C_3- und C_4-Photosynthese in Mais (*Zea mays*): Das Hüllblatt der weiblichen Infloreszenz als Modellsystem zur Analyse photosynthetischer Genexpression

---

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
oder eines Doktors der Ingenieurwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologin Silke Hahnen
aus Aachen

Berichter:
Universitätsprofessor Dr.rer.nat. Fritz Kreuzaler
Universitätsprofessorin Dr.rer.nat. Ursula Priefer

Tag der mündlichen Prüfung: 2.August 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Hahnen, S., Joeris, T., Kreuzaler, F. and Peterhänsel, C. (2003)
Quantification of photosynthetic gene expression in maize C_3 and C_4 tissues by real-time PCR. Photosynthesis Research **75**, 183-192

1 EINLEITUNG 1

1.1 Die C_4-Photosynthese 1

1.2 Regulation der C_4-Photosynthese 5

1.2.1 Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) 7

1.2.2 Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) 8

1.2.3 Malatenzym (ME) 9

1.3 Weitere differentiell exprimierte Gene 9

1.4 C_4- und C_3-typische Photosynthese in Blattgeweben von Mais 10

1.5 Ziele dieser Arbeit 12

2 MATERIAL UND METHODEN 13

2.1 Pflanzenmaterial 13

2.2 Bakterienkulturen 13

2.3 Phagenbank 13

2.4 Plasmide 14

2.5 Häufig verwendete Lösungen 14

2.6 Gewebepräparationen 16

2.6.1 Präparation von C_4-Mesophyllzell-Protoplasten 16

2.6.2 Präparation von Bündelscheidenzellen 17

2.6.3 Präparation von C_3-Mesophyll aus Hüllblättern 17

2.7 Nukleinsäurepräparation 17

2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mais (*Zea mays*) 17

2.7.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (<2 ml) 18

2.7.3 Isolierung genomischer DNA aus Phagen 18

2.8 cDNA-Synthese 19

2.9 Restriktionsspaltung mit DNase I 20

2.10 PCR-Techniken 20

2.10.1 Kolonie-PCR 21

2.10.2 SMART^{TM} cDNA-Synthese und Amplifikation 21

2.10.3 Genome Walking ... 23
2.10.4 Real-Time-PCR ... 26
2.10.5 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde ... 27

2.11 Reverser Northern ... 28
2.11.1 Immobilisierung von PCR-Produkten auf Nylonmembran ... 28
2.11.2 Hybridisierung und Nachweis ... 28

2.12 Subtraktion ... 29

2.13 Screenen einer Phagenbank ... 32

2.14 Klonierung von PCR-Fragmenten ... 33

2.15 Analyse von Sequenzen anhand von Datenbanken und Programmen ... 34

3 ERGEBNISSE ... 35

3.1 Optimierung der Gewebepräparationen ... 36

3.2 Etablierung eines Real-Time-PCR-Systems ... 39

3.3 Charakterisierung der isolierten Gewebe ... 43

3.4 Quantifizierung spezifischer Transkriptisoformen für die kleine Untereinheit von Rubisco ... 47

3.5 Quantifizierung der Transkripte für die Transkriptionsfaktoren DOF1 und DOF2 ... 49

3.6 Subtraktive Hybridisierung ... 51

3.7 Analyse sequenzierter Transkripte ... 57

3.8 Charakterisierung des bündelscheidenspezifischen Transkriptes 239 ... 63

4 DISKUSSION ... 65

4.1 Präparation und Charakterisierung verschiedener Gewebe aus Mais ... 65

4.2 Subtraktionsanalyse zur Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte im Hüllblatt ... 73
4.2.1 Charakterisierung der erhaltenen Bibliothek ... 74
4.2.2 Effekte plastidärer RNAs auf die Subtraktionanalyse ... 78

4.3 Das Hüllblatt als Modell zur Untersuchung des C_4-Syndroms ... 80
4.3.1 Mutationsanalytische Verfahren ... 81
4.3.2 Subtraktionsanalytische Varianten ... 82

5 ZUSAMMENFASSUNG 86

6 ANHANG 87

6.1 Primersysteme 87

6.2 cDNA-Sequenzen verschiedener Transkripte 90

6.3 Abkürzungsverzeichnis 93

6.4 Abbildungsverzeichnis 95

6.5 Tabellenverzeichnis 96

6.6 Literaturverzeichnis 96

1 Einleitung

1.1 Die C_4-Photosynthese

Die Photosynthese ist einer der bedeutendsten enzymatischen Prozesse der Erde, der von fast allen Pflanzen zur Energiegewinnung genutzt wird und die Grundlage für autotrophe wie heterotrophe Lebensformen bildet. Bei diesem Prozess wird die Energie des Sonnenlichtes durch photosynthetisch aktive Organismen in Stoffwechselenergie umgewandelt. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Fixierung von anorganischem, oxidiertem Kohlenstoff und die anschließende Reduktion der entstehenden organischen Verbindungen.

Die Photosynthese wird klassischerweise in zwei Teilprozesse gegliedert, die Licht- und die Dunkelreaktion. In der Lichtreaktion findet mittels der absorbierten Strahlungsenergie des Sonnenlichtes die Photolyse von Wasser statt. Dabei dissoziieren die Wasserstoffatome und die Sauerstoffatome des Wassers und der Sauerstoff wird als O_2 freigesetzt. Die Wasserstoffatome dagegen werden energetisch aktiviert und dienen in der nachfolgenden Dunkelreaktion als Energielieferant. Innerhalb der Lichtreaktion entstehen energiereiche Phosphatbindungen in Form von ATP (Adenosintriphosphat) und Reduktionsäquivalente wie NADH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid), die in der Dunkelreaktion zum Einsatz kommen.

In der vom Sonnenlicht unabhängigen Dunkelreaktion findet nun die eigentliche Fixierung des anorganischen CO_2 (Kohlendioxid) und die Überführung in eine energiereiche organische Verbindung statt. Dazu wird Kohlenstoff mit der Energie aus den entstandenen Produkten der Lichtreaktion (ATP und NADH) reduziert und es entstehen eine Vielzahl von Zuckern, die Hauptprodukte der Photosynthese. Neben der Verwendung dieser Verbindungen zur Produktion von Biomasse werden sie zu einem späteren Zeitpunkt in der Atmung zur Energiegewinnung wieder oxidiert.

95 % aller terrestrischen Pflanzen assimilieren Kohlenstoff über den C_3-Stoffwechselweg, das heißt bei der Fixierung des atmosphärischen CO_2 entsteht als erstes nachweisbares Produkt ein C_3-Körper (Phosphoglycerat). Dieser wird in den Calvin-Zyklus eingeschleust, wo er zur Zucker- und Energiegewinnung genutzt wird. Das entscheidende Enzym der Reaktion ist Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase). Dieses Enzym besitzt eine Doppelfunktion und kann neben der in der Photosynthese notwendigen Carboxylasereaktion auch eine Oxygenasereaktion katalysieren und daher sowohl mit CO_2 als auch mit O_2 reagieren. Im Fall der Fixierung von O_2 durch Rubisco läuft an Stelle der Photosynthese der photorespiratorische Stoffwechselweg ab.

Dabei entsteht neben Phosphoglycerat das Nebenprodukt Phosphoglycolat, welches nicht zur Energiegewinnung eingesetzt werden kann, sondern von der Pflanze unter Verwendung von Sauerstoff und Stickstoff recycelt werden muss. Dieser Vorgang findet in speziellen Zellkompartimenten, den Peroxysomen, statt. Dort wird das in den Chloroplasten entstandene Glycolat durch die Glycolatoxidase zu Glyoxylat oxidiert und das bei dieser Reaktion produzierte H_2O_2 mittels Katalase abgebaut. Das entstandene Glyoxylat wird transaminiert und als Glycin in die Mitochondrien exportiert, wo es unter Desaminierung und Decarboxylierung zur Serinsynthese genutzt wird. Der Pflanze gehen dadurch bereits fixiertes CO_2, Stickstoff und Energie verloren. Durch die Photorespiration kann die Photosyntheseeffizienz der Pflanze daher stark eingeschränkt und der Nettoenergiegewinn der Photosynthesereaktion reduziert werden. Besonders in trockenen, heißen Gegenden mit ariden Bedingungen stellt die Photorespiration ein erhebliches Problem für Pflanzen dar, da die Oxygenaseaktivität der Rubisco mit der Temperatur zunimmt und das Schließen der Stomata als Schutz vor Wasserverlust den O_2-Partialdruck in den Interzellularen steigen lässt (Brooks and Farquhar, 1985).

Als vor 450 Millionen Jahren die ersten Landpflanzen auf der Erde auftraten, war die Oxygenaseaktivität der Rubisco nicht von Bedeutung, da die Atmosphäre zu großen Teilen aus CO_2 bestand und der O_2-Anteil gering war. In den darauf folgenden 300 Millionen Jahren veränderte sich die Zusammensetzung der Erdatmosphäre und der Sauerstoffgehalt nahm zu, während die CO_2-Konzentration abnahm (Sage, 1999) Im Laufe der Evolution entwickelten sich daher aus dem gegebenen photosynthetischen C_3-Grundzustand (Blasing et al., 2000; Langdale and Nelson, 1991; Sheen, 1999) die C_4-Pflanzen. Dies geschah wahrscheinlich in mind. 18 Pflanzenfamilien unabhängig voneinander, so dass heute eine Vielzahl verschiedener Spezies C_4-Photosynthese zeigen (Kellogg, 1999; Sage et al., 1999). In einigen Pflanzen scheint dieser evolutionäre Schritt noch nicht abgeschlossen, so findet man in der Gattung *Flaveria* (Asteraceae) neben den ursprünglichen C_3-Formen ebenfalls reine C_4-Pflanzen, aber auch Pflanzen in einem Zwischenstadium der Photosynthese zwischen C_3- und C_4-Fixierungsweg (Stockhaus et al., 1994).
Der neue C_4-Stoffwechselweg erforderte viele anatomische und physiologische Anpassungen der C_4-Pflanzen, da dieser in zwei zellulär getrennten Schritten abläuft und meist eine koordinierte Interaktion zweier morphologisch und funktionell unterschiedlicher Zelltypen, den Bündelscheiden- und Mesophyllzellen, voraussetzt. Die primäre Fixierung des CO_2 in einem C_4-Körper findet in den Mesophyllzellen statt, während die Freisetzung und

Refixierung des CO_2 durch Rubisco in den Bündelscheidenzellen abläuft. Es findet dadurch im Vergleich zur Umgebung eine 3-20fache Aufkonzentrierung des CO_2 im Bereich der Rubisco statt (Dai et al., 1993; Jenkins et al., 1989; Maroco et al., 2000), wodurch das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der Carboxylierung verschoben und somit die Photorespiration stark eingeschränkt wird.

Um den Vorgang der CO_2-Konzentrierung der C_4-Pflanzen effizient zu gestalten und einen ausreichenden Metabolitaustausch zwischen den Zellen zu gewährleisten, ist ein direkter Kontakt der beiden beteiligten Zelltypen durch zahlreiche Plasmodesmata erforderlich. In C_4-Pflanzen ist die Anzahl der Plasmodesmata zwischen Mesophyll- und Bündelscheidenzellen dadurch 3-5 mal höher als in C_3-Pflanzen (Botha, 1992). Der notwendige, enge Kontakt zwischen den Zelltypen limitiert daher die Anzahl der Mesophyllzellen zwischen den Bündelscheidenzellen und führt in den photosynthetisch aktiven Geweben bei C_4-Pflanzen zu einer auffälligen Anatomie, der Kranz-Anatomie. Dabei sind die Bündelscheidenzellen konzentrisch um die Leitbündel angeordnet, zwischen denen sich maximal zwei Mesophyllzellen befinden. Der Abstand der Leitbündel ist also im Vergleich zu C_3-Geweben, mit bis zu 20 Mesophyllzellen zwischen den Leitbündeln, deutlich erniedrigt (Dengler and Nelson, 1999; Langdale et al., 1988). Die Bündelscheidenzellen der C_4-Pflanzen weisen zusätzlich, oftmals aufgrund von Suberineinlagerungen, eine dickere, besonders stabile Zellwand auf, die den Gasaustausch mit den Interzellularen erschwert und die Konzentrierung des CO_2 in den Zellen begünstigt (Dengler and Nelson, 1999).

Auch die Chloroplasten der beiden Zelltypen unterscheiden sich in ihren Charakteristika. Während die Chloroplasten der Mesophyllzellen kleiner sind, einen hohen Grad an Grana aufweisen und eher den typischen C_3-Mesophyllchloroplasten gleichen, sind die Chloroplasten der Bündelscheiden deutlich größer, zumeist agranal und zentrifugal angeordnet (Crespo et al., 1979; Dengler and Nelson, 1999).

Bei der in dieser Arbeit verwendeten C_4 Pflanze *Zea mays* wird das CO_2 im Cytoplasma der Mesophyllzellen durch die Carboanhydrase (CA) zu HCO_3^- (Bicarbonat) umgewandelt und dann mit Phosphoenolpyruvat (PEP) durch das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) als Oxalacetat fixiert (Abbildung 1). In den Chloroplasten der Mesophyllzellen wird das Oxalacetat daraufhin zu Malat reduziert, welches anschließend in die Bündelscheidenzellen diffundiert und dort in den Chloroplasten durch das NADP-abhängige Malatenzym (ME) wieder decarboxyliert wird. Das freigesetzte CO_2 kann nun von Rubisco refixiert und in den Calvin-Zyklus eingeschleust werden. Das bei dieser Reaktion entstandene Pyruvat wird durch die Pyruvat-Orthophosphatdikinase (PPDK) in den Chloroplasten der

Mesophyllzellen wieder zu PEP recycelt und steht zur erneuten Fixierung von CO_2 bereit (Hatch, 1999; Kanai and Edwards, 1999).

Neben dem hier beschriebenen Typ existieren noch zwei weitere Typen der C_4-Photosynthese, der NAD-ME Typ und der PEP-CK Typ. Die Einteilung in die verschiedenen Gruppen erfolgt dabei nach den Decarboxylierungsenzymen in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen (Kanai and Edwards, 1999).

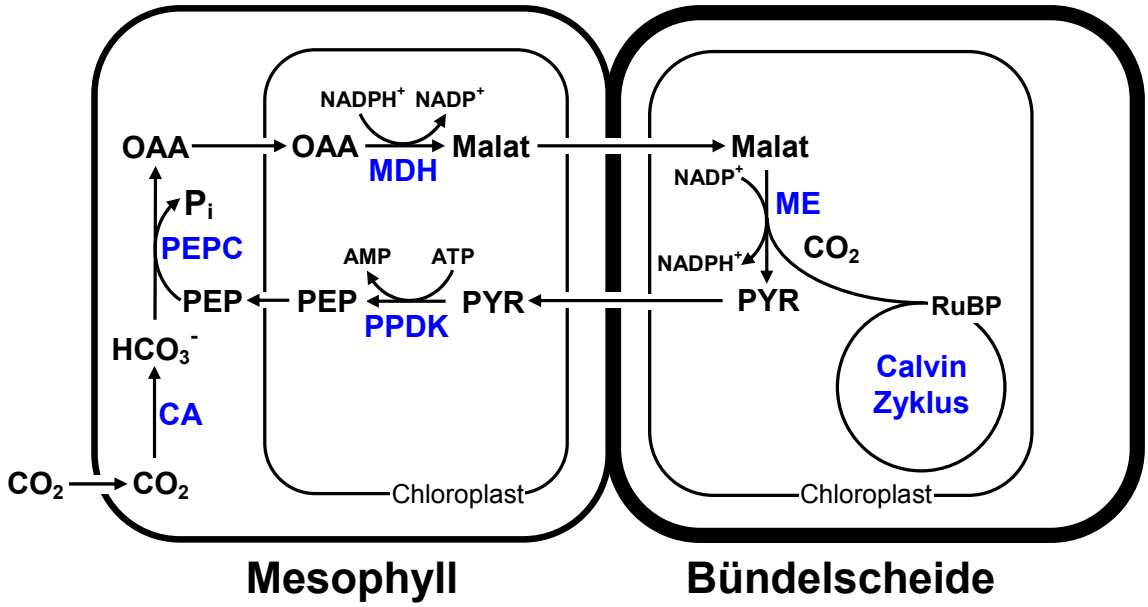


Abbildung 1: Schematische Darstellung des C_4-Stoffwechsels in *Zea mays*

C_4-$NADP^+$-Malatenzymtyp der CO_2-Fixierung bei Mais. Beteiligte Enzyme sind blau hervorgehoben.
CA = Carboanhydrase; MDH = Malatdehydrogenase; ME = Malatenzym; OAA = Oxalacetat; PEP = Phosphoenolpyruvat; PEPC = Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; PPDK = Pyruvat-P_i-Dikinase; PYR = Pyruvat; RuBP = Ribulose-1,5-bisphosphat

Durch die Anreicherung des CO_2 in der direkten Umgebung der Rubisco ist die Photorespiration in den C_4-Pflanzen nahezu unterdrückt. Neuere Untersuchungen bei verschiedenen Wasser- und Landpflanzen weisen allerdings darauf hin, dass die Kranzanatomie, nicht wie bisher angenommen, für eine C_4-ähnliche CO_2-Fixierung essentiell ist (Casati et al., 2000; Freitag and Stichler, 2000; Reiskind et al., 1997; Voznesenskaya et al., 2002; Voznesenskaya et al., 2001). Diesen Pflanzen ist es gelungen, eine räumliche Anordnung von dimorphen Chloroplasten, anderen Organellen und den typischen Enzymen der C_4-Photosynthese innerhalb einer Zelle zu schaffen, die es ihnen ermöglicht, die CO_2-Konzentration in der Umgebung der Rubisco zu erhöhen und so die Photorespirationsrate zu senken. Diese Sonderfälle werden in der Diskussion nochmals aufgegriffen.

1.2 Regulation der C_4-Photosynthese

Neben anatomischen Änderungen waren auch auf der genomischen Ebene einige Anpassungen zur Etablierung eines alternativen photosynthetischen Stoffwechselweges nötig. Zwar entwickelten sich die Gene der C_4-Photosynthese auf der Basis bereits bestehender Gene der C_3-Pflanzen, es waren jedoch regulatorische Anpassungen notwendig, um die hohen Transkriptionsstärken und die differentielle, spezifische Expression in den verschiedenen Zellkompartimenten zu sichern. So weisen sie gegenüber den ursprünglichen Genen eine veränderte Promotor- und 3'-Region mit zusätzlich eingebrachten *cis*-Elementen auf. Diese *cis*-Elemente verleihen den Genen ihre Gewebespezifität (Ku et al., 1996) und sind auch für die Lichtinduktion der C_4-Gene verantwortlich, die neben der Position der Zelle zu den Leitbündeln des Blattes eine große Rolle bei der Regulation der C_4-photosynthetisch relevanten Gene spielt.

Ein von Langdale et al. (1991) entwickeltes hypothetisches Modell verdeutlicht das mögliche Zusammenspiel von Zellposition und Lichtinduktion bei der Etablierung des für C_4-Pflanzen typischen Expressionsmusters (Abbildung 2). Entscheidend ist hierbei ein Faktor (A), der nach Lichtinduktion von den Leitbündeln aus in das Blattgewebe eindringt und sowohl mit Bündelscheidenfaktoren (B) als auch mit mesophyllspezifischen Faktoren (C) agieren kann. In Abwesenheit von Licht ist dieser Faktor A nicht anwesend und beide Zelltypen zeigen das gleiche C_3-typische Grundexpressionsmuster. Erst nach Belichtung wird der Regulationsfaktor gebildet und reagiert mit den spezifischen Faktoren der jeweiligen Zelltypen, um das typische C_4-Expressionsmuster auszubilden. Weiter als zwei Zellen vom Leitbündel entfernte Mesophyllzellen behalten jedoch das Expressionsmuster des Grundzustandes bei, da die von den Leitbündeln ausgehende Konzentration des lichtinduzierten Regulationsfaktors A nicht ausreicht, um durch Diffusion auch entfernter gelegene Zellen in ausreichenden Mengen zu erreichen. Das Vorkommen solch weiter vom Leitbündel entfernter Mesophyllzellen in Mais wird noch in Abschnitt 1.4 ausführlich erläutert. Die zellspezifischen Faktoren B und C können in diesem Modell sowohl konstitutiv exprimiert als auch lichtinduzierbar sein.

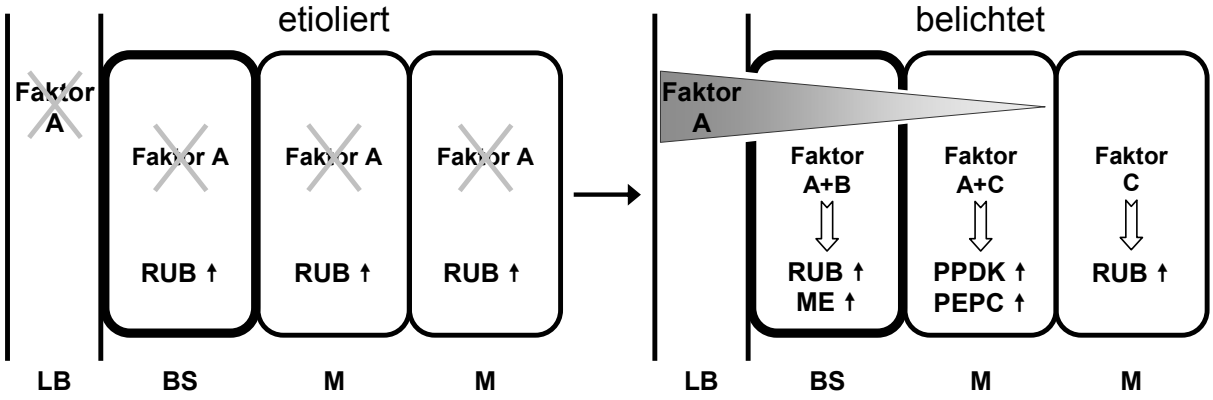


Abbildung 2: Modell zur Regulation der C_4-Genexpression nach Langdale

Schematische Darstellung eines Modells zur Regulation der Genexpression in *Zea mays* (Langdale and Nelson, 1991). Ein lichtinduzierbarer Faktor A diffundiert vom Leitgewebe aus in das Blattgewebe und erreicht nur Zellen, die maximal zwei Zelllagen von einem Leitbündel entfernt sind. Durch Interaktion des Faktors A mit den zelltypspezifischen Faktoren B und C wird die Differenzierung der bündelscheiden- und mesophylltypischen Expressionsmuster photosynthetisch relevanter Gene reguliert.
BS = Bündelscheidenzelle; LB = Leitbündel; M = Mesophyllzelle; ME = Malatenzym; PEPC = Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; PPDK = Pyruvat-P_i-Dikinase; RUB = Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco)

Obwohl sich zahlreiche Untersuchungen mit der Regulation der C_4-Photosynthese befasst haben, sind viele der regulatorischen Faktoren weiterhin unbekannt. Im folgenden Abschnitt soll die transkriptionelle Regulation des Gens für die kleine Untereinheit der Rubisco, welche sowohl in C_3- als auch in C_4-Geweben exprimiert wird, sowie der C_4-spezifischen Gene für PEPC und ME ausführlich dargestellt werden. Auf die vielfältigen Möglichkeiten der Regulation der C_4-Photosynthese auf posttranskriptionaler Ebene durch Substrate oder Kinase-Aktivitäten wird dabei nicht eingegangen.

1.2.1 Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco)

Das Schlüsselenzym der Photosynthese Rubisco ist ein Holoenzym, das aus einer großen und einer kleinen Untereinheit besteht, die wiederum jeweils aus acht Einheiten zusammengesetzt sind. Während die große Untereinheit im Chloroplastengenom codiert ist, wird die kleine Untereinheit durch eine Genfamilie im Nukleus codiert. Die Anzahl der codierenden Gene für die kleine Untereinheit der Rubisco in Mais war Bestandteil einer Reihe von Untersuchungen, die zu verschiedenen Ergebnissen kamen. Neuere Daten von Ewing et al. (1998) weisen auf die Existenz von nur zwei unterschiedlichen Genen für die kleine Untereinheit der Rubisco hin (*rbcS1* und *rbcS2*). Wie schon in Abbildung 2 gezeigt, tritt in etiolierten Maispflanzen auch in den Mesophyllzellen Expression von Rubisco auf, die erst nach Belichtung auf die Bündelscheidenzellen beschränkt wird. Zwei Faktoren sind daher bei der gewebespezifischen Regulation von Rubisco entscheidend, die erhöhte Transkription der Gene bei Belichtung in den Bündelscheidenzellen und die Unterdrückung dieser Expression in den Mesophyllzellen. Einige dieser regulatorisch wirkenden cis-Elemente konnten bereits identifiziert werden. So wurden sowohl Regulatorelemente stromaufwärts als auch in der 3'-Region der Gene gefunden, die synergistisch bei der Regulation und gewebespezifischen Expression wirken (Schaeffner and Sheen, 1991; Sheen, 1999).

Weitere Daten zeigen Hinweise auf eine möglicherweise stärkere Lichtinduzierbarkeit des *rbcS2*-Gens im Vergleich zum *rbcS1*-Gen (Ewing et al., 1998) und die Beteiligung von Phytochromrezeptorelementen (Purcell et al., 1995) an der erhöhten Transkriptionsrate in Bündelscheiden sowie der verminderten Expression in Mesophyllzellen. Neben dieser transkriptionellen Regulation der kleinen Untereinheit der Rubisco deuten Untersuchungen auch auf eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene hin, da der Promotor der Rubiscogene auch nach Belichtung in den Mesophyllzellen weiterhin Aktivität zeigt, aber kein Protein nachweisbar ist (Schaeffner and Sheen, 1991; Sheen, 1999).

1.2.2 Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC)

Das Enzym PEPC katalysiert den primären CO_2-Fixierungsschritt der C_4-Photosynthese und ist in seiner transkriptionellen Regulation besonders gut untersucht worden. Im Maisgenom findet man drei verschiedene PEPC-Gene, aber nur die C_4-spezifische Isoform weist eine lichtinduzierbare, gewebespezifische Regulation auf und wird ausschließlich in den Mesophyllzellen exprimiert (Schaeffner and Sheen, 1992; Sheen, 1999). Im Gegensatz zur Expression von Rubisco, die ohne Belichtung in beiden Zelltypen auftritt, liegen in etiolierten Maispflanzen keine Transkripte der C_4-spezifischen Isoform von PEPC vor. Erst nach Belichtung kommt es zu einem starken Anstieg der Expression ausschließlich in den Mesophyllzellen (Sheen and Bogorad, 1987). Zur Ursache dieses Anstieges gibt es widersprüchliche Untersuchungen, die entweder auf eine direkte Lichtinduktion des C_4-PEPC-Gens mittels Phytochrom-Kontrolle (Ma and Feng, 1993; Thomas et al., 1990) oder eher auf eine indirekte Wirkung durch lichtinduzierte Veränderungen in der Blattentwicklung schließen lassen (Schaeffner and Sheen, 1992).

Ein weiterer Aspekt bei der lichtabhängigen Regulation des PEPC-Gens ist die Chromatinstruktur des Promotors. So konnte gezeigt werden, dass es nach Belichtung etiolierter Maisblätter zu einer Reorganisation des Chromatins im Promotorbereich des C_4 spezifischen PEPC-Gens in Mais kommt (Kalamajka et al., 2003). Weitere Daten lassen auch einen Zusammenhang zwischen der Demethylierung eines Sequenzbereiches < 3 kb stromaufwärts des Promotors und der spezifischen Expression in Mesophyllzellen erkennen (Langdale et al., 1991). Zahlreiche weitere Analysen konnten bereits in der 5'-Region des Gens *cis*-agierende Elemente identifizieren, die regulierend für die Gewebespezifität und die hohen Transkriptionsstärken in den Mesophyllzellen sind (Schaeffner and Sheen, 1992; Sheen, 1999; Taniguchi et al., 2000).

Über ihre Interaktion mit dem PEPC-Promotor wurden auch die *trans*-agierenden Faktoren DOF1 und DOF2 identifiziert (Yanagisawa and Izui, 1993). Die DOF-Proteine gehören zu einer bisher nur in Pflanzen gefundenen Proteinfamilie, deren Mitglieder alle eine hochkonservierte Aminosäuresequenz aufweisen, die den DNA-Bindebereich der Faktoren repräsentiert und DOF-Domäne genannt wird. Die Bindung an die DNA erfolgt dabei über einen einzigen Zinkfinger und gab der Familie ihren Namen (DOF=DNA binding with one finger). DOF1 wird in Mais konstitutiv in der Wurzel, im Stängel und in Blättern exprimiert, DOF2 dagegen nur in der Wurzel und im Stängel. Yanagisawa und Sheen konnten in Mais anhand eines transienten Protoplastenassays Hinweise sammeln, die zeigen, dass DOF1 die

Rolle eines lichtinduzierten Transkriptionsaktivators übernimmt, während DOF2 einen gewebespezifischen Transkriptions-Repressor darstellt (Yanagisawa and Sheen, 1998).

1.2.3 Malatenzym (ME)

Zur Regulation von ME gibt es eine Reihe von Untersuchungen, doch sollen hier nur die Erkenntnisse für Mais dargestellt werden. ME katalysiert die Decarboxylierungsreaktion von Malat in den Bündelscheidenzellen und ermöglicht so die Refixierung des freigesetzten CO_2 durch Rubisco. In Mais wurden bisher drei über große Bereiche homologe Gene gefunden, die für ME codieren. Während eine dieser Isoformen nur im Wurzelgewebe vorkommt, ist die Expression der zwei weiteren Gene für den Hauptanteil an ME in der Pflanze verantwortlich. So weist das Genprodukt der zweiten Isoform ähnliche Eigenschaften und Funktionen auf, wie das in C_3-Pflanzen vorkommende Enzym und wird in allen Geweben, mit Ausnahme der Bündelscheidenzellen, konstitutiv exprimiert. Die dritte Isoform dagegen zeigt eine lichtinduzierbare, bündelscheidenspezifische Expression in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums des Blattes und repräsentiert die C_4-typische ME-Isoform (Tausta et al., 2002). Die Regulation der Lichtinduktion dieser Isoform des ME findet auf transkriptioneller Ebene statt (Collins and Hague, 1983), doch konnten bisher noch keine konkreten Regulationselemente im Bereich des Gens identifiziert werden. Die gewebespezifische Expression dagegen scheint im Gegensatz zur Lichtinduzierbarkeit posttranskriptional reguliert zu werden, da ältere Untersuchungen in Form von Run-On Experimenten die Expression der C_4-spezifischen Isoform sowohl in Mesophyllzellen als auch in Bündelscheiden zeigen, während das C_4-typische Enzym nur in Bündelscheiden nachgewiesen werden konnte (Sheen, 1999).

1.3 Weitere differentiell exprimierte Gene

Neben den schon erwähnten Spezialisierungen der C_4-Pflanzen gibt es auch eine Reihe weiterer spezifischer Änderungen, die sich aus der Aufteilung der Photosynthese auf zwei Zelltypen ergeben. So zeigen die Gene der Chlorophyll-Bindeproteine (cab-Gene), die einen Großteil der Proteine der Photosysteme I und II codieren, ein deutlich differentielles Expressionsmuster in den Mesophyll- und Bündelscheidenzellen. Fünf der bekannten sieben cab-Gene werden entweder ausschließlich in den Bündelscheiden oder in den Mesophyllzellen exprimiert, während nur zwei gleichermaßen in beiden Zelltypen transkribiert werden (Bansal et al., 1992). Diese zelltypspezifische Expression führt zu einer Unterdrückung des Photosystems II in den Bündelscheidenzellen (Bansal and Bogorad, 1993; Becker et al., 1992; Sheen and Bogorad, 1986). Da das Photosystem II (PS II) in der

Lichtreaktion an der Dissoziation von Wasser und der damit verbundenen Freisetzung von Sauerstoff beteiligt ist, kann durch die Verlagerung dieses Systems in die Mesophyllzellen so eine O_2-Akkumulation in den Bündelscheiden vermieden werden. Dadurch wird die Carboxylase-Aktivität der Rubisco nicht durch kompetetive Oxygenase-Aktivität gemindert (Leegood and Walker, 1999). Aufgrund der unterdrückten PS II Funktionen in den Bündelscheiden ist die Decarboxylierung von Malat durch ME die Hauptquelle für Reduktionsäquivalente in diesem Zelltyp. So finden viele reduktive Reaktionen in den Bündelscheiden statt, unter anderem auch die Reaktionen der Enzyme des Calvin-Zyklus, deren Gene fast ausschließlich in den Bündelscheiden exprimiert werden (Kanai and Edwards, 1999).

Auch für Transporter codierende Gene zeigen eine differentielle Expression. Der Transport durch Transportersysteme spielt neben der Diffusion eine große Rolle in der C_4-Photosynthese, da der aktive Transport von Stoffwechselprodukten über die Chloroplasten-membran für eine effektive C_4-Photoynthese essentiell ist. Die beiden Zelltypen weisen daher eine differentielle Expression und Verteilung dieser Transporterssysteme auf (Leegood, 2002; Taniguchi et al., 2004). Eine Reihe weiterer Gene weist aufgrund der anatomischen und physiologischen Anpassungen der C_4-Pflanzen ein verändertes Expressionsmuster zu den C_3-Pflanzen auf, wie z.B. die Gene der Enzyme des Stickstoff- und Schwefelstoffwechsels oder des Elektronen-Transports (Kanai and Edwards, 1999).

1.4 C_4- und C_3-typische Photosynthese in Blattgeweben von Mais

Die Feststellung, dass die zellspezifische Akkumulation der C_4-Genprodukte in Zusammenhang mit der Lichtinduktion und der Entwicklung des vaskulären Systems steht (Langdale et al., 1987; Langdale et al., 1988), führte zu der Annahme, dass die Leitbündel Faktoren transportieren, die für die Entwicklung der zwei C_4-typischen Zelltypen Mesophyll und Bündelscheide von Bedeutung sind, und somit die Anzahl der Zellen zwischen den Leitbündeln limitiert ist (Langdale et al., 1988). Zur Überprüfung dieser These untersuchten Langdale et al. (1988) mit Hilfe von nicht quantitativen *in situ* Immunolokalisierungen das typische Verteilungsmuster einiger C_4-Markerenzyme in verschiedenen Blatttypen von Mais. Mais besitzt neben den Laubblättern noch weitere blattähnliche Organe, die eine veränderte Anatomie aufweisen. Das am besten untersuchte System stellen hierbei die Hüllblätter der weiblichen Infloreszenz dar. Im Gegensatz zum Laubblatt ist der Abstand zwischen zwei

Leitbündeln im Hüllblatt deutlich vergrößert und es können bis zu 20 Mesophyllzellen zwischen den Bündelscheiden liegen (Abbildung 3) (Langdale et al., 1988).

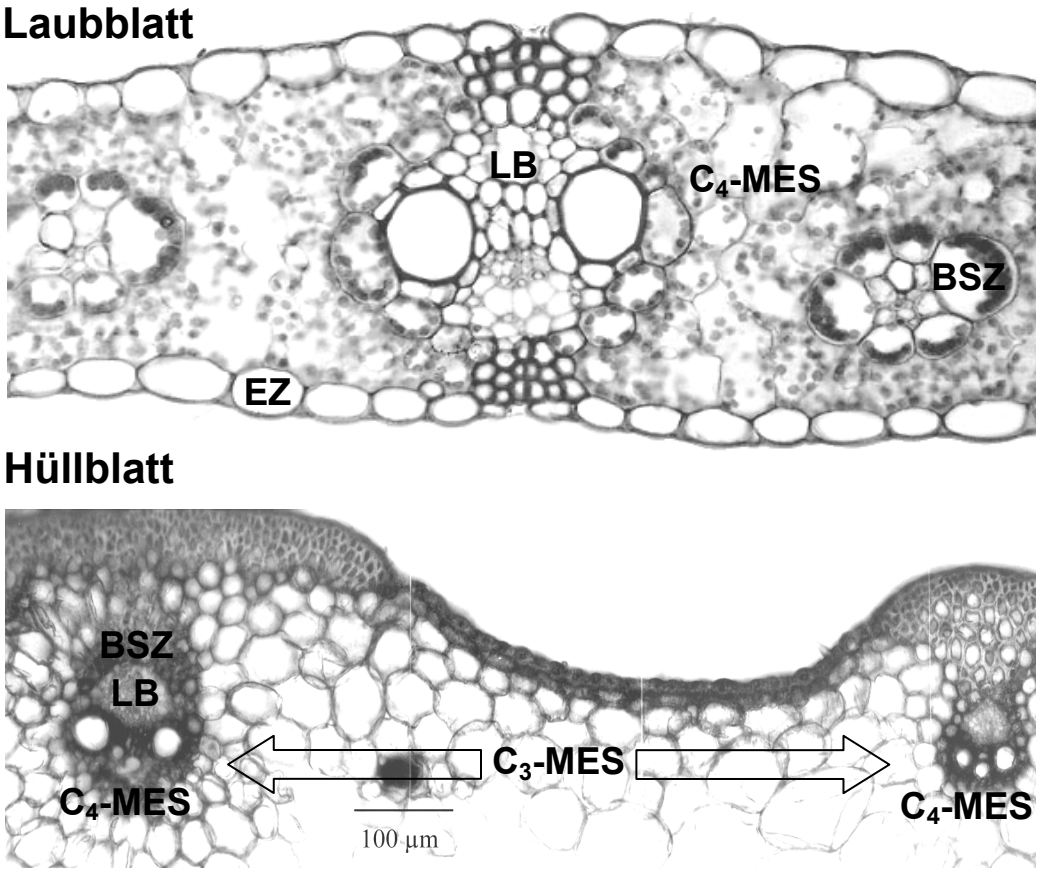


Abbildung 3: Blattquerschnitte durch Laub- und Hüllblatt von Mais

Dargestellt ist die mikroskopische Aufnahme zweier Querschnitte durch Blattgewebe von Mais.
BSZ = Bündelscheidenzelle; EZ = Epidermiszelle; LB = Leitbündel; MES = Mesophyllzelle (C_3- oder C_4 Photosynthese)

Ihre Daten zeigen, dass in den Geweben mit mehr als zwei Mesophyllzellen zwischen den Bündelscheiden ein von der C_4-Photosynthese abweichendes Proteinmuster auftrat. So konnte im Hüllblatt sowohl in den Bündelscheiden als auch in Mesophyllzellen in einem größeren Abstand zu den Leitbündeln Rubisco nachgewiesen werden, während die C_4-typischen Proteine nur in Mesophyllzellen nah an Bündelscheidenzellen gefunden wurden. Durch Kohlenstoff-Diskriminierungsanalysen der Hüllblätter konnte gezeigt werden, dass die $\delta^{13}C$-Werte von Hüllblattgewebe einen Mittelwert zwischen Werten aus reinem C_4-Gewebe und reinem C_3-Gewebe darstellten (Yakir et al., 1991). Weitere Messungen, wie die der Sauerstoff-Sensitivität der Rubisco (Langdale et al., 1988) in Laub- und Hüllblättern von

Mais, legten den Schluss nahe, dass Mesophyllzellen im Hüllblatt, die sich in einem größeren Abstand zur Bündelscheide befinden, Photosynthese nach dem C_3-Mechanismus betreiben.
Im Hüllblattgewebe sind die Leitbündel soweit voneinander entfernt, dass die meisten Mesophyllzellen nicht im direkten Kontakt zur Bündelscheide stehen. Diese im Folgenden als C_3-Mesophyll bezeichneten Zellen zeigen die typische Enzymausstattung der C_3-Photosynthese (Langdale and Nelson, 1991; Langdale et al., 1988). Mais weist somit in den Hüllblättern sowohl C_4-Mesophyllzellen und Bündelscheidenzellen auf, aber auch C_3-Mesophyllzellen. Damit stellen die Hüllblätter ein besonders gut geeignetes System zur Untersuchung der Regulation C_4-spezifischer Genexpression dar.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Zielsetzung der Arbeit ist die Analyse der an der Etablierung und Aufrechterhaltung der C_4-Photosynthese beteiligten Mechnismen. Dazu sollen die photosynthetisch aktiven Gewebe in Laub- und Hüllblättern von Mais isoliert und mittels Real-Time-PCR näher charakterisiert werden. Eine gleichzeitige Quantifizierung von Transkripten der für die Photosynthese relevanter Gene soll dabei neue Erkenntnisse über die Verteilungsmuster und relativen Akkumulationsverhältnisse liefern. Zur Detektion neuer, differentiell exprimierter Gene im Zusammenhang mit der C_4-Photosynthese soll die subtraktive Hybridisierung eingesetzt werden. Ziel dieser Technik ist die Subtraktion aller aus C_3-Mesophyllgewebe isolierten mRNAs von der mRNA-Population des Hüllblatts, um Transkripte von Genen zu identifizieren, die spezifisch für C_4-Gewebe sind. Durch nachfolgende Verifizierung und Datenbankanalysen sollen die detektierten Gene weiter beschrieben und charakterisiert werden, um so neue Erkenntnisse zur Regulation der C_4-Photosynthese zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Bei den Maispflanzen handelte es sich um *Zea mays* cv. Helix.

Die Maispflanzen wurden in Phytokammern bei einer Temperatur von 25 °C angezogen. Die Belichtung erfolgte täglich für 16 h mit Osram Superstar HQI-T 400W/DH Lampen. Dabei lag die Photonen-Flux-Dichte zwischen 200 und 300 µmol m^{-2} s^{-1}. Anschließend folgte eine Dunkelperiode von 8 h.

Hüllblätter wurden von Maispflanzen präpariert, die im Gewächshaus unter nicht kontrollierten Bedingungen angezogen wurden. Um eine optimale Belichtung der Hüllblätter zu gewährleisten, wurden die eventuell Schatten spendenden Laubblätter und das Prophyll 48 h vor der Gewebepräparation entfernt.

2.2 Bakterienkulturen

Zur Isolierung und Vermehrung von TOPO-Plasmiden wurde der *Escherichia coli (E.coli)*-Stamm TOP10 von Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet:

[F- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deo*R araD139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G]

Zur Anzucht und Vermehrung der Phagen EMBL3 wurde der *Escherichia coli (E.coli)*-Stamm NM 538 verwendet: [*sup*F, *hsd*R (r_K-,m_K+), *trp*R, *lac*Y]

2.3 Phagenbank

Bei der verwendeten Phagenbank handelt es sich um eine kommerziell erhältliche Bibliothek der Firma BD Biosiences (Erembodegem, Belgien).

DNA-Quelle: Mais-Keimlinge im zweiblättrigen Entwicklungsstadium (*Zea mays* cv. B73)

Durchschnittliche Fragmentgröße : 16 kb (8 bis 21 kb)

Titer: 3 x 10^9 pfu/ml

Vektor: EMBL3

2.4 Plasmide

Bei der Klonierung von PCR-Produkten wurde das Plasmid pCR®4-TOPO nach Herstellerangaben der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet.

2.5 Häufig verwendete Lösungen

LB	10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0
	Zusatz von 10 mM $MgSO_4$ zur Phagenanzucht
	Zusatz von 15 g/l Agarose zur Plattenherstellung
	Zusatz von 0,2 % (w/v) Maltose
	Zusatz von 7,2 g/l für LB Soft-top Agarose
	Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsagens
PEG/NaCl-Lösung	20 % (w/v) PEG 800
	2 M NaCl
10 x PCR-Puffer	500 mM KCl
	22,5 mM $MgCl_2$
	100 mM Tris-HCl pH 8,5
	0,1 % (v/v) Tween 100
Trizol	0,8 M Guanidiniumthiocyanat
	0,4 M Ammoniumthiocyanat
	0,1 M Na-Acetat pH 5,0
	5 % (v/v) Glycerin
	38 % (v/v) Phenol (Wasser äquilibriert)
1 x SMC	0,5 M Sorbitol
	5 mM MES
	10 mM $CaCl_2$
	pH 8,0

STETL-Lösung	8 % (w/v) Saccharose 50 mM Tris-CHl pH 8,0 50 mM EDTA 5 % (v/v) Triton X-100 0,5 mg/ml Lysozym, frisch zugeben
1 x SSC	150 mM NaCl 15 mM NaCitrat, pH 7,0
1 x TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA, pH 8,0
Phagen-Verdünnungspuffer	0,1 M NaCl 0,01 M $MgSO_4$ 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) 2 % (w/v) Gelatine

2.6 Gewebepräparationen

Die Präparation der Gewebe erfolgte aus 14 Tage alten Pflanzen 6 h nach Beginn der Belichtung. Ausnahme war die Präparation von C_3-Mesophyll aus Hüllblättern. Hierbei wurden 2 Monate alten Pflanzen verwendet.

Für die Präparation von Laub- und Hüllblättern wurden Laubblätter und dunkelgrüne Bereiche der Hüllblätter in Stücke geschnitten und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bei der Präparation von C_4-Mesophyllzellen und Bündelscheidenzellen wurde das Protokoll von Sheen und Bogorad (1985) mit Modifikationen verwendet.

Die Trennung der C_4-Mesophyllzellen von denen der Bündelscheidenzellen beruht im Wesentlichen auf den morphologischen Unterschieden dieser Zellen. Bündelscheidenzellen haben im Gegensatz zu den Mesophyllzellen eine wesentlich dickere und stabilere Zellwand, die durch Suberineinlagerungen verstärkt wird. Aufgrund dieser Bedingungen werden bei einem enzymatischen Abbau der Zellwände die Protoplasten der Mesophyllzellen früher freigesetzt. Auch bei mechanischer Behandlung werden die Mesophyllzellen leichter und damit schneller aufgebrochen. Diese Tatsache macht man sich bei der Trennung dieser Zelltypen zu Nutze.

2.6.1 Präparation von C_4-Mesophyllzell-Protoplasten

Die Maisblätter wurden in feine Streifen geschnitten und kurz mit SMC-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Blattstücke in SMC-Puffer mit 3 % (w/v) Rohalase 7069, 2 % (w/v) Rohament PL, 0,12 % (w/v) Mazerozym R-10 gegeben. Um den enzymatischen Abbau der Zellwände effektiver zu gestalten, wurde durch Anlegen eines Vakuums die Luft aus den Interzellularen gesaugt. Dadurch konnte die Enzymlösung auch in die Interzellularräume eindringen. Dann erfolgte eine 1,5-stündige Inkubation bei 30 °C unter Belichtung. Anschließend wurden die Protoplasten vom Zelldebris mittels Filtrieren durch ein 100 µm Sieb abgetrennt. Die resultierende Protoplastensuspension wurde mit 0,5 Volumen Linsmeier-Skoog verdünnt und die Protoplasten durch Zentrifugation bei 300 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das verbleibende Protoplastenpellet in Trizol (2.5) resuspendiert.

2.6.2 Präparation von Bündelscheidenzellen

Zur Isolierung von Bündelscheiden wurden die Blätter in kleine Stücke zerschnitten und anschließend 5 s mit Diethylether behandelt, um die kutikulären Wachse zu entfernen und somit die Gewebezerkleinerung zu erleichtern. Nach intensivem Waschen mit eiskaltem Wasser erfolgte die Homogenisierung des Blattmaterials in ebenfalls gekühltem Wasser in einem Waring Blender für 6 x 4 sec. Das Homogenisat wurde auf ein Sieb gegeben, ein Teil des Zelldebris durch Waschen mit Wasser entfernt und der Homogenisierungsschritt mit dem verbleibenden Siebrückstand wiederholt. Es erfolgte eine Filtration durch ein 100 µm Sieb und intensives Waschen des Filterrückstandes mit eiskaltem Wasser. Verbleibendes Wasser wurde abgesaugt und die Bündelscheidenzellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.
Der Grad an Kontamination des Gewebes durch Mesophyllzellen wurde durch optische Kontrolle überprüft und bei Bedarf die Homogenisierung wiederholt.

2.6.3 Präparation von C_3-Mesophyll aus Hüllblättern

Die Isolierung von C_3-Mesophyll erfolgte unter dem Binokular durch Ausschneiden der betreffenden Zellen aus den Hüllblättern. Dazu wurden nur die Regionen der Hüllblätter verwendet, die dem Licht ausgesetzt waren und ein dunkles Grün zeigten. Es wurde besonders darauf geachtet, dass der Abstand zu den Leitbündeln mind. 3 Zellen betrug, so dass Streifen von ca. 0,5 mm Breite zwischen den Leitbündeln herausgeschnitten wurden. Die erhaltenen Blattstücke wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.7 Nukleinsäurepräparation

2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mais (*Zea mays*)

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Mais erfolgte mit einigen Modifikationen nach dem Protokoll von Chomczynski (1993).
Das Prinzip ist ähnlich einer Phenol-Cloroform-Extraktion, doch wird in diesem Fall wassergesättigtes Phenol mit einem pH von 5,5 verwendet, welches eine Trennung der Nukleinsäuren bewirkt. Die DNA verbleibt in der Interphase, während die RNA in der wässrigen Phase gelöst vorliegt.
Das Blattmaterial wurde fein gemörsert und anschließend in 10 Vol Trizol (2.5) aufgenommen, im Fall von isolierten Mesophyll-Protoplasten (2.6.1) nur in einem Volumen Trizol. Nach 10-minütigem Homogenisieren wurde durch Zugabe von Chloroform eine

Phasentrennung herbeigeführt und nach Zentrifugation die obere, wässrige Phase abgenommen. Nach zweimaligem Waschen der Phase mit Chloroform erfolgte die Präzipitation der RNA aus der wässrigen Phase mit zwei Volumen eiskaltem Ethanol (96 %) für 1 h bei -20 °C. Anschließend wurde die RNA pelletiert, mit Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in einer adäquaten Menge Wasser aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm gemessen.

2.7.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (<2 ml)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Kulturen mit kleineren Volumina erfolgte im Wesentlichen nach der von Sambrock et al. beschriebenen STETL-Methode. Eine Übernachtkultur der Bakterien wurde für 15 min bei 15500 g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zur Lyse der Bakterien wurde das Pellet in einer lysozymhaltigen Lösung (STETL-Lösung 2.5) resuspendiert und 30 s aufgekocht. Um die plastidäre DNA von den Zelltrümmern und dem Bakterienchromosom abzutrennen, erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 15000 g für 15 min. Anschließend konnte die Plasmid-DNA und noch vorhandene bakterielle RNA aus dem Überstand mit 96 %-igem Ethanol präzipitiert werden. Die so gewonnene DNA wurde ohne weitere Aufreinigung in die PCR als Matrize eingesetzt.

2.7.3 Isolierung genomischer DNA aus Phagen

Der Phage EMBL3 gehört zu den lytischen Phagen, er ist daher nach Vermehrung im Bakterium und Freisetzung im Medium zu finden. Die Isolierung genomischer DNA aus Phagen wurde zu großen Teilen nach Protokollangaben der Phagenbank der Firma BD Biosiences (Erembodegem, Belgien) durchgeführt. Zur Präparation der Phagen-DNA wurde zunächst eine NM538 Bakterienkultur bei einer Dichte von OD_{600} = 0,6 mit Phagen infiziert und bis zur Lyse der Bakterien bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Sobald die Lyse eingesetzt hatte, wurden durch Zugabe von 10 % Chloroform die noch verbliebenen Bakterien lysiert, um alle Phagen freizusetzen. Um die Phagen von dem Bakteriendebris abzutrennen, wurde bei 7200 x g für 10 min zentrifugiert und die Bakterientrümmer pelletiert. Zum Überstand wurden 15000 u Worthington DNase (Worthington, England) und 25 µg/ml RNase A zum Abbau bakterieller Nukleinsäuren gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Chloroform-Extraktion, um die zugesetzten Enzyme herauszuwaschen. Die in der Lösung befindlichen Phagen konnten nun mit 1 Volumen PEG/NaCl-Lösung über Nacht

bei 4°C ausgefällt werden, um sie von den Resten freier, bakterieller DNA/RNA zu trennen. Die gefällten Phagen wurden daraufhin mit 0,5 % (w/v) SDS und 50 µg/ml Proteinase K aufgeschlossen und die Phagen-DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol/NaAc-Fällung aufgereinigt. Die erhaltene DNA wurde ohne weitere Aufreinigung zur Herstellung einer Genome Walking Bank verwendet (2.10.3).

2.8 cDNA-Synthese

Bei der reversen Transkription erfolgt durch eine virale Reverse Transkriptase die Synthese einer einzelsträngigen cDNA anhand eines RNA-Stranges als Matrize. Der für diese Reaktion notwendige Primer kann sowohl genspezifisch sein als auch spezifisch für den PolyA-Schwanz der mRNA und somit die Gesamtheit aller mRNAs als Matrize nutzen.
Für die Reaktion wurde der Primer mit der Matrize und Wasser 5 min auf 65 °C erhitzt, anschließend auf Eis gehalten und die restlichen Komponenten wie dNTPs, Puffer und Reverse Transkriptase zugegeben. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C konnte der Erststrang ohne weitere Aufreinigung in die PCR eingesetzt werden.
Für die Reaktion wurde die Reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (MML-V; Promega, Mannheim) eingesetzt.

Standardreaktion:

Matrize	1-2 µg
Primer	10 pmol
Desoxynukleotide (dNTPs)	20 nmol
MML-V Reaktionspuffer	1 x
MML-V	200 u
Σ-Volumen	20 µl

2.9 Restriktionsspaltung mit DNase I

DNAse I ist eine unspezifisch wirkende Endonuklease, die sowohl doppelsträngige als auch einzelsträngige DNA bevorzugt in Tetranukleotide spaltet. Die Restriktion mit DNAse I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde in einigen Fällen vor der cDNA-Synthese durchgeführt, um zu verhindern, dass die DNA in späteren PCR-Reaktionen neben der entstandenen cDNA ebenfalls als Matrize vorliegt. Dazu wurde 1 u DNAse I mit 2 mM $MgCl_2$ zu den Ansätzen gegeben und die Proben 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNAse I fand anschließend ein Denaturierungsschritt für 10 min bei 70 °C statt.

2.10 PCR-Techniken

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ist eine effiziente Methode zur spezifischen Vermehrung von DNA-Sequenzen. Sie teilt sich in drei Abschnitte: der Denaturierung, (Aufschmelzen der dsDNA in Einzelstränge), Anlagerung (Anlagern spezifischer Oligonukleotide an die komplementären DNA-Sequenzen, die das zu vermehrende DNA-Fragment flankieren) und Synthese (Synthese eines neues DNA-Stranges durch die *Taq*-Polymerase, ausgehend vom 3'-Ende der angelagerten Oligonukleotide). Durch eine zyklische Wiederholung von Denaturierung, Anlagerung und Synthese kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes. Die verwendete Taq-Polymerase wurde freundlicherweise von Sonja Töpsch, RWTH Aachen, Institut für Biologie I, zur Verfügung gestellt.

Standardreaktion:

Matrize	1 pg-100 ng
Reaktionspuffer	1 x
Desoxynukleotide (dNTPs)	5 nmol
Oligonukleotid	5 pmol
Taq-Polymerase	1 u
Σ-Volumen	25 µl

Standardthermoprofil:

Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	94 °C	5’	1 x
Denaturierung	94 °C	20’’	35 x
Anlagerung	58 °C	20’’	
Synthese	72 °C	30’’	
Finale Elongation	72 °C	5’	1 x

2.10.1 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der PCR-Technik wurden, nach Klonierung von DNA-Fragmenten, die erhaltenen Kolonien auf das enthaltene DNA-Fragment hin überprüft. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher ein Teil der Kolonie von der Platte entnommen und in 10 µl Wasser überführt. Das Gemisch aus Bakterien und Wasser wurde für 5 min aufgekocht, um die Plasmid-DNA freizusetzen und dann zur Abtrennung der Bakterientrümmer bei 15000 g für 5 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden anschließend 5 µl als Matrize in die Standard-PCR-Reaktion eingesetzt.

2.10.2 SMART^{TM} cDNA-Synthese und Amplifikation

Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit der eine geringe Menge einer RNA-Population in Form von cDNA amplifiziert werden kann ohne eine Angleichung der Mengenverhältnisse der einzelnen RNAs zu bewirken. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab: Herstellung einer SMART^{TM}-cDNA und Amplifikation dieser cDNA durch PCR: Alle verwendeten Komponenten zur cDNA-Synthese und PCR-Reaktion sind im SMART^{TM} PCR cDNA Synthesis Kit (Erembodegem, Belgien) enthalten.

Zur cDNA-Synthese wird ein Oligo(dT)-Nukleotid verwendet, das an den PolyA-Schwanz der mRNA bindet und der Reversen Transkriptase als Primer dient (Abbildung 4). Dieses Oligonukleotid besitzt am 5’-Ende eine spezifische Sequenz, die in einer anschließenden PCR als Binderegion für einen Primer dient. Während der cDNA-Synthese werden an das 5’-Ende der entstandenen ss cDNA durch die terminale Transferaseaktivität der Reversen Transkriptase einige Desoxycytosine angehängt. An diese Nukleotide kann das SMART II A Oligonukleotid, welches zu der Reaktion gegeben wird, mit seinem komplementären Ende binden. Die Reverse Transkriptase wechselt die Matrize und synthetisiert nun auch das

Oligonukleotid, so dass eine ss cDNA entsteht, die an beiden Enden eine teilweise gleiche, invertierte Sequenz enthält. In einer anschließenden PCR-Amplifikation kann nun mit Hilfe eines Primers, der sowohl spezifisch für das 5'-Ende als auch für das 3'-Ende der cDNA ist, die gesamte cDNA amplifiziert werden. Die Methode wurde im Wesentlichen nach Herstellerangaben durchgeführt, allerdings fand die Amplifikation der cDNA mittels Real-Time-PCR statt. Dadurch konnte die jeweilige Reaktion am Ende der exponentiellen Phase gestoppt werden, um die gegebenen Mengenverhältnisse der RNA bzw. cDNA nicht zu verschieben.

Standard-SMART^{TM}-Reaktion

Matrize	1 µl SMART^{TM} cDNA
Reaktionspuffer	1 x
Desoxynukleotide (dNTPs)	20 nmol
SMART II A Oligonukleotid	20 pmol
Advantage 2 Polymerase Mix	1 x
Σ-Volumen	100 µl

Thermoprofil der SMART^{TM}-PCR, optimiert für die PE 9600

Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95 °C	1'	1 x
Denaturierung	95 °C	5''	20-31 x
Anlagerung	65 °C	5''	
Synthese	68 °C	6'	

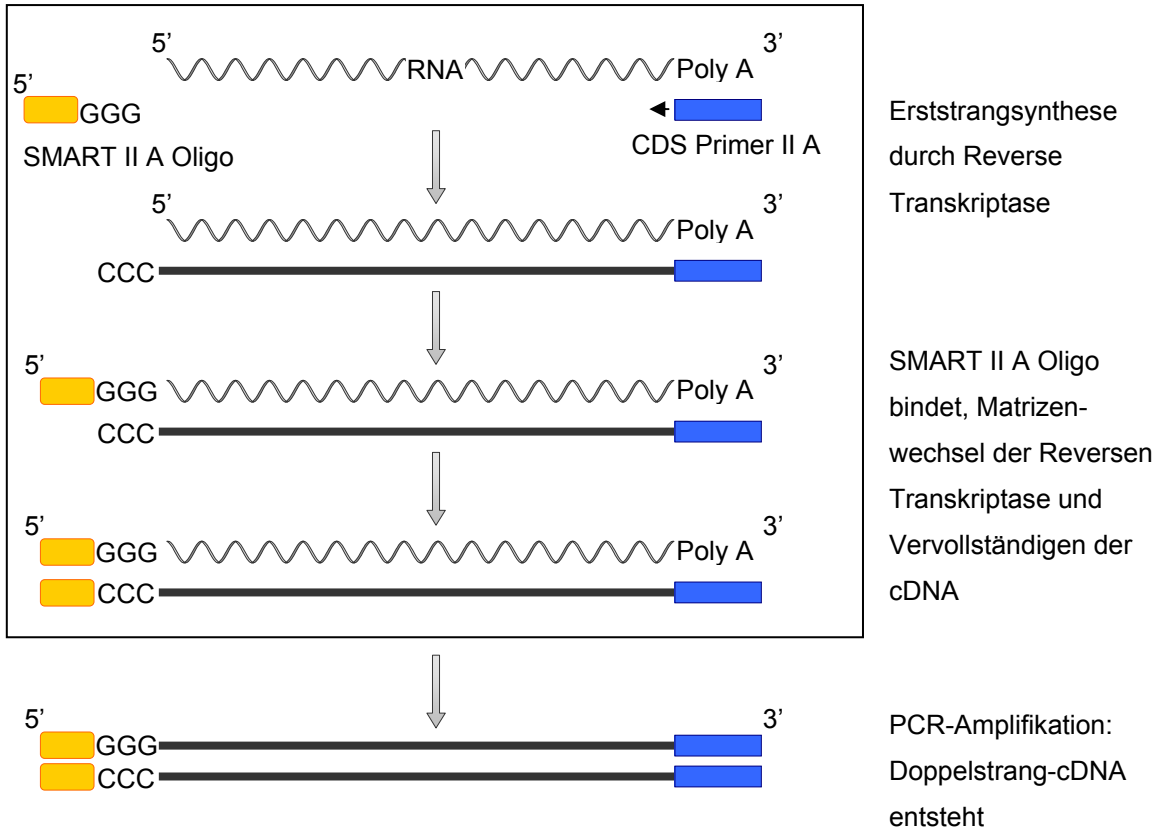


Abbildung 4: Übersicht SMART-Reaktion

Schematische Darstellung des Ablauf der SMART-Reaktion. Sowohl das SMART II A Oligo, der CDS-Primer II A als auch die PCR-Primer enthalten alle eine kurze homologe Sequenz.

2.10.3 Genome Walking

Diese PCR-Methode bietet die Möglichkeit aus einem bekannten Genbereich in unbekannte Sequenzregionen genauf- oder genabwärts zu amplifizieren. Dies ist sowohl mit genomischer DNA als auch mit cDNA möglich. In diesem Fall wurde genomische DNA als Grundlage der Reaktion verwendet. Nach einer partiellen Restriktion der genomischen DNA aus Mais wurden an die entstandenen Fragmente Adaptoren bekannter Sequenz ligiert, die in einer anschließenden PCR als Primerbindestelle dienen. In der PCR können nun ein adaptorspezifischer Primer und ein genspezifischer Primer verwendet werden, um Fragmente unbekannter Länge zu amplifizieren (Abbildung 5). Um die Spezifität dieser Reaktion zu erhöhen, wird die PCR in zwei aufeinander aufbauenden Schritten durchgeführt. Dabei dienen die Produkte der ersten PCR als Matrize der zweiten Amplifikationsrunde, bei der ein Primersystem verwendet wird, welches versetzt zueinander angeordnete Primer nutzt (nested PCR).

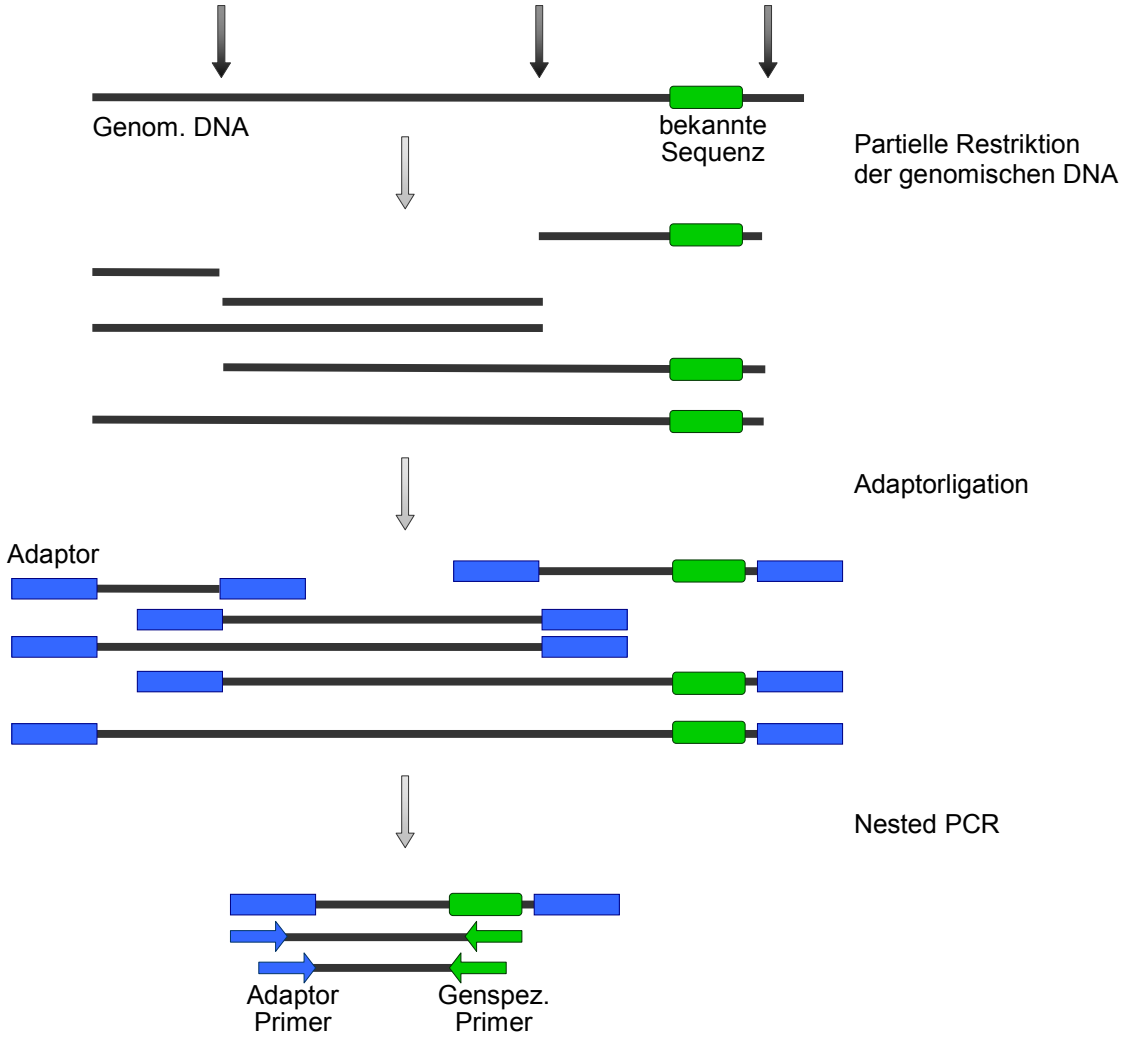


Abbildung 5: Übersicht Genome Walking

Schematische Darstellung der auf PCR basierenden Reaktion des Genome Walking. Die partielle Restriktion der genomischen DNA ist durch dunkelgraue Pfeile dargestellt.

Nach dem gleichen Prinzip wurden auch Genome Walking-Banken mit Phagen-DNA als Matrize verwendet. Während beim Genome Walking die Gesamtheit des Genoms als Grundlage dient, ist beim Genome Walking mit Phagen-DNA die Matrize spezifischer, da der bekannte Genbereich vorher durch Sichtung einer Phagenbank isoliert und amplifiziert wurde. Die Herstellung der Bank erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben.

Durch Sequenzieren der PCR-Produkte ist es somit möglich, Sequenzen über den bekannten Bereich hinaus zu verlängern. Die genomischen Banken wurden freundlicherweise von Holger Wilden, RWTH Aachen, Institut für Biologie I, zur Verfügung gestellt.

Name der Bank	Restriktionsenzym	Bedingungen	Konzentration
HW 174	Hae III	partielle Restriktion, 0,5 U	10 ng/µl
HW 175	Hinf I	partielle Restriktion, 0,5 U	10 ng/µl
HW 176	Mbo I	partielle Restriktion, 0,1 U	10 ng/µl
Phage 239	Hae III	partielle Restriktion, 0,5 U	9,5 ng/µl

Als Negativkontrolle wurde jede Bank auch ohne Adaptorligation hergestellt.

Thermoprofile

1.PCR

Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	94 °C	2''	7 x
Anlagerung & Synthese	72 °C	3'	
Denaturierung	94 °C	2''	32 x
Anlagerung & Synthese	67 °C	3'	
Finale Elongation	67 °C	4'	1 x

2.PCR

Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	94 °C	2''	5 x
Anlagerung & Synthese	72 °C	3'	
Denaturierung	94 °C	2''	25 x
Anlagerung & Synthese	67 °C	3'	
Finale Elongation	67 °C	4'	1 x

2.10.4 Real-Time-PCR

Bei der Real-Time-PCR handelt es sich um eine Variante der normalen PCR, die es ermöglicht, genaue Quantifizierungen der eingesetzten Matrizenmengen vorzunehmen. Der Ablauf ist einer herkömmlichen PCR ähnlich, doch wird bei dieser PCR-Reaktion zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) verwendet, der an doppelsträngige DNA bindet. In freier Form ist der Farbstoff nicht detektierbar, aber bei Bindung an doppelsträngige DNA und unter Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge fluoresziert dieser Farbstoff und das entstehende Signal kann gemessen werden. Diese Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an die doppelsträngige DNA ist quantitativ, so dass anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals auf die Menge an DNA-Produkt zurück geschlossen werden kann. Während der exponentiellen Amplifikationsphase der PCR besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Menge an gebildetem Produkt und Menge an eingesetzter Matrize. Da bei der Real-Time-PCR nach jedem Zyklus eine Messung der Fluoreszenz erfolgt, ist es möglich, die exponentielle Phase der Reaktion zu erfassen und die mit der entstandenen Produktemenge korrelierende Matrizenmenge zu errechnen. Verdünnungsserien, deren Konzentration in selbst definierten „units“ angegeben wurde, dienten als Eichreihen und lassen somit die Quantifizierung der Matrize zu. Bei jeder Reaktion wurde dieselbe Verdünnungsserie mitgeführt, um die verschiedenen PCR-Läufe miteinander vergleichen zu können.

Um Differenzen in den Matrizenmengen der unterschiedlichen RNA-Präparationen oder cDNA-Sythesen auszugleichen, wurden die quantifizierten Transkriptmengen auf die Menge der Transkripte der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bezogen. GAPDH wird in den Geweben von Mais konstitutiv exprimiert und konnte daher zur Standardisierung genutzt werden. So wurde es möglich, die Transkriptmengen der untersuchten Gene aus verschieden Präparationen zu vergleichen.

Nach Beendigung der PCR-Reaktion erfolgt die Erstellung von Schmelzkurven. Dazu wird das Reaktionsgemisch langsam auf 95 °C erhitzt und die Fluoreszenz über den gesamten Zeitraum detektiert. Zu einem bestimmten Zeitpunkt, der für jedes PCR-Produkt aufgrund seiner Länge und Nukleotidzusammensetzung spezifisch ist, denaturiert das PCR-Produkt. Dadurch wird es einzelsträngig und setzt den Fluoreszenzfarbstoff wieder frei, der daraufhin nicht mehr fluoresziert. Zur Darstellung der Schmelzkurve wird die negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur gebildet. So entsteht eine Kurve mit einem Maximum, das die spezifische Schmelztemperatur des PCR-Produktes repräsentiert. Um den Schmelzpunkt dem erwarteten PCR-Produkt zuordnen zu können ist eine einmalige Kontrolle des entstandenen Produktes mittels Gelelektrophorese notwendig. Die Erstellung der

Schmelzkurven nach einer Real-Time-PCR ist notwendig, um die ermittelten Signale auch wirklich auf das gewünschte Produkt zurückführen zu können, da der Fluoreszenzfarbstoff an jede doppelsträngige DNA bindet, also auch an Primer-Dimere und unspezifische Nebenprodukte.

Bei allen Primerkombinationen wurde darauf geachtet, dass sich PCR-Produkte aus cDNA und genomischer DNA in der Größe unterschieden, oder Produkte aus genomischer DNA aufgrund sehr großer Intronbereiche zwischen den Primern in der gegebenen Zeitspanne des Verlängerungschrittes der PCR nicht entstehen konnten. Damit sollte vermieden werden, dass Produkte aus der genomischen DNA, die sich eventuell noch in der RNA-Präparation befindet, berücksichtigt werden. Falls dies nicht möglich war, wurde vor der cDNA-Synthese eine DNaseI-Restriktion (2.9) mit den RNA-Präparationen durchgeführt. Zusätzlich wurde in der reversen Transkription ebenfalls eine Reaktion ohne MML-V angesetzt, um die Abwesenheit von Amplifikationsprodukten, die nicht auf cDNA beruhen, zu überprüfen.

Die PCR-Bedingungen wurden anhand von cDNA aus Mais-Laubblättern und genomischer DNA optimiert. Da bis auf eine Ausnahme die cDNA durch einen Oligo(dT)-Primer hergestellt wurde, war es möglich, alle Transkripte aus einem cDNA-Ansatz nachzuweisen. PPDK bildete die Ausnahme, da hier ein genspezifischer Primer in der reversen Transkription benutzt wurde. Die Komponenten der PCR-Reaktion wurden dem Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) entnommen und die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit 3 mM $MgCl_2$ und 1 % der cDNA-Synthese als Matrize.

2.10.5 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Als Sonde diente entweder ein aus genomischer DNA amplifiziertes DNA-Fragment oder die Gesamtheit aller zum Zeitpunkt der Isolierung vorhandenen RNAs eines Gewebes, in Form von amplifizierter cDNA.

Generell wurde zum Einbau von Digoxigenin-markierten Nukleotiden in die Sonde anstelle des herkömmlichen dNTP-Mixes ein Mix verwendet, der neben den normalen Nukleotiden auch Digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) im Verhältnis 1: 10 zu dTTP enthielt. Das Digoxigenin markierte Nukleotid wird so während der Strangsynthese in der PCR-Reaktion eingebaut.

Im Fall von genomischer DNA als Matrize erfolgte die Amplifikation mit den spezifischen Primern Sonde 1 und Sonde 2. Eine Überprüfung des Einbaus markierter Nukleotide fand durch Agarose-Gelelektrophorese statt. Aufgrund des Molekulargewichtes der

Digoxigeninmoleküle zeigen markierte DNA-Fragmente eine verringerte gel-elektrophoretische Mobilität.

Bei der Verwendung von SMART^{TM}-Erststrang-cDNA aus C_4-Gewebe, C_3-Gewebe und Bündelscheiden-Zellen erfolgte der Einbau der markierten Nukleotide ebenfalls durch eine PCR-Reaktion. Die Amplifikation wurde allerdings mit dem SMART-spezifischen Primer nach der SMART-Technik (2.10.2) durchgeführt, so dass eine markierte Sonde aus allen cDNA Erststrängen generiert werden konnte. Es handelt sich bei dieser Sonde also nicht um ein spezifisches Fragment, sondern um ein Gemisch aus markierten DNAs, die die gesamte mRNA des jeweiligen Gewebes repräsentieren.

2.11 Reverser Northern

2.11.1 Immobilisierung von PCR-Produkten auf Nylonmembran

Die PCR-Produkte wurden unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe eines Roboters Q-Pix (Genetix, New Milton, England) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) übertragen. Dazu wurde eine Art Stempel verwendet, der in die PCR-Produkte eintauchte und dann einen Abdruck auf der Membran hinterließ. Um eine ausreichende Signalstärke zu gewährleisten, wurde dieser Stempelabdruck 15 Mal auf der gleichen Stelle der Membran aufgetragen. Da jedes PCR-Produkt zweimal parallel nebeneinander aufgestempelt wurde, konnten bei Verwendung einer 384-Well Platte somit alle 384 PCR-Produkte als Replikate auf einer Membran untergebracht werden. Anschließend wurde die Membran 10 Minuten auf mit Denaturierungspuffer getränktes Whatman3M-Papier (Mainstone, England) gelegt und dann 10 Minuten auf Whatman3M-Papier, getränkt mit Neutralisierungspuffer, inkubiert. Nach dem Trocknen der Membran wurde die DNA auf der Membran durch UV-Licht (125 mJ, 254 nm) fixiert und in Frischhaltefolie verpackt bei 4 °C gelagert.

2.11.2 Hybridisierung und Nachweis

Zunächst wurde die Membran mit der DNA-Seite nach innen in einer Glasröhre ausgerollt und in 10 ml DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bei 37 °C in einem Hybridisierungsofen für 30 min prähybridisiert. Dann wurde die Prähybridisierungslösung gegen 10 ml DIG Easy Hyb mit hitzedenaturierter Sonde ausgetauscht und bei 37 °C über Nacht hybridisiert. Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, folgten mehrere

Waschschritte. Zuerst zweimaliges Waschen mit 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei Raumtemperatur sowie zweimaliges Waschen mit 0,5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei 68 °C. Dann erfolgte das Absättigen der Membran. Nach kurzer Inkubation in Maleinsäure wurde die Membran mit einer entsprechenden Menge Blockingreagenz in Folie eingeschweißt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe eines DIG-spezifischen Antikörpers (AntiDIG-Fab-Fragment, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 1:10000 (v/v), gekoppelt an eine alkalische Phosphatase (AP), wurde weitere 30 min inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschritte für jeweils 10 min in Maleinsäure + 0,3 % (v/v) Tween-20, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Zum Nachweis wurde die Membran in Nachweispuffer alkalisiert und mit Nachweispuffer + 0,01 Volumen AP Substrat CDP Star (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) benetzt. Die Membran wurde zwischen zwei Folien eingeschweißt und Luftblasen sowie überschüssige Nachweislösung entfernt. Das Auslesen der entstehenden Signale auf der Membran erfolgte mit einer LAS-1000 Kamera und der Intelligent Dark Box (Raytest, Berlin). Dabei erfolgte die Auswertung durch die Programme Software Image Reader LAS-1000 Pro Version 2.5 und AIDA Software Version 3.11.002 (Raytest, Berlin).

2.12 Subtraktion

Bei der subtraktiven Hybridisierung werden zwei mRNA-Populationen miteinander verglichen, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Dazu wird die mRNA aus zu vergleichenden Populationen in cDNA umgeschrieben und anschließend diese cDNAs miteinander hybridisiert. Die sich dabei ausbildenden Hybridstrukturen werden als Matrize in eine PCR eingesetzt und aufgrund ihrer Strukturen unterschiedlich stark amplifiziert. So können auch seltene Transkripte identifiziert und differentiell expirimierte cDNAs angereichert werden. Dazu wurde das Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Erembodegem, Belgien) nach Vorschrift verwendet.

Die Reaktion lässt sich in folgende Abschnitte gliedern: cDNA-Synthese (2.8), *Rsa* I-Restriktion, Adaptor-Ligation, zwei Hybridisierungsschritte und zweifache PCR-Amplifikation (Abbildung 6). Die Adaptorligation wird allerdings nur mit der mRNA-Population durchgeführt, die laut Erwartung zusätzlich exprimierte mRNAs enthält, im weiteren „Tester“ genannt. Die zu subtrahierende mRNA Population wird im Folgenden „Driver“ genannt.

Da die Ausgangsmengen limitierend waren (2.6.3), wurde die cDNA-Synthese mittels SMART durchgeführt (2.10.2). Die anschließende Restriktion der entstandenen cDNA-Fragmente mit *Rsa* I generierte kürzere, leichter zu hybridisierende cDNA-Stücke mit glatten Enden. Zur Adaptorligation wurde die Tester-cDNA aufgeteilt und mit zwei verschiedenen Adaptoren ligiert. Dann erfolgte der erste Hybridisierungsschritt. Dazu wurde ein Überschuss an "Driver"-cDNA zu beiden Testerproben gegeben, die Ansätze denaturiert und langsam wieder abgekühlt. Bei der Renaturierung bilden sich nun verschiedene Moleküle aus (Abbildung 6). Häufig vertretene Transkripte hybridisieren aufgrund der Kinetik der Hybridisierungsreaktion wesentlicher schneller als die seltener auftretenden Transkripte, die weiterhin einzelsträngig vorliegen. Transkripte, die in beiden Populationen vertreten sind bilden Strukturen des Typs C aus und „Driver"-spezifische Transkripte formen Moleküle der Sorte D.

Im zweiten Hybridisierungsschritt werden nun beide Ansätze ohne erneutes Denaturieren zusammengegeben und frisch denaturierter „Driver" hinzugefügt. Da nur die weniger repräsentierten Transkripte des Testers noch einzelsträngig vorliegen, können diese aus beiden Ansätzen der Reaktion miteinander hybridisieren und ein Molekül mit verschiedenen Adaptoren an den Enden bilden (Abbildung 6). Der erneut zugegebene denaturierte „Driver" verstärkt die Anreicherung der differentiell exprimierten Transkripte noch, da er die Bildung der schon in der ersten Hybridisierung gebildeten Moleküle fördert. Die Mischung aus den entstandenen Hybridisierungsprodukten wird anschließend als Matrize in eine PCR eingesetzt. Da nur die Moleküle mit beiden Adaptoren in der PCR durch das Primersystem exponentiell amplifiziert werden, findet eine deutliche Anreicherung der differentiell exprimierten Transkripte statt. Moleküle des „Drivers" (D) weisen keine Adaptoren auf und bieten somit keine Primerbindestelle, sie werden nicht amplifiziert. Auch die anderen Produkte der Hybridisierung zeigen aufgrund fehlender Adaptoren oder Sekundärstrukturen keine oder nur lineare Amplifikation.

Um die Anreicherung der differentiellen Transkripte noch zu steigern, wurde mit den Produkten der ersten PCR eine weitere PCR-Reaktion durchgeführt, die mit der Verwendung von nested Primern die Spezifität erhöhen sollte. Die erhaltenen Produkte wurden anschließend in Vektoren kloniert (2.14).

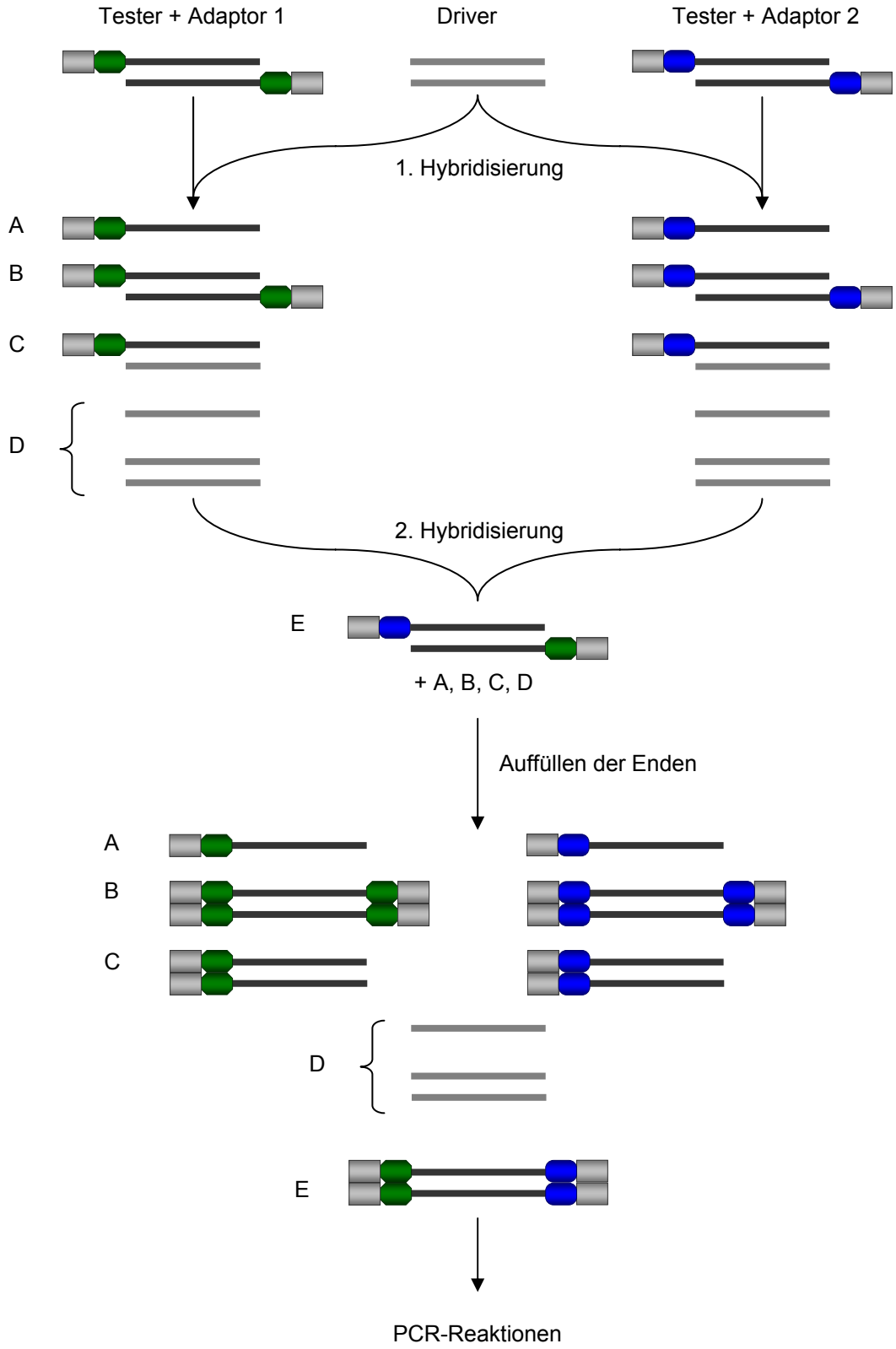


Abbildung 6: Übersicht Subtraktion

Dargestellt ist die schematische Übersicht der subtraktiven Hybridisierung. Die dabei entstehenden unterschiedlichen Moleküle sind durch die Buchstaben A-E gekennzeichnet.

2.13 Screenen einer Phagenbank

Zum Screenen der Phagenbank wurden auf 30 LB-Agarose-Platten (ca. 150 cm^2) jeweils ca. 10000 Phagen (2.3) ausplattiert. Das entspricht bei einem Titer von 3 x 10^9 etwa der Größe eines Maisgenoms. Jeweils 600 µl einer Über-Nacht-Kultur der Bakterien NM538 in LB + 0,2 % (w/v) Maltose wurden mit 100 µl Phagenverdünnung (4 µl Originalbank + 1330 µl Phagenverdünnungspuffer) gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aus Phagen und Bakterien zu 7 ml flüssiger, 40 °C warmer Soft-Top-Agarose hinzugefügt und durch Invertieren gemischt. Sofort danach wurde die Soft-Top-Agarose auf große, vorgewärmte LB-Agarose-Platten gegeben und durch Schwenken verteilt. Die Platten wurden so lange bei 37 °C inkubiert, bis eine deutliche Plaquebildung sichtbar war (in der Regel nach 8 h). Dabei wurde darauf geachtet, dass keine konfluente Lyse eintrat. Anschließend wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Immobilisierung der Phagen-DNA auf Nylonmembran wurde diese 2 min auf die Platte mit Phagenplaques aufgelegt und die genaue Lage durch drei Einstiche mit einer Kanüle markiert. Anschließend wurde die Membran mit der DNA-Seite nach oben je 5 min nacheinander auf Whatman-Papier, getränkt mit Denaturierungspuffer und Neutralisierungspuffer, aufgelegt und dann 10 min in 2 x SSC gewaschen. Nach dem Trocknen der Membran fand die Fixierung der DNA mittels UV-Licht statt (2.11.1). Die Lagerung der Membranen erfolgte trocken bei 4 °C in Frischhaltefolie.

Hybridisierung und Nachweis erfolgte wie in Kapitel 2.11.2 beschrieben. Die Sonde stellte ein mit den Primern Sonde 1 und Sonde 2 in einer PCR DIG-markiertes PCR-Fragment dar.

Nach erfolgter Detektion wurde die Lage der nachgewiesenen Signale (positive Plaques) und die Position der Einstichlöcher auf eine Folie übertragen, so dass eine Schablone entstand, welche die Identifizierung der richtigen Plaques auf der Agaroseplatte möglich machte. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze wurden so als positiv erkannte Plaques ausgestochen und in 400 µl Phagenverdünnungspuffer + 4 % (v/v) Chloroform gegeben. Die Elution der Phagen erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zum Abtrennen der Agarose und Bakterien von den Phagen wurde bei 15000 x g für 2 min zentrifugiert und der Überstand als Phagenlysat abgenommen.

Da es aufgrund der Dichte der Phagenplaques auf den Platten nicht möglich war, einen einzelnen Plaque auszustechen, wurden mit den Phagen aus den ausgestochenen Plaques eine weitere Screening-Runde durchgeführt, um die gesuchten Plaques zu vereinzeln. Das Ausplattieren wurde wie anfangs beschrieben durchgeführt, doch wurden hier 5 µl Phagenlysat aus der ersten Runde zur Infizierung der Bakterien eingesetzt. Von den so hergestellten Platten konnten nun einzelne positive Plaques ausgestochen werden.

Die Überprüfung der positiv detektierten Plaques auf die gesuchte DNA-Sequenz fand mittels PCR statt. Dazu wurde die gleiche Primerkombination wie zur Sondenherstellung verwendet (2.10.5). Als Matrize dienten die eluierten Phagen aus den vereinzelten, ausgestochenen Plaques, die ohne weitere Behandlung in die PCR-Reaktion eingesetzt werden konnten, da der Denaturierungsschritt in der PCR ausreicht, um die DNA aus den Phagen freizusetzen.
Aus den so als positiv identifizierten Phagen wurde nach Vermehrung anschließend im großen Maßstab die Phagen-DNA extrahiert (2.7.3).

2.14 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zum Klonieren von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde das TOPO TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen verwendet. Dieses bietet den Vorteil, dass durch PCR erhaltene DNA-Fragmente nach kurzer Aufreinigung und ohne weitere Restriktion schnell und unkompliziert kloniert werden können.
Das Prinzip der Topo-Klonierung beruht dabei auf den 3'Desoxyadenosin-Überhängen von PCR-Produkten, die aufgrund der terminalen Transferase-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase während der PCR entstehen. Dieses angehängte einzelne Desoxyadenosin ist nun komplementär zu dem am linearisierten Vektor befindlichen Desoxythymidin und erlaubt die Ligation des PCR-Produktes mit dem linearisierten Vektor. Diese Reaktion wird durch die an den Vektor gebundene Topoisomerase katalysiert. Anschließend wird das entstandene Plasmid durch eine Hitzeschocktransformation in die TOP10-Zellen eingebracht. Eine Selektion auf transformierte Bakterien findet mittels Ampicillin in den LB-Platten zur Anzucht der Bakterien statt.

2.15 Analyse von Sequenzen anhand von Datenbanken und Programmen

Zur Analyse von Sequenzdaten auf Nukleotid- und Proteinebene wurden die Programme und Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), Expert Protein Analysis System (ExPASy) des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB, http://us.expasy.org), sowie des Institute for Genomic Research (TIGR, http://tigrblast.tigr.org/tgi/) verwendet. Um Homologien zwischen multiplen Sequenzen zu erkennen wurden die Programme T-Coffee (http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html) und BCM Sequence Launcher (http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/) eingesetzt.

3 Ergebnisse

Das Hüllblatt der weiblichen Infloreszenz von Mais fixiert in zu den Leitbündeln benachbarten Mesophyllzellen CO_2 nach dem C_4-Mechanismus, während weiter von Leitbündeln entfernte Mesophyllzellen eine C_3-typische Fixierung durchführen. In dieser Arbeit wird diese ungewöhnliche Eigenschaft genutzt, um das Hüllblatt als System zur Analyse der Regulation photosynthetischer Genexpression zu etablieren. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 7 zusammengefasst.

Ausgehend von der Isolierung der in der Abbildung 7 aufgelisteten Gewebe soll die aus diesen präparierte cDNA einerseits zur näheren Charakterisierung des photosynthetischen Subtyps und andererseits zum Aufbau eines subtraktiven Hybridisierungssystems zur Bestimmung neuer differentiell exprimierter Gene genutzt werden. Hierdurch sollen neue Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen bei der Etablierung und Aufrechterhaltung eines bestimmten Photosynthesetypus gewonnen werden.

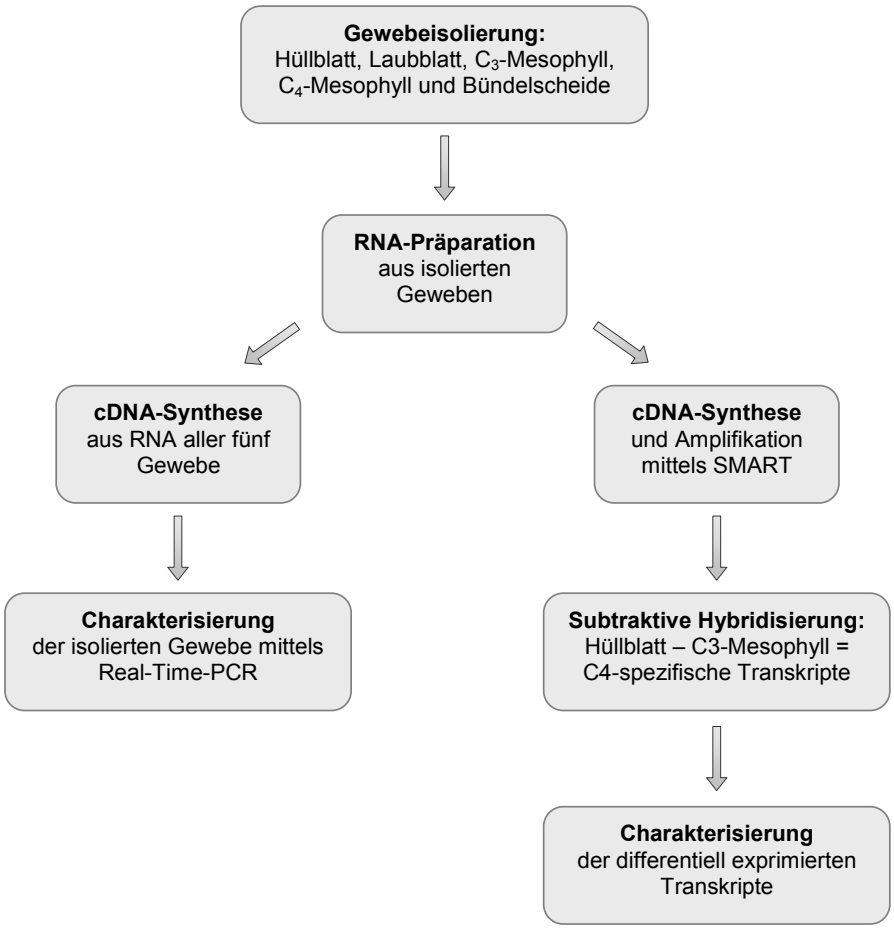


Abbildung 7: Schema Vorgehensweise

Dargestellt ist eine schematische Übersicht über den Ablauf und Zusammenhang der einzelnen Versuchsteile.

3.1 Optimierung der Gewebepräparationen

Als Grundlage der Präparation der C_4-Mesophyll- und Bündelscheiden-Gewebe dienten Protokolle von Bogorad und Sheen, die in einigen Punkten modifiziert wurden.

Bei der Präparation der Bündelscheiden wurde ein zusätzlicher Schritt eingeführt, der die anschließende Homogenisierung erleichtern sollte. Dazu wurden die Blattstücke für kurze Zeit mit Ether behandelt, um die kutikulären Wachse zu entfernen, die der Epidermis und damit dem Blatt zusätzliche Stabilität verleihen. Aufgrund ihrer dicken festen Zellwand und dem darin eingelagerten Suberin kann man die Bündelscheidenzellen starken Scherkräften aussetzen. Die Mesophyllzellen dagegen zerreißen schon bei geringer mechanischer Beanspruchung. Daher wurde auch die Dauer und Stärke der Homogenisierung variiert, um die optimalen Bedingungen zu finden, bei denen die Mesophyllzellen schon aufgebrochen sind, aber die Zellen der Bündelscheiden noch intakt vorliegen. Die Überprüfung auf Reinheit der isolierten Bündelscheidenzellen erfolgte zunächst optisch unter dem Binokular und nach anschließender RNA-Präparation durch Messung von Transkripten einiger Markerenzyme der C_4-Photosynthese mittels Real-Time-PCR. Abbildung 8 zeigt präparierte intakte Bündelscheidenzellen nach der Durchführung von zwei Homogenisierungsschritten. Die Bündelscheidenzellen sind noch um die Leitbündel herum angeordnet, weisen jedoch kein Mesophyllgewebe zwischen den Bündelscheiden mehr auf.

Neben den Zellen der Bündelscheiden und des Mesophylls sind auch deutlich Zellen der Epidermis zu erkennen, die mittels dieser Präparationstechnik nicht von den Bündelscheidenzellen getrennt werden können. Es findet daher neben einer Anreicherung der Bündelscheidenzellen parallel auch eine Anreicherung der Epidermiszellen statt. Bündelscheiden-Präparationen nach nur einem Homogenisierungsschritt ließen dagegen noch deutlich Mesophyllgewebe zwischen den Leitbündeln erkennen (Daten nicht gezeigt) und wurden daher noch weiter behandelt (2.6.2), bis sie die gleichen Charakteristika wie Abbildung 8 aufwiesen. Die so präparierten Bündelscheidenzellen sind dadurch zwar nach Schätzung zu 95 % frei von Mesophyllzellen, zeigen aber eine deutliche Kontamination an Epidermiszellen.

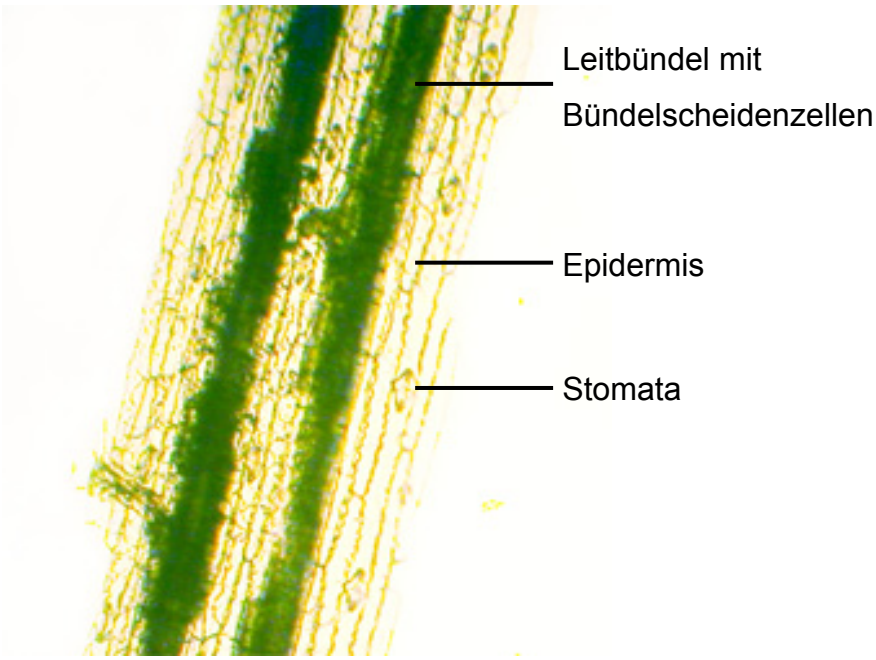


Abbildung 8: Präparation von Bündelscheiden

Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Fotographien der Bündelscheidenpräparation nach mehreren Homogenisierungsschritten. Vergrößerung 400-fach.

Um C_4-Mesophyll zu erhalten, wurde das umgekehrte Prinzip der Bündelscheidenisolierung genutzt. Die Zellwände des Mesophylls sind wesentlich instabiler als die der Bündelscheidenzellen und daher leichter zugänglich für einen mechanischen oder enzymatischen Aufschluss. Bei der Protoplastierung von Laubblattzellen werden so die Protoplasten aus dem Mesophyllgewebe zuerst freigesetzt, während die stabile Zellwand der Bündelscheidenzellen das Protoplastieren bei einer zeitlich limitierten Reaktion verhindert. Im Gegensatz zum ursprünglichen Protokoll wurden die Protoplasten der Mesophyllzellen nicht durch Herausdrücken mittels eines Spatels freigesetzt, sondern durch Herausspülen mit SMC-Puffer. Durch die geringere mechanische Belastung blieben mehr Protoplasten intakt und die Verunreinigung durch Zelltrümmer und freie Chloroplasten ging zurück. In Abbildung 9 ist eine typische C_4-Mesophyll-Protoplastenpräparation zu sehen. Die Protoplasten der Mesophyllzellen zeigen darin deutlich eine kugelrunde Form und eine periphere Anordnung der Chloroplasten, die darauf schließen lässt, dass es sich um intakte Mesophyll-Protoplasten handelt. Außerdem sind beschädigte Protoplasten und freie Chloroplasten zu erkennen, doch ist der Grad an Verunreinigungen durch Zelltrümmer gering. Man kann der Abbildung 9 ebenfalls entnehmen, dass keine Kontamination durch Protoplasten der Epidermiszellen vorliegt, da diese wesentlich größer sind und statt Chloroplasten Etioplasten aufweisen würden. Auch eine Unterscheidung zwischen Mesophyll- und Bündelscheidenprotoplasten wäre aufgrund der

Größe möglich, da die Protoplasten der Bündelscheidenzellen deutlich größer als die der Mesophyllzellen sind. Eine solche Protoplasten-Präparation wurde als reines C_4-Mesophyllgewebe zur RNA-Isolierung weiterverwendet.

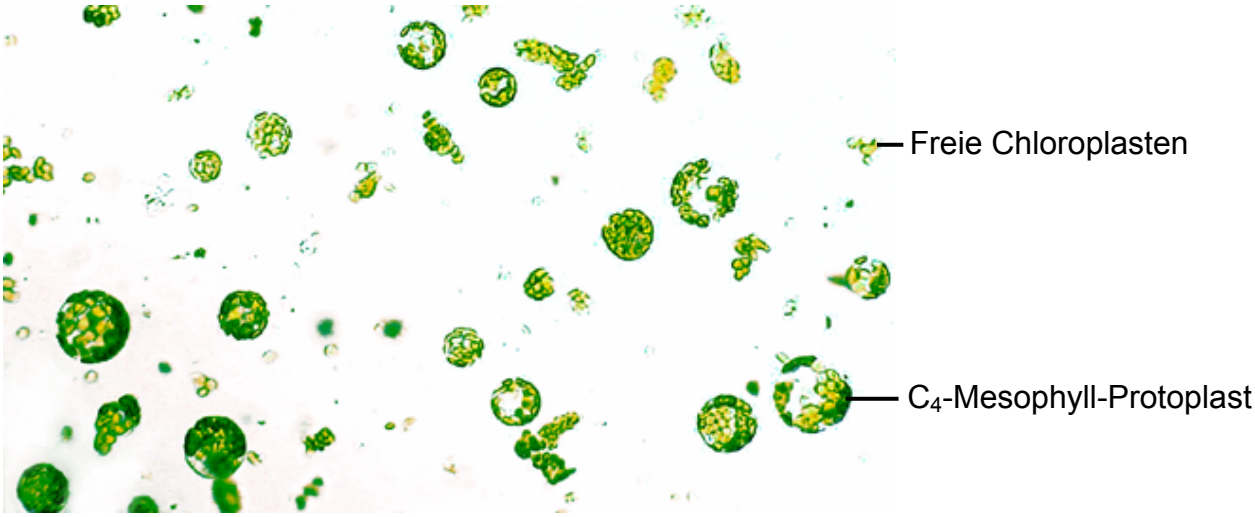


Abbildung 9: Isolierung C_4-Mesophyll

Dargestellt sind lichtmikroskopische Fotographien der Präparationen von C_4-Mesophyll-Protoplasten nach enzymatischem Abbau der Zellwände. Vergrößerung 400-fach

Bei der Isolierung des als C_3-Mesophyll definierten Gewebes lag die Problematik in der Trennung des C_3-Mesophylls von dem morphologisch gleich erscheinenden C_4-Mesophyll. Daher musste besonders darauf geachtet werden, dass ein Mindestabstand von drei Zellen zu den Leitbündeln eingehalten wurde. Eine optische Kontrolle während der Separation der Zellen war daher von großer Bedeutung. Versuche, die Zellen des C_3-Mesophylls durch einen Laserstrahl abzutrennen, scheiterten an der großen Hitzeentwicklung während der Präparation, die zu starker Schädigung des isolierten Gewebes führte. Ein manuelles Herausschneiden des C_3-Gewebes unter dem Binokular mit Hilfe von Rasierklingen ermöglichte dagegen die Trennung der Gewebe bei gleichzeitiger Kontrolle des Vorgangs. Die entstandenen ca. 0,5 mm breiten Streifen konnten zudem schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren werden, um mögliche Veränderungen im Expressionsprofil und Degradation der RNA zu verhindern. Dabei wurden nur Stücke von Hüllblättern verwendet, die eine ausreichende Belichtung (2.1) erhalten hatten und möglichst wenige quer verlaufende Leitbündel (Querleitbündel) zwischen den lateralen Leitbündeln aufwiesen. Diese Anforderungen schränkten die Menge an Ausgangsmaterial stark ein, da nur kleine Bereiche der Hüllblätter genutzt werden konnten. Aufgrund der sehr zeitintensiven Präparation des

Materials stand für die RNA-Präparation nur eine limitierte Menge an C_3-Mesophyll zur Verfügung.

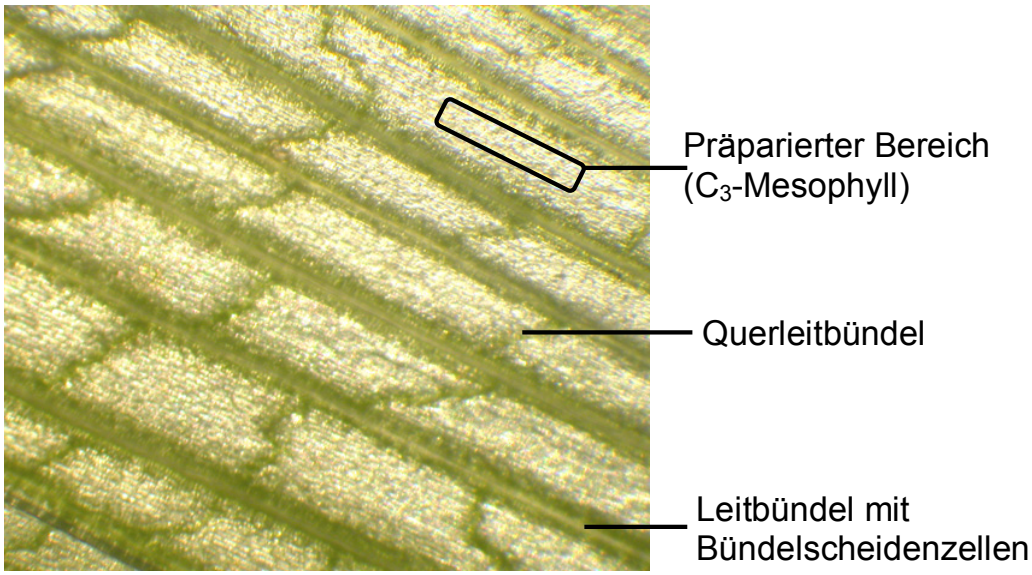


Abbildung 10: Hüllblatt

Dargestellt ist die 400-fach vergrößerte lichtmikroskopische Fotographie eines Hüllblattes.
Der markierte Bereich repräsentiert die Zellen, die als C_3-Mesophyll herauspräpariert wurden.

In der Abbildung 10 erkennt man einen schmalen Streifen Hüllblatt, der ausreichend weite Abstände zwischen den Leitbündeln aufweist und zudem noch wenig Querleitbündel enthält. Das eingezeichnete Feld repräsentiert den Bereich, der als C_3-Mesophyll verwendet wurde. Deutlich erkennbar ist der Mindestabstand zum Bündelscheidengewebe, der eine Kontamination mit C_4-Mesophyll verhindert. Das so isolierte C_3-Mesophyll war somit weitestgehend kontaminationsfrei und wies aufgrund der sorgfältigen Auswahl der zur Präparation genutzten Blattbereiche einen geschätzten Reinheitsgrad von ca. 98 % auf. Da die optische Abschätzung der Reinheit der Gewebe nur grob war, fand eine zusätzliche Überprüfung mittels Real-Time-PCR statt.

3.2 Etablierung eines Real-Time-PCR-Systems

Zur Charakterisierung der präparierten Gewebe wurde ein Real-Time-PCR-System etabliert, welches die Möglichkeit der Quantifizierung von Transkripten C_4-Photosynthese-relevanter Gene bot. So konnten neue Erkenntnisse über die Verhältnisse der als Marker genutzten Transkripte zueinander gewonnen werden. Darüber hinaus bot das System die Möglichkeit der Quantifizierung von Transkripten weiterer Gene, die im Zusammenhang mit C_4-

Photosynthese stehen. So konnten Verteilungsmuster für die Transkripte der beiden Rubisco-Isogene erstellt werden, sowie die Akkumulation der Transkripte von PPDK und der Regulationsfaktoren DOF1 und DOF2 quantifiziert werden.

Die dazu notwendigen Primer für das Real-Time-System wurden aufgrund der erhältlichen Sequenzinformationen aus den Datenbanken entwickelt (alle angegebenen „Accession numbers“ (gi-Nummern) beziehen sich auf die Datenbanken des NCBI (2.15)).

Da sich die Gene der C_4-Enzyme aus Isoformen entwickelt haben, die sowohl bei den C_3-Pflanzen, als auch bei den C_4-Pflanzen wichtige Funktionen im Grundstoffwechsel erfüllen (Ku et al., 1996), wurde besonders darauf geachtet, dass in allen Fällen die spezifische C_4-Isoform in der Real-Time-PCR detektiert wurde. Dazu wurden die Primer auf der Basis von Sequenzbereichen entwickelt, die keine Homologien zwischen den Sequenzen der Isoformen aufwiesen. Durch eine herkömmliche PCR-Reaktion wurden die Primerkombinationen anschließend anhand der erwarteten Produktgröße auf ihre Spezifität überprüft (Daten nicht gezeigt).

So lag den Primern für PEPC die genomische Sequenz gi22396 zu Grunde, die die C_4-spezifische Isoform des PEPC-Gens darstellt. Es wurde besonderen Wert darauf gelegt, dass neben der C_3-spezifischen Form auch die Wurzel-spezifische Form der PEPC (Dong et al., 2001) durch diese Primerkombination nicht amplifiziert wurde.

Im Fall vom ME wurde eine von Rothermel und Nelson als C_4-spezifische Isoform des ME veröffentlichte Sequenz verwendet (Rothermel and Nelson, 1989). Diese Sequenz gi168527 zeigt hohe Homologie zu zwei weiteren Isoformen (gi4096785 und gi1846094), so dass nur ein Primer spezifisch für C_4-aktive Form gewählt werden konnte. Der zweite Primer passt daher auch auf eine weitere Form des ME. Doch reichte die durch nur einen Primer vermittelte Spezifität unter den gewählten PCR-Bedingungen aus. Die Rubisco-Primer wurden anhand der Sequenz gi22464 für die kleine Untereinheit der Rubisco erstellt. Sequenzanalysen zeigten allerdings, dass die Primer auch auf eine weitere Sequenz der kleinen Untereinheit der Rubisco gi1673455 passten. Daher wurden zusätzliche Primer ausgewählt, die jeweils spezifisch für eine der beiden Sequenzen waren.

Bei PPDK wurde die Sequenz gi68579 gewählt, die J. Sheen in ihrer Veröffentlichung als C_4-spezifische Isoform beschrieben hatte (Sheen, 1991). Hier beruht die Spezifität der PCR-Reaktion, wie bei ME schon beschrieben, nur auf einem Primer, da die 3’-Enden der bekannten Sequenzen zu homolog waren. Doch konnten keine C_3-Isoformen mit dieser Primerkombination detektiert werden.

Zur Amplifikation der DOF-Transkripte wurden Primer für DOF1 mit Hilfe der Sequenz gi517257 und für DOF2 auf Basis der Sequenz gi1061305 entwickelt. Beide Sequenzen weisen einen hohen GC-Gehalt auf. Daher wurden der PCR-Reaktion DMSO und Betain zugesetzt, um die Schmelztemperaturen der Produkte und Primer zu senken. Zur Erhöhung der Spezifität der Reaktion wurde die DOF1-PCR zusätzlich in zwei Schritten durchgeführt, wobei das Produkt des ersten Schrittes als Matrize in die zweite PCR-Reaktion eingesetzt wurde (semi-nested PCR) Dabei wurde in der zweiten Amplifikationsrunde der Primer DOF1A durch einen weiteren, leicht versetzt bindenden Primer DOF1B ersetzt.

Im Fall von GAPDH wurde die Sequenz der Untereinheit C der cytosolischen Isoform zur Primerentwicklung genutzt. Obwohl es eine Reihe weiterer GAPDH-Sequenzen in den Datenbanken gibt, passten die Primer auf keine andere bekannte für GAPDH Isoenzyme codierende Sequenz aus Mais (gi293886, gi293888, gi22294, gi312178, gi312180).

Die Primer des Real-Time-PCR-Systems wurden also so ausgewählt, dass unter den gegeben Bedingungen nur ein Produkt amplifiziert wurde. Die Primerkombinationen für Rubisco, PEPC, GAPDH und ME wurden zudem so entwickelt, dass bei Verwendung von DNA oder RNA als Matrize in der PCR unterschiedlich große Fragmente entstanden. RNA als Matrize resultierte in kleineren PCR-Produkten aufgrund der fehlenden Introns. So konnte überprüft werden, dass Produkte in der PCR in Abhängigkeit von RNA bzw. cDNA als Matrize entstehen und nicht aufgrund von DNA-Verunreinigungen.

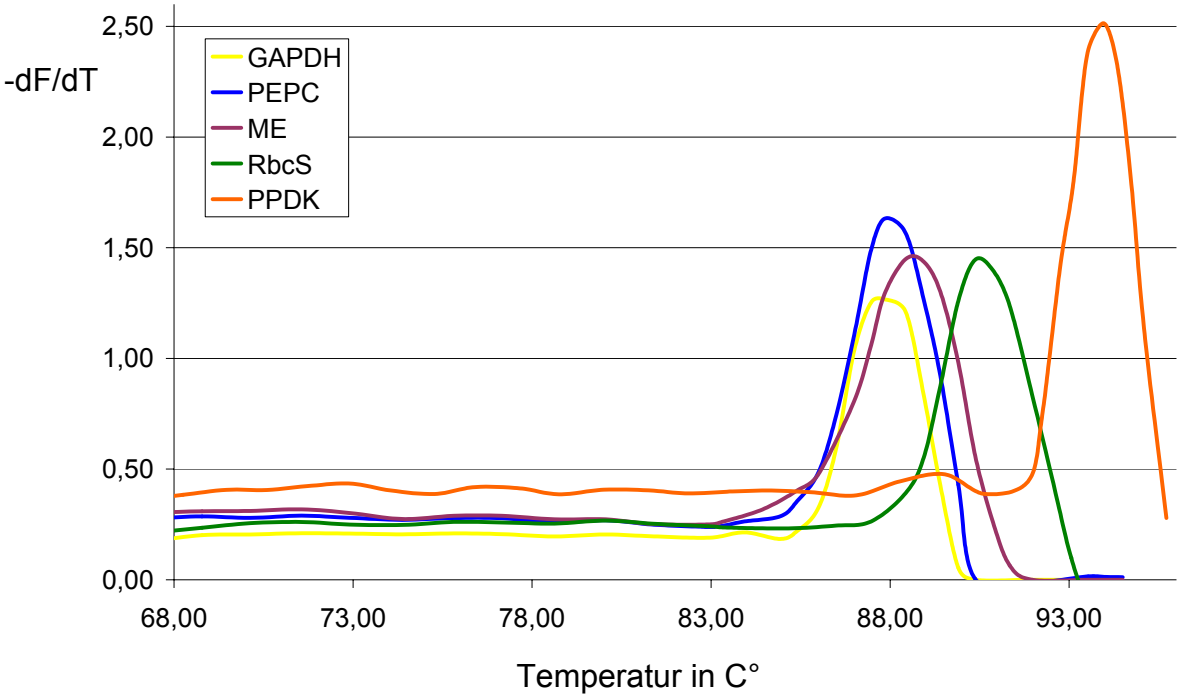


Abbildung 11: Schmelzkurven amplifizierter PCR-Produkte

Exemplarisch sind hier die Schmelzkurven der mittels Real-Time-PCR amplifizierten PCR-Produkte dargestellt. Als Matrize wurde aus Laubblatt-RNA synthetisierte cDNA eingesetzt (2.8). Es wurden folgende Primer verwendet: GAPDH1/2, PEPC1/2, ME1/2, RUBISCO1/2, PPDK1/2 (6.1) Die Produkte wurden langsam auf 95 °C erhitzt und die SYBR Green vermittelte Fluoreszenz aufgenommen. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz der PCR-Produkte nach der Temperatur.

Abbildung 11 zeigt beispielhaft die typischen Schmelzkurven der durch die beschriebenen Primerkombinationen erhaltenen PCR-Produkte. Wie man der Abbildung 11 entnehmen kann, weisen alle Schmelzkurven nur ein einziges definiertes Maximum im für PCR-Produkte dieser Länge erwarteten Temperaturbereich auf. Es sind keine weiteren Maxima zu erkennen, die andere PCR-Produkte repräsentieren könnten oder in niedrigeren Temperaturbereichen auf Primerdimere schließen lassen würden. Die Daten der Schmelzkurven wurden durch Gelelektrophorese der entstandenen PCR-Produkte bestätigt. Auch hier waren nur einzelne Produkte der erwarteten Größe und keine Primerdimere zu sehen. Alle Primersysteme wurden auf ein Thermoprofil optimiert, so dass es möglich war, die Amplifikation aller Produkte innerhalb einer einzigen PCR-Reaktion durchzuführen.

Das etablierte Real-Time-PCR-System ist also zur genauen Quantifizierung dieser Transkripte aus RNA-Präparationen verschiedener Maisgewebe geeignet.

3.3 Charakterisierung der isolierten Gewebe

Mit Hilfe des etablierten Real-Time-PCR-Systems konnten die aus Mais präparierten Gewebe auf ihren Kontaminationsgrad hin untersucht und neben der optischen Kontrolle weiter charakterisiert werden. Um die relative Akkumulation der einzelnen Transkripte zu bestimmen, wurde ihre Häufigkeit auf die Expression von GAPDH standardisiert. GAPDH ist ein Enzym des Grundstoffwechsels der Pflanze und daher wurde davon ausgegangen, dass die Transkriptmenge in allen Zelltypen vergleichbar ist. Somit konnten ungleich eingesetzte cDNA-Mengen ausgeglichen werden. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurden in die PCR-Reaktion Verdünnungsserien einer Standard-cDNA als Eichreihen eingesetzt und die Häufigkeit der einzelnen Transkripte relativ zum Standard angegeben. Abbildung 12 zeigt die Häufigkeit der Transkripte der zur Charakterisierung der präparierten Gewebe verwendeten Markerenzyme PEPC, ME und RbcS in relativen GAPDH-Einheiten in den verschiedenen Geweben.

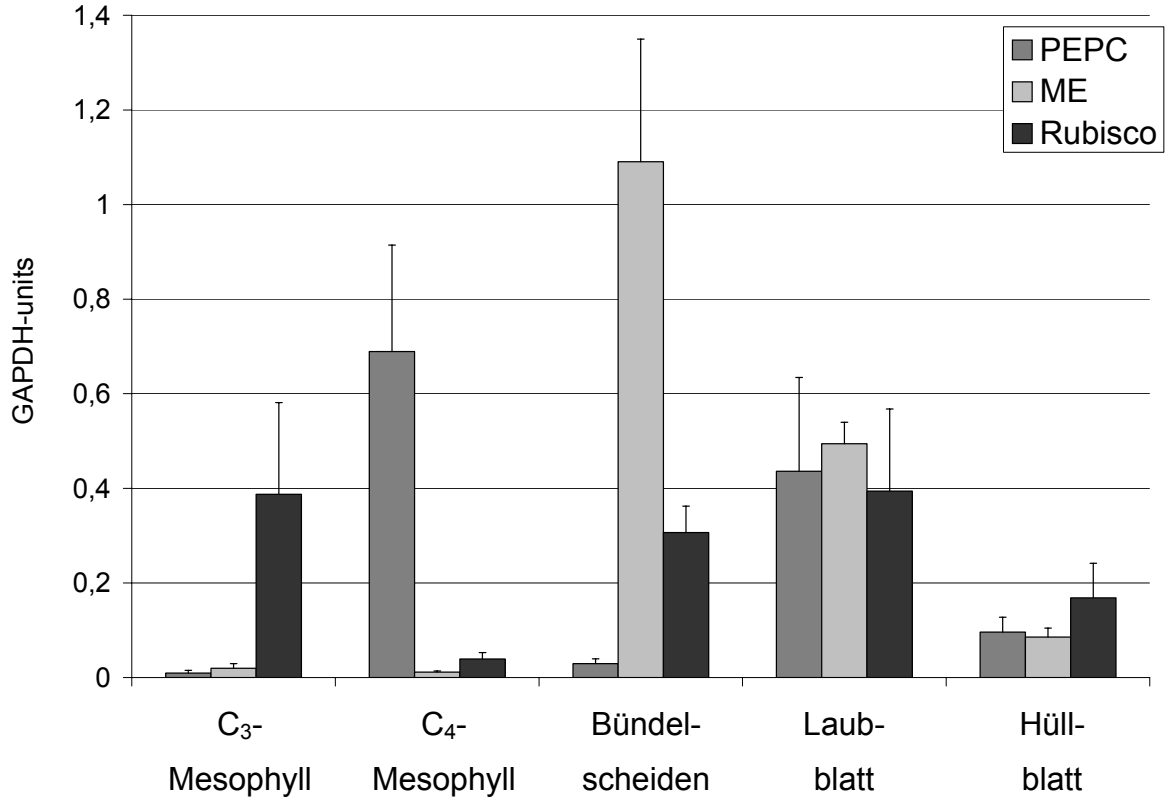


Abbildung 12: Quantifizierung der Akkumulation verschiedener mRNAs in unterschiedlichen Maisgeweben

Dargestellt ist die mRNA-Akkumulation der Transkripte von RbcS, PEPC und ME in fünf Blattgeweben von *Zea mays*. Die Menge an transkribierter mRNA wurde durch Real-Time-PCR aufgenommen und durch den Vergleich mit einer Verdünnungsreihe in Einheiten umgerechnet. Jeder Wert repräsentiert die relative Akkumulation der jeweiligen mRNA im Verhältnis zur Akkumulation von GAPDH-Transkripten. Die Daten beruhen auf dreifach wiederholten Messungen dreier unabhängiger RNA-Präparationen. Die Standardabweichung wird durch die vertikalen Balken angegeben.

Wie man der Abbildung 12 entnehmen kann, akkumulieren die drei hier zunächst untersuchten Transkripte in Laubblättern zu ähnlichen Mengen. Alle drei Transkripte der Markerenzyme zeigen eine Akkumulation von ca. 0,5 units; das entspricht etwa der Hälfte der Menge an Transkripten der GAPDH. Beim Hüllblatt zeigt sich ein ähnliches Bild, doch ist die Anhäufung der Transkripte bei weitem nicht so stark. Hier liegt die Akkumulation der Transkripte nur bei 1/3 der Werte des Laubblattes, wahrscheinlich aufgrund der allgemein schwächeren photosynthetischen Aktivität (Langdale and Nelson, 1991). Allerdings fällt auf, dass sich die RbcS-Transkripte leicht von den anderen abheben und eine etwas stärkere relative Akkumulation in Hüllblättern als in Laubblättern aufweisen. Bei Betrachtung der isolierten Teilgewebe sieht man deutlich, dass auch im C_3-Mesophyll eine signifikante Anhäufung von RbcS-Transkripten stattgefunden hat. Im Vergleich zum Hüllblatt ist im C_3-Mesophyll eine Verdopplung der RbcS-Transkripte zu beobachten. Da das C_3-Mesophyll aus Hüllblättern isoliert wurde, ist daher eine vergleichsweise Anreicherung von RbcS gelungen. Die C_4-typischen Transkripte wie ME und PEPC sind dagegen im C_3-Gewebe fast gar nicht vorhanden. Es handelt sich also bei dem isolierten C_3-Mesophyllgewebe tatsächlich um ein Gewebe, dessen Akkumulation photosynthetischer Transkripte nicht C_4-typisch ist, sondern der C_3-Photosynthese zuzuordnen ist.

Im Gegensatz dazu fand im C_4-Mesophyll nur eine Anreicherung an PEPC-Transkripten statt. Im Vergleich zum Laubblatt konnte hier die 1,5-fache Menge an PEPC-Transkripten gemessen werden, während das Vorkommen von Transkripten von ME und RbcS gering ist. In der Bündelscheidenzellen-Präparation sind wiederum nur geringe Mengen an PEPC-Transkripten zu finden, stattdessen aber eine klare Akkumulation von sowohl ME als auch von RbcS. Die Menge an ME-Transkripten geht hier sogar noch über die Menge an GAPDH hinaus und steigert sich um das 3,5-fache im Vergleich zum Laubblattgewebe. Man kann also von einer klaren Anreicherung der ME-Transkripte in Bündelscheiden sprechen. Allerdings ist die Häufigkeit der RbcS-Transkripte in Bündelscheiden schwächer als erwartet, da sie noch unter dem RbcS-Wert des Laubblattes liegt und somit keine Anreicherung erreicht werden konnte. Dies ist eventuell auf die unterschiedlichen Präparationstechniken der Gewebe und den verschiedenen RNA-Stabilitäten bei diesem Prozess zurückzuführen. Die Gewebe C_4-Mesophyll und Bündelscheide entsprachen also der Erwartung bezüglich der Aufteilung an Transkripten von PEPC, ME und RbcS und zeigen im Vergleich zum Laub- bzw. Hüllblatt das vermutete Akkumulationsmuster. Auch das C_3-Gewebe zeigte das erwartete nicht typische C_4-Expressionsmuster, sondern bestätigte mit seiner Transkriptverteilung die Annahme einer C_3-Photosynthese im Hüllblatt von Mais.

Die Standardabweichung von bis zu 30 % der gemessenen Werte ist auf die biologische Variation zwischen den drei völlig unabhängigen Präparationen der Gewebe zurückzuführen. Innerhalb einer dreifachen einzelnen Messung lag die Standardabweichung unter 10 % (Daten nicht gezeigt). Der Kontaminationsgrad der Präparationen wurde durch Vergleich der quantifizierten Transkriptmengen der Markertranskripte PEPC und ME in den jeweiligen Geweben bestimmt. Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass die isolierten Gewebe kaum Kontaminationen aufweisen. Insbesondere das durch Protoplastierung isolierte C_4-Mesophyll weist mit einer Kontamination von etwa 1 % eine sehr große Reinheit auf. Die Bündelscheiden sind ebenfalls sauber von den anderen Geweben getrennt worden. Hier liegt die Kontamination durch C_4-Mesophyllzellen bei 4,2 %.

Im Fall des C_3-Gewebes kann kein Vergleich mit anderen Geweben vorgenommen werden, da es das einzige aus Hüllblatt isolierte Gewebe darstellt. Daher ist keine Aussage über den Grad an Kontamination im Rahmen der gegebenen Definition möglich. Doch aufgrund des Expressionsmusters, das keinerlei PEPC- oder ME-Transkriptakkumulation im C_3-Mesophyll zeigt, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die RNA-Präparation spezifisch für das C_3-Mesophyll ist. Alle Gewebe wurden somit sorgfältig und sauber getrennt und eignen sich daher für weitere Analysen, wie z.B. die Durchführung einer Subtraktion.

Tabelle 1: Kontamination der präparierten Gewebe

Der Grad an Kontamination im C_4-Mesophyll wurde durch den Anteil an ME im Vergleich zum Bündelscheidengewebe bestimmt. Im Fall vom Bündelscheidengewebe wurde der Anteil an PEPC vergleichend zum C_4-Mesophyll berechnet. n.a. = nicht anwendbar

Gewebe	Kontaminationsgrad in %
C_4-Mesophyll	1,0
Bündelscheiden	4,2
C_3-Mesophyll	n.a.

Die bisherigen Untersuchungen der präparierten Gewebe sind daher zur Charakterisierung und Quantifizierung der Transkripte von PEPC, ME und Rubisco geeignet. Sie zeigen deutlich die saubere Trennung der einzelnen Gewebe und die unterschiedlichen Verhältnisse der Transkripte der verschiedenen Enzyme in den entsprechenden Geweben.

Zusätzlich sollte nun auch die Akkumulation der mRNA der PPDK, einem weiteren Schlüsselenzym der C_4-Photosynthese, analysiert werden. Dabei stellte sich das „besondere Problem“ der Detektion der C_4-typischen Isoform des Enzyms. Sie unterscheidet sich von ihrer C_3-Isoform nur im ersten Exon des 5’-Bereiches. Der dadurch entstehende große

Abstand des PolyA-Schwanzes der mRNA des PPDK-Gens zum 5'-Ende verhindert eine effiziente cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern, da die Prozessivität der Reversen Transkriptase nicht ausreichend ist. Daher wurde ein genspezifischer Primer zur Synthese der cDNA eingesetzt. Die Bindestelle des Primers wurde so gewählt, dass sie stromabwärts des ersten Exons lag.

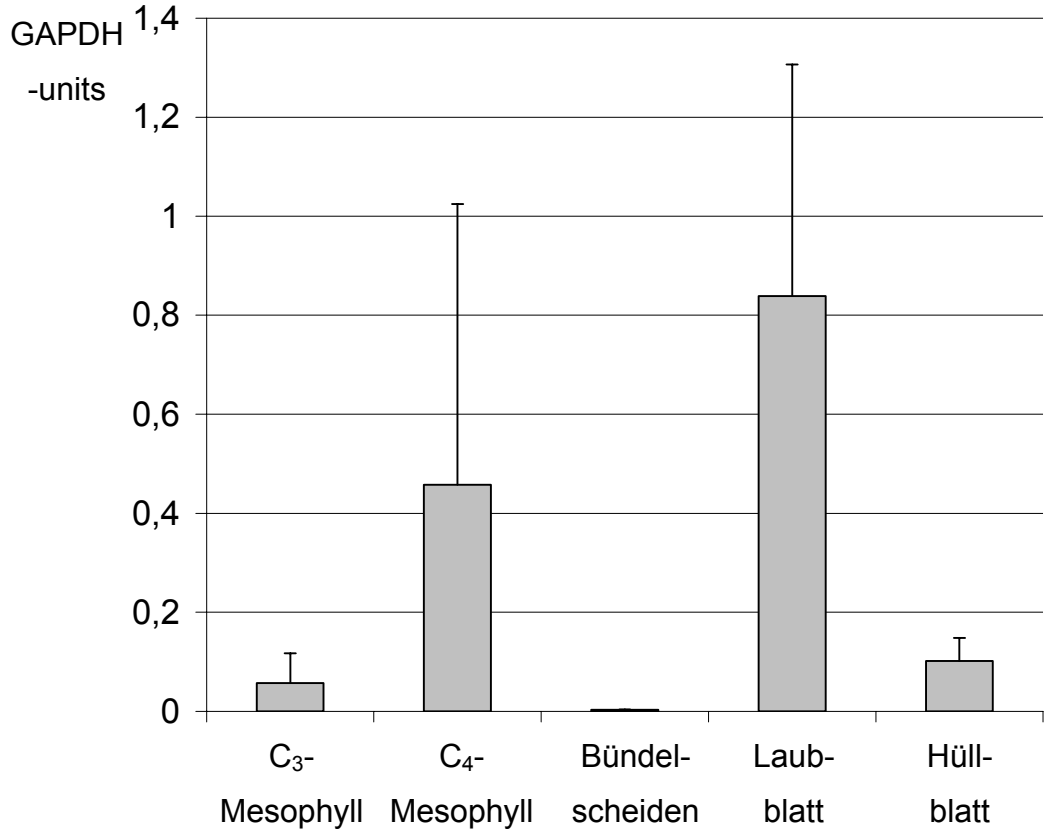


Abbildung 13: Quantifizierung der mRNA Akkumulation von PPDK-Transkripten in den untersuchten Maisgeweben

Dargestellt ist die Akkumulation von Transkripten der PPDK in fünf Blattgeweben von *Zea mays*. Die Menge an transkribierter PPDK-RNA wurde durch die Messung von SYBR Green vermittelter Fluoreszenz durch Real-Time-PCR aufgenommen und durch den Vergleich mit einer Verdünnungsreihe in Einheiten umgerechnet. Jeder Wert repräsentiert die relative Akkumulation der PPDK-RNA im Verhältnis zur Akkumulation von GAPDH-Transkripten. Die Daten beruhen auf dreifach wiederholten Messungen dreier unabhängiger RNA-Präparationen. Die Standardabweichung wird durch die vertikalen Balken angegeben.

Bei Betrachtung der Abbildung 13 erkennt man deutlich eine Akkumulation von PPDK-Transkripten in den Geweben mit C_4-Photosynthese, mit Ausnahme der Bündelscheiden. So zeigen Laubblatt und C_4-Mesophyll die höchste PPDK-Transkript–Akkumulation, während in den Bündelscheiden dagegen keine Transkripte von PPDK nachweisbar sind. Das entspricht den Erwartungen, da das Enzym PPDK eine in den Mesophyllzellen lokalisierte Reaktion katalysiert. Im C_3-Gewebe dagegen konnten PPDK-Transkripte detektiert werden. Die Menge

ist allerdings gering und liegt bei 1/9 der Transkriptmenge des C_4-Mesophylls. Auch im Hüllblatt, welches neben C_4-Gewebe auch große Bereiche mit C_3-Photosynthese aufweist, akkumulieren Transkripte der PPDK und weisen gegenüber dem C_3-Gewebe eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge auf. Aufgrund der Verwendung genspezifischer Primer bei der cDNA-Synthese, wurde die cDNA zur Standardisierung mittels GAPDH gesondert hergestellt. Da die Messungen der PPDK- und der GAPDH-Transkripte daher aus unabhängigen cDNA-Synthesen erfolgten, ist eine Variation der Effizienz der Erststrangsynthese nicht auszuschließen. Darin liegt vielleicht die Erklärung für die hohe Standardabweichung der Messungen.

3.4 Quantifizierung spezifischer Transkriptisoformen für die kleine Untereinheit von Rubisco

Die charakterisierten Gewebe und das etablierte Real-Time-PCR-System wurden außerdem zur Quantifizierung weiterer Transkripte genutzt. So bot sich hier die Möglichkeit, die Transkripte für das Enzym Rubisco näher zu betrachten. Rubisco stellt das einzige der untersuchten Gene dar, welches sowohl in der C_3-Photosynthese als auch in der C_4-Photosynthese eine zentrale Rolle spielt. Erste semiquantitative Analysen von Ewing et al. (1998) zeigten Hinweise auf eine mögliche auffällige Akkumulation der *RbcS1* Isoform gegenüber der *RbcS2* Isoform in den Hüllblättern von Mais. Während bei der initialen Charakterisierung der Gewebepräparationen alle Isoformen der Rubisco detektiert wurden (3.4), sollten nun ebenfalls Untersuchungen mit Hilfe des Real-Time-Systems zur Quantifizierung der einzelnen Isoformen der kleinen Untereinheit der Rubisco in den präparierten Geweben durchgeführt werden.

Die Abbildung 14 zeigt die relative Häufigkeit von *RbcS1*-Transkripten im Vergleich zu *RbcS2* Transkripten in den fünf Geweben. Während das Laubblatt eine ungefähr gleich starke Verteilung von *RbcS1* zu *RbcS2* Transkripten aufweist, ist im Hüllblatt eine vergleichsweise deutlich erhöhte Akkumulation von *RbcS1*-Transkripten zu *RbcS2*-Transkripten zu erkennen. Das Verhältnis von *RbcS1*- zu *RbcS2*-Transkripten ist in diesem Gewebe mehr als 6-mal so hoch wie im Laubblatt. Noch auffallender ist diese Beobachtung bei reinem C_3-Mesophyll. Hier liegt der Wert für das Transkriptverhältnis von *RbcS1* zu *RbcS2* sogar noch höher und die *RbcS1*-Transkripte sind im Vergleich zum Laubblatt mehr als zehnfach angereichert. Bei den einzelnen Geweben des Laubblattes, C_4-Mesophyll und Bündelscheiden ist vergleichsweise keine Akkumulation der *RbcS1*-Transkripte zu beobachten. Während bei C_4-

Mesophyll erwartungsgemäß gar keine RbcS-Transkripte detektiert werden konnten, liegt bei den Bündelscheiden eine leichte Akkumulation der *RbcS2*-Transkripte vor. Die Ergebnisse bestätigen also bisherige Annahmen und liefern erste quantitative Daten zur Verteilung der *RbcS1* und *RbcS2*-Transkripte in den Blattgeweben von Mais, die auf eine bevorzugte *RbcS1*-Expression in C_3-Geweben hinweisen, während sich in den C_4-Geweben die Expression beider Gene nicht signifikant unterscheidet.

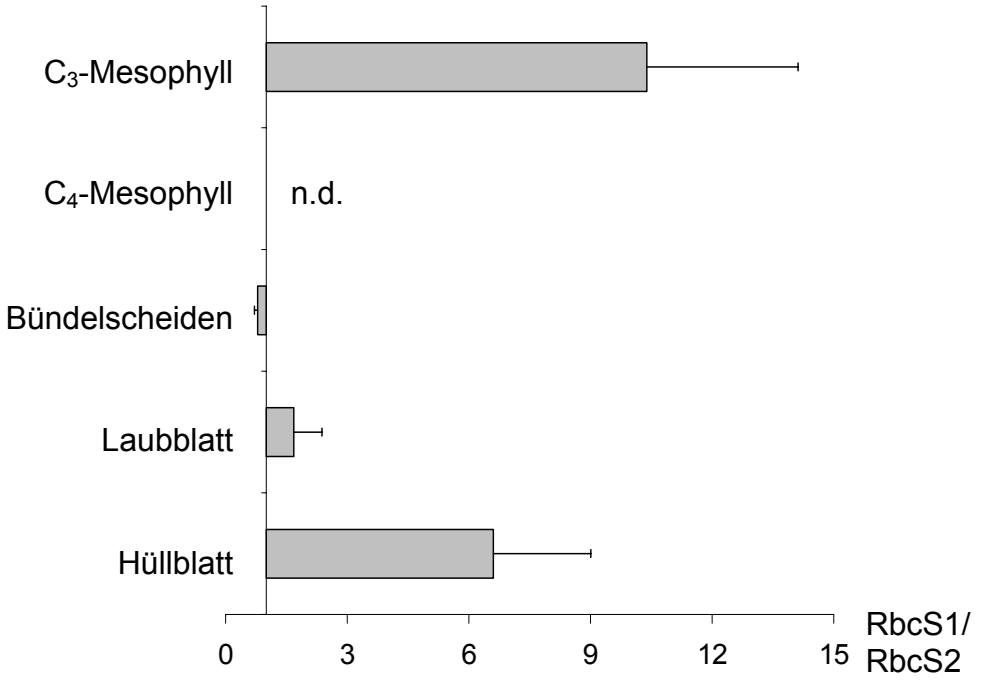


Abbildung 14: Akkumulationsverhältnisse von *RbcS1* und *RbcS2* Transkripten in verschiedenen Geweben von Mais

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der zwei Transkripte *RbcS1* und *RbcS2* von Rubisco in fünf Blattgeweben von *Zea mays*. Die Menge an transkribierter mRNA wurde durch die Messung von SYBR Green vermittelter Fluoreszenz durch Real-Time-PCR aufgenommen und durch den Vergleich mit einer Verdünnungsreihe in Einheiten umgerechnet. Jeder Wert repräsentiert das Verhältnis von *RbcS1*- zu *RbcS2*-Transkripten in den jeweiligen Geweben. Die Daten beruhen auf dreifach wiederholten Messungen dreier unabhängiger RNA-Präparationen. Die Standardabweichung wird durch die horizontalen Balken angegeben. n.d. = nicht detektierbar

3.5 Quantifizierung der Transkripte für die Transkriptionsfaktoren DOF1 und DOF2

Wichtige Transkriptionsfaktoren, die mit der Regulation der C_4-Photosynthese in Zusammenhang gebracht werden, sind die DOF-Proteine. Bisherige Daten ließen den Schluss zu, dass es sich bei DOF1 um einen lichtinduzierbaren Transkriptionsaktivator der C_4-Photosynthese handelt und bei DOF2 um einen gewebespezifischen Repressor (Yanagisawa and Sheen, 1998). Daher war die Verteilung und Quantifizierung von DOF-Transkripten in den isolierten Geweben von besonderem Interesse. Bei der Quantifizierung dieser Transkriptionsfaktoren wurde die Menge an Transkript auf die Häufigkeit der Transkripte der DOF-Faktoren im Laubblatt bezogen. DOF2 konnte in keinem der Blattgewebe nachgewiesen werden, weder in C_3-typischen Geweben noch in den Geweben mit C_4-Photosynthese. Zur Kontrolle des Systems wurde daher auch RNA aus Wurzelgewebe zur Quantifizierung genutzt und hier konnte eine klare Akkumulation des DOF2-Transkriptes nachgewiesen werden, wie es auch schon durch Yanagisawa et al. (1998) beschrieben wurde (Daten nicht gezeigt). Daher kann die Aussage gemacht werden, dass möglicherweise vorkommende DOF2-Transkripte in Blattgeweben noch unter 1 % der Häufigkeit der Transkripte in der Wurzel liegen (Schätzwert aufgrund der Detektionsgrenze). Auch im als C_3-typisch definierten Gewebe des Hüllblattes konnte kein DOF2-Transkript nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, dass der repressiv wirkende Transkriptionsfaktor DOF2 zwar eventuell die Expression der C_4-spezifischen PEPC in nicht photosynthetischen Geweben (Yanagisawa and Sheen, 1998) unterdrückt, anscheinend jedoch nicht in Geweben mit C_3 Photosynthese.
Für DOF1 dagegen konnte eine Quantifizierung der Transkripte in den Geweben vorgenommen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 zusammengefasst.

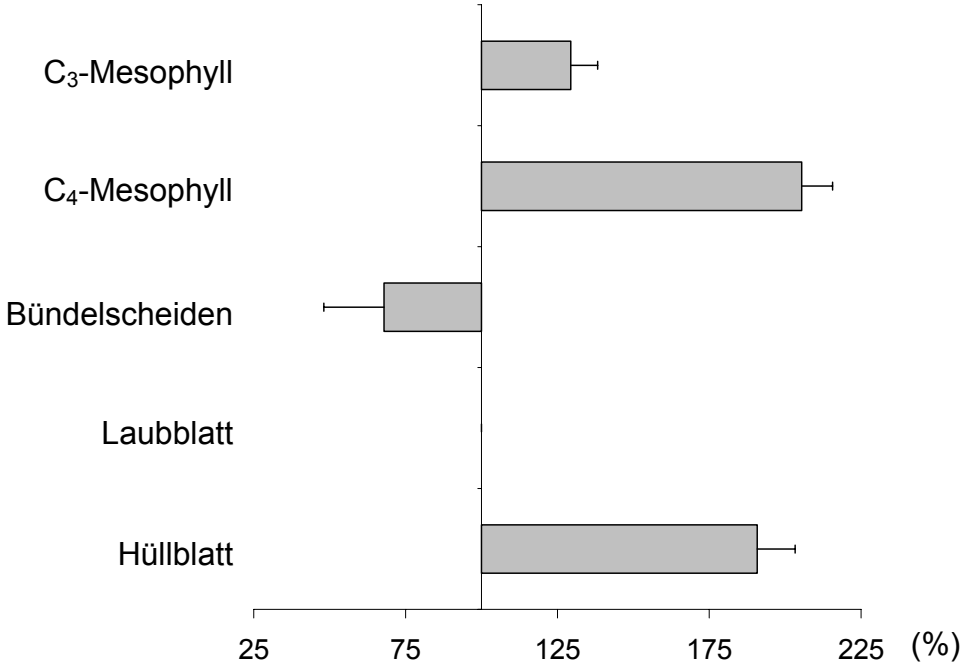


Abbildung 15: Quantifizierung der mRNA Akkumulation von DOF1-Transkripten in verschiedenen Geweben von Mais

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der DOF1-Transkripte in fünf Blattgeweben von *Zea mays*. Die Menge an transkribierter mRNA wurde durch die Messung von SYBR Green vermittelter Fluoreszenz durch Real-Time-PCR aufgenommen und durch den Vergleich mit einer Verdünnungsreihe in Einheiten umgerechnet. Jeder Wert repräsentiert die Häufigkeit der DOF1-Transkripte im Vergleich zur Akkumulation des DOF1-Transkriptes im Laubblattgewebe. Die Daten beruhen auf dreifach wiederholten Messungen dreier unabhängiger RNA-Präparationen. Die Standardabweichung wird durch die horizontalen Balken angegeben.

Wie man in der Abbildung 15 erkennen kann, ist die Verteilung und Häufigkeit der DOF1-Transkripte sehr unterschiedlich in den untersuchten Geweben. So zeigen die Gewebe des Laubblattes eine völlig ungleiche Verteilung des DOF1-Transkriptes. Das C_4-Mesophyll weist die meisten DOF1-Transkripte auf, aber auch in der Bündelscheide konnten DOF1-Transkripte nachgewiesen werden. Allerdings liegt der Wert deutlich unter dem der C_4-Mesophyllzellen. Im Hüllblatt sieht man im Vergleich zum Laubblatt eine sehr hohe Akkumulation an DOF1-Transkripten und es werden ähnliche Werte erreicht wie im C_4-Mesophyllgewebe. Auffallend ist, dass auch das C_3-Mesophyll im Vergleich zum Laubblatt überraschend eine größere Menge an DOF1-Transkripten akkumuliert, wobei dieser Wert aber deutlich niedriger ist als der des Gesamt-Hüllblattes. Von der Theorie ausgehend, dass DOF1 ein Aktivator der PEPC-Expression ist, sollte man daher auch PEPC-Transkripte in diesen Geweben finden; insbesondere da Transkripte des möglichen Repressors DOF2 nicht detektiert werden konnte. Dies ist aber nicht der Fall, daher kann man aufgrund dieser Daten

eine Rolle der Transkriptionsfaktoren DOF1 und DOF2 bei der Kontrolle C_3- oder C_4-spezifischer Genexpression in den Blattgeweben von Mais ausschließen.

3.6 Subtraktive Hybridisierung

Die isolierten Gewebe Hüllblatt und C_3-Mesophyll wurden nach ihrer Charakterisierung zur Detektion bisher unbekannter Gene, die eine differentielle Transkriptakkumulation zeigen, eingesetzt. Da das Hüllblatt neben den C_4-typischen Geweben auch aus C_3-Mesophyll besteht, sollten durch Subtraktion des C_3-Mesophylls, C_4-spezifisch exprimierte Gene identifiziert werden. Aufgrund des limitierten Ausgangsmaterials zur RNA-Isolierung, wurde vor der Subtraktion eine SMART-Reaktion zur Amplifikation der RNA-Populationen durchgeführt. Dazu wurde, wie auch bei der Subtraktion, ein Kit der Firma Clontech verwendet. Die Vorgehensweise entsprach größtenteils den Herstellerangaben und ist im Material und Methoden Teil dieser Arbeit (Abschnitte 2.12 und 2.10.2) nochmals ausführlich erläutert.
Um genügend cDNA zur Subtraktion zu erhalten, wurden sowohl mit der RNA des C_3-, als auch des Hüllgewebes mehrere Parallelreaktionen angesetzt, da beim ersten Versuch der SMART-Amplifikation durch die anschließende Restriktion und zweimalige Aufreinigung der Proben zuviel Material verloren ging. Diese Parallelansätze wurden nach der PCR-Reaktion vereinigt und aufgereinigt. So gelang es, ausreichende Mengen an cDNA zu generieren, die anschließend zur Erleichterung des Ablaufs der subtraktiven Hybridisierung in kleinere Fragmente gespalten wurde. Die Kontrolle der Restriktion mittels Gelelektrophorese zeigte bei den Ansätzen des C_3- und des Hüllgewebes das gleiche Bild. Vor der Restriktion lagen die Fragmentgrößen zwischen 500 bp – 10000 bp und nach erfolgter Restriktion war eine deutliche Verkleinerung der Fragmente auf einen Größenbereich zwischen 100 bp und 2000 bp zu erkennen. Das entsprach den Angaben des Herstellers (Daten nicht gezeigt). Vor der Ligation der Adaptoren an die cDNA des Hüllblattes wurden die Konzentrationen beider cDNA Populationen mittels OD-Messung bestimmt und angeglichen. Zur Kontrolle der Ligation erfolgte anschließend eine PCR mit einem adaptorspezifischen Primer und einem genspezifischen Primer. Mit beiden Primersystemen konnte das gewünschte Produkt erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Nach der erfolgreichen Ligation der Adaptoren, wurden die zwei Hybridisierungsschritte und die daran angeschlossenen PCR-Reaktionen durchgeführt. Abbildung 16 zeigt die Proben vor und nach der Subtraktion. Neben dem Ansatz mit der Subtraktion des C_3-Mesophylls von Hüllblatt sind auch die Kontrollen des Herstellers aufgetragen. In der Spur 2 mit der nicht subtrahierten Probe ist ein Gemisch an Fragmenten zu

erkennen, dass sich über einen Größenbereich von ca. 300 bp bis ca. 4000 bp erstreckt. Vereinzelt treten einige Banden stärker hervor. Dies ist auch bei den subtrahierten Proben in Spur 3 zu sehen. Deutlich wird jedoch, dass die durchschnittliche Größe der Fragmente leicht erhöht ist. Der Hintergrund, bestehend aus einem Gemisch an Fragmenten unterschiedlichster Größe, ist leicht zurückgegangen und man sieht einzelne angereicherte Banden im Bereich um 750 bp, die in den Proben vor der Subtraktion nicht sichtbar sind. Insgesamt ist die Menge an Produkt in Spur 3 schwächer. Spur 4 zeigt die nicht subtrahierte Probe der Kontrolle. Diese im Kit mitgelieferte Kontrolle stellt eine Mischung aus „human skeletal muscle cDNA“ mit 0,02 % Standard ΦX174 /Hae III DNA dar. Dabei repräsentieren die Fragmente des Standards die differentiellen DNAs. Die Kontrolle wurde während der Subtraktion parallel mitgeführt und wie die eigentlichen Proben behandelt. In diesem Fall wurde die „skeletal muscle cDNA“ von der Mischung aus „skeletal muscle cDNA“ und ΦX174 DNA/Hae III subtrahiert, so dass die DNA des Standards angereichert werden sollte. In der Spur 4 der nicht subtrahierten Kontrolle ist ein Gemisch an Fragmenten zu erkennen, die eine Größe zwischen 250 und 1500 bp aufweisen. Vereinzelt zeigen einige Banden eine stärkere Signalintensität. Die subtrahierte Probe in Spur 3 dagegen zeigt weitaus weniger Schmier, sondern einzelne deutlich hervorgehobene Banden. Im Vergleich mit der bereits subtrahiert mitgelieferten Positivkontrolle des Kits in Spur 6 erkennt man klar, dass die Fragment auf gleicher Höhe laufen und den Banden des Standards in Spur 7 entsprechen.

Da die Kontrollen den Erwartungen entsprechen, kann man davon ausgehen, dass eine Subtraktion stattgefunden hat.

Spur	1	2	3	4	5	6	7
Probe	Standard 1kb	PU	PS	KU	KS	PK	Standard ΦX174

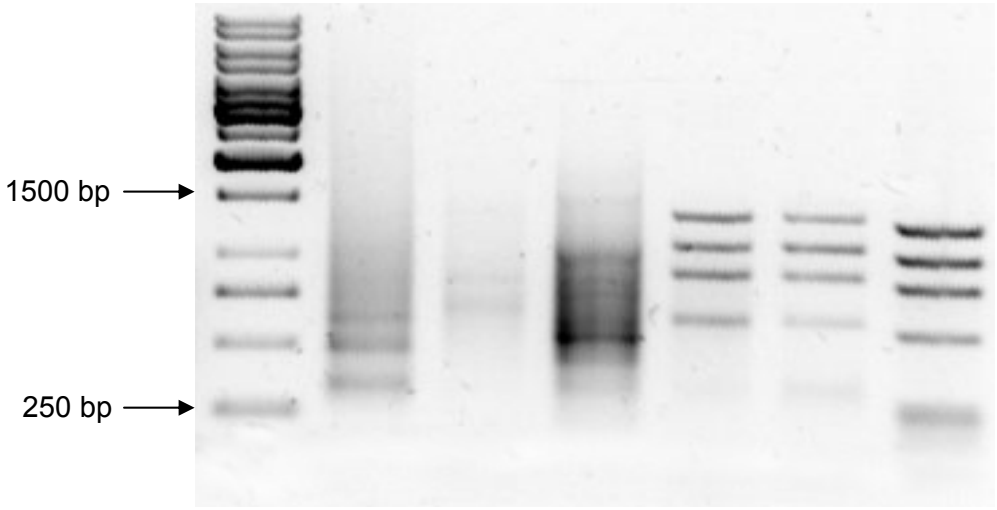


Abbildung 16: Subtraktions-PCR

Dargestellt ist die EtBr-vermittelte Fluoreszenz von DNA nach elektrophoretischer Trennung für 1,5 h bei 100 V in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel in 1 x TAE. PU = Probe unsubtrahiert; PS = Probe subtrahiert; KU = Kontrolle unsubtrahiert; KS = Kontrolle subtrahiert; PK = Positivkontrolle; Standard 1kb = 300 ng GeneRuler 1KB DNA Ladder; Standard ΦX174 = 300 ng ΦX174 DNA/Hae III

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden zur Vereinzelung in den TOPO-Vektor der Firma Invitrogen kloniert und anschließend ausplattiert. Von insgesamt 526 Klonen wurden die Plasmide isoliert und anschließend eine PCR mit plasmidspezifischen Primern durchgeführt, so dass alle klonierten Fragmente vollständig und in ausreichender Menge vorlagen. Eine gelelektrophoretische Überprüfung der Amplifikate aus den Plasmiden ergab eine durchschnittliche Fragmentlänge von ca. 500 bp. Das größte so erhaltene Fragment hatte eine Länge von 1110 bp, während das kleinste klonierte PCR-Produkt nur bei 100 bp lag. Abbildung 17 zeigt die Größenverteilung der inserierten Fragmente. Deutlich erkennbar ist das häufige Auftreten von Fragmenten im Bereich zwischen 300 bp und 700 bp. Im Vergleich dazu sind größere Fragmente, insbesondere mit einer Größe von über 900 bp, mit einem Auftreten von fast 15 % unterrepräsentiert, ebenso wie kleinere DNA-Fragmente unter 300 bp, die nur mit einer Häufigkeit von 5 % zu finden sind. Die Verteilung spiegelt die nach der Subtraktion in der PCR erhaltenen Fragmentgrößen wieder. Auch traten hier bei 400 bp einige Banden stärker hervor, die ebenfalls nach der Klonierung häufig aufzufinden sind. Aus Abbildung 17 geht außerdem hervor, dass auch große Fragmente über 900 bp erfolgreich in Plasmide inseriert werden konnten.

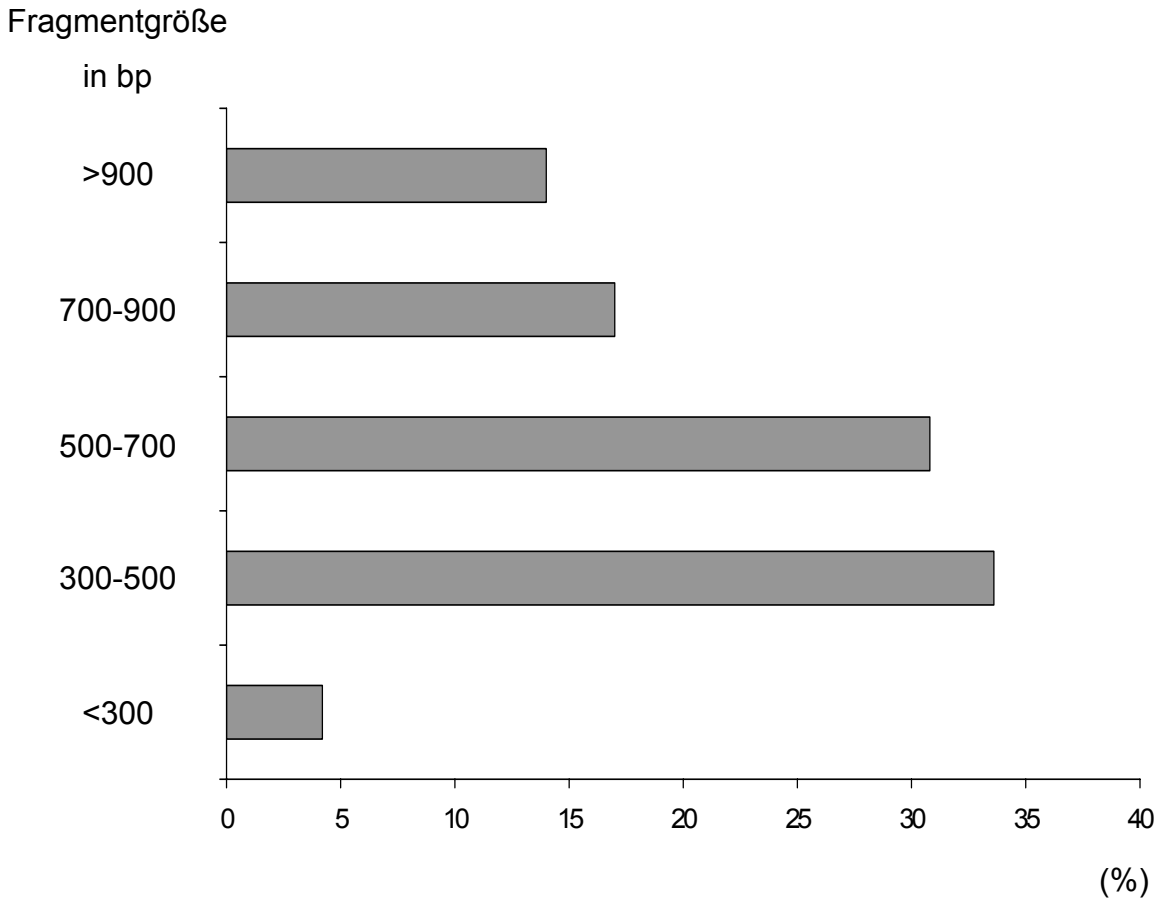


Abbildung 17: Größenverteilung der klonierten Fragmente

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Fragmente eines Größenbereichs an der gesamten Anzahl der klonierten Fragmente. Der Prozentanteil ist gegen die Fragmentgröße in bp aufgetragen. Die Daten basieren auf gelelektrophoretischer Größenauftrennung von 526 Fragmenten.

In jedem Fall war die Anzahl der Nukleotide der Fragmente ausreichend, um damit weitere Sequenzanalysen in Datenbanken durchzuführen oder eine Hybridisierung mit Sonden zu gewährleisten. Alle inserierten Fragmente wurden mit Hilfe der Technik eines reversen Northerns (2.11) auf ihre Verteilung in den Geweben C_4-Mesophyll, C_3-Mesophyll und Bündelscheiden überprüft. Dies diente der Verifizierung ihrer differentiellen Verteilung und der Unterscheidung in C_3- bzw. C_4-Mesophyll-spezifische Expression oder bündelscheidenspezifische Expression. Die PCR-Produkte der inserierten Fragmente wurden dazu auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit Digoxigenin-markierten Sonden spezifisch für die drei Gewebe, C_4-Mesophyll, C_3-Mesophyll und Bündelscheiden hybridisiert. Der Nachweis erfolgte mit CDP-Star (2.11.2). Diese gewebspezifischen, DIG-markierten cDNA-Sonden wurden mittels der SMART-Technik in einer Real-Time-PCR gewonnen (2.10.2). Um ein Angleichen der Mengenverhältnisse der RNAs zu verhindern, wurde die PCR-Reaktion vor Erreichen der Plateauphase abgestoppt und die Mengenverhältnisse der RNAs

anhand einer Quantifizierung der Markergene PEPC, GAPDH, Rubisco und ME überprüft. Dabei ergaben sich die erwarteten gewebetypischen Expressionmuster (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Stärke der jeweiligen Sonden mittels DIG-Nachweis mehrerer Verdünnungsstufen bestimmt und angeglichen.

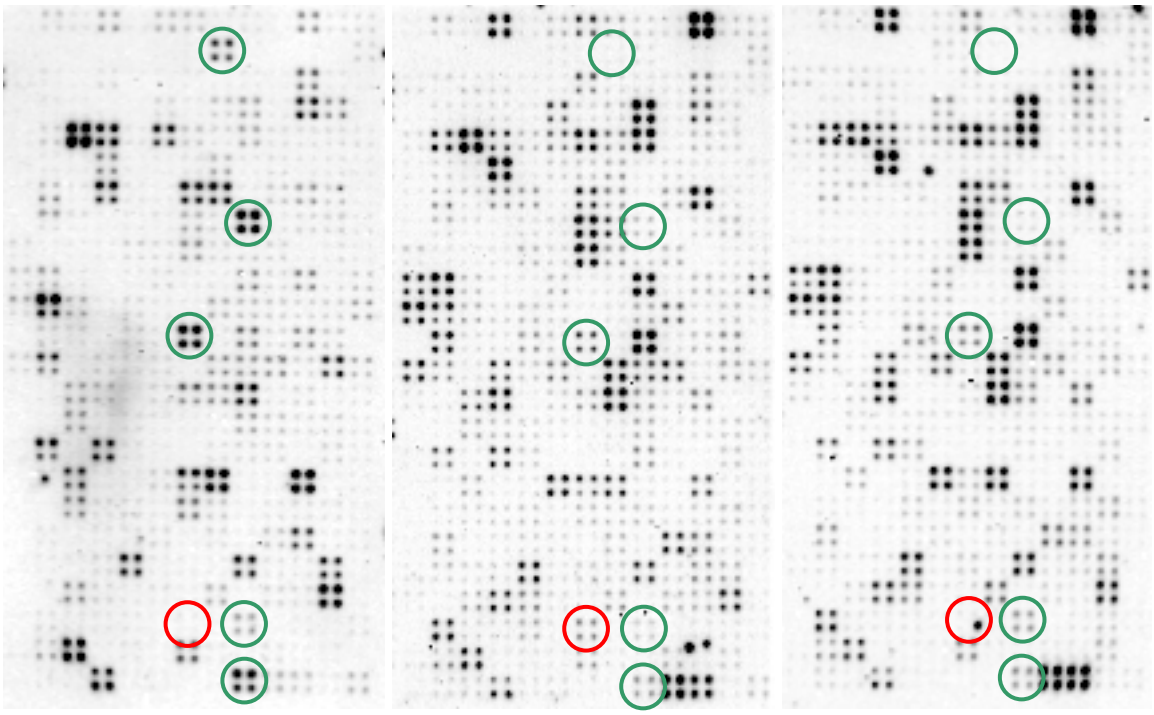


Abbildung 18: Reverse Northern-Analyse der nach der Subtraktion erhaltenen Transkripte

Die Abbildung zeigt die CDP-Star vermittelte Chemolumineszenz der reversen Northern-Analyse nach 20-minütiger Exposition in der Intelligent Dark Box mit LAS-1000 Kamera (Raytest, Berlin). Dargestellt sind 312 von 526 Transkripten. Jedes Transkript wurde in Form eines PCR-Produktes viermal punktuell auf die Membran aufgebracht. Hybridisierung mit den cDNA-Sonden (C_4-Mesophyll, C_3-Mesophyll und Bündelscheide) und der Nachweis erfolgten wie unter 2.11.2 beschrieben. Grüne Kreise markieren Beispiele für präferentiell in C_4-spezifischen Geweben exprimierte Transkripte, während der rote Kreis ein präferentiell im C_3-Gewebe akkumuliertes Transkript hervorhebt.

Die Abbildung 18 zeigt repräsentativ die Analyse von 312 PCR-Produkten mittels reverser Northern-Technik. Jedes PCR-Produkt wurde viermal auf die Membran übertragen, um eine bessere Reproduzierbarkeit der Daten zu sichern und die Signale deutlich von möglicherweise auftretenden Artefakten zu unterscheiden. Durch die farbigen Kreise wurden Beispiele für Transkripte hervorgehoben, die nach der Detektion unterschiedliche Signalintensitäten in den drei Geweben aufwiesen. Das rot markierte Transkript zeigt bei Hybridisierung mit der C_3-Mesophyllsonde ein deutlich stärkeres Signal als auf den anderen Membranen. Transkripte mit grüner Markierung unterscheiden sich ebenfalls deutlich in der Intensität der Signale und

zeigen ein stärkeres Signal mit der Sonde für C_4-Mesophyll oder Bündelscheiden und repräsentieren die erwarteten angereicherten differentiellen C_4-spezifischen Transkripte. Der Abbildung 18 kann man außerdem entnehmen, dass nicht alle PCR-Produkte detektiert werden konnten, während andere Signale durch sehr starke Intensitäten auffallen. Damit unterschiedliche Signalstärken auf die Häufigkeit des Transkriptes in den Sonden zurückzuführen sind und nicht auf die Menge an eingesetzter Sonde, wurden die Sonden durch vorherige Kontrollen auf die gleiche Intensität der DIG-Markierung eingestellt (Daten nicht gezeigt). Nach mehreren Hybridisierungsrunden mit den insgesamt 526 untersuchten Klonen konnten 43,2 % aufgrund der Hybridisierungsanalyse als differentiell exprimiert eingestuft werden. 41,8 % traten dagegen in allen drei Hybridisierungen auf und unterschieden sich nicht auffallend in ihren Signalstärken. Alle Transkripte mit unterschiedlichen Signalstärken auf den Membranen wurden entsprechend ihres Detektionsmusters eingeteilt und in acht Gruppen zusammengefasst. Alle als differentiell exprimiert ausgewerteten Muster zeigten eine präferentielle Akkumulation eines Transkriptes in bestimmten Geweben. In keinem der Fälle konnte eine Akkumulation eines Transkriptes in einem oder mehrerer Gewebe bei absoluter Abwesenheit des Transkriptes in einem anderen untersuchten Gewebe nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Einteilung der Klone nach präferentieller Expression in den untersuchten Geweben

Präferentielle Akkumulation der untersuchten Transkripte aufgrund der reversen Northern-Analyse. Die Häufigkeit von Transkripten, die das spezielle Muster zeigten, wird in Prozent bezogen auf die Gesamtanzahl von 526 Transkripten angegeben. Der Punkt symbolisiert eine deutliche Expression in den entsprechenden Geweben. Durch das Minuszeichen wird eine schwache Expression in den jeweiligen Geweben dargestellt.
BS = Bündelscheide, C_3 = C_3-Mesophyll; C_4 = C_4-Mesophyll; n.d. = nicht detektierbar

C_3	C_4	BS	Häufigkeit in %
n.d.	n.d.	n.d.	15
●	●	●	41,8
●	-	-	6,1
-	●	-	9,1
-	-	●	2,1
●	-	●	17,1
●	●	-	4,2
-	●	●	4,6

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht ist der Anteil an Transkripten, die in keiner der Hybridisierungen detektierbar waren mit 15 % sehr hoch. Dies ist wohl auf die geringe Sensitivität der Analytik zurückzuführen. Ebenfalls deutlich wird die starke Präsenz von präferentiell im C_3-Gewebe exprimierten Transkripten, die nach der Subtraktion eigentlich nicht auftreten sollten. Immerhin zeigen 6,1 % aller getesteten Transkripte ein stärkeres Signal in der Hybridisierung mit der Sonde spezifisch für das C_3-Gewebe als in den beiden anderen Reaktionen mit Sonden für die C_4-typischen Gewebe. Mit einem Anteil von 17,1 % ist auch die Menge an Transkripten ungewöhnlich hoch, die sowohl in C_3-Geweben als auch in Bündelscheiden stärker auftreten als im C_4-Mesophyll. Nur 4,6 % der analysierten Transkripte zeigen indessen das umgekehrte Muster, nämlich höhere Intensität der Signale auf den beiden Membranen hybridisiert mit Sonden für das C_4-Mesophyll- und Bündelscheidengewebe. Neben den Gruppen mit Transkripten, die präferentiell entweder im C_4-Mesophyll oder dem Bündelscheidengewebe akkumulieren, sind diese Transkripte von besonderem Interesse, da mögliche Regulationsfaktoren, die für die allgemeine Etablierung oder Aufrechterhaltung des C_4-Syndroms notwendig sind, hier enthalten sein könnten.
Laut der reversen Northern-Analyse konnten 15, 8 % der Transkripte als präferentiell in C_4-spezifischen Geweben exprimierte Transkripte eingestuft werden.
Um einige dieser Transkripte näher zu identifizieren, wurde eine Auswahl sequenziert und ausführlichen Datenbankanalysen unterzogen. Diese Auswahl beinhaltete die Gruppe der präferentiell in C_4-Mesophyll und Bündelscheiden exprimierten Transkripte und weiterhin Transkripte mit einem ansonsten auffälligen Akkumulationsmuster. Darüberhinaus wurden zur Kontrolle der Subtraktion neben den differentiell exprimierten Transkripten auch einige nicht detektierte Transkripte und solche mit gleichen Signalstärken in allen drei Geweben sequenziert und analysiert. Insgesamt wurden 73 Transkripte sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit bereits bekannten Sequenzen aus Datenbanken verglichen.

3.7 Analyse sequenzierter Transkripte

Um die subtrahierten Sequenzen näher zu charakterisieren, erfolgten ausführliche Datenbankanalysen. Mittels Homologien zu bekannten Sequenzen sollten den Transkripten mögliche Funktionen zugeordnet werden. Alle Sequenzen aus der Gruppe der Transkripte, die präferentiell in C_4-Mesophyll und Bündelscheiden exprimiert werden, entsprachen dabei Abschnitten des Chloroplastengenoms und sind daher in der nachfolgenden Tabelle 3 beispielhaft nur durch das Transkript 70 vertreten. Auch bei den anderen Gruppen der als

differentiell exprimiert angenommenen Transkripten lagen die Anteile an Chloroplasten-RNA nach Datenbankanalyse zwischen 25 und 77 %. Insgesamt wiesen 50 der Transkripte Homologien zu plastidären Sequenzen auf, doch konnten bei 32 % der sequenzierten Transkripte Homologien zu mRNAs aus Mais gefunden werden.

Tabelle 3: Ergebnisse der Datenbankvergleiche auf Nukleotidebene

Die Sequenzvergleiche wurden mit der Datenbank des NCBI unter www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST durchgeführt. Der E-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der Sequenzen an. Die Signifikanz der Übereinstimmung ist daher umso größer, je mehr sich der E-Wert „0“ annähert.

Transkript	Sequenz	„Accession number“	Identische Basen bp/bp	Übereinstimmung komplementärer Bereich	E-Wert
42	Z.mays MNB1b mRNA for DNA-binding protein	397395	488/507	96 %	0
	Maize mRNA for a high mobility group protein	22328	487/508	96%	0
70	*Zea mays* complete chloroplast genome	11990232	554/564	98 %	0
	Pollen Sorghum bicolor cDNA clone POL1_58_E02_A002 3'.	34518408	554/564	98 %	0
89	*Zea mays* PCO113764 mRNA sequence	21208862	244/259	94 %	e^{-112}
	Zea mays PCO113764 mRNA sequence mays cDNA clone	21621351	244/259	94 %	e^{-112}
94	2 week shoot from Barkan lab *Zea mays* cDNA.	133388978	443/455	97 %	0
112	*Zea mays* PCO101760 mRNA sequenze	21207907	777/808	96 %	0
134	Phosphorous-deficient seedlings Sorghum bicolor cDNA clone 5' mRNA sequence.	34441033	107/110	97 %	$6e^{-47}$
129	*Zea mays* histone deacetylase (HDA108) mRNA, partial cds	17017397	669/682	98 %	0
137	Juvenile leaf and shoot cDNA from Steve Moose	15053699	190/199	95 %	$4e^{-88}$

Transkript	Sequenz	„Accession number“	Identische Basen bp/bp	Übereinstimmung komplementärer Bereich	E-Wert
239	2 week shoot from Barkan lab *Zea mays* cDNA	13388978	489/505	96 %	0
	QBF *Zea mays* cDNA clone QBF7a01, mRNA sequence	32859868	398/409	97 %	0
275	*Zea mays* cDNA	37378761	313/315	99 %	e^{-171}
	tassel primordium prepared by Schmidt lab Zea	9254525	283/285	99 %	e^{-153}
286	Salt stressed *Zea mays* roots cDNA library *Zea mays* cDNA clone RNOSEQ6G10_SK.ab1 similar to contains EST AU094821(E31815)	21621351	382/410	93 %	e^{-165}
309	*Zea mays* PCO120172 mRNA sequence	21207822	301/304	99 %	e^{-162}
	Full length cDNA library created by Invitrogen from multiple tissues, *Zea mays* cDNA.	33467611	387/400	96 %	0
314	QBF7a01.xg QBF *Zea mays* cDNA clone QBF7a01.	32859868	344/350	98 %	0
361	SK.ab1 Salt stressed *Zea mays* roots cDNA library	21621351	509/509	100 %	0
	Zea mays PCO113764 mRNA sequenze	21208862	469/469	100 %	0
447	MEST359-D01.T3 ISUM5-RN *Zea mays* cDNA clone	16922714	307/309	99 %	e^{-165}
448	*Zea mays* PCO063168 mRNA	21209102	225/227	99 %	e^{-119}
503	*Zea mays* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxy-genase large subunit (rbcL) pseudogene, complete mito-chondrial	30959082	306/306	100 %	e^{-171}

Wie man der Tabelle 3 entnehmen kann, konnten nicht allen Transkripten Funktionen zugeordnet werden. Allerdings weisen die Transkripte 42 und 129 interessante Homologien auf. Transkript 42 zeigt eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des MNB1 DNA-Binde-Proteins und eines Proteins der HMG-Gruppe (high mobility group). Die Proteine der HMG-Klasse sind kleine, häufige nicht-Histon-Proteine. Sie werden mit der Beugung von DNA in Zusammenhang vieler biologischer Prozesse gebracht und als architektonische Faktoren im Zellkern angesehen (Grasser et al., 1996; Stemmer et al., 1999). Das Transkript 129 weist über große Bereiche Homologie zu der Sequenz einer Histon-Deacetylase auf. In neueren Untersuchungen wird Histon-Deacetylasen und Acetyltransferasen eine Rolle in der Kontrolle der Genexpression zugeschrieben. Dabei bewirken sie Strukturänderungen im Chromatin und erlauben so funktionelle Änderungen (Lusser et al., 2001). Beide Transkripte wurden mittels Real-Time-PCR weiter analysiert.

Die Transkripte 70 ,283 und 503 zeigten dagegen Homologien zu Sequenzen plastidärer Genome, wobei bei 283 und 503 wahrscheinlich ein mitochondriales Pseudogen der großen Untereinheit der Rubisco darstellen. Da diese Transkripte wiederholt nach der Subtraktion vorkamen, wurden nur Transkript 70 und 503 weiter charakterisiert. Des Weiteren wurden mittels der Datenbankanalysen auch zwei Transkripte identifiziert, deren Sequenzen Gemeinsamkeiten mit mRNA stressinduzierter Maispflanzen aufwiesen. Aufgrund der hier ebenfalls auftretenden Redundanz wurde nur ein Transkript (361) weiterverfolgt. Bis auf eine Ausnahme konnten bei allen weiteren Transkripten Homologien zu mRNAs bzw. cDNAs unbekannter Funktion aus Mais gefunden werden. Nur Transkript 134 ließ keine Ähnlichkeit zum Mais-Genom erkennen. Die hier auftretende Homologie entsprach einer cDNA aus der C_4-Pflanze Hirse (*Sorghum bicolor).* Um weitere Informationen zu den Transkripten unbekannter Funktion zu erhalten, wurden diese Sequenzen in alle 6 möglichen Aminosäuresequenzen translatiert und auf Proteinebene mit Datenbanken verglichen. Diese Analyse wurde ebenfalls mit den Sequenzen der zu den untersuchten Transkripten homologen cDNAs durchgeführt. Dabei ergab sich für das abgeleitete Protein der zu Transkript 448 homologen cDNA eine deutliche Übereinstimmung zu einem ribosomalen Protein aus Mais (gi:542157). Das Transkript 134 zeigte auch in translatierter Form keinerlei Übereinstimmung zu Proteinen aus Mais, wies aber eine Ähnlichkeit zu einer Aminosäuresequenz eines Photosystem II CP 43 Proteins aus *Metasequoia glyptostroboides* auf.

Für alle anderen Sequenzen konnten auch durch gründliche Vergleiche auf Proteinebene keine weiteren Informationen zu einer möglichen Funktion gefunden werden. Zur näheren Charakterisierung der nach der Subtraktion erhaltenen Transkripte fand daher eine

Überprüfung der Akkumulationsmuster in den fünf Blattgweben statt. Dazu wurden anhand der Sequenzen für diese Transkripte Primersysteme entwickelt und die Akkumulation ausgewählter Transkripte mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Akkumulationmuster ausgewählter Transkripte

Die Angaben zur Quantifizierung der Transkripte erfolgen in willkürlichen „Units", die anhand einer idealen, theoretischen Eichreihe für das jeweilige Amplifikat abgelesen wurden. Die in der Spalte Reverser Northern aufgeführten Angaben zeigen die Gewebe der präferentiellen Expression der Transkripte in der reversen Northern-Analyse. Bei der Angabe aller drei Gewebe wurde das Transkript gleichermaßen in allen Geweben exprimiert. Keine Detektion des Transkriptes wird durch das Minuszeichen symbolisiert. Durch die Real-Time-PCR als bündelscheidenspezifisch eingeordnete Transkripte sind in der Spalte Bündelscheide hervorgehoben.
BS = Bündelscheide, C_4 = C_4-Mesophyll, C_3 = C_3-Mesophyll

Transkript	Reverser Northern	C_3-Mesophyll	C_4-Mesophyll	Bündel-scheide	Laub-blatt	Hüll-Blatt
42	C_4	52,08	309,03	436,52	416,87	42,99
70	C_4+BS	230,85	1079,78	2492,68	1031,18	175,12
89	C_3+C_4+BS	1,11	0,10	**93,33**	44,67	11,22
94	C_3+C_4+BS	0,01	0	**10,39**	5,09	4,54
112	C_3+C_4+BS	0,06	0,10	0,03	0,02	0,05
129	C_3+C_4+BS	0,74	1,66	1,16	2,09	0,63
239	C_3+C_4+BS	0,26	0,09	**18,34**	1,02	10,31
314	C_3+C_4+BS	1,11	0,55	**50,89**	13,91	31,87
361	-	1,43	0,09	**74,13**	9,92	12,02
447	BS	0,47	0,20	10,00	3,95	12,40
448	BS	2,07	1,60	2,38	0,47	1,56
503	BS	30,43	5,75	**532,93**	88,44	31,87

Wie man Tabelle 4 entnehmen kann, entsprechen die Ergebnisse der reversen Northern-Analyse nicht in allen Fällen den Daten der Real-Time-PCR. So zeigten z.B. die Transkripte 89, 94 und 239 mit der Technik des reversen Northerns keine Gewebespezifität, während die Real-Time-PCR-Analyse eine klare Bündelscheidenspezifität ergab. Ein ähnliches Expressionsmuster konnte über die Real-Time-PCR auch für die Transkripte 314, 361 und 503 ermittelt werden. Diese Transkripte zeigten eine starke Akkumulation in der Bündelscheide (in der Tabelle 4 hervorgehoben), waren aber in den Mesophyllgeweben nur schwach bis gar nicht detektierbar. Bei zwei dieser bündelscheidenspezifischen Transkripte 239 und 314 ist die Akkumulation im Hüllblatt auffallend hoch und erreicht sogar deutlich

höhere Werte als im Laubblatt. Das entspricht nicht den Erwartungen für ein bündelscheidenspezifisches Transkript, da das Hüllblatt im Vergleich zum Laubblatt wesentlich weniger Bündelscheiden enthält. Allerdings wurde das Hüllblatt aus wesentlich älteren Pflanzen präpariert, so dass unterschiedliche Entwicklungsstufen der Blätter als Ursache für diese Verschiebung im Akkumulationsmuster möglich sind. Auch Stress aufgrund der Anzuchtbedingungen der Maispflanzen ist nicht auszuschließen sind. Neben den geschilderten Transkripten, die hauptsächlich in den untersuchten Bündelscheidenpräparationen gefunden wurden, konnten weitere Transkripte identifiziert werden, die vor allem in allen Geweben des Laubblattes, jedoch nicht in den Hüllblättern exprimiert werden. Dieses Expressionsmuster konnte insbesondere den Transkripten 42, 70 und 129 zugeordnet werden. Darüberhinaus konnte ein Transkript mit präferentieller Akkumulation im C_3-Mesophyll detektiert werden. Dieses Transkript 137 ist nicht in Tabelle 4 aufgeführt, da es im Rahmen einer Diplomarbeit quantifiziert und ausführlich charakterisiert wurde (Kahlau, 2004). Die Real-Time-PCR-Daten dieser Diplomarbeit bestätigten die Ergebnisse der reversen Northern-Analyse und zeigten eine deutliche Akkumulation des Transkriptes im C_3-Mesophyll und im Hüllblattgewebe.

Im Gegensatz zu den genannten Transkripten mit differentiellem Akkumulationsmuster in den untersuchten Geweben ergaben sich in der Real-Time-PCR für einige Transkripte keine gewebespezifischen Präferenzen. So zeigten die aufgenommenen Expressionsmuster für Transkript 112 und 448 in allen untersuchten Geweben eine ähnlich starke Akkumulation.

Nicht in allen Fällen konnte eine Analyse der Expressionsmuster mittels Real-Time-PCR vorgenommen werden, da teilweise kein funktionierendes Primersystem etabliert werden konnte (Transkripte 275 und 309). Dennoch konnten nach der Subtraktion mit Hilfe der Technik der Real-Time-PCR drei Transkripte als präferentiell im Laubblatt exprimiert und weitere sechs Transkripte als bündelscheidenspezifisch identifiziert werden.

3.8 Charakterisierung des bündelscheidenspezifischen Transkriptes 239

Da die Funktion der meisten nach der Subtraktion sequenzierten Transkripte unbekannt war, wurde versucht, die bekannte cDNA-Sequenz zu verlängern. Dadurch sollte die Möglichkeit erweitert werden, Homologien zu bekannten Sequenzen zu finden und so dem Transkript eine mögliche Funktion zuzuordnen. Dazu wurde das Transkript 239, welches laut PCR- und Sequenzanalysen in mind. zwei Isoformen im Maisgenom vorliegt (Daten nicht gezeigt) genutzt. Dieses Transkript zeigte in Datenbankanalysen Homologien zu cDNAs unbekannter Funktion aus Maissprösslingen (Tabelle 3). Es wird in den Mesophyllgeweben fast gar nicht transkribiert, akkumuliert aber deutlich in den Bündelscheiden (Tabelle 4). Das Verteilungsmuster des Transkriptes 239 konnte in drei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Zur Ergänzung der bereits bekannten Sequenz wurde zunächst ein Phagenbank-Screening verwendet. Dabei wurden anhand der Sequenz des aus der Subtraktion erhaltenen cDNA-Fragmentes PCR-Primer erstellt, die in einer PCR-Reaktion eine DIG-markierte Sonde generierten. Mit dieser Sonde wurden 30000 Phagen gesichtet und zwei Phagenklone identifiziert, die Teile des entsprechenden Gens enthielten. Aus diesen positiven Phagenklonen wurde die rekombinante Phagen-DNA isoliert, eine partielle Restriktion durchgeführt und Adaptoren an die entstandenen Fragmente ligiert. In anschließenden PCR-Reaktionen diente so prozessierte Phagen-DNA als Matrize für eine Genome Walking PCR (2.10.3). Dadurch konnte die bereits bekannte Sequenz des Transkriptes 239 um 1165 Basen verlängert werden. Unerwarteterweise ergaben die PCR-Schritte des Genome Walking, dass das in der Phagenbank enthaltene Fragment des gesuchten Gens 239 nur 1749 bp lang war, daher wurden die weiteren Genome-Walking-Schritte mit genomischen Mais-Banken weitergeführt.. Mit Hilfe von mehreren PCR-Schritten konnten so insgesamt ca. 2320 bp Sequenzinformationen gewonnen werden. Um auszuschließen, dass der Wechsel der Matrize in der Genome-Walking-PCR zu unzusammenhängenden Sequenzinformationen geführt hatte, wurden zusätzliche PCR-Analysen durchgeführt. Dabei war es möglich den gesamten bekannten Bereich des Transkriptes 239 aus genomischer DNA zu amplifizieren (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 19 stellt schematisch die durch Genome-Walking-Schritte mit wechselnder Matrize ermittelte Sequenz des Transkriptes 239 dar. Datenbankanalysen der zusätzlich ermittelten Sequenz ergaben dabei neue homologe Bereiche zu cDNAs aus Pollen. Das Transkript 239 wird also sowohl in Sprösslingen von Mais als auch in Zellen zur

Reproduktion exprimiert. Interessanterweise zeigten Datenbankanalysen der translatierten Sequenz der cDNA 239 weder Übereinstimmungen zu Proteinen der dicotyledonen Pflanze Arabidopsis noch zu der C_3-Pflanze Reis (*Oryza sativa*). In Mais dagegen konnten Übereinstimmungen zu Proteinen gefunden werden. Dies lässt möglicherweise auf eine C_4-spezifische Funktion des Transkriptes 239 schließen.

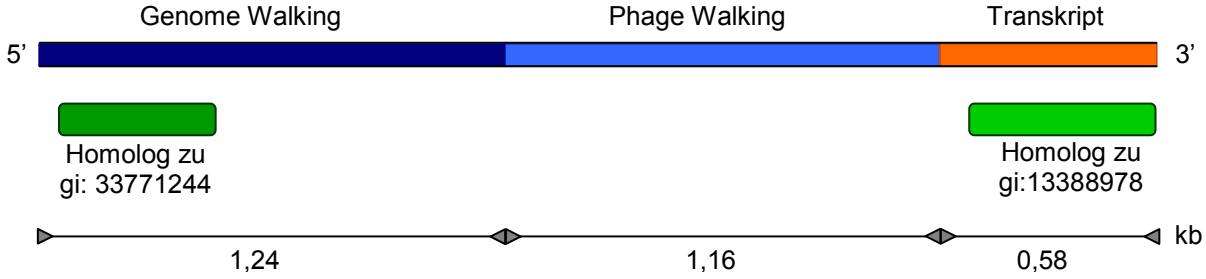


Abbildung 19: Ermittelte Sequenz des Transkriptes 239

Die Abbildung zeigt die durch die Methode des Genome Walking verlängerte Sequenz des Transkriptes 239 (rot markiert). Sequenzinformationen, die durch Genome Walking Schritte auf genomischer DNA erhalten wurden, sind durch einen dunkelblauen Kasten gekennzeichnet. Im Fall von Phagen-DNA als Matrize ist der ermittelte Sequenzbereich durch einen hellblauen Kasten dargestellt. Zwei durch Datenbankvergleiche detektierte homologe Bereiche des Transkriptes 239 zu cDNAs unbekannter Funktion sind grün eingezeichnet.

4 Diskussion

4.1 Präparation und Charakterisierung verschiedener Gewebe aus Mais

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der Regulation der C_4-spezifischen Genexpression zu studieren. Dazu wurde das Hüllblatt der weiblichen Infloreszenz aus Mais genutzt. Neben den typischen C_4-Geweben Mesophyll und Bündelscheide enthält das Hüllblatt vom Mais auch Gewebebereiche mit einer C_3-typischen Photosynthese und stellt daher ein sehr gutes Modellsystem zur Analyse des C_4-Syndroms dar.

Ein neuer, wesentlicher Aspekt hierbei war die Isolierung dieses C_3-Mesophylls aus dem Hüllblatt. Bisherige Untersuchungen zur C_4-Photosynthese beschränkten sich meist auf die Separation und den Vergleich von Bündelscheidenzellen und C_4-Mesophyll aus dem Laubblatt (Kubicki et al., 1994; Sheen and Bogorad, 1986; Sheen and Bogorad, 1987; Sheen and Bogorad, 1985) oder verwendeten das gesamte Hüllblatt ohne Isolierung der verschiedenen Gewebe (Langdale et al., 1988). Die Präparation von isoliertem C_3-Mesophyll aus dem Hüllblatt in dieser Arbeit bot daher die Gelegenheit, die Genexpression in diesen Mesophyllzellen separat zu betrachten und einen direkten Vergleich mit den C_4-Mesophyllzellen aus Mais durchzuführen. Eine weitere Neuerung war die Verwendung der Methode der RT-PCR unter Nutzung der Real-Time-PCR-Technik zur Charakterisierung der isolierten Gewebe. Frühere Analysen zur differentiellen Expression und der Akkumulation C_4-spezifischer Transkripte wurden mittels Northern- oder *in situ*-Hybridisierungen zur Detektion einiger Markerenzyme erstellt (Langdale et al., 1988). Zur Durchführung einer Northern-Hybridisierung sind allerdings RNA-Mengen im µg-Bereich notwendig (Sambrook and Russel, 2002), deren Präparation aufwendig ist und die bei limitiertem Ausgangsgewebe schwer zu erhalten sind. Einen weiteren Nachteil der Northern-Hybridisierungen stellt die Herstellung einer entsprechenden Sonde zur zuverlässigen Detektion der gewünschten RNA dar. Da sich die Gene für die Enzyme des C_4-Stoffwechsels aus Isoformen entwickelt haben, die in C_3-Pflanzen Funktionen im Grundstoffwechsel erfüllen (Ku et al., 1996), weisen diese Gene zum Teil sehr hohe Sequenzhomologien auf. Daher müssen Bedingungen bei der Sondenwahl getroffen werden, die spezifisch genug sind, um zwischen den verschiedenen Isoformen der Gene zu unterscheiden. Darüberhinaus sollten die markierten Fragmente der Sonde trotzdem eine ausreichende Größe aufweisen, um eine reproduzierbare Detektion zu ermöglichen. Auch bei der Detektion mit Antikörpern ist die Diskriminierung der Isoformen

der C_3- und C_4-Gene schwierig. Diese Beeinträchtigungen treten bei der Methode der RT-PCR nicht auf. Bei dieser Technik werden nur minimale Mengen an RNA benötigt, da eine Amplifikation innerhalb der Reaktion stattfindet, die eine Detektierung der zu untersuchenden RNA möglich macht. Dieser Aspekt war innerhalb dieser Arbeit von großem Vorteil, da die Präparation von C_3-Mesophyll nur einige mg Material ergab, die daraus präparierte RNA aber ausreichend für mehrfache PCR-Analysen ist. Verdünnungsreihen mit RNA aus Laubblatt zeigten, dass Gesamt-RNA-Mengen im Bereich von pg in den gewählten Bedingungen der Real-Time-PCR ausreichend für die spezifische Detektion von Transkripten sind (Daten nicht gezeigt).

Auch die notwendige Unterscheidung zur Differenzierung zwischen C_3-Isoform des Gens und der C_4-Isoform kann mittels dieser Technik erreicht werden, da die verwendeten Primer nur kurze Bereiche abdecken und stringente Anlagerungstemperaturen unspezifische Bindungen bis auf einzelne Nukleotide genau verhindern. Die RT-PCR stellt damit eine sehr sensitive und spezifische Alternative zu den bekannten Techniken dar und wurde bereits zuvor bei der Detektierung von PPDK-Transkripten (Schaeffner and Sheen, 1992) in Mais verwendet. Allerdings handelte es sich hierbei um eine Endpunkt-Detektion, die keinen Rückschluss von der Menge an Produkt auf die Menge an Matrize zuließ (Raeymaekers, 2000). Dazu ist es notwendig die Amplifikation in der exponentiellen Phase einer PCR-Reaktion zu verfolgen. Die Entwicklung der Real-Time-PCR machte die Detektierung der entstehenden Produkte während der PCR-Reaktion möglich und erlaubte die Berechnung eingesetzter Matrizenmenge aufgrund der Kinetik des Amplifikationsprozesses (Heid et al., 1996; Wittwer et al., 1997). Die Sensitivität der Real-Time-PCR ist dabei wesentlich höher als die Technik der Northern- oder *in situ*-Hybridisierung und erlaubt sogar Analysen des Transkriptionsstatus einzelner Zellen (Al-Taher et al., 2000). Mittels dieser Technik war daher eine genaue Überprüfung auf Kontaminationen und eine parallele Charakterisierung der isolierten Gewebe durchführbar. So konnten anhand des Expressionmusters der fünf Gewebe im Vergleich zueinander neue Erkenntnisse zur Akkumulation und Verteilung C_4-typischer Transkripte gewonnen werden.

Neben C_3-Mesophyll wurden ebenso C_4-Mesophyll und Bündelscheidenzellen isoliert. Die Gewebe Laubblatt und Hüllblatt dienten dabei als zusätzliche Kontrolle. Als Maß für die Kontaminationsfreiheit der Gewebe dienten drei Markerenzyme, die schon in früheren Untersuchungen genutzt wurden. Als C_4-Mesophyllmarkergen wurde Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) verwendet, während die Bündelscheidenpäparationen mittels Malatenzym (ME) und Ribulose1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) auf ihre

Reinheit überprüft wurden. Für das C_3-Mesophyll gab es keine spezifischen Marker, hier diente die Abwesenheit der C_4-typischen Transkripte bei gleichzeitiger Akkumulation von Rubisco zur Festlegung des Kontaminationsgrades. Aus vorherigen Untersuchungen war bekannt, dass auch etiolierte Laubblättern oder Blätter mit nicht komplett ausgebildeter C_4-Anatomie ein C_3-typisches Genexpressionsmuster zeigen (Crespo et al., 1979; Cribb et al., 2001; Langdale et al., 1988). Daher wurde besonderer Wert darauf gelegt in dieser Arbeit nur ausreichend belichtetes Blattmaterial in die Untersuchungen einzusetzten (2.1). Bei den Hüllblättern wurden nur solche Bereiche des Blattes verwendet, die eine deutliche Grünfärbung aufgrund von zahlreichen Chloroplasten aufwiesen und deren Kranzanatomie vollständig ausgebildet war (Daten nicht gezeigt). Um eine ausreichende Genexpression der photosynthetisch relevanten Gene zu gewährleisten, erfolgte die Entnahme der Blattproben zu einer Tageszeit, die eine vorherige 6-stündige Belichtung sicherstellte (2.1).

In den beiden Mischgeweben Laub- und Hüllblatt wurden alle drei Markergene exprimiert, wobei das Hüllblatt im Allgemeinen eine weniger starke Akkumulation der Transkripte zeigt. Dies beruht wahrscheinlich auf der niedrigeren Photosyntheserate dieses Gewebes (Langdale et al. 1988). In den isolierten Teilgeweben konnte dagegen eine klare Anreicherung der jeweils spezifischen Marker erreicht werden. So zeigte das C_3-Mesophyll eine Akkumulation von Rubisco im Vergleich zum Hüllblatt, wogegen die Transkripte von PEPC und ME kaum detektierbar waren. Dies konnte hier zum ersten Mal an isoliertem C_3-Mesophyll aus Hüllblättern gezeigt werden. Das C_4-Mesophyll wies ein Expressionsmuster mit einer minimalen Expression von Rubisco und ME, aber einer offensichtlichen Akkumulation von PEPC auf. Im Gegensatz dazu waren bei den Bündelscheiden nur wenige Transkripte von PEPC nachweisbar, aber ME wies eine auffallend hohe Expression auf. Da die Bündelscheiden den Zelltyp der C_4-Photosynthese repräsentieren, in dem die Freisetzung und Refixierung des CO_2 stattfindet, wäre hier ebenfalls eine Anreicherung der Rubiscotranskripte zu erwarten gewesen. Im Vergleich zum Laubblatt konnte dies aber nicht gezeigt werden. Dies ist wahrscheinlich auf die rigide Präparation der Bündelscheiden zurückzuführen und die wohl eher geringe Stabilität der Rubisco-mRNA. Das Verhältnis von PEPC als C_4-Mesophyllmarker zu ME und Rubisco belegt aber die geringe Kontamination der isolierten Bündelscheidenzellen mit C_4-Mesophllzellen. Eventuell ist die PEPC-Expression in den Bündelscheiden dabei auch auf die Anreicherung der Epidermis während der Präparation zurückzuführen. So gibt es Hinweise, die auf ein Vorkommen von C_4-spezifischer PEPC in den Nebenzellen der Stomata deuten (Langdale et al., 1987).

Insgesamt weisen die präparierten Gewebe mit Werten zwischen 1 und 5 % einen sehr niedrigen Grad an Kontamination auf. Die Reinheit der isolierten C_4-Mesophyllzellen und der Bündelscheiden ist daher durchaus mit aus Northern-Hybridisierungen ermittelten Daten früherer Untersuchungen vergleichbar, bei denen ebenfalls Kontaminationsgrade von < 2 % für das Mesophyllgewebe und < 5 % für isolierte Bündelscheiden erreicht wurden (Sheen and Bogorad, 1986). Für das präparierte C_3-Mesophyll liegen keine Vergleichsdaten vor, da dieses Gewebe bisher nicht isoliert wurde. Die Charakterisierung der präparierten Gewebe zeigte also, dass eine weitestgehend kontaminationsfreie Isolierung der Gewebe stattgefunden hat. Daher konnten die aus ihnen präparierten RNA-Proben auch zur Quantifizierung der Transkripte und Erstellung von Verteilungsmustern anderer C_4-relevanter Gene genutzt werden.

Da Rubisco eine entscheidende Rolle sowohl in der C_3- als auch in der C_4-Photosynthese und der Photorespiration spielt, wurde die relative Akkumulation der zwei bekannten Isoformen der kleinen Untereinheit von Rubisco (1.2.1) und ihr Verhältnis zueinander im Einzelnen betrachtet. Dabei sollte ermittelt werden, ob die verschiedenen Genprodukte möglicherweise unterschiedliche Funktionen in der Photosynthese ausüben. Die Analysen basierten auf Hinweisen von Ewing et al. (1998), dass die Rubiscotranskripte in Hüllblättern vornehmlich auf der Expression von *RbcS1* beruhen und *RbcS2* dagegen eher in den C_4-Geweben gebildet wird. Diese Beobachtung wurde auf die differentielle Lichtinduktion der Gene der Rubisco zurückgeführt, da die Promotoren der RbcS-Gene auf Licht roter und blauer Wellenlänge unterschiedlich reagieren (Purcell et al., 1995). Insbesondere bei den Hüllblättern würde dies zu Unterschieden in der Expression von *RbcS1* und *RbcS2* führen, da diese überlappend angeordnet sind und so nicht alle Blattbereiche der gleichen Lichtqualität ausgesetzt sind. Die äußeren Hüllblätter wirken dabei aufgrund der in ihnen enthaltenen Chlorophylle und Carotinoide wie Filter und absorbieren große Mengen an rotem und blauem Licht, so dass hauptsächlich Licht dunkelroter Wellenlänge die inneren Hüllblätter erreicht. Um Effekte aufgrund dieser unterschiedlichen Lichtbedingungen auszuschließen, wurden zur Präparation der Gewebe innerhalb dieser Arbeit nur die nicht verdeckten Bereiche der äußeren Blätter des Kolbens verwendet. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben den Lichteffekten die Position der Zelle im Verhältnis zum Leitbündel entscheidenden Einfluss auf die Expression der beiden Rubisco-Gene hat.

Dazu wurden zwei zusätzliche Primersysteme entwickelt, die eine Unterscheidung von *RbcS1* und *RbcS2* erlaubten. Die Untersuchungen zeigten, dass sich C_3- und C_4-Gewebe hinsichtlich der bevorzugten RbcS-Expression unterscheiden. Während *RbcS1* präferentiell im C_3-Gewebe

auftrat und damit auch stark im Hüllblatt exprimiert wurde, ist diese differentielle Akkumulation in den C_4-Geweben nicht zu beobachten, dort liegt eine in etwa gleichwertige Expression der beiden Gene der kleinen Untereinheit von Rubisco vor. Besonders aufschlussreich war der Vergleich von C_3-Mesophyll und Hüllblatt. Da das C_3-Gewebe aus Hüllblatt isoliert wurde und beide Gewebe den identischen Lichtbedingungen ausgesetzt waren, scheint hier die Position der Zelle bzw. die Entfernung zum Leitbündel entscheidend für die präferentiell differentielle Rubiscoexpression zu sein. Dies lässt vermuten, dass der Effekt des Lichtes im Zusammenhang mit der gewebespezifischen Expression der zwei Isoformen von Rubisco in den Blattgeweben von Mais daher eine untergeordnete Rolle spielt.
Wie schon erwähnt, ist außer der räumlichen Anordnung der Zelle innerhalb des Gewebes die Lichtinduktion ein weiteres wichtiges Kontrollelement bestimmter Genexpressionsmuster in Pflanzen.
In diesem Zusammenhang sind die in Mais bekanntesten und am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren DOF1 und DOF2. Sie wurden bereits 1998 von Yanagisawa als mögliche Regulatoren C_4-spezifischer Expression in Mais vorgeschlagen (Yanagisawa and Sheen, 1998). Während DOF1 konstitutiv in allen Geweben exprimiert wird, ist die Expression von DOF2 weitgehend auf den Stängel und die Wurzel von Mais beschränkt. Im Fall der C_4-spezifischen Isoform des PEPC-Gens fungiert laut einem Modell von Yanagisawa und Sheen (1998), DOF1 als Aktivator, der erst nach Belichtung im Blattgewebe aktiviert wird. In den photosynthetisch inaktiven Geweben Wurzel und Stängel dagegen wird DOF1 durch DOF2 inhibiert und die PEPC-Expression wird unterdrückt (Abbildung 20). Neuere Daten Yanagisawas (2000) zeigen allerdings, dass DOF2 nicht generell reprimierend wirkt, sondern in einigen Fällen abhängig vom Kontext des Promotors auch aktivatorische Funktionen erfüllen kann.

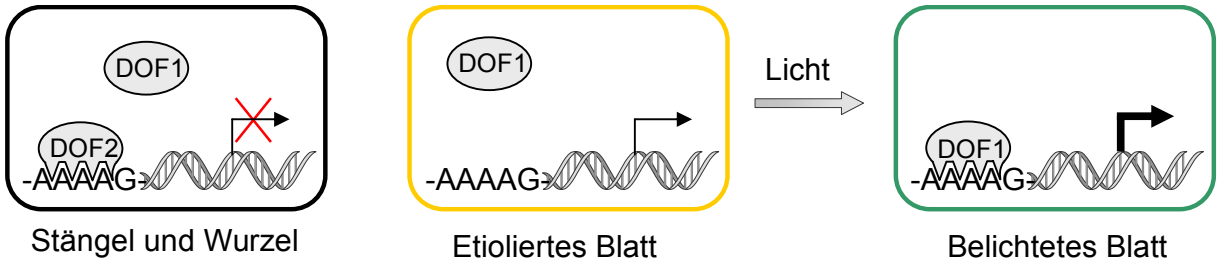


Abbildung 20: Modell der licht- und gewebeinduzierten Genexpression des PEPC-Gens durch die Proteine DOF1 und DOF2 in *Zea mays* nach Yanagisawa & Sheen

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der durch DOF1 und DOF2 vermittelten Genexpression der C_4-spezifischen Isoform des PEPC-Gens in Mais (Yanagisawa and Sheen, 1998). Im Fall eines etiolierten Blattes liegt DOF1 in inaktiver Form vor und nimmt daher keinen Einfluss auf die Expression des PEPC-Gens. Nach der Induktion durch Licht bindet die aktivierte Form von DOF1 an den PEPC-Promotor und löst dadurch eine verstärkte Transkription aus. Inwieweit weitere Faktoren hieran beteiligt sind, ist noch unklar. Im Stängel und der Wurzel dagegen ist neben DOF1 auch DOF2 anwesend und inhibiert durch kompetitive Bindung eine mögliche Expression des PEPC-Gens. Die Stärke der Transkription wird durch die Dicke des Pfeils angegeben, eine unterdrückte Transkription symbolisiert ein durchgestrichener Pfeil. In der Zeichnung wird die DOF-Binde-Domäne auf der DNA als AAAAG Sequenzmotif gezeigt.

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten keine Transkripte von DOF2 in belichteten Blättern nachweisen und bestätigten daher vorherige Beobachtungen geringerer Sensitivität (Yanagisawa and Sheen, 1998). Da in keinem der untersuchten Blattgewebe DOF2-Transkripte nachweisbar waren und somit auch keine differentielle Expression im Vergleich der C_3- und C_4-Geweben auftrat, scheint DOF2 im Hinblick auf die Ausbildung eines speziellen Photosynthesetyps innerhalb der Blattgewebe keine Rolle zu spielen. Die nahe liegende Annahme, dass DOF2 als Repressor C_4-typischer Genexpression im C_3-Mesophyll des Hüllblattes wirkt, ist daher ausgeschlossen. So lassen die Ergebnisse vermuten, dass sich die Kontrollmechanismen, die für Ausbildung eines C_3- oder C_4-Photosynthesetypes einer bestimmten Zelle verantwortlich sind, sich von den Regulationssystemen, die zwischen photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Organen differenzieren, unterscheiden.

In dieser Hinsicht tritt ein Problem bei der Betrachtung des auf Yanagisawas Daten basierten Modells und den hier gemessenen Daten auf. Bei Mais wird der Stängel aus mehreren Schichten Blattscheiden gebildet, die einen ähnlichen anatomischen Aufbau wie das Hüllblatt zeigen und oftmals mit diesem zur Gruppe der blattähnlichen Organe zusammengefasst wurden (Langdale et al., 1988). Da in dieser Arbeit keine DOF2-Transkripte in den Hüllblattgeweben festgestellt werden konnten, scheinen diese Ergebnisse im Widerspruch zu der im Stängel auftretenden DOF2-Akkumulation aus Yanagisawas Untersuchungen zu stehen. Eine Erklärung hierfür könnte in den unterschiedlichen Lichtbedingungen, denen der Stängel ausgesetzt ist und der schon angesprochenen Filterwirkung sich überlagernder

Blattgewebe liegen. Der Grossteil der Blattscheiden erhält somit nur sehr wenig Licht, während in dieser Arbeit ausdrücklich nur ausreichend belichtete Gewebebereiche des Hüllblattes verwendet wurden (2.1).

Bei der Quantifizierung von DOF1 zeigt sich im Vergleich zu DOF2 ein anderes Bild; hier war die Expression des Transkriptionsfaktors in allen untersuchten Geweben detektierbar. Auffallend war die starke Akkumulation von DOF1-Transkripten im Hüllblatt, die im Vergleich zum Laubblatt fast doppelt so stark auftrat. Dies wird noch deutlicher in Vergleich mit der Quantifizierung der PEPC-, ME- und Rubisco-Transkripte (3.3), die im Gegensatz dazu nur die Hälfte der Transkriptmengen des Laubblattes erreichen. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Blätter sich auf die Expression von DOF1 auswirken und so kein direkter Vergleich zwischen den DOF-Transkriptmengen des Hüllblattes und des Laubblattes möglich ist. Auch bei Betrachtung der anderen Gewebe kann keine deutliche Korrelation zwischen den Transkripten der an der Photosynthese beteiligten Gene und der DOF1-Expression gefunden werden. Neben dem Hüllblatt zeigt auch das C_4-Mesophyll eine starke Akkumulation von DOF1-Transkripten, die ca. dreimal höher ist, als die Transkriptmenge in den Bündelscheiden. Eine mögliche Degradation der DOF1-Transkripte in den Bündelscheiden während der Isolierung aufgrund der rigiden Präparationsmethode ist unwahrscheinlich, da das Laubblatt einen mittleren Wert aufweist und somit wohl den Durchschnitt der Expression in den Teilgeweben Mesophyll und Bündelscheide darstellt. Da bisher nur mesophyllspezifische Promotoren auf ihre Interaktion mit DOF1 getestet wurden, deuten diese neuen Daten auch auf eine Rolle von DOF1 in der Kontrolle photosynthetischer Genexpression in der Bündelscheide hin.

Inwieweit sich die Funktion von DOF1 auf photosynthetisch-relevante Promotoren beschränkt, ist allerdings noch unklar. Für eine weitere Gruppe von Zielpromotoren sprechen etwa Analysen von Yanagisawa (2000), in denen DOF1 auch in Zusammenhang mit der Aktivierung einiger Promotoren der nicht C_4-spezifischen Isoformen der PPDK- und PEPC-Gene gebracht wird. Eine generelle regulatorische Funktion der DOF-Proteine im Kohlenstoffstoffwechsel von Pflanzen ist daher nicht auszuschließen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten betonen noch einmal, dass sich die Regulationsmechanismen einer positionsgesteuerten Entwicklung von denen einer lichtinduzierbaren Zellidentität unterscheiden. Der starke Einfluss der Position der Zelle auf ihre Genexpression und Entwicklung wurde auch bereits in anderen Systemen gezeigt. Ein besonders interessantes Beispiel für die Positionsabhängigkeit der Zellentwicklung wurde von van den Berg 1995 beschrieben. So ist in den Wurzelgeweben von Arabidopsis nicht das

ursprüngliche Gewebe, aus dem die Zelle entstanden ist, entscheidend für die Festlegung ihrer Entwicklung, sondern die Position der Zelle. In den Versuchen von van den Berg (1995) wurden mit Hilfe der Lasertechnologie einzelne Zellen in verschiedenen Bereichen der Wurzel abgetötet. Die aus den benachbarten Geweben nachwachsenden Zellen nahmen die Position der abgestorbenen Zelle ein und wechselten entsprechend des neuen Gewebes ihre Genexpression und damit den Zelltyp. Der Einfluss der Position einer Zelle kann also für die Differenzierung der Zelle von stärkerer Bedeutung sein als ihr klonaler Ursprung. Als Erklärung wurde ein Signal bereits entwickelter Zellen angenommen, dass an die neuen Zellen abgegeben wurde und deren Differenzierung steuerte (Van Den Berg et al., 1995). Auch bei den Epidermiszellen der Wurzel von Arabidopsis ist die Entwicklung der Zelle zur Haar- oder Nicht-Haar-Zelle abhängig von der Lage der Epidermiszelle zu den darunterliegenden Cortexzellen (Berger et al., 1998).

Auch im Maisblatt bestimmt bei der Ausbildung des vaskulären Systems die Position der Zelle den entstehenden Zelltyp. So bilden sich zuerst die Mittelrippe und dickere Leitbündel aus. Erst später mit dem Breitenwachstum des Blattes werden kleinere Leitbündel in definierten Abständen zwischen großen Leitbündeln eingezogen. Dabei entwickeln sich die neuen Leitbündel parallel zu den schon existierenden Leitbündeln, sind aber nicht mit diesen verbunden. Die Position der entwickelten Leitbündel beeinflusst also entscheidend die Ausbildung des weiteren vaskulären Systems. Auch hier scheint ein Regulationsfaktor von bereits ausdifferenziertem Gewebe an die umliegenden Zellen abgegeben zu werden (Nelson and Dengler, 1997). In der Wurzel von Arabidopsis konnte bereits ein solcher interzellulär beweglicher Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden, der die Gewebeentwicklung innerhalb der Wurzel beeinflusst. Dieser Transkriptionsfaktor SHR (short-root) wird nur in der Stele der Wurzel exprimiert, während das Protein anschließend in den Nukleus der benachbarten Zellen eindringt und Effekte auf die Genexpression und die dadurch bedingte Zellentwicklung ausübt (Nakajima et al., 2001). Die Mechanismen zur Regulation einer positionsbezogenen Zellidentität sind also unabhängig von den Regulationsmechanismen einer durch Lichtinduktion bestimmten Zellentwicklung.

4.2 Subtraktionsanalyse zur Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte im Hüllblatt

Neben den durchgeführten Analysen zur Untersuchung bekannter Gene im Zusammenhang mit dem C_4-Syndrom war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung neuer an der C_4-Photosynthese beteiligter Gene. Da Mais, wie geschildert, in den Hüllblättern neben C_4-Mesophyll und Bündelscheiden auch C_3-Mesophyll aufweist, bot sich die Möglichkeit, einen direkten Vergleich von einem C_3-Gewebe mit C_4-Geweben einer Pflanze durchzuführen. In bisherigen Experimenten dagegen wurden hauptsächlich die zwei typischen C_4-Gewebe, Mesophyll und Bündelscheide, miteinander verglichen. Diese Untersuchungen zu differentiellen Genexpressionsmustern und zur Identifizierung der daran beteiligten Gene nutzten meist die Methoden des Differential Screening oder cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Bachem et al., 1998; Durrant et al., 2000; van der Biezen et al., 2000). Bei der Technik des Differential Screening werden genomische Phagenbanken mit Hilfe von cDNA-Sonden spezifisch für das jeweilige Gewebe auf eine differentielle Genexpression untersucht. Diese Methode ist sehr robust, erfordert aber erheblichen experimentellen Aufwand und zeigt geringe Spezifität. Da die Sensitivität ebenfalls gering ist, lassen sich selten transkribierte und damit unterrepräsentierte RNAs kaum detektieren.

Die Technik des cDNA-AFLP dagegen berücksichtigt aufgrund einer PCR-Amplifikation auch weniger stark auftretende RNAs und erlaubt die Betrachtung mehrerer Gewebe gleichzeitig. Dazu werden alle cDNAs eines Gewebes amplifiziert und Teilpopulationen mit den amplifizierten cDNAs weiterer Gewebe verglichen. Die Auftrennung der erhaltenen Amplifikate erfolgt gelelektrophoretisch und die entstandenen Produkte zeigen ein charakteristisches Bandenmuster des jeweiligen Gewebes. Durch einen Vergleich dieser Bandenmuster können so differentiell exprimierte Gene gefunden werden.

Die Technik des Differential Screening wurde bereits in früheren Untersuchungen zur Analyse des C_4-Syndroms verwendet. Dazu wurde eine cDNA-Bank aus der RNA des Laubblattes von *Sorghum* erstellt und mit cDNA Sonden aus isolierten Mesophyll- und Bündelscheidengeweben hybridisiert. So konnten ca. 350 differentiell exprimierte Gene detektiert werden, die sich aus schon bekannten Genen und zahlreichen unbekannten Genen mit zum Teil unklarer Funktion zusammensetzten (Wyrich et al., 1998). In dieser Arbeit dagegen wurde zu Beginn zusätzlich zu der im Ergebnisteil aufgeführten Methode der subtraktiven Hybridisierung die Technik des cDNA-AFLP angewandt. Diese Methode erwies

sich als nicht sehr robust und erforderte eine aufwändige Optimierung, da die mit der cDNA-AFLP-Technik erhaltenen Bandenmuster der einzelnen Gewebe anfangs sehr verschieden wirkten. Dabei ließ sich meist kein logischer Zusammenhang zwischen den ursprünglichen Geweben und den daraus präparierten Teilgeweben erkennen. So tauchten z.B. Banden in den PCR-Produkten der Reaktion mit cDNA aus Bündelscheidenpräparationen auf, die aber nicht in den amplifizierten Produkten der Laub-cDNA zu erkennen waren. Hinzu kamen technische Probleme, wie starke Hintergrundsignale und insgesamt unterschiedliche Signalstärken der PCR-Produkte je nach Gewebe. Ein weiterer Nachteil war die teilweise schwere Reamplifikation der als differentiell eingestuften Fragmente und deren geringe Größe von durchschnittlich ca. 250 bp. Hinzu kam, dass bei der Auswertung der als differentiell eingestuften Transkripte zum Großteil ribosomale RNAs nachgewiesen wurden. Aufgrund dieser Nachteile wurde die Technik zur Identifizierung differentieller Transkripte im Hüllblatt von Mais gewechselt und die Methode der subtraktiven Hybridisierung verwendet.

4.2.1 Charakterisierung der erhaltenen Bibliothek

Die in dieser Arbeit verwendete subtraktive Hybridisierung stellt eine attraktive Alternative zu bisher eingesetzten Techniken zur Analyse differentieller Genexpression dar. Sie ermöglicht die Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte bei gleichzeitiger selektiver Bevorzugung selten auftretender Transkripte.

In den hier durchgeführten Untersuchungen sollten die RNA-Populationen des C_3-Mesophylls von der des Hüllblattes mit seinen drei Geweben Bündelscheiden, C_4-Mesophyll und C_3-Mesophyll subtrahiert werden, um so typische Gene für die C_4- Gewebe anzureichern. Die Anreicherung erfolgt dabei nach der Hybridisierung der cDNAs der jeweiligen Gewebe in zwei aufeinander aufbauenden Suppressions-PCR-Reaktionen (2.12). Aus diesen PCR-Schritten wurde ein Gemisch aus PCR-Fragmenten erhalten, welches die angereicherten C_4-typischen Transkripte repräsentierte. Diese waren im Durchschnitt ca. 500 bp groß und damit deutlich größer als die durch cDNA-AFLP identifizierten Fragmente. Die Analyse der klonierten Fragmente ergab eine ähnliche Größenverteilung, so dass man davon ausgehen kann, dass kaum cDNAs aufgrund von Größenselektion verloren gingen. Um die erhaltenen cDNAs auf ihre differentielle Akkumulation in den Geweben zu überprüfen, wurden sie in Form von PCR-Produkten punktuell auf eine Nylonmembran aufgebracht und eine Hybridisierung mit gewebespezifischen cDNA-Sonden (C_3-Mesophyll, C_4-Mesophyll und Bündelscheiden) durchgeführt (2.11). Gleichzeitig konnte so eine Einordnung in bündelscheidenspezifisch, C_4-Mesophyll spezifisch oder allgemein C_4-spezifisch (in beiden

C_4-Geweben exprimiert) vorgenommen werden. In dieser Arbeit wurden 526 Fragmente durch eine Hybridisierung mit gewebespezifischen Sonden in Form einer reversen Northern-Hybridisierung auf differentielle Akkumulation untersucht. Dabei zeigten fast 16 % der Fragmente ein stärkeres Hybridisierungssignal in den C_4-typischen Geweben als in dem C_3-spezifischen Gewebe.

15 % der Transkripte dagegen wurden durch keine der drei Sonden nachgewiesen, da sie aufgrund mangelnder Sensitivität der Methode unter der Detektionsgrenze lagen. Die Abundanz dieser Transkripte in den Geweben ist wahrscheinlich sehr gering, da trotz einer Amplifikation der cDNA innerhalb der Sondenherstellung nicht genügend markierte Sequenzen zur Hybridisierung vorhanden waren, um ein nachweisbares Signal zu erzeugen. Auf diese Problematik wird in Kaptitel 4.2.2 noch ausführlich eingegangen.

Im Gegensatz zu den nicht detektierbaren Transkripten zeigten 41,8 % nach der Hybridisierung zwar ein Signal, aber von gleicher Intensität in allen Geweben. Auch in diesem Fall ist die mangelnde Genauigkeit der Hybridisierungsreaktion möglicherweise die Ursache. Kleinere Unterschiede in der Expression dieser Transkripte und damit auch kleine Unterschiede in den Signalstärken nach der Hybridisierung lassen sich mit Hilfe dieser Technik nicht feststellen. Da aber anzunehmen ist, dass Gene, die an der Etablierung und Aufrechterhaltung des C_4-Syndroms beteiligt sind, eine deutlich differentielle Expression in den C_4- und C_3-Geweben aufweisen, sind Transkripte mit schwach unterschiedlich ausgeprägten Akkumulationsmustern von geringerem Interesse.

6,1 % der analysierten Transkripte wiesen trotz Subtraktion das stärkste Signal in der Hybridisierung mit der C_3-Mesophyll-Sonde auf. Eine Erklärung hierfür liegt wahrscheinlich in unspezifischen Bindungen der Sonde. In der Markierungsreaktion zur Herstellung der Sonde werden alle cDNAs des jeweiligen Gewebes mit Digoxigenin markiert, so dass Sequenzen mit homologen Bereichen zu den aus der Subtraktion hervorgegangenen Transkripten ebenfalls an die Transkripte binden können. Da die auf die Membran aufgebrachten Transkripte im Schnitt ca. 500 bp groß sind, sind Hybridisierungen mit ähnlichen Sequenzen durchaus denkbar. Insgesamt 69 % der cDNAs zeigten nicht das erwartete Expressionsmuster in dieser Analyse. Das spricht gegen eine effiziente Anreicherung C_4-typischer Transkripte. Dennoch zeigten ca. 16 % der untersuchten cDNAs eine präferentielle Akkumulation in den C_4-typischen Geweben. Eine Auswahl an cDNAs mit möglichst deutlichen Unterschieden der Signalstärken in der reversen Northern-Analyse wurde sequenziert, um diese weiter zu charakterisieren. So konnten mit den erhaltenen

Sequenzinformationen Datenbankanalysen durchgeführt werden, um eventuelle Homologien zu anderen Sequenzen mit bereits bekannter Funktion des Genproduktes zu identifizieren.
Diese Datenbankanalysen der ausgewählten Transkripte ergaben, dass fast 70 % der aus der Subtraktion hervorgegangen und sequenzierten Transkripte zu Genen des plastidären Genoms komplementär waren. Die Analysen der restlichen 15 nach der Subtraktion untersuchten Transkripte, die keine Chloroplasten-DNA repräsentierten, ergab zumeist Homologien zu mRNAs aus Mais unbekannter Funktion, die aus EST-Analysen (expressed sequence tags) hervorgegangen waren. Zwei Transkripten konnten dennoch Funktionen zugeordnet werden. Zum einen wies das Transkript 42 Homologien zu einer mRNA eines HMG-Proteins auf und zum anderen zeigte Transkript 129 Überseinstimmungen der Sequenz zu einer mRNA einer Histon-Deacetylase. Beide Funktionen stehen im Zusammenhang mit der Strukturänderung des Chromatins im Verlauf zellkernbedingter Prozesse wie beispielsweise Replikation oder Transkription (Bustin and Reeves, 1996; Lusser et al., 2001).
Neben den Analysen der untersuchten Transkripte mittels DNA-Sequenz-Übereinstimmungen wurde auch auf Ebene der möglichen Translationsprodukte versucht, die Funktion dieser Transkripte näher zu charakterisieren. Doch auch hier ergab sich zumeist kein deutlicher Hinweis auf ihre Funktion. Nur im Fall von zwei weiteren Transkripten konnten so Übereinstimmungen zu bekannten Proteinen gefunden werden, die auf RNA-Ebene noch nicht nachweisbar waren.
Zusätzlich wurden anhand der Sequenzinformationen Primersysteme für einige Transkripte erstellt, die zur Verifizierung der Ergebnisse der reversen Northern-Analyse in einer Real-Time-PCR genutzt wurden. Diese Technik weist eine wesentlich höhere Sensitivität als die Hybridisierungen in der reversen Northern-Analyse auf und ist sehr spezifisch, da mit den gewählten Primern in der Regel nur ein einzelnes Produkt amplifiziert wurde. Der Arbeitsaufwand zur Identifikation differentieller Transkripte mittels Real-Time-PCR ist allerdings sehr groß, so dass eine vorherige Anreicherung bzw. Eingrenzung der zu untersuchenden Transkripte durch die optimierte Technik eines reversen Northerns durchaus sinnvoll erscheint.
Die erhöhte Spezifität der Analytik erklärt auch die auftretenden Unterschiede zwischen den Ergebnissen der reversen Northern-Analyse und den aufgenommenen Akkumulationsmustern einiger Transkripte mittels Real-Time-PCR (Tabelle 4).
So zeigten z. B. die Transkripte 89, 94 und 314 im den reversen Northern-Untersuchungen kein klares differentielles Genexpressionsmuster, wiesen aber in der Real-Time-PCR eine deutliche Akkumulation in der Bündelscheide auf.

Neben den Transkripten mit einer bündelscheidenspezifischen Akkumulation ergaben die Daten der Real-Time-PCR für die cDNAs 42 und 129 eine präferentielle Expression im Laubblatt. Bei Transkript 42 ist die Akkumulation in den C_4-spezifischen Geweben des Laubblattes sogar zwischen 6- und 8-fach stärker als im C_3-Mesophyll. Ein Einfluss dieser Transkripte auf die Etablierung oder Aufrechterhaltung des C_4-Syndroms ist also durchaus möglich. Allerdings wäre im Hüllblatt eine leicht erhöhte Akkumulation des Transkriptes gegenüber dem C_3-Mesophyll zu erwarten gewesen, da das Hüllblatt neben dem C_3-Mesophyll auch geringe Anteile von C_4-Mesophyll und Bündelscheiden aufweist.
Im Fall des Transkriptes 448 war aufgrund der Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz zu einem ribosomalen Protein keine spezifische Expression für C_4-photosynthetisch aktive Gewebe zu erwarten. Da die Hybridisierungen in der reversen Northern-Analyse jedoch auf eine bündelscheidenspezifische Expression hindeuteten, wurde auch von diesem Transkript ein Akkumulationsmuster in den fünf Geweben aufgenommen. Die Quantifizierung mittels Real-Time-PCR zeigte jedoch in keinem der Gewebe eine deutliche differentielle Akkumulation des Transkriptes 448 und bestätigte so die ursprünglichen Erwartungen.
Trotz einiger methodischer Probleme konnten in der Real-Time-PCR-Analyse sechs der sequenzierten Transkripte mit unklarer Funktion als präferentiell in der Bündelscheide akkumulierend identifiziert werden. Diese Transkripte stellen möglicherweise potentielle Kandidaten in der Etablierung und Aufrechterhaltung der C_4-Photosynthese dar.
Daher wurde für die cDNA 239 versucht, mittels der Sichtung einer genomischen Bibliothek und der Genome Walking-Technik (2.10.3) mehr Sequenzinformation zu erlangen und so neue Erkenntnisse zur Funktion zu gewinnen. Genomische Banken enthalten im Gegensatz zu cDNA-Banken das gesamte Gen einschließlich des Promotorbereichs und bieten darüber hinaus den Vorteil, dass sie alle Gene enthalten und zur Analyse aller Maissequenzen dienen können.
Das Transkript 239 ist in den Mesophyllgeweben fast gar nicht zu detektieren, sondern akkumuliert nur in der Bündelscheide. Entgegen der Erwartung ist allerdings die Expression des Transkriptes 239 im Hüllgewebe stärker als im Laubblatt. Das ist insofern unerwartet, da die Bündelscheiden aus dem Laubblattgewebe isoliert wurden und das Hüllblattgewebe im Vergleich zum Laubblatt weniger Bündelscheiden enthält. Weiterhin steht dies im Gegensatz zum Akkumulationsmuster der Transkripte der Markergene, die im Hüllblatt alle schwächer exprimiert werden als im Laubblatt. Eine mögliche Erklärung für dieses Muster ist das unterschiedliche Entwicklungsstadium der Blattgewebe oder möglicherweise eine durch Umwelteinflüsse wie Trockenstress oder Pathogenbefall ausgelöste Genexpression in den

Hüllblättern. Die Ergänzung der ursprünglichen Sequenz des Transkriptes 239 um mehr als 2000 bp genomischer DNA-Sequenz konnte nicht zur Aufklärung der Funktion beitragen, da ein Großteil der neuen Sequenz ein Intron zu repräsentieren scheint. Die Rolle des Transkriptes in der Pflanze bleibt daher unklar. Die Datenbankanalysen lassen jedoch eine Rolle im Zusammenhang mit der C_4-Photosynthese erwarten, da nur in Mais homologe Bereiche identifiziert werden konnten, jedoch keine Überstimmungen zu den vollständig sequenzierten Genomen der C_3-Pflanzen Reis und Arabidopsis gefunden wurden.
Da die nächsten Schritte zur Charakterisierung der in dieser Arbeit identifizierten bündelscheidenspezifischen Transkripte maßgeblich von ihrer Funktion abhängen, ist die Gewinnung der Gesamtsequenzinformation bedeutsam. Anschließend könnten beispielsweise heterologe Expressionsanalysen zur Aufklärung der Rolle dieser Transkripte bei der Etablierung und Aufrechterhaltung des C_4-Syndroms beitragen, wie z.B. die Analysen Yanagisawas et al. (2004).

4.2.2 Effekte plastidärer RNAs auf die Subtraktionanalyse

Wie schon im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Datenbankanalysen der differentiell exprimierten Transkripte erwähnt, ist die Anzahl plastidärer Transkripte nach der Subtraktion unerwartet hoch. Eine ähnliche Erfahrung wurde mit der Technik des cDNA-AFLP ebenfalls gemacht. Dabei stellten sich die meisten der als differentiell eingestuften Transkripte ebenfalls nicht als mRNA, sondern als ribosomale RNA heraus.
Plastidäre und ribosomale RNAs enthalten im Gegensatz zu mRNAs keine PolyA-Enden und sollten daher bei der Umschreibung in cDNA mittels eines Oligo(dT)-Primers aufgrund des fehlenden Bindebereichs für den Primer diskriminiert werden. Eine mögliche Erklärung für die dennoch auftretenden cDNAs aus Chloroplasten-RNA ist das so genannte „Selfpriming“. Hierbei kommt es zu einer Faltung der RNA, wodurch kurze doppelsträngige Bereiche entstehen, die der Reversen Transkriptase als Primer dienen können (Le Grice, 2003). Eine weitere Erklärung wäre die Bindung des Oligo(dT)-Primers an A-reiche-Regionen der Transkripte.
Da diese RNAs den Großteil an Gesamt-RNA darstellen, wurden die eigentlich interessanten mRNAs in den Hintergrund gedrängt. Dies wird zu einem besonders auffälligen Problem in der SMART-Amplifikation. Um die Mengenverhältnisse der RNAs zueinander nicht zu verschieben, wird die Amplifikation der RNAs in der SMART-PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase abgebrochen, da zu diesem Zeitpunkt ein lineares Verhältnis von Matrize zu Produkt besteht. Die Bestimmung der exponentiellen Phase fand durch den

gelelektrophoretischen Vergleich der erhaltenen Produkte aus PCR-Reaktionen statt, die nach einer verschiedenen Anzahl von Zyklen abgebrochen wurden. Die ebenfalls in cDNA umgeschriebenen plastidären und ribosomalen RNAs führen so zu einer falschen Einschätzung des Zeitpunktes der exponentiellen Phase. Sie sind überproportional stärker in der cDNA-Population vertreten und treten daher früher in die exponentielle Phase der PCR-Reaktion ein als die Amplifikation der meisten anderen cDNAs. Aufgrund dieser Problematik sind möglicherweise seltene mRNAs, die z.B. Transkriptionsregulatoren repräsentieren könnten, nicht ausreichend amplifiziert in die Subtraktion eingegangen.

Ein ähnliches Problem tritt bei der Sondenherstellung für die reverse Northern-Analyse auf. Auch hier wurde die gleiche cDNA-Population als Ausgangsmatrize für die SMART-PCR-Reaktion mit Digoxigenin verwendet und die Reaktion vor Erreichen der Plateauphase gestoppt. Dadurch ist es möglich, dass seltene RNAs nicht ausreichend amplifiziert wurden und somit die Signalstärke zur Detektion nach der Hybridisierung nicht ausreicht. Basierend auf den innerhalb dieser Arbeit erzielten Erfahrungen wurde daher bei einer weiteren Subtraktion im Rahmen einer Diplomarbeit (Kahlau, 2004) isolierte mRNA als Ausgangsmaterial zur cDNA-Präparation genutzt. Dadurch konnte der Anteil an Transkripten plastidären oder ribosomalen Ursprungs nach der Subtraktion auf 10 % gesenkt werden.

Ein weiterer Aspekt, der zur Identifizierung einer Vielzahl von Chloroplasten-Transkripten führte, ist die im Vergleich zu Zellen des C_3-Mesophylls wesentlich höhere Chloroplasten-Dichte in Bündelscheiden- und C_4-Mesophyllzellen. Dies führt dazu, dass die Sonden der jeweiligen Gewebe unterschiedliche Mengen an Chloroplasten-cDNA enthalten, die bei der Hybridisierung in der reversen Northern-Analyse zu stärkeren Signalen im Bündelscheiden- und C_4-Mesophyllgewebe führen. Das erklärt wahrscheinlich auch, dass alle nach der reversen Northern-Analyse als C_4-Mesophyll- und bündelscheidenspezifisch eingestuften Transkripte Homologien zum Chloroplastengenom zeigten.

Es ist allerdings auch denkbar, dass einige der nach der Subtraktion auftretenden plastidären Transkripte auf eine differentielle Expression der im Chloroplastengenom lokalisierten Gene zurückzuführen sind. Die Transkription plastidärer Gene erfolgt durch zwei verschiedene Polymerasen, zum einen durch eine kerncodierte Form und zum anderen durch eine im plastidären Genom codierte RNA-Polymerase. Diese plastidäre Form der RNA-Polymerase ist dabei auf σ-ähnliche Transkriptions-Initiationsfaktoren angewiesen, die wiederum im Kern codiert sind. Einige dieser Faktoren konnten bereits in Arabidopsis (Privat et al., 2003), Weizen (Ikeda and Gray, 1999), Senf (Kestermann et al., 1998) und Mais (Lahiri and Allison, 2000; Lahiri et al., 1999; Tan and Troxler, 1999) identifiziert und charakterisiert werden. Das

Maisgenom hat eine Genfamilie mit mind. fünf Genen, deren putative Produkte Ähnlichkeit zu σ-Faktoren haben. Einige dieser Faktoren zeigen ein differentielles Expressionsmuster, das gewebespezifisch oder lichtabhängig ist (Lahiri and Allison, 2000; Lahiri et al., 1999; Tan and Troxler, 1999). Eine Erklärung für das differentielle Expressionsmuster dieser Faktoren liegt möglicherweise in der Kontrolle der Chloroplastenexpression durch den Zellkern. Somit kann die Zelle durch die Transkription dieser Faktoren die Chloroplastenentwicklung steuern und auf Umwelteinflüsse wie Licht reagieren. Eine C_4-Spezifität der σ-ähnlichen Faktoren ist in Anbetracht der unterschiedlichen Expressionmuster in den untersuchten Geweben daher durchaus möglich.

Vorläufige Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit weisen auf eine gewebespezifische Expression eines σ-ähnliche Faktors hin. Der Faktor sig2 (gi:4336607) zeigte eine auf Laubblattgewebe beschränkte Akkumulation mit leicht präferentieller Akkumulation im C_4-Mesophyllgewebe (Daten nicht gezeigt). Eine durch diese σ-ähnlichen Faktoren vermittelte differentielle Expression plastidärer Gene zwischen dem C_4-spezifischen Gewebe und dem C_3-Mesophyll ist also nicht auszuschließen und begründet neben dem „Self-priming“ der stark vertretenen plastidären RNA in der Zelle möglicherweise die hohe Anzahl an Chloroplastentranskripten nach der Subtraktion. Eine solch differentielle Expression wäre wegen der unterschiedlichen Aufgabenverteilung von Chloroplasten in C_3- und C_4-Geweben auch zu erwarten. Es scheint daher angeraten, diese in dieser Arbeit nicht näher analysierten Transkripte weiter zu charakterisieren.

4.3 Das Hüllblatt als Modell zur Untersuchung des C_4-Syndroms

Im folgenden Kapitel soll das Hüllblatt als System zur Analyse der Regulation photosynthetischer Genexpression behandelt werden. Das blattähnliche Organ weist sowohl Gewebebereiche mit einer CO_2-Fixierung nach dem C_4-Mechanismus als auch nach dem C_3-Mechanismus auf. Diese ungewöhnliche Tatsache macht das Hüllblatt von Mais zu einer interessanten Alternative zur Untersuchung der C_4-Photosynthese. Bisher wurde zu diesem Zweck vor allen Dingen die Sichtung von Mutanten oder Untersuchungen der Gattung Flaveria oder Borszczowia genutzt. Im Folgenden sollen diese Ansätze kurz dargestellt werden, um einen Vergleich zum hier verwendeten System zu ermöglichen und dessen Potenzial kritisch einzuordnen.

4.3.1 Mutationsanalytische Verfahren

Die Analyse von mutierten Pflanzen zur Untersuchung der C_4-Photosynthese ist eine oft angewendete Technik. Die mutierten Pflanzen werden dabei auf die ihrem Phänotyp zu Grunde liegenden Mutationen untersucht, um neue Einblicke in die C_4-spezifische Photosynthese zu erhalten. Ein entscheidendes Problem besteht allerdings in der Differenzierung von Mutationen, die direkt die Photosynthese betreffen, von solchen, bei denen Veränderungen in der Physiologie oder Anatomie indirekt die Photosynthese beeinflussen. Aufgrund der Aufteilung der C_4-Photosynthese in zwei Zelltypen und den damit verbundenen anatomischen Anpassungen des Blattes ist die Wahrscheinlichkeit hoch auf Mutanten mit Störungen in der Blattentwicklung zu stoßen, die nur sekundär Einfluss auf die Regulation der C_4-Photosynthese haben. Da diese Mutanten oft einen deutlich veränderten Phänotyp zeigen, sind sie leicht zu identifizieren. Ein entscheidender Punkt zur Analyse von C_4-Mutanten sind daher die angewandten Kriterien zur Selektion von Pflanzen mit Mutationen im C_4-Stoffwechselweg, die nicht auf anatomischen Veränderungen beruhen. So lassen ein veränderter CO_2-Kompensationspunkt oder eine abweichende ^{13}C-Isotopendiskriminierung auf Mutationen im Stoffwechselweg schließen, aber sekundäre Effekte durch Störungen in der Anatomie können nicht ausgeschlossen werden.

Dennoch konnten mit Hilfe der Technik der Mutanten-Sichtung bereits mehrere interessante Gene isoliert werden, die Einfluss auf die Entwicklung der Bündelscheiden-Chloroplasten im Laubblatt von Mais nehmen. Aufgrund einer Mutation des Gens *bundle sheath defective2* entwickeln sich die Chlorplasten der Bündelscheiden unter Belichtung nicht normal und die typische Enzymausstattung der C_4-Photosynthese tritt nicht auf. Die Mesophyllzellen dagegen sind von dieser Mutation nicht betroffen und zeigen eine ungestörte Entwicklung unter Ausbildung der für sie spezifischen Enzyme. Im Gegensatz dazu hat die Mutation unter etiolierten Bedingungen Effekte auf beide Zelltypen. Zwar ist wiederum nur die Entwicklung der Bündelscheiden-Etioplasten ungewöhnlich, doch kann in beiden Zelltypen die im Wildtyp auftretende Rubisco-Expression nicht festgestellt werden. Sicherlich wäre in diesem Zusammenhang eine Untersuchung der Bündelscheiden des Hüllblattes auch interessant, da so auch die Auswirkungen der Mutation auf C_3-Mesophyllzellen analysiert werden könnten. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Mutation allelisch zu einer bereits zum ersten Mal vor 70 Jahren als *golden2* (Jenkins, 1927) beschriebenen Mutation ist. Nähere Charakterisierungen ergaben, dass es sich bei *golden2* um einen Transkriptionsregulator der zellulären Differenzierung im Maisblatt handelt (Cribb et al., 2001; Hall et al., 1998; Langdale and Kidner, 1994).

Eine weitere relevante Maismutante ist *tangled1*, in deren Laubblättern Bündelscheidenzellen auch in kleinen Gruppen ohne direkten Kontakt aller Zellen zum Leitbündel auftreten. Diese Bündelscheidenzellen zeigen die Charakteristika der C_4-Zellen und sind durch zusätzliche Teilung der ursprünglichen C_4-Bündelscheidenzellen entstanden. Dem *tan*-Gen wird daher eine Funktion im Zellzyklus zugeschrieben, die für das Stoppen des Zellteilungsprozesses nach der Differenzierung zuständig ist (Jankovsky et al., 2001; Smith et al., 1996).
Auch weiteren interessanten Phänotypen lagen Mutationen in Regulatoren der Zelldifferenzierung oder Blattentwicklung zugrunde, wie bei den Maismutanten *rough sheath2* (Tsiantis et al., 1999) oder *argentia* (Langdale et al., 1987). Bei diesen analysierten Mutanten lassen sich die primären Effekte schwer von den sekundären Effekten auf die C_4-Photosynthese unterscheiden. Die Wirkung der Gene ist wahrscheinlich unabhängig von der Induktion der C_4-Photosynthese und erfolgt erst nach Etablierung des C_4-Syndroms, beeinflusst es aber direkt oder indirekt in entscheidender Weise. Die Identifizierung regulatorischer Faktoren der C_4-Photosynthese auf einer von der Anatomie unabhängigen Ebene ist daher über diesen experimentellen Ansatz schwierig.

4.3.2 Subtraktionsanalytische Varianten

Interessante Perspektiven zu den im vorherigen Kapitel genannten Mutationsanalysen bieten daher C_4-Pflanzen mit einer von der Kranz-Anatomie unabhängigen Physiologie. In diesen Gattungen läuft eine C_4-artige Photosynthese innerhalb einer Zelle ab. Diese Pflanzen gehören zur Familie der Chenopodiaceae, welche die meisten C_4-Pflanzen innerhalb der dicotyledonen Familien aufweist (Sage et al., 1999).
Im Fall von *Bienertia cycloptera* und *Borszczowia aralocaspica* konnte erfolgreich gezeigt werden, dass diese Pflanzen Charakteristika der C_4-Pflanzen erfüllen, aber keine Kranz-Anatomie ausbilden. Dies gelang durch die Anordnung der photosynthetischen Enzyme und benötigten Zellorganellen wie Chloroplasten und Mitochondrien in bestimmten Zellbereichen. So ist bei *B. aralocaspica* das Enzym PPDK im distalen Teil der Zelle zu finden, wo es das Substrat für PEPC generiert, während sich ME und Rubisco in den Chloroplasten mehr im Zellinneren befinden. Aufgrund der langsamen Diffusion von Gasen in wässrigen Lösungen ist der Verlust an CO_2 nach Freisetzung durch ME gering, so dass die Pflanzen über eine effiziente CO_2-Pumpe verfügen. Kohlenstoffdiskriminierungs-Analysen, geringe Sauerstoff-Sensitivität der Rubisco und die C_4-typische Enzymausstattung weisen diese Pflanzen als C_4-Photosynthesetyp aus (Voznesenskaya et al., 2002; Voznesenskaya et al., 2001). Sie sind insofern zur Untersuchung des C_4-Syndroms interessant, da der in anderen C_4-Pflanzen eng

gekoppelte Ablauf von anatomischer Entwicklung und Etablierung des C_4-Stoffwechselweges hier nicht vorliegt.

Im Zusammenhang mit C_4-artigen Stoffwechselwegen innerhalb einer Zelle wäre eine Variante der in dieser Arbeit durchgeführten Subtraktion denkbar. Bei den Wasserpflanzen *Hydrilla verticillata* oder *Eleocharis vivipara*, die normalerweise eine C_3-typische Photosynthese durchführen, ist unter bestimmten Bedingungen oder durch Hormonzugabe sogar eine Induktion eines C_4-ähnlichen Stoffwechsels möglich (Magnin et al., 1997; Reiskind et al., 1997; Ueno, 1998). Somit könnte der Transkriptionsstatus des C_3-Stoffwechsel und des C_4-Stoffwechsels ohne anatomisch bedingte Veränderungen verglichen werden. Da durch diese Induktion wahrscheinlich aber eine Vielzahl von Genen induziert wird, die nicht direkt Einfluss auf die Photosynthese der Pflanze hat, wird im Fall einer Subtraktion eventuell keine wirkliche Anreicherung photosynthetisch relevanter Gene stattfinden. Des Weiteren ist nicht klar, ob die Induktion des C_4-ähnlichen Stoffwechsels die gleichen Mechanismen nutzt wie die Induktion des C_4-Photosynthesetyps in C_4-Pflanzen.

Neben den bisher genannten Systemen wurden viele bisherige Untersuchungen zur C_4-Photosynthese am Modell der Gattung *Flaveria* durchgeführt. Diese Gattung enthält mit ihren 21 Spezies, Pflanzen mit sowohl C_3-typischer als auch mit C_4-typischer Photosynthese, weist aber auch Zwischenformen mit einem gemischten Photosynthesetyp auf (Ku et al., 1991). Durch Vergleiche des genomischen Aufbaus C_4-spezifischer Gene und ihrer C_3-Isoformen in diesen Spezies konnten viele Erkenntnisse zur Regulation C_4-spezifischer Gene gewonnen werden. Es gelang in vielen Fällen, wie bei PPDK, PEPC und ME die *cis*-agierenden Regulatorelemente auf den Genen zu identifizieren und die Entwicklung der Gene vom C_3-Grundzustand zum veränderten C_4-Photosynthesetyp nachzuvollziehen (Blasing et al., 2000; Drincovich et al., 1998; Gowik et al., 2004; Marshall et al., 1997; Rosche et al., 1998). Auch ein C_4-spezifisches alternatives Splicing konnte in Flaveria gezeigt werden (Kopriva et al., 1996). Darüberhinaus bietet dieses System die Möglichkeit, *trans*-agierende Faktoren über Bindungsassays an bekannten und charakterisierten C_4-spezifischen Promotorelementen zu identifizieren. Gleichsam dem Hüllblatt von Mais ist bei Flaveria ein Vergleich zwischen C_3- und C_4-Zustand der Photosynthese durch subtraktive Hybridisierung möglich, da beide Formen innerhalb einer Gattung auftreten. Allerdings ist unklar, inwieweit sich die einzelnen Spezies der Gattung neben ihren Photosynthesetypen unterscheiden.

Eine ebenso nahe liegende Subtraktionsvariante wäre die Subtraktion von mRNA etiolierter Laubblätter von mRNA belichteter Laubblätter aus Mais. Da die C_4-Photosynthese erst nach

Belichtung etabliert wird und die etiolierten Blätter daher den C_3-Grundzustand darstellen, könnten so C_4-spezifische, regulatorische Transkripte identifiziert werden. Der Nachteil dieser Methode liegt allerdings, ähnlich wie oben, in der geringen Spezifität der Lichtinduktion, da durch die Belichtung nicht nur C_4-spezifische Gene induziert werden, sondern auch zahlreiche weitere Gene, wie die der Chloroplastenentwicklung, Gene der Lichtreaktion der Photosynthese und allgemein den Stoffwechsel der Pflanze betreffend (Markelz et al., 2003).
Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe zur Subtraktion dagegen sollten eine Anreicherung C_4-spezifischer Transkripte ermöglichen, da das zu subtrahierende C_3-typische Gewebe Teil des als „Driver“ (2.12) verwendeten Hüllblattes ist. Somit herrschen für beide Testpopulationen immer identische äußere Bedingungen. Außerdem weisen sie das gleiche Alter und Entwicklungsstadium auf, wodurch anatomische und entwicklungsbedingte Unterschiede reduziert werden.
Ein Nachteil des Hüllblattes als System zur Untersuchung C_4-spezifischer Genexpression ist allerdings die Isolierung des C_3-Mesophylls. Die Präparation ist aufwendig und die daraus resultierende RNA stark limitiert, wodurch eine Amplifikation der RNA erforderlich wird. Innerhalb dieser Arbeit wurde dazu die SMART-Reaktion verwendet. Nakazono und Asano, die ebenfalls die Genexpression bestimmter Pflanzengewebe in Mais untersuchten, schlugen eine alternative Technik zur Präamplifikation von RNA vor. Sie verwendeten innerhalb einer *in vitro*-Transkriptionsreaktion rekombinante RNA-Polymerase zur Vermehrung der minimalen Ausgangsmengen an RNA. Mit Hilfe dieser Methode konnten bereits cDNA-Banken erstellt werden, die auf RNA-Mengen im ng-Bereich beruhen und deren 60000-fache Amplifikation möglich war (Asano et al., 2002; Nakazono et al., 2003). Auch in diesem Fall ist eine cDNA-Synthese notwendig, die aber anschließend nicht in Form einer PCR-Reaktion amplifiziert wird, sondern durch den Einsatz von rekombinanter RNA-Polymerase in Form neu synthetisierter RNA vermehrt wird. Bei dieser Technik bleiben ebenfalls die Mengenverhältnisse der RNAs zueinander erhalten und die Problematik der Mengenangleichung in einer PCR-Reaktion wird vermieden. Auch die schon erwähnte Problematik des Self-Priming plastidärer RNAs könnte so verhindert werden. Allerdings erfordert diese Methode mehrere RNA-Syntheserunden, die immer wieder eine neue und effiziente cDNA-Synthese voraussetzen. Dabei besteht die Gefahr von RNA-Degradationen, da über den Zeitraum mehrerer Arbeitschritte mit RNA gearbeitet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls versucht, mit Hilfe dieser Methode die RNA aus den präparierten Geweben zu amplifizieren, doch waren die erhaltenen Fragmente im Durchschnitt deutlich kürzer als die Produkte der SMART-Reaktion (Daten nicht gezeigt).

Um den Nachteil der aufwendigen Präparation und daher limitierten Menge an C_3-Mesophyll zu vermeiden, wäre es auch denkbar, eine RNA-Population des Laubblattes von der des Hüllblattes zu subtrahieren. Beide Gewebe stehen in großem Maßstab zur Verfügung und würden eine mRNA-Isolierung in ausreichender Menge möglich machen. Hierbei würden sowohl C_3-spezifische Transkripte angereichert als auch solche, die nur im Hüllblatt, nicht aber im Laubblatt exprimiert würden. Würde man diese cDNA-Population als „Driver" (2.12) in einer zweiten Subtraktionsrunde von den Transkripten des Hüllblattes subtrahieren, könnten so C_4-spezifische Transkripte angereichert werden. Durch diese zweifache subtraktive Hybridisierung wäre man nicht auf das isolierte C_3-Mesophyll zur Subtraktion angewiesen und könnte die Amplifikation der RNA vermeiden. Dabei wäre eine effiziente erste Subtraktion für den Erfolg der zweiten subtraktiven Hybridisierung natürlich von entscheidender Bedeutung.

Das Hüllblatt von Mais stellt somit ein geeignetes System für differentielle Expressionsanalysen zur Identifizierung neuer an der C_4-Photosynthese beteiligter Gene dar. Durch die Sequenzierung des Maisgenoms bieten sich zusätzlich neue Perspektiven. Bekannte und unbekannte Gene mit den Charakteristika von Transkriptionsfaktoren können in den jeweiligen Geweben quantifiziert werden, um so auf eine einfache und schnelle Art ihre mögliche Gewebespezifität festzustellen. Mit Hilfe dieser Methode könnten so neue *trans*-agierende Regulatoren der C_4-Photosynthese identifiziert werden. Diese erweiterten Möglichkeiten werden die Nutzung des Hüllblattes von Mais als Modellsystem zur Untersuchung des C_4-Syndroms stark erleichtern und machen es zu einer attraktiven Alternative zu den hier vergleichend dargestellten Systemen.

5 Zusammenfassung

C_4-Pflanzen wie Mais benötigen physiologische und anatomische Anpassungen zur Etablierung und Aufrechterhaltung ihres Photosynthesetyps. Die Regulation dieser Prozesse ist noch weitgehend unbekannt.

Innerhalb dieser Arbeit wurde das Hüllblatt der weiblichen Infloreszenz als System zur Analyse C_4-spezifischer Genexpression etabliert. Das blattähnliche Organ weist eine deutlich erhöhte Anzahl an Mesophyllzellen zwischen den Leitbündeln auf. Nur Mesophyllzellen mit direktem Kontakt zu Bündelscheidenzellen fixieren CO_2 nach dem C_4-Mechanismus, während weiter entfernte Mesophyllzellen anscheinend den C_3-Stoffwechsel nutzen. Dieses C_3-Mesophyll konnte im Rahmen dieser Arbeit isoliert und charakterisiert werden. In Verbindung mit den isolierten Laubblattgeweben Bündelscheide und C_4-Mesophyll konnten somit vergleichende Analysen zur Expression der beiden Photosynthesetypen innerhalb einer Pflanze gemacht werden.

Der photosynthetische Mechanismus der isolierten Gewebe konnte durch den Nachweis von typischen Transkripten über quantitative Real-Time-RT-PCR verifiziert werden. Durch Nutzung spezifischer Primer konnte ebenso gezeigt werden, dass die zwei bekannten Isogene für die kleine Untereinheit der Rubisco in C_3- und C_4-Geweben differentiell exprimiert werden, wobei die Isoform *RbcS1* eine stark präferentielle Expression im C_3-Mesophyll zeigt.

Für die Transkriptionsfaktoren DOF1 und DOF2 war bereits zuvor eine wichtige Rolle in der Regulation lichtinduzierter Genexpression postuliert worden. Die hier aufgenommenen Expressionsmuster in C_3- und C_4-Geweben schließen dagegen eine Funktion bei der Steuerung des Photosynthesetyps aus. Beide Prozesse scheinen daher unabhängig voneinander reguliert zu werden.

Die Isolierung des C_3-Mesophylls aus Hüllblättern bot zudem die Möglichkeit einer subtraktiven Hybridisierung von C_4- und C_3-Geweben. Mit Hilfe dieser Technik gelang es, sechs neue bündelscheidenspezifische Transkripte zu identifizieren. Die Funktion der abgeleiteten Proteine ist noch unklar, doch mindestens eines der Transkripte scheint ausschließlich in C_4-Pflanzen vorzukommen.

In der Diskussion werden die Ergebnisse in einen Zusammenhang mit den bisher bekannten Regulationsmechanismen der C_4-Photosynthese gebracht und die in dieser Arbeit verwendete Technik zur Untersuchung differentieller Genexpression kritisch betrachtet. Dabei wird das Hüllblatt als System zur Untersuchung des C_4-Syndroms vergleichend zu anderen Analysesystemen diskutiert.

6 Anhang

6.1 Primersysteme

Name	Sequenz	gi Nummer	Produkt (bp)		T_m cDNA Produkt (°C)
			DNA	cDNA	
PEPC					
PEP 1	aga act caa gcc ctt tgg gaa gc	22396	327	248	88,4
PEP 2	gtc ggc gaa ctc ctt gga cag c				
ME					
ME 1	gat ctc tgc gca cat cgc tgc	168527	300	145	89,2
ME 2	gca gca cta ccg gta gtt gcg g				
RbcS					
RUB 1	gct ccg ttc cag ggg ctc aag t	22464	418	254	91,4
RUB 2	tct cgc ggt aca cga agc cga cct t				
RbcS1					
RUB 1	acg gac gac ctg ctg aag cag gtg g	22464	226	226	90,3
RUB 2	ggt gga agg cgt ccg ggt agg att tg				
RbcS2					
RUB 1	ggt gta caa gga gct gca gga ggc cat	1673455	168	168	90,2
RUB 2	ggc aga ggc atg gcc atg ggt cg				
PPDK					
PDK 1	ccg tcg acg atc tcg gcc cag				
PDK 2	gtc gtt gac gcc gcg ccg ata cag	168579	> 5000	244	93,6
PDK 3	cgc cca tgt act cct cca ccc a				
GAPDH					
GAP 1	ctg gtt tct acc gac ttc ctt g	22302	327	204	88,7
GAP 2	cgg cat aca caa gca gca ac				
DOF1					
DOF1 1	aag aag cgc cgc gtc gtg gcg ccg				
DOF1 2	gag ggg aag tcg gag agg ccg agg	517257	137	137	87,4
DOF1 3	gcg cca ggg agt cgg agt cct cc				
DOF2					
DOF2 1	gca gcg acg gtg gct gcc tcg gag	1061305	153	153	90,6
DOF2 2	cct aac gcc gcc gct ccc agc atc				

	Sequenz	gi Nummer	Produkt (bp) DNA	Produkt (bp) cDNA	T_m cDNA Produkt (°C)
Phage239					
Sonde 1	cac cac ata ttt cag aag cca cac ac	-	294	294	-
Sonde 2	caa tcg atg ata agt ctc atc caa ggg				
pCR®4-TOPO					
T3	att aac cct cac taa agg ga	-	-	-	-
T7	taa tac gac tca cta tag gg				
42					
42for	tat tca gtt tca ctc cac atc gtg at	-	176	176	88,9
42rev	tgg aaa cag taa tct agg tac aag cag				
70					
70for	tac gtc aag caa tac gta gag taa ctc	-	134	134	79,8
70rev	cta ata acc aac gaa tgg caa gtg ctc				
89					
89for	gca caa cca tgt acc aac ctt cta c	-	216	216	82,3
89rev	aca aaat tac aca tct cct ata acc ac				
94					
94for	gag tgg aag gct ata tat gta tgc	-	151	151	84,3
94rev	ata tgt ctc atc caa agg cac cca cat ac				
112					
112for	cat ggt cac aat gct tgc agc tag	-	177	177	84,4
112rev	ggt tta gtg gca gca caa ctt ata cg				
129					
129for	cac ctc agc gca gca gat tat g	-	351	351	85,5
129rev	ttc tcc agc tca aca gtt tgg gac				
239					
239for	gaa acc acc ttg ctg gca aat tcg	-	340	340	84,6
239rev	ggg ctt gat ctg aga acc tgg c				
314					
314for	tga agg aac caa ggg cat aca tca tg	-	197	197	83,9
314rev	agg gaa tgc aac cag gag cta ag				
361					
361for	tgc cca agc ctt gtg ctt cag c	-	140	140	83,6
361rev	tag cgt ggt cgc ggc cga g				

Name	Sequenz	gi Nummer	Produkt (bp)		T_m cDNA Produkt (°C)
			DNA	cDNA	
447					
447for	gcc atc aat gga gtg aat tct ccg	-	213	213	86,5
447rev	gat tgc cct aat atg aat cac tcg atc				
448					
448for	gct tat cat cct tct tga agc cag c	-	129	129	84,8
448rev	aga tgt cgg cct tat tag gac tac tac				
503					
503for	tcc ctt tca act tgg ata ccg tga g	-	266	266	82,8
503rev	gat gga ctt acc agt ctt gat cgt tac				

6.2 cDNA-Sequenzen verschiedener Transkripte

Sequenzen quantifizierter Transkripte (Orientierung im Genom unbekannt):

Transkript 42

TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACAACAAGGCCATCGCAGCCTACAACAAGGGCGAGAGCACTGCAGCTAAGAAG
GCTCCTGTCAAGGAGGAAGAGGAGGAAGACGAAGAGGAGTCTGACAAGTCCAAGTCGGAGGTCAATGACGAGGAT
GACGAAGAGGGTAGCGAGGAGGATGAAGATGATGACGAGTGATGGAGAGCTCGCTCGAGACAATGGACGGTGCTT
CATCCAACAATGGAGCGGCTACACAAGGCCCCGTGGCGATCAAAAAAAAGGAGCCTATATCCATGTACTAGAATT
ATTCAGTTTCACTCCACATCGTGATGTTTTATTTTTACTTTTGTCGTGCTATAACGGATAGCGCTCCTCGTTGGC
GCCACTGGCGGGTGGTTCTGCCTCTGGTCTGGTGTGTTTGTGTGTGGTCACACTTGCCAGCTAGCAGAGGCGCCT
GCTTGTACCTAGATTACTGTTTCCATTGTCGTCGTCATCGGCTAACATTGTCATAATGTCAGTTTGGGTAATGTT
AGATTAAGTAATTATTGTGTTCTAAAAAAAAAAAAA

Transkript 70

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTGCAGAAAAAAGAACCGCAAAATCCGATCCAATTTTTCGTAATCGATTAGTTA
ACATGGTGGTTAACCGTATTATGAAAGACGGAAAAAAAATCATTGGCTTATCAAATTCTCTATCGAGCCGTGAAA
AAGATTCAACAAAAGACAGAAACAAATCCACTATTGGTTTTACGTCAAGCAATACGTAGAGTAACTCCCAATATA
GGAGTAAAAACAAGACGTAATAAAAAAGGATCGACGCGGAAAGTTCCGATTGAAATAGGATCTAAACAAGGAAGA
GCACTTGCCATTCGTTGGTTATTAGAAGCATCCCAAAAGCGTCCGGGTCGAAATATGGCTTTCAAATTAAGTTCC
GAATTAGTAGATGCTGCCAAAGGGAGTGGGGGCGCCATACGCAAAAAGGAAGCGACTCATAGAATGGCAGAGGCA
AATAGAGCTCTTGCACATTTTCGTTAATCCATGAACAGAATCTAGGTATGTAGACACATGGATCCATACATCTCG
ATCGGAAAAGAATCAATAGAAGGAGAATCGGGACGATATCT

Transkript 89

TCGTTNACCTGCGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGGTTAANNGACGGCACGCGCCNTNCTTCNTCATGCTGNAGCAC
ANNGTTTGGGCACTCCAGAAGAGCACAACCATGTACCAACCTTCTACCTAAAGGTGTCAATAGTTCANCAAGTTG
ATACTATATACTTATGCTTGNCTCTGTATAGTCTATAAGTCCTAATTCAAATAACAGGTGCTGCTCNCAGCCTTG
GATATTTGCGGANGCGGAGNGAAGTTACCATGGCATCGTTGCTAAGAATAANAAAGTAATGTGGTTATGAGGAGA
TGTGTAATTTTGTGGNTAAA

Transkript 94

CCTGCGGACTTCTCCCTTTAGTGAGGGTTAATACGCCCGGGCAGGTACAATAACACCACATATTTCAGAAGCCAC
ACACATTATTTAGATAGGTTTCCACTCATACTACACAAGGGACTTGATCTGAGAACCTGGCGATATGCAACATAT
CATATGTGTCTATATATAGATCGGATACCAGCATATGATGAGTGGAAGGCTATATATGTATGCATGAACTTTAGG
GAATGCAACCAGGAGCTAAGTATGAGGGTTGCTTGAGAGGGTTGCTTGAGCAACCAGGAGCTAAGTATGAGGGTT
GCTTGAGCTCAGTATGTGGTGCCTTTGGATGAGACATATCATCGATTGAATACTCACGGTTTGAACCAATACTAT
TGTCCATCAGCTTTCTTCCATGATGTATGCCCTTGGTTCCTTCAGTTCTTCCATACGAATTTGCCAGCAAGGTGG
TTTCTTCAGCCATCGTTCCATGATCAAAGTATGCAACTATGCACATCATGTTCAACAAAATGAGCAGTGCCACCG
TTGCAGGCTTCATCCTAGTAAGCTGATTAGTTGAAACTTCTATTGTTGATCCCCGCGTACCTCGGCCGCGACCAC
GCTAAGGGCG

Transkript 112

TAGTGAGGGTTAATACGAGGTACGCGGGGATAGTTTTTGCTCTTCCTCTCTCATGGTCACAATGCTTGCAGCTAG
TTCTCTAGTGAACAGCAACCTCGCTTGCTCATCAAGGATATCATCCTGTTCAGACTTCACATATAGCCACTCCTG
GCGTCCCATACATGCTATGAAACTCCATCAGATGCGTGCTGTGAGCTCAATACGTATAAGTTGTGCTGCCACTAA
ACCTGCAAAGACTCCTGCTGAAGAANAATGGAAAGTTAAGCGGCAACTGCTATCANAAAAGCGGGTACNAAGTGT
CGATGTGAAGGAAGCACTGCGCCTTCAAAAGGAAAACAACTTTGTCATTCTTGATGTCTGGCCAGAAGCAGAGTT
TAAAGAGGCTCATCCACCTGGCGCCATCAATGTACAAATATACAGATTAATCANGGAATGGACAGCGTGGGATAC
TGCGAGGCGTGCAGCGTTTGCGTTCTTCGGCATATTTGCTGGAACAGAAGAGAATCCTGAGTTCATACAGAGNGT
TGATACGAAGGTTGGGAAAGATGCGAAGATAATTGTGGCATGCTCTACAGGAGGACACCCTNGGAGCCCAACGCA
AAAATTTCCCTGATGGGAAAGCAATCTCGGTCCCTGATAGCTGCGTACCTGNTGGTCCTGAATGGCTACAGCAAC
GGGTACCATCTGGAAGGAGGACTTTACACATGGTTCAAGAAGGACTACCAGCTGTTGCAGGAGAAGAGTAGAGAG
ACATTACGACATAGTGTTCNCTGCTGGANANAGTGGANAGTGGANACTAAANTGCGAGGACTTGTAGTGATGTGC
TTGCTTCCAGTCCAGGGTTGTCGAT

Transkript 129

GGCCGCNAGGGCAGGTACTTTGGNTCTGATTATACTCTTCATATCCAACCAAAAAGTGTTGAAAACCTGAATACC
ACAAAGGACTTGGAGAACATAAAGAACATGATATTGGAGAACCTGTCAAAGATAGAACATGTTCCCAGCACTCAA
TTCCATGACAGACCGTCAGACCCTGAAGCTCCAGAGGAGAAAGAGGAGGACATGGACAAGAGGCCACCTCAGCGC
AGCAGATTATGGAGCGGAGGAGCTTACGACTCTGATACAGAGGATCCTGACAGCCTGAAAAGCGAGGGTAAAGAC
GTAACTGCTAACTTCCAGATGAAGGATGAACCAAAAGATGATCTGTAGAAGTTTCAGAAGTGCCCCCAAAGTTAC
TGAGTTGTCAATGGGATCGTCGACATGCATGTTGAAGAGTGGGGACGCATCTGAACCTGTCCGTGCTGATATCTG
CCGCTGTGCATCTGTAACAGACTGAACGTTTTGCTGGTTCCAGCTTTCCTGCGTGTTGGTAACTAGACTAGATAT
ATGGCCCTTTGGTGGGGTCCCAAACTGTTGAGCTGGAGAAATGAAATGATTATTCTCGCATGATTTACTGTAGCA
TGCATGTAATCCTTACCCATTTAGTTCATTAGGCTATCAACAGTAGTTTACTCCTCCCCATATTCCAACTTCACT
ATGCGCGCATACAGTGATTTGNGTGGACCTNTGGATAAACTTTGAGGAGATTTTTGGGNAGTGTTTGGGTTCGAG

Transkript 239 (5'→3')

ACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTGATCTAGACATGGTAACCCATTCCTAGCTAGGCAATGTT
CGAAATCCTGGCGACATATTAGTAGGCACTAAAATTATTTTAACTTTATTTAGGAGATAGATGTCTAGAGATATA
CTTATCTTTGTATTGAATGATAGGAGTAATAGATTCCTGGACATCGTAAGTGTGTGTTAGCCATCGATAGTGCGT
GTTCTAGACATCGAAAAGTGTGTGTTTGGTATGCATACCAATCAGTCATTTTTGATATTGGTGACATAATTATAC
CATTCGCTTTATTTGCCCATGTGTCAACATATTCGAGGGGTGCTTTATAATCATTAGCCATTAGGCAAGAAACCT
CGCATGCACCAAACCCACTCAGTTATGAGAAGATATTCTTACTTTCATGCAATGCCAATCAATCTTTCTGATACT
CTCAAGCTGGCATGATACTTGCAATATGTAAGGCCACACAACTTTGTCTAGAGATTTATGTATCTATGTATTAAG
GAGTAATGGATAGTTGGACATTGAAATTGTGTGTTGTTGCCACTGATAGTGTTCTAGACACCGAAAGTGTGTTCG
GTATGCATATCAACCAGTCATTTTCTAGATATTGGTGACATAATTATACCACACTAGTACACAGAAGCTCTATAG
TGGCGGTTGTGAACCTATTTTCACTGGCATTTCTTAGAACCATCGGTGCTAGGAGAAATAGAAATCATTATTTTT
ACAGGCGGGTAACTGAGGATCGCTAGTGAAAATCGATTTCCACTAGCGGTTGAGTTAATTTAACCATCAATGGAA
ATCGATTTCCACTGGTGGTCGACGTAATAAAACCGCTAATGAAAATTATTTTTAGACACGTTAAACAGGTTTTAA
AAACAGAAAATAATTATTTTCAGTAAGGACCTGTTCATTGAGAAACCANCTGGGNAAACAGTACAACCATGAAGG
TGCTATTGGACGCCCTTAANTGGANTAATTGGAGNATCTGGGGTGTAGCTTGCTTCGCCGTTGTGCCGTCATGGG
AGTTGGGGCATAACGCTTGCTTGCTTTGATTTTGTTTGTACGACTGGCGAAACCTAACGGGCGGCTACACACCAG
GAGAATCTTTGTAAATGCTATGTAGTGATACCCTGCCAGACCACCTAGGAAGAGATCAATGAAGCGAATCATGTC
TCATGGGTAAAGTGTGCAACCTTTGTTGAGGGTTAGAAACTGGTATATCAGTTGTGCTCACAGTTAAGAGCAGCC
TTGGGATCCTCTTTGATTAGAGATACTCTGGATACATTTATGTTGATGGTTTAATGATGATAGCTATACTTATGA
TGTCTGGTACTTTCCTCTCTGAGGAGGTGCTTTCTTTTGGGGTATCAACTTGGGTTCTATGATAAATCTTGGCTT
CTACTAATGATAAATACCTGACCAACTAAAAGCAACTACTGGAGCTTAACCCCACATATAGCTAATCCACTTCAA
CCAAACAGGACATTGTTGAGTACGTTGATGTGTACCCACTCTTGCTTAAACACCAAACACCAGGTTGTTTTTCCT
TCCNAAACTGGGTGTGACAAGCCCTCCGTCTTTTTTATAATGAGTTATTTCTCTTTCCTAAACTACCCCNAGATA
CATATAGTGTATCCACTCAGCCTATGGTAAAATGGACCAATTCTTGATATGTCGACCTGACAACCACACCCTTTT
CACGAAGTTGCTTCGCCTTGATAGATCCTTCATAATGATGCCACGTGTCTCCTTTGATTCCTTCTGAAACAGTGT
CGCCAGATTTTGTGGCCCAGCCCCTGTTAGTCTACATGACTCAACCCAAGACGCTACTTGTTGGCAATCACTCAT
CACAATCCAAACACAAATGCACATATCAACCTTGTGTTGGCACTAACCCTCATGCACGCATTGCTAGGCGATGAT
ATTGATACGTGTGCTCGACCTGGCTGCAATAGTGGTAGCTATCACTACTACTTGGTTCTTAAATCAATTTTTACA
ATAGTAAGTAGTGGTCTAGACCAGTACTACATGTTATGATGTTTGTGGTGCGCCATGATGCGCCAAGCCCTAAAG
CCCCCAAACCAGAGATGCAAACATCATGAGACTCCTCTTCATCTAAATAGGTTGTTCTCCATTGTCTATATATAG
CGTGCCTGGAGTATCTTTGATTATCAACAATAGAAGTTTCAACTAATCAGCTTACTAGGGTGAGTCCTTTTCTTT
TTGTGAGCTACACCAGTTTTCTTTAGTAGGATTCAATATATTTTCCACGTACTAATTATGTTACAAAATATAGCA
TATATAATGTGTACATATCCNATATATACAGATGAAGCCTGCAACGGTGGCACTGCTCATTTTGTTGAACATGAT

GTGCATAGTTGCATACTTTGATCATGGAACGATGGCTGAAGAAACCACCTTGCTGGCAAATTCGTATGGAAGAAA
TGAAGGAACCAAGGGCATACATCATGGAAGAAAGCTGATGGACAATAGTATTGGTTCAAACCGTGAGTATTCAAT
CGATGATAAGTCTCATCCAAGGGCACCACATACTGAGCTCAAGCAACCCTCATACTTAGCTCCTGGTTGCTCAAG
CAACCCCCTCAAGCAACCCTCAAACTTAGCTCCTGGTTGCATTCCCTAAAGTTCATGCATACATATATAGCCTTC
CACTCATCATATGCTGGTATCCGATCTATATATAGACACATATGATATGTTGCATATCGCCAGGTTCTCAGATCA
AGTCCCTTGTGTAGTATGAGTGGAAACCTATCTAAATAATGTGTGTGGCTTCTGAAATATGTGGTGTTATTGTAC
TGAGCTATGCTCAATAGTAAACAACAAATTATTGAAATATGTCGCGTGTGCGAT

Transkript 314

GGTACGCGGGGAACAATAGAAGTTTCAACTAATCAGCTTACTAGGATGAAGCCTGCAACGGTGGCACTACTCATT
TTGTTGAACATGATGTGCATAGTTGCATACTTTGATCATGGAACGATGGCTGAAGAAACCACCTTGCTGGCAAAT
TCGTATGGAAGAAATGAAGGAACCAAGGGCATACATCATGGAAGAAAGCTGATGGACAATAGTATTGGTTCAAAC
CGTGAGTATTCAATCGATGATATGTCTCATCCAAAGGCACCACATACTGAGCTCAAGCAACCCTCATACTTAGCT
CCTGGTTGCTCAAGCAACCCTCTCAAGCAACCCTCAAACTTAGCTCCTGGTTGCATTCCCTAAAGTTCATGCATA
CATATATAGCCTTCCACTCATCATATGCTGGTATCCGATCTATATATAGACACATATGATATGTTGCATATCGCC
AGGTTCTCAGATCAAGTCCCTTGTGTAGTATGAGTGGAAACCTATCTAAATAATGTGTGTGGCTTCTGAAATATG
TGGTGTTATTGTACCTGCCCGGGCG

Transkript 361

CGAGGTACGCGGGGATACCAACCTACAATTGTCACTTCCATTTTCTCAATACCTTAAGCAAGGACCAATGTCTCA
AGCCCAGCCCCCTCGTTCCCAAGCCCAGTGGAAACACGTTAAATTTCAGGATAACCAAGCTAATGCCATGAAGGA
ACCAGGAACCGGTGGGTATGGCTATGGGACGAAAAATGACAAGAATAAGGATGTGGATACAATAGCTTCGGACTT
CATCAAGCTGAAGCACAAGGCTTGGGCACTCCAGAAGAGCACAACCATGTACCTGCCCGGGCGGCC

Transkript 447

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTTGTGGTCTCCTGCAATGTTGTGGACGGTAGTGCAGCAGACATGAGGCATGCA
ACGCTTCCACGCAAAGGTCTAAAGGAAGACATCAAGCTCGCCATCAATGGAGTGAATTCTCCGGTTAGCAGTATA
TCTGGACAGGCATCTAGCAACTCTGAAACCGGCACAGACAACGATATGTCAAGCGCTACAGCCTTTACCTCAAAG
GTGACCACTACCCAAGGTAGCCACCGTGGCTACGAGATCCACGGGTTCCAAGGCAGTAAGATCAGCCCCCATGAT
GATCGAGTGATTCATATTAGGGCAATCAAATCATCAGTTATTAATGAACAATAGGTATCTATAAGGGAACCAACT
ATCAAAACAACATATCTAATAATCATATGTTGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGAAAGGGCG

Transkript 448

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTTGCGGTGGATACCAGCATCCAGCTGCTTATCATCCTTCTTGAAGCCAGCAAA
CCTCTTATCGCTGTGAGGAATATCTAGACCACCATCCAAAGCTCCCTTGAGGGCACCAAAGACACGGTTTCCAGT
AGTAGTCCTAATAAGGCCGACATCTAAGAGGGCACGGAAAGGCCTCCTCTCTTCCGCTGGCTCGACAGAGAAGTC
CTCACCAGTGGCCTCAACATCCCGCGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGAA

Transkript 503

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTTGTTCAACTTATCCCTTTCAACTTGGATACCGTGAGGCGGACCTTGGAAAGT
TTTTGAATAAGCAGGGGGAATTCGTAGATCCTCCAAACGTAGAGCGCGTAAGGCTTTGAAACCAAATACGTTACC
CACAATGGAAGTAAACATGTTAGTAACAGAACCCTCTTCAAATAGGTCTAATGGATAAGCTACATAACAGATATA
TTGATCTGGGTCCCCAGGAACGGGCTCGATGTGATAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGTCCATC
AGTCCAAACAGTTGTCCATGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGAAAGGGC

6.3 Abkürzungsverzeichnis

AFLP	amplified fragment length polymorphism
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
ca.	circa
CA	Carboanhydrase
cDNA	copy DNA (Kopie-DNA)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cv.	Kultivar
DIG	Digoxigenin-11-dUTP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Desoxynukleotidtriphosphate
DOF	DNA binding with one finger
dTTP	Didesoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	expressed sequence tag
EtBr	Ethidiumbromid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HMG	high mobility group
kb	Kilobasen
µg	Mikrogramm
(m)M	(milli)Mol
ME	Malatenzym
M-MLV RT	Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transkriptase
n.a.	nicht anwendbar
NADP+-ME	$NADP^+$-abhängiges Malatenzym
n.d.	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
OAA	Oxalacetat

OD	Optische Dichte
pg	Picogramm
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
Pfu	plaque forming units
PYR	Pyruvat
PPDK	Pyruvat-Orthophosphatdikinase
RbcS	Gen der kleinen Unterheit der RUBISCO
RNA	Ribonukleinsäure (Gesamt-RNA)
mRNA	messenger-RNA
RT	Reverse Transkription
Rubisco	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s	Sekunde
SHR	short-root
ss DNA	single stranded DNA (Einzelstrang-DNA)
TAE	Tris-Acetat-Puffer mit EDTA
TBE	Tris-Borat-Puffer mit EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
U	units
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des C_4-Stoffwechsels in *Zea mays* 4
Abbildung 2: Modell zur Regulation der C_4-Genexpression nach Langdale 6
Abbildung 3: Blattquerschnitte durch Laub- und Hüllblatt von Mais 11
Abbildung 4: Übersicht SMART-Reaktion 23
Abbildung 5: Übersicht Genome Walking 24
Abbildung 6: Übersicht Subtraktion 31
Abbildung 7: Schema Vorgehensweise 35
Abbildung 8: Präparation von Bündelscheiden 37
Abbildung 9: Isolierung C_4-Mesophyll 38
Abbildung 10: Hüllblatt 39
Abbildung 11: Schmelzkurven amplifizierter PCR-Produkte 42
Abbildung 12: Quantifizierung der Akkumulation verschiedener mRNAs in unterschiedlichen Maisgeweben 43
Abbildung 13: Quantifizierung der mRNA Akkumulation von PPDK-Transkripten in den untersuchten Maisgeweben 46
Abbildung 14: Akkumulationsverhältnisse von *RbcS1* und *RbcS2* Transkripten in verschiedenen Geweben von Mais 48
Abbildung 15: Quantifizierung der mRNA Akkumulation von DOF1-Transkripten in verschiedenen Geweben von Mais 50
Abbildung 16: Subtraktions-PCR 53
Abbildung 17: Größenverteilung der klonierten Fragmente 54
Abbildung 18: Reverse Northern-Analyse der nach der Subtraktion erhaltenen Transkripte 55
Abbildung 19: Ermittelte Sequenz des Transkriptes 239 64
Abbildung 20: Modell der licht- und gewebeinduzierten Genexpression des PEPC-Gens durch die Proteine DOF1 und DOF2 in *Zea mays* nach Yanagisawa & Sheen 70

6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kontamination der präparierten Gewebe 45

Tabelle 2: Einteilung der Klone nach präferentieller Expression in den untersuchten Geweben 56

Tabelle 3: Ergebnisse der Datenbankvergleiche auf Nukleotidebene 58

Tabelle 4: Akkumulationmuster ausgewählter Transkripte 61

6.6 Literaturverzeichnis

Al-Taher, A., Bashein, A., Nolan, T., Hollingsworth, M., and Brady, G. (2000). Global cDNA amplification combined with real-time RT-PCR: accurate quantification of multiple human potassium channel genes at the single cell level. Yeast *17*, 201-210.

Asano, T., Masumura, T., Kusano, H., Kikuchi, S., Kurita, A., Shimada, H., and Kadowaki, K. (2002). Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. Plant Journal *32*, 401-408.

Bachem, C. W. B., Oomen, R. J. F. J., and Visser, R. G. F. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. Plant Molecular Biology Reporter *16*, 157-163.

Bansal, K., Viret, J., Haley, J., Khan, B., Schantz, R., and Bogorad, L. (1992). Transient Expression from cab-m1 and rbcS-m3 Promoter Sequences is Different in Mesophyll and Bundle Sheath Cells in Maize Leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *89*, 3654-3658.

Bansal, K. C., and Bogorad, L. (1993). Cell type-preferred expression of maize cab-m1: Repression in bundle sheath cells and enhancement in mesophyll Cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *90*, 4057-4061.

Becker, T. W., Templeman, T. S., Viret, J. F., and Bogorad, L. (1992). The cab-m7 Gene: A light-inducible mesophyll-specific gene of maize. Plant Molecular Biology *20*, 49-60.

Berger, F., Haseloff, J., Schiefelbein, J., and Dolan, L. (1998). Positional information in root epidermis is defined during embryogenesis and acts in domains with strict boundaries. Current Biology *8*, 421-430.

Blasing, O. E., Westhoff, P., and Svensson, P. (2000). Evolution of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase in Flaveria, a conserved serine residue in the carboxyl-terminal part of the enzyme is a major determinant for C_4-specific characteristics. Journal of Biological Chemistry *275*, 27917-27923.

Botha, C. E. J. (1992). Plasmodesmatal distribution structure and frequency in relation to assimilation in C_3 and C_4 grasses in southern Africa. Planta *187*, 348-358.

Brooks, A., and Farquhar, G. D. (1985). Effect of the temperature on the CO_2/O_2 specifity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. Planta *165*, 397-406.

Bustin, M., and Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal protein: Architectural components that facilitate chromatin function. Progress in Nucleic Acids Research *54*, 35-100.

Casati, P., Lara, M. V., and Andreo, C. S. (2000). Induction of a C_4-like mechanism of CO_2 fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. Plant Physiology *123*, 1611-1622.

Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques *15*, 532-534.

Collins, P. D., and Hague, D. R. (1983). Light-stimulated synthesis of NADP-malic enzyme in leaves of maize (*Zea mays*) cultivar Golden Cross Bantam. Journal of Biological Chemistry *258*, 4012-4018.

Crespo, H. M., Frean, M., Cresswell, C. F., and Tew, J. (1979). The occurrence of both C_3 and C_4 photosynthetic characteristics in a single *Zea mays* plant. Planta *147*, 257-263.

Cribb, L., Hall, L. N., and Langdale, J. A. (2001). Four mutant alleles elucidate the role of the G2 protein in the development of C_4 and C_3 photosyntesizing maize tissues. Genetics *159*, 787-797.

Dai, Z., Ku, M., and Edwards, G. E. (1993). C_4 Photosynthesis (The CO_2-concentrating mechanism and photorespiration). Plant Physiology *103*, 83-90.

Dengler, N. G., and Nelson, T. (1999). Leaf Structure and Development in C_4 Plants. In C_4 Plant Biology, R. F. Sage, and R. K. Monson, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 133-172.

Dong, L., Ermolova, N. V., and Chollet, R. (2001). Partial purification and biochemical characterization of a heteromeric protein phosphatase 2A holoenzyme from maize (*Zea mays*) leaves that dephosphorylates C_4 phosophoenolpyruvate carboxylase. Planta *213*, 379-389.

Drincovich, M. F., Casati, P., Andreo, C. S., Chessin, S. J., Franceschi, V. R., Edwards, G. E., and Ku, M. S. (1998). Evolution of C_4 photosynthesis in Flaveria species. Isoforms of NADP-malic enzyme. Plant Physiology *117*, 733-744.

Durrant, W. E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J. D. (2000). cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. Plant Cell *12*, 963-977.

Ewing, R. M., Jenkins, G. I., and Langdale, J. A. (1998). Transcripts of maize RbcS genes accumulate differentially in C_3 and C_4 tissues. Plant Molecular Biology *36*, 593-599.

Freitag, H., and Stichler, W. (2000). A remarkable new leaf type with unusual photosynthetic tissue in a Central Asiatic genus of Chenopodiaceae. Plant Biology *2*, 154-160.

Gowik, U., Burscheidt, J., Akyildiz, M., Schlue, U., Koczor, M., Streubel, M., and Westhoff, P. (2004). Cis-regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C_4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. Plant Cell *16*, 1077-1090.

Grasser, K. D., Grimm, R., and Ritt, C. (1996). Maize chromosomal HMGc. Two closely related structure-specific DNA-binding proteins specify a second type of plant high mobility group box protein. Journal of Biological Chemistry *271*, 32900-32906.

Hall, L. N., Rossini, L., Cribb, L., and Langdale, J. A. (1998). GOLDEN2: A novel transcriptional regulator of cellular differentiation in the maize leaf. Plant Cell *10*, 925-936.

Hatch, M. D. (1999). C_4 photosynthesis: A historical overview. In C_4 Plant Biology, R. F. Sage, and R. K. Monson, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 17-46.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. Genome Research *6*, 986-994.

Ikeda, T. M., and Gray, M. W. (1999). Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. Plant Molecular Biology *40*, 567-578.

Jankovsky, J. P., Smith, L. G., and Nelson, T. (2001). Specification of bundle sheath cell fates during maize leaf development: roles of lineage and positional information evaluated through analysis of the tangled1 mutant. Development *128*, 2747-2753.

Jenkins, C. L. D., Furbank, R. T., and Hatch, M. D. (1989). Mechanism of C_4 photosynthesis: a model describing the inorganic carbon pool in bundle sheath cells. Plant Physiology *91*, 1372-1381.

Jenkins, M. T. (1927). A second gene producing golden plant color in maize. American Naturalist *60*, 484-488.

Kahlau, S. (2004) C_3- und C_4-Photosynthese in Mais (*Zea mays*): Isolierung und Charakterisierung differentiell akkumulierender Transkripte, Diplomarbeit, RWTH Aachen.

Kalamajka, R., Hahnen, S., Cavalar, M., Töpsch, S., Weier, D., and Peterhänsel, C. (2003). Restriction accessibility in isolated nuclei reveals light-induced chromatin reorganization at the PEPC promoter in maize. Plant Molecular Biology *52*, 669-678.

Kanai, R., and Edwards, G. E. (1999). The biochemistry of C_4 photosynthesis. In C_4 Plant Biology, R. F. Sage, and R. K. Monson, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 49-87.

Kellogg, E. A. (1999). Phylogenetic aspects of the evolution of C_4 photosynthesis. In C_4 Plant Biology, R. F. Sage, and R. K. Monson, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 411-444.

Kestermann, M., Neukirchen, S., Kloppstech, K., and Link, G. (1998). Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*). Nucleic Acids Research *26*, 2747-2753.

Kopriva, S., Chu, C. C., and Bauwe, H. (1996). H-protein of the glycine cleavage system in Flaveria: alternative splicing of the pre-mRNA occurs exclusively in advanced C_4 species of the genus. Plant Journal *10*, 369-373.

Ku, M. S. B., Kano Murakami, Y., and Matsuoka, M. (1996). Evolution and expression of C_4 photosynthesis genes. Plant Physiology *111*, 949-957.

Ku, M. S. B., Wu, J., Dai, Z., Scott, R. A., Chu, C., and Edwards, G. E. (1991). Photosynthetic and photorepiratory characteristics of Flaveria spp. Plant Physiology *96*, 518-528.

Kubicki, A., Steinmuller, K., and Westhoff, P. (1994). Differential transcription of plastome-encoded genes in the mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C_4 plants maize and Sorghum. Plant Molecular Biology *25*, 669-679.

Lahiri, S. D., and Allison, L. A. (2000). Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize. Plant Physiology *123*, 883-894.

Lahiri, S. D., Yao, J., McCumbers, C., and Allison, L. A. (1999). Tissue-specific and light-dependent expression within a family of nuclear-encoded sigma-like factors from *Zea mays*. Molcular Cell Biology Research Communications *1*, 14-20.

Langdale, J. A., and Kidner, C. A. (1994). bundle sheath defective, a mutation that disrupts cellular differentiation in maize leaves. Development *120*, 673-681.

Langdale, J. A., Metzler, M. C., and Nelson, T. (1987). The *argentia* mutation delays normal development of photosynthetic cell types in *Zea mays*. Developmental Biology *122*, 243-255.

Langdale, J. A., and Nelson, T. (1991). Spatial regulation of photosynthetic development in C_4 plants. Trends Genet *7*, 191-196.

Langdale, J. A., Taylor, W. C., and Nelson, T. (1991). Cell-specific accumulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase is correlated with demethylation at a specific site greater than 3 Kb upstream of the gene. Molecular & General Genetics *225*, 49-55.

Langdale, J. A., Zelitch, I., Miller, E., and Nelson, T. (1988). Cell position and light influence C_4 versus C_3 patterns of photosynthetic gene expression in maize. EMBO Journal *7*, 3643-3652.

Le Grice, S. F. (2003). "In the beginning": initiation of minus strand DNA synthesis in retroviruses and LTR-containing retrotransposons. Biochemistry *42*, 14349-14355.

Leegood, R. C. (2002). C_4 photosynthesis: principles of CO_2 concentration and prospects for its introduction into C_3 plants. Journal of Experimental Botany *53*, 581-590.

Leegood, R. C., and Walker, R. P. (1999). Regulation of the C_4 pathway. In C_4 Plant Biology, R. F. Sage, and R. K. Monson, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 89-131.

Lusser, A., Kolle, D., and Loidl, P. (2001). Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. Trends in Plant Science *6*, 59-65.

Ma, L.-G., and Feng, F.-S. (1993). Phytochrome-mediated regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase synthesis in etiolated maize leaves. Photosynthetica *28*, 83-90.

Magnin, N. C., Cooley, B. A., Reiskind, J. B., and Bowes, G. (1997). Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C_4-type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. Plant Physiology *115*, 1681-1689.

Markelz, N. H., Costich, D. E., and Brutnell, T. P. (2003). Photomorphogenic responses in maize seedling development. Plant Physiology *133*, 1578-1591.

Maroco, J. P., Ku, M. S. B., and Edwards, G. E. (2000). Utilization of O_2 in the metabolic optimization of C_4 photosynthesis. Plant, Cell & Environment *23*, 115-121.

Marshall, J. S., Stubbs, J. D., Chitty, J. A., Surin, B., and Taylor, W. C. (1997). Expression of the C_4 Me1 Gene from *Flaveria bidentis* requires an interaction between 5' and 3' sequences. Plant Cell *9*, 1515-1525.

Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., and Benfey, P. N. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. Nature *413*, 307-311.

Nakazono, M., Qiu, F., Borsuk, L. A., and Schnable, P. S. (2003). Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: Identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. Plant Cell *15*, 583-596.

Nelson, T., and Dengler, N. (1997). Leaf vascular pattern formation. Plant Cell *9*, 1121-1135.

Privat, I., Hakimi, M. A., Buhot, L., Favory, J. J., and Mache-Lerbs, S. (2003). Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. Plant Molecular Biology *51*, 385-399.

Purcell, M., Mabrouk, Y. M., and Bogorad, L. (1995). Red/far-red and blue light-responsive regions of maize rbcS-m3 are active in bundle sheath and mesophyll cells, respectively. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *92*, 11504-11508.

Raeymaekers, L. (2000). Basic principles of quantitative PCR. Molecular Biotechnology *15*, 115-122.

Reiskind, J. B., Madsen, T. V., Van Ginkel, L. C., and Bowes, G. (1997). Evidence that inducible C_4-type photosynthesis is a chloroplastic CO_2-concentrating mechanism in Hydrilla, a submersed monocot. Plant, Cell & Environment *20*, 211-220.

Rosche, E., Chitty, J., Westhoff, P., and Taylor, W. C. (1998). Analysis of promoter activity for the gene encoding pyruvate orthophosphate dikinase in stably transformed C_4 flaveria species. Plant Physiology *117*, 821-829.

Rothermel, B. A., and Nelson, T. (1989). Primary structure of the maize NADP-dependent malic enzyme. Journal of Biological Chemistry *264*, 19587-19592.

Sage, R. F. (1999). Why C_4 photosynthesis. In C_4 Plant Biology, R. F. Sage, and R. K. Monson, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 3-16.

Sage, R. F., Li, M., and Monson, R. K. (1999). The taxonomic distribution of C_4 photosynthesis. In C_4 Plant Biology, R. F. Sage, and R. K. Monson, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 551-584.

Sambrook, J., and Russel, D. W. (2002). Molecular Cloning - A Laboratory Mannual, Vol 1-3, 3 edn (Cold Spring Habour, New York, Cold Spring Habour Laboratory Press).

Schaeffner, A. R., and Sheen, J. (1991). Maize *rbcS* promoter activity depends on sequence elements not found in dicot *rbcS* promoters. Plant Cell *3*, 997-1012.

Schaeffner, A. R., and Sheen, J. (1992). Maize C_4 photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase. Plant Journal *2*, 221-232.

Sheen, J. (1991). Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes. Plant Cell *3*, 225-245.

Sheen, J. (1999). C_4 gene expression. Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology *50*, 187-217.

Sheen, J., and Bogorad, L. (1986). Expression of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit gene and three small subunit genes in two cell types of maize leaves. EMBO Journal *5*, 3417-3422.

Sheen, J., and Bogorad, L. (1987). Regulation of levels of nuclear transcripts for C_4 photosynthesis in bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. Plant Molecular Biology *8*, 227-238.

Sheen, J. Y., and Bogorad, L. (1985). Differential expression of the ribulose bisphosphate carboxylase large subunit gene in bundle sheath and mesophyll cells of developing maize (*Zea mays*) leaves is influenced by light. Plant Physiology *79*, 1072-1076.

Smith, L. G., Hake, S., and Sylvester, A. W. (1996). The tangled-1 mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. Development *122*, 481-489.

Stemmer, C., Grimm, R., and Grasser, K. D. (1999). Occurrence of five different chromosomal HMG1 proteins in various maize tissues. Plant Molecular Biology *41*, 351-361.

Stockhaus, J., Poetsch, W., Steinmuller, K., and Westhoff, P. (1994). Evolution of the C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase promoter of the C_4 dicot *Flaveria trinervia*: an expression analysis in the C_3 plant tobacco. Molecular and General Genetics *245*, 286-293.

Tan, S., and Troxler, R. F. (1999). Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: photoregulation and differential expression. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *96*, 5316-5321.

Taniguchi, M., Izawa, K., Ku, M. S. B., Lin, J.-H., Saito, H., Ishida, Y., Ohta, S., Komari, T., Matsuoka, M., and Sugiyama, T. (2000). Binding of cell type-specific nuclear proteins to the 5'-flanking region of maize C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene confers its differential transcription in mesophyll cells. Plant Molecular Biology *44*, 543-557.

Taniguchi, Y., Nagasaki, J., Kawasaki, M., Miyake, H., Sugiyama, T., and Taniguchi, M. (2004). Differentiation of dicarboxylate transporters in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. Plant Cell Physiology *45*, 187-200.

Tausta, S. L., Coyle, H. M., Rothermel, B., Stiefel, V., and Nelson, T. (2002). Maize C_4 and non-C_4 NADP-dependent malic enzymes are encoded by distinct genes derived from a plastid-localized ancestor. Plant Molecular Biology *50*, 635-652.

Thomas, M., Cretin, C., Vidal, J., Keryer, E., Gadal, P., and Monsinger, E. (1990). Light-regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase messenger RNA in leaves of C_4 plants: Evidence for phytochrome control on transcription during and for rhythmicity. Plant Science *69*, 65-78.

Tsiantis, M., Schneeberger, R., Golz, J. F., Freeling, M., and Langdale, J. A. (1999). The maize rough sheath2 gene and leaf development programs in monocot and dicot plants. Science *284*, 154-156.

Ueno, O. (1998). Induction of kranz anatomy and C_4-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid. Plant Cell *10*, 571-584.

Van Den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1995). Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signalling. Nature *378*, 62-65.

van der Biezen, E. A., Juwana, H., Parker, J. E., and Jones, J. D. (2000). cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Microbe Interactions *13*, 895-898.

Voznesenskaya, E. V., Franceschi, V. R., Kiirats, O., Artyusheva, E. G., Freitag, H., and Edwards, G. E. (2002). Proof of C_4 photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). Plant Journal *31*, 649-662.

Voznesenskaya, E. V., Franceschi, V. R., Kiirats, O., Freitag, H., and Edwards, G. E. (2001). Kranz anatomy is not essential for terrestrial C_4 plant photosynthesis. Nature *414*, 543-546.

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques *22*, 130-138.

Wyrich, R., Dressen, U., Brockmann, S., Streubel, M., Chang, C., Qiang, D., Paterson, A. H., and Westhoff, P. (1998). The molecular basis of C_4 photosynthesis in Sorghum: isolation, characterization and RFLP mapping of mesophyll- and bundle-sheath-specific cDNAs obtained by differential screening. Plant Molecular Biology *37*, 319-335.

Yakir, D., Osmond, B., and Giles, L. (1991). Autotrophy in maize husk leaves: Evaluation using natural abundance of stable isotopes. Plant Physiology *97*, 1196-1198.

Yanagisawa, S. (2000). Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. Plant Journal *21*, 281-288.

Yanagisawa, S., Akiyama, A., Kisaka, H., Uchimiya, H., and Miwa, T. (2004). Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *101*, 7833-7838.

Yanagisawa, S., and Izui, K. (1993). Molecular cloning of two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif. Journal of Biological Chemistry *268*, 16028-16036.

Yanagisawa, S., and Sheen, J. (1998). Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. Plant Cell *10*, 75-89.

Danken möchte ich ...

Professor Fritz Kreuzaler für die Übernahme des Hauptreferates und die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Professor Ursula B. Priefer für die Übernahme des Korreferates.

Dr. habil. Christoph Peterhänsel für die engagierte Betreuung und die Bereitschaft, sein enormes Wissen mit mir zu teilen. Außerdem möchte ich ihm für sein offenes Ohr für jegliche Art von Problemen, die Korrektur dieser Arbeit und die witzigen, überhaupt nicht wissenschaftlichen Diskussionen danken.

Sonja für die erstklassige Unterstützung bei zahlreichen Arbeiten.

Holger Wilden für die Bereitstellung der genomischen Banken.

Thomas Lahaye und seiner Arbeitsgruppe in Halle, die mich in die Geheimnisse des cDNA-AFLP eingeweiht haben.

Bärbel Rüger und Brigitte Miedl aus Penzberg, die meine Real-Time-Analysen ermöglicht haben.

Claudia, Heike, Markus, Rainer, Ruben, Sabine, Sven, Tanja und Yvonne für ihre hilfreichen Korrekturen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

den HiWis, Praktikanten und Diplomanden, die so mutig waren, sich meiner Betreuung auszusetzten. Mit Euch zu arbeiten hat mir sehr viel Spass gemacht und Ihr wart mir eine große Hilfe!

Rainer für seine Hilfe bei vielen Gelegenheiten.

Sascha für seinen Einsatz bei der Lösung zahlreicher Computerprobleme und seine Versuche mich nach Tiefschlägen wieder zu motivieren.

Rafijul, der mir gezeigt hat, dass man auch ganz lässig durch das Leben gehen kann.

Staggy für viele erheiternde Gespräche zwischendurch.

Radin für Lady und Earl Grey.

allen Mitarbeitern des Instituts für Biologie I für die gute Atmosphäre und die nette Zeit im Labor, die mir sehr viel Freude beschert hat.

ganz besonders Markus, der ein toller Kollege war und darüber hinaus ein sehr guter Freund geworden ist. Danke für alles!!

allen Freunden, die immer für mich da waren.

Joe, für seine Gelassenheit mit meinen Tiefs nach Rückschlägen im Labor umzugehen.

meinen Eltern dafür, dass sie mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und dafür, dass sie so sind wie sie sind.

Lebenslauf des Verfassers: Silke Hahnen

geboren am 9. März 1975 in Aachen

1981-1985	Grundschule Breinig
1985-1994	Goethe-Gymnasium Stolberg Abschluß: Abitur
1994-2000	Studium der Biologie an der RWTH Aachen Hauptfach: Molekularbiologie Nebenfächer: Mikrobiologie Biotechnologie Molekulare Pathologie
1999-2000	Diplomarbeit am Institut für Biologie I der RWTH Aachen unter Anleitung von Prof. Dr. Kreuzaler: *Die epigenetische Regulation des C_4-Syndroms: Vergleichende Untersuchungen zur Chromatin-struktur gewebespezifisch aktiver Promotoren in Mais (Zea mays)*
2000-2004	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie I der RWTH Aachen unter Anleitung von Prof. Dr. Kreuzaler