo21	70	88	1.8
mgf10	67	128	0.15	t4o24	60	132	1.8
sr_d_22	60	181	0.4	f19k6	59	187	1.9
mvil1	64	142	1.1
f13m14	60	203	1.3

Kreuzhybridisierung mit At2g37280 (AtPDR5). Alle anderen angegebenen Kreuzhybridisierungen sind nicht relevant.

AttTAP1 ABC_X (199 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f24j13	100	199	0	.f5a18	100	199	0	At1g70620
f5a18	100	199	2.2e-35	.f5a18	100	199	0	At1g70610
se_c_20	61	139	0.38	.se_c_20	61	139	0.28	At3g51120

Abstand zwischen At1g70610(C) und At1g70620(C) beträgt 303nt. Abstand zwischen EST (AV529078) des Gens At1g70620 und der Sonde beträgt 53nt.

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtWBC3 ABC_Y (209 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f24d13	100	209	6.6e-23	.f24d13	100	209	1.5e-26	At2g28070
f11p17	67	142	1.3	.f11p17	67	142	0.62	At1g61240
k15n18	63	163	1.3	.k15n18	63	163	0.77	At5g48650

→ Keine Kreuzhybridisierung

ABC_C (173 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
fca_all	100	173	2.2e-32	.fca_all	76	125	3.7e-10	At4g15230
fca_all	81	123	9e-12	.fca_all	76	125	6.2e-10	At4g15220
f3g5	66	125	0.0012	.f3g5	66	125	0.0011	At2g37280
t16n11	63	115	0.023	.t16n11	63	115	0.017	At1g15520
f12c20	66	83	0.16	.f12c20	66	83	0.17	At2g26910
f1o19	72	75	0.58	.t4o24	72	75	0.68	At1g66950
k2a11	65	93	0.75	.f14j9	61	133	1.6	At1g09390
f9i5	65	86	0.94	.f2j7	63	128	1.7	At1g25570
t4o24	72	75	1.1
f5f19	65	86	1.1
t12p18	63	97	1.1
mug13	65	93	1.1
f13m22	61	114	2

→ Aus Auswertung entfernt, da Sonde nicht im kodierenden Bereich hybridisiert.

7.1.2 Cytochrom P450**CYP71B7 (500 nt)**

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f3f19	100	500	0	.f3f19	100	500	0	At1g13110
mtc11	58	330	0.0048	.f3f19	100	417	0	At1g13120
mtc11	58	185	1	.mtc11	58	330	0.00053	At3g26210
ge_c_34	57	353	1.5	.my_d_35	55	390	0.32	At4g35160
.mtc11	58	185	0.56	At3g26200
.ku_e_24	58	231	0.99	At5g16070
.f3f19	63	156	1.2	At1g13080
.dt_d_28	59	204	1.3	At4g29180
.mg_c_21	56	247	1.6	At3g53290
.bt_d_20	59	245	1.8	At4g31410

→ Sonde überlappt mit EST (AV539776) des benachbarten Gens (At1g13120).

CYP71B15 (500 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
mdj14	100	500	0	.mdj14	100	500	0	At3g26830
ln_c_22	69	236	0.00018	.tn_e_23	72	151	0.00018	At5g04690
f7f22	70	196	0.0083	.f3f19	74	115	0.011	At1g13090
tn_e_23	71	164	0.011	.pl_e_23	55	409	0.1	At5g03400
f3f19	74	115	0.21	.f3f19	71	109	0.11	At1g13100
mwf20	62	261	0.35	.f15c21	55	397	0.13	At1g36180
ch_e_27	63	200	0.44	.k6m13	60	278	0.32	At5g49570
ch_e_26	63	200	0.45	.t2p11	58	361	0.43	At1g26930
f28n24	58	370	0.53	.t3f12	56	375	0.83	At4g08610
t2j15	61	248	0.58	.t32g9	59	232	0.93	At1g35030
t9l6	58	399	1.2	.f21p24	57	318	1	At2g23100
f9l11	58	399	1.6	.t27d20	56	349	1.1	At4g04230
t15f16	59	279	1.7	.f21p24	55	390	1.2	At2g23100
wu_e_28	55	391	1.8	.t3p18	56	344	1.4	At1g62580
wt_d_29	57	383	1.9	.f20d23	55	380	1.4	At1g17140
wu_e_93	59	234	2	.tn_e_23	77	77	1.6	At5g04680
.t7d17	56	356	1.8	At2g40760
.bt_d_20	57	352	2	At4g31280

→ Zwei Kreuzhybridisierungen mit weiteren P450-Enzymen: At1g13090 (CYP71B28) und At1g13100 (CYP, ohne Sonde)

→ Zwei weitere Kreuzhybridisierungen: At5g04690 und At5g04680

CYP71B20 (497 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
mtc11	100	497	0	.mtc11	100	497	0	At3g26170
f3f19	72	102	0.033	.mtc11	74	300	2.1e-16	At3g26180
gf_c_20	61	180	0.074	.mtc11	75	259	4.6e-14	At3g26160
mtc11	68	100	0.7	.mtc11	90	112	7.4e-09	At3g26150
mxh1	72	81	0.97	.f3f19	58	320	0.002	At1g13080
f25p12	54	461	1.2	.f3f19	72	102	0.024	At1g13070
mg_c_21	65	129	1.3	.mg_c_21	61	180	0.058	At3g53300
ch_d_25	65	123	1.4	.mtc11	60	216	0.35	At3g26220
ch_d_24	65	123	1.4	.mg_c_21	65	129	0.53	At3g53280
.mtc11	70	91	0.72	At3g26230
.mtc11	68	100	0.74	At3g26200
.mca23	57	373	0.89	At5g47910
.mtc11	59	226	1.2	At3g26280
.mtc11	71	84	1.3	At3g26270
.f8d23	53	374	1.8	At2g18130
.t12c22	64	153	1.8	At1g44810

→ 6 Kreuzhybridisierungen mit anderen P450-Enzymen (alle ohne spezifische Sonde).

CYP72A8 (300 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
mie1	100	300	0	.mie1	100	300	0	At3g14620
k5k13	61	202	0.26	.mie1	100	103	2.6e-13	At3g14630
f12p23	59	198	0.74	.k5k13	61	202	0.19	At3g28970
pl_d_27	59	235	1.3	.f22d16	59	227	1.2	At1g02900
.ge_c_24	58	236	1.4	At3g47820
.t14l22	62	148	1.6	At1g51890

Abstand zwischen Sonde und benachbartem Gen beträgt 398bp.

→ Keine Kreuzhybridisierung.

CYP76C1 (450 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f17k2	100	450	0	.f17k2	100	450	0	At2g45560
mrh10	64	148	0.16	.f17k2	100	158	2.6e-23	At2g45550
f14m2	66	109	0.69	.f17k2	74	87	0.085	At2g45570
t8l23	65	121	1.9	.f14m2	66	109	0.28	At1g33720
se_c_21	61	181	1.9	.f14m2	69	98	1.3	At1g33730
.mxe2	56	219	1.5	At3g29150
.t8l23	65	121	1.9	At1g57580
.f11i2	67	95	1.9	At3g30790

Abstand zwischen Sonde und At2g45550 (CYP76C4) beträgt 343bp → Keine Kreuzhybridisierung

→ Kreuzhybridisierung mit At2g45570 (CYP76C2)

CYP76C2 (450 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f17k2	100	450	0	f17k2	100	450	0	At2g45570
k21l13	63	285	1.9e-07	k21l13	63	285	2.1e-07	At5g65580
mub3	74	152	2.7e-06	f17k2	75	85	0.049	At2g45560
t12b11	74	152	4.2e-06	f17k2	74	74	0.44	At2g45550
ap2	80	66	0.081	f28o16	68	110	0.57	At1g76770
f28o16	83	59	0.42	f10o5	58	190	0.83	At1g35920
f3l24	56	239	0.9	.bs_c_22	57	202	1.4	At3g55490
f10o5	58	190	1.3	f3l24	56	239	1.7	At3g09350
f14m2	68	88	1.7

→ Zwei Kreuzhybridisierungen mit At2g45560 (CYP76C1) und At2g45550 (CYP76C4)

CYP76C6 (500 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f14m2	100	500	0	f14m2	100	231	0	At1g33710
f14m2	86	131	1e-09	f14m2	100	500	0	At1g33720
ch_e_44	66	248	6.5e-08	f14m2	86	131	5.8e-11	At1g33730
f17k2	76	138	7.9e-07	f17k2	72	158	9.1e-08	At2g45560
f1i21	62	209	0.00043	f17k2	76	138	9.8e-08	At2g45570
rr_c_23	63	152	0.41	f17k2	71	135	1.1e-05	At2g45550
dt_d_26	61	186	0.7	f1i21	62	209	0.00029	At1g43260
f23a5	64	151	0.75	.ge_c_34	68	91	0.5	At3g61040
ge_c_34	68	91	0.86	f14o23	59	156	1.3	At1g71691
wu_e_90	62	174	1.4	.dt_d_26	61	186	1.4	At4g11760
f14o23	59	156	1.4
mxc9	62	152	1.6
my_d_40	62	152	1.6
f4h6	58	186	1.9

→ Keine Kreuzhybridisierung mit benachbartem Gen: Abstand zwischen Sonde und Gen beträgt 270bp

→ Vier Kreuzhybridisierungen mit anderen P450-Enzymen: At1g33730 (CYP76C5), At2g45560 (CYP76C1), At2g45570 (CYP76C2), At2g45550 (CYP76C4).

CYP79B2 (500 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
my_d_45	100	500	0	my_d_45	100	500	0	At4g39950
f14m13	64	302	5e-06	f14m13	64	302	3.6e-07	At2g22330
t4b21	59	292	0.16	.k21h1	59	246	0.22	At5g67050
en_d_22	63	190	0.39	.sa_d_31	58	235	1.3	At4g24170
k21h1	59	250	0.48	f1o19	59	288	1.7	At1g67070
k8a10	59	250	0.69
t12j2	60	211	0.84
f28k20	58	257	1.9

→ Keine Kreuzhybridisierungen

CYP81D1 (450 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t30g6	100	450	0	t30g6	100	450	0	At5g36220
mab16	100	450	0	t30g6	100	177	6.6e-29	At5g36210
f15b18	92	230	6.7e-29	t9f8	58	186	1	At2g06870
my_d_33	59	211	0.96
f2j6	60	153	1.8

Abstand zwischen Sonde und benachbartem Gen beträgt 323bp.

→ Keine Kreuzhybridisierungen

CYP81D8 (408 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
en_d_27	100	408	0	en_d_27	100	408	0	At4g37370
ap2	65	228	0.0037	ap2	65	228	0.0027	At4g37330
f28g11	59	254	0.77	ap2	65	228	0.0029	At4g37340
f15o4	63	163	1	f28g11	59	254	0.86	At1g66540
.	.	.	.	si_d_20	58	225	1.5	At4g13670

→ Keine Kreuzhybridisierungen

CYP98A9 (500 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f1m20	100	500	0	f1m20	100	500	0	At1g74550
t21114	68	109	0.38	f1m20	100	500	0	At1g74560
f14i3	62	143	1.2	f1m20	78	131	1.9e-08	At1g74540
.	.	.	.	f6a14	76	107	0.0065	At1g18800
.	.	.	.	f14i3	62	127	0.57	At1g50200
.	.	.	.	t21114	68	109	1.1	At2g32820
.	.	.	.	rr_c_30	60	172	1.1	At3g60390
.	.	.	.	f17o14	60	169	1.9	At3g08660

→ Sonde reicht bis in den codierenden Bereich des benachbarten Gens

→ Eine Kreuzhybridisierung mit P450-Enzym: At1g74540 (CYP98A8).

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At1g18800.

CYP706A4 (450 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
sa_d_29	100	450	0	sa_d_29	100	450	0	At4g12300
f4n2	59	198	0.15	sa_d_29	62	171	0.013	At4g12310
f3f20	55	298	0.77	sa_d_29	79	69	0.015	At4g12320
t25n20	55	298	0.77	t9h9	55	279	1.5	At2g31520
f25p12	57	333	0.82	k15c23	69	91	1.8	At5g44620
wu_d_24	58	208	0.83
ch_e_43	67	126	1.2
f14p1	61	153	1.6
f5g3	63	127	1.7
t32n15	60	152	1.9
wu_e_35	60	165	2

→ Keine Kreuzhybridisierungen

CYP706A6 (427 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
sa_d_29	100	427	0	sa_d_29	100	427	0	At4g12320
mje4	56	276	1.2	sa_d_29	64	284	1.7e-06	At4g12310
.	.	.	.	sa_d_29	81	74	0.074	At4g12300
.	.	.	.	f9h3	54	235	1	At4g03550
.	.	.	.	f5m15	57	348	1.7	At1g20590

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At4g12300 (CYP706A4).

7.1.3 Glutathion-S-Transferasen und Glutathion-abhängige Enzyme

AtGSTF2 (162 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t10p11	100	162	1.6e-34	t10p11	100	162	0	At4g02520
t14p8	100	162	2.9e-34	t17m13	91	163	2.8e-29	At2g02930
t17m13	91	163	7e-28	f22d16	72	99	3.7e-06	At1g02930
f22d16	72	99	1.9e-06	f22d16	69	107	4.7e-06	At1g02920
ln_c_27	70	62	0.78	ln_c_27	70	62	1.1	At3g44510
.	.	.	.	dt_d_21	71	74	1.2	At4g22670
.	.	.	.	k3k7	69	65	1.6	At5g51040
.	.	.	.	my_e_21	63	100	1.9	At5g07470

→ Zwei Kreuzhybridisierungen: At2g02930 (AtGSTF3) und At1g02930 (AtGSTF6).

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At4g22670.

AtGSTF3 (157 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t17m13	100	157	1.4e-33	t17m13	100	157	0	At2g02930
t10p11	91	157	1.3e-26	t10p11	91	157	9.3e-28	At4g02520
t14p8	91	157	2.3e-26	f22d16	70	81	0.0016	At1g02920
f22d16	70	81	0.00073	f22d16	71	81	0.0023	At1g02930
bs_c_26	66	69	0.36	bs_c_26	66	69	0.8	At3g56280
t28i24	69	69	0.74	t20p8	63	90	1.1	At2g27120
t20p8	69	69	1	t20p8	69	69	1.1	At2g27070
t9j23	70	71	1	f15o4	69	69	1.3	At1g35620
f15o4	69	69	1	t9j23	70	71	1.9	At2g48080
t30d6	65	69	1.1	f23n11	65	69	2	At2g20570
mqd22	65	69	1.1
pt_d_21	72	55	1.2
en_d_28	72	55	1.2
mxl8	62	101	1.4
mvc8	69	69	1.4
mzn14	66	75	1.5
ve_c_25	67	85	1.7
mnf13	72	55	1.7
t20p8	63	90	1.8
ch_e_36	69	68	1.9

→ Drei Kreuzhybridisierungen: At4g02520 (AtGSTF2), At1g02920 (AtGSTF7), At1g02930 (AtGSTF6)

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At2g48080

AtGSTF6 (150 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f22d16	98	150	2.5e-23	f22d16	98	150	7.5e-23	At1g02930
mbk21	63	149	0.16	f22d16	79	102	1.2e-05	At1g02920
.	.	.	.	mbk21	63	149	0.58	At3g12820

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At1g02920 (AtGSTF7).

AtGSTF7 (190 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f22d16	97	190	0	f22d16	97	190	0	At1g02920
t10p11	68	90	0.00032	f22d16	87	148	3.7e-22	At1g02930
t14p8	68	90	0.00057	t10p11	68	90	0.00059	At4g02520
t17m13	70	81	0.00093	t17m13	70	81	0.0018	At2g02930
mqd22	61	126	0.41	t8o81	66	118	0.55	At2g28650
f18p14	59	120	0.84	f17a9	73	63	0.85	At3g07010
.	.	.	.	mqd22	61	126	0.95	At5g46920

→ Zwei Kreuzhybridisierungen: At1g02930 (AtGSTF6) und At2g02930 (AtGSTF3).

AtGSTU3 (169 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f16p2	100	169	3.9e-25	f16p2	100	169	5.3e-26	At2g29470
f9c16	66	103	1.5	f16p2	75	125	0.00022	At2g29460

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At2g29460 (AtGSTU4).

AtGSTU4 (133 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f16p2	100	133	4.6e-19	f16p2	100	133	2.3e-19	At2g29460
k7b16	63	108	1.5	f16p2	74	109	0.02	At2g29470
.	.	.	.	k7b16	63	108	1.5	At5g50830

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At2g29470 (AtGSTU3).

AtGSTU9 (170 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
k19b1	100	170	1.6e-29	k19b1	100	170	4.5e-28	At5g62480
ku_e_20	68	99	0.91	t20p8	60	125	1.7	At2g27110
ch_e_27	63	123	1.6	ku_e_20	68	99	1.9	At5g17020
ch_e_26	63	123	1.6

→ Keine Kreuzhybridisierungen

AtGSTU12 (178 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t17f3	100	178	2e-27	t17f3	100	178	1.2e-28	At1g69920
ch_e_52	67	89	1.1	f19c17	63	138	1.4	At1g42150
f8a24	61	133	1.4	ku_e_30	64	108	1.7	At5g17450
f6a14	65	115	1.8

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtGSTU16 (181 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f23h11	100	181	9.8e-35	t30e16	100	181	1.7e-33	At1g59700
t30e16	100	181	1.9e-34	t30e16	73	125	4e-07	At1g59670
rr_c_20	71	57	1.5	f5d14	65	90	1.2	At1g32460

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At1g59670 (putative GST, ohne Sonde).

AtGSTU17 (193 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f14n23	100	193	0	f14n23	100	193	0	At1g10370
f11i2	68	89	0.6	f14n23	100	159	4e-28	At1g10360
f27o10	61	94	1.6

Abstand zwischen Sonde und benachbartem Gen beträgt 344bp.

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtGSTU18 (157 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f14n23	100	157	1.7e-23	f14n23	100	157	6.2e-25	At1g10360
mup24	68	91	0.57	mup24	68	91	0.56	At5g60700
wt_e_21	70	92	1.8	mup24	68	91	0.7	At5g60690
.	.	.	.	wt_e_21	70	92	1.7	At5g10510

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At5g10510.

AtGSTU20 (204 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f3f9	100	204	4.3e-30	.f3f9	100	204	5.8e-30	At1g78370
f20d23	64	167	0.00069	.f3f9	62	208	0.0011	At1g78380
mxc9	60	174	0.94	.f20d23	64	167	0.0043	At1g17180
.f3f9	62	158	0.011	At1g78320
.f3f9	60	199	0.027	At1g78360
.f20d23	62	185	0.03	At1g17170
.f3f9	66	123	0.087	At1g78340
.my_d_40	63	119	0.38	At4g09820
.f13k3	63	157	1	At2g36740
.f13k3	63	157	1.2	At2g36730
.f20d23	59	159	2	At1g17190

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtGSTU24 (192 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f20d23	100	192	1.7e-31	.f20d23	100	192	3.4e-30	At1g17170
f3f9	65	146	0.05	.f20d23	66	139	0.021	At1g17180
ch_d_24	62	171	0.2	.f3f9	65	146	0.17	At1g78380
t3h13	62	171	0.28
k11j14	60	163	0.46

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtGSTZ1 (135 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t16f16	100	135	3.9e-18	.t16f16	100	135	1.8e-21	At2g02390
f14m4	79	63	0.71	.t16f16	100	135	1.9e-19	At2g02400
mve11	81	49	1.1	.t16f16	77	95	0.00096	At2g02380
t12j13	65	100	1.4	.mve11	81	49	0.73	At3g18810
f28i8	66	92	1.5	.f14m4	79	63	1.1	At2g47080

Abstand zwischen Sonde und benachbartem Gen beträgt 348bp → Keine Kreuzhybridisierung.

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At2g02380 (AtGSTZ2)

AtGlxII.1 (210 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t1o24	100	210	0	.t1o24	100	210	0	At2g43430
t28p16	65	129	0.00027	.t21e18	65	133	0.00021	At1g06130
t21e18	65	133	0.0003	.t28p16	65	129	0.00025	At2g31350
k12b20	61	136	0.29	.k12b20	61	136	0.43	At5g37670
k15o15	75	54	1.3	.k12b20	61	136	0.45	At5g37680
.t7m7	69	94	1.9	At2g40140

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtGlxII.3 (210 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t28p16	100	210	0	.t28p16	100	210	0	At2g31350
t21e18	83	136	2.3e-18	.t21e18	83	136	1.4e-18	At1g06130
t1o24	68	147	1.9e-09	.t1o24	68	147	2e-09	At2g43430
f10a5	57	146	0.13	.t21e18	67	111	0.00075	At1g06110
t23e18	68	75	0.49	.f10a5	57	146	0.22	At1g75710
.t23e18	68	75	1.1	At1g76130

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At1g06130 (AtGlxII.5)

AtGlxII.4 (225 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f22g10	100	225	0	t3f20	100	225	0	At1g53580
t3f20	100	225	0	f22g10	80	68	0.04	At1g53560
t2p11	65	116	0.68	k24a2	63	174	0.37	At3g28000
mba10	65	136	0.91	f28k19	61	164	0.61	At1g77830
tn_e_20	59	161	1.7	f2h15	66	142	1.1	At1g17770
.	.	.	.	t2p11	65	116	1.3	At1g26860
.mnj8	60	220	2	At5g37300

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtGlxII.5 (219 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t21e18	100	219	0	t21e18	100	219	0	At1g06130
t28p16	83	99	2.9e-11	t21e18	100	98	2.3e-17	At1g06120
t1o24	66	115	0.00017	t21e18	87	121	7e-14	At1g06110
f28b23	63	121	1	t28p16	83	99	1.6e-10	At2g31350
k9e15	64	92	1.2	t1o24	66	115	0.0003	At2g43430
f28j7	61	134	1.2	t24p13	62	121	0.11	At1g26760
f1c9	61	134	1.2	f28b23	63	121	1.8	At1g26330
sa_e_20	59	147	1.8

Abstand zwischen Sonde und benachbartem Gen beträgt 407bp → Keine Kreuzhybridisierung

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At2g31350 (AtGlxII.3).

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At1g06110.

AtGpx1 (236 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
dt_d_26	99	185	0	dt_d_26	99	185	0	At4g11600
t1o24	69	75	0.082	dt_d_26	99	185	0	At4g11590
f7h1	62	115	0.13	t1o24	69	75	0.19	At2g43350
gl_d_21	64	116	0.17	f7h1	62	115	0.26	At2g16090
t32o22	60	118	0.55	gl_d_21	64	116	0.28	At4g34370
t15p17	60	118	0.75	.mqd22	64	104	0.7	At5g47020

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At4g11590.

AtGpx3 (236 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f27c12	100	236	1.3e-33	f27c12	100	236	0	At2g25080
.bs_c_25	61	131	1	At3g55740
.bs_c_25	61	131	1.5	At3g55750
.	.	.	.	t2p4	60	169	1.7	At2g40620

→ Keine Kreuzhybridisierung

AtGpx7 (185 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
mx_c_23	100	185	0	mx_c_23	100	185	0	At3g63080
mtc11	68	73	0.68
f5d14	60	153	1
mng4	62	80	1.4
t20k24	62	125	1.4

→ Keine Kreuzhybridisierungen

AtGrd2 (195 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
muj8	100	195	0	.muj8	100	195	0	At3g24170
mfj20	62	106	0.44	.mfj20	62	106	1.2	At3g28370
rr_c_26	61	136	0.91	.t14p4	58	114	1.7	At1g02650
me_c_21	62	114	1.3

→ Keine Kreuzhybridisierung

7.1.4 UDP-Glycosyltransferasen**UGT73B3 (357 nt)**

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
wr_d_21	100	357	0	.wr_d_21	100	357	0	At4g34131
f9o13	69	230	5.3e-18	.wr_d_21	84	223	9.4e-31	At4g34135
fca_all	59	207	8.4e-05	.wr_d_21	100	136	2.2e-26	At4g34120
f13k3	61	198	0.0099	.f9o13	68	253	2.2e-17	At2g15490
pl_d_26	60	104	0.4	.f9o13	69	230	9.2e-17	At2g15480
mhk7	73	61	0.5	.f9o13	70	214	1.8e-15	At2g15500
f2k11	64	85	0.53	.wr_d_21	63	352	4.5e-13	At4g34138
myi13	61	129	0.68	.fca_all	59	207	6.2e-05	At4g14090
mqk4	60	105	1.3	.fca_all	59	207	0.00013	At4g14100
f24d7	64	85	1.4	.t25n20	60	182	0.0044	At1g05530
f13p17	65	82	1.5	.ge_c_26	58	191	0.016	At3g46670
f11a17	59	111	1.6	.f13k3	61	198	0.018	At2g36780
f9c22	61	100	1.7	.k18j17	57	179	0.039	At5g05980
sa_d_28	59	162	1.9	.f13k3	60	191	0.23	At2g36770
.f13k3	58	208	0.29	At2g36750
.fca_all	56	212	0.32	At4g15490
.ch_d_21	64	117	0.41	At4g08710
.t6b20	63	108	0.69	At2g30560
.pl_d_26	60	104	0.71	At4g13340
.t6b20	59	154	0.72	At2g30550
.mhk7	73	61	0.83	At5g40890
.f13k3	59	173	0.87	At2g36800
.f19k23	61	118	1	At1g62250
.f23a5	54	283	1.1	At1g80930
.f10d13	66	96	1.2	At1g69550
.f13k3	58	160	1.5	At2g36760
.k18g13	57	218	1.5	At5g54180

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At4g34135 (UGT73B2).

→ Zwei Kreuzhybridisierungen mit At4g34120 und At2g15500.

UGT73C5 (300 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f13k3	100	300	0	.f13k3	100	300	0	At2g36800
t25m19	58	239	0.34	.f13k3	91	262	0	At2g36790
.f13k3	74	290	1.6e-21	At2g36780
.f13k3	67	232	5.2e-08	At2g36770
.f13k3	83	99	6.1e-07	At2g36750
.f13k3	79	102	7.9e-06	At2g36760
.mg_c_21	61	163	0.24	At3g53160

→ Vier weitere Kreuzhybridisierungen mit At2g36790 (UGT71C2); At2g36780 (UGT73C3); At2g36750 (UGT73C1) und At2g36760 (UGT73C2).

UGT74E2 (381 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f3f20	100	381	0	f3f20	100	381	0	At1g05680
f20m17	67	358	5.1e-17	f3f20	91	258	1.7e-31	At1g05670
f3i6	63	300	2.1e-10	f20m17	67	358	2.3e-17	At2g31790
f18o19	68	225	5.4e-10	f20m17	75	228	2.7e-15	At2g31750
f18o19	67	230	7.3e-10	f18o19	68	225	2.4e-10	At2g43840
f14n23	63	259	2.9e-06	f3i6	63	300	3.1e-10	At1g24100
t25n20	63	218	3.9e-06	f18o19	67	230	7.5e-10	At2g43820
f3f20	63	218	3.9e-06	f14n23	63	259	2.8e-06	At1g10400
mil23	61	229	7.5e-05	t25n20	63	218	7.8e-06	At1g05560
fca_all	58	238	0.0045	t25n20	58	341	1.7e-05	At1g05530
ap2	65	147	0.01	mil23	61	229	0.00013	At3g21560
f2n1	60	148	0.28	f18o19	70	126	0.00015	At2g43850
f7p12	70	92	1.2	t27e13	63	234	0.0016	At2g30150
t13m11	55	278	1.5	fca_all	62	167	0.0092	At4g15470
f12k21	70	92	1.6	fca_all	58	238	0.012	At4g15480
t2p4	61	142	1.7	ap2	65	147	0.013	At4g36760
f5j5	54	320	1.8	ap2	65	147	0.029	At4g36770
vt_e_26	57	290	1.8	t27e13	61	170	0.067	At2g30140
vt_e_21	58	260	1.9	t16e15	55	332	0.44	At1g22340
.	.	.	.	bs_c_22	55	293	0.64	At3g55390
.	.	.	.	f2n1	60	148	0.86	At4g01070
.	.	.	.	t16e15	62	133	1.1	At1g22360
.	.	.	.	f7p12	70	92	1.3	At1g34410

→ Zwei Kreuzhybridisierungen mit At1g05670 (UGT74E1) und At2g31750 (UGT74D1).

→ Zwei Kreuzhybridisierungen mit At2g43850 und At1g34410.

UGT75B1 (254 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t25n20	100	254	0	t25n20	100	254	0	At1g05560
f3f20	100	254	0
f25p17	61	152	0.64

→ Keine Kreuzhybridisierungen.

UGT75D1 (387 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
fca_all	99	387	0	fca_all	99	387	0	At4g15550
fca_all	62	297	8.2e-11	fca_all	99	169	3.4e-27	At4g15540
t25n20	69	210	1.3e-10	fca_all	62	297	6.2e-12	At4g14090
f3f20	69	210	1.3e-10	fca_all	62	297	2.2e-11	At4g14100
f3i6	64	237	3.2e-07	t25n20	69	210	3.6e-11	At1g05560
f18o19	57	265	0.0012	t25n20	64	245	1e-08	At1g05530
f18o19	57	343	0.0013	f3i6	64	237	1.6e-07	At1g24100
f13k3	62	193	0.01	fca_all	59	263	1.1e-05	At4g15490
se_c_20	61	152	0.44	fca_all	58	276	6.2e-05	At4g15480
mth12	63	147	0.51	f18o19	57	265	0.00059	At2g43840
t20d16	58	208	0.71	f13k3	60	255	0.0007	At2g36800
t14p1	66	109	0.71	fca_all	57	267	0.0012	At4g15500
f12f1	66	106	0.91	f18o19	57	343	0.0013	At2g43820
f16m14	63	126	1.6	f3f20	59	212	0.0022	At1g05670
mqd17	61	185	1.6	wr_d_21	60	220	0.0065	At4g34138
.	.	.	.	f9o13	56	278	0.0094	At2g15490
.	.	.	.	f13k3	62	193	0.012	At2g36750
.	.	.	.	t27e13	63	176	0.017	At2g30140
.	.	.	.	f13k3	62	198	0.018	At2g36790
.	.	.	.	f9o13	56	255	0.089	At2g15480
.	.	.	.	f20m17	60	190	0.16	At2g31790
.	.	.	.	fca_all	59	161	0.2	At4g15470
.	.	.	.	f13k3	58	232	0.23	At2g36770
.	.	.	.	f18o19	61	127	0.34	At2g43850
.	.	.	.	se_c_20	61	152	0.37	At3g51290
.	.	.	.	t20d16	58	208	0.76	At2g23200
.	.	.	.	f2811	63	170	0.94	At3g06180
.	.	.	.	t14p1	66	109	1.1	At2g44940

EST (AV534618) des benachbarten Gens (At4g15540) und Sonde haben einen Abstand von 10bp.

→ Keine weiteren Kreuzhybridisierungen.

UGT76B1 (373 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f11b9	100	373	0	f24k9	100	373	0	At3g11350
f24k9	100	373	0	f11b9	100	373	0	At3g11340
f14a1	55	317	0.72	t6p5	54	368	0.89	At2g05870
my_d_42	61	195	0.89	f9b22	56	335	1.4	At2g13920
t5a14	55	367	1.5

→ Keine Kreuzhybridisierung. Die beiden Gene liegen auf sich überlappenden BACs und sind identisch.

UGT76E11 (217 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
ge_c_26	100	217	0	ge_c_26	100	217	0	At3g46670
k21c13	58	174	0.097	ge_c_26	80	132	2.1e-11	At3g46660
se_d_21	66	93	1.5	k21c13	58	174	0.26	At5g45030
t12h1	65	102	2

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At3g46660 (UGT76E12).

UGT74F1 (234 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f18o19	100	234	0	f18o19	100	234	0	At2g43820
t13d8	60	208	0.42	mra19	60	165	1.9	At5g45610
t1g11	59	196	1.7

→ Keine Kreuzhybridisierungen.

UGT78D1 (318 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f26g16	100	318	0	f26g16	100	318	0	At1g30530
ku_e_20	82	67	0.064	f26g16	100	173	6.5e-25	At1g30540
f14o4	64	172	0.18	ku_e_20	82	67	0.047	At5g17040
.	.	.	.	f12p19	56	278	0.17	At1g65960
.	.	.	.	ku_e_20	57	267	0.56	At5g17050
.	.	.	.	wt_e_21	58	237	0.59	At5g10360
.	.	.	.	f5a13	57	292	0.62	At1g41830
.	.	.	.	ku_e_20	77	66	0.72	At5g17030

Abstand zwischen spezifischer Sonde und EST (AV555754) des benachbarten Gens (At1g30540) beträgt 150bp).

UGT84A2 (280 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
mil23	100	280	0	mil23	100	280	0	At3g21560
f3p11	62	178	0.4
ch_d_24	60	237	1.6

→ Keine Kreuzhybridisierungen.

UGT84A3 (238 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
fca_all	100	238	0	fca_all	100	238	0	At4g15490
f1n21	62	152	0.37	f13k9	60	127	1.9	At1g28020
f6a14	57	199	1.7
f13k9	60	127	1.7
mcd7	67	97	1.7

→ Keine Kreuzhybridisierungen.

UGT85A1 (478 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t16e15	100	478	0	t16e15	100	478	0	At1g22370
f12k8	59	261	0.46	t16e15	100	302	0	At1g22360
f3e22	61	216	1.9	t16e15	58	328	0.004	At1g22380
.	.	.	.	mg_c_24	56	365	0.049	At3g60130
.	.	.	.	f12k8	59	261	0.061	At1g22400
.	.	.	.	t6b13	55	338	0.71	At2g14670
.	.	.	.	rr_c_25	57	288	1.2	At3g49830
.	.	.	.	f27m3	63	204	1.3	At1g31710
.	.	.	.	f23n11	59	229	1.7	At2g20620
.	.	.	.	mln1	61	163	1.7	At5g44110
.	.	.	.	kl1i1	58	240	1.9	At5g46490
.	.	.	.	f3e22	61	216	2	At3g06750

Abstand zwischen Sonde und benachbartem Gen (At1g22360; UGT85A2) beträgt 203bp.

UGT86A1 (520 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t1j8	100	520	0	t1j8	100	520	0	At2g36970
f18a8	67	166	0.5	t1j8	100	345	0	At2g36980
bs_c_21	75	93	0.57	f7h1	58	196	1.8	At2g16080
.	.	.	.	f14o10	58	270	1.9	At1g20290

→ Abstand zwischen benachbartem Gen (At2g36980) und Sonde beträgt 159bp.

→ Keine weiteren Kreuzhybridisierungen.

UGT87A2 (510 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t27e13	100	510	0	t27e13	100	510	0	At2g30140
fca_all	65	278	1.7e-10	t27e13	80	429	0	At2g30150
f20m17	59	372	4.2e-08	fca_all	65	278	5.9e-11	At4g15550
f3i6	58	333	5.5e-08	f20m17	59	372	6.2e-09	At2g31750
bs_c_25	62	295	3.9e-07	bs_c_25	62	254	6.3e-09	At3g55710
fca_all	61	288	1.1e-06	f3i6	58	333	2.9e-08	At1g24100
f12k8	59	282	1.9e-06	bs_c_25	62	295	8.1e-08	At3g55700
f3f20	60	293	2.2e-06	f12k8	59	282	2.5e-07	At1g22400
mg_c_21	63	228	2.9e-06	t25n20	62	295	3.4e-07	At1g05560
f3f20	60	293	3.4e-06	fca_all	61	288	5.4e-07	At4g14090
t25n20	60	293	3.4e-06	fca_all	61	288	7.3e-07	At4g14100
f9o13	57	328	4.2e-06	f3f20	60	293	8.6e-07	At1g05680
f24d13	59	303	6.1e-06	f9o13	57	328	1.3e-06	At2g15490
t16e15	59	282	8.5e-06	t16e15	59	282	1.7e-06	At1g22360
f18o19	58	327	1e-05	mg_c_21	63	228	2e-06	At3g53150
ge_c_26	60	315	1.1e-05	t25n20	60	293	2.5e-06	At1g05530
f18o19	59	283	1.8e-05	f18o19	59	283	3e-06	At2g43840
f14n23	58	280	2e-05	f18o19	58	327	3.6e-06	At2g43820
ch_e_27	60	275	3.6e-05	f24d13	59	303	3.8e-06	At2g28080
ap2	58	281	5.3e-05	ge_c_26	60	315	4.7e-06	At3g46660
f6f3	57	289	0.00017	t16e15	59	277	8.3e-06	At1g22340
wr_d_21	55	477	0.0002	ap2	58	205	0.33	At4g36760
msn2	59	269	0.00022	kl1i1	64	130	0.35	At5g46490
k19p17	60	296	0.00049	my_d_45	62	145	0.8	At4g39900
mjp23	60	296	0.00066	mil15	66	144	1.2	At3g30190
k18j17	57	259	0.0007	ku_e_23	57	321	1.2	At5g15780
mjj3	57	259	0.0012	f3f20	60	229	1.7	At1g05630
f13k3	57	314	0.0013	t20d16	61	129	1.7	At2g23200
ku_e_28	59	226	0.0016	f10c21	62	136	1.7	At1g33350
t9j22	58	302	0.0018
f2o15	57	310	0.0033
ku_e_20	60	163	0.007
t27a16	58	275	0.015
t20d16	63	146	0.02
f13o11	56	270	0.028
f16f17	57	261	0.028
k19a23	57	261	0.051
k1813	56	260	0.064
mgn6	66	151	0.065
f2815	63	159	0.36

→ Eine Kreuzhybridisierung mit At2g30150 (UGT87A1).

UGT89B1 (306 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
f2p9	100	306	0	f2p9	100	306	0	At1g73880
dt_e_20	61	92	1.2	dt_e_20	61	92	1.3	At5g02370
f9h16	59	116	1.7	f9h16	59	116	1.8	At1g20860

→ Keine Kreuzhybridisierungen.

UGT79B2 (391 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
vt_d_22	100	391	0	vt_d_22	100	331	0	At4g27550
ch_d_22	73	152	3.6e-11	vt_d_22	100	391	0	At4g27560
t20k9	69	178	2e-10	vt_d_22	89	184	7.5e-25	At4g27570
f13o11	67	185	7.1e-10	ch_d_22	73	152	2.4e-10	At4g09500
f17j6	66	171	7.4e-09	t20k9	69	178	1.6e-09	At2g22930
f11f12	66	171	1.4e-08	f13o11	67	185	3.2e-09	At1g64910
k19p17	65	176	1.7e-08	k19p17	70	159	3.5e-09	At5g54010
f13o11	67	160	5.1e-08	f17j6	66	171	4.1e-09	At1g50590
mt024	67	159	6.1e-08	f17j6	66	171	6.1e-08	At1g50580
mjp23	60	157	0.0013	k19p17	65	176	7.4e-08	At5g53990
f13p17	69	83	0.85	f13o11	67	160	1.6e-07	At1g64920
wt_d_26	57	179	1.5	mt024	67	159	2.6e-07	At3g29630
.	.	.	.	mjp23	60	157	0.0036	At5g54060
.	.	.	.	tn_d_25	66	110	0.12	At4g33040
.	.	.	.	k12g2	64	116	0.62	At5g24190
.	.	.	.	f13p17	69	83	1.7	At2g34350

→ Abstand zwischen Sonde und benachbartem Gen (At4g27550) beträgt 172bp.

→ Der Kreuzhybridisierungen mit At4g27570 (UGT79B3), At4g09500 (UGT79B7) und At5g54010 (UGT79B6).

UGT89C1 (443 nt)

FASTA against genomic sequences				FASTA against coding sequences				
contig	%identity	overlap(nt)	E-value	contig	%identity	overlap(nt)	E-value	gene
t21e18	100	443	0	t21e18	100	443	0	At1g06000
f8n16	61	189	0.054
f2214	57	264	1.7

→ Keine Kreuzhybridisierungen.

7.2 Untersuchungen zur Kreuzhybridisierung der cDNA-Klone

43A12T7; ABC-20 (787 bp); AtPDR8=ABC-R

```
>>At1g15210 putative ABC transporter (AtPDR7) (5329 nt)
80.650% identity in 739 nt overlap
>>At3g16340 putative ABC transporter (AtPDR1) (5251 nt)
71.370% identity in 730 nt overlap
>>At1g15520 hypothetical protein (5272 nt)
67.089% identity in 553 nt overlap
>>At2g36380 putative ABC transporter (5353 nt)
61.642% identity in 743 nt overlap
>>At2g29940 putative ABC transporter (5332 nt)
61.892% identity in 740 nt overlap
>>At5g16020 hypothetical protein (2926 nt)
68.831% identity in 77 nt overlap
>>At5g62510 putative protein (2263 nt)
65.882% identity in 85 nt overlap
```

178K23T7; ABC-63 (641 bp); AtMDR4=ABC-K

```
>>At3g62150 P-glycoprotein-like proetin (AtMDR17) (4879 nt)
82.059% identity in 641 nt overlap
>>At1g02520 P-glycoprotein, putative (AtMDR8) (4837 nt)
77.589% identity in 647 nt overlap
>>At1g02530 hypothetical protein (AtMDR16) (4822 nt)
77.434% identity in 647 nt overlap
>>At4g01830 putative P-glycoprotein-like protein (AtMDR5) (4693 nt)
76.863% identity in 644 nt overlap
>>At4g01820 P-glycoprotein-like protein pgp3 (AtMDR3) (4690 nt)
76.087% identity in 644 nt overlap
>>At4g18050 multidrug resistance protein/P-glycoprotein (AtMDR9) (4972 nt)
71.242% identity in 612 nt overlap
>>At5g46540 multidrug resistance p-glycoprotein (4747 nt)
67.419% identity in 620 nt overlap
>>At1g10680 putative P-glycoprotein-2 emb|CAA71277 (4684 nt)
62.887% identity in 582 nt overlap
>>At1g27940 hypothetical protein (4738 nt)
63.036% identity in 606 nt overlap
>>At3g13220 ABC transporter (2944 nt)
62.617% identity in 107 nt overlap
>>At3g62670 putative protein (2281 nt)
67.089% identity in 79 nt overlap
```

7.3 Oligonukleotide

7.3.1 Quantitative RT-PCR

Tab. 7.1: Oligonukleotide der quantitativen RT-PCR.

Genname	Forward-Primer Bezeichnung	Sequenz	Reverse-Primer Bezeichnung	Sequenz
AtPDR4	QPCR-ABC-B-f	gcacttcccttgcatttgc	QPCR-ABC-B-r	atgaatatgagagttgtaagtg
AtMDR1	QPCR-ABC-H-f	ccaagggagaaaatggagtctatg	QPCR-ABC-H-r	ttcaccagcaagctgcgttc
AtMDR4	QPCR-ABC-K-f	aatcaacggtgattgattgttgc	QPCR-ABC-K-r	cggtcttaacgacggcaattacgt
AtMRP3	QPCR-ABC-P-f	agtacacagatgatcaaatctgg	QPCR-ABC-P-r	tcatcatcagcaggaaaatagc
AtPDR8	QPCR-ABC-R-f	ctttatggatgagccaactcagg	QPCR-ABC-R-r	gaacagttgtgattcccacgaag
AtAOH1	QPCR-ABC-Z-f	tttgcaccagaaatggtacagagg	QPCR-ABC-Z-r	gcaataatggttcactggctatga

7.3.2 Herstellung der Antigene

Tab. 7.2: Oligonukleotide zur Antigenherstellung.

Antikörper	Vektor	Forward-Primer Bezeichnung	Sequenz	Reverse-Primer Bezeichnung	Sequenz
fampdr	pGEX-2T	fampdr1-f (<i>Bam</i> HI)	act ggatc ctttagacctggtg	fampdr2-r (<i>Eco</i> RI)	tat gaattc taggctgatgaatcg
	pMal-pdH	fampdr1-f (<i>Bam</i> HI)	act ggatc ctttagacctggtg	fampdr4-r (<i>Pst</i> I)	tag ctgcag agcaattgtaacc
fampgp	pGEX-2T	fampgp1-f (<i>Bam</i> HI)	gatctt ggatc ccattgatcac	fampgp1-r (<i>Eco</i> RI)	ttt gaattc tagaaagcgatg
	pMal-pdH	fampgp1-f (<i>Bam</i> HI)	gatctt ggatc ccattgatcac	fampgp4-r (<i>Pst</i> I)	atc ctgcag tccaatctcagag

Tab. 7.3: Größenangaben der Antigene. Angabe der Fragmentlängen vor dem Restriktionsverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen, Anzahl der Aminosäuren des ABC-Transporter-Antigens und das erwartete Molekulargewicht des Antigens.

Antikörper	Vektor	Fragmentlänge [bp]	Aminosäuren [Anzahl]	Fragmentgröße [kDa]
fampdr	pGEX-2T	550	179	19,9
	pMal-pdH	405	101	11,2
fampgp	pGEX-2T	690	245	24,9
	pMal-pdH	748	266	27

7.3.3 Isolierung der Insertionsmutanten

Tab. 7.4: Oligonukleotide, die zur Isolierung und zum Nachweis der Insertionsmutanten eingesetzt wurden.

En-Element	Sequenzen
En8202	cactcctacctttttctgtagtg
En8130	gagcgtcggccccacactctatac
En205	agaagcagcagcgctgagaatagga
En1	cactacaagaaaacgcaaggagtg
En603	ggtgggcagaaacatttgcttacg
En26	cactccttgacgtttctgtagtg
AtPDR4	Sequenzen
5168fw1	gtactcgcagcctcctgtgcg
5168fw2	cctcataacatactccacgacgag
5168bw2	actactaggtcctcaagttcaggg
5168bw1	agccaactcaggattggatgcacg
5168nbw1	attgtgatgaggactgtaagaaatattg
AtMDR4	Sequenzen
4411fw1	gcttctcgtggacaaactgcttacg
4411bw1	actaaagccaccggtgtaccactcg
4411fw2	atggaagttggatggttcgacgagc
4411bw2	ctacatcgctttgctggaatctgg

7.3.4 Vektorspezifische Oligonukleotide

Tab. 7.4: Oligonukleotide, die zu den verwendeten Plasmiden gehören.

Vektor	Forward-Primer Bezeichnung	Sequenz	Reverse-Primer Bezeichnung	Sequenz
pGEM-T Easy	M13(22)-f	tcacgacgtgtaaaacgacgg	M13(25)-r	aaacagctatgacatgattacgcc
pGEM-T Easy	T7	taatacgactcactataggg	Sp6	tatttaggtgacactatag
pMAL-pΔH	mbp-f	gccgaacatcccgcagatgtcc	mbp-r	gtaacgccagggtttccagtcac
pGEX-2T	GEX-f	gtggggcgaccatcctcc	GEX-r	tttaccgctatcaccgaaac

7.4 Organspezifische Expression der ABC-Transporter

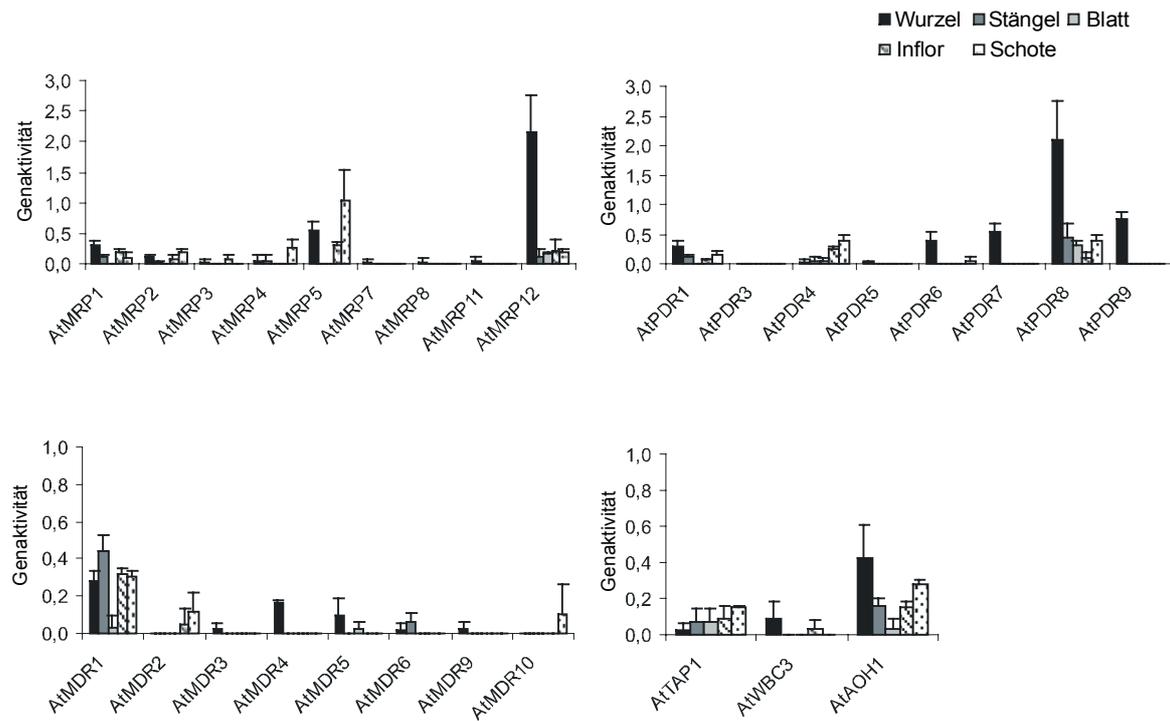


Abb. 7.1: Organspezifische Expression der 28 untersuchten ABC-Transporter. Die Genaktivitäten geben einen relativen Wert zur Expressionshöhe an (Berechnung siehe 2.11.7).

Danksagung

Herrn PD Dr. Anton R. Schäffner danke ich sehr für die Betreuung meiner Arbeit, die unter seiner Anleitung am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit entstand. Außerdem danke ich ihm für die stete Diskussionsbereitschaft und für die engagierte Organisation der zahlreichen Kooperationen, die eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung des Detox-Arrays waren.

Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens der Dissertation an der Ludwig-Maximilian-Universität München.

Zahlreichen Kooperationspartnern möchte ich auf diesem Weg danken: Sebastian Kloska vom MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm für den Zugang zur „Haruspex“-Datenbank, Oliver Thulke (BIOP, GSF), Felix Mauch (Institute de Biologie Végétale, Université Fribourg), Enrico Martinoia (Laboratoire de physiologie végétale, Université de Neuchâtel) und Danièle Werck-Reichhart (Institute of Plant Molecular Biology, Strasbourg) für die Bereitstellung der Gensonden und Gerhard Welzl (IBB, GSF) für die Berechnung der Hauptkomponentenanalysen. Bei Heidrun Gundlach und Klaus Mayer bedanke ich mich für die Spezifitätsuntersuchungen der Gensonden.

Außerdem bedanke ich mich bei Matthias Affenzeller für die Versuche zur organspezifischen Expression und Pierre-Henri Dubuis, Michael Götz und Lucien Bovet deren Daten Grundlage für die Hauptkomponentenanalysen waren.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Matthias Affenzeller und Oliver Thulke. Ohne die gute und effektive Zusammenarbeit wäre die Entwicklung des Detox-Arrays nicht möglich gewesen. Ihre fachliche Kompetenz, Einsatzbereitschaft und ihre äußerst humorvolle Art sorgte stets für eine produktive und motivierende Atmosphäre, die über so manchen kritischen (und manchen nicht ganz runden) Punkt hinweg geholfen hat.

Für die technische Assistenz bei der Herstellung der Antigene bedanke ich mich bei Birgit Geist. Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers (Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung; LMU München) danke ich für die Herstellung der zahlreichen Antikörperseren, die leider nicht alle in dieser Arbeit verwertet werden konnten.

Bei Birgit, Elisabeth, Elke, Moni, Susanna, Ulrike, Burkhard, Henrik und Robert bedanke ich mich für die stete Unterstützung, die Hilfsbereitschaft und für das äußerst angenehme Arbeitsklima. Insbesondere bedanke ich mich bei Andrea, die nicht nur während der Arbeitszeit eine große Unterstützung im Laboralltag war, sondern mir auch darüber hinaus zu einer Freundin geworden ist.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Steffi, sowie Oliver, Robert, Matthias, Uta und Sebastian für die Korrektur des Manuskripts.

Allen meinen Arbeitskollegen des Instituts danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und für das angenehme Arbeitsklima in BIOP.

Meinen Eltern danke ich neben der finanziellen Unterstützung auch für die vielen angenehmen und entspannenden Wochenenden in Hannover.

Meinen Geschwistern, meiner Schwägerin und all meinen Freunden aus dem „hohen Norden“ danke ich für die unendlich vielen Telefonate, die die über hunderttausend Millionen Kilometer glatt auf 650 km haben schrumpfen lassen.

Ein ganz besonders riesiger Dank gilt meiner Freundin Anja, die mir im richtigen Moment mit ihrer unglaublichen Motivationsfähigkeit den nötigen Ansporn gab und so einen Teil zur Fertigstellung dieser Arbeit beitrug.

Lebenslauf

Name: Sabine Glombitza
Geburtsdatum/Ort: 26.03.1967 in Frankfurt/Main

Schulbildung

1973-1977: Grundschule Borken/Hessen
1977-09/1979: König-Heinrich-Schule, Fritzlar
10/1979-1987: Gymnasium Lehrte
08/84-06/85: Austauschschülerin in Ogden, Utah (USA)
05/87: Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Lehrte

Ausbildung und Berufstätigkeit:

08/87-06/90: Ausbildung zur Chemielaborantin, Kali Chemie AG, Hannover
07/90-09/90: Tätigkeit als Chemielaborantin, Kali Chemie Pharma, Hannover

Studium und Berufstätigkeit:

10/90-05/97: Studium der Biologie, Universität Hannover
05/92: Diplom-Vorprüfung
02/96: Diplom-Hauptprüfung
03/96-05/97: Diplomarbeit an der Forschungsanstalt für Landwirtschaft (Braunschweig); Institut für Produktions- und Ökotoxikologie
06/97-12/97: Tätigkeit als Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Forschungsanstalt für Landwirtschaft (Braunschweig)

Promotion:

Seit 04/98: Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, München-Neuherberg
Betreuung: PD Dr. Anton R. Schäffner

Praktika:

09/94-12/94: Praktikum an der Northeastern University, Boston (USA)
01/98-03/98: Praktikum am Institut für Biochemie, LMU München